فصلنامه بوم‌شناسی گیاهان زراعی
جلد ۱۲، شماره ۲، صفحات ۳٤ – ۲۵
(تابستان ۱۳۹۵)

نشت یونی و فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در گیاهچه چند ژنوتیپ نخود در واکنش به دماهای پایین

احسان فتحی
دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی
دانشگاه کردستان
سنندج، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
ehsanfathi1988@yahoo.com

ایرج طهماسبی*
عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی
دانشگاه کردستان
سنندج، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
irajtahmasbi@yahoo.com
مسؤل مکاتبات*

نسرین تیموری
دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی
دانشگاه کردستان
سنندج، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
nasrin.teimoori@gmail.com

چکیده این مطالعه به منظور ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های نخود به تنش دمای پایین در مرحله رشد گیاهچه‌ای در اتاقک رشد انجام شد. دراین آزمایش سطوح دمایی ۱۵–، ۱۰–، ۵–، ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ درجه سلسیوس روی پنج ژنوتیپ نخود شامل ILC482، آزاد، آرمان، کاکا و پیروز به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اعمال شد. در تمام ژنوتیپ‌های نخود با افزایش شدت تنش سرما از ۱۵ تا ۰ درجه سلسیوس، میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش و در دمای حدود ۰ درجه به حداکثر رسید. در دامنه دمایی اعمال شده، ژنوتیپ آزاد و ILC482 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان نشت الکترولیت بودند. با کاهش دما تا ۰ درجه سلسیوس فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در همه ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. در دماهای کمتر از ۰ درجه سلسیوس پاسخ ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. همچنین بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز متعلق به ژنوتیپ ILC482 بود. در مجموع، به نظر می‌رسد ژنوتیپ ILC482 در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها مقاومت بیشتری به تنش سرما داشته باشد و بنابراین با توجه به نتایج آزمایش می‌توان توصیه کرد در مناطقی که دمای هوا در فصل پاییزه و زمستان در کشت‌های پاییزه و انتظاری با کاهش شدیدی مواجه می‌شود از این ژنوتیپ استفاده شود.

شناسه مقاله:
نوع مقاله: **پژوهشی**
تاریخ پژوهش: **۱۳۹۲**
تاریخ دریافت: **۹٤/۰۹/۱۲**
تاریخ پذیرش: **۹۵/۰۳/۰٤**

واژه‌های کلیدی
- **آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان**
- **تنش سرما**
- **نشت الکترولیت**
- **آزاد**
- **پیروز**
- **ILC482**

مقدمه رشد نخود دیم به طور طبیعی تحت تأثیر تنش‌های دما و خشکی در بهار و زمستان قرار می‌گیرد، این تنش‌ها طول مدت رشد رویشی و زایشی را کوتاه کرده و محصول دانه را کاهش می‌دهند.[۳۷،۳۸] جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه مراحل بحرانی در چرخه زندگی گیاه هستند. در تولید محصول استقرار گیاهچه تعیین کننده تراکم بوته، یکنواختی و عملیات زراعی است.[۱۳] جوانه‌زنی مناسب، نیاز اولیه برای استقرار مناسب گیاه است. سطح سبز نامطلوب گیاه در مزارع نخود دیم می‌تواند ناشی از یک یا ترکیبی از عواملی مانند مقدار کم بذر، قوه نامیه ضعیف، عدم جوانه‌زنی، سبز شدن نامناسب بذر و مرگ و میر زیاد گیاهچه باشد.[۳] بعد از کاشت بذر درصد و سرعت جوانه‌زنی، سرعت سبز کردن و رشد گیاهچه‌ها بستگی به دمای محیط دارد.[٤] از سودمندی‌های کاشت زمستانه می‌توان به کارایی مصرف آب بالاتر اشاره نمود. به تأخیر افتادن تاریخ کاشت باعث می‌شود که کارایی مصرف آب یعنی تولید ماده خشک در هکتار به ازای آب مصرفی کاهش یابد.[۲۷] بررسی‌های اولیه در نواحی مدیترانه‌ای نشان می‌دهد در صورتی که از ارقام مقاوم به سرما و برق‌زدگی نخود استفاده شود، کشت زمستانه نسبت به بهاره، برتری دارد. در همین راستا پژوهشگران، تعداد زیادی از ژنوتیپ‌های نخود متحمل به سرما را برای کاشت زمستانه در نواحی مدیترانه‌ای شناسایی و معرفی کرده‌اند.[٤١] گیاهان در شرایط طبیعی و زراعی همواره در معرض تنش هستند[۲٦] و معمولاً می‌توانند دماهای کمی بالاتر یا پایین‌تر از حد بهینه برای رشد و نمو خود را تحمل کنند. با توجه به این‌که هر یک از مراحل رشد گیاه نیازهای دمایی متفاوتی دارند، بنابراین، در تنش‌های دمایی مرحله وقوع، دوام و شدت تنش سرما ازمهم‌ترین عوامل مؤثر به حساب می‌آیند.[٦] علایم خسارت معمولاً بین ٤۲ تا ۷۲ ساعت بعد از قرار گرفتن در معرض تنش مشاهده می‌شود.[۳۳] تنش دمای پائین شامل سرمازدگی و یخ‌زدگی است.[۱۲] برخی پژوهشگران دامنه دمایی کمتراز ۱/۵- درجه سلسیوس را به عنوان تنش انجماد و دمای بین ۱/۵- تا ۱۵ درجه سلسیوس را به عنوان تنش سرما در نخود در نظر گرفته‌اند.[۱۵،۲۰] تنش دمای پایین با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک باعث عدم تعادل متابولیسمی، کاهش رشد، عملکرد و در بعضی موارد مرگ در گیاهان حساس می‌گردد.[۲٤] دمای پایین یکی از عوامل محیطی عمده است که رشد گیاهان را محدود می‌کند.[۲۰] فرآیندهای فیزیولوژیکی مقاومت به سرما از قبیل تغلیظ شیره سلولی و تغییرات آنزیمی و پروتئینی در سطح سلولی و خصوصاً غشای سلول‌های گیاهی به وجود می‌آید.[۳٤] به نظر می‌رسد این تغییرات کیفی ناشی از پیام‌های محیطی و ترکیب و تداخل نور و دماهای پایین باشد.[۹] تنش سرما یکی از عوامل تغییر در رشد و نمو و عملکرد بسیاری از گیاهان زراعی از جمله نخود است. به طور کلی، دمای پایین در مرحله جوانه‌زنی موجب عدم استقرار مناسب گیاه می‌گردد و ضعف گیاهچه در این مرحله دستیابی به عملکرد مطلوب را تحت تأثیر قرار می‌دهد.[٤۳] تنش دمای پایین باعث کاهش سیالیت غشا شده که در کنار پراکسیداسیون لیپید موجب تخریب غشا و در نتیجه افزایش نشت یونی می‌گردد.[۷] در پژوهشی روی نهال‌های زیتون گزارش شده که تنش یخبندان موجب تسریع در تخریب غشای سلولی و در نتیجه افزایش نشت یونی می‌شود.[۱] هنگامی که بافت‌های گیاه در اثر سرما آسیب می‌بینند، فعالیت غشای سلولی مختل شده و الکترولیت‌های داخل سلول به خارج از آن نشت می‌کنند. آزمایش‌ها نشان داده است که اولین مکان خسارت در اثر سرما، غشای سلولی است و سرما باعث تغییر حالت غشا از کریستال مایع به حالت جامد ژل می‌شود و با این تغییر، فعالیت آن مختل می‌گردد.[۲٦] به همین دلیل اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی به عنوان یک روش مناسب برای تخمین تراوایی غشا در ارتباط با اثر تنش‌های محیطی بر ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی مورد استفاده پژوهشگران قرار گرفته است.[۱۸] تغییر در ساختار غشا در اثر سرما سبب افزایش نشت الکترولیت‌های سلولی در اندام‌های حساس به سرما

می‌گردد.[۳۸] در بررسی روی گیاهچه‌های نخود ۱۴ روزه تحت تنش سرما، با کاهش دما میزان نشت یونی افزایش پیدا کرد. تنش سرما با آسیب به غشاهای کلروپلاستی می‌تواند بیشترین خسارت را به فتوسنتز و راندمان تولید گیاه وارد سازد.[۳۵] یکی از عوامل اصلی مسبب خسارت سرما، ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال است که منجر به تغییر عوامل دخیل در حفظ ترکیبات غشایی، ترکیبات ضد انجماد، آنتی اکسیدان‌ها و فرآیندهای متعدد دیگر می‌شود.[۸] کاتالاز[1]و پراکسیداز[2]دو آنزیم مهم در مقابله با پراکسید هیدروژن به عنوان یکی از گونه‌های اکسیژن فعال اصلی می‌باشند. گزارش شده که پراکسیداز پس از کاتالاز در درجه دوم اهمیت در حذف پراکسید هیدروژن نقش ایفا می‌کند.[۱۴] گیاهان سازوکارهای حفاظتی مختلفی را برای دفع یا کاهش اکسیژن فعال دارند که در سطوح مختلف تنش مؤثر است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت یکی از این سازوکارهای حفاظتی است. مطالعات نشان داده است که بین فعالیت آنزیم‌های ضداکسایشی[3]و تحمل گیاه به تنش های غیرزنده مانند تنش سرما همبستگی وجود دارد.[۲۱] گیاهانی که از سطوح بالاتری از ضداکسایندهها برخور دارند مقاومت بیشتری به آسیب‌های اکسایشی نشان می‌دهند. دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز از مهم‌ترین ضد اکساینده‌ها می‌باشند که باعث شکسته شدن پراکسید هیدروژن می‌گردند.[۱۹،۲۳] با بررسی تأثیر تنش سرما بر فعالیت آنزیم‌های ضداکسایشی در گندم اعلام شد که سرما موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در این گیاه می‌شود.[۴۰] *گاستا و همکاران (۱۹۸۲)* تغییر در ساختار غشا، ترکیب اسیدهای چرب، تغییرات متابولیکی، تغییر در مقادیر پروتئین، فعالیت‌های آنزیمی و نشت الکترولیت‌ها را جزو صدمات تنش یخزدگی به گیاهان ذکر کردند[۲۲] در علف‌های چمنی[4]نیز برخی خصوصیات مانند میزان پایداری غشاهای سلولی[۱۶]، ترکیب و ذخیره کربوهیدرات-ها[۱۸] و سنتز پروتئین‌های تنظیم کننده سرما نقش مهمی در تحمل به یخزدگی آنها ایفا می‌کنند. به همین دلیل اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌هااز بافت‌های گیاهی پس از اعمال تنش یخزدگی، به عنوان یک روش مناسب برای تخمین میزان خسارت سرما[۱۶] و ارزیابی تحمل به یخزدگی در گیاهان مختلف مورد استفاده قرار گرفته است.[۱۸] در پژوهشی به منظور مطالعه تأثیر تنش شوری بر فعالیت سیستم ضداکسایشی در جو مشخص شده که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز[5]در ریشه و ساقه تحت تنش افزایش پیدا می‌کند.[۴۴] با توجه به این که کشت پاییزه و زمستانه باعث افزایش عملکرد در نخود می‌شود اما تنش‌های سرمایی در این فصل باعث نقصان بوته در واحد سطح و آسیب‌های جدی به بافت گیاه می‌شود بنابراین باید از ژنوتیپ‌هایی استفاده کرد که نسبت به دماهای پایین از خود مقاومت خوبی در برابر تنش سرما نشان دهند.

هدف از این پژوهش شناسایی ژنوتیپ مقاوم به تنش سرما برای استفاده در کشت‌های پاییزه و زمستانه در شرایط مزرعه بود.

مواد و روش‌ها در این آزمایش خسارت تنش سرمایی در مرحله دو تا سه برگی گیاهچه مورد ارزیابی قرار گرفت. کشت در اتاقک رشد به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی شامل یک گلدان با قطر ۱۲ سانتی‌متر بود. فاکتور اول شامل هفت سطح دمایی ۱۵-، ۱۰-، ۵-، ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ درجه سلسیوس و فاکتور دوم شامل پنج ژنوتیپ نخود ILC482، آزاد، آرمان، کاکا و پیروز بود.بذور قبل از کشت با قارچ‌کش کاربوکسین تیرام[6]با غلظت ۲ در هزار ضدعفونی شدند. در هر گلدان پنج بذر کاشته شد. بعد از کشت، گلدان‌ها به اتاقک رشد منتقل و در دمای ۱۵ درجه سلسیوس و شدت نور ۴۶۰ وات بر متر مربع به مدت ۲۱ روز یعنی تا رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله ۲ تا ۳ برگ

[1] catalase
[2] peroxidase
[3] antioxidant
[4] grass
[5] superoxide dismutase
[6] Carboxin Thiram®

مرکب نگهداری شدند. سپس هر کدام از تیمارهای دمایی بالاتر از ۰ درجه سلسیوس به مدت دو روز اعمال و نمونه‌برداری انجام شد. قبل از اعمال تیمارهای دمایی ۰ درجه سلسیوس و کمتر عملیات خود سرمایی گیاهچه‌ها انجام شد، به این ترتیب که برای اعمال تیمار دمای ۰ درجه، گلدان‌ها به مدت ۲ روز در دمای ۵+، برای تیمار دمایی ۵- دو روز در دمای ۵+ و دو روز در دمای ۰ و برای اعمال تیمارهای ۱۰- و ۱۵- سلسیوس به مدت دو روز به ترتیب در هر کدام از دماهای ۵+، ۰ و ۵- درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس تیمارهای دمایی مورد نظر در یک دستگاه فریزر که به این منظور بهینه سازی شده بود، اعمال و بلافاصله نمونه‌برداری انجام شد. اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها به روش *لوتس و همکاران (۱۹۹۶)*[۳۱]، سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش *مک آدام و همکاران* (۱۹۹۲)[۳۲] و آنزیم کاتالاز به روش چنس و ماهلی (۱۹۹۵)[۱۱] انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTATC و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

نتایج و بحث

خسارت به غشای سلول

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان دهنده‌ی تأثیر بسیار معنی‌دار دما، ژنوتیپ و اثرات متقابل آن‌ها بر نشت الکترولیت‌ها از غشای سلولی بود (جدول ۱). مقایسه میانگین-های تأثیر دما بر نشت الکترولیت‌ها در ژنوتیپ‌های نخود نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار نشت الکترولیت‌ها به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های پیروز در دمای ۱۵- درجه و ILC482 در دمای ۱۵ درجه سلسیوس بود (جدول ۲). نشت یونی نشانگر عدم توانایی غشا در حفظ ترکیبات درون سلولی به علت خسارت به غشای سلولی است، در نتیجه هر چه میزان نشت بیشتر باشد خسارت وارده به غشای سلول هم بیشتر است. در تمام ژنوتیپ‌های نخود با افزایش شدت تنش سرما (کاهش دما از۱۵ تا ۰ درجه سلسیوس)، میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت و در دمای حدود ۰ درجه به حداکثر رسید. این افزایش به طور متوسط ۳۲/۲۱٪ بود. *نایار و همکاران(۲۰۰۵)* تأثیر تنش سرما بر گیاهچه‌های نخود ۱٤ روزه را بررسی و گزارش کردند که با کاهش دما میزان نشت یونی افزایش پیدا کرد.[۳۵] در دمای ۰ درجه کمترین نشت الکترولیت مربوط به ژنوتیپ ILC482 بود که می‌تواند بیانگر تحمل بیشتر این ژنوتیپ به تنش سرما باشد. در این دما ژنوتیپ آزاد دارای بیشترین میزان نشت بود که نشان از حساسیت بیشتر این ژنوتیپ به سرما در مقایسه با سایرین باشد. تنش سرما در شرایط کنترل شده نشان داد که ژنوتیپ ILC482 متحمل به سرماست[٤١]. تنش سرمایی طولانی مدت در نخود می تواند سبب جلوگیری از رشد و در تنش‌های شدیدتر موجب مرگ گیاه شود[۱۵]. در تنش انجماد یعنی دمای کمتر از ۰ درجه سلسیوس، هر چند که در برخی ژنوتیپ‌ها مانند پیروز و ILC482 تفاوت نشت الکترولیت‌ها بین دمای ۰ و ۱۵- درجه سلسیوس معنی‌دار بود ولی خیلی کمتر از تنش سرما و به طور متوسط در حدود ۱/۳۵٪ بود که علت آن می‌تواند به حداکثر رسیدن خسارت به غشای سلول تا دمای ۰ درجه و عدم توانایی غشا برای حفظ محتوای سلول باشد. در دامنه دمایی اعمال شده در این آزمایش، در بین ژنوتیپ‌های مختلف ژنوتیپ آزاد و ILC482 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین نشت الکترولیتی بودند که می تواند نشان دهنده بیشترین و کمترین حساسیت به تنش دمای پایین در این ژنوتیپ‌ها باشد. نتایج مطالعات مختلف تایید کننده آن است که اسیدهای چرب غیراشباع موجود در غشای سلولی در سیالیت غشا دارای اهمیت زیادی هستند. به علاوه درجه حرارت پایین باعث تغییر سیالیت اسیدهای چرب غشا از حالت نیمه مایع به حالت کریستالی می‌شود که به دنبال آن نشت یونی افزایش می‌یابد.[۳۳] گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش سرما می‌توانند با اسیدهای چرب واکنش دهند و سبب پراکسیداسیون لیپیدهای اصلی غشا و

به دنبال آن نشت محتوای سلولی و خشکی سریع و مرگ سلول شوند.[۳۹] این تغییرات سبب ظهور سایر اثرات سرمازدگی در سطح سلول و گیاه می‌شود.[۶] در آزمایش‌های جداگانه روی چهار رقم برنج[۲۱] و دو رقم ذرت[۳۹] میزان نشت یونی در رقم‌های حساس به سرما افزایش یافت در حالی که در رقم‌های مقاوم تغییر چندانی پیدا نکرد، در آزمایش حاضر با کاهش دما، حتی دماهای بالای ۰ درجه سلسیوس، در همه ژنوتیپ‌ها میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش پیدا کرد که نشان دهنده حساسیت بیشتر ژنوتیپ‌های نخود به تنش سرما در مقایسه با محصولاتی مانند برنج و ذرت است.

فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده معنی‌داری بودن اثرات دما، ژنوتیپ و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱٪ بر فعالیت آنزیم پراکسیداز بود (جدول ۱). با کاهش دما تا ۰ درجه سلسیوس فعالیت آنزیم پراکسیداز در همه ژنوتیپ‌ها افزایش یافت (جدول ۳). نتایج آزمایش‌های مختلف هم نشان می‌دهد که با کاهش دما فعالیت آنزیم پراکسیداز به منظور جلوگیری از آسیب‌های وارده به گیاه ناشی از تنش سرما و تولید پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد.[٤٤] در دماهای کمتر از ۰ درجه سلسیوس پاسخ ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. در برخی ژنوتیپ‌ها مانند آرمان و پیروز فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش یافت ولی در سایرین تغییر معنی‌داری رخ نداد. علت عدم افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌تواند تخریب غشای سلول و تراوش مواد محلول به خارج سلول و در نتیجه اختلال در فعالیت سلول یا به حداکثر رسیدن تولید پراکسید هیدروژن باشد که بدین ترتیب نیاز به فعالیت بیشتر آنزیم پراکسیداز برای خنثی سازی آن برطرف شده باشد. در دامنه دمایی در این آزمایش بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به ژنوتیپ ILC482 و کمترین آن مربوط به ژنوتیپ آزاد بود. یکی از دلایل تحمل بیشتر ژنوتیپ ILC482 به تنش سرما می تواند فعالیت بیشتر آنزیم پراکسیداز برای خنثی سازی پراکسید هیدروژن که تخریب کننده غشای سلول است، باشد. دو رقم نخود حساس به سرما دارای تراوش یونی و میزان فعالیت پراکسید هیدروژن بیش‌تری در مقایسه با دو رقم مقاوم بودند.[۲۸] فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو رقم توت فرنگی تحت تأثیر تنش سرما ابتدا به سرعت افزایش پیدا کرد، اما با کاهش بیش‌تر دما، افزایش فعالیت پراکسیداز کاهش یافت.[٤٥] تیمار سرما در گندم نیز موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد.[٤٠]

فعالیت آنزیم کاتالاز

دما، ژنوتیپ و اثر متقابل دما در ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۱). با کاهش دما تا ۰ درجه سلسیوس میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در همه ژنوتیپ‌ها افزایش یافت، از این دما به پایین پاسخ ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. در ژنوتیپ‌های آرمان و آزاد فعالیت آنزیم کاتالاز تغییر معنی‌داری پیدا نکرد، در سایر ژنوتیپ‌ها فعالیت آنزیم تا دمای ۵- درجه سلسیوس افزایش یافت ولی با کاهش دما تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم مشاهده نشد. پاسخ‌های متفاوت در دماهای پایین شاید به علت تأثیرگذاری سایر آنزیم‌ها و موادی باشد که باعث کاهش خسارت گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به ژنوتیپ ILC482 در دمای ۱۵- درجه سلسیوس و کمترین فعالیت این آنزیم متعلق به ژنوتیپ پیروز در دمای ۱۵ درجه سلسیوس بود (جدول ٤). افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های نخود می‌تواند بیانگر توانایی بیشتر این ژنوتیپ‌ها در مهار گونه‌های اکسیژن فعال و پراکسید هیدروژن باشد که تخریب کننده غشای سلول هستند. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که بهبود تحمل به تنش سرما در نخود ممکن است با ظرفیت سیستم دفاعی ضداکسایشی از جمله فعالیت بیشتر آنزیم کاتالاز در این گیاه مرتبط باشد.[۱۰] برخی دیگر از پژوهشگران هم بر نقش آنزیم کاتالاز در حذف پراکسید هیدروژن تحت تنش

جدول ۱) تجزیه واریانس اثر تنش سرما بر میزان نشت الکترولیت و فعالیت پراکسیداز و کاتالاز در گیاهچه ژنوتیپ‌های نخود

Table 1) Analysis of variance of chilling stress effect on electrolyte leakage, peroxidase and catalase activity in chickpea genotypes seedlings

Source of variation	df	mean of squares		
		electrolyte leakage	peroxidase	catalase
Replication	2	2.30*	0.27*	0.005**
Temperature	6	3008.97**	7.30**	0.001**
Genotype	4	201.95**	2.48**	0.00025**
Temperature × Genotype	24	38.97**	0.53**	0.000041**
Error	68	0.64	0.07	0.000015
CV (%)		1.09	6.10	6.99

*,**به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱٪ respectively

* and ** no significant, Significant at 5 and 1% probability level

جدول ۲) اثر دما بر درصد نشت الکترولیت در ژنوتیپ‌های نخود

Table 2) The effect of temperature on electrolyte leakage percentage of chickpea genotypes

Genotype	15°C	10°C	5 °C	0°C	-5°C	-10°C	-15°C	Average
Arman	45.61	52.63	71.71	82.69	83.66	83.02	81.24	71.51
Azad	51.55	69.51	75.91	84.21	85.82	85.18	84.59	76.68
Pirouz	60.16	64.54	73.77	80.67	84.75	84.12	86.28	76.33
ILC482	43.28	47.78	68.75	79.98	81.78	82.01	83.24	69.55
Kaka	49.05	52.72	72.68	83.13	82.67	85.54	82.12	72.56
Average	49.93	57.44	72.56	82.14	83.74	83.97	83.49	-

حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪=۱/۳٤ LSD (0.05) = 1.34

جدول ۳) اثر دما بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بر حسب میکرو مول در دقیقه بر میلی‌گرم پروتیئن در ژنوتیپ‌های نخود

Table 3) The effect of temperature on peroxidase activity (µmol/min/mg of protein) of chickpea genotypes

Genotype	15°C	10°C	5 °C	0°C	-5°C	-10°C	-15°C	Average
Arman	3.51	3.52	3.91	4.53	5.42	4.76	6.09	4.56
Azad	3.12	3.25	4.25	4.77	4.22	3.36	4.42	4.05
Pirouz	2.23	3.56	4.02	4.34	4.02	4.19	4.87	4.17
ILC482	3.32	3.63	4.76	5.33	5.43	4.94	4.72	4.80
Kaka	3.34	3.82	4.47	4.59	5.08	5.02	4.81	4.63
Average	3.10	3.56	4.28	4.71	4.69	4.45	4.98	

حداقل اختلاف معنی دار در سطح ۵٪=۰/٤٤ LSD(0.05)= 0.44

جدول ٤) اثر دما بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب میکرو مول در دقیقه بر میلی گرم پروتیئن در ژنوتیپ‌های نخود

Table 4) The effect of temperature on catalase activity (µmol/min/mg of protein) of chickpea genotypes

Genotype	15°C	10°C	5 °C	0°C	-5°C	-10°C	-15°C	Average
Arman	0.033	0.029	0.041	0.050	0.049	0.046	0.047	0.042
Azad	0.036	0.026	0.045	0.048	0.047	0.045	0.043	0.041
Pirouz	0.026	0.028	0.036	0.039	0.048	0.055	0.057	0.041
ILC482	0.046	0.035	0.053	0.053	0.057	0.054	0.058	0.051
Kaka	0.032	0.032	0.041	0.047	0.055	0.049	0.053	0.044
Average	0.035	0.030	0.043	0.047	0.051	0.050	0.052	

حداقل اختلاف معنی دار در سطح ۵٪=۰/۰۰٦ LSD(0.05)= 0.006

اکسایشی ناشی از سرما تاکید کرده‌اند.[۲۹،۳۳] برای مثال مطالعات انجام شده روی پنج کلون گلایول[۵] و یک رقم کلزای مقاوم به سرما[۱۷] در مقایسه با شاهد غیرمقاوم نشان دهنده فعالیت بیشتر آنزیم کاتالاز در هنگام بروز تنش سرما بود. همچنین در یک رقم یونجه مقاوم به سرما فعالیت آنزیمی بیشتر از رقم حساس بود.[۴۲]

در این آزمایش همبستگی بین نشت الکترولیت‌ها که نشان دهنده میزان خسارت به غشای سلول در اثر تنش سرماست و میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز همبستگی مثبت و بسیار معنی‌داری وجود داشت. مطالعات مختلف روی نخود[۴۱]، گندم[۲،۲۵]، توت فرنگی[۳۰] و جو[۳۶] هم نشان می‌دهد که بین فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی با تحمل گیاه به تنش سرما همبستگی مثبت وجود دارد. در این آزمایش، میزان همبستگی خسارت به غشای سلول با فعالیت آنزیم پراکسید از ۰/۶۵ و کاتالاز ۰/۴۶ بود. همچنین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بسیار بیشتر از کاتالاز بود (جداول ۳ و ٤) که نشان دهنده تأثیرگذاری بیشتر آنزیم پراکسیداز در مقایسه با کاتالاز برای جلوگیری از تخریب غشای سلول است. برخی از پژوهشگران هم به تأثیرگذاری بیشتر فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با کاتالاز درگیاه نخود اشاره نموده اند.[۴۱]

نتیجه‌گیری کلی با کاهش دما میزان خسارت به غشای سلول افزایش یافت. گیاه نخود نیز به منظور کاهش خسارات وارده به غشای سلول میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را افزایش داد. فعالیت آنزیم پراکسیداز و همبستگی آن با خسارات وارده با تنش بیش از آنزیم کاتالاز بود که نشان دهنده تأثیرگذاری بیشتر این آنزیم برای جلوگیری از وارد شدن خسارت به غشا است. در کل با توجه به نشت کمتر الکترولیت‌ها در ژنوتیپ ILC482 که بیانگر خسارت وارده کمتر به غشای سلول در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌هاست، این ژنوتیپ مقاوم به سرما تشخیص داده شد.

References

1. Azzarello E, Mugnai S, Pandolfi C, Masi E, Marone E, Mancuso S (2009) Comparing image (fractal analysis) and electrochemical (impedance spectroscopy and electrolyte leakage) techniques for the assessment of the freezing tolerance in olive. Trees 23: 159-167.
2. Baek KH and Skinner DZ (2003) Alternation of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of nearisogenic wheat lines. Plant Science 165: 1221-1227.
3. Bagheri A (1999) Breeding crops for tolerance to biotic and abiotic stresses. Proceeding of Conference in Agronomy and Plant Breeding. Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran 12-13. [in Persian with English abstract].
4. Bahl PN (1988) Chickpea. In: Baldev B, Ramanujam S (eds.) Pulse Crops (Grain legumes). Oxford and IBH publishing company: New Dehli 95-139.
5. Bettaieb T, Mahmoud M, Ruiz de Galarreta JI, Du Jardin P (2007). Relation between the low temperature stress and catalase activity in gladiolus somaclones (*Gladiolus grandiflorus* Hort.). Scientia Horticulturae 113: 49-51.
6. Blum A (1988) Plant breeding for stress environments. CRC Press: Boca Raton. Florida.
7. Campos PS, Quartin V, Ramalho JC, Nunes MA (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of Coffee sp. Plants. Journal of Plant Physiology and Biochemistry 160: 283-292.
8. Cao S, Bian X, Jiang S (2010) Cold treatment enhances lead resistance in Arabidopsis. Acta Physiologiae Plantarum 32: 19-25.
9. Cattivelli L, Baldi P, Crosatti C, Grossi M, Valo G, tanca L (1999) Genetic bases of barley physiological response to stressful conditions. In: Slafer GA (eds.) Barley science, Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality. Special Issue of the Journal of Crop Production. Published by food product press: New York, USA 70-91.
10. Cavero JC, Zaragoza M, Suso L, Pardo A (1999) Competition between maize and *Datura stramonium* in an irrigated field under semi-arid conditions. Weed Research 39: 225-240.
11. Chance B, Maehly AC (1995) Assay of catalase and peroxidase. In: Colowick SP, Kaplan ND (eds.) Methods in enzymology. Academic Press: New York 2: 764-791.
12. Chen THH, Uemura M, Fujikawa S (2006) Cold hardiness in plants. CABI publishing: London.

13. Cheng Z, Bradford KJP (1999) Hydrothenmae time analysis of tomato seed germination responses to priming treatments. Journal Experimental Botany 330: 89-99.
14. Cook D, Fowler S, Fiehn O (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low temperature metabolome of Arabidopsis. Plant Biology 101: 15243-15248.
15. Croser JS, Clarke HJ, Siddique KHM, Khan TN (2003) Low temperature stress: Implications for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. Critical Review in Plant Science 22: 185-219.
16. Cyril J, Duncan RR, Baird WV (1998) Changes in membrane fatty acids in cold-acclimated turfgrass. Horticulture science 33: 453-465.
17. Fahimirad Sh, Ghasem Karimzadeh Gh, Ghanati F (2013) Cold-induced Changes of Antioxidant Enzymes Activity and Lipid Peroxidation in Two Canola (*Brassica napus* L.) Cultivars. Journal of Plant Physiology and Breeding. 3(1): 1-11.
18. Fry JD, Lang NS, Clifton RGP, Maier FP (1993) Freezing tolerance and carbohydrate content of low temperature-acclimated and non-acclimated centipede grass. Crop Science 33: 1051-1055.
19. Ghorbanali D, nojavan D, Haidari A, Farbodnia I (2002) Soluble sugars, starch and proteins by drought in Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Teacher Education 1: 53-38. [in Persian with English abstract].
20. Graham D and Patterson BD (1982) Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: proteins, metabolism, and acclimation. Annual Review in Plant Physiology 33: 347-372.
21. Guo X, Zou W, Lu S, Zhong Q (2006) Differential responses of anti-oxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology and Biochemistry 44: 828-836.
22. Gusta LV, Fowler DB, Tyler NJ (1982) Factors influencing hardening and survival in winter wheat. In: Li PH, Sakai A (eds.) Plant Cold Hardiness and Freezing Stress, Mechanisms and Crop Implications. Academic Press: London 23-40.
23. Jabari P, Ahmadi A, Postini K, Alizadeh H (2007) Investigate the relationship activity of antioxidant enzymes and chlorophyll cell membrane stability bread wheat cultivars resistant and susceptible to drought stress. Journal of Agricultural Science 2: 12-19. [in Persian with English abstract]
24. Jafari R, Manochahry Kalantari Kh, Mousavi A (2008) Effect on the accumulation of antioxidants in tomato seedlings under cold stress. Iranian Journal of Biology 20: 216-206. [in Persian with English abstract].
25. Javadian N, Karimzadeh G, Mahfoozi S and Ghanati F (2010) Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. Russian Journal of Plant Physiology 57: 540-547.
26. Kafi M, Zand A, Kamkar B, Sharifi HR, Goldani D (2008) Plant Physiology. Mashhad University Press: Mashhad. [in Persian with English abstract].
27. Kaiser WJ, Hannan RM (1985) Effects of planting data and fungicide seed treatments on emergence and yield of kabuli and desi chickpea in eastern Washington State. International Chickpea Newsletter 12: 16-19.
28. Kaumar SJ, Malik P, Thakur S, Kaistha KD, Sharma HD, Upadhyaya J, Berger D, Nayyar H (2010) Growth and metabolic responses of contrasting chickpea (*Cicer arientinum* L.) genotypes to chilling stress at reproductive phase. Acta Phisiol plant 33(3): 779-787.
29. Khorshidi M, Nojavan AM (2006) The effects of Abscise Acid and CaCl2 on the activities of anti-oxidant enzymes under cold stress in maize seedlings in the dark. Journal of Biological Sciences 9: 54-59.
30. Luo Y, Tang H and Zhang Y (2011) Production of reactive oxygen species and antioxidant metabolism about strawberry leaves to low temperature. Journal of Agricultural Science 3: 89-96.
31. Lutts S, Kinet J M, Bouharmont J (1996) NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Journal. Annual Botany 78(2): 389-398.
32. Mac Adam JW, Nelson CJ, Sharp RE (1992) Peroxidase Activity in the leaf elongation zone of tall fescue. Plant Physiology 99: 872-878.
33. Mahajan Sh, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stress: An Overview. Journal of Biochemistry and Biophysics 446: 139-158.
34. Mendham NJ, Shipway PA, Scott RK(1981) The effects of seed size, autumn nitrogen and plant population density on the response to delayed sowing in winter oil-seed rape (*Brassica napus*). Journal of Agricultural Science 96:417-426.
35. Nayyar H, Bains T S, Kumer S (2005) Chilling stressed chickpea seedling: effect of cold acclimation, calcium and abscise acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Journal of Environmental and Experimental Botany 54: 275-285.
36. Radyuk MS, Domanskaya IN, Shcherbakov RA and Shalygo NV (2010) Effect of low above-zero temperature on the content of low-molecular antioxidants and activities of antioxidant enzymes in green barley leaves. Russian Journal of Plant Physiology 56: 175-180.
37. Saxena MC (1984) Agronomic studies on winter chickpea. In: Saxena MC, Singh KB (Eds.) Proceedings of the Workshop in Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpeas. Aleppo, Syria 123-139.
38. Sumithson JB, Thompson A, Summerfild RJ (1985) Chickpea. In: Summerfild, RJ, Roberts E (eds.) Gavin Legume Crops. Collins Publication: United Kingdom 312-390.
39. Takac T (2004) The relationship of anti-oxidant enzymes and some physiological parameters in maize during chilling. Journal of Plant Soil and Environment 50: 27-32.

40. Tasgin EO, Atici B, albantoglu N, Petrova L (2006) Effects of salicylic acid and cold treatment on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. Journal of Phytochemistry 67: 710-715.
41. Vanaei S, Siosemardeh A, Haidari Gh (2011) The Effects of Cold Stress at Germination and Seedling Stages on Antioxidant Enzymes and Some Physiological Aspects of Chickpea (*Cicer arientinum*). Iranian Journal of Field crops research 9: 514-524. [in Persian with English abstract].
42. Wang WB, Kim YH, Lee HS, Yong Kim K, Deng X, Wak SK (2009) Analysis of antioxidant enzymes activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. Journal of Plant Physiology and Biochemistry 47: 570-577.
43. Yin L, Wang C, Yu Y, Chen C, Cheng Y, Li W(2009) Cold stratification, light and high seed density enhance the germination of (*Ottelia alismoides*) Aquatic. Botany 90: 85-88.
44. Yong Kim SH, Lim MR, Park Y, Kim Y, Won SO, Choi KG, Yun SJ (2005) Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barely roots under saline stress. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 38: 218-224.
45. Yong Z, Hao-Ru T, Ya L (2008) Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. Journal of Agricultural Sciences 4: 456-462.

Electrolyte leakage and catalase and peroxidase activity in chickpea genotypes seedling responding to low temperatures

Agroecology Journal
Volume 12, Issue 2, Pages 25-34
(summer 2016)

Ehsan Fathi
Master of Agronomy
Faculty of Agriculture
Kurdistan University
Sanandaj, Iran
Email ✉: ehsanfathi1988@yahoo.com

Iraj Tahmasebi*
Assistant professor
Department of Agronomy and Plant Breeding
Faculty of Agriculture,
Kurdistan University
Sanandaj, Iran
Email ✉: irajtahmasebi@yahoo.com
(corresponding author*)

NasrinTeimoori
Master of Agronomy
Faculty of Agriculture
Kurdistan University
Sanandaj, Iran
Email ✉: nasrin.teimoori@gmail.com

Received: 3 December 2015 **Accepted:** 24 May 2016

ABSTRACT This study aimed to evaluate the resistance of chickpea genotypes to low temperature stress at seedling growth stage under growth chamber condition. In this experiment treatments consisted of seven temperature levels of -15, -10, -5, 0, 5, 10 and 15 °C and five genotypes of chickpea including Arman, Azad, Pirouz, ILC482 and Kaka. Experiment was in factorial with combination of chickpea genotypes and low temperatures stress arranged in completely randomized design with three replications. Electrolyte leakage of all five chickpea genotypes increased as temperature dropped from 15 to 0°C. So that electrolyte leakage reached the maximum at 0°C. Among all studied genotypes Azad and ILC482 had the highest and lowest electrolyte leakage respectively under all low temperature imposed. Peroxidase and catalase activity increased as temperature decline from 15 to 0°C. Response of various genotypes to below 0°Cwas various in terms of catalase and peroxidase activity. ILC482 genotype had the highest catalase and peroxidase activity. overall, it seems that ILC482 genotype is the most resistant genotype to cold stress compared to other genotypes. Therefore, using ILC482 in areas with hard cooled temperatures during autumn and winter could be recommended.

Keywords:
- antioxidant enzymes
- Azad
- cold stress
- electrolyte leakag
- ILC482
- Pirouz