

## تأثیر 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  
سراشه 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 او۱ بیس فسفات آلدولاز در برگ گندم (N۸۰۱۹) در مرحله رویشی (۴ تا ۵ برگ) تحت تأثیر طول دوره غرقاب در دماهای متفاوت در قالب تجزیه مرکب با طرح پایه کاملاً تصادفی در ۴ سطح غرقاب (۰، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت) و ۳ سطح دما (۵، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد) با ۴ 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 او۱ بیس فسفات آلدولاز در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. با افزایش طول دوره غرقاب فعالیت آنزیم‌ها الکل دهیدروژناز و فروکتوز او۱ بیس فسفات آلدولاز در دماهای ۵ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش طول دوره غرقاب تا ۴۸ ساعت فعالیت هر دو آنزیم افزایش ولی با افزایش طول دوره غرقاب تا ۹۶ ساعت فعالیت هر دو آنزیم کاهش معنی‌داری یافت.

واژه‌های کلیدی: تنش، الکل دهیدروژناز، فروکتوز او۱ بیس فسفات آلدولاز، رشد رویشی

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

## مقدمه

هرگونه تغییر در شرایط محیطی که عکس العمل گیاه را از حد مطلوب خارج سازد تنش گویند (۴). کاهش اکسیژن به زیر سطح مطلوب (هیپوکسی<sup>۱</sup>) رایج ترین شکل تنش در خاک های مرطوب است. هیپوکسی زمانی اتفاق می افتد که ریشه ها در طول دوره های کوتاه غرقاب یا آب ایستادگی در آب غوطه ورنند اما تاج گیاه در شرایط کمبود اکسیژن قرار ندارد. فقدان کامل اکسیژن (آنوکسی<sup>۲</sup>) زمانی اتفاق خواهد افتاد که خاک آب ایستادگی را به مدت طولانی تر تجربه کرده باشد. کاهش تنفس ریشه ای بدون توجه به متحمل یا غیر متحمل بودن گیاه، اولین پاسخ گیاهان تحت تنش آنوکسی می باشد (۱۲). گیاهان از طریق تغییر الگوی سنتز پروتئین نیز به تنش غرقابی پاسخ می دهند. زیرا در اثر تنش کمبود اکسیژن، تولید ATP<sup>۳</sup> کاهش می یابد و برای جبران این کاهش باید NAD<sup>۴</sup> از مسیر دیگری که نیاز به اکسیژن ندارد تأمین شود. در نتیجه گیاهان از مسیر تنفس بی هوازی استفاده می کنند. در طول تنش غرقاب گلیکولیز از طریق تخمیر اتانولی و یا در میزان کمتر از طریق مسیر تخمیر لاکتات ادامه می یابد. انرژی تولیدی از مسیر تخمیری پایین است. بنابراین، گیاه مسیر گلیکولیز را افزایش می دهد (۲). پروتئین هایی که به طور اختصاصی در پاسخ به شرایط بی هوازی ساخته می شوند پلی پپتیدهای بی هوازی یا A<sup>NP۵</sup> نامیده می شوند که شامل ساکارز سنتاز، فسفوگروز ایزومراز، فروکتوز-۶-ا-بیس فسفات آلدولاز (FBP<sup>۶</sup> آلدولاز)، پیرووات دکربوکسیلاز، لاکتات دهیدروژناز و الکل دهیدروژناز (ADH<sup>۷</sup>) می باشند (۱۱).

بنابراین آنزیم های الکل دهیدروژناز و فرکتوز ۶-ا-بیس فسفات آلدولاز جزء آنزیم های گلیکولیتیک هستند. از بین پلی پپتیدهای بی هوازی الکل دهیدروژناز غالب بوده و بیشتر مطالعه شده است. از آنجائی که با فقدان پذیرنده نهایی الکترون در تنفس هوازی، زنجیره انتقال الکترون و چرخه تری کربوکسیلیک اسید متوقف شده و تخمیر بی هوازی در قسمت سلول ها و بافت های ریشه از طریق گلیکولیز اتفاق می افتد، بنابراین فعالیت الکل دهیدروژناز در اکثر گیاهان افزایش یافته (۸) و منجر به تجمع اتانول می گردد.

- 
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 (۱۳۸۴) گزارش کردند ۵ روز ماندابی در گندم منجر به افزایش فعالیت‌های الکل دهیدروژناز و پیرووات دکربوکسیلاز می‌گردد. پس از ۶/۵ روز ماندابی، سطح الکل دهیدروژناز در ریشه‌های رقم مقاوم جوای‌اچ‌آز ۵۷ 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 پیروکیوتا کارولینینا 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 ۱۶ ساعت فعالیت آنزیم به علت حساس بودن گیاه به تجمع اتانول و مواد سمی و در نتیجه توقف میسر تخمیر کاهش پیدا کرد.

سینگلا و همکاران (۲۰۰۴) گزارش نمودند که فعالیت آنزیم فروکتوز ۶‌اویس 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 بی‌هوای نیز گزارش شده است (۶). اکسو و هیوانگ (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 ۴۰ 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 ۲۴ ساعت به طور کامل از آب خاک تخلیه کند (۶). 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 بی‌هوای کامل به دلیل فعالیت میکروبی پایین و

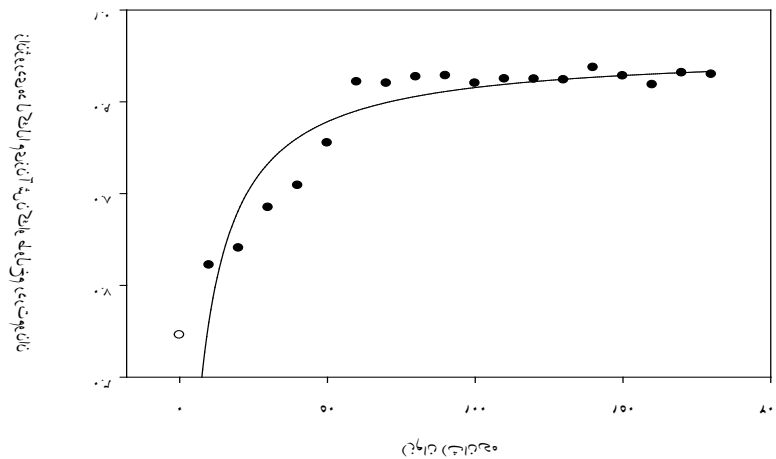
یا دمای کم هرگز اتفاق نمی افتد زیرا زمانی که دما پایین بوده و گیاهان در حالت رکود هستند، تخلیه اکسیژن خاک کند و نسبتاً بی ضرر است.

در واقع هدف اصلی این تحقیق بررسی اثر طول دوره غرقاب در دماهای مختلف بر پاسخ های فیزیولوژیکی برگ گیاه گندم به خصوص فرآیند متابولیسم تخمیری و آنزیم های نشانگر آن مثل آنزیم الکل دهیدروژناز و فروکتوز او۱ بیس فسفات آلدولاز در مراحل اولیه رشد آن به دلیل حساس تر بودن گیاه نسبت به مراحل پایانی رشد بود.

### مواد و روش ها

در این آزمایش فعالیت آنزیم های الکل دهیدروژناز و فروکتوز او۱ بیس فسفات آلدولاز در برگ بوته گندم در طول دوره غرقاب در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای مورد مطالعه شامل طول دوره های غرقابی (۰، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت) و دما (۵، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی گراد) در ۴ تکرار، بودند. برای انجام این آزمایش تعداد ۲۵ بذر جوانه دار شده در گلدان هایی با قطر دهانه ۲۵ سانتی متر و ارتفاع ۱۷ سانتی متر 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، ۶۲٪ 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 (۴۹٪)، هدایت الکتریکی (۰/۸ دسی زیمنس بر متر) و وزن مخصوص ظاهری (۱/۷ گرم در سانتی متر مکعب) خاک توسط آزمون خاک محاسبه شدند. پس از رسیدن بوته ها به مرحله ۴ برگگی (۲۸ روز پس از کاشت)، برای اعمال تیمارهای غرقابی (بوته ها به طور مساوی تا ارتفاع ۳ سانتی متر بالای سطح خاک غرقاب شدند) و دما در اتاقک رشد (مدل WEISS TECHNIK-QS) قرار داده شدند.

در این آزمایش پس از اتمام اعمال تنش، استخراج و اندازه گیری فعالیت آنزیم های الکل دهیدروژناز و فروکتوز او۱ بیس فسفات آلدولاز به روش فوکو و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز افزایش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر برای مدت زمان ۳ دقیقه اندازه گیری شد (شکل ۱). فعالیت آنزیم بر اساس اتانول تجزیه شده در هر دقیقه به ازای هر گرم بافت برگ با ضریب خاموشی ( $\epsilon$ ) برابر با  $62200 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  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 سانتی گراد)

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

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

که در این رابطه:

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

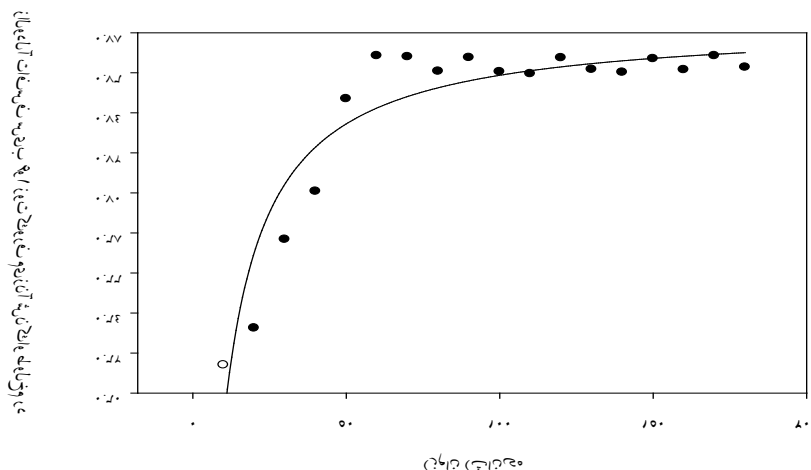
$V_2$  برابر با حجم محلولی از عصاره است که در آزمایش برای اندازه گیری استفاده شد (بر حسب میلی لیتر).

$V_3$  برابر با حجم کل مخلوط واکنش (بر حسب میلی لیتر) است.

$dA$  برابر تغییرات جذب نور

$dA$  برابر تغییر زمان بر حسب دقیقه است.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم فروکتوز ۱ او ۶ بیس فسفات آلدولاز افزایش جذب نور در طول موج ۳۲۴ نانومتر برای مدت زمان ۳ دقیقه اندازه گیری 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 ( $\Delta OD \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) بیان گردید.



شکل ۲- تغییرات جذب نور با زمان در مخلوط واکنش آنزیم فروکتوز او۱ بیس فسفات آلدولاز در گندم (تیمار غرقابی ۹۶ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد)

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 معنی دار (LSD) در سطح ۰.۰۵ 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 او۱ بیس فسفات آلدولاز در سطح ۰.۰۱٪ معنی دار بود.

جدول ۱: تجزیه واریانس (درجه آزادی و مجموع مربعات) فعالیت آنزیم‌های الکل دهیدروژناز و فروکتوز او۱-۶ بیس فسفات آلدولاز در سطوح مختلف غرقابی و دما

منابع تغییرات	درجه آزادی	فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز	فعالیت آنزیم فروکتوز او۱-۶ بیس فسفات آلدولاز
دما	۲	۰/۳۲۹**	۰/۱۱۵۴**
اشتباه ۱	۹	۰/۰۲۳۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۸۳ <sup>ns</sup>
طول دوره غرقابی	۳	۰/۵۷۳**	۰/۲۰۱۱**
طول دوره غرقابی × دما	۶	۵۴/۹۶**	۰/۱۹۲۸**
اشتباه ۲	۲۷	۰/۰۷۴	۰/۰۲۵۹
ضریب تغییرات (/)		۷/۳۳	۹/۳۸

\*، \*\* و <sup>ns</sup> به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۰.۰۵، ۰.۰۱ و غیرمعنی دار

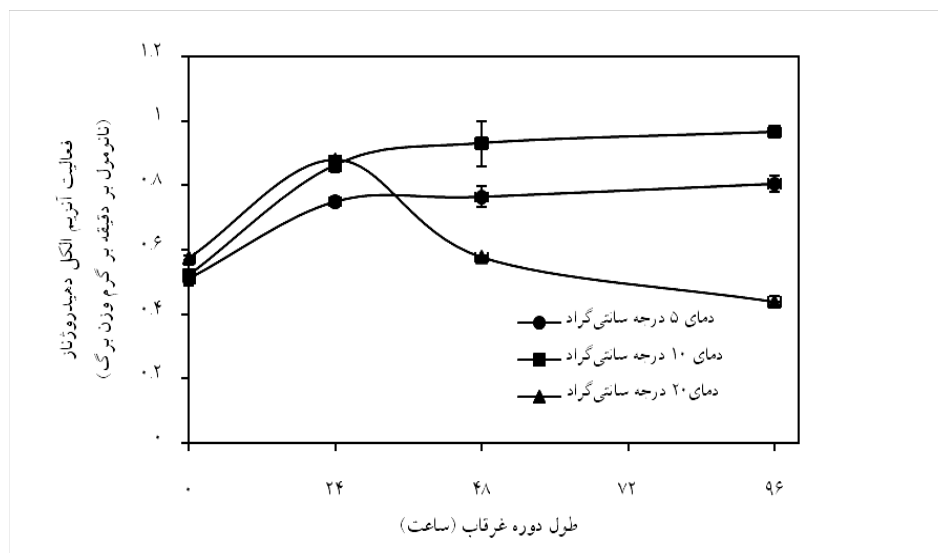
آنزیم های الکل دهیدروژناز و فرکتوز ۱و۶ بیس فسفات آلدولاز جزء آنزیم های گلیکولیتیک هستند. از بین ANP ها الکل دهیدروژناز غالب بوده است. با فقدان پذیرنده نهایی الکترون در تنفس هوازی، زنجیره انتقال الکترون و چرخه تری کریوکسیلیک اسید متوقف شده و تخمیر بی هوازی در ریشه از طریق گلیکولیز اتفاق می افتد. بنابراین فعالیت الکل دهیدروژناز در اکثر گیاهان افزایش یافته (۸) و منجر به تجمع اتانول می گردد. در این آزمایش زرد شدن و مرگ سلول های برگ ها مشاهده شد که احتمالاً دلیل آن می تواند به علت افزایش اتانول باشد. سینگلا و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه خود بر روی گیاه سورگوم نشان دادند که غرقابی باعث افزایش آنزیم فروکتوز ۱و۶ بیس فسفات آلدولاز در برگ ها شد.

### اثر غرقابی و دما بر فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز

در شکل (۳) میزان فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز در تیمارهای ۰ (به عنوان شاهد)، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت غرقاب در دماهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی گراد ارائه شده است. همان طور که ملاحظه می شود در دمای ۵ درجه سانتی گراد میزان فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز در تیمار شاهد (۰ ساعت غرقابی)  $0/50854$  نانومول بر دقیقه بر گرم بافت برگ بود که با افزایش طول دوره غرقابی فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز نیز افزایش یافت به طوری که در تیمار ۹۶ ساعت غرقابی میزان فعالیت آن به  $0/80353$  نانومول بر دقیقه بر گرم بافت برگ رسید. در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد میزان فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز نیز همانند دمای ۵ درجه سانتی گراد با افزایش طول دوره غرقابی ولی با شدت بیشتری افزایش یافت که این افزایش نیز از نظر آماری معنی دار بود. میزان فعالیت آنزیم در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد در تیمار شاهد (۰ ساعت غرقابی) و ۹۶ ساعت غرقابی به ترتیب  $0/52078$  و  $0/9639$  نانومول بر دقیقه بر گرم بافت برگ بود.

در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد میزان فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز نیز همانند دماهای ۵ و ۱۰ درجه سانتی گراد با افزایش طول دوره غرقابی از تیمار شاهد (۰ ساعت غرقاب) تا ۲۴ 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 معنی دار بود. میزان فعالیت آنزیم در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد در تیمار شاهد (۰ ساعت غرقابی) و ۹۶ ساعت غرقابی به ترتیب  $0/57395$  و  $0/43848$  نانومول بر دقیقه بر گرم بافت برگ بود که فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز تیمار ۹۶ ساعت غرقاب در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نسبت به تیمار ۹۶ ساعت غرقاب در دمای ۵ درجه سانتی گراد کاهش یافت. بنز و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز را بر سه قسمت از بافت ریشه گیاه پیروکیوتا کارولینینا در شرایط کمبود اکسیژن خاک بررسی کردند، نتایج آن ها 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 ۱۶

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 می یابد و برای جبران این کاهش باید NAD از مسیر دیگری که نیاز به اکسیژن ندارد تامین شود. در نتیجه گیاهان از مسیر تنفس بی هوازی استفاده می کنند. در طول تنش غرقاب گلیکولیز از طریق تخمیر اتانولی و یا در میزان کمتر از طریق مسیر تخمیر لاکتات ادامه می یابد. انرژی تولیدی از مسیر تخمیری پایین است. بنابراین، گیاه مسیر گلیکولیز را افزایش می دهد (۲).



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

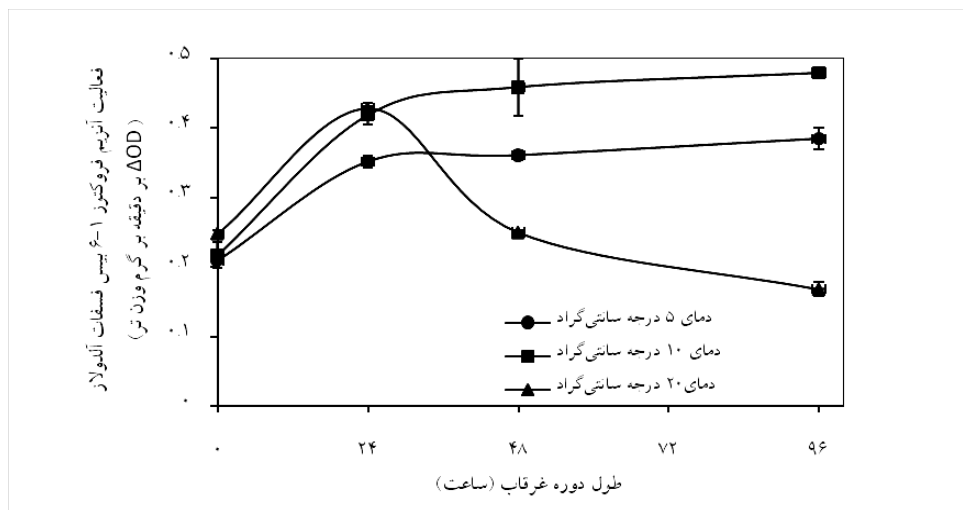
ایران نژاد و شهبازیان (۱۳۸۴) گزارش کردند ۵ روز غرقابی در گندم منجر به افزایش فعالیت های الکل دهیدروژناز و پیرووات دکربوکسیلاز می گردد. پس از ۶/۵ روز ماندابی، سطح الکل دهیدروژناز در ریشه های رقم حساس جوای اچ آ ۵۷ نسبت به رقم مقاوم ساکنین بیشتر بود (۱). گیاهان از طریق تغییر الگوی سنتز پلی پپتیدهای بی هوازی نیز به تنش غرقابی پاسخ می دهند. 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 ۶ا بیس فسفات آلدولاز

در شکل (۴) نیز میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۶ا بیس فسفات آلدولاز در تیمارهای ۰ (به عنوان شاهد)، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت غرقاب در دماهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی گراد ارائه شده است. همان طور که ملاحظه می شود میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۶ا بیس فسفات آلدولاز در تیمار شاهد در هر سه دما کمتر از تیمارهای دیگر بود که این افزایش از نظر آماری معنی دار بود. در دمای ۵ درجه سانتی گراد میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۶ا بیس فسفات آلدولاز در تیمار شاهد (۰ ساعت غرقابی)  $\Delta OD$  ۰/۲۰۹۲۵ بر



دقیقه بر گرم بافت برگ بود که با افزایش طول دوره غرقابی فعالیت آنزیم فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات آلدولاز نیز افزایش یافت به طوری که در تیمار ۹۶ ساعت غرقابی میزان فعالیت آن به  $\Delta OD$  ۰/۳۸۴ بر دقیقه بر گرم بافت برگ رسید. در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات آلدولاز نیز همانند دمای ۵ درجه سانتی گراد با افزایش طول دوره غرقابی ولی با شدت بیشتری افزایش یافت که این افزایش نیز از نظر آماری معنی دار بود. میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد ( بدون غرقاب) و ۹۶ ساعت غرقابی به ترتیب  $\Delta OD$  ۰/۲۱۶۵ و ۰/۴۷۹ بر دقیقه بر گرم بافت برگ بود. در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات آلدولاز نیز همانند دماهای ۵ و ۱۰ درجه سانتی گراد با افزایش طول دوره غرقابی از تیمار شاهد ( بدون غرقاب) تا ۲۴ ساعت غرقابی روندی رو به افزایش داشت ولی پس از آن با افزایش طول دوره غرقابی میزان فعالیت آنزیم فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات آلدولاز کاهش یافت که این کاهش از نظر آماری معنی دار بود، که می تواند دلیل آن مرگ تدریجی سلول های گیاهی باشد، زیرا با افزایش دما تنفس نیز افزایش می یابد و گیاه تا حدی می تواند این شرایط را تحمل کند. میزان فعالیت آنزیم در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد در تیمار شاهد (۰ ساعت غرقابی) و ۹۶ ساعت غرقابی به ترتیب  $\Delta OD$  ۰/۲۴۸ و ۰/۱۶۷۷ بر دقیقه بر گرم بافت برگ بود که فعالیت آنزیم فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات آلدولاز تیمار ۹۶ ساعت غرقاب در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نسبت به تیمار ۹۶ ساعت غرقاب در دمای ۵ درجه سانتی گراد ۵۶/۳۲٪ کاهش یافت.



شکل ۴- تأثیر تنش غرقابی در دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات آلدولاز

سینگلا و همکاران (۲۰۰۴) گزارش نمودند که فعالیت آنزیم فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات آلدولاز (FBP) در ریشه های گیاهچه های سورگوم غرقاب شده در حدود ۱۰ تا ۲۵٪ افزایش یافت. فعالیت آنزیم پس از ۷۲ ساعت در ریشه های این گیاهان در مقایسه با شاهد دو برابر شد. همچنین غرقابی موجب افزایش قابل توجه فعالیت این آنزیم در برگ های این گیاهان گردید. افزایش فعالیت FBP آلدولاز

در ریشه های گیاهچه های ذرت تحت شرایط بی هوازی گزارش شده است (دنیس و همکاران، ۲۰۰۰). این نتایج با نتایج به دست آمده در این آزمایش مطابقت داشت.

نتایج مقایسه میانگین آنزیم الکل دهیدروژناز و آنزیم فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات آلدولاز نشان داد (جدول ۲) در ابتدا با افزایش ساعت غرقابی بر میانگین فعالیت هر دو آنزیم افزوده شد، ولی با طولانی تر شدن طول دوره غرقاب (۹۶ ساعت) در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد 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 می رود مصرف اکسیژن توسط ریشه گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم های موجود در خاک می تواند اکسیژن را در مدت کمتر از ۲۴ ساعت به طور کامل از آب خاک تخلیه کند. رشد و بقای بسیاری از گیاهان تا حد زیادی تحت این شرایط کاهش می یابد. به هر حال در غیاب اکسیژن چرخه تری کربوکسیلیک اسید فعال نیست و تولید ATP تنها از طریق فرآیند تخمیر صورت می گیرد (۶). بنابراین شاید بتوان گفت این کاهش می تواند 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 سانتی گراد در تیمار ۹۶ ساعت غرقابی و کمترین میزان فعالیت در دمای ۲۰ درجه در تیمار ۹۶ ساعت غرقاب مشاهده شد، افزایش فعالیت آنزیم با افزایش طول دوره غرقابی می تواند به دلیل حساسیت گیاه در برابر شرایط بی هوازی باشد. افت ناگهانی فعالیت نیز با توجه به دیگر پارامترها می تواند به دلیل صدمات ناشی از تنش شدت غرقابی در گیاه باشد.

میانگین فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز نسبت به میانگین فعالیت آنزیم فروکتوز ۱،۶ 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 آنزیم ها جزء پروتئین هایی هستند که تحت شرایط اکسیژن پایین سنتزان ها القا می شوند (۶). با این تفاوت که آنزیم فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات آلدولاز در ابتدای مسیر گلیکولیز باعث کاتالیز تبدیل فروکتوز ۱،۶ فسفات به فسفوگلیسرآلدئید می شود که این فرآیند در شرایط هوازی هم صورت می گیرد، ولی فرآیند تبدیل استالددئید به اتانول که توسط آنزیم الکل دهیدروژناز کاتالیز می شود 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 فروکتوز او ۶ بیس فسفات آلدولاز ( $\Delta OD$  بر دقیقه بر گرم بافت برگ) در تیمارهای غرقابی در دماهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درجه سانتی گراد به روش LSD در سطح احتمال ۵٪.

LSD	دما (درجه سانتی گراد)				تیمار غرقابی (ساعت)
	۲۰	۱۰	۵		
فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز					
۰/۰۴۷۶	۰/۰۵۷۳e	۰/۰۵۲۱e	۰/۰۵۰۸e	۰	
۰/۰۴۷۶	۰/۰۸۷۷bc	۰/۰۸۶۲bc	۰/۰۷۴۷d	۲۴	
۰/۰۴۷۶	۰/۰۵۷۶e	۰/۰۹۲۹ab	۰/۰۷۶۳ d	۴۸	
۰/۰۴۷۶	۰/۰۴۳۸f	۰/۰۹۶۴a	۰/۰۸۰۳cd	۹۶	
	۰/۰۳۸	۰/۰۳۸	۰/۰۳۸	LSD	
فعالیت آنزیم فروکتوز او ۶ بیس فسفات آلدولاز					
۰/۰۲۸۲	۰/۰۲۴۸e	۰/۰۲۱۶e	۰/۰۲۰۹ ef	۰	
۰/۰۲۸۲	۰/۰۴۲۷abc	۰/۰۴۱۸bc	۰/۰۳۵۱d	۲۴	
۰/۰۲۸۲	۰/۰۲۴۹e	۰/۰۴۵۸ab	۰/۰۳۶d	۴۸	
۰/۰۲۸۲	۰/۰۱۶۷f	۰/۰۴۷۹a	۰/۰۳۸۴cd	۹۶	
	۰/۰۲۲۵	۰/۰۲۲۵	۰/۰۲۲۵	LSD	

میانگین‌های با حروف یکسان از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند

اثر دما، طول دوره غرقابی و اثر متقابل دما در طول دوره غرقابی بر فعالیت آنزیم‌ها الکل دهیدروژناز و فروکتوز او ۶ بیس فسفات آلدولاز در سطح ۱٪ معنی دار 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. ۱۳۸۴. 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. ۴۶۷ صفحه.
- ۴- کوچکی، ع.، سلطانی، ا. و عزیزی، م. ۱۳۷۶. اکوفیزیولوژی گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۲۷۱ صفحه.

5- Benz, B. R., Rhoad, 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 anaerobically induced 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 thaliana*, 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 Voisenek, 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.