نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، ص. ۱۱۰-۱۰۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 29, No. 1, Spring 2015, P. 103-110
ISSN: 2008 - 4730

بررسی تغییرات آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و پروتئین کل در پاسخ به تنش سرما در برخی ارقام انگور

مریم کریمی علویجه[1*]- علی عبادی[2]- سید امیر موسوی[3]- سید علیرضا سلامی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۲

چکیده

سرمازدگی یکی از مهم‌ترین استرس های محیطی می‌باشد که عملکرد و کیفیت بسیاری از محصولات کشاورزی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. گیاهان مختلف برای تحمل سرما و از بین بردن صدمات ناشی از آن، از سیستم های مختلفی استفاده می‌کنند. یکی از این سیستم‌ها، سیستم آنزیمی می‌باشد. برای درک بهتر پاسخ ارقام مختلف انگور به شرایط تنش دمای پایین، تغییرات آنزیمی در طی زمان‌های مختلف بعد از تنش سرما به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های برگی گرفته شده ازگیاهان انگور تحت تنش سرما، برای تهیه عصاره آنزیمی در دمای منهای ۸۰ نگهداری شدند. کاهش دما تا مرز چهار درجه سانتیگراد برای انگیزش و القا ژنهای سنتز کننده پروتئین‌های سازگاری به سرما کافی است. نتایج این آزمایش نشان داد که با کاهش دما فعالیت آنزیمی بین شش رقم انگور ایرانی (اتابکی، خلیلی دانه‌دار، شاهرودی، رجبی سیاه، عسکری و بیدانه سفید) و هم‌چنین انگور آمریکایی ریپاریا تغییر یافت. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز مربوط به انگور خلیلی دانه دار و گونه ریپاریا و کمترین فعالیت مربوط به ارقام رجبی سیاه، بیدانه سفید و شاهرودی بود. فعالیت آنزیم گوئیکولپراکسیداز، در تمامی ارقام در محدوده زمانی ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش سرما به حداکثر رسید و پس از آن تقریبا ثابت ماند، در حالی‌که حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز در بین ارقام مورد آزمایش در محدوده زمانی هشت ساعت مشاهده شد. هم‌چنین شرایط تنش باعث افزایش محتوی پروتئین کل در نمونه‌هایمورد آزمایش شد که در این سنجش، رقم خلیلی دانه‌دار بیشترین میزان پروتئین کل را دارا بود و بیشترین تجمع پروتئین در محدوده زمانی ۱۲ ساعت مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: انگور، تنش سرما، کاتالاز، گوئیکولپراکسیداز، پروتئین کل

مقدمه

سرما، شوری و خشکی از جمله استرس‌هایی هستند که رشد و تولید محصول گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بنابراین تولید گیاهان مقاوم به منظور تامین غذای جمعیت رو به رشد جهان دارای اهمیت زیادی می‌باشد.انگور از زمره اولین میوه‌هایی است که انسان از دوره‌های ما قبل تاریخ و شروع کشاورزی در دنیا مورد کشت و کار قرار داده و از آن به عنوان محصول باغی و وحشی استفاده‌های زیادی کرده است. سرمازدگی بوته‌های مو ارقام وینیفرادر دماهای پایین‌تر از ۱۵- درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد. کاهش دما موجب وارد آمدن فشار مکانیکی به دیواره سلولی و به دنبال آن تحریک ژنهایی که بیان آن‌ها، اثرات مخرب تنش را کاهش می‌دهد، می‌شود (۱۲).

به‌علاوه وجود تنش سرما با ممانعت از انجام واکنش‌های شیمیایی به طور مستقیم و از طریق تنش‌هایاسمزی و اکسیداتیو به طور غیر مستقیم از بیان کامل پتانسیل ژنتیکی گیاه ممانعت می‌کند. تنش سرما موجب تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژی ازجمله : تغییر در میزان و فعالیت آنزیم‌ها، تجمع کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه و پروتئین‌های محلول و هم‌چنین موجب تغییر در ترکیبات چربی غشای سلولی می‌شود (۳۰). دمای پایین سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که با واکنش سریع با DNA، پروتئین و لیپیدها صدمات جدی به سلول می‌زنند (۲۵). بنابراین توانایی سلول‌ها برای از بین بردن گونه‌های اکسیژن فعال یکی از اساسی‌ترین مکانیزم‌ها برای کسب تحمل نسبت به تنش های محیطی است(۶). در این مسیر هر دو سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی در حفظ گیاه در مواجهه با اکسیژن فعال موثرند (۲۳).

برای از بین بردن ترکیبات سمی، مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی در

۱، ۲ و ۴ - دانشجوی دکتری، استاد و استادیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: Mkarimia61@gmail.com)
۳- دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

گیاه آغاز به فعالیت می‌کنند که در نهایت گونه‌های اکسیژن فعال را از بین می‌برند. تحقیقات انجام شده بسیاری بر زنجیره آنتی اکسیدانی در سلول، برای مقابله با تنش های مختلف تاکید کرده‌اند (۱۲، ۲۸، ۳۱ و ۳۲). آنزیم‌هایی مانند سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، آسکورباتپراکسیداز، گلوتاتیونردوکتاز و آنتی اکسیدان‌هایی از جمله آسکوربیک اسید، گلوتاتیون و نوکلئوتیدهاپیریدین به همراه ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی و توکوفرول‌ها برای از بین بردن خاصیت سمی گونه‌های اکسیژن فعال ضروری هستند (۲۴).

در گیاهان عالی تولید زیاد گونه های فعال اکسیژن، صفتی ذاتی است که در شرایط تنش ایجاد می‌شود. مکانیسم پاسخگویی به تنش بوسیله آنزیم‌های آنتی اکسیدان تکمیل می‌گردد. گیاهان تراریخت که تولید بیشتر آنزیم‌های آنتی اکسیدان (سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیونردوکتاز) را دارند، تحمل به شرایط تنش بهتری دارند. تجمع متابولیت‌ها و تغییر در فعالیت آنزیم‌ها از جمله کاتالاز و پراکسیداز ممکن است مربوط به پتانسیل گیاه برای مقابله با اثرات مضر تنش‌های محیطی در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی باشد (۵ و ۷).

کاتالاز اولین آنزیم آنتی اکسیدان کشف و شناسایی شده است (۱۹و ۱۳). کاتالاز یک آنزیم محتوی هم[1] است که تبدیل دو مولکول پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند (جدول ۱). کاتالاز بالاترین و سریع‌ترین پتانسیل از بین بردن پراکسید هیدروژن را در بین آنزیم‌ها دارا است.میزانپایه فعالیت آنزیم کاتالازدر گونه‌های گیاهی متفاوت می‌باشد. در طی دوره سرمادهی، فعالیت پایه نسبت به گونه گیاهی و مدت زمان طی شده از آغاز شرایط تنش سرما تغییر پیدا می‌کند. (۱۸). کوکرجا و همکاران (۱۶) افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز را در ریشه‌های *C. arietinum* تحت تنش شوری گزارش کردند در حالی‌که در مطالعه دیگر، شرما و دوبی (۲۶) در دانهال‌های برنج که تحت تنش خشکی بودند، کاهش فعالیت کاتالاز را گزارش کردند.

گوئیکولپراکسیداز تعداد زیادی از ترکیبات آلی مانند فنول‌ها، آمین‌های معطر و هیدروکینون‌ها را اکسید می‌کند، اما معمول‌ترین سوبسترای مورد استفاده این آنزیم گوئیکول یا پایروگالول است. این پروتئین دارای آهن، اسید ایندول استیک را تجزیه می‌کند، در سنتز لیگنین نقش دارد و در مقابله با استرس‌های محیطی به عنوان مصرف کننده پراکسید هیدروژن عمل می‌کند. این آنزیم در سیتوپلاسم و آپوپلاست یافت میشود. فعالیت این آنزیم به گونه گیاه و شرایط استرس بستگی دارد (۱۴).

به‌نظر می‌رسد با مطالعه و بررسی فعالیت آنزیم‌های فوق الذکر شده و هم‌چنین محتوی کل پروتئین ارقام مختلف انگور تحت شرایط تنش و مقایسه آن‌ها با شرایط کنترل بتوان ارقام مقاوم انگور را تشخیص داد. باید توجه داشت ارقام تجاری انگور دارای برخی صفات نامطلوب (حساسیت به شرایط محیطی مانند سرما و خشکی، حساسیت به آفات و بیماری‌ها) می‌باشند که می‌توان با برنامه‌های دورگ گیری و یا انتقال ژن درجهت اصلاح این صفات نامطلوب قدم برداشت و ارقامی را به بازار معرفی کرد که مجموعه‌ای از صفات مطلوب را داشته باشد. شرایط دمایی چهار درجه سانتی‌گراد برای فعال شدن ژنها وآنزیم‌های موثر در سازگاری و مقاومت انگور به سرماهای سخت زمستانه کافی است. در طی دوره سازگاری گیاهان، پروتئین‌های کافی در سلول ها سنتز شده و سلول‌ها توانایی گذراندن سرماهای بسیار پایین را کسب می‌کنند. با اعمال این شرایط تنش میتوانارقامی از انگور با فعالیت بیشتر آنزیم را انتخاب کرد که به احتمال زیاد نسبت به شرایط دمایی پایین تحمل دارند. بنابراین، هدف مطالعه حاضر بررسی میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و گوئیگولپراکسیداز به منظور تشخیص ارقام متحمل از ارقام حساس نسبت به تنش سرما انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

قلمه‌های انگور از ارقام خلیلی دانه دار، اتابکی، عسکری، شاهرودی، بیدانه سفید و رجبی و گونه ریپاریا در زمستان سال ۱۳۸۹ از مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی پردیس دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران جمع آوری و به گلخانه‌های گروه علوم باغبانی انتقال یافت. این قلمه‌ها در گلدان‌ها کشت شده و شرایط محیطی مناسب برای ریشه‌دار شدن و رشد قلمه‌ها فراهم گردید. گیاهان در شرایط گلخانه (رطوبت ۲۰±۵۰ و دمای ۵±۲۰) رشد داده شدند و به طور مرتب با محلول غذایی تغذیه شدند و با آفات و بیماری‌ها موجود مبارزه گردید. گیاهان یکساله به فیتوترون های با شرایط دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۴۰۰۰-۳۵۰۰ لوکس که بطور دائمی بود، منتقل شدند. در زمان‌های مشخص (۴ ساعت، ۸ ساعت، ۱۲ ساعت، ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت، ۱۴۴ ساعت) نمونه‌گیری از برگ‌ها انجام شد و نمونه‌ها در داخل ازت مایع به فریزر ۸۰-درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گوئیکولپراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس تبدیل گوئیکول به تترا گوئیکول در حضور پراکسید هیدروژن و تغییر رنگ مخلوط واکنش و افزایش در جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر، به روش چانس و مهلی (۱۱) انجام گرفت. به منظور تهیه عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار (پی اچ ۷) استفاده شد. بدین منظور پس از پودر کردن ۳۵۰ میلی گرم از برگ در

1-Heme

حضور ازت مایع و انتقال آن به تیوب ۲ میلی‌لیتری، ۱۵۰۰ مایکرولیتر از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار حاوی ۲ درصد PVPP و ۱/۳ میلی مولارEDTA، به آن افزوده شد و پس از ورتکس، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در g ۲۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. به منظور سنجش فعالیت آنزیمی ۶۰۰ مایکرولیتربافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار به همراه ۲۷۰ مایکرولیترگوئیکول ۲درصد ، و ۱۷۰ مایکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱درصد به مدت ۹ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس ۱۵۰ مایکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش افزوده و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، افزایش جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۳ دقیقه ثبت شد. میزان فعالیت این آنزیم بر اساس کاتالدر میلی لیتر گزارش شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت این آنزیم به روش ابی[1](۴) اندازه گیری شد. به این منظور به ۳۵۰ میلی گرم بافت برگی پودر شده ۱۵۰۰ مایکرولیتر از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار حاوی ۲ درصد PVPP و ۱/۳ میلی مولارEDTA، افزوده شد و پس از ورتکس، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و روشناور برای سنجش آنزیم بکار گرفته شد. مخلوط واکنش دارای ۳۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (پی اچ ۷) و ۱۰۰ مایکرولیتر عصاره آنزیم در حجم نهایی ۱۰۰۰ مایکرولیتر بود. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس مصرف پراکسید هیدروژن در واکنش و کاهش جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجیده و بر اساس کاتال در میلی‌لیتر گزارش شد.

اندازه‌گیری پروتئین محلول کل

در این آزمایش پروتئین های محلول به روش برادفورد(۱۰) اندازه‌گیری شدند. به این منظور ۳۵۰ میلی‌گرم از برگ در ازت مایع پودر شد و ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار(پی اچ ۷/۵) به آن افزوده شد. مخلوط حاصل بلافاصله پس از ورتکس، بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در g۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از این مرحله روشناور برداشته شده و تا زمان اندازه‌گیری پروتئین در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور سنجش غلظت پروتئین نمونه های مورد آزمایش، با استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) منحنی استاندارد رسم گردید (ضریب پیوستگی منحنی استاندارد رسم شده طی انجام آزمایش ۰/۹۹۴بود) و بعد از تهیه منحنی استاندارد، ۲۰ مایکرولیتر از نمونه‌های عصاره آنزیمی با ۲ میلی‌لیتر از معرف برادفورد ۲۰درصد مخلوط شد و بعد از ۵ دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکترفتومتر قرائت شد.

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با هفت رقم انگور و هفت زمان نمونه‌گیری بعد از اعمال تنش سرما اجرا شد. تمام آزمایشات نورسنجی به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Perkin Elmer, Lambda EZ201, U.S.A. انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزارهای Excel و SAS (version 9.1.3) استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان پروتئین کل در جدول۱ نشان داده شده است. اثر رقم و زمان و اثر متقابل رقم و زمان بر میزان پروتئین کل در سطح یک درصد معنی‌دار بود.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس میزان پروتئین کل در طی دوره تنش سرمادر ارقام مختلف انگور و گونه ریپاریا در زمان‌های مختلف بعد از تنش سرما

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم	۶	۰/۰۲۰۵**
زمان	۶	۰/۱۶۱۱**
رقم× زمان	۳۶	۰/۰۰۵۷**
خطا	۹۸	۰/۰۰۰۱۵

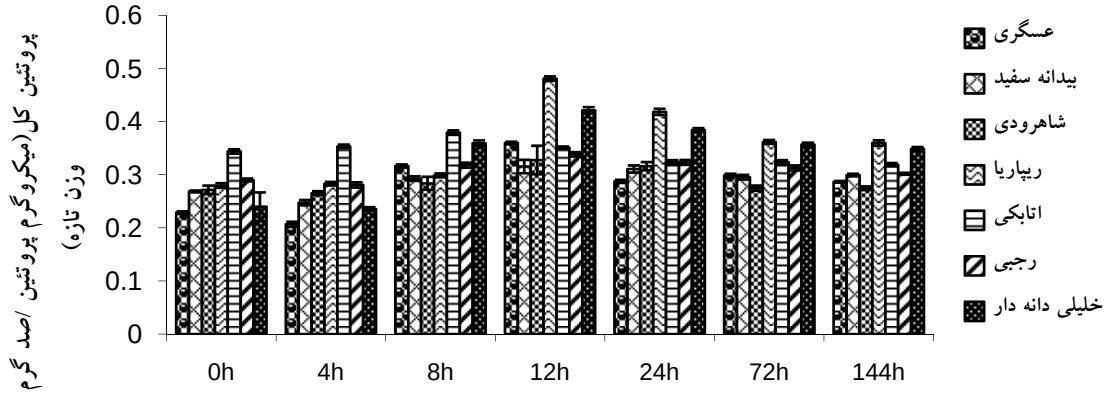
**- تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪

ریپاریا نشان داد که انگور ریپاریا به‌طور کلی(۳۳۷/. میکروگرم/ ۱۰۰گرم وزن تازه) نسبت به ارقام وینیفرا برتری داشته است، به‌طور واضح این تفاوت میزان پروتئین در زمان ۱۲ ساعت بعد از اعمال تنش مشاهده شد. رقم خلیلی دانه دار (۰/۳۱۲ میکروگرم/ ۱۰۰گرم وزن تازه) از نظر میانگین کلی تجمع پروتئین بعد از گونه ریپاریا و حداکثر میزان تجمع پروتئین را در بازه زمانی ۱۲ ساعت، مشابه با انگور ریپاریا، نشان داد (شکل ۲).

در مورد انگور اتابکی حداکثر میزان پروتئین کل (۳۷۹/ ۰ میکروگرم/ ۱۰۰گرم وزن تازه) در بازه زمانی هشت ساعت مشاهده شد و میانگین کلی برای این رقم (۰/۲۵۹) بعد از گونه ریپاریا و رقم خلیلی دانه دار قرار داشت. در دیگر ارقام انگور تفاوت چشمگیری در تغییرات میزان پروتئین کل دیده نشد ولی تقریباً در همه آن‌ها روند رو به افزایش مشاهد شد و پس از ۱۲ ساعت افزایشی دیده نشد. کمترین میزان اندازه گیری شده پروتئین کل در ارقام شاهرودی و بیدانه سفید بود (شکل۱).

پژوهش افشار محمدیان و همکاران (۱) که بر روی دو رقم زیتون انجام شده بود نشان داد که در رقم زیتون مقاوم به سرما میزان پروتئین کل نسبت به رقم حساس بیشتر بود.

1-Abei



شکل ۱- میزان پروتئین کل در ارقام مختلف انگور و گونه ریپاریا در زمانهای مختلف بعد از تنش سرما

طی تنش سرما آنزیم های دفاعی دخیل در استرس اکسیداتیو افزایش فعالیت دارند. بعد از تنش سرما ذخیره پروتئین گیاه برای برگشت به حالت طبیعی افزایش می یابد (۲۰). روند افزایشی میزان پروتئین کل در ساعات اولیه بعد از تنش را میتوان اینگونه تفسیر نمود که با شروع تنش، گیاه برای محافظت از ساختارهای سلولی و حفظ فعالیت های عادی آن شروع به افزایش بیان ژن‌های دخیل در سنتز آنزیم های دفاعی میکند. لذا با سنتز میزان کافی از آنزیم های دفاعی توسط سلول لزومی برای افزایش بیشتر میزان آنزیم‌هایی که زیر مجموعه ای از پروتئین کل می‌باشند، نیست و پس از طی مدت زمان کافی از آغاز تنش، شرایط تحت کنترل سازمان گیاهی در خواهد آمد. از سوی دیگر هر گونه آسیب وارد شده به ساختار دی ان ا سلول از طریق گونه های اکسیژن فعال منجر به عدم سنتز پروتئین‌های مناسب برای عملکرد گیاه میشود (۲۲). بنابراین احتمالاً بتوان روند کاهشی میزان پروتئین کل (بعد از ۱۲ ساعت) را با آسیب وارده به برخی ساختارهای سلولی مربوط دانست.

تولید گونه های اکسیژن فعال در گیاهان یک عکس العمل عمومی در پاسخ به تنش های محیطی از جمله سرما، خشکی، شوری و تنش اوزون می‌باشد (۹ و ۲۱). سیستم دفاعی در مقابل تنش‌های اکسیداتیو در گیاهان شامل چندین آنزیم است. در این مطالعه، تغییرات آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز که در از بین بردن گونه‌های اکسیژن فعال داری اهمیت می‌باشند، در طی دوره زمانی شش روزه در شش رقم انگور وینیفرا و گونه ریپاریا مورد مطالعه قرار گرفتند (شکل ۲).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم گوئیکولپراکسیدازدر جدول ۲ نشان داده شده است. اثر رقم و زمان و اثر متقابل رقم و زمان بر میزان فعالیت آنزیم گوئیکولپراکسیدازدر سطح یک درصد معنی دار بود.

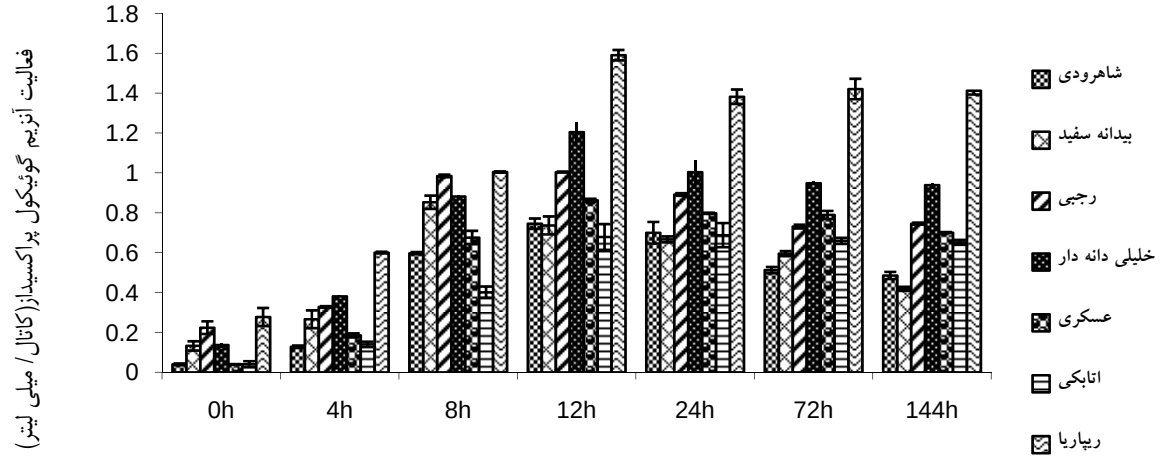
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم گوئیکولپراکسیداز در طی دوره تنش سرمادر ارقام مختلف انگور و گونه ریپاریا در زمان‌های مختلف بعد از تنش سرما

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم	۶	۱/۲۴۷۳**
زمان	۶	۲/۰۲۰۶**
رقم× زمان	۳۶	۰/۰۵۳۲**
خطا	۹۸	۰/۰۱۶۲۳

**- تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪

نتایج اندازه‌گیری آنزیم گوئیکولپراکسیداز در طی پنج زمان بعد از قرارگیری گیاهان در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و مقایسه آن‌ها با شاهد (شکل۲) نشان داد که با گذشت زمان فعالیت این آنزیم برای کنترل اثرات مخرب گونه‌های اکسیژن فعال افزایش می‌یابد.

میزان فعالیتاین آنزیم در زمان شاهد نسبت به دیگر زمان‌ها کم و با زمان‌های دیگر تفاوت معنی‌دار داشت. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم بین ارقام انگور وینیفرا و گونه ریپاریا نشان می‌دهد که گونه ریپاریا به طور مشخصی فعالیت پراکسیداز بیشتری نسبت به ارقام وینیفرا دارد. در زمان ۱۲ ساعت بعد از تنش سرما بیشترین فعالیت این آنزیم در رقم ریپاریا مشاهده شد و بعد از آن رقم خلیلی دانه دار در بین ارقام وینیفرا قرار داشت. کمترین فعالیت در همین زمان مربوط به ارقام بیدانه سفید، شاهرودی و رجبی بود. پس از زمان ۱۲ ساعت میزان فعالیت آنزیم ثابت بود و افزایش معنی داری پس از این زمان در هیچ کدام از ارقام مشاهده نشد.



شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام مختلف انگور وینیفرا و گونه ریپاریادر زمانهای مختلف بعد از تنش سرما

شنگچاون و همکاران (۲۷) با بررسی تاثیر دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بر روی دو رقم توتون حساس و مقاوم به سرما مشاهده کردند که تنش سرما باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ‌های این گیاهان تنش دیده نسبت به گیاه شاهد گردید. آپوستلوا و یانوا (۸) در مطالعه دفاع آنتی اکسیداتیودرطی مراحل اول سازگاری گندم زمستانه نتیجه گرفتند، در روز دوم بعد از تنش سرمای دو درجه سانتیگراد، افزایش معنی داری در سنتز آنزیم های پراکسیداز و کاتالاز نسبت به روز اول مشاهده شد. یانگ و همکاران(۳۵) تاثیر تنش سرما را بر توت فرنگی بررسی و گزارش کردند که ابتدا فعالیت آنزیم پراکسیداز به شدت افزایش پیدا کرد، اما با کاهش بیشتر دما، فعالیت به آرامی صورت گرفت. نتایجی مشابه بوسیله تاسگین و همکاران (۲۹) گزارش شده است.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به داده‌های فعالیت آنزیم کاتالاز در جدول ۳ نشان داده شده است. اثر رقم و زمان و اثر متقابل رقم و زمان بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح یک درصد معنی‌دار بود.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم کاتالاز در طی دوره تنش سرمادر ارقام مختلف انگور و گونه ریپاریا در زمان‌های مختلف بعد از تنش سرما

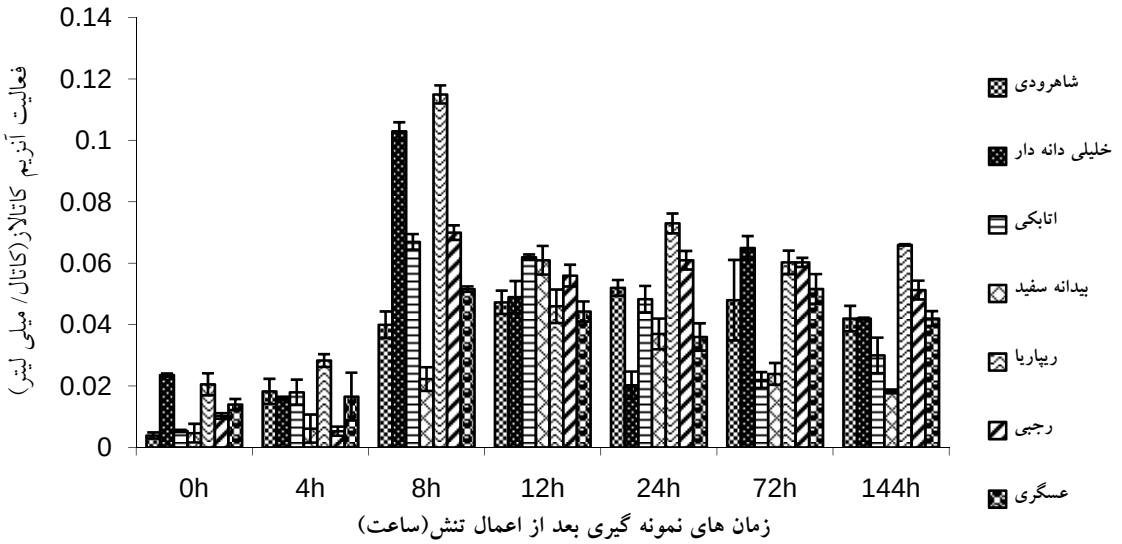
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم	۶	۰/۰۰۲۱**
زمان	۶	۰/۰۱۱**
رقم× زمان	۳۶	۰/۰۰۷۱**
خطا	۹۸	۰/۰۰۰۰۴۰

**- تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪

مقایسه میانگین طی زمان‌های مختلف بعد ازتنش نشان داد که بین انگورهای تحت تنش، گونه ریپاریا و رقم خلیلی دانه‌دار با تفاوت معنی‌داری نسبت به دیگر ارقام قرار دارند (شکل ۳). آن‌ها در ساعات اولیه بعد از تنش افزایش فعالیت چشمگیری نشان ندادند. شاید علت این عدم افزایش فعالیت بعد از تنش تا هشت ساعت به خاطر کافی بودن میزان کاتالاز موجود و عدم تجمع گونه‌های اکسیژن فعال در حد خطرناک برای سلول‌های آن‌ها باشد ولی با گذشت زمان نیاز برای فعالیت هر چه بیشتر این آنزیم ضروری به نظر می‌رسد.

بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز برای این دو رقم در بازه زمانی هشت ساعت بعد از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد دیده شد و پس از آن دوباره کاهش فعالیت مشاهد شد. حدود یک روز بعد از تنش، فعالیت آنزیم کاتالاز در ریپاریا و خلیلی دانه دار به ثبات نسبی رسید. در مورد ارقام دیگری مانند شاهرودی، بیدانه سفید و عسگری سطح حداکثر فعالیت این آنزیم پایین تر از دیگر ارقام بود. رقم های رجبی و اتابکی مانند خلیلی دانه دار و ریپاریا حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز را هشت ساعت بعد از تنش نشان دادند و پس از آن کاهش فعالیت چشمگیری نداشتند. این ارقام در مقایسه با ریپاریا و خلیلی دانه‌دار به طور کل میزان فعالیت پایین تری را نشان دادند (شکل ۳).

کاتالاز با همکاری پراکسیداز و دیگر آنزیم ها، پراکسیدهیدروژن تولیدی در مواجهه سلول با تنش را از بین می‌برد (۱۴). با وجود جایگاه مشخص این آنزیم که در پراکسیزوم و گلی اکسی زوم ها میباشد، کاتالاز نقش کلیدی در مواجه با تنش‌های اکسیداتیو دارد.



شکل ۳- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام مختلف انگور وینیفرا و گونه ریپاریا در زمانهای مختلف بعد از تنش سرما

مقایسه فعالیت کاتالاز در دو رقم گندم (اریدانو[1] و براسیلا[2]) در شرایط سازگاری به سرما نشان داد که میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم براسیلا که رقم مقاوم به سرما میباشد بالاتر از رقم اریدانو است، که نشان دهنده سیستم محافظتی قوی‌تری در این رقم برای به دام انداختن پراکسید هیدروژن است (۱۵).

میتوان احتمال داد که فعالیت بیشتر و کارآتر آنزیم کاتالاز در رقم خلیلی دانه دار و گونه ریپاریا باعث از بین رفتن و جلوگیری از آسیب‌های H_2O_2 میشود. کاهش فعالیت این آنزیم بعد از حداکثر فعالیت آن در زمان هشت ساعت احتمالاً به خاطر رفع نیاز سلول و کنترل اثرات مخرب تنش میباشد. پس از آن فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام مورد بررسی دچار نوسان چشمگیری نشد و نسبتا ثابت باقی ماند. رقم بیدانه سفید حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز را کمی دیرتر (۱۲ ساعت بعد از تنش) نشان داد ولی این رقم نیز روندی مشابه دیگر ارقام پس از رسیدن به حداکثر فعالیت خود داشت.

کاتالاز نقش مهمی در تحمل سرما (۲۴)و حذف پراکسید هیدروژن (۳۴) در گیاهان دارد . نظری و همکاران (۲) با بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز و اسکورباتپراکسیداز در دو رقم نخود بیان کردند که بعد از تنش سرما میزان فعالیت آنزیم کاتالازدرژنوتیپ مقاوم جم بیشتر از ژنوتیپ حساس۴۳۲۲ بود.

در مطالعه دیگر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز یک روز بعد ازتنش سرمای دو درجه سانتیگراد در خیار، ذرت، ارزن و سیب زمینی اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز طی یک روز در تمامی گیاهان ذکر شده، افزایش یافت تا اثرات مخرب فعالیت گونه‌های اکسیژن فعال را از بین ببرد (۱۸).

پاسخ دانهال های نوعی از غلات (Buckwheat) به سرمای چهار درجه سانتیگراد نشان داد که تحت تاثیر این تنش میزان آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز تغییییر معنی‌داری نداشت در حالی‌که گوئیکول پراکسیداز و آسکورباتپراکسیداز به ترتیب ۳۳درصدو ۲۲درصد نسبت به شاهد افزایش فعالیت داشتند. بنابراین احتمالا میزان سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز برای کنترل شرایط تنش کافی بوده است و احتیاجی به فعالیت فراوان نداشته اند (۱۷).

در تحقیق ونایی و همکاران (۳) نخود رقم ILC428 به عنوان رقم مقاوم با کاهش دما تا منفی پنج درجه سانتی‌گراد نسبت به رقم حساس پیروز افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز را نشان داد که به دنبال آن تجزیه گونه فعال اکسیژن رخ می‌دهد. وانگو همکاران (۳۳) اثر تنش سرما را بر یونجه بررسی کردند و گزارش کردند که در رقم مقاوم فعالیت آنزیمی بیشتری هم در ساقه و هم در ریشه وجود دارد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان رقم خلیلی دانه دار را در بین ارقام وینیفرای مورد آزمون به عنوان مقاوم‌ترین معرفی نمود که در سطحی مشابه با گونه ریپاریا که به عنوان گونه مقاوم در جهان معرفی شده فعالیت آنزیمی و تجمع پروتئین کل را نشان داد. در تمامی ارقام روند فعالیت آنزیم گوئیکولپراکسیداز و کاتالاز مشابه بوده

1-Eridano
2-Brasilia

و پس از رسیدن به میزان حداکثر و کسب توانایی کنترل شرایط تنش، کمی کاهش پیدا کرده و پس از آن ثابت باقی ماند. لزوم فعالیت مداوم آنزیم‌ها را شاید بتوان به علت این امر دانست که فعالیت باید تا حدی ادامه داشته باشد که سلول‌ها به میزان کافی مواد لازم برای مواجهه با شرایط دمایی پایین را سنتز کنند. احتمالا دوره زمانی شش روزه برای کسب این توانایی کافی نبوده و در دوره زمانی طولانی‌تری این امر میسر می‌گردد و پس از آن به احتمال زیاد لزومی برای ادامه فعالیت بالای این آنزیم ها نبوده و فعالیتشان کاهش می‌یابد.

منابع

۱- افشار محمدیان م.، رضایی ش. و رمضانی ملک رودی م. ۱۳۹۱. بررسی مقاومت دو رقم زیتون به تنش سرما. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی.۱ (۲) :۱-۱۱

۲- نظری م.، معالی ا.ر. و رمضانپور س.س. ۱۳۹۰. بررسی پاسخ آنزیمی و بیان ژن‌های کاتالاز و پراکسیداز به تنش سرما در ژنوتیپ‌های ایرانی نخود. ژنتیک در هزاره سوم. سال نهم. ۱: ۲۲۹۹-۲۲۹۰.

۳- ونایی س.، سی و سه مرده ع.، و حیدری غ.۱۳۹۰. اثرات تنش سرما در مرحله جوانه زنی و گیاهچه ای بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و برخی صفات فیزیولوژیکی در نخود. نشریه پژوهشهای زراعی ایران.۹(۳): ۵۲۴-۵۱۴.

4- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. Academic press, Orlando, 105: 121-126.

5- Allen R.D., Webb R.P and Schake S.A. 1997. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. Free Radical Biology and Medicine 23:473-479.

6- Anderson M.D., Prasad T.K., and Stewart C.R.1995. Changes in izozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings, Plant Physiology, 109: 1247-1257.

7- Aono M., Saji H., Sakamoto A., Tanaka K., Kondo N., and Tanaka K. 1995. Paraquat tolerance of transgenic Nicotianatabacum with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. Plant and Cell Physiology 36:1687-1691.

8- Apostolova P., and Yaneva I. 2006. Antioxidativedefence in winter wheat plants during early cold acclimation. General and Applied Plant Physiology, Special issue: 101-108.

9- Baker C.J., and Orlandi E.W., 1995. Active oxygen in plant pathogenesis, Annual Review Phytopathology, 33: 299–321.

10- 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.

11- Chance B., and Maehly A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 764–775.

12- Dalton T.H., Shertzer, A., and Puga, A.1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 39: 67-101.

13- Desikan R., Cheung M., Bright J., Henson D., Hancok J., and Neill S. 2004. ABA hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. Journal of Experimental Botany55(395): 205-212.

14- Foyer C. H., Lelandais M., and Kunert K. J. 1994. Oxidative stress in plants, Physiology Plant., 92: 696–717.

15- Francesca S., Luca S., and Claudio V. 1998. Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat(*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. Physiologiaplantarum 104: 747-752.

16- Kukreja S., Nandwal A. S., Kumar N., Sharma S.K., Unvi V., and Sharma P. K. 2005. Plant water status, H2O2 scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicerarietinum* roots as affected by salinity, Biologia Plantarum 49: 305-308.

17- Lučić B., Jovanović Ž., Radović S., and Maksimović V. 2009. Cold-induced response of buckwheat (*Fagopyrum esculemtum* moench) seedlings. Archives of Biological Sciences 61(3) 3-4.

18- Lukatkin A. S. 2002. Contribution of Oxidative Stress to the Development of Cold-Induced Damage to Leaves of Chilling-Sensitive Plants: 2. The Activity of Antioxidant Enzymes during Plant Chilling. Russian Journal of Plant Physiology. 49(6): 878-885.

19- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Breusegem F.V., and Noctor G. 2010. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. Journal of Experimental Botany, 61:4107-4320.

20- Millard P. 1988. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. Plant Cell and Environment 11:18.

21- Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, Trends in Plant Science, 7: 405-410.

22- Mundree S.G., Baker B., Mowla S., Peters S., Marais S., Willigen C.V., Govender K., Maredza A., Muyanga S., Farrant J.M., and Thomson J.A. 2002 Physiological and molecular insights into drought tolerance. African Journal of Biotechnoly 1: 2838.

23- Pastori G.M., and Foyer C.H. 2002. Common components, networks, and pathways of crosstolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls, Plant Physiology, 129: 460-468.
24- Prasad T.G. 1996. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedling: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. Plant Journal, 10: 1017–1026.
25- Sattler U., Calson P., Boiteux s., and Salles B. 2000. Detection of oxidative base DNA damage by a new biochemical assay. Archives of Biochemistry and Biophysics, 376: 26-33
26- Sharma P., and Dubey R.S. 2005. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminum toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant, Journal of Plant Physiology, 162: 854-864.
27- Sheng C.X., Yong P.L., Jin H., Ya J.G., Wen G.M., Yun Y.Z., and Shui J.Z. 2010. Responses of Antioxidant enzymes to chilling stress in tobacco seedlings, Agricultural Sciences in China, 11: 1594-1601.
28- Shin R., and Schachtman D. 2004. Hydrogen peroxide mediates plant root response to nutrient deprivation. Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America. 101: 8827-8832.
29- Tasgin E., Atici O., Nalbantoglu B., and Petrova L. 2006. Effects of salicylic acid and cold treatment on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. Journal of Phytochemistry, 67: 710-715.
30- Tomashow M.F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance gene and regulatory mechanisms. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology50: 571-599
31- Tuteja N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants, Methods of Enzymology, 428: 419-438.
32- Tuteja N. 2009. Cold, Salinity, and Drought Stress, Plant Stress Biology, Hirt, H. WILEYVCH Verlag GmbH &Co. KGaA, Weinheim, 137-159.
33- Wang W.B., Kim Y.H., Lee H., Yong Kim S., Deng X., and Kwak S. 2009. Analysis of antioxidant ezyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 47: 570-577.
34- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inze ´ D., and Van Camp W. 1997. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defense in C3plants. EMBO Journal 16: 4806–4816.
35- Yong Z., Hao-Ru T., and Ya L. 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawbreey cultivars with short-term low temperature stress. Journal of Agricultural Sciences, 4: 456-462.