

نقش رنگیزه های فتوستتزی و آنزیمهای آنتی اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو

زهرا امینی*^۱ و رحیم حداد^۲^۱ اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده کشاورزی^۲ قزوین، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۳۱

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۶

چکیده

در این پژوهش اثر تنش اکسیداتیو (Oxidative stress) ناشی از تنش خشکی و پیری بر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئیدها، پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو (rbcL)، آنزیمهای آنتی اکسیدان شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) در مراحل شروع باروری، پرشدن دانه، شیری شدن ثانویه و خمیری نرم در شرایط مزرعه ای در دو ژنوتیپ جو با عملکرد متفاوت (ژنوتیپ Q13 با عملکرد ۱۳۹۰ کیلوگرم در هکتار و ژنوتیپ Q20 با عملکرد ۱۵۹۸ کیلوگرم در هکتار) در گیاهان تحت تیمارهای آبی و خشکی بررسی گردید. نتایج نشان دادند در هر دو ژنوتیپ تغییرات محتوای کلروفیل b به تنش کم آبی حساس تر از کلروفیل a می باشد. مقدار کاروتنوئیدها در ابتدای دوره تنش افزایش پیدا کرد اما با افزایش شدت تنش مقدار آنها کاهش یافت. میزان پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو با افزایش سن گیاه و در اثر تنش خشکی کاهش پیدا کرد. با افزایش سن گیاه فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هر دو ژنوتیپ هم در گیاهان تیمار آبی و هم در گیاهان تیمار خشکی کاهش یافت. اما در گیاهان تحت تنش خشکی ژنوتیپ Q13 فعالیت این آنزیم با شدت بیشتری کاهش یافت. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با افزایش سن گیاهان ژنوتیپ Q13 در هر دو تیمار کاهش پیدا کرد. اما در ژنوتیپ Q20 با افزایش سن گیاهان هر دو تیمار کاهش معنی داری در فعالیت این آنزیم مشاهده نشد. به نظر می رسد توانایی بیشتر ژنوتیپ Q20 در حفظ فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در زمان تنش کم آبی و افزایش سن گیاه و همچنین حفظ فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در طی مراحل پیری گیاه جو نقش مؤثری در بیشتر بودن عملکرد دانه این ژنوتیپ نسبت به ژنوتیپ Q13 دارد.

واژه های کلیدی: آنزیمهای آنتی اکسیدان، تنش اکسیداتیو، کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئیدها

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۳۰۰۴۶۶۹، پست الکترونیکی: zohamini@gmail.com

مقدمه

جدایی از گیاه از سبز به زرد، نارنجی و قرمز تغییر رنگ می دهند. گیاهان یکساله مانند غلات نیز وقتی از سبز به زرد طلایی تغییر رنگ می دهند، فرآیند مشابهی را دنبال می کنند (۴). در غلات از جمله جو تغییر رنگ برگها از مرحله رسیدن دانه آغاز می گردد. در مرحله رسیدن دانه می توان مراحل رسیدن سبز یا شیری، رسیدن زرد یا

پیری (senescence) برگ یا گیاه آخرین مرحله نمو آن می باشد که به صورت ژنتیکی و با دقت بسیار زیادی تنظیم می گردد. این مرحله از نمو گیاهان شامل تغییرات متابولیکی و فیزیولوژیکی منظمی است که در نهایت به مرگ برگ (گیاه) منجر می شود (۲۸ و ۲۹). مرحله پیری برگ معمولاً با تغییرات رنگی آشکار همراه است. برگهای سبز درختان در فصل پاییز قبل از قهوه ای شدن، مردن و

خمیری، رسیدن نیمه سخت و رسیدن کامل یا سخت را تشخیص داد (۱).

پیری برگ به دلیل اینکه طول دوره ساخت مواد غذایی را در گیاهان تعیین می‌کند، یکی از عوامل تعیین کننده میزان عملکرد گیاهان می‌باشد. اگر چه در بیشتر گونه‌ها پیری ناشی از افزایش سن می‌باشد، اما عوامل درونی گیاه مانند تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و عوامل بیرونی می‌توانند بر آغاز پیری و پیشرفت آن اثر داشته باشند (۱۸). فرآیند پیری در سطح مولکولی، سلولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیار هماهنگ عمل می‌کند و با تغییرات ویژه در ساختمان سلول، افزایش تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species)، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، از بین رفتن کلروفیل و کاهش میزان فتوسنتز شناسایی می‌گردد (۲۷ و ۳۷). تا به امروز اساس بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی فرآیندهایی که منجر به آغاز پیری و پیشرفت آن در گیاهان می‌شود، به خوبی شناخته نشده است. جهت درک بهتر فرآیندهای پیری لازم است مکانیسم‌های تنظیم کننده میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن در گیاهان بررسی گردد. رادیکال‌های فعال اکسیژن به طور مستقیم باعث تخریب پروتئینها، اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌شوند (۳۶ و ۳۹). گیاهان جهت مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های فعال اکسیژن دارای مکانیزم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند (۷، ۲۹ و ۳۱). آنتی‌اکسیدانهای غیر آنزیمی شامل ترکیبات آب‌گریز (توکوفرول‌ها و کاروتنوئیدها) و آب‌دوست (گلوکاتینون و اسید آسکوربیک) می‌باشند (۳۴). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1)، کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6)، آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11)، گلوکاتینون ردوکتاز (GR, EC 1.6.4.2) و پراکسیداز (POX, EC 1.11.1.7) می‌باشد (۸، ۱۹ و ۲۶). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول در

محافظت سلول‌های گیاهی در مقابل تنش اکسیداتیو ناشی از وجود رادیکال‌های فعال اکسیژن نقش مهمی بر عهده دارد. مشخص شده است که در ارقام همیشه سبز گونه‌های مختلف گیاهان نسبت به ارقامی که زودتر پیر می‌شوند و یا در ارقامی که به تنش‌های محیطی مقاوم هستند، فعالیت آنتی‌اکسیدانها بیشتر می‌باشد (۶، ۱۴ و ۲۳). همچنین زینالی یادگاری و همکاران (۱۳۸۸) گزارش کردند در گیاه سویا افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در اثر پیش تیمار سرمایی باعث می‌گردد این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد بهتر بتوانند تنش سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد را تحمل کنند (۳). از این رو بررسی نحوه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به عنوان بخشی از سیستم دفاعی سلول، در درک بهتر فرآیندهایی که منجر به مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شوند، نقش مهمی دارد.

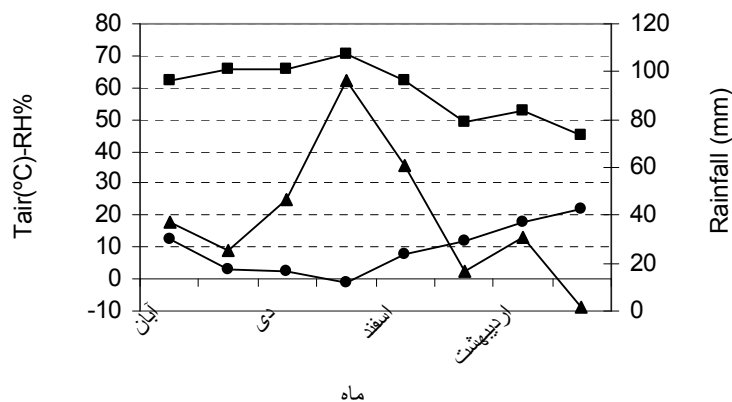
جو (*Hordeum vulgare* L.) به دلیل داشتن مالت در صنعت و همچنین به طور مستقیم به وسیله انسان و دام مصرف می‌شود و در بین غلات مقام چهارم را در تولید جهانی دارا می‌باشد (۵). این گیاه نسبت به سایر غلات به تنش خشکی مقاوم تر می‌باشد، اما جو نیز در دوره رشد و نمو خود در دو مرحله شروع باروری و پرشدن دانه نسبت به کمبود آب حساس است و تنش خشکی در این مراحل منجر به کاهش عملکرد جو می‌شود (۹ و ۱۰). خشکی یکی از مهم ترین تنش‌های محیطی می‌باشد که بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان تأثیر دارد. تا به امروز تحقیقات زیادی درباره اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان صورت گرفته است، اما اطلاعات اندکی درباره اثر تنش خشکی بر فعالیت این آنزیم‌ها در شرایط طبیعی رشد گیاهان وجود دارد. از این رو در این پژوهش اثرات تنش خشکی و افزایش سن گیاه بر تغییرات میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئیدها (شامل β کاروتن و گزاتوفیل) و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و

قرار می‌گرفتند، پوشش پلاستیکی قرار داده شد تا از رسیدن آب باران به آنها جلوگیری شود. این گیاهان تا پایان دوره آزمایش آبیاری نشدند. گیاهانی که تحت تیمار آبی قرار گرفتند، در طول دوره آزمایش هفته‌ای یک بار آبیاری شدند. نمونه برداری از برگ گیاهان تیمار آبی در روزهای ۲۱۵، ۲۲۹، ۲۳۶ و ۲۴۱ بعد از کاشت بر اساس روش ده‌دهی یا زادوکس به ترتیب در مراحل شروع باروری (۶۱-۶۰)، پر شدن دانه (۷۲-۷۱)، شیرینی شدن ثانویه (۷۶-۷۵) و خمیری نرم (۸۵) و ۲۴ ساعت پس از آبیاری گیاهان صورت گرفت (اعداد نوشته شده در پرانتز نشان‌دهنده مراحل رشد و نمو غلات بر اساس روش ده‌دهی یا دو صفر تا ۱۰۰ (زادوکس) می‌باشد). گیاهان تیمار خشکی در روزهای ۲۱۵، ۲۲۹ و ۲۳۶ بعد از کاشت در مراحل شروع باروری، پر شدن دانه و خمیری نرم نمونه برداری شدند.

آسکوربات پراکسیداز در دو ژنوتیپ جو در چهار مرحله شروع باروری، پر شدن دانه، شیرینی شدن ثانویه و خمیری نرم بررسی شده است تا نقش آنتی‌اکسیدانها در مقاومت گیاه جو به تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی و مرحله پیری بررسی گردد.

مواد و روشها

مواد گیاهی و شرایط کاشت: بذر دو ژنوتیپ جو (*Hordeum vulgare* L.) به نامهای Q13 و Q20 با تراکم ۲۵۰ بوته در هکتار و با سه تکرار در مزرعه کاشته شدند. از زمان کاشت تا ۲۰۰ روز بعد از کاشت گیاهان در شرایط طبیعی مزرعه قرار داشتند و فقط آب باران را دریافت می‌کردند (مشخصات آب و هوایی شهر قزوین در طول دوره آزمایش در شکل ۱ نشان داده شده است). از این تاریخ به بعد بر روی گیاهانی که باید تحت تنش خشکی



شکل ۱- میزان بارندگی (▲)، دمای متوسط (●) و رطوبت نسبی (■) در طول دوره آزمایش

به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در پایان این زمان، دیسکها دوباره وزن شدند (DW). به منظور محاسبه میزان نسبی آب برگ پرچم از رابطه ریاضی زیر استفاده گردید (۲۹):

$$RWC = \frac{FW - DW}{SW - DW} \times 100$$

تعیین میزان نسبی آب برگ (RWC): از برگ پرچم ساقه اصلی دیسکهایی تهیه شد. ابتدا وزن تر هر نمونه اندازه‌گیری گردید (FW). پس از آن دیسکهای هر نمونه به مدت ۵ ساعت در آب مقطر قرار داده شده تا به حالت اشباع برسند. پس از گذشت این مدت زمان دیسکها از آب مقطر خارج شده و پس از رفع رطوبت سطحی، دوباره توزین گردیدند (SW). در مرحله بعد دیسکهای اشباع شده

سازی نمونه‌های پروتئینی ۵ میکرولیتر از عصاره خام با ۱ میکرولیتر بافر SDS×۳ (شامل تریس هیدروکلراید ۱۸۷/۵ میلی مولار (pH = ۶/۸)، سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۶ درصد، گلیسرول ۳۰ درصد و برموفنل بلو ۰/۳ درصد) و ۰/۵ میکرولیتر بافر DTT×۳ (دی‌تیوتریتول ۴۰ میلی‌مولار) مخلوط کرده و به مدت پنج دقیقه در آب جوش (با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. بعد از آن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس ۵ میکرولیتر از مایع سطحی در چاهک ژل SDS – پلی‌اکریل‌امید به روش لاملی (۲۲) تزریق گردید. با استفاده از نرم افزار LabWorks 4.0 ژل‌های SDS-PAGE تجزیه و تحلیل شده و وزن مولکولی نوارها مشخص گردید.

سنجش آنزیمی: فعالیت آنزیمها به روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر Labomed مدل UV-3200) در دمای آزمایشگاه (۲۵±۲) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (۱. ۱۵. ۱ SOD, EC) از طریق اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید (NBT) به روش دهیندسا و همکاران (۱۵) اندازه‌گیری شد. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۷/۸)، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم کلراید ۷۵ میکرومولار، اتیلن دی‌آمین تتراسنتیک اسید ۰/۱ میلی‌مولار، ریوفلاوین ۳۶۰ میکرومولار و ۳۰ میکرولیتر عصاره خام بود. پس از آن که مخلوط به هم زده شد سلهای اسپکتروفتومتر به مدت ۱۰ دقیقه در زیر یک لامپ فلورسنت ۱۵W به فاصله ۳۵ سانتیمتر قرار داده شد. با خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند تا ۵۰ درصد مانع از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید گردد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی‌گرم

پروتئین محلول کل: جهت استخراج پروتئین محلول کل یک گرم بافت برگ در حضور ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) و ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۷) و سدیم متا بی سولفات یک میلی‌مولار) همگن شدند. جهت عصاره‌گیری نمونه حاصل به لوله‌های سانتریفیوژ انتقال داده شده و در ۱۵۰۰۰ rpm و دمای +۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ رومیزی (Beckman Culter مدل Allegra – 64R) سانتریفیوژ شدند. همه مراحل تهیه عصاره آنزیمی در دمای +۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. میزان پروتئین محلول کل به روش بردفورد (۱۱) اندازه‌گیری شد. جهت تهیه منحنی استاندارد از غلظتهای مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumin, BSA) استفاده گردید.

کلروفیل و کاروتنوئیدها: جهت سنجش کلروفیل های a و b و کاروتنوئیدها از روش لیختن تیلر (۱۹۸۷) استفاده شد (۲۴). یک گرم برگ تازه در هاون چینی با ۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد ساییده و محتوی با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید. جذب محلول در طول موجهای ۶۶۴، ۶۶۷ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها با استفاده از فرمولهای زیر محاسبه گردید.

$$C_a = 12.25 \times A_{664} - 2.79 \times A_{647}$$

$$C_b = 21.51 \times A_{647} - 5.01 \times A_{664}$$

$$C_{x+c} = (1000 \times A_{470} - 1.8 \times C_a - 85.02 \times C_b) / 198$$

C_a ، C_b و C_{x+c} به ترتیب غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها می‌باشد.

پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو (rbcl): بررسی تغییرات مقدار این پروتئین در طول دوره آزمایش با استفاده از روش SDS-PAGE انجام گرفت. جهت آماده

گیاهان آبیاری شده بعد از چهار مرحله نمونه برداری در ژنوتیپ‌های Q13 و Q20 به ترتیب ۳۷ درصد و ۴۶ درصد و در گیاهان تحت تنش خشکی بعد از سه مرحله نمونه‌برداری به ترتیب ۲۱ درصد و ۴۳ درصد کاهش نشان داد (شکل ۲). در اثر تنش خشکی میزان پروتئین محلول کل در گیاهان تحت تنش خشکی نسبت به گیاهان آبیاری شده کاهش پیدا کرد. کاهش میزان پروتئین محلول کل در نمونه برداری اول در هر دو ژنوتیپ و در نمونه برداری دوم فقط در ژنوتیپ Q13 معنی دار بود. در نمونه برداری سوم بین گیاهان آبیاری شده و گیاهان تحت تنش خشکی هر دو ژنوتیپ تفاوت معنی داری مشاهده نگردید.

در گیاهان آبیاری شده میزان کاهش کلروفیل a پس از چهار مرحله نمونه برداری در ژنوتیپ Q13، ۷۵ درصد و در ژنوتیپ Q20 ۷۷ درصد و میزان کاهش کلروفیل b به ترتیب ۸۰ درصد و ۹۰ درصد به دست آمد (شکل ۳). در گیاهانی که تحت تنش خشکی قرار داشتند بعد از سه مرحله نمونه برداری در ژنوتیپ‌های Q13 و Q20 میزان کاهش کلروفیل a به ترتیب ۶۸ درصد و ۷۸ درصد و میزان کاهش کلروفیل b به ترتیب ۷۰ درصد و ۸۲ درصد بود. مقدار کلروفیل a در نمونه برداری اول و دوم بین گیاهان آبیاری شده و گیاهان تحت تنش خشکی تفاوت معنی داری نشان نداد و فقط در نمونه برداری سوم میزان کلروفیل a در هر دو ژنوتیپ در گیاهان تحت تنش خشکی کمتر از گیاهان آبیاری شده مشاهده شد. تفاوت مقدار کلروفیل b در گیاهان تحت تنش خشکی و گیاهان آبیاری شده در ژنوتیپ‌های Q13 و Q20 در نمونه برداری اول، به ترتیب ۵۲ درصد و ۶۰ درصد به دست آمد. در نمونه برداری دوم و سوم فقط در ژنوتیپ Q13 میزان کلروفیل b در گیاهان تحت تنش خشکی به ترتیب ۴۳ درصد و ۵۱ درصد از مقدار کلروفیل b در گیاهان آبیاری شده کمتر بود.

پروتئین گزارش گردید. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC ۱۱,۱,۱,۱) به روش ناکانو و اسدا (۳۰) اندازه گیری گردید. یک میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار (pH = ۷/۸)، آسکوربات ۱۰ میلی مولار، پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها: آزمایش به صورت فاکتوریل $3 \times 2 \times 2$ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل پراکندگی مورد مطالعه در این تحقیق عبارت از دو نوع تیمار آبیاری (T) ب: دو نوع ژنوتیپ (G) و ج: سه مرحله رشد گیاه (S) بودند. بررسی داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS 11.5 (Chicago, IL, USA) انجام گرفته و میانگینها به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

میزان نسبی آب برگ (RWC)، پروتئین محلول کل، کلروفیل ها و کاروتنوئیدها: میزان این صفات در گیاهان آبیاری شده و گیاهان تحت تنش خشکی در طول دوره آزمایش با افزایش سن گیاه به تدریج کاهش پیدا کرد. الگوی کاهش در گیاهان آبیاری شده و گیاهان تحت تنش خشکی مشابه بود. میزان RWC گیاهان آبیاری شده ژنوتیپ‌های Q13 و Q20 بعد از چهار مرحله نمونه برداری به ترتیب ۵/۶۲ درصد و ۷/۶۸ درصد و در گیاهان تحت تنش خشکی بعد از سه مرحله نمونه برداری ۴/۴۸ درصد و ۵/۱۷ درصد کاهش پیدا کرد (شکل ۲). در هر دو ژنوتیپ در نمونه برداری اول تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده نگردید. اما در نمونه برداری دوم و سوم تفاوت بین تیمارها معنی دار بود. پروتئین محلول کل در

مرحله نمونه برداری به ترتیب ۵۷/۴۱ درصد و ۷۳/۲۴ درصد مشاهده گردید. در ابتدای اعمال تنش میزان کاروتنوئیدها در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت. اما با افزایش شدت تنش، مقدار آن کاهش پیدا کرد به طوری که در نمونه برداری سوم مقدار آن در گیاهان تحت تنش کمتر از گیاهان آبیاری شده بود.

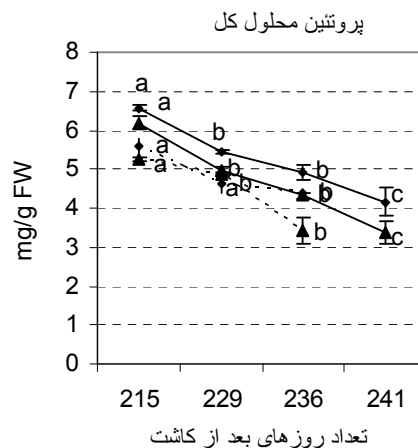
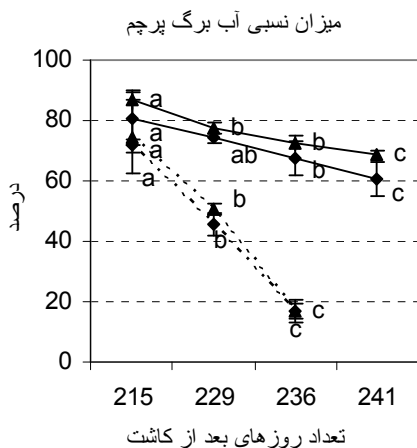
در این آزمایش مقدار کاروتنوئیدها شامل β -کاروتن و گزانتوفیل در طول دوره آزمایش در گیاهان آبی و گیاهانی که تحت تنش خشکی قرار داشتند به طور مشابه کاهش پیدا کرد (شکل ۳). در گیاهان آبیاری شده میزان کاهش کاروتنوئیدها بعد از چهار مرحله نمونه برداری در ژنوتیپ Q13، ۵۷/۱۴ درصد و در ژنوتیپ Q20 ۶۲/۲ درصد و در گیاهانی که تحت تنش خشکی قرار داشتند بعد از سه

جدول ۱- نتایج اندازه گیری برخی صفات مورفولوژیکی در مرحله شروع باروری ژنوتیپهای بکار برده شده در این پژوهش.

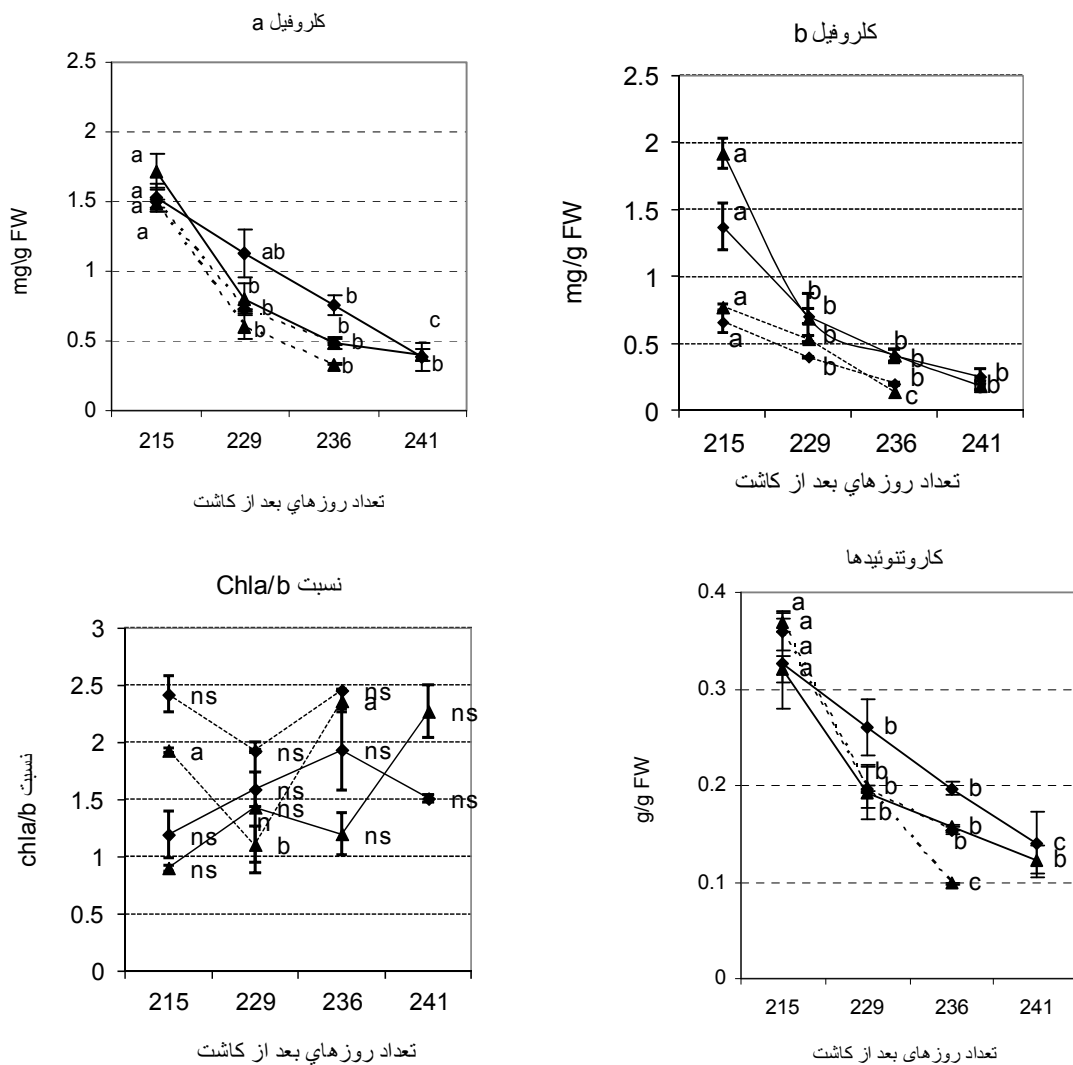
ژنوتیپ	ارتفاع بوته (cm)	طول خوشه (cm)	طول ریشک (cm)	طول برگ پرچمی (cm)	وزن هزار دانه (gr)	متوسط عملکرد (Kg/ha)
Q13	۴۸/۳۳	۶/۷	۸/۰۰	۶/۲۷	۳۶/۱۱	۱۳۹۰
Q20	۶۵/۰۷	۸/۶۰	۱۳/۰۰	۹/۲۷	۳۵/۹۹	۱۵۸۲

جدول ۲- همبستگی بین صفات اندازه گیری شده شامل میزان نسبی آب برگ پرچم (RWC)، کلروفیل a (Chla)، کلروفیل b (Chlb)، کاروتنوئیدها (CAR)، پروتئین محلول کل (TSP) و فعالیت آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیت پراکسیداز (APX) در تیمار آبی در طول دوره آزمایش.

صفت	SOD	APX	TSP	CAR	Chlb	Chla
RWC	۰/۲۷۲	-۰/۶۱۱**	۰/۷۴۴**	۰/۶۱۹**	۰/۶۸۴**	۰/۶۸۶**
Chla	۰/۵۷۳**	-۰/۱۵۸	۰/۸۳۳**	۰/۹۲۹**	۰/۷۸۵**	
Chlb	۰/۴۴۶**	-۰/۳۷۴*	۰/۷۹۹**	۰/۵۹۹**		
CAR	۰/۵۸۹**	-۰/۰۴۸**	۰/۷۵۴**			
TSP	-۰/۴۱۳*	-۰/۳۸۸*				
APX	۰/۴۱۹*					



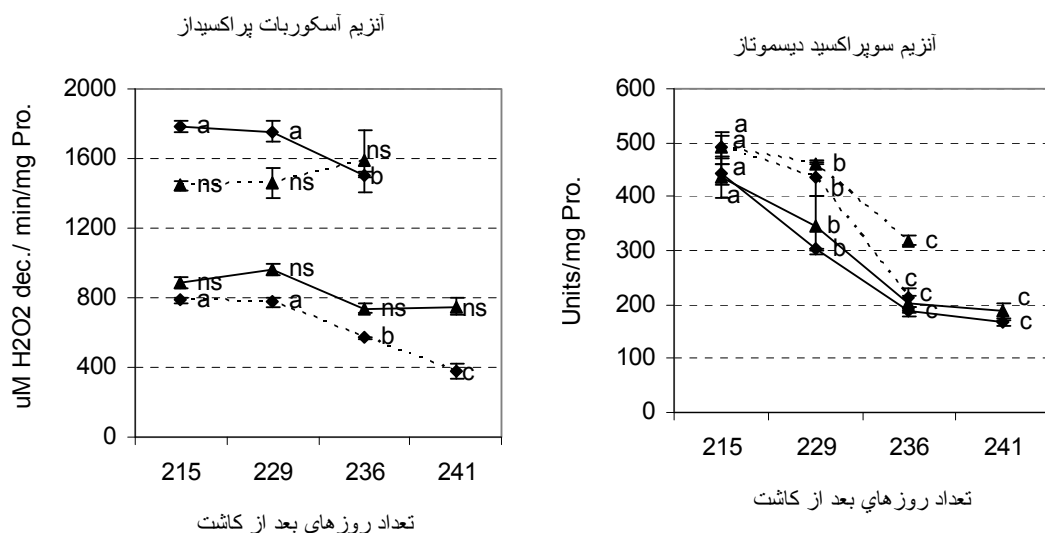
شکل ۲- تغییرات میزان نسبی آب برگ پرچم و پروتئین محلول کل ژنوتیپ Q13 (◆) و ژنوتیپ Q20 (▲) در مراحل شروع باروری (۲۱۵ روز بعد از کاشت)، پر شدن دانه (۲۲۹ روز بعد از کاشت)، شیری شدن ثانویه (۲۳۶ روز بعد از کاشت) و خمیری نرم (۲۴۱ روز بعد از کاشت) در گیاهان تیمار آبی (-) و در مراحل شروع باروری (۲۱۵ روز بعد از کاشت)، پر شدن دانه (۲۲۹ روز بعد از کاشت) و خمیری نرم (۲۳۶ روز بعد از کاشت) گیاهان تحت تنش خشکی (---). هر عدد میانگین سه تکرار می‌باشد (Mean±SE). میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱ درصد مقایسه شدند.



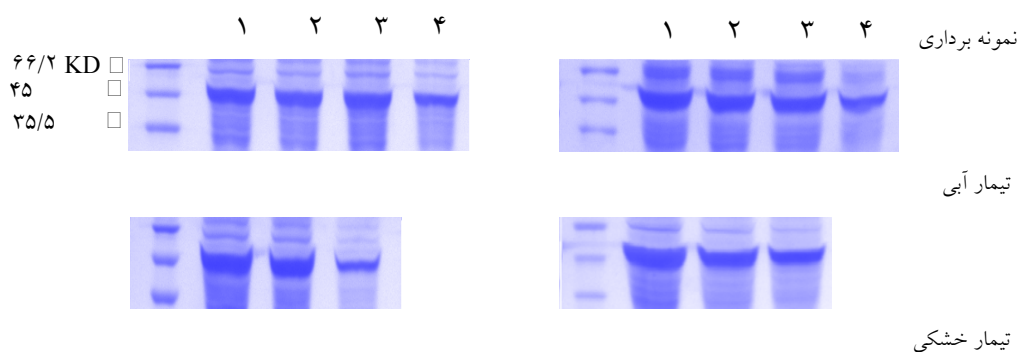
شکل ۳- تغییرات میزان نسبی کلروفیل a، کلروفیل b، نسبت Chla/b و کاروتنوئیدهای ژنوتیپ Q13 (◆) و ژنوتیپ Q20 (▲) در مراحل شروع باروری (۲۱۵ روز بعد از کاشت)، پر شدن دانه (۲۲۹ روز بعد از کاشت)، شیری شدن ثانویه (۲۳۶ روز بعد از کاشت) و خمیری نرم (۲۴۱ روز بعد از کاشت) در گیاهان تیمار آبی (-) و در مراحل شروع باروری (۲۱۵ روز بعد از کاشت)، پر شدن دانه (۲۲۹ روز بعد از کاشت) و خمیری نرم (۲۳۶ روز بعد از کاشت) گیاهان تحت تنش خشکی (---). هر عدد میانگین سه تکرار می‌باشد (Mean±SE). میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱ درصد مقایسه شدند.

Q13 و Q2۰ به ترتیب ۵۷ درصد و ۳۵ درصد کاهش نشان داد. تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گردید. بنحوی که فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ Q13 در نمونه برداری دوم ۴۴ درصد و در ژنوتیپ Q20 در نمونه برداری سوم ۵۸ درصد در گیاهان تحت تنش خشکی از گیاهان آبیاری شده بیشتر مشاهده شد. اما در نمونه برداری اول تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده نگردید.

آنزیمهای آنتی اکسیدان: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC ۱۰۱۵۰۱۰۱) با افزایش سن گیاهان هر دو تیمار کاهش پیدا کرد (شکل ۴). در گیاهان آبیاری شده فعالیت SOD در طول دوره آزمایش با افزایش سن برگ در ژنوتیپهای Q13 و Q22 به ترتیب ۶۲ درصد و ۵۷ درصد کاهش نشان داد. الگوی کاهش فعالیت SOD در گیاهان تحت تنش خشکی نیز مشابه گیاهان آبیاری شده بود. در گیاهان تحت تنش خشکی با افزایش سن گیاه طی سه مرحله نمونه برداری فعالیت SOD در ژنوتیپهای



شکل ۴- آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز ژنوتیپ Q13 (♦) و ژنوتیپ Q20 (▲) در مراحل شروع باروری (۲۱۵ روز بعد از کاشت)، پر شدن دانه (۲۲۹ روز بعد از کاشت)، شیری شدن ثانویه (۲۳۶ روز بعد از کاشت) و خمیری نرم (۲۴۱ روز بعد از کاشت) در گیاهان تیمار آبی (-) و در مراحل شروع باروری (۲۱۵ روز بعد از کاشت)، پر شدن دانه (۲۲۹ روز بعد از کاشت) و خمیری نرم (۲۳۶ روز بعد از کاشت) گیاهان تحت تنش خشکی (---). هر عدد میانگین سه تکرار می‌باشد (Mean±SE). میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱ درصد مقایسه شدند.



شکل ۵- تغییرات پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو در تیمارهای آبی و خشکی طی مراحل مختلف رشد. اعداد یک تا چهار به ترتیب نشان دهنده مراحل مختلف رشد شامل شروع باروری (مرحله ۱)، پر شدن دانه (مرحله ۲)، شیری شدن ثانویه (مرحله ۳) و خمیری نرم (مرحله ۴) در گیاهان تیمار آبی و مراحل شروع باروری (مرحله ۱)، پر شدن دانه (مرحله ۲) و خمیری نرم (مرحله ۳) می‌باشند. شانه بکار برده شده جهت ژل تیمار خشکی ژنوتیپ Q20 کوچکتر از شانه استفاده شده در سایر شکلها بوده است. لذا شدت باند روبیسکو در این تصویر بیشتر از سایر تصاویر به نظر می‌رسد. در صورتی که اندازه واقعی آن کمتر می‌باشد. دلیل صحت موضوع فوق الذکر ضخامت بارز خط کش می‌باشد. در هر چاهک ۵ میکرو لیتر عصاره خام بارگیری شد.

۱۵ درصد کاهش نشان داد. در صورتی که در ژنوتیپ Q20 تغییر معنی داری مشاهده نگردید.

پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو: با استفاده از نرم افزار LabWorks 4.0 ژلهای SDS-PAGE آنالیز شدند و وزن مولکولی باندها مشخص گردید. باندهای که وزن مولکولی آن 55 ± 3 KD بود به عنوان باند پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو شناسایی گردید (شکل ۵). تعیین نوار پروتئینی با وزن مولکولی ۵۵ KD به عنوان نوار پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو به وسیله دیگران نیز گزارش شده است (۴۲). نتایج به دست آمده نشان داد که میزان پروتئین rbcL در طی دوره آزمایش در گیاهان آبیاری شده و گیاهانی که تحت تنش خشکی بودند، کاهش پیدا کرد. همچنین در اثر تنش خشکی در دو ژنوتیپ به کار برده شده در این آزمایش مقدار پروتئین rbcL کاهش نشان داد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, ۱۰۱۱۰۱۰۱۱) در طی چهار مرحله نمونه برداری در گیاهان آبیاری شده در ژنوتیپ Q13 ۵۲ درصد کاهش نشان داد (شکل ۴). در صورتی که در ژنوتیپ Q20 کاهش معنی دار نبود. تنش خشکی باعث گردید میزان فعالیت APX افزایش پیدا کند. در هر دو ژنوتیپ فعالیت APX در طول دوره آزمایش در گیاهان تحت تنش خشکی از گیاهان آبیاری شده بیشتر بود. فعالیت APX در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاهان آبیاری شده در ژنوتیپ‌های Q13 و Q20 به ترتیب در نمونه برداری اول ۱۲۷ درصد و ۶۲ درصد، در نمونه برداری دوم ۱۲۶ درصد و ۵۲ درصد و در نمونه برداری سوم ۱۶۳ درصد و ۱۱۴ درصد افزایش نشان داد. فعالیت APX در گیاهان تحت تنش خشکی ژنوتیپ Q13 نیز مانند گیاهان آبیاری شده با افزایش سن گیاه کاهش پیدا کرد. اما میزان کاهش در گیاهان تحت تنش خشکی از گیاهان آبیاری شده کمتر بود. فعالیت APX در طول دوره آزمایش در گیاهان تحت تنش خشکی در ژنوتیپ Q13،

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تنش خشکی باعث تسریع پیری می‌گردد. به طوری که گیاهان تیمار آبی تا ۲۴۱ روز بعد از کاشت نمونه برداری شدند. در صورتی که گیاهان تیمار خشکی تا ۲۳۶ روز بعد از کاشت نمونه برداری شدند. تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی می‌باشد که باعث کاهش رشد گیاهان و در نتیجه کاهش عملکرد آنها می‌شود. در شرایط تنش خشکی گیاه جهت حفظ آب سلول اقدام‌های مختلف روزانه‌های خود را می‌بندد. در نتیجه میزان فتوسنتز به دلیل کمبود میزان دی‌اکسید کربن کاهش می‌یابد (۳۴). در چنین شرایطی میزان تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن به ویژه رادیکال سوپراکسید در کلروپلاست افزایش پیدا می‌کند (۳۳ و ۳۸). رادیکال‌های آزاد باعث تخریب ماکرومولکول‌ها و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند. بدین ترتیب تنش اکسیداتیو ناشی از شرایط نامساعد خشکی منجر به تسریع پیری در گیاهان می‌شود (۱۸). از آنجایی که گیاهان نمی‌توانند از شرایط نامساعد محیطی فرار کنند، پیر شدن برگ در اثر تنش خشکی مکانیسمی است که می‌تواند باعث بقای گیاه در شرایط نامساعد محیطی گردد (۱۲). در این زمان، مواد غذایی از برگ به سایر قسمت‌های گیاه (برگ‌های جوان‌تر، میوه و گل) منتقل می‌شود (۲۸). بررسی‌ها نشان می‌دهد در غلات اگر تنش خشکی شدیدتر شود، گیاهان دچار رسیدن اجباری شده و گیاه به سرعت زرد و خشک می‌گردد (۱).

با افزایش سن گیاه، میزان RWC در تیمارهای آبی و خشکی کاهش پیدا کرد. همچنین تنش خشکی نیز باعث کاهش RWC گردید. در تحقیقی بر روی ارتباط خشکی و تنش اکسیداتیو ناشی از آن با پیری برگ در گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) انجام گردید، گزارش شده است که تنش خشکی باعث بروز علائم پیری در برگ می‌شود.

این علائم شامل افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، کاهش میزان کلروفیل، فتوسنتز و کاهش شدید آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل β - کاروتن و α - توکوفرول بود. همچنین در این آزمایش مشخص گردید با افزایش شدت تنش خشکی RWC نیز به تدریج کاهش می‌یابد (۲۸).

نمونه برداری اول ۲۱۵ روز بعد از کاشت و در مرحله شروع باروری انجام شد. با توجه به اینکه جو در طول دوره رشد و نمو در این مرحله نسبت به خشکی حساس می‌باشد (۹ و ۱۰). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که حساسیت گیاه جو به کمبود آب در این مرحله ناشی از کاهش پروتئین محلول کل می‌باشد. کاهش پروتئین محلول کل در اثر تنش خشکی در سایر گیاهان مانند آفتابگردان، گندم و برنج نیز گزارش شده است (۱۷، ۳۳ و ۳۷).

کاهش مقدار کلروفیل در طی مراحل پیری و در اثر تنش خشکی در سایر گونه‌های گیاهی نیز گزارش شده است (۱۲، ۱۶ و ۲۱). میزان کاهش کلروفیل b در اثر تنش خشکی بیشتر از کلروفیل a می‌باشد. زیرا در اثر تنش خشکی مقدار کمپلکس پروتئینی جذب‌کننده نور *chl a/b* موجود در فتوسیستم II به شدت کاهش پیدا می‌کند. بخش کلروفیل b این کمپلکس پروتئینی درون غشاء کلروپلاست قرار دارد (۴). با افزایش تشکیل ROS در کلروپلاست در اثر تنش خشکی، میزان تخریب غشاهای کلروپلاستی نیز افزایش می‌یابد. از این رو در اثر تنش خشکی تخریب کمپلکس پروتئینی *Chl a/b* و در نتیجه کلروفیل b نیز افزایش پیدا می‌کند. افزایش نسبت *Chl a/b* در اثر تنش خشکی نیز ناشی از این مسئله می‌باشد. حساسیت کلروفیل b به سایر تنش‌های اکسیداتیو از جمله تنش غرقابی نیز مشخص شده است. بررسی‌های انجام شده بر روی گیاهان ذرت و فلفل نشان داد که تنش غرقابی

بنیادی برمی‌گردد (۲۰). در این پژوهش مقدار کاروتنوئیدها در ابتدای دوره تنش افزایش پیدا کرد اما با افزایش شدت تنش مقدار آن کاهش یافت. مون بوش و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند در اوایل دوران پیری کاهش معنی داری در مقدار کاروتنوئیدها مشاهده نگردید، اما در اواخر پیری میزان آنها به شدت کاهش می‌یابد (۲۹). بنابراین به نظر می‌رسد که مکانسیم دفاع محافظت نوری در اوایل دوره پیری می‌تواند کلروپلاست‌ها را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت کند. اما در اواخر پیری دفاع محافظت نوری از بین می‌رود. تنش خشکی نیز باعث کاهش مقدار کاروتنوئیدها می‌شود.

طبق نتایج حاصله میزان پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو (rbcL) طی مراحل مختلف رشد در گیاهان تیمارهای آبی و خشکی کاهش یافت. همچنین تنش خشکی باعث کاهش مقدار پروتئین rbcL گردید. این نتایج با سایر نتایج گزارش شده در این زمینه هماهنگ می‌باشد. بوچانان و همکاران (۲۰۰۳) به کمک تکنیک SDS-PAGE نشان دادند که در برگهای آراییدوپسیس از روز ۳۲ بعد از کاشت (بعد از اینکه برگها کاملاً توسعه یافتند) میزان پروتئین زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو کاهش پیدا می‌کند (۱۲). مشخص شده است که تخریب پروتئینهای استرومای کلروپلاست بویژه آنزیم روبیسکو در شرایط تنش اکسیداتیو به وسیله رادیکالهای فعال اکسیژن به صورت غیر آنزیمی صورت می‌گیرد (۴۰). از آنجایی که در زمان پیری و در اثر تنش خشکی میزان ROS در کلروپلاست افزایش می‌یابد، بنابراین هم در اثر پیری و هم در زمان تنش خشکی تخریب پروتئین آنزیم روبیسکو افزایش می‌یابد. بیش از ۴۰ درصد پروتئین محلول کل برگ را آنزیم روبیسکو تشکیل می‌دهد (۴۲). بنابراین کاهش آنزیم روبیسکو در اثر تنش اکسیداتیو می‌تواند کاهش پروتئین محلول کل را در زمان پیری و در اثر تنش خشکی توجیه کند. همچنین با توجه به نقش آنزیم

مقدار کلروفیل a و b به ویژه کلروفیل b را کاهش می‌دهد. مطالعه بر روی گیاهان مختلف از جمله ژنوتیپهای مختلف ذرت نشان می‌دهد که کلروفیل b حساسیت بیشتری به تنش غرقابی دارد. همچنین فتوسیستم II که دارای مقدار بیشتری کلروفیل b می‌باشد به تنشهای محیطی حساس است و در نتیجه کلروفیل b بیشتری در اثر شرایط نامساعد محیطی از بین می‌رود (۲).

تغییرات نسبت Chl a/b در دوران پیری در دو ژنوتیپ به کار برده شده در این آزمایش در گیاهان آبیاری شده و گیاهان تحت تنش خشکی الگوی مشخصی را دنبال نکرد (شکل ۳). مون - بوش و همکاران (۲۰۰۱) در آزمایشی در شرایط مزرعه بر روی *Salvia officinalis* L. نشان دادند که در دوران پیری برگ نسبت Chl a/b فقط ۴ درصد کاهش پیدا کرد (۲۷). همچنین در آزمایشی که بر روی *Panicum miliaceum* صورت گرفت؛ هم در برگهای پیر شده به وسیله تاریکی و هم در برگهایی که در اثر تنش خشکی پیری در آنها تشدید شده بود، نسبت Chl a/b فقط زمانی به طور معنی دار در دوران پیری کاهش پیدا کرد که میزان کاهش کلروفیل بیش از ۸۵ درصد بود (۱۷).

کاروتنوئیدها شامل β - کاروتن و گزانتوفیل‌ها آنتی‌اکسیدانهای چربی دوست با وزن مولکولی کم در کلروپلاست هستند که غشاهای کلروپلاستی را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. کاروتنوئیدها علاوه بر نقش ساختمانی و جذب نور می‌توانند به صورت مستقیم اکسیژن یکتایی را غیر فعال کنند و یا از طریق فرو نشانیدن کلروفیل برانگیخته شده، به صورت غیر مستقیم از تشکیل اکسیژن یکتایی جلوگیری کنند (۲، ۲۵ و ۲۹). بدین ترتیب دستگاه فتوسنتزی را از شروع پراکسیداسیون لپیدی محافظت می‌کنند. مولکول کاروتن برانگیخته شده از طریق انتقال الکترون به سایر رنگیزه‌های موجود در گیرنده‌های کلروپلاست و یا به وسیله انتشار گرما به حالت

در محافظت سلولها علیه تنش اکسیداتیو بر عهده دارند. زیرا آنها رادیکال سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌کنند. در اثر تنش خشکی فعالیت هر سه نوع آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش پیدا می‌کند. افزایش فعالیت SOD می‌تواند به دلیل افزایش رادیکال سوپر اکسید و یا اینکه یک مکانیسم دفاعی علیه تنش اکسیداتیو در گیاهان باشد (۳۸).

فعالیت آنزیم APX در هر دو ژنوتیپ در اثر تنش خشکی افزایش پیدا کرد. رتناپاکا و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که تنش خشکی باعث می‌گردد فعالیت APX در گیاه کتان (*Gossypium hirsutum* L.) ۴۰ درصد و در گیاه آنودا (*Anoda cristata* L.) ۲۶ درصد افزایش یابد (۳۵). همچنین در تحقیقی که میزان فعالیت APX را در برگهای تنباکو، با سنن مختلف بررسی کردند، مشخص گردید با افزایش سن برگ فعالیت APX کاهش می‌یابد (۱۵).

به طور کلی آنزیمهای آنتی اکسیدان نقش مهمی در مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از دوران پیری و شرایط نامساعد محیطی دارند. در این آزمایش با افزایش سن گیاه فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در هر دو ژنوتیپ و در هر دو تیمار کاهش پیدا کرد. اما در گیاهان تیمار خشکی ژنوتیپ Q13 فعالیت این آنزیم با شدت بیشتری کاهش یافت. فعالیت آنزیم آسکوبات پراکسیداز با افزایش سن گیاهان ژنوتیپ Q13 در هر دو تیمار کاهش پیدا کرد. اما در ژنوتیپ Q20 کاهش معنی داری در فعالیت این آنزیم مشاهده نشد. به نظر می‌رسد توانایی بیشتر ژنوتیپ Q20 در حفظ فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در زمان تنش خشکی و همچنین حفظ فعالیت آسکوبات پراکسیداز در طی مراحل پیری می‌تواند نقش مؤثری در بیشتر بودن عملکرد این ژنوتیپ نسبت به ژنوتیپ Q13 داشته باشد.

در این آزمایش بین صفات همبستگی مشاهده شد. همبستگی بین صفات مثبت بود. فقط همبستگی بین

روییسکو در تثبیت CO₂ در گیاهان، کاهش فعالیت آنزیم روییسکو در اثر تنش خشکی می‌تواند اثر تنش خشکی را در تسریع پیری نیز توجیه کند (۳۳).

فعالیت SOD با افزایش سن برگ گیاهان هر دو تیمار کاهش پیدا کرد. کاهش فعالیت SOD در دوران پیری برگ در سایر گونه های گیاهی از جمله تنباکو، ذرت، کلم بروکلی و نخود فرنگی نیز گزارش شده است (۱۵، ۱۸ و ۳۲). آنالیز وسترن بلات (Western blot) پروتئینهای لپه خیار که به طور طبیعی پیر شده بودند نشان داد که در دوران پیری لپه‌های خیار، به موازات کاهش فعالیت SOD، میزان پروتئین SOD در میتوکندری کاهش پیدا می‌کند (۲۰). هی و اوساکی (۲۰۰۵) در آزمایشی بر روی برگهای تنباکو با سنن مختلف نشان دادند که در دوران بلوغ برگ به موازات کاهش فعالیت SOD میزان mRNAs مربوط به SOD نیز کاهش می‌یابد (۱۸). در آزمایش مشابهی بر روی برگهای جوان و پیر جو، نیز مشخص گردید که میزان mRNAs مربوط به SOD در برگهای پیر کمتر از برگهای جوان می‌باشد. محققین با قرار دادن برگهای جوان و پیر در معرض تنش اکسیداتیو نوری نتیجه‌گیری کردند تخریب اکسیداتیو در زمان پیری به دلیل عدم توانایی برگهای پیر در تنظیم مقدار SOD مربوط به mRNAs متناسب با سرعت تشکیل رادیکالهای فعال اکسیژن، به وجود می‌آید (۱۳).

افزایش فعالیت SOD در اثر تنش خشکی به وسیله محققین دیگر نیز گزارش شده است. حبیبی و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی نحوه فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان در شرایط مزرعه در ۵ رقم آفتابگردان نشان دادند که در اثر تنش خشکی فعالیت SOD افزایش می‌یابد (۱۷). در آزمایش مشابهی بر روی نشاهای برنج نیز مشخص گردید که فعالیت SOD در اثر تنش خشکی افزایش می‌یابد. به طور کلی آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز نقش عمده ای

سلول از جمله پروتئینها از بین می‌روند (۴۱). فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز تغییر معنی داری نداشته است، از آنجایی که فعالیت ویژه آنزیم نشان دهنده فراوانی نسبی پروتئین می‌باشد، این امر می‌تواند ناشی از افزایش بیان ژنهای کد کننده این آنزیم و یا اینکه پایداری مولکولهای پروتئینی این آنزیم در مقابل تخریب اکسیداتیو ناشی از شرایط پیری سلول باشد. اما نتیجه‌گیری قطعی درباره این موضوع نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه دارد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و سایر صفات شامل میزان RWC، کلروفیل b، کاروتنوئیدها، پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم SOD منفی می‌باشد. به عبارت دیگر با کاهش میزان این صفات، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در مراحل آخر رشد گیاه جو تغییر معنی داری پیدا نکرد. علی‌رغم اینکه در مراحل پیری توانایی محافظتی سلول در مقابل رادیکالهای فعال اکسیژن کاهش می‌یابد و سلول دچار تنش اکسیداتیو می‌شود به نحوی که فعالیتهای طبیعی سلول و به دنبال آن ماکرومولکولهای

منابع

- کریمی، ه. ۱۳۷۵. گیاهان زراعی. انتشارات دانشگاه تهران. ۷۱۴ صفحه.
- ملک احمدی، ف. کلانتری، خ. موو ترکزاده، م. ۱۳۸۴. اثر تنش غرقابی بر القاء تنش اکسیداتیو و غلظت عناصر در گیاه فلفل (*Capsicum annum L.*). مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۱۸، شماره ۲، ص ۱۱۰-۱۱۹.
- زینالی یادگاری، ل. حیدری، ر. کاراپتیان، ژ. ۱۳۸۸. تغییر نفوذ پذیری غشاهای زیستی و فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیداتیو گیاه سویا در پاسخ به دمای پایین. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۲، شماره ۲، ص ۲۳۶-۲۲۹.
- Alberet R. S. and Thornber J. P. 1977. Water stress effects on the content and organization of chlorophyll in mesophyll and bundle sheath chloroplast of maize. *Plant Physiology*. 59: 351-353
- Ali Peighambari S. Yazdi Samadi B. Nabipour A. Charmet G. and Sarrafi A. 2005. QTL analysis for agronomic traits in a barley doubled haploids population grown in Iran. *Plant science*. 169: 1008-1013.
- Allen R. D. Webb R. P. and Schake S. A. 1997. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radicals Biology Medicine*. 23(3): 473-9.
- Alscher R.G. Erturk N. and Heath L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 1331-1341.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. 85: 235-241.
- Aspinall D. 1966. Effects of day length and light intensity on growth of barley. 4. Genetically controlled variation in response to photoperiod. *Australian Journal of Biological Sciences*. 19: 517-534.
- Blum A. 1985. Photosynthesis and transpiration in leaves and ears of wheat and barley varieties. *Journal of Experimental Botany*. 36: 432-440.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Buchanan-Wollaston V. Earl S. Harrison E. Mathas E. Navabpour S. Page T. and Pink D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*. 1: 3-22.
- 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 Physiology*. 106: 1033-1039.
- Dellongo O. T. Gonzalez C. A. Pastori G. M. and Trippi V. S. 1993. Antioxidant defenses under hyperoxygen and hyperosmotic conditions in leaves of 2 lines maize with differential sensitivity to drought. *Plant and Cell Physiology*. 34(7): 1023-1028
- Dhindsa, R. A. Plumb-Dhindsa P. and Thorpe T. A. 1981. Leaf senescence: correlated with

- increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*. 126: 93-101.
16. Embry J. L. and Nothnagel E. A. 1988. Leaf development and senescence in *Panicum miliaceum* L., a cereal with a short seed-to-seed cycle. *Plant Science*. 55 (2):129-136.
 17. Habibi D. Boojari M. M. A. Mohmoudi A. Ardakani M. R. and Taleghaani D. 2004. Antioxidant Enzyme in sunflower subjected to drought stress. 4th International crop science congress. 26 sep- 1 oct.
 18. He P. Osaki M. Takebe M. Shinano T. and Wasaki J. 2005. Endogenous hormones and expression of senescence-related genes in different senescent types of maize. *Journal of Experimental Botany*. 56 (414): 1117-1128.
 19. Hsu S. Y. and C. H. Kao. 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol and antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regulation*. 39: 83-90.
 20. Kanazawa S. Sano S. Koshiha T. and Ushimaru T. 2000. changes in antioxidant enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence. *Physiologia Plantarum*. 109: 211-216.
 21. Kukavica B. and Jovanovic S. V. 2004. Senescence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing *physiologia Plantarum*. 122 (3): 321-327.
 22. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680- 685.
 23. Lascano H. R. Antonicelli G. E. Luna C. M. Melchiorre M. N. Gomez L. D. Racca R. w. Trippi V. S. and Casano L. M. 2001. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and *in vitro* studies. *Australian Journal of plant physiology*. 28: 1095-1102
 24. Lichtenthaler H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane. *Methods of Enzymology*. 148: 350.
 25. Loggini B. Scartazza A. Brugnoli E. and Navari-Izzo F. 1999. Antioxidative Defense System, Pigment Composition, and Photosynthetic Efficiency in Two Wheat Cultivars Subjected to Drought. *Plant Physiology*. 119: 1091-1099.
 26. Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7: 405-410.
 27. Munne-Bosch S. Jubany-Mari T. and Alegre L. 2001. Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant Cell and Environmental*. 24: 1319-1327.
 28. Munne-Bosch S. and Alegre L. 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plants survival under drought stress. *Functional Plant Biology*. 31 (3): 203-216.
 29. Munne-Bosch S. and Penuelas J. 2003. Photo- and antioxidant protection during summer leaf senescence in *Pistiscia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. *Annals of Botany*. 92: 385-391.
 30. 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 Physiology*. 28: 131-140.
 31. Noctor G. and Foyer C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 249-279.
 32. Olsson M. 1995. Alterations in lipid-composition, lipid-peroxidation and antioxidative protection during senescence in drought-stressed plants and non-drought stressed plants of *Psium sativum*. *Plant physiology and Biochemistry* 33 (5): 547-553.
 33. Parry M. A. J. Andralojc P. J. Khan S. Lea P. J. and Keys A. J. 2002. Rubisco Activity: Effects of Drought Stress. *Annals of Botany*. 89: 833-839.
 34. Pinheiro H. A. DaMatta F.M. Chaves A. R. M. Fontes E. P. B. Loureiro M. E. 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Science*. 167: 1307-1314.
 35. Ratnayaka H. H. Molin W. T. and Sterling T. M. 2003. Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. *Journal of Experimental Botany*. 54 (391): 2293-305.
 36. Reddy B. S. Yuvaraj N. Babitha V. Ramnath V. Philomina P. T. Sabu M. C. 2004. Antioxidant

- and hypolipidemic effects of Spirulina and natural carotenoids in broiler chicken. *Indian Veterinary Journal*. 81: 383-386.
37. Selote D. S. and Khanna-Chopra R. 2004. Drought-induced spiklet sterility is associated with an inefficient antioxidant defence in rice panicles. *Physiologia Plantarum*. 121(3): 462-471.
38. Sharma P. and Dubey R. S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*. 46: 209-221.
39. Sofo A. Dichio B. Xiloyannis C. and Masia A. 2004. Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiologia Plantarum*. 121: 58-65.
40. Srivall B. and Khanna-Chopra R. 2004. The developing reproductive sink induces oxidative stress to mediate nitrogen mobilization during momocarpic senescence in wheat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 325: 198-202.
41. Swidzinski J. A. Leaver C. J. and Sweetlove L. J. 2004. A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Photochemistry*. 65: 1829-1838.
42. Taiz L. and Zeiger E. 1998. *Plant physiology*. Second Edition. Sinauer Associated, Inc., Publisher. pp: 792.

Role of photosynthetic Pigments and antioxidant enzymes against oxidative stress

Amini Z.¹ and Haddad R.²

¹ Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz, I.R. of Iran

² Agricultural Biotechnology Dept., Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. of Iran

Abstract

In this experiment, we studied the effects of drought stress under field conditions on chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids, rubisco large subunit (rbsl) and the activities of antioxidant enzymes in barley at early anthesis, watery ripe, late milk and soft dough stages of two genotypes with different yield (Q13: 1390 Kg/ha and Q20:1582 Kg/ha). The results showed that under oxidative stress chlorophyll b is more sensitive than chlorophyll a. The amount of cartenoids increased at initial time of stress period, but declined with the progress of stress. The amount of rbsl declined during senescence and drought stress. The activity of SOD declined with plant age in both water treatments. However it was more in plants under drought stress of Q13. APX activity declined with age in both water treatments of Q13. There were no significant difference with age in Q20 APX activity. Drought stress triggered increases in antioxidant enzymes activities. We concluded that Q20 has more ability to maintain SOD activity during water deficit stress and APX activity during senescence; therefore it seems that this ability is a key role for increasing the yield of Q20 in compare to Q13.

Keywords: Antioxidant enzymes, carotenoids, Chlorophyll a, Chlorophyll b, Oxidative stress