



الگوی نواری برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش کم آبی و پرولین در گیاهچه آفتابگردان

علی بنده حق^{۱*}، مصطفی ولیزاده^۱، مهدی غفاری^۲، فاطمه جهانگیر^۱، زهرا دهقانیان^۱

^۱گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۲موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش تحقیقات دانه‌های روغنی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۹/۳/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: بروز تنش خشکی سبب ایجاد اختلالات متابولیسمی در سلول‌های گیاهی می‌گردد که می‌توان به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان یکی از عوامل اصلی اختلالات متابولیسمی سلول اشاره کرد. گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم دفاعی با کارایی بالایی هستند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا خنثی کند. بنابراین در شرایط تنش خشکی، فعالیت‌های بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای تحمل تنش توسط گیاهان مهم است. آگاهی از تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش خشکی می‌تواند کمکی برای شناسایی صفات مورفوفیزیولوژیکی موثر و مرتبط با این آنزیم‌ها در برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام متحمل باشد.

مواد و روش‌ها: برای بررسی اثر تنش خشکی و تیمار خارجی پرولین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX)، تیمار خشکی توسط پلی اتیلن گلیکول در سه سطح (صفر، ۴- و ۸- بار) و تیمار پرولین در سه سطح (صفر، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار)، به‌صورت محلول غذایی در مرحله گیاهچه‌ای به محیط گلدان‌ها اضافه شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در ۱۰ ژنوتیپ آفتابگردان انجام گرفت.

یافته‌ها: بر اساس میزان تغییر در میزان پرولین و وزن خشک شاخه از بین ۱۰ لاین اینبرد دو لاین BGK ۳۲۹ و RGK ۲۲۱ به‌ترتیب به‌عنوان متحمل‌ترین و حساس‌ترین لاین‌های اینبرد شناسایی شدند. الگوی نواری آنزیم‌ها با الکتروفورز در ژل‌های افقی آکریل‌امید ۷/۵ درصد بررسی شد. ارزیابی کمی فعالیت دنسیتومتریک ایزوزیم‌های مشاهده شده و تجزیه‌های آماری داده‌ها نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر فعالیت چهار ایزوزیم SOD₁، SOD₂، CAT₁ و POX₁ از کل هفت ایزوزیم مشاهده شده، تفاوت معنی‌دار وجود دارد. ایزوزیم SOD₁ با افزایش میزان تنش و تیمار پرولین تغییر معنی‌دار نشان نداد. اثر متقابل ژنوتیپ × پرولین برای SOD₂ و POX₁ در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد. تنش خشکی برای CAT₁ و اثر متقابل تنش × ژنوتیپ روی فعالیت ایزوزیم SOD₂ اثر معنی‌دار گذاشت. در حالی که فعالیت ایزوزیم POX₁ در سطوح تنش × پرولین معنی‌دار بود، اثر سه جانبه تنش × پرولین × ژنوتیپ POX₁ در سطح یک درصد معنی‌دار شد. فعالیت ایزوزیم SOD₂ تحت تاثیر ژنوتیپ قرارگرفت به‌طوری که در سطوح مختلف تنش و پرولین، برخی ژنوتیپ‌ها افزایش و برخی دیگر کاهش فعالیت نشان دادند. تیمار خارجی ۵ میلی‌مولار پرولین باعث کاهش فعالیت ایزوزیم POX₁ و CAT₁ در حضور تنش شد. تجزیه داده‌ها بر اساس دو

*نویسنده مسئول: bandehhagh@tabrizu.ac.ir

گروه حساس و متحمل آفتابگردان در برابر تنش خشکی نشان داد که تنها فعالیت POX_1 بین دو گروه فوق اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

نتیجه‌گیری: اسید آمینه پرولین توانایی تعدیل اثرات تنش را دارد و یک سیستم آنتی‌اکسیدان کارآمد به‌همراه القای افزایش تجمع پرولین در گیاه می‌تواند نقش مهمی در تحمل به خشکی ایفا کند. می‌توان از این ایزوزیم‌های POX در تشخیص ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در مرحله گیاهچه‌ای استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز، ایزوزیم، پراکسیداز، دنسیتومتریک، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز

مقدمه

آسکوربیک ...) کنترل می‌کنند. تغییر فعالیت و بیان آنزیم‌های مختلف آنتی‌اکسیدان در شرایط بدون تنش در گیاهان C_3 و C_4 گزارش شده است.

استپین و کلوبوس (۲۰۰۵) فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD، APX و GR را در ارقام گندم و ذرت تحت تنش شوری گزارش کرده‌اند (۲۹). تنش‌هایی همانند خشکی و شوری باعث افزایش میزان تنفس در نتیجه نشت الکترون تنفسی به بیرون از چرخه و تولید رادیکال‌های آزاد و ROS شامل سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) شده و غلظت این مواد به بالاتر از حد آستانه رسیده و سمیت ایجاد می‌کند که به اجزای مختلف سلول‌های زنده از جمله چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک آسیب اکسیداتیو وارد می‌کند (۱). فعال شدن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان گیاه تحت تنش‌های اکسیداتیو (از جمله خشکی) در گزارشات مختلف اعلام شده است (۱۴، ۲۱، ۲۲). البته میزان فعال شدن، بسته به حساسیت ارقام مختلف و پتانسیل ژنتیکی گونه‌های مختلف، متفاوت است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌عنوان سریع‌ترین واحدهای مقابله کننده در برابر افزایش ROSها به شمار می‌آیند. خصوصیات فیزیولوژیک گیاه از جمله بسته شدن روزنه‌ها، تغییر در الگوی تنظیم کننده‌های رشد و تجمع متابولیت‌ها نیز

خشکی خاک از جمله مخرب‌ترین و مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی در کشاورزی است. با وجود تحمل نسبی آفتابگردان در برابر خشکی، کمبود آب یکی از مهمترین عوامل محدود کننده عملکرد است (۲۴). دانه آفتابگردان به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی تولید آن به دلیل گستردگی مناطق خشک کافی نیست. در شرایط تنش عدم توازن بین فرآیند جذب انرژی و مصرف آن توسط اندام فتوسنتزی باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن^۱ و ناتوانی گیاه در مهار آن می‌گردد که در نهایت منجر به بروز تنش در غشاء سلول و بروز علائم ناشی از صدمات اکسیداتیو می‌شود (۸). الکترونی که از زنجیره انتقال الکترون خارج شده می‌تواند با O_2 در طول متابولیسم هوازی طبیعی واکنش نشان دهد و منجر به تولید ROS شود (۱۵). تولید ROS در گیاهان تحت، شرایط عادی از فتوسنتز، تنفس نوری و تنفس معمولی نیز رخ می‌دهد. گیاهان در شرایط معمولی و همچنین تنش، غلظت ROSها را توسط مجموعه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیت پراکسیداز (APX)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR) و پراکسیداز (POX) و غیر آنزیمی (شامل گلوکاتایون و اسید

نمونه‌های بارزی از سازگاری با شرایط تنش می‌باشند (۲۶).

یکی دیگر از تغییرات عمده بیوشیمیایی که در اثر کمبود آب در گیاه رخ می‌دهد، تغییر کمی و کیفی پروتئین‌های گیاهی و اسیدهای آمینه است. اشرف و فولاد (۲۰۰۷) گزارش کردند که تیمار گیاهان با اسمولیت‌هایی نظیر پرولین، گلاسیسین بتائین و تره‌هالوز موجب کاهش قابل ملاحظه اثر تنش می‌گردد (۴). سوشین کوا و همکاران (۲۰۱۳) به این نتیجه رسیدند که محتوای آنزیم SOD در گیاه *Thellungiella salsuginea* تحت تنش اکسیداتیو در حضور پرولین کاهش یافته و از نظر سطح، این آنزیم بین گیاهان شاهد و تحت تنش تفاوت معنی داری مشاهده نشد (۲۸). انور حسین و فوجیتا (۲۰۱۰) گزارش کردند که تیمار خارجی ۱۵ میلی‌مولار پرولین روی گیاه ماش، از طریق کاهش H_2O_2 و اکسیداسیون چربی، به عنوان یک مکانیسم محافظتی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از شوری عمل می‌کند (۳). بال اوگلو و همکاران (۲۰۱۲) به این نتیجه رسیدند که آنزیم APX و پرولین نقش مهمی در حفاظت بافت ریشه دو رقم آفتابگردان (Musala و Aydin) تحت شرایط تنش ناشی از پلی اتیلن گلیکول دارند و هر دو رقم واکنش یکسانی در مقابل تنش خشکی ۴- و ۸- بار نشان دادند (۷).

معصومی و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که همه ارقام مورد بررسی سویا به تنش کم آبی واکنش نشان داده و با فعال نمودن سیستم دفاع آنتی اکسیدان خود درصدد مقابله با رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش خشکی برآمدند (۱۷). با این که سیستم دفاعی در ارقام مورد بررسی فعال شده بود، ولی تنش شدید خشکی به طور معنی دار تخریب لیپیدها و فرآورده ناشی از آنها (مالون دی آلدئید) را افزایش و در نهایت عملکرد دانه و روغن را کاهش داده بود. این آزمایش

نشان داد که در شرایط تنش کم آبی، ارقام با مقادیر بالاتر آنتی اکسیدان دارای میزان کمتری از تخریب لیپیدها و در نهایت عملکرد بالاتر دانه و روغن بودند. پان و همکاران (۲۰۰۶) گیاهان هشت روزه شیرین بیان را به وسیله پلی اتیلن گلیکول و نمک طعام در معرض تنش خشکی و شوری قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که تغییرات آنتی اکسیدانی القا شده در اثر تنش، وابسته به شدت و افزایش مدت تنش و نیز ژنوتیپ و سن گیاه است (۲۰).

سیف‌زاده و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که تنش خشکی باعث کاهش عملکرد ریشه و افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و گلوکاتیون پراکسیداز در برگ‌های چغندر قند شده و تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان وجود دارد (۲۳). در این پژوهش، اثر سطوح مختلف تنش خشکی و مقادیر متفاوتی از پرولین در تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان SOD، CAT و APX در دو گروه از ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به خشکی در مرحله گیاهچه‌ای آفتابگردان مورد بررسی قرار گرفت تا احتمالاً در برنامه‌های گزینش ارقام در برابر خشکی از نتایج حاصل استفاده شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل ۱۰ لاین خالص آفتابگردان (جدول ۱) است که از ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوی تهیه شدند. به منظور بررسی تاثیر تنش کم آبی ناشی از پلی اتیلن گلیکول (PEG₆₀₀₀) و تیمار خارجی پرولین بر الگوی نواری آنزیم‌های آنتی اکسیدان، بذور آفتابگردان در آزمایشگاه سیتوژنتیک دانشگاه تبریز در بستر ماسه با سه تکرار بر اساس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی کشت شدند. در هر گلدان پنج عدد بذر کاشته شد که در چهار روز اول کشت،

فاکتور دیگر اعمال خارجی پرولین در سه سطح (صفر، ۵ و ۱۰ میلی مولار) بر اساس روش انور حسین و فوجیتا (۲۰۱۰) بود که به صورت محلول غذایی به محیط گلدانها بصورت آبیاری اضافه شدند (۱۸، ۳)

آبیاری با آب مقطر صورت گرفت و بعد از استقرار گیاهچه‌ها در شش روز بعدی تیمارهای مربوطه اعمال شد. یکی از فاکتورها، تنش خشکی ناشی از پلی اتیلن گلیکول با سه سطح (صفر، ۴- و ۸- بار) بر اساس روش میشل و کافمن (۱۹۷۳) و

جدول ۱- اسامی لاین‌های خالص مورد مطالعه آفتابگردان و نوع واکنش آنها به خشکی.

Table 1- List of sunflower pure lines and type of their reaction to drought stress.

کد ژنوتیپ Genotype code	نام name	واکنش نسبی در برابر خشکی Relative reaction to drought
1	BGK147	متحمل Tolerant
2	RGK259	متحمل Tolerant
3	RGK329	متحمل Tolerant
4	BGK 46	متحمل Tolerant
5	RGK26	متحمل Tolerant
6	BGK 56	متحمل Tolerant
7	BGK343	حساس Sensitive
8	RGK345	حساس Sensitive
9	BGK 23	حساس Sensitive
10	RGK 221	حساس Sensitive

اتمام الکتروفورز، رنگ آمیزی جهت مشاهده الگوهای نواری آنزیم‌ها که رنگ آمیزی آنزیم POX به روش آندرسون و همکاران (۱۹۹۵) و آنزیم‌های SOD و CAT به روش سولتیس و سولتیس (۱۹۹۰) انجام گرفت (۲، ۲۷). پس از ظهور نوارهای آنزیمی، عکس برداری از ژل‌ها صورت گرفت. وزن خشک شاخه‌ها، با قرار دادن در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک کردن به دست آمد.

تجزیه آماری

از نرم‌افزار MCID برای کمی‌سازی "مساحت × شدت" هر نوار ایزوزیمی به‌عنوان ارزیابی فعالیت دنسیتومتریک آنزیمی روی ژل استفاده شد. داده‌های کمی شده فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد مطالعه ابتدا تحت آزمون نرمال بودن داده‌ها با روش کولموگروف-اسمیرنوف قرار گرفت و یکنواختی

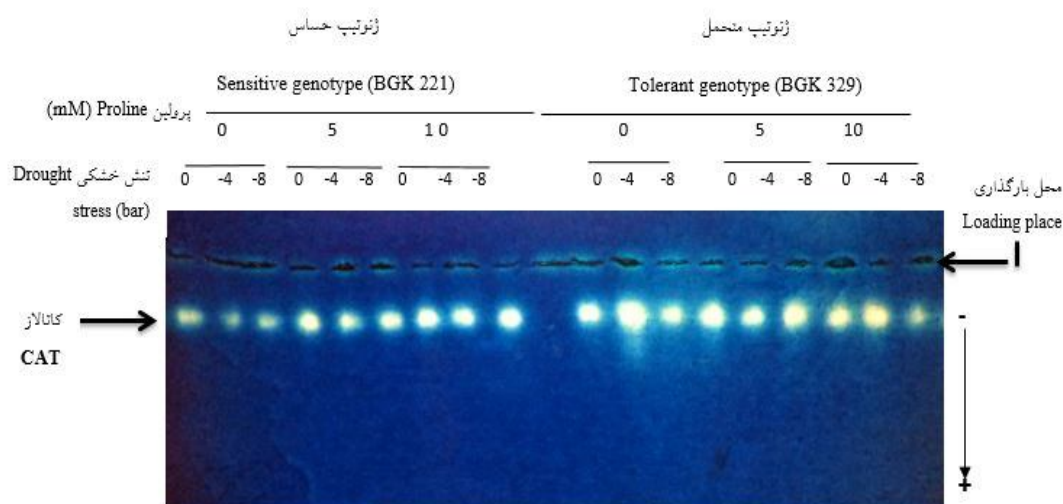
سپس از هیپوکوتیل گیاهچه‌های ۱۰ روزه نمونه‌گیری به صورت توده‌ای به عمل آمد و هر نمونه حداقل سه بوته را به شکل متعادل شامل می‌شد. میزان پرولین به روش بتیس و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد (۹). برای استخراج آنزیم‌ها مطابق روش ولیزاده و همکاران (۲۰۱۱) بافت هیپوکوتیل در حضور بافر استخراج همونیژه و در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند (۳۱). عصاره آنزیمی با قطعات بریده شده کاغذ واتمن شماره ۳ و مناسب با ابعاد چاهک، جذب و در ژل پلی آکرلامید ۷/۵ درصد بارگذاری شد. برای خنک کردن ژل و نگه‌داشتن دمای پایین هنگام الکتروفورز، از ظرف واجد یخ استفاده شد. حدود چهار ساعت پس از راه‌اندازی دستگاه الکتروفورز با آمپراژ ۲۸-۲۵ میلی آمپر، آبی بروموفنول با حرکت ۱۰-۸ سانتی‌متری به انتهای ژل رسید و ژل برای برش و رنگ آمیزی آماده شد. بعد از

گیاهچه‌ای تحت تنش خشکی ناشی از PEG در (سه سطح صفر، ۴- و ۸- بار) و تیمار خارجی پرولین (در سه سطح صفر، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) در ژل‌های پلی‌آکرلامید افقی نشان داد، که با روش الکتروفورز به کار رفته برای CAT تنها یک ایزوزیم (شکل ۱)، برای POX سه تا چهار ایزوزیم (شکل ۳)، و برای SOD (شکل ۷)، دو ایزوزیم مشاهده می‌شود.

واریانس‌های درون تیماری و تجزیه آزمایش فاکتوریل برپایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد و با آزمون LSD صورت گرفت.

نتایج و بحث

بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در هیپوکوتیل ۱۰ ژنوتیپ آفتابگردان، در مرحله



شکل ۱- نمونه‌ای از ژل رنگ آمیزی شده برای آنزیم مونومورف کاتالاز.
Figure 1- A sample of a stained gel for the catalase monomorphic enzyme.

جدول ۲- تجزیه واریانس فعالیت دنسیتومتریک آنزیمی در هیپوکوتیل گیاهچه آفتابگردان تحت تنش خشکی و تیمار خارجی پرولین.

Table 2- ANOVA table of densitometric enzyme activity in sunflower seedling hypocotyl under drought stress and exogenous proline treatment.

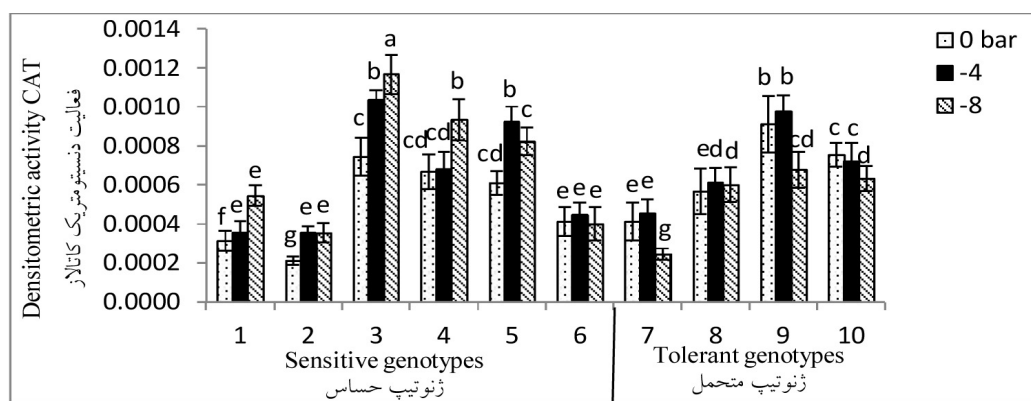
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات MS			
		CAT	POX ₁	SOD ₁	SOD ₂
S.O.V	df				
ژنوتیپ	9	10*	20**	30**	40**
(Genotype) G					
پرولین	2	0.148	10	4.332	0.716
(Proline) A					
تنش خشکی	2	1.190**	10	4.509	2.363
(Drought) B					
G*A	18	0.494	10*	2.446	4.329*
G*B	18	0.280	4.85	1.950	3.925*
A*B	4	0.117	10*	1.019	4.647
A*B*G	36	0.168	10**	1.483	2.528
خطای آزمایشی	180	0.250	3.075	2.362	2.365
Experimental error					
CV(%)		21	11	2	4

significant at: * p<0.05, ** p<0.01,

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

یون سوپراکسید کاهش یافته و در نتیجه فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش می‌یابد. در ژنوتیپ‌های گروه متحمل هرچند که میزان فعالیت آنزیمی در تنش ملایم (۴- بار) افزایش یافته ولی در تنش ۸- بار کاهش میزان فعالیت آنزیمی مشاهده شد که این کاهش فعالیت در ژنوتیپ‌های ۷ و ۹ نسبت به سایر ژنوتیپ‌های گروه متحمل معنی‌دار بوده است که سان و همکاران (۳۰) نیز نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های CAT، POX و SOD در برگ تاج‌خروس از یک الگوی افزایش - کاهش در مواجهه با تنش در مقایسه با حالت عادی پیروی می‌کنند، به طوری که با شدت یافتن و طولانی شدن تنش خشکی کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اتفاق می‌افتد. برای آنزیم POX بسته به ژنوتیپ، سه ایزوزیم پایدار تشخیص داده شد که به ترتیب حرکت نسبی به صورت POX_1 ، POX_2 و POX_3 نامگذاری شدند (شکل ۳). ایزوزیم کاتیونی POX_4 (حرکت کننده به طرف قطب منفی) نیز در ژنوتیپ‌ها اکثراً حالت پایدار نداشت و مورد استفاده قرار نگرفت.

میزان حرکت اندک نمونه‌ها، از محل بارگذاری نشان از وزن مولکولی بالای آن داشت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد (جدول ۲) که بین ژنوتیپ‌ها و بین سطوح خشکی از نظر فعالیت ایزوزیم CAT اختلاف معنی‌دار ۱ درصد وجود داشت ($p < 1\%$). اثر متقابل تنش \times ژنوتیپ نیز در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. اثر پرولین و اثر متقابل آن با فاکتورهای دیگر معنی‌دار نشد. ضریب تغییرات برای فعالیت این آنزیم مانند سایر ایزوزیم‌ها بالا بوده و ۲۱ درصد بدست آمد. این امر می‌تواند غیرمعنی‌دار شدن اثر پرولین یا تنش خشکی را توجیه کند. بررسی اثر متقابل ژنوتیپ \times خشکی (شکل ۲) نشان داد که در ژنوتیپ‌های گروه حساس، معمولاً با افزایش شدت تنش میزان فعالیت آنزیمی نیز به شکل معنی‌دار افزایش یافته است. به نظر می‌رسد که در شرایط تنش خشکی، افزایش غلظت پراکسید هیدروژن توسط فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز برای تجزیه پراکسید هیدروژن می‌گردد، اما در شرایط بدون تنش به دلیل عدم تولید بیش از حد ROSها، تولید پراکسید هیدروژن ناشی از

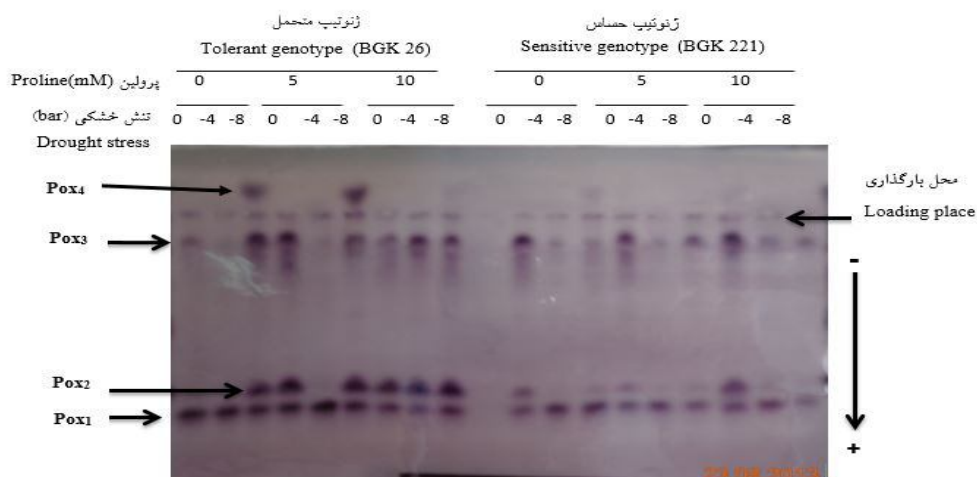


شکل ۲- فعالیت CAT در ژنوتیپ‌های آفتابگردان در سطوح مختلف تنش در مرحله گیاهچه‌ای.

Figure 2- CAT activity of sunflower seedlings under drought stress conditions.

تغییر فعالیت آنزیمی برای همه ژنوتیپ‌ها امکان‌پذیر نشد.

POX_3 و POX_2 نیز چند شکلی نسبتاً پایدار نشان دادند یعنی در برخی ژنوتیپ‌ها همواره حضور داشتند و در برخی دیگر وجود نداشتند. بنابراین اندازه‌گیری



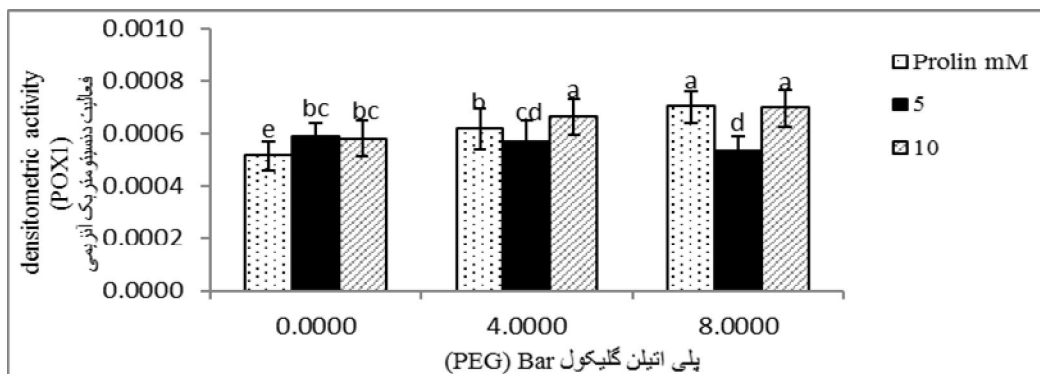
شکل ۳- ایزوزیم های مشاهده شده برای آنزیم POX در گیاهچه های آفتابگردان در سطوح مختلف تنش خشکی و پرولین خارجی.
Figure 3- Observed isozymes for POX enzyme in sunflower seedlings under drought stress and exogenous proline levels.

بررسی اثر متقابل ژنوتیپ × تنش (شکل ۶) نشان داد که فعالیت آنزیم POX₁ بسته به ژنوتیپ متفاوت بود. در ژنوتیپ های ۶ و ۹ از گروه متحمل باز هم بیشترین فعالیت آنزیمی مشاهده شد ولی فقط در ژنوتیپ شماره ۹ با افزایش تنش تا ۴- بار میزان فعالیت آنزیمی نیز افزایش یافت و در تنش ۸- بار میزان فعالیت به شکل معنی دار کاهش پیدا کرد، در حالی که در ارقام حساس ۱، ۲ و ۵ افزایش معنی دار فعالیت دیده شد. ژیانگ و هوآنگ (۲۰۰۱) نیز در یک بررسی گزارش کردند که فعالیت آنزیم پراکسیداز در طی مراحل اولیه تنش در گراس علف چمنی افزایش یافت ولی وقتی تنش طولانی شد فعالیت این آنزیم کاهش یافت و به نظر می رسد این مقدار از تنش باعث تخریب سلول های گیاهی شده است (۱۳). در نتیجه می توان گفت با افزایش میزان تنش، بسته به ژنوتیپ فعالیت ایزوزیم های POX و CAT متفاوت بوده است، در اغلب موارد در اثر افزایش تنش تا ۴- بار میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان CAT و POX افزایش یافته است، که این نتایج با گزارش های جانگ (۲۰۰۴) در مورد فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان تحت تنش خشکی در گیاه

تجزیه واریانس فعالیت POX₁ به عنوان تنها ایزوزیم پایدار مورد استفاده نشان داد که اثر ژنوتیپ و اثر متقابل ژنوتیپ × پرولین و پرولین × تنش خشکی و نیز اثر سه جانبه، پرولین × تنش خشکی × ژنوتیپ معنی دار بود. بررسی اثر متقابل تنش خشکی × پرولین (شکل ۴) نشان داد که با افزایش تنش و تیمار ۵ میلی مولار پرولین فعالیت آنزیمی کاهش می یابد، به طوری که در تنش ۸- بار این کاهش معنی دار است که این نتیجه با یافته های بال اوگلو و همکاران (۲۰۱۲) در مورد نقش پرولین در حفاظت بافت ریشه ی آفتابگردان تحت تنش ۴- و ۸- بار ناشی از PEG و انور حسین و فوجیتا (۲۰۱۰) در مورد نقش محافظتی پرولین در برابر تنش شوری در گیاه ماش مطابقت دارد (۷، ۳). استفاده از تیمار ۱۰ میلی مولار پرولین در حضور تنش باعث افزایش فعالیت آنزیمی شده و در شرایط تنش شدید خود به عنوان عامل تنش زا عمل کرده است. کیفیت اثر متقابل پرولین × ژنوتیپ در شکل ۵ آمده است. در ژنوتیپ سه از گروه حساس تغییر فعالیت معنی دار آنزیم در حضور پرولین بدست آمد و بیشترین فعالیت آنزیمی در ژنوتیپ های متحمل شماره ۶ و ۹ مشاهده گردید.

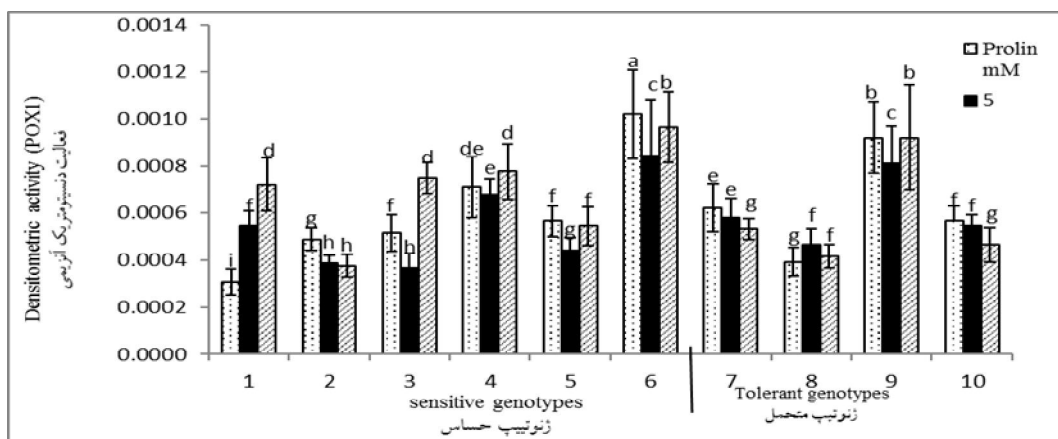
خشکی بر فعالیت آنزیم CAT در گندم مطابقت دارد (۱۴، ۶، ۱۱).

آرابیدوپسیس، بای و سوئی (۲۰۰۶) در مورد تاثیر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ذرت و سلینا و همکاران (۲۰۰۴) در مورد تاثیر تنش



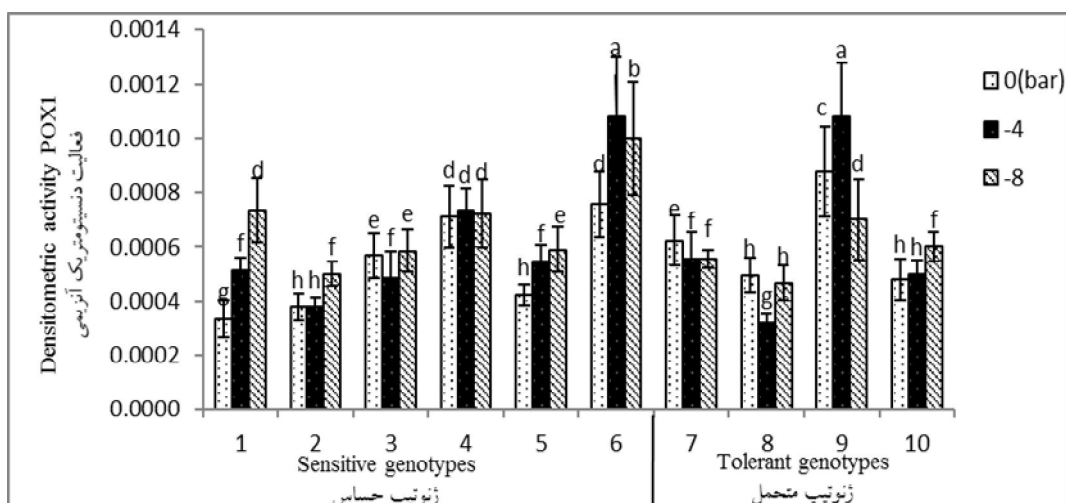
شکل ۴- فعالیت POX_1 در سطوح مختلف تیمار با پرولین خارجی تحت تنش خشکی در مرحله گیاهچه‌ای آفتابگردان.

Figure 4- POX_1 activity of sunflower seedlings under drought stress and exogenous proline levels.



شکل ۵- فعالیت آنزیم POX_1 در ژنوتیپ‌های آفتابگردان در سطوح مختلف تیمار با پرولین خارجی.

Figure 5- POX_1 activity of sunflower seedlings under exogenous proline treatments.

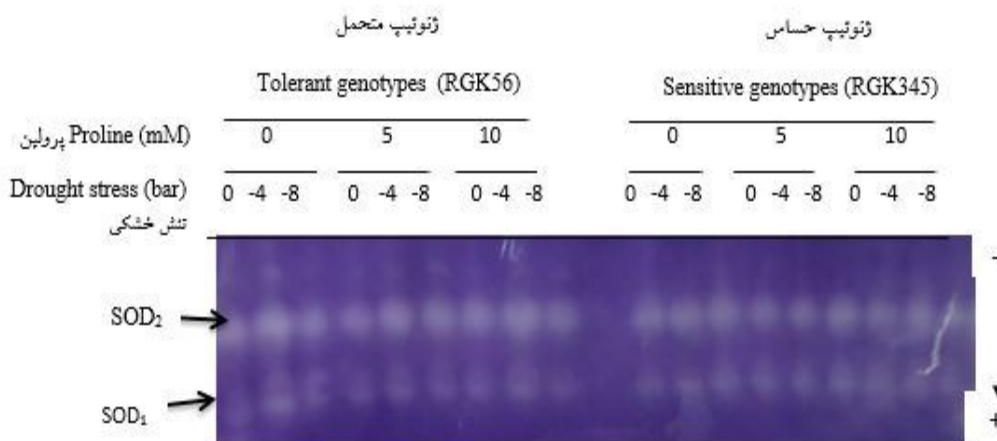


شکل ۶- فعالیت POX_1 در ژنوتیپ‌های آفتابگردان در سطوح مختلف تنش در مرحله گیاهچه‌ای.

Figure 6- POX_1 activity of sunflower seedlings under drought stress conditions.

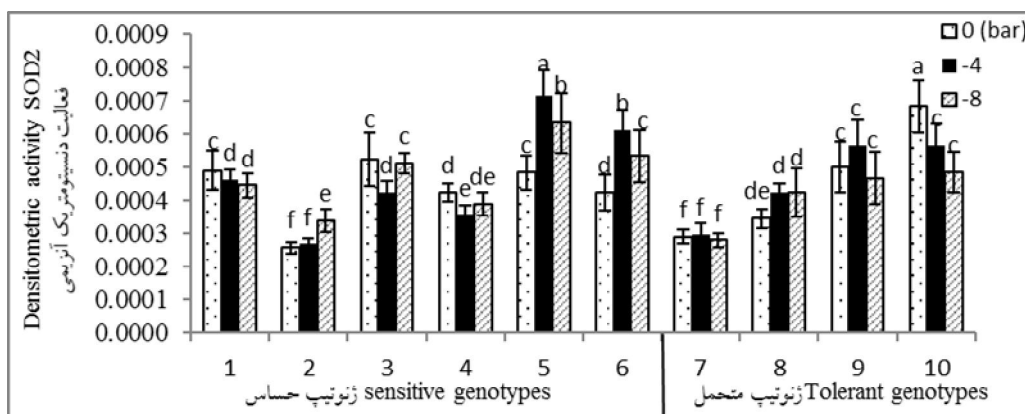
۸) نشان داد که با افزایش میزان تنش خشکی، میزان فعالیت SOD_2 در اکثر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه یا بدون تغییر بوده یا افزایش پیدا کرده است و فقط در ژنوتیپ شماره ۱۰ کاهش معنی‌دار فعالیت در شرایط تنش خشکی شدید دیده شد. افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مورد گونه‌های مختلف گیاهی نیز گزارش شده است به طوری که شمارما و دویی (۲۰۰۵) گزارش کردند فعالیت آنزیم-های SOD در گیاهچه برنج با افزایش شدت تنش خشکی افزایش پیدا می‌کند، در صورتی که یانگ و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که با افزایش شدت خشکی در *Radix astragali* فعالیت آنزیم SOD کاهش می‌یابد (۲۴، ۳۲). به نظر می‌رسد این اختلاف ناشی از نوع گونه گیاهی، مرحله رشد و نمو بافت گیاهی و شرایط محیطی باشد (۱۰).

در الکتروفورگرام SOD دو نوار در دو ناحیه ظاهر شد که به ترتیب حرکت نسبی بیشتر با SOD_1 و SOD_2 نامگذاری شدند (شکل ۷). در تجزیه واریانس فعالیت ایزوزیم SOD_1 (جدول ۲)، تنها اثر ژنوتیپ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد که مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی (جدول ۳) نشان داد که ژنوتیپ‌ها در شش گروه قرار گرفتند و ژنوتیپ شماره ۵ از گروه حساس و ژنوتیپ شماره ۱۰ از گروه متحمل، بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان دادند. بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه آفتابگردان از لحاظ فعالیت ایزوزیم SOD_2 نیز تفاوت معنی‌دار وجود داشت (جدول ۳) و ژنوتیپ‌ها در هفت گروه قرار گرفتند و ژنوتیپ شماره ۵ از گروه حساس و شماره ۱۰ از گروه متحمل بیشترین میانگین فعالیت دنسیتومتریک SOD_2 را داشتند. همچنین اثر متقابل ژنوتیپ \times تنش و ژنوتیپ \times پرولین برای SOD_2 معنی‌دار شد. بررسی اثر متقابل ژنوتیپ \times تنش (شکل



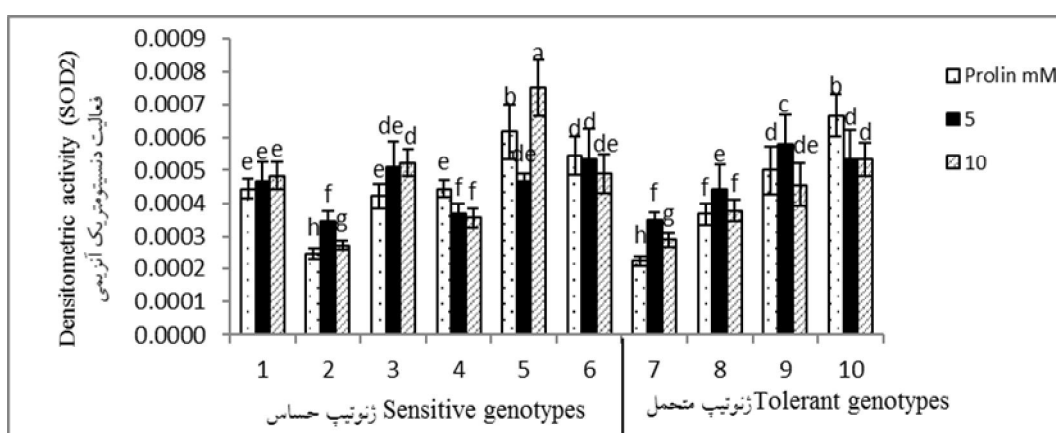
شکل ۷- نمونه‌ای از الکتروفورگرام SOD در گیاهچه‌های آفتابگردان.

Figure 7- Example of an SOD electropherogram in sunflower seedlings



شکل ۸- فعالیت SOD_2 در ژنوتیپ‌های آفتابگردان در سطوح مختلف تنش در مرحله گیاهچه‌ای.

Figure 8- SOD_2 activity of sunflower seedlings under drought stress conditions.



شکل ۹- فعالیت دنسیتومتریک ایزوزیم SOD_2 در ژنوتیپ‌های آفتابگردان در سطوح مختلف پرولین خارجی.

Figure 9- Densitometric activity of SOD_2 in sunflower genotypes under exogenous proline treatments.

تنش، سیستم آنتی اکسیدان گیاه فعال شده و با افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز به‌عنوان اولین سد دفاعی در مقابل حمله رادیکال‌های اکسیژن در مقابل خسارات ناشی از تنش مقاومت می‌نماید و تا زمانیکه گیاه قادر به مهار حجم سوپراکسید تولید شده در گیاه باشد این فرایند ادامه دارد (۱۱). اطلاعات و بررسی‌های مختلف نیز نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم SOD در سلول‌ها در پاسخ به تنش‌های مختلف محیطی و تنش‌های غیرزیستی مانند علف‌کش پاراکوات، شدت نور بالا، شوری و خشکی افزایش پیدا می‌کند (۱۲، ۱۹، ۲۱، ۵).

بررسی اثر متقابل ژنوتیپ × پرولین (شکل ۹) نشان داد که در اغلب ژنوتیپ‌ها با افزایش میزان پرولین در محیط کشت، میزان فعالیت ایزوزیم SOD_2 به‌جز در ژنوتیپ شماره ۵، یا بدون تغییر بوده یا به صورت معنی‌دار کاهش پیدا کرده است. گزارش شده که SOD یک آنتی‌اکسیدان قوی است که اولین ماده تولید شده از احیاء یک ظرفیتی اکسیژن، یعنی رادیکال سوپر اکسید را از بین می‌برد، بنابراین به SOD دفاع اولیه در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن اطلاق می‌شود (۱۱). طی دوران تنش خشکی، وضعیت آب درون سلولی نقش کلیدی را در فعال کردن این مکانیسم‌های دفاعی بازی می‌کند. با افزایش میزان

جدول ۳- فعالیت دنسیتومتریک SOD₁ و SOD₂ در ژنوتیپ‌های آفتابگردان تحت تنش خشکی ناشی از PEG و تیمار با پرولین.

Table 3- Densitometric activity of SOD1 and SOD2 in sunflower genotypes under drought stress induced by PEG and treatment with exogenous proline.

Sensitive genotype	ژنوتیپ‌های حساس		Tolerant genotype	ژنوتیپ‌های متحمل	
	SOD ₁	SOD ₂		SOD ₁	SOD ₂
1	0.625ab	0.381cd	6	0.627ab	0.385abc
2	0.671de	0.351e	7	0.610de	0.359e
3	0.615cd	0.383bc	8	0.602d	0.373d
4	0.621bc	0.373d	9	0.621bc	0.383bc
5	0.634a	0.393a	10	0.624b	0.391ab

حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

Different letters indicate a significant difference at the 5% probability level.

جدول ۴- تجزیه واریانس فعالیت ایزوزیمی تحت تنش خشکی در دو گروه حساس و متحمل به خشکی آفتابگردان در مرحله گیاهچه‌ای

Table 4- Analysis of variance of isozyme activity under drought stress in two susceptible and tolerant sunflower groups in seedling stage

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS			
		CAT ₁	POX ₁	SOD ₁	SOD ₂
ژنوتیپ	1	0.00009	0.003*	0.001	0.00001
Gnotype					
پرولین	2	0.00001	0.001	0.0004	0.00006
Proline					
خشکی	2	0.0001	0.001	0.0004	0.0002
Drought					
G×P ژنوتیپ × پرولین	2	0.0001*	0.001	0.0002	0.0002
G×D ژنوتیپ × خشکی	2	0.0003**	0.001	0.0001	0.0004
ژنوتیپ × خشکی × پرولین	8	0.00002	0.001	0.00008	0.0003
Error خطای آزمایش	252	0.00004	0.0004	0.0003	0.0003
CV% ضریب تغییرات		3	13	3	5

significant at: *P < 0.05; **P < 0.01

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد

فعالیت ایزوزیم POX₁ آنزیم پراکسیداز اختلاف معنی‌دار دیده شد، به‌طوریکه فعالیت این ایزوزیم در گروه متحمل به شکل معنی‌داری بیشتر از گروه حساس بود. فعالیت سایر آنزیم‌های مورد مطالعه در بین ارقام متحمل و حساس یکسان بوده است.

نتیجه‌گیری

از بین ۱۰ لاین اینبرد دو لاین BGK ۳۲۹ و RGK ۲۲۱ به‌ترتیب به‌عنوان متحمل‌ترین و حساسترین لاین‌های اینبرد شناسایی شدند. بررسی اثر

مقایسه بین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به خشکی: نتایج تجزیه واریانس فعالیت ایزوزیم‌های مورد مطالعه در دو گروه آفتابگردان‌های حساس و متحمل به خشکی نشان داد که اختلاف بین دو گروه آفتابگردان فقط برای POX₁ در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد و اثر ژنوتیپ × تنش خشکی و ژنوتیپ × سطوح پرولین بر روی فعالیت ایزوزیم CAT₁ به‌ترتیب در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد معنی‌دار بوده است. بر اساس جدول ۴ ملاحظه می‌شود که بین ارقام حساس و متحمل تنها در مورد

تنش و کاهش فعالیت این ایزوزیم شده است و اعمال ۱۰ میلی مولار پرولین باعث ایجاد تنش و افزایش فعالیت آنزیمی شده است. میانگین فعالیت دنسیتومتریک تمام آنزیم‌های آنتی اکسیدان مورد بررسی بین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس نشان داد که بین این دو گروه تنها در مورد ایزوزیم POX₁ اختلاف معنی دار وجود داشت ($P \leq 0.05$) و فعالیت این ایزوزیم در گروه متحمل به مراتب بیشتر از گروه حساس بود. این نشان می‌دهد که از لحاظ فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان بین دو گروه از ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به خشکی، تفاوت زیادی وجود ندارد و این تفاوت فقط به POX₁ محدود شده است.

متقابل ژنوتیپ × تنش خشکی برای ایزوزیم‌های CAT₁ و SOD₂ نشان داد که اضافه کردن ۵ میلی مولار پرولین باعث تعدیل اثرات تنش می‌شود. اثر سه جانبه ژنوتیپ × پرولین × تنش برای ایزوزیم POX₁ معنی دار شد ($P \leq 0.01$). بررسی اثر متقابل ژنوتیپ × پرولین برای ایزوزیم‌های POX₁ و SOD₂ نشان داد که تیمار ۵ میلی مولار پرولین باعث کاهش فعالیت ایزوزیم POX₁ و فعالیت ایزوزیم SOD₂ در اغلب موارد تا حد زیادی تحت تاثیر ژنوتیپ قرار گرفته است. بررسی اثر متقابل پرولین × خشکی برای ایزوزیم POX₁ نشان داد که تیمار ۵ میلی مولار پرولین به ژنوتیپ‌های تحت تنش، باعث تعدیل اثرات

References

1. Abogadallah, M.J. 2010. Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signal Behav.* 5: 4. 369-374.
2. Anderson, M.D., Prasad, T.K., and Stewart, C.R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedling. *J Plant Physiol.* 109: 4. 1247-1257.
3. Anwar Hossain, M., and Fujita, M. 2010. Evidence for a role of exogenous Glycine betaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. *Plant Mol. Biol.* 16:1.19-28.
4. Ashraf, M., and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant to abiotic stress tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 59: 2. 206-216.
5. Baloglu, M.C., Kavas, M., Aydin, G., Oktem, H.A., and Yucel, A.M. 2012. Antioxidative and physiological responses of two sunflower cultivars under PEG mediated drought stress. *Turk J Botany.* 36: 6. 707-714.
6. Bai, L.P., and Sui, F.G. 2006. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. *Pedosphere.* 16: 3. 326-332.
7. Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. A review. *Ann Bot.* 91: 2. 179-194.
8. Casano, L.M., Martin, M., and Sabater, B. 1994. Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. *Plant Physiol.* 106: 3. 1033-1039.
9. Celina, M.L., Gabriela, M.P., and Simon, D. 2004. Drought and CAT gene expression in wheat. *J. Exp. Bot.* 56: 2. 417-423.
10. Jiang, Y., and Huang, N. 2001. Drought and Heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Sci.* 41: 2. 436-442.
11. Jung, S. 2004. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of (*Arabidopsis thaliana*). subjected to drought. *Plant Sci.* 166: 2. 459-466.
12. Maribel, L., Dionisio, S., and Satoshi, T. 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135: 1. 1-9.
13. Manivannan, P., AbdulJaleel, C., Sankar, B., Kishorekumar, A.,

- Somasundaram, R., Lakshmanan, G. M.A., and Panneerselvam, R. 2007. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in (*Helianthus annuus* L.) as induced by drought stress. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 59: 2. 141-149.
14. Masoumi, H., Masoumi, M., Darvish, F., Daneshian, J., Nourmohammadi, G.H., and Habibi, D. 2010. Change in several antioxidant anzymes activity and seed yield by water deficit stress in soybean (*Glycine max* L.) cultivars, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici. Cluj-Napoca*. 38: 3. 50-59. (In Persian)
 15. Pan, Y., Jun Wu, L., and Liang Yu Z. 2006. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis Fisch*), *J. Plant Growth Regul.* 49: 2. 157-165.
 16. Sairam, k., Chandrasekhar, V., and srivasta, G.C. 2001. Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their responses to water stress. *Biologia Plantarum*. 44: 1. 89-94.
 17. Sairam, K., Deshmuh, P.S., and Shukla, D.S. 1997. Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *J. Agron. Crop Sci.* 178: 3. 171-178.
 18. Sayfzadeh, S., Habibi, D., and Fathollah, D.F. 2010. Response of antioxidant enzyme activities and root yield in sugar beet to drought stress. *Int. J. Agric. Biol.* 13: 3. 358-362. (In Persian)
 19. Sharma, P., and Dubey, R.S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *J. Plant Growth Regul.* 46: 3. 209-221.
 20. Sharp, R.E., and Boyer, J.S. 1986. Photosynthesis at low water potential in sunflower: lack of photoinhibitory effects. *Plant Physiol.* 82: 1. 90-95.
 21. Singh, A.M.L., and Saini, R.K. 2004. Seed germination and seedling growth of citrus (*Cytrus* species) root stocks under different salinity regimes. *J. Agri. Sci.* 74: 5. 246-248.
 22. Soltis, D., and Soltis, P.S. 1990. *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press. Portland. USA. 97: 13. 7051-7057.
 23. Soshinkova, T.N., Radyukina, N.L., Korolkova, D.V., and Nosov, A.V. 2013. Proline and functioning of the antioxidant system in (*thellungiella salsauginea*) plants and cultured cells subjected to oxidative stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 60: 1. 41-54.
 24. Stepien, P., and Klobus, G. 2005. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiol. Plant.* 125: 1. 31-40.
 25. Sun, C., Du, W., Cheng, X., Xu, X., Zhang, Y., Sun, D., and Shi, J. 2010. The effects of drought stress on the activity of acid phosphatase and its protective enzymes in pigweed leaves. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 6. 825-833.
 26. Valizadeh, M., Mohayeji, M., Yasinzadeh, N., Nasrullazade, S., and Moghaddam, M. 2011. Genetic diversity of synthetic alfalfa generations and cultivars using tetrasomic inherited allozyme markers. *J. Agri. Sci.* 13: 425-430. (In Persian)
 27. Yong, T.L., Zongsuo, S., and Feng, D. 2006. Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of (*Radix astragali*) at seedling stage. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 49: 1. 60-65.

