نشریه تولید گیاهان زراعی
جلد هفتم، شماره دوم، تابستان ۹۳
۹۷-۱۱۲
http://ejcp.gau.ac.ir

نحوه تغییر محتوای کربوهیدرات، پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تحت‌تأثیر اسیدسالیسیلیک طی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در دو رقم گندم

شیوا حمیدزاده‌مقدم[۱]، *سدابه جهانبخش گده‌کهریز[۲] و علی عبادی[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی،
[۲و۳]استادیار و دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۷

چکیده

گندم یکی از محصولات زراعی مهم در سطح جهانی بوده که همواره تحت‌تأثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرد. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از جمله روش‌های مقابله با تنش‌های مختلف می‌باشد که تحت عوامل مختلفی تحریک می‌گردد. با توجه به این‌که اسیدسالیسیلیک در ایجاد مقاومت به تنش‌های مختلف دخالت دارد، به‌منظور بررسی نحوه تأثیر اسیدسالیسیلیک در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، اثرات تیمار خارجی اسیدسالیسیلیک بر گیاهچه‌های دو رقم گندم فلات و چمران بررسی گردید تا سیستم‌های دخیل در انتقال پیام دفاعی این گیاه طی مرگ برنامه‌ریزی شده از جنبه بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گیرد. به این منظور آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. فاکتورهای آزمایش شامل دو رقم چمران و فلات، تیمار با هورمون اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار و نمونه‌برداری ۸ و ۱۲ ساعت بعد از تیمار بود. نتایج این بررسی نشان داد که تحت تیمار اسیدسالیسیلیک میزان فعالیت کاتالاز و پلی‌فنل‌اکسیداز با افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک کاهش و برعکس میزان پروتئین کل، کربوهیدرات، فعالیت پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز افزایش می‌یابد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، با توجه به این‌که این متابولیت‌ها در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی دخالت دارند، تیمار اسیدسالیسیلیک می‌تواند از طریق دخالت در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و سطوح پروتئین‌ها در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی دخالت داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اسیدسالیسیلیک، سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی

* مسئول مکاتبه: jahanbakhsh@uma.ac.ir

مقدمه

گندم به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع غذایی مردم جهان، به‌طور گسترده در سطح جهان کشت می‌شود. گیاهان از جمله گندم دائماً در معرض انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند که رشد، تکثیر و تمایز گیاه را تغییر می‌دهند (باچانان و همکاران، ۲۰۰۰). شدت یک تنش، پاسخ‌های گیاهی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. حتی نوع بافت و اندام، سن و ژنوتیپ گیاه نیز در شدت و نوع پاسخ مؤثر است (کونز و همکاران، ۲۰۰٦). مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی می‌تواند بخشی از پاسخ گیاه به انواع متفاوت تنش‌ها باشد. در گیاه اصطلاح مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی به‌منظور توصیف انواع کنترل‌شده ژنتیکی مرگ سلولی به‌کار می‌رود که علائم آن مشابه با این نوع مرگ در جانوران می‌باشد که شامل تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در موجود زنده می‌باشد (گاراواردنا و همکاران، ۲۰۰٤).

اسیدسالیسیلیک یکی از ترکیبات القاکننده مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در برابر انواع تنش‌ها می‌باشد. این هورمون مولکول علامت‌دهنده شناخته‌شده‌ای است که نقش عمده‌ای را در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی در گیاهان ایفا می‌کند. کاربرد خارجی اسیدسالیسیلیک عملکرد گیاهی را تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌دهد و همچنین این هورمون مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی را در مواجهه با انواع تنش‌ها کنترل می‌کند. یکی از واضح‌ترین علایم و نشانه‌های مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی تحت‌تأثیر اسیدسالیسیلیک تغییر در میزان بیان پروتئین‌ها می‌باشد (ماچ و همکاران، ۲۰۰۱). از طرف دیگر اسیدسالیسیلیک با تنظیم ساختار دفاعی آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی و غیرآنزیمی، گیاه را در برابر تنش اکسیداتیو حمایت می‌کند (سینق گیل، ۲۰۱۰). علی‌رغم فعالیت تخریبی گونه‌های فعال اکسیژنی، آن‌ها می‌توانند به‌عنوان پیام‌بر ثانویه در فرایندهای مختلف سلولی شامل فعال‌سازی مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی نقش مثبتی را ایفا کنند (یانگ وهمکاران، ۲۰۰۷). تعامل کنترل‌شده بین سطوح اسیدسالیسیلیک و میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژنی باعث ایجاد تفاوت بین بافت آسیب‌دیده و سالم می‌شود (آلوارز، ۲۰۰۰). همچنین اسیدسالیسیلیک از طریق تأثیر بر آنزیم‌های هیدرولیزکننده پلی‌ساکاریدها می‌تواند منجر به افزایش مقدار قندها شده یا این‌که تشکیل قندهای محلول از پلی‌ساکاریدها را تسریع نماید (خداری، ۲۰۰٤).

بنابراین در این پژوهش اثر اسیدسالیسیلیک بر بیان عوامل مؤثر در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی از جمله کربوهیدرات، محتوای پروتئینی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی مورد استفاده، شرایط کاشت و نمونه‌برداری: آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۱ اجرا گردید. در این آزمایش دو رقم گندم فلات و چمران بعد از ۳ برگچه‌ای شدن، با اسیدسالیسیلیک تیمار شدند. برای این منظور محلول‌پاشی توسط اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار، پس از ۳ برگچه‌ای شدن گیاهان انجام گرفت و نمونه‌برداری از برگ‌ها ۸ و ۱۲ ساعت بعد از محلول‌پاشی انجام شد. در هر مرحله نمونه‌برداری، گیاهچه‌های شاهد و تیمار به‌طور جداگانه نمونه‌برداری شدند و بلافاصله به داخل یخچال ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

تعیین غلظت پروتئین: این اندازه‌گیری براساس روش برادفورد (برادفورد، ۱۹۷٦) انجام گردید. به‌منظور رسم منحنی استاندارد پروتئین، از پروتئین استاندارد آلبومین گاوی (BSA)[1] استفاده شد و مقدار کمی پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش مقدار کربوهیدرات برگ: استخراج قندهای کل از جوان‌ترین برگ با استفاده از روش اوموکولو و همکاران (۱۹۹٦) انجام گرفت. بدین‌منظور ۰/۱ گرم نمونه برگی با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در هاون چینی خوب سائیده شد. عصاره به‌دست آمده به‌مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. اندازه‌گیری مقدار قند با استفاده از روش مک‌ردی و همکاران (۱۹۵۰) انجام شد. برای این منظور ۳ میلی‌لیتر از محلول آنترون به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره اضافه و مقدار قند محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ٦۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

روش اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی

استخراج آنزیمی: برای استخراج عصاره آنزیمی از روش (سودهاکر و همکاران، ۲۰۰۱) استفاده شد. بدین‌منظور، ۱ گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوای ۵ میلی‌لیتر بافر تریس- HCL ۰/۰۵ مولار با pH=۷/۵ خوب سائیده شد. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. در پایان مرحله سانتریفوژ، محلول روئی (حاوی عصاره پروتئینی) جهت بررسی فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت.

1- Bovine Serum Albumin

روش اندازه‌گیری آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز: پس از آماده‌سازی عصاره پروتئینی فعالیت سینتیکی آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با روش کار و میشرا با یک سری تغییرات (۱۹۷٦) بررسی شد. برای این منظور ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با ۰/٤ میلی‌لیتر پیروگالل و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی خوب مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، منحنی تغییرات جذب در طول موج ٤۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

روش اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز: فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز با استفاده از روش چنس و مهلی (۱۹۵۵) همراه با تغییراتی سنجیده شد. برای این منظور ۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس به همراه ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه در حمام یخ با ٦۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

روش اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز: برای اندازه‌گیری فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز از روش کار و میشرا (۱۹۷٦) استفاده شد. ابتدا محلول‌های بافر تریس ۱ مولار، آب اکسیژنه ۵۰ میلی‌مولار، پیروگالل ۱۰۰ میلی‌مولار تهیه شد. از هر کدام از مواد ذکر شده، ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و محلول حاصل به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول بالا با ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط و منحنی تغییرات جذب در طول موج ٤۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

روش اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسیددیسموتاز: برای استخراج آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۰/۵ گرم نمونه برگی پودر شده با نیتروژن مایع، در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار سرد (pH=۷/۵) حاوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار هموژن شد و با استفاده از عصاره حاصل فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به روش (دینسا و همکاران ۱۹۸۰)، اندازه‌گیری گردید. میزان جذب در طول موج ۵٦۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد.

بعد این بررسی فعالیت هر یک از آنزیم‌ها بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

تجزیه‌های آماری: مطالعه صفات اندازه‌گیری شده از طریق آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار: رقم گندم در ۲ سطح، تیمار اسیدسالیسیلیک در ٤ سطح و زمان نمونه‌برداری در ۲ سطح و با ۳ تکرار انجام گرفت و برای تجزیه‌های آماری داده‌ها از دو نرم‌افزار SAS و SPSS استفاده شد.

نتایج و بحث

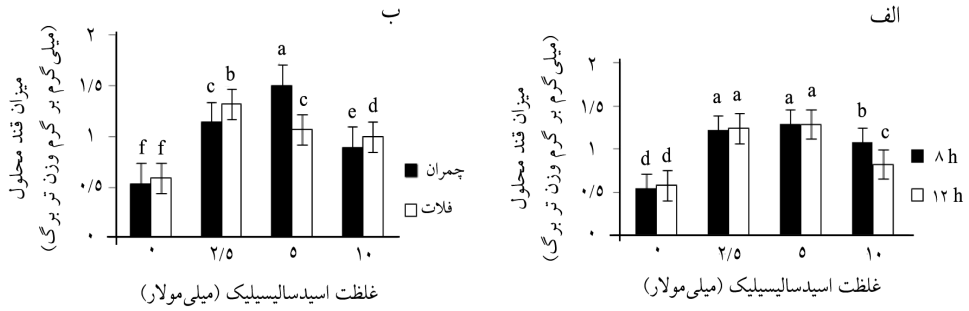
تغییرات کمی کربوهیدرات‌ها در دو رقم فلات و چمران تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک در بازه‌های زمانی ۸ و ۱۲ ساعت: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثرات متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک و زمان و همچنین غلظت اسیدسالیسیلیک و رقم در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک تا غلظت ۵ میلی‌مولار در هر دو بازه زمانی، میزان کربوهیدرات افزایش پیدا می‌کند، در حالی‌که در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک در هر دو بازه زمانی از نظر میزان کربوهیدرات اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. از طرف دیگر غلظت ۱۰ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک در هر دو بازه زمانی سبب کاهش میزان کربوهیدرات شد. همچنین در هر دو رقم چمران و فلات در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک، افزایش معنی‌داری وجود داشت و سپس با افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک به ۱۰ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۱).

از آن‌جا که غلظت بالای کربوهیدرات باعث کاهش خسارت‌های اکسیداتیو و حفظ ساختار پروتئین در طی کمبود آب محسوب می‌شود، به‌نظر می‌رسد که اسیدسالیسیلیک با افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، کاهش تنش اکسیداتیو و حفاظت از غشاهای کلروپلاستی و سلولی و حفاظت از ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، موجب افزایش میزان قندهای موجود در گیاهان می‌شود. اسیدسالیسیلیک از طریق تأثیر بر آنزیم‌های هیدرولیزکننده پلی‌ساکاریدها منجر به افزایش مقدار قندها شده یا این‌که تشکیل قندهای محلول از پلی‌ساکاریدها را تسریع می‌نماید (خداری، ۲۰۰٤). قند در گیاه علاوه‌بر تولید انرژی منجر به تنظیم بیان ژن‌های متفاوت نیز می‌شود (رولاند و همکاران، ۲۰۰٦). برخی از ژن‌های القاکننده مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی توسط کاهش میزان ذخیره قندی تنظیم می‌شوند. در نتیجه توانایی علامت‌دهی توسط میزان کربوهیدرات به‌همراه هورمون‌های گیاهی، می‌تواند نقش مهمی را در واکنش‌های گیاهی به عوامل محیطی داشته باشد (مورکوناز و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین قندها در گیاهان می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانتی داشته باشند (لانک- ملادک و همکاران، ۲۰۱۰). ساکارز در غلظت‌های کم به‌عنوان یک مولکول علامت‌دهی و در غلظت‌های بالا به‌عنوان پالاینده گونه‌های فعال اکسیژنی عمل می‌کند (ساجیو و همکاران، ۲۰۰۹).

جدول ۱- میانگین مربعات تجزیه واریانس کربوهیدرات، پروتئین کل، کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز تحت تیمار اسیدسالیسیلیک.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		کربوهیدرات	پروتئین کل	کاتالاز	پراکسیداز	پلی‌فنل‌اکسیداز	سوپراکسیددیسموتاز
گندم	۱	۰/۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۷**	٤/۳۳۸**	۲۳/۵۵۱**	٦۹/۰۲٤**	۲۱۰/۸۸۵**
اسید سالیسیلیک	۳	۱/۳۳۲**	۰/۰۰۷**	۵/۵۷۱**	٦/۱۱٤**	۲۰/۲۲۸**	۱۵۳/۷۷۵**
زمان	۱	۰/۰۳۱*	۰/۰۰۰٤**	۰/۰۱٦^{ns}	۰/۷۷۷^{ns}	۲/۳۲۱*	۲۸/۷۷٦**
گندم*اسید سالیسیلیک	۳	۰/۲۲۳**	۰/۰۰۰۱^{ns}	۱/۳۹۷**	۳/۹۹٦**	۵/۲۵۸**	۷/۰٤٤**
گندم × زمان	۱	۰/۰۰۳^{ns}	۰/۰۰۰۱^{ns}	۱/٤۰۵*	۰/۱۳۹^{ns}	۱/۹٦۸^{ns}	۰/۰۰٤^{ns}
اسید سالیسیلیک × زمان	۳	۰/۰۵۵**	۰/۰۰۰۳**	۰/۷٤۲*	۰/۳۹۱^{ns}	۰/۵۰۵^{ns}	۱۷/٦٦۵**
گندم × اسیدسالیسیلیک × زمان	۳	۰/۰۱۵^{ns}	۰/۰۰۰۰٤^{ns}	۰/۲۰۳^{ns}	۰/٦٦۱^{ns}	۱/۲٤۹^{ns}	۰/۱۲٤^{ns}
خطا	۳۲	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۰۵	۰/۲٤۸	۰/۲۳۵	۰/٤۳۵	۰/۳۰۱
ضریب تغییرات		۸/۲۹	۷/۲۱	۸/۹۰٦	۱۱/٦٤	۸/۷۵	۸/۷۹

*، ** و ns به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۵ درصد، ۱ درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.

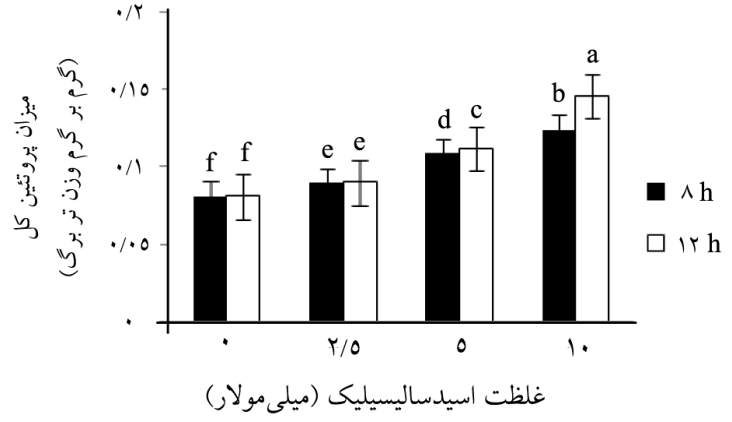


شکل ۱- میانگین تغییرات اثر دوجانبه غلظت اسیدسالیسیلیک × زمان (الف) و غلظت اسیدسالیسیلیک × رقم (ب) برای صفت کربوهیدرات.

تغییرات کمی غلظت پروتئین در دو رقم فلات و چمران تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک در بازه‌های زمانی ۸ و ۱۲ ساعت: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک و زمان در سطح احتمال ۵ درصد، معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج حاصل

مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک تا غلظت ۲/۵ میلی‌مولار در بازه زمانی ۸ ساعت میزان پروتئین کل تفاوت معنی‌داری نداشت، در حالی‌که در غلظت ۲/۵ میلی‌مولار در زمان ۱۲ ساعت و غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک در هر دو بازه زمانی افزایش معنی‌داری از نظر میزان پروتئین کل وجود داشت (شکل ۲).

گونه‌های فعال اکسیژنی میزان تولید این متابولیت را براساس نیاز سلولی در مکان‌های متفاوت و در زمان‌های خاص تنظیم می‌کنند (گچو و همکاران، ۲۰۰۶). سنتز پروتئین‌های جدید در فرایند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی نقش کلیدی دارند (وان‌بروسجم و دات، ۲۰۰۶). جومالی و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که بیش‌تر ژن‌هایی که تحت تجمع اسیدسالیسیلیک در اثر تنش بیان می‌شوند باعث تولید پروتئین‌هایی می‌شوند که فعال‌سازی مسیرهای علامت‌دهی و در نهایت مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی را منجر می‌شوند. همچنین ثابت شده است که برخی از پروتئین‌ها در گیاهان با کاربرد اسیدسالیسیلیک حتی در غیاب عامل تنش‌زا تولید می‌شوند.



شکل ۲- میانگین تغییرات اثر دوجانبه غلظت اسیدسالیسیلیک × زمان برای صفت پروتئین کل.

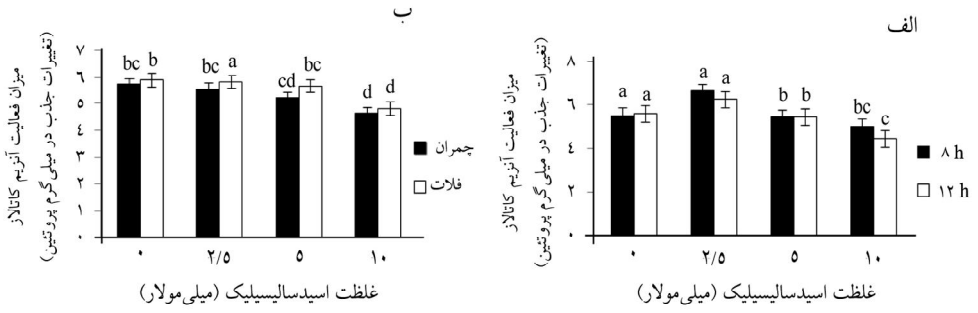
بررسی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرات متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک و زمان و همچنین غلظت اسیدسالیسیلیک و رقم به‌ترتیب در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین مشخص نمود که در غلظت

۲/۵ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک در هر دو بازه زمانی اختلاف معنی‌داری از نظر میزان کاتالاز وجود نداشت، در حالی‌که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک در هر دو بازه زمانی کاهش معنی‌داری مشاهده شد. علاوه‌بر این در رقم فلات نیز در همه غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ کاهش معنی‌داری وجود داشت (شکل ۳).

یکی از تنظیم‌کننده‌های منفی مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، LSD1[1] می‌باشد. عدم فعالیت LSD1 در انواع جهش‌یافته منجر به مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژنی می‌شود. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در انواع جهش‌یافته نشانگر این موضوع می‌باشد که فعالیت آنزیم کاتالاز وابسته به LSD1 می‌باشد. ارتباط بین LSD1 و کاتالاز، در تنظیم گونه‌های فعال اکسیژنی تولیدشده در پراکسی‌زوم دخالت دارد. علاوه‌بر این، تجمع اسیدسالیسیلیک نیازمند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی تنظیم شده، از طریق ارتباط بین LSD1 و کاتالاز می‌باشد (لی و همکاران، ۲۰۱۳)

اسیدسالیسیلیک با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز باعث افزایش هیدروژن پراکسید و برخی از گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد که این مولکول‌ها برای فعال کردن ژن‌های عامل مقاومت به شرایط تنش‌زا و بیماری‌زا وارد عمل می‌شوند، بعد از فعال شدن ژن‌های عامل مقاومت رادیکال‌های آزاد باید از سلول حذف شوند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی در تیمار اسیدسالیسیلیک برای حذف آن‌ها مصرف شده و میزان آن‌ها را کاهش می‌دهد (هرناندز و همکاران، ۲۰۰۱). اسیدسالیسیلیک از یک‌سو روی فعالیت کاتالاز نقش بازدارندگی دارد و از سوی دیگر با توجه به نقش تحریک‌کنندگی آن در نظام دفاع اکتسابی، افزایش تولید کل و در نتیجه افزایش فعالیت کاتالازی بافت را سبب می‌شود (دورانت و دونگ، ۲۰۰٤)، اما این‌که کدام یک از جنبه‌های افزایش و یا کاهش فعالیت کاتالازی کل بافت در نتیجه پیش‌تیمار اسیدسالیسیلیک غلبه پیدا کند به تعادل نقش بازدارندگی مستقیم آن روی آنزیم کاتالاز و نقش افزایش‌دهندگی آن روی تولید بیش‌تر کاتالاز در بافت باز می‌گردد.

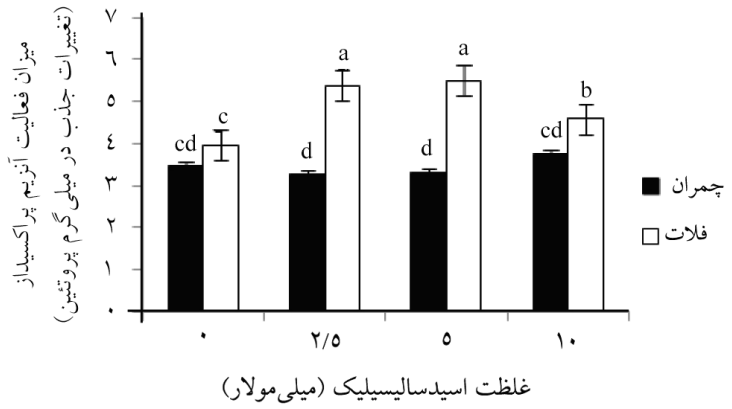
1- Lesion Simulating Disease 1



شکل ۳- میانگین تغییرات اثر دوجانبه غلظت اسیدسالیسیلیک × زمان (الف) و غلظت اسیدسالیسیلیک × رقم (ب) برای صفت کاتالاز.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثرات متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک و رقم در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که در رقم چمران در غلظت ۱۰ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیمی نسبت به دو غلظت دیگر وجود داشت. در حالی‌که در رقم فلات افزایش معنی‌داری در همه غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار نسبت به کنترل وجود داشت (شکل ٤).

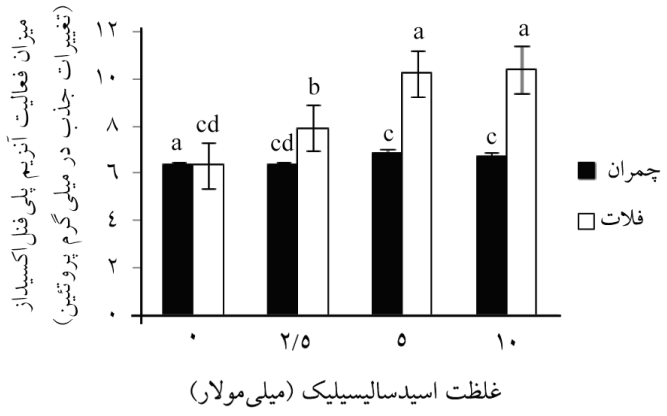
پراکسیدازها از جمله آنزیم‌هایی به‌شمار می‌روند که نقش بسیار مهمی را در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی دارند. پراکسیدازها مسئول حذف مقادیر اضافی پراکسید هیدروژن می‌باشند. اسیدسالیسیلیک به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از جمله پراکسیداز را فعال می‌کند که می‌تواند به‌عنوان یک سوبسترای دهنده الکترون برای پراکسیداز عمل نماید. کاهش آسیب غشای سلولی در پاسخ به تیمار اسیدسالیسیلیک می‌تواند نمایانگر مسأله القاء سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی به‌وسیله اسیدسالیسیلیک، با از بین بردن رادیکال‌های آزاد به‌طور مستقیم و یا توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت باشد، که خسارت‌های ناشی از این گونه‌های فعال در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی غشاء را کاهش دهد (حیات و احمد، ۲۰۰۷). پراکسیدازها نمی‌توانند به‌عنوان فعال‌کننده مستقیم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی عمل کنند، اما افزایش بیان ژن پراکسیداز، تأثیر مهمی بر روی تولید گونه‌های فعال اکسیژنی و در نتیجه فعال‌سازی مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در طی مواجهه با تنش دارد (بوربریج و همکاران، ۲۰۰۷).



شکل ٤- میانگین تغییرات اثر دوجانبه غلظت اسیدسالیسیلیک × رقم برای صفت پراکسیداز.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثرات متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک و رقم در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در رقم فلات و همچنین در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیمی وجود داشت، ولی در رقم چمران با وجود افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیمی نسبت به کنترل، بین غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۵).

پلی‌فنل‌اکسیداز در سلول‌های گیاهی نقش مهمی در اکسیداسیون فنل‌ها به کئینون‌ها و تشکیل لیگنین دارد. این آنزیم در واکنش‌های دفاعی و فوق حساسیت گیاه در مقابل ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها دخالت دارد. نقش کئینون‌ها در مقاومت گیاهان به عوامل بیماری‌زا ثابت شده است (محمدی و همکاران، ۲۰۰۲). اهمیت پلی‌فنل‌اکسیداز به‌دلیل وجود هماهنگی در تنظیم میزان فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز و سنتز فنیل پروپانوئید می‌باشد. وقتی‌که سلولی آسیب می‌بیند، در نتیجه فعالیت این آنزیم، ترکیبات فنلی به کئینون تبدیل می‌شود که در القا مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی مؤثر می‌باشد و همچنین، ترکیبات فنلی پلیمریزه شده را برای جلوگیری از آلودگی‌های بعدی مهیا می‌سازد (نیومن و همکاران، ۲۰۱۱).

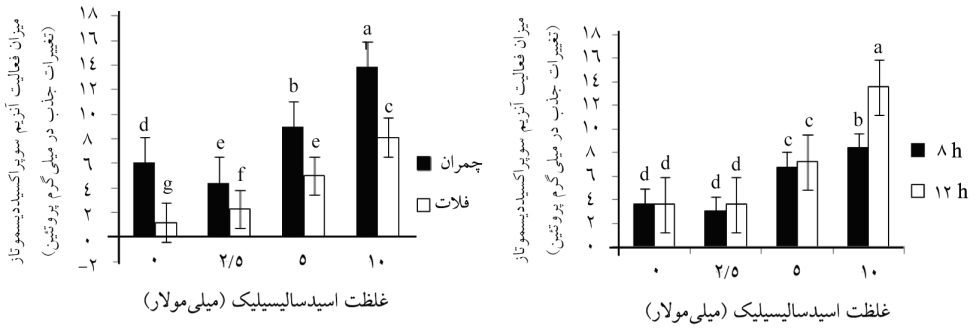


شکل ۵- میانگین تغییرات اثر دوجانبه غلظت اسیدسالیسیلیک × رقم برای صفت پلی‌فنل‌اکسیداز.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل غلظت اسیدسالیسیلیک، رقم و همچنین غلظت اسیدسالیسیلیک و زمان در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مولار در هر دو بازه زمانی افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل وجود داشت، همچنین در غلظت ۱۰ میلی‌مولار با افزایش زمان از ۸ ساعت به ۱۲ ساعت، افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز مشاهده شد. علاوه‌بر این در هر دو رقم چمران و فلات در هر دو بازه زمانی افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیمی وجود داشت که این افزایش در رقم چمران بیش‌تر از رقم فلات بود (شکل ٦).

افزایش بیان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مواجهه با تنش‌های زیستی (بوگوسزوسکا و همکاران، ۲۰۱۰) و غیرزیستی (تورس، ۲۰۱۰) مشاهده شده است. تنش‌های محیطی سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کلروپلاست و دیگر اندامک‌های سلولی گیاه می‌شود که این رادیکال‌های آزاد اکسیژن ممکن است به‌وسیله آنزیم سوپراکسیددیسموتاز تبدیل به پراکسید هیدروژن شده و سپس توسط آسکوربات‌پراکسیداز و گلوتاتیون‌ردوکتاز در کلروپلاست تبدیل به آب شود (هوسلادرن و آلچستر، ۱۹۹۳). سنارانتا و همکاران (۲۰۰۲) با تأکید بر نقش سیستم آنتی‌اکسیدانت در فرآیند خنثی‌سازی اثرات تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی، سرما و گرما در دو گیاه لوبیا و گوجه‌فرنگی، نشان دادند که به‌کار بردن اسیدسالیسیلیک به‌صورت خارجی در شرایط تنش، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از

جمله سوپراکسیددیسموتاز را بهبود می‌بخشد. از طرف دیگر، یوردانووا و پوپووا (۲۰۰۷) بیان کردند که استفاده از اسیدسالیسیلیک به همراه سرما، باعث افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز می‌شود. این آنزیم وظیفه پالایش رادیکال‌های سوپراکسیددیسموتاز، که در نتیجه تولید هیدروژن پراکسید در واکنش دیسموتاسیون تولید می‌شود، را دارا می‌باشد. اسیدسالیسیلیک به‌عنوان القاکننده تولید سوپراکسیددیسموتاز، منجر به تبدیل سوپراکسید به هیدروژن پراکسید شده و همراه با اکسید نیتریک منجر به واکنش‌های دفاعی گیاه از جمله مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی می‌شود (بیرز و مک‌دوئل، ۲۰۰۱).



شکل ٦- میانگین تغییرات اثر دوجانبه غلظت اسیدسالیسیلیک × زمان (الف) و غلظت اسیدسالیسیلیک × رقم (ب) برای صفت سوپراکسیددیسموتاز.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل، نقش کلیدی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی نشان می‌دهند. به‌طوری‌که میزان فعالیت کاتالاز و پلی‌فنل‌اکسیداز با افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک کاهش و برعکس میزان فعالیت پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز افزایش پیدا کرد و همچنین میزان غلظت کربوهیدرات‌ها که در مکانیسم‌های دفاعی گیاه نقش اساسی دارند افزایش یافت. در کل این بررسی نشان‌دهنده آن است که تیمار خارجی اسیدسالیسیلیک می‌تواند در ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی تأثیر داشته باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که اسیدسالیسیلیک می‌تواند از طریق تنظیم مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و ساختار دفاعی آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی و غیرآنزیمی در کاهش تنش‌های اکسیداتیو نقش حیاتی داشته باشد و با ایجاد مقاومت در مقابل تنش مرتبط باشد.

منابع

1.Alvarez, M.E. 2000. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. Plant Mol. Biol. 44: 429-442.

2.Beers, E., and Mc Dowel, J. 2001. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. Plant Biol. 4: 561-567.

3.Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

4.Boguszewska, D., Grudkowska, M., and Zagdanska, B., 2010. Drought responsive antioxidant enzymes in potato (*Solanum tuberosum L.*). Am. J. Potato Res. 53: 373-382.

5.Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L. 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. John Wiley & Sons. USA. 1195p.

6.Burbridge, E., Diamond, M., Dix, P.J., and Mccabe, P.F. 2007. Use of cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on cell death induction thresholds in tobacco. Plant Sci. 172: 853-860.

7.Chance, B., and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Method Enzymol. 11: 764-755.

8.Dhindsa, R.S., Dhindsa, P.P., and Thorpe, T.A. 1980. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid-peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Exp. Bot. 32: 93-101.

9.Durrant, W.E., and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 42: 185-209.

10.Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denevi, I., and Laloi, C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. Bioassays. 28: 1091-1101.

11.Gunawardena, A.H.L.A., Greenwood, J.S., and Dengler, N.G. 2004. Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development. Plant Cell. 16: 60-73.

12.Hausladen, A., and Alscher, R.G. 1993. Glutathione-active oxygen in plants. Antioxidants in Higher Plants. CRC Press. Boca Raton. Pp: 1-30.

13.Hayat, S., and Ahmad, A. 2007. Salicylic Acid: A Plant Hormone. Springer, Dordrecht, Netherlands. Pp: 97-99.

14.Hernandez, J.A., Ferrer, M.A., Jimenez, A., Barcelo, A.R., and Sevilla, F. 2001. Antioxidant systems and O^{2-}/ H^2O^2 production the apoplast of pea leaves. Its relation with salt- induced necrotic lesions in minor veins. Plant Physiol. 127: 827-831.

15.Jumali, S.S., Said, I.M., Ismail, I., and Zainal, Z. 2011. Genes induced by high concentration of salicylic acid in *Mitragyna speciosa.* Aust. J. Crop Sci. 5: 296-303.

16.Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenol oxidase activities during Rice leaf senescence. Plant Physiol. 57: 315-319.
17.Khodary, S.E.A. 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed Maize plants. IJAB. 6: 5-8.
18.Kunz, B.A., Cahill, D.M., Mohr, P.G., Osmond, M.J., and Vonarx, E.J. 2006. Plant responses to UV radiation and links to pathogen resistance. Int. Rev. Cytol. 255: 1-40.
19.Lang-Mladek, C., Popova, O., Kiok, K., Berlinger, M., Rakic, B., and Aufastez, W. 2010. Transgenerational inheritance and resetting of stress-induced loss of epigenetic in Arabidopsis. Mol. Plant. 3: 594-602.
20.Li, Y., Chen, L., and Mu, J. 2013. Lesion Simulating Disease1 interacts with catalases to regulate hypersensitive cell death in Arabidopsis. Plant Physiol. 163: 1059-1070.
21.Mauch, F., Mauch-Mani, B., Gaille, C., Kull, B., Haas, D., and Reimmann, C. 2001. Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. Plant J. 25: 67-77.
22.McCready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V., and Owens, H.S. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. Anal Chem. 22: 1156-1158.
23.Mohammadi, M., and Kazemi, H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Sci. 162: 491-498.
24.Morkunas, I., Garnczarska, M., Bednarski, W., Ratajczak, W., and Waplak, S. 2003. Metabolic and ultrastructural responses of lupine embryo axes to sugar starvation. J. Plant Physiol. 160: 311-319.
25.Newman, S., Tantasawat, D., and Steffens, J. 2011. Tomato Polyphenol Oxidase B is spatially and temporally regulated during development. Molecules. 6: 493-517.
26.Omokolo, N.D., Tsala, N.G., and Djocgoue, P.F. 1996. Changes in carbohydrate, amino acid and phenol content in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya Bra. Grif.* Ann Bot. 77: 153-158.
27.Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 675-709.
28.Senaranta, T., Touchell, D., Bumm, E., and Dixon, K. 2002. Acetylaslicylic (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. Plant Growth Regul. 30: 157-161.
29.Singh Gill, S., and Tuteja, N. 2010. Reactive Oxygen Species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48: 909-930.
30.Sudhakar, S., Li, Y., Katz, M.S., and Elango, N. 2001. Translational regulation is a control point in RUNX2/Cbfa1 gene expression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 289: 616-22.

31. Sugio, A., Dreos, R., Aparicio, F., and Maule, A.J. 2009. The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis. Plant Cell. 21: 642-645.
32. Torres, M.A. 2010. ROS in biotic interactions. Physiol. Plant. 138: 414-429.
33. Van Breusegem, F., and Dat, J. 2006. Reactive Oxygen Species in plant cell death. Plant Physiol. 141: 384-390.
34. Yang, H., Yang, S., Li, Y., and Hua, J. 2007. The Arabidopsis BAP1 and BAP2 genes a regeneral inhibitors of programmed cell death. Plant Physiol. 145: 135-146.
35. Yordanova, R., and Popova L. 2007. Effect of exogenous treatment with salicylic acid on photosynthetic activity and antioxidant capacity of chilled wheat plants. Plant Physiol. 33: 155-170.

Iranian Society of Agronomy and Plant Breeding Sciences

EJCP., Vol. 7 (2): 97-112
http://ejcp.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Salicylic acid effect on variation of carbohydrate content, total protein and antioxidant enzymes during programmed cell death in two wheat cultivars

Sh. Hamidzadeh Moghadam[1], *S. Jahanbakhsh Godekahriz[2] and A. Ebadi[3]

[1]M.Sc. Student, Dept. of Agriculture Biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, [2,3]Assistant Prof. and Associate Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Accepted: 2014/01/01; Received: 2014/05/17

Abstract

Wheat is one of the most important crops in the world that is constantly faced with the different biotic and abiotic stresses. Programmed cell death is one of the methods for coping with different stress which is stimulated by several factors. Because salicylic acid is involved in resistance to various stresses, to explore the effects of salicylic acid on programmed cell death, the effects of salicylic acid exogenous treatment examined on the Chamran and Falat cultivars to evaluate biochemical aspects of plant defense system to transmit messages during the programmed cell death. So, the experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. Experimental factors consisted of two Chamran and Falat cultivars, Salicylic acid treatment at concentrations of 0, 2.5, 5 and 10 mM and sampling after 8 and 12 hours treatment. The results of this study showed that catalase and polyphenol oxidase activity decreased with increasing of salicylic acid concentration, however carbohydrate, total protein, peroxidase and superoxide dismutase activity increased. The results indicated, as regards, these metabolites are involved in programmed cell death, salicylic acid exogenous treatment could involve in the regulation of programmed cell death through the involvement of antioxidant enzymes activity and protein levels.

Keywords: Catalase, Programmed cell death, Salicylic acid, Superoxide dismutase, Wheat

* Corresponding Author; Email: jahanbakhsh@uma.ac.ir