

ارزیابی تغییرات سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی ارقام سویا در واکنش به تنش خشکی طی مراحل رشد زایشی

Evaluation of Enzymatic and Non-enzymatic Defense Mechanism in Response to Drought Stress During Growth Stage in Soybean

سعید نواب پور^{۱*}، سیده ساناز رضانبور^۲ و ابوالفضل مازندرانی^۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۵/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۶/۲۶

چکیده

سویا گیاهی دیپلوئید با سازگاری نسبی گسترده در شرایط مختلف محیطی است. تنش خشکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصول سویا در مناطق خشک و نیمه‌خشک به‌شمار می‌رود. علاوه بر تغییرات فیزیولوژیک ناشی از بروز تنش، خسارت فزاینده عوامل اکسنده نیز موجب محدودیت رشد و تولید می‌گردد. در این تحقیق میزان رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن، مقادیر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، تغییرات اسید اسکوربیک، آلفا توکوفرول، کاروتنوئید و میزان شاخص اکسیداسیون سلولی در سه ژنوتیپ سویا (DPX، ساری و لاین WE6) تحت شرایط تنش خشکی شامل آبیاری بعد از ۵۰ میلی‌متر تبخیر به‌عنوان تیمار شاهد (عدم تنش)؛ آبیاری بعد از ۱۰۰ میلی‌متر تبخیر و آبیاری بعد از ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر) در مراحل زایشی (گلدهی، غلاف‌بندی و پر شدن دانه) اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش برای تمامی صفات معنی‌دار گردید. بر این اساس افزایش میزان آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و عوامل پاد اکسیدان غیر آنزیمی (اسید اسکوربیک، کاروتنوئید و آلفاتوکوفرول)، بیانگر نقش فعال سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی ژنوتیپ‌های سویا در پاسخ به تنش خشکی بود. رقم DPX و لاین WE6 با داشتن خصوصیات مطلوب‌تر از لحاظ میزان فعالیت عوامل پاد اکسیدانی تحت تنش خشکی برتری معنی‌داری نسبت به رقم ساری نشان دادند که بیانگر تحمل نسبی بیشتر آن‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: سویا، تنش اکسیداتیو، سیستم دفاعی پاد اکسیدان، رادیکال‌های فعال اکسیژن

۱ و ۲. دانشجویان ارشد اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳. دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: s.navabpour@yahoo.com

*: نویسنده مسئول

مقدمه

سویا با نام علمی *Glycine max* L. گیاهی دیپلوئید با $2n = 2x = 40$ کروموزوم، دارای دامنه نسبتاً گسترده‌ای از انطباق با شرایط آب و هوایی و خاک است (بورتون^۱، 1977). سویا در طی دوره رشد به شش تا هفت هزار مترمکعب آب نیاز دارد و به جزء در مناطق پر باران، زراعت دیم آن امکان‌پذیر نمی‌باشد. این گیاه در زمان رشد رویشی تا نزدیک گلدهی تا حدودی به تنش آبی مقاوم بوده ولی در دوره رشد زایشی به آبیاری منظم نیاز دارد (سینگ و والینگفورد^۲، 2010). کم‌آبی اولین عامل محدودکننده تولید سویا در مناطق نیمه‌خشک می‌باشد (مینگ و همکاران^۳، 2007). یکی از راه‌کارهای افزایش عملکرد سویا انتخاب ارقام مقاوم و سازگار با شرایط اقلیمی خشک یا کم‌آب است (آزادبخت^۴ و همکاران، 2003). تحمل خشکی یا مقاومت گونه‌های یک گیاه، شامل چندین سازوکار فیزیولوژیکی می‌باشد (نیلسن و اورکات^۵، 1996). بنابراین، درک رفتار فیزیولوژیکی گیاه در واکنش به خشکی برای رسیدن به تصویر کاملی از مکانیسم مقاومت گیاه ضروری است. اخیراً نتایج برخی تحقیقات نشان داده است که علاوه بر تغییرات فیزیولوژیکی که در اثر کمبود آب در گیاه ایجاد می‌شود، صدمات اکسیداتیو نیز از عوامل مهم محدودکننده رشد و تولیدات گیاهی هستند که در اثر وجود شرایط حاصل از تنش ایجاد می‌شوند (آلن^۶، 1995؛ آریانو^۷ و همکاران، 2005). خسارت ناشی از بروز تنش در سطح سلولی به دلیل وقوع تنش اکسیداتیو و برهم خوردن تعادل اکسیداسیون و احیاء رخ می‌دهد (مکرنس^۸ و همکاران، 2001). در زمان تنش خشکی برای حفظ رطوبت موجود در گیاه روزه‌ها بسته می‌شوند؛ این موضوع ضمن کاهش تبادل گازی در برگ‌ها منجر به ایجاد H_2O_2 و سایر گونه واکنشگر اکسیژن^۹ (ROS) در بافت‌ها می‌گردد (لونا^{۱۰} و همکاران، 2004). این مولکول‌های فعال موجب صدمه به ماکرومولکول‌ها و نیز ساختار سلولی گردیده یا این که به‌عنوان مولکول منفرد موجب فعال شدن سلسله پاسخ‌های دفاعی گیاهان می‌گردند (آریانو و همکاران، 2005).

برای خنثی نمودن اثرات سمی و مخرب ROS، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی در سلول‌های گیاه فعال شده و میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله این سیستم تنظیم می‌شود (گیچو^{۱۱} و همکاران، 2002). سیستم دفاعی آنزیمی شامل آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز^{۱۲} (SOD) و کاتالاز^{۱۳} (CAT) است و سیستم دفاعی غیر آنزیمی شامل آنتی‌اکسیدانت‌هایی مانند اسید آسکوربیک (ویتامین C)، آلفاتوکوفرول (ویتامین E) و کاروتنوئیدها می‌باشد (بیابر^{۱۴}، 2004). تفاوت عمده گیاهان حساس و مقاوم، در میزان فعالیت این سیستم‌های دفاعی در برابر تنش‌ها می‌باشد (هسو و کائو^{۱۵}، 2003). نتایج تحقیقات مختلف مبین یک ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود و افزایش میزان غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجود در گیاهان است (سایرام و ساکسنا^{۱۶}، 2000؛ سایرام و سیرواستاوا^{۱۷}، 2002). تنش خشکی میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش می‌دهد (لاسانو^{۱۸} و همکاران، 2005). تاکنون پژوهش‌های زیادی در راستای شناسایی نقش این عوامل در شرایط آزمایشگاه صورت گرفته است. این تحقیق به منظور ارزیابی نقش سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی تحت تنش خشکی در ژنوتیپ‌های سویا و در شرایط مزرعه انجام گرفت. بدین منظور میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن (سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن) در سطوح مختلف تنش خشکی طی مراحل رشد زایشی و همچنین ارزیابی میزان فعالیت سیستم پاد اکسیدانی آنزیمی (با اندازه‌گیری مقادیر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز)، سیستم پاد اکسیدان غیر آنزیمی (با ارزیابی میزان تغییرات اسید آسکوربیک، آلفا توکوفرول و کاروتنوئید) و در نهایت میزان پراکسیداسیون چربی‌ها با انجام سنجش اسید تیوباربیتوریک^{۱۹} (TBARM) اندازه‌گیری شد.

11. Gechev
12. Super Oxide Dismutase (SOD)
13. Catalase
14. Biaber
15. Hsu and Kao
16. Sairam and Saxena
17. Sairam and Srivastava
18. Lascano
19. Thiobarbituric acid reactive material

1. Burton
2. Singh and Walingford
3. Ming
4. Azadbakht
5. Nilsen and Orcutt
6. Allen
7. Ariano
8. Mackeress
9. Reactive Oxygen Species (ROS)
10. Luna

رسم نمودارها به ترتیب با استفاده نرم افزار SAS 9.1 و Excel 2010 صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

ارقام آزمایشی شامل DPX، ساری و لاین WE6 بودند. ارقام DPX و ساری از ارقام تجاری هستند که به طور رایج در استان‌های شمالی کشت می‌شوند. لاین WE6 از لاین‌های اصلاحی و معرفی نشده مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان می‌باشد که در مرحله ارزیابی عملکرد می‌باشد. ارقام مزبور براساس پتانسیل عملکرد و ویژگی‌های ظاهری انتخاب شدند.

نحوه اعمال تنش

تیمارهای خشکی شامل آبیاری بعد از ۵۰ میلی‌متر تبخیر به‌عنوان تیمار شاهد (عدم تنش)، آبیاری بعد از ۱۰۰ میلی‌متر تبخیر به‌عنوان سطح اول تنش و آبیاری بعد از ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر از سطح تشتک تبخیر کلاس A به‌عنوان سطح دوم تنش بود. برای انجام آبیاری میزان تبخیر صورت گرفته از روی تشتک تبخیر کلاس A موجود در کنار مزرعه قرائت و براساس تیمارهای موجود آبیاری انجام شد. بدین‌منظور مقدار رطوبت خاک در حالت ظرفیت زراعی اندازه‌گیری شد و براساس اندازه کرت‌ها مقدار آب مورد نیاز هر کرت تعیین گردید. همچنین با اندازه‌گیری دبی آب ورودی به کرت‌ها مقدار زمان آبیاری هر کرت برای رسیدن به ظرفیت زراعی نیز تعیین شد و آبیاری بر این اساس صورت گرفت. به‌منظور دقت در اعمال تنش، عدد مربوط به سطح آب موجود در تشتک تبخیر به‌طور روزانه یادداشت می‌شد.

اندازه‌گیری رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن

میزان یون سوپراکسید (O_2^-) با استفاده از روش استنر و هیوپل^۱ (1976) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد. یک گرم نمونه برگ یخ زده به‌طور یکنواخت کوبیده و مقدار ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۵ mM (pH=7.8) به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. یک میلی‌لیتر از محلول فوق برداشت و به‌همراه ۰/۹ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۵ mM، ۰/۱ میلی‌لیتر هیدروکلراید هیدوکسیل‌آمین ۱۰ mM در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. پس از آن مقدار معادل حجم محلول اتیل اتر اضافه شد و با دور ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (BR-Technologies مدل BT 600) خوانده شد. با استفاده از منحنی نرمال استاندارد، مقدار یون سوپراکسید بر حسب واحد تنظیم گردید.

میزان رادیکال پراکسید هیدروژن با کمک روش برنان و فرنکل^۲ (1977) و با استفاده از کمپلکس پراکسید تیتانیوم انجام شد. میزان جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت و به‌وسیله منحنی استاندارد غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تصحیح گردید و نتایج بر حسب واحد تنظیم شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پاد اکسیدان

میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کل با روش جیانو پولیتیس و ریس^۳ (1977) به شرح زیر اندازه‌گیری شد. یک گرم نمونه یخ زده کوبیده شده و یکنواخت گردید. سپس مقدار ۰/۱ گرم آن با ۳ میلی‌لیتر محلول واکنش شامل (بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM (pH=7.8)، متیونین ۱۳ mM، تترازایلوم ۷۵ μ M، ریپوفلاوین ۲ μ M، EDTA ۱ mM و آنزیم استخراج ۱۰۰ μ l) مخلوط و یکنواخت گردید. مخلوط در شرایط نوری ۵۰۰۰ لوکس به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. کالیبراسیون با افزودن یک واحد آنزیم سوپر اکسید برای احیاء ۵۰ درصد تترازایلوم افزوده و میزان فعالیت با طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (BRITE-Technologies مدل BT 600) قرائت شد.

طرح آماری و نمونه‌برداری

آزمایش به‌صورت کرت‌های خرد شده با طرح پایه بلوک کامل تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. فاکتور اصلی شامل سه سطح آبیاری (آبیاری بعد از ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر از سطح تشتک تبخیر کلاس A) بود. سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ به ترتیب به‌عنوان شاهد، سطح اول تنش و سطح دوم تنش در نظر گرفته شدند. ترکیب فاکتوریل رقم و مرحله رشد (گله‌ی، غلاف‌بندی و پرشدن دانه) نیز به‌عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شدند. نمونه‌برداری تصادفی از برگ در مراحل گله‌ی، غلاف‌بندی و پرشدن دانه صورت گرفت. بدین‌صورت که در هر یک از مراحل از هر تیمار و تکرار ابتدا پنج بوته به‌طور تصادفی انتخاب گردید سپس دو برگ به‌طور تصادفی از هر بوته برداشت و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شدند و به فریزر ۸۰- درجه منتقل گردید. تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی و

1. Elstner and Heupel
2. Brennan and Frenkel
3. Giannopolitis and Ries

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز I با استفاده از روش اِبی^۱ (1984) به شرح زیر تعیین گردید. ۰/۵ گرم نمونه یخ زده برگ کوبیده و به میزان ۰/۱ آن در ۳ میلی‌لیتر بافر واکنش شامل (بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM، pH=7.8)، استاندارد پراکسید هیدروژن و آنزیم استخراج (۲۰۰ μl) مخلوط و یکنواخت گردید. میزان جذب محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (BR-Technologies مدل BT 600) قرائت شد.

اندازه‌گیری عوامل پاد اکسیدان غیر آنزیمی

میزان نمک اسکوربات سدیم با کاربرد روش آراکاو^۲ و همکاران (1981) به شرح زیر صورت پذیرفت. مقدار ۰/۵ گرم نمونه یخ زده در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدتری کلرو استیک ۵ درصد به‌طور یکنواخت مخلوط شد. مخلوط حاضر به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی به آرامی جداسازی و میزان جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد در دامنه ۰-۲۵ نانومول تهیه و نتایج حاصله از نمونه بر حسب استاندارد تنظیم گردید.

میزان آلفا توکوفرول با استفاده از روش مون-بوش و همکاران^۳ (1999) اندازه‌گیری شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه یخ زده برگ در ازت مایع به‌طور یکنواخت کوبیده شد و مقدار ۵ میلی‌لیتر متانول حاوی یک درصد اسکوربات به آن اضافه گردید. با افزودن ۴ میلی‌لیتر هگزان مخلوط حاضر به‌مدت یک دقیقه ورتکس و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شد. لایه هگزان فوقانی با دقت حذف و با کمک محفظه خلاء نسبی خشک گردید. مقدار ۲ میلی‌لیتر متانول به نمونه اضافه و محلول یکنواخت حاصل به دستگاه اچ-پی-ال-سی (HPLC) منتقل شد. میزان آلفا توکوفرول جدا شده به‌وسیله ستون التا سفر با (OD=۵μm) در شدت ۱/۵ میلی-لیتر بر دقیقه خالص‌سازی شد و غلظت آن با کمک دستگاه آشکارساز فرابنفش در طول موج برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر و خروجی ۳۲۸ نانومتر تعیین گردید.

مقدار کاروتنوئید با انجام اسپکتوفوتومتری و استفاده از روش لیچتن تالر^۴ (1987) اندازه‌گیری شد.

سنجش TBARM

در این سنجش که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است، مقدار مالون دی‌آلدید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ است اندازه‌گیری می‌شود. در این خصوص از روش هنگ^۵ و همکاران (1990) با تغییراتی استفاده گردید. مقدار ۰/۵ گرم برگ هموژنیزه و یک میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (۰/۱۵ w/v) به آن اضافه شد. محلول حاضر پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون به شدت مخلوط شد و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب کوچک حاصل از سانتریفیوژ با ۵ میلی‌لیتر استون شستشو شد، پس از ورتکس مجدداً با همان دور به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس به آن مقدار ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک (۰/۱ w/v) و یک میلی‌لیتر اسید تیوباریوریک (۰/۵ w/v) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف شد و مقدار جذب محلول حاصل را با طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه جذب نوری (BR-Technologies مدل BT 600) اندازه‌گیری گردید.

نتایج

نتایج مربوط به تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی نشان‌دهنده وجود اختلافات معنی‌دار بین تیمارها بود (جدول ۱). معنی‌دار شدن اثر تنش، برای تمامی صفات به نوبه خود به تغییرات متفاوت میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن، عوامل پاد اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی تحت سطوح مختلف تنش اشاره دارد. همچنین معنی‌دار شدن اثر رقم و مرحله نیز می‌تواند بیانگر عکس‌العمل متفاوت ارقام به تنش در مراحل مختلف رشدی باشد.

1. Aebi
2. Arakawa
3. Munné-Bosch
4. Lichtenthaler

5. Hagege

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک کامل تصادفی

Table 1: Analysis of variance of evaluated traits in split plot format based on randomized complete block design

		میانگین مربعات Sum of Square							درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Source of variable
آلفا توکوفرول α - tocopherol	کاروتنوئید Carotenoid	تیوباربیتوریک اسید TBARM test	اسید آسکوربیک Ascorbic acid	آنزیم کاتالاز Catalase enzyme	یون پراکسید هیدروژن Peroxide hydrogen ion	آنزیم سوپراکسید دیسموتاز Super oxide dismutase enzyme	یون سوپراکسید Super oxide ion			
5.51 ^{ns}	3.78 ^{ns}	4.01 ^{ns}	1.02 ^{ns}	1.89 ^{ns}	1.33 ^{ns}	1.7 ^{ns}	1.2 ^{ns}	3	بلوک Block	
17.01*	21.11**	19.71**	8.11**	11.10*	7.02*	11.07*	6.93*	2	تنش Stress	
2.13	1.73	1.80	0.7	3.01	1.08	1.43	0.73	6	خطای (I) Error (I)	
16.81**	17.81**	13.01**	7.14**	7.81**	5.73**	6.11**	4.85**	2	رقم Cultivar	
26.13**	30.17**	25.39**	10.03**	8.91**	3.13*	17.08**	4.15**	2	مرحله Stage	
11.32**	33.07**	3.01 ^{ns}	2.01*	4.57*	2.58*	10.37**	2.01*	4	رقم×تنش Cultivar × Stress	
19.03**	17.09**	3.18 ^{ns}	1.42 ^{ns}	2.17 ^{ns}	2.31*	1.13 ^{ns}	1.08 ^{ns}	4	مرحله × تنش Stage × Stress	
5.59*	10.31**	5.83*	2.43*	4.31*	1.87*	5.03*	1.25 ^{ns}	4	رقم × مرحله Cultivar × Stage	
14.38**	13.86**	2.63 ^{ns}	1.21 ^{ns}	3.09*	2.05*	2.67*	1.53*	8	رقم × مرحله × تنش Cultivar × Stage × Stress	
2.11	1.59	1.41	0.61	1.51	0.78	1.3	0.58	72	خطای (II) Error (II)	

ns, * و ** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطوح پنج و یک درصد

ns, * and ** non-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively

پیدا کرد. در مرحله غلافبندی (ب) میزان رادیکال‌های سوپراکسید افزایش یافت و این افزایش تحت شرایط تنش خشکی بیشتر از شرایط عدم تنش بود. مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز در این مرحله و در سطح دوم تنش به دو برابر مقدار آن در شرایط عدم تنش افزایش یافت. در مرحله پرشدن دانه (پ) نیز افزایش میزان رادیکال سوپراکسید در هر دو شرایط تنش و عدم تنش قابل ملاحظه بود و اختلاف معنی داری با دو مرحله دیگر نشان داد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در این مرحله افزایش نشان داد به طوری که در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) مقدار آن بیست واحد نسبت به شرایط عدم تنش بیشتر بود و در لاین WE6 مقدار آن بیشتر از دو ژنوتیپ دیگر بود. به طور کلی با نزدیک شدن به مراحل انتهایی رشد مقدار فتوسنتز کاهش یافته و تبدیل کلروفیل a به b صورت می‌پذیرد که به دنبال آن میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن نیز افزایش می‌یابد این مسأله در نتایج سایر محققین نیز بیان شده است (نواب پور و همکاران، 2003؛ مکرنس و همکاران، 2001).

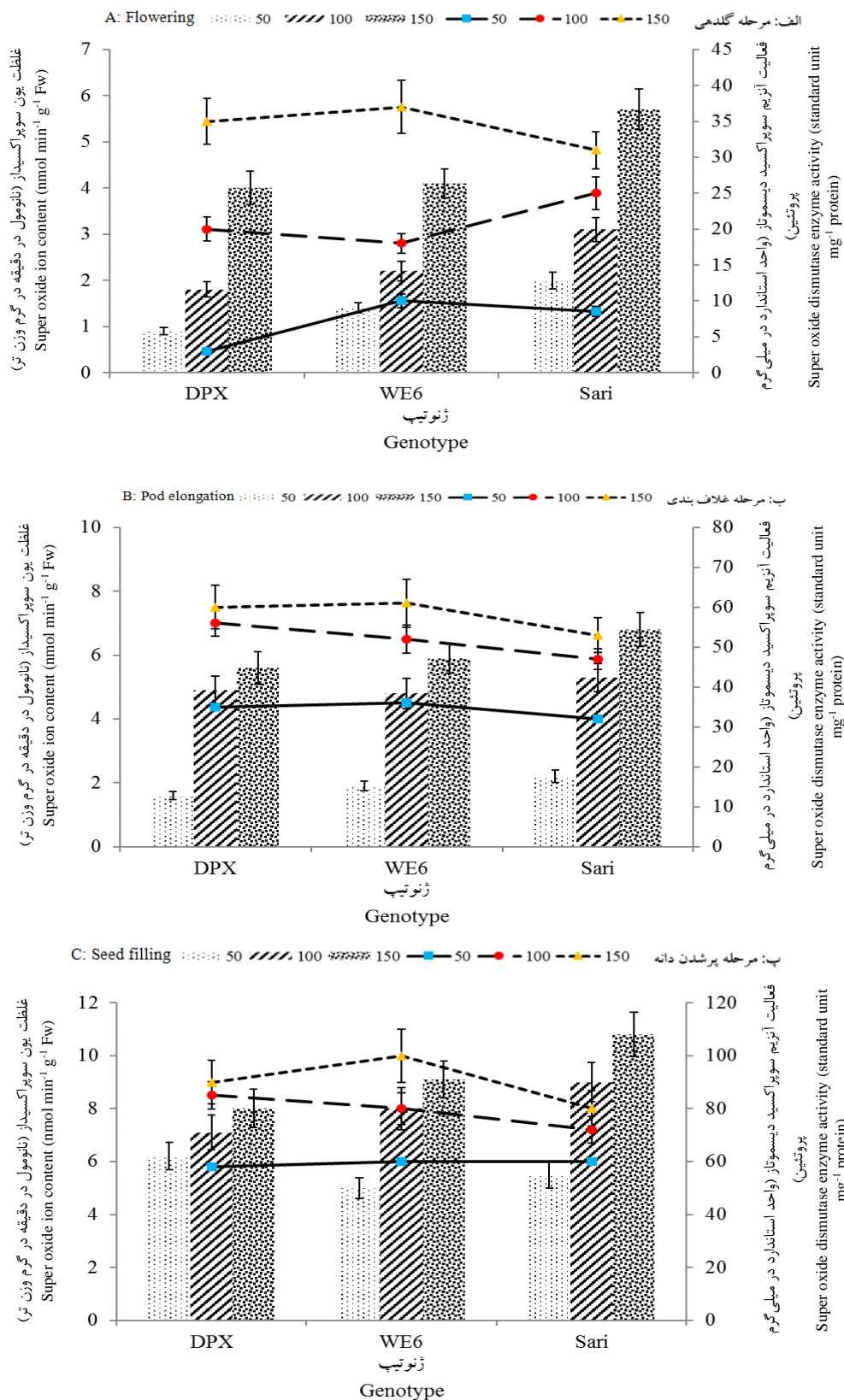
فعالیت رادیکال پراکسید هیدروژن در برابر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت شرایط کنترل تنش در مراحل رشد در شکل ۲

به طور کلی غلظت رادیکال سوپراکسید و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش خشکی و در مراحل مختلف رشد افزایش یافت (شکل ۱). البته این افزایش در ژنوتیپ‌های مختلف اختلاف معنی داری داشت. در مرحله گلدهی (الف) غلظت رادیکال سوپراکسید در تیمار شاهد (۵۰ میلی‌متر تبخیر از سطح تشتک تبخیر) کمتر از غلظت آن در شرایط تنش بود همچنین این میزان در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) بیشتر از سطح اول تنش (تیمار ۱۰۰) بود. همان‌طور که در سایر تحقیقات (نواب پور و همکاران، 2003؛ مکرنس و همکاران، 2001) اشاره شده است افزایش شدت تنش موجب افزایش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن گردیده و تنش‌های با شدت زیاد باعث پیری زود رس و مرگ سلولی می‌شوند. در بین سه ژنوتیپ مورد بررسی مقدار رادیکال سوپراکسید در رقم ساری در شرایط تنش و عدم تنش (شاهد) نسبت به رقم DPX و لاین WE6 بالاتر بود. در رابطه با فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در این مرحله همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در هر سه ژنوتیپ مقدار فعالیت این آنزیم در شرایط تنش افزایش

1. Navabpour

نشان داده شده است. در مرحله گلدهی (الف) کمترین و بیشترین غلظت رادیکال پراکسید هیدروژن در رقم ساری به ترتیب در شرایط عدم تنش (تیمار ۵۰) و در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) مشاهده شد. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله گلدهی (الف) در لاین WE6 و در سطح اول تنش (تیمار ۱۰۰) حاصل شد. همچنین در رقم DPX که کمترین میزان رادیکال پراکسید هیدروژن در آن مشاهده شد فعالیت آنزیم کاتالاز نسبتاً بالا بود. در این مرحله و در شرایط عدم تنش (تیمار ۵۰) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سه ژنوتیپ با اختلاف کم در سطح پایینی قرار داشتند. در مرحله غلافبندی (ب) میزان رادیکال پراکسید هیدروژن در هر سه ژنوتیپ افزایش پیدا کرد. عکس‌العمل ژنوتیپ‌ها تقریباً مشابه مرحله گلدهی بود و در رقم ساری در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰)

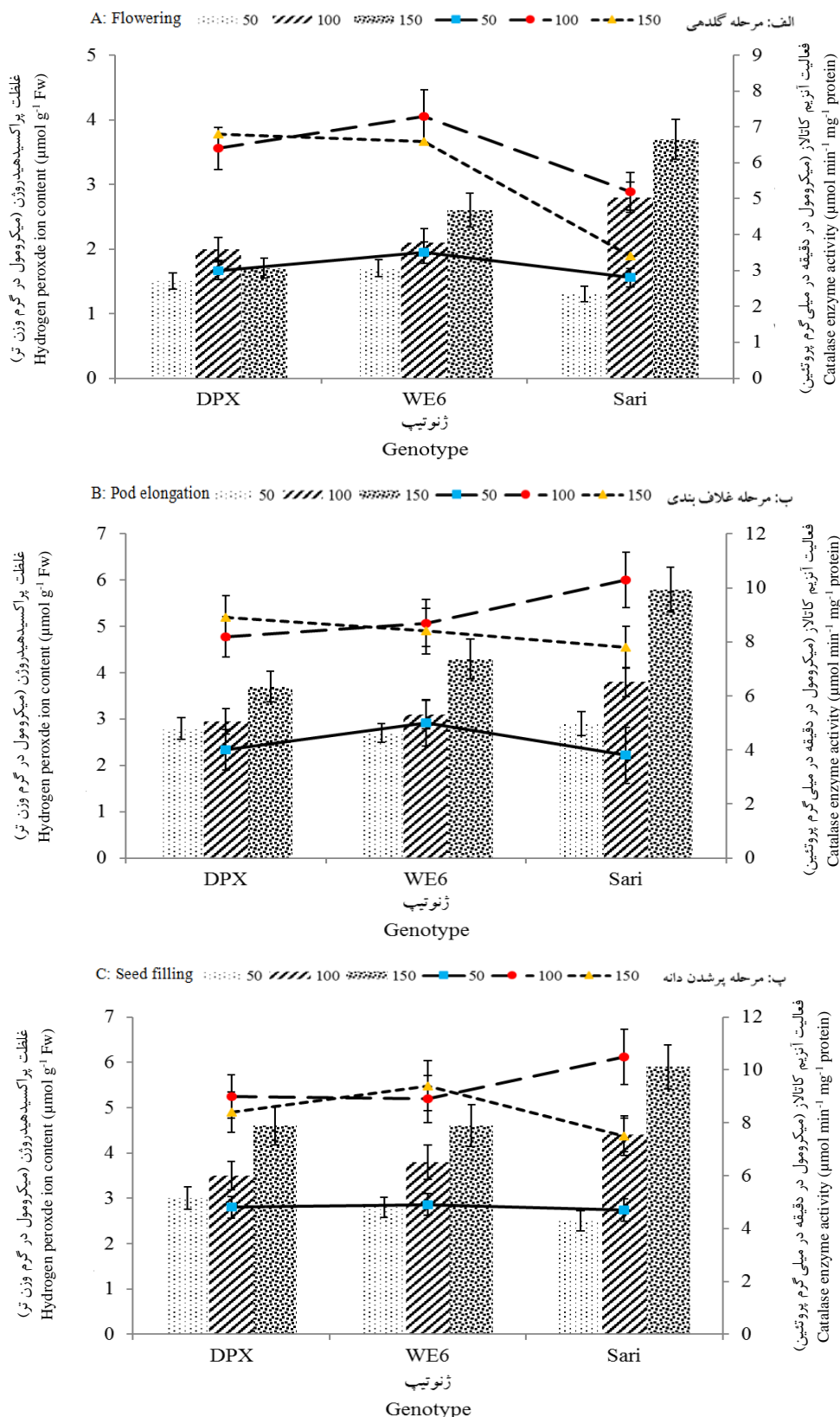
بیشترین غلظت رادیکال پراکسید هیدروژن مشاهده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در این مرحله افزایش یافت به طوری که میزان آن در تمامی ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش بیشتر از شرایط عدم تنش (تیمار ۵۰) بود. بیشترین میزان آنزیم کاتالاز در رقم ساری و در سطح اول تنش (تیمار ۱۰۰) مشاهده شد، اما میزان آن در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) کاهش یافت که به دلیل شدت تنش بود. در رقم DPX و لاین WE6 نیز میزان آنزیم کاتالاز در مرحله غلافبندی (ب) نسبت به مرحله گلدهی (الف) افزایش نشان داد ولی میزان آن‌ها در سطوح مختلف تنش و همین‌طور در شرایط عدم تنش نسبت به هم تغییر نیافت. در مرحله پرشدن دانه (پ) با کمی افزایش در میزان رادیکال پراکسید هیدروژن و آنزیم کاتالاز شرایطی تقریباً مشابه با مرحله غلافبندی (ب) مشاهده شد.



شکل ۱: میزان رادیکال سوپراکسید (نمودار ستونی) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (نمودار خطی) تحت شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ‌های سویا طی مراحل رشد. میزان خطای معیار (n=4) به صورت میله‌ای نشان داده شده است

Fig. 1: Super oxide radical content (columns) and super oxide enzyme activity (lines) during growth stages in soybean genotypes under drought stress conditions. Standard error is shown by bar sign (n=4)

ارزیابی تغییرات سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی...



شکل ۲: میزان یون پراکسید هیدروژن (نمودار ستونی) و فعالیت آنزیم کاتالاز (نمودار خطی) تحت شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ‌های سویا طی مراحل رشد. میزان خطای معیار (n=4) به صورت میله‌ای نشان داده شده است

Fig. 2: Hydrogen peroxide content (columns) and catalase enzyme activity (lines) during growth stages in soybean genotypes under drought stress conditions. Standard error is shown by bar sign (n=4)

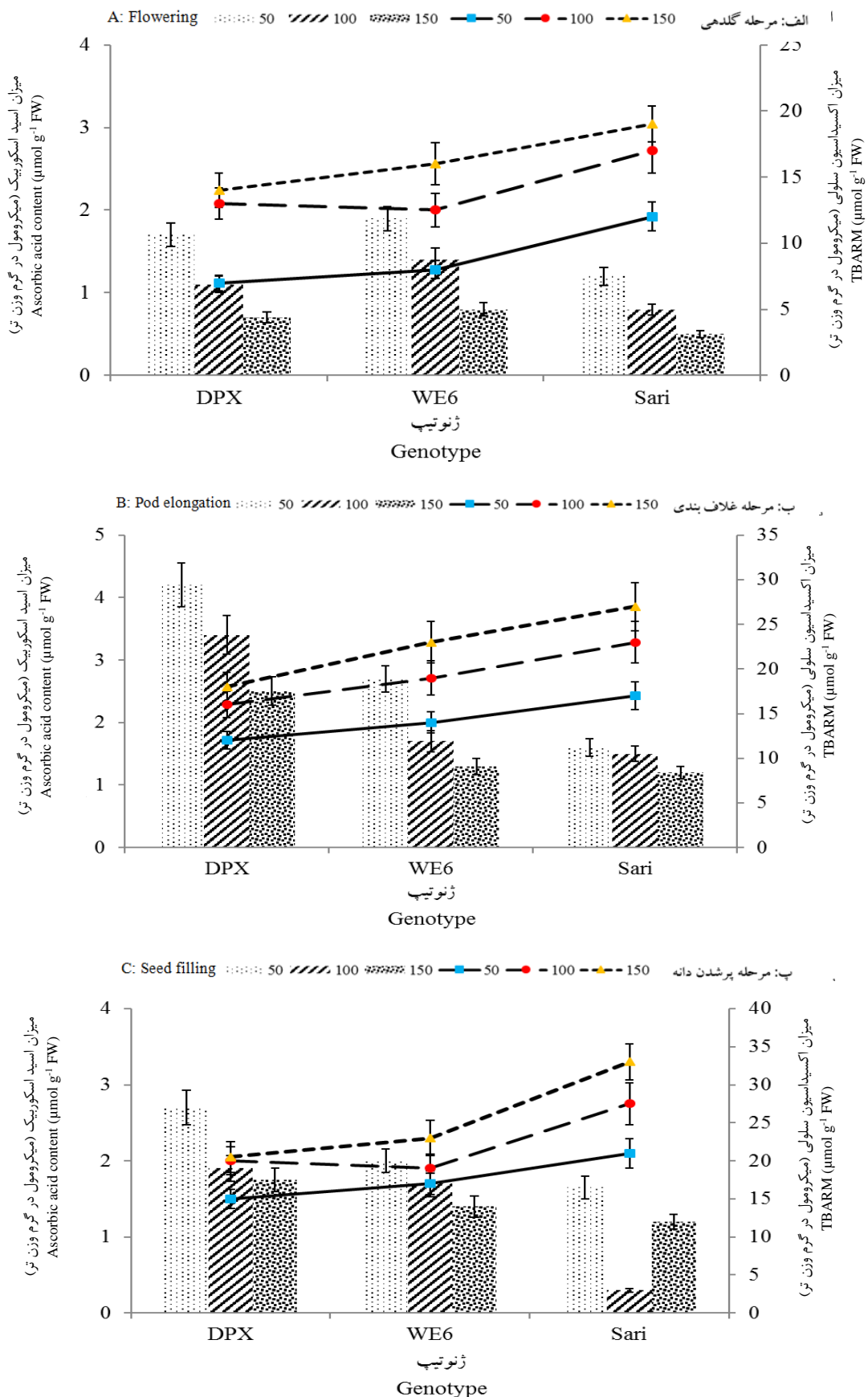
به‌طورکلی میزان اسید آسکوربیک در شرایط تنش نسبت به شرایط عدم‌تنش روند کاهشی و سطح اکسیداسیون سلولی

روند تغییرات اسید آسکوربیک در برابر شاخص اکسیداسیون سلولی (TBARM) در شکل ۳ نشان داده شده است.

لاین WE6 میزان آلفاتوکوفرول در سطح اول تنش (تیمار ۱۰۰) نسبت به شرایط عدم تنش (تیمار ۵۰) کاهش یافت، اما در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) مقدار آن افزایش یافت. در مرحله غلافبندی (ب) میزان کاروتنوئید در رقم ساری با افزایش میزان تنش روند افزایشی نشان داد اما مقدار آن در بیشترین حالت کمتر از دو ژنوتیپ دیگر بود. در لاین WE6 مقدار کاروتنوئید در مرحله غلافبندی ابتدا در سطح اول تنش (تیمار ۱۰۰) افزایش یافت سپس در سطح دوم تنش کاهش یافت. رقم DPX در این مرحله بالاترین میزان کاروتنوئید را در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) نشان داد که بیشترین میزان کاروتنوئید در مرحله غلافبندی در بین ژنوتیپها بود. همچنین میزان کاروتنوئید در این مرحله نسبت به مرحله گلدهی (الف) افزایش چندانی نیافت. میزان آلفاتوکوفرول بر خلاف میزان کاروتنوئید، به خصوص در لاین WE6 افزایش زیادی نشان داد و با افزایش خشکی روند افزایشی نشان داد. میزان آلفاتوکوفرول در رقم DPX نیز در مرحله غلافبندی (ب) افزایش یافت اما میزان آن برخلاف مرحله گلدهی (الف) با افزایش تنش کاهش یافت. در رقم ساری میزان افزایش آلفاتوکوفرول در مرحله غلافبندی کمتر از دو ژنوتیپ دیگر بود و میزان آن در سطح اول تنش (تیمار ۱۰۰) افزایش و در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) کاهش یافت. در مرحله پر شدن دانه (پ) میزان کاروتنوئید در همه ژنوتیپها افزایش نشان داد و بیشترین میزان آن در رقم ساری و در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) مشاهده گردید. میزان کاروتنوئید در رقم ساری در مرحله پر شدن دانه (پ) تحت تنش افزایش نشان داد. در رقم DPX و لاین WE6 در سطح اول تنش (تیمار ۱۰۰) میزان کاروتنوئید افزایش و در سطح دوم (تیمار ۱۵۰) کاهش یافت. میزان آلفاتوکوفرول در مرحله پر شدن دانه (پ) در رقم DPX و لاین WE6 تحت تنش افزایش نشان داد و با افزایش سطح تنش افزایش یافت. در رقم ساری در سطح اول تنش (تیمار ۱۰۰) میزان آلفاتوکوفرول افزایش و در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) کاهش یافت.

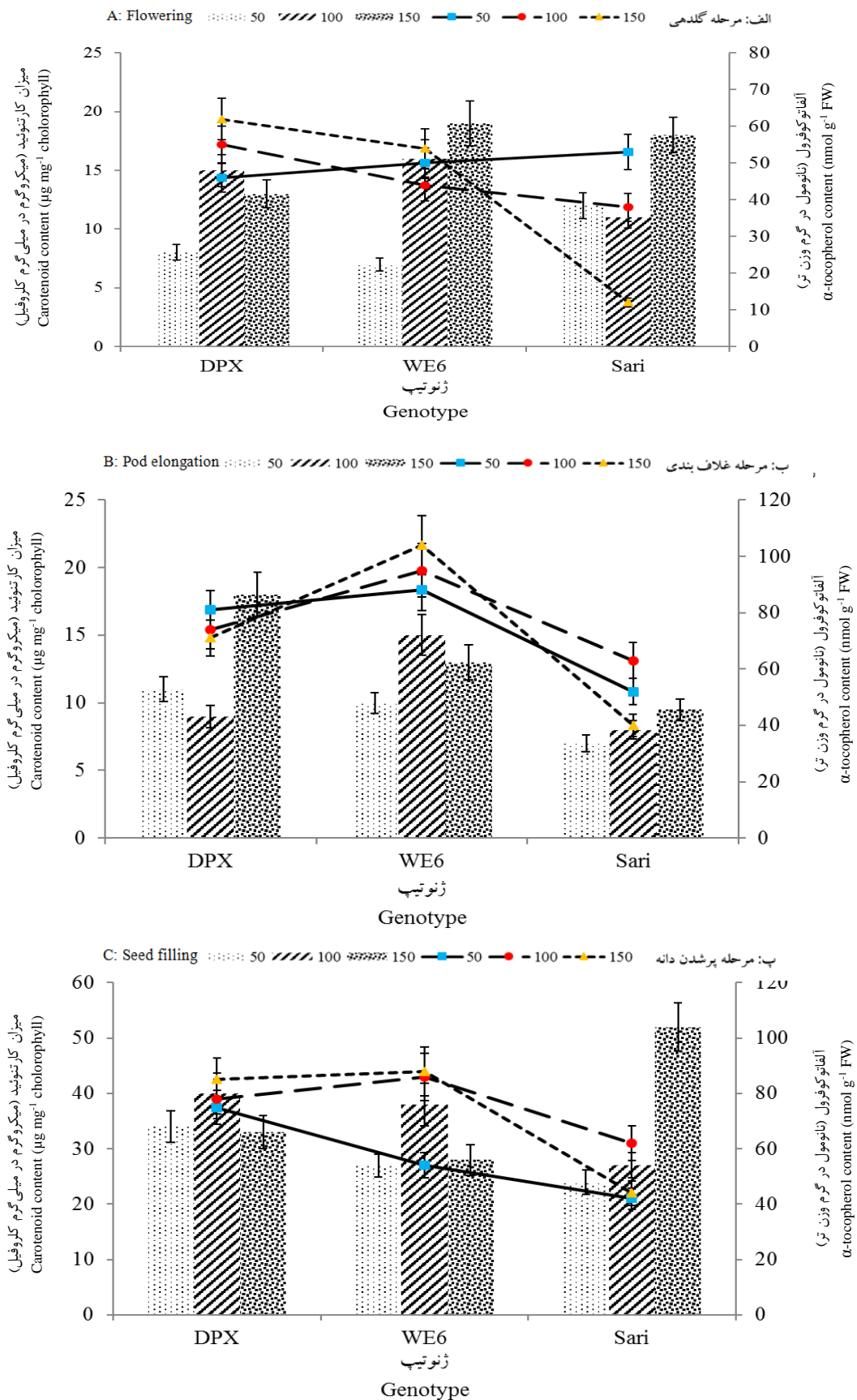
روند افزایشی داشت. در مرحله گلدهی (الف) میزان اسید آسکوربیک در لاین WE6 در شرایط عدم تنش (شاهد) و در شرایط تنش بیشتر از رقم DPX بود و رقم ساری از این حیث در رتبه سوم قرار گرفت. میزان شاخص اکسیداسیون سلولی در این مرحله در رقم ساری بیشتر از دو ژنوتیپ دیگر بود و در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) به بیشترین حد خود در این مرحله رسید. میزان این شاخص در رقم DPX کمتر از لاین WE6 بود. در مرحله غلافبندی (ب) میزان اسید آسکوربیک در هر سه ژنوتیپ افزایش یافت که این افزایش در رقم DPX قابل ملاحظه بود. با این وجود مشابه مرحله گلدهی (الف) یک روند کاهش در میزان اسید آسکوربیک در شرایط تنش مشاهده شد. میزان شاخص اکسیداسیون سلولی نیز در این مرحله افزایش یافت اما میزان و روند افزایشی آن در ژنوتیپ-های مختلف و در شرایط مختلف مشابه با وضعیت آن در مرحله گلدهی بود. مرحله پر شدن دانه تقریباً مشابه با مرحله غلافبندی بود با این تفاوت که میزان اسید آسکوربیک در این مرحله در هر سه ژنوتیپ کمی کاهش یافت. همچنین میزان پایین اسید آسکوربیک در سطح اول تنش (تیمار ۱۰۰) در رقم ساری جالب توجه بود.

تغییرات مربوط به میزان کاروتنوئید و آلفاتوکوفرول در شکل ۴ نشان داده شده است. روند تغییرات مربوط به میزان کاروتنوئید در مراحل مختلف نسبتاً زیاد بود. در مرحله گلدهی (الف) میزان کاروتنوئید در لاین WE6 طی شرایط تنش (تیمار ۱۰۰ و ۱۵۰) نسبت به شرایط عدم تنش (تیمار ۵۰) روند افزایشی نشان داد، به طوری که بیشترین میزان آن در این لاین و در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) مشاهده گردید. در رقم ساری مقدار کاروتنوئید ابتدا در سطح اول تنش (تیمار ۱۰۰) کاهش و سپس در سطح دوم تنش (تیمار ۱۵۰) افزایش یافت. در رقم DPX و در مرحله گلدهی شرایط عکس حالتی بود که در رقم ساری مشاهده شد. در رابطه با میزان آلفاتوکوفرول در مرحله گلدهی (الف) با افزایش میزان تنش، روند افزایشی برای رقم DPX و روند کاهشی برای رقم ساری مشاهده گردید. در



شکل ۳: میزان اسید اسکوربیک (نمودار ستونی) و مقدار شاخص اکسیداسیون سلولی (نمودار خطی) تحت شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ‌های سویا طی مراحل رشد. میزان خطای معیار (n=4) به صورت میله‌ای نشان داده شده است

Fig. 3: Ascorbic acid content (columns) and TBARM levels (lines) during growth stages in soybean genotypes under drought stress conditions. Standard error is shown by bar sign (n=4)



شکل ۴: میزان کاروتنوئید (نمودار ستونی) و میزان آلفاتوکوفرول (نمودار خطی) تحت شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ‌های سویا طی مراحل رشد. میزان خطای معیار (n=4) به صورت میله‌ای نشان داده شده است

Fig. 4: Carotenoid content (columns) and α -tocopherol content (lines) during growth stages in soybean genotypes under drought stress conditions. Standard error is shown by bar sign (n=4)

بحث

میزان رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن با افزایش میزان تنش خشکی و همچنین با نزدیک شدن به مراحل انتهایی رشد افزایش نشان داد که این موضوع در نتایج سایر محققین نیز گزارش شده است (نوب پور و همکاران، 2003؛ معصومی¹ و همکاران، 2010). وجود این رادیکال‌ها در مقادیر کم نه تنها مضر نیست بلکه به‌عنوان عوامل سیگنالی انتقال پیام در گیاه ایفای نقش می‌نمایند اما در غلظت‌های بالا منجر به اکسید شدن لیپیدها، تغییر ساختار غشاء و در نتیجه از هم پاشیدگی یکپارچگی آن می‌شوند (نوب پور و همکاران، 2003). تحقیقات مختلف نشان داده است که یک ارتباط قوی بین تحمل تنش‌های محیطی و افزایش در غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان وجود دارد *سایرام و سیرواستاوا*، 2001، 2002). محققین نشان داده‌اند که غلظت آنزیم‌های پاداکسیدان در شرایط تنش دو برابر شده و لذا باعث افزایش مقاومت به تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند و از طرفی بیان داشته‌اند تنش خشکی (که از جمله تنش‌های اکسیداتیو به شمار می‌رود) نیز میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش می‌دهد (گامبل و بروک²، 1984؛ لاسکانو و همکاران، 2005). هرچند میزان این فعالیت، بسته به حساسیت ارقام مختلف و همچنین پتانسیل ژنتیکی گونه‌های مختلف، متفاوت است (معصومی و همکاران، 2010؛ *ماناوالان*³ و همکاران، 2009). نقش این دو آنزیم در تعدیل میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن ثابت شده است به‌طوری‌که محققین مختلف آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را به‌عنوان مکانیسم دفاعی اولیه در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌دانند (السچر⁴ و همکاران، 1999؛ *آسادا*⁵، 2002).

آلفاتوکوفرول معمولاً به‌عنوان فعال‌ترین توکوفرول مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است. این آنتی‌اکسیدان قادر است میزان اکسیژن منفرد و پراکسیدهای چربی را کنترل نماید. به‌طور کلی اسید آسکوربیک و آلفاتوکوفرول آنتی‌اکسیدان‌های مؤثری هستند، زیرا آن‌ها دهنده‌های ضعیف الکترون در شرایط فیزیولوژیکی هستند و در کل به‌وسیله انتقال اتم‌های هیدروژن یگانه فعالیت می‌کنند. این دو پاد اکسیدان در تعدیل میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن نقش مهمی را ایفا می‌کنند (آرورا⁶ و

همکاران، 2002). میزان اسید آسکوربیک با اعمال تنش روند کاهشی نشان داد که این امر می‌تواند به‌دلیل شدت تنش باشد اما میزان آن در مرحله غلاف‌بندی نسبت به گلدھی افزایش یافت و در مرحله پرشدن دانه کاهش کمی نشان داد، به نظر می‌رسد با افزایش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن در مرحله غلاف‌بندی مقدار اسید آسکوربیک جهت تعدیل مقدار این رادیکال‌ها افزایش یافته است. در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی، میزان اسید آسکوربیک در رقم DPX بیشتر از دو ژنوتیپ دیگر بود. همان‌طور که در نتایج مشاهده شد، به‌طور کلی میزان آلفاتوکوفرول تحت تنش خشکی نسبت به شرایط عدم تنش در هر سه ژنوتیپ افزایش یافته است که این افزایش در رقم DPX و لاین WE6 بیشتر از رقم ساری بود.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان اکسیداسیون سلولی (TBARM) در این مطالعه نشان‌دهنده‌ی افزایش مقدار آن با افزایش شدت تنش و نیز در مراحل پایانی رشد بود. این مسئله به نوبه خود بیانگر این امر می‌باشد که افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن به‌واسطه تنش خشکی باعث بروز صدمات جدی از قبیل مرگ سلولی و پیری زودرس گیاه و در نتیجه کاهش میزان عملکرد می‌شود. همان‌طور که ملاحظه شد میزان افزایش شاخص اکسیداسیون سلولی در هر سه رقم در مرحله پرشدن دانه به‌خصوص در سطح دوم تنش نسبت به مراحل گلدھی و غلاف‌بندی بیشتر بود که می‌تواند نشان‌دهنده حساسیت بالای این مرحله نسبت به تنش خشکی باشد.

کاروتنوئیدها در کلروپلاست به‌عنوان رنگدانه‌های کمکی در برداشت نور فعالیت می‌کنند، اما شاید مهم‌ترین نقش آن‌ها، توانایی در رفع سمیت شکل‌های مختلفی از اکسیژن فعال شده باشد که در نتیجه برانگیختگی ترکیب‌های فتوسنتزی به‌وسیله نور تولید می‌شوند (کافی⁷ و همکاران، 2009). کاروتنوئیدها انرژی را از مولکول‌های تهییج‌شده و آزاد اکسیژن گرفته و آن را به انرژی گرمایی تبدیل می‌کنند (آرورا⁸، 2005). افزایش میزان کاروتنوئیدها در شرایط تنش با توجه به نقش آن‌ها در سیستم دفاع پاد اکسیدانی برای محافظت از رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل) قابل انتظار است. افزایش چشمگیر میزان کاروتنوئیدها در مرحله پر شدن دانه و همچنین افزایش آن تحت تنش خشکی نشان‌دهنده نقش آن در تعدیل میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌باشد.

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق بیانگر نقش فعال سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی گیاهان در پاسخ به تنش خشکی

1. Masoumi
2. Gambel and Burke
3. Manavalan
4. Alscher
5. Asada
6. Arora

7. Kafi

8. Edreva

می‌باشد، چنان‌که پیش‌تر نقش فعال این سیستم دفاعی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی توسط سایر محققین به اثبات رسیده است (عبدل-مونائم^۱، ۲۰۱۳؛ نواب پور و همکاران، ۲۰۰۳). به‌طورکلی در این آزمایش رقم DPX و لاین WE6 نسبت به رقم ساری با داشتن خصوصیات مطلوب‌تر از لحاظ میزان فعالیت آنزیم‌های پاد اکسیدانی تحت تنش خشکی، عملکرد بهتری نشان دادند که بیانگر تحمل نسبی بیشتر آن‌ها بود. از آن‌جایی‌که تحمل به خشکی در گیاهان یک امر نسبی می‌باشد می‌توان با ارزیابی میزان فعالیت سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی و همچنین بررسی سایر سازوکارهای دفاعی (از جمله بیان ژن‌های تحمل به خشکی) در برابر تنش خشکی، ژنوتیپ‌هایی را که از این حیث نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتری دارند شناسایی نموده و به‌عنوان ارقام متحمل به خشکی معرفی نمود.

1. Abdel-Monaim

- Abdel-Monaim, M. F. 2013. Improvement of biocontrol of damping-off and root rot/wilt of Faba bean by salicylic acid and hydrogen peroxide. *Mycobiology*, 41: 47-55.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*, 105: 121-126.
- Allen, R. D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology*, 57: 1049-1054.
- Alscher, R. G., Erturk, N. and Heath, L. S. 2002. Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plant. *Journal Experimental of Botany*, 153: 1331-1341.
- Arakawa, N., Tsutsumi, K., Sanceda, N. G., Kurata, T. and Inagaki, C. 1981. Rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using diphenyl-1, 10-phenanthroline. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45: 1289-1290.
- Ariano, S., Bartolomeo, D., Cristos, X. and Andras, M. 2005. Antioxidant defenses in Olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32: 45-53.
- Arora, A., Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Annual Review of Current Sciences*, 82: 1227-1238.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 50: 601-639.
- Azadbakht, L., shakerhosseini, R., Atabak, S., jamshidian, M., Mehrabi, Y. and Emillzadeh, A. 2003. Beneficiary effect of dietary soy protein on lowering plasma levels of lipid and improving kidney function in type II diabetes with nephropathy. *European Journal of clinical nutrition*, 57: 1292-1294.
- Biaber, B., Cureuett, J. T. and Kipnes, R. S. 2004. Biologic defense mechanisms. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 85: 235-244.
- Brennan, T. and Frenkel, C. 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology*, 59: 411-416.
- Burton, J. W. 1997. Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Field Crops Research*, 53: 171-186.
- Edreva, A. 2005. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agriculture Ecosystems and Environmental*, 106: 135-146.
- Eltner, E. F. and Heupel, A. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxyl ammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Analytical Biochemistry*, 70: 616-620.
- Gambel, P. E. and Burke, J. J. 1984. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. I. Alteration in glutathione reductase activity. *Plant Physiology*, 76: 615- 621.
- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inze, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V. and Minkov, I. 2002. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cell Molecular Life Science*, 59: 708-714.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
- Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J. and Gaspar, T. 1990. Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis*, 1: 86-89.
- Hsu, S. Y. and Kao, C. H. 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol and antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 39: 83-90.
- Kafi, M., Borzoe, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoumi, A. and Nabati, J. 2009. Physiology of environmental stresses in plants. Ferdowsi University, Mashhad, Iran, 502 pp.
- Lascano, H. R., Antonicelli, G. E., Luna, C. M., Melchiorre, M. N., Gomez, L. D., Racca, R. W., Trippi, V. S. and Casano, L. M. 2005. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and *in vitro* studies. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 1095-1102.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*, 148: 350-382.
- Luna, C. M., Pastori, G. M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S. and Foyer, C. H. 2004. Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal Experimental of Botany*, 56: 417-423.
- Mackerness, S. A. H., John, C. F., Jordan, B. and Thomas, B. 2001. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *Federation of European Biochemical Societies Letter*, 489: 237-242.
- Manavalan, L. P., Guttikonda, S. K., Tran, L. S. P. and Nguyen, H. T 2009. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant and Cell Physiology*, 50: 1260-1276.
- Masoumi, H., Masoumi, M., Darvish, F., Daneshian, J., Nourmohammadi, G. H. and Habibi, D. 2010. Change in several antioxidant enzymes activity and seed yield by water deficit stress in soybean (*Glycine max* L.) Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38: 50-59.
- Ming, C., Qiao-Yan, W., Xian-Guo, C., Zhao-Shi, X., Lian-Cheng, L., Xing-Guo, Y., Lan-Qin, X. and You-Zhi, M. 2007. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353: 299-305.

- Munné-Bosch, S., Schwarz, I. and Aleg, L. 1999. Enhanced formation of α -tocopherol and highly oxidized abietanediterpenes in water-stress rosemary plants. *Plant Physiology*, 121: 1047-1052.
- Navabpour, S., Morris, K., Harrison, E., Makerness, S. and Buchanan-Wollaston, V. 2003. Expression of senescence enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal Experimental of Botany*, 54: 2285-2292.
- Nilsen, E. T. and Orcutt, D. M. 1996. *Physiology of plant under stress: Abiotic factors*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 689 pp.
- Sairam, R. K. and Saxena, D. C. 2000. Oxidative stress and antioxidant in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *Journal Agronomy and Crop Science*, 184: 55-61.
- Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*, 162: 897-904.
- Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2001. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotype. *Journal Agronomy and Crop Science*, 186: 63-70.
- Singh, G. and Walingford, U. K. 2010. *The Soybean, Botany, Production and Uses*. Cambridge University Press. P.p: 494.

Evaluation of Enzymatic and Non-enzymatic Defense Mechanism in Response to Drought Stress During Growth Stage in Soybean

Navabpour^{1*}, S., Ramezanpour², S. S. and Mazandarani³, A.

Abstract

Soybean is a diploid plant with relatively wide range of environmental conditions and climate adaptation. Water deficit is first limitation that cause soybean yield reduction in dried and semi-dried regions. In addition to the physiological changes that occurs due to water deficiency in plants, oxidative damage is also an important factor limiting plant growth and production. In this study, the level of super-oxide and hydrogen peroxide were measured, also the amount (of) super-oxide dismutase and catalase enzyme as well as ascorbic acid, α -tocopherol, carotenoid and TBARM (cellular oxidative level) were assessed. Three soybean genotypes (DPX, sari and WE6 Line) were evaluated for above traits in three drought stress treatments included 50mm evaporation (as control), 100mm and 150mm evaporation from A class evaporation pot. Leaf samples collected for each treatments in three reproductive stages (flowering, pod elongation and seed filling). The variance analysis results showed that drought stress treatment had significant effect on all measured traits. Base on this, enzyme activity (super oxide and catalase) and non-enzymatic antioxidants (ascorbic acid, carotenoid and α -tocopherol) had a key role in response to drought stress in studied soybean genotypes. DPX cultivar and WE6 line showed superior antioxidant agents activity in comparison with sari cultivar in drought stress conditions.

Keywords: Glycin max, Oxidative stress, Anti-oxidant defense system, Reactive oxygen species

1 and 2. Associate Professors of Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3. M.Sc. Graduate, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

*: Corresponding author

Email: s.navabpour@yahoo.com