

بررسی اثرات تنش خشکی بر برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و پرولین در سورگوم

پیام معاونی^{۱*}

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس؛ payam.moaveni@yahoo.com

چکیده

به منظور ارزیابی اثر تنش خشکی بر تجمع آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و پرولین در سورگوم علوفه‌ای، آزمایشی به صورت طرح کرت های خرد شده در پایه بلوک های کامل تصادفی در چهار تکرار در منطقه شهر قدس به اجرا درآمد. در این آزمایش ۴ رقم ژنوتیپ سورگوم علوفه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که مقدار پرولین در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال بیشتر است. اثر ارقام بر میزان تجمع پرولین در سطح ۵٪ احتمال معنی دار بود. همچنین میزان آنزیم های سوپراکسید دیسموتازی، دی هیدروکسی گوانوزین، مالون دی آلدئید در شرایط تنش نسبت به دور آبیاری نرمال افزایش معنی دار داشت.

واژه های کلیدی: پرولین، تنش خشکی، سورگوم، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، سوپراکسید دیسموتاز، دی هیدروکسی گوانوزین، مالون دی آلدئید.

مقدمه

متابولیت‌های سازگاری نظیر اسیدهای آمینه، آنتی اکسیدانتها و هورمون‌ها اثرات تنش را خنثی نموده و به رشد خود ادامه دهند (شکری و همکاران ۱۳۸۰). پرولین یکی از پایدارترین اسیدهای آمینه است که در برابر هیدرولیز اسیدی اکسیداتیو به توکسین‌ها، مقاومت می‌کند و کمترین اثر بازدارندگی را در رشد سلول ها در بین تمام اسیدهای آمینه دارد (Kumur and sachan, 1990). یکی از مهمترین اسید آمینه هایی که در گیاهان تحت تاثیر تنش خشکی تجمع می یابد، پرولین است و می توان گفت که احتمالاً مهمترین نقش پرولین محافظت از آنزیم ها در برابر دهیدراسیون می باشد (Thomas, 1990). یک مکانیسم بالقوه در افزایش و ساخت پرولین موثر

خشکی یکی از مهمترین تنش های محیطی است که تولید گیاهان زراعی را تحت تاثیر قرار داده و تقریباً تمام فعالیت های گیاهان را در بر می گیرد (Hern- Ndez et al, 2001). گیاهانی که در شرایط تنش خشکی قرار می‌گیرند با از دست دادن آب درون سلولی خود باعث افزایش تجمع تنظیم کننده های اسمزی مانند: پرولین، گلاسیسین، و بتائین به منظور عکس العمل به تنش خشکی می‌گردند (Nonami, 1998, Patakas et al. 2002). پرولین پایدارترین اسید آمینه ای است که در برابر تنش‌های اکسیداتیو مقاومت کرده و کم ترین اثر بازدارندگی را بر رشد سلولها در بین تمام اسید آمینه ها دارد (Kumur, 1992). برحسب میزان تنش، گیاهان ممکن است با تولید

۱- آدرس نویسنده مسئول: تهران، جاده قدیم کرج-تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت.

* دریافت: ۸۹/۱۰/۱۸ و پذیرش: ۹۰/۱/۲۷

تنش های محیطی به خصوص تنش های خشکی به کار می برند. تجمع مواد محلول در داخل سلول است که تحت عنوان اسمولیت ها شناخته می شوند و می توان به ترکیبات پلی اولها- قندها- اسیدهای آمینه- پرولین و بتائین اشاره نمود. (Bohnert et al, 1996; Ramanjul and Bartels, 202). انتخاب ارقام متحمل به خشکی در گیاهان زراعی براساس صفات ثانویه در شرایط تنش خشکی در ذرت (Ribout et al, 2004), گندم (Conson et al, 2004), و سورگوم (Sanchez et al, 2002) به اثبات رسیده است. بررسیهای انجام شده در گیاه *Rose hybrideah* نشان داد که غلظت مالون دی آلدئید و دی هیدروکسی گوآنوزین، در طول تنش خشکی پس از ۲۴ ساعت افزایش یافته ولی بلافاصله پس از دسترسی گیاه به آب و کاهش تنش میزان این دو ماه کاهش می یابد. (Jin et al, 2006). Nonami (۱۹۹۸) نشان دادند که تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت می شود از این رو از این آنزیم ها به عنوان شاخصی جهت انتخاب ارقام متحمل به خشکی استفاده کرد. ساعی و همکاران (۱۳۸۴) نشان دادند که فعالیت بعضی آنزیم های آنتی اکسیدانت تحت تاثیر تنش خشکی نسبت به شاهد به طور معنی داری افزایش می یابد. این محققین تعیین سطح فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت را به عنوان یک پارامتر مهم جهت تعیین گونه های مقاوم به خشکی در سورگوم علوفه ایی تشخیص دادند. بررسی های اصغری (۱۳۸۴) بر روی گندم بهاره (*Triticum aestivum*) نشان داد که تحت تاثیر تنش خشکی در مراحل اولیه رشد و نمو آنزیم های پراکسیداز افزایش معنی داری از خود نشان می دهند که علت این افزایش می تواند نتیجه حساس تر بودن تنش نوری در مراحل اولیه رشد و نمو به تنش خشکی باشد.

می باشد، اثر افزایش تولید پرولین بر روی مقاومت به تنش خشکی یا شوری هنوز قابل بحث است و علاوه بر افزایش سنتز پرولین کاهش کاتابولیس پرولین می تواند به تجمع آن در پتانسیل آب پایین مربوط باشد (Blum et al, 1996). نتایج بررسی های اثر تنش خشکی روی ۵ رقم آفتابگردان نشان داد که عامل خشکی در گیاه آفتابگردان می تواند به عنوان یک عامل تنش زا تولید رادیکالهای اکسیدانت کننده و خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه را تحت تاثیر قرار دهد، لذا دفاع آنزیم های آنتی اکسیدانت در برابر این رادیکالها می تواند شاخص یا بیومارکر مهمی از اثرات خشکی بر بافتهای مختلف گیاه باشد (شکروی و همکاران ۱۳۸۰). Jones و Turner (۱۹۹۵) اظهار نمودند که با افزایش تنش خشکی پس از ۲۴ ساعت میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسیوتاز در گیاه افزایش می یابد. رفیعی و همکاران (۱۳۸۴) به این نتیجه رسیدند که می توان از سوپراکسید دسیموتاز (SOD) به عنوان یک معیار جهت گزینش ارقام مقاوم استفاده نمود. رقم مقاوم تر SOD بالاتری دارد و می توان از آنزیم های آنتی اکسیدانت جهت تعیین گونه های مقاوم به خشکی در آفتابگردان استفاده کرد. سوپر اکسید دسیموتاز یک عامل حیاتی برای فعالیت ارگانیزم های هوازی به حساب می آید، این متالوآنزیم ها رادیکالهای سمی را که دائماً به عنوان متابولسیم هوازی شکل می گیرد جمع آوری می نماید و از انواع صدمات سلولی جلوگیری می نماید (Asada and Takashi, 1987). در آزمایشی که بر روی آنزیم های آنتی اکسیدانت و محصول تخریبی مالون دی آلدئید (MDA) روی سورگوم در شرایط تنش خشکی انجام گردید، سطوح آنزیم ها و MDA در شرایط تنش نسبت به شرایط آبیاری نرمال افزایش نشان داد (Jingxian and kirkham, 2006). آنزیم های آنتی اکسیدانت مانند پراکسیداز (POD)، سوپراکسید دسیموتاز (SOD) و کاتالاز یکی از مهمترین سیستم های دفاعی در برابر اکسیدانت ها در گیاه می باشد (Larson, 1988; Burke and Mahan, 1991). یکی از مهمترین مکانیسم های گیاهان در برابر

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۸۷ در مزرعه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس انجام گردید. طرح آماری به کار رفته کرت‌های خرد شده در پایه بلوک‌های کامل تصادفی در ۴ تکرار بود که دوره‌های آبیاری نرمال-متوسط و تنش در داخل کرت‌های اصلی و ۴ ژنوتیپ و رقم سورگوم علوفه‌ای (شوگر گریز-اسپیدفید- KSF_1 و MSF_2) در داخل کرت‌های فرعی قرار گرفتند، آبیاری نرمال در ۸۰٪ FC (ظرفیت زراعی)، آبیاری متوسط در ۴۰٪ FC و تنش آبی در ۲۰٪ FC انجام گرفت.

سنجش میزان پرولین: برای اندازه‌گیری میزان پرولین آزاد ابتدا ۲ سی سی از محلول شامل عصاره گیاهی ۲+ سی سی اسید نین هیدرین ۲+ سی سی اسیداستیک در یک لوله آزمایش اضافه شده و درب لوله را بسته، سپس لوله‌های آزمایش، در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند. بلافاصله بعد از آن این لوله‌ها در داخل یخ قرار گرفته و به هر لوله ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه شد و برای مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه هم زده شد. آنگاه لوله‌ها را به کناری گذاشته تا با دمای محیط آزمایشگاه به تعادل برسند. سپس قسمت رنگی محلول در تولوئن جدا گردید و غلظت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. در این روش برای کمی کردن تغییرات پرولین در نمونه‌های مورد آزمایش یک منحنی استاندارد جذب براساس دامنه تغییر رنگ در نمونه‌هایی با مقادیر مختلف پرولین مشخص گردید. ابتدا محلول استاندارد پایه پرولین با حل کردن پرولین خالص در آب مقطر به غلظت ۱۰۰ پی پی ام تهیه شده و سپس ۷ محلول استاندارد با غلظت‌های صفر، ۲، ۷، ۱۰، ۱۲، ۱۵، ۲۰ ppm از محلول پایه مذکور تهیه گردید. تولوئن خالص نیز به عنوان بلینگ دستگاه مورد استفاده قرار گرفته و استانداردها نسبت به آن سنجیده شدند کلیه مراحل که بر روی نمونه‌های گیاهی انجام شد، برای استاندارد نیز عمل گردید. سپس منحنی استاندارد رسم و معادله خط محاسبه و غلظت پرولین براساس میلی گرم بر

وزن تر گیاه تعیین گردید (Irigoyen and Emerich, 1992).

استخراج آنزیم: برای آنزیم‌ها جوان‌ترین برگهای جوان (۲۰ عدد) ۴۰ روز پس از شروع تیمار تنش برداشت شدند ۰/۵ گرم از برگهای برداشت شده هموژنیزه شده و در ۱۰۰ میلی لیتر با فسفات پتاسیم (pH=7/8) که حاوی ۰/۱ mM EDTA بود قرار گرفتند، سپس محلول هموژنیزه شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند.

سنجش SOD: سنجش آنزیم SOD با استفاده از قابلیت بازدارندگی فتوشیمیایی طبق روش (Misra et al, 1972) و (Chowdhury and chaudhuri, 1972) (, zhang et al, 1985) انجام گردید بدین ترتیب که ابتدا محلول بافر تریس حاوی فسفات دی سدیک، pH=7/2 به همراه ۱/۳ میلی مول EDTA و ۰/۱ میلی-مول کربنات مونوسدیک تهیه شده و سپس از اپی نفرین با غلظت با غلظت ۰/۲۵ میلی مول به عنوان سوبسترا استفاده گردید و سپس محلول تهیه شده را به آن افزوده و تغییرات جذب نوری حاصل از اکسیداسیون اپی نفرین، به عنوان فعالیت آنزیمی اندازه گیری شد.

سنجش دی هیدروکسی گوانوزین: برای اندازه گیری دی هیدروکسی گوانوزین از روش Blum و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد که عصاره را از ستون کربن شماره ۸ عبور داده و پس از تبادل رسیدن و عبور تمامی حلال موجود در عصاره، ستون با عبور از فاز متحرک جدید حاوی HCL تریس با PH=8/2 ماده 8-OH-dg از این ستون خارج می‌شود.

نتایج و بحث

مقدار پرولین برگ‌ها در شرایط تنش نسبت به دو دور آبیاری نرمال و متوسط افزایش یافت و بیشترین مقدار پرولین در ارقام شوگرگریز و اسپیدفید ملاحظه شد و میزان پرولین به طور متوسط در ارقام

ژنوتیپ های تحت تنش با میانگین ۱۰/۹۲، ۹/۹۵، ۸/۹۱، ۸/۷۸ میکرومول برگرم وزن تر برگ نسبت به سایر ارقام در دوره های آبیاری نرمال و متوسط بالاتر بود و بیشترین تجمع پرولین در ارقام شوگرگریز و اسپید فید در شرایط تنش آبی ملاحظه گردید، در بسیاری از گیاهان زراعی مانند: سورگوم، برنج، خردل هندی و گوجه فرنگی تفاوت در میزان پرولین در شرایط تنش گزارش شده است (Heuer, 1993) تحت شرایط تنش خشکی، گیاهان رشد خود را متوقف کرده و تجمع مواد محلول را در سلولها به منظور دسترسی بیشتر به آب افزایش می دهند که این مسئله تنظیم اسمزی نامیده می شود (Nanami, 1998; Patakas et al, 2002).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): مقدار آنزیم SOD در تنش خشکی با میانگین ۲۳۰۰ واحد بین المللی بر میلی گرم پروتئین نسبت به سایر دوره های آبیاری افزایش نشان داد که این مقدار به تنهایی در گروه آماری برتر قرار می گیرد. همانطور که ملاحظه می شود بین دوره های آبیاری از نظر مقدار آنزیم SOD در سطح ۱٪ اختلاف معنی داری به چشم می خورد (جدول ۱) نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از آزمایشات جین وهمکاران (۲۰۰۶)، عمان و همکاران (۱۳۸۴) مطابقت دارد. بین اثرات متقابل تنش × اثرات اثر معنی داری ملاحظه نگردید. بدان معنی که تنش آبی قادر به ایجاد اختلاف بین ارقام از نظر میزان آنزیم SOD نمی گردد ولی در دوره های آبیاری و ملایم و نرمال اثر متقابل بین ارقام × سطوح آبیاری کاملاً معنی دار بود. به عنوان یک نتیجه گیری کلی می توان گفت که سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش خشکی بیشتر از سایر سطوح است که نشان دهنده اثرات مفید این آنزیم در کاهش صدمات تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی می باشد.

هیدروکسی گوانوزین در شرایط تنش خشکی و در ژنوتیپ MSF₄ و نیز آبیاری متوسط و ژنوتیپ MSF₄ ملاحظه گردید. در شرایط آبیاری نرمال بیشترین مقدار در رقم شوگرگریز و کمترین مقدار دی هیدروکسی گوانوزین در رقم اسپید فید و ژنوتیپ KSF₁ ملاحظه می گردد. به طور کلی سطح فعالیت این محصول تخریبی در شرایط تنش خشکی می تواند به عنوان یک عامل مهم در انتخاب ارقام مقاوم به خشکی به کار گرفته شود. نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از آزمایشات پوراسماعیل و همکاران (۱۳۸۵) مطابقت دارد.

مالون دی آلدئید: اثر عامل تنش خشکی بر مقدار مالون دی آلدئید در سطح ۵٪ معنی دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن در سطح ۵٪ نشان داد که بیشترین مقدار مالون دی آلدئید با میانگین ۵/۸ نانومول بر میلی گرم پروتئین مربوط به سطح تنش خشکی می باشد و تفاوت معنی داری بین دو سطح آبیاری دیگر برای MDA ملاحظه نشد. اثر متقابل تنش کم آبی و ارقام بر میزان مالون دی آلدئید معنی دار گردید. مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن در سطح ۱٪ نشان داد که بیشترین میزان مالون دی آلدئید با میانگین ۷/۱ نانومول بر میلی گرم پروتئین در مرحله تنش شدید و ژنوتیپ MSF₄ و کمترین میزان مالون دی آلدئید با میانگین ۳/۱ نانومول بر میلی گرم پروتئین در سطح آبیاری نرمال و ژنوتیپ KSF₁ ملاحظه گردید. لازم به ذکر است که سطح فعالیت محصولات تخریبی مانند MDA در آزمایشات تنش خشکی بیشتر از آزمایش در شرایط نرمال است و مقدار محصولات تخریبی می تواند به عنوان یکی از شاخص های مهم در انتخاب ارقام مقاوم به خشکی در نظر گرفته شود، نتایج این آزمایش با نتایج حاصل از آزمایشات شافعی و همکاران (۱۳۸۴) مطابقت دارد.

دی هیدروکسی گوانوزین: اثر عامل تنش خشکی بر مقدار دی هیدروکسی گوانوزین در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۱). همچنین بیشترین مقدار دی

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در ارقام و تیمارهای خشکی

تیمار	پرولین proline میکرومول گرم وزن تر برگ	مالون دی آلدنید MDA نانو مول بر میلی گرم پروتئین	دی هیدروکسی گوانوزین DH نانو مول بر میلی گرم پروتئین	سوپراکسید دسموتاز میکرومول گرم وزن تر برگ
سطح آبیاری				
I_1 - نرمال-N	0/02bc	2/1	11/4C	1340C
I_2 - آبیاری متوسط	0/02bc	0/2	17/9b	1700b
I_3 - تنش خشکی	9/64a	0/8	18/7a	2300a
V_1 شوگرگریز-	7/24a	0/2	16/2	1781/6
V_2 اسپیدیفد-	7/06a	4/6	14/9	1822/2
$V_3=KSF_1$	6/81b	4/4	10/2	1782/2
$V_4=MSF_2$	6/70b	4/0	17/7	1782/2
I_1V_1 اثر متقابل	0/14c	2/9c	12/2e	1280
I_1V_2 رقم × آبیاری	0/68c	2/8c	10/1g	1420e
I_1V_3	0/72c	2/1d	10/4g	1360e
I_1V_4	0/02c	1/6e	12/1f	1300e
I_2V_1	0/60c	6/1ab	16/4d	1760c
I_2V_2	0/00c	0/7a	17/2c	1820b
I_2V_3	0/79c	4/0b	17/ac	1620d
I_2V_4	0/92c	4/9b	20/9a	1800b
I_3V_1	10/92a	6/1ab	18/9b	2220a
I_3V_2	9/90a	4/2b	17/4c	2260a
I_3V_3	8/91b	0/7a	18/2b	2270a
I_3V_4	8/78b	7/1a	20/2a	2280a

در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف غیر مشترک می باشند در سطح احتمالاً 7.0 دارای اختلاف معنی دار هستند.

فهرست منابع:

- ۱- اصغری، ر. و ح. ابراهیم زاده. ۱۳۸۱. بررسی اثر تنش خشکی در فعالیت و ظهور ایزوآنزیم‌های پراکسیداز در دو رقم گندم. موسسه تحقیقات و تهیه نهال و بذر.
- ۲- چابوک، ب. ۱۳۷۵. ارزیابی شاخص‌های فیزیولوژیکی موثر در مقاومت به خشکینخود سفید پایان نامه کارشناسی ارشد آزاد اسلامی واحد کرج.
- ۳- حبیبی، د. و م. مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۸۱. تعیین مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت به عنوان آنزیم‌های ضد استرس در ارقام مختلف آفتابگردان آجیلی، طرح پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.
- ۴- سید، س. ۱۳۷۳. اثر خشکی بر بعضی از جنبه‌های فیزیولوژیک و زراعتی گندم، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران.
- ۵- معاونی، پ. ۱۳۸۲. مطالعه تاثیر دور آبیاری بر عملکرد برخی شاخص‌های فیزیولوژیک علوفه‌ای، گزارش طرح پژوهشی، دانشگاه آزاد ايرانشهر.
- 6- Asada, k, 1999, The water _water cycle in chloroplasts : Scavenging of Active ox yy en and dissipation of excess Photons, Annual Review of plant Physiolooy and Plant Molecular Biology 50 601-639 .(Croos Ref(ISI).
- 7- Feunade z,k,F.1997.role of ascorbata g lutahione ontioxidant system in chilling resistnece of sunflower.journal of plant physiology 141:234-239.
- 8- Jagtap. V. Bhargava S- 1995. Variation in the antioxidant metabolisem of tolerant and drought susceptible varieties of Sorghum bicolor (L) Moench. Exposed to high light. Low water and high temperature stress .J.Plant Physiol , 145: 195 -197.
- 9- Jordan.w.R.,Dugas,YR.WA.,shouse.p J ,1983.strategies for crop improvement for drought-prone regions Agricultural water Management ,7,2S1-299.
- 10- Jones.M.M.Turner N.C, 1995.Accumulation of solutes in leaves of Sorghum and Sunflower in response to water deficits. PlantPhysiol .6I.122-126.
- 11- Kumar, V and Spencer , M. E, Plant Mol Boil. 1992, 9, 781-792.
- 12-Misra,H.P,P Fridovich.1972. the generation of superoxide readical during outooxidation. g. Biol.chem.247.6960-6966.
- 13-Navari,R,2001.Activity of superoxid disutase . and catalase.36:306_313.
- 14- Nonami, H., 1998. Plant water relations and control of cell elongation at low water potential. J. Plant Res. 111, 373-382.
- 15- Paglia, D. E. valentine.W. N- (1967) Studies on the quantitative and qualitive characterizati of Glutalion peroxidase. J.Lab.Med/70,158-165.
- 16- Prasad.T.K.M.D. Andcrson, B.A. Martin, and C.R-Stewart(1994) Evidence For chilling – Induced oxidative stress in maize seeding and a Regulator rolefor Hydrogen proxide-Plant Cell:65-74.
- 17- Rao,M(1996).induced changes in the antioxidant enzymes Plant Physiology.110,125,136.
- Seminiroff,N.1990.Role of superoxiddismutase in wheat and cotton, Plant Physiology.114:1369-1376.
- 18- Semirn off.N.1990.role of Glutation proxidase inwheat and Cotton.Plant Physiology/114 1369_1376.
- 19- Sivakumar,M-V.K. and R,H.Shaww (1979)Methods of growth in Field grown Soybeans, Ann. Bot.42:213-222.
- 20- Safaa. H-and T.W, Barger.2003. Influence of water stress on selected physiological Response of three Sorghum genotypes, Ital .Agron -,7,1,15-22.

- 21-Thomas, H, 1990, Osmotic adjustment in *Lolium perenne*; its heritability and the nature of solute accumulation , *Annals of Botany*, 66, 521-530.
- 22- Ukeda.,T., 1991- Abrupt increase in level of hydrogen peroxidase of winter wheat, *Plant Physiology* .97:1265-1267.
- 23- Watson.M-2003- the correlation among drought resistances and leaf water potential.*Academic. Press.vol 2, New York.*