

پاسخ سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان گیاه گوجه‌فرنگی به تنش کم آبی و برهم‌کنش آن با آسکوربیک اسید

فاطمه دانشمند *

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۳۶۹۷ تهران، ایران

چکیده

در تنش‌های محیطی از جمله تنش کم آبی، اکسیدان‌هایی نظیر گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شوند که به ساختار غشایی در گیاهان آسیب می‌رسانند. در بین آنتی‌اکسیدان‌ها، آسکوربیک اسید دارای نقش حیاتی در سلول‌های زنده است و سبب از بین رفتن گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد. در پژوهش حاضر، گیاهان گوجه‌فرنگی تحت تیمار با آسکوربیک اسید در غلظت‌های ۰ و ۱۰ میلی‌مولار و تنش کم آبی در سه سطح آبیاری در حد ظرفیت زراعی (شاهد)، آبیاری تا ۶۰ درصد ظرفیت زراعی و آبیاری تا ۳۰ درصد ظرفیت زراعی قرار گرفتند. سپس، تغییرات در شاخص‌های رشد، مقدار مالون‌دی‌آلدئید و سایر آلدئیدها، مقدار آسکوربیک اسید و گلوکاتایون و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و گایاکول پراکسیداز بررسی شد. هر دو سطح تنش کم آبی موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید، کاهش مقدار آسکوربیک اسید و گلوکاتایون و افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و گایاکول پراکسیداز و کاهش شاخص‌های رشد شد. تیمار آسکوربیک اسید در گیاهان تحت تنش موجب کاهش پراکسیداسیون لیپید، افزایش مقدار آسکوربیک اسید و گلوکاتایون و کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و گایاکول پراکسیداز شد و در نتیجه سبب بهبود شاخص‌های رشد گردید.

واژه‌های کلیدی: آسکوربیک اسید، تنش اکسیداتیو، تنش کم آبی، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان

مقدمه

میلی‌مولار، هم در بافت‌های فتوسنتزی و هم غیرفتوسنتزی ذخیره شود. در برگ‌ها، غلظت آسکوربیک اسید از غلظت کلروفیل بیشتر است و مخزن آسکوربیک اسید بیش از ۱۰ درصد

همه گیاهان و حیوانات به استثنای انسان و خوکیچه هندی قادر به سنتز آسکوربیک اسید هستند. در گیاهان، آسکوربیک اسید می‌تواند در غلظت‌هایی در حد

تنش‌های مختلف محیطی شامل تنش‌های زنده و محیطی سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند. از جمله این تنش‌ها می‌توان به تنش خشکی، نور شدید، شوری، سمیت فلزات و عوامل بیماری‌زا اشاره نمود. تنش خشکی مانند دیگر تنش‌های محیطی باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل در سلول و آسیب رساندن به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (Abdul Jaleel *et al.*, 2009). در سلول‌های گیاهی، غشای پلاسمایی و اندامک‌هایی نظیر: کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم تولیدکننده‌های اصلی رادیکال‌های آزاد اکسیژن طی فرآیندهای فتوسنتز و تنفس هستند. زنجیره انتقال الکترون در غشای تیلاکوئید مهم‌ترین منبع تولید گونه‌های فعال اکسیژن است. تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کلروپلاست به وسیله انتقال مستقیم انرژی از کلروفیل به مولکول اکسیژن و برانگیخته شدن آن یا به وسیله احیای مولکول اکسیژن در فتوسیستم I صورت می‌گیرد (Bartosz, 1997). گیاهان سازوکارهای متفاوتی برای کاهش آثار مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارند، از جمله این سازوکارها تولید ترکیبات آنزیمی و غیر آنزیمی آنتی‌اکسیدان است. بدین صورت که مقدار گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی به وسیله فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها تنظیم می‌شود. ظرفیت کاهش آثار مخرب گونه‌های فعال اکسیژن بستگی به میزان تحمل گیاه به تنش دارد (Abdul Jaleel *et al.*, 2009).

تنش خشکی از طریق بسته شدن روزنه و در نتیجه

کربوهیدرات‌های محلول را در گیاه تشکیل می‌دهد (Noctor and Foyer, 1998).

آسکوربیک اسید یک آنتی‌اکسیدان اولیه است که به طور مستقیم با رادیکال هیدروکسیل، سوپراکسید و اکسیژن یکتایی واکنش می‌دهد. آسکوربیک اسید در حفاظت نوری و تنظیم فتوسنتز نیز نقش دارد. آسکوربیک اسید نقش مهمی در حفظ فعالیت آنزیم‌هایی دارد که گروه پروستتیک آنها دارای فلزات واسطه است. آسکوربیک اسید یک آنتی‌اکسیدان ثانویه قوی است که قادر به احیا کردن شکل اکسیده آلفاتوکوفرول (ویتامین E) است. آلفا توکوفرول یک آنتی‌اکسیدان مهم محلول در چربی است (Noctor and Foyer, 1998). آسکوربیک اسید در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون که در پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست و سیتوسول نقش دارد به عنوان یک ماده کلیدی عمل می‌نماید (Kuzniak, 2004؛ Afzali *et al.*, 2006). مشخص شده است که آسکوربیک اسید با از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند مقاومت گیاه را در برابر تنش افزایش دهد و باعث تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گردد. پژوهش‌ها نشان داده است که آسکوربیک اسید خارجی می‌تواند مقاومت به تنش شوری را در گیاهان افزایش داده، همچنین تنش اکسیداتیو را کاهش دهد (Shalata and Neuman, 1990؛ Shaddad *et al.*, 2001). بر اساس گزارش Al-qurainy (۲۰۰۷) میزان جوانه‌زنی گیاهان نخود و لوبیا که تحت تنش شوری کاهش یافته بود، با افزودن تیمار آسکوربیک اسید افزایش یافت.

کمبود CO₂ باعث مهار فتوسنتز شده، به تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست منجر می‌شود که باعث آسیب دیدن غشا در اثر پراکسیداسیون لیپیدها می‌گردد (Bartosz, 1997; Turkan *et al.*, 2005). همان‌طور که اشاره شد، گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی و زنده‌مانند به سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی هستند تا بتوانند گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده را مهار نمایند، با این حال، با تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن ممکن است آسیب اکسیداتیو رخ دهد و دفاع آنتی‌اکسیدانی ناتوان باشد (Abdul Jaleel *et al.*, 2009). بنابراین، طی دوره تنش خشکی لازم است هماهنگی در سازوکارهای حفاظت‌کننده در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن صورت گیرد تا ساختار ماکرومولکول‌ها پایدار بماند (Hoekstra *et al.*, 2001). مقاومت به تنش‌های مختلف به توانایی آنتی‌اکسیدانی بستگی دارد و تغییر در سطوح آنتی‌اکسیدانی می‌تواند از آسیب ناشی از تنش جلوگیری نماید. در پژوهش حاضر، آثار تنش کم آبی در گیاه گوجه‌فرنگی بررسی شد تا تغییر در شاخص‌های رشد، مقدار پراکسیداسیون لیپیدها، مقدار آسکوربات و گلوکاتینون و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتینون ردوکتاز و گایاکول پراکسیداز در تنش کم آبی و تنش‌های ناشی از آن مشخص شود و نقش آسکوربیک اسید خارجی در حفاظت از گیاهان گوجه‌فرنگی تحت تنش کم آبی مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد بررسی در این پژوهش، گوجه‌فرنگی

(*Lycopersicon esculentum* Mill.) رقم Falcato بود. بذرها در گلدان‌هایی به قطر ۱۱ سانتی‌متر حاوی خاک: ماسه: پیت ماس (۲:۱:۱) کاشته شد. گلدان‌ها روزانه آبیاری و در شرایط گلخانه‌ای نگهداری شدند. در آغاز مرحله چهار برگی، برای اعمال پیش‌تیمار، غلظت‌های ۰ 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 گردید). سپس، تنش کم آبی 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 گردید. پس از اعمال تیمارها، شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شد و برای سنجش‌های بیوشیمیایی، برگ سوم بعد از قراردادن در نیتروژن مایع در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری و همه سنجش‌های بیوشیمیایی روی برگ سوم انجام گرفت.

شاخص‌های رشد: وزن تر و سطح برگ سوم در

گروه‌های تیماری مختلف اندازه‌گیری گردید.

پراکسیداسیون لیپیدها: برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دی‌آلدئید و سایر آلدئیدها که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع هستند، اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید (MDA) با روش Heath و Packer (۱۹۶۹) انجام شد. بر اساس 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 با نیروی ۱۰۰۰۰g سانتیفریوژ

(۱۹۹۹) استفاده شد. ۰/۵ گرم بافت فریز شده گیاه (برگ) در ۱۰ میلی‌لیتر متانسفریک اسید ۵ درصد ساییده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس، ۳۰۰ میکرولیتر از عصاره سانتریفیوژ شده در لوله آزمایش ریخته شد و محلول‌های زیر به ترتیب به آن اضافه گردید: ابتدا ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، سپس ۱۵۰ میکرولیتر دی‌تیو تریاتول ۱۰ میلی‌مولار و مخلوط حاصل ۱۰ دقیقه در ۱۵۰ درجه حرارت اتاق قرار داده شد. سپس، ۱۵۰ میکرولیتر N-اتیل مال آمید ۰/۵ درصد اضافه و مخلوط حاصل ورتکس شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰ درجه حرارت اتاق قرار گرفت. پس از آن، ۶۰۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد، ۶۰۰ میکرولیتر اورتو فسفریک اسید ۴۴ درصد، ۶۰۰ میکرولیتر آلفا آلفا دی پیریدیل ۴ درصد و ۱۰ میکرولیتر $FeCl_3$ (۴۷۵ میلی‌گرم در ۰/۵ میلی‌لیتر آب) اضافه گردید. مخلوط حاصل با ورتکس به هم زده شده و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت سپس مجدداً ورتکس شد و برای بار دوم به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت و شدت جذب در ۵۲۵ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار آسکوربیک اسید کل با استفاده از آسکوربیک اسید منحنی استاندارد رسم گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

گلو تاتیون کل: برای اندازه‌گیری مقدار

گلو تاتیون از روش Griffith (۱۹۸۰) استفاده گردید. برای اندازه‌گیری مقدار گلو تاتیون کل، ابتدا ۰/۵ گرم

شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، ۴ میلی‌لیتر TCA ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید (TBA) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم حرارت داده شد و بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. شدت جذب این محلول توسط اسپکتروفتومتر (مدل Cary50 Varian، شرکت Varian، آمریکا) 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 گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری غلظت سایر آلدئیدها (پروپانال، بوتانال، هگزانال، هپتانال و پروپانال دی متیل استال) با روش Meirs و همکاران (۱۹۹۲) دقیقاً مانند روش ذکر شده برای مالون دی آلدئید انجام شد با این تفاوت که جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۵ نانومتر خوانده شد. جذب سایر رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت این آلدئیدها از ضریب خاموشی معادل $10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 0.458$ استفاده شد. و نتایج بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

آسکوربیک اسید کل: برای سنجش مقدار

آسکوربیک اسید کل از روش De Pinto و همکاران

نوری نیترو بلو تترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت. مخلوط واکنش نمونه‌ها شامل: بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته=۷، NBT ۰/۰۷۵، میکرومولار، ۰/۱ میلی‌مولار Na-EDTA، ۷۵ میکرومولار ریوفلاوین ۱۳ میلی‌مولار متیونین و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. برای سنجش فعالیت این آنزیم علاوه بر بلانک (برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر)، نیاز به نمونه شاهد نیز است. میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه‌ها در مقایسه با بلانک سنجیده شد. واکنش در عصاره‌های تهیه شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با روشن شدن لامپ فلورسنت (۴۰W) آغاز شد و پس از ۸ دقیقه با خاموش کردن لامپ، واکنش متوقف گردید. لوله بلانک شامل مواد ذکر شده بود با این تفاوت که در آن، عصاره آنزیمی اضافه نگردید و در روشنایی نیز قرار نگرفت. در لوله بلانک نیز مخلوط واکنش ذکر شده وجود داشت با این تفاوت که به آن عصاره آنزیمی اضافه نشد ولی در نور قرار گرفت. بنابراین، به دلیل عدم وجود آنزیم در بلانک، احیای NBT در حضور نور (احیای نوری) به طور ۱۰۰ درصد در شاهد انجام و تمام نیترو بلو تترازولیوم موجود در مخلوط واکنش در حضور نور به فورمازون تبدیل می‌شود. میزان جذب بلانک در ۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده ۱۰۰ درصد احیای نوری NBT است و نیمی از آن معادل یک واحد آنزیمی است. بنابراین، یک واحد آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیای نوری احیای نیترو بلو تترازولیوم (با جلوگیری از تبدیل آن به فورمازون) می‌گردد. اختلاف جذب نمونه‌ها و شاهد در

از برگ گیاه در یک هاون چینی محتوی ۲ میلی لیتر متاسفریک اسید ۲ درصد به طور کامل ساییده شد. محلول همگن به دست آمده به لوله سانتریفیوژ منتقل و پس از ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتیگراد، توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ گردید. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محلول رویی به لوله آزمایش حاوی ۷۰۰ میکرولیتر NADPH (۰/۳ میلی‌مولار)، ۱۰۰ میکرولیتر دی تیوبیس DTNB (۶ میلی‌مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید و پس از ۳-۴ دقیقه، ۱۰ میکرولیتر آنزیم گلوکاتیون ردوکتاز افزوده شد و جذب در ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. محاسبه گلوکاتیون کل از طریق منحنی استاندارد انجام و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارایه گردید.

تهیه عصاره آنزیمی: برای تهیه عصاره آنزیمی ۱ گرم بافت تر برگ در یک هاون چینی محتوی ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با اسیدیته= ۷/۲ که شامل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی مولار، فیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی مولار و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود، ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار در ۱۴۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. از محلول رویی برای مطالعه فعالیت آنزیم‌ها و نیز سنجش پروتئین استفاده گردید (این محلول در اپندورف و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (EC 1.15.1.1): سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از سنجش مهار احیای

H_2O_2 را در یک دقیقه تجزیه می‌کند.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

(APX) (EC1.11.1.1): مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مول با اسیدیته=۷، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی مولار، H_2O_2 ۰/۱۵ میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. به دنبال اکسید شدن آسکوربیک اسید با آغاز واکنش آنزیمی، کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر، ۲ دقیقه پس از آغاز واکنش نسبت به زمان آغاز واکنش محاسبه شد. با استفاده از تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر، ضریب خاموشی آسکوربیک اسید ($2/8 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و رابطه $A=\epsilon bc$ ، میزان آسکوربیک اسید بر جای مانده پس از ۲ دقیقه انجام واکنش آنزیمی محاسبه شد. یک واحد آنزیمی آسکوربات پراکسیداز مقدار آنزیمی است که یک میلی مول آسکوربیک اسید را در یک دقیقه اکسید می‌کند (Nakano and Asada, 1981). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره (به دست آمده از روش Bradford (۱۹۷۶)) گزارش شد.

فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR)

(EC 1.6.4.2): فعالیت آنزیم GR به وسیله اکسیداسیون NADPH با روش Foyer و Halliwell (۱۹۷۶) تعیین می‌شود. در این روش از مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار (اسیدیته=۷/۸)، گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) ۰/۵ میلی مولار، NADPH ۰/۱ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با اضافه کردن NADPH آغاز شد. جذب نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیمی مقدار

۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده مهار احیای نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه است. با محاسبه اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه‌ها محاسبه و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) در ۵۰ میکرولیتر عصاره (به دست آمده از روش Bradford (۱۹۷۶)) بیان شد (Giannopolitis and Ries, 1977).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (EC 1.11.1.6):

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر و با روش Dhindsa و Motowe (۱۹۸۱)) انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با اسیدیته=۷ و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار است. با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط ذکر شده، واکنش آغاز می‌شود. بلانک برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر شامل مخلوط واکنش اما فاقد عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب (یعنی تفاوت جذب در زمان آغاز واکنش از جذب در زمان یک دقیقه) پس از آغاز واکنش محاسبه گردید. میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از ۱ دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=0/28 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و رابطه $A=\epsilon bc$ محاسبه شد که نشان‌دهنده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز است. A: معادل جذب خوانده شده، ϵ : ضریب خاموشی، c: غلظت H_2O_2 و b: طول کووت (۱ سانتی متر) است. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره (به دست آمده از روش Bradford (۱۹۷۶)) در یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که ۱ میلی مول

از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

نتایج این آزمایش نشان داد که تنش کم آبی در هر دو سطح در گیاهان گوجه‌فرنگی موجب کاهش معنی‌دار شاخص‌های رشد شامل: وزن تر برگ سوم (شکل ۱) و سطح برگ سوم (شکل ۲) شد. همچنین، سبب کاهش معنی‌دار مقدار آسکوربات (شکل ۵) و گلوکاتیون (شکل ۶) شد. تنش کم آبی همچنین در هر دو سطح، میزان پراکسیداسیون لیپیدها (مالون دی‌آلدئید) (شکل ۳) و سایر آلدئیدها (شکل ۴)، و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۷)، کاتالاز (شکل ۸)، گایاکول پراکسیداز (شکل ۹)، آسکوربات پراکسیداز (شکل ۱۰) و گلوکاتیون ردوکتاز (شکل ۱۱) را به صورت معنی‌دار افزایش داد.

استفاده از آسکوربیک اسید موجب بهبود شاخص‌های رشد شامل وزن تر برگ سوم (شکل ۱) و سطح برگ سوم (شکل ۲) و افزایش مقدار آسکوربات (شکل ۵) و گلوکاتیون (شکل ۶) در شرایط تنش و غیرتنش شد و مقدار پراکسیداسیون لیپیدها (مالون دی‌آلدئید) (شکل ۳) و سایر آلدئیدها (شکل ۴)، و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۷)، کاتالاز (شکل ۸)، گایاکول پراکسیداز (شکل ۹)، آسکوربات پراکسیداز (شکل ۱۰) و گلوکاتیون ردوکتاز (شکل ۱۱) را در شرایط تنش کاهش داد، ولی مقدار سایر آلدئیدها (شکل ۴) و فعالیت گایاکول پراکسیداز (شکل ۹) در شرایط غیرتنش نیز توسط آسکوربیک اسید کاهش یافت.

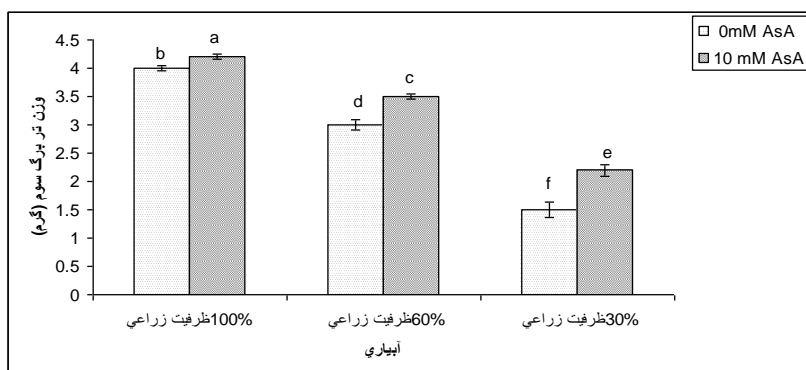
آنزیمی است که برای اکسیداسیون یک نانومول NADPH در یک دقیقه لازم است. برای محاسبه مقدار NADPH اکسید شده از ضریب خاموشی معادل $6/2 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز (GPOD) (EC 1.11.1.7):

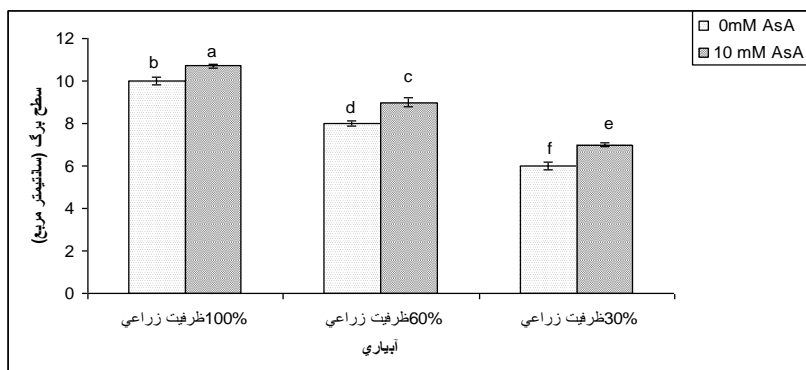
سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکول و اندازه‌گیری میزان جذب تراگایاکول تشکیل شده از گایاکول در نتیجه فعالیت پراکسیداز، در 470 نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات 50 میلی‌مولار با اسیدیته 7 ، پراکسید هیدروژن $0/3$ درصد و گایاکول 1 درصد است. واکنش با افزودن 20 میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش در 25 درجه سانتیگراد آغاز گردید. میزان جذب تراگایاکول (حاصل از اکسید شدن گایاکول) در 470 نانومتر در لحظه آغاز واکنش پس از افزودن عصاره آنزیمی و پس از یک دقیقه خوانده شد. با استفاده از تغییرات جذب در یک دقیقه در 470 نانومتر، ضریب خاموشی تراگایاکول $(\epsilon=25/5 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ و رابطه $A=\epsilon bc$ ، مقدار تراگایاکول تشکیل شده محاسبه شد. این مقدار از تراگایاکول معادل فعالیت یک واحد آنزیم پراکسیداز است (Plewa et al., 1991). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در 20 میکرولیتر عصاره (به دست آمده از روش Bradford (1976)) گزارش شد.

تحلیل آماری: تحلیل‌های آماری با آزمایش

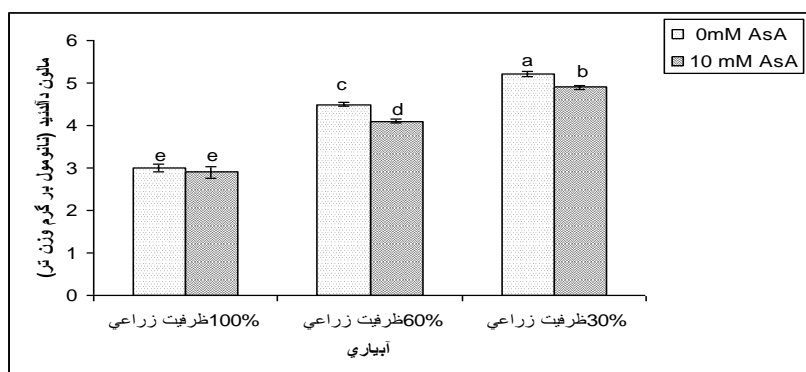
فاکتوریل و طبق طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تحت آنالیز واریانس قرار گرفته، اختلاف میانگین‌ها با استفاده



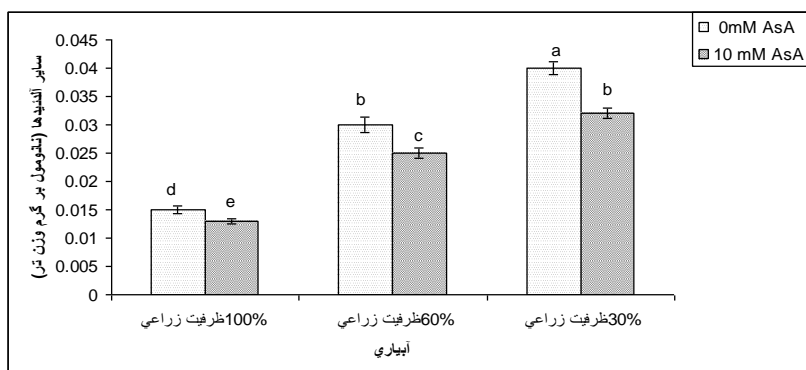
شکل ۱- اثر تنش کم آبی و آسکوربیک اسید (AsA) بر وزن تر برگ سوم در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).



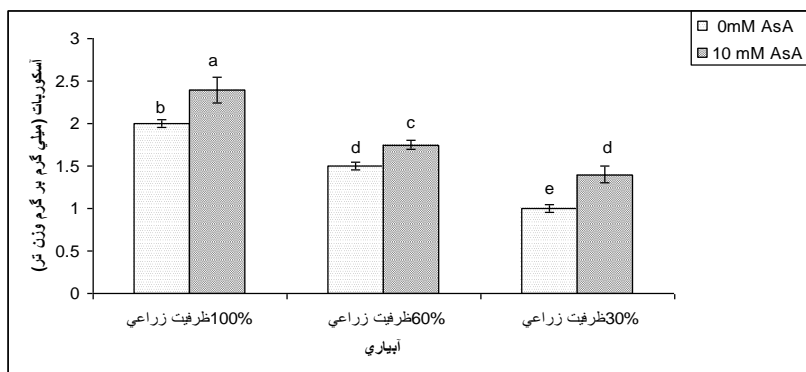
شکل ۲- اثر تنش کم آبی و آسکوربیک اسید (AsA) بر سطح برگ سوم در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).



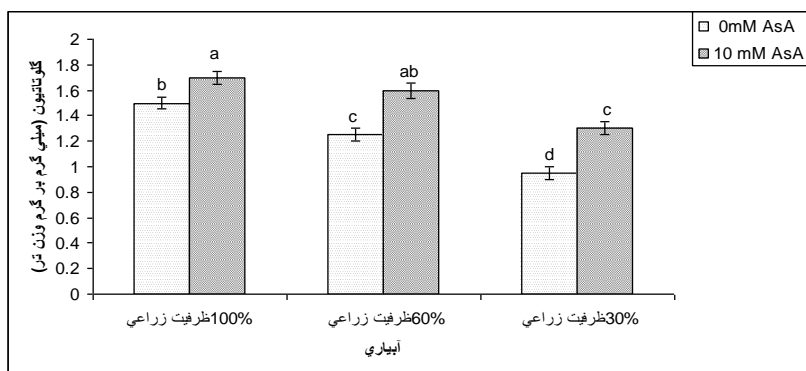
شکل ۳- اثر تنش کم آبی و آسکوربیک اسید (AsA) بر میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).



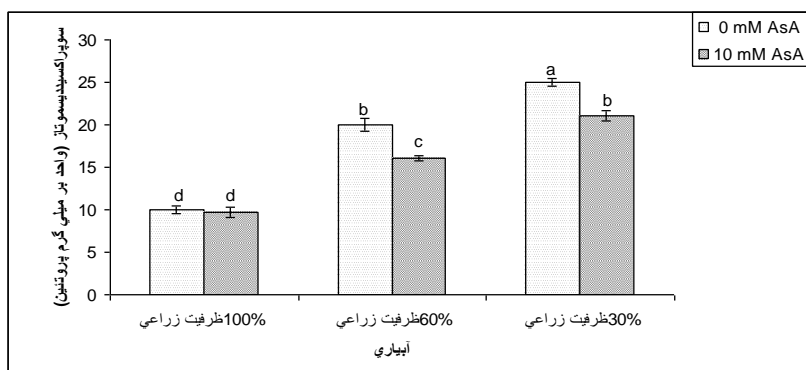
شکل ۴- اثر تنش کم آبی و آسکوربیک اسید (AsA) بر مقدار سایر آلدئیدها در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).



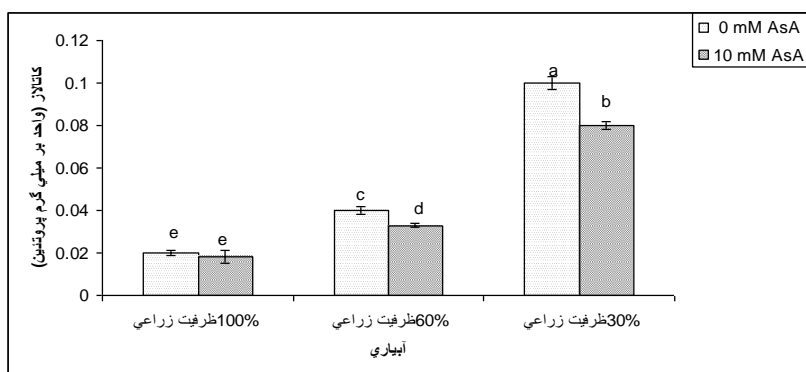
شکل ۵- اثر تنش کم آبی و تیمار آسکوربیک اسید (AsA) بر مقدار آسکوربیک اسید در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).



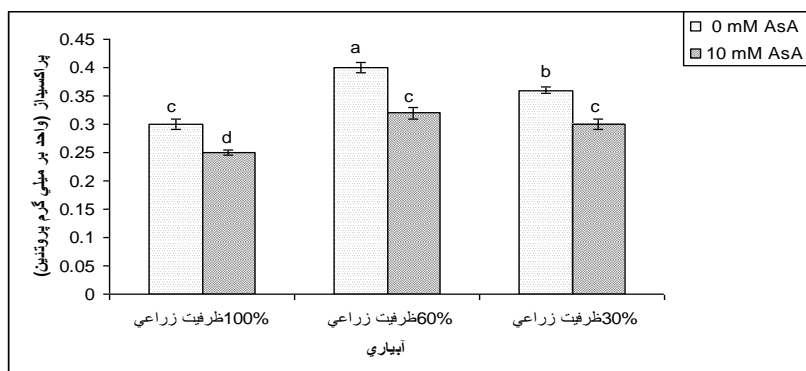
شکل ۶- اثر تنش کم آبی و آسکوربیک اسید (AsA) بر مقدار گلو‌تاتیون در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).



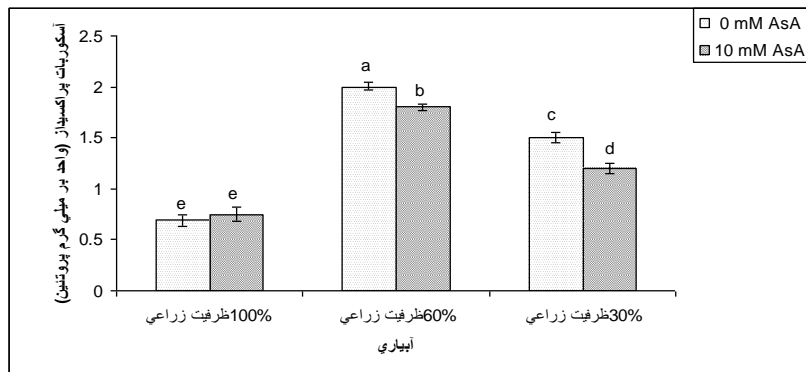
شکل ۷- اثر تنش کم آبی و آسکوربیک اسید (AsA) بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).



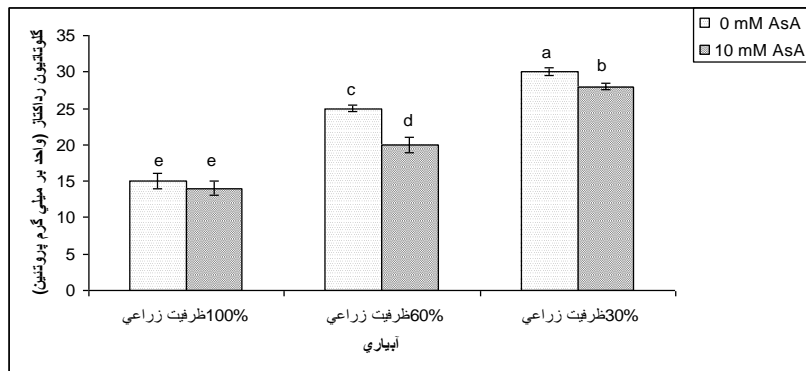
شکل ۸- اثر تنش کم آبی و آسکوربیک اسید (AsA) بر فعالیت کاتالاز (CAT) در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).



شکل ۹- اثر تنش کم آبی و آسکوربیک اسید (AsA) بر فعالیت گایاکول پراکسیداز (GPOD) در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).



شکل ۱۰- اثر تنش کم آبی و آسکوربیک اسید (ASA) بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).



شکل ۱۱- اثر تنش کم آبی و آسکوربیک اسید (ASA) بر فعالیت گلو تاتیون ردو کتاز (GR) در گوجه‌فرنگی (داده‌ها میانگین سه تکرار و علایم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن است).

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز زمانی رخ می‌دهد که مقدار یون سوپراکسید درون سلول افزایش یابد (Smirnoff, 1996). سوپراکسید دیسموتاز آنیون سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد که آسکوربیک اسید سبب کاهش فعالیت این آنزیم می‌شود. این کاهش فعالیت آنزیم در گیاهان تنش دیده را می‌توان به اثر آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک اسید در خنثی‌سازی مستقیم یون سوپراکسید نسبت داد (Noctor and Foyer, 1998). چنین به نظر می‌رسد که در شرایط کم آبی، افزایش

در پژوهش حاضر، تنش کم آبی در هر دو سطح بر تمام آنزیم‌های مورد بررسی تأثیر معنی‌دار داشت. در گیاهان، تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سازوکارهایی است که برای افزایش مقاومت در برابر تنش‌ها رخ می‌دهد. در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. مشابه با نتایج این مطالعه در گیاهان آراییدوبسیس تحت تنش کم آبی نیز افزایش فعالیت این آنزیم گزارش شده است (Jung, 2004).

نیز افزایش فعالیت GR در تنش خشکی گزارش شده است (Turkan *et al.*, 2005).

اما نتایجی عکس نتایج مطالعه حاضر در گیاهان سیب‌زمینی تحت تنش شوری (Zahoor and Faheem, 2009) و گیاهان لویبای تحت تنش شوری و خشکی (Younis *et al.*, 2010) گزارش شده است. در این گیاهان کاربرد آسکوربیک اسید موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز گردید.

بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاهان تحت تنش و بدون مصرف آسکوربیک اسید مشاهده شد (شکل ۹). تیمار آسکوربیک اسید کاهش فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهان شاهد گردید. پراکسیدازها در پاک‌سازی مولکول پراکسید هیدروژن نقش دارند. به نظر می‌رسد که کاهش یون سوپراکسید توسط آسکوربیک اسید تولید پراکسید هیدروژن توسط سوپراکسید دیسموتاز کاهش را داده، در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز برای تجزیه پراکسید هیدروژن کاهش می‌یابد. مشابه با نتایج پژوهش حاضر، کاربرد آسکوربیک اسید در گیاهان سیب‌زمینی تحت تنش شوری موجب کاهش فعالیت پراکسیداز گردید (Zahoor and Faheem, 2009).

به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نتیجه مصرف آسکوربیک اسید، به تأثیر غیرمستقیم آسکوربیک اسید بر روی آنزیم‌ها بر می‌گردد. بدین ترتیب که آسکوربیک اسید با کاهش اثر مخرب تنش (خنثی‌سازی مستقیم رادیکال‌های آزاد) از افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌ها جلوگیری کرده است.

غلظت پراکسید هیدروژن حاصل از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز سبب تحریک فعالیت آنزیم کاتالاز برای تجزیه پراکسید هیدروژن می‌گردد. کاتالاز، پراکسید هیدروژن را که برای سلول سمی است به آب و اکسیژن تجزیه می‌نماید. کاهش فعالیت این آنزیم را در گیاهان تحت تنش که با آسکوربیک اسید پیش‌تیمار شده بودند، می‌توان این‌گونه توجیه نمود که آسکوربیک اسید به دلیل خنثی‌سازی و از بین بردن یون سوپراکسید در پاک‌سازی این یون مخرب نقش داشته، در نتیجه سبب کاهش تولید پراکسید هیدروژن و در پی آن کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود (Noctor and Foyer, 1998).

آسکوربیک اسید در چرخه آسکوربات-گلوکاتیون در میتوکندری، پراکسی‌زوم، کلروپلاست و سیتوپلاسم نقشی کلیدی را برابر گونه‌های فعال اکسیژن حاصل از تنش‌های زنده و غیرزنده ایفا می‌کند. همچنین، این ویتامین برای آنزیم‌هایی نظیر آسکوربات پراکسیداز که در تجزیه پراکسید هیدروژن نقش دارند به عنوان کوفاکتور عمل می‌کند (Noctor and Foyer, 1998)؛ (Upadhyaya *et al.*, 2010).

آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز نیز از آنزیم‌های مهم در چرخه آسکوربات-گلوکاتیون هستند. در پژوهش حاضر، فعالیت این دو آنزیم در تنش کم آبی افزایش و با کاربرد آسکوربیک اسید کاهش یافت (شکل‌های ۱۰ و ۱۱). مشابه با این نتایج، افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان لویبای مقاوم به تنش خشکی (Turkan *et al.*, 2005)، کنجد (Fazeli *et al.*, 2007) و تنباکو (Gupta *et al.*, 1993) نیز گزارش شده است. در گونه‌های مقاوم لویبای

Cajanus caja, (Iturbe-Ormaeche et al., 1998)
Cammellia sinensis و (Jain et al., 2006)
 (Upadhaya and Panda, 2004) در شرایط تنش
 آسمزی گزارش شده است و علت آن تأثیر کم آبی بر
 ژن‌های کدکننده آنتی‌اکسیدان‌ها است (Bartoli et al.,
 1999). در گزارش Iturbe-Ormaeche و همکاران
 (۱۹۹۸) علت کاهش مقدار آسکوربیک اسید در تنش
 کم آبی در گیاه نخود را به علت تخریب مستقیم
 آسکوربیک اسید به وسیله O_2^- یا سایر رادیکال‌های
 آزاد اکسیژن و همچنین مصرف آسکوربیک اسید برای
 سنتز زاگزاتین و تولید مجدد آلفا توکوفرول ذکر شده
 است (Iturbe-Ormaeche et al., 1998).

گلو‌تاتیون یک تری‌پتید (آلفا گلو‌تامیل
 سسیستینیل گلیسین) است که در تمام قسمت‌های
 سلول مانند: سیتوسول، کلروپلاست، شبکه
 آندوپلاسمی، واکوئل و میتو‌کندری وجود دارد
 (Abdul Jaleel et al., 2009). گلو‌تاتیون در تنظیم
 مقدار H_2O_2 از طریق چرخه آسکوربات-گلو‌تاتیون و
 چرخه گلو‌تاتیون مؤثر است. علاوه بر این، گلو‌تاتیون
 در بازسازی آسکوربیک اسید (آنتی‌اکسیدان
 غیر آنزیمی) طی چرخه آسکوربات-گلو‌تاتیون نیز
 دارای نقش اساسی است (Abdul Jaleel et al.,
 2009). گلو‌تاتیون به عنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌تواند
 با اکسیژن یکتایی، رادیکال‌های سوپراکسید و
 هیدروکسیل واکنش دهد و به عنوان جاروب‌کننده
 گونه‌های فعال اکسیژن عمل نماید. گلو‌تاتیون می‌تواند
 بسیاری از اجزای سلولی از جمله گروه‌های تیول
 پروتئین‌ها را در برابر تنش اکسیداتیو محافظت نماید.
 گلو‌تاتیون در ثبات بخشیدن به لیپیدها در غشاهای

گونه‌های فعال اکسیژن عامل اصلی پراکسیداسیون
 لیپیدها هستند (Upadhaya and Panda, 2004).
 پراکسیداسیون لیپیدها و تولید مالون دی‌آلدئید و سایر
 آلدئیدها به عنوان شاخصی برای میزان خسارت
 تنش‌های اکسیداتیو به کار می‌رود (Upadhaya and
 Panda, 2004). بیشترین پراکسیداسیون لیپید در گیاهان
 تحت تنش کم آبی و بدون مصرف آسکوربیک اسید
 مشاهده شد. مصرف آسکوربیک اسید، سبب کاهش
 غلظت مالون دی‌آلدئید و سایر آلدئیدها شد (شکل‌های
 ۳ و ۴). اسیدهای چرب و لیپیدها حساسیت زیادی به
 اکسیژن دارند و به سرعت اکسید می‌شوند، از آنجایی
 که غشای سلول، یک غشای فسفولیپیدی است، واکنش
 آن با اکسیژن سبب تخریب غشای سلولی و نشت یون‌ها
 به بیرون از سلول می‌شود. آسکوربیک اسید با از بین
 بردن گونه‌های اکسیژن فعال به طور مستقیم، سبب
 کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی و کاهش
 مقدار مالون دی‌آلدئید و سایر آلدئیدها می‌گردد. این
 نتایج با نتایج Shalata و Neuman (۲۰۰۱) مطابقت
 دارد.

در شرایط تنش اکسیداتیو، آسکوربیک اسید به
 عنوان یک ماده مصرفی در پاک‌سازی گونه‌های فعال
 اکسیژن عمل کرده و در گیاه کاهش می‌یابد. بیشترین
 مقدار آسکوربیک اسید در گیاهان شاهد همراه با
 مصرف آسکوربیک اسید بود و کمترین مقدار
 آسکوربیک اسید در گیاهان تحت تنش بدون مصرف
 آسکوربیک اسید بود. در گیاهان مقاوم به تنش، مقدار
 آسکوربیک اسید درون سلول افزایش می‌یابد ولی در
 گیاهان حساس کاهش می‌یابد. کاهش مواد
 آنتی‌اکسیدان نظیر آسکوربیک اسید در نخود

دو آنتی‌اکسیدان گردید (Younis *et al.*, 2010). علاوه بر نقش آسکوربیک اسید در افزایش قدرت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول، گزارش شده است که آسکوربیک اسید کوفاکتوری مهم برای برخی از آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز هورمون‌هایی نظیر جیبرلین است (Zahoor and Faheem, 2004؛ Kuzniak, 2004). (2009) که این مطلب می‌تواند توضیحی برای بهبود شاخص‌های رشد در گیاهان مورد مطالعه باشد.

به طور کلی، نتایج بررسی حاضر نشان داد که تنش کم آبی موجب تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان آنزیمی گیاه می‌شود. کاربرد آسکوربیک اسید به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی آثار مضر تنش کم آبی و تنش اکسیداتیو حاصل از آن را کاهش داد به طوری که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاهش یافت اما شاخص‌های رشد بهبود پیدا کرد.

سپاسگزاری

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

سلولی و قطع زنجیره پراکسیداسیون لیپیدها نیز نقش دارد (Noctor and Foyer, 1998).

کاهش محتوای گلوکاتایون در نخود (Iturbe-Ormaeche et al., 1998) و *Camellia sinensis* (Upadhaya and Panda 2004) در تنش اسمزی گزارش شده است. Iturbe-Ormaeche و همکاران (۱۹۹۸) در مطالعه روی گیاه نخود، علت کاهش مقدار گلوکاتایون در تنش اسمزی را ناشی از مهار سنتز گلوکاتایون می‌دانند که با مهار سنتز پروتئین در تنش اسمزی مرتبط است. در مطالعه Vasquez-Robinet و همکاران (۲۰۰۸) دلایل افزایش مقاومت به تنش‌هایی نظیر کم آبی و تنش اکسیداتیو، فعال شدن ژن‌های دفاع آنتی‌اکسیدان کلروپلاستی درگیر در سنتز و انتقال گلوکاتایون ذکر شده است.

در پژوهش حاضر، تیمار آسکوربیک اسید موجب افزایش مقدار آسکوربات و گلوکاتایون کل در گیاهان تحت تنش گردید (شکل‌های ۵ و ۶). مشابه با این نتیجه، کاربرد آسکوربیک اسید در گیاهان لوبیای تحت تنش شوری و کم آبی موجب افزایش مقدار این

منابع

- Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H. J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S. and Panneerselvam, R. (2009) Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologia Plantarum* 31: 427-436.
- Afzali, I., Basra, S.M.A., Farooq, 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* 8(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.
- Bartoli, C. G., Simontacchi, M., Tambussi, E., Beltrano, J., Montaldi, E. and Puntarulo, S. (1999) Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* 50(332): 375-383.
- Bartosz, G. (1997) Oxidative stress in plants. *Acta Physiologia Plantarum* 19(1): 47-64.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

- protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 248-254.
- De Pinto, M. C., Francis, D. and Gara, L. (1999) The redox state of ascorbate-dehydroascorbate pairs a specific sensor of cell division in tobacco By-Z cells. *Protoplasma* 209: 90-97.
- Dhindsa, R. S. and Motowe, W. (1981) Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 32: 79-91.
- Fazeli, F., Ghorbanli, M. and Niknam, V. (2007) Effects of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum* 51(1): 98-103.
- Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Griffith, O. W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Annals of Biochemistry* 106: 207-212.
- Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S. and Allen, D. (1993) Over expression of SOD protects plants from oxidative stress, induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase over expressing plants. *Plant Physiology* 103: 1067-1073.
- 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.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. and Buitink, J. (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Plant Science* 6: 431-438.
- Iturbe-Ormaeche, I., Escorredo, P., Arrese-Igor, C. and Becana, M. (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology* 116: 173-181.
- Jain, M., Nandwal, A. S., Kundu, B., Kumar, B., Sheoran, I. S. and Kumar, N. (2006) Water relation, activities of antioxidants, ethylene evolution and membrane integrity of pigeonpea roots as affected by soil moisture. *Biologia Plantarum* 50(2): 303-306.
- Jung, S. (2004) Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science* 166: 459-466.
- 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.
- Meirs, S., Philosophadas, S. and Aharoni, N. (1992) Ethylene increased accumulation of fluorescent lipid peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *Journal of American Society for Horticultural Science* 117:128-132.
- Nakano, Y. and Asado, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22(5): 867-880.
- 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.
- Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wanger, E. D. (1991) Diethylthiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutant Research* 247: 57-64.
- Shaddad, M. A., Radi, A. F., Abd El-Rahman, A. M. and Azzoz, M. M. (1990) Responses of seeds of *Lupinus termis* and *Vicia faba* to the interactive effect of salinity and ascorbic acid or pyridoxine (B6). *Plant and Soil* 122: 177-183.

- 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.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolia* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168: 223-231.
- Upadhyaya, H. and Panda, S. K. (2004) Responses of *Camellia sinensis* to drought and rehydration. *Biologia Plantarum* 48(4): 597-600.
- Upadhyaya, 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.
- Vasquez-Robinet, C., Mane, S. P., Ulanov, A. V., Watkinson, J. I., Stromberg, V. K., Koeyer, D. D., Schafleitner, R., Willmot, D. B., Bonierbale, M., Bohnert, H. J. and Grene, R. (2008) Physiological and molecular adaptation to drought in Andean potato genotypes. *Journal of Experimental Botany* 59(8): 2109-2123.
- Younis, M. E., Hasaneen, M. N. A. and Kazamel, A. M. S. (2010) Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimental effects 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(5): 540-549.

Response of antioxidant system of tomato to water deficit stress and its interaction with ascorbic acid

Fatemeh Daneshmand *

Biology Department, Payame Noor University, 19395-3697 Tehran, I. R. of Iran

Abstract

Environmental stresses including water deficit stress may produce oxidants such as reactive oxygen species that damage the membrane structure in plants. Among the antioxidants, ascorbic acid has a critical role in the cell and scavenges reactive oxygen species. In this research, effects of ascorbic acid at two levels (0 and 10 mM) and water deficit stress based on 3 levels of field capacity (100, 60 and 30%) were studied in tomato plants. Both levels of stress increased lipid peroxidation, reduced the amount of ascorbic acid and glutathione and increased the activity of enzymes superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase, guaiacol peroxidase and reduced the growth parameters. Ascorbic acid treatment, reduced lipid peroxidation, increased ascorbic acid and glutathione levels and decreased the activity of superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione peroxidase and guaiacol peroxidase and positive effects of ascorbic acid treatment appeared to improve the plant growth parameters.

Key words: Ascorbic acid, Oxidative stress, Water deficit stress, Antioxidant defense system

* Corresponding Author: f.daneshmand@yahoo.com