

## Effect of ABA on oxidative stress in *Melissa officinalis* shoot cultures

Seyedeh Mosoumeh Mousavi<sup>1</sup>, Leila Shabani<sup>2\*</sup>, Neda Mirakhorli<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord University, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord University, Iran- Research Institute of Biotechnology, Shahrekord University, Iran

<sup>3</sup> Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Iran

### Abstract

Plant responses to elicitors are the result of a series of highly modulated consecutive changes in hormones or reactive oxygen species (ROS). Abscisic acid (ABA) is a stress hormone that plays a role in the transmission of messages in biotic and abiotic stresses conditions. In the present study, we examined growth index, chlorophylls and carotenoid content, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content, membrane lipid peroxidation, antioxidant enzymes (CAT, GPX, APX and SOD) activity and proline content in *M. officinalis* shoots culture that induced through the use of an elicitor, ABA. Mediums of *M. officinalis* were fed by different concentration of ABA (0, 5, 25, 50 and 100µM) and 7 and 14 day after elicitation, biochemical and physiological parameters were measured in shoot cultures. Growth index of the treated samples, content of chlorophyll a, b and total chlorophyll decreased in all concentrations of ABA compared to the control. Content of carotenoid at 25 and 100µM concentrations of ABA increased compared to the control. ABA elicitor increased the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at all concentration of ABA. Among the measured antioxidant enzymes APX enzyme and SOD enzyme increased at all concentrations of ABA. Content of lipid peroxidation increased only at 100µM concentration of ABA. Content of proline increased at all concentration except at 5µM concentration of ABA. ABA as a signal transmitter molecule seems to play an important role in the production of hydrogen peroxide and the production of antioxidant defense proteins such as catalase and peroxidases in shoot cultures of *M. officinalis*.

**Keywords:** Abscisic acid, Antioxidant, Elicitor, Lipid peroxidation, *M. officinalis*

---

\* Corresponding Author: lshabani@gmail.com

## تأثیر آبسیزیک اسید بر تنش اکسیداتیو در کشت‌های ساقه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*)

سیده معصومه موسوی<sup>۱</sup>، لیلا شبانی<sup>۲\*</sup>، ندا میرآخوری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران

<sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران- پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه شهرکرد، ایران

<sup>۳</sup>گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، ایران

### چکیده

پاسخ‌های گیاهان به محرک‌ها نتیجه تعدادی تغییرات متوالی تنظیم شده در میزان هورمون‌ها و گونه‌های فعال واکنشی (ROS) است. فیتوهورمون آبسیزیک اسید، عامل انتقال پیام در شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده است. در پژوهش حاضر، شاخص رشد، میزان کلروفیل‌ها و کاروتنوئید، میزان  $H_2O_2$ ، میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشا، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) و میزان پرولین در کشت‌های ساقه *M. officinalis* تیمار شده با محرک آبسیزیک اسید بررسی شد. محیط کشت ساقه‌های *M. officinalis* با غلظت‌های متفاوت آبسیزیک اسید (صفر، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) تغذیه و پس از گذشت ۷ و ۱۴ روز از تیمار، شاخص‌های مدنظر در کشت‌های ساقه اندازه‌گیری شدند. شاخص رشد نمونه‌های تیمار شده در تمام غلظت‌های آبسیزیک اسید نسبت به نمونه شاهد کاهش نشان داد. میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل نیز در تمام غلظت‌های آبسیزیک اسید نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. میزان کاروتنوئید در غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میکرومولار آبسیزیک اسید نسبت به شاهد افزایش یافت. آبسیزیک اسید باعث افزایش میزان  $H_2O_2$  در تمام غلظت‌های آبسیزیک اسید نسبت به نمونه شاهد شد. از میان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اندازه‌گیری شده، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در تمام غلظت‌ها افزایش یافت. میزان پراکسیداسیون لیپید غشا تنها در غلظت ۱۰۰ میکرومولار آبسیزیک اسید نسبت به شاهد افزایش یافت. میزان پرولین در تمام غلظت‌ها به‌جز غلظت ۵ میکرومولار آبسیزیک اسید نسبت به شاهد افزایش نشان داد؛ بنابراین به نظر می‌رسد آبسیزیک اسید به‌عنوان مولکول انتقال پیام، نقش مهمی در تولید پراکسید هیدروژن و پروتئین‌های دفاعی نظیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیدازها در ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه دارد.

**واژه‌های کلیدی:** آبسیزیک اسید، آنتی‌اکسیدان، الیستور، بادرنجبویه، پراکسیداسیون لیپید

\* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: dshabani@gmail.com شماره تماس: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۱۹

## مقدمه

پروکسیل ( $RO_2^{\cdot}$ ) در مقادیر مختلف و به‌واسطهٔ متابولیسم طبیعی در همهٔ گیاهان تولید می‌شوند؛ ولی افزایش و تجمع بیش از حد آنها به تنش و آسیب اکسیداتیو منجر می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن سبب آسیب به بسیاری از ساختارهای سلولی و ماکرومولکول‌ها نظیر لیپیدها، نوکلئیک‌اسیدها (DNA و RNA) و پروتئین‌ها می‌شوند که تغییر ساختار یا فعالیت یا تخریب آنها را در پی دارد. پراکسیداسیون لیپیدها که فرایندی طبیعی طی متابولیسم سلول‌های گیاهی است، در نتیجهٔ آسیب‌های اکسیداتیو تشدید می‌شود. آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو ممکن است به تجزیه و تخریب بسیاری از متابولیت‌های سلولی منجر شوند. حملهٔ گونه‌های فعال اکسیژن به لیپیدهای غشای پلاسمایی سلول‌ها آثار مخربی بر ساختار، سیالیت و نفوذپذیری غشای سلولی دارد. تأثیر گونه‌های فعال اکسیژن بر پروتئین‌ها به تغییر زنجیره‌های جانبی، آمینواسیدها، اکسیداسیون پیوندهای دی‌سولفیدی و رسوب پروتئین‌ها منجر می‌شود (Rotilio *et al.*, 1995). مشخص شده است  $H_2O_2$  آنزیم‌های چرخهٔ کالوین را غیرفعال می‌کند و رادیکال سوپراکسید از طریق واکنش مستقیم با برخی از آنزیم‌ها سبب غیرفعال شدن آنها می‌شود (Nakano and Asada, 1987). انفجار اکسیداتیو یا تولید سریع و انباشتگی گونه‌های فعال اکسیژن پاسخی است که گیاهان به تغییر شرایط و عوامل محیطی می‌دهند (Asada, 2006). به‌منظور کاهش آسیب‌های اکسیداتیو وارده در اثر تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن، سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تعبیه شده‌اند که سعی در

محرک‌ها، مولکول‌هایی با وزن مولکولی کم هستند که باعث تحریک پاسخ‌های دفاعی در گیاهان می‌شوند؛ این مواد تا حد زیادی از نظر نوع و ساختار تفاوت دارند و مواد شیمیایی یا عوامل زیستی مختلفی را شامل می‌شوند که تغییرات فیزیولوژیک و تجمع فیتوالکسین‌ها (Phytoalexin) را القا می‌کنند (Zhao *et al.*, 2005). پاسخ‌های گیاهان به محرک‌ها، نتیجهٔ تعدادی تغییرات متوالی تنظیم‌شده در میزان هورمون‌ها یا گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است.

آبسزیک‌اسید (ABA)، هورمونی تنشی است که شبکه‌های پیچیدهٔ پاسخ به تنش را هماهنگ و محتوای آن به‌سرعت در پاسخ به تنش تغییر می‌کند. فیتوهورمون آبسزیک‌اسید، عامل انتقال پیام در شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده است؛ همچنین اهمیت بسیاری در فرایندهای مهم فیزیولوژیک از جمله تنظیم دورهٔ خواب بذر و کنترل بیان ژن‌ها در مراحل مختلف نمو دارد. تجمع آبسزیک‌اسید در بافت‌های مختلف گیاه در اثر تنش‌های زنده و غیرزنده نظیر خشکی، شوری، سرما، تاریکی و عوامل بیماری‌زا، نقش انکارناپذیر آن را به‌عنوان عامل انتقال پیام تأیید می‌کند (Hare *et al.*, 1999)؛ اگرچه سازوکار دقیق این نقش کاملاً روشن نیست، شواهد پژوهشی نشان می‌دهند آبسزیک‌اسید چنین نقشی را از طریق تنظیم غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایفا می‌کند (Pei *et al.*, 2000).

گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های سوپراکسید ( $O_2^{\cdot-}$ )، هیدروکسیل ( $OH^{\cdot}$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، اکسیژن یگانه ( $O_2^{\cdot}$ ) و

ایجاد تغییرات متابولیک سلولی سبب افزایش سطح رادیکال‌های اکسیژن می‌شود و در پی آن، فعالیت سیستم دفاع آنزیمی افزایش می‌یابد (Guan *et al.*, 2000).

گیاه دارویی بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) تعلق دارد و در زمینه‌های مختلف پزشکی، غذایی، عطرسازی و آرایشی استفاده می‌شود. رایج‌ترین ویژگی‌های درمانی بادرنجبویه عبارتند از: آرام‌بخشی، آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتری، ضدویروس، ضدالتهاب، ضدحساسیت و ضدرماتیسم و ... برگ‌های این گیاه ترکیبات پل فنولیک نظیر رزمارینیک اسید و ترکیبات فلاونوئیدی دارند. رزمارینیک اسید خاصیت آنتی‌اکسیدانی زیادی دارد و ارزش غذایی و سیستم دفاعی گیاه را افزایش می‌دهد. باتوجه به اینکه آبسیزیک اسید در القای فرایند سیستم دفاعی و آنتی‌اکسیدانی گیاه نقش دارد و تاکنون نقش آن در گیاه بادرنجبویه بررسی نشده است، مطالعه حاضر با هدف تعیین نقش آبسیزیک اسید بر تنش اکسیداتیو ساقه‌های کشت شده در شرایط *in vitro* بادرنجبویه انجام شد.

### مواد و روش‌ها

**کشت بذرهاى بادرنجبویه *M. officinalis*:**  
بذرهاى گیاه بادرنجبویه (تهیه شده از شرکت پاکان بذر، اصفهان) دو تا سه بار در آب مقطر شستشو و حدود ۲۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و ۸ دقیقه در آب ژاول ۲۰ درصد قرار داده شدند. آب ژاول در دستگاه لامینار ایرفلو خالی شد و بذرها چندین بار با

کنترل سطح گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط طبیعی و همچنین در شرایط تنش‌زای محیطی دارند؛ این سیستم‌ها دو بخش آنزیمی و غیرآنزیمی دارند (Moran *et al.*, 1994).

مطالعه Guan و همکاران (۲۰۰۰) گویای افزایش پراکسید هیدروژن در تیمار آبسیزیک اسید است. کاربرد آبسیزیک اسید به تشدید فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی و افزایش غلظت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مس- روی و آهن (Kaminaka *et al.*, 1999) و سوپراکسید دیسموتاز منگنز (Bueno *et al.*, 1998) منجر می‌شود؛ همچنین محلول‌پاشی آبسیزیک اسید به افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوریک اسید پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز در بافت‌های گیاهی منجر می‌شود (Gong *et al.*, 1998; Bellaire *et al.*, 2000). نتایج برخی از مطالعه‌ها نشان می‌دهند آبسیزیک اسید به عنوان مولکول انتقال پیام، نقش مهمی در تولید پراکسید هیدروژن، بیان ژن‌ها و فرایند تولید پروتئین‌های دفاعی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوریک اسید پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز دارد (Kaminaka *et al.*, 1999; Bellaire *et al.*, 2000; Guan *et al.*, 2000). بر این اساس، به نظر می‌رسد آبسیزیک اسید در القای فرایند سیستم دفاعی و آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی دارد. اگرچه شواهد نشان می‌دهند آبسیزیک اسید و رادیکال‌های فعال اکسیژن به عنوان عوامل ثانویه در فرایندهای مهم سلولی دخالت دارند، نوع ارتباط آنها به روشنی تعیین نشده است؛ با وجود این، به نظر می‌رسد آبسیزیک اسید با

آزمایش در فریزر منفی ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت دو هفته (پایان زمان آزمایش)، نمونه‌برداری برای تجزیه و تحلیل رشد، میزان رنگیزه‌ها و میزان پرولین انجام شد و نمونه‌ها تا انجام آزمایش در فریزر منفی ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند.

**تجزیه و تحلیل رشد:** پیش از قراردادن ساقه‌ها در محیط کشت MS، وزن تر اولیهٔ آنها یادداشت شد. پس از اتمام مدت زمان تیمار آبسزیک‌اسید، گیاهان از محیط کشت خارج شدند و پس از خشک کردن آب اضافی آنها روی کاغذ صافی، وزن تر ثانویهٔ نمونه‌ها با ترازوی آزمایشگاهی سه رقم اعشار بر حسب گرم اندازه‌گیری شد. به منظور محاسبهٔ شاخص رشد نسبی ساقه‌ها، وزن تر ساقه‌های تیمار شده با آبسزیک‌اسید بر وزن تر ساقه‌های شاهد تقسیم شد.

#### سنجش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی:

اندازه‌گیری کلروفیل به روش Arnon (۱۹۴۹) و کاروتنوئید به روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام شد. ابتدا ۰/۰۵ گرم از بافت تازهٔ برگ و وزن و سپس با استفاده از حلال استون ۸۰ درصد درون هاون چینی و روی یخ ساییده شد. حجم عصارهٔ به دست آمده با استون ۸۰ درصد به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد؛ سپس عصارهٔ حاصل به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و بی‌درنگ مقداری از عصاره به کوت منتقل و جذب محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 6300، شرکت GENWAY، انگلیس) در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد.

آب مقطر استریل شستشو شدند. تعداد ۶ بذر در محیط کشت 1/2MS با اسیدیتهٔ ۵/۷، ۸ گرم در لیتر آگار، ۱۳ گرم در لیتر ساکارز و بدون هورمون کشت شدند و ظروف کشت به دستگاه اتافک رشد (Binder، آلمان) با شرایط ۸ ساعت تاریکی، ۱۶ ساعت روشنایی و دمای  $25 \pm 2$  درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند. هشت روز بعد، بذرهای شروع به جوانه‌زنی کردند و گیاهچه‌ها به مدت دو ماه در دستگاه اتافک رشد نگهداری شدند. گیاهچه‌های دو ماههٔ رشد یافته در شرایط *in vitro* برای انجام آزمایش انتخاب شدند؛ به این ترتیب که گیاهچه‌ها در دستگاه لامینار ایرفلو از محیط کشت خارج و ریشه‌های آنها جدا شدند. ساقه‌های دارای دو گره با وزن ۱ گرم به ارلن‌های حاوی محیط کشت 1/2MS مایع با غلظت‌های مختلف آبسزیک‌اسید منتقل شدند (طراحی آزمایش برگرفته از Lattanzio et al., 2009). با مطالعهٔ مقاله‌هایی مانند Gagne و همکاران (۲۰۱۱) و انجام یک آزمایش ابتدایی، غلظت‌های صفر، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آبسزیک‌اسید برای انجام آزمایش انتخاب شدند. تعداد ۱۵ ارلن حاوی محیط کشت 1/2MS مایع تهیه شدند و سپس ارلن‌ها به مدت دو هفته در دستگاه شیکر انکوباتور (LabTech، کرهٔ جنوبی) با دور ۸۰ دور در دقیقه و دمای  $25 \pm 2$  درجهٔ سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت یک هفته از کشت ساقه‌های بادرنجوبیه، نمونه‌برداری به منظور اندازه‌گیری میزان  $H_2O_2$ ، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و میزان مالون‌دی‌آلدئید انجام شد و نمونه‌ها تا انجام

بوتیله شده به آن اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۲ تا ۹۳ درجه سانتی گراد قرار داده شد؛ سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ گذاشته شدند و جذب آنها در ۵۳۲ نانومتر خوانده شد (Ertan et al., 2002).

**سنجش میزان پرولین:** اندازه‌گیری میزان پرولین به روش Troll و Lindsley (۱۹۵۵) انجام شد. ابتدا ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاه در هاون سرد شده با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد ساییده شد. عصاره حاصل پس از قرار گرفتن به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد، ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۲۵ میکرو لیتر از محلول رویی با ۴۷۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ درصد و ۱ میلی لیتر مخلوط واکنش (۱۵ میلی لیتر استیک اسید، ۵ میلی لیتر اتانول ۱۰۰ درصد، ۰/۲۵ گرم نین هیدرین و ۵ میلی لیتر آب مقطر که دور از نور نگهداری شد) رقیق و محلول حاصل برای سنجش میزان پرولین استفاده شد. برای تهیه منحنی استاندارد پرولین، غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی مولار پرولین تهیه و مانند عصاره‌ها رقیق شدند؛ سپس عصاره‌ها و استانداردها به مدت ۱ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، عصاره‌ها و استانداردها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم قرار گرفتند و سپس جذب نوری آنها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد.

**سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان:** به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها، ۰/۰۵ گرم بافت تازه برگ‌های شاهد و تیمار شده پس از

**سنجش میزان  $H_2O_2$ :** به منظور اندازه‌گیری  $H_2O_2$  از روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. برای عصاره‌گیری، ۰/۰۵ گرم بافت فریز شده برگ با ۰/۷۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد در هاون سرد شده ساییده شد. عصاره تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. برای به دست آوردن منحنی استاندارد  $H_2O_2$ ، رقت‌های صفر، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی مولار تهیه شدند. ۵۰۰ میکرو لیتر از استانداردها و عصاره‌ها با ۵۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (اسیدیته ۷) و ۱ میلی لیتر محلول دیدیتاسیم ۱ مولار ترکیب شد و جذب نوری آن در ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. بر اساس منحنی استاندارد پراکسید هیدروژن، غلظت  $H_2O_2$  در نمونه‌ها بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد. محلول TCA ۰/۱ درصد به عنوان بلانک استفاده شد.

**سنجش مالون دی‌آلدئید در کل برگ:** ۰/۱ گرم از بافت فریز شده برگ وزن و درون هاون قرار داده شد و ۲ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد به آن اضافه شد. بافت‌های عصاره‌گیری شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند؛ سپس ۱ میلی لیتر از محلول حاوی تیوباربتوریک اسید - تری کلرواستیک اسید - هیدروکلریک اسید به آنها اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند؛ پس از اینکه نمونه‌ها ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند، ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند؛ مایع رویی به فالكون جدید منتقل و ۱۰ میکرو لیتر هیدروکسی تولوئن

میلی مولار، محلول ۰/۲ میلی مولار EDAT و محلول ۲۵۰ میلی مولار  $H_2O_2$  بود.

**فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: سنجش**  
فعالیت این آنزیم به روش Fridovich و Beyer (۱۹۸۷) انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (اسیدیته ۷/۸)، متیونین (۹/۹ میلی مولار)، تربیتون X-100 (۰/۲۵)، درصد، نیتروبلوترازولیوم (۷۵ میکرومولار) و ۲۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیم به همراه ۱۰ میکرولیتر ریبوفلاوین (۰/۰۴ درصد) بود. افزایش جذب به واسطهٔ تشکیل فورمازان در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد.

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شدند. پنج غلظت آبسیزیک اسید (صفر، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به عنوان تیمار در نظر گرفته شدند. تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SAS انجام و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنادار (LSD) ( $P < 0.05$ ) مشخص شد. نمودارها با نرم افزار Excel رسم شدند.

### نتایج

گیاهچه‌های *M. officinalis* در شرایط *in vitro* و در پنج سطح از غلظت‌های آبسیزیک اسید (صفر، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) قرار گرفتند (شکل ۱). مطابق جدول ۱، آبسیزیک اسید در تمام غلظت‌ها شاخص رشد نسبی ساقه‌ها را به طور معناداری کاهش داد و بیشترین کاهش رشد در غلظت ۱۰۰ میکرومولار آبسیزیک اسید مشاهده شد.

وزن شدن درون هاون چینی از پیش سرد شده قرار داده شد و برای استخراج پروتئین محلول از بافت‌ها، ۰/۷۵ میلی لیتر محلول بافر عصاره‌گیری سالین فسفات با اسیدیته ۷/۸ به تدریج به آن افزوده شد. عصاره‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند؛ محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شد. مطالعه‌های کمی با اسپکتروفتومتر (مدل Ultrospec 3100، شرکت GE Healthcare Life Sciences، آمریکا) انجام شدند.

**فعالیت آنزیم کاتالاز: یک واحد از فعالیت**  
آنزیم کاتالاز بر اساس سرعت مصرف یک میکرومول در دقیقه آب‌اکسیژنه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از روش (Aebi, 1984) بیان شد.

**فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: اندازه‌گیری**  
فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز مطابق روش Lin و Kao (۱۹۹۹) انجام شد. یک واحد فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیمی تعریف شد که باعث تشکیل ۱ میکرومولار تتراگایاکول در دقیقه می‌شود. کینتیک جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد.

**فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: فعالیت**  
آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش Nakano و Asada (۱۹۸۷) در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷، آسکوربیک اسید ۰/۵



شکل ۱- تأثیر غلظت های متفاوت آبسزیک اسید بر ساقه های کشت شده گیاه بادرنجویه در شرایط *in vitro*

جدول ۱- تأثیر غلظت های مختلف آبسزیک اسید بر شاخص رشد نسبی، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید

ساقه های کشت شده بادرنجویه

تیمار	شاخص رشد نسبی ساقه ها	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر)
شاهد	100 ± 0 <sup>a</sup>	1/06 ± 0/05 <sup>a</sup>	0/69 ± 0/05 <sup>a</sup>	1/76 ± 0/02 <sup>a</sup>	0/05 ± 0/002 <sup>bc</sup>
ABA 5	74/33 ± 5/8 <sup>b</sup>	0/79 ± 0/12 <sup>b</sup>	0/39 ± 0/09 <sup>b</sup>	1/19 ± 0/22 <sup>b</sup>	0/03 ± 0/002 <sup>c</sup>
ABA 25	72/22 ± 9/3 <sup>b</sup>	0/58 ± 0/18 <sup>bc</sup>	0/3 ± 0/09 <sup>b</sup>	0/89 ± 0/17 <sup>b</sup>	0/08 ± 0/004 <sup>a</sup>
ABA 50	60/88 ± 4/7 <sup>bc</sup>	0/57 ± 0/16 <sup>bc</sup>	0/44 ± 0/09 <sup>b</sup>	1/09 ± 0/25 <sup>b</sup>	0/07 ± 0/01 <sup>ab</sup>
ABA 100	51/66 ± 8/4 <sup>c</sup>	0/52 ± 0/01 <sup>c</sup>	0/34 ± 0/04 <sup>b</sup>	0/86 ± 0/06 <sup>b</sup>	0/08 ± 0/007 <sup>a</sup>

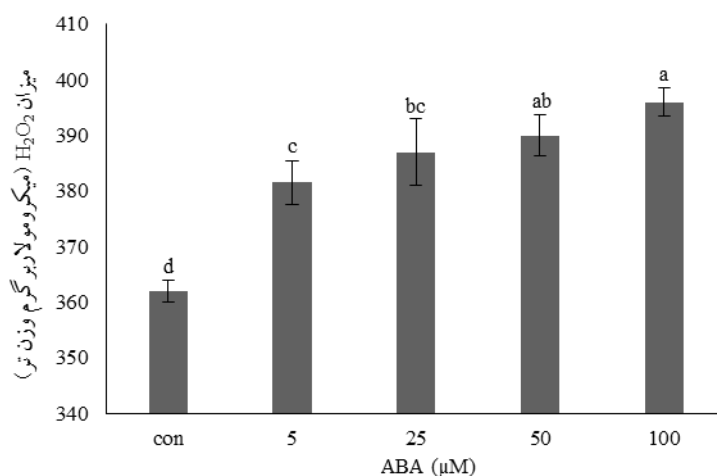
در غلظت 100 میکرومولار آبسزیک اسید نسبت به شاهد افزایش یافت. نتایج شکل 4 نشان می دهند غلظت های 25، 50 و 100 میکرومولار آبسزیک اسید مقدار پرولین گیاه را در مقایسه با شاهد افزایش دادند. تأثیر غلظت های مختلف آبسزیک اسید بر فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت های 50 و 100 میکرومولار معنادار بود. طبق شکل 5، A افزایش نه برابری فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت 50 میکرومولار نسبت به شاهد مشاهده شد؛ اما در غلظت های 5 و 25 میکرومولار آبسزیک اسید تفاوت معناداری نسبت به شاهد دیده نشد. تأثیر غلظت های مختلف آبسزیک اسید بر

مطابق نتایج جدول 1، تیمار 100 میکرومولار آبسزیک اسید به کاهش معنادار کلروفیل a به میزان 2/04 برابر در مقایسه با شاهد منجر شد. میزان کلروفیل b و کلروفیل کل نیز با افزایش غلظت آبسزیک اسید روند رو به کاهش را نشان دادند. بیشترین مقدار کاروتنوئید در غلظت های 25، 50 و 100 میکرومولار آبسزیک اسید مشاهده شد؛ هرچند این افزایش معنادار نبود. میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در تیمار ساقه ها با 5، 25، 50 و 100 میکرومولار آبسزیک اسید به ترتیب 9/39، 7/73، 6/90 و 5/38 درصد نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل 2). بر اساس نتایج شکل 3، میزان پراکسیداسیون لیپید فقط

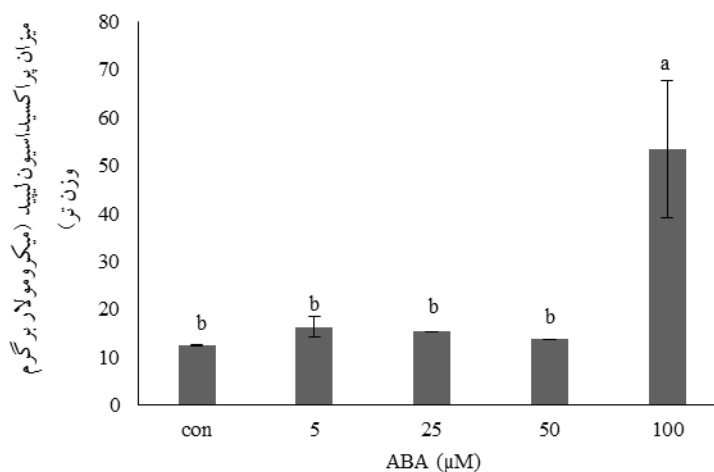


میزان فعالیت این آنزیم در تمام غلظت‌های آبسیزیک‌اسید نسبت به شاهد افزایش نشان داد. تأثیر غلظت‌های مختلف آبسیزیک‌اسید بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معنادار بود؛ طبق شکل ۵، D آبسیزیک‌اسید سبب افزایش فعالیت این آنزیم در تمام غلظت‌ها نسبت به نمونهٔ شاهد شد.

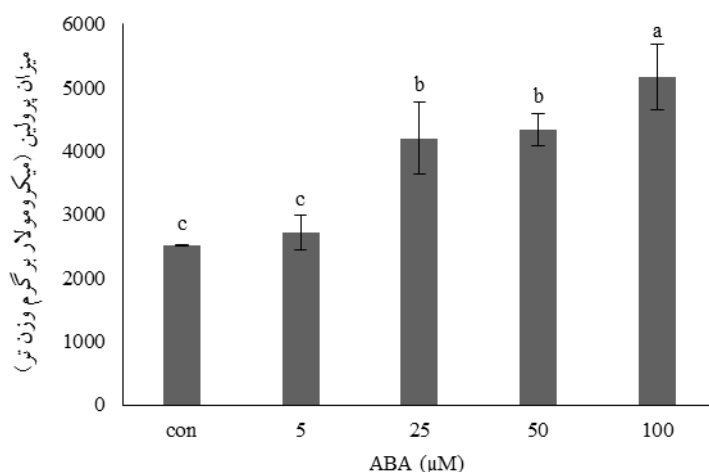
فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز معنادار بود؛ طبق شکل ۵، B در غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آبسیزیک‌اسید میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب ۴۹/۵۲، ۴۸/۳۲، ۲۵/۲۲ و ۱۳/۷۴ درصد کاهش یافت. تأثیر غلظت‌های مختلف آبسیزیک‌اسید بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز معنادار بود؛ طبق شکل ۵، C



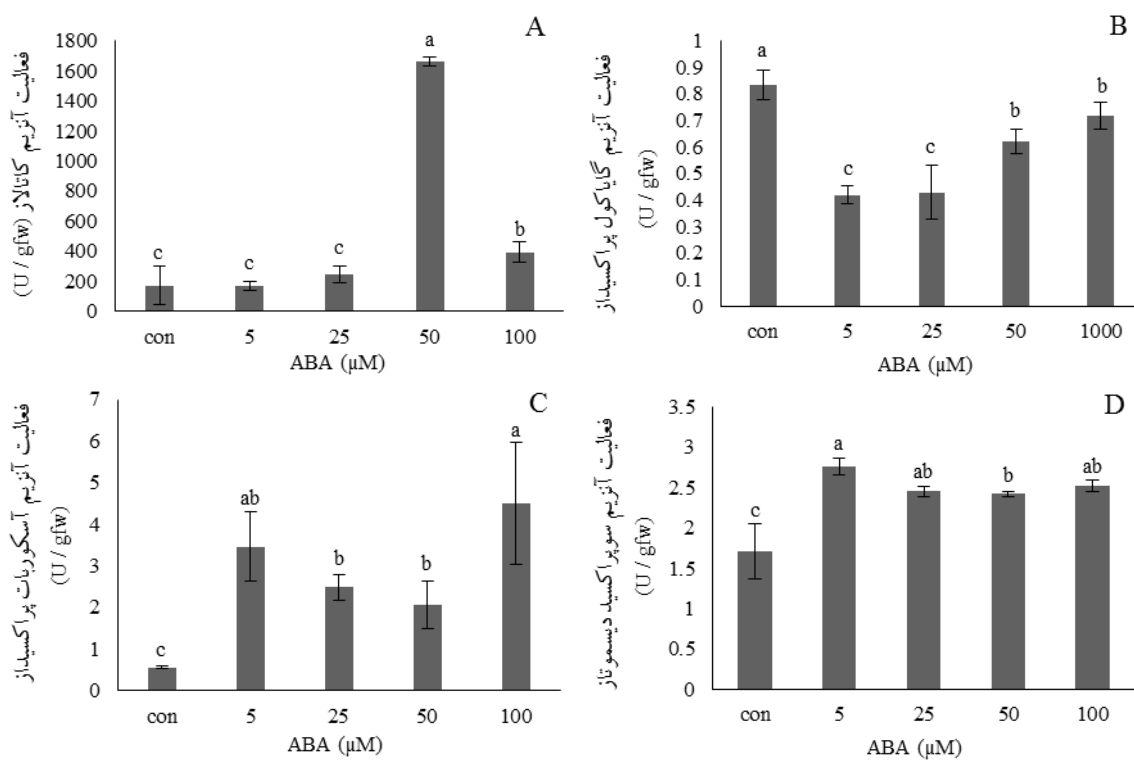
شکل ۲- تأثیر غلظت‌های متفاوت آبسیزیک‌اسید بر میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ساقه‌های کشت شدهٔ *M. officinalis*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE و حروف یکسان بیان‌کنندهٔ عدم‌اختلاف معنادار با استفاده از آزمون LSD هستند.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های متفاوت آبسیزیک‌اسید بر میزان پراکسیداسیون لیپید در ساقه‌های کشت شدهٔ *M. officinalis*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE و حروف یکسان بیان‌کنندهٔ عدم‌اختلاف معنادار با استفاده از آزمون LSD هستند.



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های متفاوت آبسزیک اسید بر میزان پرولین ساقه‌های کشت‌شده *M. officinalis*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار  $\pm$ SE و حروف یکسان بیان‌کننده عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون LSD هستند.



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های متفاوت آبسزیک اسید بر فعالیت آنزیم کاتالاز (A)، گایاکول پراکسیداز (B)، آسکوربات پراکسیداز (C) و سوپراکسید دیسموتاز (D) در ساقه‌های کشت‌شده *M. officinalis*. مقادیر، میانگین ۳ تکرار  $\pm$ SE و حروف یکسان بیان‌کننده عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون LSD است.

## بحث

افزایش میزان کاروتنوئید در ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه می‌شود (جدول ۱). آبسزیک اسید به افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز،

نتایج پژوهش حاضر نشان دادند آبسزیک اسید سبب کاهش شاخص رشد، میزان کلروفیل‌ها و

Dongfeng و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند با تیمار آبسیزیک‌اسید (۲۰۰ میکرومولار) در کشت ریشهٔ موئینهٔ *Salvia miltiorrhiza*، رشد گیاه کاهش می‌یابد.

در پژوهش حاضر، آبسیزیک‌اسید سبب کاهش وزن تر شد؛ به طوری که در غلظت ۱۰۰ میکرومولار آبسیزیک‌اسید، بیشترین کاهش وزن تر (۴۸/۴۸ درصد) در مقایسه با شاهد مشاهده شد. کاهش وزن تر مشاهده شده در تمام غلظت‌های آبسیزیک‌اسید احتمالاً به علت کاهش رشد ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است؛ در پژوهش حاضر، همبستگی منفی و معنادار ( $R^2=0/96$ ) میان وزن تر و تجمع  $H_2O_2$  مشاهده شد.

مطابق شکل ۳، میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل با افزایش غلظت آبسیزیک‌اسید روند کاهشی نشان دادند؛ به طوری که بیشترین کاهش میزان کلروفیل a در غلظت ۱۰۰ میکرومولار آبسیزیک‌اسید مشاهده شد؛ ولی با افزایش غلظت آبسیزیک‌اسید، میزان کاروتنوئید در غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میکرومولار تیمار افزایش یافت.

کلروفیل نقش مهم و اثرگذاری در زندگی گیاهان عالی دارد و از آنجاکه تجزیهٔ کلروفیل و کاروتنوئید پاسخی عمومی به تنش است، می‌توان نتیجه گرفت تغییرات میزان کلروفیل و کاروتنوئید و نسبت رنگیزه‌ها شاخص مهم تنش محیطی هستند و تحمل گونه‌ها به تنش را توصیف می‌کنند. یکی از نشانه‌های رایج تنش اکسیداتیو، کاهش محتوای رنگیزه‌هاست که نتیجهٔ سنتز کندتر یا تجزیهٔ سریع‌تر آنهاست (Smirnov, 1993). باتوجه به اینکه هر دو شاخص کلروفیل و پرولین از پیش مادهٔ گلوتامات

آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاهش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ساقه‌های کشت شدهٔ بادرنجبویه منجر می‌شود (شکل ۵) که با افزایش میزان پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپید ساقه‌ها مطابقت دارد (شکل‌های ۲ و ۳)؛ همچنین تیمار آبسیزیک‌اسید سبب افزایش مقدار پرولین در کشت‌های ساقه می‌شود (شکل ۴).

القای تنش اکسیداتیو در گیاهان در معرض تنش به افزایش انباشته شدن گونه‌های فعال اکسیژن به ویژه  $H_2O_2$  و  $O_2^-$  در کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها و پراکسیزوم‌ها منجر می‌شود؛ این رادیکال‌های آزاد اکسیژن مسئول بیشتر آسیب‌های اکسیداتیو شامل شکسته شدن DNA، پراکسیداسیون لیپید، اکسیداسیون آمینو اسید و پروتئین در سیستم‌های زیستی هستند و در نتیجه سبب اختلال در متابولیسم طبیعی سلول، اختلال در فرایندهای مهم تنفس و فتوسنتز و کاهش رشد می‌شوند (Mishra et al., 2006)؛ همچنین توسعهٔ سلول‌ها و به دنبال آن، رشد و باروری گیاهان را کاهش می‌دهند و در ادامه سبب تجمع آبسیزیک‌اسید و افزایش اسمولیت‌هایی مانند پرولین می‌شوند.

آبسیزیک‌اسید، هورمونی است که تولید آن در گیاهان طی رویارویی با تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد. این هورمون با افزایش نسبت ریشه به اندام هوایی و جذب بهتر آب در شرایط کمبود، تحمل به تنش خشکی را بهبود می‌بخشد. Maleki و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی گیاه زعفران نشان دادند با تیمار غلظت ۱ میلی‌مولار آبسیزیک‌اسید، ارتفاع اندام هوایی و تعداد برگ کاهش می‌یابد؛ در حالی که اعمال این تیمار موجب افزایش طول ریشه می‌شود.

غلظت آبسیزیک اسید (صفر، ۵۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار) افزایش نشان می‌دهد. طبق گزارش Zhang و Jiang (۲۰۰۱)، آبسیزیک اسید به میزان درخور توجهی محتوای کلروفیل و کاروتنوئید را در برگ‌های نهال ذرت افزایش می‌دهد.

در پژوهش حاضر، کاهش محتوای کلروفیل ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه در تیمار با آبسیزیک اسید پاسخی به شرایط تنش است که ممکن است به علت کاهش وزن تر یا ستنز کندتر، تجزیه سریع‌تر این رنگیزه یا نقص در سیستم فتوسنتزی طی تیمار آبسیزیک اسید رخ دهد. از سوی دیگر، باتوجه به شکل ۴ مشاهده می‌شود در تیمار آبسیزیک اسید، میزان پرولین افزایش می‌یابد؛ بنابراین احتمال دارد علت دیگر کاهش محتوای کلروفیل‌ها، افزایش میزان پرولین باشد. در پژوهش حاضر، همبستگی منفی و معناداری ( $R^2=0/83$ ) میان میزان کلروفیل و تجمع پرولین مشاهده شد.

طبق نتایج پژوهش حاضر (شکل ۲)، میزان  $H_2O_2$  در تمام غلظت‌های آبسیزیک اسید نسبت به شاهد افزایش نشان می‌دهد. یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاه در معرض تنش ایجاد می‌شود، تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است که محصول اجتناب‌ناپذیر متابولیسم طبیعی سلول هستند. این رادیکال‌ها تنش ثانویه اکسیداتیو را از طریق پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه تخریب غشا، تخریب پروتئین‌ها، غیرفعال کردن آنزیم‌ها، از بین بردن رنگیزه‌ها و اختلال در عملکرد DNA ایجاد می‌کنند که خسارت‌های جدی به ساختارهای سلولی و گیاه را در پی دارد (Sandalio et al., 2001).  $H_2O_2$  در گیاهان ممکن است از دو مسیر احتمالی تولید شود:

ساخته می‌شوند، می‌توان گفت افزایش ستنز پرولین طی تنش‌ها به کاهش ستنز کلروفیل منجر می‌شود (Rabiei, 2003). Amirian و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند میزان کلروفیل a با کاربرد ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۲/۵ مولار آبسیزیک اسید در دو تیمار آبسیزیک اسید و شاهد گیاه *Sporobolus stapfianus*، کاهش ۲۰ درصدی کلروفیل a توسط آبسیزیک اسید را نشان می‌دهد.

اگرچه با افزایش غلظت تیمار آبسیزیک اسید، میزان کاروتنوئید در گیاهچه‌های *M. officinalis* افزایش یافت (جدول ۱)، این افزایش معنادار نبود؛ به طوری که بیشترین میزان کاروتنوئید در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آبسیزیک اسید مشاهده شد.

کاروتنوئید در چند سطح باعث حفاظت سیستم فتوسنتزی در برابر فوتون‌های اضافی نور و تنش اکسیداتیو می‌شود که از جمله آنها می‌توان به واکنش کاروتنوئید با کلروفیل برانگیخته به منظور ممانعت از تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن اشاره کرد؛ در حقیقت، کاروتنوئیدها در برابر تنش اکسیداتیو القا می‌شوند و به عنوان سیستم حفاظتی از بین می‌روند.

طبق گزارش Gu و همکاران (۲۰۱۰)، با کاربرد غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام آبسیزیک اسید در کاهو هیچ تفاوت معناداری در میزان کلروفیل کل و کلروفیل a نسبت به شاهد دیده نمی‌شود، ولی میزان کلروفیل b و کاروتنوئید کل نسبت به شاهد افزایش درخور توجهی نشان می‌دهد. Navabpour (۲۰۱۲) گزارش کرد در برگ جو زراعی تیمار شده با آبسیزیک اسید، میزان کاروتنوئید در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ساعت پس از محلول‌پاشی با افزایش

انتقال الکترون) و ترکیب‌شدن آن با اکسیژن مولکولی به تولید بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن در مقایسه با نمونه شاهد منجر شد و در نتیجه، میزان آن افزایش یافت.

نتایج پژوهش حاضر (طبق شکل ۳) افزایش چشمگیر میزان پراکسیداسیون لیپید را تنها در تیمار ۱۰۰ میکرومولار آبسیزیک‌اسید نسبت به شاهد نشان می‌دهند. در شرایط تنش‌زا، فرایندهای مخرب غشا فعال و به پراکسیداسیون لیپیدهای غشا منجر می‌شوند؛ برای نمونه، رادیکال‌های آزاد تنش اکسیداتیو حاصل از شرایط محیطی نامناسب باعث آسیب‌رساندن به لیپیدها و اسیدهای چرب غشایی می‌شوند و رادیکال‌های لیپید و پراکسی و هیدروکسی پراکسی تولید می‌کنند. رادیکال‌های جدید تولیدشده واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها را تسریع می‌کنند. مالون‌دی‌آلدئید شاخص مناسبی برای پراکسیداسیون لیپید غشا محسوب می‌شود. Moraghebi و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند گیاهچه‌های ذرت تیمار شده با آبسیزیک‌اسید به‌طور معناداری سطح MDA کمتری نسبت به تیمارهای بدون آبسیزیک‌اسید دارند؛ همچنین کلسیم کلرید همراه آبسیزیک‌اسید موجب تخفیف تنش گرما و کاهش مقدار MDA در گیاهچه‌ها در مقایسه با تیمار آبسیزیک‌اسید می‌شود.

در پژوهش حاضر، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا تنها در غلظت ۱۰۰ میکرومولار آبسیزیک‌اسید نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت که این مشاهده باتوجه‌به افزایش  $H_2O_2$  در تمام غلظت‌های آبسیزیک‌اسید قابل توجیه است. در حقیقت، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا به‌واسطهٔ تولید

دیسموتاسیون  $O_2^{\cdot -}$  توسط SOD و از طریق اکسیدازهایی مانند NADPH اکسیداز، آمین‌اکسیداز، اگزالات‌اکسیداز و اکسیدازهای حاوی فلاوین (Jajic *et al.*, 2015). مدت‌هاست نقش  $H_2O_2$  در آسیب القاشده توسط تنش مشخص شده است، اما امروزه به‌طور کلی پذیرفته شده است  $H_2O_2$  یکی از اجزای کامل آبشارهای پیام‌دهی سلول و پیک ثانویهٔ ضروری در تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (Pastori and Foyer, 2002)؛ همچنین در فرایندهای پیام‌دهی وابسته به هورمون، رشد و تقسیم دیوارهٔ سلولی و پیام‌رسانی در سلول‌های نگهبان از طریق تنظیم بسته‌شدن روزنه مؤثر است (Schroeder *et al.*, 2001). یکی دیگر از نقش‌های پیام‌دهی  $H_2O_2$  در فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف در شرایط تنش است؛ این فرایندها شامل تنظیم فرایند پیری، حفاظت در برابر حملهٔ بیماری‌زها، کاهش شدت تنش در نور کم و اثر گذاشتن روی بیان صدها ژن است (Jajic *et al.*, 2015).

طبق گزارش‌های Tsai و Kao (۲۰۰۴)،  $H_2O_2$  در فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون‌ردوکتاز (GR) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) ناشی از آبسیزیک‌اسید در ریشه‌های برنج درگیر است. Mohd Hafiz و Hawa (۲۰۱۳) اظهار داشتند  $H_2O_2$  در گیاه *Orthosiphone stamineus* با افزایش غلظت آبسیزیک‌اسید (۰ تا ۶ میکرومولار) افزایش می‌یابد. Lin و Kao (۲۰۰۱) نیز نشان دادند آبسیزیک‌اسید تولید  $H_2O_2$  و  $O_2^{\cdot -}$  را در نهال‌های برنج افزایش می‌دهد. در پژوهش حاضر، افزایش میزان  $H_2O_2$  (احتمالاً به‌علت نشت الکترون از زنجیرهٔ

در گیاهان، ایزوفرم‌های آسکوربات پراکسیداز با حداقل چهار محل در سلول (تیلاکوئیدها، میتوکندری، سیتوزول و پراکسی‌زوم) مرتبط هستند. Shahpiri و Talaei (۲۰۱۵) گزارش کردند فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز در لایه آلرون بذر جو تیمارشده با آبسیزیک اسید طی ۶ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون، روند افزایشی نشان می‌دهد؛ در این تیمار برخلاف آلرون‌های کشت‌شده در محیط بدون هورمون، میزان فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز در آلرون‌های انکوبه‌شده به مدت ۷۲ ساعت به‌طور درخور توجهی بیش از فعالیت آنزیمی آسکوربات پراکسیداز در آلرون‌های انکوبه‌شده به مدت ۴۸ ساعت است. فعالیت زیاد آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش آن را در سم‌زدایی  $H_2O_2$  نشان می‌دهد (Zhou et al., 2008)؛ بنابراین در پژوهش حاضر، افزایش فعالیت این آنزیم بیان‌کننده نقش آن در سم‌زدایی  $H_2O_2$  است.

آنزیم گایاکول پراکسیداز، اکسیداسیون پیش‌ماده وابسته به پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کند. گایاکول پراکسیداز بیوسنتز لیگنین را تحریک می‌کند و قادر به ایجاد سد فیزیکی در برابر فلزات سنگین سمی است که به موجب آن، بافت‌ها را علیه رادیکال‌های آزاد فعالی که به سلول‌ها آسیب می‌رسانند، تقویت می‌کند (Hegedus et al., 2001)؛ همچنین این آنزیم از غشای سلولی در برابر اکسیدان‌های فعال حفاظت و گیاهان را در کاهش آثار تنش یاری می‌کند. کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ممکن است به علت شکسته شدن مولکول‌های آنزیم توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد (Sandalio et al., 2001).

اکسیژن‌های فعال در حضور بیشترین غلظت آبسیزیک اسید افزایش می‌یابد.

بررسی‌های انجام‌شده در پژوهش حاضر (طبق شکل ۵) نشان دادند فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آبسیزیک اسید افزایش معناداری نسبت به شاهد دارد. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در تمام غلظت‌های آبسیزیک اسید نسبت به شاهد کاهش یافت. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تمام غلظت‌های آبسیزیک اسید نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد. طبق شکل ۵، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تمام تیمارها افزایش معناداری نسبت به شاهد داشت. در سال‌های اخیر مشخص شده است انواع تنش‌های محیطی به تنش اکسیداتیو منجر می‌شوند. افزایش مقاومت به تنش اغلب با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان رابطه دارد. آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) نقش مهمی در سیستم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهان دارند و مقدار این آنزیم‌ها با تیمار آبسیزیک اسید افزایش می‌یابد (Moraghebi et al., 2007). مشخص شده است آبسیزیک اسید باعث القای بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش ظرفیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان از جمله ترکیبات آنزیمی و غیر آنزیمی می‌شود (Jiang and Zhang, 2001)؛ القای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، راهکاری برای سازگاری کلی گیاهان به منظور غلبه بر تنش‌های اکسیداتیو است. مشخص شده است آبسیزیک اسید نسخه‌برداری ژن‌های *CAT2* و *CAT3* در جنین ذرت را افزایش می‌دهد (Knight, 2000).

آبسزیزیک‌اسید باعث تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود و غلظت‌های زیاد آن، تولید زیاد گونه‌های فعال اکسیژن را به دنبال دارد و به آسیب اکسیداتیو در سلول‌های گیاه منجر می‌شود. این محرک می‌تواند پاسخ‌های سلولی بی‌شماری را از طریق آبشارهای انتقال پیام پیچیده در گیاه ایجاد کند. با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد در ساقه‌های بادرنجویه تیمار شده با غلظت‌های مختلف آبسزیزیک‌اسید، این هورمون به‌عنوان مولکول انتقال پیام نقش مهمی در تولید پراکسید هیدروژن و فرایند تولید پروتئین‌های دفاعی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیدازها دارد. کاربرد آبسزیزیک‌اسید در این گیاه به تشدید فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی و افزایش غلظت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز به‌منظور کاهش آثار ایجاد شده توسط تنش اکسیداتیو ناشی از کاربرد آگزوزن آبسزیزیک‌اسید منجر می‌شود.

### سپاسگزاری

پژوهش حاضر در قالب پایان‌نامهٔ دانشجویی و با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام پذیرفته است و به این وسیله از گرنٔ با شمارهٔ 95GRN1M1032 سپاسگزاری می‌شود.

### References

- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. Methods Enzymology 105: 121-126.
- Amirian, H., Ghasempour, H., Ghorbanli, M., Vanaee, S. and Ghasemi, H. (2015) Investigation of abscisic acid on increasing drought tolerance of *Sporobolus stapfianus* in comparison with *Sporobolus pyramidalis*. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research 9: 1-11 (in Persian).

توانایی برخی گیاهان در غلبه بر تنش اکسیداتیو تا حدی به القای فعالیت SOD و متعاقباً افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پایین دست تکیه دارد. مشخص شده است آبسزیزیک‌اسید نسخه‌برداری ژن‌های *SOD3.1*، *SOD3.2*، *SOD3.3* و *SOD3.4* در مزوکوتیل ذرت را افزایش می‌دهد (Knight, Esparham و Mahmoodzadeh 2000). مطالعه‌های (۲۰۱۱) نشان دادند استفاده از آبسزیزیک‌اسید در نهال لویا، تولید APX، CAT و SOD را به‌طور درخور توجهی افزایش می‌دهد؛ علاوه بر این، شواهد گیاهی اینست که آبسزیزیک‌اسید بیان ژن‌هایی را القا می‌کند که Cu، Zn-SOD، Mn-SOD، Fe-SOD (Kaminaka *et al.*, 1999) و CAT (Guan *et al.*, 2000) را کد می‌کنند.

در پژوهش حاضر، آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در تمام غلظت‌های آبسزیزیک‌اسید افزایش معناداری نسبت به شاهد داشتند؛ ولی در مورد آنزیم کاتالاز، تنها در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار افزایش معنادار در مقایسه با شاهد دیده شد که با افزایش میزان  $H_2O_2$  در این دو غلظت همخوانی دارد. کاهش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در تمام غلظت‌های آبسزیزیک‌اسید می‌تواند به علت شکسته شدن مولکول‌های آنزیم توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد.

### جمع بندی

فیتوهورمون‌ها محرک‌های ویژه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هستند که به‌طور وسیع برای تحریک تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه مهم در گیاهان استفاده می‌شوند. مشخص شده است

- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141(2): 391-396.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment* 24(12): 1337-1344.
- Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24(1): 1-15.
- Bellaire, B. A., Carmody, J., Braud, J., Gossett, D. R., Banks, S. W., Lucas, M. C. and Fowler, T. E. (2000) Involvement of abscisic acid-dependent and-independent pathways in the upregulation of antioxidant enzyme activity during NaCl stress in cotton callus tissue. *Free Radical Research* 33: 531-545.
- Beyer, W. F. and Fridovich, I. (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor change in condition. *Analytical Biochemistry* 161(2): 559-566.
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savouré, A., Verbruggen, N., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1998) Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Science* 138: 27-34.
- Dongfeng, Y., Dongfeng, S., Qimei, D., Xiao, L., Zongsuo, L. and Yan, L. (2012) PEG and ABA trigger the burst of reactive oxygen species to increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Growth Regulation* 31: 579-587.
- Ertan, T., Soran, A., Kocer, B. and Cengiz, O. (2002) Oxidative stress in hemorrhagic shock: Prospective clinical study. *Nagoya Medical Journal* 45(2): 43-54.
- Gagne, S., Cluzet, S., Merillon, J. M. and Geny, L. (2011) ABA initiates anthocyanin production in *grape* cell cultures. *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 1-10.
- Gong, M., Li, Y. J. and Chen, S. Z. (1998) Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. *Journal of Plant Physiology* 153: 488-496.
- Gu, L., Li, Z., Zhao, X. and Sandhu, A. (2010) Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown *Lettuces*. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 58: 6503-6509.
- Guan, L., Zhao, J. and Scandalios, J. G. (2000) Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant Journal* 22: 87-95.
- Hare, P. O., Cress, W. A. and Van Staden, J. (1999) Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* 50: 413-434.
- Hegedus, A., Erdei, S. and Horvath, G. (2001) Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science* 160(6): 1085-1093.
- Jajic, I., Sarna, T. and Strzalka, K. (2015) Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species. *Plants* 4(3): 393-411.
- Jiang, M. and Zhang, J. (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system, and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiology* 42: 1265-1273.
- Kaminaka, H., Morita, S., Tokumoto, M., Masumura, T. and Tanaka, K. (1999) Differential gene expression of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses.



- Free Radical Research 31: 219-225.
- Knight, H. (2000) Calcium signalling during abiotic stress in plants. *International Review of Cytology* 195: 269-324.
- Lattanzio, V., Cardinali, A., Ruta, C., Fortunato, I. M., Lattanzio, V. M. T., Linsalata, V. and Cicco, N. (2009) Relationship of secondary metabolism to growth in oregano (*Origanum vulgare* L.) shoot cultures under nutritional stress. *Environmental and Experimental Botany* 65: 54-62.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Mahmoodzadeh, H. and Esparham, E. (2011) Changes in hydrogen peroxide content and antioxidant enzymes in abscisic acid induced antioxidant defense in leaves of bean seedlings. *International Journal of Botany* 7: 195-199.
- Maleki, M., Ebrahimzade, H., Gholami, M. and Niknam, V. (2011) The effect of drought stress and exogenous abscisic acid on growth protein content and antioxidative enzyme activity in saffron (*Crocus sativus* L.). *African Journal of Biotechnology* 10(45): 9068-9075.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V. and Prasad, M. N. V. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 44(1): 25-37.
- Mohd Hafiz, I. and Hawa, Z. E. (2013) Abscisic acid induced changes in production of primary and secondary metabolites, photosynthetic capacity, antioxidant capability, antioxidant enzymes and lipoxygenase inhibitory activity of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Molecules* 18: 7957-7976.
- Moraghebi, F., Madani, A. and Ghasemi, M. (2007) The effect of abscisic acid on the induced thermotolerance in the maize seedlings and its relationship with calcium ion and antioxidant systems. *Plant and Ecosystem* 7: 49-67 (in Persian).
- Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I. A., Frechilla, S., Klucas, R. V. and Aparicio-Tejo, P. (1994) Drought induces oxidative stress in pea plant. *Planta* 194(3): 346-352.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology* 28(1): 131-140.
- Navabpour, S. (2012) Effect of abscisic acid application on enzymatic and non-enzymatic activity in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Cereal Research* 1: 39-51 (in Persian).
- Pastori, G. M. and Foyer, C. H. (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* 129(2): 460-468.
- Pei, Z. M., Murata, N., Benning, O., Thomine, S., Klusener Allen, G. J., Grill, E. and Schroeder, J. I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* 406: 731-734.
- Rabiei, V. (2003) Physiological and morphological reaction of some grapes varieties to drought stress. PhD thesis, Tehran University, Tehran, Iran.
- Rotilio, G., Rossi, L., De Martino, A., Da Costa Ferreira, A. M. and Ciriolo, M. R. (1995) Free radicals, meta ions and oxidative stress: chemical mechanisms of damage and protection in living system. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 6(3): 221-227.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C. and Del Rio, L. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental*

- Botany 52(364): 2115-2126.
- Schroeder, J. I., Kwak, J. M. and Allen, G. J. (2001) Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410(6826): 327-330.
- Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 52: 27-58.
- Talaei, N. and Shahpiri, A. (2015) Analysis of gene expression and enzymatic activity of ascorbate peroxidase in aleurone layers treated with gibberellic acid, abscisic acid and salicylic acid hormones. *Journal of Plant Process and Function* 3(10): 39-46 (in Persian).
- Troll, W. and Lindsley, J. (1955) A photometric method for the determination of prolin. *Journal Biology Chemistry* 215: 655-660.
- Tsai, Y. C. and Kao, C. H. (2004) The involvement of hydrogen peroxide in abscisic acid-induced activities of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in rice roots. *Plant Growth Regulation* 43: 207-212.
- Lin, C. C. and Kao, C. H. (1999) NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedling. *Plant and Soil* 216(1-2): 147-153.
- Zhao, J., Davis, L. C. and Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283-333.
- Zhou, Z. S., Wang, S. J. and Yang, Z. M. (2008) Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere* 70(8): 1500-1509.