اثر تنش خشکی بر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در برگ پرچم و سنبله ژنوتیپ‌های متحمل و حساس گندم

پریسا شریفی[1]* و نیر محمدخانی

۱-*نویسنده مسئول: استادیار، گروه ترویج و آموزش کشاورزی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (pa.sharifi@urmia.ac.ir)

۲- استادیار، گروه گیاهان دارویی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۹

چکیده

تنش خشکی به‌عنوان یکی از عامل اصلی کاهش عملکرد گیاهان در مناطق نیمه‌خشک محسوب‌شده و منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود. به منظور بررسی اثر تنش خشکی پس از گرده‌افشانی بر برخی صفات زراعی و فیزیولوژیک برگ پرچم و سنبله ژنوتیپ‌های مختلف گندم، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مرکز تحقیقات دیم مراغه اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو سطح آبیاری؛ کنترل (آبیاری در تمام مراحل رشدی بر اساس شرایط کشت آبی) و تنش خشکی (قطع آبیاری پس از گرده‌افشانی تا پایان دوره رشد) و ژنوتیپ‌های مختلف گندم (متحمل: PTZ و TRK، نیمه متحمل: Manning و Sabalan و حساس: RINA-11 و Saratoves) بود. در شرایط تنش خشکی پس از گرده‌افشانی، عملکرد دانه و وزن هزار دانه نسبت به شرایط شاهد کاهش معنی‌دار یافت. حداکثر و حداقل عملکرد دانه در این شرایط به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های نیمه متحمل Manning (۲۴۲/۹۷) و حساسSaratoves (۱۴۵/۳۴ gm^{-2}) بود. بیشترین تغییرات در محتوی مالون‌دی‌آلدئید مربوط به ژنوتیپ‌های حساس بود. فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز) و غیرآنزیمی (گلوتاتیون و آسکوربات) به واسطه اعمال تنش خشکی افزایش یافت. بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌ترتیب در برگ پرچم ژنوتیپ‌های TRK Saratovesو در سنبله ژنوتیپ‌های Manning و Saratoves مشاهده شد. برگ پرچم و سنبله ژنوتیپ‌های Manning و Saratoves بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز را نشان دادند. بیشترین محتوی گلوتاتیون و آسکوربات در برگ پرچم و سنبله، به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌هایTRK و Manning بود، این درحالی است که در ژنوتیپ Saratoves کمترین مقادیر مشاهده شد. به نظر می‌رسد که در سنبله ژنوتیپ Manning فعال شدن هر دو سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز) و غیرآنزیمی (گلوتاتیون و آسکوربات) نقش کلیدی را در افزایش تحمل به تنش خشکی داشتند و در این میان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مؤثرترین نقش را ایفا کردند.

کلید واژه‌ها: آسکوربات، پراکسیداز، گیاه، عملکرد دانه

مقدمه

در شرایط طبیعی تنش خشکی از عوامل محدودکننده رشد محسوب می‌شود. مرحله گلدهی و پر شدن دانه از حساس‌ترین مراحل رشدی گندم به تنش‌های محیطی از جمله تنش خشکی محسوب می‌شود (Winkel, 1989). تنش خشکی به‌طور تقریبی کلیه فرآیندهای حیاتی سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Yang *et al.*, 2006). در گیاهان زراعی به هنگام بروز تنش خشکی کلروپلاست مهم‌ترین اندامک تولیدکننده انواع اکسیژن فعال به شمار می‌آید، زیرا در چنین شرایطی روزنه‌ها بسته می‌شوند. به همین دلیل تثبیت دی‌اکسیدکربن در چرخه کالوین کاهش و تولید انواع اکسیژن فعال در کلروپلاست افزایش می‌یابد (Mittler, 2002). چنین شرایطی اغلب منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردد. گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های آزاد و

© 2018 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

عوامل غیررادیکالی می‌باشند. گونه‌های فعال اکسیژن باعث آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و از دست رفتن یکپارچگی غشاها و حتی مرگ سلول می‌گردند (Sharma *et al.*, 2012). گیاهان برای جلوگیری از اثرات مخرب تنش اکسیداتیو، از یک سیستم دفاعی پیچیده استفاده می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) بوده و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل مولکول‌هایی با وزن مولکولی پائین همانند اسید آسکوربیک، گلوتاتیون، کاروتنوئیدها و توکوفرول می‌باشند (Verma *et al.*, 2014) استفاده می‌کنند. مکانیسم‌های بیوشیمیایی درگیر برای ممانعت از اثرات تنش اکسیداتیو عبارتند از چرخه مهلر، چرخه آسکوربات-گلوتاتیون، چرخه گزانتوفیل و تنفس نوری (Cruz De Carvalho, 2008). گلوتاتیون و آسکوربات از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب می‌باشند که در اکثر اندامک‌های سلول حضور دارند و این آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی واکنش مستقیم با رادیکال‌های فعال اکسیژن نظیر سوپراکسید و هیدروکسیل را داشته و آن‌ها را جمع‌آوری می‌کنند (Mittler, 2002؛ Smirnoff, 2000). آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در تبدیل پراکسید هیدروژن به آب می‌باشد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه‌های آسکوربات-گلوتاتیون و مهلر حضور دارد (Asada, 2000). در مطالعه حاضر شش ژنوتیپ مختلف گندم انتخاب انتخاب و پس از اعمال تیمار تنش خشکی در مرحله بعد از گرده‌افشانی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (آسکوربات و گلوتاتیون)، آنزیمی (آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز) و پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های برگ و سنبله اندازه‌گیری شد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه جزو پیشرفته‌ترین ارقام گندم دیم بوده که طی چندین سال بررسی در آزمایش‌های عملکرد در مناطق سردسیر کشور شرکت داشته و به‌عنوان ارقام متحمل یا حساس گزارش شده‌اند. با توجه به تحلیل همبستگی عملکرد و شاخص‌های مقاومت به خشکی در محیط تنش و بدون تنش نشان داد که شاخص تحمل تنش (STI)، مناسب‌ترین شاخص برای غربال‌سازی ژنوتیپ‌های گندم می‌باشد.

تاکنون مطالعات زیادی در مورد اثرات تنش خشکی بر میزان آنتی‌اکسیدان‌ها و سایر صفات فیزیولوژیک انجام گرفته است، اما در این مطالعات حداکثر ۴ رقم گندم مطالعه شده و همچنین اکثر این مطالعات در گلخانه و مربوط به مراحل ابتدایی رشد بوده است. لذا هدف از این تحقیق بررسی تأثیر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی و میزان خسارت اکسیداسیونی وارده به گیاه و مطالعه نقش این سیستم‌ها در تعیین چگونگی مقاومت یا حساسیت به خشکی شش ژنوتیپ مختلف گندم در روزهای پایانی پس از گرده‌افشانی در شرایط مزرعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

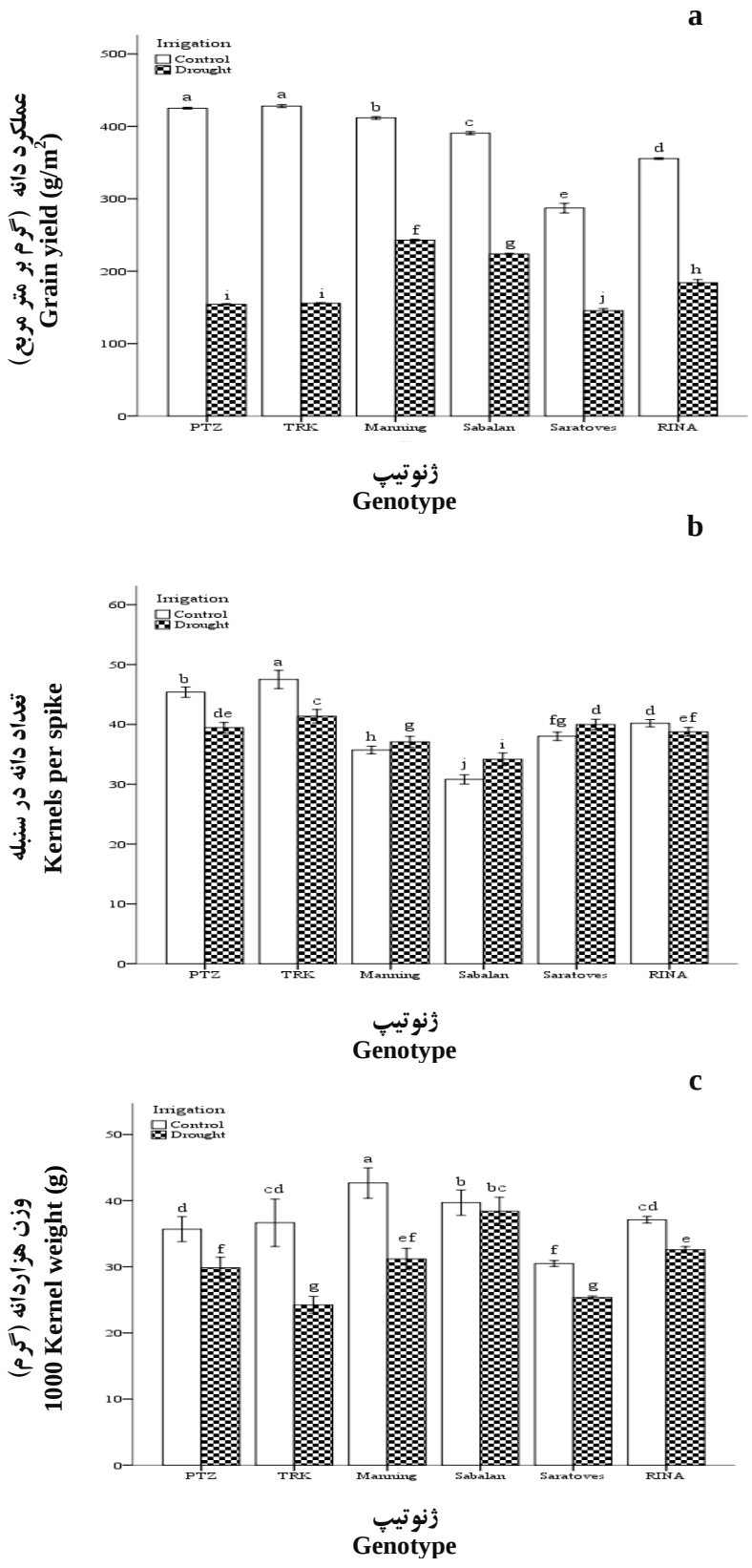
این پژوهش در سال ۱۳۹۴ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه واقع در ۳۰ کیلومتری شرق مراغه با ارتفاع ۱۷۵۰ متر از سطح آب‌های آزاد، واقع در طول جغرافیائی ۴۶ درجه و ۲۵ دقیقه شرقی و عرض جغرافیائی ۳۷ درجه و ۱۲ دقیقه شمالی، با اقلیم نیمه‌خشک سرد هم مرز با فرا سرد، در دو سال متوالی به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد (Sadegh zadeh Ahari *et al.*, 1996). بافت خاک لومی رسی با pH=۷/۸ و EC=۰/۳۷ میکروموز بر سانتی‌متر گزارش گردید. برای آماده‌سازی قطعه زمین آزمایش در پاییز از گاوآهن به عمق ۲۵-۲۰ سانتی‌متر و در بهار قبل از گلدهی علف‌های هرز از پنجه‌غازی استفاده گردید. نیتروژن مورد نیاز بر اساس نتایج آزمایش‌های مزرعه‌ای به میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار اوره و ۲۰ کیلوگرم سوپرفسفات آمونیوم در زمان کاشت به‌صورت جایگذاری مصرف گردید. میزان بذر به‌ترتیب با احتساب ۳۸۰ و ۴۲۰ دانه در مترمربع (شرایط دیم و آبیاری تکمیلی) بر اساس وزن هزار دانه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه محاسبه و کشت گردید. طول، تعداد خطوط

و فواصل بین خطوط هر کرت به‌ترتیب شش متر، شش خط و ۱۷/۵ سانتی‌متر بود. فاکتورهای مورد مطالعه شامل دو سطح آبیاری بود که سطح اول آن به‌عنوان شاهد یا عدم تنش (آبیاری در کلیه مراحل رشدی بر اساس شرایط کشت آبی) و سطح دوم آن تنش خشکی به‌صورت قطع آبیاری پس از مرحله گرده‌افشانی (حذف ۳ مرحله آبیاری آخر دوره رشد) بود. فاکتور دوم شامل شش ژنوتیپ مختلف گندم بود (ژنوتیپ‌های متحمل: PTZ NISKA/UT1556-170//UNKNOWN و TRK13/KAUZ، نیمه متحمل: Manning/Sdv1/Dogu8 و Sabalan و حساس: RINA-11 و Saratoveskaya-29) که مبنای غربال‌سازی این ژنوتیپ‌ها، شاخص‌های کمی مقاومت به خشکی بود که از میان این شاخص‌ها، مناسب‌ترین شاخص، شاخص تحمل تنش(STI) بود. با توجه به اهمیت دوره گرده‌افشانی برای گیاه گندم و با توجه به این‌که گیاه وارد مرحله زایشی‌شده و تعداد سنبله‌ها، نحوه پر شدن آن‌ها و وزن هزار دانه در دوره زایشی تعیین می‌شود و این فاکتورها نشان‌های از عملکرد گیاه است، زمان گرده‌افشانی برای اعمال تنش انتخاب شد. زمان گرده‌افشانی، تکمیل ۵۰ درصد گرده‌افشانی در سنبله‌های هر ژنوتیپ به‌طور جداگانه لحاظ شد (Ehdaie *et al.*, 2006). سنجش میزان مالون دی آلدهید انجام شد (Stewart, 1980). میزان پروتئین محلول کل اندازه‌گیری شد (Bradford, 1979). استخراج عصاره آنزیمی انجام گرفت (Gapinska *et al.*, 2008). سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز انجام گرفت (Nakano and Asada, 1981). فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز نیز اندازه‌گیری شد (Dalton *et al.*, 1986). سنجش محتوای گلوتاتیون انجام گرفت (Griffith and Meister, 1979). سنجش محتوای آسکوربات نیز در مراحل مختلف برداشت انجام شد (Smirnoff, 2000). برای محاسبه عملکرد، در مرحله رسیدگی پس از حذف حاشیه‌ها از هر کرت یک مترمربع برداشت شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزارSPSS و مقایسات میانگین با روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

تغییرات عملکرد و اجزای عملکرد

اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ بر میزان عملکرد دانه نشان داد که اعمال تنش خشکی باعث افت عملکرد ژنوتیپ‌ها شد به‌طوری‌که بیشترین و کمترین عملکرد دانه در شرایط تنشی به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های Manning (۲۴۲/۹۷) و Saratoves (۱۴۵/۳۴) گرم بر مترمربع بود (شکل 1a). عملکرد دانه گندم به‌طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر تنش خشکی انتهای فصل قرار گرفته و کاهش می‌یابد (Abdoli and Saeidi, 2013). این گزارش با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. وقوع تنش خشکی بعد از مرحله گرده‌افشانی احتمالاً یا از طریق کاهش ذخیره‌سازی مواد پرورده در دانه‌ها و یا از طریق کاهش ظرفیت ذخیره‌سازی دانه‌ها باعث افت عملکرد دانه می‌شود (Wang *et al.*, 1999؛ Blum and Ebercon, 1976). تنش خشکی باعث کاهش تعداد دانه در سنبله شد. مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر متقابل تنش خشکی و ژنوتیپ نشان داد که بیشترین و کمترین تعداد دانه در سنبله در شرایط تنش خشکی به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های متحمل TRK (۴۱/۳۸) و نیمه متحمل Sabalan (۳۵/۵۷) بود (شکل 1b). اعمال تنش خشکی همچنین باعث افت وزن هزار دانه گردید. کمترین و بیشترین کاهش وزن هزار دانه به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های نیمه‌متحمل Manning (۳۱/۱۹) و حساس Saratoves (۲۵/۳۶) گرم بود (شکل 1c). وقوع تنش خشکی بعد از مرحله گرده‌افشانی در گندم کاهش بیشتر وزن هزار دانه را در مقایسه با دیگر اجزای عملکرد (تعداد دانه در سنبله) به دنبال داشت. تنش در مرحله بعد از گرده‌افشانی عملکرد را از طریق کاهش وزن هزار دانه کاهش می‌دهد، در این مرحله مواد فتوسنتزی به دانه‌ها منتقل‌شده، بنابراین هرگونه کاهش در میزان آب قابل دسترس گیاه موجب کوچک و لاغر شدن دانه‌ها می‌گردد (Dalvandi *et al.*, 2013). بنابراین دوره رشد دانه پس از گرده‌افشانی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی نقش مهمی در شکل‌گیری عملکرد دانه دارد و بروز هر گونه تنشی از جمله تنش خشکی در این



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و رژیم رطوبتی بر عملکرد دانه (a)، تعداد دانه در سنبله (b) و وزن هزاردانه (c)

میانگین‌های دارای حروف مشابه، بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با در سطح احتمال پنج درصد ندارند

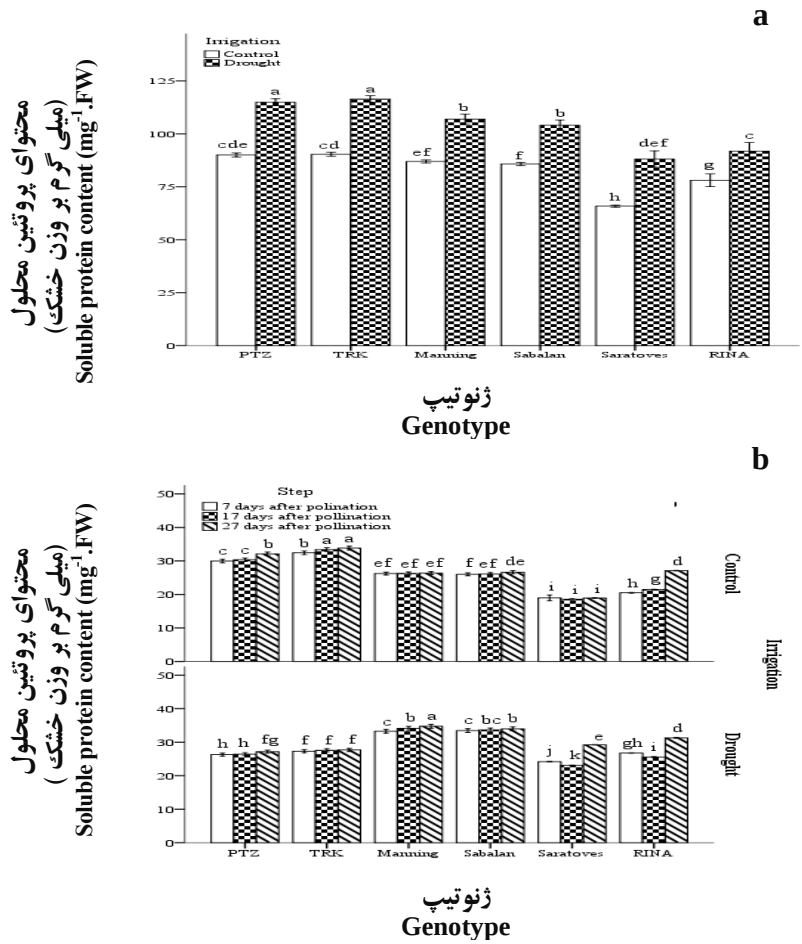
Figure 1. Mean comparison of interaction in genotypes and irrigation on yield (a), grain number per spike (b) and 1000 grain weight (c)

Means followed by the same letters are not significantly different at 5% probability level by Duncan's test

مرحله باعث کاهش وزن هزاردانه با شدت بیشتری نسبت به دو جزء دیگر عملکرد یعنی تعداد دانه در سنبله و تعداد سنبله در واحد سطح خواهد شد. دلیل این امر عدم تأمین مواد فتوسنتزی مورد تقاضای دانه‌ها می‌باشد زیرا در این شرایط فتوسنتز جاری به وسیله تنش خشکی و تنش گرمایی دچار اختلال می‌شود (Saeidi *et al.*, 2010).

تغییرات پروتئین‌های محلول در برگ پرچم و سنبله

اعمال تنش خشکی باعث افزایش محتوای پروتئین‌های محلول در برگ پرچم و سنبله ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شد. به‌طوری‌که در برگ پرچم ژنوتیپ متحمل به تنش خشکی، TRK (۱۱۶/۴۸) بیشترین و ژنوتیپ حساس به تنش Saratoves (۸۸/۱۰۷ mg g^{-1} FW) کمترین مقدار پروتئین مشاهده شد. در ژنوتیپ‌های نیمه متحمل میزان محتوی پروتئینی حدواسط ژنوتیپ‌های متحمل و حساس بود (شکل ۲a). در سنبله نیز بیشترین و کمترین محتوی در آخرین مرحله نمونه‌برداری در شرایط تنشی به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های Manning (۳۴/۷۷) و Saratoves (۲۹/۲۲ mg g^{-1} FW) بود (شکل ۲b). تنش خشکی باعث افزایش معنی‌دار محتوی پروتئین‌های محلول در ژنوتیپ‌های متحمل نسبت به ژنوتیپ‌های حساس شد. چنین به نظر می‌رسد که ژنوتیپ‌های متحمل با تنظیم افزایشی بیان برخی ژن‌ها قادر به تحمل بهتر شرایط تنش می‌باشد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (Behboodi *et al.*, 2010).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل رژیم رطوبتی و ژنوتیپ بر محتوای پروتئین در برگ پرچم (a) و مقایسه میانگین اثر متقابل رژیم رطوبتی، ژنوتیپ و مراحل نمونه‌برداری بر محتوای پروتئین در سنبله (b)

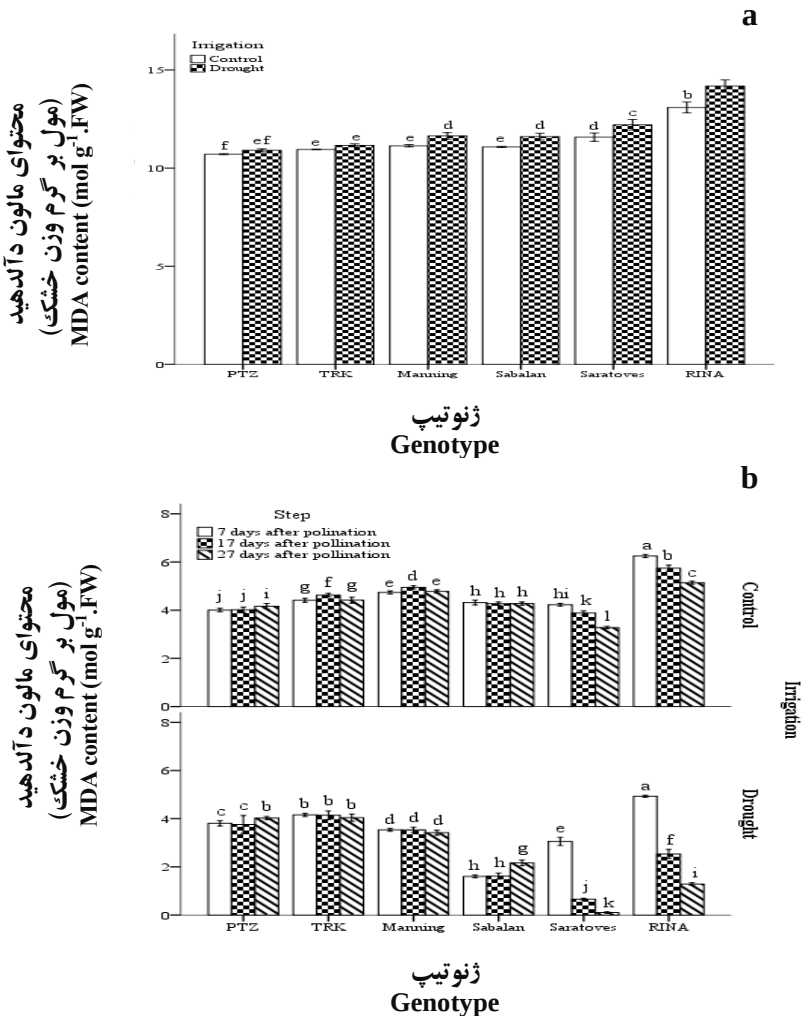
میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند

Figure 2. Mean comparison of interaction in genotypes and irrigation on protein content in flag leaf (a) and spike (b)

Means followed by the same letters are not significantly different by Duncan's method at 5% probability level

تغییرات محتوای مالون‌دی‌آلدهید در برگ پرچم و سنبله

محتوای MDA در برگ پرچم ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تحت تنش خشکی افزایش یافت. بیشترین و کمترین افزایش به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های حساس RINA (۱۴/۱۸) و متحمل TRK (۱۱/۱۶ nmol g^{-1}) بود (شکل ۳a). در سنبله، ژنوتیپ‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی از نظر محتوی MDA نشان دادند. به‌طوری‌که در دو ژنوتیپ متحمل TRK و نیمه متحمل Manning در مراحل مختلف نمونه‌برداری تفاوت معنی داری از نظر محتوای MDA مشاهده نشد. در دو ژنوتیپ PTZ و Sabalan، در دو مرحله اول تفاوت معنی‌داری در این محتوی مشاهده نگردید و در مرحله پایانی افزایش معنی‌داری در این محتوی مشاهده گردید. تغییرات محتوی MDA در ژنوتیپ‌های حساس در مراحل مختلف روند کاهشی داشت. تغییرات محتوای MDA در ژنوتیپ نیمه متحمل Manning کمتر از ژنوتیپ متحمل TRK بود (شکل ۳b).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل رژیم رطوبتی و ژنوتیپ بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید در برگ پرچم (a) و مقایسه میانگین اثر متقابل رژیم رطوبتی، ژنوتیپ و مراحل نمونه‌برداری بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید در سنبله (b)

میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند

Figure 3. Mean comparison of interaction in genotypes and irrigation on MDA content in flag leaf (a) and spike (b)

Means followed by the same letters are not significantly different by Duncan's method at 5% probability level

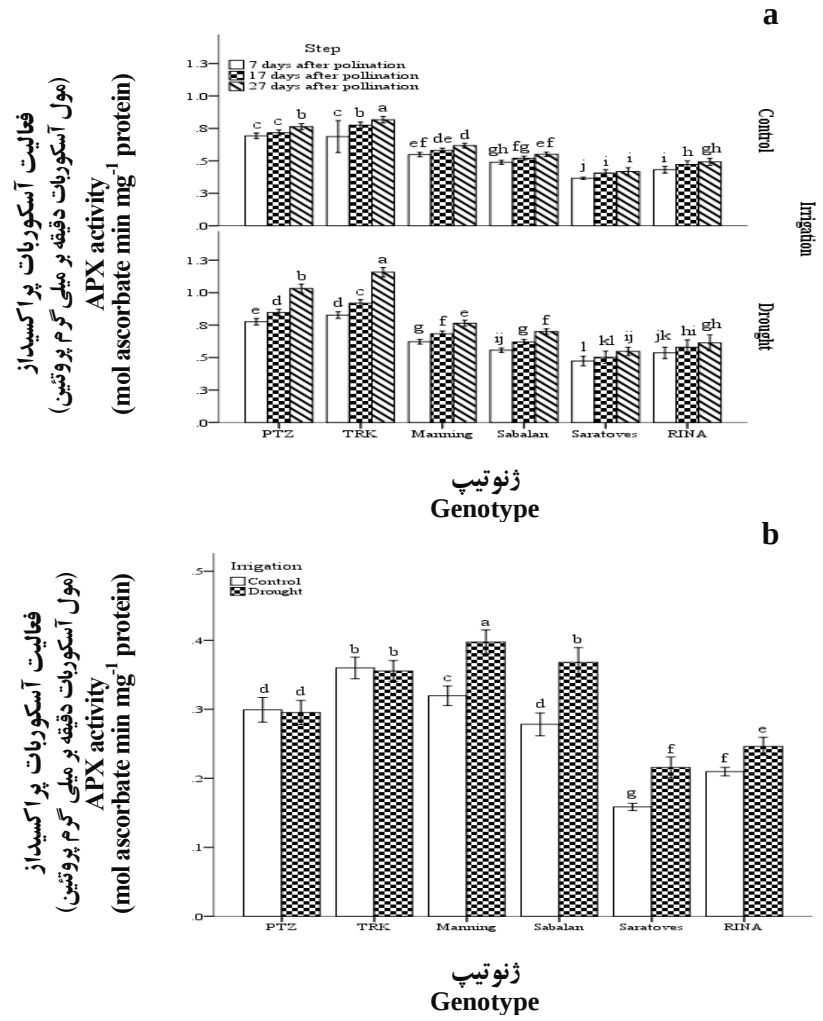
تخریب غشاهای سلول یکی از پیامدهای مستقیم کمبود آب می‌باشد. به عبارت دیگر بین میزان MDA و شدت تنش خشکی رابطه مستقیمی وجود دارد. افزایش MDA در برگ پرچم و سنبله ژنوتیپ‌های گندم در شرایط تنش خشکی نشان می‌دهد که سازوکارهای ترمیم سلولی با سازوکارهای تخریب حاصل از کمبود آب که می‌توانند بر تجزیه و بازیابی لیپیدهای غشاء تأثیر بگذارند، همگام نمی‌شوند؛ به‌ویژه در اثر تنش خشکی، پراکسیداسیون گلیکولیپیدهای تیلاکوئید کلروپلاستی و به‌دنبال آن تولید دی‌آسیل گلیسرول، تری‌آسیل گلسیرول و اسیدهای چرب آزاد اتفاق می‌افتد و در نتیجه میزان MDA در بافت گیاهی افزایش می‌یابد (Smirnoff, 1993). غلظت MDA به‌عنوان یکی از شاخص‌های اصلی تنش اکسیداتیو محسوب می‌گردد. همچنین تنش خشکی با تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن، موجب آسیب اکسیداتیو به غشاء و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها گردیده است (Izabela *et al.*, 2013).

تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ پرچم و سنبله

افزایش فعالیت آنزیم APX در برگ پرچم‌های ژنوتیپ‌های مختلف در شرایط تنش خشکی و تشدید تنش کم‌آبی در آخرین مراحل نمونه‌برداری مشهود است. به گونه‌ای که بیشترین فعالیت و کمترین میزان فعالیت این آنزیم به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ TRK (۱/۱۶) و Saratoves (۰/۵۵ mmol ascorbate $min^{-1}mg^{-1}protein$) بود (شکل ۴a). تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم APX در سنبله‌های ژنوتیپ‌های مختلف می‌شود. بیشترین و کمترین فعالیت این آنزیم در سنبله به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های Manning (۰/۳۹۸) و Saratoves (۰/۲۱۶ mmol ascorbate $min^{-1}mg^{-1}protein$) بود (شکل ۴b). آنزیم اصلی حذف H_2O_2، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز می‌باشند. آنزیم APX در چرخه‌های مهلر و گلوتاتیون آسکوربات نقش مؤثری را در جمع‌آوری پراکسیدهیدروژن ایفا می‌کند (Mittler, 2002). این آنزیم بیشتر در اندامک‌های سلولی حضور داشته و تمایل آن نسبت به آنزیم کاتالاز جهت حذف H_2O_2 بیشتر است. به همین دلیل APX به‌عنوان تنظیم‌کننده و کنترل‌کننده داخل سلولی خوب، جهت حفظ حالت تعادل ROS شناخته شده است (Mittler, 2002). افزایش فعالیت آنزیم APX در شرایط تنش خشکی در تحقیقات مختلف مثلاً در مورد کاهو گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (Han and Lee, 2005). نتایج جدول‌های (۱) و (۲) همبستگی نشان دادکه در برگ پرچم همبستگی مثبت معنی‌داری ($r>۰/۸$ و $p<۰/۰۵$) بین فعالیت آنزیم APX و محتوی ASA، GSH و پروتئین در سنبله همبستگی مثبت معنی‌داری بین فعالیت آنزیم APX و پروتئین کل وجود داشت.

تغییرات فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در برگ پرچم و سنبله

با اعمال تنش خشکی و افزایش شدت آن، در برگ پرچم و سنبله ژنوتیپ‌های مختلف، فعالیت آنزیم GR روند صعودی داشت، به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در مراحل پایانی نمونه‌برداری در برگ پرچم و سنبله ژنوتیپ نیمه متحمل Manning (µmol NADPH $min^{-1}mg^{-1}protein$ ۵۰/۴۱ و ۱۱/۳۹) و کمترین آن در برگ پرچم و سنبله ژنوتیپ حساس Saratoves (µmol NADPH $min^{-1}mg^{-1}protein$ ۱۱/۸۹و ۷/۴۳) مشاهده شد (شکل‌های ۵a و ۵b). گلوتاتیون ردوکتاز آخرین آنزیم چرخه گلوتاتیون/آسکوربات است که می‌تواند شبیه آسکوربات مستقیما به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کند (Asada, 1999). این آنزیم مسئول تبدیل گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) به گلوتاتیون احیاشده (GSH) و حفظ نسبت بالای GSH به GSSG است. گلوتاتیون در چرخه‌های گزانتوفیل، مهلر و آسکوربات-گلوتاتیون نقش مهمی را در جمع‌آوری H_2O_2 و حفظ GSH ایفا می‌کند. از این رو افزایش GR به دلیل احیای مجدد گلوتاتیون اکسیدشده بسیار حائز اهمیت است افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در شرایط تنش خشکی باعث افزایش تحمل به تنش اکسیداتیو می‌شود (Sairam *et al.*, 2003).



شکل ٤- مقایسه میانگین اثر متقابل رژیم رطوبتی، ژنوتیپ و مراحل نمونه‌برداری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ پرچم (a) و مقایسه میانگین اثر متقابل رژیم رطوبتی و ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سنبله (b)
میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند

Figure 4. Mean comparison of interaction in genotypes and irrigation and stage on APX activity content in flag leaf (a) and spike (b)
Means followed by the same letters are not significantly different by Duncan's method at 5% probability level

جدول ۱- ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در برگ پرچم ژنوتیپ‌های گندم تحت تأثیر خشکی در روزهای پس از گرده‌افشانی

Table 1. Correlation coefficient between studied characteristics in flag leaves of wheat genotypes under drought stress after anthesis

صفات Traits	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	آسکوربات Ascorbate	گلوتاتیون Glutathione	پروتئین محلول Soluble protein
آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	1			
آسکوربات Ascorbate	0.852**	1		
گلوتاتیون Glutathione	0.957**	0.881**	1	
پروتئین محلول Soluble protein	0.814**	0.797**	0.857**	1

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن ضریب همبستگی در سطح یک درصد می‌باشد.

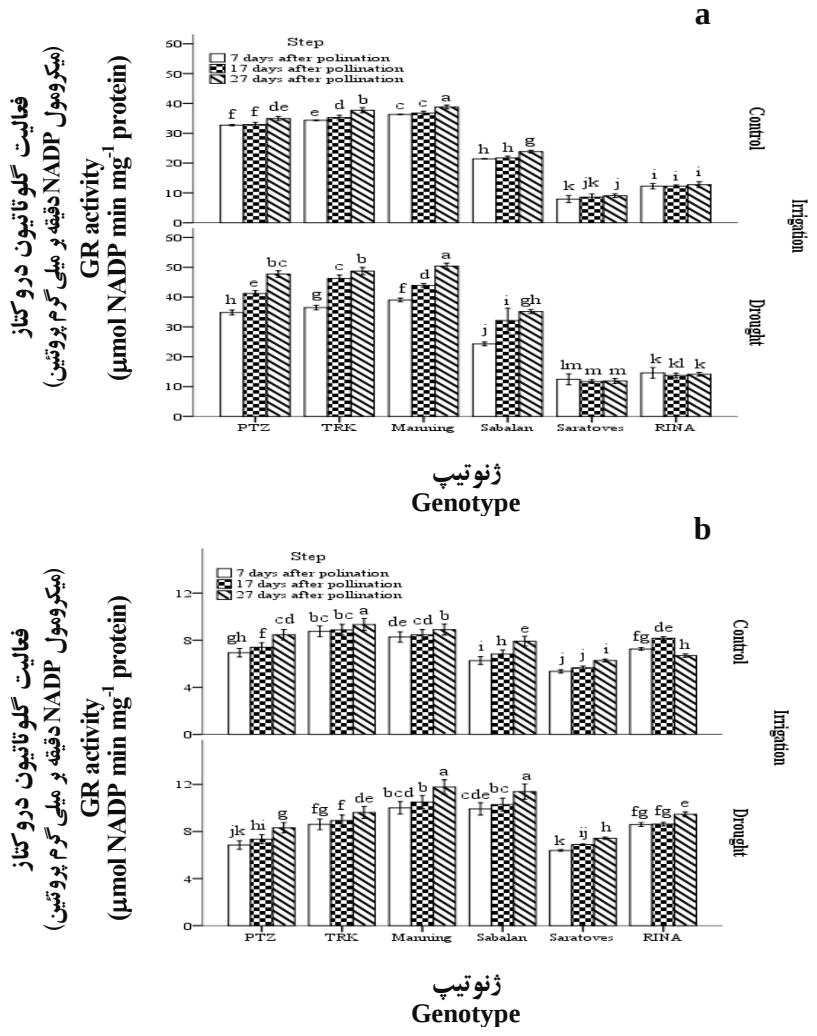
**showed correlation coefficient was significant at 1%.

جدول ۲- ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در سنبله ژنوتیپ‌های گندم تحت تاثیر خشکی در روزهای پس از گرده‌افشانی
Table 2. Correlation coefficient between studied characteristics in spikes of wheat genotypes under drought stress after anthesis

صفات Traits	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	آسکوربات Ascorbate	گلوتاتیون Glutathione	پروتئین محلول Soluble protein	عملکرد Grain yeild
آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	1				
آسکوربات Ascorbate	0.736**	1			
گلوتاتیون Glutathione	0.531**	0.892**	1		
پروتئین محلول Soluble protein	0.835**	0.638**	0.451**	1	
عملکرد Grain yeild	0.011	-0.385**	-0.677**	-0.003	1

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن ضریب همبستگی در سطح یک درصد می‌باشد.

**showed correlation coefficient was significant at 1%.

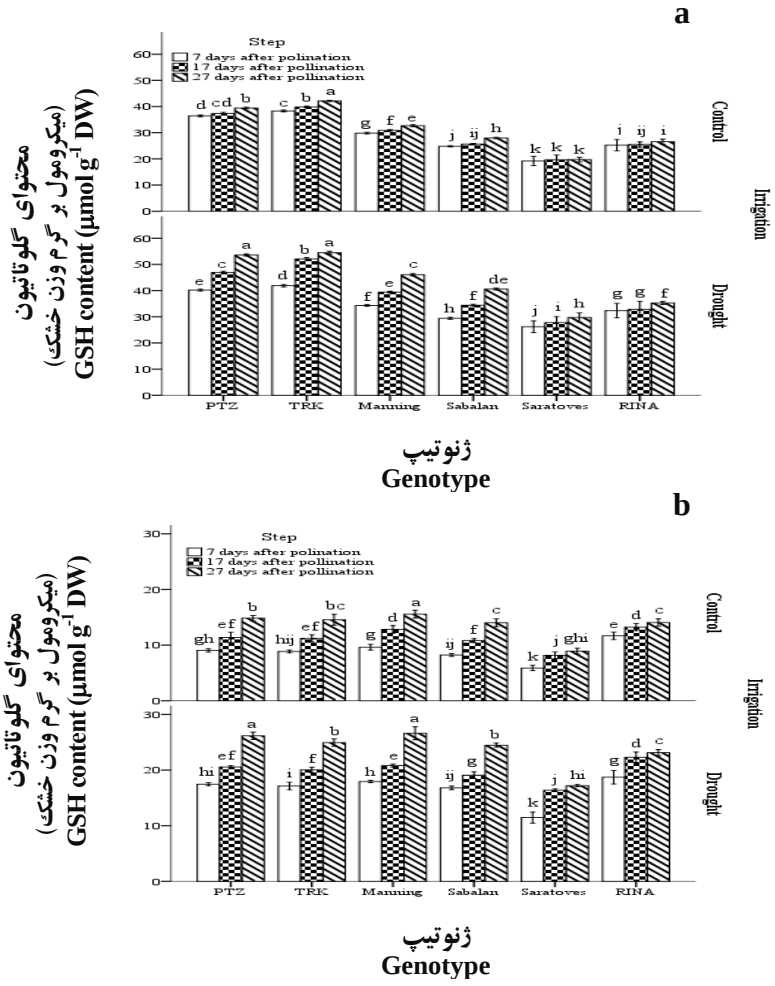


شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل رژیم رطوبتی، ژنوتیپ و مرحله نمونه‌برداری بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در برگ پرچم (a) و در سنبله (b)
میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند

Figure 5. Mean comparison of interaction in genotypes and irrigation and stage on GR activity content in flag leaf (a) and spike (b)
Means followed by the same letters are not significantly different by Duncan's method at 5% probability level

تغییرات محتوای گلوتاتیون در برگ پرچم و سنبله

محتوای GSH برگ پرچم و سنبله ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، در شرایط تنش خشکی و با افزایش شدت تنش کم‌آبی، افزایش یافت. به‌طوری‌که حداکثر محتوای GSH در برگ پرچم مربوط به ژنوتیپ‌های متحمل TRK (۵۴/۴۶) و PTZ (۵۳/۶۱) و حداقل آن مربوط به ژنوتیپ Saratoves (۲۹/۷۳ µmol g-1DW) در مرحله پایانی نمونه‌برداری بود (شکل ۶a). در سنبله نیز بیشترین و کمترین محتوای GSH در آخرین مرحله نمونه‌برداری به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ نیمه متحمل Manning (۲۶/۶۱) و ژنوتیپ حساس Saratoves (۱۷/۲۱ µmol g^{-1}DW) بود (شکل ۶b). غلظت گلوتاتیون (GSH) به تدریج در طول تنش خشکی افزایش می‌یابد و همزمان با آن فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) نیز افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده نقش بسیار مهم گلوتاتیون در پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن در چرخه آسکوربات- گلوتاتیون می‌باشد. گلوتاتیون یک ماده بیوشیمیایی ایده‌آل برای محافظت گیاهان در برابر تنش‌ها از جمله تنش اکسیداتیو می‌باشد که در کنترل سطوح پراکسید هیدروژن (H_2O_2) شرکت می‌کند (Sanker *et al.*, 2007). ASA و GSH آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی کلیدی هستند که در تنظیم ردوکس در قسمت‌های مختلف سلول شرکت می‌کنند. محتوای GSH در شرایط تنش خشکی در ارقام متحمل به خشکی گندم بیشتر از ارقام حساس افزایش نشان داد (Herbinger *et al.*, 2002). در سنبله همبستگی مثبت معنی‌داری ($r>0/8$ و $p<0/05$) بین محتوای گلوتاتیون و عملکرد وجود داشت.

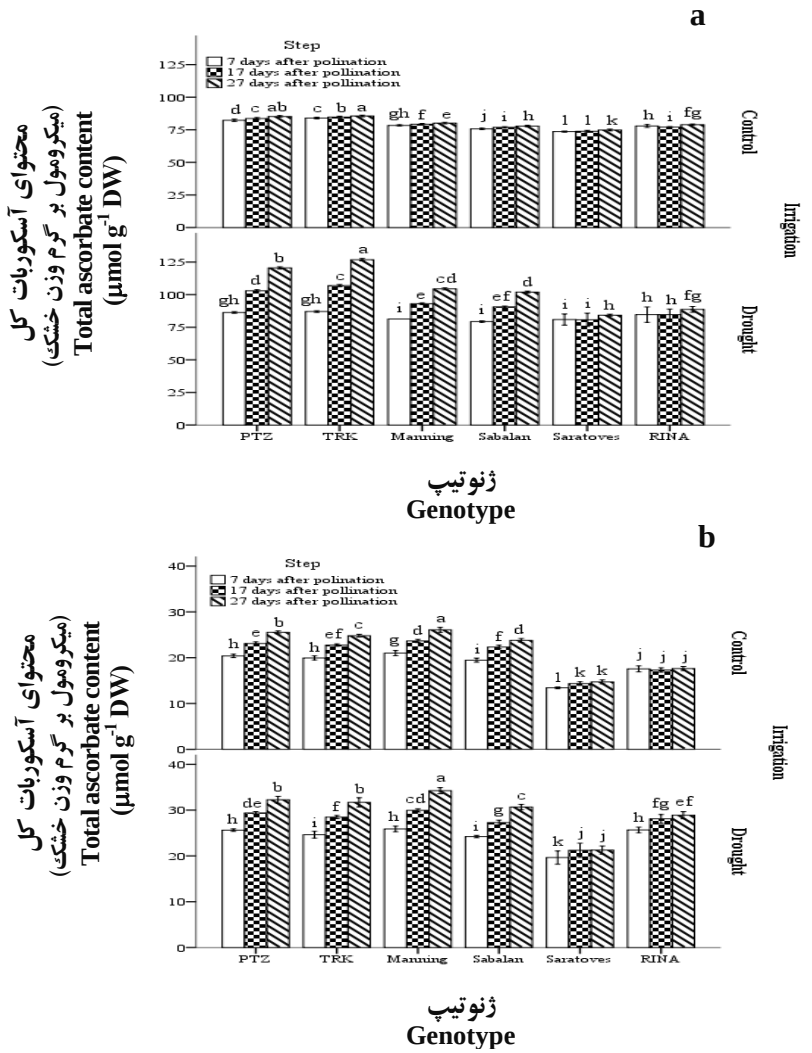


شکل ٦- مقایسه میانگین اثر متقابل رژیم رطوبتی، ژنوتیپ و مرحله نمونه‌برداری بر محتوای گلوتاتیون در برگ پرچم (a) و در سنبله (b)
میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند

Figure 6. Mean comparison of interaction in genotypes and irrigation and stage on glutathione content content in flag laef (a) and spike (b)
Means followed by the same letters are not significantly different by Duncan's method at 5% probability level

تغییرات محتوای آسکوربات در برگ پرچم و سنبله

محتوای ASA همانند GSH در برگ پرچم و سنبله با افزایش خشکی، روند صعودی داشت. بیشترین و کمترین آسکوربات در برگ پرچم به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های مقاوم TRK (۱۲۶/۸۰) و حساس Saratoves (۸۴/۲۷) بود (شکل ۷a). در سنبله حداکثر و حداقل محتوی ASA در آخرین مرحله نمونه برداری به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ نیمه‌متحمل Manning (۳۴/۲۴) و حساس Saratoves (۲۱/۲۷) بود (شکل ۷b). آسکوربیک اسید به‌عنوان یکی از اجزای اصلی چرخه آسکوربات-گلوتاتیون در پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن مؤثر است و می‌تواند در واکنش با گونه‌های فعال اکسید و یا به‌عنوان عامل احیاکننده در بازسازی آلفا توکوفرول به کار گرفته شود و موجب حفاظت از غشا در برابر تنش اکسیداتیو گردد (Abdul Jithesh *et al.*, 2006؛ Jaleel *et al.*, 2009). محققان متعددی افزایش آسکوربات و گلوتاتیون در خشکی را گزارش کرده‌اند که با نتایج حاضر مطابقت دارد (Gill and Tuteja, 2010). در برگ پرچم و سنبله همبستگی مثبت معنی‌داری ($r>0/8$ و $p<0/05$) بین محتوای ASA و GSH وجود داشت.



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل رژیم رطوبتی، ژنوتیپ و مرحله نمونه‌برداری بر محتوای آسکوربات در برگ پرچم (a) و در سنبله (b)
میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند

Figure 7. Mean comparison of interaction in genotypes and irrigation and stage on ascorbate content in flag leaf (a) and spike (b)
Means followed by the same letters are not significantly different by Duncan's method at 5% probability level

نتیجه‌گیری

تنش خشکی بعد از مرحله گرده‌افشانی باعث افت معنی‌دار عملکرد دانه شد و بیشترین و کمترین افت عملکرد به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های حساس Saratoves و نیمه متحمل Manning بود. اجزای عملکرد نیز کاهش یافتند و شدت این کاهش در وزن هزار دانه بیشتر بود. در شرایط غیرتنش بین میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ظرفیت پاکسازی آن‌ها توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی تعادل وجود دارد. اما تحت خشکی میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن بیشتر شده و در نتیجه تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد. در این مطالعه تنش خشکی بعد از مرحله گرده‌افشانی باعث افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز همراه با افزایش آنتی‌اکسیدان‌های آسکوربات و گلوتاتیون در سنبله ژنوتیپ Manning نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها شد. فعالیت آنزیم APX، محتوی گلوتاتیون و آسکوربات در برگ پرچم ژنوتیپ متحمل TRK نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر افزایش یافت ولی عملکرد دانه آن نسبت به ژنوتیپ Manning کمتر بود که احتمالاً به دلیل کارآمدتر بودن سیستم آنتی‌اکسیدانی موجود در سنبله ژنوتیپ نیمه‌متحمل Manning نسبت به TRK می‌باشد. ژنوتیپ‌های حساس از عملکرد پایین‌تری برخوردار بودند.

References

Abdoli, M. and Saeidi, M. (2013). Evaluation of water deficiency at the post anthesis and source limitation during grain filling on grain yield, yield formation, some morphological and phonological traits and gas exchange of bread wheat cultivar. Albanian Journal of Agricultural Science, 12(2), 255-265.

Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H. G., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, Z. and Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. Acta Physiologiae Plantarum, 31(3), 427-436.

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology, 50(1), 601-639.

Asada, K. (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 355(1402), 1419-143.

Behboodi, S., Ahmadi, J., Shanjat, A. and Haddad, R. (2010). Study protein profiles of wheat during germination under abiotic non-stress conditions. M.Sc. Thesis, Imam Khomeini International University, Ghazvin.

Blum, A. and Ebercon, A. (1976). Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. Crop Science, 16(3), 428-431.

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(1-2), 248-254.

Cruz De Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species. Plant Signaling and Behavior, 3(3), 156-165.

Dalvandi, G., Ghanbari-odivi, A., Farnia, B., Khaliltahmasebi, B. and Nabati, E. (2013). Effects of drought stress on the growth, yield and yield components of four wheat

populations in different growth stages. Advances in Environmental Biology, 7(4), 619-624.

Dalton, D. A., Russell, S. A., Hanus, F. J., Pascoe, G. A., and Evans, H. J. (1986). Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America, 83(11), 3811-3815.

Ehdaie, B., Alloush, G. A., Madore, M. A. and Wanies, J. G. (2006). Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat. I: post anthesis changes in internode dry matter. Crop Science, 46(2), 735-746.

Gapinska, M., Sklodowska, M. and Gabara, B. (2008). Effect of short and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. Acta Physiologiae Plantarum, 30(1), 11-18.

Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry Journal, 48(12), 909-930.

Griffith, O. W. and Meister, A. (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butylhomocysteine sulfoximine). Journal of Biological Chemistry, 254(16), 7558-7560.

Han, H. S. and Lee, K. D. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of Lettuce under soil salinity. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 1(3), 210-215.

Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A. and Grill, D. (2002). Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. Plant Physiology Biochemistry, 40(6-8), 691-696.

Izabela, M., Ilona, C. M., Edyta, S., Maria, F., Stanisław, G. and Maciej, T. G. (2013). Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought susceptible and drought-resistant wheat genotypes. Acta Physiologiae Plantarum, 35(2), 451-461.

Jithesh, M. N., Prashanth, S. R., Sivaprakash, K. R. and Parida, A. K. (2006). Antioxidative response mechanisms in halophytes: Their role in stress defense. Journal of Genetics, 85(3), 237-254.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7(9), 405-410.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiology, 22(5), 867-880.

Saeidi, M., Moradi, F., Ahmadi, A., Spehri, R., Najafian, G. and Shabani, A. (2010). The effects of terminal water stress on physiological characteristics and sink-source relations in two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Iranian Journal of Crop Science, 12(4), 392-408. [In Farsi]

Sadegh zadeh Ahari, D., Hossaini, K. and Alizadeh, K. (1996). Study of adaptability and stability of durum wheat lines in tropical and sub-tropical dry land areas. Seed and Plant, 21(4), 561-576. [In Farsi]

Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. C. (2003). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science, 163(5), 1037-1046.

Sanker. B. C., Jaleel, A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram R. and Panneerselvam, R. (2007). Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L. Colloids and Surface B: Biointerfaces, 60(2), 229-235.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. and Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany, 2013, e217037.

Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in response of plants to water deficit and desiccation. New Phytology, 125(1), 27-58.

Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multi-facetted molecule. Current Opinion Plant Biology, 3(3), 229-235.

Stewart, C. R. (1980). The mechanism of abscisic acid-induced proline accumulation in barley leaves. Plant Physiology, 66(2), 230-233.

Verma, K. K., Singh, M., Gupta, R. K. and Verma, C. L. (2014). Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes and growth responses of Jatropha curcas during soil flooding. Turkish Journal of Botany, 38(1), 130-40.

Wang, R. Y., Yu, Z. W. and Pan, Q. M. (1999). Changes of endogenous plant hormone contents during grain development in wheat. Acta Agronomica Sinica**,** 25(2), 227-231.

Winkel, A. (1989). Breeding for drought tolerance in cereals. Vortrage fur Pflanzenzuchtung, 16(1), 357-368.

Yang, X. D., Dong, C. J. and Liu, J. Y. (2006). A plant mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: its precise localization and higher enzymatic activity. Plant Molecular Biology, 62(6), 951-962.

Effects of Drought Stress on Enzymatic and Non- Enzymatic Antioxidants in Flag Leaf and Spikes of Tolerant and Sensitive Wheat Genotypes

P. Sharifi[1]* and N. Mohammadkhani[2]

1- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Agriculture and Extension Education, Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia, Iran (pa.sharifi@urmia.ac.ir)
2- Assistant Professor, Department of Medicinal Plants, Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 4 December, 2016 Accepted: 11 October, 2017

Abstract

Background and Objectives

Drought stress is one of the main limiting factors in plant production in semiarid regions; this is due to its oxidative stress.

Materials and Methods

For evaluation of drought stress after pollination on some agronomic physiological factors in flag leaf and spikes of different wheat genotypes this study was designed as Randomized Complete Block Design with three replicates in Maragheh dryland research center in 2016. The first factor contains two levels of irrigation, control and drought stress (irrigation cut after pollination until the end of growth period) and the second factor contains different wheat genotypes (PTZ and TRK: tolerant, Manning and Sabalan: semi tolerant, Saratoves and RINA-11: sensitive).

Results

Drought stress decreased grain yield. Manning semi tolerant and Saratoves sensitive genotypes showed the highest and lowest grain yield. The activities of enzymatic (ascorbate peroxidase and glutathione reductase) and non- enzymatic (glutathione and ascorbate) antioxidants increased under drought stress. The highest and lowest ascorbate peroxidase enzyme activity was observed in flag leaf of TRK and Saratoves genotypes and in spikes of Manning and Saratoves genotypes. Also flag leaf and spikes of Manning and Saratoves genotypes showed the highest and lowest glutathione reductase enzyme activity. The highest glutathione and ascorbate content in flag leaf and spikes was related to TRK and Manning genotypes; the lowest content was observed in Saratoves.

Discussion

It seems that in spikes of Manning genotype, activation of enzymatic (ascorbate peroxidase and glutathione reductase) and non-enzymatic (glutathione and ascorbate) antioxidants had a key role in increase of tolerance to drought stress.

Keywords: Ascorbate, Peroxidase, Plant, Yield