فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۲۷-۱٤ (۱۳۹۱)

اثر تنش شوری و برهم‌کنش آن با آسکوربات بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پرولین و مالون دی‌آلدئید در گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) چهار هفته بعد از جوانه‌زنی

مه‌لقا قربانلی[1*]، فریده احمدی[2]، اعظم منفرد[3] و غلامحسین بخشی‌خانیکی[4]

۱*- نویسنده مسئول، استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد واحد گرگان، پست الکترونیک: mghorbanli@gorganiau.ir
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور، تهران
۳- استادیار، دانشگاه پیام نور، تهران
٤- استاد، دانشگاه پیام نور، تهران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۹

چکیده

آسکوربات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی اثرهای زیستی قابل‌توجهی بر روی رشد و نمو گیاهان دارد، ازجمله باعث افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود. در پژوهش حاضر اثر تنش شوری و برهم‌کنش آن با آسکوربات روی مقدار پرولین، آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و مالون دی‌آلدئید در گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.)، مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان مورد مطالعه در گلدان‌های حاوی شن، رس و خاک برگ (به نسبت ۱: ۱: ۱) کاشته شده و گیاهان سه هفته بعد از جوانه‌زنی تحت غلظت‌های مختلف کلریدسدیم (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ میلی‌مولار) و آسکوربات (۹ میلی‌مولار) قرار گرفتند. در گیاهان تحت تیمار شوری با افزایش غلظت‌های NaCl میزان پرولین، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و مالون دی‌آلدئید افزایش یافت و گیاهانی که همزمان تحت تأثیر کلریدسدیم و آسکوربات قرار گرفتند در میزان غلظت‌های یکسان NaCl میزان پرولین، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش بیشتری نشان دادند. مقدار افزایش مالون دی‌آلدئید کاهش معنی‌داری داشت که نشان‌دهنده اثر آسکوربات بر کاهش خسارت اکسیداتیو است.

واژه‌های کلیدی: کلرید سدیم، آسکوربات، زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.)، پرولین، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، مالون دی‌آلدئید.

مقدمه

زیره سبز یکی از مهمترین گیاهان دارویی است که نه تنها در فهرست قدیمیترین گیاهان دارویی جهان ثبت شده بلکه در فهرست جدیدترین منابع ارائه شده نیز جایگاه خود را حفظ نموده‌است. این گیاه یکی از محصولات مهم صادراتی است که با توجه به شرایط خاص اکولوژیکی مورد نیاز برای کشت آن، در مناطق محدودی از جهان تولید می‌گردد (بالندری، ۱۳۷۱؛ صادقی، ۱۳۷۰).

طیف وسیعی از تنش‌های محیطی مانند افزایش یا کاهش دما، خشکی، شوری و اشعه ماوراء بنفش و میکروبها برای گیاهان مضر هستند (Van Breusegem *et al.*, 2001). شوری در خاک یا آب یکی از تنش‌های

Archive of SID

www.SID.ir

اصلی در مناطق خشک و نیمه‌خشک است و می‌تواند رشد و محصول گیاه را بشدت محدود کند (Koca *et al*., 2007؛ Allakhverdiev *et al*., 2000).

بنابراین به‌دلیل توسعه و افزایش زمین‌های شور و کاهش زمین کشاورزی مطلوب برای کشت، شناسایی گیاهان دارویی مقاوم به شوری و یا عواملی که بتوانند اثرهای شوری را کاهش دهند، اهمیت زیادی دارد. شوری مشکلات زیادی را برای رشد و گسترش گیاه به‌خصوص گلیکوفیت‌ها از طریق تأثیرهای منفی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه دارد (Shannon *et al*., 1994).

شوری بالا یکی از مهمترین عوامل محدودکننده رشد و گسترش محصولات کشاورزی است (Jaleel *et al*., 2007؛ Flowers, 2004). بنابراین افزایش شوری خاک مسئله مهمی به‌شمار می‌رود و افزایش غلظت نمک سبب عدم توازن یونی در سلول‌ها و در نتیجه سمیت یونی و تنش اسموتیک می‌شود (Mandhania *et al*., 2006؛ Dermiral & Turkan, 2005). پاسخ گیاهان به افزایش شوری پیچیده است و باعث تغییراتی در ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیسم گیاه می‌شود (Parida & Das, 2005). از تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی که در پاسخ به شوری ممکن است رخ دهد، محصولات اکسیژن‌های واکنشگر (ROS)، مانند رادیکال‌های سوپراکسیداز (O_2^-) و اکسیژن منفرد (O_1^-)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^-) و همراه با آنها تشکیل H_2O_2 می‌باشد (Misra & Gupta, 2006). ROS بر روی تعدادی از ترکیب های سلولی اثر گذاشته و باعث صدمه به غشاء و ساختارهای سلولی شده و مانع از رشد منظم گیاه می‌شود (Agarwal & Shaheen, 2007؛ Gao *et al*., 2008؛ Verma & Mishra, 2005). تعدادی از اکسیژن‌های واکنش‌گر سمی هستند و اگر گیاه بخواهد باقی بماند و رشد کند، باید به‌وسیله پاسخ‌های سلول اثرشان را کاهش دهد. جاروب‌کنندگان ROS باعث خنثی‌شدن اثر سمی اکسیژن‌های واکنش‌گر می‌شوند که ممکن است نتیجه فعالیت پیوسته و همزمان شماری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، سوپراکسید دیس‌موتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) باشد. سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو به یک سیستم جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد مجهز هستند که از این میان می‌توان به اسید آسکوربیک اشاره نمود (Beltagi, 2008). سازگاری به نمک به‌وسیله افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها برای از بین بردن ROS صورت می‌گیرد که به‌وسیله گزارش‌های پیشین تأیید می‌شود (Hernandez *et al*., 1993؛ Sehmer *et al*., 1995).

اسید آسکوربیک یک مولکول کوچک فراوان در گیاهان و یک ماده کلیدی در شبکه آنتی‌اکسیدانی شامل آسکوربات، گلوتاتیون، آلفا-توکوفرول و یکسری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است. همچنین نشان داده شده‌است که اسید آسکوربیک نقش‌های متعددی در رشد گیاه ازجمله تقسیم سلولی، گسترش دیواره سلولی و سایر پدیده‌های رشدی دارد (Conklin, 2001؛ Piganocchi & Foyer, 2003). گزارشهای متعددی مبنی بر اثرهای مثبت اسید آسکوربیک بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان مختلف وجود دارد؛ ازجمله می‌توان به گزارشهایی بر روی نخود (Beltagi , 2008) در خصوص افزایش پارامترهای رشد، بر روی آرابید و پسیس (Huang *et al*., 2005) در زمینه افزایش محتوی کلروفیل و کاروتنوئید و بررسی Sheteawi (۲۰۰۷) بر

Archive of SID

www.SID.ir

روی سویا و افزایش میزان پرولین اشاره کرد که نشان‌دهنده آنست که این گیاهان در مقایسه با گیاهانی که تحت تنش شوری قرار دارند، بردباری بیشتری در برابر شوری از خود نشان می‌دهند. در این تحقیق اثر متقابل شوری و آسکوربات بر روی گیاه زیره سبز به منظور تخفیف اثر تنش شوری بررسی شد.

مواد و روشها

کاشت گیاه زیره سبز

بذرها پس از ضدعفونی شدن، برای رشد بهتر، به مدت ۳۶ ساعت در آب جاری قرار گرفتند. بدین ترتیب، مقدار زیادی از فنل‌های بذر که مانع جوانه‌زنی می‌شوند، آب‌شویی شدند. سپس در گلدان پلاستیکی به عمق ۱۲ سانتی‌متر و قطر دهانه ۱۲ سانتی‌متر کاشته شدند. خاک مورد استفاده در این پژوهش دارای ماسه رس و هوموس به نسبت ۱: ۱: ۱ بود.

تهیه محلول‌های لازم برای تیمارها

تهیه محلول‌های کلرید سدیم: محلول‌هایی با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی‌مولار کلریدسدیم تهیه شد.

تهیه محلول آسکوربات: محلول اسید آسکوربیک ۹ میلی‌مولار تهیه شد و به علت ناپایداری آن برای هر سری استفاده در تیمارها، این محلول به‌صورت تازه تهیه و استفاده شد.

اعمال تیمار بر روی گیاهان

گیاهان بعد از حدود ۷ روز جوانه زدند و ۲۱ روز پس از جوانه‌زنی گلدان‌های مختلف تحت تیمار قرار گرفتند. نیمی از گلدان‌ها تحت تیمارهای مختلف نمک با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ میلی‌مولار کلریدسدیم و نیمی دیگر تحت تیمارهای کلریدسدیم با غلظت‌های فوق و اسپری با اسید آسکوربیک ۹ میلی‌مولار قرار گرفتند.

روش استخراج و سنجش پرولین

برای استخراج و سنجش پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. برای تهیه معرف نین‌هیدرین، ۱/۲۵ گرم نین‌هیدرین در ۳۰ میلی‌لیتر استیک‌اسید گلاسیال و در حرارت ملایم حل شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ٦ مولار به آن اضافه شده و کاملاً به‌هم زده شد. این محلول در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت پایدار می‌باشد. برای سنجش محتوای پرولین ۰/۵ گرم بافت تر گیاه را برداشته در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ در هاون چینی ساییده تا کاملاً یکنواخت شد. عصاره حاصل با کاغذ واتمن شماره ۲ صاف و حجم آن یادداشت شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده با ۲ میلی‌لیتر محلول نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک‌اسید گلاسیال مخلوط شده و به مدت یک ساعت در حمام آب‌گرم (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. پس از آن با قرار دادن لوله‌های آزمایش در حمام یخ واکنش مذکور پایان یافت. سپس ٤ میلی‌لیتر تولوئن به محتویات هر لوله اضافه گردید و به مدت ۲۰– ۱۵ ثانیه به شدت به‌هم زده شد. فاز رویی که شامل تولوئن و پرولین بود از فاز آبی جدا شد و جذب آن به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد. در این سنجش از تولوئن به‌عنوان شاهد استفاده شد. غلظت پرولین در هر نمونه براساس جذب و غلظت‌های معین موجود در منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج آنزیم‌ها

برای استخراج و سنجش پروتئین از روش Benavides و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. ۵ گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی ۵ میلی‌لیتر بافر تریس HCl ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۵ به مدت ۳۰ دقیقه در حمام یخ کاملاً ساییده شد. سپس مخلوط همگن حاصل در لوله سانتریفوژ ریخته و ۱۰ دقیقه به حالت سکون نگهداری شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار، عمل سانتریفوژ نمونه‌ها انجام شد (Sudhakar *et al*., 2001). برای سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز از آنجا که این آنزیم در غیاب آسکوربات بسیار ناپایدار می‌باشد، به بافر عصاره‌گیری فوق ۰/۲ میلی‌لیتر آسکوربات ۵ میلی‌مولار اضافه شد و تمامی مراحل همانند سایر آنزیم‌ها به انجام رسید. در پایان مرحله سانتریفوژ لوله‌ها به آرامی از دستگاه خارج و محلول رویی از چند لایه پارچه عبور داده شد و از عصاره‌های پروتئینی حاصل برای بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز استفاده شد.

روش سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

پس از آماده‌سازی عصاره پروتئینی به منظور سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۰۵ و pH= ۷) و ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳٪ را در حمام یخ با یکدیگر مخلوط کرده بلافاصله ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین براساس تغییرات واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر گرم وزن تر بافت گیاهی محاسبه گردید (Aebi, 1974).

روش سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

پس از آماده‌سازی عصاره‌های پروتئینی، برای سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم آسکوربات پراکسیداز معرف زیر مورد استفاده قرار گرفت:

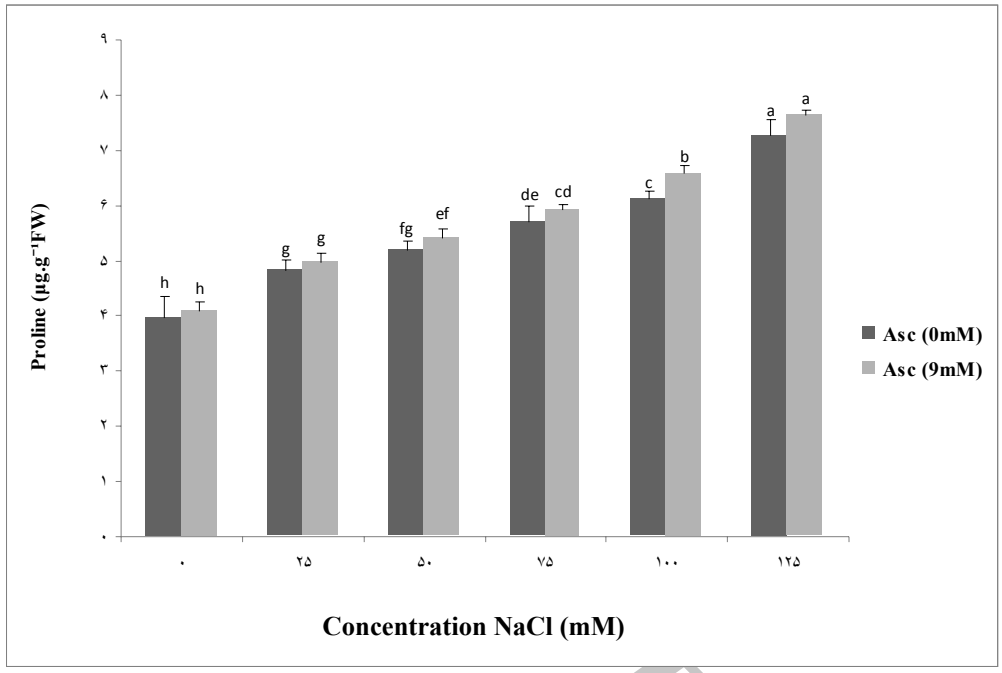
۲ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۵ مولار و pH ٦/٥)، ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه (۳ V/V٪) و ۰/۲ میلی‌لیتر آسکوربات ۵۰ میکرومولار را در حمام یخ با هم مخلوط کرده، بلافاصله ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲٦٥ نانومتر خوانده شد و فعالیت آنزیمی بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین و براساس تغییرات جذب در دقیقه به‌ازای هر گرم وزن تر بافت گیاهی محاسبه گردید (Nakano & Asada, 1981).

اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA)

طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تازه برگی توزین شد و در هاون چینی با ۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک (TCA) ۰/۱٪ ساییده شد. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ ٤/٥ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰٪ که دارای ۵ گرم اسید تیوباربیتوریک (TBA) در ۱۰۰ گرم بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با ٤۰۰۰ دور (g ۱۰۰۰) سانتریفوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) است. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ٦۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- اثر متقابل شوری و اسیدآسکوربیک بر میزان پرولین در گیاه زیره سبز

جدول ۱- اثر متقابل شوری و اسیدآسکوربیک بر میزان پرولین بر حسب ($\mu g.g^{-1}FW$) در گیاه زیره سبز

تیمارها	۰ mM NaCl	۲۵ mM NaCl	۵۰ mM NaCl	۷۵ mM NaCl	۱۰۰ mM NaCl	۱۲۵ mM NaCl
۰ mM Asc	۳/۹۵۳۳ ± ۰/۴۰۶۷۳ h	۴/۸۳ ± ۰/۱۸۳۳ g	۵/۱۷۶۷ ± ۰/۱۸۷۷۱ fg	۵/۶۸۶۷ ± ۰/۳۱۰۷ de	۶/۱۲۳۳ ± ۰/۱۲۶۶۲ c	۷/۲۷۳۳ ± ۰/۲۹۲۶۳ a
۹ mM Asc	۴/۰۸ ± ۰/۱۷۵۷۸ h	۴/۹۷۶۷ ± ۰/۱۶۱۶۶ g	۵/۴۰۶۷ ± ۰/۱۷۶۱۶ ef	۵/۹۲۳۳ ± ۰/۰۸۵۰۵ cd	۶/۵۷ ± ۰/۱۵ b	۷/۶۲ ± ۰/۱۱ a

میانگین‌ها مربوط به ۳ تکرارند. گروه‌بندی براساس آزمون دانکن ($p\leq0.05$) و (Bar= S.D) صورت گرفت.

www.SID.ir

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری تمام داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف با استفاده از برنامه Anova و نرم‌افزار SPSS انجام گردید. هر آزمایش به‌صورت تصادفی و سه بار تکرار شد. میانگین شاخص‌های اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون دانکن ($p\leq0.05$) گروه‌بندی شدند.

نتایج

تغییرات میزان پرولین

با افزایش غلظت کلریدسدیم، میزان پرولین در تمام تیمارها، نسبت به شاهد افزایش یافت، در عدم حضور اسیدآسکوربیک (ASC)، افزایش میزان پرولین در مقایسه با شاهد در همه تیمارها (در سطح ۰/۰۵) معنی‌دار بود.

در غلظت‌های یکسان کلرید سدیم، تیمارهایی که تحت تأثیر اسیدآسکوربیک قرار گرفته بودند، در مقایسه با گیاهانی که فقط تحت تأثیر کلرید سدیم بودند، افزایش بیشتری در میزان پرولین نشان دادند. طبق شکل ۱ بیشترین میزان پرولین در تیمار Asc= ۹ mM و NaCl= ۱۲۵ mM و کمترین میزان پرولین در شاهد (Asc= ۰ mM و NaCl= ۰ mM) مشاهده شد.

تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

تغییرات فعالیت کاتالاز: با افزایش غلظت کلریدسدیم، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش یافت. در عدم حضور اسید آسکوربیک، افزایش میزان آنزیم کاتالاز در مقایسه با شاهد (به‌استثناء NaCl= ۲۵ mM) در همه تیمارها (در سطح ۰/۰۵) معنی‌دار بود.

در غلظت‌های یکسان کلریدسدیم، در بین تمام تیمارهایی که تحت تأثیر اسید آسکوربیک قرار گرفته بودند، در مقایسه با گیاهانی که فقط تحت تأثیر کلریدسدیم بودند، افزایش بیشتری در میزان آنزیم کاتالاز مشاهده شد. طبق شکل ۲ بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار Asc= ۹ mM و NaCl= ۱۲۵ mM و کمترین فعالیت آنزیم کاتالاز در شاهد (NaCl= ۰ mM و Asc= ۰ mM) مشاهده شد.

تغییرات فعالیت آسکوربات پراکسیداز: با افزایش غلظت کلریدسدیم، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش یافت. البته در عدم حضور اسید آسکوربیک، افزایش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با شاهد (به‌استثناء NaCl= ۲۵mM) در همه تیمارها (در سطح ۰/۰۵) معنی‌دار بود.

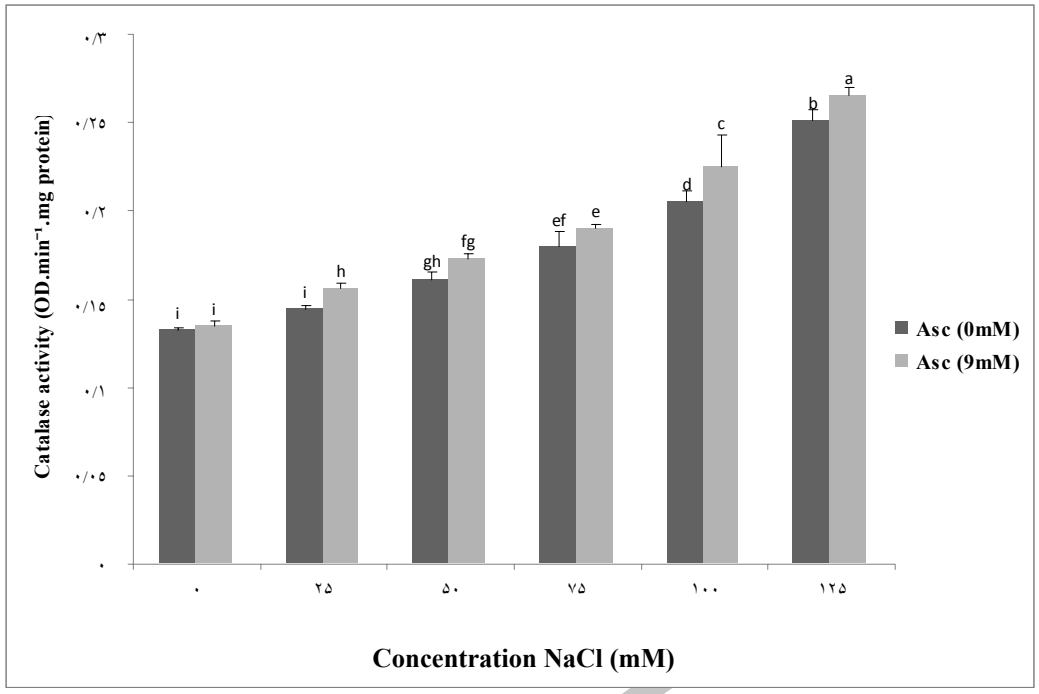
در غلظت‌های یکسان کلریدسدیم، در بین تمام تیمارهایی که تحت تأثیر اسید آسکوربیک قرار گرفته بودند، در مقایسه با گیاهانی که فقط تحت تأثیر کلریدسدیم بودند، افزایش بیشتری در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز دیده شد. طبق شکل ۳ بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار Asc= ۹ mM و NaCl= ۱۲۵ mM و کمترین فعالیت آن در شاهد (Asc= ۰ mM و NaCl= ۰ mM) مشاهده شد.

میزان مالون دی‌آلدئید: با افزایش غلظت کلریدسدیم، میزان مالون دی‌آلدئید در تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش یافت. در عدم حضور اسیدآسکوربیک، افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در مقایسه با شاهد، در همه تیمارها (در سطح ۰/۰۵) معنی‌دار بود.

در غلظت‌های یکسان کلریدسدیم، در بین تمام تیمارهایی که تحت تأثیر اسید آسکوربیک قرار گرفته بودند، در مقایسه با گیاهانی که فقط تحت تأثیر کلرید سدیم بودند، افزایش کمتری در میزان مالون دی‌آلدئید دیده شد. طبق شکل ٤ بیشترین میزان مالون دی‌آلدئید در تیمار Asc= ۰ mM و NaCl= ۱۲۵ mM مشاهده شد و کمترین میزان مالون دی‌آلدئید در شاهد وجود داشت.

Archive of SID

www.SID.ir



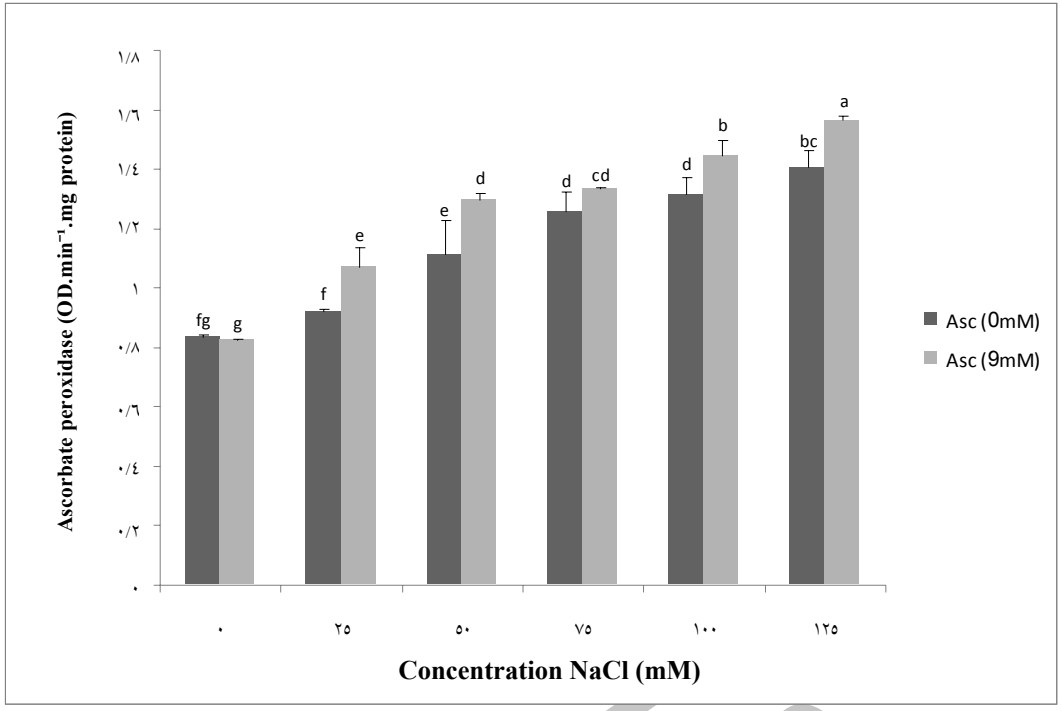
شکل ۲- اثر متقابل شوری و اسیدآسکوربیک بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه زیره سبز

جدول ۲- اثر متقابل شوری و اسید آسکوربیک بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب (OD.min⁻¹.mg protein) در گیاه زیره سبز

تیمارها	۰ mM NaCl	۲۵ mM NaCl	۵۰ mM NaC	۷۵ mM NaCl	۱۰۰ mM NaCl	۱۲۵ mM NaCl
۰ mM Asc	۰/۱۳۲ ± ۰/۰۰۲ i	۰/۱۴۳۷ ± ۰/۰۰۲۵۲ i	۰/۱۶۰۷ ± ۰/۰۰۵۰۳ gh	۰/۱۷۹۷ ± ۰/۰۰۸۶۲ ef	۰/۲۰۵۳ ± ۰/۰۰۵۶۹ d	۰/۲۵۱۳ ± ۰/۰۰۶۰۳ b
۹ mM Asc	۰/۱۳۴۳ ± ۰/۰۰۳۰۶ i	۰/۱۵۵۷ ± ۰/۰۰۳۵۱ h	۰/۱۷۲۳ ± ۰/۰۰۳۵۱ fg	۰/۱۸۹۷ ± ۰/۰۰۲۵۲ e	۰/۲۲۴۷ ± ۰/۰۱۸۴۵ c	۰/۲۶۵۳ ± ۰/۰۰۴۷۳ a

میانگین‌ها مربوط به ۳ تکرارند. گروه‌بندی براساس آزمون دانکن ($p\leq0.05$) و (Bar= S.D) صورت گرفت.

www.SID.ir



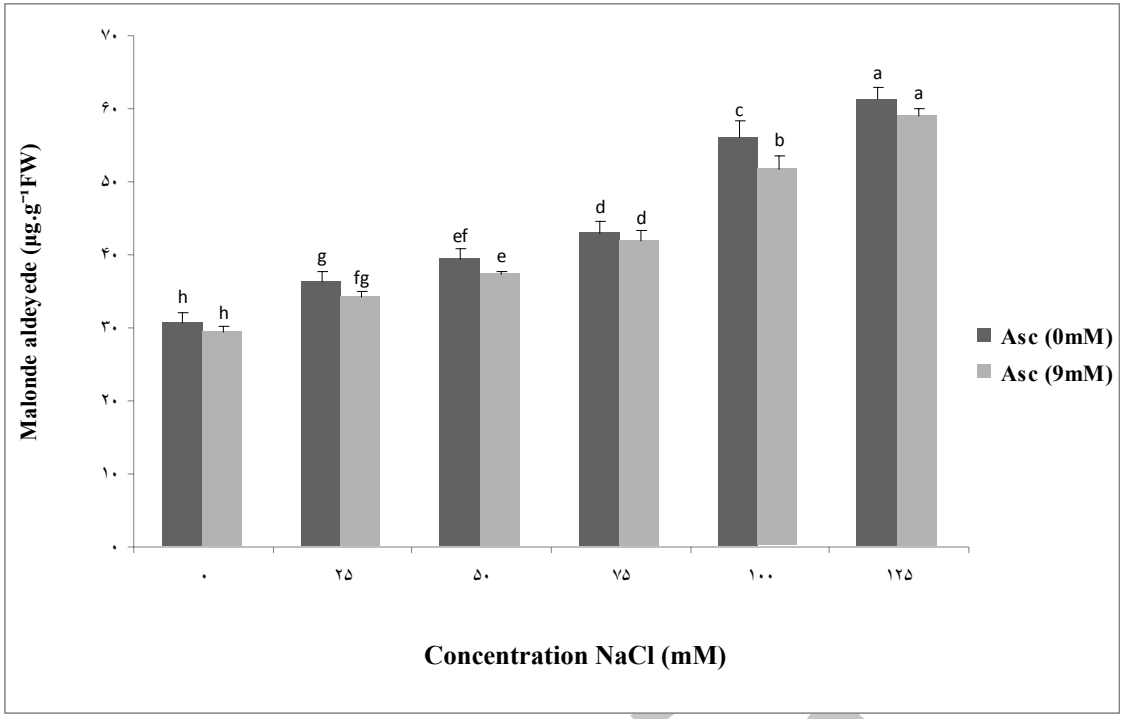
شکل ۳- اثر متقابل شوری کلریدسدیم و اسیدآسکوربیک بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه زیره سبز

جدول ۳- اثر متقابل شوری کلریدسدیم و اسیدآسکوربیک بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برحسب (OD.min⁻¹.mg protein) در گیاه زیره سبز

تیمارها	۰ mM NaCl	۲۵ mM NaCl	۵۰ mM NaCl	۷۵ mM NaCl	۱۰۰ mM NaCl	۱۲۵ mM NaCl
۰ mM Asc	۰/۸۳۲ ± ۰/۰۰۸۸۹ fg	۰/۹۱۷۷ ± ۰/۰۱۰۰۷ f	۱/۱۱٤ ± ۰/۱۱٤۹ e	۱/۲۵۸ ± ۰/۰٦۷۵۸ d	۱/۳۱۳ ± ۰/۰٦۰۲٦ d	۱/٤۰٦۷ ± ۰/۰۵۷۳۳ bc
۹ mM Asc	۰/۸۲۱ ± ۰/۰۰۹ g	۱/۰٦۷۳ ± ۰/۰٦۸٤۲ e	۱/۲۹٦ ± ۰/۰۲۳۹ d	۱/۳۳٤ ± ۰/۰۰۳٦۱ cd	۱/٤٤٤۳ ± ۰/۰۵۰۲٤ b	۱/۵٦٦۳ ± ۰/۰۱۰٦۹ a

میانگین‌ها مربوط به ۳ تکرارند. گروه‌بندی براساس آزمون دانکن ($p\leq0.05$) و (Bar= S.D) صورت گرفت.

www.SID.ir



شکل ٤- اثر متقابل شوری کلریدسدیم و اسیدآسکوربیک بر میزان مالون دی‌آلدئید در گیاه زیره سبز

جدول ٤- اثر متقابل شوری کلریدسدیم و اسیدآسکوربیک بر میزان مالون دی‌آلدئید بر حسب ($\mu g.g^{-1}FW$) در گیاه زیره سبز

تیمارها	۰ mM NaCl	۲۵ mM NaCl	۵۰ mM NaCl	۷۵ mM NaCl	۱۰۰ mM NaCl	۱۲۵ mM NaCl
۰ mM Asc	۳۰/٦۱٦۷ ± ۰/۷۵۷۱۹ h	۳٦/۱٦۳۳ ± ۰/۷۹٦۷۲ fg	۳۹/۳۱۸۳ ± ۰/۵۸٦۸۲ e	٤۲/۹۳۵ ± ۱/٤۲۰٦ d	۵٦/۱۱ ± ۱/۸٦ b	٦۱/۳۲۸۳ ± ۱/۱۷۳٦٤ a
۹ mM Asc	۲۹/٤۵ ± ۱/۵۵ h	۳٤/۱۱۸ ± ۱/۵٤٦٦۸ g	۳۷/۲۰٤۳ ± ۱/۵٤۸۰۱ ef	٤۱/۸٦٦۳ ± ۱/۵٤٤۵۳ d	۵۱/٦۹۹۷ ± ۲/۳۲۷۹۷ c	۵۸/۹ ± ۱/۵۵ a

میانگین‌ها مربوط به ۳ تکرارند. گروه‌بندی براساس آزمون دانکن ($p\leq0.05$) و (Bar= S.D) صورت گرفت.

www.SID.ir

بحث

گیاهان برای غلبه بر تنش شوری از خود مکانیسم‌های پیچیده‌ای ظاهر می‌سازند تا آنها را در برابر تنش‌های اسموتیک و یونی ناشی از شوری بالا سازگار کند. یکی از این مکانیسم‌های تنظیم اسمزی که معمولاً به‌وسیله یون‌های غیرآلی انجام می‌شود، تجمع محلول‌های سازگار (Osmoprotectant) یا حمایت‌کننده‌های اسمزی است. یون‌های غیرآلی در واکوئل قرار گرفته‌اند (Binzel *et al.*, 1988)، در حالی‌که محلول‌های آلی در بخش‌های جدا از هم و در سیتوپلاسم، (Rontein *et al.*, 2002) قرار دارند. حمایت‌کننده‌های اسمزی مولکول‌های کوچک، خنثی و غیرسمی هستند که پروتئین‌های غشاء را در برابر اثرهای مخرب محلول نمک در غلظت بالا و سایر محلول‌های زیان‌آور تثبیت می‌کنند (Munns, 2002). علاوه بر آن، حمایت‌کننده‌های اسمزی دارای غلظت‌های طبیعی در واحد سیتوپلاسمیک هستند و دارای نقش محوری در نگهداری حالت تورم در سلول و بالا بردن درجه رانش آب در حالت تنش هستند (Rontein *et al.*, 2002؛ Naidoo & Naidoo, 2001). در گیاهان مهمترین محلول حمایت‌کننده اسمزی سازگار گلیسین بتائین، پرولین و پلی‌اُلها (Polyols) هستند (Rontein *et al.*, 2002). معمولاً سطح حمایت‌کننده‌های اسمزی در زمان در معرض قرار گرفتن تنش اسمزی بالاست (Bohnert *et al.*, 1995). تجمع پرولین رابطه مثبت و مستقیم با افزایش مقاومت به کم‌آبی در تنش‌های کم‌آبی و شوری ایجاد شده در گیاه دارد (Saneoka *et al.*, 2004). تجمع پرولین در سیتوپلاسم مانند یک اسموتیکوم در حفاظت ساختمان ماکرومولکول‌ها در محیطی که تعادل یونی آن بهم خورده‌است، عمل می‌کند (Nayyar, 2003). افزایش پرولین منجر به حفظ تورم و کاهش خسارت غشاء در گیاهان می‌شود. بدین ترتیب با روش تنظیم اسمزی، سازگاری به تنش کم‌آبی و شوری افزایش می‌یابد (Pandey & Agarwal, 1998). در زمینه افزایش میزان پرولین در گیاهان تحت تنش شوری گزارشهای زیادی وجود دارد، ازجمله می‌توان انواع رده‌های گیاهان حساس آفتابگردان (Ashraf & Tufail, 1995) و گیاه گلرنگ (Ashraf & Fatima, 1995) را نام برد. گزارشهایی نیز وجود دارد که بیانگر افزایش پرولین در گیاهان تحت تنش شوری و آسکوربات مانند *Khaya Sensgalensis* (Abd EL-Aziz *et al.*, 2006) و سویا (Sheteawi, 2007) به‌طور همزمان است.

طبق نتایج بدست‌آمده در این پژوهش، با افزایش میزان تنش شوری در تیمارهای مختلف میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش یافت. کاتالاز یکی از مهمترین جاروب‌کننده‌های H_2O_2 محسوب می‌شود که این عمل را با تبدیل H_2O_2 به آب و O_2 انجام می‌دهد، کاتالاز به همراه آسکوربات پراکسیداز جاروب‌کننده مهم، H_2O_2 و در نتیجه تنظیم‌کننده سطح H_2O_2 در سلول می‌باشد (Dixit *et al.*, 2001). در این زمینه که افزایش شوری باعث افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود، گزارشهای متعددی وجود دارد ازجمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: شرایط خشکی، دمای بالا و شوری باعث افزایش در فعالیت SOD و APX، CAT و GR در ژنوتیپ‌های گندم سازگار می‌شود (Sairam *et al.*, 2001). چنین اثری در کلزا توسط قربانلی و همکاران (۱۳۸۲) گزارش شده‌است. اسیدآسکوربیک به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم گیاهی می‌تواند با انواع اکسیژن‌های واکنش‌گر ترکیب شده و یک نقش مهم حمایتی علیه ROS ایفا کرده و در ضمن

Archive of SID

www.SID.ir

تنش‌های زیستی و غیرزیستی از خود نشان دهد (Noctor & Foyer, 1998؛ Smirnoff & Wheeler, 2000). یک نقش اسیدآسکوربیک افزایش فعالیت چرخه آسکوربات-گلوتاتیون در میتوکندری و پراکسی‌زوم (Jime´nez et al., 1997) و در نتیجه افزایش جاروب‌کننده‌های H_2O_2 و بعد افزایش فعالیت کاتالاز است که به این ترتیب با تنش اکسیداتیو مقابله می‌شود (Dixit *et al*., 2001).

مالون دی‌آلدئید یک محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در فسفولیپیدها است. از سطح پراکسیداسیون لیپید به‌عنوان یک نشانه رادیکال آزاد مضر برای غشاء سلولی تحت شرایط تنش استفاده شده‌است. بنابراین MDA به‌عنوان یک معرف برای بررسی میزان صدمات غشاء در شرایط تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jaleel *et al*., 2007؛ Katsuhara *et al*., 2005). البته پراکسیداسیون لیپید در کلروپلاست و میتوکندری هم صورت می‌گیرد (Elstner, 1982).

افزایش نمک باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول‌ها و پدید آمدن اختلال در اعمال فیزیولوژیکی سلول می‌شود. این تنش ثانویه به علت ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژنی است که در درون سلول تولید می‌شود (Sofo *et al*. 2004). رادیکال‌های آزاد موجود در سلول باعث صدمه به لیپیدها و اسیدهای چرب غشاء شده و رادیکال‌هال لیپید و پراکسی و هیدروپراکسی تولید می‌کنند، رادیکال‌های جدید تولید شده می‌توانند به واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها سرعت بخشند. مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص مناسبی برای پراکسیداسیون لیپید غشاء، محسوب می‌شود (Sofo *et al*., 2004). در زمینه افزایش MDA با افزایش تنش نمک گزارشهای متعددی ازجمله در کولتیوارهای حساس (Azevedo Arora *et al*., 2008؛ Neto *et al*., 2006) وجود دارد. نتایج آزمایشهای انجام شده در این پژوهش نیز این گزارشها را تأیید می‌کند. بیشتر گزارشهای ارائه شده اثر حمایتی اسیدآسکوربیک را مربوط به کاهش زیان‌های ROS به پروتئین‌های ضروری یا نوکلئیک اسیدها می‌دانند (Becana & Moran, 1998؛ Inze & Van Montague, 1995؛ Noctor & Foyer, 1998). همچنین گزارش دیگر ارائه شده مبنی بر اثر مثبت اسید آسکوربیک، به این صورت است که کاهش سطح اسید آسکوربیک به همراه توقف تقسیم در مریستم ریشه بوده‌است.

منابع مورد استفاده

- بالندری، ا.، ۱۳۷۱. گردآوری و بررسی خصوصیات بوتانیکی توده‌های علمی زیره سبز ایران. سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران.
- صادقی، ب.، ۱۳۷۰. اثر مقادیر ازت و آبیاری در تولید زیره سبز. سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی خراسان.
- قربانلی، م.، ساطعی، آ. و مقیسه، ا.، ۱۳۸۲. اثر شوکهای مختلف محیط بر فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و نیترات ردوکتاز در ریشه و برگهای دو رقم کلزا (*Brassica napus* L.). پژوهش و سازندگی، ۱٦(۱): ۳۹-٤۳.

- Abd EL-Aziz, N.G., Mazher Azz, A.M. and EL-Habba, E., 2006. Effect of foliar spraying ascorbic acid on growth and chemical constituents of *Khaya senegalensis* growth under salt condition. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences, 1(3): 207-214.
- Aebi, H., 1974. Catalase: 673-677. In: Bergmeyer, H.U., (Ed.). Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press, New York, USA, 641p.
- Agarwal, S. and Shaheen, R., 2007. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stress in leaves of *Momordica charantia*. Brazilian Journal of Plant Physiology, 19(2): 149-161.
- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M. and Murata, N., 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. Plant Physiology, 123(3): 1047-1056.
- Arora, N., Bhardwaj, R., Sharma, P. and Arora, H.K., 2008. 28-Homobrassinolide alleviates oxidative stress in salt-treated maize (*Zea mays* L.) plants.

Archive of SID

www.SID.ir

American Society of Plant Physiology, Rockville, MD, 286p.
- Flowers, T.J., 2004. Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany, 55: 307-319.
- Gao, S., Ouyang, C., Wang, S., Xu, Y., Tang, L. and Chen, E., 2008. Effect of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. Plant, Soil and Environment, 54: 374-381.
- Hernandez, J.A., Corpas, F.J., Gomez, M., del Rı´o, L.A. and Sevilla, F., 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. Physiologia Plantarum, 89: 103-110.
- Huang, C., He, W., Gua, J., Change, X., Su, P. and Zhang, L., 2005. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. Journal of Experimental Botany, 56(422); 3041-3049.
- Inze, D. and Van Montague, M., 1995. Oxidative stress in plants. Current Opinion in Biotechnology, 6: 153-158.
- Jaleel, C.A., Gopi, B. Sankar, P. Manivannan, A. Kishorekumar, R.S. and Panneers, L., 2007. Studies on germination, seedling vigour, Lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedling under salt stress. South African Journal of Botany, 73(2): 190-195.
- Jime´nez, A., Herna´dez, J.A., del Rıo L.A. and Sevilla, F., 1997. Evidence for the presence of the ascorbate glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea (*Pisum sativum* L.) leaves. Plant Physiology, 114: 275-284.
- Katsuhara, M., Otsuka, T. and Ezaki, B., 2005. Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. Plant Sciences, 169(2): 369-373.
- Koca, H., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I., 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. Environmental and Experimental Botany, 60(3): 344-351.
- Mandhania, S., Madan, S. and Sawhney, V., 2006. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. Biologia Plantarum, 50(2): 227-231.
- Misra, N. and Gupta, A.K., 2006. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. Journal of Plant Physiology, 163: 11-18.
- Munns, M., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant, Cell and Environment, 25: 239-250.

Brazilianian Journal of Plant Physiology, 20(2): 153-157.
- Ashraf, M. and Fatima, H., 1995. Responses of some salt tolerant and salt sensitive lines of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Acta Physiologiae Plantarum, 17: 61-71.
- Ashraf, M. and Tufail, M., 1995. Variation in salinity tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Journal of Agronomy and Crop Science, 174(5): 351-362.
- Azevedo Neto, D., Prisco, J. Eneas, J., De Abreu, C. and Gomes, E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany, 56: 87-94.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Terae, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Becana, M. and Moran, J.F., 1998. Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental strees; toxicity and antioxidant protection. Plant and Soil, 201: 137-147
- Beltagi, M.S., 2008. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) induced anabolic changes for salt tolerance in chick pea (*Cicer arietinum* L.) plants. African Journal of Plant Science, 2(10): 118-123.
- Benavides, F.G., Benach, J., Diez-Roux, A.V. and Roman, C., 2000. How do types of employment relate to health indicators? Finding from the second European survey on working conditions. Journal Epidem community Health. 54: 494-501.
- Binzel, M.L., Hess, F.D, Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M., 1988. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. Plant Physiology, 86: 607-614.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G., 1995. Adaptation to environmental stresses. Plant Cell, 7(7): 1099-1111.
- Conklin, P., 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. Plant, Cell and Environment, 24: 383-394.
- Dermiral, T. and Turkan, I., 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense system and proline content in root of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environmental and Experimental Botany, 53(3): 247-257.
- Dixit, V., Pandey, V. and Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum*). Journal of Experimental Botany, 52: 1101-1109.
- Elstner, E.F., 1982. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cell: 13-25. In: Pell, E.J. and Stefen, K.L. (Eds.). Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism.

Archive of SID

www.SID.ir

stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in *Agrostis palustris* Huds. Environmental and Experimental Botany, 52(2): 131-138.
- Sehmer, L., Alaoui-Sosse, B. and Dizengremel, P., 1995. Effect of salt stress on growth and on the detoxifying pathway of pedunculate oak seedlings (*Quercus robur* L.). Journal of Plant Physiology, 147: 144-151.
- Shannon, M.C., Grieve, C.M. and Francois, L.E., 1994. Whole plant response to salinity: 199-244. In: Wilkson, R.E. and, Vepraskas M.J., (Eds.). Plant Environment Interactions. Marcel Dekker, New York, USA, 640p.
- Sheteawi, S.A., 2007. Improving growth and yield of salt-stressed soybean by exogenous application of Jasmonic acid and ascobin. International Journal of Agriculture and Biology, 9(3): 473-478.
- Smirnoff, N. and wheeler, G.L., 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 35(4): 291-314.
- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A., 2004. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondealdehyde content during rewatering in olive tree. Plant Sciences, 166(2): 293-302.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science, 161(3): 613-619.
- Van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J.F. and Inze, D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Science, 161(3): 405-414.
- Verma, S. and Mishra, N., 2005. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defence system. Journal of Plant Physiology, 162(9): 669-677.
- Naidoo, G. and Naidoo, Y., 2001. Effects of salinity and nitrogen on growth, ion relations and proline accumulation in *Triglochin bulbosa*. Wetlands Ecology and Management, 9(6): 491-497.
- Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in Spanish choloroplasts. Plant and cell physiology, 22(5): 867-880.
- Nayyar, H., 2003. Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. Environmental and Experimental Botany, 50(3): 253-264.
- Noctor, G. and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49: 249-279.
- Pandey, R. and Agarwal, R.M., 1998. Water stress-induced change in proline contents and nitrate reductase activity in Rice under light and dark condition. Physiology and Molecular Biology of Plants, 4: 53-57.
- Parida, A.K. and Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60(3): 324-349.
- Piganocchi, C. and Foyer, C.H., 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. Current Opinion in Plant Biology, 6(4): 379-389.
- Rontein, D., Basset, G. and Hanson, A.D., 2002. Metabolic engineering of osmoprotectants accumulation in plants. Metabolic Engineering, 4: 49-56.
- Sairam, R.K., Chandrasekhar, V. and Srivastava, G.C., 2001. Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their response to water stress. Biologia Plantarum, 44: 89-94.
- Saneoka, H., Moghaieb, R.E.A., Premachandra, G.S. and Fujita, K., 2004. Nitrogen nutrition and water

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of salt stress and its interaction with ascorbate on catalase, ascorbate peroxidase activity, proline and malondialdehyde in *Cuminum cyminum* L.four weeks after germination

M. Ghorbanli[1*], F. Ahmadi[2], A. Monfared[2] and Gh. Bakhshi Khaniki[2]

1*- Corresponding author, Biology Group, Islamic Azad University, Gorgan Unit, Iran, E-mail: mghorbanli@gorganiau.ir
2- Payame Noor University , Tehran, Iran

Received: July 2010 Revised: January 2011 Accepted: February 2011

Abstract

Ascorbate as a strong antioxidant has a considerable bio effect on growth of plants, such as increase in their tolerance against environment stresses. In this investigation, the effect of salt stress and its interaction with ascorbate on amount of proline, catalase and ascorbate peroxidase enzymes and MDA in a medicinal plant of *Cuminum cyminum* L. was randomly studied in the green house conditions with three replications. Plants were treated by different concentrations of NaCl (0, 25, 50, 75, 100, 125 mmolar) and ascorbate (9 mmolar). In the plants treated with salt, the amount of proline, antioxidant enzymes activity and MDA were increased with increasing NaCl concentrations. The plants treated with NaCl and ascorbate at the same time in a same NaCl concentration, the amount of proline, catalase activity, ascorbate peroxidase and MDA were increased. The results indicated that the ascorbate was one of the antioxidants that caused an increase in resistance of *Cuminum cyminum* L. to salt stress.

Key words: *Cuminum cyminum* L., salt stress, ascorbate, antioxidant enzymes, proline, malonde aldehyde.

Archive of SID

www.SID.ir