Archive of SID

اثر تنش کم آبی و محلول‌پاشی اسید آسکوربیک بر میزان فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان و برخی تغییرات بیوشیمیایی در برگ ذرت دانه ای (*Zea maize* L.)

آریا دولت آبادیان[۱]، سید علی محمد مدرس ثانوی[۱*] و مظفر شریفی[۲]

[۱] **تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت**

[۱] **تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه علوم گیاهی**

تاریخ دریافت: ۸۶/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۲۹

چکیده

تنش کم‌آبی یک تنش غیر زنده عمومی است که به طور جدی تولید محصولات کشاورزی را در بیشتر نقاط جهان متأثر می سازد. به این ترتیب به منظور بررسی اثر تنش کمبود آب و محلول‌پاشی اسید آسکوربیک بر فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان، تجمع پرولین، پراکسیداسیون لیپیدی، محتوی پروتئین، کلروفیل، آسکوربات و دهیدروآسکوربات برگهای ذرت دانه‌ای (سینگل کراس ۷۰٤) آزمایشی به صورت دوبار خرد شده در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعهٔ تحقیقاتی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. در این آزمایش تنش کمبود آب در کرتهای اصلی، زمان محلول‌پاشی در کرتهای فرعی و غلظت محلول در کرتهای فرعی- فرعی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تنش کمبود آب فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان را افزایش داده است به طوری که این افزایش فعالیت، در کرتهای تنش در مرحله زایشی مشهود تر بود. این در حالی است که محلول‌پاشی اسید آسکوربیک سبب کاهش در میزان فعالیت آنزیمی شد. همچنین تنش کمبود آب محتوی پروتئین محلول و غلظت کلروفیل برگ را کاهش داد. غلظت پرولین و مالون‌دی‌آلدهید در پاسخ به تنش، افزایش معنی‌داری پیدا کرد. اسید آسکوربیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان توانست از کاهش محتوی پروتئین و کلروفیل و افزایش پرولین و مالون‌دی‌آلدهید، با کاهش اثر مخرب تنش جلوگیری نماید. مشاهده شد که غلظت آسکوربات درون سلولی با مصرف آسکوربات برون‌زاد افزایش و دهیدروآسکوربات در شرایط تنش به خصوص تنش بعد از گل‌دهی کاهش یافته است. می‌توان گفت که گیاه مصرف اسید آسکوربیک را به عنوان از بین برنده رادیکالهای آزاد بر افزایش فعالیت آنزیمها در برابر تنش ترجیح داده است و این ماده به طور غیر مستقیم سبب کاهش فعالیت این آنزیمها و بهبود شرایط رشد گیاه گردیده است.

واژه های کلیدی: تنش کمبود آب، اسیدآسکوربیک، آنزیمهای آنتی اکسیدانت، ذرت دانه‌ای

*نویسنده مسئول، تلفن تماس ٤٤١٩٦٥٢٢ ، پست الکترونیکی modaresa@modares.ac.ir

مقدمه

تنش کم‌آبی عاملی است که به طور جدی تولید محصولات زراعی را در مناطق مختلف از جمله مناطق خشک و نیمه خشک محدود می‌کند. تنش کم‌آبی سبب ایجاد واکنشهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متفاوتی در گیاهان می‌شود (۳۱). یکی از اثرات تنش کم‌آبی، مشابه دیگر تنشهای محیطی، ایجاد آسیبهای اکسیداتیو می‌باشد که توسط رادیکالهای آزاد اکسیژن مانند رادیکالهای سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکالهای هیدروکسیل صورت می-گیرد (۳۷ و ٤٤). تولید گونه‌های اکسیژن فعال سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء (۱٦) تخریب پروتئینها (۲۷) و نوکلئیک اسیدها می‌شود (۲۵). پراکسیداسیون چربیهای غشاء می‌تواند در اثر گونه‌های اکسیژن فعال به وجود آید و

www.SID.ir

Archive of SID

در نتیجه باعث کاهش نفوذ پذیری انتخابی غشاء سلولی شود (۷). در سلولهای گیاهی کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها و پراکسی‌زوم‌ها مکانهای مهم تولید گونه‌های فعال اکسیژن هستند (۱۹، ۲۰، ۳٤ و ۳۵). تولید گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست‌ها به وسیلهٔ انتقال مستقیم انرژی از کلروفیل به مولکول اکسیژن یا به وسیله کاهش تک ظرفیتی اکسیژن در فتوسیستم یک طی چرخهٔ مهلر صورت می‌گیرد (٤). گیاهان برای کاهش دادن اثر مخرب گونه‌های اکسیژن فعال مکانیسمهای متفاوتی دارند. از جمله این مکانیسمها می‌توان به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. این سیستم شامل سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی است. مهمترین ترکیبات آنتی‌اکسیدان، شامل گلوتاتیون، توکوفرول، فلاوونوئیدها و آسکوربات می‌باشند که در پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن به طور مستقیم نقش دارند. همچنین آنزیمهای آنتی اکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، پلی فنول‌اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در پاکسازی رادیکالهای آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند (۱). همبستگیهای گوناگونی بین تنش کمبود آب و میزان آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب درون سلولی گزارش شده است (٤۱). یکی از راههای افزایش مقاومت، بالا بردن سطح سوبستراهای آنزیمهای آنتی اکسیدان و مواد آنتی اکسیدان درون سلولی مانند اسید آسکوربیک می‌باشد. اسید آسکوربیک یک مولکول کوچک قابل حل در آب است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی بوده و به عنوان سوبسترای اولیه در مسیرهای چرخه‌ای، برای سمیت زدایی و خنثی کردن رادیکالهای سوپراکسید و اکسیژن منفرد نقش دارد. همچنین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان ثانویه در باز چرخ آلفا توکوفرول و دیگر آنتی‌اکسیدانهای چربی‌دوست نقش ایفا می‌کند (۳۰). این مولکول آنتی‌اکسیدان همراه دیگر ترکیبات سیستم آنتی‌اکسیدانی، سلولهای گیاهی را در برابر آسیبهای اکسیداتیو ناشی از متابولیسمهای هوازی فتوسنتز و تنفس و حتی آلودگیها حفظ می‌نماید. اسید آسکوربیک دارای یک نقش محوری در فتوسنتز بوده و در غلظتهای بالا در کلروپلاست یافت می‌شود. اسید آسکوربیک به سه طریق در واکنشهای بیوشیمیایی در گیاهان نقش ایفا می‌کند. اول اینکه به عنوان یک آنتی‌اکسیدان به طور مستقیم در از بین بردن پراکسید هیدروژن تولید شده به وسیلهٔ احیای نوری اکسیژن در فتوسیستم یک عمل می‌کند (۳۰). دوم، مونودهیدروآسکوربات تولید شده به وسیله آسکوربات پراکسیداز به طور مستقیم پذیرنده الکترون در فتوسیستم یک است (۲۱). سوم اینکه اسید آسکوربیک کوفاکتوری برای چرخه ویولاگزانتین می‌باشد (٤) که این چرخه گیاهان را در برابر آسیبهای فتواکسیداتیو حفاظت می‌کند. به علاوه مشخص شده است که اسید آسکوربیک مجموعه‌ای از نقشها را در رشد گیاهان مانند تقسیم و بزرگ شدن سلول، توسعه دیواره سلولی و دیگر فرآیندهای نموی بازی می‌کند (۳۲). پیشنهاد شده است که اسید آسکوربیک بر روی غشاء پلاسمایی و پمپهای پروتونی و ATP-ase (۱۵) تأثیر گذار بوده و بر طبق فرضیهٔ اسیدی سبب تحریک عوامل سست کننده دیواره سلولی و در نتیجه افزایش توسعه دیواره سلولی و بزرگ شدن سلول می‌گردد (۳۳). همچنین شواهدی مبنی بر افزایش پیشرفت تقسیم سلولی از مرحله G_1 تا S در مریستم ریشهٔ پیاز توسط کاربرد خارجی اسید آسکوربیک وجود دارد (۳). اسید آسکوربیک همراه با گلوتاتیون و آنزیمهای آنتی‌اکسیدان در خنثی سازی یون سوپراکسید که به وسیله واکنش مهلر و واکنشهای تنفس نوری تولید می‌شود نقش دارد (۳۰). اعتقاد براین است که اسید آسکوربیک علاوه بر پاکسازی یون سوپراکسید در پاکسازی یون هیدروکسیل نیز نقش دارد (٤). مصرف خارجی اسید آسکوربیک سبب افزایش مقاومت به تنش شوری و کاهش اثر مضر تنشهای اکسیداتیو می‌شود (۳٦).

در پاسخ به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد (۲٤). اولین آنزیم پاکسازی کننده سوپراکسید دیسموتاز است که تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید

www.SID.ir

Archive of SID

هیدروژن که یک مولکول با خاصیت غیر رادیکالی است را بر عهده دارد. پراکسید هیدروژن تولید شده توسط آنزیم کاتالاز(۱۷) و یا آسکوربات پراکسیداز تبدیل به آب و اکسیژن می‌شود. پراکسید هیدروژن در غلظتهای بالا سمی بوده ولی در غلظتهای پایین به عنوان یک پیغامبر، در بیان ژنهای مقاومت و تولید آنزیمهای آنتی‌اکسیدان نقش دارد (۵). همچنین آنزیم پراکسیداز نقش مهمی را در جاروب کردن پراکسید هیدروژن دارد که این عمل با کمک اسید آسکوربیک به عنوان یک دهنده الکترون برای احیای پراکسید هیدروژن به آب صورت می‌گیرد. درطی این واکنش اسید آسکوربیک به مونودهیدروآسکوربات تبدیل می‌شود. کاتالاز نیز یک آنزیم شناخته شده در موجودات زنده بوده که مهمترین نقش آن تجزیهٔ پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن است (۱٤). آنزیم پلی فنول اکسیداز، هیدرولاسیون مونو فنول‌ها را به دی فنول‌ها کاتالیز می‌کند. همچنین این آنزیم اکسیداسیون دی‌فنول‌ها را به کوئینون‌ها که در پلی‌مریزاسیون رنگدانه‌ها نقش دارند کاتالیز می‌کند. تغییرات در میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان در شرایط تنشهای محیطی از جمله تنش کمبود آب گزارش شده است (۲٦). هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر تنش کمبود آب و کاربرد خارجی و اضافی اسید آسکوربیک بر میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان، محتوی پروتئین، پرولین، مالون‌دی‌آلدهید و دیگر تغییرات فیزیولوژیک ذرت می‌باشد. ارقام دیررس ذرت (۷۰٤) در طول دوره رشد خود ممکن است با شرایط تنش کم آبی مواجه شده و از عملکرد آنها کاسته شود چنانچه اسید آسکوربیک بتواند در مراحلی که گیاه دچار تنش شده است سبب افزایش مقاومت ویا بهبود رشد آن شود، می‌توان با مصرف این ماده از کاهش عملکرد جلوگیری کرد.

مواد و روشها

آزمایش در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۵ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به منظور بررسی اثر محلول پاشی اسید آسکوربیک (ویتامین C) بر میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان، محتوی پروتئین، پرولین، مالون‌دی‌آلدهید و غلظت کلروفیلهای a، b و کل وهمچنین میزان آسکوربات و دهیدروآسکوربات برگ ذرت دانه‌ای سینگل‌کراس هیبرید ۷۰٤ در شرایط تنش کم آبی انجام گرفت. در این آزمایش عامل تنش در ۳ سطح بدون تنش، تنش قبل از گل‌دهی (۸ برگی) و تنش بعد از گل‌دهی (خروج کامل گل نر) به عنوان کرت اصلی و زمان محلول-پاشی (قبل و بعد ازگل دهی) به عنوان کرت فرعی و غلظت محلول در کرتهای فرعی- فرعی در نظر گرفته شدند. نتایج به صورت کرتهای دوبار خرد شده در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی در سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. در مجموع این آزمایش ۲٤ تیمار و ۳ تکرار ۷۲ کرت آزمایشی داشت. هر کرت از ۵ خط کاشت به طول ٤ متر و فواصل ۷۰ سانتیمتر از یکدیگر تشکیل شده بود و سطحی معادل ۱۲ متر مربع را شامل می‌شد. عملیات آماده سازی زمین شامل، شخم، دیسک و ایجاد جوی و پشته طبق روال معمول انجام شد. دادن کود اوره به میزان ٤۰۰ کیلوگرم در هکتار در سه زمان هنگام کاشت، شش برگی و در زمان ظهور گل تاجی انجام گرفت. از نظر کوددهی، کود فسفره نیاز زمین از سال قبل تأمین شده بود و از نظر کود پتاس زمین غنی بوده و نیاز به کود پتاسه نبود. کشت به صورت دستی و با فواصل ۲۰ سانتیمتر روی ردیفها و با تراکم نهایی ۷۰۰۰۰ بوته در هکتار انجام شد. آبیاری کرتها به میزان لازم و مطابق معمول منطقه با فواصل ۳ روز انجام می‌گرفت. جهت ثبت میزان آب مصرفی و کنترل میزان آب در هر بار آبیاری، مزرعه به سیستم آبیاری شامل لوله‌های پلی‌اتیلن و کنتور آب مجهز شد. مبارزه با علفهای هرز نیز به صورت وجین دستی در طول دوره رشد انجام گرفت. تیمار تنش کم آبی در دو مرحله رویشی و زایشی به وسیله قطع آبیاری و ثبت رطوبت خاک به وسیله دستگاه TDR برای اعمال تنش یکسان در مراحل مختلف صورت گرفت. همچنین اعمال تیمار محلول‌پاشی

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدآسکوربیک در پایان دوره تنش توسط سم پاش در غلظتهای ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ ppm انجام شد. ۲٤ ساعت بعد از محلول‌پاشی نمونه‌برداری انجام گرفت و نمونه‌های جمع آوری شده بلافاصله توسط نیتروژن مایع فریز شدند و برای آنالیزهای بیوشیمیایی در فریزر با دمای ۸۰- درجهٔ سانتی گراد نگهداری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز: ۰/۲ گرم از نمونهٔ منجمد در نیتروژن مایع سائیده در بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۲ مولار،pH٦/۸ در دمای ٤ درجهٔ سانتی گراد عصاره گیری شد و سپس محلول یکنواخت حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دمای ٤-۲ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی جهت اندازه-گیری فعالیت پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز مطابق روش قناتی و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۲۲).

فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزودن مقادیر مناسب از عصاره آنزیمی، بافر، گایاکول با غلظت نهائی ۲۸ میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن با غلظت نهائی ۵ میلی‌مولار در طول موج ٤۷۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان شد. برای آنزیم پلی‌فنول اکسیداز نیز مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ مایکرولیتر از عصاره آنزیمی، ۵۰۰ مایکرولیتر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و ۵۰۰ مایکرولیتر متیل‌کاتکول ۰/۰۲ میلی-مولار در ۱۹۰۰ مایکرولیتر بافر پتاسیم فسفات با pH ٦/۱ بود. افزایش در جذب در طول موج ٤۱۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Cintra GBC خوانده شد و فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: ۰/۲ گرم نمونهٔ منجمد در ۳ میلی‌لیتر بافر HEPES-KOH با pH۷/۸ حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار عصاره‌گیری شد. همگنهای حاصل در دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجهٔ سانتی گراد سانتریفیوژ شده و بخش رویی برای سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مورد استفاده قرار گرفت (۲۳). مخلوط واکنش شامل: بافر HEPES-KOH ۵۰ میلی‌مولار با pH۷/۸ حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH۱۰/۲، ال-متیونین۱۲ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۱ میکرومولار و ۲۰۰ مایکرولیتر عصارهٔ آنزیمی بود. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور قرار داده شدند و پس از این مدت جذب آنها در طول موج ٥٦۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. یک واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار۵۰ درصد احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز ۰/۲ گرم نمونه منجمد در ۳ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH٦/۸ عصاره‌گیری شد. همگن حاصل در دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجهٔ سانتی گراد سانتریفیوژ شده و سپس محلول فوقانی برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد. تجزیهٔ آب اکسیژنه با کاهش در جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفته و به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در عصارهٔ آنزیمی بیان شد (۱٤).

سنجش غلظت پروتئین: میزان پروتئین برگ و ریشه نیز بر طبق روش (۱۳) تعیین شد. بدین منظور ۱ میلی لیتر از محلول معرف به همراه ۱۰۰ مایکرولیتر عصاره آنزیمی پس از مخلوط شدن کامل، در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و جذب محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت گردید. غلظت پروتئین بر حسب میلی گرم بر گرم بافت تازه توسط منحنی استاندارد که با استفاده از غلظتهای مختلف آلبومین سرم گاوی تهیه شده بود محاسبه شد.

تعیین پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء: پراکسیداسیون لیپید-ها با استفاده از اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید به عنوان فرآوردهٔ نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشاء انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های منجمد شده به میزان ۰/۵ گرم در ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد عصاره‌گیری شدند. سپس به یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون صاف شده ۱ میلی‌لیتر تیوباربی‌توریک اسید ۰/۵ درصد به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد و در حمام آب گرم ۱۰۰ درجهٔ سانتی گراد قرار گرفت. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، لوله‌ها از حمام خارج شده و پس از سرد شدن میزان مالون‌دی‌آلدئید با اندازه-گیری جذب در طول موجهای ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی (ε=۱۵۵ $\mu M\ cm^{-1}$) محاسبه شد (۱۸).

جدول ۱- تجزیهٔ واریانس فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت محتوی پروتئین، مالون‌دی‌آلدهید، کلروفیل، پرولین آسکوربات و دهیدروآسکوربات. علامت‌های ** و * به ترتیب به مفهوم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱درصد و ۵ درصد می‌باشد.

منابع تغییر	درجهٔ آزادی	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	پلی‌فنول اکسیداز	پراکسیداز	پروتئین	مالون‌دی‌آلدهید
تکرار	۲	۳۵۲/۷۴	۱۰۳۴۵/۵۶	۱/۰۱۳	۲۵۹۸/۳۷	۰/۰۰۰۹	۰/۰۲۵
خشکی	۲	۲۹۹۷۲/۸۴**	۳۹۵۱۸۵/۸۹**	۸۸/۳۷**	۳۶۴۶۲/۹۲**	۰/۰۵۳۲**	۲/۲۵۹**
تکرار×خشکی	۴	۱۲۱/۳۷	۲۸۲۱/۳۹	۲/۸۹	۸۳۸/۶	۰/۰۰۰۴	۰/۰۶۹
زمان	۱	۸۹۶/۹	۶۱۴۸/۶۶	۱۴**	۳۷۱۰/۷۶*	۰/۰۰۵۶*	۰/۱۸۴
خشکی × زمان	۲	۲۴۸۱/۰۵**	۸۳۹۵/۵۹	۱/۹۲	۶۵۹۵/۲۲	۰/۰۰۴۸**	۰/۰۹۲
تکرار×زمان(خشکی)	۶	۵۶۵/۲	۴۷۰۶/۲۵	۲/۰۶	۱۳۱۷/۳۴	۰/۰۰۰۲	۰/۰۸۹
غلظت	۳	۲۶۳۵۷/۹۷**	۲۰۴۸۳۴/۳۵**	۳۱/۹۷**	۱۵۹۸۸/۸۲**	۰/۰۰۸۷**	۲/۰۳۳**
خشکی × غلظت	۶	۶۶۴۷/۱۴**	۱۸۶۲۰/۶۱	۳/۶۱	۲۵۴۱/۱۸	۰/۰۰۳۹**	۰/۷۲۲**
زمان×غلظت	۳	۲۹۰۸/۰۶**	۳۱۸۱/۷۹	۰/۹۷	۵۱۳/۳۷	۰/۰۰۰۶	۰/۲۰۸*
خشکی×زمان×غلظت	۶	۱۳۵۱/۶۸**	۱۲۶۰۵/۷۲	۴/۳۸*	۳۴۶۵/۳۱	۰/۰۰۲۹**	۰/۰۸۱
خطا آزمایشی	۳۶	۳۸۳/۷۸	۸۶۹۳/۶۹	۱/۷۹	۱۷۳۱/۰۱	۰/۰۰۰۷	۰/۰۶۳

منابع تغییر	درجهٔ آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	پرولین	آسکوربات	دهیدروآسکوربات
تکرار	۲	۰/۰۳۷	۰/۰۸۲	۰/۰۳۶	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۴۶	۰/۰۰۰۴۶
خشکی	۲	۷/۵۴۹**	۰/۱۵۶**	۵/۷۳۳**	۰/۰۰۲۵۲۳**	۰/۱۲۲۶۵**	۰/۰۹۷۶۹**
تکرار×خشکی	۴	۰/۰۲۹	۰/۰۴۷	۰/۰۹۴	۰/۰۰۰۰۱۱	۰/۰۰۰۷۱	۰/۰۰۰۱۵
زمان	۱	۰/۲۳۵	۰/۰۳۳	۰/۴۴۶*	۰/۰۰۰۱۵۹**	۰/۰۰۰۳۵	۰/۰۰۰۰۹
خشکی × زمان	۲	۰/۰۲۹	۰/۰۰۵	۰/۰۶۰	۰/۰۰۰۰۸۳**	۰/۰۰۶۹**	۰/۰۰۴۵۱**
تکرار×زمان(خشکی)	۶	۰/۰۸۲	۰/۰۲۰	۰/۱۰۶	۰/۰۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۳۸	۰/۰۰۰۲۷
غلظت	۳	۰/۴۳۸**	۰/۳۵۴**	۱/۵۵۸**	۰/۰۰۰۲۶۸**	۰/۰۶۶۳۹**	۰/۰۴۲۲۲**
خشکی × غلظت	۶	۰/۲۸۹**	۰/۱۰۹**	۰/۳۶۷**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۵۵۲**	۰/۰۰۲۹۱**
زمان×غلظت	۳	۰/۱۶۶	۰/۰۲۶	۰/۲۶۹	۰/۰۰۰۰۱۳	۰/۰۰۲۳۹*	۰/۰۰۰۳۷
خشکی×زمان×غلظت	۶	۰/۰۳۲	۰/۰۳۱	۰/۱۱۰	۰/۰۰۰۰۲۷	۰/۰۰۰۷۳	۰/۰۰۰۳۱
خطا آزمایشی	۳۶	۰/۰۸۲	۰/۰۱۵	۰/۱۰۴	۰/۰۰۰۰۱۲	۰/۰۰۰۵۷	۰/۰۰۰۷۸

سنجش مقدار پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین محتوی بافت برگ از روش (۸) استفاده شد. برای اندازه‌گیری پرولین، ابتدا مقدار ۰/۲ گرم گیاهچه توزین و در هاون چینی در ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد به خوبی سائیده شد و محلول یکنواخت حاصل در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۸۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ

www.SID.ir

Archive of SID

گشت. آنگاه ۲ میلی‌لیتر از عصاره‌های صاف شده را به لوله‌های در پوش‌دار منتقل نموده و به تمام لوله‌ها مقدار ۲ میلی لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد. پس از بستن در لوله‌ها به مدت یک ساعت در آب ۱۰۰ درجهٔ سانتی گراد قرار داده شدند. پس از سرد کردن لوله‌ها به هر کدام مقدار ٤ میلی لیتر تولوئن اضافه گشت و با استفاده از دستگاه ورتکس به مدت ۱۵ تا۲۰ ثانیه لوله‌ها تکان داده شد. سرانجام فاز رویی را که به رنگ صورتی کمرنگ و حاوی پرولین محلول در تولوئن بوده برداشته و همزمان با نمونه‌های استاندارد در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت و اعداد در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. غلظت پرولین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازهٔ برگ با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد. برای تهیهٔ محلولهای استاندارد پرولین، مقدار ۰/۵ گرم پرولین خالص در ۵۰۰ میلی لیتر محلول اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد (۳/۳ گرم از اسید سولفوسالیسیلیک خشک در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) حل شد. بدین ترتیب محلول ppm ۱۰۰ پرولین به دست می‌آمد. از محلول ppm ۱۰۰ برای تهیهٔ سایر غلظتهای استاندارد استفاده گردید.

اندازه‌گیری کلروفیل: برای سنجش غلظت کلروفیل، ۰/۲ گرم نمونه برگی در استون ۸۰ درصد عصاره گیری شد (۲). سپس عصاره حاصل بر روی کاغذ صافی قرار داده شد و تا رسیدن به حجم ۲۵ نهایی میلی‌لیتر و استخراج کامل کلروفیل از بافت برگ به آن استون اضافه گشت. جذب نوری کلروفیل a و b به ترتیب در طول موجهای ٦٤٥ و ٦٦٣ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول مربوطه غلظت کلروفیل a و b و کلروفیل کل بر حسب میلی گرم بر گرم برگ تازه به دست آمد.

کلروفیل a $= [12.7\ (D_{663}) - 2.69\ (D_{645})] \times \frac{V}{1000W}$

کلروفیل b $= [22.9\ (D_{645}) - 4.68\ (D_{663})] \times \frac{V}{1000W}$

کلروفیل کل $= [20.2\ (D_{645}) - 8.02\ (D_{663})] \times \frac{V}{1000W}$

اندازه‌گیری آسکوربات و دهیدروآسکوربات: برای سنجش محتوی آسکوربات و دهیدروآسکوربات برگ، از روش لاو و همکاران (۲۹) استفاده شد. ۰/۲ گرم بافت گیاه در ۳ میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۵ درصد عصاره‌گیری شد و پس از سانتریفیوژ و جدا کردن محلول فوقانی pH آن به وسیلهٔ اضافه کردن ۸۰۰ مایکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۵۰ میلی‌مولار (pH٦/٤) و ۳۳ مایکرولیتر NaOH ۵ مولار، روی ۵/۵ تا ٦/۵ تنظیم گشت. سپس مواد زیر به ترتیب به نمونه‌های حاصل و محلول بلانک اضافه شد: ۱۰۰ مایکرولیتر آب مقطر، ۲۰۰ مایکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد، ۲۰۰مایکرولیتر H_3PO_4 ٤٤ درصد، ۲۰۰مایکرولیتر بی‌پیریدیل ٤ درصد (حل شده در اتانول ۷۰ درصد) و ۱۰۰ مایکرولیتر $FeCl_3$ ۳ درصد. پس از آن نمونه‌ها به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه قرار داده شدند پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۵ نانومتر جهت محاسبه غلظت آسکوربات خوانده شد. برای اندازه‌گیری دهیدروآسکوربات به نمونه‌های فوق ۵۰ مایکرولیتر دی‌تیوتریتول۱۰ میلی‌مولار اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۵۰ مایکرولیتر ان- اتیل‌مالی‌آی‌ماید ۰/۵ درصد برای غیر فعال کردن دی‌تیوتریتول اضافه شد و جذب محلول حاصل در طول موج ۵۲۵ نانومتر ثبت گردید. غلظت آسکوربات و دهیدروآسکوربات بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازهٔ برگ با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.

بررسی آماری: از نرم افزار SAS برای تجزیه آماری داده ها استفاده گردید. و برای مقایسه میانگینها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P<0/05$)استفاده شد.

نتایج و بحث

در این آزمایش تنش خشکی به عنوان کرت اصلی، زمان محلول‌پاشی به عنوان کرت فرعی و غلظت اسید

www.SID.ir

Archive of SID

آسکوربیک به عنوان کرت فرعی- فرعی در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از جدول تجزیهٔ واریانس (جدول ۱) نشان داد که تنش کم آبی بر تمام صفات مورد ارزیابی اثر معنی-دار داشته است و این در حالی است که زمان محلول‌پاشی تنها بر روی فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز، محتوی پروتئین، پرولین و غلظت کلروفیل کل تأثیر گذار بود. همچنین فاکتور غلظت بر تمام صفات اثر معنی‌دار نشان داد.

جدول ۲: اثرات اصلی هر یک از تیمارهای تنش، زمان محلول‌پاشی و غلظت محلول بر فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت، محتوی پروتئین، مالوندی-آلدهید، کلروفیل a، b و کل، پرولین، آسکوربات و دهیدروآسکوربات در شرایط تنش کم آبی و محلول‌پاشی با اسید آسکوربیک

اثرات اصلی	سطح	کاتالاز(تغییرات جذب به میلی گرم پروتئین در دقیقه)	سوپراکسید دیسموتاز(تغییرات جذب به میلی گرم پروتئین در دقیقه)	پلی‌فنول-اکسیداز(تغییرات جذب به میلی گرم پروتئین در دقیقه)	پراکسیداز (تغییرات جذب به میلی گرم پروتئین در دقیقه)	پروتئین(میلی گرو بر گرم بافت تازه)	مالوندی-آلدهید(میلی مول بر سانت‌متر)
	بدون تنش	۱٤٤/٥٥c	٦٦٢/٩c	۹/٤٧c	۱٥۳/۱۷c	۰/۷۲٥a	۱/۲٦٤b
تنش	تنش‌قبل‌گل‌دهی	۱٦۱/۷b	۸۱۸/۲b	۷/۱۰b	۱۸۷/٤۱b	۰/٦۸٦b	۱/۸٦۱a
	تنش‌بعدگل‌دهی	۲۱۲/٥۱a	۹۱۷/٥a	۹/٤۷a	۲۳۰/۹٤a	۰/٦۳۱c	۱/٦۸٦a
زمان	قبل‌گل‌دهی	۱۷٦/٤٥a	۷۹۰/۳٤a	۷/۸٦a	۱۹۷/٦۹a	۰/٦۷۲b	۱/٥٥a
محلول‌پاشی	بعدگل‌دهی	۱٦۹/۳۹a	۸۰۸/۸۲a	٦/۹۸b	۱۸۳/۳۳a	۰/٦۹۰a	۱/٦٥a
	۰	۲۲٤/٤۱a	۹۲۲/۳۹a	۹/۲۷a	۲۳۲/۷۸a	۰/٦٥c	۲/۰٥a
غلظت اسید	۵۰	۱۷۹/۲b	۸۳۷/٤۲b	۷/۰٤b	۱۸۷/۳۰b	۰/٦۷b	۱/٦٥b
آسکوربیک	۱۰۰	۱٤۸/۱٤c	۷٦۷/۸۳c	۷/۲٦b	۱۷۸/۲٤b	۰/٦۸b	۱/٤۱c
	۱٥۰	۱۳۹/۹۲c	٦۷۰/٦۷d	٦/۱۱c	۱٦۳/۷۳b	۰/۷a	۱/۲۹c

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهائی که با حرف یکسان نشان داده شده‌اند، در سطح احتمال ۰/۰۵ بر اساس آزمون دانکن دارای اختلاف معنی دار نیستند.

ادامه جدول ۲: اثرات اصلی هر یک از تیمارهای تنش، زمان محلول‌پاشی و غلظت محلول بر فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت، محتوی پروتئین، مالون-دی‌آلدهید، کلروفیل a، b و کل، پرولین، آسکوربات و دهیدروآسکوربات در شرایط تنش کم آبی و محلول‌پاشی با اسید آسکوربیک

اثرات اصلی	سطح	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم بافت تازه)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم بافت تازه)	کلروفیل کل(میلی گرم بر گرم بافت تازه)	پرولین(میلی گرم بر گرم بافت تازه)	آسکوربات(میلی گرم بر گرم بافت تازه)	دهیدروآسکوربات(میلی گرم بر گرم بافت تازه)
	بدون تنش	۱/۸۹۲a	۰/٦٤۷a	۲/٥۳۹a	۰/۰۱٥c	۰/٤۷٦a	۰/٤۲۰a
تنش	تنش‌قبل‌گل‌دهی	۱/٦۷۱b	۰/٦۰۹a	۲/۲۸b	۰/۰۲۱b	۰/۳٤۰c	۰/۳۰۳c
	تنش‌بعدگل‌دهی	۰/۸۲۹c	۰/۷٦٤a	۱/٥۹۳c	۰/۰۳٥a	۰/۳٦۹b	۰/۳۱۸b
زمان محلول‌پاشی	قبل‌گل‌دهی	۱/٤a	۰/٦٥a	۲/۰٥a	۰/۰۲٥a	۰/۳۹۳a	۰/۳٤٦a
	بعدگل‌دهی	۱/٥۲a	۰/٦۹a	۲/۲۱a	۰/۰۲۲b	۰/۳۹۷a	۰/۳٤۸a
	۰	۱/۲۳b	۰/٤۸c	۱/۷۱b	۰/۰۲۸a	۰/۳۱٤c	۰/۲۸٤c
غلظت اسید	۵۰	۱/٥۷a	۰/۸a	۲/۳۸a	۰/۰۲٥b	۰/۳۸٤b	۰/۳۳٥b
آسکوربیک	۱۰۰	۱/٥a	۰/٦٦b	۲/۱۷a	۰/۰۲۲c	۰/٤۳٥a	۰/۳۷۹a
	۱٥۰	۱/٥۳a	۰/۷٤ab	۲/۲۷a	۰/۰۱۹c	۰/٤٤۷a	۰/۳۹۱a

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهائی که با حرف یکسان نشان داده شده‌اند، در سطح احتمال ۰/۰۵ بر اساس آزمون دانکن دارای اختلاف معنی دار نیستند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول اثرات اصلی (جدول ۲) نشان داد که تنش کم آبی بر فعالیت تمام آنزیمهای مورد بررسی اثر معنی‌دار داشته به طوری که تنش بعد از گل‌دهی بیشترین فعالیت آنزیمها را به خود اختصاص داده است. کمترین میزان فعالیت در کرتهای بدون تنش کم آبی مشاهده شد. تنش کم آبی به خصوص تنش در فاز زایشی سبب کاهش معنی‌داری در محتوی پروتئین محلول در برگها شد. نتایج نشان داد که کمترین غلظت مالون‌دی‌آلدهید در کرتهای بدون تنش می-باشد علاوه بر این بین گیاهانی که قبل از گل‌دهی یا بعد از گل‌دهی تنش دیده بودند اختلافی از نظر غلظت مالون‌دی-آلدهید مشاهده نشد. تنش کم آبی باعث کاهش غلظت کلروفیل a و محتوی کلروفیل کل گشت اما بر غلظت کلروفیل b تأثیر نگذاشت به طوری که تنش بعد از گل‌دهی سبب کاهش بیشتر کلروفیل شد. محتوی پرولین برگ در گیاهان تنش دیده بیشتر از گیاهان بدون تنش بود. تولید پرولین در طی تنش بعد از گل‌دهی بیش از تنش قبل از گل‌دهی مشاهده شد. تنش کمبود آب سبب کاهش آسکوربات و دهیدروآسکوربات نسبت به شاهد شد به طوری که اثر تنش قبل از گل‌دهی در این کاهش بیشتر بود. بیشترین غلظت آسکوربات در کرتهای بدون تنش و با مصرف ppm ۱۵۰ و ۱۰۰ اسید آسکوربیک و بیشترین غلظت دهیدروآسکوربات در کرت‌های تنش دیده و بدون مصرف اسید آسکوربیک برون‌زاد دیده شد.

با توجه به جدول مقایسه میانگینها (جدول ۳) بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای تنش بعد از گل‌دهی و بدون مصرف اسید آسکوربیک مشاهده شد. همچنین کمترین میزان فعالیت در این آنزیم، مربوط به تیمارهای بدون تنش و ppm۱۰۰اسید آسکوربیک در فاز رویشی و تنش قبل از گل‌دهی و ppm۱۵۰ اسید آسکوربیک در فاز رویشی می‌باشد. در گیاهانی که در فاز رویشی تنش دیده بودند، مصرف اسید آسکوربیک در این مرحله سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز گشت. ولی مصرف ppm۵۰ اسید آسکوربیک اختلافی را با تیمار شاهد در گیاهان نشان نداد.

همچنین مصرف آن در فاز زایشی همراه با تنش در فاز رویشی نیز کاهش فعالیت این آنزیم را در پی داشت. در تنش زایشی و زمان محلول‌پاشی قبل از ظهور گل تاجی نیز کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده شد. تغییر در فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان یکی از مکانیسم‌هایی است که در گیاهان برای افزایش تحمل به تنشها رخ می‌دهد (۲۶). فعالیت آنزیم کاتالاز مطابق نتایج به دست آمده در شرایط تنش کم آبی افزایش می‌یابد(۴۳). چنین به نظر می-رسد که در شرایط تنش کم آبی، افزایش غلظت پراکسید هیدروژن توسط فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (۱۱)، سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز برای تجزیهٔ پراکسید هیدروژن می‌گردد اما در شرایط بدون تنش به دلیل عدم تولید بیش از حد رادیکالهای آزاد اکسیژن، تولید پراکسید هیدروژن ناشی از یون سوپراکسید کاهش یافته و در نتیجه فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش می‌یابد. اسید آسکوربیک نیز به دلیل خنثی‌سازی و از بین بردن یون سوپر اکسید در پاکسازی این یون مخرب نقش داشته و در نتیجه سبب کاهش تولید پراکسید هیدروژن و در پی آن کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود (۳۰).

افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان تنش دیده نسبت به تنش ندیده مطابق نتایج ژانگ وکایرخام مشاهده گشت (۴۳). در شرایط بدون تنش و محلول‌پاشی در مرحلهٔ رویشی، کاربرد اسید آسکوربیک سبب کاهش فعالیت این آنزیم شد. اما در بین غلظتهای ۵۰ ۱۰۰ و ppm ۱۵۰ اختلافی مشاهده نشد. در کرتهای بدون تنش و مصرف اسید آسکوربیک بعد از خارج شدن گل نر، اختلاف معنی‌داری بین مصرف ppm ۱۵۰ اسید آسکوربیک و عدم مصرف آن در این تیمارها مشاهده شد به طوری که مصرف ppm ۱۵۰ اسیدآسکوربیک، باعث کاهش فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار شاهد گشت. مصرف ۱۰۰ و ۱۵۰ ppm اسید آسکوربیک در مرحلهٔ رویشی گیاهانی که در این مرحله تنش دیده بودند سبب کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نسبت به تیمار شاهد شد. این

www.SID.ir

Archive of SID

کاهش در فعالیت، با مصرف ppm ۱۵۰ اسید آسکوربیک بعد از گل‌دهی در گیاهان تنش دیده قبل از گل‌دهی نیز مشاهده شد. تنش بعد از خارج شدن گل تاجی به طور چشمگیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را افزایش داد و مصرف اسید آسکوربیک در مرحلهٔ رویشی تأثیری بر میزان فعالیت این آنزیم نشان نداد. اما محلول‌پاشی با محلول ppm ۱۵۰بعد از گل‌دهی در کرتهای تنش در فاز زایشی، فعالیت این آنزیم را نسبت به عدم مصرف آن کاهش داد. ولی غلظتهای کمتر آن مؤثر نبود. افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز زمانی رخ می‌دهد که یون سوپر اکسید درون سلولی افزایش یابد. این گونهٔ فعال اکسیژن در اثر تنشهای محیطی مختلف از جمله کم آبی، شوری و تشعشع بالا افزایش می‌یابد (۳۷). نتایج نشان داد که اسید آسکوربیک سبب کاهش فعالیت این آنزیم می‌شود. این کاهش فعالیت آنزیم در گیاهان تنش دیده را می‌توان به اثر آنتی‌اکسیدانی اسید آسکوربیک در خنثی سازی مستقیم یون سوپر اکسید نسبت داد(۳۰).

جدول ۳: مقایسات میانگین فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت محتوی پروتئین، مالون‌دی‌آلدهید، کلروفیل، پرولین آسکوربات و دهیدروآسکوربات

تنش کم‌آبی	زمان محلول‌پاشی	غلظت محلول	کاتالاز(تغییرات جذب به میلی گرم پروتئین در دقیقه)	سوپراکسید دیسموتاز (تغییرات جذب به میلی گرم پروتئین در دقیقه)	پلی‌فنول‌اکسیداز (تغییرات جذب به میلی گرم پروتئین در دقیقه)	پراکسیداز (تغییرات جذب به میلی گرم پروتئین در دقیقه)	پروتئین (میلی گرو بر گرم بافت تازه)	مالون دی-آلدهید(میلی مول بر سانت‌متر)
بدون تنش	محلول‌پاشی قبل از گل‌دهی	۰	۱۴۸/۷۸ij	۸۱۷/۷۲bcdef	۶/۴۱۱efg	۱۶۸/۸۱cde	۰/۷۲۹۳ab	۱/۳۶efgh
		۵۰	۱۷۲/۳۶fghi	۵۸۵/۴۱ij	۶/۲۳۸efg	۱۶۴de	۰/۷۳۲vab	۱/۲۸fgh
		۱۰۰	۸۹/۶۸k	۶۱۴/۲۷hij	۵/۹۶۵efg	۱۵۴/۴۳e	۰/۷۲۸۷ab	۱/۱۰gh
		۱۵۰	۱۳۴/۹۲ij	۵۱۸/۹۹j	۴/۵۸۶fg	۱۳۶/۲۴e	۰/۷۲۶۴ab	۱/۳۷efgh
	محلول‌پاشی بعد از گل‌دهی	۰	۱۵۱/۶۴ij	۸۱۲/۳۴bcdefg	۶/۶۱۷def	۱۵۴/۷۶e	۰/۷۳۷۲a	۱/۲۲gh
		۵۰	۱۶۸/۲۱fghij	۷۰۵/۵۷efghi	۵/۹۵۱efg	۱۵۲/۷۶e	۰/۷۲۱۸ab	۱/۰۳h
		۱۰۰	۱۵۱/۵۶ij	۶۵۲/۱۰fghij	۵/۷۲۴efg	۱۵۰/۳۲e	۰/۷۱۳۸ab	۱/۱۶gh
		۱۵۰	۱۳۹/۲۹ij	۵۹۷/۲۴ij	۳/۹۵۸g	۱۴۴/۰۸e	۰/۷۱۶۱ab	۱/۵۷efg
تنش قبل از گل‌دهی	محلول‌پاشی قبل از گل‌دهی	۰	۲۳۳/۳۶dc	۹۶۸abc	۹/۸۴۸abc	۲۵۰/۷۴ab	۰/۶۴۳۵cd	۲/۵۶a
		۵۰	۲۰۰/۹۵def	۸۷۹/۱۸abcde	۸/۳۴۱cde	۱۹۸/۵۴bcde	۰/۶۳۸۵cde	۱/۸۱cde
		۱۰۰	۱۵۹/۴۹ghij	۷۵۹/۵۲defghi	۶/۴۷۱defg	۱۳۶/۶e	۰/۷۱۶۸ab	۱/۵۱efgh
		۱۵۰	۹۵/۴۶k	۶۳۷/۱۷ghij	۵/۹۷۵efg	۱۳۷/۰۱e	۰/۷۲۳۹ab	۱/۱۳gh
	محلول‌پاشی بعد از گل‌دهی	۰	۲۴۹/۷۰bc	۹۰۹/۱۲abcd	۹/۵۳۲abc	۲۴۷/۴۵abc	۰/۶۲۷۳de	۲/۳۶ab
		۵۰	۱۳۲/۲۷j	۱۰۰۲/۷۱a	۴/۸۱۰fg	۱۴۶/۵۸e	۰/۷۱۰۲ab	۲/۱۵abcd
		۱۰۰	۱۳۹/۲۸ij	۷۵۶/۵۸defghi	۵/۹۲۵efg	۱۹۶/۷۸bcde	۰/۷۰۴۰ab	۱/۷۷def
		۱۵۰	۸۳/۱۳k	۶۳۳/۴۷hij	۵/۹۴۵efg	۱۸۵/۶۵bcde	۰/۷۲۶۶ab	۱/۵۷efg
تنش بعد از گل‌دهی	محلول‌پاشی قبل از گل‌دهی	۰	۲۶۸/۹۳ab	۱۰۰۰/۴۰a	۱۱/۹a	۲۸۷/۰۶a	۰/۵۸۹۰ef	۲/۵۷a
		۵۰	۲۳۰/۰۳cde	۹۹۲/۵۷ab	۷/۹۱۶cde	۲۴۳/۳۹abcd	۰/۵۷۴۵f	۱/۵۴efg
		۱۰۰	۱۹۴/۲۸fg	۸۶۳/۵۳abcde	۱۱/۲۵۵ab	۲۵۵/۸۳ab	۰/۶۲۹۶cde	۱/۳۳efgh
		۱۵۰	۱۸۹/۲۰fgh	۸۴۷/۲۸abcde	۹/۴۵۵abc	۲۳۹/۶۵abcd	۰/۶۳۷۳cde	۱/۰۳h
	محلول‌پاشی بعد از گل‌دهی	۰	۲۹۴/۰۵a	۱۰۲۶/۷۵a	۱۱/۳۵۲ab	۲۸۷/۸۷a	۰/۵۹۷۵def	۲/۲۵abc
		۵۰	۱۷۱/۴۳fghi	۸۵۹/۰۷abcde	۸/۹۹bcd	۲۱۸/۵۵abcde	۰/۶۳۴۳cde	۲/۰۷bcd
		۱۰۰	۱۵۴/۵۸hij	۹۶۰/۹۸abc	۸/۲۲۴cde	۱۷۵/۴۶bcde	۰/۶۸۰۵bc	۱/۵۷efg
		۱۵۰	۱۹۷/۵۷ef	۷۸۹/۸۸cdefgh	۶/۷۴۸def	۱۳۹/۷۶e	۰/۷۱۲۹ab	۱/۰۹gh

www.SID.ir

Archive of SID

در هر ستون میانگین‌هائی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند.

ادامه جدول ۳: مقایسات میانگین فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت محتوی پروتئین، مالون‌دی‌آلدهید، کلروفیل، پرولین آسکوربات و دهیدروآسکوربات.

تنش کم‌آبی	زمان محلول-پاشی	غلظت محلول	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم بافت تازه)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم بافت تازه)	کلروفیل کل(میلی گرم بر گرم بافت تازه)	پرولین(میلی گرم بر گرم بافت تازه)	آسکوربات(میلی گرم بر گرم بافت تازه)	دهیدروآسکوربات(میلی گرم بر گرم بافت تازه)
بدون تنش	محلول‌پاشی قبل از گلدهی	۰	۱/۷۳abc	۰/۵۰ghij	۲/۲۳cdef	۰/۰۱۳h	۰/۳۹cd	۰/۳۵bcde
		۵۰	۱/۹۷abc	۰/۶۹cdefgh	۲/۶۷abc	۰/۰۱۶gh	۰/۴۳bc	۰/۳۸b
		۱۰۰	۱/۸۵abc	۰/۶۳defghi	۲/۴۸abcd	۰/۰۱۶gh	۰/۵۲a	۰/۲۳g
		۱۵۰	۱/۶۲bcd	۰/۶۰defghi	۲/۲۲cdef	۰/۰۱۵gh	۰/۵۳a	۰/۲۳g
	محلول‌پاشی بعد از گلدهی	۰	۱/۸۱abc	۰/۶۴defghi	۲/۴۵abcd	۰/۰۱۴h	۰/۳۹cd	۰/۳۵bcde
		۵۰	۱/۷۸abc	۰/۵۴efghij	۲/۳۲bcde	۰/۰۱۵gh	۰/۴۳bc	۰/۳۸bc
		۱۰۰	۲/۲۳a	۰/۸۰cd	۳/۰۳a	۰/۰۱۵h	۰/۵۵a	۰/۲۷fg
		۱۵۰	۲/۱۱ab	۰/۷۵cdef	۲/۸۷ab	۰/۰۱۵gh	۰/۵۳a	۰/۲۵g
تنش قبل از گل‌دهی	محلول‌پاشی قبل از گلدهی	۰	۱/۱۶def	۰/۴۶hij	۱/۶۲fghi	۰/۰۲۹cd	۰/۳۱e	۰/۴۷a
		۵۰	۲/۱۴ab	۰/۷۶cdef	۱/۹۵defg	۰/۰۲۵def	۰/۳۶d	۰/۳۱def
		۱۰۰	۱/۴۳cde	۰/۵۲ghij	۲/۹۱ab	۰/۰۱۹fgh	۰/۳۵d	۰/۳۲def
		۱۵۰	۱/۸۲abc	۰/۶۵defghi	۲/۴۸abcd	۱۰/۰۱۳	۰/۳۹cd	۰/۳۴bcde
	محلول‌پاشی بعد از گلدهی	۰	۱/۱۴def	۰/۴۳ij	۱/۵۷ghi	۰/۰۲۸d	۰/۲۷ef	۰/۴۷a
		۵۰	۱/۹۵abc	۰/۶۶defghi	۲/۳۶bcde	۰/۰۱۷gh	۰/۳۰e	۰/۲۷fg
		۱۰۰	۱/۷۵abc	۰/۶۱defghi	۲/۶۲abc	۰/۰۱۸fgh	۰/۳۵d	۰/۳۱def
		۱۵۰	۱/۹۵abc	۰/۷۴cdefg	۲/۶۹abc	۰/۰۱۶gh	۰/۳۵d	۰/۳۲def
تنش بعد از گل‌دهی	محلول‌پاشی قبل از گلدهی	۰	۰/۷۹f	۰/۳۶j	۱/۱۵i	۰/۰۴۴a	۰/۲۵f	۰/۴۶a
		۵۰	۰/۷۵f	۱/۰۳ab	۱/۷۸efgh	۰/۰۴۰ab	۰/۳۵d	۰/۳۰ef
		۱۰۰	۰/۸۱f	۰/۸۱bcd	۱/۶۳fghi	۰/۰۳۵bc	۰/۳۶d	۰/۳۳cde
		۱۵۰	۰/۷۵f	۰/۷۶cde	۱/۵۲ghi	۰/۰۳۵bc	۰/۴۳bc	۰/۳۳bcde
	محلول‌پاشی بعد از گلدهی	۰	۰/۷۵f	۰/۴۸hij	۱/۲۳hi	۰/۰۴۲a	۰/۲۵f	۰/۴۷a
		۵۰	۰/۸۴f	۱/۱۳a	۱/۹۷defg	۰/۰۳۵bc	۰/۴۱bc	۰/۳۴bcde
		۱۰۰	۰/۹۴ef	۰/۶۰defghi	۱/۵۵ghi	۰/۰۲۷de	۰/۴۴b	۰/۳۶bcd
		۱۵۰	۰/۹۶ef	۰/۹۱bc	۱/۸۷defg	۰/۰۲۲efg	۰/۴۳bc	۰/۳۸bc

در هر ستون میانگین‌هائی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند.

در شرایط بدون تنش کاربرد اسید آسکوربیک تأثیری بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز نداشت (جدول ۳). اما تنها در کرتهای محلول پاشی در مرحلهٔ زایشی و بدون تنش، مصرف ppm ۱۵۰ نسبت به عدم مصرف آن، فعالیت این آنزیم را کاهش داد همچنین کاربرد ppm ۱۵۰ اسید آسکوربیک در مرحلهٔ رویشی و تنش در این مرحله کاهش معنی‌داری را در فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد درپی داشت. کاربرد اسید آسکوربیک با غلظتهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ ppm بعد از گل‌دهی و تنش قبل از گل‌دهی اختلافی با هم نداشتند اما سبب کاهش فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز نسبت به شاهد شدند. در کرتهایی که در فاز زایشی تنش دیده بودند و اسید آسکوربیک در این فاز

www.SID.ir

Archive of SID

مصرف شده بود، مشاهده شد که مصرف ppm ۱۵۰ اسید آسکوربیک، فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز را کاهش داده است.

بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمارهای تنش دیده و بدون مصرف اسید آسکوربیک مشاهده شد. همچنین کاربرد اسید آسکوربیک در فاز رویشی و تنش در فاز زایشی تأثیری بر فعالیت این آنزیم نداشت و اختلافی با عدم مصرف آن نشان نداد. بین مصرف ۵۰ و ۱۰۰ ppm با تیمار شاهد در مصرف اسید آسکوربیک بعد از گل‌دهی و تنش بعد از گل‌دهی از لحاظ آماری اختلافی وجود نداشت. اما کاربرد ppm ۱۵۰ اسید آسکوربیک در این تیمار سبب کاهش فعالیت، نسبت به شاهد گشت. تیمارهای بدون تنش کمترین میزان فعالیت آنزیم را نشان دادند و کاربرد اسید آسکوربیک در این تیمارها تأثیری بر میزان فعالیت نداشت. مرحلهٔ زایشی در ذرت حساس ترین مرحله به تنش کم آبی است به طوری که فعالیت آنزیم در این مرحله به شدت افزایش یافت. تنش کم آبی در مرحله زایشی به دلیل نیاز بیشتر گیاه به آب و بیشتر بودن تبخیر و تعرق اثر بیشتری بر گیاه می‌گذارد و افزایش فعالیت آنزیمها در این مرحله نسبت به مرحلهٔ رویشی بیشتر است. به این دلیل تأثیر اسید آسکوربیک در مرحلهٔ رویشی بیشتر از زایشی بود. محلول‌پاشی با ppm ۱۵۰ اسید آسکوربیک بعد از تنش در مرحلهٔ زایشی کاهش فعالیت آنزیمهای پلی فنول اکسیداز و پراکسیداز را در پی داشت. پراکسیداز نیز در پاکسازی مولکول پراکسید هیدروژن نقش دارد(۴۳). چنین به نظر می‌آید که کاهش یون سوپراکسید توسط اسید آسکوربیک تولید این ماده را توسط سوپراکسید دیسموتاز کاهش داده و در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز برای تجزیهٔ پراکسید هیدروژن کاهش می‌یابد. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که کاهش فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان، ناشی از مصرف اسید آسکوربیک، به اثر غیر مستقیم اسید آسکوربیک بر روی آنزیمها برمی‌گردد بدین ترتیب که اسید آسکوربیک با کاهش اثر مخرب تنش از افزایش فعالیت آنزیمها جلوگیری کرده است.

کمترین میزان پروتئین در تیمارهائی که بعد از گل‌دهی تنش دیده و محلول‌پاشی نشده بودند مشاهده شد. در اکثر موارد مشاهده شد که مصرف ۱۰۰ و ppm۱۵۰ اسید آسکوربیک سبب افزایش پروتئین شده است. تنش کم آبی با تولید رادیکالهای مخرب اکسیژن سبب تخریب ساختار پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه می‌شود. کاهش پتانسیل آب در برگهای ذرت، موجب نقصان قابل توجهی در پلی-ریبوزومها و مونوریبوزومها می‌شود که این مسئله باز گو کننده کاهش سنتز پروتئینها می‌باشد (۱۲). همچنین رادیکالهای آزاد اکسیژن میل ترکیبی بالایی با پروتئینها داشته و سبب اکسید شدن آنها می‌شوند. تنش بعد از گل-دهی بیشترین تأثیر را بر محتوی پروتئین محلول در برگ داشت. استفاده از اسید آسکوربیک، سبب افزایش محتوی پروتئین شد. اسید آسکوربیک از اکسید شدن و تخریب ساختار پروتئینها جلوگیری به عمل می‌آورد.

گونه‌های فعال اکسیژن عامل اصلی پراکسیداسیون لیپیدی هستند (۴۲). بیشترین غلظت مالون‌دی‌آلدهید در تیمارهای تنش دیده و بدون مصرف اسید آسکوربیک مشاهده شد اما در کرت محلول‌پاشی بعد از گل‌دهی و تنش قبل از گل دهی مصرف ppm ۵۰ اختلافی با شاهد نشان نداد. در کرتهای بدون تنش محتوی مالون‌دی‌آلدهید کمترین مقدار بود. مصرف اسید آسکوربیک سبب کاهش غلظت مالون-دی‌آلدهید گشت اما در بین غلظت آنها اختلافی وجود نداشت. اسیدهای چرب و لیپیدها حساسیت زیادی به اکسیژن دارند و به سرعت اکسید می‌شوند از آنجایی که غشای سلولی یک غشای فسفولیپیدی می‌باشد واکنش اکسیژن با آن سبب تخریب غشاء سلولی و ترشح الکترولیت‌ها به بیرون سلول می‌شود. اسید آسکوربیک با پاکسازی اکسیژن فعال سبب کاهش در اکسیداسیون چربیهای غشای سلولی و کاهش محتوی مالون‌دی‌آلدهید

www.SID.ir

Archive of SID

می گردد. به طوری که نتایج به دست آمده با نتایج آزمایش شالاتاو نئومن بر روی گوجه فرنگی مطابقت دارد(۳۶).

تنش بعد از گل‌دهی کمترین میزان کلروفیل a را به خود اختصاص داد. مصرف اسید آسکوربیک تنها در فاز زایشی و تنش رویشی سبب افزایش کلروفیل a نسبت به شاهد گشت. بیشترین غلظت کلروفیل b در تیمار ppm ۵۰ در زمان مصرف قبل و بعد از گل‌دهی در شرایط تنش بعد از گل‌دهی به دست آمد. مصرف اسید آسکوربیک در مرحلهٔ رویشی سبب افزایش کلروفیل b در شرایط تنش زایشی شد. محلول‌پاشی با اسید آسکوربیک بعد از ظهور گل تاجی و تنش قبل از گل‌دهی باعث افزایش محتوی کلروفیل کل شد. به طوری که نتایج نشان می دهند تنش سبب کاهش محتوی کلروفیل گردیده است. در گیاهان علائم بروز تنشهای اکسیداتیو شامل کاهش پروتئینها، کاهش محتوی کلروفیل و نفوذ پذیری غشاء می‌باشند که منجر به کاهش فتوسنتز و در نتیجه رشد گیاه می شوند (٤٠). تنش کم آبی سبب افزایش رادیکالهای آزاد اکسیژن در کلروپلاست شده و تخریب مولکول کلروفیل و غشاء کلروپلاست را در پی دارد که خود منجر به کاهش فتوسنتز و رشد می‌گردد. در گیاهان تنش دیده کاهش معنی‌داری در محتوی کلروفیل کل و کلروفیل a مشاهده شد. در چنین شرایطی مولکول کلروفیل به یک عامل فوتودینامیک برای کاهش اثر مخرب نیاز دارد (۳۹) در غیر این صورت، تخریب کلروفیل توسط گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. همچنین تخریب مولکول کلروفیل به وسیلهٔ جدا شدن زنجیره فیتولی از حلقه پورفیرین در اثر رادیکالهای آزاد اکسیژن و یا آنزیم کلروفیلاز صورت می-گیرد و در گیاهان حساس تجلی ژنهای کد کننده آنزیم کلروفیلاز افزایش می‌یابد (۹). اسید آسکوربیک به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی خود از تخریب کلروفیل جلوگیری کرده و به طور غیر مستقیم سبب افزایش آن شد.

بالاترین غلظت پرولین در کرت تنش زایشی و بدون مصرف اسید آسکوربیک مشاهده شد. در شرایط بدون تنش مصرف اسید آسکوربیک تأثیری بر محتوی پرولین نداشت مصرف ۱۰۰ و ۱۵۰ ppm در فاز رویشی و تنش در این مرحله، سبب کاهش پرولین نسبت به شاهد شد همچنین درزمان مصرف بعد از گل‌دهی نیز نتایج مشابهی به دست آمد. مصرف ۱۰۰ و ppm۱۵۰ اسید آسکوربیک در زمان مصرف قبل و بعد از گل‌دهی در شرایط تنش بعد از گل دهی باعث کاهش غلظت پرولین نسبت به عدم مصرف آن گردید. در شرایط تنش غلظت اسید آمینه پرولین نسبت به سایر اسیدهای آمینه افزایش می‌یابد، پرولین به عنوان مخزن ذخیره‌ای نیتروژن و یا مادهٔ محلولی که پتانسیل اسمزی سیتوپلاسم را کاهش می‌دهد عمل می-نماید و گیاه را در تحمل به تنش یاری می‌کند (۱۰). پرولین، پروتئینها و غشاهای سلولی را از آسیب غلظتهای بالای یونها حفظ می نماید. اسید آسکوربیک با پاکسازی رادیکالهای آزاد اکسیژن سبب کاهش خسارت به اسیدهای چرب، پروتئینها شده و در نتیجه اثر مخرب تنش را کاهش می دهد و لذا سنتز و تجمع پرولین به عنوان یک عکس-العمل گیاه به تنش کاهش می‌یابد.

در شرایط تنشهای اکسیداتیو آسکوربات به عنوان یک ماده مصرفی در پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن عمل کرده و در گیاه کاهش می‌یابد. بیشترین محتوی آسکوربات در تیمارهای بدون تنش همراه با مصرف ۱۰۰ و ۱۵۰ ppm اسید آسکوربیک در قبل و بعد از گل‌دهی مشاهده شد. تیمارهای تنش بعد از گل‌دهی و بدون مصرف اسید آسکوربیک جزء دارندگان کمترین مقدار آسکوربات بودند. به طور کلی محلول‌پاشی محتوی آسکوربات را افزایش داد ولی در کرت‌های تنش دیده این افزایش کمتر بود. بیشترین مقدار دهیدروآسکوربات در تیمارهای تنش قبل و بعد از گل‌دهی و بدون مصرف اسید آسکوربیک به دست آمد. کمترین میزان دهیدروآسکوربات در تیمارهای بدون تنش مشاهده شد. در گیاهان مقاوم به تنش میزان

www.SID.ir

Archive of SID

آسکوربات درون سلول افزایش می‌یابد ولی در گیاهان حساس کاهش آن گزارش شده است (۳۸). بر طبق نتایج به دست آمده، تنش بعد از ظهور گل نر، محتوی آسکوربات را کاهش داد. ذرت در این مرحله حساسیت بالایی به تنش کمبود آب دارد و کاهش محتوی آسکوربات در اثر مصرف آن برای مقابله با تنش مؤید این مطلب است. همچنین در شرایط تنش و کمبود آسکوربات درون سلولی در طی مراحل اکسیداسیون، آسکوربات با دادن یک الکترون احیاء شده و تبدیل به مونودهیدروآسکوربات و سپس با دادن یک الکترون دیگر به دهیدروآسکوربات تبدیل می‌شود در نتیجه محتوای دهیدروآسکوربات درون سلولی بالا می‌رود، به این ترتیب از اکسید شدن پروتئینها، اسیدهای چرب و دیگر مولکولهای زیستی جلوگیری می‌کند (۵). اما با مصرف آسکوربات به دلیل خنثی سازی رادیکالهای آزاد تولید دهیدروآسکوربات کاهش می‌یابد. کاهش مواد آنتی‌اکسیدان مانند آسکوربات در اثر افزایش تنش در گندم (٤٣) و ذرت (۲۸) گزارش شده است که علت آن اثر تنش کمبود آب بر پروتئینها و ژنهای کد کننده آنتی‌اکسیدانها می‌باشد (٦).

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت تنش کم‌آبی سبب ایجاد تغییرات بیوشیمیایی در گیاه شد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه نیز به این تنش پاسخ داد. همچنین اسید آسکوربیک به عنوان یک آنتی‌اکسیدان اثرات مضر حاصل از تنش کمبود آب را کاهش داد و سبب بهبود رشد گیاه در شرایط تنش شد به طوری که گیاه اسید آسکوربیک را به عنوان یک آنتی‌اکسیدان نسبت به افزایش فعالیت آنزیمها ترجیح داد. از این رو می‌توان پیشنهاد نمود که مصرف این ماده در گیاهان تنش دیده عاملی برای رفع و یا کاهش تنش و به دنبال آن افزایش عملکرد می‌باشد و کاربرد آن به صورت محلول‌پاشی روی گیاهان درحال تنش توصیه می‌شود.

منابع

1-Agarwal, S., Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme resposes to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. Plant Biol. 48: 555-560.

2-Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphennoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 4:1-150.

3-Arrigoni, O., 1994. Ascorbate system in plant development. J. of Bioenerg. Biomembr. 26: 407-419.

4-Asada, K., 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 50: 601–639.

5-Asada, K., 1994. Production and action of active oxygen in photosynthetic tissues. In: C.H., Foyer, Mullineaux, P.M. (Eds.): Causes of Photooxidative Stress in Plants and Amelioration of Defence System. CRC Press, Boca Raton. pp. 77-109.

6-Bartoli, C.G., Simontacchi, M., Tambussi, E., Beltrano, J., Montaldi, E., Puntarulo, S., 1999. Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. J. Exp. Bot. 50: 375–383.

7-Basaga, H.S. 1989. Biochemical aspects of free radicals. J. of Biochem Cell Biol. 68: 989-998.

8-Bates, L.S., Waldern, R.P. and Teave, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39: 205-207.

9-Benedetti, C.E. and P. Arruda. 2002. Altering the expression of the chlorophyllase gene ATHCOR1 in transgenic Arabidopsis caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio. Plant Physiol. 128: 1255–1263.

10-Bian, YM.. Chen, S.Y Liu, SK Xie, MY. 1988. Effects of HF on praline of some plants. Plant Physiol. Commun. 6: 19-21.

11-Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., 1992. Superoxie dismutase and stress tolerance. Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 43: 83-116.

12-Bradford, K.J. and Hsiao, T.C. 1982. Physiological response to moderate water stress. In: Physiological Plant Ecology. II. Water relation and carbon assimilation Encyclopedia

www.SID.ir

Archive of SID

Plant physiques, Vol. 123., eds Laneg, O.L., Nobel, P. S., Osmond, C. B. and Zeigler, Z, Springer Vellage, Berlin and New York. pp. 263-324.

13-Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annu. Rev. Biochem.72: 248-254.

14-Cakmak, I. and Horst, W. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glysin max*). Plant Phisiol. 83: 463-468.

15-Carrasco-Luna J, Calatayud A, Gonzalez-Daros F, de Valle-Tascon S. 1995. Hexacyanoferrate (III) stimulation of elongation in coleoptile segments from *Zea mays* L. Protoplasma. 184: 63-71.

16-Chen, W. P., Li, P.H., Chen, T.H.H. 2000. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. - Plant Cell Environ. 23: 609- 618.

17-Comba, M.E., Benavides, M.P., Tomaro, M.L. 1998. Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules. - Aust. J. Plant Physiol. 25: 665-671.

18-De Vos, C., Schat, H., De Waal, M., Vooijs, R. and Ernst, W. 1991. Increased to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant silene cucubalus, Plant Physiol. 82: 523-528.

19-Del Rio, L.A., Sevilla, F., Sandalio, L.M., Palma, J.M.L. 1991 Nutritional effects and expression of superoxide dismutase: induction and gene expression, diagnostics, prospective protection against oxygen toxicity. - Free Radical Res. Commun. 12-13: 819-828.

20-Elstner, E.F. 1991. Mechanism of oxygen activation in different compartments of plant cell. In: Pell, E.J., Steffen, K.L. (ed.): Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism. Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville. pp. 13-25.

21-Foyer, C.H. Lelandais, M. Kunert, K.J. 1994. Photooxidative stress in plants, Plant Physiol.. 92: 696-717.

22-Ghanati, F., Morita, A., Yokota, H. 2002. Induction of suberin and increase of liginin content by exess Boron in Tabacco cell. Soil Science. Plant Nutrition.48 :357-364.

23-Giannopolitis, C. and Ries, S. 1997. Superoxid desmutase. I.Occurence in higher plant. Plant Physiol. 59: 309-314.

24-Gressel, J. Galun, E. 1994. Genetic controls of photooxidant tolerance. In: C.H., Foyer, Mullineaux, P.M. (Eds.): Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, pp. 237-274.

25-Hagar, H., Ueda, N., Shal, S.V. 1996. Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury LLC-PK1 cells. - Amer. J. Physiol. 271: 209-215.

26-Hernandez, J.A., Jimenez, A., Mullineaux, P., Sevilla, F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. – Plant Cell Environ. 23: 853-862.

27-Jiang, M., Zhang, J.2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative efence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. - Plant Cell Physiol. 42: 1265- 1273.

28-Jiang, M.Y., Zhang, J.H. 2002. Role of abscisic acid in water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. Free Radic. Res. 36: 1001–1015.

29-Law MY, Charles SA, Halliwell B. 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. J Biochem 253: 109-116.

30-Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annu. Rev. of plant physiol. and plant Mol. Biol.49: 249-279.

31-Pattangual, W., Madore, M. 1999. Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in *Coleus*. Plant Physiol. 121: 998-993.

32-Pignocchi C, Foyer CH. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. *Current Opinion in* Plant Biol. 6: 379–389.

33-Rayle DL, Clelend RE. 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiol. 99: 1271-1274.

34-Rich, P.R., Bonner, W.D., Jr. 1978. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. - Arch. Biochem. Biophys. 188: 206-213.

35-Salin, M.L. 1991. Chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. Free Radical Res. Commun. 12-13: 851-858.

www.SID.ir

Archive of SID

36-Shalata A, Neumann PM. 2001. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. J. of Exp. Bot. 52: 2207–2211.

37-Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. Curr. Opin. Biotechnol. 9: 214-219.

38-Sreenivasulu, N. Grimm, B. Wobus U. and Weschke, W. 2000. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet *(setaria italica*).Physiol. Plant.. 109:435-442.

39-Takamiya, K.I. Tsuchiya, T. and Ohta, H. 2000. Degradation pathway (s) of chlorophyll: What has gene cloning revealed? Trends Plant Sci. 5: 426–431.

40-Tompson, J.E. Ledge, R.L and Barber R.F. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. New Phytol. 105: 317-344.

41-Tsugane K, Koboyashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Koboyashi H. 1999. A recessive *Arabidobsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhancedactive oxygen detoxification. The Plant Cell .11: 1195-1206.

42-Upadhyaya, H. Panda, S.K. 2004. Responses of Camellia sinensis to drought and rehydration. - Biol. Plant. 48: 597-600.

43-Zhang, J.X., Kirkham, M.B. 1994. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. Plant Cell Physiol. 35: 785–791.

44-Zhu, J.K. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis, Plant Physiol. 124: 941-948

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Water Deficit Stress and Foliar Application of Ascorbic acid on Antioxidants Enzymes Activity and Some Biochemical's Changes in Leaves of Grain Corn (*Zea maize* L.)

Dolatabadian A.[1], Modarres Sanavy S.A.M.[1] and Sharifi M.[2]

[1] **Agronomy Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN**

[2] **Plant Science Dept., Faculty of Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN**

Abstract

Water deficit stress is a common abiotic stress that seriously affects crop production in more parts of the world. Thus, in order to study the effects of water deficit stress and foliar application of ascorbic acid on the activity of some antioxidant enzymes, proline accumulation, lipid peroxidation, protein, chlorophyll, ascorbate and dehydroascorbate contents of grain corn (single cross 704), an experiment was conducted in Faculty of Agronomy of Tarbiat Modares University. Experiment was as a split-split plot in randomized complete block design arrangement with three replications. Water deficit stress was allocated to main plots (before flowering, after flowering and without stress). Ascorbic acid was used at two times (before and after flowering) in sub plot units and four concentrations (0, 50, 100, 150-ppm) in sub-sub plot units. Results showed that water deficit stress increased antioxidant enzymes activity, as this enhancement was remarkably in after flowering stress plots whereas, foliar application of ascorbic acid decreased it. In addition, water deficit stress decreased protein content and chlorophyll concentration in leaves. Proline and malondialdehyde content were increased in response to stress. Ascorbic acid prevented of degradation of protein and chlorophyll of leaves and decreased proline and malondialdehyde in leaves by reduction of water deficit stress. It was observed that cellular ascorbate concentration was increased by exogenous ascorbate application and dehydroascorbate concentration was decreased in water deficit stress treatments particularly in plots which were treated after flowering stress. In addition, plants were preferred ascorbate utilize as a scavenger than the enhancement enzyme activity in against stress. The latter could indirectly decrease enzyme activity and improved growth conditions for plants.

Keywords: Water deficit stress, ascorbic acid, Antioxidant enzymes, Grain corn

www.SID.ir