دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان

مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی
سال دوازدهم، شماره چهل و دوم، ۱۳۹۹

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و متابولیسم بی‌هوازی در ریشه سه لاین امیدبخش گندم تحت تنش غرقابی امیدبخش گندم

فرشته علیزاده واسکسی[۱]، همت الله پیردشتی[۲]، علی چراتی آرایی[۳]، سارا سعادتمند[۱]

دریافت: ۹۷/۹/۲۸ پذیرش: ۹۸/۲/۱۳

چکیده

تنش غرقابی اثرات منفی بر رشد و عملکرد گیاه گندم دارد که شناخت مکانیسم دفاعی گیاه در مقابل غرقابی می‌تواند ارزشمند باشد. به منظور بررسی واکنش سه ژنوتیپ گندم به سطوح مختلف تنش غرقابی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با پنج تکرار در ایستگاه تحقیقات زراعی قراخیل قائمشهر اجرا شد. در این تحقیق تاثیر تنش غرقابی (صفر، ۷، ۱٤ و ۲۱ روز) در دو مرحله پنجه‌زنی (ZG21) و رشد طولی ساقه (ZG31) بر رشد، کلروفیل کل، محتوای پرولین، مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و آنزیم-های مسیر متابولیسم بی‌هوازی ریشه سه ژنوتیپ گندم (N-93-19، N-93-9 و N-92-9) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که تنش غرقابی در هر دو مرحله رشدی باعث کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی و رشد هر سه ژنوتیپ شد با این حال بیشترین میزان وزن خشک اندام هوایی و ریشه و محتوای کلروفیل کل در ژنوتیپ N-92-9 مشاهده شد. تشدید تنش غرقابی باعث افزایش محتوای پرولین، مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، الکل دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز و کاهش فعالیت پراکسیداز ریشه ژنوتیپ‌ها در هر دو مرحله رشد نسبت به گیاه شاهد شد. براساس نتایج این آزمایش، ژنوتیپ N-92-9 پاسخ بهتری نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها در صفت‌های مورد بررسی شده تحت تنش غرقابی نشان داد و به عنوان ژنوتیپ متحمل به غرقابی معرفی گردید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم آنتی اکسیدان، الکل دهیدروژناز، تنش اکسیداتیو، پرولین، لاکتات دهیدروژناز

علیزاده واسکسی، ف.، ه. پیردشتی، ع. چراتی آرایی و س. سعادتمند. ۱۳۹۹. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و متابولیسم بی‌هوازی در ریشه سه لاین امیدبخش گندم تحت تنش غرقابی امیدبخش گندم. مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. ٤۲: ۱٦۱-۱٤۷.

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران- مسئول مکاتبات.
Pirdasht@yahoo.com

۳- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، ساری، ایران

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهمترین محصولات کشاورزی است که بطور گسترده تحت شرایط مختلف آب و هوایی کشت می‌شود. گندم در نواحی با رطوبت‌های مختلف رشد می‌کند که میزان بارندگی آنها بین ۲۵۰ تا ۱۸۰۰ میلیمتر می-باشد، با اینحال بیشتر نواحی کشت گندم متوسط بارندگی بین ۳۸۰ تا ۸۸۰ میلیمتر دارند (هرزوگ و همکاران، ۲۰۱٦). کشت گندم نیاز به رطوبت کافی طی فصل رشد دارد با اینحال، بارندگی یا آبیاری زیاد باعث تنش غرقابی در آن می‌شود. براساس آمار، بیش از ۱۰ تا ۱۵ میلیون هکتار از اراضی کشت شده گندم تحت خطر غرقابی هستند (سیره و همکاران، ۱۹۹٤). اولگون و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که رشد و عملکرد گیاه گندم تحت تنش غرقابی کاهش می‌یابد.

غرقابی یکی از استرس‌های محیطی است که باعث محدود کردن رشد و نمو گیاه می‌شود. کمبود اکسیژن یکی از تنش‌های اولیه ریشه در خاک‌های غرقاب است که متابولیسم گیاه در مراحل مختلف رشدی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (کولمر و ووسنیک، ۲۰۰۹). تحت شرایط آب زیادی، یکی از تغییرات فیزیولوژیکی اساسی، تغییر در مسیرهای تنفسی بی‌هوازی القا شده توسط غرقابی است. در غیاب اکسیژن، ریشه گیاهان برای تامین انرژی، وابسته به مسیرهای تنفسی بی‌هوازی هستند تا فعالیت‌های متابولیکی را حفظ کنند (بیلی‌سیرس و ووسنیک، ۲۰۰۸). بنابراین، سازگاری ریشه‌ها به تنش غرقابی برای زنده ماندن کل گیاه حیاتی است. در مقایسه با گونه‌های حساس به تنش غرقابی، گونه‌های مقاوم توانایی بهتری برای تنظیم فرآیندهای گلیکولیز و تخمیر به اتانول دارند (دری، ۱۹۹۷). بسته به گونه‌های گیاهی و مدت زمان تنش، تغییرات فعالیت آنزیم‌های بی‌هوازی همیشه باعث افزایش تحمل به غرقابی نمی‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و الکل دهیدروژناز در رقم‌های مقاوم و حساس یک گونه گیاهی گزارش شده است (وی و همکاران، ۲۰۱۳؛ یین و همکاران، ۲۰۰۹). فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و الکل دهیدروژناز در ریشه‌های رقم سورگوم (*Sorghum bicolor*) متحمل به غرقابی طی ۷۲ ساعت تنش غرقابی افزایش پیدا کرد در حالیکه در ریشه یک رقم حساس سورگوم، افزایش گذرا در ۲٤ ساعت پس از تنش غرقابی اتفاق افتاد که بعد از آن با کاهش در فعالیت آنها همراه بود (جین و همکاران، ۲۰۱۰). علاوه براین، گونه‌های گیاهی در انتخاب مسیرهای تنفس بی‌هوازی تحت شرایط غرقابی متفاوت هستند. در گزارشی نشان داده شد در رقم متحمل گل داوودی (*Dendranthema zawadskii*) تحت تنش غرقابی فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز ریشه افزایش یافت درحالیکه رقم گل داوودی حساس به تنش غرقابی (*Dendranthema nankingense*) از تخمیر اسید لاکتیک به عنوان مسیر اصلی تنفس بی‌هوازی استفاده کرد (یین و همکاران، ۲۰۱۰).

تنش غرقابی باعث اختلال در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری می‌شود که موجب تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) و در نتیجه آسیب به سلول می‌شود. گیاهان نیز دارای سیستم‌های دفاعی هستند که با خنثی‌سازی و جاروب کردن اکسیژن‌های فعال از سلول‌های گیاهی در مقابل آسیب اکسیداتیوی محافظت می‌کنند (میتلر، ۲۰۰۲). در سیستم‌های دفاعی، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نقش مرکزی در کاتالیز دیسموتاسیون سوپراکسید آنیون (O_2^-) به پراکسید هیدروژن و مولکول اکسیژن (O_2) دارد. کاهش یا عدم تغییر در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و همچنین دیگر آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز تحت غرقابی در گونه‌های مختلف گیاهی گزارش شده است (آربونا و همکاران، ۲۰۰۸؛ تان و همکاران، ۲۰۱۰؛ وانگ و جیانگ، ۲۰۰۷). مشابه متابولیسم غیرهوازی، پاسخ‌های متفاوت آنزیم‌های آنتی اکسیدان به غرقابی به گونه‌های گیاهی، مدت و شدت تنش غرقابی بستگی دارد.

شرایط خاص جلگه‌های مازندران به نحوی است که بارندگی‌های نسبتا سنگین در فصل‌های پاییز و زمستان و همچنین بافت سنگین خاک همراه با زهکشی ضعیف، منجر به بوجود آمدن شرایط ماندابی می‌شود. از آنجا که کشت دوم (پس از برنج) در مزارع کشاورزی استان مازندران خصوصا در مناطق شرقی استان به کشت گندم اختصاص داده می شود، شرایط ماندابی در اثر غرقاب شدن مزارع، خسارات جبران‌ناپذیری به محصول وارد می نماید. لذا دستیابی به ارقامی از گندم که در شرایط مطلوب توانایی تولید محصول بالاتری داشته و در عین حال در شرایط تنش غرقابی نیز میزان تحمل بیشتری از خود نشان دهند، از جمله ضروریات این تحقیق بوده است. بنابراین با توجه به اهمیت گیاه گندم، در این تحقیق تاثیر سطوح مختلف تنش غرقابی بر رشد و صفات بیوشیمیایی مانند محتوای کلروفیل، پرولین، تنش اکسیداتیو (محتوای مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن)، آنزیم‌ها آنتی

اکسیدان و آنزیم‌های مسیر تنفس بی‌هوازی (الکل دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز) در سه ژنوتیپ امیدبخش گندم در دو مرحله پنجه‌زنی و رشد طولی ساقه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در بهار ۱۳۹۶ در گلخانه ایستگاه تحقیقات کشاورزی قراخیل وابسته به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. تعداد ۲۰ عدد بذر هر کدام از سه ژنوتیپ امیدبخش گندم (N-93-19, N-93-9 و N-92-9) در گلدان‌های پلاستیکی (ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر و قطر ۲۳ سانتی‌متر) جوانه‌دار شدند. گلدان‌ها با چهار کیلوگرم از خاک مزرعه‌ای اتوکلاو شده پر شدند که به هر گلدان کودهای اکسید پتاسیم (۲/٤ گرم)، سوپرفسفات تریپل (۳/۲ گرم) و سولفات آمونیوم (٤ گرم) اضافه شد. بعد از جوانه‌زنی بذرها، تعداد گیاهچه‌ها به ۱۰ عدد در هر گلدان کاهش یافت. تیمارهای غرقابی شامل صفر، ۷، ١٤ و ۲۱ روز در مراحل پنجه‌زنی (ZG21) و رشد طولی ساقه (ZG31) با پنج تکرار اعمال شد. در مرحله رشد طولی ساقه، گیاهان تحت تیمار ۲۱ روز غرقابی به طور کامل از بین رفتند که نمونه‌برداری برای این تیمار انجام نشد. تنش غرقابی با قرار دادن گلدان‌ها در گلدان‌های بزرگتر (ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر و قطر ۳۰ سانتی‌متر) پر شده با آب تا ارتفاع دو سانتی‌متر بالاتر از سطح خاک گلدان انجام شد. گلدان‌های شاهد (بدون تنش غرقابی) به میزان موردنیاز آبیاری شدند تا از تنش غرقابی و خشکی جلوگیری شود. تمام گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای با دمای روز/شب ۲۰/۲۸ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۵۵ تا ٦۵ درصد و مدت روشنایی ١٤ روز نگهداری شدند. بعد از اتمام دوره تنش، نمونه‌برداری انجام شد و برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

محتوای کلروفیل کل از روش آرنون و همکاران (۱۹٤۹) اندازه‌گیری شد که برای این منظور، یک گرم از برگ تازه گیاه با استون ۸۰ درصد کوبیده شد و بعد از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه، جذب محلول رویی در طول موج‌های ٦٤۵ و ٦٦۳ نانومتر ثبت گردید. جهت اندازه‌گیری پرولین آزاد ریشه گیاه گندم از عصاره الکلی ریشه استفاده شد. پرولین با قرائت جذب واکنش نین هیدرین در طول موج ۵۱۵ نانومتر طبق روش بیتس و همکاران (۱۹۷۳) محاسبه شد. برای اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن، ۰/۵ گرم از بافت تازه ریشه با محلول اسید تری کلرواستات ۱ درصد (TCA) کوبیده شد و بعد از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، جذب محلول واکنش (محلول رویی (۰/۵ میلی‌لیتر) + پتاسیم یدید ۱ مولار (۱ میلی‌لیتر) + بافر فسفات پتاسیم ۱۰میلی-مولار (۰/۵ میلی‌لیتر، pH 7) در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد (ولیکووا و همکاران، ۲۰۰۰). با تعیین محتوای مالون دی آلدئید (MDA) با استفاده از روش اسید تیوباربیتوریک مطابق روش هیث و پاکر (۱۹٦۸) و ضریب خاموشی ۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$، میزان پراکسیداسیون لیپید غشا اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های مسیر تنفس بی‌هوازی، ابتدا بافت تازه ریشه با محلول ۵ درصد پلی وینیل پلی پیرولیدون (w:fw) و بافر استخراج آنزیم (تریس اسید کلریدریکی ۵۰ میلی-مولار با اسیدیته ۷/۵ شامل DDT–دی تیوتریتول ۱ میلی‌مولار) هموژن شد. بعد از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه، از محلول رویی برای سنجش آنزیم‌ها استفاده شد. سنجش آنزیم‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر و از طریق اکسیداسیون NADH در طول موج ۳٤۰ نانومتر انجام شدند. فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز با اندازه‌گیری میزان جذب محلول واکنش که شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، NADH ۰/۲ میلی‌مولار، استالدهید ۵ میلی-مولار و عصاره آنزیمی است، انجام شد (هانسن و همکاران، ۱۹۸٤). فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز نیز با اندازه‌گیری میزان جذب محلول واکنش که شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، NADH ۰/۲ میلی‌مولار، سیانید پتاسیم ۳ میکرومولار، ٤-متیل پیرازول ٤ میلی‌مولار، سدیم پیروات ۱۰ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی است، انجام شد (هانسن و جاکوبسن، ۱۹۸٤).

برای استخراج پروتئین محلول کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، یک گرم بافت ریشه با ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) هموژن شد و بعد از سانتریفیوژ در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه، از محلول رویی برای سنجش پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها استفاده گردید. برای اندازه‌گیری پروتئین محلول کل از روش برادفورد (۱۹۷٦) استفاده شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با قابلیت آن در بازدارندگی واکنش احیایی فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) اندازه‌گیری شد. محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.5)، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۷۵ میکرومولار و عصاره آنزیمی بود که در طول موج ۵٦۰ نانومتر خوانده شد (جیانوپولیتیس و ریس، ۱۹۷۷). فعالیت کاتالاز طبق روش آئبی (۱۹۸٤) و در طول موج ۲٤۰ نانومتر اندازه-گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH

7)، آب اکسیژنه ۷۰ میلی‌مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، آب مقطر و عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز مطابق روش همدا و کلین (۱۹۹۰) در طول موج ٤٧٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7)، گایاکول ۱۰ میلی‌مولار محلول در آب دوبار تقطیر، پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7)، آب مقطر استریل و عصاره آنزیمی بود.

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) و آزمون مقایسه میانگین توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد انجام شد و رسم نمودارها با اکسل صورت گرفت.

نتایج و بحث

وزن خشک اندام هوایی و ریشه

تجزیه واریانس نشان داد اثر ژنوتیپ و تیمار غرقابی بر وزن خشک ریشه در هر دو مرحله پنجه‌زنی و رشدطولی ساقه در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱ و ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد تیمار غرقابی در هر دو مرحله رشدی باعث کاهش معنی‌داری در وزن خشک ریشه هر سه ژنوتیپ گندم شد. در مرحله پنجه‌زنی، بیشترین کاهش تحت تیمار ۲۱ روز غرقابی مشاهده شد که میزان کاهش در رقم‌های N-93-19، N-93-9 و N-92-9 به ترتیب به میزان ۲۹/۳۹، ۲۸/۸۳ و ۱۰/۸۸ درصد نسبت به تیمارهای شاهد بود (شکل ۱ الف). در مرحله رشد طولی ساقه نیز بیشترین کاهش در هر سه ژنوتیپتحت تنش غرقابی ١٤ روز مشاهده شد که رقم N-93-19 بیشترین میزان کاهش را نشان داد (شکل ۱ ب). تیمار غرقابی در هر دو مرحله رشدی باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی هر سه ژنوتیپ گندم شد بطوری‌که بیشترین کاهش تحت تیمار ۲۱ و ١٤ روز غرقاب به ترتیب در مرحله پنجه‌زنی و رشد طولی ساقه مشاهده شد. بیشترین میزان کاهش در ژنوتیپ N-93-19 تحت تیمار غرقابی ۲۱ روز به میزان۱۹/۰۸ درصد و تیمار ١٤ روز غرقابی به میزان ۹/٤١ درصد ثبت گردید (شکل ۲). با توجه به اهمیت گندم و تاثیری که تنش غرقابی بر رشد و عملکرد آن دارد، اثرات تنش غرقابی بر گندم بیش از بقیه گیاهان زراعی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار تنش غرقابی باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک ریشه و اندام هوایی هر سه ژنوتیپ در هر دو مرحله پنجه‌زنی (ZG21) و رشد طولی ساقه (ZG31) شد، با اینحال، ژنوتیپ N-92-9 واکنش بهتری نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها داشت. نتایج مشابهی از تاثیر منفی تنش غرقابی بر رشد گیاه گندم توسط لی و همکاران (۲۰۱۱) و مرعشی و چینچانیکار (۲۰۱۲) گزارش شده است. بکشنده (۱۹۸۹) در گزارشی بیان کرد تنش غرقابی به مدت ٢٤ ساعت در مرحله ۳ برگی تاثیری بر رشد اندام هوایی و ریشه گیاه گندم نداشت اما تنش در زمان کاشت و مرحله قبل از دو برگی بطور معنی‌داری رشد رویشی گیاه گندم را کاهش داد. کاتاشی و همکاران (۲۰۰۷) کاهش ماده خشک گیاهچه‌های جو و گندم را در مرحله یک برگی به ترتیب به میزان ۵۹ و ۷۳ درصد در شرایط تنش غرقابی ۱۲ روز اعلام کردند که نشان دهنده حساسیت بیشتر گندم به تنش غرقابی می‌باشد. شارما و سوارپ (۱۹۸۸) در یک تحقیق که روی گیاه گندم انجام دادند بیان داشتند دلیل کاهش رشد گیاه تحت تنش غرقابی می‌تواند کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی، کاهش جذب عناصر غذایی و افزایش رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو باشد که باعث کاهش تعداد پنجه و رشد گیاه می‌شود. بنابراین، نتایج این پژوهش نشان داد که رقم N-92-9 پاسخ بهتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها به تنش غرقابی نشان داده و رشد بهتری در هر دو مرحله رشدی داشت.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، تنش غرقابی و اثر متقابل آنها بر رشد، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و مسیر متابولیسم بی‌هوازی در ریشه سه ژنوتیپ گندم در مرحله پنجه‌زنی

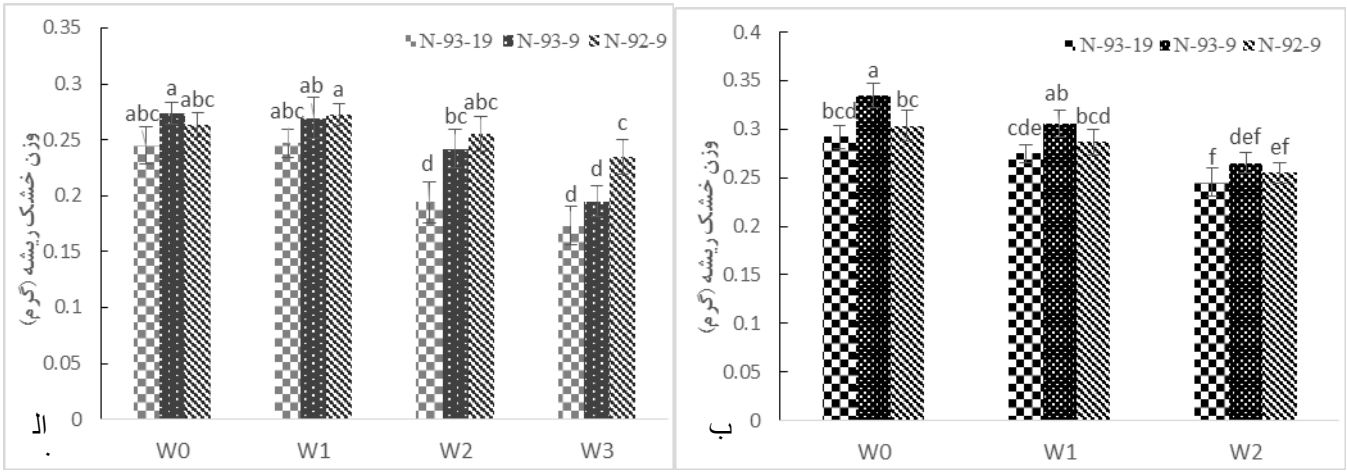
	df	وزن خشک ریشه	وزن خشک اندام هوایی	کلروفیل کل	پرولین	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	سوپراکسید دیسنوتاز	پراکسیداز	کاتالاز	لاکتات دهیدروژناز	الکل دهیدروژناز
ژنوتیپ	۲	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۴**	۰/۱۹**	۳۵**	۹**	۸**	۴۳**	۹۸۶۰۴**	۱۶۹۲۰**	۰/۵**	۴**
تنش غرقابی	۳	۰/۰۰۸**	۰/۰۰۸**	۱/۸**	۱۱۵**	۵۹**	۴۹**	۷۷۳۹**	۸۱۶۰۱۵**	۱۹۱۷**	۱۴**	۲۰**
ژنوتیپ * تنش	۶	۰/۰۰۰۶^{ns}	۰/۰۰۰۵*	۰/۰۲**	۱۰**	۲**	۰/۹**	۷۸**	۱۱۱۴۵**	۳۷۰۹**	۰/۴**	۰/۷**
خطا		۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۷	۰/۰۱	۰/۰۱	۱/۸	۱۵۰۹	۴۲	۰/۰۲	۰/۰۱
ضریب تغییرات		۶/۳	۳/۱	۴	۲	۱/۸	۱/۹	۱/۴	۴/۹	۵/۴	۳/۲	۳/۲

^{ns}، ** و * به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد

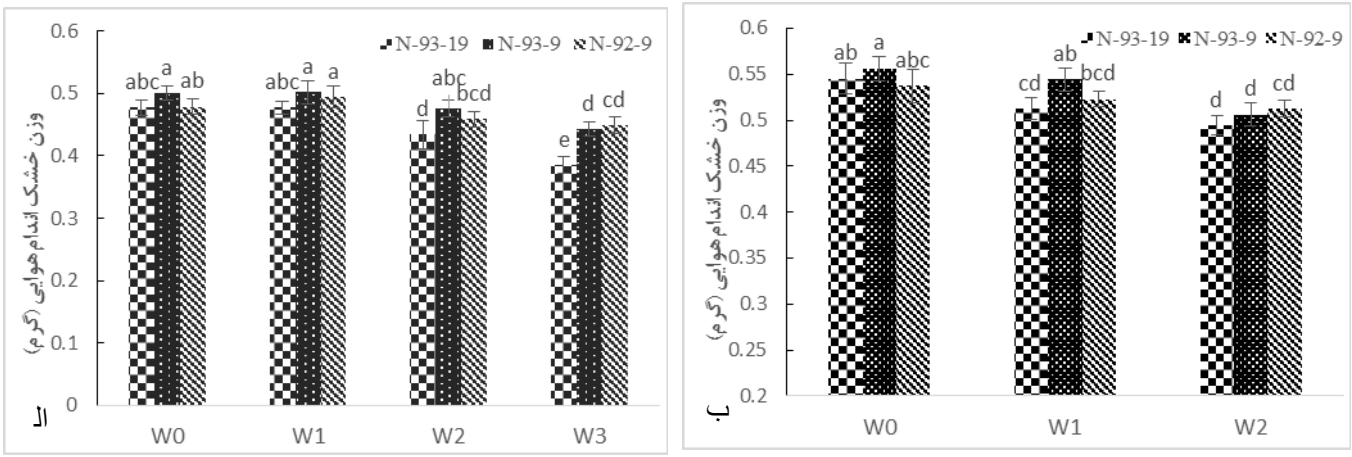
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، تنش غرقابی و اثر متقابل آنها بر رشد، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و مسیر متابولیسم بی‌هوازی در ریشه سه ژنوتیپ گندم در مرحله رشد طولی ساقه

	df	وزن خشک ریشه	وزن خشک اندام هوایی	کلروفیل کل	پرولین	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	سوپراکسید دیسنوتاز	پراکسیداز	کاتالاز	لاکتات دهیدروژناز	الکل دهیدروژناز
ژنوتیپ	۲	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۰۸*	۰/۱۲**	۲۱**	۱۳**	۷**	۳۵۵**	۵۷۸۲۴**	۸۰۳۷**	۰/۶**	۳**
تنش غرقابی	۲	۰/۰۰۷**	۰/۰۰۴**	۱/۴**	۱۷۳**	۹۷**	۷۳**	۷۹۸۱**	۸۲۷۸۹۸**	۳۲۲*	۱۷**	۲۷**
ژنوتیپ * تنش	۴	۰/۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۳^{ns}	۰/۰۴**	۸**	۵**	۲**	۲۸**	۹۸۹۲**	۴۹۴۸**	۱**	۱/۱**
خطا		۰/۰۰۰۱۶	۰/۰۰۰۱۷	۰/۰۰۳	۰/۰۱۵	۰/۰۱۶	۰/۰۳	۲/۵	۱۵۵۰	۵۶	۰/۰۱۷	۰/۰۳
ضریب تغییرات		۴/۴	۲/۵	۵	۲/۷	۲/۱	۲/۵	۱/۶	۴/۸	۵/۹	۳/۳	۴

^{ns}، ** و * به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد



شکل ۱- تاثیر تنش غرقابی (W0: ۰، W1: ۷، W2: ۱٤ و W3: ۲۱ روز) بر وزن خشک ریشه ژنوتیپ‌های گندم در مرحله پنجه‌زنی (الف) و رشد طولی ساقه (ب). میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD ندارند (۵ تکرار).

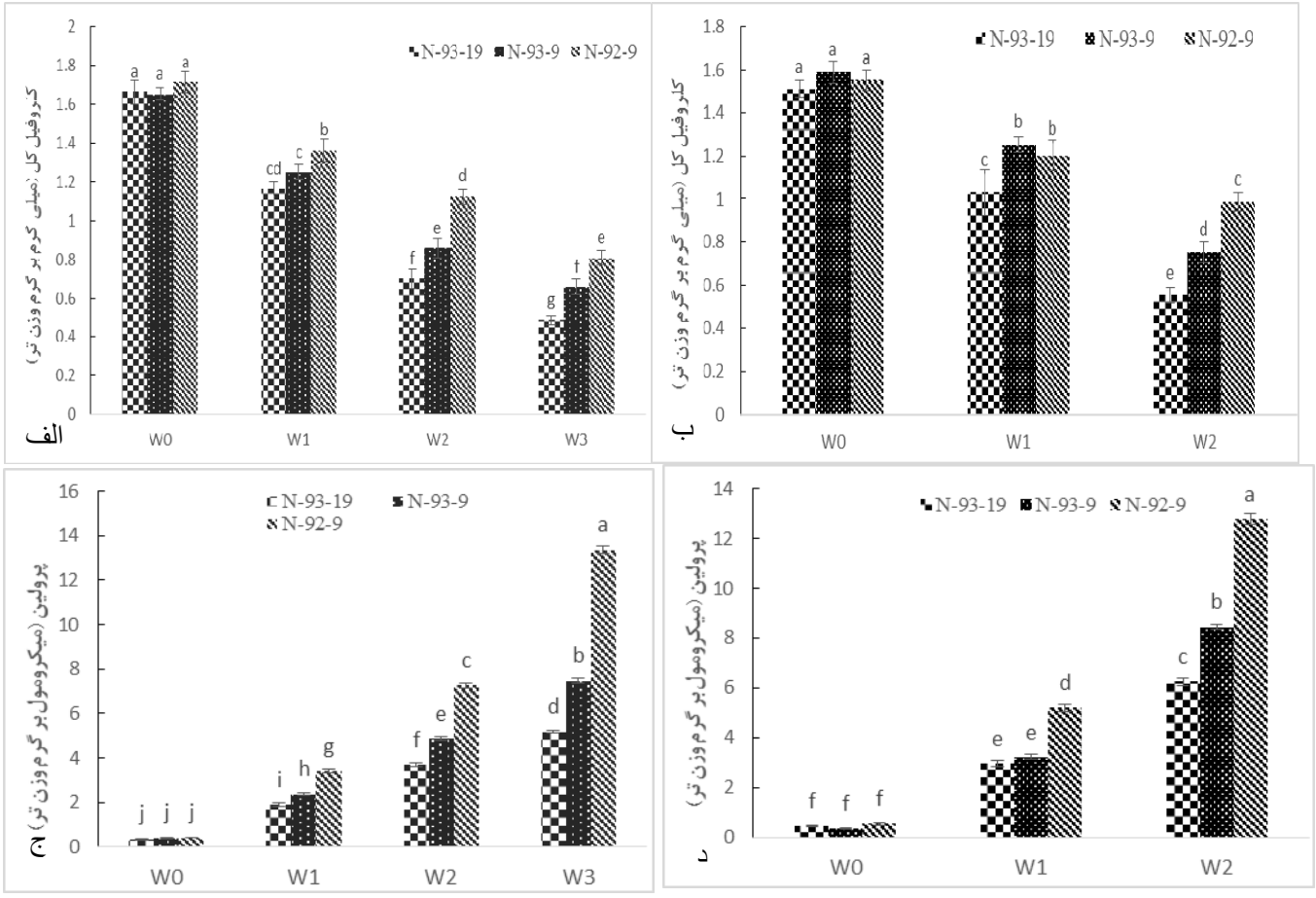


شکل ۲- تاثیر تنش غرقابی (W0: ۰، W1: ۷، W2: ۱٤ و W3: ۲۱ روز) بر وزن خشک اندام هوایی ژنوتیپ‌های گندم در مرحله پنجه‌زنی (الف) و رشد طولی ساقه (ب). میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD ندارند (۵ تکرار)

محتوای کلروفیل کل

آنالیز واریانس محتوای کلروفیل کل نشان داد اثر تیمار ژنوتیپ، تنش غرقابی و اثر متقابل آن‌ها در هر دو مرحله پنجه-زنی و رشد طولی ساقه بر محتوای کلروفیل کل در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱ و ۲). تحت تیمار شاهد (بدون غرقابی) تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها وجود نداشت اما اعمال تنش غرقابی باعث کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل کل در هر دو مرحله رشدی گردید و افزایش مدت زمان غرقابی باعث کاهش بیشتر محتوای کلروفیلی شد. بین ژنوتیپ‌ها مورد پژوهش در این آزمایش نیز در سطوح مختلف غرقابی تفاوت معنی‌داری وجود داشت، بطوری‌که در تمام سطوح غرقابی، ژنوتیپ N-93-19 کمترین میزان و ژنوتیپ N-92-9 بیشترین میزان کلروفیل را داشتند (شکل ۳). محتوای کلروفیل بالا تحت شرایط تنش‌زا می-تواند راهکاری مناسب برای بهبود رشد و عملکرد گیاه تحت تنش باشد (قربانی و همکاران، ۲۰۱۸a). پنگ و همکاران (۲۰۰٤) بیان داشتند تنش غرقابی باعث کاهش محتوای کلروفیل و در نتیجه کاهش میزان تثبیت دی‌اکسید کربن در گیاه جو می-شود. اسمتورست و شابالا (۲۰۰۳) گزارش کردند محتوای کلروفیل در تمام ژنوتیپ‌های یونجه تحت تنش غرقابی با کاهش همراه بود. بررسی مدت زمان تنش غرقابی بر محتوای کلروفیل در این آزمایش نشان داد که افزایش مدت زمان غرقابی باعث کاهش بیشتر محتوای کلروفیل کل شد که مطابق نتایج بدست آمده توسط اولگون و همکاران (۲۰۰۸) و دوان و همکاران (۲۰۱۸) بود.

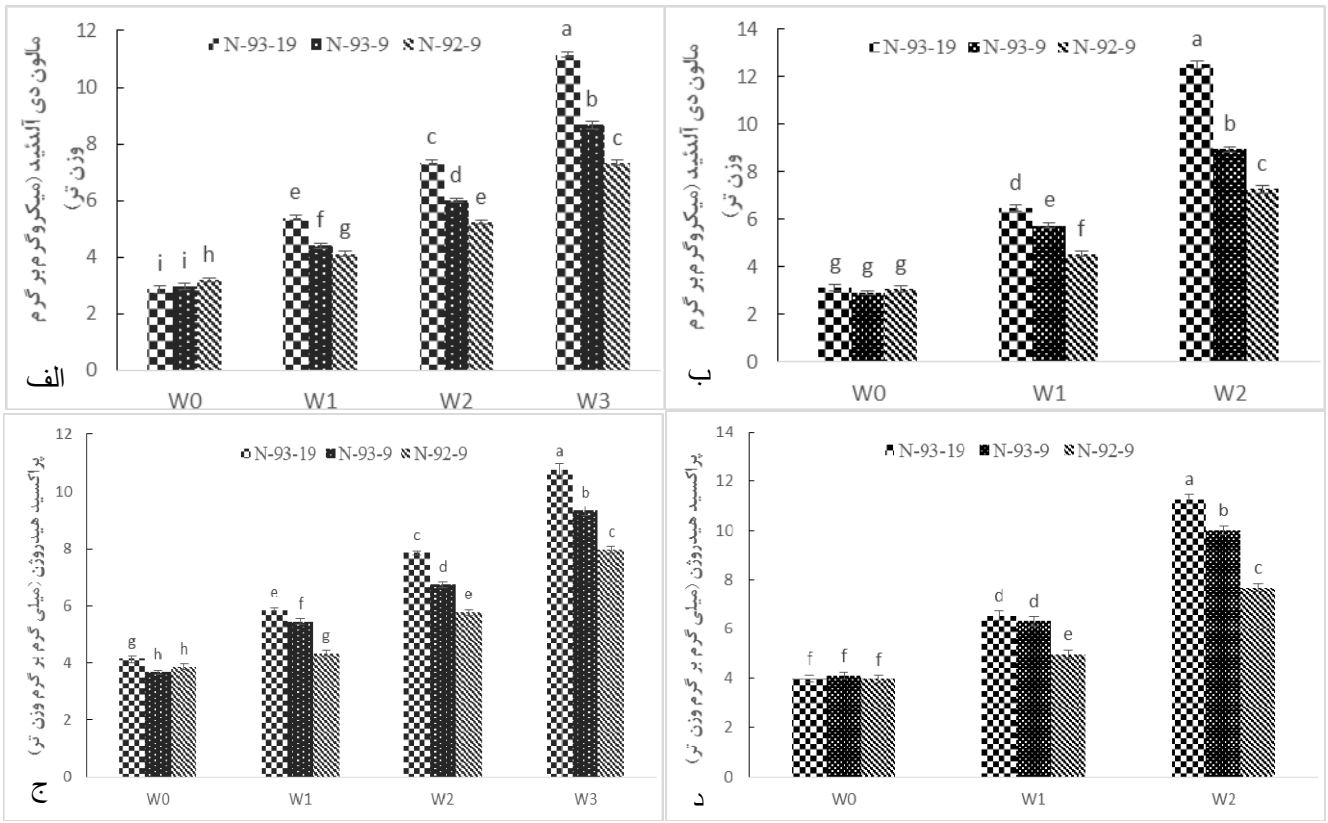
محتوای پرولین: محتوای پرولین ریشه در هر سه ژنوتیپ در مرحله پنجه‌زنی با اعمال تیمار غرقابی افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد که افزایش مدت زمان غرقابی باعث افزایش بیشتر محتوای پرولین شد. بیشترین افزایش در محتوای پرولین مربوط به رقم N-92-9 در تمام سطوح غرقابی نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر بود (شکل ۳ ج). در مرحله رشد طولی ساقه، در هر سه ژنوتیپ گندم با اعمال تنش غرقابی، محتوای پرولین ریشه افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد. بین ژنوتیپ‌ها نیز تفاوت معنی‌داری وجود داشت بطوریکه ژنوتیپ N-92-9 بیشترین و N-93-19 کمترین محتوای پرولین در تمام سطوح غرقابی را نشان دادند (شکل ۳ د).حفظ تعادل آب گیاه تحت استرس‌های محیطی برای تحمل تنش توسط گیاه اهمیت زیادی دارد، که پرولین یکی از مهمترین ترکیبات اسمولیت سازگار می‌باشد (قربانی و همکاران، ۲۰۱۸b؛ قربانی و همکاران، ۲۰۰۹). افزایش محتوای پرولین تحت تنش غرقابی مطابق نتایج بدست آمده توسط اولگون و همکاران (۲۰۰۸) بود. با توجه به نقش پرولین در تنظیم اسمزی سلول و حفظ ثبات ساختمان غشا و پروتئین‌ها، افزایش غلظت آن تحت غرقابی می‌تواند باعث افزایش تحمل گیاه به تنش شود که رقم N-92-9 با افزایش بیشتر پرولین نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها، نشان داد از توانایی بیشتری برای مقابله با اثرات نامطلوب تنش غرقابی برخوردار است. ویدمچک و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند ژنوتیپ‌های مختلف گندم توانایی متفاوتی برای سنتز و تجمع پرولین دارند که بر میزان تحمل آنها به غرقابی تاثیر می‌گذارد.



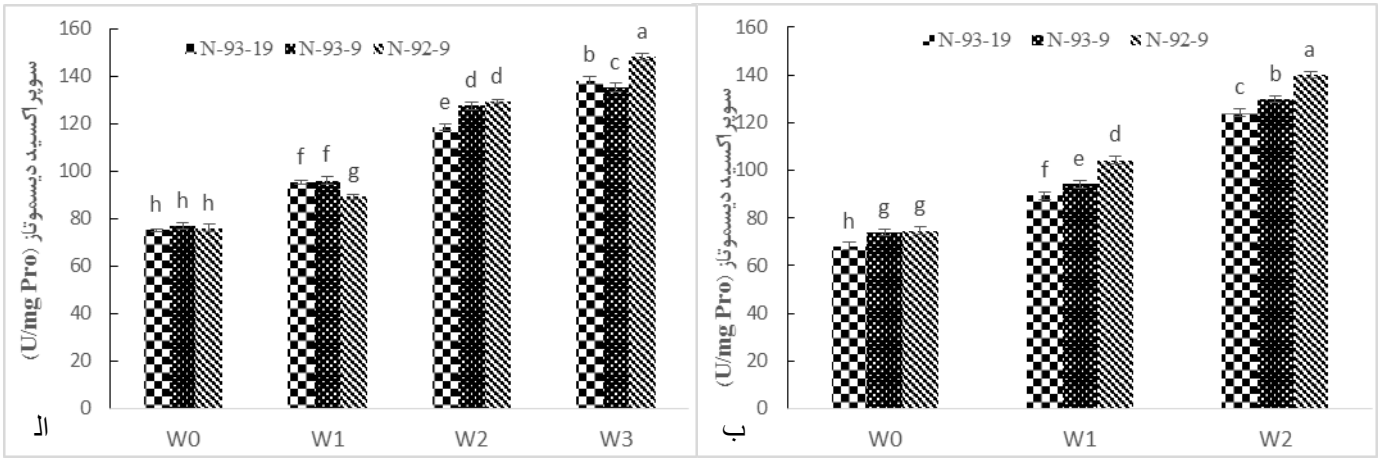
شکل ۳- تاثیر تنش غرقابی (W0: ۰، W1: ۷، W2: ۱۴ و W3: ۲۱ روز) بر محتوای کلروفیل کل برگ (الف و ب) و پرولین ریشه (ج و د) ژنوتیپ‌های گندم در مرحله پنجه‌زنی (الف و ج) و رشد طولی ساقه (ب و د). میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD ندارند (۵ تکرار)

محتوای مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن

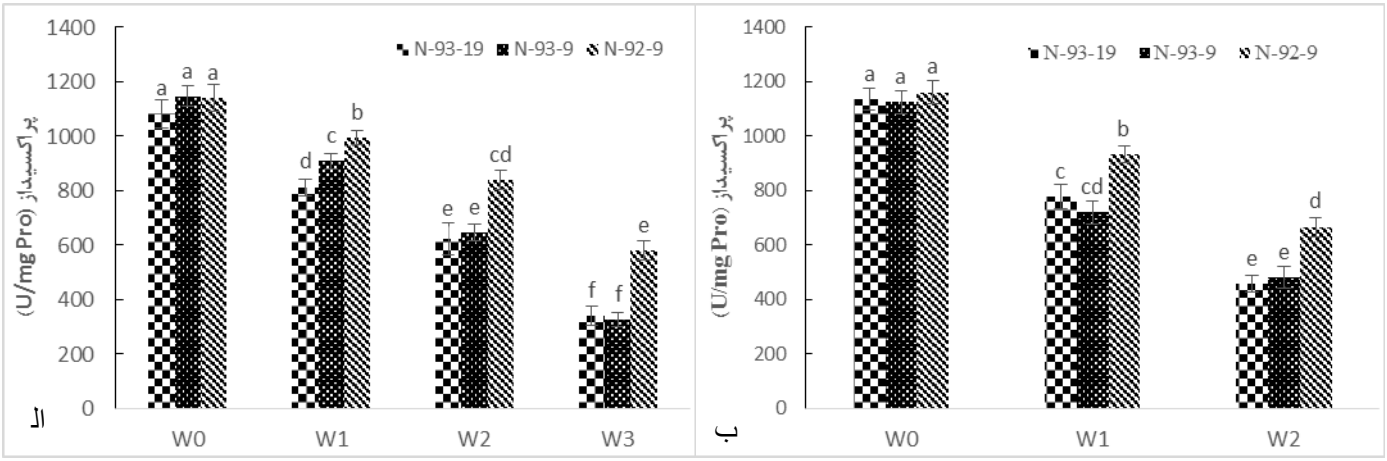
آنالیز واریانس نشان داد اثر تیمار ژنوتیپ، غرقابی و اثر متقابل آن‌ها بر محتوای MDA و پراکسید هیدروژن ریشه در دو مرحله پنجه‌زنی و رشد طولی ساقه در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱ و ۲). استرس اکسیداتیو القاء شده توسط تنش غرقابی باعث پراکسیداسیون لیپید و آسیب به غشا می‌شود که به صورت MDA اندازه‌گیری می‌شود. محتوایMDA ریشه در هر دو مرحله پنجه‌زنی و رشد طولی ساقه تحت تنش غرقابی افزایش معنی‌داری در هر سه ژنوتیپ نسبت به تیمارهای شاهد مربوطه نشان داد که ژنوتیپ N-93-19 بیشترین افزایش را نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها در تمام سطوح غرقابی داشت (شکل ٤). نتایج مربوط به پراکسید هیدروژن نشان داد در دو مرحله پنجه-زنی و رشد طولی ساقه، تنش غرقابی باعث افزایش معنی‌داری محتوای پراکسید هیدروژن در هر سه ژنوتیپ نسبت به تیمار شاهد شد که افزایش مدت زمان غرقابی باعث افزایش بیشتر پراکسید هیدروژن شد و بیشترین افزایش تحت غرقابی ۲۱ روز مشاهده شد. در تمام سطوح غرقابی بین هر سه ژنوتیپ نیز تفاوت معنی‌داری وجود داشت بطوری‌که بیشترین میزان پراکسید هیدروژن در ژنوتیپ N-93-19 و کمترین میزان در ژنوتیپ N-92-9 اندازه‌گیری شد (شکل ٤). بسته شدن روزنه‌ها و کاهش میزان در دسترس بودن دی اکسید کربن تحت شرایط غرقابی باعث افزایش تولید انواع اکسیژن فعال و در نتیجه تنش اکسیداتیو در گیاه می‌شود (گوست و همکاران، ۱۹۹٤). نتایج این تحقیق مطابق نتایج آربونا و همکاران (۲۰۰۸) می‌باشد که نشان دادند تنش غرقابی باعث افزایش MDA و پراکسید هیدروژن در هر سه ژنوتیپ پرتقال مورد بررسی شد، با اینحال میزان افزایش MDA و پراکسید هیدروژن در ژنوتیپ متحمل کمتر بود. نتایج این تحقیق نشان داد تنش غرقابی باعث افزایش محتوای MDA و پراکسید هیدروژن در گیاه گندم شده که نشان‌دهنده میزان تنش اکسیداتیو و آسیب وارده به غشای سلولی و بخش‌های مختلف سلولی می‌باشد. بااینحال، تفاوت قابل توجه‌ای بین ژنوتیپ‌ها وجود داشت که نشان دهنده تفاوت در ظرفیت دفاعی ژنوتیپ‌ها در مقابل تنش اکسیداتیوی حاصل تنش غرقابی می‌باشد.



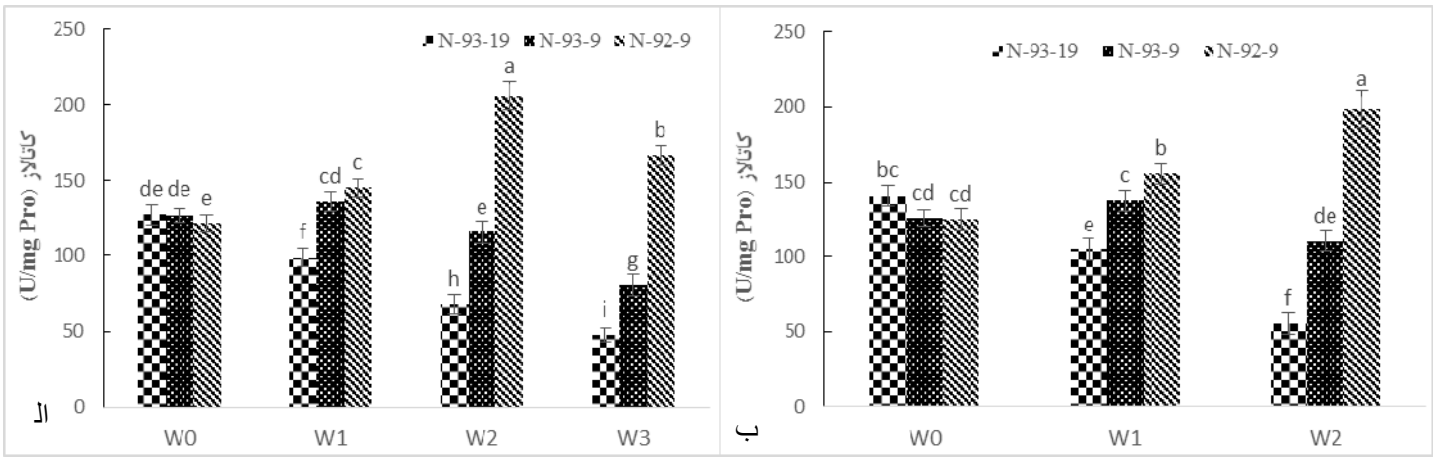
شکل ٤- تاثیر تنش غرقابی (W0: ۰، W1: ۷، W2: ١٤ و W3: ۲۱ روز) بر محتوای مالون دی آلدئید (الف و ب) و پراکسید هیدروژن (ج و د) ریشه ژنوتیپ‌های گندم در مرحله پنجه‌زنی (الف و ج) و رشد طولی ساقه (ب و د). میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD ندارند (۵ تکرار)



شکل ۵- تاثیر تنش غرقابی (W0: ۰، W1: ۷، W2: ۱۴ و W3: ۲۱ روز) بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ریشه ژنوتیپ‌های گندم در مرحله پنجه‌زنی (الف) و رشد طولی ساقه (ب). میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD ندارند (۵ تکرار)



شکل ٦- تاثیر تنش غرقابی (W0: ۰، W1: ۷، W2: ۱٤ و W3: ۲۱ روز) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه ژنوتیپ‌های گندم در مرحله پنجه‌زنی (الف) و رشد طولی ساقه (ب). میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD ندارند (۵ تکرار)



شکل ۷- تاثیر تنش غرقابی (W0: ۰، W1: ۷، W2: ۱٤ و W3: ۲۱ روز) بر فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه ژنوتیپ‌های گندم در مرحله پنجه‌زنی (الف) و رشد طولی ساقه (ب). میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD ندارند (۵ تکرار)

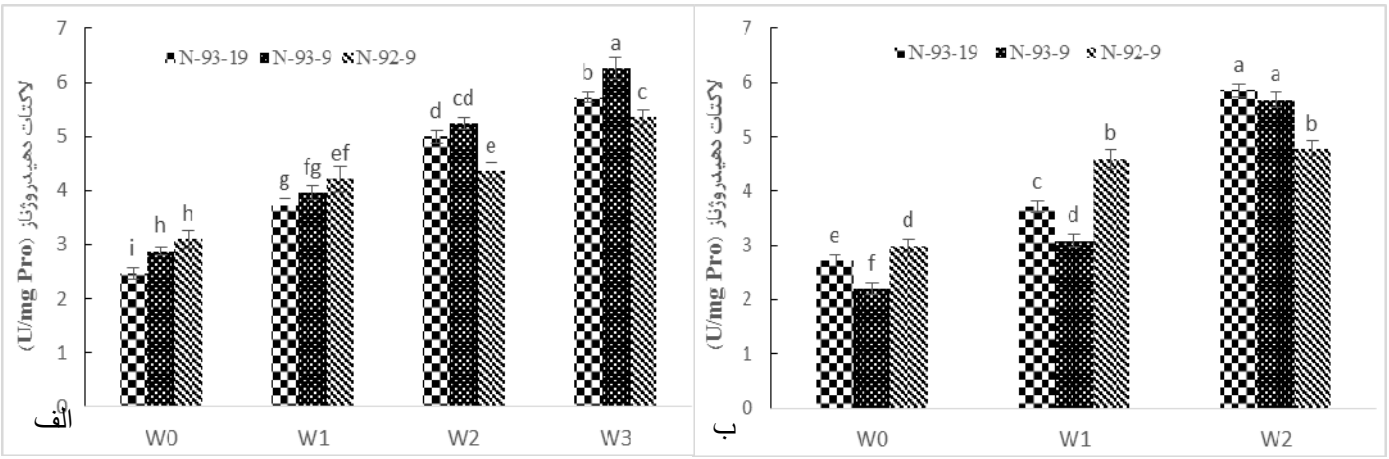
فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان

آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد تاثیر تیمار غرقابی، ژنوتیپ و اثر متقابل آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱ و ۲). مقایسه میانگین صفات نشان داد اعمال تنش غرقابی در مرحله پنجه‌زنی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در هر سه ژنوتیپ نسبت به تیمار شاهد شد که بیشترین افزایش در تیمار ۲۱ روز غرقابی مشاهده شد بطوری‌که میزان افزایش در ژنوتیپ‌های N-93-19، N-93-9 و N-92-9 به ترتیب به میزان ۸۳/۷٦، ۷٦/۰۵ و ۹٤/۷٦ درصد نسبت به تیمار شاهد بود (شکل ۵ الف). در مرحله رشد طولی ساقه نیز غرقابی باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت به تیمار شاهد شد که در تمام سطوح تنش، ژنوتیپ N-92-9 بیشترین افزایش را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان داد (شکل ۵ ب). نتایج مربوط به فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد تیمار تنش غرقابی باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز در هر دو مرحله پنجه‌زنی و رشد طولی ساقه در هر سه ژنوتیپ گندم شده و افزایش مدت زمان غرقابی باعث کاهش بیشتر فعالیت آنزیم پراکسیداز گردید، بطوری‌که در دو مرحله پنجه‌زنی و رشد طولی ساقه به ترتیب بیشترین میزان کاهش تحت تیمار ۲۱ و ۱٤ روز غرقابی مشاهده شد (شکل ٦). در تمام سطوح غرقابی بین ژنوتیپ‌ها هم تفاوت معنی‌داری وجود داشت بطوری‌که کمترین و بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز به ترتیب در ژنوتیپ‌های N-93-19 و N-92-9 در تمام سطوح غرقابی در هر دو مرحله رشدی مشاهده شد (شکل ٦). فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد پاسخ ژنوتیپ‌ها به تنش غرقابی متفاوت بود. در مرحله پنجه‌زنی، فعالیت کاتالاز در N-93-19 با اعمال تنش و افزایش مدت زمان غرقابی روند کاهشی نشان داد و کمترین میزان فعالیت تحت تنش ۲۱ روزه مشاهده شد اما در ژنوتیپ N-93-9، تیمار ۷ روز غرقابی باعث افزایش فعالیت آنزیم شد و روند کاهشی از تیمار ۱٤ روز غرقابی شروع شد و تحت تنش ۲۱ روز به کمترین میزان خود در این ژنوتیپ رسید (شکل ۷ الف). در ژنوتیپ N-92-9 اعمال تنش غرقابی باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز شد و بیشترین فعالیت تحت تنش ۱٤ روز مشاهده شد، هرچند افزایش مدت زمان تنش به ۲۱ روز با کاهش فعالیت نسبت به تیمار ۱٤ روز همراه بود اما همچنان نسبت به تیمار شاهد فعالیت بیشتری داشت (شکل ۷ الف). در مرحله رشد طولی ساقه، در ژنوتیپ N-92-9 فعالیت کاتالاز روند افزایشی داشت و بیشترین میزان افزایش تحت تیمار ۱٤ روز غرقابی ثبت گردید. در ژنوتیپ N-93-19 تیمار غرقابی باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شد و کمترین میزان تحت تنش ۱٤ روز غرقابی مشاهده شد اما در ژنوتیپ N-93-9 کاهش فعالیت کاتالاز تحت تیمار ۱٤ روز غرقابی مشاهده شد و بین تیمار شاهد و ۷ روز غرقابی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۷ ب). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز می‌تواند نقش مهمی در تحمل به تنش غرقابی داشته باشد. نتایج این آزمایش نشان داد در هر سه ژنوتیپ، با افزایش مدت زمان تنش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز روند افزایشی و فعالیت آنزیم پراکسیداز روند کاهشی داشتند. با این وجود، فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش غرقابی در ژنوتیپ N-92-9 روند افزایشی داشته اما در دو ژنوتیپ N-93-19 و N-93-9 روند کاهشی مشاهده شد. در سایر گزارش‌های سایر محققین اظهار شده است که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تحت شرایط غرقابی باعث افزایش تحمل گیاه به تنش اکسیداتیو حاصل از غرقابی می‌شود (آربونا و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج این پژوهش مطابق نتایج بدست آمده توسط بلوخینا و همکاران (۲۰۰۱) می‌باشد که بیان داشتند تنش اکسیداتیو تحت تنش غرقابی افزایش می‌یابد و با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، باعث کاهش تولید رادیکال آزاد می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار غرقابی باعث افزایش تولید انواع رادیکال‌های آزاد در هر سه ژنوتیپ گندم شد که افزایش مدت زمان غرقابی باعث افزایش بیشتر آنها شد. بنابراین افزایش سریع فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاه تحت تنش غرقابی می‌تواند باعث محافظت گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو حاصل از تنش غرقابی شود. محققان دیگری نیز افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز (اوشیمارو و همکاران، ۱۹۹۷) و سوپراکسید دیسموتاز (بیملت و همکاران، ۲۰۰۰) تحت تنش غرقابی را گزارش دادند، اما کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تنش غرقابی در این تحقیق مخالف نتایج بدست آمده ملونی و همکاران (۲۰۰۳) می باشد.

فعالیت آنزیم‌های بی‌هوازی

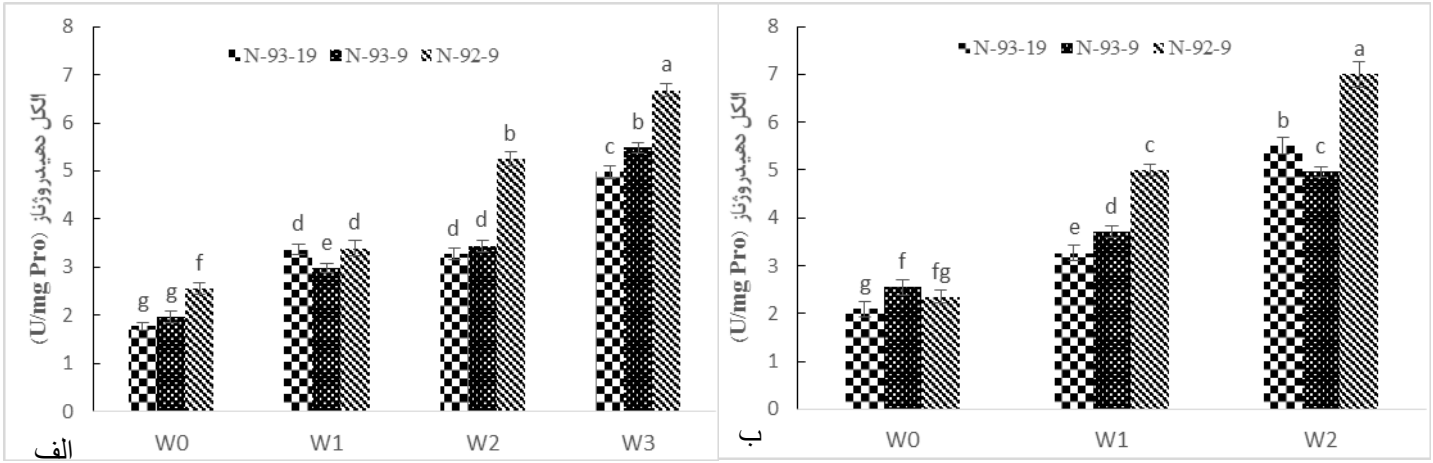
آنالیز واریانس نشان داد اثر تیمارهای ژنوتیپ، غرقابی و اثر متقابل آنها بر فعالیت آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژنازدر هر دو مرحله پنجه‌زنی و رشد طولی ساقه در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۱ و ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد تنش غرقابی در مرحله پنجه‌زنی باعث افزایش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز نسبت به تیمار شاهد

شد بطوریکه بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در هر سه ژنوتیپ در تنش غرقابی ۲۱ روز مشاهده شد (شکل ۸ الف). در تمام سطوح غرقابی بین ژنوتیپ‌ها نیز تفاوت معنی‌داری وجود داشت. تحت تنش ۷ روز غرقابی، ژنوتیپ N-92-9 بیشترین میزان فعالیت را نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها داشت اما با افزایش مدت زمان غرقابی، فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در دو ژنوتیپ N-93-9 و N-93-19 افزایش بیشتری نسبت به ژنوتیپ N-92-9 داشت بطوری‌که تحت تنش ۲۱ غرقابی بیشترین میزان فعالیت در ژنوتیپ N-93-9 مشاهده شد (شکل ۸ الف). در مرحله رشد طولی ساقه، بین ژنوتیپ‌ها در میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز تفاوت معنی‌داری وجود داشت و افزایش مدت زمان غرقابی هم باعث افزایش معنی‌داری فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۸ ب). تحت تیمار ۷ رو غرقابی فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در ژنوتیپ‌های N-92-9 بیشتر از بقیه ژنوتیپ‌ها بود اما تحت تنش ١٤ روز، بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ N-93-19 ثبت شد. نتایج مربوط به فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز نشان داد در مرحله پنجه‌زنی، میزان فعالیت این آنزیم با اعمال تنش غرقابی افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت و افزایش مدت غرقابی باعث افزایش بیشتر فعالیت این آنزیم شد بطوری‌که در هر سه ژنوتیپ بیشترین میزان این فعالیت تحت تنش ۲۱ روز مشاهده شد و ژنوتیپ N-92-9 بیشترین میزان فعالیت را در تمام سطوح تنش غرقابی داشت (شکل ۹ الف). فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز در هر سه ژنوتیپ در مرحله رشد طولی با اعمال غرقابی افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت که در تمام سطوح غرقابی میزان فعالیت در ژنوتیپ N-92-9 بیشتر از بقیه ژنوتیپ‌ها بود (شکل ۹ ب). متابولیسم بی‌هوازی ریشه نقش مهمی در تولید انرژی برای زنده ماندن کوتاه مدت گیاهان در شرایط بی‌هوازی از طریق متابولیسم تخمیر بازی می‌کند که آنزیم‌های کلیدی آن الکل دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز می‌باشند (ریچارد و همکاران، ۲۰۰٦). تنش غرقابی باعث القای آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز در گونه‌های گیاهی می‌شود، با اینحال نتایج متناقضی از مقایسه پاسخ‌های بی‌هوازی گونه‌های حساس و متحمل به تنش غرقابی وجود دارد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹؛ یین و همکاران، ۲۰۰۹). فعالیت و یا بیان این آنزیم‌های بی‌هوازی الگوی متفاوتی تحت تنش‌های غرقابی نشان داده است. در آزمایشی روی برنج، تنش غرقابی کوتاه مدت تغییری در فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز یا تجمع لاکتات ایجاد نکرد اما فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز و غلظت اتانول در کولئوپتیل ٤ ژنوتیپ برنج افزایش یافت که در رقم‌های برنج با ارتفاع بیشتر، افزایش بیشتری یافت (کاتو نوگوچی و موروکوما، ۲۰۰۷). نتایج آنها پیشنهاد کرد که توانایی افزایش تخمیر اتانولی ممکن است یکی از عوامل تعیین‌کننده تحمل شرایط بی‌هوازی کولئوپتیل‌های برنج تحت تنش غرقابی کوتاه مدت باشد. در مطالعه دیگری نشان داده شد فعالیت آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز در ریشه گیاه کنجد افزایش یافت اما فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز در رقم‌های متحمل و فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در رقم‌های حساس بالاتر بود که مطابق نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌باشد (وی و همکاران، ۲۰۱۳). افزایش فعالیت این دو آنزیم مسیر متابولیسم بی‌هوازی در گیاه گل داوودی نیز گزارش شد که میزان افزایش در رقم حساس به غرقابی به مراتب بیشتر بود (یین و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۸- تاثیر تنش غرقابی (W0: ۰، W1: ۷، W2: ١٤ و W3: ۲۱ روز) بر فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز ریشه ژنوتیپ‌های گندم در مرحله پنجه‌زنی (الف) و رشد طولی ساقه (ب). میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD ندارند (۵ تکرار)

نتایج تحقیق حاضر نشان داد فعالیت هر دو آنزیم مسیر بی-هوازی الکل دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز با اعمال تنش غرقابی در هر سه ژنوتیپ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت و افزایش مدت زمان تنش باعث افزایش بیشتر فعالیت آنها شد. با این‌حال بالاترین فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز در ژنوتیپ متحمل N-92-9 و بالاترین فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در ژنوتیپ حساس N-93-9 مشاهده شد که نشان دهنده مکانیسم متفاوت ژنوتیپ‌ها در پاسخ به تنش غرقابی می‌باشد. این یافته‌ها مطابق نتایج بدست آمده توسط وی و همکاران (۲۰۱۳) می‌باشد. در گزارش دیگری نیز نشان داده شد گیاهان موتانت ذرت و جو فاقد ژن ADH1 حساسیت بالایی به تنش غرقابی نسبت به نوع وحشی داشتند که نشان دهنده نقش این آنزیم در تحمل گیاه به غرقابی دارد (رابرتز و همکاران، ۱۹۸۹). با این حال، بیان بالای ژن‌های الکل دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز در گیاه آرابیدوپسیس تحت تنش غرقابی تاثیری بر میزان زنده مانده گیاه تحت شرایط کمبود اکسیژن نداشت (ایزموند و همکاران، ۲۰۰۳). تمام این نتایج نشان می‌دهد که تنوع ژنوتیپ‌ها و مدت زمان استرس بر متابولیسم بی‌هوازی و تحمل به تنش غرقابی تاثیرگذار است و میزان تحمل متفاوت ژنوتیپ‌ها می‌تواند به مکانیسم تنظیمی متفاوت هر کدام از ژنوتیپ‌ها در مسیر متابولیسمی بی‌هوازی تحت تنش غرقابی مرتبط باشد.



شکل ۹- تاثیر تنش غرقابی (W0: ۰، W1: ۷، W2: ۱٤ و W3: ۲۱ روز) بر فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز ریشه ژنوتیپ‌های گندم در مرحله پنجه-زنی (الف) و رشد طولی ساقه (ب). میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد براساس آزمون LSD ندارند (۵ تکرار).

نتیجه گیری

نتایج کلی این تحقیق نشان داد تنش غرقابی باعث القای تنش اکسیداتیو در ژنوتیپ‌های گندم در هر دو مرحله رشدی پنجه‌زنی و رشد طولی ساقه شد و با افزایش مدت زمان تنش، شدت تنش اکسیداتیو نیز افزایش یافت. ژنوتیپ N-92-9 با افزایش تجمع پرولین، تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و تنظیم بهتر آنزیم‌های مسیر متابولیسم بی‌هوازی، تحمل بیشتری به تنش غرقابی نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها نشان داد. بنابراین نتایج کلی این تحقیق نشان داد ژنوتیپ N-92-9 نسبت به دو ژنوتیپ N-93-19 و N-93-9 تحمل بیشتری نسبت به تنش غرقابی داشت و به عنوان ژنوتیپ متحمل به غرقابی برای کشت در مناطق با بارندگی بالا مانند مناطق شرقی استان مازندران معرفی می‌گردد.

منابع

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 105: 121–126

Arbona, V., Z. Hossain, M. F. Lopez-Climent, R. M. Perez-Clemente and A. Gomez-Cadenas. 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. Physiol. Plant. 132: 452–466.

Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1–15

Bailey-Serres, J. and L. A. C. J. Voesenek. 2008. Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 313–319.

Bakshandeh, A. 1989. Effect of waterlogging at early stage of crop development on the growth of wheat (*Triticumaestivum* L.). MSc dissertation. Uni Reading. U.K.

Bates, L.S., R. P. Waldren and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39: 205–207.

Biemelt, S., U. Keetman, H. P. Mock and Grimm, B. 2000. Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia. Plant Cell Environ. 23: 135–144.

Blokhina, O. B., K. V. Fagerstedt, and T. V. Chirkova. 1999. Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reaeration. Physiol. Plant. 105: 625–632.

Bradford, K. J., J. J. Steiner and S. T. Trawatha. 1990. Seed priming influence and emergence of pepper seed lots. Crop Sci. 30: 718–721.

Colmer, T. D. and L. A. C. J. Voesenek. 2009. Flooding tolerance: Suites of plant traits in variable environments. Funct. Plant Biol. 36: 665–681.

Drew, M. C. 1997. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 223–250.

Duan, H., Y. Ma, R. Liu, Q. Li, Y. Yang and J. Song. 2018. Effect of combined waterlogging and salinity stresses on euhalophyte *Suaeda glauca.* Plant Physiol. Biochem. 127: 231–237.

Ghorbani, A., S. M. Razavi, V. O. Ghasemi Omran and H. Pirdashti. 2018a. *Piriformospora indica* alleviates salinity by boosting redox poise and antioxidative potential of tomato. Russ. J. Plant Physiol. 65 (6): 898–907

Ghorbani, A., S. M. Razavi, V. O. Ghasemi Omran and H. Pirdashti. 2018b. *Piriformospora indica* inoculation alleviates the adverse effect of NaCl stress on growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence in tomato (*Solanumlycopersicum* L.). Plant Biol. 20(4): 729–736.

Ghorbani, A., F. Zarinkamar and A. Fallah. 2009. The effect of cold stress on the morphologic and physiologic characters of two rice varieties in seedling stage. J. Crop Breed. 1(3): 50–66

Giannopolities, C. N. and S. K. Ries. 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59: 309–314.

Gossett, D. R., E. P. Millhollon and M. C. Lucas. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. Crop Sci. 34: 706–714.

Hanson, A. D., and J. V. Jacobsen. 1984. Control of lactate dehydrogenase, lactate glycolysis, and α-amilase by O_2 deficit in barley aleurone layers. Plant Physiol. 75: 566–572.

Hanson, A. D., J. V. Jacobsen and J. A. Zwar. 1984. Regulated expression of three alcohol dehydrogenase genes in barley aleurone layers. Plant Physiol. 75: 573–581.

Heath, R. L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: II. Role of electron transfer. Arch. Biochem. Biophys. 125: 850–857.

Hemeda, H. M. and B. P. Klein. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. J. Food Sci. 55: 184–185.

Herzog, M., G. G. Striker, T. D. Colmer and O. Pedersen. 2016. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat--a review of root and shoot physiology. Plant Cell Environ. 39(5): 1068–86.

Ismond, K. P., R. Dolferus, M. De Pauw, E. S. Dennis and A. G. Good. 2003. Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway. Plant Physiol. 132: 1292–302.

Jain, V., N. K. Singla, S. Jain, and G. Kaushalya. 2010. Activities of enzymes of fermentation pathways in the leaves and roots of contrasting cultivars of sorghum (*Sorghumbicolor* L.) during flooding. Physiol. Mol. Biol. Plants 16:241–247.

Katashi, K., S. Yumi, K. Hiroyuki and O. Atsushi. 2007. Specific variation in shoot growth and root traits under waterlogging conditions of the seedlings of tribe triticeae including Mizutakamoji (*Agropyronhumidum*). Plant Prod. Sci. 10: 91–98.

Kato, H. 2000. Abscisic acid and hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of lettuce seedlings. J. Exp. Bot. 51: 1939–1944.

Kato-Noguchi, H. and M. Morokuma. 2007. Ethanolic fermentation and anoxia tolerance in four rice cultivars. J. Plant Physiol. 164: 168–173.

Li, C., D. Jiang, B. Wollenweber, Y. Li, T. Dai, W. Cao. 2011. Waterlogging pretreatment during vegetative growth improves tolerance to waterlogging after anthesis in wheat. Plant Sci. 180: 672–678

Marashi, S. and G. Chinchanikar. 2012. Evaluation of growth parameters of wheat under waterlogging conditions. Crop Physiol. J. 3(12): 29–39.

Meloni, D.A., M.O. Oliva,C.A. Martinez and J. Cambraia. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. Environ. Exp. Bot. 49: 69–76.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7:405–410.

Olgun, M., A.M. Kumlay, M.C. Adiguzel and A. Caglar. 2008. The effect of waterlogging in wheat (*T.aestivum* L.). Acta Agric. Scand. B 58(3): 193-198.

Pang, J., M. Zhou, N. Mendham, and S. Shabala. 2004. Growth and physiological responses of six barley genotypes to waterlogging and subsequent recovery. Austra. J. Agric. Res. 55(8): 895–906.

Richard, B., S. Aschi-Smiti, I. Gharbi and R. Brouquisse. 2006. Cellular and molecular mechanism of plant tolerance to waterlogging, p. 177–208. In: B. Huang (ed.). Plant-environment interaction. CRC Press, Boca Raton, FL.

Roberts, J.K.M., K. Chang, C. Webster, J. Callis and V. Walbot. 1989. Dependence of ethanolic fermentation, cytoplasmic pH regulation, and viability on the activity of alcohol dehydrogenase in hypoxic maize root tips. Plant Physiol. 89: 1275–1278.

Sayre, K.D., M. Van Ginkel, S. Rajaram andI. Ortiz-Monasterio.1994. Tolerance to waterlogging losses in spring bread wheat: effect of time of onset on expression. Annu. Wheat Newsl. 40: 165–171.

Sharma, D.P. and A.Swarup. 1988. Effects of short-term flooding on growth yield mineral composition of wheat on sodic soil under field conditions. Plant Soil 107: 137-143.

Smethurst, C. F. andS. Shabala.2003. Screening methods for waterlogging tolerance in lucerne: comparative analysis of waterlogging effects on chlorophyll fluorescence, photosynthesis, biomass and chlorophyll content. Funct. Plant Biol. 30: 335-343.

Tan, S., M. Zhu and Q. Zhang. 2010. Physiological responses of bermudagrass (*Cynodondactylon*) to submergence. Acta Physiol. Plant. 32:133–140.

Ushimaru, T., Y.Maki, S. Sano,K.Koshiba, K. Asada andH.Tsuji. 1997. Induction of enzymes involved in the ascorbate-dependent antioxidative system, namely ascorbate peroxidase, mono dehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase, after exposure to air of rice (*Oryzasativa*) seedlings germinated under water. Plant Cell Physiol. 38: 541-549.

Velikova, V., I. Yordanov and A. Edreva. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Plant Sci. 151: 59–66.

Videmšek, U., B. Turk andD.Vodnik. 2006. Root aerenchyma–formation and function. Acta Agric. Slov. 87: 445-453.

Wang, K. and Y. Jiang. 2007. Waterlogging tolerance of Kentucky bluegrass cultivars. HortScience 42:386–390.

Wei, W., D. Li, L. Wang, X. Ding, Y. Zhang, Y. Gao and X. Zhang. 2013. Morpho-anatomical and physiological responses to waterlogging of sesame (*Sesamumindicum* L.). Plant Sci. 208:102–111.

Yin, D., S. Chen, F. Chen, Z. Guan and W. Fang. 2009. Morphological and physiological responses of two chrysanthemum cultivars differing in their tolerance to waterlogging. Environ. Exp. Bot. 67:87–93.

Yin, D., S. Chen, F. Chen, Z. Guan and W. Fang. 2010. Morpho-anatomical and physiological responses of two Dendranthema species to waterlogging. Environ. Exp. Bot. 68: 122–130.

Antioxidant enzyme activities and fermentation metabolism in the root of three wheat promising lines under waterlogging stress

F. Alizadeh-vaskasi[1], H. Pirdashti[2], A. Cherati-Araei[3], S. saadatmand[1]

Received: 2018-12-19 Accepted: 2019-5-13

Abstract

Waterlogging stress has negative effects on the growth and yield of wheat plants, which recognizes the defense mechanism of the plant against waterlogging, can be valuable. In order to study the response of three wheat genotypes to different levels of waterlogging stress, a factorial experiment was conducted based on a completely randomized design with five replications in Gharakhil (Ghaemshahr) Agricultural Station. The objective of this study was to investigate the effects of waterlogging (0, 7, 14 and 21 day) at tillering (ZG21) and stem elongation (ZG31) stages on the growth, total chlorophyll, proline, malondialdehyde (MDA), H_2O_2, activity of antioxidant enzymes, and enzymes of fermentation pathway in root of three wheat promising lines (N-93-19, N-93-9 and N-92-9). The results showed that waterlogging stress in both growth stages reduced the total chlorophyll and growth of all three genotypes, however, the highest contents of total chlorophyll and shoot and root dry weight were observed in N-92-9 genotype. Increased waterlogging stress increased the contents of proline, MDA, H_2O_2, activity of superoxide dismutase, catalase, alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase and decreased peroxidase activity of root of genotypes in both growth stages compared to control treatments. The results of this experiment that N-92-9 genotype had better response than other two genotypes in all studied traits under waterlogging conditions and was introduced as a flood tolerant genotype.

Key words: Alcohol dehydrogenase, antioxidant enzymes, oxidative stress, lactate dehydrogenase, proline

1- Department of Biology, Basic Science Campus, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Agronomy, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari agricultural science and natural resources university, Sari, Iran
3- Agricultural and Natural Resources Research Center of Mazandaran, sari, Iran