زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال پنجم، شماره هجدهم، زمستان ۱۳۹۲، صفحه ۵۳-۶۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۹/۰۶
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۱۲/۲۸
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۰۵/۱۲

اثر پیش‌تیمار آسکوربیک اسید در گیاه گوجه‌فرنگی و واکنش به تنش خشکی میزان تنش اکسیداتیو، اسمولیت‌ها، ترکیبات فنلی و پروتئین

فاطمه دانشمند *
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران ۳۶۹۷ – ۱۹۳۹۵، تهران، ایران

چکیده

تنش خشکی باعث تحریک ساخته شدن گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی می‌شود و گونه‌های فعال اکسیژن نیز باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و آسیب به غشاهای سلولی می‌شوند. در مطالعه حاضر، آسکوربیک اسید با هدف اهمیّت کنترل تنش اکسیداتیو در بهبود مقاومت در برابر تنش آبی به کار گرفته شد. تنش کم آبی باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی، درصد آب بافت، مقدار کلروفیل، کاروتنوئید، پروتئین، ترکیبات فنلی، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها (مالون‌دی‌آلدئید)، نشت یونی، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز و مقدار پراکسید هیدروژن، قندهای کل و پرولین شد. کاربرد آسکوربیک اسید اثر معکوس بر شاخص‌های فوق داشت و نتایج این تغییرات باعث افزایش درصد آب بافت و بهبود رشد شد.

واژه‌های کلیدی: آسکوربیک اسید، اسمولیت، تنش خشکی، تنش اکسیداتیو

مقدمه

آب ماده‌ای حیاتی برای رشدونمو گیاه است. تنش ناشی از کمبود آب چه به شکل مستمر و چه به صورت موقت، رشد و توزیع پوشش گیاهی را محدود می‌سازد. تنش خشکی در حقیقت کاهش پتانسیل آب خاک است. گیاهان با روش‌های گوناگون در برابر تنش آبی مقاومت می‌کنند. در تنش آبی فعالیت‌های فیزیولوژیک گیاه، به طور مستقیم یا غیر مستقیم دچار اختلال می‌شود. با توجه به این که وجود فشار تورژسانس بالای سلولی برای انجام فعالیت‌های مهم از جمله رشد سلول‌ها و حرکات روزنه‌ای ضروری است، در چنین شرایطی گیاه به منظور ادامه جذب آب از طریق تجمع ترکیبات اسمزی، پتانسیل اسمزی خود را کاهش می‌دهد؛ به بیان دیگر، تنظیم اسمزی اتفاق می‌افتد (Zhu, 2001). اما متابولیت‌هایی که تجمع می‌یابند، متابولیسم طبیعی گیاه را مختل نمی‌کنند. اسمولیت‌های

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: f.daneshmand@yahoo.com، شماره تماس: ۰۳۵۲۶۲۳۲۸۰۰

معروف عبارتند از: سوکروز، فروکتوز، گلیسرول، اینوزیتول متیله، ترهالوز، رافینوز، پرولین و گلایسین بتائین و یون‌هایی مانند سدیم و پتاسیم (Orcutt and Nilsen, 2000؛ Matysik *et al*., 2002). یکی از تنش‌های ثانویه حاصل از تنش خشکی در گیاهان، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که روی درشت مولکول‌های سلولی اثر کرده، سبب تخریب آنها می‌شود. بسیاری از فرآیندهای طبیعی در کلروپلاست، میتوکندری و غشای پلاسمایی با سیستم انتقال الکترون ارتباط دارند و انواع گونه‌های فعال اکسیژن را تولید می‌کنند. سلول‌های فتوسنتز کننده گیاه به علت شرایط اکسیژنی و وجود اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای تیلاکوئیدی و غشای کلروپلاست، به تنش اکسیداتیو بسیار حساس هستند. بنابراین، سلول‌های گیاهی برای مقابله با آثار منفی گونه‌های فعال اکسیژن، مکانیسم‌های دفاعی ویژه‌ای دارند که شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز، پراکسیدازها و ...) و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (کاروتنوئید، توکوفرول، آسکوربیک اسید، گلوتاتیون، ترکیبات فنلی و ...) است. همکاری این اجزا باعث تشکیل چرخه‌های بسیار مهم نظیر آسکوربیک اسید-گلوتاتیون و گزانتوفیل می‌شود. این چرخه‌ها به عنوان مکانیسم‌های دفاعی، سلول را قادر می‌سازد تا تولید گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش داده، یا آنها را از سلول جاروب نماید و آثار مضر تجمع آنها را کاهش دهد (Bartosz, 1997؛ Abdul Jaleel *et al*., 2009).

از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر تنش‌ها، آسکوربیک اسید (ویتامین C) است که در سمّزدایی گونه‌های فعال و واکنشگر اکسیژن نقش دارد. آسکوربیک اسید به مقدار چند میلی‌مول در برگ‌ها وجود دارد و این مقدار نقش مهم این ماده را به عنوان بخشی از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد. آسکوربیک اسید جزو چرخه آنتی‌اکسیداتیو آسکوربیک اسید-گلوتاتیون و ماده‌ای کلیدی در شبکه آنتی‌اکسیدان‌هایی است که شامل آسکوربیک اسید، گلوتاتیون، آلفاتوکوفرول و مجموعه‌ای از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که H_2O_2 را در کلروپلاست، میتوکندری، سیتوپلاسم و آپوپلاست‌ها حذف می‌کنند. این آنتی‌اکسیدان در غشا داخلی میتوکندری‌ها سنتز می‌شود (Smirnoff, 1996؛ Noctor and Foyer, 1998).

آسکوربیک اسید چندین نقش فیزیولوژیک و اساسی در گیاهان دارد. برای مثال، در برخی از واکنش‌های فتوسنتزی به عنوان کوفاکتور عمل می‌کند و با احیا غیر مستقیم ترکیباتی مانند آلفا-توکوفرول در دفع رادیکال هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن مؤثر است. علاوه بر این، آسکوربیک اسید به طور مستقیم نیز با رادیکال‌های آزاد اکسیژن واکنش داده و آنها را خنثی می‌کند. همچنین، در اعمال دیگری مانند رشد گیاه، تنظیم بیان ژن، تنظیم فعالیت و حفاظت از برخی آنزیم‌ها و تنظیم ردوکس اجزای آنتی‌اکسیدان متصل به غشا دخالت می‌کند (Kuzniak, 2004؛ Sofo *et al*., 2005).

به طور کلی، مقابله با تنش خشکی بستگی به این دارد که مقدار گونه‌های فعال اکسیژن توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی نسبتاً پایین نگه داشته شود (Afzali *et al*., 2006؛ Al-qurainy, 2007؛ Younis *et al*., 2010).

مطالعه حاضر با هدف بررسی آثار آسکوربیک اسید برون‌زا بر گیاهان گوجه‌فرنگی تحت تنش خشکی انجام شد تا مکانیسم‌هایی که مسؤول حفاظت از گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو هستند بررسی شود و به این منظور مقدار پراکسیداسیون لیپیدها، نشت یونی، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز، مقدار پراکسید هیدروژن، درصد آب بافت، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، پروتئین، قند کل، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در گیاهان گوجه‌فرنگی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد بررسی در این پژوهش، گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicun esculentum* Mill.) رقم Falcato بود. بذرها در گلدان‌هایی به قطر ۱۱ سانتی‌متر حاوی خاک، ماسه و پیت‌ماس (با نسبت‌های ۲:۱:۱) کاشته شد و گلدان‌ها روزانه آبیاری و در شرایط گلخانه‌ای نگهداری شدند. در شروع مرحله چهار برگی، برای اعمال پیش‌تیمار آسکوربیک اسید غلظت صفر و ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید در سه نوبت به صورت یک روز در میان روی همه برگ‌های گیاهان افشانه شد (طی یک آزمایش مقدماتی غلظت و زمان استفاده از آسکوربیک اسید بهینه شده بود) سپس، تنش خشکی در سه سطح (آبیاری در سطح ظرفیت مزرعه‌ای، آبیاری تا ۶۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای و آبیاری تا ۳۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) به مدت یک هفته اعمال شد. پس از اعمال تیمارها، شاخص‌های ریخت‌شناختی اندازه‌گیری شد و برای سنجش‌های بیوشیمیایی، برگ سوم گیاه پس از قراردادن در نیتروژن مایع در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری و همه سنجش‌های بیوشیمیایی روی برگ سوم انجام شد.

شاخص‌های ریخت‌شناختی

وزن خشک اندام هوایی گیاهان در گروه‌های تیماری مختلف اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده شد و به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد خشک شد. سپس، وزن خشک نمونه‌ها با ترازو اندازه‌گیری و بر حسب گرم گزارش شد.

درصد آب بافت (برگ)

برای محاسبه محتوای نسبی آب بافت، وزن تر برگ سوم گیاهان اندازه‌گیری شد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت در آب یون‌گیری شده قرار گرفته، وزن آنها در حالت تورژسانس نیز اندازه‌گیری شد. پس از آن، نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده و به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد خشک شد. سپس، وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری و محتوای آب برگ (RWC) از رابطه ۱ محاسبه شد (Turkan *et al.*, 2005). FW: وزن تر، DW: وزن خشک، TW: وزن تورژسانس.

رابطه ۱: $RWC\ (\%)=(FW-DW)/(TW-DW)\times 100$

پراکسیداسیون لیپیدها

برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دی‌آلدئید که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع است، اندازه‌گیری شد. میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با روش Heath و Packer (۱۹۶۹) اندازه‌گیری شد. طبق این روش، ۰/۲ گرم از بافت فریز شده گیاه (برگ) با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو

استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، ۴ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در حمام آب‌گرم حرارت داده شد. سپس، بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. شدت جذب این محلول با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج، کمپلکس قرمز MDA-TBA است. جذب سایر رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155\ mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن‌تر محاسبه شد.

نشت یونی

برای سنجش میزان آسیب به غشا، میزان نشت یونی با روش Ben Hamed و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری شد. ۰/۲ گرم از بافت سالم و تازه برگ گیاه پس از شستشو با آب مقطر برای شستشوی یون‌های احتمالی از سطح گیاه، درون لوله آزمایش درپیچ‌دار قرار داده شد و ۱۰ میلی‌لیتر آب یون‌گیری شده به‌آن اضافه گردید. لوله‌های آزمایش به مدت ۲ ساعت درون حمام آب گرم با دمای ۳۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد و میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها (Ec_1) با Ec متر اندازه‌گیری شد. سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردیده، پس از رسیدن به دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها (Ec_2) مجدداً اندازه‌گیری شد و از رابطه ۲ درصد نشت یونی محاسبه گردید.

رابطه ۲: $EL=(EC_1/EC_2)\times100$

پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

برای سنجش پراکسید هیدروژن از روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. برگ گیاه در حمام یخ با تری کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد ساییده شد. عصاره در سانتریفیوژ یخچال‌دار در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ و یک میلی‌لیتر پتاسیم یدید یک مولار اضافه شد و جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با منحنی استاندارد محاسبه و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش شد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل کل و کاروتنوئیدها با روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام شد. ۰/۲ گرم از برگ‌های فریز شده با ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد و پس از صاف کردن جذب آنها با اسپکتروفتومتردر طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

قند کل

برای سنجش کربوهیدرات‌های کل از روش Fales (۱۹۵۱) استفاده شد. کربوهیدرات‌های محلول از ۰/۱ گرم از برگ با استفاده از ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد

در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه (دو مرحله ۳۰ دقیقه‌ای) استخراج شدند و عصاره‌ها با کاغذ صافی صاف و سپس الکل آنها تبخیر شد. رسوب حاصل در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. از هر نمونه ۲۰۰ میکرولیتر در یک لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون اضافه شد. پس از مخلوط شدن، لوله‌های آزمایش به مدت ۱۷ دقیقه در حمام آب‌گرم در ۹۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و پس از سرد شدن جذب آنها در ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. غلظت هر نمونه با منحنی استاندارد گلوکز بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

پرولین

برای اندازه‌گیری میزان پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. ۰/۰۲ گرم از بافت فریز شده گیاه (برگ) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید ساییده و عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی با ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید خالص مخلوط شد و به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد در حمام آب‌گرم قرار گرفت. پس از آن، بلافاصله لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ سرد شد. سپس، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه و لوله‌ها به خوبی تکان داده شد. با ثابت نگه داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه دو لایه مجزا تشکیل شد. میزان جذب لایه رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود در ۵۲۰ نانومتر تعیین شد و برای محاسبه مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

ترکیبات فنلی کل

محتوای پلی فنل کل با روش Soland و Laima (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد. ۰/۱ گرم از برگ گیاه در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس، به یک میلی‌لیتر از محلول رویی ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه شد و با آب‌مقطر دو بار تقطیر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از آن، ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد و پس از آن جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با منحنی استاندارد گالیک اسید غلظت پلی فنل‌های کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

پروتئین

برای سنجش مقدار پروتئین نخست پروتئین‌ها از برگ گیاه در دمای صفر تا ۴ درجه سانتیگراد استخراج شدند. به این منظور یک گرم بافت تر برگ در یک هاون چینی محتوی ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷/۲ که شامل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) یک میلی‌مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) یک میلی‌مولار و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود، ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار در g ۱۴۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. از محلول رویی برای بررسی فعالیت آنزیم‌ها و نیز سنجش پروتئین استفاده شد (این محلول در اپندورف و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد). برای سنجش مقدار پروتئین از روش Bradford (۱۹۷۶)

استفاده شد. به این منظور به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی و ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً مخلوط شد. پس از ۲ دقیقه و پیش از یک ساعت جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین با منحنی استاندارد با کمک آلبومن گاوی (BSA) و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

تهیه عصاره آنزیمی

تهیه عصاره آنزیمی برای لیپوکسیژناز همانند استخراج پروتئین‌ها از بافت گیاهی بود. در مورد آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز روش عصاره‌گیری در بخش مربوط به این آنزیم توضیح داده شده است.

فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز (LOX) (EC 1.13.11.12)

فعالیت این آنزیم بر اساس روش Minguez-Mosquera و همکاران (۱۹۹۳) بررسی شد. در این روش مخلوط واکنش حاوی لینولئیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار به عنوان گوهرمایه، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۶ و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش به مدت یک دقیقه در ۳۰ درجه سانتیگراد انجام شد. سپس جذب حاصل از واکنش در ۲۳۴ نانومتر اندازه‌گیری و با ضریب خاموشی $۲۵۰۰۰\ mol^{-1}cm^{-1}$، فعالیت آنزیم به ازای میلی‌گرم پروتئین موجود در عصاره آنزیمی گزارش شد. یک واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که یک میکرومولار لینولئیک اسید را در یک دقیقه استفاده می‌کند.

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) (EC 4.3.1.5)

برای تهیه عصاره آنزیمی مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه برگ با ۶/۵ میلی‌لیتر بافر تریس-HCl با اسیدیته ۸/۸ (۵۰ میلی‌مولار) حاوی بتا مرکاپتو اتانول (۱۵ میلی‌مولار) در هاون سرد ساییده شد. سپس، عصاره به دست آمده با دور g ۵۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز واکنش تبدیل فنیل‌آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. در این روش از فنیل‌آلانین به عنوان گوهرمایه آنزیم استفاده شده، فعالیت آنزیم PAL بر اساس سرعت تشکیل سینامیک اسید تعیین می‌شود. در یک لوله آزمایش یک میلی‌لیتر از بافر استخراج به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر L- فنیل‌آلانین (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۴ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شده و یک میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر کلریدریک اسید (۶ مولار) پایان می‌پذیرد. محصول به وجودآمده با ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات استخراج شده و سپس اتیل استات تبخیر شد. ماده جامد باقی‌مانده در ۳ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (۰/۰۵ مولار) حل شد و غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با ضریب خاموشی معادل $۹۵۰۰\ ^{1}cm^{-1}mol^{-}$ به دست آمد. یک واحد از فعالیت PAL معادل یک میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه است (Wang *et al.*, 2006).

تحلیل داده‌ها

تحلیل داده‌ها با آزمایش فاکتوریل و طبق طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تحلیل واریانس شد. اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شد.

نتایج

نتایج این آزمایش در جدول ۱ آورده شده است. تنش خشکی در هر دو سطح در گیاهان گوجه‌فرنگی باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی و درصد آب بافت (برگ سوم)، مقدار کلروفیل، کاروتنوئید، پروتئین، ترکیبات فنلی و فعالیت فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز شد و مقدار مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، درصد نشت یونی، فعالیت لیپوکسیژناز، مقدار پرولین و قندهای محلول را افزایش داد. همچنین، استفاده از آسکوربیک اسید باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی در شرایط تنش و درصد آب بافت (برگ سوم) در شرایط تنش و غیر تنش و افزایش مقدار کلروفیل در شرایط تنش، کاروتنوئید در شرایط تنش و غیر تنش، پروتئین در شرایط تنش، ترکیبات فنلی در شرایط تنش و غیر تنش و افزایش فعالیت فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در شرایط تنش و غیر تنش شد. استفاده از آسکوربیک اسید مقدار مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، درصد نشت یونی، فعالیت لیپوکسیژناز، مقدار پرولین و قندهای محلول را در شرایط تنش کاهش داد.

بحث

گونه‌های فعال اکسیژن عامل اصلی پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به غشاهای زیستی هستند. اسیدهای چرب و لیپیدها حساسیت زیادی به اکسیژن دارند و به سرعت اکسید می‌شوند، با توجه به این که غشای سلول، غشایی فسفولیپیدی است، واکنش آن با اکسیژن باعث تخریب غشای سلولی و نشت یون‌ها به بیرون سلول می‌شود (Upadhyaya and Panda, 2004). از دیگر عوامل پراکسیداسیون لیپیدها، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز است. این آنزیم، آنزیمی اکسیداتیو است که واکنش پراکسیداسیون لیپیدها را کاتالیز می‌کند (Egert and Tevini, 2002؛ Babar Ali *et al*., 2006). افزایش پراکسیداسیون لیپید و نشت یونی در شرایط تنش از جمله تنش خشکی ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن است که جاروب کردن و یا خاموش نمودن آنها خارج از توان گیاه بوده است و نشان می‌دهد که مکانیسم‌های دفاعی ایجاد شده در گیاه در مقابله با تنش اکسیداتیو کافی نبوده است.

در پژوهش حاضر، بیشترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید، نشت یونی، پراکسیدهیدروژن و فعالیت لیپوکسیژناز در گیاهان تحت تنش کم آبی و بدون مصرف آسکوربیک اسید مشاهده شد. مصرف آسکوربیک اسید باعث کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدئید، نشت یونی، پراکسید هیدروژن و فعالیت لیپوکسیژناز شد. آسکوربیک اسید با از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن یا به طور مستقیم و یا به طور غیر مستقیم از طریق آنزیم‌هایی مانند آسکوربیک اسید پراکسیداز (حذف پراکسید هیدروژن) باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی، کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدئید و کاهش نشت یونی می‌شود. نتایج پژوهش حاضر با نتایج Shalata و Neuman (۲۰۰۱) مطابقت دارد. مشابه با نتایج این مطالعه، کاربرد آسکوربیک اسید در گیاه سورگوم تحت تنش شوری نیز باعث حفاظت از غشاهای سلولی و کاهش پراکسیداسیون لیپید و در نتیجه نشت یونی شد (Arafa *et al*., 2007). در گیاه سویای تحت تنش نیکل نیز کاربرد آسکوربیک اسید باعث کاهش فعالیت لیپوکسیژناز و در نتیجه کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید شد (Saeidi-Sar *et al*., 2007).

جدول ۱- اثر تنش خشکی و پیش‌تیمار آسکوربیک اسید بر مقدار بر وزن خشک اندام هوایی، درصد آب بافت (برگ)، مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، درصد نشت یونی، فعالیت لیپوکسیژناز (LOX)، مقدار کلروفیل کل، کاروتنویید، پروتئین، پرولین، قندهای محلول، ترکیبات فنلی و فعالیت فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) در گیاه گوجه‌فرنگی. مقادیر میانگین ۳ تکرار است، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است.

	آبیاری (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی)	آبیاری (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و آسکوربیک اسید (۱۰ میلی‌مولار)	آبیاری (۶۰ درصد ظرفیت زراعی)	آبیاری (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و آسکوربیک اسید (۱۰ میلی‌مولار)	آبیاری (۳۰ درصد ظرفیت زراعی)	آبیاری (۳۰ درصد ظرفیت زراعی) و آسکوربیک اسید (۱۰ میلی‌مولار)
وزن خشک اندام هوایی (گرم)	۱/۰۰^{a}	۱/۳۰^{a}	۰/۷۸^{c}	۰/۸۵^{b}	۰/۶۰^{e}	۰/۶۸^{d}
درصد آب برگ	۹۱/۰۰^{b}	۹۲/۰۰^{a}	۸۵/۰۰^{d}	۸۸/۰۰^{c}	۸۰/۰۰^{f}	۸۳/۵۰^{e}
مالون‌دی‌آلدئید (نانومول بر گرم وزن تر)	۳/۰۰^{e}	۲/۹۰^{e}	۴/۵۰^{c}	۴/۱۰^{d}	۵/۲۰^{a}	۴/۹۰^{b}
پراکسید هیدروژن (میکرومول بر گرم وزن تر)	۱۴/۰۳^{e}	۱۳/۰۱^{e}	۲۵/۰۲^{c}	۲۱/۰۵^{d}	۳۵/۰۲^{a}	۲۹/۰۱^{b}
درصد نشت یونی	۱۱/۰۰^{e}	۱۰/۰۰^{e}	۱۶/۷۵^{c}	۱۳/۰۰^{d}	۲۲/۰۰^{a}	۱۹/۰۰^{b}
لیپوکسیژناز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۰/۲۲^{d}	۰/۲۳^{d}	۰/۲۹^{b}	۰/۲۵^{c}	۰/۳۵^{a}	۰/۲۹^{b}
کلروفیل کل (میکروگرم بر گرم وزن تر)	۲/۵۰^{a}	۲/۶۰^{a}	۲/۰۰^{c}	۲/۲۰^{b}	۱/۵۰^{e}	۱/۷۰^{d}
کاروتنوئید (میکروگرم بر گرم وزن تر)	۶/۰۱^{b}	۶/۴۰^{a}	۵/۰۲^{d}	۵/۶۰^{c}	۴/۰۲^{f}	۴/۴۵^{e}
پروتئین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۱۰/۰۱^{a}	۱۰/۱۰^{a}	۸/۵۰^{c}	۹/۱۰^{b}	۷/۰۳^{d}	۸/۱۰^{c}
پرولین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۵/۰۲^{e}	۵/۲۵^{e}	۱۰/۰۳^{c}	۸/۰۴^{d}	۱۵/۰۵^{a}	۱۲/۰۱^{b}
قندهای محلول (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۷۰/۱۰^{c}	۷۲/۲۰^{c}	۸۰/۱۰^{b}	۷۵/۴۰^{c}	۹۰/۳۰^{a}	۸۱/۵۰^{b}
ترکیبات فنلی (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۳/۰۱^{a}	۳/۳۰^{b}	۲/۰۱^{d}	۲/۵۰^{c}	۱/۵۱^{f}	۱/۷۶^{de}
فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۳/۷۰^{b}	۴/۰۰^{a}	۲/۷۰^{d}	۳/۰۵^{c}	۲/۰۰^{e}	۲/۵۰^{d}

در پژوهش حاضر، کمترین مقدار پروتئین در گیاهان تحت تنش کم آبی مشاهده شد و مصرف آسکوربیک اسید باعث افزایش مقدار پروتئین شد. کاهش غلظت پروتئین در تنش خشکی می‌تواند به علت کاهش سنتز پروتئین و یا افزایش هیدرولیز آن باشد (Iturbe-Ormaexte *et al*., 1998). تنش کم آبی با تولید گونه‌های فعال اکسیژن سبب تخریب ساختار پروتئین‌ها و آمینو اسیدها می‌شود. کاهش پتانسیل آب در سلول باعث کاهش مقدار پلی‌ریبوزوم‌ها و مونوریبوزوم‌ها می‌شود که این باعث کاهش سنتز پروتئین‌ها می‌شود (Heuer and Nadler, 1998). استفاده از آسکوربیک اسید باعث افزایش محتوای پروتئین شد. آسکوربیک اسید با حذف مستقیم یا غیر مستقیم رادیکال‌های آزاد اکسیژن به طور غیر مستقیم از اکسید شدن و تخریب ساختار پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند. مشابه با نتایج این تحقیق، کاربرد آسکوربیک اسید برون‌زا در گیاهان سیب‌زمینی تحت تنش شوری باعث افزایش مقدار پروتئین شد (Zahoor and Faheem, 2009).

در این پژوهش مصرف آسکوربیک اسید باعث افزایش کلروفیل کل و کاروتنوئید شد. تنش خشکی باعث کاهش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید شد. در گیاهان علایم بروز تنش اکسیداتیو شامل: کاهش پروتئین، کاهش مقدار کلروفیل و افزایش نفوذپذیری غشا است که به کاهش فتوسنتز و در نتیجه کاهش رشد گیاه منجر می‌شود. تنش کم آبی باعث افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کلروپلاست شده و تخریب ملکول کلروفیل و غشای کلروپلاست را در پی دارد. کاهش مقدار کلروفیل می‌تواند به علت تخریب ملکول کلروفیل توسط جدا شدن زنجیره فیتولی از حلقه پورفیرین در اثر گونه‌های فعال اکسیژن و یا آنزیم کلروفیلاز اتفاق افتد. در این شرایط، در گیاهان حساس به خشکی بیان ژن‌های کد کننده آنزیم کلروفیلاز افزایش می‌یابد (Sultana *et al*., 1999). کاهش مقدار کاروتنوئید در شرایط تنش به علت تجزیه بتاکاروتن و تشکیل زآگزانتین در چرخه گزانتوفیل و یا اکسید شدن مستقیم آن توسط اکسیژن یکتایی است (Sultana *et al*., 1999). آسکوربیک اسید نقش تعیین کننده‌ای در جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین، پراکندگی تشعشعات بیش از حد خورشید ایفا می‌کند، زیرا آسکوربیک اسید برای فعالیت آنزیم‌های چرخه گزانتوفیل ضروری است (Loggini *et al*., 1999). بنابراین، آسکوربیک اسید به علت ویژگی آنتی‌اکسیدانی خود از تخریب کلروفیل و کاروتنوئید جلوگیری کرده، به طور غیر مستقیم باعث افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌شود. مشابه با نتایج حاصل از این مطالعه، افزایش مقدار آسکوربیک اسید درون‌زا در گیاهان سیب‌زمینی باعث حفظ محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی این گیاهان در تنش شوری و اسمزی شد (Upadhyaya *et al*., 2010).

کاهش محتوای نسبی آب بافت در شرایط تنش خشکی به علت کاهش میزان آب در محیط یا منفی شدن پتانسیل آبی محیط است. برای ادامه ورود آب به سلول، سلول‌ها باید پتانسیل آبی خود را از محیط منفی‌تر نمایند. یکی از مکانیسم‌هایی که گیاهان برای مقابله با آثار زیان‌آور کمبود آب به کار می‌برند، سنتز محلول‌های سازگار از جمله قندهای محلول و پرولین است که در تنظیم اسمزی دخالت داشته و ترجیحاً سطح غشا را به شکل هیدراته نگه می‌دارند (Rai,

(2002. اما به نظر می‌رسد در این آزمایش اسمولیت‌ها نیز گیاهان گوجه‌فرنگی را قادر به غلبه در برابر آثار تنش خشکی نکرده‌اند، زیرا درصد آب بافت در تنش خشکی در این گیاهان کاهش یافت. علاوه بر آن، استفاده از اسمولیت‌ها برای تنظیم اسمزی برای گیاه هزینه‌بَر است و باعث مصرف انرژی و کربن نیز می‌شود. پرولین به عنوان یک ماده اسمزا و محافظ اسمزی در حفظ تعادل آب، حفظ ثبات پروتئین‌ها، حفظ ساختار سه بُعدی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، تثبیت غشاها و دستگاه سنتز پروتئین، منبع ذخیره کربن و نیتروژن برای رشد پس از رفع تنش، کاهش خطرات حاصل از تولید ROS، جاروب کردن رادیکال‌های هیدروکسیل، خاموش کردن اکسیژن یکتایی (و در نتیجه حفظ ماکرومولکول‌های سلولی نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA از آسیب رادیکال‌های آزاد)، تنظیم اسیدیته سلولی و تنظیم نسبت $NADP^+/NADPH$ نقش دارد (Matysik *et al.*, 2002؛ Verbruggen and Hermans, 2008). تجمع پرولین در بافت‌های گیاهی می‌تواند در نتیجه: الف) کاهش درتجزیه پرولین، ب) افزایش بیوسنتز پرولین، ج) کاهش سنتز پروتئین‌ها یا استفاده از پرولین و د) هیدرولیز پروتئین‌ها باشد. بنابراین، افزایش مقدار پرولین در تنش خشکی در سلول‌های گیاهی را می‌توان از راه‌های مختلف توجیه کرد (Rahnama and Ebrahimzadeh, 2004).

در مطالعه حاضر، بیشترین غلظت پرولین در گیاهان تحت تنش بدون استفاده از آسکوربیک مشاهده شد. در شرایط تنش غلظت آمینو اسید پرولین نسبت به سایر آمینو اسیدهای افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد آسکوربیک اسید با پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث کاهش خسارت به اسیدهای چرب و پروتئین‌ها شده، اثر مخرب تنش را کاهش می‌دهد. بنابراین، تجمع پرولین به عنوان یکی از عکس‌العمل‌های گیاه در برابر تنش کاهش می‌یابد.

تغییر در متابولیسم و تبدیل قندها در شرایط اسمزی در تحمل تنش دارای نقش تعیین کننده‌ای است. افزایش غلظت قندها علاوه بر این که باعث منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی در سیتوپلاسم می‌شود، در حفاظت اسمزی غشاها و پروتئین‌ها و همچنین، جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن نیز نقش دارد (Kerepesi and Galiba, 2000). در این مطالعه با وجود کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش مقدار آب بافت و کاهش شاخص‌های رشد، تجمع قندهای محلول در برگ گیاه مشاهده شد. ارتباط مستقیمی بین فرآیندهای فیزیولوژیک نظیر: فتوسنتز، انتقال، تنفس، رشد و تغییر در مقدار کربوهیدرات‌ها وجود دارد. کاربرد آسکوربیک اسید باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش مقدار آب بافت و بهبود شاخص‌های رشد شد و میزان تجمع قندهای محلول کاهش داد. Smirnoff (۲۰۰۰) معتقد است که آسکوربیک اسید به عنوان مولکولی کوچک ولی با توان فیزیولوژیک زیاد می‌تواند فرآیندهای ماده‌سازی و به ویژه ساخت قندها را در جهتی القا کند که در نهایت، به رشد گیاه منجر شود. به عبارت دقیق‌تر، کاهش قندهای محلول در حضور آسکوربیک اسید ممکن است به علت افزایش رشد باشد. البته این احتمال نیز وجود دارد که مانند پاسخ مشاهده شده درباره پرولین، با کاربرد آسکوربیک اسید تنش کاهش یافته، نیاز به افزایش قندهای محلول کاهش یافته باشد.

ترکیبات فنلی به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعددی مانند جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و قطع کردن واکنش‌های زنجیره‌وار اکسیداسیون، دادن هیدروژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، شلات کردن یون‌های فلزی و با قرار گرفتن به عنوان گوهرمایه آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات همچنین با دادن سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون جلوگیری می‌کنند و قادرند محصولاتی با قدرت اکسیدکنندگی کمتر از ترکیبات اولیه به وجود آورند (Roback and Gryglewski, 1988؛ Hamilton *et al.*, 1997). در سلول‌های گیاهی معمولاً ترکیبات فنلی به ویژه پلی فنل‌ها در سمّ‌زدایی پراکسید هیدروژن بسیار مؤثر بوده، به عنوان سیستم پشتیبان چرخه آسکوربیک اسید-گلوتاتیون در از بین بردن پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند. از آنجا که همه این ترکیبات از سینامیک اسید مشتق می‌شوند که خود محصول عمل دِآمیناز آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) روی فنیل‌آلانین است، به نظر می‌رسد که تغییرات در فعالیت PAL می‌تواند یکی از علل تغییر مقدار این ترکیبات در گیاهان باشد (Solecka, 1997؛ Wen *et al.*, 2008). به هر حال، در یک مطالعه با کاربرد مهارکننده PAL، فعالیت PAL و غلظت ترکیبات فنلی به طور معنی‌داری کاهش یافت و به تبع آن مقاومت به تنش‌ها نیز کاهش یافت (Wen *et al.*, 2008). این نتایج نشان می‌دهد که تغییرات در فعالیت PAL و سایر آنزیم‌های دخیل در مسیر فنیل پروپانوئید و تجمع انواع ترکیبات فنلی می‌تواند جزو نخستین مراحل پاسخ به تنش‌ها باشد.

در بررسی حاضر، در تنش خشکی مقدار ترکیبات فنلی در گیاه کاهش یافت که می‌تواند هم به علت کاهش بیوسنتز آن (به علت کاهش فعالیت PAL) و هم به علت افزایش تجزیه آن توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد. کاربرد آسکوربیک اسید با افزایش فعالیت PAL باعث افزایش این ترکیبات و افزایش قدرت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی شد که نتیجه آن کاهش تنش اکسیداتیو است.

در مجموع، نتایج این بررسی نشان داد که آسکوربیک اسید با افزایش مقدار کاروتنوئید و ترکیبات فنلی و فعالیت PAL و بهبود وضعیت آبی و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان باعث کاهش تنش اکسیداتیو شد و نتیجه این تغییرات باعث شد تا میزان نیاز به پرولین و قندهای محلول برای تنظیم اسمزی کاهش یابد و از منابع کربن و نیتروژن برای رشد استفاده شد و نتایج مثبت استفاده از آسکوربیک اسید در بهبود شاخص‌های رشد مشخص است.

سپاسگزاری

نگارنده از دانشگاه پیام نور به خاطر فراهم آوردن امکانات مالی برای انجام این طرح پژوهشی، کمال تشکر را دارد.

منابع

Abdul Jaleel, C. K., Riadh, R., Gopi, P., Manivannan, J., Ines, H. J., Al-Juburi, Z., Chang-Xing, S., Hong-Bo R. and Panneerselvam, R. (2009) Antioxidant defense responses: physiological plasticity

in higher plants under abiotic constrains. Acta Physiologia Plantarum 31: 427-436.

Afzali, I., Basra, S. M. A., Faroog, M. and Nawaz, A. (2006) Alleviation of salinity stress in spring wheat by hormonal priming with ABA, salicylic acid and ascorbic acid. International Journal of Agriculture and Biology 1: 23-28.

Al-qurainy, F. (2007) Responses of bean and pea to vitamin C under salinity stress. Agriculture and Biological Science 3(6): 714-722.

Arafa, A. A., Khafagy, M. A. and El-Banna, M. F. (2007) The effect of glycinebetaine or ascorbic acid on the salt stress induced damages in sorghum plant cells. International Journal of Botany 3(3): 251-259.

Babar Ali, M., Yu, K. W., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2006) Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. Plant Cell Reports 25: 613-620.

Bartosz, G. (1997) Oxidative stress in plants. Acta Physiologia Plantarum 19(1): 47-64.

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

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

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

Egert, M. and Tevini, M. (2002) Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). Environmental Exprmental Botany 48: 43-49.

Fales, F. W. (1951) The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. Journal of Biological Chemistry 193: 113-124.

Hamilton, R., Kalu, C., Prisk, E., Padly, F. and Pievce, H. (1977) Chemistry of free radical in lipid. Food Chemistry 60: 193-199.

Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archive of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Heuer, B. and Nadler, A. (1998) Physiological responses of potato plants to soil salinity and water deficit. Plant Science 137:43-51.

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

Kerepesi, I. and Galiba, G. (2000) Osmotic and salt stress induced alternation in solute carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Science 40: 482-487.

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

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

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

Matysik, J., Alia, A., Bhalu, B. and Mohanty, P. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science 82(5): 525-532.

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

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

Orcutt, D. M. and Nilsen, E. T. (2000) The physiology of plants under stress, soil and biotic factors. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Rahnama, H. and Ebrahimzadeh, H. (2004) The effect of NaCl on proline accumulation in potato seedlings and calli. Acta Physiologia Plantarum 26(3): 263-270.

Rai, V. K. (2002) Role of amino acids in plant responses to stresses. Biologia Plantarum 45(4): 481-487.

Roback, J. and Gryglewski, R. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. Biochemistry and Pharmacology 37: 837-841.

Saeidi-Sar, S., Khavari-Nejad, R. A., Fahimi, H., Ghorbanli, M. and 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. Russian Journal of Plant Physiology 54(1): 74-79.

Shalata, A. and Neuman, P. M. (2001) Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany 52: 2207-2211.

Smirnoff, N. (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. Annals of Botany 78: 661-669.

Smirnoff, N. (2000) Ascorbic acid, metabolism and function of a multi-facetted molecule. Current Opinion Plant Biology 3: 229-235.

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

Soland, S. F. and Laima. S. K. (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. Plant Agriculture 1: 1-5.

Solecka, D. (1997) Role of phenyl propanoid compounds in plant responses to different stress factor. Acta Physiologia Plantarum 19(3): 257-268.

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

Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *Phaseolus acutifolia* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science 168: 223-231.

Upadhyaya, H. and Panda, K. (2004) Responses of *Camellia sinensis* to drought and rehydration. Biologia Plantarum 48(4): 597-600.

Upadhyaya, H. C. P., Akula, N., Young, K. E., Chun, S. C., Kim, D. H. and Park, S. W. (2010) Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses. Biotechnology Letters 32: 321-330.

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

Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008) Proline-accumulation in plants: a review. Amino acids 35(4): 753-759.

Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. and Tan, R. Y. (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide 15: 351-358.

Wen, P. F., Chen, J. Y., Wan, S. B., Kong, W. F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J., Pan, Q. H. and Hung, W. D. (2008) Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. Plant Growth Regulation 55(1): 1-10.

Younis, M. E., Hasaneen, M. N. A. and Kazamel, A. M. S. (2010) Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimentaleffects of NaCl and mannitol stress in *Vicia faba* seedlings. Protoplasma 239: 39-48.

Zahoor, A. S. and Faheem, A. (2009) Amelioration of salinity tolerance in *Solanum tuberosum* L. by exogenous application of ascorbic acid. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 45: 540-549.

Zhu, J. K. (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. Current Opinion in Plant Biology 4: 401-406.

The effect of ascorbate pre-treatment on tomato plant under drought stress: oxidative stress, osmolytes, phenolics and protein

Fatemeh Daneshmand *

Biology Department, Payame Noor University, 19395-4697- Tehran, I. R. Iran.

Abstract

Drought stress increases the generation of reactive oxygen species and causes membrane lipid peroxidation and damages cell membranes in the plant cells. In this study, we investigated the role of ascorbate pre-treatment in inducing tolerance to oxidative stress and improving resistance to drought stress. Drought stress reduced growth parameters, percent of water content, chlorophyll, carotenoids, protein, phenolics and phenylalanine ammonialyase activity but increased lipid peroxidation, ion leakage, lipoxygenase activity and hydrogen peroxide, total sugars, and proline levels. Pretreatment with ascorbic acid decreased lipid peroxidation, ion leakage, lipoxygenase activity, the amount of hydrogen peroxide and total sugars content but increased the amount of chlorophyll, carotenoids, protein, phenolics and phenylalanine ammonialyase activity all resulting in increased water content and improved growth parameters.

Key words: Ascorbic acid, Osmolyte, Drought stress, Oxidative stress

* Corresponding Author: f.daneshmand@yahoo.com