مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

# ارزیابی فعالیت برخی از آنزیم‌های دفاعی نخود (*Cicer arietinum* L.) تحت تنش سرما

**سمانه کرمی معلم[۱]، رضا معالی امیری[۲*]، هوتن وفایی[۳]، یاسمن نظیری[٤]**

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ایران.

[۲] دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ایران.

[۳] دانشجوی کارشناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ایران.

[٤] دانشجوی کارشناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ایران.

**تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۰**

## چکیده

گیاهان جهت بقا و تحمل تنش‌های محیطی نیازمند مکانیسم‌های دفاعی متعددی هستند. در این پژوهش فعالیت آنزیم‌های اکسیداز متناوب (AOX) میتوکندری، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) ، میزان نشت الکترولیتی (ELI) و پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) به عنوان شاخص‌های خسارت سلولی در دو ژنوتیپ حساس (ILC533) و متحمل (Sel 96TH11439) نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) تحت تنش سرمای ٤ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد. نتایج تجزیه آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها تحت تیمارهای دمایی وجود داشت. تحت تنش سرما به موازات کاهش شاخص‌های خسارت، فعالیت آنزیم AOX افزایش معنی‌داری یافت. بیشترین فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ متحمل در روز ششم پس از تنش سرما مشاهده شد در حالی‌که تحت این شرایط میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ حساس به‌طور معنی‌داری کمتر از ژنوتیپ متحمل بود. افزایش فعالیت آنزیم AOX که با خسارت سلولی کمتر (نتایج ELI و $H_2O_2$) به‌خصوص در روز ششم پس از تنش سرما همراه بود، بیانگر اهمیت این آنزیم در تحمل به سرما در گیاه نخود می‌باشد. افزایش معنی‌دار و همزمان الگوی فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT ضمن تایید نتایج فعالیت AOX، درجه تحمل ژنتیکی نخود به سرما را افزایش داده و یا اینکه سبب بهبود گیاه پس از اعمال تنش می‌شود. چنین شاخص‌هایی ممکن است در ارزیابی ژنوتیپ‌های نخود تحت تنش سرما و یا بکارگیری آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی مفید باشند.

**واژه‌های کلیدی:** *اکسیداز متناوب، سرما، نشت الکترولیتی، نخود.*

*نویسنده مسئول: رضا معالی امیری تلفن: ۰۹۱۲٤۱۹۰۱۲٤ Email: rmamiri@ut.ac.ir

**مقدمه**

گیاهان به‌دلیل آنکه توانایی حرکت و جابه-جایی ندارند، پیوسته در معرض تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده قرار دارند. بنابراین تحت شرایط مزرعه از یک طرف باید قادر به درک تغییرات محیطی بوده و از طرف دیگر توانایی پاسخ و حفظ توازن سلولی را تحت این شرایط داشته باشند (Kazemi Shahandashti *et al*., 2013). تنش سرما به عنوان یکی از عوامل محدود کننده رشد گیاهان زراعی بر عملکرد و کیفیت محصول اثر می‌گذارد. افزایش تحمل به تنش سرما در اثر تغییر پاسخ‌های سلولی در سطوح فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی است که احتمالاً در اثر تغییر فعالیت ژن‌های القایی و برنامه‌ریزی مجدد ژنوم اتفاق می‌افتد. غشای پلاسمایی به عنوان اولین بخش از سلول بوده که به تنش سرما واکنش می‌دهد. بنابراین اندازه‌گیری میزان خسارت وارد شده به غشا از طریق شاخص نشت الکترولیتی (ELI)[1] در مراحل اولیه تنش می‌تواند الگوی مناسب میزان تحمل به سرما را نمایش دهد (Heidarvand *et al*., 2011). از طرف دیگر، گونه‌های فعال اکسیژن[2] (ROS) شامل رادیکال‌های آزاد آنیون سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$)، رادیکال هیدروکسیل (•OH) و همچنین مولکول‌های غیررادیکالی از جمله پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) از عوامل اصلی خسارت سلولی می‌باشند (Gill and Tuteja 2010). در گیاهان، ROSها طی نشت اجتناب‌ناپذیر الکترون‌ها به مولکول اکسیژن طی فعالیت‌های زنجیره انتقال الکترون در کلروپلاست، میتوکندری و غشای پلاسمایی و یا به‌عنوان محصول فرعی مسیرهای متابولیکی سلول تولید می‌شوند (Heyno *et al*., 2011). تنش‌های محیطی از جمله سرما، به‌دلیل ایجاد اختلال در فرآیندهای تعادل[3] سلولی منجر به افزایش تولید ROSها می‌شوند. افزایش بیش از حد میزان ROSها و یا حذف ناکارآمد آن‌ها سلول را در وضعیت تنش اکسیداتیو[4] قرار داده که می‌تواند تهدیدی برای سلول در اثر پراکسیداسیون چربی‌ها، اکسیداسیون پروتئین‌ها، خسارت اسیدهای نوکلئیک، مهار آنزیم‌ها و فعال‌سازی مسیر مرگ سلولی باشد (Mishra *et al*., 2011; Huang *et al*., 2012). با وجود اثرات مخرب، ROSها به عنوان مولکول‌های پیام رسان ثانویه[5]، در بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله پاسخ به تنش‌های سلولی شناخته شده‌اند (Heidarvand and Maali Amiri 2010). اینکه ROSهای سلولی به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان عمل کنند و یا اینکه خسارت اکسیداتیو به سلول وارد کنند بستگی به تعادل در تولید ROS و سیستم‌های حذف کننده[6] آن‌ها دارد. حذف موثر

[1] Electrolyte leakage index
[2] Reactive oxygen species
[3] Homeostasis
[4] Oxidative stress
[5] Secondary messengers
[6] Scavenging system

ROSهای تولیدشده تحت تنش سرما نیازمند فعالیت مکانیسم‌های دفاعی سلول از جمله آنتی-اکسیدان‌های آنزیمی[7] شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)[8]، کاتالاز (CAT)[9]، گایاکول پراکسیداز (GPX)[10]، آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوتاتیون مانند آسکوربات پراکسیداز (APX)[11] و گلوتاتیون ردوکتاز (GR)[12] در بافت‌ها و اندامک‌های سلولی می‌باشد (Foyer and Noctor 1998). زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی شامل کمپلکس‌های آنزیمی مختلفی است که در تامین شیب پروتون لازم برای تولید ATP نقش بسزایی دارند. مسیر اصلی این زنجیره که منجر به تولید انرژی می‌شود، مسیر تنفسی سیتوکروم سی اکسیداز (COX)[13] نام دارد که با استفاده از الکترون‌های ارسالی از استخر یوبیکوینول، اکسیژن را به آب احیا می‌کند (Wang *et al*., 2010). به‌موازات فعالیت مسیر COX، گیاهان پایانه اکسیداز تنفسی دیگری نیز به‌نام اکسیداز متناوب (AOX)[14]دارند که یوبیکوینول را اکسید کرده و اکسیژن را به آب احیا می‌کند (Vanlerberghe, 2013). AOX توسط یک خانواده ژنی در هسته کنترل‌شده که این خانواده ژنی شامل دو زیرخانواده با اسامی *aox1* و *aox2* می‌باشد. بیان ژن‌های *aox1* (مانند *aox1a* در آرابیدوپسیس و توتون) در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده و همچنین عدم کارکرد مناسب مسیر انتقال الکترون میتوکندریایی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Gandin *et al*., 2012). مسیر متناوب AOX احتمالا در تعدیل تولید ROSهایی که طی زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی تولید می‌شود، نقش دارد به طوری‌که تحت تاثیر تنش‌های محیطی میزان فعالیت آنزیم AOX افزایش می‌یابد و در نتیجه میزان ROS و در نهایت خسارت سلولی کاسته می‌شود (Vanlerberghe *et al*., 2009). به‌دلیل مشکلات کشت بهاره گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) از جمله خشکی و کمبود رطوبت آخر فصل که منجر به کاهش تولید تا میزان ۴۰۰-۳۰۰ کیلوگرم در هکتار می‌شود، کشت پاییزه این محصول با توجه به بارندگی و وجود رطوبت در پاییز و زمستان منطقی به نظر می‌رسد، لیکن سرما عامل محدودکننده در توسعه کشت پاییزه نخود محسوب می‌شود (Kazemi Shahandashti *et al*., 2013). مطالعه مسیر تنفسی AOX تحت تنش سرما در گیاه نخود به دلیل نقش احتمالی آن در تنظیم تولید ROSها می‌تواند در شناسایی مکانیسم‌های تحمل به تنش سرما و بکارگیری آن ها در برنامه‌های اصلاحی مفید باشد. در این پژوهش فعالیت آنزیم AOX به همراه برخی پاسخ های دفاعی دو ژنوتیپ متحمل و حساس نخود تحت تنش سرما بررسی شد.

[7] Enzymatic antioxidant
[8] Superoxide dismutase
[9] Catalase
[10] Guaiacol peroxidase
[11] Ascorbate peroxidase
[12] Glutathione reductase
[13] Cytochrome *c* oxidase
[14] Alternative oxidase

**مواد و روش‌ها**

بذور دو ژنوتیپ متحمل (Sel96Th11439) و حساس (ILC533) به تنش سرما نخود کابلی از موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور تهیه شد. بذور در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شده و پس از شستشو ۵ الی ۱۰ بذر در پتری‌دیش بر روی کاغذ صافی و آب مقطر جوانه زدند. گیاهچه‌ها به گلدان (نسبت ماسه، خاک رس و کود برگ ۱:۳:۱) انتقال داده شد و در اتاقک رشد در گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران با شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی و شدت نوری ۲۲۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۵ درصد به مدت ۲۱ روز نگه‌داری شدند. بخشی از گیاهان به‌عنوان نمونه‌های کنترل یا شاهد در چنین شرایطی حفظ شده و بخشی دیگر به دمای ٤ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و به‌مدت ٦ روز در آن دما نگه‌داری شد. نمونه‌برداری از برگ‌ها در روز اول، سوم و ششم تحت تیمار دمایی ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

در اندازه‌گیری میزان هدایت الکترولیتی از برگ‌های کاملاً سالم بخش میانی ساقه استفاده شد. هشتاد میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ده میلی‌لیتر آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب بهتر آب با استفاده از پمپ خلا هوای درون محیط خارج شده و لوله‌های آزمایش به مدت سی دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند. میزان هدایت الکترولیتی نمونه‌ها (EC1) با استفاده از دستگاه EC متر (Inolab، آلمان) قرائت شد. در مرحله دوم میزان هدایت الکترولیتی (EC2) محتوی لوله آزمایش، پس از ۱۰ دقیقه قرارگیری در حمام آب جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) و سپس ۳۰ دقیقه قرارگیری در دستگاه شیکر تعیین شد و در نهایت میزان شاخص خسارت براساس فرمول $I = \frac{Ec_1}{Ec_2} \times 100$ محاسبه شد (Popov et al., 2005).

در خصوص جداسازی میتوکندری، پنج گرم نمونه برگی از در ۲۰ میلی لیتر بافر استخرج شامل ۰/٤ مولار مانیتول، ۵۰ میلی‌مولار MOPS[15] (pH 7.2)، ۲ میلی‌مولار EGTA[16]، ٤ میلی‌مولار L-cystein، ۲۰ میلی‌مولار بتامرکاپتواتانول[17]، ۰/٦ درصد PVP[18] و ۰/۵ درصد BSA[19] در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد هموژنیزه شد. محلول حاصل با سرعت 4000×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول شناور در دو مرحله یکبار به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 2000×g و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت 10,000×g سانتریفیوژ شد. رسوب موجود در تیوب با بافر شست‌وشو شامل ۰/۳ مولار مانیتول، ۲۰ میلی مولار MOPS، ۰/۱ درصد حجمی Defatted BSA و یک میلی مولار EGTA هموژنیزه شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 2000×g سانتریفیوژ شد. پس از

[15] Morpholino propane sulfonic acid
[16] Ethylene glycol tetra acetic acid
[17] β-Mercaptoethanol
[18] Polyvinylpyrrolidone
[19] Bovine serum albumim

سانتریفیوژ محلول رویی به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت 15000×g، رسوب موجود در انتهای تیوب در بافر شست‌وشو هموژنیزه شد (Erdal *et al.*, 2015).

فعالیت AOX از طریق اسپکتروفتومتری تغییرات غلظت فرم اکسید (DQ) و احیای ($DQH_2$) دوروکوئینول[20] به دست آمد. فعالیت AOX در محیط S شامل ۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۱۰ میلی‌مولار $K_2HPO_4$ ، ۱۰ میلی‌مولار سدیم پیروات، ۵ میلی‌مولار DDT[21]، ۰/۰۲۵ درصد EDTA[22] ، ۱/۸ میکرومول میکسوتیوزول[23] و ۱۰ میلی‌مولار TES (تنظیم pH روی ۶/۸ توسط KOH) به دست آمد. فعالیت آنزیم AOX پس از افزودن ۲۰۰ میلی‌لیتر پیش‌ماده $DQH_2$ به ۲۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط S و اضافه نمودن ۲۰ میلی‌لیتر عصاره حاوی میتوکندری به‌کمک اسپکتروفتومتر (Shimadzu 160) در طول موج ۲۸۸ نانومتر قرائت شد (Affourtitand Moore 2003).

اندازه گیری فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز طبق روش Beyer and Fridovich (1987) انجام شد. فعالیت این آنزیم به صورت فتومتریک بررسی شد. بافر اصلی واکنش شامل بافر فسفات (pH=۷/۸) ۱۰۰ میلی مولار، متیونین۱۲ میلی مولار، نیتروبلو تترازولیوم ۷۵ میکرو مولار،EDTA ۱۰۰ میکرو مولارو ترایتون ایکس-۱۰۰ (۰/۰۲۵ درصد) بود. از بافر اصلی به هر چاهک به میزان۲۹۰ میکرو لیتر اضافه شد. سپس از بافر ریبوفلاوین ۲ میکرو مولار به میزان ۵ میکرو لیتر به مخلوط واکنش اضافه شد و دستگاه روی طول موج ۵۶۰ nm کالیبره شد. برای سنجش هر نمونه ۱۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استفاده شد. این واکنش بر اساس میزان احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم و توانایی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ممانعت از این واکنش بررسی شده است. میزان فعالیت آنزیم براساس واحد آنزیم در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌روش Scebba et al. (1998) اندازه‌گیری شد. مواد استفاده شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) ۵۰ میلی-مولار، ۵ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۳/۴۱ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه‌شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

محتوای $H_2O_2$ برگ با کمک ۰/۳۵ گرم از بافت برگی انجام شد. ابتدا برگ‌ها در ازت مایع ساییده‌شده و در حمام آب یخ با ۵ میلی‌لیتر TCA[24] ٪۰/۱ کاملا مخلوط شدند. مخلوط هموژن‌شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰×*g* به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار افزوده

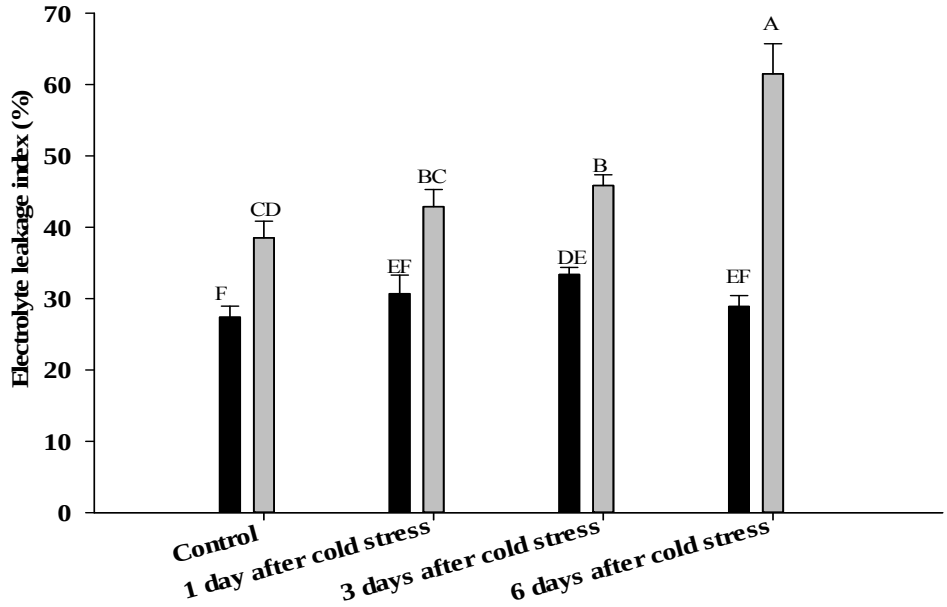
[20] Duroquinol
[21] Dithiothreitol
[22] Ethylenediaminetetraacetic acid
[23] Myxothiazol
[24] Trichloroacetic acid

شد. سپس یک میلی‌لیتر از یدید پتاسیم یک مولار به آن اضافه شده و میزان جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد (Loreto and Velikove 2001).

داده‌های آزمایشی بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار به کمک نرم‌افزار SPSS 20 تجزیه و تحلیل شد و میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل ژنوتیپ و تیمارهای دمایی از نظر صفات مورد بررسی تفاوت‌های معنی‌داری ($P\leq$۰,۰۱) داشتند که دلالت بر وجود تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها و نیز واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها تحت تیمارهای دمایی داشت. در این پژوهش ELI به‌عنوان شاخص فیزیولوژیکی در تعیین خسارت غشاء در ژنوتیپ‌های نخود به کار گرفته شد. آزمون مقایسه میانگین ELI، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای دمایی نشان داد که بیانگر تنوع بالقوه پاسخ‌های دو ژنوتیپ نخود تحت این شرایط بود (شکل۱). تحت دمای فیزیولوژیکی (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، میزان ELI در ژنوتیپ متحمل به‌طور معنی‌داری کمتر از ژنوتیپ حساس بود که بیانگر ظرفیت ژنتیکی متمایز آن‌ها می‌باشد. انتقال گیاهچه‌ها به دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در روز اول تغییر قابل توجهی در میزان ELI ایجاد نکرد. با این‌وجود در روز سوم و ششم تنش، میزان ELI در ژنوتیپ حساس افزایش معنی‌داری داشت در حالی‌که در ژنوتیپ متحمل تغییر معنی‌داری در میزان ELI مشاهده نشد. کمترین و بیشترین میزان ELI مربوط به ژنوتیپ متحمل و حساس در روز ششم تنش بود. بنابراین نتایج ELI تحت تنش‌های طولانی مدت (شش روز پس از تنش) احتمالا بیانگر درجه تحمل متفاوت دو ژنوتیپ استفاده شده در مقایسه با تنش‌های کوتاه مدت (یک روز پس از تنش) خواهد بود. به طور کلی میزان کم نشت الکترولیتی در سلول‌های برگ بیانگر تحمل گیاه به تنش سرما می‌باشد (Kazemi Shahandashti *et al*., 2014). بنابراین به نظر می‌رسد ژنوتیپ متحمل با میزان ELI کمتر تحت شرایط تنش از مکانیسم‌های دفاعی فعال‌تری برخوردار بوده که سبب نوعی سازگاری سلولی در آن شده است. افزایش میزان ELI به بالاتر از ۵۰ درصد بیانگر خسارت شدید سلولی و در نهایت مرگ آن می‌باشد که چنین وضعیتی در ژنوتیپ حساس مشاهده شد (Heidarvand *et al*., 2011).



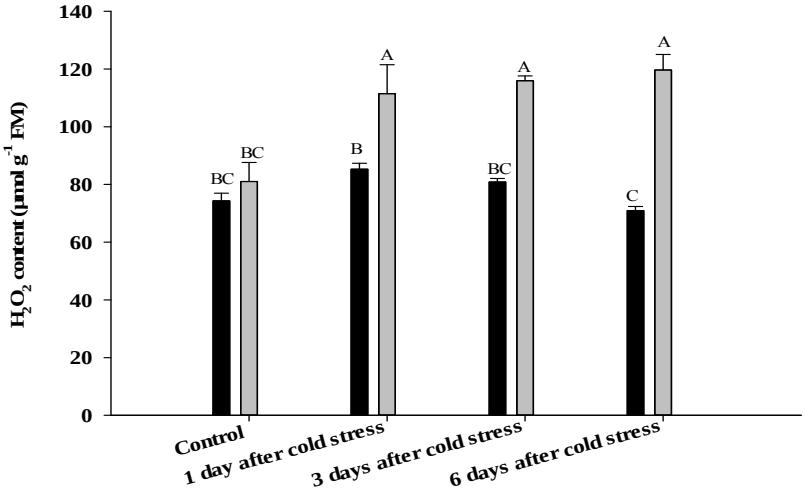

**شکل ۱- تغییر شاخص هدایت الکترولیتی (ELI) تحت شرایط کنترل، روز اول، روز سوم و روز ششم تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد در ژنوتیپ متحمل Sel96Th11439 (ستون سیاه) و ژنوتیپ حساس ILC 533 (ستون خاکستری) نخود.**

**Figure 1- Change in electrolyte leakage index ELI in the leaves of tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C) and day 1, day 3 and day 6 of cold stress (4°C).**

میزان بالاتر ELI تحت تنش سرما ناشی از تولید ROS بوده که در نهایت منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود (Heidarvand and Maali-Amiri 2013). بنابراین، در این آزمایش الگوی تغییر میزان $H_2O_2$ طی روزهای مختلف تنش سرما اندازه‌گیری شد. این مولکول برخلاف سایرROSها، نیمه عمر بیشتری داشته و قادر به انتشار مابین غشاهای زیستی می‌باشد و به‌عنوان مولکول پیام‌رسان در محلی به‌دور از محل تولید خود، سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شود (Bienert *et al*., 2007). نتایج نشان داد که در ژنوتیپ متحمل، میزان $H_2O_2$ بعد از یک افزایش معنی‌دار طی روزهای اول و سوم تنش، در روز ششم کاهش یافت به طوری‌که تحت چنین شرایطی به کم‌ترین سطح بین تیمارهای آزمایشی رسید. تحت چنین شرایطی میزان $H_2O_2$ در ژنوتیپ حساس به طور مهیجی در مقایسه با شرایط کنترل افزایش یافت (حدود ۳۳٪) (شکل ۲). چنین وضعیتی ضمن تایید نتایج ELI بیانگر توسعه تنش اکسیداتیو تحت تنش

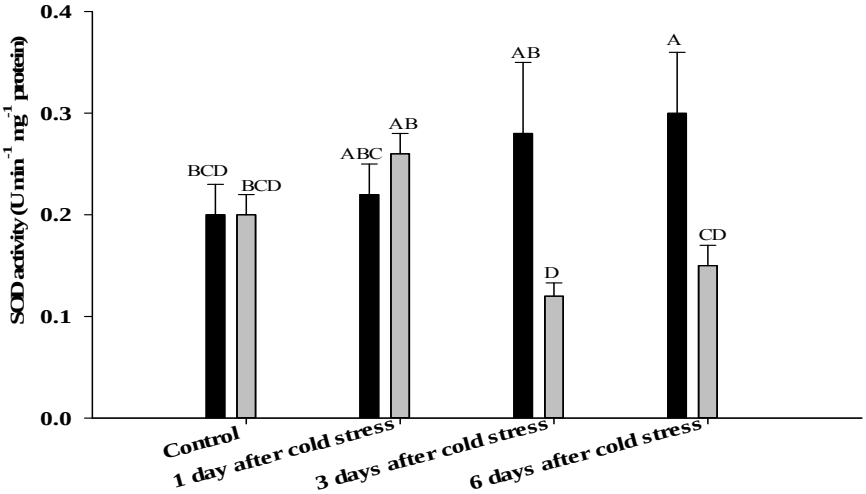
سرما (در مقایسه با شرایط کنترل) در ژنوتیپ حساس (در مقایسه با ژنوتیپ متحمل) می‌باشد. بنابراین در نخود، درجه پاسخ به تنش سرما وابسته به ژنوتیپ متفاوت بوده که مطالعه الگوهای خسارت در شرایط کنترل و تنش نشان دهنده آن بودند (Nazari *et al*., 2012).

SOD و CAT مولکول‌های فعال در سازوکارهای دفاعی سلول تلقی شده که به ترتیب نقش مهمی در تولید و تخریب $H_2O_2$ دارند (Kazemi Shahandashti *et al*., 2014). نتایج نشان داد که از نظر فعالیت آنزیمی، دو ژنوتیپ پاسخ‌های متفاوتی به سرما نشان دادند. سطوح فعالیت SOD در ژنوتیپ حساس پس از تغییر جزئی در روز اول تنش، به تدریج طی روزهای سوم و ششم تنش کاهش یافت به طوری که به کمترین میزان فعالیت خود رسید در حالی‌که در ژنوتیپ متحمل افزایش تدریجی در میزان فعالیت SOD مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت SOD (حدود ۵۰ درصد) در روز ششم تنش سرما بود. در روز اول تنش، میزان فعالیت CAT در ژنوتیپ متحمل کاهش یافته در حالی‌که در روز سوم و ششم تنش افزایش معنی‌داری مشاهده شد، در نتیجه فعالیت آن به سطوح مشاهده شده در شرایط کنترل رسید. فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ حساس، کاهشی در حدود ۵۲ درصد در روز سوم تنش درمقایسه با کنترل نشان داد.




**شکل ۲- تغییر میزان پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) تحت شرایط کنترل، روز اول، روز سوم و روز ششم تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد در ژنوتیپ متحمل Sel96Th11439 (ستون سیاه) و ژنوتیپ حساس ILC 533 (ستون خاکستری) نخود.**

**Figure 2- Change in hydrogen peroxide ($H_2O_2$) content in the leaves of tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C) and day 1, day 3 and day 6 of cold stress (4°C).**

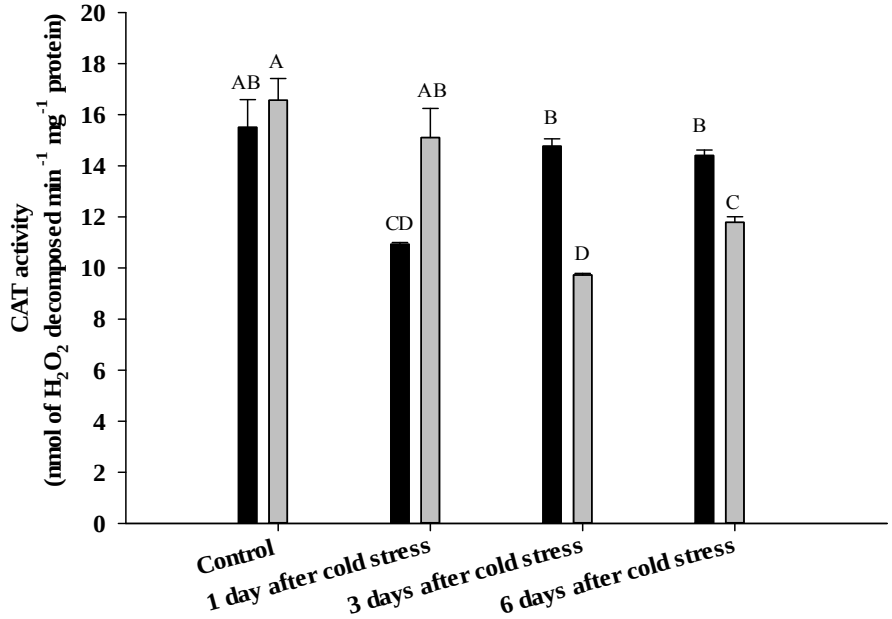



**شکل ۳- تغییر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) تحت شرایط کنترل، روز اول، روز سوم و روز ششم تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد در ژنوتیپ متحمل Sel96Th11439 (ستون سیاه) و ژنوتیپ حساس ILC 533 (ستون خاکستری) نخود.**

**Figure 3- Change of activity in superoxide dismutase (SOD) in the leaves of tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C) and day 1, day 3 and day 6 of cold stress (4°C).**

اگرچه فعالیت آن در روز ششم تنش بیشتر از روز سوم تنش بود اما در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری در فعالیت CAT مشاهده شد (شکل ۳ و ٤). بنابراین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مطالعه شده در این تحقیق با یکدیگر همکاری کرده به طوری که افزایش فعالیت همزمان آن‌ها سبب کاهش میزان خسارت سلولی (ELI) و همچنین کاهش $H_2O_2$ به عنوان یکی از ROSهای تولیدی سلول شده است. در میتوکندری گیاهان، فرآیند انتقال الکترون، تولید ROS و در نهایت میزان ATP پیچیده می‌باشد زیرا تحت تنش، مسیر متناوب دیگری از جریان الکترون به‌سمت آنزیم AOX ایجاد شده که یک نوع انعطاف‌پذیری بین سه فرآیند متابولیسم کربن، انتقال الکترون و تولید ATP فراهم می-آورد (Vanlerberghe 2013). بنابراین در مرحله بعدی، فعالیت آنزیم AOX به‌عنوان یکی از کمپلکس‌های آنزیمی مهم در زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی گیاهان سنجیده شد.

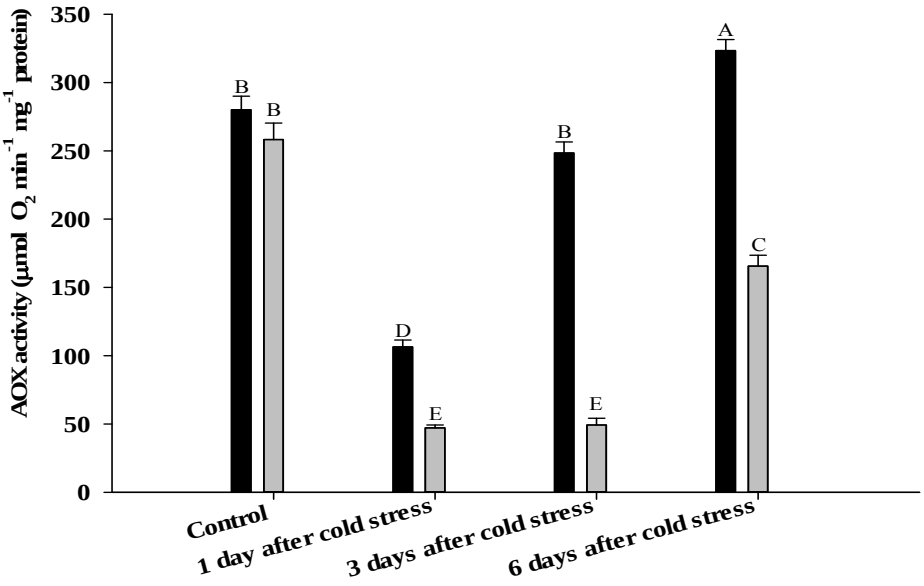
میزان فعالیت آنزیم AOX با طولانی‌تر شدن دوره تنش از روز اول به ششم در هر دو ژنوتیپ پس از یک کاهش معنی‌دار، افزایش نشان داده که بیانگر نقش موثر این آنزیم در پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاه به تنش سرما بود




**شکل ٤- تغییرفعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) تحت شرایط کنترل، روز اول، روز سوم و روز ششم تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد در ژنوتیپ متحمل Sel96Th11439 (ستون سیاه) و ژنوتیپ حساس ILC 533 (ستون خاکستری) نخود.**

**Figure 4- Change of activity in catalase (CAT) in the leaves of tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C) and day 1, day 3 and day 6 of cold stress (4°C).**

. با این‌وجود میزان فعالیت AOX در ژنوتیپ متحمل بسیار بیشتر از ژنوتیپ حساس بود طوری‌که این روند صعودی برخلاف ژنوتیپ حساس در روز سوم پس از تنش آغاز شد و در روز ششم پس از تنش به حداکثر میزان خود رسید (شکل ٥). تحقیقات نشان داده است که فعالیت AOX تولید $O_2^{\cdot-}$ را تعدیل کرده که به‌نوبه خود تبدیل آن به سایر گونه‌های ROS مانند $H_2O_2$ و $^{\bullet}OH$ را کاهش می‌دهد (Rogov*et al*., 2014). به نظر می‌رسد که تحت تنش پیام‌رسانان تنش اکسیداتیو و خصوصیات غشای پلاسمایی (نتایج ELI و $H_2O_2$) به عنوان عوامل اساسی در تنظیم فعالیت ژن‌های *aox* عمل کرده که در نهایت سبب مهار تولید ROS (در این آزمایش $H_2O_2$) می‌شود (شکل ۱ و ۲).




**شکل ۵- تغییر فعالیت آنزیم اکسیداز متناوب (AOX) تحت شرایط کنترل، روز اول، روز سوم و روز ششم تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد در ژنوتیپ متحمل Sel96Th11439 (ستون سیاه) و ژنوتیپ حساس ILC 533 (ستون خاکستری) نخود.**

**Figure 5- Change of activity in alternative oxidase (AOX) in the leaves of tolerant (Sel96Th11439) and susceptible (ILC533) chickpea genotypes (black and light gray bars, respectively) grown under control (23°C) and day 1, day 3 and day 6 of cold stress (4°C).**

تحقیقات درتوتون نشان داده است که انتقال گیاهان به شرایط سرما باعث القای فعالیت آنزیم AOX می‌شود به طوری‌که میزان مالون دی‌آلدئید[۲۵] (MDA) به عنوان یکی از شاخص‌های خسارت سلولی کاهش یافت (Wang *et al*., 2011).

بنابراین، در میتوکندری تغییر در تولید ROS در اثر تغییر در ظرفیت مهار ROS سلول رخ می‌دهد. این بدان معنی است که مکانیسم‌های کنترلی تولید ROS میتوکندریایی مانند AOX می‌توانند اهمیت زیادی در تعیین اینکه چگونه سلول میزان ROS خود را مدیریت کرده و سطح ثابت ROS سلولی را تعیین کند، دارند (Amirsadeghi *et al*., 2006).

ارتباط بین خسارت سلولی (ELI) و فعالیت آنزیم AOX در این آزمایش غیرهمسو بوده به طوری که میزان بالاتر فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ متحمل با کاهش خسارت سلولی در ارتباط بود. نکته جالب آن است که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز به موازات افزایش فعالیت آنزیم AOX در نخود مخصوصا در ژنوتیپ متحمل افزایش یافت. به نظر می‌رسد مسیر AOX و مسیر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول با یکدیگر همکاری داشته که در نتیجه آن بیشترین مهار تولید $H_2O_2$ و میزان ELI با

[25] Malondialdehyde

بیشترین فعالیت آنزیم AOX و آنتی‌اکسیدان‌ها همراه بود.

افزایش فعالیت آنزیم AOX نشان داد که القای فرآیند سازگاری سلولی در جهت مهار ROS ممکن است در سطح رونویسی و ترجمه صورت گیرد طوری‌که انتقال گیاهچه‌ها به سرما، در مسیر انتقال الکترون در میتوکندری اختلال ایجاد کرده و گیاه با سنتز پروتئین AOX و همچنین افزایش فعالیت آن به این شرایط پاسخ دهد که در نتیجه آن میزان ROS سلولی کاهش می‌یابد (نتایج $H_2O_2$ و ELI). ژنوتیپ حساس نخود به دلیل فعالیت کمتر آنزیم AOX به موازات ظرفیت کاهش یافته فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دچار خسارت بیشتری در مقایسه با ژنوتیپ متحمل شد. مطالعه بهتر و دقیق‌تر مکانیسم فعالیت این آنزیم و اعضای خانواده آن و همچنین مطالعه راهکارهای افزایش بیان و فعالیت این آنزیم در نخود زراعی راهکاری مهم در تحمل به تنش سرما در این گیاه بوده به - طوری‌که بکارگیری آن‌ها کشت پاییزه این گیاه را ممکن می‌سازد.

## منابع


Affourtit C, Moore AL (2003). Purification of the plant alternative oxidase from Arum maculatum: measurement, stability and metal requirement. Biochimicae Biophysica Acta 1608: 181-189.

Amirsadeghi, S, McDonald AE, Robson, C.A, Vanlerberghe GC (2006). Changes in plant mitochondrial electron transport alter cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signaling molecules. Plant Cell Physiology 47: 1509-1519.

Beyer WF, Fridovich I (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in condition. Analytical Biochemistry 161: 559–566.

Bienert GP, Kristiansen KA, Møller ALB (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. Journal of Biological Chemistry 282: 1183-1192.

Erdal S, Genisel M, Turk H, Dumlupinar R, Demir Y (2015). Modulation of alternative oxidase to enhance tolerance against cold stress of chickpea by chemical treatments. Journal of Plant Physiology 175: 95-101.

Foyer CH, Noctor G (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Biology 49: 249-279.

Gandin A, Duffes C, Day DA, Cousins AB (2012). The absence of alternative oxidase AOX1A results in altered response of photosynthetic carbon assimilation to increasing $CO_2$ in Arabidopsis thaliana. Plant and Cell Physiology 53: 1627-1637.

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

Heidarvand L, MaaliAmiri R (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress? Acta Physiologiae Plantarum 32:419-432.

Heidarvand L, Maali Amiri R, Naghavi MR, Farayedi Y, Sadeghzadeh B, AlizadehKh (2011). Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. Russian Journal of Plant Physiology 58: 157-163.

Heidarvand L, Maali-Amiri R (2013). Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. Journal of Plant Physiology 170: 459-469.

Heyno E, Krieger-Liszkay A, Mary V, Schopfer P (2011). Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. Planta 234: 35-45.

Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. Molecular Biology Reports 1: 969-987.

Kazemi Shahandashti SS, MaaliAmiri R, Ramezanpour SS, Zeinali H (2013). Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced resposes in chickpea. Molecular Biology Reports 40: 893-903.

Kazemi Shahandashti SS, Khazaei M, Maali-Amiri R, Ramezanpour SS, Talei AR, Zeinali H (2014). Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. Journal of Plant Physiology 171: 1106-1116.

Loreto F, Velikova V (2001). Isoprene production by leave protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Plant Physiology 127: 1781-1787.

Mishra S, Jha AB, Dubey RS (2011). Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. Protoplasma 248: 565-577.

Nazari M, MaaliAmiri R, Mehraban FH (2012). Change in antioxidant responses against damage in black chickpea following cold acclimation. Russian Journal of Plant Physiology 59: 183-189.

Popov VN, Orlova IV, Kipaikina NV, Serebriiskaya TS, Merkulova NV, Nosov AM,Trunova TI, Tsydendambaev VD, Los A D (2005). The effect of tobacco plant transformation with a gene for acyl lipid Δ9-desaturase from *Synechococcus vulcanus* on plant chilling tolerance. Russian Journal of Plant Physiology 52: 664-667.

Rogov AG, Sukhanova EI, Uralskaya LA, Aliverdieva DA, Zvyagilskaya RA (2014). Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. Biochemistry (Moscow) 79: 1615-1634.

Scebba F, Sebastiani L, Vitaglianpo C (1998). Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (Triticumaestivum) seedlings under cold acclimation. Physiologia Plantarum 104: 747–752.

Vanlerberghe GC, Cvetkovska M, Wang J (2009). Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? Physiologia Plantarum 137: 392-406.

Vanlerberghe GC (2013). Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. International Journal of Molecular Science 14: 6805-6847.

Wang J, Rajakulendran N, Amirsadeghi S, Vanlerberghe GC (2011). Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature. Physiologia Plantarum 142: 339-351.

# Evaluation of some defense enzymes activities in chickpea plants under cold stress

**Karami S.[1], Maali-Amiri R.[*2], Vafaee H.[3], Naziri Y.[4]**

[1] MSc Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
[2] Associate Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
[3] BSc Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
[4] BSc Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

## Abstract

Plants require different defensive mechanisms for being survive and tolerance to environmental stresses. In present study, activity of defensive enzymes such as alternative oxidase (AOX), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), electrolyte leakage index (ELI) and hydrogen peroxide ($H_2O_2$) amount as a cellular damage indices in two genotypes of chickpea, susceptible (ILC533) and tolerant (Sel96Th11439) under 4°C cold stress was evaluated. Statistical analyses results showed that there is a significant difference between genotypes under cold stress. Under cold stress, decrease in damage indices was accompanied with an increase in AOX activity. The maximum activity of AOX was seen in tolerant genotype on sixth day of cold stress, whereas under such conditions AOX activity in susceptible genotype significantly was lower compared to tolerant genotype. The increase in AOX activity which was accompanied with a decrease in cellular damage (ELI and $H_2O_2$ results) particularly on sixth day of cold stress showed the significance of AOX enzyme in tolerance of chickpea plants to cold stress. The simultaneous and significant increase in SOD and CAT activities along with confirmation the results of AOX activity increased degree of genetic tolerance of chickpea to cold stress or plant recovery after exposure to cold stress. These indices may be useful in assessment of chickpea genotypes under cold stress or utilization them in breeding programs.

**Key words**: ***alternative oxidase, cold, electrolyte leakage, chickpea.***

* Corresponding Author: Maali-Amiri Tel: 09124190124 Email: rmamiri@ut.ac.ir