تفاوت در پاسخ آنتی‌اکسیدانی دو رقم کلزا بهاره و پاییزه (*Brassica napus* L.) در شرایط مزرعه‌ای تحت تأثیر اسید سالیسیلیک

حامد کشاورز[۱]، سید علی محمد مدرس ثانوی[۱*] و فاطمه زرین کمر[۲]

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت

[۲] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱

چکیده

سرما یکی از مهمترین تنش‌های غیر زنده می‌باشد که بر رشد و نمو گیاهان تأثیر می‌گذارد. در این تحقیق تأثیر اسید سالیسیلیک بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی در دو رقم کلزا با مقاومت متفاوت به سرما مورد بررسی قرار گرفت. اسید سالیسیلیک در ۴ سطح ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو مولار در مرحله طوقه‌ای دو رقم کلزا که شامل رقم RGS (بهاره و حساس به سرما) و رقم LICORD (پاییزه و مقاوم به سرما) محلول‌پاشی گردید. نمونه‌گیری از گیاهان ۲۴ ساعت بعد از محلول‌پاشی انجام شد. تأثیر اسید سالیسیلیک و دمای پایین بر پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز، آنزیم پلی فنل اکسیداز، مقدار پروتئین محلول برگ و پرولین در برگ‌های کلزا مورد بررسی قرار گرفت. اسید سالیسیلیک به طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز (در رقم مقاوم)، مقدار پروتئین محلول و پرولین شد اما فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در هر دو رقم به طور چشمگیری کاهش یافت. محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک موجب افزایش عملکرد بذر شد. بیشترین وزن خشک اندام هوایی نیز در رقم مقاوم بدست آمد. البته در مواردی غلظت‌های بالاتر اسید سالیسیلیک منجر به کاهش مقدار صفات فوق در هر دو رقم شد. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم‌ها در دو رقم متفاوت بوده و بجز کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در سایر موارد اسید سالیسیلیک سبب افزایش فعالیت این آنزیم‌ها گردید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، تنش اکسیداتیو، کلزا

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۴۸۱۶۳۷، پست الکترونیکی: Modaresa@modares.ac.ir

مقدمه

رشد و نمو و عملکرد گیاهان بشدت تحت تأثیر عوامل محیطی است. دما ازجمله عوامل محیطی مهمی است که در پراکنش گیاهان نقش دارد و دمای پایین از تنش‌های مهم محدود کننده‌ی رشد، تولید و پراکنش گیاهان است. دمای پایین فعالیت بیوسنتزی گیاهان را کاهش داده و از کارکرد طبیعی فرایندهای فیزیولوژیک جلوگیری می‌نماید و ممکن است سبب آسیب‌های دائمی شود که در نهایت به مرگ می‌انجامد (۳).

تنش‌های محیطی باعث تغییرات شیمیایی و بیوشیمیایی و به هم خوردن تعادل در فعالیت آنزیم‌های سلول‌های گیاهی می‌شود. اولین اتفاقی که در شرایط تنش می‌افتد تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species (ROS)) (O_2^- و OH) است (۱). این مولکول‌ها باعث تخریب غشاء سلولی، ماکرومولکول‌ها، آنزیم‌ها، اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌های سلول و DNA می‌شوند (۱). در عین حال نقش مهمی در انتقال پیام در مراحل اولیه پاسخ

به تنش ایفا می‌کنند که موجب فعال شدن مکانیسم دفاعی سلول‌ها می‌شود. نقش آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در تنش‌ها اکسایشی بوده و مانع از صدمات اکسیداتیو و یا کاهش این صدمات می‌شوند. از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توان به سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) اشاره کرد. تعادل بین فعالیت‌های این آنزیم‌ها و سرعت تولید این رادیکال‌ها موجب بقای ثبات در غلظت این رادیکال‌ها شده و برای سازگاری گیاهان با تنش‌ها ضروریست.

ترکیبات غشاء نقش مهمی در حساسیت به سرما دارند. سرما موجب تغییر ترکیبات چربی‌های غشایی و کاهش نفوذپذیری انتخابی غشاء سلولی است (۸). سوپر اکسید اولین آنزیمی است که در کاهش $O_2^{\cdot-}$ نقش دارد و باعث تبدیل $O_2^{\cdot-}$ به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود. سمیت H_2O_2 به اندازه‌ی رادیکال‌های سوپر اکسید نیست اما دارای اثرات اکسید کنندگی است. مقدار H_2O_2 درون سلولی به وسیله فعالیت تعداد زیادی آنزیم کنترل می‌شود که CAT و POX ازجمله مهمترین آنها هستند. دمای پایین باعث القاء تغییراتی در مقدار پروتئین‌ها و آمینو اسیدهایی همانند پرولین می‌شود. پرولین در تنظیم فشار اسمزی، حفظ یکپارچگی غشاء، برقراری نسبت مناسب NADP/NADPH و پاکسازی رادیکال‌های آزاد نقش دارد. انباشتگی پرولین در شرایط تنش به میزان مقاومت گیاه بستگی دارد (۱).

مواد فنولیکی، اسید سالیسیلیک (SA) و دیگر مشتقات آن (اسید بنزوئیک، اسید جنریک و اسید استیل اسید سالیسیلیک) ازجمله موادی هستند که باعث ایجاد مقاومت در گیاهان می‌شود. مدت زمان زیادی است اسید سالیسیلیک (SA) به عنوان یک مولکول پیغام بر در ایجاد مکانیسم‌های دفاعی گیاهان عمل می‌کند (۲). بر طبق نظر راسکین (۲۹) SA باید به‌عنوان یک هورمون طبقه‌بندی شود. شواهد زیادی نشان داده که SA در پاسخ به تنش‌هایی مانند دمای بالا و پایین (۳۲)، شوری (۱۰) و عناصر سنگین (۲۷) نقش دارد. کاربرد SA موجب بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاه شده و به تولید مواد حفاظتی مانند پلی‌آمین‌ها کمک می‌کند (۲). میزان تأثیر SA در ایجاد مقاومت نسبت به تنش وابسته به غلظت، به روش استفاده، وضعیت گیاه، مرحله نموی و مقدار رادیکال‌های آزاد سلول بستگی دارد (۲). غلظت بالاتر SA باعث تنش اکسیداتیو می‌شود که گیاه توانایی مقابله با آن را ندارد و ممکن است منجر به مرگ گیاه شود (۲۰). این ترکیب علاوه بر موارد ذکر شده در فرایندهایی ازجمله تعرق (۲۳)، بسته شدن روزنه‌ها (۲۸)، تراوایی غشاء (۷)، رشد و فتوسنتز (۲۲) نیز می‌تواند تأثیرگذار باشد. این شبه هورمون با ایجاد تأثیرات معنی‌دار بر فتوسنتز، تعرق، جذب و انتقال عناصر و افزایش غلظت کلروفیل منجر به افزایش کارآیی فتوسنتز، تولید بیشتر فرآورده‌های فتوسنتزی و در نتیجه افزایش عملکرد و اجزاء عملکرد در گیاهان زراعی می‌شود (۲۶). افزایش در تعداد غلاف در ماش سیاه و لوبیا و افزایش عملکرد در گندم ازجمله این نتایج است (۳۳، ۳۰ و ۲۴). در این تحقیق تأثیر محلول‌پاشی SA بر شدت اکسیداسیون لیپیدهای غشائی، فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان، مقدار پروتئین‌های محلول و پرولین در گیاه کلزا در شرایط دمای پایین در شرایط مزرعه‌ای بررسی شده و رابطه بین تنش اکسیداتیو و واکنش سیستم دفاع آنتی-اکسیدانی، مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روشها

آزمایش در سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸ در مزرعه‌ی تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به اجرا درآمد. ارتفاع محل آزمایش از سطح دریا ۱۳۵۲ متر و مختصات جغرافیایی آن به‌ترتیب ۵۱°/۱۰` طول شرقی و ۳۵°/۴۴` عرض شمالی بود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. پس از اجرای عملیات شخم به‌منظور کنترل علف‌های هرز،

مزرعه با علفکش ترفلان (تری فلورالین به میزان ۳/۵ کیلوگرم در هکتار) تیمار شد و بعد تیمارها به طور تصادفی به واحدهای آزمایشی منتسب گردیدند. مساحت هر کرت در تمامی آزمایش‌ها ۱۰ متر شامل ۶ خط کاشت با فواصل ۳۵ سانتی‌متر و طول ۵ متر بود. فاصله‌ای به اندازه‌ی ۱/۵ متر بین بلوک‌ها و ۰/۷۵ متر بین کرت‌ها لحاظ گردید. اسید سالیسیلیک در ۴ سطح (آب مقطر) ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو مولار در مرحله طوقه‌ای بر روی دو رقم کلزا شامل RGS (بهاره و حساس به سرما) و رقم LICORD(پاییزه و مقاوم به سرما) محلول‌پاشی گردید. زمان محلول‌پاشی با توجه به آمار ۳۰ ساله منطقه با نزدیک شدن دما به محدوده دمایی ۷ - ۱۰ درجه سانتی‌گراد و داده‌های ایستگاه هواشناسی واقع در دانشکده کشاورزی تعیین گردید (۳۰ آبان). نمونه‌گیری از برگ کلزا ۲۴ ساعت بعد از محلول‌پاشی (اول آبان) انجام شد (جدول ۱). به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم‌ها و تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها، نمونه‌ها در نیتروژن مایع فریز و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء: براساس روش هلت و پیکر (۱۸) و با استفاده از اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید(MDA) به‌عنوان فرآورده‌ی نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشاء انجام شد. بدین منظور ۰/۳ گرم از بافت تازه گیاهی در ۳ میلی-لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (وزن به حجم) عصاره گیری شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون صاف شده ۱ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ درصد (وزن به حجم) اضافه شد و در حمام آب گرم (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس لوله‌ها از حمام خارج و پس از سرد شدن، میزان مالون دی آلدئید با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی (ε=155 $\mu M^{-1} cm$) محاسبه شد.

عصاره‌گیری برای سنجش فعالیت آنزیمی و پروتئین: برای سنجش فعالیت آنزیمی و پروتئین ۰/۲ گرم از بافت گیاهی تازه منجمد شده در نیتروژن مایع در بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار، pH= ۷ در دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد سائیده و عصاره‌گیری شد، سپس همگن حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴-۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول روشناور برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها و مقدار پروتئین محلول مورد استفاده قرار گرفت.

پروتئین: مقدار پروتئین نمونه‌ها بر طبق روش برادفورد (۱۱) تعیین شد. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از محلول برادفورد به همراه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی پس از مخلوط شدن کامل، در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت و جذب محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت شد. غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

فعالیت آنزیم SOD: بر طبق روش گیانوپولیتیز و ریز (۱۶) انجام شد. مخلوط واکنش، شامل بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار حاوی EDTA ۰/۱ میلی مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH=۱۰/۲، L-methionine ۱۲ میلی مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میلی مولار، ریبوفلاوین ۱ میکرو مولار و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی بود. نمونه-ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور قرار گرفت و پس از این مدت جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. همچنین از یک لوله‌ی آزمایش حاوی مخلوط واکنش بجز عصاره‌ی آنزیمی به‌عنوان شاهد استفاده شد. یک واحد فعالیت SOD به‌عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار ۵۰ درصد احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم می‌گردد و فعالیت آن به میلی‌گرم بر گرم پروتئین وزن تر بر حسب تغییرات جذب در دقیقه بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم POX: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز بر طبق روش قناتی و همکاران (۱۵) انجام شد.

فعالیت آنزیمی با افزودن مقادیر مناسب از عصاره‌ی آنزیمی، بافر، گایاکول با غلظت نهایی ۲۸ میلی مولار و پراکسید هیدروژن با غلظت نهایی ۵ میلی مولار در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و فعالیت آنزیمی به میلی‌گرم بر گرم پروتئین وزن تر بر حسب تغییرات جذب در دقیقه بیان شد.

فعالیت آنزیم CAT: سنجش فعالیت آنزیم CAT به روش ککمک و هورست (۱۲) انجام شد. بر این اساس از عصاره آماده شده در مرحله قبل استفاده شد. مخلوط واکنش شامل عصاره‌ی آنزیمی، بافر پتاسیم فسفات و پراکسید هیدروژن با غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار بود. تجزیه آب اکسیژنه با کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر پیگیری و به میلی-گرم بر گرم پروتئین وزن تر بر حسب تغییرات جذب در دقیقه بیان شد.

فعالیت PPO: سنجش فعالیت PPO بر طبق روش قناتی و همکاران (۱۵) تعیین گردید. مخلوط واکنش، شامل ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی آنزیمی، ۵۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۵ میلی مولار و ۵۰۰ میکرولیتر متیل‌کاتکول ۰/۰۲ مولار در ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات است. افزایش در جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر محاسبه و فعالیت آنزیمی به میلی‌گرم بر گرم پروتئین وزن تر بر حسب تغییرات جذب در دقیقه بیان شد.

پرولین: پرولین برگ بر طبق روش بیتس (۹) مشخص شد. بدین منظور ۰/۲ گرم بافت برگ توزین و در هاون چینی در ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد به خوبی سائیده شد. همگن حاصل با دور ۱۸۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد. پس از بستن در لوله‌ها، به مدت ۱ ساعت در حمام آب داغ (۱۰۰ $^{\circ}C$) قرار داده شد. پس از سرد شدن به هر کدام از لوله‌ها ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید و با استفاده از دستگاه ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شدند. روشناور را که به رنگ قرمز و حاوی پرولین محلول در تولوئن بود، برداشته و همزمان با نمونه‌های استاندارد در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. غلظت پرولین بر حسب میلی-گرم بر گرم بافت تازه برگ با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.

به‌منظور بررسی عملکرد، برداشت (۴ تیر ماه ۱۳۸۹) به صورت دستی و با داس از فاصله‌ی ۴ تا ۵ سانتی‌متری سطح زمین، هنگامی که ۳۰ تا۴۰ درصد بذرها از حالت سبز به قهوه‌ای تا سیاه تغییر رنگ داده بودند انجام شد. مساحت برداشت شده‌ی هر کرت از ۴ ردیف میانی با لحاظ کردن اثر حاشیه، بالغ بر ۱ مترمربع بود. بوته‌های برداشت شده به دانه و کاه تقسیم گردید و در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. عملکرد دانه براساس رطوبت ۱۰ درصدی دانه محاسبه گردید. تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P <$۰/۰۵) استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که بین دو رقم بهاره و پاییزه در شرایط کشت مزرعه‌ای اختلاف معنی‌داری از نظر صفات اندازه‌گیری شده وجود دارد ($P <$۰/۰۵) و تیمار غلظت‌های مختلف SA نیز سبب ایجاد تفاوت معنی‌داری در صفات اندازه‌گیری شد ($P <$۰/۰۱).

محلول‌پاشی با SA به طور معنی‌داری باعث کاهش MDA در برگ گیاه کلزا (بجز غلظت ۴۰۰ میکرو مولار در رقم حساس) شد (جدول ۲)، به‌طوری‌که با افزایش غلظت از میزان MDA کاسته شد (جدول ۲). تیمار ۴۰۰ میکرو مولار دارای کمترین میزان MDA در برگ رقم مقاوم بود اما در رقم حساس تیمار ۴۰۰ میکرو مولار از اثر بخشی

SA کاست، به‌طوری‌که باعث افزایش MDA در برگ رقم حساس گردید (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس میانگین مربعات صفات مورد بررسی در دو رقم کلزا تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک

منابع تغییر	درجه آزادی	MDA	SOD	POX	CAT	PPO	پروتئین	پرولین	عملکرد بذر در هکتار	وزن خشک اندام هوایی
تکرار	۲	۰/۰۰۱۴	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۰۰۳۸۷۷	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۰۰۰۰۰۸	۱/۳۴۲۳	۰/۰۳۶	۰/۱۷	۰/۳۲
رقم	۱	۰/۵۲۸**	۴/۱۵۴۶**	۰/۰۱۲۵**	۰/۰۰۶۱**	۰/۰۰۰۳**	۱۳/۹۸۶۰**	۲/۲۹۸۶**	۰/۰۴۱	۲۷/۲۴**
غلظت SA	۳	۰/۱۷۱**	۰/۳۳۱۶**	۰/۰۰۳۵**	۰/۰۰۳۹**	۰/۰۰۰۰۲**	۳۷/۳۹۲۶**	۱/۳۱۸۴**	۰/۳۲*	۴/۱۶
اثر متقابل	۳	۰/۱۷۲**	۰/۰۷۱۴**	۰/۰۰۳۰**	۰/۰۰۴۲**	۰/۰۰۰۰۸**	۳۱/۵۵۰۴**	۱/۲۰۹۹**	۰/۰۱	۳/۴۱
خطای آزمایشی	۱۴	۰/۰۰۰۸۶	۰/۰۰۴۹	۰/۰۰۰۰۵۹	۰/۰۰۰۰۴۸	۰/۰۰۰۰۰۰۴	۰/۴۹۵۴	۰/۰۲۷	۰/۰۸۹	۱/۹۷
٪ ضریب تغییرات		۲/۸۵	۶/۲۳	۷/۲۶	۶/۴۸	۶/۰۳	۳/۷۵	۸/۷۴	۱۸/۳۰	۱۶/۷۴

بدون علامت و ** به‌ترتیب بدون معنی و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۲- تأثیر محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک (میکرو مولار) بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و متابولیت‌های غیر آنزیمی در دو رقم کلزا با تحمل متفاوت به سرما

رقم	غلظت	MDA	SOD	POX	CAT	PPO	پروتئین	پرولین	عملکرد بذر در هکتار	وزن خشک اندام هوایی
RGS (حساس)	۰	۱/۲۰۶۶۷b	۱/۳۹۰۲b	۰/۰۴۹۹e	۰/۱۴۵۳a	۰/۰۰۸۱c	۱۴/۶۹۸۵e	۱/۴۳۹۷e	۱/۴۹۳۳ab	۶/۴۴۳ c
	۱۰۰	۱/۱۴۶۶۷c	۱/۴۵۳۴b	۰/۱۱۴۱cd	۰/۰۶۹۰c	۰/۰۰۷۰d	۱۹/۴۳۹۶b	۱/۴۸۱۱de	۲/۰۱۳۳ a	۷/۳۳۳ c
	۲۰۰	۱/۰۷۶۶۷d	۱/۶۴۷۳a	۰/۱۲۵۸bc	۰/۰۵۲۰d	۰/۰۰۶۱de	۲۰/۱۸۰۷ab	۱/۶۶۹۹cde	۱/۶۰۶۷ab	۷/۴۴۳ c
	۴۰۰	۱/۲۹۳۳۳a	۱/۶۸۳۹a	۰/۰۴۳۵e	۰/۰۹۸۰b	۰/۰۰۵۸e	۱۷/۶۲۸۸d	۱/۸۱۰۴bc	۱/۵۹۰۰ab	۸/۱۱۰ bc
Licord (مقاوم)	۰	۱/۳۳۶۶۷a	۰/۴۲۸۰e	۰/۱۰۲۷d	۰/۱۴۱۳a	۰/۰۱۱۳b	۱۹/۸۳۶۹ab	۱/۷۶۶۳cbd	۱/۵۱۶۷ab	۸/۱۹۰ bc
	۱۰۰	۰/۹۰۰۰۰e	۰/۵۰۴۵e	۰/۱۳۷۶ab	۰/۱۴۳۰a	۰/۰۱۱۲b	۲۱/۰۹۹۰a	۱/۹۹۴۸b	۱/۹۴۶۷ a	۱۰/۹۴۳a
	۲۰۰	۰/۶۹۳۳۳f	۰/۷۳۶۳d	۰/۱۲۶۷bc	۰/۱۳۳۰a	۰/۰۱۷۶a	۱۹/۱۴۱۵bc	۳/۵۴۵۷a	۱/۳۹۶۷ b	۱۰/۴۴۳ab
	۴۰۰	۰/۶۰۶۶۷g	۱/۱۷۷۵c	۰/۱۴۸۹a	۰/۰۷۵۰c	۰/۰۱۶۶a	۱۷/۹۷۷۳ cd	۱/۵۶۶۵ced	۱/۵۱۰۰ab	۸/۲۷۷bc

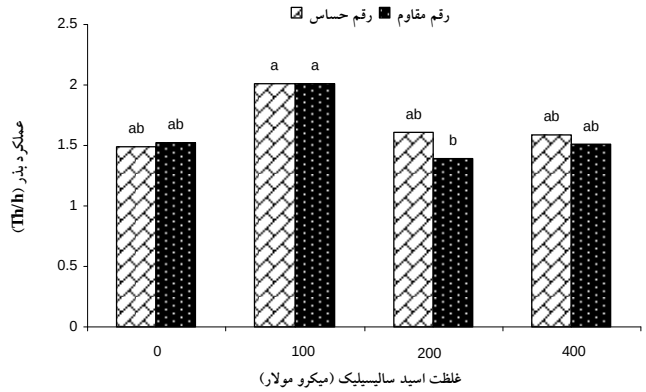
در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

واحد فعالیت آنزیمی: میلی‌گرم بر گرم پروتئین وزن تر بر حسب تغییرات جذب در دقیقه. واحد پروتئین و پرولین: میلی‌گرم بر گرم وزن تر. واحد مالون‌دی‌آلدهید: میکرو مولار بر سانتی‌متر

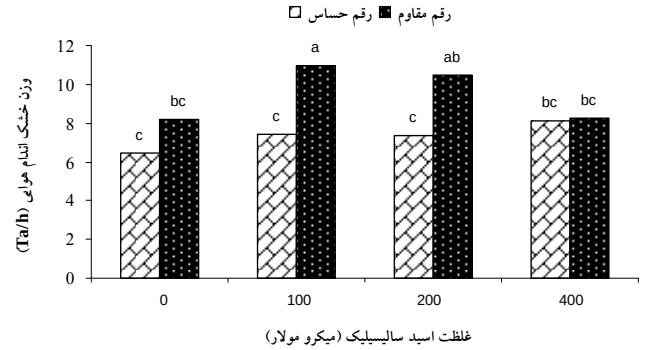
فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بشدت تحت تأثیر رقم و غلظت‌های مختلف SA قرار گرفت. بیشترین فعالیت آنزیم SOD در رقم حساس و با بالاترین غلظت SA (۴۰۰ میکرو مولار) بدست آمد (جدول ۲). میزان فعالیت آنزیم SOD در رقم مقاوم با افزایش غلظت سیر صعودی داشت اما در رقم حساس بین غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو مولار اختلافی وجود نداشت (جدول ۲). نتایج نشان می‌دهد که در رقم مقاوم با افزایش غلظت بر میزان فعالیت آنزیم POX افزوده شد، به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در رقم مقاوم و با غلظت ۴۰۰ میکرو مولار بدست آمد. در رقم حساس بیشترین میزان فعالیت آنزیم POX در غلظت ۲۰۰ میکرو مولار بدست آمد و با افزایش غلظت به ۴۰۰ میکرو مولار از میزان فعالیت POX کاسته شد (جدول ۲).

فعالیت آنزیم CAT به طور معنی‌داری تحت تیمار SA کاهش یافت. بیشترین مقدار حساسیت آنزیم CAT در رقم

حساس و بدون تیمار SA مشاهده شد. در رقم مقاوم بین شاهد و غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد اما غلظت ۴۰۰ میکرو مولار باعث کاهش مقدار فعالیت آنزیم CAT گردید. افزایش غلظت از ۲۰۰ به ۴۰۰ باعث افزایش فعالیت این آنزیم در رقم حساس شد (جدول ۲). فعالیت آنزیم PPO نیز تحت تأثیر غلظت SA قرار گرفت و بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در رقم مقاوم و با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار SA مشاهده شد اما افزایش غلظت SA به ۴۰۰ میکرو مولار تأثیری در فعالیت این آنزیم نداشت. در رقم حساس افزایش غلظت منجر به کاهش فعالیت این آنزیم شد (جدول ۲).



شکل ۱- تأثیر محلول‌پاشی با اسید سالیسیلیک بر عملکرد بذر در دو رقم کلزا با تحمل متفاوت به سرما
در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.



شکل ۲- تأثیر رقم بر وزن خشک اندام هوایی کلزا
در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

بیشترین غلظت پروتئین محلول در رقم مقاوم با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار مشاهده شد اما افزایش غلظت SA باعث کاهش مقدار پروتئین محلول شد، به طوری که مقدار پروتئین محلول در تیمار ۴۰۰ میکرو مولار نسبت به شاهد مربوطه کمتر بود. پروتئین محلول در رقم حساس با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار بیشترین غلظت را داشت اما با افزایش غلظت SA از مقدار پروتئین محلول کاسته شد (جدول ۱).

بطور کلی محلول‌پاشی گیاهان با SA باعث افزایش غلظت پرولین در هر دو رقم شد (بجز رقم مقاوم در غلظت ۴۰۰ میکرو مولار SA) و بیشترین غلظت پرولین در رقم مقاوم با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار SA بدست آمد و در رقم حساس افزایش غلظت SA باعث افزایش غلظت پرولین شد (جدول ۲).

عملکرد بذر در هکتار تنها تحت تأثیر غلظت SA قرار گرفت، به‌طوری‌که بیشترین میزان بذر در هکتار در غلظت ۱۰۰ µM بدست آمد و با افزایش غلظت از میزان عملکرد بذر کاسته شد (شکل ۱). عملکرد ماده خشک در هکتار نیز تنها تحت تأثیر تیمار رقم قرار گرفت، به گونه‌ای که رقم مقاوم دارای بیشترین میزان ماده خشک در هکتار بود (شکل ۲).

بحث

شرایط نامناسب محیطی منجر به افزایش ROS می‌شود که خود عاملی برای پراکسیده شدن لیپیدهای غشاء و تولید MDA است (۱). در این تحقیق SA باعث کاهش MDA شد که احتمالاً به علت کاهش اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد و حفاظت از غشاء توسط SA باشد که بدین وسیله از صدمه به اسیدهای چرب غیر اشباع و کاهش نفوذپذیری غشاء جلوگیری می‌شود. نتایج این تحقیق با نتایج ونگ و همکاران (۳۴) مطابقت دارد. نتایج حکایت از آن داشت که محلول‌پاشی با SA باعث کاهش و یا به تعویق انداختن خسارت اکسیداتیو ناشی از دمای پایین می‌شود. علاوه بر این گزارش شده که SA موجب کاهش MDA تولید شده در تنش شوری در برگ‌ها و ریشه‌های گیاهان جو می‌باشد (۱۴).

آنیون‌های سوپراکسید تولید شده در شرایط تنش موجب افزایش تنفس سلولی و تولید یون‌های مخرب در میتوکندری می‌شود. در چنین شرایطی فعالیت آنزیم SOD به‌عنوان یک آنزیم از بین برنده‌ی یون سوپراکسید، مشابه نتایج بدست آمده افزایش می‌یابد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که محلول‌پاشی گیاهان با ۲۰۰ میکرو مولار SA باعث افزایش فعالیت SOD گردید. افزایش فعالیت این آنزیم منجر به سمیت‌زدایی بیشتر سوپر اکسید و کاهش آسیب-های حاصل در گیاه می‌شود. احتمالاً SA عاملی برای کاهش اثرات مخرب دمای پایین می‌باشد و از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌ها باعث افزایش مقاومت به سرما می شود.

طبق نتایج بدست آمده فعالیت آنزیم‌های POX و PPO در رقم مقاوم بیش از رقم حساس بود (بدون محلول‌پاشی) و محلول‌پاشی برگ‌ها با SA سبب افزایش فعالیت این آنزیم-ها (بجز PPO در رقم حساس) گردید (جدول ۲). پلی فنل اکسیداز یک اکسید کننده فنل می‌باشد و شرایط تنش، فعالیت PPO به‌عنوان شاخصی برای سنجش مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی است. ارقام مقاوم دارای فعالیت بیشتری از PPO می‌باشند (۳۴) و دلیل آن هم افزایش تولید فنل‌های دیواره و لیگنین است که اندام‌های گیاهی را سخت و مقاوم به یخ‌زدگی می‌کند. همچنین گزارش شده در گیاهانی مانند کلزا فعالیت PPO توسط جاسمونات‌ها افزایش می‌یابد (۳۴). پراکسیداز مسئول حذف مقادیر اضافی H_2O_2 می‌باشد. SA به‌عنوان دهنده‌ی الکترون برای POX عمل می‌کند که باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود. نتایج پژوهشی که بر روی ذرت انجام شد نشان داد که غلظت ۰/۵ میلی‌مولار SA و دیگر ترکیبات فنولیک باعث افزایش مقاومت به سرما در گیاهچه‌های ذرت می‌شود. این افزایش مقاومت به دلیل افزایش فعالیت POX و کاهش در فعالیت CAT بود (۱۹ و ۲۳). در این آزمایش SA سبب کاهش فعالیت آنزیم CAT شد. به طور معمول در شرایط تنش از میزان فعالیت CAT کاسته شده، در حالی که میزان فعالیت سایر آنزیم‌ها دفاعی افزایش می‌یابد (۲۰). از آنجایی که SA بازدارنده‌ی فعالیت آنزیم CAT در نتیجه افزایش H_2O_2 را به همراه خواهد داشت (۱۹). اگرچه H_2O_2 در غلظت‌های بالا سمی است و به وسیله آنزیم CAT و آسکوربات پراکسیداز تجزیه می شود اما در غلظت‌های پایین می‌تواند نقش پیام را در فرایندهای انتقال پیام بازی کند و ژن‌های وابسته به مقاومت در گیاه را فعال کند (۱۷). بنابراین تعادل بین فعالیت دو آنزیم POX و CAT نقش مهمی در کارکرد سیستم دفاعی دارد. نتایج نشان داده که SA با باند شدن به

آنزیم CAT سبب کاهش فعالیت آن در توتون (۱۳) و چند گونه گیاهی می‌شود (۳۲). به نظر می‌رسد افزایش SOD و POX توسط SA با پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن از تنش‌های اکسیداتیو جلوگیری کرده و باعث افزایش مقاومت در گیاه می‌شود. اسید سالیسیلیک با فراهم کردن انرژی از طریق تولید NADPH موجب فعالیت سیستم دفاعی گیاه می‌شود. از آنجا که NADPH خود یک احیا کننده ضعیف می‌باشد، استعمال بیش از اندازه SA موجب تولید بیش از اندازه این ماده می‌شود و از آنجا که گیاه به علت شرایط تنش (بسته شدن روزنه‌ها و توقف ورود CO_2 به درون مرکز فتوسنتز) توانایی استفاده از تمام NADPH را ندارد، ازاین‌رو موجب خسارت دیدن اندام‌های سلولی می‌شود. بنابراین استفاده از غلظت‌های بالای SA نه تنها برای گیاه مفید نمی‌باشد، بلکه توانایی وارد کردن خسارت به گیاه را نیز دارد (۲۰). رادیکال‌های آزاد می‌توانند به ساختار پروتئین آسیب زده و کاهش مقدار پروتئین را در پی داشته باشند (۲۶). رادیکالهای آزاد اکسیژن میل ترکیبی بالایی با پروتئین‌ها داشته و سبب اکسید شدن آنها می شوند. ازاین‌رو مقدار پروتئین به نسبت بین سنتز و تجزیه رادیکال‌های آزاد بستگی دارد. کاهش مقدار پروتئین و افزایش نیترات، آمونیوم و اسیدهای آمینه آزاد در شرایط شوری و کم آبی در گیاهان لوبیا و ذرت را گزارش کرده اند (۳۱ و ۱).

تجمع ترکیباتی با وزن مولکولی پایین، pH خنثی و بسیار محلول ازجمله مکانیسم‌های عمومی گیاهان برای کاهش خسارت می‌باشد. این ترکیبات باعث حفظ فشار اسمزی، تثبیت ساختار پروتئین و حفظ غشاء در شرایط تنش می‌شوند. ازاین‌رو نقش مهمی در سازگاری سلول به استرس‌های مختلف دارند. تجمع پرولین به علت تخریب پروتئین سینتتاز و کاهش تبدیل پرولین به پروتئین بوده که در نتیجه باعث کاهش رشد می‌گردد (۲۶ و ۳۵). در شرایط تنش پروتئین گیاه صرف تولید پرولین می‌شود. بنابراین تولید اندام گیاهی در چنین شرایطی متوقف شده و کاهش رشد اندام گیاهی را شاهد خواهیم بود. در این تحقیق نیز SA باعث افزایش میزان پرولین گیاه شد که می‌تواند منجر به افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش شود. آپوستولووا و همکاران (۶) مشاهده کردند که سرما باعث افزایش پرولین در گندم بهاره شد. تجمع پرولین در مواجه با تنش شوری (۳۱) و H_2O_2 نیز گزارش شده است (۸). کاربرد ۰/۵ میلی مولار SA باعث افزایش پرولین و کاهش اثرات مخرب شوری بر رشد عدس شد (۳۱).

فتوسنتز فرایندی فیزیولوژیک است که تأثیر بسزایی در رشد و عملکرد گیاهان زراعی دارد. همچنین اثبات شده که تنظیم کننده‌های رشد می‌توانند نخست باعث بهبود کارایی فرایندهای فیزیولوژیک مرتبط با فتوسنتز شوند؛ درثانی با افزایش انتقال آسیمیلات‌ها از منبع به مخزن موجب افزایش توده‌ی خشک گیاهی و افزایش عملکرد دانه گردند (۳۶). نقش SA در بهبود فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز به اثبات رسیده است. غلظت ۱۰ µM SA باعث افزیش فعالیت نیترات ردوکتاز نسبت به عدم مصرف شد (۴) که نشان‌دهنده‌ی تأثیر SA در فرایند جذب نیتروژن در گیاه نخود و کلزا می‌باشد (۴ و ۵).

تأثیر SA در تعدیل پاسخ گیاه و افزایش فعالیت آنزیم‌ها در محدوده‌ی وسیعی از تنش‌های اکسیداتیو گزارش شده است. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ممکن است راهی برای تحمل گیاه به تنش‌های محیطی باشد و از آنجایی‌که مصرف ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو مولار SA باعث کاهش فعالیت سوپراکسید نسبت به شاهد شد، می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است این ماده به طور غیرمستقیم در از بین بردن رادیکال‌های آزاد نقش داشته باشد.

منابع

۱- دولت آبادیان. آ، مدرس ثانوی. ع، شرفی.م. (۱۳۸۸). اثر تنش کم آبی و محلولپاشی اسید آسکوربیک بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و برخی تغییرات بیوشیمیایی در برگ ذرت دانه ای (*Zea maize* L.). مجله زیست شناسی ایران. ۴۲۲-۴۰۷ : (۳) ۲۲

۲- شبانی. ل، احسان پور. ع.الف. (۱۳۸۸). القاء آنزیمهای آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولیک و فلاونوئید در کشت در شیشه شیرین بیان (L. Glycyrrhiza glabra) با استفاده از متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید. مجله زیست شناسی ایران. ۷۰۳-۶۹۱ : (۴) ۲۲

۳- مهدوی. ب، مدرس ثانوی. ع، آقا علیخانی. م. (۱۳۸۸). بررسی اثر سویه و دماهای مختلف منطقه ریشه بر صفات مورفولوژیکی و تثبیت نیتروژن سه رقم خلر (*Lathyrus sativus* L.). مجله زیست شناسی ایران. ۶۸۱-۶۷۱ : (۴) ۲۲

4- Ahmad, A. (1988). Nitrate accumulation and nitrate reductase activity during rooting of pea cuttings treated with auxins. Indian J. exp. Biol. 26: 470-472.

5- Ahmad, A., Hayat, S., Fariduddin, Q. and Ahmad, I. (2001). Photosynthetic efficiency of plants of *Brassica juncea* treated with chlorosubstituted auxins. Photosynthetica. 39: 565-568.

6- Apostolova, P., Yordanova, R. and Popova, L. (2008). Response of antioixidative defence system to lowtemperature stress in two wheat ultivar. Gen. Appl. Plant Physiology, Special Issue. 34(3-4):281-294.

7- Barkosky, R.R. and Einhellig, F.A. (1993). Effects of salicylic acid on plant water relationship. J. Chem. Ecol. 19:237-47.

8- Basaga, H.S. (1989). Biochemical aspects of free radicals. Biochemistry of Cell Biology. 68:989-998.

9- Bates, L. S., Waldern R. P and Teave I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and soil. 39:205-207.

10- Borsanio O., Valpuesta V. and Botella M. A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stess in Arabidopsis seedlings. Plant Physiology. 126: 1024-1030.

11- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Review Biochemistry.72:248-254.

12- Cakmak, I. and Horst, W. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glysin max*). Plant Phisiology.83:463-468.

13- Chen, Z, Ricigliano JR, Klessig DF. (1993a). Purification and characterization of a soluble salicylic acid binding protein from tobacco. Proc Natl. Acad. Science. USA. 90: 9533-9537.

14- El-Tayeb M. A. (2005). Response of barley Gains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. Plant Growth Regulation. 45: 215-225.

15- Ghanati, F. Morita, A and Yokota, H. (2002). Induction of suberin and increase of liginin content by exess Boron in Tabacco cell. Soil Science. Plant Nutrition. 48:3:357-364.

16- Giannopolitis, C and Ries, S. (1977). Superoxid desmutase. I.Occurence in higher plant. Plant Physiology. 59:309-314.

17- Hausladen, A. And alscher, R. G. (1993). Glutathione-active oxygen. In: Alscher, R. G. And Hess, J. L. (eds) Antioxidants in Higher Plants. CRC Press, Boca Raton. Pp: 12-15.

18- Heath, R. L. and Packer, L. (1969). Photoperoxidation in isolated choloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of biochemistry and biophysics. 125: 189-198.

19- Horváth, E., Janda, T., Szalai, G. and Páldi, E. (2002). *In vitro* salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isoenzymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. Plant Science. 163:1129-1135.

20- Horváth, E., Szalai, G. and Janda T. (2007). Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling: Review. Plant Growth Regulation. 26:290–300.

21- Janda, T., Szalai, G. Tari, I and Paldi, E. (1999). Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. Planta. 208:175-180.

22- Khan, W., Prithiviraj, B. and Smith, D. 2003. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. Plant Physiol. 160: 485-92.

23- Larque Saavedra, A. (1979). Stomatal closour in response to acetylsalicylic acid treatment. Z Pflannzen physiol. 93:371-5.

24- Lopez, T.R. (1989). Evaluacidn de acido salicflico para incrementar ndmero de granos por espiga y rendimiento en trigo Triticum durum var. Altar C-84, Valle de1 Yaqui, Son, tesis de licenciatura, Instituto Tecnologico de Sonora.

25- Mehler, A.H. (1951). Studies on reactivities of illuminated chloroplasts. I. mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. Architect of Biochemistry Biophysics. 33:65-77.

26- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. Trends Plant Science. 11: 15–19

27- Patrick, Mc C., Zuoxing, Z., Jennifer, L. P. and Kalidas, S. (2000). A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. Process Biochemistry 35: 603–613.

28- Rai, V.K., Sharma, S.S. and Sharma, S. (1986). Reversal of ABA induced stomatal closure by phenolic compounds. J. Exp. Bot. 37:129–34.

29- Raskin, I, (1992). Role of salicylic acid in plants. Annual. Review. Plant Physiology Plant Mol. Biol. 43: 439–463.

30- Rendon, S.L.A. (1983). Control hormonal de la abscisidn de organos reproductivos en Phaseolus vulgaris L. cv. Cacahuate-72, tesis de Maestrfa en ciencias, C.P., Chapingo, Mexico.

31- Reza, S., Heidari, R., Zare, S. and Norastehnia, A. (2006). Antioxidant response of two salt-stressed barley varieties in the presence or absence of exogenous proline. Gen. Appl. Plant Physiol. 32(3-4): 233-251.

32- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn E., Dixon K. (2000). Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plant. Plant Growth Regul. 30, 157–161.

33- Singh, G. and Kaur, M. (1980). Effect of growth regulators on podding and yield of mung bean (*Vigna radiata* L. cv Wilczek), Indian J. Plant Physiol. 23: 366-370.

34- Wang, Y., Yang, Z.M., Zhang, Q. F. and Li, J. L. (2009). Enhanced chilling tolerance in *Zoysia matrella* by pre-treatment with salicylic acid, calcium chloride, hydrogen peroxide or 6-benzylaminopurine. Biologia Plantarum.. 53 (1): 179-182.

35- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Kamayushi-shino zaki, K. and Shinozaki, K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. Plant and Cell Physiology. 38,1095-1102.

36- Zhao, H.J., Lin, X.W., Shi, H.Z. and Chang, S.M. (1995). The regulating effect of phenolic compounds on the physiological characteristics and yield of soybeans. Acta Agro. Sci. 21:351-5.

Differences in antioxidant responses of autumn and spring rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars affected by salicylic acid under the field condition

Keshavarz H.[1], Modarres Sanavy S.A.M.[1] and Zarin Kamar F.[2]

Agronomy Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Plant Physiology Dept., Faculty of Biology Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Low temperature is one of the most important stress factors limiting the growth and productivity of canola. To alleviate or prevent low temperature-induced oxidative injury, plants have evolved mechanisms to scavenge these toxic reactive species. Recently, many different compounds are applied to minimize the harmful effects of low temperature. In this study effect of foliar application of salicylic acid has been studied on some biochemical properties of two canola cultivars with different cold resistant [RGS (Spring canola and sensitive to cold) and LICORD (Winter canola and resistant to cold)]. Salicylic acid was sprayed at four levels, including 0, 100, 200 and 400 µM. Leaf samples were collected 24 h after spraying. The effects of salicylic acid and cold stress on the lipid peroxidation, activities of antioxidants enzymes including superoxide dismutase, peroxidase, catalase, polyphenol oxidase, protein content and proline in leaves of canola plants were investigated. The results showed that salicylic acid increased significantly activity of antioxidant enzymes including superoxide dismutase and peroxidase, content of protein and proline but decreased significantly lipid peroxidation and catalase activity in both cultivars. Sprayed with salicylic acid increased the seed yield. Maximum shoot dry weight was in resistance cultivar, as well. However, in some cases, higher concentrations led to a decrease in the measured traits of both cultivars. The results show that enzyme activity in both cultivars were different. Except CAT and PPO, in other cases, salicylic acid enhanced the activity of these enzymes.

Key words: Antioxidant enzymes, Canola, Lipid peroxidation, Oxidative stress