نقش آسکوربیک اسید در تقلیل اثرات اکسیداتیو شوری روی گیاه شاهی

آزاده نجار خدابخش و نادر چاپارزاده*

تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، گروه زیست شناسی گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۸

چکیده

شوری خاک یکی از عوامل مهم محیطی کاهش رشد و محصول گیاهان در دنیاست و در توزیع گیاهان نقش تعیین کننده دارد. سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان نقش مهمی در تحمل به شوری را ایفا می‌کنند. در پژوهش حاضر اثر تنش شوری و برهمکنش آن با آسکوربیک اسید بر محتوای H_2O_2، مالون‌دی‌آلدئید، پایداری غشا و میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گیاه شاهی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد. گیاهان یک هفته پس از اولین تیمار برداشت شدند. نتایج نشان دادند که شوری موجب افزایش محتوای H_2O_2 و مالون‌دی‌آلدئید برگ‌ها و ریشه‌ها و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز ریشه‌ها و کاهش وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها و پایداری غشای برگ‌ها شد و آسکوربیک اسید موجب کاهش اثرات تنش شوری روی گیاهان گردید. بنابراین، به نظر می‌رسد که آسکوربیک اسید با کمک به غلبه بر اثرات اکسیداتیو موجب افزایش تحمل به شوری در گیاه شاهی می شود.

واژه‌های کلیدی: آسکوربیک اسید، شاهی، اکسیداتیو، شوری.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱-۳۴۳۲۷۵۴۱، پست الکترونیکی: nchapar@azaruniv.ac.ir

مقدمه

تنش‌های محیطی اثرات متنوعی بر رشد و نمو گیاهان می گذارند. شوری یکی از مشکلات اصلی در تولید محصولات کشاورزی و تعیین کننده پراکنش گیاهان در طبیعت می‌باشد. شوری از طریق ایجاد سمیت یونی، کمبود عناصر غذایی و خشکی فیزیولوژیکی بر جنبه های مختلف فیزیولوژیکی گیاهان تاثیر می‌گذارد (۳۱). بسیاری از تنش‌های محیطی همچون شوری، خشکی، عناصر سنگین و نور با ایجاد تنش ثانویه اکسیداتیو آسیب گیاهان را تشدید می‌کنند. به هنگام تنش اکسیداتیو به دلایل مختلف گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) تشکیل می شوند. کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها، پراکسیزوم‌ها و غشاهای سلولی جایگاه اصلی تولید ROS محسوب می‌شوند. ROSها شامل رادیکال‌های آزاد (سوپراکسید $O_2^{\bullet-}$، هیدروکسیل $OH^{\bullet}$، پرهیدروکسیل $HO_2^{\bullet}$ و رادیکال‌های آلکوکسیل $RO^{\bullet}$) و اشکال غیررادیکالی (پراکسید هیدروژن و اکسیژن یکتایی) می‌باشند (۱۸) که در صورت ضعف مکانیسم‌های حفاظتی منجر به تخریب سلولی به وسیله اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک خواهند شد (۸). ROSها در همه گیاهان در مقادیر مختلف طی متابولیسم طبیعی تولید می‌شوند ولی افزایش و تجمع بیش از حد آن‌ها در شرایط نامطلوب ایجاد می‌شود. ROSها فرآیندهایی مانند رشد و نمو، چرخه سلولی، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، پاسخ به تنش‌های غیرزیستی و دفاع در برابر پاتوژن‌ها را کنترل می‌کنند (۱۸). گیاهان برای خنثی کردن اثرات تخریبی گونه‌های فعال اکسیژن دارای سیستم‌های آنتی-اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی هستند. آسکوربیک اسید یکی از آنتی اکسیدان های غیرآنزیمی جاروب کننده

رادیکال‌های آزاد برای حفاظت سلول ها در مقابل آسیب-های اکسیداتیو می‌باشد (۸). این مولکول، ترکیب ۶ کربنی است که به عنوان آنتی‌اکسیدان محلول در سلول‌های جانوری و گیاهی عمل می نماید. گیاهان، قارچ‌ها و بسیاری از جانوران به طرق متفاوت توانایی بیوسنتز آسکوربیک اسید را دارند. انسان به دلیل نداشتن برخی آنزیم‌های مسیر بیوسنتز آسکوربیک اسید فاقد این توانایی می‌باشد (۳۵). آسکوربیک اسید درفضاهای آپوپلاستی، سیتوزول، میتوکندری‌ها، پراکسی‌زوم‌ها، گلی‌اکسی‌زوم‌ها و واکوول‌ها در غلظتی در حد چند میلی‌مولار وجود دارد (۱۳). در گیاهان آسکوربیک اسید نقش زیادی در عملکردهای فیزیولوژیکی ازجمله تقسیم سلولی، گسترش دیواره سلولی و سایر پدیده‌های رشدی ایفا می‌کند و منبع اصلی و مستقیم ویتامین C برای انسان محسوب می‌شود (۱۳). گزارش هایی از بهبود رشد گیاهان در شرایط شوری به وسیله کاربرد برون زای آسکوربیک اسید نیز در دست است (۴).

شاهی گیاهی یک‌ساله، متعلق به تیره براسیکاسه و به ارتفاع حدود ۳۰ تا ۵۰ سانتی‌متر می‌باشد. منشا آن به منطقه وسیعی از مصر تا تبت نسبت داده شده است. برگ و ساقه آن رنگ سبز روشنی دارد و گل‌هایش سفید است. شاهی اثر ضد آسکوربوت قوی داشته، اشتهاآور، مدر و تصفیه کننده خون است و دانه آن به عنوان داروی خلط‌آور مصرف می‌شود (۲). به دلیل ماهیت آنتی اکسیدانی آسکوربیک اسید و تاثیر آن در بهبود رشد گیاهان تحت تنش، در پژوهش حاضر تاثیر آن بر جنبه های اکسیداتیو تنش شوری در گیاه شاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

بذرهای سالم و یک دست گیاه شاهی (*Lepidium sativum* L. cv. Red Mobarakeh) انتخاب و با هیپوکلریت سدیم ۱٪ ضدعفونی و با آب مقطر شستشو داده شدند. بذرها پس از ۴ ساعت نگهداری در آب مقطر به گلدان‌های حاوی پرلیت انتقال یافته و با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند. گلدان‌ها در شرایط نوری تنظیم شده ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی در شدت نور فتوسنتزی ۲۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع و رطوبت ۳۰ تا ۴۰ درصد و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۱۴ روز، دانه رست‌ها به چهار گروه تقسیم شدند: گروه اول با محلول هوگلند (تیمار شاهد)، گروه دوم با محلول هوگلند حاوی ۱ میلی‌مولار آسکوربیک اسید (تیمار ASA)، گروه سوم با محلول هوگلند حاوی ۲۲۵ میلی‌مولار NaCl (تیمار NaCl) و گروه چهارم با محلول هوگلند حاوی ۱ میلی‌مولار آسکوربیک اسید و ۲۲۵ میلی-مولار NaCl (تیمار ASA+NaCl) به مدت هشت روز تیمار شدند. ۲۴ ساعت بعد از آخرین تیمار برگ‌ها و ریشه‌ها جهت آنالیز استفاده شدند.

تعیین وزن تر: ابتدا گرد و غبار و نمک احتمالی باقیمانده در سطح بخش‌های هوایی و ریشه‌ها پس از شستشو با آب مقطر و خشک کردن مجدد حذف و سپس وزن تر بخش-های هوایی و ریشه‌ها با ترازوی حساس اندازه‌گیری شد.

سنجش محتوای H_2O_2 : مقداری بافت برگی و ریشه‌ای تر با بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی‌مول و pH=۶/۵) همگن و به مدت ۲۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مقداری از عصاره رویی با تیتانیوم کلراید ۱٪ مخلوط و به مدت ۲۵ دقیقه دیگر سانتریفیوژ شد. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۱۰ nm تعیین (۲۲) و محتوای H_2O_2 با استفاده از ضریب تصحیح ۰/۲۸ $\mu M^{-1}\ cm^{-1}$ بر حسب $\mu mol\ g^{-1}$ وزن تر ارزیابی شد.

سنجش محتوای مالون‌دی‌آلدئید: مقداری بافت برگی و ریشه‌ای تر با تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱٪ همگن و به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مقداری از محلول رویی با TCA ۲۰٪ حاوی تیوباربیتوریک اسید ۰/۵٪ مخلوط و ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. واکنش درآب یخ متوقف و پس از سانتریفیوژ میزان جذب

مایع رویی در طول موج‌های۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر تعیین (۳) و محتوای مالون‌دی‌آلدئید از روی ضریب تصحیح ۱۵۵ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ برحسب $\mu mol\ g^{-1}$ وزن تر ارزیابی شد.

سنجش شاخص پایداری غشا (Membrane Stability Index, MSI): قطعات برگی هم اندازه در فالکون‌های حاوی آب مقطر در دمای آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه شیکر تکان داده شده و میزان هدایت الکتریکی (C_1) محلول ها اندازه‌گیری شد. سپس همان قطعات در اتوکلاو تخریب و پس از آن به مدت ۱ ساعت روی دستگاه شیکر تکان داده شده و دوباره میزان هدایت الکتریکی (C_2) محلول ها تعیین و شاخص پایداری غشا از رابطه زیر محاسبه شد (۳۳):

$$MSI = [1- (C_1/C_2)]\times 100$$

استخراج عصاره آنزیمی: مقداری بافت ریشه‌ای تر در دمای ۴ °C با بافر فسفات سدیم حاوی EDTA و پلی-وینیل پلی‌پیرولیدون (۱۰۰ mM و pH= ۷/۵) همگن و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور و دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد. از محلول رویی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز استفاده شد.

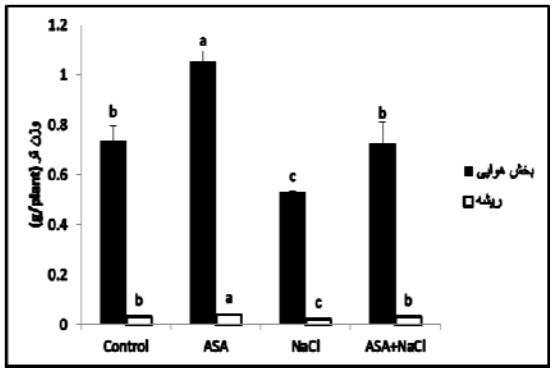
سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز مقداری از مایع رویی با بافر فسفات (۵۰ mM و pH = ۷/۸) حاوی گایاکول ۴۰ mM و آب اکسیژنه ۲۰ mM مخلوط شد. میزان تولید تتراگایاکول در ۴۷۰ nm در ۱ دقیقه اندازه‌گیری و فعالیت آنزیمی با استفاده از ضریب تصحیح ۶/۳۹ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ به صورت واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد. میزان پروتئین هر نمونه بر اساس روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۲۳).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: مقداری از مایع رویی با بافر فسفات (۱۰۰mM و pH= ۷/۵) و آب اکسیژنه ۲ mM مخلوط و بعد از ۳ دقیقه معرف تیتانیوم اضافه و پس از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور، میزان جذب مایع رویی در nm ۴۲۰ اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین هر نمونه بر اساس روش برادفورد تعیین و با استفاده از منحنی استاندارد آب اکسیژنه با غلظت‌های ۱۰-۰ میلی‌مول بر لیتر تعیین فعالیت کاتالاز به صورت واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (۳۹).

تجزیه و تحلیل آماری: برای انجام تجزیه های آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای رسم نمودارها از Excel استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

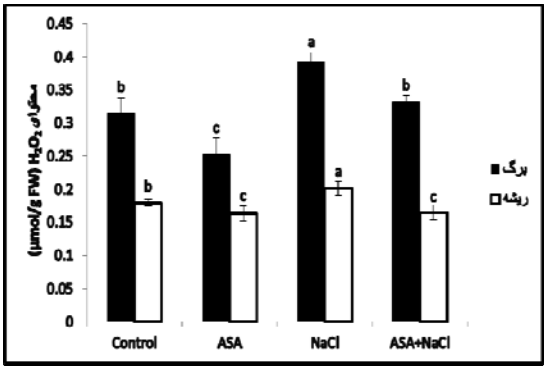
وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها: طبق نتایج به دست آمده شوری موجب کاهش معنی‌دار وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها نسبت به شاهد شد. آسکوربیک اسید باعث افزایش معنی‌دار وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها شد. وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها در گیاهان تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید نسبت به تیمار شوری افزایش معنی دار نشان داد ولی نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۱).



شکل ۱- مقادیر میانگین وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها با ۴ تکرار ±SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

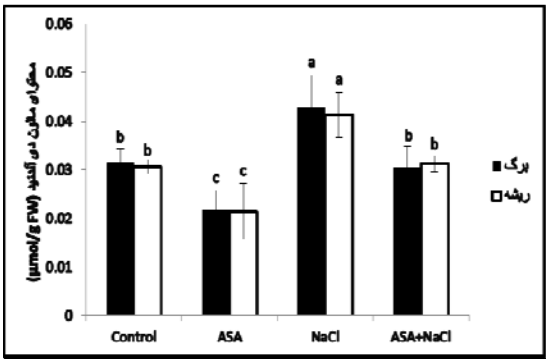
محتوای H_2O_2 برگ‌ها و ریشه‌ها: بر اساس نتایج شوری موجب افزایش معنی‌دار محتوای H_2O_2 برگ‌ها و ریشه‌ها نسبت به شرایط شاهد شد. آسکوربیک اسید باعث کاهش معنی‌دار محتوای H_2O_2 برگ‌ها و ریشه‌ها شد. محتوای

H_2O_2 برگ‌ها و ریشه‌ها در گیاهان تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید نسبت به تیمار شوری کاهش نشان داد ولی نسبت به تیمار شاهد در برگ‌ها تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۲).



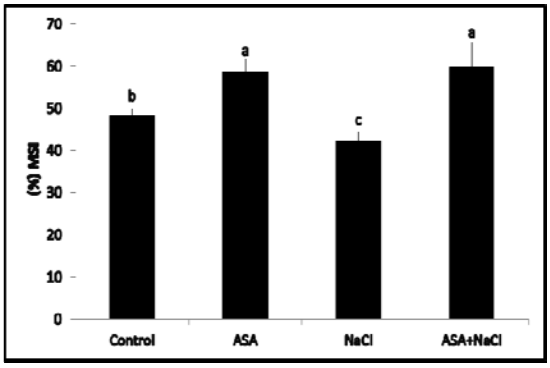
شکل ۲- مقادیر میانگین محتوای H_2O_2 برگ‌ها و ریشه‌ها با ۴ تکرار ±SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

محتوای مالوندی‌آلدئید برگ‌ها و ریشه‌ها: شوری موجب افزایش معنی‌دار محتوای مالوندی‌آلدئید برگ‌ها و ریشه‌ها نسبت به شاهد شد. این در حالی است که تیمار آسکوربیک اسید محتوای مالوندی‌آلدئید برگ‌ها و ریشه‌ها را به طور معنی‌داری کاهش داد. محتوای مالوندی‌آلدئید برگ‌ها و ریشه‌ها در گیاه تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید نسبت به گیاه شاهد تفاوت معنی داری نداشت ولی نسبت به تیمار شوری کاهش یافت (شکل ۳).



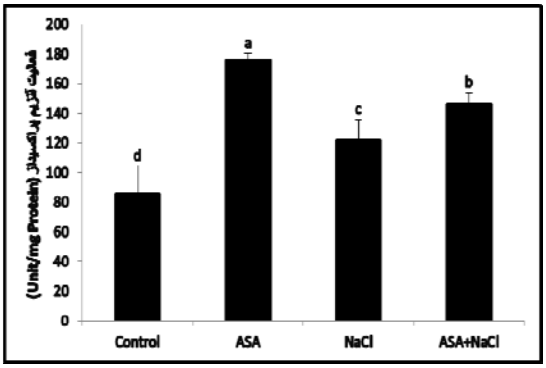
شکل ۳- مقادیر میانگین محتوای مالوندی‌آلدئید برگ‌ها و ریشه‌ها با ۴ تکرار ±SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

پایداری غشاهای سلولی: نتایج حاصل از اثرات شوری روی شاخص پایداری غشاهای سلولی برگ‌ها نشان داد که شوری موجب کاهش معنی‌دار MSI برگ‌ها نسبت به شاهد شد. تیمار آسکوربیک اسید باعث افزایش معنی‌دار MSI برگ‌ها شد. MSI برگ‌ها در گیاه تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید نسبت به گیاه شاهد و گیاهان تحت تنش شوری افزایش معنی داری داشت (شکل ۴).



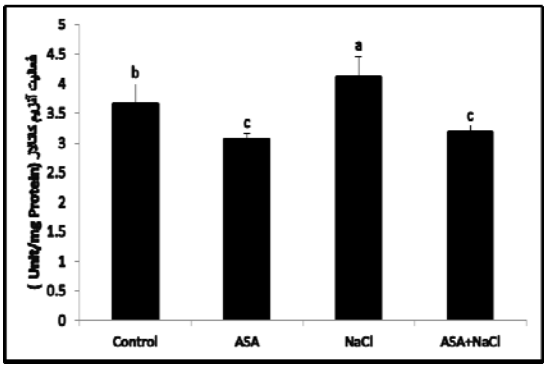
شکل ۴- مقادیر میانگین MSI برگ‌ها با ۴ تکرار ±SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه‌ها: فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه‌ها هم در تنش شوری و هم تحت تیمار آسکوربیک اسید افزایش معنی‌دار نسبت به شرایط شاهد نشان داد. همچنین در گیاهان تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه‌ها نسبت به تیمار شوری و شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵- مقادیر میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه‌ها با ۴ تکرار ±SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه‌ها: در ریشه گیاهان، شوری موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربیک اسید باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم نسبت به شرایط شاهد شد. در گیاه تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید، فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه‌ها نسبت به تنش شوری و شاهد کاهش معنی‌داری یافت (شکل ۶).



شکل ۶- مقادیر میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه‌ها با ۴ تکرار±SD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<۰/۰۵ است.

بحث

وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها: بر اساس نتایج، شوری موجب کاهش معنی‌دار وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها نسبت به شاهد شد (شکل ۱). کاهش رشد، عمده-ترین اثر شوری بر گیاهان است (۱۰). تنش شوری بر کاهش رشد گیاهان به طرق مختلف تاثیر می گذارد. کاهش جذب آب در شرایط شوری از اثرات اولیه روی گیاهان می باشد که این مسئله بر رشد تاثیر جدی می گذارد (اثر اسموتیک شوری). با گذشت زمان و انباشتگی یون های سمی در بافت های برگی فرآیند فتوسنتز آسیب دیده و کاهش رشد مضاعف می شود. جلوگیری از رشد گیاه در شرایط شوری ممکن است از طریق افزایش تولید برخی هورمون ها به ویژه آبسیزیک اسید صورت بگیرد (۲۹). همچنین شوری نیاز انرژیایی لازم برای حفظ حالت طبیعی سلول را افزایش داده و در نتیجه انرژی کمتری برای نیازهای رشدی باقی می‌ماند. برخی از گیاهان در شرایط تنشی توان آنتی اکسیدانی خود جهت مقابله با شرایط جدید را افزایش می دهند (۱۰). تیمار ASA باعث افزایش معنی‌دار وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها در حضور و عدم حضور نمک شد. ASA با افزایش جذب نیتروژن (از طریق سنتز مالات و تبادل آن با نیترات) می‌تواند به افزایش رشد گیاه کمک کند (۶). همچنین ASA در سنتز گلیکوپروتئین‌های اکستانسین غنی از هیدروکسی پرولین دیواره نقش دارد (۱۴). ASA یکی از ترکیبات مهم در حفظ حالت ردوکس سلولی می‌باشد که در شرایط تنشی در عملکرد مناسب سلول دخالت می‌کند. این ترکیب به عنوان کوفاکتور مهم در بیوسنتز برخی هورمون‌های گیاهی از جمله جیبرلین (۳۷)، می‌تواند سبب افزایش تقسیم و توسعه سلولی و رشد گیاه شود. گزارش‌هایی از افزایش مقدار ASA در طی تنش شوری روی گیاهان وجود دارد (۲۶). از طرف دیگر تیمار برون زای گیاهان با ASA می تواند با حفظ فتوسنتز و رنگدانه های فتوسنتزی در شرایط تنش شوری رشد گیاهان را بهبود بخشد (۱۹). اثر بهبودی کاربرد ASA در رشد گیاهان دیگر از جمله لوبیا (۵) و نخود (۵ و ۸) نیز گزارش شده است.

محتوای H_2O_2 برگ‌ها و ریشه‌ها: بر اساس نتایج، شوری موجب افزایش معنی‌دار محتوای H_2O_2 برگ‌ها و ریشه‌ها نسبت به شاهد شده است (شکل ۲). افزایش میزان پراکسید هیدروژن در طی تنش شوری در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (۶ و ۲۰). تنش شوری همانند بسیاری از تنش های محیطی می تواند به تنش ثانویه اکسیداتیو در گیاهان منجر شود (۱۱). اکسیژن‌های فعال توسط فعالیت-های متابولیکی مختلف در کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها، پراکسی‌زوم‌ها، میکروبادی‌ها، NADPH اکسیدازهای متصل به غشاهای سلولی و پراکسیدازهای دیواره سلولی تولید می‌شوند (۳۰). گیاهان وقتی در معرض تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند، اشکال مختلفی از اکسیژن‌های فعال، که به بافت‌های گیاهی صدمات اکسیداتیو وارد می سازند، را تولید می‌کنند (۳۸). در شرایط تنشی تعادل تولید و حذف

گونه‌های فعال اکسیژن به هم خورده و مقدار آنها افزایش می‌یابد. در میان گونه‌های فعال اکسیژن، H_2O_2 از اهمیت خاصی برخوردار است. H_2O_2 دارای پایداری ببیشتر و نیمه عمر طولانی است و به آسانی از غشاهای سلولی عبور می-کند (۴۰). هیدروژن پراکسید همچنین در برخی غلظت ها به عنوان مولکول علامتی عمل می کند، بطوریکه با پیش تیمار این ترکیب، تحمل به شوری در گیاهان می تواند افزایش یابد (۱۷).

نتایج نشان داد که تیمار آسکوربیک اسید باعث کاهش معنی‌دار محتوای H_2O_2 برگ‌ها و ریشه‌ها می شود. مطابق با نتایج این پژوهش، کاهش سطح H_2O_2 با کاربرد ASA در گندم تحت تنش شوری نیز گزارش شده است (۶). همچنین محتوای H_2O_2 برگ‌ها و ریشه‌ها در گیاهان تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید نسبت به تیمار شوری نیز کاهش یافت. گیاهان به طور طبیعی مکانیسم-هایی برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن دارند. از جمله مکانیسم های دفاعی افزایش تولید ترکیبات آنتی اکسیدان می باشد. ASA یک مولکول آنتی‌اکسیدان درون زا و محلول در آب است که در گیاهان به عنوان ماده اولیه در چرخه سم‌زدایی آنزیمی H_2O_2 عمل می‌کند (۸). ASA به طور مستقیم رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید را حذف و H_2O_2 را به کمک آسکوربات پراکسیداز به آب احیا می‌کند (۴).

محتوای مالون‌دی‌آلدئید برگ‌ها و ریشه‌ها: بر اساس نتایج، شوری موجب افزایش معنی‌دار محتوای مالون‌دی آلدئید برگ‌ها و ریشه‌ها نسبت به شاهد شد (شکل ۳). رادیکال‌های آزاد اکسیژن توانایی انجام واکنش‌های اکسیداسیون با اسیدهای چرب غیراشباع را دارند که منجر به پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاهای سلولی می شود (۲۷). گونه های فعال اکسیژن به فسفولیپیدها در محل پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع و پیوند استری بین گلیسرول و اسیدهای چرب آسیب می‌رسانند. اندازه‌گیری محصولات پراکسیداسیون یکی از قابل‌قبول-ترین روش‌های اندازه‌گیری صدمات اکسیداتیو به غشاهای سلولی است. پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، آلدئیدهایی را تولید می‌کند که این محصولات آلدئیدی به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو بیان می‌شوند (۳۸). پراکسیداسیون چربی ها به عنوان یک فرآیند متابولیکی طبیعی تحت شرایط عادی نیز صورت می پذیرد ولی در شرایط تنشی تشدید می شود. پیامد عمل گونه‌های فعال اکسیژن نه تنها آسیب به چربی هاست بلکه پروتئین‌ها و DNA نیز صدمه دیده و در شایط حاد منجر به مرگ سلولی می‌شوند (۱۸). افزایش پراکسیداسیون چربی ها در شرایط تنش شوری در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (۳ و ۱۲).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار آسکوربیک اسید باعث کاهش معنی‌دار محتوای مالون‌دی‌آلدئید برگ‌ها و ریشه‌ها شد. همچنین محتوای مالون‌دی‌آلدئید برگ‌ها و ریشه‌ها در گیاهان تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید نسبت به تیمار شوری کاهش یافت (شکل ۳). ASA با خنثی‌سازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق مصرف اکسیژن‌های فعال و تولید مونو دهیدروآسکوربات از بروز آسیب به سلول و چربی های غشاها جلوگیری کرده و سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۳۷). مونو دهیدروآسکوربات دوباره توسط مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز به آسکوربات تبدیل می‌شود. تاثیر کاهندگی پراکسیداسیون چربی ها با کاربرد برگی ASA، در گیاه کلزای تحت تنش شوری نیز مشاهده شده است (۱).

پایداری غشاهای سلولی: بر اساس نتایج، شوری موجب کاهش معنی‌دار شاخص پایداری غشاهای سلولی برگ‌ها نسبت به شاهد شد (شکل ۴). یکی دیگر از روش‌ها برای بررسی عملکرد فیزیولوژیکی سلول ها، سنجش نفوذپذیری غشاهای سلولی و تغییرات ساختاری آنها است. غشاهای سلولی محتوای درونی سلول ها را از محیط بیرونی جدا

می کنند. غشا اولین جایگاهی است که در معرض تنش شوری قرار می‌گیرد (۷). هرگونه تغییر در ساختار غشاهای سلولی عملکرد سلول ها را متاثر می کند. همانطور که در بخش قبلی بیان شد، پراکسیداسیون چربی‌ها به وسیله گونه‌های فعال اکسیژن طی تنش شوری یکی از مکانیسم-های مهم تخریب غشاهای سلولی می باشد. با آسیب به ساختار و یکپارچگی غشاها نقل و انتقال یون ها و متابولیت ها از تعادل خارج شده و این مسئله عوارض مخربی برای سلول خواهد داشت (۳۶).

همان طور که در شکل ۴ نشان داده است، تیمار ASA باعث افزایش معنی‌دار شاخص پایداری غشاهای سلولی برگ‌ها شد. همچنین شاخص پایداری غشاهای سلولی برگ‌ها در گیاهان تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید نسبت به گیاه تحت تنش شوری افزایش یافت. یکی از دلایل اصلی تاثیر مثبت ASA در حفظ و پایداری ساختار غشاهای سلولی تاثیر آن در تولید مجدد ویتامین E از رادیکال مربوطه می‌باشد (۳۰). همچنین ویتامین E رادیکال‌های لیپوپراکسی را پاکسازی و رادیکال αتوکوفروکسیل را تولید می‌کند که توسط ASA دوباره به شکل احیا بر می‌گردد و از این طریق باعث انسجام غشایی می‌شود. ویتامین E آنتی‌اکسیدان محلول در چربی بسیار مهمی بوده و در غشاهای غنی از اسیدهای چرب غیراشباع کلروپلاست‌ها وجود دارد که از پراکسیداسیون اسیدهای چرب جلوگیری کنند. زنجیره فیتیل آنها به اسیدهای چرب آزاد متصل شده و از هم گسیختگی اسیدهای چرب در غشاها را به حداقل می‌رساند. همچنین ASA با کاهش تجمع پراکسید هیدروژن از پراکسیداسیون لیپیدی و تغییر نفوذپذیری غشاها جلوگیری کرده و مانع نشت یونی می-شود (۱۶). تاثیر ASA در کاهش اثرات شوری روی پایداری غشاهای سلولی گیاهان دیگر از جمله پیاز نیز گزارش شده است (۳۴).

فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه‌ها: بر اساس نتایج، شوری موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه‌ها نسبت به شاهد شد (شکل ۵). نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همانند پراکسیداز و کاتالاز در کاهش آسیب وارده به ماکرومولکول‌ها و نهایتا ساختارهای سلولی توسط ROS ثابت شده است. درمجموع، بین توان آنتی اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی) و درجه تحمل به انواع تنش ها همبستگی وجود دارد (۵). پراکسیداز یک پروتئین دارای هِم است که برای اکسیداسیون سوبستراهای مختلف از H_2O_2 استفاده می‌کند. این آنزیم به طور عمده در دیواره سلولی قرار داشته و دارای نقش‌های مختلفی از جمله اکسیداسیون ترکیبات فنلی، پلی‌مریزاسیون به منظور سنتز لیگنین و پاکسازی H_2O_2 می‌باشد (۲۵). H_2O_2 یک مولکول علامتی مهم در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد که باعث القای سنتز تعدادی از آنزیم های دفاعی در گیاهان شده و موجب تغییر تحمل گیاه علیه تنش‌های مذکور می‌شود. در این بررسی، افزایش فعالیت پراکسیداز با افزایش تولید پراکسید هیدروژن همراه بود. افزایش فعالیت این آنزیم نشان دهنده این است که پراکسیداز نقش مهمی را در سمیت‌زدایی از پراکسید هیدروژن ایفا می‌کند. افزایش فعالیت پراکسیداز در ریشه و ساقه گیاه *Crithmum maritimum* (۹) و برگ های تحت تنش شوری در مقایسه با گیاه شاهد گزارش شده است. میزان افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گونه های گیاهی و حتی ارقام مختلف یک گونه تحت تنش شوری یکسان نمی باشد (۲۱). الگوی فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز در ریشه گیاهان ممکن است در تنش کوتاه مدت و دراز مدت شوری متفاوت باشد به طوری که در ریشه کلم تیمار شوری پس از یک روز موجب کاهش ولی پس از هفت روز موجب افزایش فعالیت این آنزیم ها شد (۲۰).

بر اساس داده های شکل ۵، تیمار ASA باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه‌ها شد. همچنین

فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه‌ها در گیاه تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید نسبت به گیاه تحت تنش شوری افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم در سویا (۱۵) و نیشکر (۲۸) تحت تنش شوری توسط تیمار برون زای ASA نیز گزارش شده است. همان طور که در قبل بیان شد، پراکسیدازها می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل نمایند. بنابراین، آسکوربیک اسید برای آنزیم آسکوربات پراکسیداز که در تجزیه H_2O_2 نقش دارد به عنوان سوبسترا عمل می‌کند (۲۴) و احتمالا بتواند با تامین سوبسترای مورد نیاز آنزیم در سم‌زدایی H_2O_2 نقش ایفا کند.

فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه‌ها: بر اساس نتایج ارایه شده در شکل ۶، شوری موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه‌ها نسبت به گیاهان شاهد شد. در تنش شوری یکی از مهمترین ترکیبات سمی تولید شده ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسیدهیدروژن می‌باشد. کاتالاز یک آنزیم تترامر حاوی هِم است که در تمام موجودات هوازی وجود داشته و در تجزیه H_2O_2 نقش دارد. گونه های فعال اکسیژن علاوه بر اینکه متابولیت‌های سمی برای سلول هستند، نقش مهمی در انتقال علایم در فرآیندهای سلولی به عنوان پیامبر ثانویه برای فعال شدن فاکتورهای رونویسی و بیان ژن‌ها ایفا می‌کنند (۵). افزایش فعالیت کاتالاز در هر دو رقم حساس و مقاوم به شوری در گیاه گندم گزارش شده است (۳۲). از طرف دیگر، این آنزیم در گیاه شورپسند *Cakile maritima* در شرایط شوری دارای نقش حفاظتی نمی باشد (۱۰). در شرایط تنش شوری، مقدار H_2O_2 در سلول‌ها افزایش می‌یابد که کاتالاز یکی از تخصصی‌ترین و اصلی‌ترین آنزیم‌های پاکسازی‌کننده H_2O_2 محسوب می شود.

نتایج شکل ۶ حاکی از کاهش معنی دار فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه‌ها در تیمار آسکوربیک اسید می باشد. همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه‌ها در گیاه تیمار شده با شوری توام با آسکوربیک اسید نسبت به گیاه تحت تنش شوری کاهش یافت. یکی از مکانیسم‌های مهم عملکردی آسکوربیک اسید پاکسازی موثر گونه های اکسیژن فعال و حفاظت سلول ها از آسیب اکسیداتیو می باشد. آنزیم کاتالاز، H_2O_2 را به آب و اکسیژن تبدیل و در طی این واکنش آسکوربیک اسید به عنوان دهنده هیدروژن عمل می‌کند (۲۰). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ASA، می‌تواند دلیلی بر خنثی شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله ASA (شکل ۲) و بهبود وضع رشدی (شکل ۱) و فیزیولوژیکی (شکل ۴) گیاهان باشد.

جمع‌بندی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که شوری ۲۲۵ میلی مولار NaCl منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه شاهی شده و کاربرد ریشه‌ای آسکوربیک اسید به عنوان آنتی-اکسیدان می‌تواند اثرات مضر و تنش اکسیداتیو حاصل از شوری را بهبود بخشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به خاطر حمایت مالی و آقای علیرضا محمدپور به سبب همکاری آزمایشگاهی سپاسگزاری می نمایند.

منابع

۱- دولت آبادیان آ.، مدرس ثانوی س.م. و شریفی م. ۱۳۸۸. اثر تغذیه برگ با آسکوربیک اسید بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، تجمع پرولین و لیپید پراکسیداسیون کلزا (*Brassica napus* L) در شرایط تنش شوری. مجله علوم و فنون کشاورزی ومنابع طبیعی، ۴۷.

۲- زرگری ع. ۱۳۷۱. گیاهان دارویی. جلد اول. انتشارات دانشگاه تهران.

۳- قربانلی م.، احمدی ف.، منفرد ا. و بخشی خانیکی غ. ۱۳۹۱. اثر تنش شوری و برهمکنش آن با آسکوربات بر میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پرولین و مالوندی‌آلدئید در گیاه زیره سبز چهار هفته پس از جوانه زنی. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، (۱)۲۸: ۲۷-۱۴.

4- Alqurainy F. 2007. Responses of bean and pea to vitamin C under salinity stress. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 3: 714-722.

5- Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnology Advances, 27:84–93.

6- Azzedine F., Cherroucha H. and Baka M. 2011. Improvement of salt tolerance in durum wheat by ascorbic acid application. Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 7(1): 27-37.

7- Bajji M., Kinet J.M. and Lutts S. 2001. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. Plant Growth Regulation, 45: 1-10.

8- Beltagi M.S. 2008. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) induced anabolic changes for salt tolerance in chick pea (*Cicer arietinum* L.) plants. African Journal of Plant Science, 2(10): 118-123.

9- Ben Amor N., Ben Hamed K., Debez A., Grignon C. and Abdelly C. 2005. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. Plant Science, 168(4): 889-899.

10- Ben Amor N., Jimenez A., Megdiche W., Lundqvist M., Sevilla F. and Abdelly C. 2006. Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte Cakile maritima. Physiologia Plantarum, 126: 446-457.

11- Chaparzadeh N., Aftabi Y., Dolati M., Mehrnejad F. and Pessarakli M. 2014. Salinity tolerance ranking of various wheat landraces from the west of the urmia saline lake in iran by using physiological parameters. Journal of Plant Nutrition, 37: 1025-1039.

12- Chaparzadeh N., D'Amico M.L., Khavari-Nejad R.A., Izzo R. and Navari-Izzo F. 2004. Antioxidative responses of Calendula officinalis under salinity conditions. Plant Physiology and Biochemistry, 42: 695-701.

13- Conklin P. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. Plant, Cell and Environment**,** 24: 383-394.

14- Davey M.W., Montagu M.V., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I.J.J., Strain J.J., Favell D. and Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. Journal of the Science of Food and Agriculture**,** 80: 825-860.

15- Dehghan G., Rezazadeh L. and Habibi G. 2011. Exogenous ascorbate improves antioxidant defense system and induces salinity tolerance in soybean seedlings. Acta Biologica Szegediensis, 55: 261-264.

16- Farouk S. 2011. Osmotic adjustment in wheat flag leaf in relation to flag leaf area and grain yield per plant. Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 7: 117-138.

17- Fedina I.S., Nedeva D. and Çiçek N. 2009. Pre-treatment with H_2O_2 induces salt tolerance in barley seedlings. Biologia Plantarum, 53: 321-324.

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

19- Hamada A.M. and Al-Hakimi A.M. 2009. Exogenous ascorbic acid or thiamine increases the resistance of sun flower and maize plants to salt stress. Acta Agronomica Hungarica, 57:335-347.

20- Hernandez M., Fernandez-Garcia N., Diaz-Vivancos P. and Olmos E. 2010. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. Journal of Experimental Botany, 61: 521-535.

21- Izadi M. H., Rabbani J., Emam Y., Pessarakli M. and Tahmasebi A. 2014. Effects of salinity stress on physiological performance of various wheat and barley cultivars. Journal of Plant Nutrition, 37: 520-531.

22- Jana S. and Chaudhuri M.A. 1981. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. Aquatic Botany, 12: 345-54.

23- Krizek D.T., Britz S.J. and Mirecki R. M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. Physiologia Plantarum, 103: 1-7.

24- Lee S.K. and Kader A.A. 2000. Pre-harvest and post-harvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest Biology and Technology, 20: 207-220.

25- Mafakheri A., Siosemardeh A., Bahramnejad B., Struik P.C. and Sohrabi Y. 2011. Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. Australian Journal of Crop Science, 10: 1255-1260.

26- Mohamed M.A., Matter M.A. and Saker M.M. 2010. Effect of salt stress on some defense mechanisms of transgenic and wild potato clones (*Solanum tuberosum* L.) grown in vitro. Natural Science, 12: 181–193.

27- Montillet J.L., Chamnongpol S., Rusterucci C. and Triantaphylides C. 2005. Fatty acid hydroperoxides and H_2O_2 in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. Plant Physiology, 138: 1516-1526.

28- Munir N. and Aftab F. 2011. Enhancement of salt tolerance in sugarcane by ascorbic acid pretreatment. African Journal of Biotechnology, 10: 18362–18370.

29- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment, 25: 239-250.

30- Parida A.K. and Das A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60: 324-349.

31- Parvaiz A. and Satyawati S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. Plant Soil and Environment, 54: 89-99.

32- Sairam R.K., Rao K.V. and Srivastava G.C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long-term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science, 163: 1037-1046.

33- Sairam R., Singh D. and Srivastava G. 2003. Changes in activities of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. Biologia Plantarum, 47: 61-66.

34- Salama K.H. 2009. Amelioration of NaCl-induced alterations on the plasma membrane of *Allium Cepa* L. by ascorbic acid. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3: 990-994.

35- Smirnoff N., Conklin P.L. and Loewus F.A. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants. Annual Review Plant Physiology, 52: 437-467.

36- Stevens J., Senaratn T. and Sivasithamparam K. 2006. Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. Plant Growth Regulation, 49: 77-83.

37- Taqi A.K., Mazid M. and Firoz M. 2011. A review of ascorbic acid potentialities against oxidative stress induced in plants. Journal of Agrobiology, 28(2): 97-111.

38- Torres-Franklin M.L., Contour-Ansel D., Zuily-Fodil Y. and Pham-Thi A.T. 2008. Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from moderate drought stress. Journal of Plant Physiology, 165: 514-521.

39- Wahid A., Perveen M., Gelani S. and Basra Sh. 2007. Pretreatment of seed with H_2O_2 improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. Journal of Plant Physiology, 164: 283-294.

40- War A. R., Paulraj M. G., War M. Y., and Ignacimuthu S. 2011. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Signaling and Behavior, 6: 1787-1792.

The role of ascorbic acid in reduction of oxidative effects of salinity on *Lepidium sativum* L.

Najjar-khodabakhsh A. and Chaparzadeh N.

Biology Dept., Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

Soil salinity is one of the most important factors reducing the growth and yield of plants worldwide and determining plant distribution. Antioxidant systems play a crucial role in salt tolerance of plants. In this investigation, the effect of salt stress and its interaction with ascorbic acid on production of H_2O_2, malondialdehyde, membrane stability and root activities of catalase and peroxidase in *Lepidium sativum* L. were investigated. The experiment was conducted in a completely randomized design with four replications. Plants were harvested one week after starting treatments. The results showed that salinity increased the amount of H_2O_2 and malondialdehyde in leaves and roots, and catalase and peroxidase enzymes activities of the roots. Salinity decreased fresh weight of the shoots and roots, and membrane stability of the leaves. This reports shows that exogenous ascorbic acid can alleviate salinity stress effects on plants. As a whole, these data suggest that the ascorbic acid increased the tolerance of *Lepidium sativum* under salinity stress by overcoming the oxidative effects.

Key words: Ascorbic acid, *Lepidium sativum* L., Oxidative, Salinity.