یافته های نوین کشاورزی
سال دهم- شماره۳- بهار ۱۳۹۵

تاثیر طول دوره غرقابی و دما بر فعالیت آنزیم‌های گلیکولیتیک- تخمیری در گیاهچه های گندم

مریم طهماسبی، دانشجوی دکترای گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زابل
سرالله گالشی، استاد گروه زراعت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
افشین سلطانی، استاد گروه زراعت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
حمیدرضا صادقی پور، استادیار گروه زیست دانشگاه گلستان
احمد ابراهیمی*، دانشجوی دکترای گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زابل

چکیده

تنش غرقابی اثرات مخرب زیادی بر کیفیت و کمیت تولیدات زراعی دارد. این تحقیق به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و فروکتوز ۱و٦ بیس‌فسفات آلدولاز در برگ گندم (N۸۰۱۹) در مرحله رویشی (٤ تا ٥ برگی) تحت تأثیر طول دوره غرقاب در دماهای متفاوت در قالب تجزیه مرکب با طرح پایه کاملاً تصادفی در ٤ سطح غرقاب (۰، ٢٤، ٤٨ و ٩٦ ساعت) و ۳ سطح دما (٥، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد) با ٤ تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که اثر دما، طول دوره غرقابی و اثر متقابل دما در طول دوره غرقابی بر فعالیت آنزیم‌ها الکل دهیدروژناز و فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. با افزایش طول دوره غرقاب فعالیت آنزیم‌ها الکل دهیدروژناز و فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز در دماهای ٥ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش طول دوره غرقاب تا ٤٨ ساعت فعالیت هر دو آنزیم افزایش ولی با افزایش طول دوره غرقاب تا ٩٦ ساعت فعالیت هر دو آنزیم کاهش معنی‌داری یافت.

واژه‌های کلیدی: تنش، الکل دهیدروژناز، فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز، رشد رویشی

---

* نویسنده مسئول: E-mail :Ae.iranshahr@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ٩٤/٩/١٥ تاریخ پذیرش مقاله: ٩٥/٢/٢٨

مقدمه

هرگونه تغییر در شرایط محیطی که عکس‌العمل گیاه را از حد مطلوب خارج سازد تنش گویند (٤). کاهش اکسیژن به زیر سطح مطلوب (هیپوکسی[1]) رایج‌ترین شکل تنش در خاک‌های مرطوب است. هیپوکسی زمانی اتفاق می‌افتد که ریشه‌ها در طول دوره‌های کوتاه غرقاب یا آب ایستادگی در آب غوطه‌ورند اما تاج گیاه در شرایط کمبود اکسیژن قرار ندارد. فقدان کامل اکسیژن (آنوکسی[2]) زمانی اتفاق خواهد افتاد که خاک آب ایستادگی را به مدت طولانی‌تر تجربه کرده باشد. کاهش تنفس ریشه‌ای بدون توجه به متحمل یا غیر متحمل بودن گیاه، اولین پاسخ گیاهان تحت تنش آنوکسی می‌باشد (۱۲). گیاهان از طریق تغییر الگوی سنتز پروتئین نیز به تنش غرقابی پاسخ می‌دهند. زیرا در اثر تنش کمبود اکسیژن، تولید ATP[3] کاهش می‌یابد و برای جبران این کاهش باید NAD[4] از مسیر دیگری که نیاز به اکسیژن ندارد تأمین شود. در نتیجه گیاهان از مسیر تنفس بی‌هوازی استفاده می‌کنند. در طول تنش غرقاب گلیکولیز از طریق تخمیر اتانولی و یا در میزان کمتر از طریق مسیر تخمیر لاکتات ادامه می‌یابد. انرژی تولیدی از مسیر تخمیری پایین است. بنابراین، گیاه مسیر گلیکولیز را افزایش می‌دهد (۲). پروتئین‌هایی که به طور اختصاصی در پاسخ به شرایط بی‌هوازی ساخته می‌شوند پلی‌پپتیدهای بی‌هوازی یا A^{NP}[5] نامیده می‌شوند که شامل ساکارز سنتاز، فسفوهگزوز ایزومراز، فروکتوز-۱و٦- بیس فسفات آلدولاز (FBP[6] آلدولاز)، پیروات دکربوکسیلاز، لاکتات دهیدروژناز و الکل دهیدروژناز (ADH[7]) می‌باشند (۱۱).

بنابراین آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و فرکتوز ۱و٦ بیس‌فسفات آلدولاز جزء آنزیم‌های گلیکولیتیک هستند. از بین پلی‌پپتیدهای بی‌هوازی الکل دهیدروژناز غالب بوده و بیشتر مطالعه شده است. از آنجائی‌که با فقدان پذیرنده نهایی الکترون در تنفس هوازی، زنجیره انتقال الکترون و چرخه تری کربوکسیلیک اسید متوقف شده و تخمیر بی‌هوازی در قسمت سلول ها و بافت های ریشه از طریق گلیکولیز اتفاق می‌افتد، بنابراین فعالیت الکل دهیدروژناز در اکثر گیاهان افزایش یافته (۸) و منجر به تجمع اتانول می‌گردد.

1. Hypoxia
2. Anoxia
3. Adenosine Three Phosphate
4. Nicotinamide adenine dinucleotide
5. Anaerobic polypeptides
6. fructose 1,6 bisphosphate aldolase
7. Alcohol dehydrogenase

ایران‌نژاد و شهبازیان (۱۳۸٤) گزارش کردند ۵ روز ماندابی در گندم منجر به افزایش فعالیت‌های الکل دهیدروژناز و پیروات دکربوکسیلاز می‌گردد. پس از ٦/۵ روز ماندابی، سطح الکل دهیدروژناز در ریشه‌های رقم مقاوم جوای‌اچ‌آز۵۷ نسبت به رقم حساس ساکنن بیشتر بود (۱). فعالیت الکل دهیدروژناز، در گیاهان حساس (ذرت و نخود) در ریشه بیش از برگ و در گیاهان مقاوم (برنج و سوروف) در برگ بیش از ریشه مشاهده شده است (۳). در مطالعه‌ای که جاریلو و همکاران (۱۹۹۳) بر روی آرابیدوبسیس تالیانا انجام دادند دریافتند که در دمای پایین فعالیت الکل دهیدروژناز افزایش یافت، که دلیل این افزایش را، به افزایش غلظت هورمون اسید آبسزیک اسید در اثر تنش آب در دمای پایین مربوط دانستند. بنز و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز را بر سه قسمت از بافت ریشه گیاه پیرویکیوتا کارولینیانا در شرایط کمبود اکسیژن خاک بررسی کردند، نتایج آن‌ها نشان داد که تا ۱۲ ساعت غرقابی فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز در هر سه بافت روندی رو به افزایش داشت ولی با افزایش طول دوره غرقابی تا ۱٦ ساعت فعالیت آنزیم به علت حساس بودن گیاه به تجمع اتانول و مواد سمی و در تنیجه توقف میسر تخمیر کاهش پیدا کرد.

سینگلا و همکاران (۲۰۰٤) گزارش نمودند که فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز (FBP آلدولاز) در ریشه‌های گیاهچه‌های سورگوم غرقاب شده در حدود ۱۰ تا ۲۵٪ افزایش می‌یابد. فعالیت آنزیم پس از ۷۲ ساعت در ریشه‌های این گیاهان در مقایسه با شاهد دو برابر می‌شود. همچنین غرقابی موجب افزایش قابل توجه فعالیت این آنزیم در برگ‌های این گیاهان می‌گردد. افزایش فعالیت FBP آلدولاز در ریشه‌های گیاهچه‌های ذرت تحت شرایط بی‌هوازی نیز گزارش شده است (٦). اکسو و هیوآنگ (۲۰۰۸) در مطالعه‌ای بر روی دو رقم اگروستیس گراس تحت تنش دمایی بالا فعالیت FBP آلدولاز را اندازه‌گیری کردند، آن‌ها دریافتند در هر دو رقم با افزایش دما تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت FBP آلدولاز افزایش یافت ولی با افزایش دما تا ٤۰ درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم در رقم حساس به دمای بالا کاهش یافت ولی در رقم مقاوم همچنان روندی افزایشی داشت، و دلیل آن را به مقاومت بیشتر رقم مقاوم در دمای بالا جهت کاهش مصرف انرژی تنفسی ربط دادند.

شدت اثرات غرقابی بر روی رشد و تولید فرآورده‌های فتوسنتزی به گونه‌ی گیاه، حتی ارقام زراعی در یک گونه، مرحله تکوین گیاه، ویژگی‌های خاک (مانند pH و میزان مواد آلی) و به ویژه دمای خاک بستگی دارد. زمانی که دما بالا می‌رود مصرف اکسیژن توسط ریشه گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌های موجود در خاک می‌تواند اکسیژن را در مدت کمتر از ۲٤ ساعت به طور کامل از آب خاک تخلیه کند (٦). چون با کاهش دما نیاز به اکسیژن برای تنفس کاهش می‌یابد، بنابراین، آسیب‌های ناشی از غرقابی در دماهای پایین در مقایسه با دماهای بالای خاک از شدت کمتری برخوردار است (۵). کافی و همکاران (۱۳۸۸) گزارش کردند در برخی از انواع خاک‌ها شرایط بی‌هوازی کامل به دلیل فعالیت میکروبی پایین و

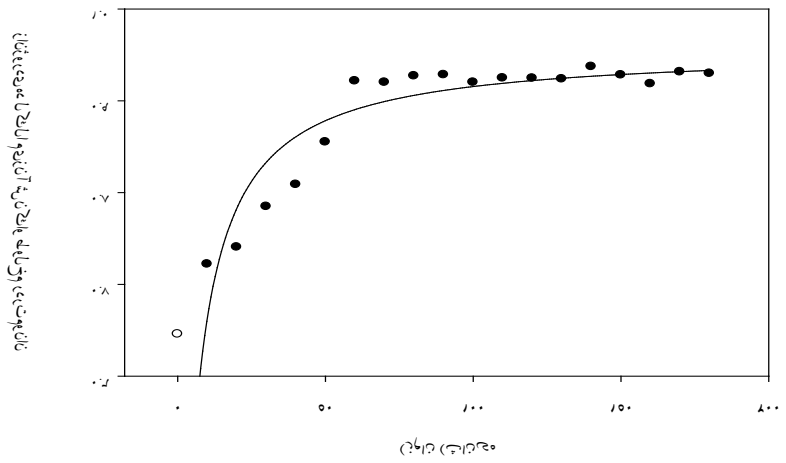
یا دمای کم هرگز اتفاق نمی‌افتد زیرا زمانی که دما پایین بوده و گیاهان در حالت رکود هستند، تخلیه اکسیژن خاک کند و نسبتاً بی ضرر است.

در واقع هدف اصلی این تحقیق بررسی اثر طول دوره غرقاب در دماهای مختلف بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی برگ گیاه گندم به خصوص فرآیند متابولیسم تخمیری و آنزیم‌های نشانگر آن مثل آنزیم الکل دهیدروژناز و فروکتوز ۱و٦ بیس‌فسفات آلدولاز در مراحل اولیه رشد آن به دلیل حساس‌تر بودن گیاه نسبت به مراحل پایانی رشد بود.

مواد و روش ها

در این آزمایش فعالیت آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و فروکتوز ۱و٦ بیس‌فسفات آلدولاز در برگ بوته گندم در طول دوره غرقاب در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای مورد مطالعه شامل طول دوره‌های غرقابی (۰، ٢٤، ٤٨ و ٩٦ ساعت) و دما (۵، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد) در ٤ تکرار، بودند. برای انجام این آزمایش تعداد ۲۵ بذر جوانه‌دار شده در گلدان‌هایی با قطر دهانه ۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۷ سانتی‌متر در گلخانه کشت شدند. خاک مورد نیاز برای اجرای آزمایش از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. این خاک دارای ۲۸٪ رس، ٦٢٪ سیلت و ۱۰٪ شن بود، علاوه بر خاک پرلیت نیز جهت سبک کردن ساختمان خاک به نسبت ۱ به ۲ (۱ واحد پرلیت، ۲ واحد خاک) در هر گلدان اضافه شد. همچنین درصد رطوبت اشباع خاک (٤٩٪)، هدایت الکتریکی (۰/۸ دسی‌زیمنس بر متر) و وزن مخصوص ظاهری (۱/۷ گرم در سانتی‌متر مکعب) خاک توسط آزمون خاک محاسبه شدند. پس از رسیدن بوته‌ها به مرحله ٤ برگی (۲۸ روز پس از کاشت)، برای اعمال تیمارهای غرقابی (بوته‌ها به طور مساوی تا ارتفاع ۳ سانتی‌متر بالای سطح خاک غرقاب شدند) و دما در اتاقک رشد (مدلWEISS TECHNIK-QS) قرار داده شدند.

در این آزمایش پس از اتمام اعمال تنش، استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و فروکتوز ۱و٦ بیس‌فسفات آلدولاز به روش فوکو و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز افزایش جذب نور در طول موج ۳٤۰ نانومتر برای مدت زمان ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد (شکل ۱). فعالیت آنزیم بر اساس اتانول تجزیه شده در هر دقیقه به ازای هر گرم بافت برگ با ضریب خاموشی (ϵ) برابر با $L.mmol^{-1}.cm^{-1}$ ٦٢٢٠٠ بیان شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از تغییرات جذب نور در یک دقیقه اول واکنش استفاده شد.



شکل ۱- تغییرات جذب نور با زمان در مخلوط واکنش آنزیم الکل دهیدروژناز در گندم (تیمار غرقابی ۹۶ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد)

در نهایت با استفاده از رابطه ۱ فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز محاسبه شد:

$$\text{Activity (فعالیت)} = \frac{10^9}{\varepsilon}\left(\frac{V_3 \times V_1}{V_2}\right)\frac{dA}{dt} \qquad \text{(معادله ۱)}$$

که در این رابطه:

V_1 برابر با حجم کل عصاره آنزیمی است که در آزمایش استفاده شد (بر حسب میلی‌لیتر).

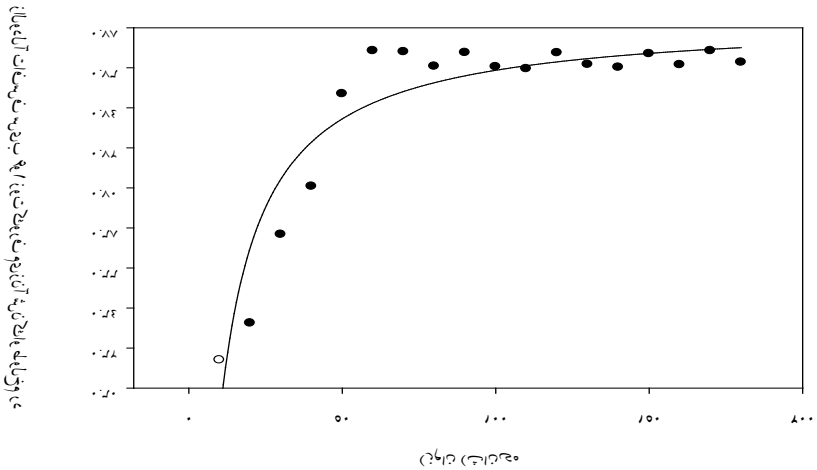
V_2 برابر با حجم محلولی از عصاره است که در آزمایش برای اندازه‌گیری استفاده شد (بر حسب میلی‌لیتر).

V_3 برابر با حجم کل مخلوط واکنش (بر حسب میلی‌لیتر) است.

dA برابر تغییرات جذب نور

dA برابر تغییر زمان بر حسب دقیقه است.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس‌فسفات آلدولاز افزایش جذب نور در طول موج ۳۲٤ نانومتر برای مدت زمان ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد (شکل ۲). برای محاسبه فعالیت آنزیم از تغییرات جذب نور در یک دقیقه اول واکنش استفاده شد و میزان فعالیت آنزیم بر حسب تغییر جذب نور بر دقیقه بر گرم وزن تر بافت ($\triangle OD.\ min^{-1}.\ g^{-1}$) بیان گردید.



شکل ۲- تغییرات جذب نور با زمان در مخلوط واکنش آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس‌فسفات آلدولاز در گندم (تیمار غرقابی ۹٦ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد)

داده‌های حاصل از این آزمایش در قالب تجزیه مرکب با طرح پایه کاملاً تصادفی به کمک برنامه آماری SAS تجزیه شدند و میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلافات معنی‌دار (LSD) در سطح ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر دما، طول دوره غرقابی و اثر متقابل دما در طول دوره غرقابی بر فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز و آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز در سطح ۱٪ معنی‌دار بود.

جدول ۱: تجزیه واریانس (درجه آزادی و مجموع مربعات) فعالیت آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و فروکتوز ۱-٦ بیس فسفات آلدولاز در سطوح مختلف غرقابی و دما

منابع تغییرات	درجه آزادی	فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز	فعالیت آنزیم فروکتوز ۱-٦ بیس فسفات آلدولاز
دما	۲	۰/۳۲۹**	۰/۱۱۵٤**
اشتباه۱	۹	۰/۰۲۳۹ns	۰/۰۰۸۳ns
طول دوره غرقابی	۳	۰/۵۷۳**	۰/۲۰۱۱**
طول دوره غرقابی× دما	٦	٥٤/٩٦**	۰/۱۹۲۸**
اشتباه۲	۲۷	۰/۰۷٤	۰/۰۲۵۹
ضریب تغییرات (٪)		۷/۳۳	۹/۳۸

*، ** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ۱٪ و غیرمعنی‌دار

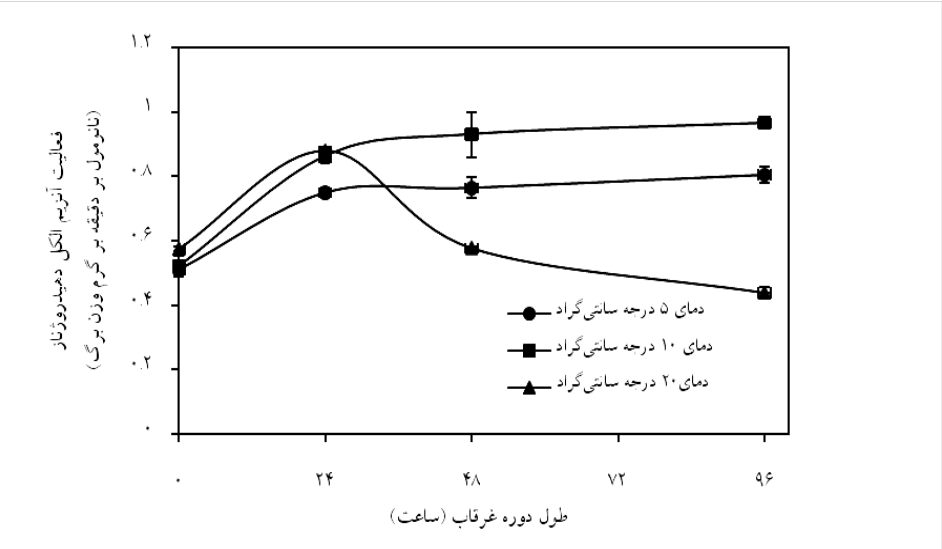
آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و فرکتوز ۱و٦ بیس‌فسفات آلدولاز جزء آنزیم‌های گلیکولیتیک هستند. از بین ANPها الکل دهیدروژناز غالب بوده است. با فقدان پذیرنده نهایی الکترون در تنفس هوازی، زنجیره انتقال الکترون و چرخه تری کربوکسیلیک اسید متوقف شده و تخمیر بی‌هوازی در ریشه از طریق گلیکولیز اتفاق می‌افتد. بنابراین فعالیت الکل دهیدروژناز در اکثر گیاهان افزایش یافته (۸) و منجر به تجمع اتانول می‌گردد. در این آزمایش زرد شدن و مرگ سلول‌های برگ‌ها مشاهده شد که احتمالاً دلیل آن می‌تواند به علت افزایش اتانول باشد. سینگلا و همکاران (۲۰۰٤) در مطالعه خود بر روی گیاه سورگوم نشان دادند که غرقابی باعث افزایش آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس‌فسفات آلدولاز در برگ‌ها شد.

اثر غرقابی و دما بر فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز

در شکل (۳) میزان فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز در تیمارهای ۰ (به عنوان شاهد)، ۲٤، ٤۸ و ۹٦ ساعت غرقاب در دماهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد ارائه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز در تیمار شاهد (۰ ساعت غرقابی) ۰/۵۰۸۵٤ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت برگ بود که با افزایش طول دوره غرقابی فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز نیز افزایش یافت به طوری‌که در تیمار ۹٦ ساعت غرقابی میزان فعالیت آن به ۰/۸۰۳۵۳ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت برگ رسید. در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز نیز همانند دمای ۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش طول دوره غرقابی ولی با شدت بیشتری افزایش یافت که این افزایش نیز از نظر آماری معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار شاهد (۰ ساعت غرقابی) و ۹٦ ساعت غرقابی به ترتیب ۰/۵۲۰۷۸ و ۰/۹٦۳۹ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت برگ بود.

در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز نیز همانند دماهای ۵ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش طول دوره غرقابی از تیمار شاهد (۰ ساعت غرقاب) تا ۲٤ ساعت غرقابی روندی رو به افزایش داشت ولی پس از آن با افزایش طول دوره غرقابی میزان فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز کاهش یافت که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار شاهد (۰ساعت غرقابی) و ۹٦ ساعت غرقابی به ترتیب ۰/۵۷۳۹۵ و ۰/٤۳۸٤۸ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت برگ بود که فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز تیمار ۹٦ ساعت غرقاب در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمار ۹٦ ساعت غرقاب در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. بنز و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز را بر سه قسمت از بافت ریشه گیاه پیرویکیوتا کارولینیانا در شرایط کمبود اکسیژن خاک بررسی کردند، نتایج آن‌ها نشان داد که تا ۱۲ ساعت غرقابی فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز در هر سه بافت روندی رو به افزایش داشت ولی با افزایش طول دوره غرقابی تا ۱٦

ساعت فعالیت آنزیم به علت حساس بودن گیاه به تجمع اتانول و مواد سمی و در نتیجه توقف میسر تخمیر کاهش پیدا کرد. که این نتایج مشابه نتایج به دست آمده در این آزمایش بود. در اثر تنش کمبود اکسیژن تولید ATP کاهش می‌یابد و برای جبران این کاهش باید NAD از مسیر دیگری که نیاز به اکسیژن ندارد تامین شود. در نتیجه گیاهان از مسیر تنفس بی‌هوازی استفاده می‌کنند. در طول تنش غرقاب گلیکولیز از طریق تخمیر اتانولی و یا در میزان کمتر از طریق مسیر تخمیر لاکتات ادامه می‌یابد. انرژی تولیدی از مسیر تخمیری پایین است. بنابراین، گیاه مسیر گلیکولیز را افزایش می‌دهد (۲).



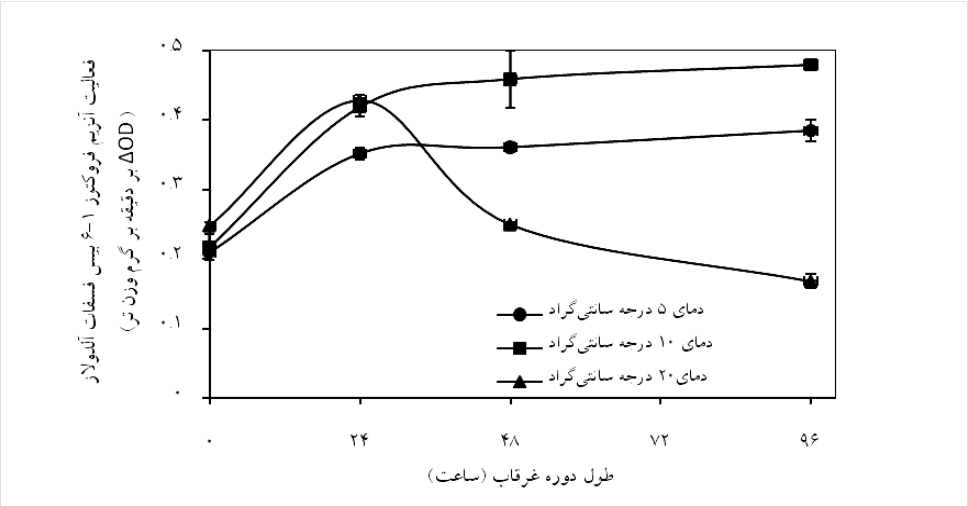
شکل ۳- تأثیر تنش غرقابی در دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز

ایران‌نژاد و شهبازیان (۱۳۸٤) گزارش کردند ۵ روز غرقابی در گندم منجر به افزایش فعالیت‌های الکل دهیدروژناز و پیروات دکربوکسیلاز می‌گردد. پس از ٦/۵ روز ماندابی، سطح الکل دهیدروژناز در ریشه‌های رقم حساس جوای‌اچ‌آز۵۷ نسبت به رقم مقاوم ساکنن بیشتر بود (۱). گیاهان از طریق تغییر الگوی سنتز پلی‌پپتیدهای بی‌هوازی نیز به تنش غرقابی پاسخ می‌دهند. فعالیت الکل دهیدروژناز، در گیاهان حساس (ذرت و نخود) در ریشه بیش از برگ و در گیاهان مقاوم (برنج و سوروف) در برگ بیش از ریشه مشاهده شده است (۳).

اثر غرقابی و دما بر فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز

در شکل (٤) نیز میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز در تیمارهای ۰ (به عنوان شاهد)، ۲٤، ٤۸ و ۹٦ ساعت غرقاب در دماهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد ارائه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز در تیمار شاهد در هر سه دما کمتر از تیمارهای دیگر بود که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود. در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز در تیمار شاهد (۰ ساعت غرقابی) ۰/۲۰۹۲۵ OD△ بر

دقیقه بر گرم بافت برگ بود که با افزایش طول دوره غرقابی فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز نیز افزایش یافت به طوری‌که در تیمار ۹٦ ساعت غرقابی میزان فعالیت آن به ۰/۳۸٤ △OD بر دقیقه بر گرم بافت برگ رسید. در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز نیز همانند دمای ۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش طول دوره غرقابی ولی با شدت بیشتری افزایش یافت که این افزایش نیز از نظر آماری معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد (بدون غرقاب) و ۹٦ ساعت غرقابی به ترتیب ۰/۲۱٦۵ و ۰/٤۷۹ △OD بر دقیقه بر گرم بافت برگ بود. در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز نیز همانند دماهای ۵ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش طول دوره غرقابی از تیمار شاهد (بدون غرقاب) تا ۲٤ ساعت غرقابی روندی رو به افزایش داشت ولی پس از آن با افزایش طول دوره غرقابی میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز کاهش یافت که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود، که می‌تواند دلیل آن مرگ تدریجی سلول‌های گیاهی باشد، زیرا با افزایش دما تنفس نیز افزایش می‌یابد و گیاه تا حدی می‌تواند این شرایط را تحمل کند. میزان فعالیت آنزیم در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار شاهد (۰ ساعت غرقابی) و ۹٦ ساعت غرقابی به ترتیب ۰/۲٤۸ و ۰/۱٦۷۷ △OD بر دقیقه بر گرم بافت برگ بود که فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز تیمار ۹٦ ساعت غرقاب در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به تیمار ۹٦ ساعت غرقاب در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ۵٦/۳۲٪ کاهش یافت.



شکل ٤- تأثیر تنش غرقابی در دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز

سینگلا و همکاران (۲۰۰٤) گزارش نمودند که فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز (FBP آلدولاز) در ریشه‌های گیاهچه‌های سورگوم غرقاب شده در حدود ۱۰ تا ۲۵٪ افزایش یافت. فعالیت آنزیم پس از ۷۲ ساعت در ریشه‌های این گیاهان در مقایسه با شاهد دو برابر شد. همچنین غرقابی موجب افزایش قابل توجه فعالیت این آنزیم در برگ‌های این گیاهان گردید. افزایش فعالیت FBP آلدولاز

در ریشه‌های گیاهچه‌های ذرت تحت شرایط بی‌هوازی گزارش شده است (دنیس و همکاران، ۲۰۰۰). این نتایج با نتایج به‌دست آمده در این آزمایش مطابقت داشت.

نتایج مقایسه میانگین آنزیم الکل دهیدروژناز و آنزیم فرکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز نشان داد (جدول ۲) در ابتدا با افزایش ساعت غرقابی بر میانگین فعالیت هر دو آنزیم افزوده شد، ولی با طولانی‌تر شدن طول دوره غرقاب(۹٦ ساعت) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد کاهش سطح فعالیت هر دو آنزیم مشاهده شد. زمانی که دما پایین بوده و گیاهان در حالت رکود هستند، تخلیه اکسیژن خاک کند و نسبتاً بی ضرر است. زمانی که دما بالا می‌رود مصرف اکسیژن توسط ریشه گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌های موجود در خاک می‌تواند اکسیژن را در مدت کمتر از ۲٤ ساعت به طور کامل از آب خاک تخلیه کند. رشد و بقای بسیاری از گیاهان تا حد زیادی تحت این شرایط کاهش می‌یابد. به هر حال در غیاب اکسیژن چرخه تری کربوکسیلیک اسید فعال نیست و تولید ATP تنها از طریق فرآیند تخمیر صورت می‌گیرد (٦). بنابراین شاید بتوان گفت این کاهش می‌تواند به دلیل از هم پاشیدن اجزاء داخلی گیاه به دلیل فعالیت هورمونی و تجمع اتانول باشد. اسماعیل و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که در ارقام حساس برنج و گندم پس از ۳ روز غرقابی نشاسته به دلیل به هم خوردن تعادل هورمونی بویژه افزایش هورمون اتیلن از هم پاشیده شد. در هر دو آنزیم بیشترین میزان فعالیت در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در تیمار ۹٦ ساعت غرقابی و کمترین میزان فعالیت در دمای ۲۰ درجه در تیمار ۹٦ ساعت غرقاب مشاهده شد، افزایش فعالیت آنزیم با افزایش طول دوره غرقابی می‌تواند به دلیل حساسیت گیاه در برابر شرایط بی‌هوازی باشد. افت ناگهانی فعالیت نیز با توجه به دیگر پارامترها می‌تواند به دلیل صدمات ناشی از تنش شدت غرقابی در گیاه باشد.

میانگین فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز نسبت به میانگین فعالیت آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز تحت تنش غرقابی بیشتر تحت تاثیر قرار گرفت و در هر سه دما دارای مقدار بیشتری بود (جدول ۲). هر دو این آنزیم‌ها جزء پروتئیین‌هایی هستند که تحت شرایط اکسیژن پایین سنتزآن‌ها القا می‌شوند (٦). با این تفاوت که آنزیم فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز در ابتدای مسیر گلیکولیز باعث کاتالیز تبدیل فرکتوز ۱و٦ فسفات به فسفوگلیسروآلدئید می‌شود که این فرآیند در شرایط هوازی هم صورت می‌گیرد، ولی فرآیند تبدیل استالدئید به اتانول که توسط آنزیم الکل دهیدروژناز کاتالیز می‌شود تحت تاثیر مستقیم کمبود یا فقدان اکسیژن است.

جدول ۲: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز (نانومول بر دقیقه بر گرم بافت برگ) و فعالیت آنزیم فرکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز (△OD بر دقیقه بر گرم بافت برگ) در تیمارهای غرقابی در دماهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد به روش LSD در سطح احتمال ۵ ٪

دما (درجه سانتی‌گراد) / تیمار غرقابی (ساعت)	۵	۱۰	۲۰	LSD
	فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز			
۰	۰/۵۰۸e	۰/۵۲۱e	۰/۵۷۳e	۰/۰٤۷٦
۲٤	۰/۷٤۷d	۰/۸٦۲bc	۰/۸۷۷bc	۰/۰٤۷٦
٤۸	۰/۷٦۳ d	۰/۹۲۹ab	۰/۵۷٦e	۰/۰٤۷٦
۹٦	۰/۸۰۳cd	۰/۹٦٤a	۰/٤۳۸f	۰/۰٤۷٦
LSD	۰/۰۳۸	۰/۰۳۸	۰/۰۳۸	
	فعالیت آنزیم فرکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز			
۰	۰/۲۰۹ ef	۰/۲۱٦e	۰/۲٤۸e	۰/۰۲۸۲
۲٤	۰/۳۵۱d	۰/٤۱۸bc	۰/٤۲۷abc	۰/۰۲۸۲
٤۸	۰/۳٦d	۰/٤۵۸ab	۰/۲٤۹e	۰/۰۲۸۲
۹٦	۰/۳۸٤cd	۰/٤۷۹a	۰/۱٦۷f	۰/۰۲۸۲
LSD	۰/۰۲۲۵	۰/۰۲۲۵	۰/۰۲۲۵	

میانگین‌های با حروف یکسان از نظر آماری در سطح ۵ %اختلاف معنی‌داری ندارند

اثر دما، طول دوره غرقابی و اثر متقابل دما در طول دوره غرقابی بر فعالیت آنزیم‌ها الکل دهیدروژناز و فروکتوز ۱و٦ بیس فسفات آلدولاز در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. با افزایش طول دوره غرقابی فعالیت هر دو آنزیم افزایش یافت. این روند افزایشی در دمای پایین‌تر (۵ و ۱۰) نسبتاً ثابت‌تر از دمای ۲۰ درجه بود. که نشان می‌دهد گیاه زراعی گندم می‌تواند در دمای پایین بهتر از دمای بالا در شرایط غرقابی مقاومت کند.

منابع

۱- **ایران‌نژاد، ح. و شهبازیان، ن. ۱۳۸٤.** مقاومت گیاهان زراعی به تنش‌های محیطی. انتشارات کارنو. ۲۳۰ صفحه.

۲- **کافی، م.، برزونی، ا.، صالحی، م.، کمندی، ع.، معصومی، ع. و نباتی، ج. ۱۳۸۸.** فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه مشهد. ۵۰۲ صفحه.

۳- **کافی، م. و دامغانی، ع. ۱۳۸۱.** مکانیسم‌های مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی. (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ٤٦۷ صفحه.

٤- **کوچکی، ع.، سلطانی، ا. و عزیزی، م. ۱۳۷٦.** اکوفیزیولوژی گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۲۷۱ صفحه.

5- Benz, B. R., Rhoed, J. M. and Cruzan, M. B. 2007. Aerenchyma development and elevated alcohol dehydrogenase activity as alternative responses to hypoxic soils in the Piriqueta caroliniana complex. Amer J. Bot. 94(4):542–550.

6- Dennis, E .S., Dolferus, R., Ellis, M., Rahman, M., Wu, Y., Hoeren, F. U., Grover, A., Ismond, K. P., Good, A. G. and Peacock, W. J. 2000. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. J. Exp. Bot. 51: 89-97.

7- Fukao, T., Kennedy, R. A., Yamasue, Y. and Rumpho, M. E. 2003. Genetic and biochemical analysis of anaerobicallyinduced enzymes during seed germination of Echinochloa crus-galli varieties tolerant and intolerant of anoxia. J. Exp. Bot. 54 (386):1421-1429.

8- Irfan, M., Hayat, S., Hayat, Q., Afroz, S. and Ahmad, A. 2010. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. Protoplasma. 241:3-17.

9- Ismail, A. M., Ella, E. S., Vergara, G. V. and Mackill, D. J. 2009. Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (Oryza sativa L.). Ann . Bota. 103:197–209.

10- Jarillo, J. A., Leyva, A., Salinas, J. and Martinez-Zapater, J. M. 1993. Low temperature induces the accumulation of alcohol dehydrogenase mRNA in Arabidopsis fhaliana, a chilling-tolerant plant. Plant Physiol. 101:833-837.

11- Sairam, R. K., Kumutha, D., Ezhilmathi, K., Deshmukh, P. S. and Srivastava, G. C. 2008. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. Biol. Plant. 52:401-412.

12- Serres. J. B. and Voesenek, L. A. C. J. 2008. Flooding stress:Acclimations and genetic diversity. Ann Revi Plant Biol. 59:313-339.

13- Singla, N. K., Jain, V., Jain, S. and Sawhney, S. K. 2004. Activities of glycolytic enzymes in leaves and roots of contrasting cultivars of sorghum during flooding. Biol. Plant. 47: 555-560.

14- Xu, C. and Huang, B. 2008. Root proteomic responses to heat stress in two Agrostis grass species contrasting in heat tolerance. J.Exp. Bot. 59:4183–4194.