

اثر کوئرسیتین و آسکوربات برونزاد بر دانه رست یولاف تحت سطوح مختلف شوری

علیرضا ایرانبخش^{۱*}، مریم نیاکان^۲ و سید داوود حسینی^۳

(۱) گروه زیست شناسی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.

(۲) گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.

(۳) گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: Iranbakhshar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۵/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۱۱

چکیده

تنش‌های محیطی سبب افزایش انواع اکسیژن فعال و واکنش‌گر در گیاهان می‌شود. مواد آنتی‌اکسیدانی نظیر کوئرسیتین و آسکوربات دارای ساختار شیمیایی مناسب جهت حذف رادیکال‌های آزاد بوده و موجب افزایش تحمل گیاهان به تنش می‌گردند. یولاف (*Avena sativa* L.) دارای خواص دارویی و غذایی فراوانی است که می‌توان با بهبود سیستم حفاظتی گیاه علیه تنش اکسیداتیوی آن را در خاک‌های شور کشت نمود. بررسی اثر کوئرسیتین و آسکوربات برونزاد به‌طور جداگانه و توأم بر جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دانه رست گیاه دارویی یولاف در تنش‌های ملایم و شدید شوری بود. بذر یولاف (رقم امیدبخش) بر اساس طرح کاملاً تصادفی تحت تیمار کوئرسیتین در غلظت‌های صفر، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومول، آسکوربات دو میلی‌مول و نمک کلرید سدیم با مقادیر صفر، ۲۵۰ و ۴۵۰ میلی‌مول در محیط پتری‌دیش قرار گرفتند. درصد جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در دانه رست مورد ارزیابی قرار گرفت. اضافه نمودن آسکوربات و کوئرسیتین موجب افزایش درصد جوانه‌زنی در مقایسه با نمک ۴۵۰ میلی‌مول شد. افزودن آسکوربات و کوئرسیتین به محیط حاوی نمک به‌ویژه در غلظت ۴۵۰ میلی‌مول موجب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و افزایش فعالیت پراکسیداز گشت. اما تغییرات معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز ایجاد ننمود. بکارگیری آسکوربات و کوئرسیتین به تنهایی و توأم باعث تحریک جوانه‌زنی دانه در مقدار بالای نمک (۴۵۰ میلی‌مولار) شد که احتمالاً این واکنش به علت افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و حذف انواع اکسیژن فعال در دانه رست یولاف بود.

واژه‌های کلیدی: یولاف، شوری، آسکوربات، کوئرسیتین، جوانه‌زنی.

مقدمه

هنگامی که گیاهان در معرض شرایط نامساعد محیطی از قبیل: تغییر دما، استرس خشکی و یا شوری قرار می‌گیرند، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از قبیل: اکسیژن یکتایی، رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل افزایش می‌یابد (Moller *et al.*, 2001). این مواد آنتی‌اکسیدان می‌توانند به کلروفیل، پروتئین، DNA، لیپیدها و سایر ماکرومولکول‌های مهم آسیب بزنند. بنابراین اثر منفی بر متابولیسم و در نتیجه رشد و عملکرد گیاه خواهند داشت (Imlay and Linn, 1986). در این زمان بایستی سطح گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌ها به‌طور دقیق تنظیم شود. در گیاهان شبکه‌ای از ژن‌های مختلف وجود دارد که سطح گونه‌های فعال اکسیژن را مدیریت می‌کنند. این شبکه به‌طور پویا تولید گونه‌های فعال اکسیژن و عوامل جاروب‌کننده‌ی آن (آنتی‌اکسیدان‌ها) را کنترل می‌کند (Mittler *et al.*, 2004). این سیستم‌های حفاظتی تحت عنوان آنتی‌اکسیدان مطرح هستند که سطوح گونه‌های فعال اکسیژن را در گیاه تنظیم می‌کند. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند اکسیداسیون لیپیدها یا مولکول‌های دیگر را به‌وسیله‌ی جلوگیری از راه‌اندازی یا گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداتیو به تأخیر انداخته یا بازدارند (Veliloglu *et al.*, 1998). ترکیبات فنلی متابولیت‌های ثانویه گوناگونی هستند که در بافت‌های گیاهی فراوانند (Doussos and Pontikis, 2003). پلی‌فنل‌ها دارای ساختار شیمیایی مناسب جهت فعالیت حذف رادیکال‌های آزاد هستند. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌ها از واکنش‌پذیری بالای آن‌ها به‌عنوان دهنده‌های هیدروژن و الکترون و توانایی رادیکال‌های مشتق شده از پلی‌فنل‌ها به منظور برقراری و جایگیری الکترون غیر جفت و نیز توانایی آن‌ها به‌عنوان انتقال دهنده‌های کلات‌های فلزی حاصل می‌شود (Arora *et al.*, 2002). از دیگر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی، توانایی فلاونوئیدها برای تغییر کینتیک پراکسیداسیون توسط تغییر و تبدیل بخش‌های لیپیدی به منظور کاهش سیالیت غشاءها می‌باشد. کوثرسیتین گروهی از ترکیبات فلاونوئیدی (ترکیبات فنلی) بوده که دارای گروه‌های هیدروکسیلی بیش‌تر (بین یک تا شش) می‌باشند و توانایی جاروب‌کنندگی رادیکال‌های ناشی از استرس‌ها را دارند (Arora *et al.*, 2002). یکی دیگر از آنتی‌اکسیدانهای قوی آسکورات می‌باشد که در اکثر سلولهای گیاهی در اندامک‌هایی نظیر کلروپلاست و میتوکندری وجود دارد (Detullio *et al.*, 2000). توانایی دادن الکترون در محدوده‌ی عظیمی از واکنش‌های آنزیمی و غیرآنزیمی باعث شده که اسیدآسکوربیک به‌عنوان یک ترکیب مهم جهت رفع سمیت گونه‌های فعال اکسیژن در بخش‌های آبی معرفی شود. آسکورات به‌طور مستقیم رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروکسیل و اکسیژن یکتایی را از بین برده و پراکسید هیدروژن را از طریق واکنش با آسکورات پراکسیداز به آب احیا می‌کند (Noctor and Foyr, 1998). یولاف با نام علمی *Avena sativ* گیاهی است که علاوه بر این‌که به‌عنوان غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند، خواص دارویی نیز دارد (Chance and Maehley, 1995). دراین گیاه مواد غذایی مغذی وجود دارد که انرژی تحلیل رفته پس از بیماری را ترمیم می‌کنند، به

کاهش کلسترول خون کمک کرده و همچنین استقامت انسان را بالا می‌برند (Chevallier, 1996). دانه، آردی مغذی دارد که آنتی‌اسپاسم و ضد بیماری‌های قلبی، ادرارآور، ملین و آرام‌بخش است (Lust, 1983; Chiej, 1984). دانه حاوی b- سیتوسترول ترکیب ضد سرطانی است و به‌عنوان یک گروه دارویی برای سرطان‌ها استفاده می‌شود (Duke, 1983). تا کنون تحقیقات متعددی در رابطه با اثر آنتی‌اکسیدانی آسکوربات برونزاد بر بهبود پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی موجود می‌باشد اما در رابطه با چگونگی برهمکنش آسکوربات به‌عنوان یک اسید آلی با یک ترکیب فنلی (کوئرسیتین) بر تغییر پارامترهای مورفوفیزیولوژیک یک گیاه دارویی تحت شرایط تنش اطلاعات اندک می‌باشد. لذا هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر آسکوربات و کوئرسیتین به‌طور جداگانه و توأم بر جوانه‌زنی دانه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دانه رست گیاه یولاف در تنش‌های ملایم و شدید شوری بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. مقایسه بین تیمارها و شاهد بر اساس آزمون دانکن توسط برنامه آماری SPSS انجام شد. بذر گیاه یولاف *Avena sativa* رقم شماره یک یا یولاف امیدبخش با همکاری مرکز تحقیقات کرج و تأیید مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. جهت ضدعفونی بذرها از وایتکس سه درصد به مدت سه دقیقه استفاده گردید. در این آزمایش غلظت دو میلی‌مول اسیدآسکوربیک، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومول کوئرسیتین و ۲۵۰ و ۴۵۰ میلی‌مول نمک NaCl در قالب ۱۹ تیمار ترکیبی پس از انجام پیش‌آزمایش به‌عنوان تیمارهای اصلی و آب مقطر به‌عنوان شاهد استفاده شد. دانه‌ها با غلظت‌های مختلف نمک، آسکوربات و کوئرسیتین در روز اول آب‌دهی شده و روزهای بعدی تنها با آب مقطر خیسانده شدند. نام‌ها و علائم اختصاری تیمارها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: نام و علائم اختصاری گروه‌های تیماری

نام اختصاری تیمار	تیمار
۰-۰-۰	آب مقطر
۰-۰-۳۰۰	غلظت نمک ۰، آسکوربات صفر، کوئرسیتین ۳۰۰ میکرومولار
۰-۰-۵۰۰	غلظت نمک ۰، غلظت آسکوربات صفر، غلظت کوئرسیتین ۵۰۰ میکرومولار
۰-۲-۳۰۰	غلظت نمک ۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات ۲ میلی‌مولار، غلظت کوئرسیتین ۳۰۰
۰-۲-۵۰۰	غلظت نمک ۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات ۲ میلی‌مولار، غلظت کوئرسیتین ۵۰۰
۲۵۰-۰-۰	غلظت نمک ۲۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات صفر، غلظت کوئرسیتین ۰ میکرومولار
۲۵۰-۰-۳۰۰	غلظت نمک ۲۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات صفر، غلظت کوئرسیتین ۳۰۰ میکرومولار
۲۵۰-۰-۵۰۰	غلظت نمک ۲۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات ۰ میلی‌مولار، غلظت کوئرسیتین ۵۰۰
۲۵۰-۲-۳۰۰	غلظت نمک ۲۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات ۲ میلی‌مولار، غلظت کوئرسیتین ۳۰۰ میکرومولار
۲۵۰-۲-۵۰۰	غلظت نمک ۲۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات ۲ میلی‌مولار، غلظت کوئرسیتین ۵۰۰ میکرومولار
۴۵۰-۰-۰	غلظت نمک ۴۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات صفر، غلظت کوئرسیتین صفر
۴۵۰-۰-۳۰۰	غلظت نمک ۴۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات صفر، غلظت کوئرسیتین ۳۰۰ میکرومولار
۴۵۰-۰-۵۰۰	غلظت نمک ۴۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات صفر، غلظت کوئرسیتین ۵۰۰ میکرومولار
۴۵۰-۲-۰	غلظت نمک ۴۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات ۲ میلی‌مولار، غلظت کوئرسیتین صفر
۴۵۰-۲-۳۰۰	غلظت نمک ۴۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات ۲ میلی‌مولار، غلظت کوئرسیتین ۳۰۰ میکرومولار
۴۵۰-۲-۵۰۰	غلظت نمک ۴۵۰ میلی‌مولار، غلظت آسکوربات ۲ میلی‌مولار، غلظت کوئرسیتین ۵۰۰ میکرومولار

درصد جوانه‌زنی و پارامترهای رشد دانه رست یولاف

جهت تعیین درصد جوانه‌زنی پلیت‌های حاوی دانه‌های یولاف پس از اعمال تیمارهای مورد نظر در ژرمیناتور به مدت یک هفته در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس جوانه‌زنی دانه‌ها هر ۲۴ ساعت در طی هفت روز بررسی و ثبت شد. در این آزمایش درصد جوانه‌زنی از رابطه ۱ محاسبه شد:

$$\text{رابطه ۱: } (PG) = 100 \frac{n}{N} \text{ درصد جوانه‌زنی}$$

n = تعداد بذره‌های جوانه‌زده

N = تعداد کل بذره‌های کشت شده

برای تعیین طول ریشه‌چه از خط‌کش بر حسب سانتی‌متر استفاده شد. جهت تعیین وزن تر از ترازوی دیجیتالی بر حسب گرم استفاده گردید. جهت تعیین وزن خشک، دانه رست‌ها در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند.

سنجش فعالیت آنزیم‌ها

سنجش فعالیت کاتالاز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از دانه رست‌های هشت روزه آبیاری شده با غلظت‌های مختلف و ترکیبی از آسکوربات، نمک، کوثرسیتین موجود در تیمارها استفاده شد. یک گرم وزن تر دانه رست با چهار میلی‌لیتر محلول عصاره گیری به مدت ۱۵ دقیقه ساییده شد تا به صورت مخلوط همگن در آید. محلول عصاره‌گیری شامل مخلوط کردن ۱/۲ گرم تریس، دو گرم اسیدآسکوربیک، ۳/۸ گرم بوراکس (borate Di sodium tetra)، دو گرم Na_2EDTA و ۱۶/۶ گرم پلی‌اتیلن‌گیلیکول ۶۰۰۰ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود (pH=۷). سپس محلول به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH=۷ و ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه سه درصد را با هم در حمام یخ مخلوط کرده سپس ۱۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی تازه استخراج شده به آن اضافه گردید. تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر قرائت شد فعالیت آنزیم برحسب $(\text{ODmin}^{-1}\text{gfw})$ در نظر گرفته شد (Chance and Maehley, 1995).

سنجش فعالیت پراکسیداز

از عصاره آنزیمی در آزمایش قبلی جهت تعیین فعالیت پراکسیداز استفاده شد. در این آزمایش دو میلی‌لیتر تامپون‌استات ۰/۲ مولار pH ۵ با ۰/۴ میلی‌لیتر آب اکسیژنه سه درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر بنزیدین محلول در الکل ۵۰ درجه ۰/۰۱ مولار مخلوط شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد. در مرحله آخر جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه قرائت و فعالیت آنزیم بر حسب $(\text{ODmin}^{-1}\text{gfw})$ تعیین شد (Koroi, 1989).

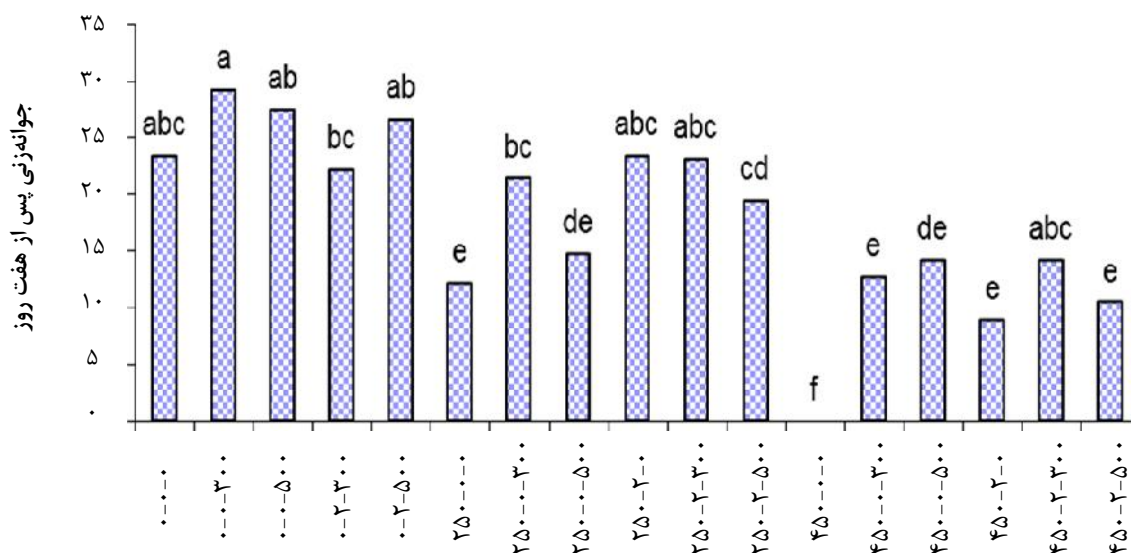
سنجش فعالیت آسکورات پراکسیداز

جهت بررسی این آنزیم نیز از عصاره آنزیمی کاتالاز استفاده شد. در این سنجش دو میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH= ۶/۵ را با ۰/۲ میلی لیتر آب اکسیژنه سه درصد و ۰/۲ میلی لیتر آسکورات ۵۰ میکرومولار در حمام یخ مخلوط کرده و بلافاصله ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد، سپس تغییرات جذب در طول موج ۲۶۵ نانومتر خوانده و فعالیت آنزیم بر حسب (ODmin⁻¹gfw) در نظر گرفته شد (Arrigoni, 1994).

مقایسه بین تیمارها و شاهد بر اساس آزمون دانکن توسط برنامه آماری SPSS برای چهار تکرار صورت گرفت و رسم نمودارها با کمک نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

با افزودن نمک کلرید سدیم در غلظت ۲۵۰ میلی مولار به محیط حاوی آسکورات و کوثرسیتین، بین شاهد، تیمار ۲۵-۰۰۰، تیمار ۲۵۰-۰۰-۵۰۰ و ۲۵۰-۲-۰۰۰ تفاوت معنی داری در درصد جوانه زنی مشاهده گردید. همچنین با افزودن نمک با غلظت ۴۵۰ میلی مولار به محیط حاوی آسکورات و کوثرسیتین بین شاهد و سایر تیمارها تفاوت معنی داری در درصد جوانه زنی در سطح پنج درصد مشاهده شد، بدین معنی که افزودن نمک درصد جوانه زنی را به طور معنی داری کاهش داد و افزودن آسکورات و کوثرسیتین سبب بهبود رشد در این غلظت از نمک شد (شکل ۱).

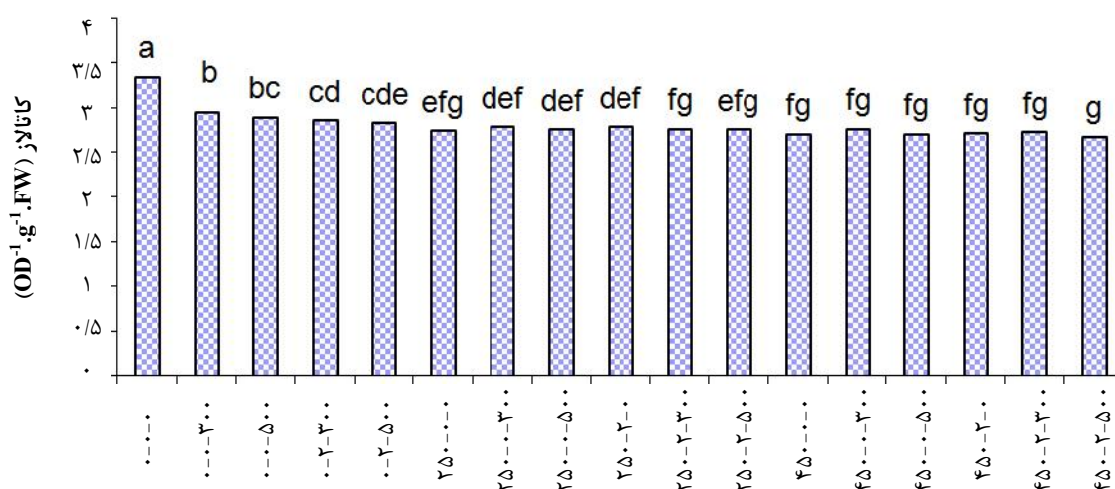


شکل ۱: اثر تیمارهای ترکیبی از نمک (صفر = شاهد، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی مول)؛ آسکورات (صفر و دو میلی مول) و کوثرسیتین (۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومول) بر درصد جوانه زنی دانه رست یولاف

تحقیقات بر روی گیاهان متعدد نشان داده است که تنش شوری باعث کاهش جوانه زنی و طول ریشه چه می شود (Gulzar and Ajmalkhan, 2001). در تنش های محیطی نظیر شوری ثبات سلولی مختل شده و گونه های واکنش گر

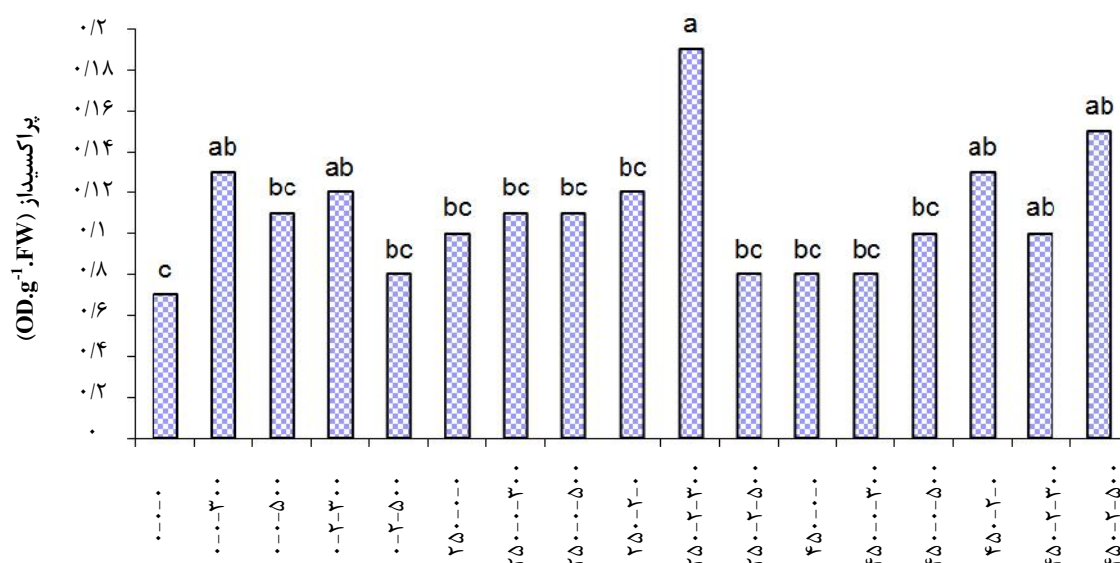
اکسیژن تولید می‌گردند. در فیزیولوژی دانه گونه‌های واکنشگر اکسیژن به‌عنوان مولکول سمی تلقی شده که منجر به آسیب سلول و اختلال در نمو دانه و یا فرایندهای جوانه‌زنی می‌شود (Bown, 1995). دیده شده است که سطوح کمی از این رادیکال‌ها توسط سیستم حمایتی آنتی‌اکسیدانی دانه کنترل می‌شود. بنابراین تحت تنش شوری شدید، سیستم‌های آنتی‌اکسیدان درون‌زاد کارایی بالایی نداشته و منجر به کاهش جوانه‌زنی و حتی مرگ دانه می‌شوند (Asada, 1999). تحقیقات نشان داده است که بکارگیری ترکیبات آنتی‌اکسیدان نظیر اسیدآسکوربیک و ترکیبات فنلی با از بین بردن گونه‌های واکنشگر اکسیژن به جوانه‌زنی و در نتیجه رشد گیاه کمک می‌کنند. در این پژوهش نیز مشاهده شد که تنش شوری شدید (۴۵۰ میلی‌مول) مانع جوانه‌زنی گردید و تنش شوری ملایم میزان جوانه‌زنی را نسبت به شاهد کاهش داد اما اضافه نمودن اسیدآسکوربیک و کوئرسیتین این روند را بهبود بخشید.

با افزودن نمک کلریدسدیم در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار به محیط حاوی آسکوربات و کوئرسیتین بین شاهد و سایر تیمارهای واجد نمک ۲۵۰ میلی‌مول نیز در فعالیت کاتالازی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و بالاترین فعالیت آنزیم کاتالاز در شاهد مشاهده گشت. همچنین طبق نتایج به‌دست آمده کاربرد نمک ۴۵۰ میلی‌مولار سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در تمام تیمارها در مقایسه با شاهد شد (شکل ۲).



شکل ۲: اثر تیمارهای ترکیبی از نمک (صفر = شاهد، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌مول)، آسکوربات (صفر و دو میلی‌مول) و کوئرسیتین (۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومول) بر فعالیت کاتالاز دانه رست هفت روزه یولاف

با افزودن نمک کلریدسدیم در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار به محیط حاوی آسکوربات و کوئرسیتین فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار ۲۵۰-۲-۳۰۰ به بیشینه خود رسید و بین این تیمار با سایر تیمارها و نیز شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. همچنین با افزودن نمک کلریدسدیم در غلظت ۴۵۰ میلی‌مولار به محیط حاوی آسکوربات و کوئرسیتین فعالیت آنزیم افزایش یافت. در تیمارهای ۴۵۰-۲-۵۰۰ و ۴۵۰-۲-۵۰۰ فعالیت آنزیم نسبت به تیمار حاوی نمک ۴۵۰ میلی‌مولار به تنهایی افزایش معنی‌داری یافت (شکل ۳).



شکل ۳: اثر تیمارهای ترکیبی از نمک (صفر = شاهد، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی مول)، آسکوربات (صفر و دو میلی مول) و کوئرسیتین (۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومول) بر فعالیت پراکسیداز دانه رست هفت روزه یولاف

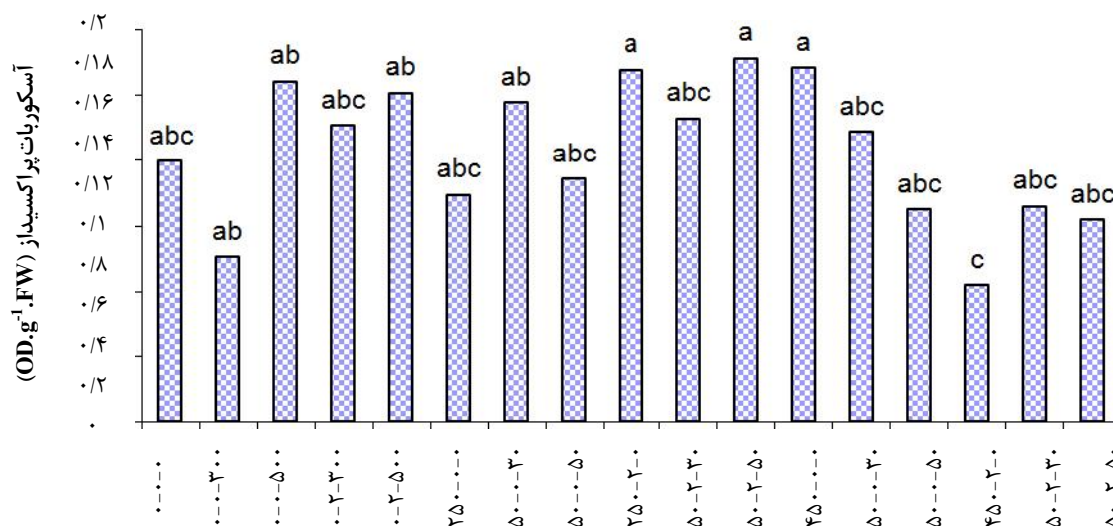
مطابق با نتایج به دست آمده فعالیت کاتالاز در نمک در دو غلظت ۲۵۰ و ۴۵۰ میلی مول در تمام تیمارها در مقایسه با شاهد کاهش معنی داری یافت و کاربرد آسکوربات و کوئرسیتین تغییر معنی داری در فعالیت آنزیم حاصل نمود. تحقیقات نشان داده است کاتالازها نقش مهمی در حذف هیدروژن پراکسید حاصل از β اکسیداسیون اسیدهای چرب و همچنین موقعیت های تنش زا از قبیل شوری را برعهده دارند (Ogawa and Iwabuchi, 2001).

مطابق با نتایج به دست آمده در محیط فاقد نمک افزودن آسکوربات و کوئرسیتین موجب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با شاهد گشت. گزارش شده است که در مرحله جوانه زنی و تشکیل دانه رست مقدار رادیکال های آزاد به علت جذب ناگهانی آب افزایش می یابد (Neill and Desikan, 2002). با توجه به این مطلب به نظر می رسد که آسکوربات و کوئرسیتین به علت نقش آنتی اکسیدانی خود مستقیماً در حذف رادیکال های آزاد و پراکسید هیدروژن شرکت کرده از این رو فعالیت آنزیم کاتالاز در حضور این آنتی اکسیدان ها کاهش یافته است. با افزودن نمک به محلول حاوی آسکوربات و کوئرسیتین کاهش معنی داری در فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با شاهد مشاهده شد. در این راستا به نظر می رسد که این آنزیم به نمک حساسیت بالایی داشته و کاربرد آسکوربات و کوئرسیتین نیز نتوانست اثر معنی داری بر فعالیت آنزیم گذارد.

گزارش شده است پراکسیدازها همانند کاتالازها اساس عملکردشان حذف پراکسید هیدروژن است. میل ترکیبی پراکسیدازها به پراکسید هیدروژن بیش تر از کاتالازها می باشد (Noctor and Foyr, 1998). عنوان شده است تغییرات دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز هم جهت با هم صورت نمی گیرد، به طوری که کاتالازها در بذرها در فصل سرما وقتی فعالیت پراکسیداز به حداقل می رسد، آشکار می شوند (Kar and Mishra, 1976). زمانی که پراکسیداز از نظر تعداد ایزوآنزیم ها و

فعالیت، در نقطه‌ای حداکثر قرار دارند کاتالاز یا وجود نداشته یا فعالیت بسیار کمی دارد (Moller *et al.*, 2001). در این تحقیق نیز مشاهده شد که در محیط فاقد نمک افزودن کوثرسیتین و آسکوربات تغییرات معنی‌داری را طی نکرد که به نظر می‌رسد این آنزیم به آسکوربات و کوثرسیتین در غلظت‌های کاربردی حساس نیست. با افزودن نمک به‌ویژه در غلظت ۴۵۰ mM کوثرسیتین و آسکوربات با افزایش قابل ملاحظه فعالیت آنزیم پراکسیداز به کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از مقادیر بالای نمک کمک نمودند.

داده‌های حاصل از آزمایش نشان داد با افزودن نمک کلرید سدیم در غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار به محیط حاوی آسکوربات و کوثرسیتین فعالیت آسکوربات پراکسیداز در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نیافت. هم‌چنین با افزودن نمک کلرید سدیم در غلظت ۴۵۰ میلی‌مولار به محیط حاوی آسکوربات و کوثرسیتین بین شاهد و سایر تیمارها در فعالیت آسکوربات پراکسیداز تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. تنها بین تیمار ۴۵۰-۰-۰ و ۴۵۰-۲۰-۰ اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۴).



شکل ۴: اثر تیمارهای ترکیبی از نمک (صفر = شاهد، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌مول)، آسکوربات (صفر و دو میلی‌مول) و کوثرسیتین (۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومول) بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز دانه رست هفت روزه یولاف

آنزیم آسکوربات پراکسیداز در کلروپلاست ها، سیتوزول و همراه با غشاءهای گلی اکسی زوم و پراکسی زومها در برگ مشاهده شده است (Velioglu *et al.*, 1998). آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز آنزیمهای مهم چرخه‌ی آسکوربات- گلوکاتیون هستند که در کلروپلاستها و سیتوزول به‌عنوان سیستم‌های جاروب‌کننده‌ی ROS فعالیت می‌نمایند. آسکوربات پراکسیداز از طریق مسیر گلوکاتیون- آسکوربات، پراکسید هیدروژن را جاروب نموده و به این ترتیب مونودهیدروآسکوربات حاصل می‌شود که به دنبال آن آسکوربات از مونودهیدروآسکوربات تولید می‌شود (Bais *et al.*, 2003; Baestib and Greppin, 2008). تحقیقات صورت گرفته بر روی برگ اسفناج بیانگر آن است که آسکوربات

پراکسیداز یک آنزیم بسیار مهم در حذف پراکسید هیدروژن می‌باشد و با اضافه نمودن آسکوربات اگزوزن، فعالیت آن بیش‌تر می‌شود (Harinasul *et al.*, 2003). هم‌چنین نشان داده شده است که آسکوربات پراکسیداز در سیتوزول به‌عنوان سیستم جاروب‌کننده‌ی گونه‌های واکنشگر اکسیژن عمل می‌نماید (Baestib and Greppin, 2008). مطابق با نتایج پژوهش حاضر در تیمارهای فاقد نمک فعالیت آسکوربات پراکسیداز مانند پراکسیداز تغییرات معنی‌داری را طی ننمود. افزودن نمک به محیط حاوی آسکوربات و کوثرسیتین نیز موجب تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای در فعالیت این آنزیم نگشت. در این مورد نیز به نظر می‌رسد این آنزیم به مقدار نمک کاربردی و نیز آسکوربات و کوثرسیتین حساسیت کافی ندارد.

پلی‌فنل اکسیدازها در بیش‌تر بافت‌های گیاهی به مقدار قابل‌توجهی وجود دارند و گونه‌های واکنشگر اکسیژن را به ترکیبات مونو و دی‌هیدروکسی‌فنولیک تبدیل می‌کنند (Roberts *et al.*, 1996). سوبسترای آنزیم پلی‌فنل اکسیداز ترکیبات فنلی می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در تیمارهای فاقد نمک و نیز تیمارهای حاوی نمک، کوثرسیتین و آسکوربات تغییرات معنی‌داری طی نکرد. در این مورد نیز به نظر می‌رسد این آنزیم نسبت به مقدار نمک و آسکوربات و کوثرسیتین در غلظت‌های کاربردی حساس نیست.

نتایج این پژوهش نشان داد که بکارگیری آسکوربات و کوثرسیتین در مرحله‌ی دانه رست به تنهایی و توأم باعث تحریک جوانه‌زنی دانه به‌ویژه در مقدار بالای نمک (۴۵۰ میلی‌مولار) گشت. هم‌چنین در این تحقیق مشخص گردید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پاسخ‌های متفاوتی را در مقادیر مختلف نمک، آسکوربات و نیز کوثرسیتین در دانه رست یولاف نشان دادند که در این بین آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز از سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد سنجش به مقادیر کاربردی از نمک آسکوربات و کوثرسیتین حساس‌تر بودند.

سپاسگزاری

از سرکار خانم الهه کیایی کارشناس محترم آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان سپاس و قدردانی می‌شود.

منابع

- Arora, A., Byrem, T.M, Nair, M.G and Strasburg, G.M. 2002. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Biochemistry and Biophysics* 373: 102
- Arrigoni, O.J. 1994. Ascorbate system in plant development. *Bioenergy Biomember* 26: 407
- Asada, K. 1997. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defense*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, London
- Bais, H.P., Vepechedu, R., Gilory, S., Callaway, R.M. and Vivanco, J.M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301: 1377-1380.

- Bown, D. 1995.** Encyclopedia of herbs and their uses. Dorling Kindersley, London.
- Chance, B. and Maehley, A. 1995.** Methods in Enzymology 2: 764.
- Chevallier, A. 1996.** The encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley. London.
- Chiej, R. 1984.** Encyclopaedia of medicinal plants. MacDonald.
- Detullio, M.C., Paciolla, C., Dalla Vecchia, F., Rascio, N., D'Emerico, S., De Gara, L., Liso, R. and Arrigoni, O. 2000.** Changes in onion root development induced by the inhibition of petidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* 209: 424-434.
- Duke, J. 1983.** Published only on the Internet, Handbook of Energy Crops.
- Gulzar, S. and Ajmalkhan, M. 2001.** Seed germination of a halophytic grass *Aeluropus lagopoides*. *Annals of Botany* 87: 319-324.
- Imlay, J.A. and Linn, S. 1986.** DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240:1302-1309.
- Koroi, S.A. 1989.** Gel elektropherstische and spectral photometrischoe under uchungen zomein fiuss der temperature auf straktur and aktritadter amylase and peroxidase isoenzyme. *Physiology* 20:15-21.
- Lust, J. 1983.** The Herb Book. Bantam books. Australia.
- Kar, M. and Mishra, D.B. 1976.** Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57: 315-319.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Breusegem, F. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science* 9: 490.
- Moller, I.M. 2001.** Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:561-591.
- Neill, S. and Desikan, R. 2002.** Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 388-395.
- Noctor, G. and Foyr, C.H. 1998.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Ogawa, K. and Iwabuchi, M. 2001.** Association of glutathione with flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 42:524-530.
- Roberts, S.E., Grof, C.P, Bucheli, C.S., Robinson, S.P. and Wilson, J.R. 1996.** Crops and Pastures, Brisbane, Australia.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B.D. 1998.** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agriculture, Food and Chemistry* 46: 411-4117.