تأثیر آسکوربیک اسید در کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از تنش شوری در سیب زمینی

فاطمه دانشمند

تهران، دانشگاه پیام نور، گروه علمی زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۰

چکیده

در این مطالعه اثر آسکوربیک اسید برون‌زا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، بر فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی و تنش اکسیداتیو حاصل از تنش شوری در سیب زمینی Solanum tuberosum L. cv. Carlton با روش درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. جداکشت‌های ساقه حاوی گره و برگ، در محیط کشت مایع موراشیگ و اسکوگ (MS) که دارای غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید (AsA) (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) و کلرید سدیم (۰ و ۷۵ میلی مولار) بود به مدت ۴ هفته قرار گرفتند. تنش شوری موجب کاهش پارامترهای رشد و مقدار کلروفیل کل، کاروتنویید، حوضچه آسکوربات و ترکیبات فنلی گردید و مقدار پراکسیداسیون لیپیدها (مالون دآلدئید)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، نشت یونی، پرولین و فعالیت لیپوکسیژناز (LOX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گایاکل پراکسیداز (GPOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون رداکتاز (GR) را افزایش داد. آسکوربیک اسید با افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی نظیر SOD، CAT، GPOD، APX و GR و همچنین با افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی نظیر کاروتنویید، آسکوربات، ترکیبات فنلی و پرولین موجب کاهش تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها، H_2O_2، نشت یونی و فعالیت LOX، و در نتیجه موجب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نهایت بهبود پارامترهای رشد و افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش شوری گردید.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، آسکوربیک اسید، سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی، شرایط درون شیشه‌ای

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۵۲۶۲۳۲۸۰۰، پست‌الکترونیکی: f.daneshmand@yahoo.com

مقدمه

تنش شوری یکی از تنش‌های مهم محیطی و کاهش دهنده تولید محصول در محصولات کشاورزیست. غلظت‌های بالای نمک در محیط اطراف ریشه موجب کاهش پتانسیل آبی، عدم تعادل تغذیه‌ای، سمیت یونی، تغییر در متابولیسم سلولی، تنش اکسیداتیو و کاهش رشد و تولید محصول می‌گردد.

هنگامی که سلولها در شرایط تنش قرار می‌گیرند تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و جاروب شدن آنها به هم می‌خورد و اغلب منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردد. گونه‌های فعال اکسیژن برای سلول بسیار خطرناک بوده و موجب آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و از دست رفتن یکپارچگی غشاها و حتی مرگ سلول می‌گردند. گونه‌های فعال اکسیژن شامل آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل ($^{\cdot}OH$) و اکسیژن یکتایی $^1O2$ می‌باشد (۳۳، ۳۸).

گیاهان دارای سازوکارهای آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی برای مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند. گیاهان دارای ۵ سیستم اصلی آنزیمی جاروب کننده ROS می‌باشند که در مکانهای تولید ROS قرار دارند، این سیستم‌ها عبارتند از: آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، آنزیم کاتالاز، چرخه آسکوربات-گلوتاتیون (راه-Halliwell

Asada)، چرخه آب-آب و چرخه گلوتاتیون (۳، ۸، ۲۳). آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی مولکولهایی با وزن مولکولی پائین می‌باشند که هر یک دارای ساختار و خصوصیات شیمیایی خاص بوده و محل قرارگیری آنها نیز متفاوت می‌باشد. این ترکیبات به واسطه دادن الکترون یا هیدروژن نقش اساسی در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد دارند (۳). آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی به دو گروه تقسیم می‌شوند: آنتی‌اکسیدان‌های غشایی محلول در چربی شامل آلفاتوکوفرول، کاروتنوییدها و گزانتوفیل‌ها و آنتی اکسیدان‌های محلول در آب شامل گلوتاتیون، آسکوربات، ترکیبات فنلی و پرولین می‌باشند (۴۳).

آسکوربیک اسید یک آنتی اکسیدان مهم در گیاهان می‌باشد. این ترکیب که در غشا داخلی میتوکندری سنتز می‌شود (۳۶) در سیتوسول، دیواره سلولی، کلروپلاست، میتوکندری، واکوئل و آپوپلاست وجود دارد. آسکوربیک اسید نقش‌های متعددی را در سلول بر عهده دارد. در کنترل چرخه سلولی و رشد سلول، رشد و نمو، طویل شدن دیواره و تنظیم سطح ردوکس سلول مؤثر است. آسکوربات پیش ساز اگزالات و تارتارات و همچنین کوفاکتور آنزیم‌های دخیل در سنتز گلیکو پروتئین‌های غنی از هیدروکسی پرولین، اتیلن، ژیبرلین و آنتوسیانین می‌باشد (۳، ۲۶). آسکوربیک اسید به‌عنوان سوبسترای بسیاری از پراکسیدازها می‌باشد و یکی از اجزای اصلی چرخه آسکوربات-گلوتاتیون و چرخه آب-آب بوده که در جاروب کردن ROS بسیار مؤثر می‌باشد (۳، ۲۳). آسکوربات همچنین می‌تواند در واکنش مستقیم با گونه‌های فعال اکسیژن نظیر سوپراکسید، اکسیژن یکتایی یا رادیکال هیدروکسیل اکسیده شود و یا به‌عنوان عامل احیاکننده در بازسازی مجدد آلفا توکوفرول (آنتی اکسیدان باند شده به غشا) به کار گرفته شود و موجب حفاظت از غشا در برابر تنش اکسیداتیو گردد (۲۳، ۳۳). آسکوربات در همکاری با آلفا توکوفرول، رادیکالهای پراکسیل لیپید را از بین برده و مانع از گسترش پراکسیداسیون لیپید در غشا می‌گردد. در کلروپلاست، آسکوربیک اسید به‌عنوان کوفاکتور آنزیم ویولاگزانتین د-اپوکسیداز عمل کرده و در پراکنش انرژی برانگیختگی اضافی کلروفیل شرکت می‌کند(۳).

سیب زمینی چهارمین منبع تأمین کننده‌ی غذای مردم جهان بعد از گندم، برنج و ذرت می‌باشد و در بسیاری از کشورها در مناطق خشک و نیمه‌خشک کشت می‌گردد و در این مناطق کمبود آب یا آبهای شور مهمترین عامل محدودکننده‌ی رشد و تولید محصول می‌باشد. اگرچه سیب‌زمینی در گروه گیاهان با حساسیت متوسط به شوری قرار می‌گیرد اما این مقاومت در بین ارقام و گونه‌های وحشی سیب زمینی متفاوت می‌باشد.

در این مطالعه تأثیر آسکوربیک اسید برون‌زا بر کاهش اثرات ایجاد شده توسط شوری در سیب‌زمینی به‌روش درون‌شیشه‌ای در محیط کشت مایع موراشیک و اسکوگ (MS) مورد بررسی قرار گرفت (۳۰). کشت‌های درون‌شیشه‌ای یک محیط یکنواخت و منظم را برای بررسی میزان مقاومت به شوری و سازوکارهای مقاومت به شوری فراهم می‌کند. این گونه کشت‌ها یک محیط جایگزین مؤثر برای جلوگیری از برهم‌کنشهای پیچیده‌ی محیط و خاک است که موجب بررسی دقیق‌تر پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه به تنش شوری می‌گردد(۶).

مواد و روشها

ریز گیاهان سیب زمینی رقم زراعی Carlton از مرکز تحقیقات ژنتیک تهران تهیه شدند. این ریزگیاهان به قطعات ۳-۲ سانتی‌متری تقسیم و این قطعات به ظرف‌های اتوکلاو شده از جنس پلی پروپیلن با نام phytacon vesseles(Sigma) (به ارتفاع ۷۸ میلی متر، قطر کف ظرف ۸۶ میلی متر و قطر لبه ظرف ۱۱۶ میلی متر) حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط کشت مایع موراشیک و اسکوگ (MS)، ۳ درصد ساکارز و بدون آگار و هورمون با pH = ۵/۷ منتقل

شدند و در اتاق با دمای ۱ ± ۲۵ °C و شدت نور $M\ m^{-}\ S^{-1}$ $۱۲۰\mu^2$ منتقل و در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند و بعد از گذشت یک‌ماه از رشد گیاهان داخل این ظرف‌ها از این گیاهان برای اعمال تیمار استفاده گردید.

برای اعمال تیمار غلظت‌های ۰و ۷۵ میلی مولار کلرید سدیم به محیط کشت مایع موراشیک و اسکوگ (MS) که حاوی ۳ درصد ساکارز و بدون آگار و هورمون با ۵/۷ = pH بود، اضافه شد و اتوکلاو گردید و بعد غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی مولار آسکوربیک اسید به محیط کشت اضافه شد و حدود ۳۰ میلی لیتر از این محیط درون phytacon vessels ریخته شد. سپس گیاهان رشد یافته (در مرحله آماده سازی)، به قطعات ۳-۲ سانتی‌متری تقسیم و ۳ قطعه از هر کدام داخل یک phytacon vessels در شرایط استریل انتقال یافت و در اتاق کشت با شرایط ذکر شده در قبل به مدت ۴ هفته نگهداری شد (داخل هر ظرف ۳ گیاه و برای هر تیمار ۳ تکرار). بعد از گذشت این مدت زمان، پارامترهای مورفولوژیک این گیاهان اندازه‌گیری گردید و اندام هوایی گیاهان در نیتروژن مایع فریز گردید و برای اندازه‌گیریهای بعدی در فریزر ۸۰- °C قرار داده شد.

پارامترهای رشد: طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی گیاهان در گروه‌های تیماری مختلف اندازه‌گیری گردید. طول ساقه بر حسب سانتیمتر و وزن خشک نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گیاه گزارش گردید.

رنگیزه‌های فتوسنتزی: اندازه‌گیری مقدار کلروفیل کل و کاروتنوییدها (کاروتنویید و گزانتوفیل) با استفاده از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام شد (۲۷) و غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

پراکسیداسیون لیپیدها: برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دآلدئید که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد اندازه‌گیری گردید و اندازه‌گیری مالون دآلدئید (MDA) به روش Packer و Heath (۱۹۶۹) انجام شد (۲۰). برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل mM^{-} $۱۵۵^{1}cm^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

نشت یونی: برای سنجش میزان آسیب به غشا، میزان نشت یونی از روش Ben Hamed و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد (۱۰).

پراکسید هیدروژن (H_2O_2): سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد (۴۱) و مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش گردید.

پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates (۱۹۷۳) استفاده شد (۹) و برای محاسبه‌ی مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده و نتایج برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

آسکوربات کل: برای سنجش مقدار آسکوربات کل از روش De Pinto و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد (۱۴) و با استفاده از آسکوربات منحنی استاندارد رسم گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

ترکیبات فنلی کل: محتوای ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش Sonald و Laima (۱۹۹۹) انجام شد (۳۷) و با استفاده از گالیک اسید منحنی استاندارد رسم و غلظت ترکیبات فنلی کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

تهیه عصاره برای سنجش فعالیت آنزیمی: برای سنجش فعالیت آنزیمی، ابتدا آنزیم‌ها از اندام هوایی گیاه در دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد استخراج شدند. به‌این منظور یک گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH = ۷/۲ که شامل اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA) ۱ میلی مولار، فنیل متان

سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی مولار و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود، سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار در $14000g$ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. از محلول رویی برای مطالعه فعالیت آنزیم‌ها و نیز سنجش پروتئین استفاده گردید.

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)(EC 1.15.1.1): سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیم (NBT) در ۵۶۰ نانومتر انجام شد. یک واحد آنزیمی سوپراکسیددیسموتاز مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیاء نوری احیای نیتروبلوتترازولیم (با جلوگیری از تبدیل آن به فورمازان) می‌گردد. فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) در عصاره (به دست آمده از روش Bradford 1976 (۱۱) بیان گردید (۱۹).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)(EC 1.11.1.6): سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2) در ۲۴۰ نانومتر و با روش Dhindsa و Motowe (۱۹۸۱) انجام شد (۱۵). یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که ۱ میلی‌مول H_2O_2 را در یک دقیقه تجزیه می‌کند.

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)(EC 1.11.1.7): سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکول و اندازه‌گیری میزان جذب تتراگایاکول تشکیل شده از گایاکول در نتیجه فعالیت پراکسیداز، در ۴۷۰ نانومتر انجام شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۲۰ میکرولیتر عصاره (به دست آمده از روش Bradford 1976) گزارش شد (۳۱).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)(EC1.11.1.1): سنجش فعالیت این آنزیم با کمک آسکوربات و طبق روش Nakano و Asada (۱۹۸۷) انجام شد (۳۱). یک واحد آنزیمی آسکوربات‌پراکسیداز مقدار آنزیمی است که یک میلی‌مول آسکوربات را در یک دقیقه اکسید می‌کند (۳۱). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره (به دست آمده از روش Bradford 1976) گزارش شد.

فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز (GR) (EC 1.6.4.2): فعالیت آنزیم GR به وسیله اکسیداسیون NADPH توسط روش Foyer و Halliwell (۱۹۷۶) تعیین می‌شود (۱۷). یک واحد فعالیت آنزیمی مقدار آنزیمی است که برای اکسیداسیون یک نانومول NADPH در یک دقیقه لازم است.

فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز (LOX)(EC 1.13.11.12): فعالیت این آنزیم براساس روش Minguez-Mosquera و همکاران (۱۹۹۳) انجام گردید (۲۹). یک واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که ۱ میکرومولار لینولئیک اسید را در یک دقیقه مورد استفاده قرار می‌دهد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل‌های آماری در این مطالعه با آزمایش فاکتوریل و طبق طرح کاملا تصادفی با سه تکرار صورت گرفته و داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS تحت آنالیز واریانس قرار گرفته و اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ٪۹۵ مقایسه شدند.

نتایج

همه نتایج به‌دست آمده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. نتایج این آزمایش نشان داد که کاربرد کلرید سدیم در گیاهان سیب زمینی موجب کاهش پارامترهای رشد شامل طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی و کاهش مقدار کلروفیل کل، کاروتنویید، حوضچه آسکوربات و ترکیبات فنلی شد و مقدار پرولین، پراکسیداسیون لیپیدها

(مالون دآلدئید)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، نشت یونی و فعالیت لیپوکسیژناز(LOX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گایاکل پراکسیداز (GPOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون رداکتاز (GR) را افزایش داد.

جدول ۱- تأثیر تیمارهای شوری (NaCl) و آسکوربیک اسید (ASA) بر پارامترهای رشد، نشت یونی و مقدار مالون دآلدئید، پراکسیدهیدروژن، فعالیت لیپوکسیژناز، مقدار کلروفیل، کاروتنوئید، آسکوربات، پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون رداکتاز (GR)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکل پراکسیداز (GPOD). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P\leq 0/05$ است.

	شاهد	ASA (۰/۵) میلی مولار)	ASA (۱) میلی مولار)	NaCl (۷۵ میلی مولار)	ASA + NaCl (۰/۵ میلی مولار)	ASA + NaCl (۰/۵ میلی مولار)
طول ساقه (سانتیمتر)	b ۲۴/۰۰	a ۲۶/۶۶	a ۲۶/۳۳	d ۹/۳۳	c ۱۲/۵۰	c ۱۲/۰۰
وزن خشک اندام هوایی (میلی‌گرم)	b ۹۱	a ۱۰۰	a ۱۰۱	d ۲۰	c ۳۰	c ۳۲
نشت یونی (درصد)	c ۶/۵۰	d ۵/۲۰	d ۵/۰۰	a ۵۰/۰۰	b ۴۱/۷۳	b ۴۰/۷۶
مالون دآلدئید (نانومول بر گرم وزن تر)	c ۸/۷۳	d ۷/۸۰	d ۷/۵۱	a ۱۲/۳۲	b ۱۰/۲۶	b ۱۰/۰۲
پراکسیدهیدروژن (میکرومول بر گرم وزن تر)	d ۳/۵۸	e ۲/۹۳	e ۲/۸۹	a ۱۱/۶۲	b ۹/۱۷	c ۸/۵۳
لیپوکسیژناز (یونیت بر میلی‌گرم پروتئین)	c ۰/۱۳۳	c ۰/۰۹۱	c ۰/۰۹۶	a ۱/۴۱۲	b ۱/۲۱۱	b ۱/۱۹۲
کلروفیل کل (میکروگرم بر گرم وزن تر)	b ۸۴/۰۰	a ۹۰/۳۴	a ۹۲/۳۱	d ۱۱/۳۹	c ۲۰/۲۱	c ۲۰/۰۶
کاروتنوئید (میکروگرم بر گرم وزن تر)	c ۲۴/۶۳	b ۲۷/۶۲	a ۲۹/۷۹	f ۶/۰۰	e ۹/۰۷	d ۱۰/۹۸
آسکوربات (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	b ۰/۹۵	a ۱/۰۷	a ۱/۱۰	e ۰/۳۰	d ۰/۶۰	c ۰/۶۹
پرولین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	e ۰/۰۵۷۷	d ۰/۰۶۸۷	d ۰/۰۶۸۸	c ۰/۰۸۹۰	a ۰/۱۰۰۳	b ۰/۰۹۵۰
ترکیبات فنلی (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	b ۲/۰۶	a ۲/۳۳	a ۲/۲۰	d ۰/۶۸	c ۰/۹۴	c ۰/۹۰
سوپر اکسید دیسموتاز (یونیت بر میلی‌گرم پروتئین)	d ۰/۱۰	c ۰/۱۵	c ۰/۱۶	b ۰/۳۴	a ۰/۴۷	a ۰/۴۴
کاتالاز (یونیت بر میلی‌گرم پروتئین)	d ۱/۹۰	c ۲/۵۸	c ۲/۵۱	b ۴/۴۶	a ۵/۹۲	a ۶/۰۳
گلوتاتیون رداکتاز (یونیت بر میلی‌گرم پروتئین)	d ۲/۱۹	c ۲/۵۸	c ۲/۵۱	b ۳/۲۲	a ۳/۹۰	a ۳/۸۱
آسکوربات پراکسیداز (یونیت بر میلی‌گرم پروتئین)	e ۰/۵۰	d ۰/۶۹	d ۰/۶۵	c ۱/۱۲	b ۱/۷۰	a ۱/۸۵
پراکسیداز (یونیت بر میلی‌گرم پروتئین)	d ۱/۹۵	c ۳/۱۰	c ۲/۸۸	b ۵/۳۱	a ۷/۷۵	a ۷/۹۲

استفاده از آسکوربیک اسید موجب بهبود پارامترهای رشد شامل طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی و افزایش مقدار کلروفیل کل، کاروتنویید، حوضچه آسکوربات، ترکیبات فنلی و مقدار پرولین گردید و مقدار پراکسیداسیون لیپیدها (مالون دآلدئید)، پراکسید هیدروژن(H_2O_2)، نشت یونی و فعالیت لیپوکسیژناز(LOX) را کاهش داد، اما فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گایاکل پراکسیداز (GPOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردااکتاز (GR) را افزایش داد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که با کاربرد نمک در محیط کشت پارامترهای رشد کاهش می‌یابد. کاهش رشد گیاه در تنش شوری می‌تواند نتیجه تأثیر تنش شوری در فرایندهای دخیل در تولید انرژی مثل فتوسنتز و تنفس باشد. تغییر در مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، سمیت نمک و رقابت و اختلال در جذب و انتقال یون‌های ضروری و عدم تعادل و کمبود عناصر ضروری، تنش اکسیداتیو ازجمله دلایلی است که در کاهش رشد در شرایط تنش شوری در گزارش‌های مختلف ذکر شده است (۳۳).

کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی یکی از اثرات تنش‌های محیطی نظیر شوری و خشکی می‌باشد و این کاهش بستگی به نوع گیاه، مدت و شدت تنش و مرحله نموی گیاه دارد. یکی از اثرات تنش‌های محیطی نظیر شوری و خشکی افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و القای تنش اکسیداتیو می‌باشد (۳۸). گونه‌های فعال اکسیژن منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تغییر در نفوذپذیری غشا (نشت یونی) و خسارت به سلول می‌شوند. مقدار H_2O_2 تولید شده در سلول نیز نشان‌دهنده تعادل بین تولید و تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن در سلول می‌باشد. غلظت‌های بالای H_2O_2 به‌عنوان عامل ایجاد کننده تنش اکسیداتیو به حساب می‌آیند (۳۳). یکی دیگر از عوامل پراکسیداسیون لیپیدها فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز است. این آنزیم یک آنزیم اکسیداتیو است که واکنشهای پراکسیداسیون لیپیدها را کاتالیز می‌کند (۷، ۱۶). در این مطالعه مقدار تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها، نشت یونی، مقدار H_2O_2 و فعالیت لیپوکسیژناز تنش شوری افزایش یافت. افزایش پراکسیداسیون لیپید یا نشت یونی و مقدار H_2O_2 در شرایط تنش شوری ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش اکسیداتیو می‌باشد که حذف، جاروب کردن و یا خاموش نمودن آنها خارج از توان گیاه بوده و نشان می‌دهد که سازوکارهای دفاعی ایجاد شده در گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو کافی نبوده است.

در شرایط غیرتنش بین میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ظرفیت جاروب کردن آنها توسط سیستم دفاع آنتی اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی) تعادل وجود دارد. اما در شرایط تنش میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن از ظرفیت جاروب کردن آنها توسط سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بیشتر شده و درنتیجه تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد. بنابراین برای مقابله با تنش اکسیداتیو تغییر ظرفیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی ضروری می‌باشد. آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردااکتاز از آنزیم‌های مهم سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در گیاهان می‌باشند (۲). در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردااکتاز در تنش شوری افزایش یافت.

آسکوربات از آنتی اکسیدان‌های مهم سلولی می‌باشد که با واکنش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در حذف گونه‌های فعال اکسیژن شرکت می‌کند. فعالیت عمده این ترکیب در چرخه آسکوربات و گلوتاتیون می‌باشد. در بررسی حاضر حوضچه آسکوربات در تنش شوری کاهش یافت. دلیل کاهش مقدار آسکوربات می‌تواند به علت تخریب مستقیم

آسکوربات به وسیله $O_2^{\cdot-}$ یا سایر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و همچنین مصرف آسکوربات برای سنتز زئازانتین و تولید مجدد آلفا توکوفرول باشد (۲۲، ۱).

در این تحقیق مقدار ترکیبات فنلی در تنش شوری کاهش یافت. البته کاهش ترکیبات فنلی در شرایط تنش شوری در گیاه فلفل گزارش شده است (۳۲). با توجه به نقش ترکیبات فنلی در کاهش یا مهار پراکسیداسیون لیپیدها، جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و خاموش کردن اکسیژن یکتایی یا تجزیه پراکسیدها، این ترکیبات سلولها را علیه تکثیر زنجیره پی در پی اکسیداسیون و دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌نمایند (۳۲).

در کلروپلاست‌ها کاروتنوییدها به‌عنوان رنگیزه کمکی عمل می‌کنند، اما نقش مهمتر آنها نقش آنتی اکسیدانی آنها می‌باشد (۱۶، ۲۵). زیرا این رنگیزه‌ها مسئول خاموش کردن اکسیژن یکتایی و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و نهایت تنش اکسیداتیو می‌باشند (۲۵). همچنین کاروتنوییدها از طریق چرخه گزانتوفیل باعث حفاظت از کلروفیل در مقابل فتواکسیداسیون می‌شوند(۲۸). در این بررسی مقدار کاروتنویید در شرایط تنش کاهش نشان داد. گزارش شده است که کاهش مقدار کاروتنویید در شرایط تنش نیز به علت تجزیه بتاکاروتن و تشکیل زئازانترین در چرخه گزانتوفیل می‌باشد (۳۹).

یکی از راه‌های مقابله با تنش‌های محیطی نظیر شوری و خشکی، سنتز ترکیبات اسمزا و سازگار و محافظ اسمزی می‌باشد که پرولین ازجمله این ترکیبات می‌باشد. در این مطالعه نیز مقدار پرولین در گیاهان سیب زمینی تحت تنش شوری افزایش یافت.

مطالعه حاضر نقش آسکوربیک اسید را در افزایش مقاومت به تنش شوری در گیاهان سیب زمینی در شرایط تنش شوری نشان می‌دهد. آسکوربیک اسید موجب بهبود پارامترهای رشد در گیاهان کنترل و گیاهان تحت تنش گردید. مشابه با این آزمایش گزارش شده که آسکوربیک اسید موجب افزایش رشد گیاهان گوجه فرنگی تحت تنش شوری می‌گردد (۳۵). علاوه بر این کاربرد آسکوربیک اسید توانست اثرات منفی تنش شوری بر جوانه‌زنی دانه برخی از هالوفیت‌ها را کاهش دهد(۲۴). Upadhyaya و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آسکوربیک اسید و افزایش مقدار آسکوربیک اسید درون‌زا، موجب افزایش مقاومت گیاهان سیب زمینی به تنش‌های محیطی نظیر شوری و خشکی شد (۴۰). Afzali و همکاران (۲۰۰۶) نیز اثرات مثبت آسکوربیک اسید را بر گیاهان گندم تحت تنش شوری گزارش نموده‌اند (۴).

در مطالعه حاضر کاربرد برون‌زای آسکوربیک اسید موجب کاهش تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها، نشت یونی، مقدار H_2O_2 و فعالیت لیپوکسیژناز در گیاهان سیب زمینی تحت تنش شوری گردید. آسکوربیک اسید یک آنتی اکسیدان مهم است که سلولها را با جاروب کردن ROS از تنش اکسیداتیو محافظت می‌نماید. آسکوربیک اسید هم به طور مستقیم و هم به طور غیرمستقیم موجب حذف ROS می‌گردد. مثلا به طور غیرمستقیم از طریق فعالیت آسکوربات پراکسیداز می‌تواند H_2O_2 را حذف نماید. علاوه بر این آسکوربیک اسید کوفاکتوری مهم برای آنزیم‌های دخیل در سنتز برخی از هورمون‌ها نظیر ژیبرلین می‌باشد. به علاوه اینکه نقش کاربرد برون‌زای آسکوربیک اسید در افزایش تقسیم سلولی نیز گزارش شده است (۱، ۱۷). آسکوربیک اسید نقش دوگانه‌ای را در سلول ایفا می‌کند، از یک طرف سبب تغییر چرخه سلولی و تحریک تقسیم سلولی می‌شود و از طرف دیگر افزایش رشد طولی و گسترش سلولی را موجب می‌شود (۱۳، ۱۲، ۲۱).

در این بررسی نیز آسکوربیک اسید موجب افزایش سیستم دفاع آنتی اکسیدانی اعم از آنزیمی و غیر آنزیمی گردید. آسکوربیک اسید موجب افزایش مقدار آسکوربیک اسید، ترکیبات فنلی، کاروتنوییدها، پرولین و افزایش فعالیت

آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر SOD، CAT، GPOD، APX و GR گردید.

مشابه با نتایج به‌دست آمده در این آزمایش، کاربرد برون‌زای آسکوربیک اسید موجب بهبود پارامترهای رشد در گیاهان لوبیای تحت تنش شوری شد (۴۲). این بهبود پارامترهای رشد با افزایش مقدار آسکوربات کل و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر SOD، CAT، APX و GR همراه بود (۴۲). کاربرد برون‌زای آسکوربیک اسید مقدار آسکوربیک اسید را در کلروپلاست برگ‌های گیاهان گلرنگ افزایش داد و موجب حفاظت از همبستگی غشا و ممانعت از آسیب رسیدن به کلروپلاست‌ها گردید (۱۸). در گیاهان سویای تحت تنش اکسیداتیو ناشی از نیکل نیز کاربرد برون‌زای آسکوربیک اسید با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر CAT و APX موجب کاهش فعالیت LOX و کاهش مقدار MDA و کاهش تنش اکسیداتیو گردید (۳۴).

در این مطالعه کاربرد آسکوربیک اسید موجب افزایش مقدار کلروفیل، کاروتنویید و ترکیبات فنلی گردید. در گیاهان سیب‌زمینی که بیان ژن‌های مسیر تولید آسکوربیک اسید و در نهایت مقدار آسکوربیک اسید اندوژن افزایش یافته بود، تنش‌های محیطی نظیر شوری و خشکی (مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی) نسبت به گیاهان کنترل کاهش کمتری را نشان داد (۴۰). مشابه با نتایج این مطالعه در مورد افزایش مقدار پرولین، نقش پیش تیمار آسکوربیک اسید روی گیاهان گندم تحت تنش شوری بررسی گردید و مشاهده شد که آسکوربیک اسید اثرات تنش نمک را با افزایش تجمع پرولین بهبود می‌بخشد (۵).

به‌عنوان نتیجه‌گیری، تنش شوری موجب کاهش پارامترهای رشد و افزایش تنش اکسیداتیو در گیاهان سیب زمینی گردید. اما کاربرد آسکوربیک اسید موجب بهبود رشد گیاهان در شرایط تنش و غیر تنش گردید. آسکوربیک اسید، آسیب اکسیداتیو را با افزایش مقدار آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر SOD، CAT، GPOD، APX و GR کاهش داد که نتایج آن در کاهش مقدار مالون دآلدئید، نشت یونی و مقدار پراکسید هیدروژن و کاهش فعالیت آنزیم LOX و در نهایت افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و بهبود پارامترهای رشد مشخص است.

منابع

۱- دولت آبادیان آ، مدرس ثانوی س ع م، شریفی م. ۱۳۸۸. اثر تنش کم آبی و محلول پاشی اسید آسکوربیک برمیزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و برخی تغییرات بیوشیمیایی در برگ ذرت دانه ای (*Zea maize* L.). مجله زیست شناسی ایران. ۲۲ (۳): ۴۰۷-۴۲۲.

۲- دولت آبادیان آ، مدرس ثانوی س ع م، اعتمادی ف. ۱۳۸۷. اثر پیش تیمار اسید سالیسیلیک بر جوانه زنی بذر گندم در شرایط تنش شوری. مجله زیست شناسی ایران. ۲۱ (۴): ۶۹۲-۷۰۲.

3- Abdul Jaleel C, Riadh K, Gopi R, Manivannan P, Ines J, Al-Juburi HJ, Chang-Xing Z, Hong-Bo S, Panneerselvam R (2009) Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. Acta Physiol Plant 31: 427-436

4- Afzali I, Basra SMA, Faroog M, Nawaz A (2006) Alleviation of salinity stress in spring wheat by hormonal priming with ABA, salicylic acid and ascorbic acid. Int J Agr Biol 1: 23-28

5- Al-Hakimi AMA; Hamada AM. (2001) Counteraction of salinity stress on wheat plants by grain soaking in ascorbic acid, thiamin or sodium salicylate. Biol Plant. 44(2): 253–261.

6- Aqueel Ahmad MS, Javed F, Ashraf M (2007) Iso osmotic effect of NaCl and PEG on growth, cations and free proline accumulation in callus tissue of two indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Plant Growth Regul 53: 53-63

7- Babar Ali M, Hahn EG, Paek KY (2005) Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lioxygenase activity in *Phalaenopsis*. Plant Physiol Biochem 43: 213-223

8- Bartosz G (1997) Oxidative stress in plants. Acta Physiol Plant 19(1): 47-64

9- Bates, L.S., Waldern, R.P., Tare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 29, 205-207.

10- Ben Hamed K, Castagna A, Salem E, Ranieri A, Abdelly C (2007) Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. Plant Growth Regul 53: 185-194.

11- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.

12- Citterio S; Sgorbati S; Scippa S; Sparvoli E (1994) Ascorbic acid effect on the onset of cell proliferation in pea root. Physiol Plant. 92: 601–607.

13- Cordoba-Pedregosa M, Gonzalez-Reycr JA, Canadillas MS, Navas P, Cordoba F (1996) Role of Apoplastic and Cell-Wall Peroxidases in the Stimulation of Root Elongation by Ascorbate. Plant Physiol. 112: 1119–1125.

14- De Pinto, M.C., Francis, D., Gara, L., 1999. The redox state of ascorbate-dehydroascorbate pairs a specific sensor of cell division in tobacco By-Z cells. Protoplasma. 209, 90-97.

15- Dhindsa RS, Motowe W (1981) Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. J Exp Bot 32: 79-91.

16- Egert M, Tevini M (2002) Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). Environ Exp Bot 48: 43-49

17- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133: 21-25.

18- Gadallah MAA (2000) Effects of acid mist and ascorbic acid treatment on the growth, stability of leaf membranes, chlorophyll content and some mineral elements of Carthamus tinctorius, the safflower. Water Air Soil Pollut. 118: 311–327.

19- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. Plant Physiol 59: 309-314.

20- Heath RL, packer L (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys 125: 189-198.

21- Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H (2000) Ascorbate Function and Associated Transport System in Plants. Plant Physiol Biochem. 38: 531– 541.

22- Iturbe-Ormaexte, I., Escordeo, P., Arrese-Igor, C., Becana, M., 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. Plant Physiol. 116, 173-181.

23- Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida AK (2006) Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defense. J Genetics 85 (3): 237-254

24- Khan MA, Ahmad MZ, Hameed A (2006) Effect of sea salt and L-ascorbic acid on the seed germination of halophytes. J Arid Environ. 67: 535–540.

25- Koyro HW (2006) Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). Environ Exp Bot 56: 136-149.

26- Kuzniak E (2004) Ascorbate and ascorbate-dependent enzymes in detached tomato leaves under conditions modulating the ascorbate pool. Acta Physiol Plant 26(3): 1-6

27- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carteniods: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymol 148: 350-382.

28- Loggini B, Scartazza A, Brugonli E, Navari-Izzo F (1999) Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. Plant Physiol 119: 1091-1099

29- Minguez-Mosquera MI, Jaren-Galen M, Garrido-Fernandez J (1993) Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. Phytochemistry 32: 1103-1108.

30- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497

31- Nakano Y, Asado K (1987) Purification of ascorbate peroxidase from spinach chloroplasts: its activation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydro-ascorbate radical. Plant Cell Physiol 28: 131-140.

32- Navarro, J.M,, Flores, P., Garrido, C., Martinez, V., 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. Food Chem. 96, 66-73.

33- Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotox Environ Safe 60: 324-349.

34- Saeidi-Sar S, Khavari-Nejad RA, Fahimi H, Ghorbanli M, Majd A (2007) Interactive effects of gibberellin A_3 and ascorbic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in *Glycine max* seedlings under nickel stress. Russ J Plant Physiol 54(1): 74-79.

35- Shalata A; Neumann PM (2001) Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt and reduce lipid peroxidation. J Exp Bot 52: 2207–2211.

36- Sofo A, Tuzio AC, Dichio B, Xiloyannis C (2005) Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. Plant Sci 169: 403-412

37- Soland, S.F., Laima, S.K., 1999. Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. Plant Agri. 1, 1-5.

38- Sudhakar C, Lakshmi A, Giridarakumar S (2001) Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Sci 141: 613-619.

39- Sultana N, Ikeda T, Itoh R (1999) Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. Environ Exp Bot 42(3):211-220.

40- Upadhyaya HCP, Akula N, Young KE, Chun SC, Kim DH, Park SW (2010) Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses. Biotechnol Lett (2010) 32: 321-330.

41- Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Plant Sci 151: 59-66.

42- Younis M.E, Hasaneen MNA, Kazamel AMS (2010) Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimentaleffects of NaCl and mannitol stress in Vicia faba seedlings. Protoplasma 239:39–48.

43- Zahoor AS, Faheem A (2009) Amelioration of salinity tolerance in Solanum tuberosum L.by exogenous application of ascorbic acid. In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant 45:540–549.

The effect of ascorbic acid on reduction of oxidative stress caused by salinity in potato

Daneshmand F.

Biology Dpt., Payame Noor University, Tehran, I. R. of Iran

Abstract

In this study, the effect of exogenous ascorbic acid treatment, as a strong antioxidant, on the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system and oxidative stress was investigated in *Solanum tuberosum* L. cv. Carlton *in vitro*. Explants were cultured in liquid MS medium containing different concentrations of ascorbic acid (0, 0.5 and 1 mM) and NaCl (0 and 75 mM) for 4 weeks. NaCl stress reduced growth parameters and photosynthetic pigments, carotenoids, ascorbate pool, phenolics content and increased lipid peroxidation, electrolyte leakage, H_2O_2 level, proline content and the activity of lipoxygenase (LOX), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPOD), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR). Ascorbic acid via increasing most enzymatic antioxidants (SOD, CAT, GPOD, APX and GR) and most non-enzymatic antioxidants and proline, reduced lipid peroxidation, electrolyte leakage, H_2O_2 content and LOX activity and leading to promote protective reactions which were reflected in improving plants growth parameters.

Key words: Salt Stress, Ascorbic acid, Enzymatic and non-enzymatic Antioxidant Systems, *In vitro*