Archive of SID

زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره نهم، پاییز ۱۳۹۰، صفحه ۶۳-۷۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۷/۰۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۱۲/۰۷
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۴/۱۳
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۴/۲۰

بررسی اثر غلظت‌های متفاوت نیتروپروساید سدیم (SNP) در تخفیف صدمات اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی در گیاه گوجه‌فرنگی

فاطمه نصیبی *
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

چکیده

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌هایی است که از رشد گیاهان جلوگیری می‌کند. این تنش با ایجاد اختلال در تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و فعالیت‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان گیاه، ایجاد تنش اکسیداتیو می‌کند. نیترو پروساید سدیم (SNP) به طور معمول به عنوان ترکیب رها کننده اکسید نیتریک در گیاهان استفاده می‌شود. در این آزمایش اثر غلظت‌های متفاوت SNP در تخفیف تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی در گیاه گوجه‌فرنگی بررسی شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که غلظت‌های پایین SNP می‌تواند گیاهان را در برابر تنش اکسیداتیو محافظت کند، زیرا در گیاهان پیش تیمار شده با SNP، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و صدمه به رنگیزه‌ها کاهش یافت. در این پژوهش رابطه بین این مکانیسم‌های دفاعی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نیز بررسی شد. بررسی‌ها نشان دادند که تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز را افزایش داد. غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار SNP در گیاهان تحت تنش خشکی، فعالیت APX را افزایش داد و تأثیر معنی‌داری بر فعالیت گایاکول پراکسیداز نداشت، ولی فعالیت CAT را کاهش داد. در گیاهان تحت تنش خشکی افزایش در فعالیت PAL نیز مشاهده گردید، ولی پیش تیمار گیاهان با ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار SNP تأثیر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم تحت تنش خشکی نداشت؛ اما پیش تیمار با ۵۰۰ میکرومولار SNP، فعالیت این آنزیم را تحت تنش خشکی کاهش داد. محتوای فنل‌ها در گیاهان شاهد و تحت تنش خشکی تفاوت معنی‌داری نشان نداد و پیش تیمار با ۱۰۰ میکرومولار SNP نیز تأثیر معنی‌داری بر مقدار آنها نداشت، اما پیش تیمار با ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار SNP مقدار این ترکیبات را تحت تنش خشکی کاهش داد. با توجه به این نتایج در گیاه گوجه‌فرنگی، پیش‌تیمار با غلظت‌های ۱۰۰ میکرومولار یا کمتر SNP می‌تواند احتمالاً از طریق تداخل با ROS یا القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو نقش حفاظتی در برابر خشکی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اکسید نیتریک، ترکیبات فنلی، تنش اکسیداتیو، تنش خشکی، گوجه‌فرنگی، نیتروپروساید سدیم

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: nasibi2002@yahoo.com، شماره تماس: ۰۳۴۱۳۲۲۲۰۳۲

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تنش خشکی یکی از تنش‌های اصلی است که باعث کاهش تولیدات کشاورزی می‌شود. این تنش از فتوسنتز گیاه ممانعت نموده، باعث تغییر در محتوای کلروفیل و صدمه به ساختارهای فتوسنتزی می‌شود. یکی از دلایلی که تنش‌های محیطی مثل خشکی، رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهند، اختلال در تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مکانیسم‌های دفاعی برطرف کننده این رادیکال‌هاست که به تجمع ROS و القای تنش اکسیداتیو، خسارت به پروتئین‌ها، لیپیدهای غشا و سایر اجزای سلولی منجر می‌گردد (Fu and Huang, 2001).

سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان در سلول‌های گیاهی شامل مکانیسم‌های آنزیمی GR, APX, CAT ,SOD gPOX (Guaiacol Peroxidase) و غیر آنزیمی مثل گلوتاتیون احیا، آسکوربیک اسید و توکوفرول است. آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با تولید آب اکسیژنه (H_2O_2) آنیون سوپر اکسید را حذف می‌کند. آب اکسیژنه تولید شده سپس توسط آنزیم‌های CAT و POX سم‌زدایی می‌شود. آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز در سیکل آسکوربات – گلوتاتیون، با مصرف آسکوربات به عنوان دهنده الکترون، مقدار پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهد (Sundhakar *et al.*, 2001).

در شرایط تنش های محیطی، مثل خشکی، فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوای بالای آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی برای تحمل گیاه به تنش بسیار مهم است.

اکسید نیتریک، یک رادیکال نسبتاً پایدار است. در ابتدا این گاز به عنوان آلوده‌کننده محیطی مورد توجه قرار گرفت؛ هر چند بررسی‌های اخیر نشان داده است که NO می‌تواند به عنوان یک مولکول در پدیده ترارسانی علامت در گیاهان عمل کند و در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک، پاتوفیزیولوژیک و نموی مثل جوانه‌زنی دانه، بسته شدن روزنه، پاسخ به عوامل بیماری‌زا و نمو ریشه دخالت نماید (Duan *et al.*, 2007; Neill *et al.*, 2003). از طرف دیگر، NO می‌تواند به عنوان واسطه در عمل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و متابولیسم ROS شرکت کند و در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که در انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نیز دخالت دارد (Del Rio *et al.*, 2004). مقدار زیاد NO می‌تواند با O^{-}_{2} ترکیب شده، رادیکال پراکسی نیتریت $ONOO^{-}$ را تولید کند و گزارش شده است که این رادیکال باعث تخریب لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (Beligni and Lamattina, 1999). چون O^{-}_{2} و H_2O_2 بسیار سمّی‌تر از NO و $ONOO^{-}$ هستند، بنابراین NO می‌تواند به عنوان یک تنش پیش تیمار سلول را از تخریب رادیکال‌های اکسیژن حفظ کند. بنابراین، اعتقاد بر این است که NO دارای نقش دو گانه است: سمّی یا حفاظتی و این بستگی به غلظت آن، نوع گیاه، بافت گیاهی، سن گیاه و نوع تنش وارده به گیاه دارد (Beligni and Lamattina, 1999; Del Rio *et al.*, 2004)، در بسیاری از مطالعات گزارش شده است که NO بیرون‌زا در گیاهان باعث کاهش خسارات ناشی از برخی تنش‌ها مثل فلزات سنگین، علف‌کش‌ها، سرما، اشعه ماوراء بنفش و تنش شوری شده است (Arasimowicz and Floryszak-wieczorek, 2007).

با توجه به مطالعات و بررسی‌های قبلی، NO دارای دو نقش در شرایط تنشی است. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش احتمالی NO در تنظیم متابولیسم ROS و

www.SID.ir

Archive of SID

مکانیسم فیزیولوژیک NO برون‌زا در تحمل به تنش خشکی در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Alicante) که از شرکت Thomson and Morgan کشور انگلستان تهیه شده بودند، در تابستان در خزانه‌های حاوی گیاه‌خاک در ژرمیناتور گروه زیست‌شناسی کاشته شدند، تا زمانی که جوانه زدند (تقریباً یک هفته). پس از جوانه‌زنی، گیاهک‌ها به اتاق رشد با دوره ۱۶ ساعت نور ۸ ساعت تاریکی، منتقل شدند. گیاهک‌ها هر روز آبیاری شدند و هفته‌ای یک‌بار محلول غذایی (Long Ashton) با غلظت ۱/۲ به گیاهک‌ها داده شد. پس از چهار هفته رشد، ریشه گیاهان با دقت شسته شد و گیاهک‌ها به شیشه‌های حاوی محلول‌های SNP با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت تیمار با SNP، به منظور اعمال تنش خشکی گیاهک‌ها به مدت ۲۴ ساعت به شیشه‌های حاوی ۱۱/۲ درصد PEG (معادل ۰/۲- MPa) منتقل گردیدند. از هر نمونه پیش تیمار شده، یک نمونه به عنوان شاهد در آب مقطر به‌جای خشکی قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت اعمال تیمار خشکی، برگ سوم گیاهک برداشته شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و برای اندازه‌گیری‌های بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها

برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها، غلظت مالون‌دآلدهید (MDA) وسایر آلدهیدها اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۲ گرم از بافت تازه برگی در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱٪ ساییده شد. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد.

به یک میلی‌لیتر از محلول حاصل از سانتریفوژ، ۵ 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 حمام آبگرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله در حمام یخ سرد گردید و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید.

برای محاسبه غلظت MDA در طول موج ۵۳۲ نانومتر از ضریب خاموشی معادل $1.55\times10^5\ M^{-1}\ Cm^{-1}$ (Heath and Packer, 1968) و برای سایر آلدهیدها در طول موج ۴۵۵ از ضریب خاموشی معادل $0.457\times10^5\ M^{-1}Cm^{-1}$ (Miers *et al.*, 1992) استفاده شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر برگ محاسبه و ارائه گردید.

اندازه‌گیری محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی

در این روش رنگیزه‌ها با استفاده از استون ۸۰٪ استخراج شدند و غلظت آنها بر اساس روابط زیر محاسبه شد.

$$Chl.a = (۱۲/۲۵A_{۶۶۳/۲} - ۲/۷۹A_{۶۴۶/۸}) \quad (۱)$$

$$Chl.b = (۲۱/۵۰A_{۶۴۶/۸} - ۵/۱\ A_{۶۶۳/۲}) \quad (۲)$$

$$Chl.T = Chl.a + Chl.b \quad (۳)$$

سنجش ترکیبات فنلی

محتوای فنل‌های محلول کل با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری شد (Gao *et al.*, 2000). ۰/۱ گرم از بافت

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهی در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰×g سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی برای سنجش فنل‌های محلول استفاده شد. برای محاسبه غلظت فنل‌های محلول از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر ارائه شد.

استخراج عصاره آنزیمی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

۰/۵ گرم از برگ منجمد شده در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، حاوی پلی وینیل پیرولیدون ۱٪ و EDTA یک میلی‌مولار همگن شدند. همگنای حاصل در ۲۰۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش رویی برای سنجش آنزیم‌های مورد نظر برداشته شد (Gapinska *et al*., 2008).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت کاتالاز با روش اسپکتروفتومتری و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در مدت ۳۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با اضافه کردن H_2O_2 آغاز شد و کاهش جذب در مدت ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری گردید. مقدار پراکسید هیدرژن تجزیه شده با مقایسه منحنی استاندارد محاسبه شد (Dhindsa *et al*., 1981).

اندازه‌گیری فعالیت گایاکول پراکسیداز (gPOX)

فعالیت گایالول پراکسیداز با استفاده از گایاکول به عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲/۷۷ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱٪ و ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۴٪ بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. هر واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقداری از آنزیم تعریف می‌شود که باعث ۰/۰۱ تغییر در جذب می‌شود (Zhang *et al*., 2005).

اندازه‌گیری فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت آسکوربات پراکسیداز با استفاده از اسپکتروفتومتر و بر اساس اکسیداسیون آسکوربات اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم APX براساس کاهش جذب آسکوربات در مدت ۱ دقیقه در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش مقدار آسکوربات اکسید شده با مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه گردید (Nakano and Asada, 1981).

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

فعالیت آنزیم PAL براساس مقدار تبدیل فنیل آلانین به سینامیک اسید اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر Tric-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۵، ۲- مرکاپتواتانول ۱ میلی‌مولار، L- فنیل آلانین ۵۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود.

www.SID.ir

Archive of SID

مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰ درجه سانتیگراد انکوباته شد. واکنش با اضافه کردن کلریدریک اسید ۶ مولار خاتمه یافت و جذب محلول شفاف در ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. هر واحد آنزیمی معادل مقدار آنزیمی است که باعث تبدیل یک میکرومولار سوبسترا به سینامیک اسید در یک دقیقه می‌شود (D'cunha *et al*., 1996).

سنجش مقدار پروتئین کل

محتوای پروتئین کل با روش برادفورد و استفاده از آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976).

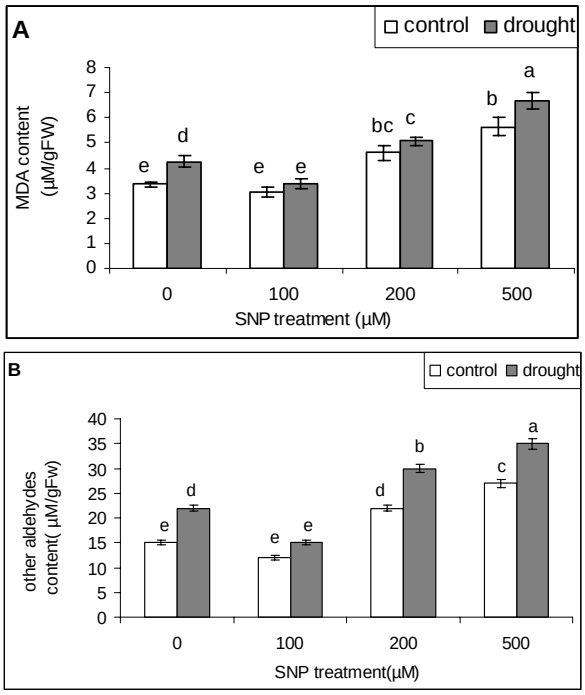
آنالیز آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در هر تیمار انجام شد. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۰ انجام گرفت و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند. برای رسم شکل‌ها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

پراکسیداسیون لیپید

پراکسیداسیون لیپید از علایم عمومی تنش اکسیداتیو است. برگ‌هایی از گیاه گوجه‌فرنگی که تحت تنش خشکی قرار گرفتند، افزایش در پراکسیداسیون لیپیدی را نشان دادند. بر اساس نتایج، وقتی گیاهان با ۱۰۰ میکرومولار SNP پیش تیمار شدند، مقدار پراکسیداسیون لیپیدها کاهش یافت، اما وقتی با ۲۰۰ یا ۵۰۰ میکرومولار SNP پیش تیمار شدند، پراکسیداسیون لیپیدها و خسارت به غشا بسیار بیشتر از گیاهانی بود که فقط تحت تیمار خشکی قرار گرفته بودند (شکل ۱).



شکل ۱- اثر پیش تیمار غلظت‌های متفاوت SNP بر مقدار مالون‌دآلدهید و سایر آلدهیدها به عنوان شاخص پراکسیداسیون غشا در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی تحت شرایط کنترل و تنش خشکی. میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P<0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارها در مقایسه با یکدیگر است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

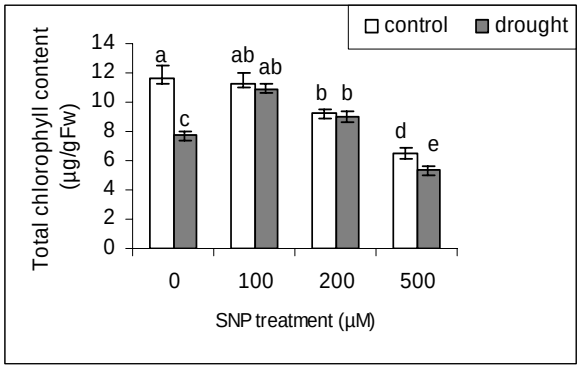
محتوای کلروفیل

گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با PEG کاهش معنی‌داری در محتوای کلروفیل کل نشان دادند. نتایج نشان داد که پیش تیمار گیاهان با ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار SNP باعث کاهش خسارات ناشی از تنش خشکی بر کلروفیل شد، اما وقتی گیاهان با ۵۰۰ میکرومولار SNP پیش تیمار شدند، مقدار کلروفیل کل در گیاهان شاهد و تحت تنش

www.SID.ir

Archive of SID

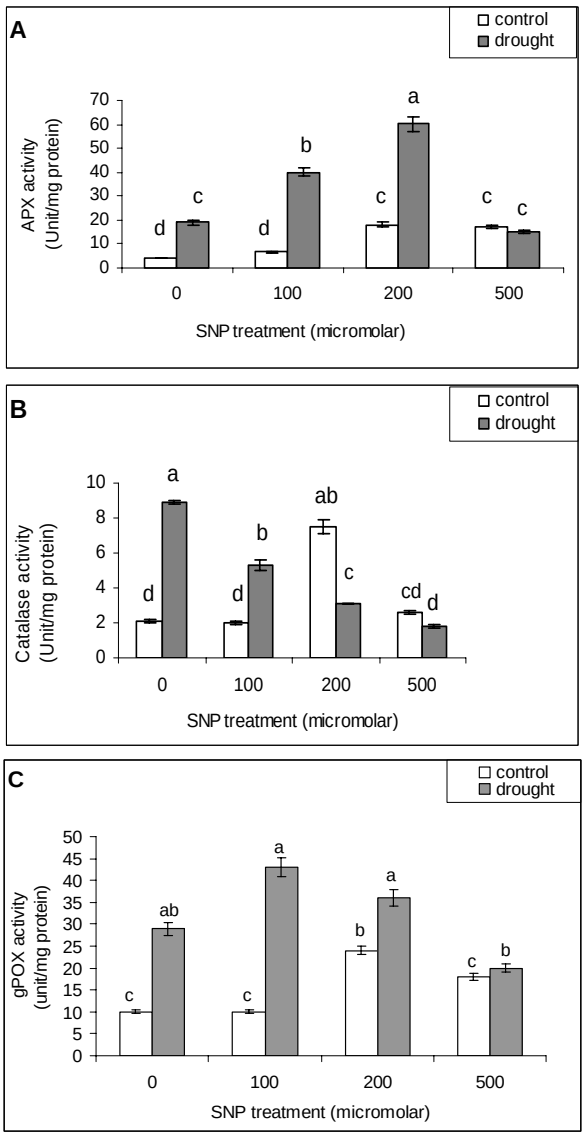
کمتر از گیاهانی بود که فقط تنش خشکی دریافت کرده بودند (شکل ۲).



شکل ۲- اثر پیش تیمار غلظت‌های متفاوت SNP بر محتوی کلروفیل کل در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی تحت شرایط کنترل و تنش خشکی. داده‌ها تحت آنالیز واریانس قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P<0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن هرچهار تیمار در مقایسه با یکدیگر است.حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

وقتی گیاهان تحت تیمار محلول PEG قرار گرفتند، فعالیت همه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت. فعالیت APX در گیاهانی که با ۱۰۰و ۲۰۰ میکرومولارSNP و خشکی تیمار شده بودند، بیشتر از گیاهانی بود که فقط تحت تیمار خشکی قرار گرفته بودند. پیش تیمار گیاهان با ۱۰۰،۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار SNP اثر معنی‌داری بر فعالیت gPOX تحت تنش خشکی نداشت، اما فعالیت CAT در گیاهانی که باSNP پیش تیمار شده بودند و سپس تحت تنش خشکی قرار گرفتند، در مقایسه با گیاهان تحت تنش خشکی، کاهش یافت (شکل ۳).



شکل ۳- اثر پیش تیمار غلظت‌های متفاوت SNP بر فعالیت آنزیم‌های APX، CAT و gPOX در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی تحت شرایط کنترل و تنش خشکی. داده‌ها تحت آنالیز واریانس قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P<0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن داده‌ها در مقایسه با یکدیگر است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

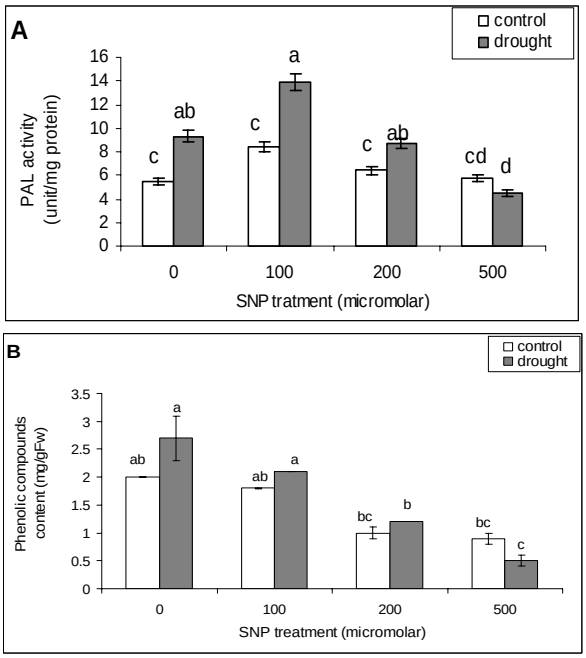
www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت PAL و محتوی فنل

تنش خشکی فعالیت آنزیم PAL را افزایش داد، اما پیش تیمار گیاهان با SNP تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم PAL در گیاهان شاهد و تحت تیمار خشکی نداشت. تنها پیش تیمار با ۵۰۰ میکرومولار SNP باعث کاهش فعالیت آنزیم تحت تنش خشکی گردید (شکل ۴).

تنش خشکی در این بررسی اثر معنی‌داری بر محتوی فنل‌ها نداشت. پیش تیمار با ۱۰۰ میکرومولار SNP نیز اثر معنی‌داری نشان نداد، اما مقدار فنل‌ها در گیاهان تیمار شده با ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار SNP کاهش معنی‌داری نشان دادند (شکل ۴).



شکل ۴- اثر پیش تیمار غلظت‌های متفاوت SNP بر فعالیت آنزیم PAL و محتوی فنل کل در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی تحت شرایط کنترل و تنش خشکی. داده‌ها تحت آنالیز واریانس قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P<0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن داده‌ها در مقایسه با یکدیگر است. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

بحث

در شرایط عادی رشد، بسیاری از فرآیندهای متابولیک تولید ROS می‌کنند. گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی پیچیده‌ای برای گریز از آثار مضر ROS هستند. تنش‌های محیطی مثل خشکی تولید ROS را افزایش می‌دهند که باعث اکسید کردن رنگیزه‌های فتوسنتزی، لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (Smirnoff, 1993).

در این شرایط، گیاهانی که دارای سطوح بالای آنتی‌اکسیدانی دائمی یا القایی هستند، در برابر خسارات اکسیداتیو مقاوم‌تر هستند (Lei *et al*., 2007). از آنجایی که پراکسیداسیون لیپید یکی از اولین نتایج خسارات اکسیداتیوی است، مواد واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید (TBARS) به عنوان شاخص تولید ROS القا شده توسط خشکی و تنش اکسیداتیو اندازه‌گیری شد. افزایش در محتوای MDA و سایر آلدئیدها در گیاهان تحت تنش خشکی نشان داد که خشکی باعث خسارت به غشا شده است (شکل ۱). وقتی گیاهان با غلظت پائین SNP (۱۰۰ میکرومولار) پیش تیمار شدند و سپس در معرض خشکی قرار گرفتند، آثار مضر خشکی بر غشا کاهش یافت. این اثر می‌تواند به توانایی NO در جمع کردن ROS و جلوگیری از افزایش تولید TBARS و سایر آلدئیدها مربوط باشد (Beligni and Lamattina, 1999). گزارش شده است که نقش NO در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید مربوط به توانایی NO در واکنش با رادیکال‌های لیپید آلکوکسیل ($LO^{\bullet}$) و لیپید پراکسیل ($LOO^{\bullet}$) و توقف زنجیره پراکسیداسیون است (Lei *et al*., 2007; Wendehenne *et al*., 2001) که با نتایج مشاهده شده در این پژوهش که در آن مقدار مالون‌دآلدهید و سایر آلدهیدها کاهش نشان داد،

www.SID.ir

Archive of SID

مطابقت دارد. نقش NO در کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید قبلاً توسط Laspina و همکاران (۲۰۰۵) و Hsu و Kao (۲۰۰۴)، در تنش فلز سنگین کادمیوم نیز گزارش شده است. Tian و Li (۲۰۰۷) نیز اثر NO در کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهچه گندم تحت تنش خشکی را گزارش کردند. در غلظت‌های بالای SNP؛ بخصوص ۵۰۰ میکرومولار به نظر می‌رسد که NO با تولید بیش از حد رادیکال $ONOO^-$ (پراکسی نیتریت) ایجاد تنش نیتروزاتیو می‌کند و با رادیکال‌های اکسیژن در تخریب سلول به صورت همکاری عمل می‌نماید.

کاهش در محتوای کلروفیل در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش خشکی مشاهده شد و این اثر وقتی گیاهان با ۱۰۰ میکرومولار SNP پیش تیمار می‌شوند، کاملاً مرتفع می‌شود. در این بررسی وقتی گیاهان با ۵۰۰ میکرومولار SNP پیش تیمار شدند، کاهش کلروفیل چشمگیرتر شد. Hsu و Kao (۲۰۰۴)، گزارش کردند که غلظت‌های بالای کادمیوم (Cd) نیز باعث کاهش محتوی کلروفیل در برگ‌های برنج شده است و وقتی که برگ‌های با ترکیب رها کننده NO پیش تیمار شدند، این اثر برطرف شده که موید این نتایج است.

در این مورد نیز به نظر می‌رسد که اثر NO به واکنش آن با ROS بر می‌گردد، زیرا رادیکال‌های آزاد اکسیژن اصلی‌ترین عاملی هستند که در شرایط تنش باعث خسارت و شکستن رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین‌های ساختاری دستگاه فتوسنتزی می‌شوند. این اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن در فتوسیستم ۲و به خصوص بر پروتئین D_1 اثبات شده است (Kim and Lee, 2005; Laspina *et al*., 2005). علاوه بر این، پروتئین‌هایی که در متابولیسم کلروفیل شرکت می‌کنند نیز می‌توانند هدف ROS ها قرار گرفته و تخریب شوند (Beligni and Lamattina, 1999). همچنین در برخی بررسی‌ها گزارش شده است که در حضور NO دسترسی گیاه به آهن بیشتر است و این نیز می‌تواند یکی از نقش‌های NO در حفظ محتوی کلروفیل گیاه باشد (Neill *et al*., 2003).

در این مطالعه مشاهده گردید که پیش تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار SNP فعالیت آنزیم APX را تحت تنش خشکی القا نمود (شکل ۳). نتایج مشابه در ریشه کدو تحت تیمار شوری و ریشه لوبیا تحت تیمار کادمیوم (Cd) نیز گزارش شده است (Kopyra and Gwozdz, 2003). در این بررسی فعالیت آنزیم APX در شرایط تنش خشکی و پیش تیمار ۱۰۰و ۲۰۰ میکرومولارSNP از فعالیت سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بیشتر بود که بیانگر نقش بیشتر این آنزیم در فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه تحت این شرایط بود و به نظر می‌رسد که آنزیم‌های gPOX و CAT دارای نقش کمتری در فعالیت دفاعی گیاه تحت این شرایط بودند. فعالیت آنزیم APX تحت تیمار ۵۰۰ میکرومولار SNP کاهش یافت که احتمالاً به علت عدم توانایی گیاه در حفاظت پروتئین‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و غلظت بالای رادیکال پراکسی نیتریت تولید شده است. فعالیت آنزیم CAT با افزایش غلظت SNP کاهش معنی‌داری نشان داد.

در مطالعات قبلی گزارش شده است که NO تبدیل آنیون سوپر اکسید به پراکسید هیدروژن را تشویق می‌کند و این مرحله مهمی در حفاظت سلول در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. اگر پراکسید هیدروژن تولید شده به‌موقع از سلول دفع نشود، آنیون‌های سوپر اکسید واکنش داده، تولید رادیکال هیدروکسیل می‌کنند که برای سلول بسیار خطر ناک است (Shi *et al*., 2007). در برخی

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات نقش NO در القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گزارش شده، اما در غلظت‌های بالا فعالیت برخی آنزیم‌ها مثل CAT و gPOX کاهش یافته است که محققان معتقدند این اثر احتمالاً به تنش نیتروزاتیو ایجاد شده در این غلظت‌ها مربوط بوده است (Wendehenne *et al*., 2001).

آنزیم PAL یکی از آنزیم‌های مهم در مسیر فنیل پروپانوئید و سنتز ترکیبات فنلی است که در پاسخ به برخی تنش‌های زیستی و غیر زیستی القا شده است و می‌تواند به عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان در نظر گرفته شود، زیرا دارای خاصیت به دام اندازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق ترکیبات فنلی تولید شده است (Tian and Li, 2007). در این بررسی مشاهده شد که تنش خشکی باعث افزایش فعالیت این آنزیم شده است (شکل ۴)، اما پیش تیمار گیاهان با ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار SNP تأثیر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم نداشت. در غلظت ۵۰۰ میکرومولار SNP کاهش فعالیت آنزیم مشاهده شد که احتمالاً به علت اختلال سیستم دفاعی گیاه در این شرایط است.

محتوی فنل‌های کل تحت شرایط تنش خشکی به تنهایی و پیش تیمار ۱۰۰ میکرومولار SNP و خشکی تغییر معنی‌داری نداشت، اما در غلظت‌های بالای SNP (۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار) مقدار فنل‌ها تحت تنش کاهش نشان داد.

گزارش شده است که ترکیبات فنلی با دادن الکترون به آنزیم‌های تیپ پراکسیداز و سمّزدایی آب اکسیژنه تولید شده، می‌توانند در سلول به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کنند (Sakihama *et al*., 2002)، اما در این پژوهش به نظر می‌رسد که پیش تیمار NO نقشی در القای تولید آنها نداشته است.

بنابراین، در مطالعه ما بر روی گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش خشکی، به نظر می‌رسد که ماده رها کننده اکسید نیتریک در غلظت‌های پایین (۱۰۰ میکرومولار) مانع عملکرد ROS می‌شود و خسارات ناشی از این رادیکال‌های اکسیژن کاهش می‌یابد. البته، این نکته را نیز باید مد نظر داشت که غلظت‌های بالای SNP نقش همکاری با ROS داشته، شدت تنش را افزایش می دهند. البته، مقدار دقیق غلظت بالا در گیاهان مختلف متفاوت است که با انجام آزمایش‌ها بر روی آنها می‌توان سطح این غلظت را تخمین زد. همچنین به نظر می رسد که غلظت‌های پایین NO در گیاهان به‌عنوان یک پیامبر ثانویه، باعث افزایش فعالیت و یا القای بیان برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند APX می‌شود و این به گیاه کمک می‌کند تا بهتر بتواند شرایط تنش را تحمل کند.

منابع

Arasimowicz, M. and Floryszak-Wieczorek, J. (2007) Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. Plant Sciences 172: 876-887.

Beligni, M. V. and Lamattina, L. (1999) Is nitric oxide toxic or protective? Trends in Plant Sciences 4: 299-300.

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

D`cunha, G. B., Satyanarayan, V. and Nair, P. M. (1996) Purification of phenylalanine ammonia-lyase from Rhodotorula glutinis. Phytochemistry 42: 17-20.

Del Rio, L. A., Corpas, F. J. and Barroso, J. B. (2004) Nitric oxide and nitric oxide

www.SID.ir

Archive of SID

synthase activity in plants. Phytochemistry 65: 783-792.

Dhindsa, R. S., Dhindsa, P. and Thorpe, T. (1981) Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decrease levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany 32: 93-101.

Duan, X., Su, X., You, Y., Qu, H., Li, Y. and Jiang, Y. (2007) Effect of nitric oxide on pericarp browing of harvested longan fruit in relation to phenolic metabolism. Food Chemistry 104: 571-576.

Fu, J. and Huang, B. (2001) Involvement of antioxidant and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Environmental and Experimental Botany 45: 105-114.

Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L. and Trajkovski, V. (2000) Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruit of sea buckthourn (Hippophae rhamnoides.L) during maturation. Journal of Agriculture and Food Chemistry 48: 1458-1490.

Gapinska, M., Sklodowska, M., Gabara, B. (2008) Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. Acta Physiologia Plantarum 30:11-18.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archive of Biochemistry and Biophysic 125: 189-198.

Hsu, Y. T. and Kao, C. H. (2004) Cd toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. Plant Growth Regulation 42: 227-238.

Kim, J. H. and Lee, C. H. (2005) In vivo deleterious effects specific to reactive oxygen species on photosystem II after photooxidative treatment of rice leaves. Plant Sciences 168: 1115-1125.

Kopyra, M. and Gwozdz, E. A. (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of Lupinus luteus. Plant Physiology and Biochemistry 31: 1011-1017.

Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M. P. (2005) Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Sciences 169: 323-330.

Lei, Y., Yin, C., Ren, J. and Li, C. (2007) Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. Biologia Plantarum 516: 386-390.

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

Miers, P., Hada, S. and Aharoni, N. (1992) Ethylene increased accumulation of fluorescent lipid peroxidation products detected during parsley by a newly developed method. Journal of American Society Horticultural Sciences 117: 128-132.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach choloroplast. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

Neill, J., Radhika, D. and Hancock, J. (2003) Nitric oxide signaling in plant. New Phytologists 159: 11-35.

Sakihama, Y., Cohen, M., Grace, S. and Yamasaki, H. (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities phenolic-induced oxidative damage mediated by metals in plant. Toxicology 177: 67-80.

www.SID.ir

Archive of SID

Shi, Q., Fei, D., Wng, X. and Wei, M. (2007) Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 45: 542-550.

Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologists 125: 27-58.

Tian, X. and Li, Y. (2007) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biologia Plantarum 50: 775-778.

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

Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. and Durner, J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. Trends in Plant Sciences 6: 77-183.

Zhang, Z., Pang, X., Duan, X., Ji, Z. L. and Jiang, Y. (2005) Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. Food Chemistry 90: 47-52.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on oxidative damages induced by drought stress in tomato plant

Fatemeh Nasibi *

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Abstract

Drought stress is one of the main stresses that inhibit the growth of plants due to mainly disturbance of the balance between production of ROS and antioxidant defense mechanism and causing oxidative stress. Sodium nitroprusside (SNP) commonly was used as nitric oxide (NO) donor in plants. In this study, the effect of different concentrations of SNP on alleviation of oxidative stress induced by drought was investigated. Results of the measurements of lipid peroxidation and photosynthetic pigments content showed that low concentration of SNP could protect plants against oxidative stress because under SNP treatment, lipid peroxidation decreased and pigment loss was ameliorated. In this study, the relationship between this defense mechanisms and activity of antioxidant enzymes was investigated. Results showed that drought stress increased the activity of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase and catalase. Concentration of 100 and 200 µM of SNP increased the activity of APX had no effect on activity of GPX and decreased the activity of CAT in plant under drought stress. In plants which were under drought stress the activity of PAL also increased but the concentration of 100 and 200 µM of SNP had no effect on activity of these enzymes under drought stress. The concentration of 500 µM of SNP decreased the activity of PAL in drought stressed plants. Drought stress and 100 µM SNP treatments had no significant effects on phenol content and 100 and 200 µM of SNP decreased the amount of these compounds under drought stress. In conclusion, in tomato plants, pretreatment with concentration of 100 µM of SNP or below could protect the plants under drought stress, probably through the contracts with ROS and or induction of anti-oxidative enzymes.

Key words: Nitric oxide, Phenolic compounds, Oxidative stress, Drought stress, Tomato, Sodium nitroprusside (SNP)

* Corresponding Author: nasibi2002@yahoo.com

www.SID.ir