

تأثیر محلول پاشی اسید آبسبزیک بر فعالیت آنزیم‌ها و ترکیبات غیر آنزیمی مرتبط با سیستم دفاعی در جو زراعی

سعید نواب‌پور*

استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۱۴)

چکیده

برگ جو زراعی (لاین L1911) در زمان حداکثر رشد رویشی (کد GS59 راهنمای زیداکس) با استفاده از غلظت‌های اسید آبسبزیک (صفر، ۵۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار) محلول پاشی شد. آزمایش در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه وارویک انگلستان در سال ۲۰۰۳ میلادی انجام شد. نمونه‌برداری از برگ تیمار شده در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ساعت پس از محلول پاشی انجام شد. برای هر یک از زمان‌های مزبور میزان رادیکال‌های سوپر اکسید و پر اکسید هیدروژن، فعالیت آنزیم‌های دخیل در سیستم دفاعی شامل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، اسکوربیک پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز اندازه‌گیری و مقادیر عوامل دخیل در سیستم دفاعی غیر آنزیمی شامل اسکوربات، آلفا توکوفرول و کاروتنوئیدها تعیین و میزان سطح اکسیداسیون سلولی با انجام سنجش تیوباربیتوریک اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که حداکثر میزان رادیکال‌های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن ۱۰ ساعت پس از اعمال محلول پاشی اسید آبسبزیک حاصل شد و پس از آن در مراحل ۲۰ و ۴۰ ساعت روند کاهشی ملاحظه شد. در تمام مراحل نمونه‌برداری، غلظت ۸۰۰ میکرومولار اسید آبسبزیک بیشترین مقدار رادیکال‌های مزبور را ایجاد کرد. در مورد کلیه آنزیم‌های مورد مطالعه علیرغم تفاوت‌های جزئی، اسید آبسبزیک تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت و سنتز عوامل آنزیمی و غیر آنزیمی نسبت به شاهد نشان داد. میزان سطح اکسیداسیون سلولی نیز تحت تأثیر غلظت‌های ABA طی مراحل نمونه‌برداری به طور چشمگیری افزایش یافت. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های پایین ABA به ویژه ۵۰ میکرومول، ضمن افزایش سطح متعادلی از رادیکال‌های اکسیژن، منجر به تحریک سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی شده و بدین وسیله گیاه از بروز تنش اکسیداتیو و خسارات مربوطه مصون می‌ماند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، اسید آبسبزیک، جو زراعی، سیستم دفاعی غیر آنزیمی

مقدمه

فیتوهورمون اسید آبساز به عنوان یک عامل انتقال پیام در شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده ایفای نقش می‌کند. در عین حال در فرآیندهای مهم فیزیولوژیکی از قبیل تنظیم دوره خواب بذر و کنترل بیان ژن‌ها در مراحل مختلف نمو حائز اهمیت زیادی است (Nambara *et al.*, 1998; Siddiqui *et al.*, 1998).

تجمع اسید آبساز در بافت‌های مختلف گیاهی تحت تأثیر تیمارهای مختلف تنش‌های زنده و غیر زنده نظیر خشکی، شوری، سرما، تاریکی و عوامل بیماریزا، نقش انکار ناپذیر آنرا به عنوان یک عامل انتقال پیام تأیید می‌کند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Hare *et al.*, 1999).

اگرچه ساز و کار دقیق این نقش کاملاً روشن نیست ولی شواهد تحقیقاتی نشان می‌دهد اسید آبساز از طریق تنظیم غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Active Oxygen Species – AOS) چنین نقشی را ایفا می‌کند (Guan and Scandalios, 1998; Pei *et al.*, 2000). مطالعه گوان و همکاران (Guan *et al.*, 2000) مبین افزایش پر اکسید هیدروژن با تیمار آبساز اسید بود. کاربرد اسید آبساز منجر به تشدید فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی و افزایش غلظت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز مس- روی و آهن (Kaminaka *et al.*, 1999) و سوپر اکسید دیسموتاز منگنز (Bueno *et al.*, 1998) شده است.

همچنین اعمال محلول پاشی اسید آبساز منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، اسکوربیک پر اکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز در بافت‌های گیاهی شده است (Bellaire *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 1998). از طرفی اسید آبساز در آغاز و القای مرحله پیری ایفای نقش می‌کند (Yi-Ting Hsu and Ching-Huei Kao, 2010). مرحله فیزیولوژیکی پیری از مراحل مهم نمو بوده که رخدادهای مهم ژنتیکی و فیزیولوژیکی در آن حادث می‌شود. از جمله مهم‌ترین این وقایع تجزیه مولکول‌های بزرگ حیاتی و انتقال مواد حاصل از تجزیه به اندام‌های ذخیره‌ای به ویژه دانه است (Navabpour *et al.*, 2003). علاوه بر این‌ها اسید آبساز واجد نقش القایی در فرآیند

پر اکسیداسیون چربی‌ها بوده و غلظت‌های بالا آن منجر به تسریع این فرآیند و در ادامه خسارت به غشاء سلول می‌شود (Bueno *et al.*, 1998).

با توجه به نقش دوگانه اسید آبساز و اطلاعات فوق الذکر به نظر می‌رسد گستره تغییرات ژنتیکی و فیزیولوژیکی ناشی از تأثیر آن بالا بوده و تحقیق متمرکز برای رسیدن به یک نتیجه قابل قبول بایستی در طیف نسبتاً وسیعی از شاخص‌های مربوطه صورت پذیرد. در این راستا برخی محققین با به کار بردن غلظت‌های مختلف اسید آبساز بر بافت‌های مختلف گیاهی دامنه تغییرات بیان ژن‌ها، روند سنتز پروتئین‌ها، بررسی سازکار و تغییرات سیستم دفاعی و ارزیابی غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن و خسارت اکسیداسیونی را مطالعه کرده‌اند (Bueno *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 2000; Bellaire *et al.*, 2000). در این تحقیق تأثیر غلظت‌های مختلف اسید آبساز بر میزان رادیکال‌های سوپر اکسید و پر اکسید هیدروژن تعیین شد. همچنین در شرایط تیماری مزبور میزان فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی با اندازه گیری مقادیر آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، اسکوربیک پر اکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز تعیین شد.

فعالیت سیستم آنتی اکسیدان غیر آنزیمی نیز با ارزیابی میزان تغییرات اسید اسکوربیک، آلفا توکوفرول و کاروتنوئید سنجد شده. در نهایت میزان پراکسیداسیون چربی‌ها با انجام سنجش اسید تیوباربیتوریک (TBARM) انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای لاین امید بخش L1911 جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۰/۲ درصد ضد عفونی شده و در شرایط مزرعه به صورت دستی کشت شد. هر واحد آزمایشی شامل ۴ ردیف کشت به طول حدود ۲ متر بود. ردیف‌های کناری به عنوان حاشیه و نمونه برداری از دو ردیف وسط با رعایت حاشیه طولی صورت پذیرفت. تراکم کشت حدود ۳۵۰ بوته در متر مربع بر اساس فواصل ردیف ۱۰ سانتی‌متر و فاصله بوته ۳ سانتی‌متر تنظیم شد.

تیمار اسید آبسزیک

میزان جذب در طول موج ۵۳۰ نانو متر با استفاده از اسپکتروفتومتری (Uvikon 930 Watford) قرائت شد. با کاربرد منحنی استاندارد، غلظت یون سوپر اکسید بر حسب واحد نانو مول بر دقیقه بر گرم وزن ترتظیم شد. منحنی مزبور با استفاده از غلظت‌های تولید شده O_2^- از ترکیب شیمیایی NO_2^- و هیدروکسیل آمین تهیه شد.

میزان رادیکال پراکسید هیدروژن به روش برنان و فرنکل (Brennan and Frenkel, 1977) و با استفاده از کمپلکس پراکسید تیتانیوم انجام شد. میزان جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت و به وسیله منحنی استاندارد غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تصحیح شد و نتایج بر حسب واحد تنظیم شد. منحنی مزبور با استفاده از کیت آماده موسوم به غلظت استاندارد H_2O_2 تهیه شد (Orozco-Cardenas et al., 2001).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

میزان آنزیم سوپر اکسید و دیسموتاز کل با روش جیانو پولیتیس و ریس (Giannopolitis and Ries, 1977) به شرح زیر اندازه‌گیری شد. ۰/۱ گرم نمونه با ۳ میلی‌لیتر محلول واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار $pH=7.8$ ، متیونین ۱۳ میلی مولار، تترازایلوم ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۲ میکرو مولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار و آنزیم استخراج ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط و یکنواخت شد. مخلوط در شرایط نوری ۵۰۰۰ لوکس به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. کالیبراسیون با افزودن یک واحد آنزیم سوپر اکسید برای احیاء ۵۰ درصد تترازایلوم افزوده و میزان فعالیت با طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری (Uvikon 930 Watford) قرائت شد.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز I با استفاده از روش ابی (Aebi, 1984) به شرح زیر تعیین شد. ۰/۱ گرم نمونه با ۳ میلی لیتر بافر واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار $pH=7.8$ ، استاندارد پراکسید هیدروژن و آنزیم استخراج مخلوط و یکنواخت شد. میزان جذب محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری (Uvikon 930 watford) قرائت شد. میزان فعالیت آنزیم گلوکاتیون ردوکتاز با استفاده از روش اسپدل و بشام (Schaedle and Basham, 1977) تعیین شد.

محلول پاشی اسید آبسزیک در غلظت‌های ۵۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میکرو مولار روی برگ انجام شد. محلول پاشی آب به عنوان شاهد نیز در شرایط مشابه صورت پذیرفت. تیمارها در زمان حداکثر رشد رویشی (کد GS59 راهنمای (زیداکس) گیاه و صبح زود (به منظور جلوگیری از اکسیداسیون نوری) انجام شد. اگر چه در برخی مطالعات، برگ جدا شده در محلول تیمار غوطه‌ور می‌شود، ولی نتایج حاصل از اعمال شرایط تیماری روی برگ گیاه به لحاظ کاربردی و دقت عمل مؤثرتر بوده است (Louis et al., 1998). به منظور یکنواختی محلول پاشی تعداد ۱۰ بوته انتخابی برای هر تیمار در هر تکرار به وسیله کیسول هوای فشرده (فشار حدود ۳ اتمسفر) با غلظت تیماری مورد نظر محلول پاشی شد.

طرح آماری و نمونه برداری

طرح آماری مورد استفاده بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار بود. نمونه برداری تصادفی از ۱۵ برگ تیمار شده در هر تکرار و در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ ساعت پس از محلول پاشی صورت پذیرفت. به منظور انجام برخی اندازه‌گیری‌ها از مواد تازه و در سایر موارد نمونه‌ها سریعاً در نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان انجام سنجش‌های مربوطه در دمای $-80^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری رادیکال‌های سوپر اکسید و پر اکسید هیدروژن

میزان یون سوپر اکسید (O_2^-) با استفاده از روش السترن و هیوپل (Elstner and Heupel, 1976) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد. یک گرم نمونه برگ به طور یکنواخت ساییده شده و مقدار ۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۵ میلی مولار ($pH=7.8$) به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول فوق برداشت و به همراه ۰/۹ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۵ میلی مولار، ۰/۱ میلی لیتر هیدرو کلراید هیدوکسیل آمین ۱۰ میلی مولار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. پس از آن مقدار معادل حجم محلول اتیل اتر اضافه شد و با دور ۱۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

میزان آلفا توکوفرول جدا شده به وسیله ستون التا سفر (OD=5 μ m) در شدت ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه خالص سازی شد و غلظت آن با کمک دستگاه آشکار ساز فرابنفش در طول موج برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر و خروجی ۳۲۸ نانومتر تعیین شد.

مقدار کارو تنوئید با انجام اسپکتروفتومتری و استفاده از روش لیچتن تالر (Lichtenthaler, 1987) اندازه‌گیری شد.

سنجش اسید تیوباربیتریک (TBARM)

در این سنجش که معیاری برای اندازه‌گیری میزان تنش اکسیداسیونی است، مقدار مالون دی آلدید که محصول نهایی و نسبتاً پایدار واکنش اکسیداسیون مولکول‌های بزرگ است، اندازه‌گیری می‌شود. در این خصوص از روش هگگ و همکاران (Hagege *et al.*, 1990) با تغییراتی استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم برگ هموژنیزه و یک میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک ۱۵ درصد (w/v) به آن اضافه شد. محلول حاضر پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون به شدت مخلوط شد و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب کوچک حاصل از سانتریفوژ با ۵ میلی‌لیتر استون شستشو شد، پس از ورتکس مجدداً با همان دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس به آن مقدار ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک یک درصد (w/v) و یک میلی‌لیتر اسید تیوباربیتریک ۰/۶ درصد (w/v) افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف شد و مقدار جذب محلول حاصل با طول موج ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری (Uvikon930) و (Watford) اندازه‌گیری شد.

نتایج

نتایج تجزیه صفات مورد مطالعه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در جدول ۱ ارائه شده است. در مورد کلیه صفات مورد ارزیابی تفاوت بسیار معنی‌داری ناشی از تأثیر غلظت آبسزیک اسید ملاحظه شد.

۰/۱ گرم نمونه برگ در یک میلی لیتر بافر واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار pH=7.8، سدیم EDTA ۲ میلی‌مولار، ۱/۵NADPH میلی مولار و آنزیم استخراج ۲۰۰ میکرو لیتر مخلوط و یکنواخت شد. میزان جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. نتایج بر حسب استاندارد جذب بدون حضور NADPH تصحیح شد. میزان فعالیت آنزیم اسکوربیک پراکسیداز I با روش ناکانو و آسادا (Nakano and Asada, 1981) محاسبه شد. ۰/۱ گرم نمونه برگ در یک میلی لیتر محلول واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار pH=7.8، استاندارد اسکوربیک پراکسیداز ۰/۵ میلی‌مولار، H₂O₂ ۰/۱ میلی‌مولار و آنزیم استخراج ۲۰۰ میکرو لیتر مخلوط شد. میزان جذب نوری در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت شد. تصحیح مقادیر با داشتن H₂O₂ بدون حضور آنزیم صورت گرفت.

اندازه‌گیری عوامل آنتی اکسیدان غیر آنزیمی

میزان نمک اسکوربات به روش آراکاو و همکاران (Arakawa *et al.*, 1981) به شرح زیر صورت پذیرفت. مقدار ۰/۵ گرم نمونه در ۱۰ میلی لیتر اسیدتری کلرو استیک ۵ درصد به طور یکنواخت مخلوط شد. مخلوط حاضر به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰g سانتریفوژ شد. فاز بالایی به آرامی جداسازی و میزان جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های محلول نمک اسکوربات خالص با فواصل مساوی ۵ نانو مول در دامنه ۲۵ -۰ نانو مول تهیه و با توجه به میزان جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر برای محلول‌های استاندارد، تنظیم شد.

میزان آلفا توکوفرول با استفاده از روش مون-بوش و همکاران (Munné-Bosch *et al.*, 1999) اندازه‌گیری شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ در نیتروژن مایع به طور یکنواخت ساییده شد و مقدار ۵ میلی لیتر متانول حاوی یک درصد اسکوربات به آن اضافه شد. با افزودن ۴ میلی‌لیتر هگزان مخلوط حاضر به مدت یک دقیقه ورتکس و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰g سانتریفوژ شد. لایه هگزان فوقانی با دقت حذف و با کمک محفظه خلاء نسبی خشک شد. مقدار ۲ میلی لیتر متانول به نمونه اضافه و محلول یکنواخت حاصل به دستگاه HPLC منتقل شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی

Table 1. Analysis of variance for studied traits in randomized complete block design

| Source of variation | منابع تغییر | درجه آزادی df | میانگین مربعات Mean square | | | | | | | | | |
|---------------------|-------------|---------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|---------|--------------------|---------|
| | | | O ₂ | H ₂ O ₂ | SOD | CAT | GR | AXP | ASA | α-Toc | CAR | TBARM |
| Block | بلوک | 3 | 6/3 ^{ns} | 5/4 ^{ns} | 37/9 ^{ns} | 14/9 ^{ns} | 28/5 ^{ns} | 36/7 ^{ns} | 7/8* | 46/3* | 33/1 ^{ns} | 35/5* |
| ABA | غلظت ABA | 3 | 53/2** | 57/1** | 213/0** | 88/6** | 170/1** | 197/2** | 42/3** | 511/0** | 223/2** | 161/0** |
| Error | خطا | 9 | 4/7 | 5/2 | 39/6 | 7/8 | 19/3 | 20/3 | 2/0 | 13/0 | 16/0 | 7/9 |

ns, * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

O₂⁻: یون سوپر اکسید H₂O₂: پراکسید هیدروژن SOD: آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز CAT: آنزیم کاتالاز GR: آنزیم گلوکوتاتیون ردوکتاز AXP: اسکوربیک پراکسیداز ASA: اسید اسکوربیک α-Toc: آلفا توکوفرول CAR: کاروتنوئید TBARM: شاخص سطح اکسیداسیون سلولی

ns, **, * not significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

O₂⁻: Superoxide ino, H₂O₂: Hydrogen peroxide, SOD: Superoxide dismutase, CAT: Catalase, GR: Glutatin reductase, AXP: Ascorbic peroxidase, ASA: Ascorbic acide, α-Toc: α-tocopherol, CAR: Carotenoid, TBARM: Cellular oxidation level index.

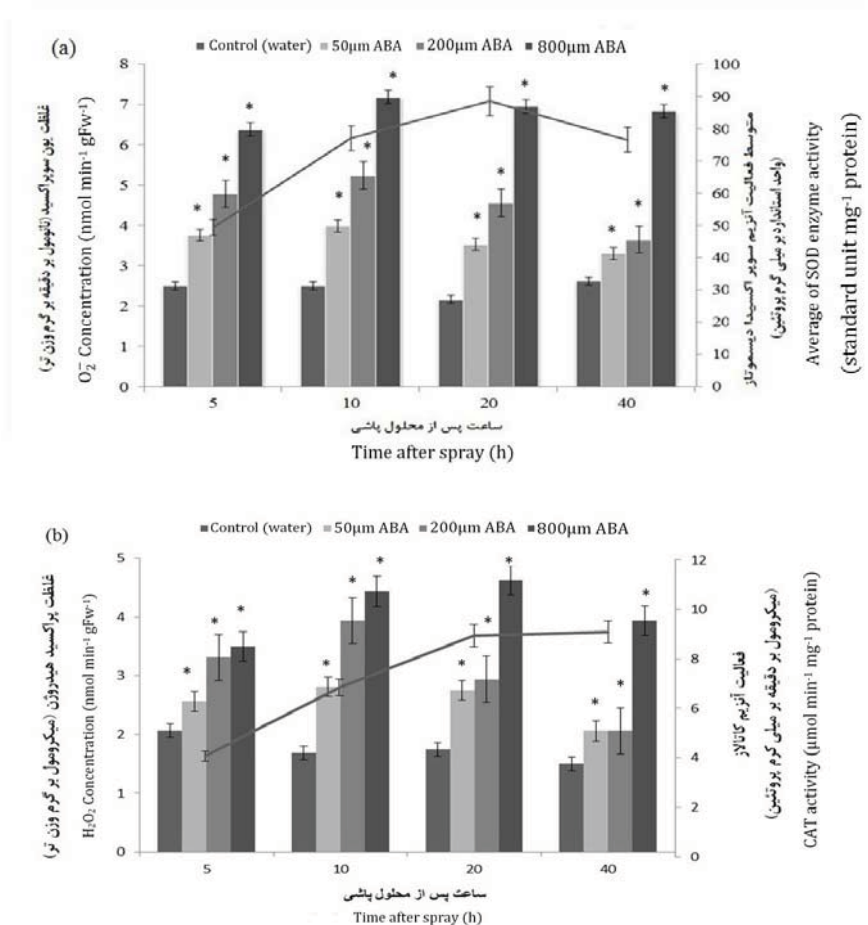
توجهی داشت و پس از آن در دو زمان بعدی ۲۰ و ۴۰ ساعت تقریباً ثابت ماند.

تأثیر اسید آسبیزیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان

میزان تغییرات آنزیم آنتی اکسیدان تحت تأثیر محلول پاشی اسید آسبیزیک در شکل ۲ نشان داده شده است. در مورد کلیه آنزیم‌های مورد مطالعه اسید آسبیزیک تأثیر معنی‌دار بر میزان فعالیت و سنتز آنزیم‌ها نسبت به شاهد نشان داد. تمام آنزیم‌ها به جز گلوکوتاتیون ردوکتاز در غلظت ۸۰۰ میکرومولار اسید آسبیزیک کاهش بیان داشتند. تشابه زیادی برای میزان فعالیت سه آنزیم کاتالاز، گلوکوتاتیون ردوکتاز و اسکوربیک پراکسیداز طی نمونه برداری در ۱۰ و ۲۰ ساعت پس از محلول پاشی با غلظت‌های مختلف ABA دیده شد. بیشترین سنتز آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در غلظت ۲۰۰ میکرومولار ABA حاصل شد.

میزان رادیکال‌های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن

تأثیر محلول پاشی اسید آسبیزیک بر میزان رادیکال‌های فعال سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد حداکثر میزان این رادیکال‌ها ۱۰ ساعت پس از اعمال محلول پاشی اسید آسبیزیک حاصل شد و پس از آن در مراحل ۲۰ و ۴۰ ساعت روند کاهشی ملاحظه شد. همچنین در تمامی مراحل نمونه برداری غلظت ۸۰۰ میکرومولار اسید آسبیزیک بیشترین مقدار رادیکال‌های مزبور را ایجاد کرد. به طور کلی با افزایش غلظت ABA میزان رادیکال‌های مذکور با یک شیب خطی بالا رفت. متوسط تغییرات آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز برای غلظت‌های مختلف ABA توسط کردار خطی نشان داده شده است (شکل ۱). میزان متوسط آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با افزایش زمان نمونه برداری تا ۲۰ ساعت پس از محلول پاشی افزایش خطی و پس از آن در زمان ۴۰ ساعت کاهش یافت. در حالیکه مقدار متوسط آنزیم کاتالاز از زمان ۵ ساعت پس از محلول پاشی تا ۱۰ ساعت افزایش قابل



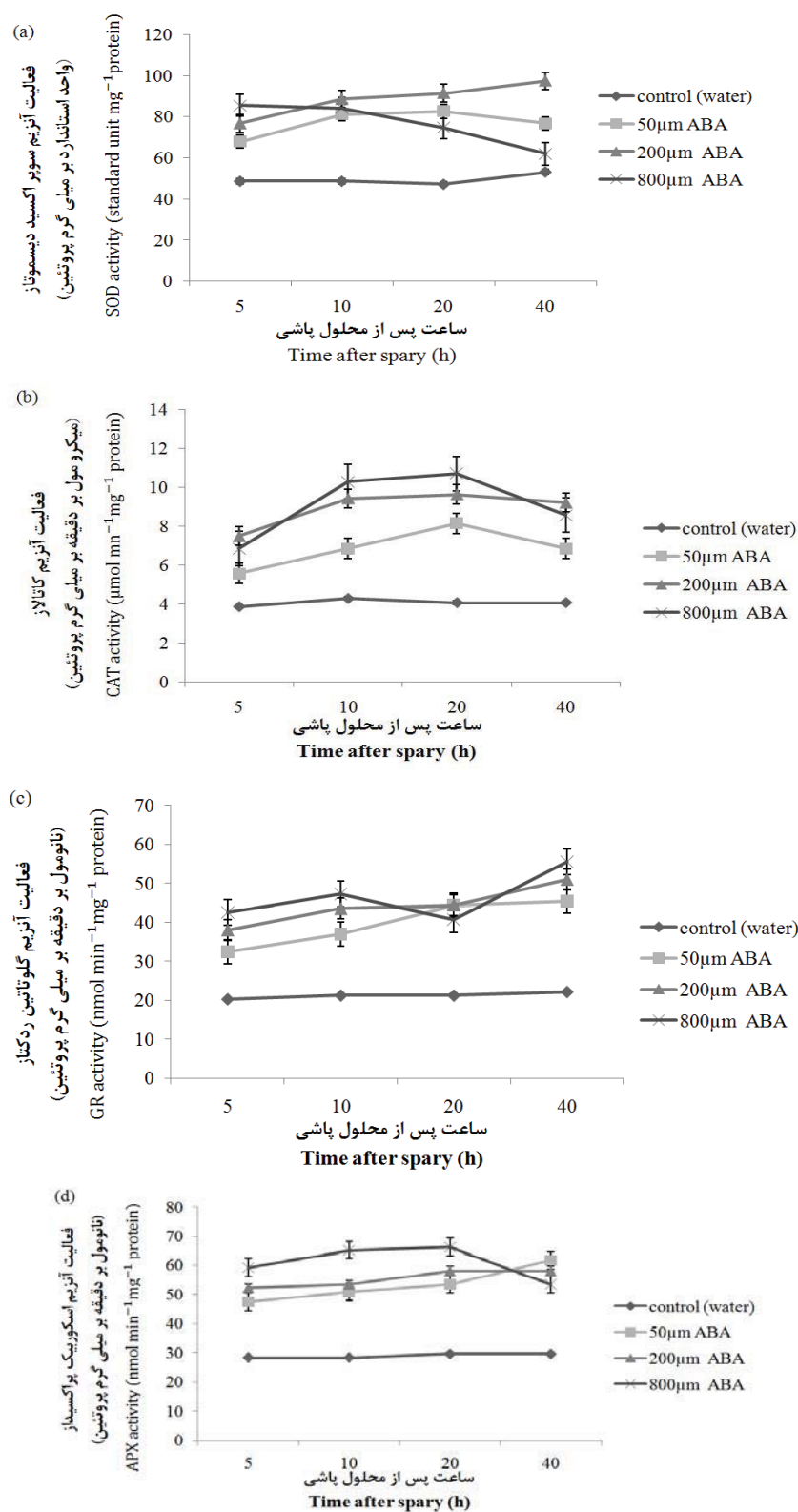
شکل ۱- تأثیر محلول پاشی اسید آبسزیک بر میزان رادیکال‌های سوپر اکسید (a) و پراکسید هیدروژن (b) طی زمان‌های نمونه برداری پس از محلول پاشی روی برگ گیاه کامل جو زراعی. مقادیر میانگین چهار نمونه است. خطای معیار توسط نشانه میله‌ای و اختلاف معنی‌دار هر میانگین با شاهد مربوطه به وسیله آزمون t انجام و با علامت ستاره مشخص شده است. میانگین تغییرات آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز روی شکل a و کاتالاز روی شکل b به صورت کردار خطی ارائه شده است.

Figure 1. Effect of ABA spray on levels of O₂⁻ (a) and H₂O₂ (b) in leaves of adult barley plants at 4 sampling times after spray. Values are the means of four replicates. Error bar represent SE with n=4. Asterisks indicate the significance difference at p<0. 05 level by t-test when compared to control. Average of enzyme activities showed by linear line: superoxide dismutase (a) catalase (b).

افزایشی نشان داد، در زمان ۴۰ ساعت پس از محلول پاشی به ویژه در غلظت ۸۰۰ میکرومولار ABA کاهش شدید اسید اسکوربیک ملاحظه شد. مقدار آلفا توکوفرول طی زمان‌های نمونه‌برداری برای کلیه غلظت‌های ABA افزایش نشان داد، این افزایش در غلظت ۸۰۰ میکرومولار شدیدتر بود. میزان واکنش کاروتنوئید ثابت بیشتری داشت و در عین حال طی زمان‌های نمونه برداری روند مشابهی از افزایش تحت تأثیر غلظت‌های مختلف ABA حاصل شد.

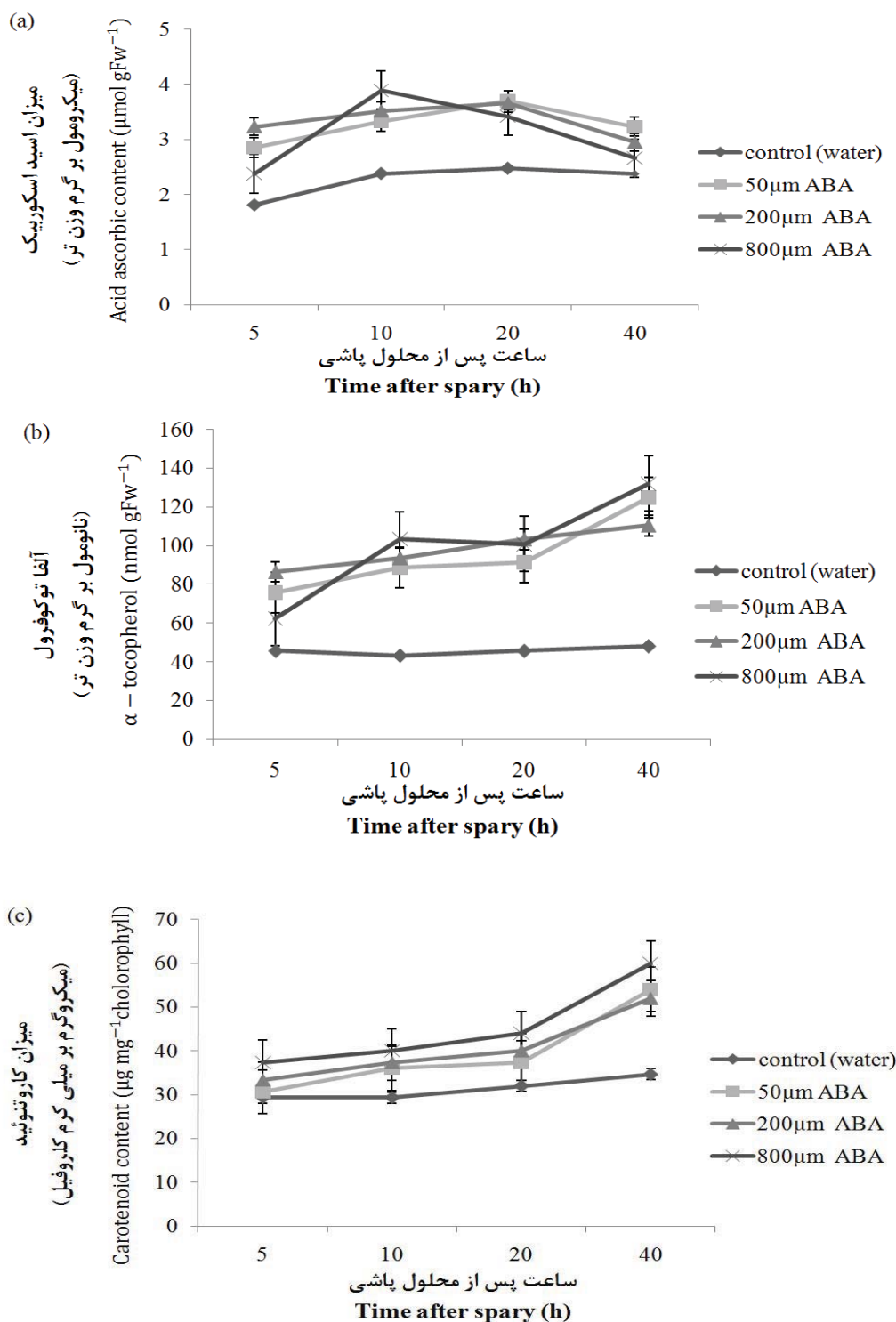
تأثیر اسید آبسزیک بر عوامل آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی

میزان سنتز عوامل غیر آنزیمی آنتی‌اکسیدان شامل اسید اسکوربیک، آلفا توکوفرول و کاروتنوئید در شکل ۳ نشان داده شده است. اساساً میزان عوامل مزبور واکنش چشمگیری به اسید آبسزیک نشان دادند و در کلیه موارد افزایش قابل توجهی نسبت به شاهد دیده شد. میزان اسید اسکوربیک تا زمان ۲۰ ساعت پس از محلول پاشی برای کلیه غلظت‌های ABA به جز ۸۰۰ میکرومولار عموماً روند



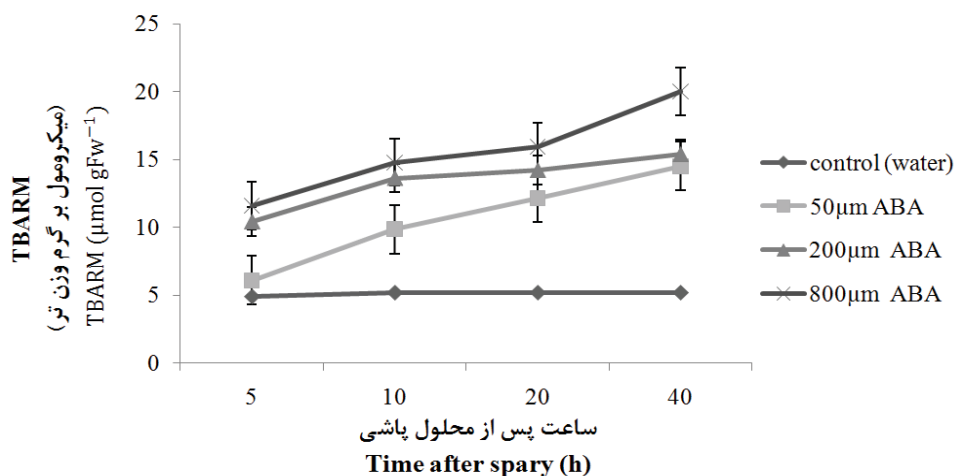
شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل: (a) سوپر اکسید دیسموتاز (b) کاتالاز (c) گلوکوتائین ردکتاز (d) اسکوربیک پراکسیداز، تحت تأثیر محلول پاشی اسید آسبیزیک روی گیاه کامل جو زراعی در زمان حداکثر رشد رویشی. میانگین‌ها (n=4) در زمان‌های نمونه برداری پس از محلول پاشی تنظیم شده است. مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده است.

Figure 2. Effect of ABA spray on anti-oxidant enzymes in leaves of adult barley plants. (a) SOD (b) CAT (c) GR (d) APX. Values are the means of four replicates at 4 sampling times after spray. Error bar represent SE with n=4.



شکل ۳- میزان فعالیت مواد غیر آنزیمی آنتی اکسیدان شامل: (a) اسید اسکوربیک (b) آلفا توکوفرول (c) کاروتنوئید، تحت تأثیر محلول پاشی اسید آبسزیک روی گیاه کامل جو زراعی در زمان حداکثر رشد رویشی. مقادیر میانگین‌ها (n=4) در زمان های نمونه برداری پس از محلول پاشی تنظیم شده است. مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده است.

Figure 3. Effect of ABA spray on non-enzymatic anti-oxidant activities in leaves of adult barely plants. (a) Acid ascorbic (b) α -tocopherol (c) Carotenoid values are the means of four replicates at 4 sampling times after spray. Error bar represent SE with n=4.



شکل ۴- میزان پراکسیداسیون چربی‌ها (TBARM) در زمان‌های نمونه‌برداری پس از محلول پاشی اسید آبسزیک روی برگ گیاه کامل جو زراعی در زمان حداکثر رشد رویشی. میزان خطای معیار برای هر میانگین (n=4) با علامت میله‌ای نشان داده شده است.

Figure 4. Effect of ABA spray on lipid peroxidation (expressed as TBARM) in leaves of adult barely plants. Error bar represent SE with n=4.

ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده حائز اهمیت هستند. از طرفی به عنوان مولکول‌های سیگنالی در پروسه تنظیم بیان ژن‌ها و سنتز پروتئین‌ها ایفای نقش می‌نمایند (Larkindale *et al.*, 2007). پراکسید هیدروژن در تشکیل دیواره لیگنینی سلول‌های گیاهی نقش مهمی دارد (Lewis and Yamamoto, 1990). این عامل رادیکالی با افزایش فعالیت مسیر متابولیکی آنزیم MAP کیناز، الگوی زمان بندی باز و بسته شدن روزنه‌ها را به عنوان یک واکنش دفاعی نسبت شرایط تنش تنظیم می‌کند (Neill *et al.*, 2001). اهمیت یون سوپر اکسید در فعالیت ژن‌های مقاومت به پاتوژن‌ها (*PR1*, *PR5*) گزارش شده است (Mackerness *et al.*, 2001). این دو رادیکال در مسیر کنترلی تولید هورمون‌های اتیلن، جازمونیک و اسید سالیسیلیک اهمیت زیادی دارند (Mackerness, 2000).

اگرچه شواهد تحقیقاتی نشان می‌دهد که اسید آبسزیک و رادیکال‌های فعال اکسیژن به عنوان عوامل ثانویه در فرآیندهای مهم سلولی دخالت دارند، اما نوع ارتباط آن‌ها به روشنی تعیین نشده است. با این حال چنین به نظر می‌رسد که اسید آبسزیک با ایجاد تغییرات متابولیک سلولی منجر به افزایش سطح رادیکال‌های اکسیژن شده و در پی آن فعالیت سیستم دفاعی آنزیمی

بحث

نتایج برخی مطالعات نشان داده است که اسید آبسزیک به عنوان یک مولکول انتقال پیام نقش مهمی در تولید پراکسید هیدروژن، بیان ژن‌ها و فرآیند تولید پروتئین‌های دفاعی از قبیل آنزیم‌های آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، اسکوربیک پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز را دارا است (Kaminaka *et al.*, 1999; Bellaire *et al.*, 2000; Guan *et al.*, 2000). بر این اساس چنین به نظر می‌رسد که اسید آبسزیک در القای فرآیند سیستم دفاعی آنتیاکسیدان نقش مهمی دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که اسید آبسزیک نه تنها در افزایش میزان پراکسید هیدروژن (شکل ۱ ب) و فعالیت آنزیم‌های مذکور (شکل ۲) نقش مؤثری دارد بلکه سبب افزایش معنی دار مقدار یون سوپر اکسید نیز می‌شود (شکل ۱ الف). به طور کلی رادیکال‌های آزاد اکسیژن به ویژه سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن واجد دونقش متمایز هستند، این عوامل در غلظت‌های بالا سمی بوده، با اعمال تنش اکسیداتیو سبب خسارت به مولکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها، DNA و چربی‌های می‌شوند. از طرفی موجب آسیب دیواره سلولی شده و روند تبادلات غشاء سلولی را مختل می‌نمایند (Golden *et al.*, 2002). درحالیکه در غلظت‌های متعادل در القای سازگاری نسبی گیاه برای

بالا می‌رود (Guan *et al.*, 2000).

در این ارتباط نتایج تحقیقات گوان و اسکندالیوس (Guan and Scandalios, 1998) نشان می‌دهد که اسید آبسیزیک عامل محرک بسته شدن روزنه‌ها بوده که منجر به کاهش میزان گاز کربنیک (CO_2) قابل دسترس برای فتوسنتز است. افت راندمان سیستم فتوسنتزی میزان مصرف الکترون‌های پر انرژی را کاهش می‌دهد و در نتیجه روند تولید رادیکال‌های آزاد با واکنش الکترون‌های مزبور و اکسیژن تسهیل شده و در نهایت فراوانی رادیکال‌های اکسیژن بالا می‌رود.

نتایج این تحقیق نیز نشان داد که با افزایش میزان غلظت ABA در هر یک از مراحل نمونه‌برداری سطح رادیکال‌های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن افزایش یافت (شکل ۱). در عین حال در مقایسه بین زمان‌های نمونه برداری بیشترین میزان این رادیکال‌ها در زمان ۱۰ ساعت پس از محلول پاشی ABA حاصل شد. روند مشابهی نیز در سنتز آنزیم‌های پاداکسیدان به ویژه سوپر اکسید دیسموتاز تحت تأثیر محلول پاشی ABA خصوصاً در غلظت ۵۰ میکرومول ملاحظه شد (شکل ۲ الف). کاهش قابل توجه مقدار آنزیم سوپر اکسید در غلظت ۸۰۰ میکرومول ABA (شکل ۲ الف) که منجر به کاهش نرخ متوسط آن نیز شد (شکل ۱ الف) غیر مترقبه به نظر می‌رسید. یک پاسخ احتمالی اینکه با اعمال غلظت بالای ABA (۸۰۰ میکرومول) امکان بروز تنش اکسیداتیو بسیار محتمل است. نتایج میزان سطح اکسیداسیون سلولی (سنجش TBARM) در شکل ۴ موید این موضوع است. در نتیجه امکان بروز مرگ سلولی بالا بوده و همین مسئله موجب شده تا سطح آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به طور

نسبی کاهش یابد. بررسی‌های انجام شده با میکروسکوپ فرا بنفش صحت این مسئله را تأیید کرد (داده‌ها نشان داده نشده است). موضوع قابل تأمل دیگر اینکه در فرآیند تولید پراکسید هیدروژن در حضور کاتالیزور یون آهن طی واکنش هایبر- وایس رادیکال هیدروکسیل (OH) با فراوانی نسبی بیشتری تولید می‌شود (Iturbe-Ormaetxe, 1998). رادیکال هیدروکسیل سمیت نسبی بالاتری داشته و به شدت مخرب بوده و ضمن واکنش با مولکول‌های حیاتی با تخریب دیواره سلولی روند مرگ سلول را تسریع می‌کند (Evans *et al.*, 1999).

تأثیر تیمار اسید آبسیزیک بر عوامل غیر آنزیمی سیستم دفاعی شامل اسید اسکوربیک، آلفا توکوفرول و کاروتنوئید نشان داد (شکل ۳) که این عوامل با افزایش غلظت ABA افزایش نشان می‌دهند.

کاهش نسبی اسید اسکوربیک به ویژه در تیمار ۸۰۰ میکرومولار در زمان نمونه برداری ۴۰ ساعت پس از محلول پاشی احتمالاً به دلیل افزایش نسبی سلول‌های مرده بوده است که توضیح آن اشاره شد. در عین حال از دلایل روند افزایش عوامل غیر آنزیمی فوق الذکر، فراوانی آن‌ها و مسیرهای مختلف بیو سنتزی تولید آنها است. اسید اسکوربیک در اکثر اندامک‌های سلولی نظیر کلروپلاست، میتوکندری، پراکسی‌زوم، واکوئل و محیط سیتوپلاسمی به وفور وجود دارد (Jimenez *et al.*, 1997). آلفا توکوفرول از عوامل پاداکسیدان غشایی بوده که نقش آن عمدتاً در کنترل اکسیداسیون چربی‌هاست. فرم اکسید شده آلفا توکوفرول به وسیله آسکوربات مجدداً احیاء و در چرخه آنتی‌اکسیدانی قرار می‌گیرد (Smirnoff and Wheeler, 2000).

References

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. **Methods Enzymology** 105: 121-126.
- Arakawa, N., Tsutsumi, K., Sanceda, N. G., Kurata, T. and Inagaki, C. 1981. Rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using diphenyl-1, 10-phenanthroline. **Agriculture Biology Chemistry** 45: 1289-1290.
- Bellaire, B. A., Carmody, J., Braud, J., Gossett, D. R., Banks, S. W., Lucas, M. C. and Fowler, T. E. 2000. Involvement of abscisic acid-dependent and-independent pathways in the upregulation of antioxidant enzyme activity during NaCl stress in cotton callus tissue. **Free Radical Research** 33: 531-545.
- Brennan, T. and Frenkel, C. 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. **Plant Physiology** 59: 411-416.
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savouré, A., Verbruggen, N., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1998. Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. **Plant Science** 138: 27-34.
- Elstner, E. F. and Heupel, A. 1976. Inhibition of nitrite formation from hydroxy lammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. **Annals of Biochemistry** 70: 616-620.
- Evans, P. J., Gallelli, D., Mathieu, C., Jesus Hernandez, M., de Felipe, M., Halliwell, B. and Puppo, A. 1999. Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. **Planta** 208: 73-79.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59: 309-314.
- Golden, T. A., Hinerfeld, D. and Melov, S. 2002. Oxidative stress and aging: beyond correlation. **Aging Cell** 117-123.
- Gong, M., Li, Y. J. and Chen, S. Z. 1998. Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. **Journal of Plant Physiology** 153: 488-496.
- Guan, L. and Scandalios, J. G. 1998. Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, Sod4 and Sod4A, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. **Plant Physiology** 117: 217-224.
- Guan, L., Zhao, J. and Scandalios, J. G. 2000. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. **Plant Journal** 22: 87-95.
- Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J. and Gaspar, T. 1990. Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: Avoidance of pigment interference. **Phytochemistry Annual** 1: 86-89.
- Hare, P. O., Cress, w. A. and Van Staden, J. 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany** 50: 413-434.
- Iturbe-Ornaetxe, I., Escuredo, P. R., Arrese-Igor, C. and Becana, M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiology** 116: 173-181.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Rio, L. A. and Sevilla, F. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology** 114: 275-284.
- Kaminaka, H., Morita, S., Tokumoto, M., Masumura, T. Tanaka, K. 1999. Differential gene expression of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. **Free Radical Research** 31: 219-225.
- Larkindale, J. D., Hall, J. R., Knight, M. and Vierling, E. 2005. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. **Plant Physiology**, 138: 882-897.
- Lewis, N. G. and Yamamoto, E. 1990. Lignin-Occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology** 41: 455-496.

- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods of Enzymology** 148: 350-382.
- Mackerness, S. A. H. 2000. Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280-320 nm) stress. What are the key regulators? **Plant Growth Regulation** 32: 27-39.
- Mackerness, S. A. H., John, C. F., Jordan, B. and Thomas, B. 2001. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. **FEBS Letters** 489: 237-242.
- Munné-Bosch, S., Schwarz, I. and Alegre, L. 1999. Enhanced formation of α -tocopherol and highly oxidized abietanediterpenes in water-stress rosemary plants. **Plant Physiology** 121: 1047-1052.
- Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology** 22: 867-880.
- Nambara, E., Kawaide, H., Kamiya, K. and Naito, S. 1998. Characterization of an Arabidopsis thaliana mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. **Plant Cell Physiology** 39: 853-858.
- Navabpour, S., Morris, K., Allen R., Harrison, E., Mackerness, S. and Buchanan-Wollaston, V. 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. **Journal of Experimental Botany** 54: 2285-2292.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. and Hancock, J. T. 2001. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany** 52: 9-17.
- Orozco-Cardenas, M. L., Narvaez-Vasquez, J. and Ryan, C. A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a sound messenger for the induction of defence genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Cell** 13: 179-191.
- Pei, Z. M., Murata, N., Benning, O., Thomine, S., Klusener, Allen, G. J., Grill, E. and Schroeder, J. I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. **Nature** 406: 731-734.
- Schaedle, M. and Bassham, J. A. 1977. Chloroplast glutathione reductase. **Plant Physiology** 59: 1011-1012.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shin Ozaki, K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology** 115: 327-334.
- Siddiqui, N. U., Chung, H. J., Thomas, T. L. and Drew, M. e. 1998. Abscisic acid-dependent and -independent expression of the carrot late-embryogene-sis-abundant-class gene Dc3 in transgenic tobacco seedlings. **Plant Physiology** 118: 1181-1190.
- Smirnoff, N. and Wheeler, G. L. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. **Critical Review of Plant Science** 19: 267-290.
- Yi-Ting H. and Ching-Huei K. 2010. Abscisic Acid-induced Leaf Senescence of Rice Seedlings is Due to Hydrogen Peroxide Accumulation. **Crop, Environment & Bioinformatics** 7:243-249.

Effect of abscisic acid application on enzymatic and non-enzymatic activity in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Saeed Navabpour*

Assistan Prof., Dept. of Plant Protection and Biotechnology, Gorgan University

(Received: August 30, 2011- Accepted: January 4, 2012)

Abstract

Leaves of *Hordeum vulgare* (line L1911) were sprayed at maximum vegetative growth in four concentrations of abscisic acid (0, 50, 200, 800 μm). The experiment was performed on the research field of Warwick University in UK in 2003. Samples were taken from treated leaves in interval time including 5, 10, 20 and 40h after application. For each sample, the amount of superoxide (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) content, the activity of enzymes involved in defense system including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbic peroxidase and glutathione reductase were measured and determined. The content of several non-enzymatic antioxidants such as ascorbate, α -tocopherol and carotenoid and the degrees of oxidative damage (TBARM assay) were examined. The obtained results revealed that maximum levels of superoxide and hydrogen peroxide radicals were produced at 10h after ABA spray and declined slightly at 20 and 40h after spray. During the whole process of sampling, the maximum level of these radicals were produced by 800 μm ABA concentration. For all of the studied enzymes, despite of minor differences, the activity of all the activity of all enzymes showed significant increase by ABA spray in compare with control (water spray). Also, degrees of oxidative damage (TBARM level) showed significant increase by the effect of ABA concentration. In general the results of this study showed moderate concentration of ABA particularly 50 μm induce enzymatic and non enzymatic defense system prevents plant from oxidative damages.

Keywords: Abscisic acid, Anti-oxidant enzyme, *Hordeum vulgare*, Non- enzymatic defense system