بررسی اثر متقابل تنش خشکی با آسکوربات وسالیسیلیک اسید برفعالیت برخی آنزیمهای آنتی اکسیدان و فلاونوئیدها در گیاه بامیه *Hibiscus esculentus* L.

امین باقی زاده[1*]، محمود حاج محمدرضایی[2] و زهرا توحیدی[2]

[1] ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی ، گروه بیوتکنولوژی

[2] ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

تنش خشکی موجب وارد شدن آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکولهای سلولی نظیر پروتئینها، چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌گردد. ترکیبات آسکوربات و اسید سالیسیلیک با داشتن خواص ضد اکسیداتیو می‌توانند باعث کاهش خسارات ناشی از تنش وارده به گیاه شوند. در تحقیق حاضر تغییر فعالیت آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز و مقدار فلاونوئیدها در شرایط تنش خشکی در گیاه بامیه مورد بررسی قرار گرفت. تنش خشکی سبب افزایش میزان فلاونوئیدها و فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به گیاهان شاهد شد و تیمار با آسکوربات و سالیسیلیک اسید و ترکیب توأم این دو ماده سبب کاهش میزان فلاونوئیدها و فعالیت پراکسیداز گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش خشکی کاهش یافت و تیمار با آسکوربات و سالیسیلیک اسید، فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش داد. بر اساس نتایج حاصله به نظر می‌رسد ترکیبات آسکوربات و اسید سالیسیلیک باعث تنظیم میزان فلاونوئیدها و فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان نظیر کاتالاز و پراکسیداز در جهت کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از خشکی شده اند لذا استفاده از این ترکیبات در شرایط تنش خشکی توصیه می‌شود.

واژه های کلیدی: تنش خشکی، اسید آسکوربیک ، سالیسیلیک اسید، فلاونوئید، گیاه بامیه.

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۹۱۳۱۴۱۴۱۵۶ پست الکترونیکی: amin_4156@yahoo.com

مقدمه

کمبود آب یکی از اصلی‌ترین عوامل محیطی تنش زا است که رشد و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث افت عملکرد محصولات کشاورزی می گردد (۱۵و۲۸). میزان کم نزولات آسمانی، پراکنش نامنظم آن و درجه حرارتهای بالا، موجب تنش خشکی در طول دوره رشد گیاهان زراعی در مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌شود و در نهایت باعث کاهش تولید محصولات زراعی می‌گردد. خشکی بر مراحل مختلف رشدی گیاه از جمله جذب آب و مواد غذایی، فتوسنتز و تنفس اثر می‌گذارد و باعث اختلال و کاهش رشد طبیعی گیاه می شود (۲۰). همچنین تنش خشکی باعث ایجاد اختلال در سیستمهای آنزیمی مهارکننده گونه های فعال اکسیژن می گردد که این امر منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی و در نتیجه خسارت به غشای سلولی و تخریب رنگدانه ها می گردد (۷و ۱۱). فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات فنلی هستند که به طور وسیع در سلسله گیاهی دیده می شوند این ترکیبات براساس یک اسکلت فلاونی ۱۵ کربنه c_6-c_3-c_6 ساخته شده اند. در واقع این ترکیبات دارای دو حلقه بنزن هستند که از طریق یک حلقه هتروسیکلیک پیران یا پیرون برای تشکیل فنیل بنزو پیرون به هم متصل می شوند. فلاونوئیدها مثل کامفرول و کوئرستین بر روی رشد اثر می‌گذارند ولی مهمترین خصوصیت فلاونوئیدها در

خاموش کردن رادیکالهای آزاد و محافظت از گیاه می‌باشد (۱۳و ۱۹). آنتوسیانینها در طول موجهای ۲۹۰-۲۷۰ و ۵۵۰-۵۰۰ نانومتر جذب زیادی دارند و قادر به حفاظت از گیاه می‌باشند.گیاهان برای مقابله با خسارت سلولی از سیستم آنتی اکسیدانی پیچیده ای استفاده می کنند که آنزیمهای آنتی اکسیدان از جمله سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و آنزیمهای دخیل در چرخه آسکوربات – گلوتاتیون مانند گلوتاتیون رداکتاز از جمله آنها می باشند (۵). آنزیمهای آنتی اکسیدان، رادیکالهای فعال اکسیژن را از بین می‌برند. یکی از مهمترین آنزیمهای آنتی اکسیدان، کاتالاز [1.11.1.6EC] می‌باشد که در شرایط تنش، فعالیت این آنزیم زیاد می‌شود (۲۷). در واقع آنزیم کاتالاز یک اکسیدوردوکتاز است که در پراکسی‌زومها قرار دارد و نقش آن غیرسمی کردن H_2O_2 از طریق تجزیه این ترکیب است . کاتالاز علاوه بر مقاومت به خشکی در به تعویق انداختن پیری نیز نقش دارد. پراکسیداز [EC1.11.1.7] یک اکسیدوردوکتاز می‌باشد و اکسیداسیون ترکیبات پروتون دهنده را به H_2O_2 سبب می‌گردد. پراکسیداز در مقاومت گیاه به تنش خشکی و گرما (۱۵) مقاومت به شوری، مقاومت به آلودگی به پاتوژنها (۹) و توسعه سلولی نقش دارد (۲۶). علاوه بر آنزیمهای آنتی-اکسیدان، بسیاری از متابولیتها مانند گلوتاتیون، آسکوربیک اسید توکوفرول، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و آنتوسیانینها با جاروب کردن رادیکالهای آزاد موجب حفاظت گیاه در برابر تنشهای اکسیداتیو می‌شوند (۲۷). سالیسیلیک اسید یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید یک تنظیم کننده رشد داخلی از گروه ترکیبات فنلی می باشد که در پروسه‌های متفاوت در گیاهان شامل جوانه‌زنی دانه‌ها و بسته‌شدن روزنه‌ها و جذب و انتقال یونها و نفوذپذیری غشاءها و نرخ رشد و فتوسنتز مؤثر است. سالیسیلیک اسید به وسیله سلولهای ریشه تولید می شود و نقش محوری در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله رشد ونمو گیاه ، فتوسنتز و جوانه زنی ایفا می کند (۱۲و۱۳). همچنین این ترکیب به عنوان یک جزء پیام رسان کلیدی باعث فعال سازی پاسخهای دفاعی گیاه و بیوسنتز و تجمع انواع ترکیبات ثانویه گیاهی از جمله فلاوونوئیدها ، آلکالوئیدها و ترکیبات فنولیک می گردد. ثابت شده است که سالیسیلیک اسید به طور معنی داری نشت یونی و تجمع یونهای سمی را در گیاهان کاهش داده و باعث کاهش اثر گذاری تنشهای محیطی از راه افزایش هورمونهای تنظیم کننده رشد از جمله اکسینها و سیتوکینینها می‌شود (۳۲و۳۴). سالیسیلیک اسید طیف گسترده ای از پاسخهای متابولیکی را درگیاهان ایجاد می کند بنابراین کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید می تواند اثرات ایجاد شده به وسیله تنش خشکی را کاهش دهد. بیشتر مطالعات انجام شده در مورد نقش سالیسیلیک اسید در گیاهان ، مربوط به اثر این ترکیب در بهبود دادن یا تخفیف دادن اثر ناشی از تنشها می باشد (۳۳). استیل سالیسیلیک اسید (یکی از مشتقات سالیسیلیک اسید) اثرات مهاری ناشی از شوری و خشکی را در لوبیا و گوجه فرنگی کاهش داد (۲۹). آسکوربیک اسید یا ویتامینC هم به عنوان یک ترکیب غیرآنزیمی است که می‌تواند با کاهش رادیکالهای آزاد اکسیژنی تشکیل شده طی تنش، گیاه را نسبت به تنش مقاوم سازد. گیاه بامیه با نام علمی (*Hibiscus esculentus* .L) از خانواده پنیرک، گیاهی است که در آب و هوای گرمسیری رشد نسبتاً خوبی دارد. گیاه بامیه به‌عنوان یک سبزی به آب نیازمند است و خشکی هوا و کم آبی باعث عدم رشد گیاه و نامرغوب شدن محصول آن می‌شود. در بامیه مانند سایر سبزیهای میوه‌ای ، تنظیم دور آبیاری متناسب با رشد و نمو گیاه اهمیت زیادی دارد. هر گونه توقف در رشد به‌دلیل کم آبی می‌تواند صدمه شدیدی به گیاه وارد کند. آز آنجایی که خشکی تأثیرات منفی بسیار زیادی بر عملکرد بامیه دارد در این تحقیق اثرات ساده و متقابل اسید سالیسیلیک و اسید آسکوربیک در جهت ایجاد مقاومت به تنش خشکی و تأثیر آنها بر میزان فعالیت

آنزیمهای آنتی اکسیدانت و تجمع فلاونوئیدها در گیاه بامیه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روشها

در تحقیق حاضر، بذرهای گیاه بامیه با نام علمی *Hibiscus esculentus* L. و واریته Clemson Spineless تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمان، در گلدانهای پلاستیکی به قطر ۱۰ سانتیمتر و ارتفاع ۱۵ سانتیمتر که با شن ، رس و پیت با نسبت های(۲: ۱: ۱) پر شده بودند ، کاشت شدند. گلدانها روزانه با آب آبیاری شدند و تا هنگام ظهور برگ چهارم و پنجم به مدت ۳۵ روز در اتاق رشد (فیتوترون) ساخت شرکت گروک (تهران – ایران) با دوره نوری ۱۴ ساعت نور و دمای ۲ ± ۲۲ سانتی گراد و ۱۰ ساعت تاریکی و دمای ۲± ۱۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. شدت نور در سطح گیاه ۱۱۰۰۰ لوکس و رطوبت ۴۶ درصد بود. پس از گذشت حدود یک ماه، هنگامی که گیاهان چهاربرگه شدند، تیمارهای اسید سالیسیلیک ۱ میلی مولار، اسید آسکوربیک ۱ میلی مولار و تیمار توأم اسید سالیسیلیک ۱ میلی مولار همراه با اسید آسکوربیک ۱ میلی مولار برای مدت ۱۰ روز به صورت اسپری روی برگهای گیاهان اعمال شدند به صورتی که تمام سطح فوقانی و زیرین اندامهای هوایی کاملاً خیس شدند. محلول پاشی گیاهان شاهد با همین روش و تنها با آب مقطر انجام گرفت. تنش خشکی در سه سطح بدون تنش به عنوان شاهد، یک سوم ظرفیت زراعی و دو سوم ظرفیت زراعی به مدت ۱۰ روز اعمال گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد.

سنجش میزان فلاونوئیدها: اندازه‌گیری فلاوونوئیدها به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از روش Krizek انجام گرفت (۱۷). ۰/۱ گرم از بافت برگی با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (اتانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت حجمی ۹۹: ۱) ساییده شد و پس از سانتریفیوژ مخلوط حاصل، عصاره به مدت ده دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شدت جذب در طول موجهای ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد و نتایج براساس درصد جذب گزارش گردید (۱۷).

اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز: به منظور اندازه گیری آنزیم پراکسیداز ابتدا پروتئینها از اندامهای هوایی (برگها) در دمای ۴-۰ درجه سانتی گراد استخراج شدند(۸). برای این منظور یک گرم بافت تر در هاون چینی محتوی ۵ میلی لیتر بافر تریسHCL ۰/۰۵ مولار در pH ۷/۵ به مدت ۳۰ دقیقه کاملاً ساییده شد. محلول همگن حاصل به لوله سانتریفیوژ منتقل شده و پس از ۱۰ دقیقه سکون به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ نمونه ها با کمک دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار انجام شد. سپس لوله ها به آرامی از دستگاه خارج شدند و محلول رویی از چند لایه پارچه عبور داده شد و در چند ویال کوچک توزیع گردید.. عصاره پروتئینی حاصل برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز مورد استفاده قرارگرفت. پس از آماده سازی عصاره‌های پروتئینی حاصل برای سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم پراکسیداز از معرفهای زیر استفاده گردید. با فرتریس- HCL (pH=7) ۱۰۰ میلی مولار به همراه آب اکسیژنه۵ میلی مولار و پیروگالول ۱۰ میلی مولار مجموعاً در حجم ۲/۴ میلی لیتر که به همراه ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲/۴۵ میلی لیتر می شود. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Cary 50-uv-Visible) خوانده شد. فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه شد(۳و۶).

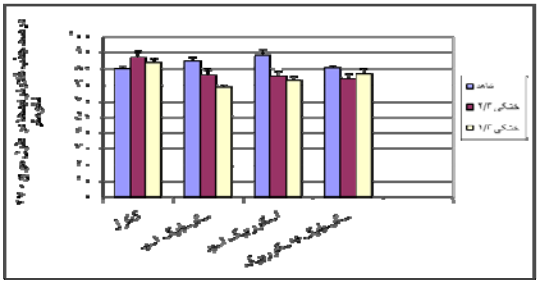
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، ابتدا پروتئین محلول برگ طبق روش گفته شده در بخش سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، استخراج شد و سپس برای سنجش فعالیت این آنزیم استفاده گردید. ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش شامل ۲/۵

میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۷ و ۳۰ میکروگرم پروتئین محلول در کووت کوارتز ریخته شد و درست به هنگام اندازه‌گیری تغییرات جذب، ۳۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد (حجم به حجم) به مخلوط واکنش اضافه شد و تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. سپس فعالیت آنزیمی براساس ضریب خاموشی و مقدار غلظت آنزیم در دقیقه بیان شد (۳۰).

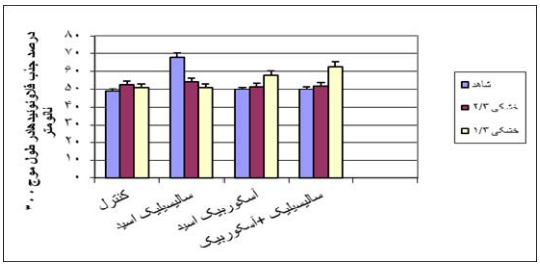
ارزیابی آماری: داده های به دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS14.0 مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگینها نیز براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد و نمودارها با نرم افزار Excel رسم شدند.

نتایج

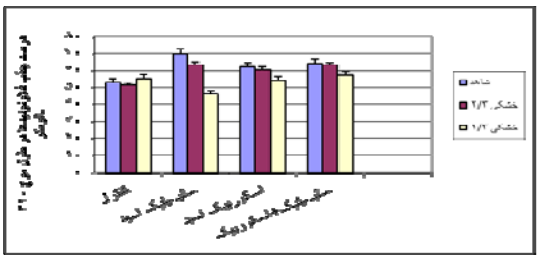
تغییرات جذب فلاونوئیدها در طول موجهای ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر نشان می‌دهد که سالیسیلیک اسید درتمامی طول موجهای مذکور (۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر) سبب افزایش مقدار فلاونوئیدها نسبت به گیاهان شاهد شده است(شکلهای ۱، ۲ و۳).



شکل ۱- اثر متقابل تنش خشکی ، سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر مقدار فلاونوئیدها در طول موج ۲۷۰ نانومتر
سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار، آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار، تیمار توأم سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار و آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار
خشکی دو سوم: خشکی به اندازه دو سوم ظرفیت مزرعه ای
خشکی یک سوم: خشکی به اندازه یک سوم ظرفیت مزرعه ای



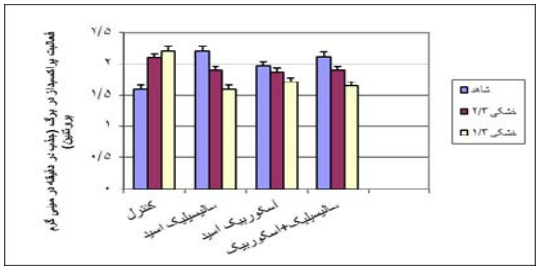
شکل ۲- اثر متقابل تنش خشکی ، سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر مقدار فلاونوئیدها در طول موج ۳۰۰ نانومتر
سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار، آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار، تیمار توأم سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار و آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار
خشکی دو سوم : خشکی به اندازه دو سوم ظرفیت مزرعه ای
خشکی یک سوم : خشکی به اندازه یک سوم ظرفیت مزرعه ای



شکل ۳- اثر متقابل تنش خشکی ، سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر مقدار فلاونوئیدها در طول موج ۳۳۰ نانومتر
سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار، آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار، تیمار توأم سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار و آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار
خشکی دو سوم : خشکی به اندازه دو سوم ظرفیت مزرعه ای
خشکی یک سوم : خشکی به اندازه یک سوم ظرفیت مزرعه ای

آسکوربیک اسید نیز در طول موج ۳۰۰ نانومتر سبب کاهش مقدار فلاونوئیدها شده اما در طول موجهای ۲۷۰ و ۳۳۰ نانومتر، آسکوربیک اسید مقدار فلاونوئیدها را نسبت به گیاه شاهد افزایش داده است. تیمار توأم سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید نیز سبب کاهش مقدار فلاونوئیدها نسبت به گیاهان شاهد شده است. تنش خشکی نیز سبب افزایش فلاونوئیدها نسبت به گیاهان شاهد در سطح احتمال ۵ درصد شده است(شکلهای ۱، ۲ و ۳). در ضمن بیشترین مقدار جذب فلاونوئیدها در طول موج ۲۷۰ نانومترمربوط به آسکوربیک اسید و در طول موج ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر مربوط به سالیسیلیک اسید بود. تنش خشکی سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در

بافت برگی نسبت به شاهد شده است. همچنین سالیسیلیک اسید، آسکوربیک اسید و ترکیب توأم این ۲ ماده سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به نمونه شاهد (در برگ و ریشه) شده است ، اما نتایج حاصل از تیمار توأم ترکیبات بالا با تنش خشکی سبب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به گیاهانی که تنها با تنش خشکی تیمار شده بودند گشت. در ضمن بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به گیاهان تیمار شده تحت شرایط تنش خشکی به اندازه یک سوم ظرفیت مزرعه‌ای تعلق داشت و کمترین فعالیت آنزیمی نیز به گروه گیاهان شاهد متعلق بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه نیز همانند برگ گیاه در اثر تنش خشکی بالا رفت (شکلهای ۴ و۵).

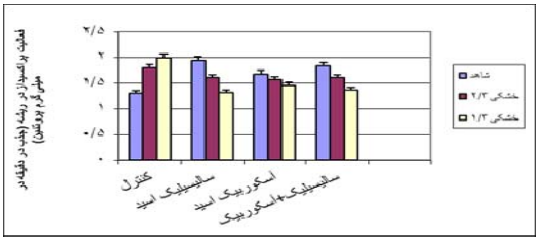


شکل ۴- اثر متقابل تنش خشکی ، سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در بافت برگ

سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار، آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار، تیمار توأم سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار و آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار

خشکی دو سوم : خشکی به اندازه دو سوم ظرفیت مزرعه ای

خشکی یک سوم : خشکی به اندازه یک سوم ظرفیت مزرعه ای



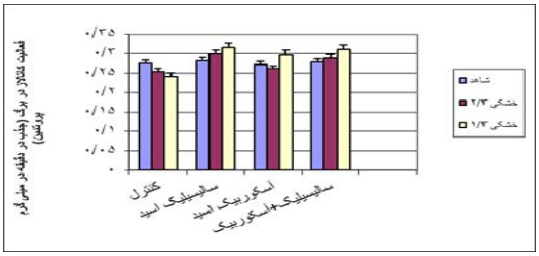
شکل ۵- اثر متقابل تنش خشکی ، سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در بافت ریشه

سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار، آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار، تیمار توأم سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار و آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار

خشکی دو سوم : خشکی به اندازه دو سوم ظرفیت مزرعه ای

خشکی یک سوم : خشکی به اندازه یک سوم ظرفیت مزرعه ای

فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهانی که تحت شرایط تنش خشکی قرار گرفته بودند نسبت به گیاه شاهد یا کاهش یافت و یا ثابت باقی ماند (شکلهای ۶ و ۷). تیمار با سالیسیلیک اسید، آسکوربیک اسید و ترکیب توأم این ۲ ماده سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت برگی نسبت به گیاهان شاهد شده است. تیمار توأم ترکیبات بالا با تنش خشکی سبب افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهانی که به تنهایی تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفته بودند شد. نتایج حاصله نشان می‌دهند که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به گیاهان شاهد بود و کمترین فعالیت آنزیمی مربوط به گیاهان تیمار شده تحت شرایط تنش خشکی به اندازه یک سوم ظرفیت مزرعه ای بود. فعالیت آنزیم کاتالازدر ریشه نیز همانند برگ گیاه در اثر تنش خشکی کاهش یافت.

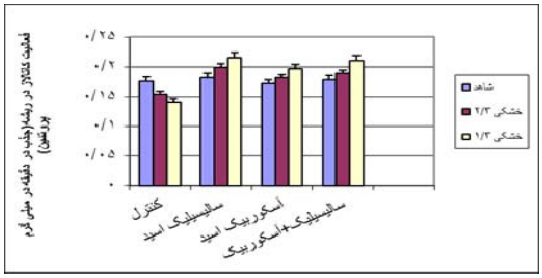


شکل ۶- اثر متقابل تنش خشکی ، سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت برگ

سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار، آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار، تیمار توأم سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار و آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار

خشکی دو سوم : خشکی به اندازه دو سوم ظرفیت مزرعه ای

خشکی یک سوم : خشکی به اندازه یک سوم ظرفیت مزرعه ای



شکل ۷- اثر متقابل تنش خشکی ، سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت ریشه

سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار، آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار، تیمار توأم سالیسیلیک اسید ۱ میلی مولار و آسکوربیک اسید ۱ میلی مولار

خشکی دو سوم : خشکی به اندازه دو سوم ظرفیت مزرعه ای
خشکی یک سوم : خشکی به اندازه یک سوم ظرفیت مزرعه ای

بحث

نقش ترکیبات فنلی در کاهش و یا مهار پراکسیداسیون لیپیدها، جاروب کردن رادیکالهای آزاد، خاموش کردن اکسیژن یکتایی یا تجزیه پراکسیدها، باعث شده است این ترکیبات به عنوان آنتی‌اکسیدانهای ضروری برای حفاظت علیه تکثیر و پیشروی زنجیره اکسیداتیو و دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل نمایند (۱۸). فلاونوئیدها به دلیل داشتن نقش آنتی اکسیدانی به طور مستقیم با وارد شدن در واکنشهای احیایی و یا غیرمستقیم به وسیله شلاته کردن آهن مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند (۲۴). آسکوربات نیز یکی از این مواد آنتی‌اکسیدان می‌باشد که در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون که یک چرخه بسیار مهم در تجزیه H_2O_2 می‌باشد، نقش اساسی را ایفاء می‌کند. به علاوه آسکوربات می‌تواند یا با واکنش مستقیم با رادیکال سوپراکسید، اکسیده شود یا به عنوان یک عامل احیاء کننده رادیکال آلفاکرموکسیل در آلفاتوکوفرول اکسید شده، مصرف شود (۲۳). گزارش شده است که سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید موجب افزایش مقدار آنتوسیانینها و محتوی کلروفیل در *Spirodella polyrriza* شده اند (۲۴). همچنین گزارش گردیده است که تنش خشکی مقدار فلاونوئیدها را در برگ گیاه کلزا تحت تنش خشکی افزایش می‌دهد (۱۴) . در پژوهش حاضر با توجه به افزایش میزان فلاونوئیدها موجود در برگ در شرایط تنش ، مشخص می شود این ترکیبات به عنوان گیرنده رادیکالهای آزاد عمل می‌کنند و گیاهان را در برابر تنشهای اکسیداتیو محافظت می‌کنند. وجود این مواد در برگ مانع کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در تعدادی از گیاهان مثل جعفری و سویا شده است ولی این حالت در تمام گیاهان عمومیت ندارد (۱). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در این پژوهش فلاونوئیدهای موجود در برگ گیاهان بامیه نقش حفاظتی را در جاروب کردن رادیکالهای آزاد ناشی از تنش خشکی دارند. اثر متقابل تنش خشکی با سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر مقدار فلاونوئیدها تغییرات منظمی را نشان نمی دهد وبسته به میزان تنش ونوع فلاونوئیدها مبتنی بر طول موج خوانده شده تغییرات متفاوتی دیده می شود. در این تحقیق سالیسیلیک اسید وآسکوربیک اسید به تنهایی مقدار فلاونوئیدها را افزایش دادند. تنش خشکی سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز گشت. آنزیم پراکسیداز که هم در سیتوزول و هم در کلروپلاست وجود دارد می‌تواند به گونه مؤثری H_2O_2 را حذف نماید. بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم در شرایط تنش خشکی احتمالاً برای حذف اثرات منفی H_2O_2 در شرایط تنش خشکی می‌باشد (۱۵). به نظر می‌رسد در شرایط تنش ، افزایش فعالیت پراکسیداز تا حد امکان از اثرات زیانبار گونه‌های فعال اکسیژن بر غشای سلولی جلوگیری می‌کند (۲). در شرایط تنش خشکی در گیاه کلزا، فعالیت آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و پراکسیداز نسبت به شاهد، افزایش نشان داد(۳). گزارش گردیده است که فعالیت این آنزیم با تیمار آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید در جو و گندم تغییر می یابد (۲۴،۲۱ و۳۱). غلظتهای بالای سالیسیلات سبب افزایش فعالیت پراکسیداز در نخود شده است (۱۶).حضور اسکوربات و سالیسیلیک اسید به صورت تنهایی و همچنین به صورت توأم در شرایط نرمال باعث افزایش فعالیت پراکسیداز می شود اما در شرایط تنش، با توجه به اینکه ترکیبات مذکور باعث مهار خسارات ناشی از تنش می شوند، در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش می یابد. بنابراین آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید به عنوان ۲ ترکیب آنتی اکسیدانی می‌توانند سبب تنظیم فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی شوند و میزان O۲ و H_2O_2 را تعدیل کنند(۳۰). فعالیت آنزیم کاتالاز در این بررسی تحت تنش خشکی یا ثابت باقی ماند و یا کاهش یافت. کاتالاز در پراکسیزومها تجزیه و غیرسمی کردن

H_2O_2 را برعهده دارد (۱۵). کاهش فعالیت کاتالاز تحت تنش خشکی در پژوهشهای دیگر نیز گزارش شده است. فعالیت این آنزیم هم به تنش خشکی و هم به تنش گرما حساس است (۱۵). کاهش فعالیت آنزیم فوق معمولاً به عنوان کاهش توانایی برگها برای تجزیه H_2O_2 در نظر گرفته می‌شود. ثابت شده که آنزیم کاتالاز با دفع H_2O_2 از گیاهان محافظت می نماید (۲۵).حضور اسکوربات و سالیسیلیک اسید به صورت تنهایی و همچنین به صورت توأم در شرایط نرمال عموماً باعث کاهش فعالیت کاتالاز می شود اما در شرایط تنش ، با توجه به اینکه ترکیبات مذکور باعث مهار خسارات ناشی از تنش می شوند، در نهایت فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش می یابد با توجه به اینکه آسکوربات و سالیسیلات دو ترکیب با خواص آنتی-اکسیدانی بسیار خوب می‌باشند لذا در حذف رادیکالهای آزاد اکسیژنی و کاهش خسارت، کمک مؤثری به آنزیمهای پراکسیداز و کاتالاز در گیاه می‌کنند. سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید در غلظت ۱ میلی‌مولار و در شرایط نرمال سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شدند. تحقیقات نشان داده که فعالیت کاتالاز تحت تیمار سالیسیلیک اسید در برنج کاهش می یابد(۱۰و۲۲). همچنین در شرایط تنش خشکی در گیاه کلزا، فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش نشان داد(۳). نتایج تحقیقات نجارخدابخش و چاپارزاده نشان داده است که شوری موجب افزایش فعالیت آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز ریشه‌های شاهی می شود و آسکوربیک اسید موجب کاهش اثرات تنش شوری روی گیاهان می گردد(۴). بنابراین، به نظر می‌رسد که آسکوربیک اسید با کمک به غلبه بر اثرات اکسیداتیو موجب افزایش تحمل به شوری در گیاه شاهی می شود(۴). براساس نتایج حاصله به نظر می رسد ترکیبات آسکوربات و اسیدسالیسیلیک باعث تنظیم میزان فلاونوئیدها و فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان نظیر کاتالاز و پراکسیداز در جهت کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از خشکی شده اند لذا استفاده از این ترکیبات در شرایط تنش خشکی توصیه می شود.

منابع

۱- انتشاری، ش. کلانتری، م. قربانلی، م. و ترک زاده ، م. ۱۳۸۴. تأثیر باندهای مختلف اشعه ماوراءبنفش بر رنگیزه‌های موجود در برگ سویا (*Glycine max* L.). مجله زیست شناسی ایران. ۱۸ (۱): ۸۴-۷۷.

۲- سی وسه مرده، ع.۱۳۸۲. جنبه های فیزیولوژیکی رشد وعملکرد ارقام گندم در ارتباط با مقاومت به خشکی.رساله دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

۳- محمدی، ن. باقی زاده، ا. رجایی، پ.۱۳۹۴. تأثیر بتا آمینوبوتیریک اسید بر روی محتوای آب نسبی، تنظیم اسمزی و فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش خشکی. مجله پژوهش های گیاهی.۲۸(۴): ۸۶۰-۸۴۴.

۴- نجارخدابخش، آ. چاپارزاده، ن.۱۳۹۴. نقش آسکوربیک اسید در تقلیل اثرات اکسیداتیو شوری روی گیاه شاهی.مجله پژوهش های گیاهی.۲۸(۱):۱۸۵-۱۷۵.

5- Baby J, Jini D. 2011. Development of salt stress tolerance plants by gene manipulation of antioxidant enzymes. Asian Journal of Agricultural Research. 5:17-27.

6- Berova M, Zlatev Z, Stoeva N. 2002. Effect of paclobutrazol on wheat seedling under low temperature stress. Bulg. J. plant physiol. 28(1-2):75-84.

7- Bowler CM, Montagu M, Inze D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Ann. Rev.Plant Physiol. 43:83-116.

8- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analitical Biochemstry. 72:248-254

9- Caruso C, Chilosi C, Caporale L, Leonardo L, Bertini P, Margo V.1999. Induction of Path hogensis-related Proteins in germination Wheat seeds infected with *Fusarius culmorum*. Plant Science. 140: 87-97.

10- Choudhury S, Panda SK. 2004. Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative

stress in *Oryza sativa* L. roots. Bulg. J. Plant Physiol.30(3-4):95-110.

11- Dat JF, Lopez–Delgado H, Foyer CH, Scott IM. 1998. Parallel changes in H_2o_2 and catalase during thermal tolerance induced by salicylic acid orheat acclimation in mustard seedling. Plant Physiol. 116:1351- 1357.

12- EL–Tayeb MA.2005. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. Plant Growth Regulation .45:215-225.

13- Horvath E, Szalai G, Janda T. 2007 Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. Journal of Plant Growth Regulation. 26: 290-300

14- Inze D, Montagu MV.2000. Oxidative stress in plants .TJ International Ltd, padstow ,Cornwall.Great Britain. 321Pages.

15- Jiang R, Nhunag. 2001. Drought and Heat stress injure to two cool- season turfgrass in relation to Antioxidant, Metabolism and Lipid peroxidation. Crop Sci. 41:436-442.

16- Kato EM, Tsuzuki T, kobayashi S. 2005. Reduction of UV A/B generated free radicals by sodium–Ascorbyl-2- phosphate in cultured Mouse skin, Journal of Health Science. 51: 122-129.

17- Krizek DT, Britz SJ,. Mirecki RM.1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv .new red fire lettuce. Physiologia Plantarum.103:1-7.

18- Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh M, Grignon C, Abdelly C. 2007 Salinity effect on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. Plant Physiology and Biochemistry. 45: 244-248.

19- Kumaran A, Karunakaran RJ. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. Food chemistry. 97: 109-114.

20- Larcher W. 2001. Physiological plant ecology. Springer verlage Berlin Heidelberg NewYork Germany.505 pages.

21- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz KJ. 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in Barley seedlings. physiology and Biochemistry of Plant .132:272-281.

22- Pal M, Horvath E, Janda, T, Paldi E. 2002. Effect of salicylic acid during heavy metal stress .Acta Biologica Szegediensis. 46(3-4):119-120.

23- Parida AK, Das AB. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety. 60: 324-349.

24- Popova L, Pancheva T, Uzunova A. 1997. Salicylic acid: properties, Biosynthesis and Physiological role .Plant Physiology.23:85-93.

25- Rukmini MS, Benedicate DS, Vivandd S. 2004. Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients .Indian Journal of Clinical Biochemistry. 19:114-118.

26- Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC. 1998. Role of antioxidant Systems in wheat genotype tolerance to water stress .Biologia Plantarum.41(3):387-394.

27- Sairam Rk, Deshumk PS, shukla DS. 1997. Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. J Agronomy Crop science. 178:171-187.

28- Schaller G, kieber J. 2002. Ethylene .American society of plant Biologists.1-17.

29- Senaranta T, Touchell D, Bumm E, Dixon K. 2002 Acetylsalicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. Plant Growth regulation. 30: 157-161.

30- Shiu CT, Lee TM. 2005. Ultraviolet induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga Ulva fasciata. Journal of Experimental Botany. 56:2851-2865.

31- Tasgin E, Atici O, Nalbantoglu B. 2006. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. Plant growth Regulation .41:231-236.

32- Traw MB, Bergelson J. 2003. Interactive effects of Jasmonic acid, Salicylic acid and Gibberellin on induction of trichomes in arabidopsis .American Society of Plant Biologist.133:1367-1375.

33- Zhang W, Curtin C, Kikuchi M, Franco C. 2002. Integration of Jasmonic Acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis inifera* suspension cultures. Plant Science. 162: 459-468

34- Zhou ZS, Guo K, Abdou Elbaz A, Yang ZM. 2009. Salicylic acid alleriates mercury toxicity by preventing oxidative stress in root of *Medicago sativa* Environmental and Experimental Botany. 65: 27-34

Evaluation of interaction effect of drought stress with ascorbate and salicylic acid on the activity of some antioxidant enzymes and flavonoids in *Hibiscus esculentus* L.

Baghizadeh A.,[1] Hajmohammadrezaei M.[2] and Tohidi Z.[2]

[1] **Dept. of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I. R. of Iran**

[2] **Dept. of Biology, Payame Noor University,Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Drought stress causes oxidative damages to the macromolecules, such as proteins, lipids and nucleic acids. Two of compounds which has antioxidative characteristic is salicylic acid (SA) and ascorbic acid (As) can decrease drought effects in plants under stress. In recent research, we evaluated parameters such as; changes in activity of catalase and peroxidase and flavonoids in the *Hibiscus esculentus* L. under drought stress conditions. The results was showed that flavonoids and peroxidase activity increased compared to control under drought stress conditions. Flavonoids and peroxidase activity decrease in plants were under salicylic acid, ascorbic acid and both of them treatment. Catalase activity in drought stress conditions decrease. Catalase activity increased in plants were under Salicylic acid and ascorbic acid treatment. Based on our results, it seems that salicylic acid and ascorbic acid can regulate the amount of flavonoids and the activity of antioxidant enzymes such as catalase and peroxidase in order to reduce the oxidative stress caused by drought. Therefore, the use of these compounds in drought conditions is recommended.

Key words: drought stress, ascorbic acid, salicylic acid, flavonoids, *Hibiscus esculentus* L.