دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات
سال چهارم/ شماره سوم/ ۱۳۹۳ (۱۹۷-۱۸۵)

# تجزیه الکتروفورزی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش خشکی در ژنوتیپ‌های گندم پاییزه در مرحله پنجه‌زنی

**رعنا نادری زرنقی[۱*]، مصطفی ولیزاده[۲] و رضا فتوت[۳]**

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، ۳- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۲- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۲۸)

**چکیده**

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌هایی است که از رشد گیاهان جلوگیری می‌کند. در این پژوهش، اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POX) در سه گروه از گندم‌های پاییزه حساس، بینابین و متحمل به خشکی در مرحله پنجه‌زنی تحت سه شرایط آبی عادی (۹۰٪FC)، تنش متوسط (۶۰٪FC) و تنش شدید (۳۰٪FC) مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد و سه آنزیم مورد نظر در مرحله پنجه‌زنی مورد ارزیابی قرار گرفتند. فعالیت آنزیم‌ها در بافت‌های برگی با الکتروفورز در ژل‌های آکریلامید افقی ۷/۵٪ بررسی شد. در این مطالعه چهار آیزوازیم برای POX، یک آیزوازیم برای CAT و دو آیزوازیم برای SOD شناسایی شد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنش خشکی اثر معنی‌داری بر فعالیت کلیه آنزیم‌ها داشت. میزان فعالیت آنزیمی در تنش شدید خشکی نسبت به حالت عادی در اکثر آنزیم‌ها افزایش یافت، به طوری‌که درصد افزایش فعالیت آنزیم‌های $POX_1$، $POX_2$، $POX_3$ و $POX_4$ نسبت به شرایط آبیاری عادی ترتیب ۳۹، ۸۶، ۷۵ و ۲۰ درصد و آنزیم‌های CAT، $SOD_1$ و $SOD_2$ به‌ترتیب ۳۱، ۱۰و ۱۵ درصد بود. نتایج حاصل نشان داد که از بین آنزیم‌های مورد مطالعه، آیزوازیم‌های SOD تغییر فعالیت کمی داشتند و از این‌رو در مرحله پنجه‌زنی نقش کمرنگی در محافظت گیاه از تنش خشکی ایفا می‌کنند، در حالی‌که آنزیم پراکسیداز افزایش فعالیت بیشتری در شرایط تنش خشکی از خود نشان داد و به نظر می‌رسد آنزیم پراکسیداز به عنوان یکی از آنزیم‌های مهم، نقش مؤثری جهت افزایش مقاومت گندم در مقابل تنش ناشی از خشکی بر عهده دارد.

**واژه‌های کلیدی**: الکتروفورز افقی، فعالیت آیزوزایمی، تنش اکسیداتیو، گندم

* نویسنده مسئول: naderi.rana@gmail.com

**مقدمه**

گندم مهمترین محصول کشاورزی جهان به شمار می‌رود و در بسیاری ازکشورهای دنیا (به عنوان غذای اصلی مردم) اکثراً بیشتر مناطق خشک و نیمه‌خشک کشت می‌شود (Loggini *et al*., 1999). در حال حاضر، سطح زیر کشت گندم در دنیا بیش از ۲۲۰ میلیون هکتار و تولید کل آن در جهان بیش از ۷۰۰ میلیون تن می‌باشد. سطح زیر کشت این گیاه در ایران ۶/۵ میلیون هکتار بوده که ۴/۲ میلیون هکتار آن به کشت دیم و ۲/۳ میلیون هکتار آن به کشت آبی اختصاص دارد و تولید آن در ایران ۱۴ میلیون تن گزارش شده است (FAO, 2013). آمارهای موجود نشان می‌دهند که جمعیت جهان تا سال ۲۰۲۵ میلادی به ۷/۹ میلیارد نفر خواهد رسید و در این شرایط، سالانه ۸۰۰ میلیون تن گندم برای تأمین غذای جمعیت جهان، نیاز خواهد بود. تأمین این مقدار، اهمیت رشد سریع و مداوم در تولید گندم را آشکار می‌سازد. 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 حائز اهمیت می‌باشد. جهت تحقق این امر، آگاهی از وضعیت دفاعی گیاه در مقابله با تنش خشکی ضروری است تا بتوان از آن‌ها در برنامه‌های اصلاح گندم استفاده کرد.

تنش‌های محیطی باعث بروز دامنه وسیعی از واکنش‌ها درگیاهان، از تغییر بیان ژن و متابولیسم سلول تا تغییر در سرعت رشد و عملکرد محصولات می‌شوند (Polle, 1997). تنش خشکی بیشتر از هر عامل محیطی دیگری رشد گیاهان را محدود می‌کند و وقتی حادث می‌شود که خروج آب از گیاه به واسطه فرآیند تعرق بیشتر از جذب آن از طریق ریشه باشد (Salin, 1991). در شرایط خشکی، در همان زمان که حداکثر تشعشع وجود دارد، بسته شدن روزنه‌ها در واکنش به تنش کمبود آب یا دما منجر به کاهش تثبیت دی اکسیدکربن خواهد شد، در حالی‌که واکنش نوری و انتقال الکترون در مقادیر طبیعی صورت می‌گیرد. تحت چنین شرایطی انرژی نورانی جذب شده توسط برگ نمی‌تواند به‌طور کارآمدی برای فتوسنتز مورد استفاده قرار گیرد و به‌طور بالقوه دستگاه فتوسنتزی آسیب می‌بیند، زیرا در چنین شرایطی به دلیل عدم اکسیده شدن مولکول NADPH، مصرف $NADP^+$ جهت دریافت الکترون کاهش می‌یابد و بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به عنوان گیرنده ثانوی الکترون عمل کرده و در نتیجه انواع مختلفی از اکسیژن فعال در سلول تولید می‌شود که گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) نامیده می‌شوند (Egneus *et al*., 1975). سوپراکسید ($O^{2-}$)، پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) و بنیان‌های هیدروکسیل ($OH^-$) که از گروه مولکول‌های اکسیژن فعال هستند و موجب پراکسیداسیون چربی‌های غشا، تخریب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شده و در نتیجهٔ پراکسیداسیون چربی‌ها، غشاهای سلولی آسیب می‌بینند (Del Rio *et* al., 1991).

گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که این سیستم‌ها باعث غیرفعال شدن گونه‌های فعال اکسیژن شده و خسارت‌های اکسیداتیو ناشی از فعایت گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش می‌دهند. سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) هستند که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کلیدی در مبارزه علیه بنیان‌های آزاد اکسیژن به‌شمار می‌روند. مهم‌ترین ترکیبات غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدانی نیز شامل گلوتاتیون، اسید آسکوربیک، آلفاتوکوفورل، زازانتین و آنترازانتین هستند (Salin, 1991).

از آنجایی‌که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش خشکی در مرحله پنجه‌زنی کمتر مورد توجه قرار گرفته و بیشتر تحقیقات در مرحله گیاهچه‌ای و بیشتر در شرایط کنترل‌شده انجام شده است، از این‌رو پژوهش حاضر اجرا شد که هدف از آن، بررسی تأثیر تنش خشکی بر میزان فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مطالعه نقش این آنزیم‌ها در تعیین چگونگی مقاومت یا حساسیت به خشکی ارقام مختلف گندم در مرحله پنجه‌زنی بود.

**مواد و روش‌ها**

این تحقیق در پاییز سال ۱۳۹۱ در ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در اراضی کرکج در ۱۲ کیلومتری شرق تبریز با ارتفاع ۱۳۶۱ متر از سطح دریا به اجرا درآمد. در این بررسی بذر ژنوتیپ‌های پاییزه (متحمل، بینابین و حساس) گندم (Mohammadi *et al*., 2010) از موسسه دیم مراغه، مرکز تحقیقات کشاورزی استان اردبیل و گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه تبریز تهیه گردید (جدول ۱). اعمال تنش به صورت وزنی بوده و به منظور تعیین ظرفیت زراعی خاک، از مخلوط خاک تهیه شده سه نمونه برداشت و بعد از خشک کردن آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۲۰

درجه سلسیوس توزین و با اضافه کردن آب به حالت اشباع درآمده و بعد از ۴۸ ساعت، با توجه به خروج آب اضافی در هر نمونه، میزان FC محاسبه گردید. سطوح تنش به صورت ۹۰٪ (نرمال)، ۶۰٪ (تنش متوسط) و ۳۰٪ (تنش شدید) ظرفیت زراعی در نظر گرفته شد. خاک مورد استفاده در گلدان‌ها یکسان و ترکیب آن به صورت خاک زراعی، ماسه و کودحیوانی به نسبت ۶ :۳ :۱ بود و هیچ کود شیمیایی به گلدان‌ها اضافه نشد. کاشت بذر در گلدان‌هایی به ابعاد ۲۵ × ۲۰ × ۱۵ سانتی‌متر (در مجموع ۱۷۱ گلدان) و گلدان‌ها در گلخانه پلاستیکی مستقر در مزرعه مورد مراقبت و آبیاری قرار گرفتند، بدین ترتیب که ابتدا در هر گلدان ده عدد بذر کشت شد و سپس در مرحله دو برگی بوته‌ها تنک شدند تا در نهایت در هر گلدان پنج بوته باقی ماند. آبیاری تمام گلدان‌ها تا شروع پنجه‌زنی به‌طور کامل انجام گرفت و پس از پنجه‌زنی جهت جلوگیری از بارش باران از پوشش پلاستیکی استفاده و سه نوع شرایط رطوبتی به مدت حدود دو هفته در گلدان‌های مورد نظر اعمال گردید (شکل ۱). آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی شامل ژنوتیپ‌ها (۱۹ ژنوتیپ) و سطوح آبیاری (سه سطح) با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. برای تجزیه‌های آنزیمی، سه یا چهار بوته از هر واحد آزمایش (گلدان) ۱۵ روز پس از اعمال تنش به صورت دسته جمعی برای کلیه ژنوتیپ‌های گندم انتخاب و پس از نمونه‌برداری، نمونه‌ها به منظور استخراج آنزیم‌ها از مزرعه به آزمایشگاه منتقل و ارزیابی شدند.

**استخراج آنزیمی و الکتروفورز افقی**

فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و POX در ژل‌های پلی‌اکریلامید افقی اندازه‌گیری شد. برای استخراج آنزیم‌ها از محلول زیر که ترکیبی از محلول‌های استخراج موجود در منابع است و در آزمایشگاه سیتوژنتیک دانشگاه تبریز مناسب تشخیص داده شده است، استفاده گردید (Valizadeh *et al*., 2011). ۰/۱ گرم از نمونه‌های برگی توزین و در هاون چینی با ازت مایع خرد گردید و به نسبت وزنی ۱:۱ با بافر استخراج مخلوط و سپس محلول

جدول ۱- مشخصات ارقام گندم پاییزه مورد مطالعه

Table 1. Characteristics of studied wheat varieties

| شماره No. | رقم Variety | شجره Families | واکنش به خشکی Response to drought |
|---|---|---|---|
| 1 | Unknown | Unknown | متحمل Tolerant |
| 2 | Sabalan | 1-27-6149/Sabalan// 84.40023 | متحمل Tolerant |
| 3 | Ghafghaz | Ghafghaz//F9.10/Maya"s" IRW92-1-D-474-OMA-OMA-OMA-OMA- IMA-OMA | متحمل Tolerant |
| 4 | DARIC | DARIC95-010-OMA-OMA-OMA-OMA-6MA-OMA | متحمل Tolerant |
| 5 | Gobostan | Azarbaijan/Gobostan | متحمل Tolerant |
| 6 | Roozi-84 | Azarbaijan/Roozi-84 | متحمل Tolerant |
| 7 | Tous | Tous | متحمل Tolerant |
| 8 | Azar-2 | check /Azar-2 | متحمل Tolerant |
| 9 | Sardari | check /Sardari | متحمل Tolerant |
| 10 | DARIC | DARIC95-010-OMA-OMA-OMA-OMA-8MA-OMA | بینابین Intermediate |
| 11 | Dogu88 | Manning/Sdv1//Dogu88 | بینابین Intermediate |
| 12 | TRK13 | RECITL/TIA.2//TRK13 | بینابین Intermediate |
| 13 | Sabalan | Vrz/3/Orf1.148/Td1/Blo/4/Sabalan | بینابین Intermediate |
| 14 | HK16 | HK16/7/KVZ/T171/3/MAYA//BB/INIA/4/KAR/JCWH99034-OAP-OAP-OAp-OMAR-6MAR | حساس Sensitive |
| 15 | FKG13 | FKG13/4/NWT/3/TAST/SPRW// TCI98-0139-OAP-OAP-OMAR-5MAR | حساس Sensitive |
| 16 | JANZ | JANZ QT3685-OAUS | حساس Sensitive |
| 17 | RINA-11 | RINA-11 | حساس Sensitive |
| 18 | Saratoveskaya-29 | Azarbaijan/Saratoveskaya-29 | حساس Sensitive |
| 19 | Saysonz | Cimmyt/Saysonz | حساس Sensitive |

حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه سلسیوس با سانتریفوژ (مدل EBA 12R) سانتریفوژ شد. بلافاصله عصاره‌ها به کمک قطعات کاغذ واتمن (۵ mm × ۳) در ژل ۷/۵٪ آکریلامید افقی (۰/۵ cm × ۱۵ × ۱۲) و بافر مخزن (Tris-Borate-EDTA) TBE، بارگذاری و به مدت سه ساعت مورد الکتروفورز قرار گرفت.

## رنگ‌آمیزی آنزیم‌ها

بعد از انجام الکتروفورز، رنگ‌آمیزی آنزیم‌های CAT و SOD مطابق روش سولتیس و سولتیس (Soltis and Soltis, 1990) و آنزیم POX به روش السون و وارنر (Olson and Varner, 1993) انجام شده و به منظور کمی‌سازی فعالیت آنزیم‌ها، پس از عکس‌برداری از ژل‌ها در هنگام تثبیت باندها از نرم‌افزار MCID Analysis 0.7 Evaluation (www.mcid.co.uk) استفاده گردید. بدین منظور مساحت (Area) و تراکم (Density) هر نوار آیزوزایمی توسط نرم‌افزار اندازه‌گیری و سپس D × A به عنوان فعالیت دنسیتومتریک آیزوزایم مربوطه محاسبه شد.

## تجزیه آماری داده‌های آنزیمی

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد مطالعه ابتدا تحت آزمون نرمال بودن داده‌ها با روش کولموگروف–اسمیرنوف و یکنواختی واریانس‌ها از طریق آزمون لون قرار گرفت. داده‌های حاصل از کمی‌کردن میزان بیان آنزیم‌ها با نرم‌افزارهای آماری از جمله SPSS و SAS بر اساس آزمایش فاکتوریل تجزیه و تحلیل گردید. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون‌های LSD و توکی استفاده شد.

## نتایج و بحث

در این پژوهش برای CAT تنها یک آیزوزایم (شکل ۲- الف)، برای SOD دو آیزوزایم (شکل ۲- ب) و برای POX شش آیزوزایم (شکل ۲- ج) شناسایی و نامگذاری گردید (از تجزیه داده‌های مربوط به $POX_5$ و $POX_6$ به دلیل عدم پایداری و ثبات لازم در ژل‌های مختلف صرف‌نظر شد). تعداد آیزوزایم‌های مشاهده شده در پژوهش‌های دیگر با یافته‌های حاضر نسبتاً همخوانی داشت، به طوری که تعداد آیزوزایم در برگ گندم تحت تنش خشکی دو ایزوفرم SOD و سه ایزوفرم CAT (Zhang *et al*., 2004)، در ریشه گندم تحت تنش خشکی برای SOD، CAT و POX به‌ترتیب دو، دو و پنج آیزوزایم (Selote & Khanna-Chopra, 2010) و در یونجه تحت تنش شوری برای SOD و POX به ترتیب سه و پنج آیزوزایم گزارش شده است (Valizadeh *et al*., 2013).

نتایج تجزیه واریانس برای فعالیت هفت آیزوزایم مطالعه شده در بالا نشان داد که تنش خشکی اثر معنی‌داری بر فعالیت کلیه آنزیم‌ها داشت (جدول ۲). بر اساس جدول ۲ اختلاف بین گروه‌های متحمل، بینابین و حساس گندم برای تمام آنزیم‌ها به جز $SOD_1$ و $POX_4$ معنی‌دار بود و این بیشتر ناشی از اختلاف گروه متحمل در برابر گروه حساس بود. اختلاف بین ژنوتیپ‌های درون گروه‌ها نیز فقط برای $SOD_1$ و $POX_3$ معنی‌دار به دست آمد. اثر متقابل تنش × گروه برای آنزیم‌های $POX_2$ و $POX_3$ معنی‌دار بود که نشان دهنده پاسخ متفاوت گروه‌های گندم در برابر تنش بود. اثر متقابل تنش× ژنوتیپ‌های درون گروه برای آنزیم‌های CAT، $POX_2$ و $POX_3$ نتایج اثر متقابل تنش× گروه را در مورد ژنوتیپ‌ها تأیید کرد. ضریب تغییرات برای فعالیت آنزیم‌ها بین ۱۶/۱۱ و ۲۷/۳۱ نوسان داشت. این مقادیر می‌توانند بیانگر دقت کافی در اندازه‌گیری‌ها باشد. مقایسه میانگین سه سطح تنش خشکی و سه گروه گندم برای آیزوزایم‌های با فعالیت معنی‌دار به ترتیب در جدول‌های ۳ و ۴ آمده است.

## کاتالاز (CAT)

بیشترین فعالیت کاتالاز در شرایط تنش شدید با ۳۱٪ افزایش فعالیت نسبت به شرایط عادی به‌دست آمد (جدول ۳). میانگین ژنوتیپ‌های درون گروه‌ها برای CAT نشان داد که بیشترین فعالیت دنسیتومتریک به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های متحمل ۱۸، ۱۹ و ۷ و کمترین میزان فعالیت در ژنوتیپ حساس۱۶ مشاهده شد. بولر و همکاران (Bowler et al., 1992) عنوان کردند که در شرایط تنش کم آبی، افزایش غلظت پراکسیدهیدروژن توسط فعالیت آنزیم SOD سبب افزایش فعالیت آنزیم CAT برای تجزیهٔ آن می‌گردد، اما در شرایط بدون تنش به دلیل عدم تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد اکسیژن، تولید پراکسید هیدروژن ناشی از یون سوپراکسید کاهش یافته و در نتیجه فعالیت آنزیم CAT کاهش می‌یابد. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام متحمل در واکنش به تنش خشکی توسط محققان دیگر در گندم (Khanna-Chopra and Selote, 2007؛ Mohanty, 2003) و برنج (Srivalli *et al*., 2003) نیز گزارش شده است و نتایج حاصل از مطالعه حاضر در

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در مرحله پنجه زنی

Table 2. Analysis of variance for antioxidant enzymes activity under drought stress condition in tillering stage

| منابع تغییرات<br>Source of Variation | درجه آزادی<br>df | میانگین مربعات (Mean square) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CAT | $SOD_1$ | $SOD_2$ | $POX_1$ | $POX_2$ | $POX_3$ | $POX_4$ |
| گروه<br>Group | 2 | 0.00122** | 0.00030 | 0.00118** | 0.00301** | 0.00705** | 0.01002** | 0.00174 |
| گروه/ژنوتیپ<br>Genotypes/Group | 16 | 0.00013 | 0.00043** | 0.00011 | 0.00074 | 0.00057 | 0.00459** | 0.00113 |
| تنش خشکی<br>Drought stress | 2 | 0.00615** | 0.00071** | 0.00117** | 0.00752** | 0.05724** | 0.03341** | 0.00316* |
| تنش × گروه<br>Stress × Genotypes | 4 | 0.00015 | 0.00011 | 0.00008 | 0.00059 | 0.00844** | 0.00345* | 0.00090 |
| تنش × گروه/ژنوتیپ<br>Stress × Genotypes/Group | 32 | 0.00022* | 0.00012 | 0.00010 | 0.00021 | 0.00251* | 0.00181* | 0.00078 |
| خطای آزمایشی<br>Experiment error | 114 | 0.00014 | 0.00014 | 0.00012 | 0.00043 | 0.00156 | 0.00116 | 0.00078 |
| درصد ضریب تغییرات (CV%) | - | 16.11 | 18.5 | 17.18 | 21.32 | 26.10 | 25.54 | 27.31 |

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱.

جدول ۳- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گندم در سه شرایط آبی متفاوت در مرحله پنجه‌زنی

Table 3. Mean comparisons of antioxidant enzymes activity under drought stress condition in tillering stage

| تنش خشکی (Drought stress) | CAT | $SOD_1$ | $SOD_2$ | $POX_1$ | $POX_2$ | $POX_3$ | $POX_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| شرایط عادی (Normal condition) | 0.0646 | 0.0579 | 0.0575 | 0.0646 | 0.0772 | 0.0689 | 0.0798 |
| تنش متوسط (Mild stress) | 0.0711 | 0.0591 | 0.0633 | 0.0739 | 0.1104 | 0.0984 | 0.0907 |
| تنش شدید (Severe stress) | 0.0849 | 0.0642 | 0.0665 | 0.0898 | 0.1425 | 0.1207 | 0.0956 |
| LSD% | 0.0024 | 0.0024 | 0.0021 | 0.004 | 0.0081 | 0.0078 | 0.0054 |
| درصد افزایش فعالیت آنزیم در تنش متوسط نسبت به شرایط عادی<br>Percentage of activity increment at mild stress vs control | 10 | 2 | 10 | 14 | 43 | 42 | 14 |
| درصد افزایش فعالیت آنزیم در تنش شدید نسبت به شرایط عادی<br>Percentage of activity increment at severe stress vs control | 31 | 10 | 15 | 39 | 86 | 75 | 20 |

جدول ۴- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گروه‌های گندم در مرحله پنجه‌زنی

Table 4. Mean comparisons of antioxidant enzymes activity for wheat groups in tillering stage

| گروه (Group) | CAT | $SOD_2$ | $POX_1$ | $POX_2$ | $POX_3$ |
|---|---|---|---|---|---|
| متحمل (Tolerant) | 0.0774 | 0.0663 | 0.0816 | 0.1167 | 0.1073 |
| بینابین (Intermediate) | 0.0714 | 0.0603 | 0.0758 | 0.1151 | 0.0889 |
| حساس (Sensitive) | 0.0691 | 0.0581 | 0.068 | 0.0967 | 0.0839 |
| LSD% | 0.0030 | 0.0022 | 0.0046 | 0.0105 | 0.0092 |
| درصد افزایش فعالیت آنزیم در گروه متحمل نسبت به بینابین<br>Percentage of activity increment at tolerant group vs intermediate | 3 | 3 | 11 | 19 | 5 |
| درصد افزایش فعالیت آنزیم در گروه متحمل نسبت به حساس<br>Percentage of activity increment at tolerant group vs sensitive | 12 | 14 | 19 | 20 | 27 |

(c) (b) (a)

شکل ۱- نمونه‌ای از بوته‌های گندم ۱۵ روز بعد از اعمال تنش خشکی: a) آبیاری عادی (۹۰٪FC)، b) تنش متوسط (۶۰٪FC) و c) تنش شدید (۳۰٪FC)

Figure 1. Samples of wheat plants 15 days after drought stress application: a) Normal (90% FC), b) mild drought stress (60%FC) and c) Severe drought stress (30% FC).

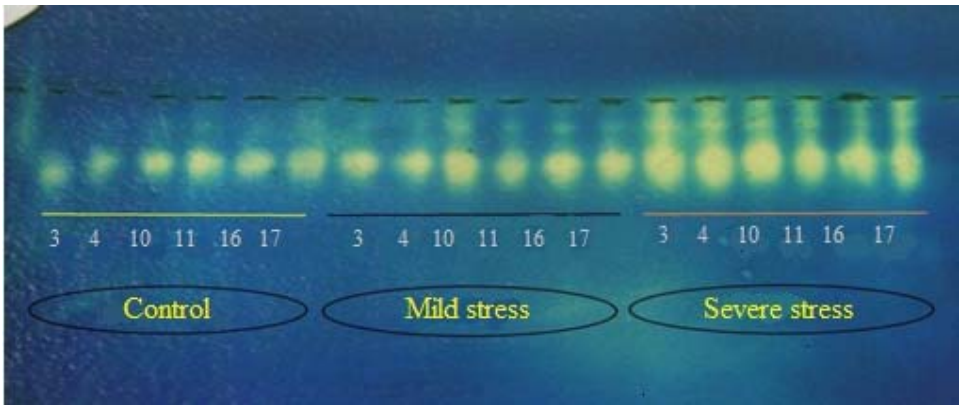
سه گروه گندم که هر کدام واجد چندین ژنوتیپ بوده‌اند، با نتایج این محققین مطابقت داشت. آنزیم کاتالاز یک آنزیم مهم برای مقابله با پراکسیدهیدروژن تولید شده در شرایط تنش می‌باشد، به طوری که در شرایط تنش ایزوفرم‌های جدیدی از آن تولید شده و مقدار ایزوفرم‌های قبلی نیز افزایش می‌یابد (Srivalli *et al.*, 2003). میانگین داده‌های کمی شده آنزیم کاتالاز نشان داد که گروه متحمل بیشترین میزان فعالیت را به خود اختصاص داده است (جدول ۴) و از این نظر با ژنوتیپ‌های حساس و بینابین اختلاف معنی‌داری دارد، به‌طوری‌که افزایش میزان فعالیت آنزیمی در گروه متحمل نسبت به گروه حساس ۱۲٪ به دست آمد. اثر متقابل تنش× گروه در آنزیم کاتالاز معنی‌دار نشد، به عبارت دیگر پاسخ گروه‌ها به تنش در شرایط آزمایشی حاضر مشابه بوده است. بررسی اثر متقابل تنش× ژنوتیپ‌های درون‌گروه برای CAT نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل، بینابین و حساس در سه شرایط آبی رفتار متفاوتی از خود نشان داده‌اند.

**سوپراکسید دیسموتاز** (SOD)

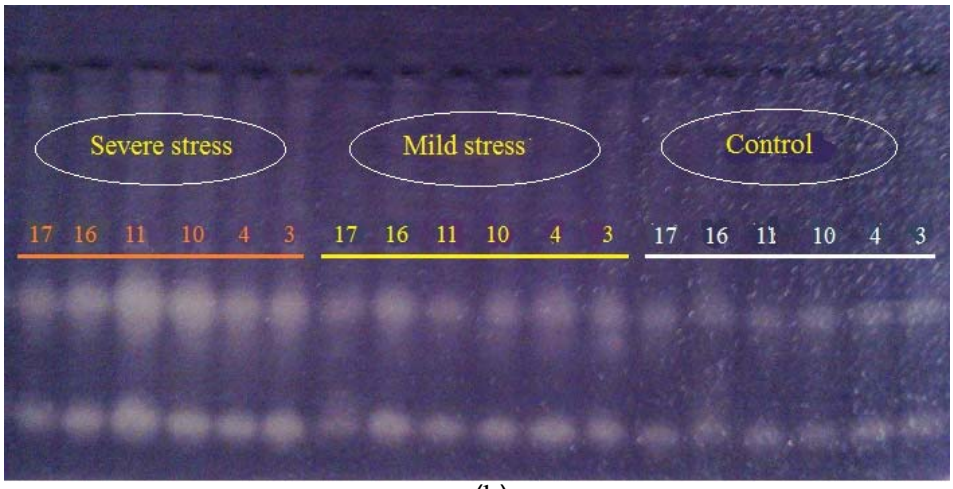
بررسی میانگین فعالیت آیزوزایم‌های SOD در سطوح تنش خشکی نشان‌داد که آیزوزایم $SOD_1$ در تنش شدید با ۱۰٪ افزایش فعالیت نسبت به شرایط عادی، بیشترین فعالیت آنزیمی را به خود اختصاص داده است. میانگین فعالیت این آیزوزایم در تنش متوسط و عادی اختلاف معنی‌دار نداشتند. همانند آیزوزایم $SOD_1$، درمورد آیزوزایم $SOD_2$ نیز بیشترین میانگین فعالیت مربوط به سطوح تنش شدید بود که ۱۵٪ افزایش فعالیت را نسبت به شرایط عادی نشان داد (جدول ۳).

میانگین ژنوتیپ‌های درون گروه‌ها نشان داد که آیزوزایم $SOD_1$ پاسخ متفاوتی در ژنوتیپ‌های درون گروه‌ها نشان داده است، به‌طوری‌که بیشترین فعالیت آیزوزایم $SOD_1$ در ژنوتیپ‌های درون دو گروه متحمل (ژنوتیپ‌های ۴، ۱۸ و ۱۹) و بینابین (ژنوتیپ‌های ۱۰ و ۱۱) مشاهده شد (شکل ۳). میانگین داده‌های کمی شده آیزوزایم $SOD_2$ نشان داد که گروه متحمل نسبت به گروه حساس ۱۴٪ فعالیت آنزیمی بیشتری داشته است (جدول۴). گنگ و همکاران (Gong et al., 2008) نیز دریافتند که در ارقام مختلف گندم تحت شرایط تنش خشکی فعالیت آنزیم SODافزایش می‌یابد، که با نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر همخوانی دارد. عدم وجود آثار متقابل می‌تواند حاکی از پاسخ مشابه گروه‌های حساس، بینابین و متحمل آنزیم SOD در شرایط محیطی مختلف و پاسخ یکنواخت ارقام داخل گروه‌ها باشد.

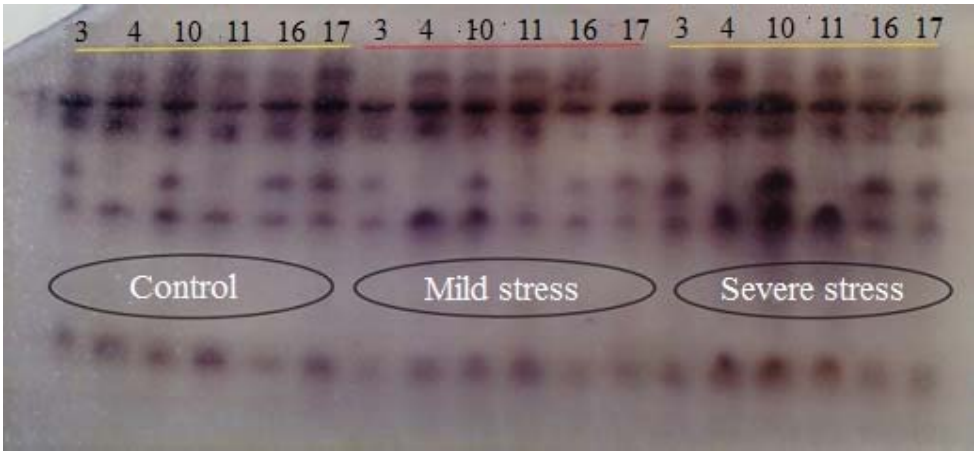
تحقیقات صورت گرفته توسط هونگ بو و همکاران (Hong Bo *et al.*, 2003) روی گیاهچه‌های گندم و مانیوانان و همکاران (Manivannan *et al.*, 2008) روی گیاهچه‌های آفتابگردان نشان داد که فعالیت این آنزیم در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال بیشتر می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در




(a)



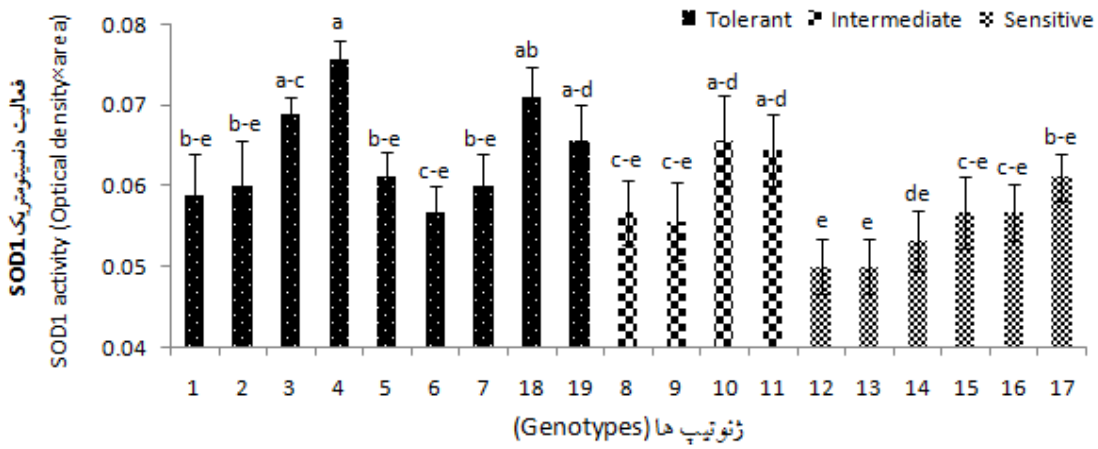

(b)




(c)

شکل ۲- نمونه‌هایی از الگوی نواربندی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برخی ژنوتیپ‌های گندم در شرایط خشکی در مرحله پنجه‌زنی. ۳و۴: ژنوتیپ‌های متحمل، ۱۰و۱۱: ژنوتیپ‌های بینابین و ۱۶و۱۷: ژنوتیپ‌های حساس هستند. (a) کاتالاز، (b) سوپراکسید دیسموتاز و (c) پراکسیداز.

Figure 2. Isozyme pattern of antioxidant enzymes in winter wheat genotypes under drought conditions in tillering stage (No.3,4: tolerant- 10, 11: intermediate and 16,17: Sensitive genotypes). a) CAT, b) SOD and c) POX.




شکل ۳- میانگین فعالیت آیزوزایم $SOD_1$ در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه در مرحله پنجه‌زنی.
Figure 3. Average $SOD_1$ isozyme activity in wheat genotypes in tillering stage.

شرایط تنش خشکی به علت افزایش تولید رادیکال سوپراکسید در این شرایط است که باعث فعال شدن مسیرهای انتقال پیام در سلول می‌شود و در نهایت بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهد (Mittler *et al.*, 2004). بنابراین افزایش فعالیت آنزیم SOD در شرایط تنش منجر به تعدیل قابل توجه رادیکال سوپراکسید می‌شود تا خسارت‌های ناشی از آن نیز کمتر شود.

**پراکسیداز (POX)**

با افزایش میزان تنش، افزایش معنی‌داری در فعالیت آیزوزایم‌های POX مشاهده شد، به‌طوری‌که بیشترین افزایش با مقادیر ۸۶٪ و ۷۵٪ به‌ترتیب در تنش شدید نسبت به شرایط عادی در $POX_2$ و $POX_3$ به‌دست آمد (جدول ۳). اختلاف بین گروه‌های متحمل، بینابین و حساس از تفاوت بین گروه متحمل و حساس گندم برای آیزوزایم‌های $POX_1$، $POX_2$ و $POX_3$ ناشی شد. میانگین فعالیت آیزوزایم‌ها نشان داد که بین گروه ژنوتیپ‌های متحمل و ژنوتیپ‌های بینابین در $POX_1$ و $POX_2$ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما بین ژنوتیپ‌های حساس و ژنوتیپ‌های متحمل از نظر فعالیت آنزیمی هر سه آیزوزایم مذکور اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۴).

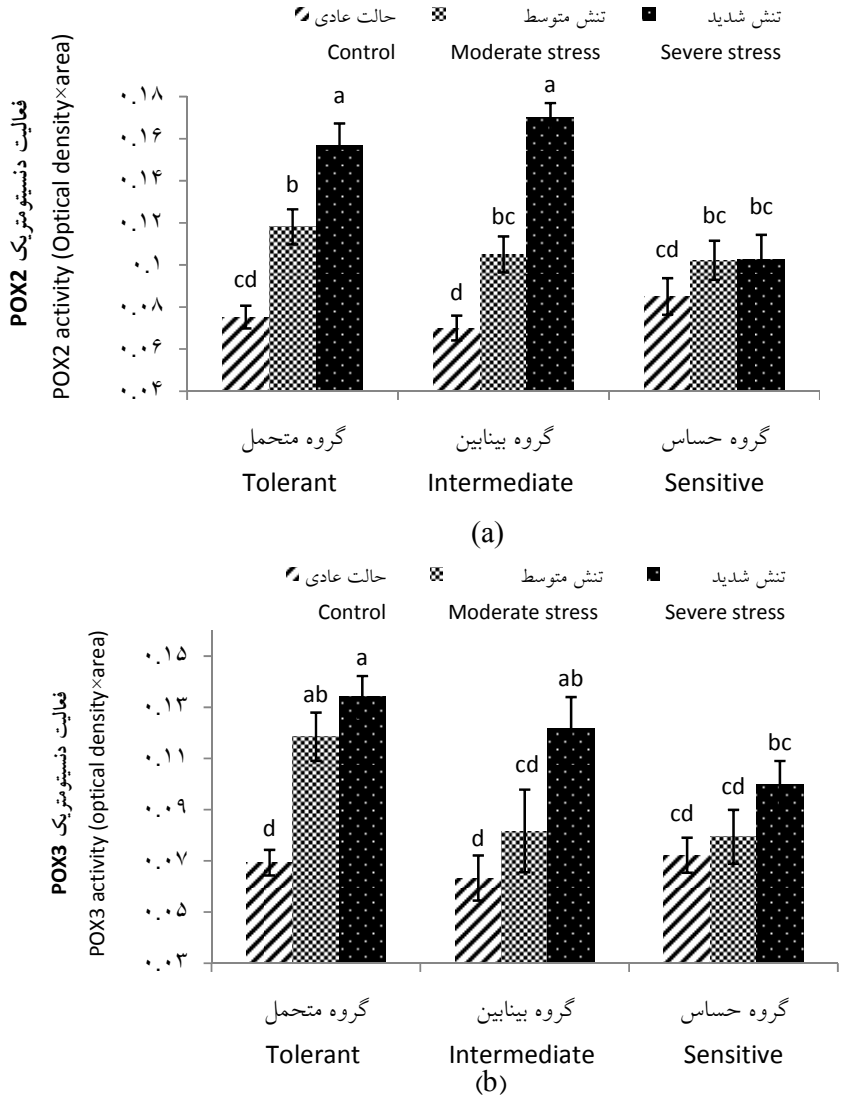
آنزیم پراکسیداز که هم در سایتوسول و هم در کلروپلاست وجود دارد، می‌تواند به گونه مؤثری $H_2O_2$ را حذف نماید. بنابراین در صورت افزایش $H_2O_2$ در شرایط خشکی، فعالیت این آنزیم نیز افزایش خواهد یافت (Jiang and Huang, 2001). تحقیقات نشان داده است که در شرایط تنش خشکی ارقام مقاوم به خشکی گندم نسبت به ارقام حساس، دارای فعالیت بالاتر آنزیم پراکسیداز هستند که باعث تجزیه بیشتر $H_2O_2$ و کاهش خسارت‌های ناشی از آن می‌شود (Kraus *et al.*, 1995).

کیفیت اثر متقابل تنش × گروه برای آیزوزایم‌های $POX_2$ و $POX_3$ در شکل ۴ آمده است. گروه ژنوتیپ‌های حساس گندم در برابر شرایط آبی پاسخ مشابه و غیر معنی‌داری از خود نشان دادند، در حالی‌که گروه ژنوتیپ‌های متحمل و بینابین فعالیت متفاوتی در سه شرایط محیطی داشته‌اند، به طوری که بیشترین فعالیت آنزیمی برای هر دو گروه در تنش شدید به‌دست آمد (شکل ۴-الف). همانند فعالیت آنزیم $POX_2$، ژنوتیپ‌های حساس گندم در سه شرایط آبی اختلاف معنی‌داری با هم ندارند، به عبارت دیگر پاسخ متفاوتی در برابر شرایط محیطی نداشته‌اند، در حالی‌که ژنوتیپ‌های گندم متحمل و بینابین در برابر شرایط آبی پاسخ‌های معنی‌دار و متفاوتی داشتند، به طوری که فعالیت آنزیم در گندم‌های متحمل هم در تنش متوسط و هم در تنش شدید نسبت به شرایط عادی افزایش یافت، ولی گندم‌های بینابین تنها در تنش شدید افزایش فعالیت معنی‌داری داشتند (شکل ۴-ب). افزایش فعالیت POX در تنش خشکی در برنج (Srivalli *et al.*, 2003) و گیاهچه‌های گندم (Hong Bo *et al.*, 2003) نیز گزارش شده است که با نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر در سه گروه گندم که هر کدام واجد چندین ژنوتیپ بودند، مطابقت داشت. جی و همکاران (Ge *et al.*, 2006)

دریافتند که در گیاه جو تحت تنش آبی، فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و POX در برگ و ریشه در مراحل رشد مرحله اولیه تقسیم سلولی و متافاز به شدت افزایش و پس از آن در آنافاز۲ کاهش می‌یابد. آن‌ها اظهار داشتند که گیاهان به سرعت در حال سم‌زدایی و ترمیم DNAهای آسیب‌دیده در مرحله آنافاز، می‌باشند و احتمالاً این افزایش فعالیت، یکی از مکانیسم های کاهش آسیب‌ها و افزایش مقاومت به تنش خشکی می‌باشد.

بدین‌ترتیب در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که آیزوزایم‌های پراکسیداز بیشترین تغییر فعالیت را نسبت به بقیه آیزوزایم‌ها تحت تنش خشکی از خود بروز دادند.

تغییراتی که در نحوه بیان و فعالیت آیزوزایم‌های پراکسیداز تحت تنش کمبود آب مشاهده شد، پیشنهاد می‌کند که آیزوزایم‌های مختلفی در تنظیم میزان اشکال مختلف اکسیژن فعال سلول‌های گیاه گندم، بسته به سطوح مختلف خشکی دخالت کرده و فعالیت می‌کنند (Feibo *et al.*, 2003). در بین آنزیم‌های مورد مطالعه، آنزیم پراکسیداز درصد افزایش فعالیت بیشتری در شرایط تنش ناشی از خود نشان داد (جدول ۳) از این رو، به نظر می‌رسد این آنزیم نقش ویژه‌ای در القا مقاومت به گیاه گندم در شرایط تنش بر عهده داشته باشد.




شکل ۴- میانگین فعالیت آیزوزایم‌های POX در مرحله پنجه‌زنی در گروه‌های گندم تحت تنش‌های مختلف: (a) $POX_2$ ، (b) $POX_3$.

Figure 4. Mean activity of POX isozymes in tillering stage in wheat groups under different drought stresses: (a) $POX_2$ , (b) $POX_3$.

**References**

**Bowler, C., Van Montagu, M. and Inze, D. 1992.** Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 43: 83-116.

**Del Rio, L. A., Sevilla, F., Sandalio, L. M. and Plama, J. M. L. 1991.** Nutritional effects and expression of superoxide dismutase: Induction and gene expression, diagnostics, prospective protection against oxygen toxicity. **Free Radical Research** 13: 819-828.

**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.

**Egneus, H., Heber, U. and Krik, M. 1975.** Reduction of oxygen by the electron chain of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide. **Biochimica et Biophysica Acta** 408: 252-268.

**FAO. 2013**. FAOSTAT. http://faostat.fao.org. 2014.04.12.

**Ge, T. D., Sui, F. G., Bai, L. P., Lu, Y. Y. and Zhou, G. S. 2006.** Effects of water stress on the protective enzyme activities and lipid peroxidation in roots and leaves of summer maize. **Agricultural Sciences in China** 5: 101-105.

**Gong, H. Z., Chen, K., Wang, S. and Zhang, C. 2005.** Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in posts under drought. **Plant Science** 169: 313-327.

**Hong Bo, S., Zong Suo, L., Ming An, S. and Bo Chu, W. 2005.** Changes of anti-oxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat genotypes at seedling stage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 42: 107-113.

**Jiang, Y. and Huang, N. 2001.** Drought and heat sress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. **Crop Science** 41: 436-442.

**Khanna-Chopra, R. and 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: 276-283.

**Kraus, E., McKersie, B. D and Fletcher R. A. 1995.** Pachobutrazol induced tolerance of wheat leaves to parquet may involve increased antioxidant enzyme activity. **Plant Physiology** 145: 570-576.

**Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E. and Navari-Izzo, F. 1999.** Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. **Plant Physiology** 119: 1091-1100.

**Manivannan, P., Jaleel, C. A., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2008.** Osmoregulation and antioxidant metabolism in drought-stressed *Helianthus annuus* under triadimefon drenching. **Comptes Rendus Biologies** 331: 418-425.

**MCID.** www.mcid.**co.**uk/Software/MCID_analysis.

**Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Breusegem, F. V. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science** 9: 490-498.

**Mohammadi, R., Roostaei, M., Haghparast, R., Roohi, E., Kazemi, S., Ahmadi, M. M., Abediasl, G. and Amri, A. 2010.** Genotype×environment interaction for grain yield in rainfed winter wheat. Multi-environmental trials in Iran. **Agronomy Journal** 102: 1500-1510.

**Mohanty, N. 2003.** Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of flag leaf and the grain yield in two cultivars of *Triticum aestivum* (L.) exposed to warmer growth conditions. **Journal of Plant Physiology** 160: 71–74.

**Olson, P. D. and Varner, J. E. 1993.** Hydrogen peroxides and lignification. **The Plant Journal** 4: 887-892.

**Polle, A. 1997.** Defense against photo-oxidative damage in plants. In: Scandalios, J. (Ed.). Oxidative stress and the molecular biology of oxidative defense. Cold Spring Harbor Laboratory. pp: 623-666

**Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. C. 2003.** Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science** 163: 1037-1046.

**Salin, M. L. 1991.** Chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. **Free Radical Research** 12: 851-858.

**Selote, D. S. and Khanna-Chopra, R. 2010.** Antioxidant response of wheat roots to drought acclimation. **Protoplasma** 245: 153-163.

**Soltis, D. E. and Soltis, P. S. 1990.** Isozymes in plant biology. Dioscorides Press. Portland.

**Srivalli, B., Sharma G. and Khanna-Chopra, R. 2003**. Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. **Physiologia Plantarum** 119: 503-512.

**Valizadeh, M., Moharamnejad, S., Ahmadi, M. and Mohammadzadeh, J. H. 2013.** Changes in activity profile of some antioxidant enzymes in alfalfa half-sib families under salt stress. **Journal of Agricultural Science and Technology** 15: 801-809.

**Valizadeh, M., Mohayeji, M., Yasinzadeh, N., Nasrullazadeh, S. and Moghaddam, M. 2011.** Genetic diversity of synthetic alfalfa generations and cultivars using tetrasomic inherited allozyme markers. **Journal of Agricultural Science and Technology** 13: 425-430.

**Zhang. F., Guo, J. K., Yang, Y. I., He, W. I. and Zhang, L. X. 2004.** Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. **Acta Physiologiae Plantarum** 26: 345-352.

# Electrophoretic analysis of antioxidant enzymes activity under drought stress in winter wheat genotypes at tillering stage

**Rana Naderi Zarnaghi[1*], Mostafa Valizadeh[2] and Reza Fotovat[3]**

1 and 2. Ph. D. Student and Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran, 3. Assist. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran

(Received: April 22, 2014- Accepted: October 20, 2014)

**Abstract**

Drought stress is one of the main stresses that inhibit the growth of plants. In this research, the effect of drought stress was studied on the activity of CAT, SOD and POX enzymes in three groups of drought sensitive, intermediate and tolerant winter wheat at tillering stage under normal irrigation (90% FC), mild drought stress (60% FC) and severe drought stress (30% FC) conditions. The experiment was conducted in factorial experiment based on completely randomized design with three replications and activity of three enzymes was recorded at tillering stage. The activity of all enzymes was measured by 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis in leaf tissues. Four isozymes were identified for POX, one isozyme for CAT and two isozymes for SOD. The analysis of variance showed that drought stress had significant effect on the activity of all enzymes. Enzyme activity levels in most enzymes increased in severe drought stress than normal condition, so the activity of $POX_1$, $POX_2$, $POX_3$ and $POX_4$ isozymes increased 39, 86, 75 and 20 percent and CAT, $SOD_1$ and $SOD_2$, isozymes increased 31, 10 and 15 percent, respectively. The results indicated that among the studied enzymes, SOD isozymes had lower changes in activity and hadn't important role in plant protection under drought stress, whereas POX enzyme showed more important increment of activity under drought stress conditions. Thus the POX might have a key and effective role in increasing of wheat resistance under drought stress conditions.

**Keywords:** Isozyme activity, Native electrophoresis, Oxidative stress, Wheat

*Corresponding author: naderi.rana@gmail.com