اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در دو رقم حساس و متحمل کلزا (*Brassica napus*) در کشت سوسپانسیون سلولی

Effect of Drought Stress on Antioxidant Activity in Two Sensitive and Tolerant Rapeseed (*Brassica napus*) Cultivars in Cell Suspension Culture

فاطمه سادات سیدابراهیمی[۱]، حسن حسنی کومله[۲*]، علی اعلمی[۳] و محمدحسین رضادوست[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۰۱

چکیده

تحقیق حاضر به‌منظور بررسی تأثیر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز در رقم حساس Hyola308 و متحمل SLM046 کلزا انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به‌صورت فاکتوریل با سه تکرار انجام شد. ابتدا بذور ضدعفونی شده‌ی دو رقم در محیط MS نیمه‌جامد و پس از یک هفته در مرحله‌ی دو برگچه‌ای در محیط‌کشت MS مایع سوسپانسیون حاوی مقادیر مختلف صفر (شاهد)، ۳، ۶، ۱۲و ۱۵ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (PEG 6000) به‌طور شناور کشت شدند. در زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش، از گیاهان نمونه‌ی برگی تهیه شد. بررسی‌ها نشان داد تنش خشکی باعث تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گردید. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم SLM046 نسبت به Hyola308 در درصدهای پایین PEG و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش افزایش یافت. میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در رقم SLM046 با پیشرفت زمان در تنش‌های حاوی ۱۲و ۱۵ درصد PEG کاهش یافت. میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در رقم حساس Hyola308 بیشتر از رقم مقاوم SLM046 بود. در محیط‌های حاوی مقادیر بالای PEG، در ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش میزان فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز در هر دو رقم افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات‌پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز، کاتالاز، کشت شناور

۱، ۳، ۲ و ۴: به‌ترتیب دانشجویان کارشناسی‌ارشد، استادیار و دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

*: نویسنده مسئول Email: kumleh@guilan.ac.ir

مقدمه

کلزا یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی محسوب می‌شود که با توجه به نیاز مبرم به تولید دانه‌های روغنی جهت استحصال روغن گیاهی، سطح زیر کشت آن در حال افزایش است (*پساراکلی*[1]، 1994). کلزا نیز همانند بسیاری از گیاهان زراعی از تنش خشکی متأثر می‌گردد. تنش خشکی عامل بسیار مهمی است که مرحله اول رشد گیاهان و استقرار آن‌ها، به‌خصوص طویل شدن و توسعه سلول‌ها را محدود می‌کند. اثرات خشکی اغلب به‌صورت مجموعه‌ای از فرآیندهای فیزیکی- محیطی در نهایت منجر به کاهش تولید محصول می‌شود (احمدی و جوادی‌فر، ۱۳۷۹). تنش خشکی نتایجی از قبیل بسته شدن روزنه‌ها، کاهش در سرعت انتقال مواد غذایی در گیاهان، کاهش در پتانسیل آب بافت‌های گیاهی، کاهش در فتوسنتز و بازدارندگی از رشد، افزایش در تجمع اسیدآبسیزیک، پرولین، مانیتول و سوربیتول، تشکیل رادیکال‌های مهارکننده (آسکوربات، گلوتاتیون و آلفاتوکوفرول) و سنتز پروتئین‌های جدید و mRNA را به همراه دارد (*آرورا*[2]، 2002). خسارت به گیاهان در اثر تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن که از تنش‌های محیطی متفاوت به‌دست می‌آید یکی از علل عمده از دست دادن بهره‌وری و حاصلخیزی گیاهان در سراسر جهان است. مکانیسم‌هایی که آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند، آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که از اهمیت بسزایی در مقاومت گیاهان به تنش خشکی برخوردارند. یکی از مهم‌ترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان که تحت تنش‌های سرما و خشکی ایجاد می‌شود، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) مانند سوپراکسید (O_2^-)، پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) در کلروپلاست و میتوکندری‌ها است(*باکالوا*[3] و همکاران، 2004؛ *رحیمی‌زاده*[4] و همکاران، 2007). گونه‌های فعال اکسیژن، شکل‌های فعالی از اکسیژن هستند که در مراحل حیاتی مانند تنفس نوری، فتوسنتز و تنفس تولید می‌شوند و می‌توانند شدیداً با بیومولکول‌های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و پراکسیداسیون لیپید، دناتوره شدن پروتئین و جهش در DNA را سبب شوند که این امر به مختل شدن متابولیسم طبیعی گیاه و درنهایت مرگ سلول‌ها منجر می‌گردد (*پنی‌کوک*[5]، 2004).

گیاهان مکانیزم‌های حفاظتی مختلفی برای حذف یا کاهش گونه‌های فعال اکسیژن دارند که در سطوح مختلف تنش مؤثر است. سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان یکی از این مکانیزم‌های حفاظتی است. گیاهانی که از سطوح بالاتری از آنتی‌اکسیدان‌ها برخوردار هستند، مقاومت بیشتری به آسیب‌های اکسیداتیو نشان می‌دهند. دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که باعث شکسته شدن پراکسیدهیدروژن به آب و مولکول اکسیژن می‌شوند (*جاندا*[6] و همکاران، 2005؛ *یونگ*[7] و همکاران؛ 2008). آنزیم کاتالاز برای برخی انواع سلول‌ها تحت شرایط طبیعی الزامی بوده و نقش مهمی در کسب مقاومت در برابر تنش اکسایشی ایفا می‌کند. آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز تبدیل مونوفنول‌ها را به دی فنول‌ها و هم‌چنین اکسیداسیون دی فنول‌ها را به کوئینون‌ها که در پلی‌مریزاسیون رنگ‌دانه نقش دارند، کاتالیز می‌کند (*بریوسگم*[8] و همکاران، 2001). آسکوربات پراکسیداز یکی دیگر از آنتی‌اکسیدان‌ها است که در کلروپلاست، سیتوسول، واکوئل و هم‌چنین فضاهای آپوپلاستی سلول‌های برگ در غلظت‌های بالا یافت می‌شود (*چو و سئو*[9]، 2005). از نظر محققان مختلف، آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاهان است که دارای نقش‌های اساسی در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه مانند رشد، نمو و متابولیسم می‌باشد و همچنین به‌عنوان یک احیاکننده برای بسیاری از رادیکال‌های آزاد و به‌خصوص پراکسیدهیدروژن عمل می‌کند (*آرورا*، 2002). آسکوربات‌پراکسیداز وابستگی بالایی به پراکسیدهیدروژن و آسکوربات دارد به‌گونه‌ای که پیش‌بینی کرده‌اند که آسکوربات نه تنها رفع سم‌زدایی پراکسیدهیدروژن را بر عهده دارد، بلکه میزان پراکسیدهیدروژن را در سیگنالینگ هدف نیز کنترل می‌کند. گزارش شده است که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز بیش‌ترین سهم را برای ایجاد مقاومت گیاهان به تنش خشکی در اثر حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارند (*آرورا*، 2002). آنزیم کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پراکسیداز، مقدار پراکسیدهیدروژن درون سلول را تنظیم می‌کنند.

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی خصوصیات بیوشیمیایی (اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پلی‌فنول‌اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) تحت تنش خشکی در کلزا بود.

1. Pessarakli
2. Arora
3. Bakalova
4. Rahimizadeh
5. Pennycooke
6. Janda
7. Yong
8. Breusegem
9. Cho and Seo

مواد و روش‌ها

آزمایش روی دو رقم متحملSLM046 و رقم حساس Hyola308 در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گیلان و در سال ۹۲-۹۳ انجام گرفت. ابتدا بذور با محلول دو درصد هیپوکلریت سدیم (به‌مدت ۱۵دقیقه) ضدعفونی و پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، در اتانول ۷۰ درصد (به‌مدت ۱دقیقه) غوطه‌ور شده و درنهایت مجدداً با آب مقطر استریل سه مرتبه شسته شدند. بذور ضدعفونی شده در محیط‌کشت MS جامد حاوی ساکارز سه درصد $\frac{w}{v}$، pH= 5.8 کشت و به‌مدت یک هفته در فتوپریود ۱۶ ساعت و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به محیط MS مایع سوسپانسیون حاوی ساکارز سه درصد $\frac{w}{v}$ و pH= 5.8 به‌مدت دو روز به‌منظور عادت‌دهی منتقل شده و سپس به محیط MS مایع سوسپانسیون حاوی ساکارز سه درصد $\frac{w}{v}$، غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلیکول (صفر، سه، شش، ۱۲ و ۱۵درصد)، pH، ۵/۸ منتقل و در فتوپریود ۱۶ ساعت، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و با دور ۵۰rpm شیک شدند. نمونه‌های برگی از گیاهچه‌ها در زمان‌های صفر، سه، شش، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش تهیه شدند.

نمونه‌گیری و استخراج آنزیم‌ها

به‌منظور استخراج آنزیم‌ها از روش *اسفندیاری*[1] و همکاران (2007) استفاده شد. ۰/۶۸ گرم پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات (KH_2PO_4) به همراه ۵٪ PVP w/v و ۰/۴ میلی‌مولار Na_2-EDTA در آب دیونیزه حل شده و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد (محلول یک). سپس به‌طور جداگانه ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول حاوی ۰/۸۷ گرم پتاسیم مونوهیدروژن‌فسفات (K_2HPO_4) به همراه دو گرم PVP و Na_2-EDTA با استفاده از آب دیونیزه تهیه شد (محلول دو). بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (بافر استخراج آنزیم) از ترکیب ۳۹ میلی‌لیتر از محلول یک با ۶۱ میلی‌لیتر از محلول دو آماده وpH آن با استفاده از pHمتر بین ۷/۲-۶/۸ تنظیم شد.

به‌منظور استخراج و اندازه‌گیری آنزیم‌ها، برگ‌های کلزا که تا هنگام آزمایش در فریزر ۸۰- نگه‌داری شده بودند کاملاً خرد شده و به مقدار ۰/۰۵ گرم از پودر برگ آسیاب شده یک میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه شد. پس از ورتکس، تیوب‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شدند. پس از اتمام سانتریفوژ، عصاره رویی به میکروتیوب‌های یک و نیم میلی‌لیتری منتقل و مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شدند. عصاره رویی به میکروتیوب‌های با همان حجم منتقل شد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی‌فنول‌اکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Biochrom) مدل Libra S22 اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان فعالیت تمامی آنزیم‌ها از کووت کوارتز استفاده شد (*اسفندیاری* و همکاران، 2007).

تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش *دهیندسا* و *موتو*[2] (1981) استفاده شد. ابتدا محلول بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH=7 و بافر اندازه‌گیری حاوی بافر پتاسیم‌فسفات، EDTA ۰/۱ مولار و H_2O_2 ۱۰میلی‌مولار براساس دستورالعمل تهیه شد. بلانک حاوی ۴۹۵ میکرولیتر از بافر اندازه‌گیری و پنج میکرولیتر بافر فسفات و نمونه شامل ۴۹۵ میکرولیتر از بافر اندازه‌گیری و پنج میکرولیتر از عصاره آنزیمی بوده است. منحنی کاهشی تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات جذب بر زمان (OD/min) به‌مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی با ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۴۰ محاسبه شد.

تعیین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز:

سنجش آنزیم مطابق روش *کومار* و *خان*[3] (1982) انجام شد. برای تعیین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز بافر فسفات‌سدیم ۰/۱ مولار با pH= ۷ و محلول پیروکته‌کول حاوی ۰/۵ مولار پیروکته‌کول در بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با ۷ =pH، تهیه شد و از این محلول برای سنجش استفاده شد.

کووت بلانک حاوی۴۵۰ میکرولیتر بافر فسفات‌سدیم و ۵۰ میکرولیتر محلول پیروکته‌کول بوده است. برای سنجش فعالیت آنزیم، ۵۰ میکرولیتر محلول پیروکته‌کول ۰/۵ مولار، ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات‌سدیم ۰/۱ مولار و۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به کووت کوارتز نمونه افزوده شد و تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر پس از یک دقیقه قرائت شد. فعالیت دی‌فنولازی این آنزیم با استفاده از قانون لامبرت و ضریب خاموشی آنزیم PPO با پیش‌ماده پیروکته‌کول ۱۴۰۰ $mM^{-1}cm^{-1}$ برحسب µmol/100g FW.min محاسبه شد.

1. Esfandiari

2. Dhindsa and Motowe

3. Kumar and Khan

تعیین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم به‌روش *ناکانو* و *آسادا*[1] (1987) با اندکی تغییرات انجام گرفت. بافر اندازه‌گیری حاوی بافر پتاسیم‌فسفات ۲۵ میلی‌مولار pH= ۷، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، اسیدآسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار و H_2O_2 ۱۰میلی‌مولار براساس دستورالعمل تهیه شد.

مخلوط بلانک حاوی ۴۹۰ میکرولیتر از بافر اندازه‌گیری و ۱۰ میکرولیتر بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار بوده است. برای سنجش فعالیت آنزیم، ۴۹۰ میکرولیتر از بافر اندازه‌گیری و ۱۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به کووت کوارتز افزوده شد. فعالیت آنزیم از طریق تعیین مقدار اکسید شدن آسکوربات، توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر برای مدت زمان یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی ۲/۸ $mM^{-1}cm^{-1}$ محاسبه شد.

آنالیز آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار اجرا شد، هر تکرار شامل ۰/۰۵ گرم از نمونه برگی گیاهچه بوده است. داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS 9.1 آنالیز شده و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح یک درصد مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند.

نتیجه و بحث

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها حاکی از وجود تفاوت‌های معنی‌دار در سنجش آنزیمی دو رقم حساس و مقاوم بود.

کاتالاز (CAT)

در رقم Hyola308 بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در محیط حاوی PEG ۱۲ درصد در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش و کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم در محیط حاوی PEG۱۵ درصد در ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش مشاهده شد (شکل ۱ و جدول ۱).

در محیط‌های حاوی مقادیر مختلف PEG، در رقم SLM046 بیش‌ترین فعالیت آنزیم در محیط حاوی PEG ۳ درصد، ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش و کم‌ترین مقدار فعالیت این آنزیم در محیط حاوی PEG ۶ درصد در ساعت صفر مشاهده شد (شکل ۲).

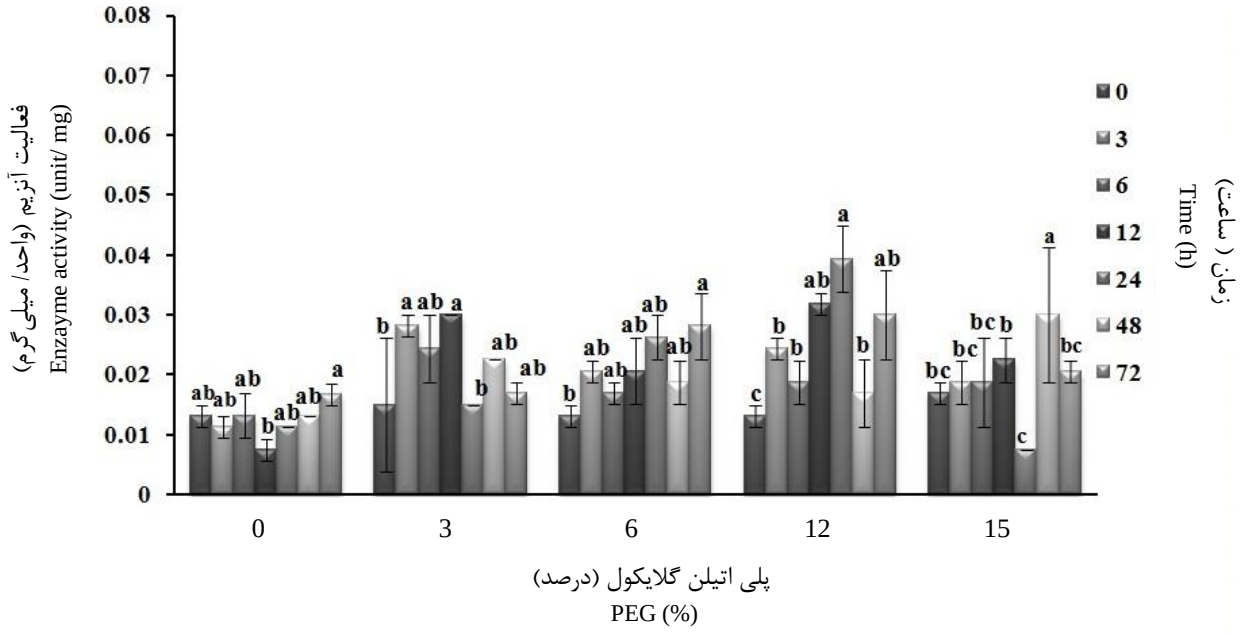
در حالات مختلف تنش اعمال شده، مشاهده شد فعالیت آنزیم با افزایش زمان در ابتدا افزایش یافته و پس از افت فعالیت مجدداً افزایش یافته است. محققان بیان نموده‌اند که کاتالاز، سلول‌ها را از اثرات پراکسیدهیدروژن محافظت می‌کند (*گرات*[2] و همکاران، 2002). تحت شرایط عادی حضور کاتالاز در سلول‌ها، می‌تواند نقش مهمی را در افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو بازی کند (*حبیبی*[3] و همکاران، 2004). پژوهشگران گزارش کردند که افزایش فعالیت کاتالاز جهت کاهش اثرات پراکسیداز در هنگام تنش‌های محیطی در گیاهان گندم، جو، سویا و نخود نقش مهمی دارد (*کندل* و *مک‌کرسی*[4]، 1989) و هم‌چنین مشاهده کردند فعالیت CAT در گندم تحت شرایط تنش خشکی، افزایش یافته است (*سیموآ-استویلا*[5] و همکاران، 2010). آزمایشات بر روی سورگوم علوفه‌ای نشان داد فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر تنش خشکی افزایش می‌یابد (ساعی و همکاران، ۱۳۸۴). در تحقیقی دیگر، بالا بودن سطح آنزیم CAT در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس گندم در برابر تنش خشکی گزارش شده است (*فنگ*[6] و همکاران، 2004). براساس نتایج حاصله میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم SLM046 نسبت به رقم Hyola308 در شرایط طبیعی کمتر بوده است اما پس از اعمال تنش پاسخ رقم SLM046 نسبت به رقم Hyola308 در درصدهای پایین‌تر PEG رخ داده ضمن این‌که شدت افزایش در رقم SLM046 بیشتر از رقم حساس Hyola308 بوده است.

پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO)

در رقم Hyola308، میزان فعالیت آنزیم با گذشت زمان در تنش‌های PEG ۶، ۱۲و۱۵ درصد به‌ترتیب در ۷۲ ساعت، ۴۸ ساعت و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش فعالیت آنزیم افزایش پیدا کرد. در رقم Hyola308 بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در محیط حاوی PEG ۱۲درصد و کم‌ترین میزان در محیط PEG ۳ درصد پس از گذشت ۴۸ ساعت از شروع تنش مشاهده شد (شکل۳).

1. Nakano and Asada

2. Garrat
3. Habibi
4. Kendall and McKersie
5. Simova-Stoilova
6. Feng



شکل ۱: تأثیر غلظت‌های مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی میزان فعالیت آنزیم CAT در رقم Hyola308

Fig. 1: Effect of different PEG concentrations on CAT activity at different times in Hyola308 cultivar

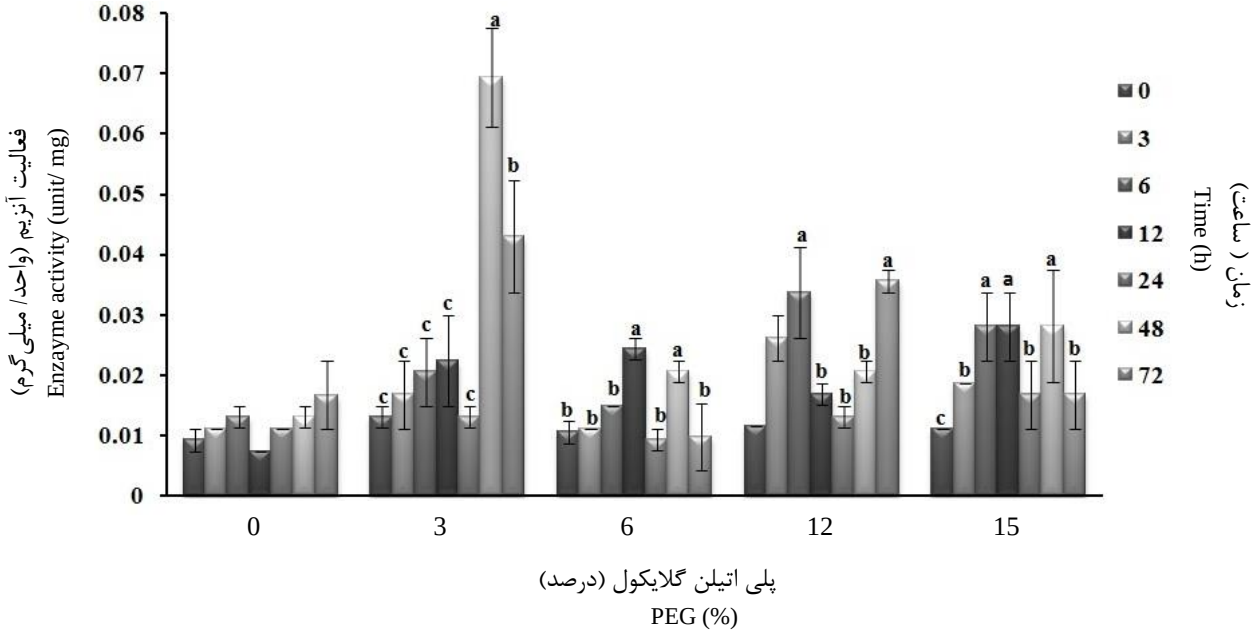
جدول ۱: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف PEG روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

Table 1: Analysis of variance of the effect of different PEG concentration on the activity of antioxidant enzymes

میانگین مربعات Mean squares			درجه آزادی df	منابع تغییرات Sources of variations
APx	PPO	CAT		
0.2**	0.00113**	0.0000009ns	1	ژنوتیپ Genotype
0.037**	0.00097**	0.00075**	4	تنش PEG PEG stress
0.052**	0.00017ns	0.00033**	6	زمان Time
0.006**	0.00038ns	0.00018**	4	تنش PEG × ژنوتیپ PEG stress × Genotype
0.02**	0.00088**	0.00023**	6	ژنوتیپ × زمان Genotype × Time
0.02**	0.0006**	0.00014**	24	زمان × تنش PEG PEG stress × Time
0.007**	0.0004**	0.00015**	24	تنش PEG × زمان × ژنوتیپ PEG stress × Time × Genotype
0.0003	0.00019	0.00005	70	خطا Error

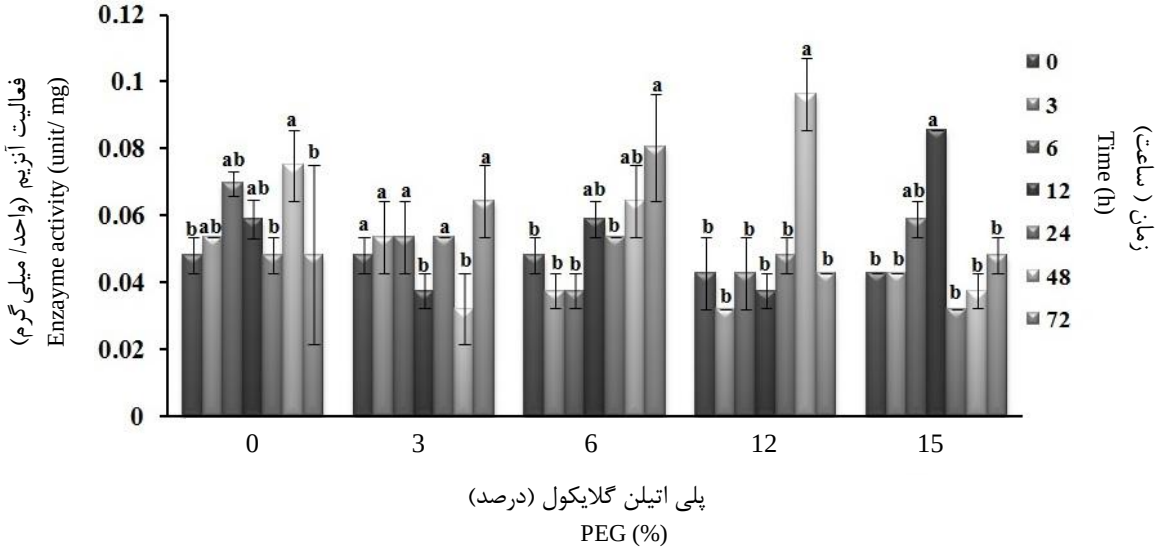
**: معنی‌دار در سطح p<0.01. ns: غیرمعنی‌دار

**: significant at p<0.01 Level. ns: not significant



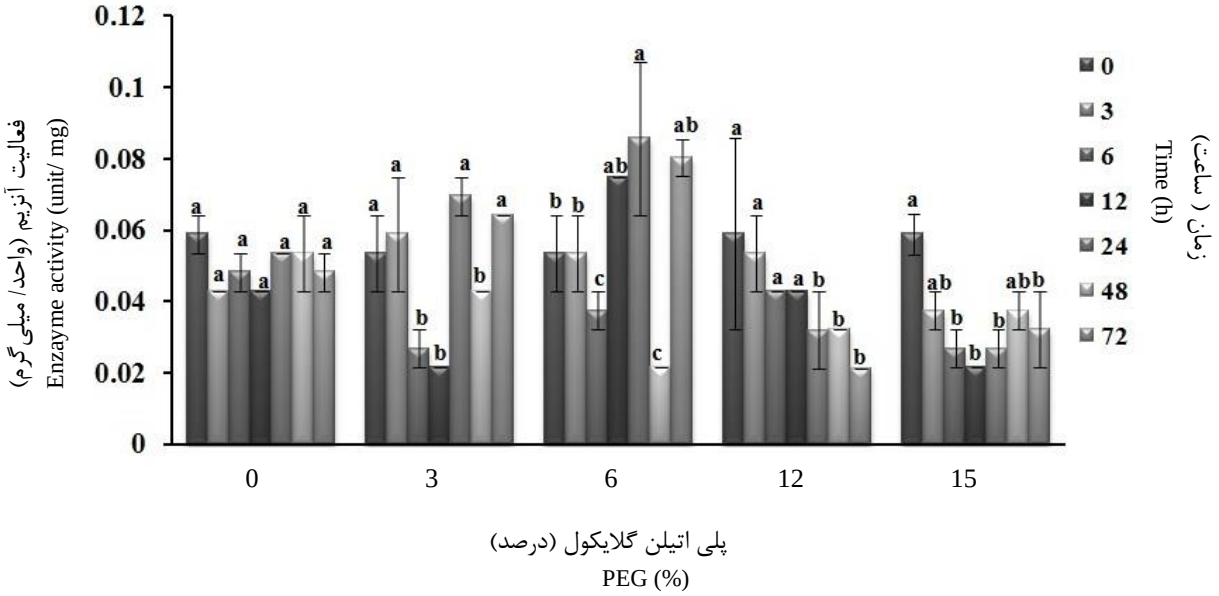
شکل ۲: تأثیر غلظت‌های مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی میزان فعالیت آنزیم CAT در رقم SLM046

Fig. 2: Effect of different PEG concentrations on CAT activity at different times in SLM046 cultivar



شکل ۳: تأثیر غلظت‌های مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی میزان فعالیت آنزیم PPO در رقم Hyola308

Fig. 3: Effect of different PEG concentrations on PPO activity at different times in Hyola308 cultivar



شکل ۴: تأثیر غلظت‌های مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی میزان فعالیت آنزیم PPO در رقم SLM046

Fig. 4: Effect of different PEG concentrations on SLM046 PPO activity at different times in SLM046 cultivar

در رقم SLM046، فعالیت آنزیم در محیط PEG سه و شش درصد به‌ترتیب بعد از کاهش در ساعت ۱۲و شش پس از شروع تنش افزایش اما در محیط PEG ۱۲درصد با گذشت زمان فعالیت آنزیم کاهش یافت. در رقم SLM046 بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در محیط حاوی PEG ۶ درصد در ساعت ۲۴ پس از شروع تنش و کم‌ترین میزان در محیط PEG ۱۲ درصد در ساعت ۷۲ مشاهده شده است (شکل ۴).

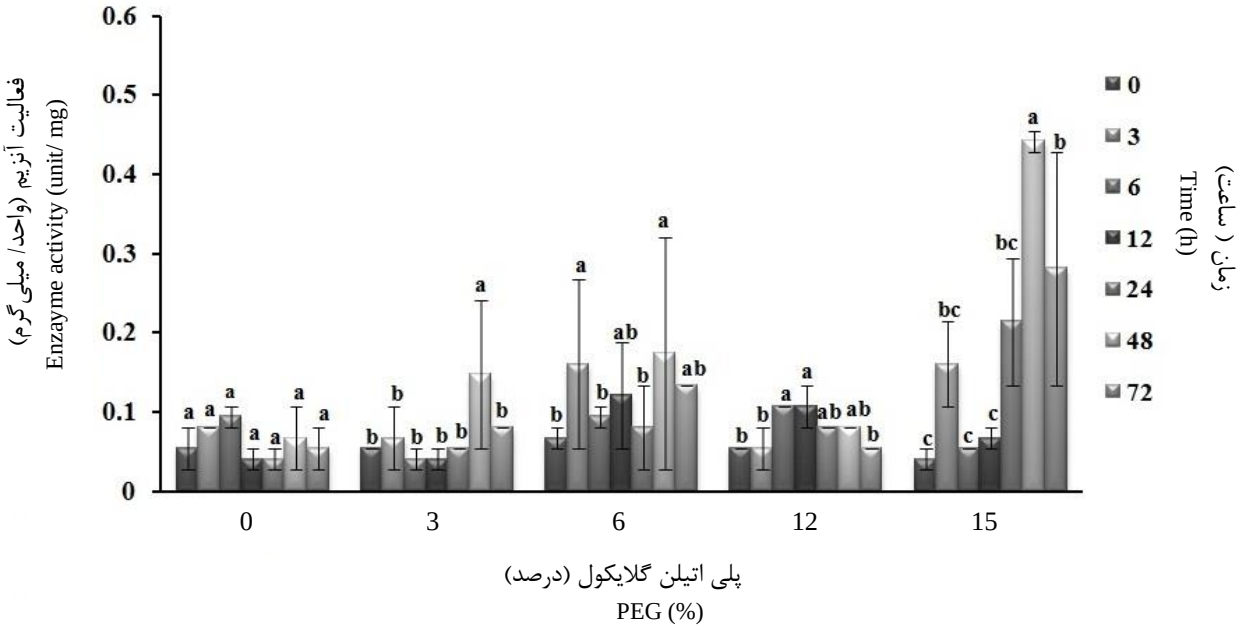
در بررسی اثر تنش خشکی ناشی از پلی‌اتیلن‌گلیکول در گیاه گندم مشخص شد که علت بالا رفتن سطوح ترکیبات فنلی، افزایش فعالیت و میزان آنزیم بیوسنتزی فنل‌ها است (*تیان و لی*[1]، 2006). انباشتگی انواع ترکیبات فنلی در شرایط تنشی می‌تواند به‌عنوان یک علامت عمل کند و برای راه‌اندازی زنجیره‌ای از واکنش‌های دیگر که در نهایت به افزایش تحمل تنش منجر می‌شوند، عمل نماید (*آندرسون و جوردهیم*[2]، 2005). در تریتکاله، تنش خشکی باعث افزایش مقدار ترکیبات فنلی در ارقام حساس شد، اما در ارقام مقاوم این تغییرات ناچیز بود (*هورا*[3] و همکاران، 2007). به‌طور کل نوع و میزان پاسخ‌دهی آنزیم PPO در شرایط تنش برای هر دو رقم تقریباً مشابه بود با این تفاوت که در رقم حساس Hyola308 میزان فعالیت آنزیم از همان ابتدا و در محیط فاقد PEG بیشتر از رقم مقاوم SLM046 بود. این رخداد را شاید بتوان این‌گونه توضیح داد که قرارگیری گیاهان حساس Hyola308 در محیط‌کشت معلق، به‌دلیل آستانه‌ی تحریک پایین‌تر نسبت به رقم مقاوم SLM046، احتمالاً مکانیسم‌های درک تنش را در این رقم فعال کرده که نتیجه‌ی آن افزایش فعالیت آنزیم PPO از همان ابتدا بوده است.

آسکوربات‌پراکسیداز (APx)

در رقم Hyola308 در PEG ۱۵ درصد و در رقم SLM046 در محیط حاوی PEG ۱۲ و ۱۵ درصد پس از گذشت ۴۸ ساعت میزان فعالیت آنزیم به حداکثر رسید. در رقم Hyola308 بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در محیط حاوی PEG ۱۵درصد در ساعت ۴۸ پس از اعمال تنش مشاهده شد (شکل ۵).

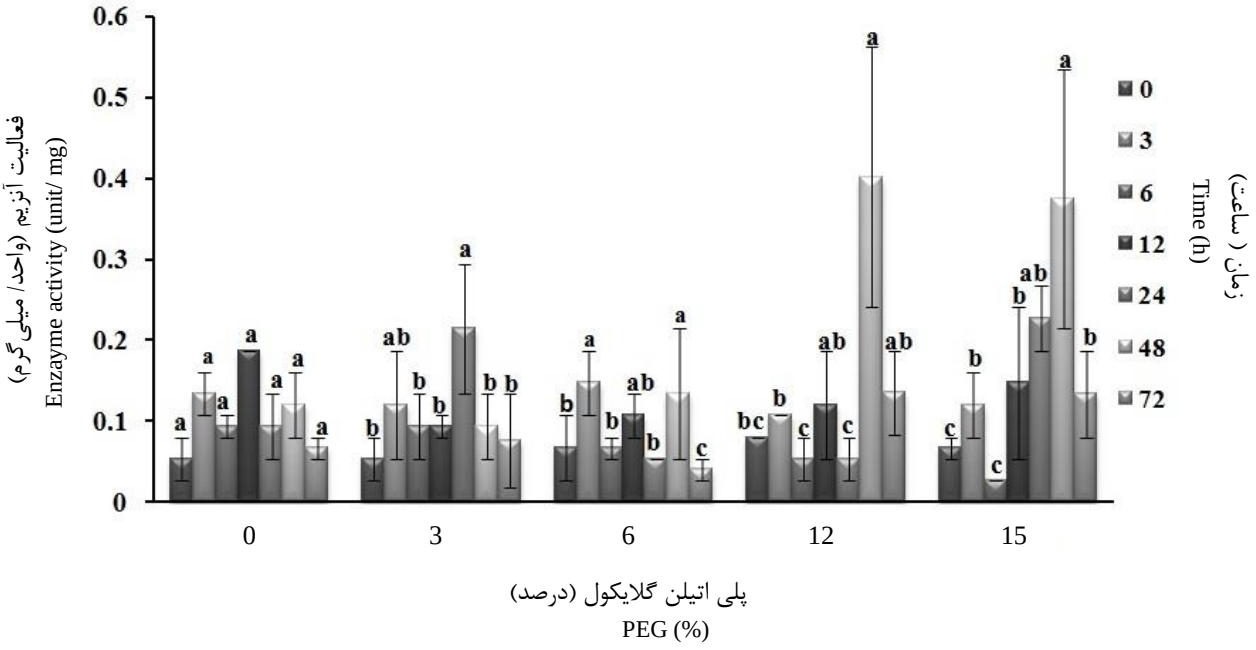
به نظر می‌رسد فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در دو رقم مورد مطالعه در شرایط تنشی شدید و در پایان روز دوّم پس از اعمال تنش افزایش می‌یابد. در رقم SLM046 بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در محیط حاوی PEG ۱۲ درصد در ساعت ۴۸ پس از شروع تنش و کم‌ترین میزان در محیط PEG ۶ درصد در ساعت ۲۴ پس از اعمال تنش مشاهده شده است (شکل ۶).

1. Tian and Lei
2. Anderson and Jordheim
3. Hura



شکل ۵: تأثیر غلظت‌های مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی میزان فعالیت آنزیم APx در رقم Hyola308

Fig. 5: Effect of different PEG concentrations on Hyola308 APx activity at different times in Hyola308 cultivar



شکل ۶: تأثیر غلظت‌های مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی میزان فعالیت آنزیم APx در رقم SLM046

Fig. 6: Effect of different PEG concentrations on SLM046 APx activity at different times in SLM046 cultivar

محققان گزارش کردند با قرار دادن گیاهچه‌های دو رقم گندم در معرض تنش خشکی، رقم مقاوم به تنش از فعالیت بالاتر آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در مقایسه با رقم حساس برخوردار بود (*اصغری*[1] و همکاران، 2000). افزایش فعالیت APx در شرایط تنش خشکی در سه رقم لوبیا (*زلاتیو*[2] و همکاران، 2006) و نوعی درخت نوئل (*یانگ*[3] و همکاران، 2008) گزارش شده است. در آزمایشی بر روی برنج تراریخته نشان داده شده است که با افزایش تنش خشکی، فعالیت آنزیم APx افزایش

1. Sgherri

2. Zlatev

3. Yang

می‌یابد (*گیل* و *توتجا*[1]، 2010). در مطالعه مشابهی گزارش شده است که رقم مقاوم به خشکی گندم فعالیت بالاتری از APx را در مقایسه با رقم حساس به خشکی گندم تحت شرایط خشکی نشان می‌دهد (*چوپرا* و *سلوت*[2]، 2007). با نگاهی کلی به میزان فعالیت APx می‌توان دریافت که در درصدهای پایین‌تر PEG میزان فعالیت آنزیم در هر دو رقم پایین بوده و افزایش چشمگیر فعالیت APx در شرایط تنش تنها در رقم مقاوم SLM046 رخ داده است.

نتیجه‌گیری

شناخت مکانیسم‌های فیزیولوژیک سلول‌های گیاه در پاسخ به تنش‌های محیطی ازجمله تنش خشکی به‌منظور غلبه بر محدودیت‌های موجود در امر تولید گیاهان زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. فعالیت آنزیم کاتلاز در هر دو رقم با پیشرفت زمان و شدت تنش فعالیتی نوسانی داشت با این تفاوت که افزایش فعالیت این آنزیم در رقم مقاوم برعکس رقم حساس در ساعات پایانی تنش های ضعیف‌تر رخ داده است. در ساعات متناظر میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در رقم حساس بیش‌تر از رقم متحمل مشاهده شد. هم‌چنین نتایج به‌دست آمده نشان داد که استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول موجب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در هر دو رقم کلزا پس از ۴۸ ساعت از اعمال تنش شده است.

تشکر و قدردانی

از همکاران و مسئولین دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان که نویسندگان را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

احمدی، م. و جاویدفر، ف. ۱۳۷۹. روش‌های ارزیابی و اصلاح مقاومت به خشکی در گونه‌های روغنی جنس براسیکا. نشر آموزش کشاورزی. صفحات ۷-۵.

ساعی، م.، حبیبی، د.، مشهدی اکبربوجار، م.، محمودی، ع. و اردکانی، م. ۱۳۸۴. تعیین سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به‌عنوان یک پارامتر در تعیین گونه‌های مقاوم سورگوم علوفه‌ای به تنش خشکی. چکیده مقالات اولین همایش بین‌المللی علوم زیستی ایران.

Anderson, O. M. and Jordheim, M. 2005. The Anthocyanins In: Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications (eds. Anderson, O. M. and Markham, K. R.) 471-553. CRC Press, London.

Arora, A., Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Sciences, 82: 1227-1238.

Bakalova, S., Nikolova, A. and Nedeva, D. 2004. Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. Plant Physiology, 30: 64-77.

Breusegem, F. V., Vranova, E., Dat, J. F. and Inze, D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Sciences, 161: 405-414.

Cho, U. and Seo, N. 2005. Oxidative stress in Arabidopsis thaliana exposed to cadmium is due to hydrogen proxide accumulation. Plant Science, 168: 113-120.

Chopra, R. K. and Selote, D. S. 2007. Acclimation to drought stress generate oxidative stress tolerance in drought-resistant than susceptible wheat cultivar under field conditions. Enviromental Exprimental Botany, 60: 276-283.

Dhindsa, R. S. and Motowe, W. 1981. Drought tolerance in two mosses, correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. Experimental Botany, 32: 79-91.

Esfandiari, E., Shekari, F. and Esfandiari, M. 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. Notulae Botanicae Horticultural Agribotanici Cluj-Napoca, 35: 48-56.

Feng, Z., Jin-Kui, G., Ying-Li, Y., Wen-Liang, H. and Li-in, Z. 2004. Changes in the pattern of antioxidant exzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. Acta Physiologiae Plantarum, 3: 345-352.

Garrat, L. C., Janagoudar, B. C., Lowe, K. C., Anthony, P., Power, J. B. and Davey, R. 2002. Salinity tolerance and antioxidant status in cotton culture. Free Radical Biology and Medicine, 33: 502-511.

Gill, S. S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology. Biochemistry, 48: 909-930.

Hbibi, D., Mashdi Akbar Boojar, M., Mahmoudi, A., Ardakani, M. R. and Taleghani, D. 2004. Antioxidative enzyme in sunflower subjected to drought stress. 4th International Crop Science.

Hura, T., Grzesiak, S., Hura, K., Thiemt, E., Tokarz, K. and Wedzony, M. 2007. Physiological and biochemical tools useful in drought-tolerance detection in genotypes of winter triticale: Accumulation of ferulic acid. Annals Botany, 100: 767-775.

Janda, T. E., Kosa, L., Szalai, G. and Paldi, E. 2005. Investigatin of antioxidant activity of maize during low Temperature stress. Plant Physiology, 49: 53-54.

1. Gill and Tuteja
2. Chopra and Selote

Kendall, E. J. and McKersie, B. D. 1989. Free radical and freezing injury to cell membrance of winter. Plant Physiology, 76: 86-140.

Kumar, K.B. and Khan, P. A. 1982. Peroxidase and polyphenoloxidase in excisedragi (*Eleusine coracana* cv. PR 202) leaves during senescence. Experimental Botany, 20: 412-416.

Nakano, Y. and Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiolgy, 28: 131-140.

Pennycooke, J. C., Cox, S. and Stushnoff, C. 2004. Relatioship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerace in petunia (*Petinia hybrida*). Environmental and Experimental Botany, 53: 225-232.

Pessarakli, M. 1994. Plant and crop stress. Handbook, Marcel deckker, New York. 203-226.

Rahimizadeh, M., Habibi, D., Madani, H., Mohammadi, H., Mehraban, A. and Sabet, A. M. 2007. The effect of micronutrients on antioxidant enzymes metabolism in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. Helianthus Annus, 47: 167-174.

Sgherri, C. L. M., Maffei, M. and Navari-Izzo, F. 2000. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. Plant Physiology, 157: 273-279.

Simova-Stoilova, L., Vaseva, I., Grigorova, B., Demirevska, K. and Feller, U. 2010. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. Plant Physiology Biochemistry, 48: 200-206.

Tian, X. and Lei, Y. 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biologia Plantarum, 50 (4): 775-778.

Yang, Y., Han, C., Liu, Q., Lin, B. and Wang, J. 2008. Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. Acta Physiology Plantarum, 30: 433-440.

Yong, Z., Hao-Ru, T. and Ya, L. 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. Agricultural Sciences, 4: 456-462.

Zlatev, Z. S., Lidon, F. C., Ramalho, J. C. and Yordanov, I. T. 2006. Comparison of resistance to drought of three bean Cultivar. Biology Plant, 50: 389-394.

Effect of Drought Stress on Antioxidant Activity in Two Sensitive and Tolerant Rapeseed (*Brassica napus*) Cultivars in Cell Suspension Culture

Seyed Ebrahimi[1], F. S., Hassani Kumleh[2*], H., Alami[1], A. and Rezadoost[3], M. H.

Abstract

This research was conducted to evaluate drought stress effect on the activity of antioxidant enzymes Catalase, Polyphenol oxidase, and Ascorbate peroxidase in sensitive Hyola308 and resistant SLM046 cultivars of canola (*Brassica napus*). Factorial experiment was carried out in a completely randomized design with three replications. Seedlings were cultured in liquid MS medium supplimented with different amounts (0%, 3%, 6%, 12% and 15%) of PEG 6000. Leaf discs were collected at 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after stress. Results showed that drought stress made significant changes in enzymatic antioxidants activity. In comparison with Hyola308, Catalase activity in SLM046 increased at lower amounts of PEG after 48 hours. Polyphenol oxidase activity in SLM046 cultivar reduced in medium containing 12% and 15% PEG. Polyphenol oxidase activity in Hyola308 was higher than SLM046 cultivar. Ascorbate peroxidase activity increased in media containing PEG after 48 hours, in both cultivars.

Keywords: Ascorbate peroxidase, Polyphenol Oxidase, Catalase, Suspension culture

1, 2 and 3. MSc Students, Assistant Professor and PhD Student, Respectively, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht

※: Corresponding author Email: kumleh@guilan.ac.ir