مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد شانزدهم، ویژه‌نامه ۲، ۱۳۸۸
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

# اثر پیش تیمار سدیم نیترو پروساید (SNP) بر برخی عوامل بیوشیمیایی گیاهچه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicun esculentum*) تحت تنش خشکی

***فاطمه نصیبی[۱]، خسرو منوچهری‌کلانتری[۲] و منصوره خداشناس[۳]**

[۱]دانشجوی دوره دکتری گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، [۲]استاد مرکز بین‌المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان، [۳]کارشناس ارشد مرکز تحقیقات منابع طبیعی کرمان

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۱۷

## چکیده

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد گیاهان و تولید محصولات کشاورزی را محدود می‌کند. نیتریک اکسید یک رادیکال گازی به نسبت پایدار است که به‌عنوان مولکول سیگنالینگ کلیدی در گیاهان عمل می‌کند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی، پاتوفیزیولوژیکی و نموی به‌عنوان واسطه دخالت دارد و به تازگی پیشنهاد شده که این ماده در پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی نیز شرکت می‌کند. در این پژوهش پیش تیمار سدیم نیتروپرساید (SNP)[۱] به‌عنوان رهاکننده نیتریک اکسید (NO)، و ترکیب پالاینده آن ٤و٤و٥و٥ و تترامتیل ایمیدازولین-۱ اکسیل-۳- اکسید (PTIO) به‌مدت دو روز در گیاهان شاهد و تحت تنش خشکی استفاده شد و نقش NO در برخی پاسخ‌های بیوشیمیایی به تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های این مطالعه نشان داد که پیش تیمار SNP سبب کاهش پراکسیداسیون لیپید و مقدار پراکسیدهیدروژن در گیاهان تحت تنش گردید. تنش خشکی و پیش تیمار SNP اثر معنی‌داری بر رنگیزه‌های فتوسنتزی نداشت. خشکی سبب افزایش مقدار گروه‌های کربونیل و کاهش گروه‌های تیول پروتئینی و غیرپروتئینی به‌عنوان شاخص اکسیداسیون پروتئین شد هر چند پیش تیمار گیاهان با SNP گروه‌های کربونیل را کاهش و گروه‌های تیول را افزایش داد و سبب تخفیف اکسیداسیون پروتئین‌ها تحت تنش خشکی گردید. مقدار پرولین، آمینواسیدهای آزاد کل و قندهای محلول تحت تنش خشکی افزایش معنی‌داری نشان دادند. پیش تیمار با SNP فقط سبب افزایش پرولین گردید و بر سایر اسمولیت‌ها اثر نداشت. مقدار فنل‌های محلول، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، تحت تنش افزایش یافت و تیمار با SNP مقدار این ترکیبات را تحت تنش خشکی افزایش داد. پیش تیمار گیاهان با SNP توأم با ٤و٤و٥و٥ و تترا متیل ایمیدازولین-۱ اکسیل-۳- اکسید (PTIO) (یک پالاینده NO) اثر حفاظتی SNP را کاهش داد و این نشان داد که اثر حفاظتی SNP مربوط به NO رها شده و به‌نظر می‌رسد که اثرات حفاظتی NO در شرایط تنش ممکن است مربوط به توانایی NO در مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش صدمات اکسیداتیو باشد.

***واژه‌های کلیدی:*** تنش خشکی، پراکسیداسیون لیپید، نیتریک اکسید، اکسیداسیون پروتئین، پلی‌فنل‌ها

* مسئول مکاتبه: nasibi2002@yahoo.com

1- Sodium Nitroprusside

Archive of SID
www.SID.ir

## مقدمه

نیتریک اکسید یک مولکول گازی کوچک و قابل انتشار است که به‌صورت درون‌زا در بسیاری از سیستم‌های بیولوژیکی مثل جانوران، گیاهان و باکتری‌ها تشکیل می‌شود و دارای نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی می‌باشد (دل‌ریو و همکاران، ۲۰۰٤). شواهد زیادی وجود دارد مبنی بر این‌که نیتریک اکسید در چندین فرآیند سلولی مثل رشد، نمو، متابولیسم، تنفس، مرگ، بلوغ و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دخالت دارد (دلدون و همکاران، ۱۹۹۸؛ ماتا و لاماتینا، ۲۰۰۱). همچنین نیتریک اکسید در برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی، پاتوفیزیولوزیکی و نموی مانند جوانه‌زنی دانه (بلیگنی و لاماتینا، ۲۰۰۰)، متابولیسم ROS و انتقال سیگنال (نیل و همکاران، ۲۰۰۲b؛ ماتا و لاماتینا، ۲۰۰۱) نیز نقش دارد. در مطالعات متعددی گزارش شده است که NO می‌تواند با رادیکال سوپراکسید ترکیب شده و تولید رادیکال پراکسی نیتریت ($ONOO^-$) نماید. این رادیکال سمی است و می‌تواند سبب خسارت به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شود، اما سمی بودن آن در مقایسه با یون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن بسیار کمتر است و بنابراین NO می‌تواند نقش حفاظتی برای سلول در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایفا کند (بلیگنی و لاماتینا، ۱۹۹۹a). نقش دفاعی NO در گیاهان بستگی به غلظت NO، بافت گیاهی، سن و گونه گیاهی و نوع تنش دارد (بلیگنی و لاماتینا، ۱۹۹۹b). در بررسی‌های اخیر نقش دفاعی NO بیرون‌زا را در کاهش خسارات ناشی از فلزات سنگین (لاسپینا و همکاران، ۲۰۰۵؛ کوپیرا و گوژز، ۲۰۰۳)، شوری (شی و همکاران، ۲۰۰۷)، گرما و سرما (نیل و همکاران، ۲۰۰۲b) و اشعه ماوراءبنفش (مکرنس و همکاران، ۲۰۰۱) گزارش نموده‌اند.

کم‌آبی از تنش‌های مهم محیطی است که تولید گیاهان را محدود می‌کند. تطابق با کم‌آبی نتیجه یک‌سری واکنش‌هایی بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است که به حفظ آب، کلروپلاست و نگهداری هموستازی یون‌ها کمک می‌کند (بوهنر و جنسن، ۱۹۹٦؛ ایتوربی- ارماتکس و همکاران، ۱۹۹۸). تنش خشکی مانع فتوسنتز گیاه و باعث تغییر در محتوای کلروفیل و خسارت به دستگاه فتوسنتزی می‌شود. این تنش همچنین فعالیت فتوشیمیایی را باز داشته و فعالیت آنزیم‌های چرخه کلوین را کاهش می‌دهد (موناخووا و چرنیادف، ۲۰۰۲). یکی از این تغییرات بیوشیمیایی که در گیاه تحت تنش ایجاد می‌شود تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است که محصول اجتناب‌ناپذیر متابولیسم طبیعی سلول می‌باشد (فو و هوانگ، ۲۰۰۱؛ ژنگ و کیرخام، ۱۹۹۵). کلروپلاست و میتوکندری سلول‌های گیاهی از مهمترین تولیدکننده‌های گونه‌های فعال اکسیژن هستند. الکترون‌های نشت کرده از زنجیره انتقال الکترون می‌توانند با اکسیژن مولکولی به‌دست آمده از متابولیسم طبیعی گیاه، ترکیب شده و تولید گونه‌های فعال اکسیژن مثل سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال هیدروکسیل کند. این گونه‌های اکسیژن سمی و بسیار واکنش‌پذیرند و در غیاب مکانیسم‌های حفاظتی می‌توانند متابولیسم طبیعی سلول را به‌میزان زیادی مختل کنند (فوبر و هالیول، ۱۹۷٦؛ اسمیرنف، ۱۹۹۳؛ شارما و دوبی، ۲۰۰۵). این رادیکال‌ها از طریق پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه تخریب غشاء (بلیگنی و لاماتینا، ۱۹۹۹a)، تخریب پروتئین‌ها (موران و همکاران، ۱۹۹٤؛ تاکدا و همکاران، ۱۹۹۵؛ یوسفیان و همکاران، ۲۰۰۱)، غیرفعال کردن آنزیم‌ها (تو و همکاران، ۲۰۰۳)، از بین بردن رنگیزه‌ها (لوگینی و همکاران، ۱۹۹۹) و اختلال در عملکرد DNA (تیان و لی، ۲۰۰٦) ایجاد تنش ثانویه اکسیداتیو کرده که منجر به خسارات جدی به ساختارهای سلولی و گیاه می‌گردند.

گیاهان در مقابله با تنش خشکی مکانیسم‌های حفاظتی متفاوتی را در پیش می‌گیرند که از آن جمله می‌توان به تجمع اسمولیت‌هایی مثل پرولین (نایار، ۲۰۰۳؛ دلاونی و ورما، ۱۹۹۳) و قندهای محلول (مورگان، ۱۹۹۲؛ جونز و ترنر، ۱۹۸۰؛ هانسون و هیتز، ۱۹۸۲) و مکانیسم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی

Archive of SID

www.SID.ir

(یاماساکی و همکاران، ۱۹۹۷؛ چانگ و همکاران، ۲۰۰۲؛ ایتوربی- ارماتکس و همکاران، ۱۹۹۸؛ تیان و لی، ۲۰۰٦) اشاره کرد.

در رابطه با اثر نیتریک اکسید در کاهش اثرات تنش خشکی مطالعات متعددی انجام شده است. در گیاه گندم ترکیب مولد NO یعنی سدیم نیتروپروساید (۰/۱ میلی‌مولار) با جلوگیری از تخریب کلروفیل و پروتئین‌های محلول به‌خصوص روبیسکو پیری را در برگ‌های جدا شده به تاخیر انداخت. در حالی‌که غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید فرآیند پیری را تشویق کرد (تو و همکاران، ۲۰۰۳). لی و همکارانش نیز گزارش کردند که غلظت ۰/۲ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید در گیاهچه گندم سبب افزایش رشد، افزایش مقدار کلروفیل و کاهش پرولین گردید. در حالی‌که غلظت ۲ میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید میزان رشد و محتوی کلروفیل را کاهش، اما مقدار پرولین را افزایش داده است (لی و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعه بر روی برگ‌های گیاه گندم مشاهده شد که غلظت ۱۵۰ میکرومولاری سدیم نیترو پروساید باعث افزایش محتوی آب برگ گردید. ماتا و لاماتینا معتقد بودند که نیتریک اکسید رها شده از سدیم نیتروپروساید با بستن روزنه این اثر را دارد (ماتا و لاماتینا، ۲۰۰۱). در مطالعه مشابهی زینگ و همکارانش اثر نیتریک اکسید و گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در محتوی آب برگ و مقدار ابسیزیک اسید در گیاهچه گندم را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که نیتریک اکسید سبب نگهداری آب برگ شده و یکی از مکانیسم‌های احتمالی آن تحریک سنتز ابسیزیک اسید است (زینگ و همکاران، ۲۰۰٤). کولبرت و همکارانش (۲۰۰۵) نیز مشاهده کردند که تنش اسمزی ناشی از تیمار پلی‌اتیلن گلیکول باعث سنتز نیتریک اکسید در ریشه گیاه نخودفرنگی شده است. آنها گزارش کردند که محل سنتز نیتریک اکسید در منطقه مریستمی و طویل شدن ریشه قرار دارد و نشان‌دهنده نقش احتمالی نیتریک اکسید در احساس تنش خشکی و سیگنالینگ دوربرد است (کولبرت و همکاران، ۲۰۰۵). نقش حفاظتی نیتریک اکسید در تنش‌های محیطی بستگی به غلظت آن، گونه گیاهی و شرایط تنش دارد. اثر نیتریک اکسید در کاهش تنش خشکی در گیاه گوجه‌فرنگی تاکنون گزارش نشده است بنابراین در این مطالعه محتوی پراکسید هیدروژن، رنگیزه‌های برگ (کلروفیل و کاروتنوئیدها)، میزان پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها، ترکیبات فنلی، محتوی پرولین و آمینواسیدهای آزاد و همچنین محتوی قندهای محلول در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش خشکی بررسی گردید و نقش پیش تیمار سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان ترکیب رهاکننده NO، در کاهش تنش اکسیداتیو تحت این شرایط مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، گیاه گوجه‌فرنگی *Lycopersicun esculentum* واریته Alicante بود. بذرهای گیاه مورد نظر از کمپانی تامپسون و مورگان کشور انگلستان تهیه شد. بذرهای گیاه گوجه‌فرنگی در خزانه‌های حاوی گیاه خاک خالص[1] کشت، و روزانه آبیاری شدند. پس از این‌که برگ‌های لپه‌ای کاملاً توسعه پیدا کردند، هفته‌ای یک‌بار با محلول غذایی[2] با رقت۱/۲ آبیاری شدند. گیاهان پس از ٤ هفته رشد برای تیمار مورد استفاده قرار گرفتند. خزانه‌های حاوی گیاهان در اتاق کشت با دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد، شب/ روز و دوره نوری ۱٦/۸ ساعت تاریکی/ نور قرار گرفتند. رطوبت نسبی ٤۵ درصد، و شدت نور در سطح گیاه تقریباً ۱۰۰۰۰ لوکس بود.

**نحوه اعمال تیمارها:** گیاهان پس از ٤ هفته رشد برای اعمال تیمار از خزانه خارج، و در شیشه‌های حاوی محلول غذایی قرار گرفتند. به‌منظور تطابق با شرایط جدید این گیاهان ۲٤ ساعت در محلول غذایی قرار داده شدند و پس از ۲٤ ساعت تیمارها اعمال گردید. در زمان اعمال تیمارها، محلول غذایی شیشه‌ها روزانه تعویض شد. برای اعمال تیمار گیاهان در ۸ گروه قرار گرفته و برگ گیاهان به‌مدت دو روز به‌صورت یک روز در میان با محلول‌های زیر اسپری شدند.

1- Compost
2- Long-Ashton

Archive of SID

www.SID.ir

گروه ۱: آب مقطر

گروه ۲: محلول ۱۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید (SNP)

گروه ۳: محلول ۲۰۰ میکرومولار محلول پالاینده[1] NO، (PTIO)[2]

گروه ٤: محلول ۱۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید + محلول ۲۰۰ میکرومولار محلول پالاینده NO

گروه ٥: آب مقطر + تنش خشکی

گروه ٦: محلول ۱۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید (SNP) + تنش خشکی

گروه ۷: محلول ۲۰۰ میکرومولار محلول پالاینده NO + تنش خشکی

گروه ۸: محلول ۱۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید + محلول ۲۰۰ میکرومولار محلول پالاینده + تنش خشکی

با توجه به اینکه در روش اسپری کردن گاز NO در محیط رها می‌شد، برای تیمارهای مربوط به SNP از محفظه‌های شیشه‌ای دربسته که نشت بسیار کمی داشتند استفاده شد. برای یکسان‌سازی شرایط تیمار، سایر گیاهان نیز در محفظه‌های شیشه‌ای جداگانه با محلول‌های دیگر تیمار شدند.

در ضمن در همه تیمارها از توین ۰/۰۱ درصد به‌عنوان روکنش‌گر[3] استفاده گردید. در مورد تیمارهای گروه‌های ٥، ٦، ۷ و ۸ پس از دو نوبت پیش تیمار محلول‌های مورد نظر، در روز سوم گیاهان پیش تیمار شده در گروه‌های مختلف برای اعمال تنش خشکی آماده گردیدند. به‌منظور اعمال تنش خشکی گیاهان در محلول ۱۱/۲ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ٦۰۰۰، (PEG6000) (تقریباً معادل 0.2MPa) قرار داده شدند. پس از ۲٤ ساعت اعمال تنش خشکی، برگ‌های همه گیاهان در نیتروژن مایع فریز گردیدند و برای اندازه‌گیری‌های بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

**سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها:** اندازه‌گیری غلظت مالون دآلدئید به روش هیت و پاکر (۱۹٦۸) انجام گردید. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تازه برگی در هاون چینی حاوی ٥ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره به‌دست آمده به‌مدت ٥ دقیقه در ۱۰۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. از فاز رویین برای اندازه‌گیری MDA[4] به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون استفاده شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $Cm^{-1}$ $M^{-1}$ ۱/٥٥×۱۰$^{٥}$ استفاده، و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب وزن خشک محاسبه و ارائه گردید.

**اندازه‌گیری مقدار پراکسیدهیدروژن:** مقدار پراکسیدهیدروژن براساس واکنش پراکسیدهیدروژن با یدور پتاسیم (KI) انجام گردید. در این روش ۰/٥ گرم از بافت تازه برگ در TCA ۰/۱ درصد سرد سائیده شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱٥ دقیقه در ۱۲۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. سپس به ٥۰۰ میکرولیتر از محلول رویی، ٥۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۲ میلی‌لیتر یدور پتاسیم ۱ مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به‌مدت ۱ ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نور نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت پراکسیدهیدروژن از منحنی استاندارد استفاده گردید (الکسیوا و همکاران، ۲۰۰۱).

**اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی:** سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید از روش لیچتنتالر (۱۹۸۷) انجام گردید. غلظت رنگیزه‌های گیاهی با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه شد.

$$Chl.a = (۱۲/۲٥A_{٦٦۳/۲} - ۲/۷۹A_{٦٤۸/۸}) \quad (۱)$$

$$Chl.b = (۲۱/۲A_{٦٤٦/۸} - ٥/٤A_{٦٦۳/۲}) \quad (۲)$$

$$Chl.T = Chl.a + Chl.b \quad (۳)$$

$$Car = [(۱۰۰۰A_{٤۷۰} - ۱/۸Chl.a - ۸٥/۰۲Chl.b)/۱۹۸] \quad (٤)$$

در این رابطه Chl.a، Chl.b، Chl.T و Car به‌ترتیب غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (شامل کاروتن و گرانتوفیل) می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از

1- NO Scavenger
2- 4,4,5,5, Tetramethylimidazoline-1oxyl-3-oxide
3- Surfactant
4- Malondialdehyde

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب گرم وزن خشک محاسبه و ارائه گردید.

**اندازه‌گیری اکسیداسیون پروتئین‌ها:**

**اندازه‌گیری گروه‌های کربونیل باند شده به پروتئین:** ۰/۲ گرم برگ تر گیاه در ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/٤) حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA[1] سائیده شد. عصاره به‌دست آمده به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید و از محلول رویی برای سنجش مقدار گروه‌های کربونیل استفاده شد. برای محاسبه غلظت گروه‌های کربونیل از ضریب خاموشی معادل $M^{-1}\ Cm^{-1}$ ۲۲۰۰۰ (برای آلیفاتیک هیدرازون) استفاده گردید.

در این آزمایش جذب هر نمونه در مقابل شاهد خودش خوانده شد و نتایج بر حسب میکرومول کربونیل برگرم پروتئین گزارش گردید (لوین و همکاران، ۱۹۹٤).

**اندازه‌گیری محتوای گروه‌های تیول کل (TT) و تیول‌های پروتئینی (PT) و غیرپروتئینی (NPT):** ۰/۲ گرم از بافت تر برگ در ٤ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲ مولار EDTA سائیده شد. عصاره گیاهی به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ گرم و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار سانتریفوژ گردید. از محلول رویی به‌دست آمده از سانتریفوژ برای اندازه‌گیری گروه‌های تیول استفاده شد.

برای اندازه‌گیری گروه‌های تیول کل، به ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی ۲/٦ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=۸/۲) و ۱۰۰ میکرولیتر (DTNB)[2] ۱۵ میلی‌مولار اضافه گردید. سپس حجم مخلوط با اضافه کردن ٦/۱ میلی‌لیتر متانول خالص به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده، و پس از ۱۵ دقیقه و تشکیل محلول رنگی، جذب آن در ٤۱۲ نانومتر خوانده شد.

برای اندازه‌گیری گروه‌های تیول غیرپروتئینی (NPT)، ۲ میلی‌لیتر از محلول حاصل از سانتریفوژ با ۱/٦ میلی‌لیتر آب مقطر و ٤۰۰ میکرولیتر TCA ۵۰ درصد مخلوط گردید. محتوای لوله‌ها با ورتکس خوب به‌هم زده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفته و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ گرم سانتریفوژ شدند. ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی به‌دست آمده از سانتریفوژ با ۲/٦ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۵۰ میلی‌مولار (pH=۸/۹) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ میلی‌مولار DTNB مخلوط و شدت جذب در ٤۱۲ نانومتر به‌مدت ۵ دقیقه در مقابل شاهد اندازه‌گیری گردید. غلظت گروه‌های سولفیدریل با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}Cm^{-1}$ ۱۳/۱ محاسبه گردید. مقدار تیول‌های باند شده به پروتئین از کم کردن مقدار تیول‌های غیرپروتئینی از تیول‌های کل حاصل می‌شود (المن، ۱۹۵۹).

**سنجش مقدار پروتئین کل:** محتوای پروتئین کل با روش برادفورد و استفاده از آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (برادفورد، ۱۹۷٦).

**سنجش محتوای فنل‌های محلول:** محتوای فنل‌های محلول کل با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری گردید (گائو و همکاران، ۲۰۰۰). ۰/۱ گرم از بافت گیاهی در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد سائیده شد. عصاره به‌دست آمده به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای اتاق قرار داده، و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. محلول رویی برای سنجش فنل‌های محلول استفاده شد. برای محاسبه غلظت فنل‌های محلول از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده گردید.

**اندازه‌گیری مقدار پرولین:** مقدار پرولین با استفاده از معرف نین‌هیدرین و براساس روش بیتس (۱۹۷۳) اندازه‌گیری گردید.

**اندازه‌گیری مقدار آمینواسیدهای آزاد (FAA):** محتوی آمینواسیدهای آزاد با روش رنگ‌سنجی و استفاده از معرف نین‌هیدرین اندازه‌گیری شد.

۰/۲ گرم بافت تازه برگی در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم سرد ۵۰ میلی‌مولار (pH=٦/۸) سائیده شد. هموژنه

1- Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
2- 5,5-Dithio-Bis (2-Nitrobenzoic acid)

Archive of SID

www.SID.ir

گیاهی به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۸۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. از محلول رویی برای سنجش آمینواسیدهای آزاد استفاده، و برای محاسبه مقدار آمینواسیدهای آزاد از منحنی استاندارد گلیسین استفاده شد (هوانگ و ادرر، ۱۹۷۵).

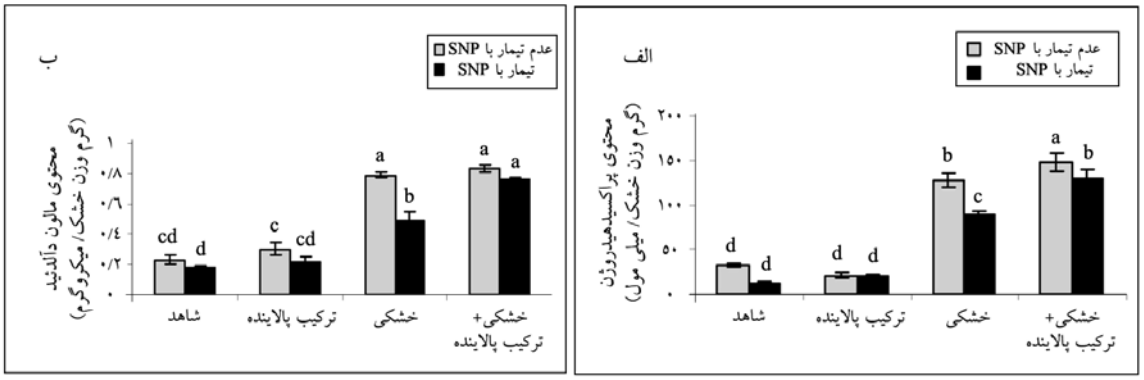
**اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول:** محتوای قند محلول نمونه‌ها با استفاده از معرف آنترون و براساس روش رو (۱۹۵۵) تعیین گردید. ۰/۱ گرم بافت تر برگ در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت و کربوهیدرات‌های محلول استخراج شدند. عصاره به‌دست آمده با استفاده از کاغذ صافی صاف، و سپس الکل آن تبخیر شد. رسوب حاصل در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در یک لوله آزمایش ریخته، و ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون به آن اضافه گردید. پس از مخلوط شدن به‌مدت ۱۷ دقیقه در بن ماری ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار قند از منحنی استاندارد گلوکز استفاده گردید.

**تجزیه و تحلیل آماری:** تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری طبق طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت و تمام آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها تحت آنالیز واریانس یک‌طرفه قرار گرفتند و اختلاف میانگین داده‌ها با آزمون دانکن (۰/۰۵≥ سطح معنی‌دار) مقایسه شدند.

## نتایج

نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری پراکسیدهیدروژن در شکل شماره ۱- الف نشان داده شده است. تنش خشکی ناشی از تیمار با پلی‌اتیلن‌گلیکول سبب افزایش قابل‌توجهی در مقدار پراکسیدهیدروژن در مقایسه با گیاه شاهد شد و پیش تیمار گیاه با سدیم نیتروپروساید اثر معنی‌داری در کاهش آن تحت شرایط خشکی داشت. پیش تیمار SNP توأم با PTIO اثر SNP را در کاهش مقدار پراکسیدهیدروژن کم کرد.

مقدار مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در این پژوهش اندازه‌گیری شده است. همان‌طور که در شکل ۱- ب نشان داده شده مقدار مالون دی‌آلدئید تحت تنش خشکی افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشت و پیش تیمار SNP این مقدار را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. در حالی‌که پیش تیمار با SNP+PTIO نتوانست کاهش قابل‌توجهی را در پراکسیداسیون لیپید، در مقایسه با گیاهانی که با SNP تنها پیش تیمار شده بودند، ایجاد کند.




**شکل ۱- اثر پیش تیمار سدیم نیتروپروساید (SNP) بر مقدار پراکسیدهیدروژن (الف) و پراکسیداسیون لیپید (ب) در گیاهچه گوجه‌فرنگی تحت تنش کم‌آبی. داده‌ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک عاملی تجزیه شده و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن (۰/۰۵≥ سطح معنی‌دار) مقایسه شدند.**

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج به‌دست آمده از تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار SNP بر رنگیزه‌های فتوسنتزی در شکل ۲ نشان داده شده است. در این مطالعه در مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تنش خشکی تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. پیش تیمار SNP نیز تأثیر معنی‌داری بر کلروفیل a (شکل ۲- الف)، کلروفیل b (شکل ۲- ب) و کاروتنوئیدها (شکل ۲- د) در گیاهچه گوجه تحت شرایط کنترل و تنش نداشت. تنها در گیاهک‌های شاهد، SNP باعث افزایش معنی‌دار کلروفیل کل شد (شکل ۲- ج).

نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که تنش خشکی ایجاد شده توسط پلی‌اتیلن گلیکول سبب اکسیداسیون پروتئین‌ها گردید (شکل ۳). همان‌طور که در شکل ۳- الف نشان داده شده، مقدار گروه‌های کربونیل در گیاهان تیمار شده با SNP در شرایط تنش خشکی کمتر از گیاهان بدون SNP تحت این شرایط بود. استفاده از PTIO توأم با SNP باعث کاهش اثر SNP گردید.

اکسیداسیون گروه‌های تیول پروتئینی و غیرپروتئینی نیز از دیگر شاخص‌های صدمات اکسیداتیو به پروتئین‌هاست. در این پژوهش غلظت تیول پروتینی، تیول غیرپروتئینی و تیول کل در شرایط خشکی کاهش معنی‌داری نسبت به شرایط کنترل نشان داد (شکل ۳- ب، ج و د).

تیول‌های پروتئینی حدود ۵۰ درصد و تیول‌های غیرپروتئینی حدود ۳۵ درصد نسبت به کنترل کاهش یافتند. پیش تیمار گیاهان با SNP باعث افزایش تیول‌های پروتئینی و تیول‌های غیرپروتئینی گردید. وقتی SNP همراه با PTIO به‌عنوان پیش تیمار استفاده گردید، اثر SNP را در شرایط تنش کاهش داده و محتوی تیول در این گیاهان در مقایسه با گیاهانی که فقط با SNP پیش تیمار شده بودند کمتر بود. پروتئین‌های محلول نیز در شرایط تنش کاهش یافتند (شکل ۳- ه). پیش تیمار SNP بر مقدار پروتئین‌ها در شرایط کنترل و تنش تأثیری نداشت.

تحت تنش خشکی افزایش چشم‌گیری در مقدار فنل‌های محلول مشاهده گردید (شکل ٤- الف).

پیش تیمار SNP یا SNP+PTIO در شرایط کنترل تأثیر معنی‌داری در مقدار این ترکیبات نداشت اما در شرایط تنش، پیش تیمار با SNP مقدار فنل‌های محلول را افزایش داد. کاربرد PTIO همراه با SNP اثر SNP را کاهش داد.

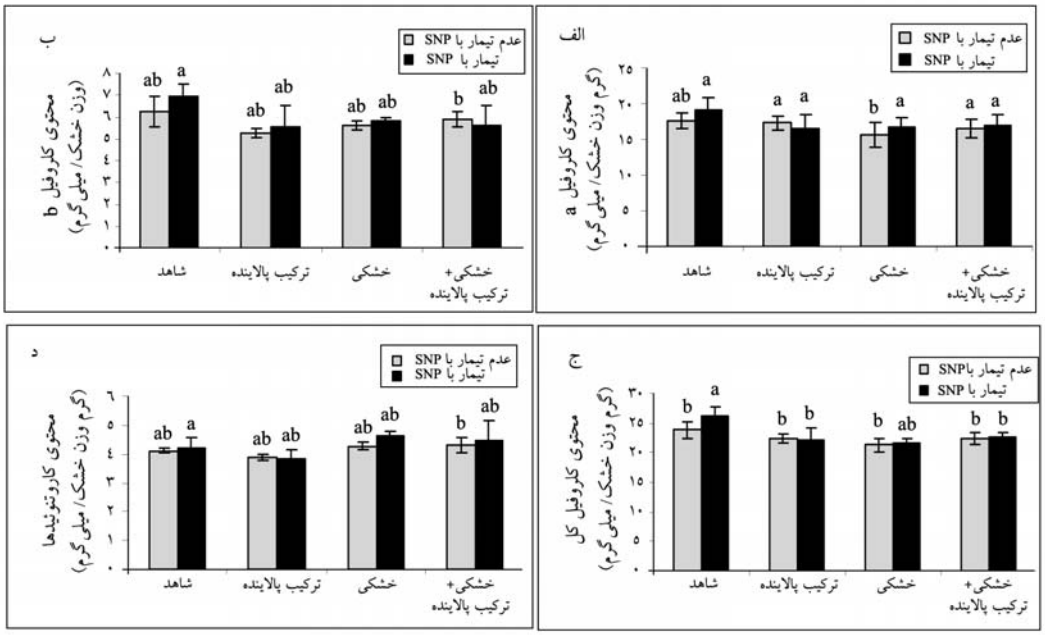
نتایج به‌دست آمده از سنجش پرولین نشان داد که مقدار پرولین گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی، تحت تنش افزایش معنی‌داری در مقایسه با گیاهچه‌های کنترل داشت (شکل ٤- ب). پیش تیمار گیاهچه‌ها با SNP باعث افزایش محتوی پرولین در شرایط تنش خشکی گردید اما استفاده از PTIO توأم با SNP مقدار پرولین را در مقایسه با گیاهانی که فقط SNP دریافت کرده بودند کاهش داد.

محتوی اسیدهای آمینه آزاد در گیاهان تحت تنش خشکی در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت اما پیش تیمار SNP یا SNP+PTIO تأثیر معنی‌داری در مقدار اسیدهای آمینه آزاد در شرایط شاهد و تنش نداشت (شکل ٤- ج).

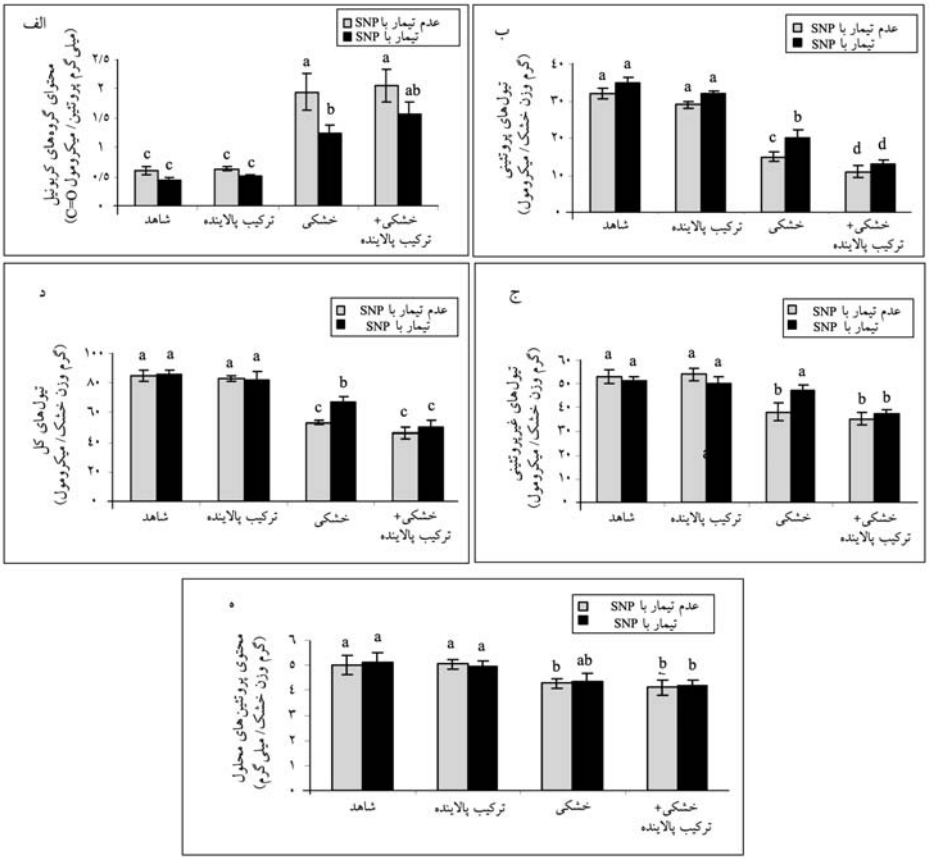
نتایج به‌دست آمده از سنجش قندهای محلول در شکل ٤- د آورده شده است. همان‌طور که در شکل نشان داده شده تنش خشکی باعث افزایش تقریباً دو برابری مقدار قندهای محلول گردیده است. پیش تیمار SNP تنها یا هم‌زمان با PTIO اثر معنی‌داری بر مقدار قندها در شرایط خشکی نداشت.

Archive of SID

www.SID.ir

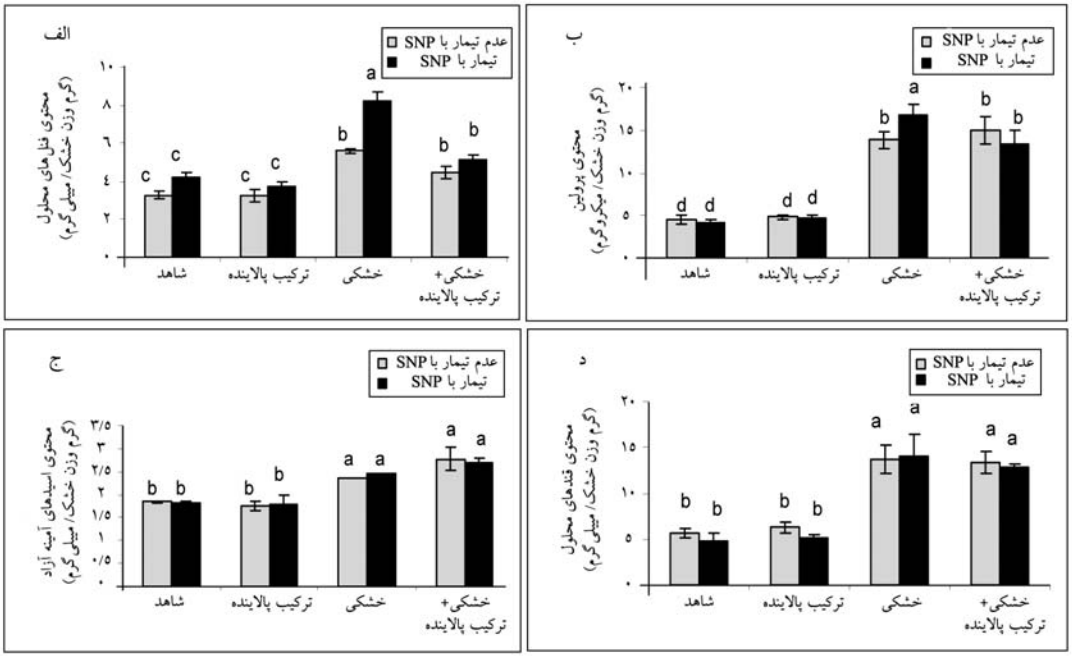



**شکل ۲- اثر پیش تیمار سدیم نیتروپروساید (SNP) بر محتوی کلروفیل a (الف)، کلروفیل b (ب)، کلروفیل کل (ج) و کاروتنوئیدها (د) در گیاهچه گوجه‌فرنگی تحت تنش کم‌آبی. داده‌ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک عاملی تجزیه شده و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن (۰/۰۵≥ سطح معنی‌دار) مقایسه شدند.**




**شکل ۳- اثر پیش تیمار سدیم نیتروپروساید (SNP) بر محتوای گروه کربونیل (الف)، گروه‌های تیول پروتئینی (ب)، گروه‌های تیول غیرپروتئینی (ج)، گروه‌های تیول کل (د) و پروتئین (ه) در گیاهچه گوجه‌فرنگی تحت تنش کم‌آبی. داده‌ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک عاملی تجزیه شده و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن (۰/۰۵≥ سطح معنی‌دار) مقایسه شدند.**

www.SID.ir




**شکل ٤- اثر پیش تیمار سدیم نیتروپروساید (SNP) بر محتوای فنل‌های محلول (الف)، مقدار پرولین (ب)، محتوی اسیدهای آمینه آزاد (ج) و مقدار قندهای محلول (د) گیاهچه گوجه‌فرنگی تحت تنش کم‌آبی. داده‌ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک عاملی تجزیه شده و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن (۰/۰۵≥ سطح معنی‌دار) مقایسه شدند.**

## بحث و نتیجه‌گیری

گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان می‌دهند تنش خشکی علاوه‌بر اثرات اولیه که بر متابولیسم سلول دارد با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) ایجاد تنش ثانویه اکسیداتیو نیز می‌نماید (اسمیرنف، ۱۹۹۳؛ ژنگ و کیرخام، ۱۹۹۵). در این پژوهش SNP به‌عنوان دهنده NO و PTIO به‌عنوان پالاینده و جمع‌کننده NO برای مطالعه نقش NO بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه گوجه‌فرنگی تحت تنش خشکی استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده از این بررسی نشان داد که مقدار پراکسید هیدروژن گیاهانی که تحت تنش خشکی بوده‌اند تقریباً ٦ برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود (شکل ۱- الف) و این بیانگر این مطلب است که تنش خشکی اعمال شده، سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان گردیده است. در شرایط عادی رشد، بسیاری از فرآیندهای متابولیکی در گیاهان باعث تولید ROS می‌شوند اما گیاهان مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی کارآمدی برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن دارند (ایتوربی- ارماتکس و همکاران، ۱۹۹۸). تحت شرایط تنش این تعادل به‌هم خورده و مقدار گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابند. حضور این گونه‌های فعال برای گیاه مضر بوده و موجب آسیب به ساختارهای سلولی مثل غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (لاسپینا و همکاران، ۲۰۰۵). افزایش مقدار پراکسید هیدروژن تحت شرایط تنش خشکی در این مطالعه نیز احتمالاً نتیجه اختلال در این تعادل است. پیش تیمار گیاهان با SNP به‌عنوان رهاکننده NO، مقدار پراکسید هیدروژن را به‌میزان معنی‌داری کاهش داد. اما استفاده توأم از SNP+PTIO اثر SNP را بر کاهش مقدار پراکسید هیدروژن، کم کرد. این مطلب نشان‌دهنده این است که NO نقش مستقیمی در برطرف کردن $H_2O_2$ تحت شرایط تنش خشکی دارد، زیرا با به‌کار بردن PTIO و حذف NO از محیط $H_2O_2$ افزایش می‌یابد. افزایش مقدار مالون دآلدئید (MDA) به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید نیز مؤید تنش اکسیداتیو تحت شرایط خشکی است (شکل ۱- ب). نتایج به‌دست آمده از

Archive of SID

www.SID.ir

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها نیز اثر تخفیفی SNP در کاهش میزان MDA در گیاهچه‌های تحت تنش خشکی را نشان داد (شکل ۱- ب). در شرایط تنش خشکی محتوی MDA در گیاهانی که با SNP+PTIO پیش تیمار شده بودند بیشتر از گیاهانی بود که فقط با SNP پیش تیمار شده بودند. این اثر نیز نقش مستقیم NO در کاهش پراکسیداسیون لیپید را تأیید می‌کند. نقش NO در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها مربوط به توانایی NO در واکنش با رادیکال‌های آلکوکسیل (LO) و پراکسیل (LOO) و در نتیجه توقف زنجیره پراکسیداسیون لیپیدها است (بلیگنی و لاماتینا، ۱۹۹۹b)، که با نتایج ما در این آزمایش مطابقت دارد. نتایج به‌دست آمده از آنالیز رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که مقادیر کلروفیل a و b تحت شرایط تنش تغییر معنی‌داری نداشته و اگرچه پیش تیمار SNP باعث افزایش این رنگیزه‌ها گردید، اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. کاهش مقدار رنگیزه‌های گیاهی در بسیاری از گونه‌ها تحت تنش خشکی گزارش شده است (ایتوربی- ارماتکس و همکاران، ۱۹۹۸) و احتمالاً در این مطالعه چون تنش به‌صورت شوک اسمزی اعمال شده تأثیر معنی‌داری در مقدار رنگیزه‌ها در این زمان کوتاه نداشته است. اکسیداسیون پروتئین‌ها نیز مانند پراکسیداسیون لیپیدها از اصلی‌ترین صدمات اکسیداتیوی و جزو شاخص‌های اولیه تنش اکسیداتیو محسوب می‌گردد (شارما و دوبی، ۲۰۰۵). افزایش گروه‌های کربونیل و کاهش در غلظت تیول‌ها به‌خصوص تیول‌های پروتئینی در گیاهچه‌های گوجه تحت تنش نشان‌دهنده آسیب به پروتئین‌ها تحت تنش خشکی است و به‌نظر می‌رسد پیش تیمار گیاهان با SNP نقش به‌سزایی در حفاظت پروتئین‌ها تحت تنش داشته است. خشکی با تولید رادیکال‌های سوپراکسید و یا هیدروکسیل باعث اکسیداسیون اسیدهای آمینه به گروه‌های کربونیل شده و به پروتئین‌ها آسیب وارد می‌کند. پروتئین‌های تغییر شکل یافته احتمالاً بیشتر تحت‌تأثیر پروتئازها قرار می‌گیرند و واسرشت[1] می‌شوند (موران و همکاران، ۱۹۹٤). کاهش غلظت گروه‌های تیول پروتئینی همچنین نشان‌دهنده اکسیداسیون پروتئین‌ها توسط گونه‌های فعال اکسیژن است (تاکدا و همکاران، ۱۹۹۵). لوگینی و همکارانش (۱۹۹۹) گزارش کردند که خشکی در گندم سبب افزایش گروه‌های کربونیل و کاهش تیول‌های پروتئینی گردیده است. گروه‌های تیول غیرپروتئینی به‌عنوان گروه‌های عملکردی آنتی‌اکسیدانی هستند که گلوتاتیون و سیستئین از مهم‌ترین آنهاست (یوسفیان و همکاران، ۲۰۰۱). در بررسی‌های پیشین گزارش شده است که پراکسید هیدروژن حتی در غلظت‌های بسیار پایین باعث اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل آنزیم‌های چرخه کلوین مثل گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز و فروکتوز بیس فسفاتاز، در کلروپلاست شده و فعالیت آنها را باز می‌دارد (تاکدا و همکاران، ۱۹۹۵). در این مطالعه نیز افزایش پراکسید هیدروژن تحت تنش خشکی کاملاً معنی‌دار است و شاید افزایش اکسیداسیون پروتئین‌ها به همین دلیل باشد. نقش NO در کاهش تنش اکسیداتیو احتمالاً مربوط به توانایی NO در القاء آنزیم SOD و تبدیل یون سوپراکسید به پراکسیدهیدروژن و اکسیژن مولکولی است که در حفاظت سلولی بسیار مهم می‌باشد زیرا آنیون سوپراکسید بسیار سمی و واکنش‌پذیر است و قابلیت تبدیل به سایر گونه‌های سمی را نیز دارا می‌باشد (شی و همکاران، ۲۰۰۷). نیتریک اکسید با تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن این آنیون را از سلول حذف می‌کند و از طرفی دیگر با القاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل آنزیم آسکوربات پراکسیداز، سمیت آب اکسیژنه را نیز کاهش می‌دهد (کوپیرا و گوژز، ۲۰۰۳). نیتریک اکسید رها شده از SNP، همچنین می‌تواند به‌طور مستقیم با آنیون سوپراکسید ترکیب شده و تولید رادیکال پراکسی نیتریت ($ONOO^-$) کند که سمیت و خسارات آن به سلول‌ها بسیار کمتر از رادیکال‌های اکسیژن است (بلیگنی و لاماتینا، ۱۹۹۹b). بنابراین کاهش در مقدار

1- Denature

Archive of SID

www.SID.ir

پروتئین‌های تحت تنش خشکی نیز که در شکل ۳-۵ دیده می‌شود، بازگوکننده همین صدمات اکسیداتیوی به پروتئین‌هاست و افزایش مقدار پروتئین‌ها در گیاهچه‌های پیش تیمار شده با SNP می‌تواند به‌دلیل کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از خشکی و هم به‌دلیل القاء سنتز برخی آنزیم‌ها مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد.

نتایج به‌دست آمده از آنالیز فنل‌های محلول نشان داد که خشکی باعث افزایش مقدار فنل‌های محلول می‌گردد و پیش تیمار SNP در تنش خشکی این مقدار را افزایش می‌دهد (شکل ٤- الف). افزایش مقدار این ترکیبات احتمالاً به‌دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی آنها در برابر ROSهاست. بسیاری از ترکیبات فنلی از پالاینده‌های بسیار کارآمد پراکسیدهیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسیل می‌باشند و به همین دلیل می‌توانند متوقف‌کننده زنجیره پراکسیداسیون لیپید و باعث ثبات غشاها باشند (یاماساکی و همکاران، ۱۹۹۷؛ چانگ و همکاران، ۲۰۰۲). در این واکنش فنل‌های محلول به رادیکال فنوکسیل اکسیده می‌شوند که این رادیکال‌ها توسط آسکوربات دوباره احیا می‌گردند. آسکوربات اکسیدشده توسط سیکل آسکوربات- گلوتاتیون دوباره بازسازی می‌گردد (یاماساکی و همکاران، ۱۹۹۷).

پرولین اسید آمینه کلیدی در تنظیم اسمزی است، علاوه‌بر این پرولین منبع نیتروژن و کربن برای رشد و ترمیم گیاه و یک پالاینده رادیکال‌های آزاد نیز محسوب می‌شود (نایار، ۲۰۰۳). تجمع پرولین آزاد در پاسخ به بسیاری از تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان گزارش شده است (دلاونی و ورما، ۱۹۹۳). در بررسی اثر خشکی بر گیاهچه گوجه‌فرنگی نیز مقدار پرولین در شرایط تنش تقریباً ٤ برابر شد (شکل ٤- ب). تجمع پرولین تحت شرایط تنش هم بستگی به فعالیت بیوسنتزی و هم توقف فعالیت کاتابولیسمی آن دارد (دلاونی و ورما، ۱۹۹۳). پیش تیمار SNP باعث افزایش مقدار پرولین تحت تنش شده است که این امر می‌تواند به‌دلیل افزایش سنتز پرولین باشد زیرا در مطالعات قبلی القاء و افزایش فعالیت آنزیم پیرولین ۵- کربوکسیلات سنتتاز (P5Cs) در مسیر سنتز پرولین توسط NO در گندم تحت تنش خشکی (لی و همکاران، ۲۰۰۷) گزارش شده است. افزایش این آنزیم می تواند یکی از دلایل افزایش پروتئین مشاهده شده در این پژوهش باشد.

قندهای محلول از دیگر اسمولیت‌های مهمی هستند که افزایش آن در پاسخ به تنش خشکی گزارش شده است. نتایج ضد و نقیضی در مورد اثر تنش خشکی و شوری بر تجمع قند در گیاهان وجود دارد. برخی محققان گزارش کرده‌اند که محتوای قند تحت تنش افزایش می‌یابد (جونز و ترنر، ۱۹۸۰)، برخی دیگر معتقدند که محتوای قند کاهش می‌یابد (هانسون و هیتز، ۱۹۸۲) و یا ثابت باقی می‌ماند (مورگان، ۱۹۹۲). در این بررسی افزایش محتوای قندهای محلول تحت تنش خشکی مشاهده شد که احتمالاً به‌دلیل هیدرولیز نشاسته و افزایش قندهای محلول حاصل از آن است. پیش تیمار SNP در این مطالعه اثر معنی‌داری بر مقدار قندهای محلول در گیاهان شاهد و تحت تنش نداشت و به‌نظر می‌رسد که NO نقش مستقیمی در بیوسنتز قندها در شرایط تنش ندارد.

از بررسی‌های انجام شده و نتایج به‌دست آمده از آن به‌نظر می‌رسد که خشکی ایجاد شده توسط PEG در این بررسی سبب ایجاد خساراتی به گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی گردیده است و به‌نظر می‌رسد که بیشتر خسارات ناشی از خشکی مربوط به تجمع رادیکال‌های اکسیژن و تنش اکسیداتیو باشد. NO حاصل از پیش تیمار SNP، بیشتر بر پارامترهای اکسیداتیو مؤثر بوده و با اثر بر مقدار ROSها و کاهش آنها صدمات ناشی از این گونه‌های فعال را کاهش داده است اما بر سایر پارامترهایی که در ارتباط با متابولیسم سلولی و افزایش اسمولیت‌ها می‌باشند بی‌اثر بوده و یا اثر بسیار کمی داشته است. بررسی‌های بیشتر در مورد مکانیسم اثر NO بر گیاهان و مقاومت آنها به خشکی لازم است و یافته‌های به‌دست آمده از این مطالعات می‌تواند منجر به تولید گیاهان ترانسژن مقاوم به خشکی گردد. به‌تازگی بر تولید گیاهان ترانسژن که دارای بیان بالای آنزیم‌های مسیر سنتز نیتریک اکسید هستند، به‌عنوان گیاهان مقاوم به تنش تاکید شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

## منابع


1.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. Environ. 24: 1337-1344.

2.Bates, L.S. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39: 205-207.

3.Beligni, M.V., and Lamatina, L. 1999a. Nitric oxide counteract cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. Planta. 208: 337-344.

4.Beligni, M.V., and Lamatina, L. 1999b. Is nitric oxide toxic or protective? TRENDS. Plant. Sci. 4: 299-300.

5.Beligni, M.V., and Lamattina, L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. Planta. 210: 215-221.

6.Bohner, H.J., and Jensen, R.G. 1996. Strategies for engineering water- stress tolerance in plants. Trends. Biotech. 14: 89-97.

7.Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

8.Chang, W.C., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., and Kim, S.K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant. Sci. 163: 1161-1168.

9.Delauney, A.J., and Verma, D.P.S. 1993. Proline biosynthesis and degradation in plants. Plant. J. 4: 215-223.

10.Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. Nature. 394: 585-588.

11.DelRio, L.A., Corpas, F.J., and Barroso, J.B. 2004. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. Phytochem. 65: 783-792.

12.Ellman, G.l. 1959. Tissue sulfydryl groups. Arch.Biochem. Biophys. 82: 70-77.

13.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.

14.Fu, J., and Huang, B. 2001. Involvement of antioxidant and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Env. Exp. Bot. 45: 105-114.

15.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. J. Agri. Food Chem. 48: 1458-1490.

16.Hanson, A.D., and Hitz, W.D. 1982. Metabolic responses of plant water deficit. Annu. Rev. Plant. Physiol. 23: 163-203.

17.Heath, R.L., and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophy. 125: 189-198.

18.Hwang, M., and Ederer, G.M. 1975. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. J. Clin. Microbiol. 1: 114-117.

19.Iturbe-ormaetxe, I., Escuredo, P.R., Arrese-Igor, C., and Becana, M.1998. Oxidative damage in pea plant exposed to water deficit or paraquat. Plant. Physiol. 116: 173-181.

20.Jones, M.M., and Turner, N.C. 1980. Osmotic adjustment in expanding and fully expanded leaves of sunflower in response to water deficits. Aust. J. Plant. Physiol. 7: 181-192.

21.Kolbert, Z., Bartha, B., and Erdel, L. 2005. Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* and *Petroselinum crispum* plants under osmotic and drought stress. Acta. Biologica. Szegediensis, 46: 13-16.

22.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 Physiol. Biochem. 41: 1011-1017.

23.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 Sci. 169: 323-330.

24.Lei, Y., Yin, C., Ren, J., and Li, C. 2007. Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. Biol. Plant. 51: 386-390.

25.Levine, R.L., Willians, J.A., Stadtman, E.R., and Shacter, E. 1994. Carbonyl assay for determination of oxidative modified proteins. Method. Enzym. 233: 346-363.


Archive of SID

www.SID.ir

26. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Method Enzym. 148: 350-382.
27. Loggini, B., Scartazza, A., Brugnol, E., and Navari-Lzzo, F. 1999. Antioxidativ defense system, Pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. Plant. Physiol. 119: 1091-1099.
28. Mackerness, S., John, C.F., Jordan, B., and Thomas, B. 2001. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. FEB. Lett. 489: 237-242.
29. Mata, C.G., and Lamattina, L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. Plant. Physiol. 126: 1196-1204.
30. Monakhova, O.F., and Chernyad′ev, I.I. 2002. Protective role of kartolin-4 in wheat plants exposed to soil drought. App. Biochem.Microbiol. 38: 373-380.
31. Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V., and Aparicio-Tejo, P. 1994. Drought induces oxidative stress in pea plants. Planta. 194: 346-352.
32. Morgan, J.M. 1992. Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat. Aust. J. Plant. Physiol. 19: 67-76.
33. Nayyar, H. 2003. Acclimation of osmolytes and osmotic adjastmant in water-stressed wheat and maiz as affected by calcium and its antagonists. Env. Exp. Bot. 50: 253-264.
34. Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., and Hancock, J.T. 2002b. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. J. Exp. Bot. 53: 1237-1242.
35. Roe, J.H. 1955. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. J. Biol. Chem. 212: 335-343.
36. Sharma, P., and Dubey, R.S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant. Growth. Regul. 46: 209-221.
37. Shi, Q., Ding, F., Wang, X., and Wei, M. 2007. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. Plant. Physiol. Biochem. Pp: 1-9.
38. Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytol. 125: 27-58.
39. Takeda, T., Yokota, A., and Shigeoka, S. 1995. Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae. Plant. Cell. Physiol. 36: 1089-1095.
40. Tian, X., and Li, Y. 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biol. Plant. 50: 775-778.
41. Tu, J., Shen, W.B., and Xu, L.L. 2003. Regulation of nitric oxide on the aging process of wheat leaves. Act. Bot. Sin. 45: 1055-1062.
42. Xing, H., Tan, L., An, L., Zhao, Z., Wang, S., and Zhang, C. 2004. Evidence for involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: Inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. Plant. Growth. Regul. 42: 61-68.
43. Yamasaki, H., Sakihama, Y., and Ikehara, N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against $H_2O_2$. Plant Physiol. 115: 1405-1412.
44. Youssefian, S., Nakamura, M., Orudgev, E., and Kondo, N. 2001. Increased cysteine biosynthesis capacity of transgenic tobacco overexpressing an O-acetylserine (thiol) lyase modifies plant responses to oxidative stress. Plant Physiol. 126: 1001-1011.
45. Zhang, J., and Kirkham, M.B. 1995. Water relations of water-stressed, split-root $C_4$ (sorghum bicolor; Poaceae) and $C_3$ (Helianthus annus; Asteraceae) plants. Am. J. Bot. 82: 1220-1229.

Archive of SID

www.SID.ir

*J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 16(Special issue 2), 2009*
*www.jasnr.info*
*www.sid.ir*
*www.magiran.com/jasnr*

# The effect of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on some biochemical parameters in tomato seedlings (*Lycopersicun esculentum*) under drought stress

**[*]F. Nasibi[1], Kh. Manoochehri Kalantari[2] and M. Khodashenas[3]**
[1]Ph.D. Student, Dept. of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, [2]Professor, International Center for Science, High Technology and Environmental Sciences, [3]M.Sc., Kerman Natural Resource Research Center

**Abstract**

Drought stress is a major environmental constraint which inhibits the growth of plants and limits crop production. Nitric oxide (NO) is a relatively stable free radical gas which may act as a key signaling molecule in plants and mediates various physiological, pathophysiological and developmental processes and recently it has been suggested that it is involved in plant response to environmental stress. In this research sodium nitroprusside (SNP) was used as NO donor and 4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxy l-3-oxide (PTIO) was used as a NO scavenger for 2 days in control and drought stressed plants, and the role of NO on some biochemical responses of *Lycopersicun* seedlings to drought stress was investigated. Data in this study showed that, SNP pretreatment decreased lipid peroxidation and hydrogen peroxide content in drought stressed plants. Drought stress and SNP pretreatment had no effects on photosynthetic pigments. Drought caused increase in carbonyl groups content and decrease in protein and non-protein thiol groups, an indicator of protein oxidation. However, SNP pretreatment reduced carbonyl content and increased thiol groups and alleviated the protein oxidation under drought stress. The amounts of proline, total free amino acids and soluble sugars increased significantly under drought stress. Treatment of plants with SNP only increased the proline content and had no effects on other osmolytes. Soluble phenols content as non-enzymatic antioxidant, increased under drought stress and SNP treatment increased the amount of these compounds. Pretreatment of plants with SNP and phenyl 4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) (a NO scavenger) reduced the protective effects of SNP in our research, which suggests that the protective effect of SNP is exerted through NO release. The protective effects of NO in drought stress may be due to its ability to counteract reactive oxygen species (ROS) and reduce the oxidative damages.

***Keywords:*** Drought stress; Lipid peroxidation; Nitric oxide; Protein oxidation; Polyphenols

Archive of SID

* Corresponding Author; Email: nasibi2002@yahoo.com

*www.SID.ir*