# بررسی تاثیر تنش خشکی و آسکوربات بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدان در دفاع آنتی اکسیدانی گیاه آنیسون (*Pimpinella anisum* L.)

**ژیکا اسدی کاوان، مه لقا قربانلی، آرین ساطعی***

گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

**چکیده**

استرس‌های غیرزیستی از جمله خشکی باعث تحریک ساخته شدن گونه‌های اکسیژن فعال در بافت‌های گیاهی می‌شوند. سیگنالهای ROS شبکه پیچیده‌ای از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را راه اندازی می‌کنند. آسکوربیک اسید یکی از مهمترین بافرهایی است که ساختارهای سلولی را در مقابل حمله اکسیدانها در گیاهان حفظ می‌نماید. اثرات تنش خشکی در دو حالت حضور و عدم حضور آسکوربات خارجی بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز(CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پلی فنل اکسیداز (PPO) در گیاه علفی و معطر *Pimpinella anisum* L. با ارزش صادراتی فراوان که در معرض کمبود آب کنترل شده قرار گرفته بود، مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به اهمیت این گونه گیاهی، این آزمایش در شرایط گلدانی انجام شد و سنجشهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به صورت تصادفی در شاهد و تیمارها (با دو عامل خشکی ٦٠درصد و ٢٥در صد ظرفیت زراعی خاک و یک عامل آسکوربات با غلظت ١/٤ mM صورت پذیرفت. نتایج حاصل نشان داد فعالیت آنزیم‌های PPO, APX, CAT در حضور و غیاب آسکوربات با پیشرفت تنش در برگها بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. در ریشه فعالیت آنزیم‌های CAT و APX در غیاب آسکوربات ابتدا در سطح خشکی ٦٠در صد ظرفیت زراعی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت و سپس در سطح درصد ٢٥ ظرفیت زراعی با کاهشی در حد شاهد روبرو شد که با اعمال آسکوربات خارجی فعالیت آنزیم‌های ریشه ای تا حد معنی‌داری تقریبا در تمام سطوح افزایش یافت.

**کلمات کلیدی**: تنش خشکی، آسکوربات، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، آنیسون

**مقدمه**

استرس خشکی مهمترین علت کاهش رشد و تولید محصول گیاهان در نواحی نیمه خشک بوده و باعث ایجاد پاسخ‌های پیچیده در سطوح مولکولی، فیزیولوژیکی و نموی می‌شود (Ingram و همکاران، ١٩٩٦). در دهیدراتاسیون شدید که محتوای آب بسیار کم می‌شود میزان گونه‌های اکسیژن فعال (AOS) مثل آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن یکتایی افزایش یافته و منجر به آسیب به ساختارهای سلولی و ماکرومولکول‌ها شده، یا بعنوان مولکولهای منفردی عمل می‌کنند که پاسخ‌های دفاعی



*e.mail: zhikaasadi_k@yahoo.com

چندگانه ای را فعال می نمایند (Van Breusegem و همکاران، ۲۰۰۱).

گیاهان برای هضم AOS از مکانیسم‌های دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی آنتی اکسیدانی استفاده می‌کنند(Tammbossi و همکاران، ۲۰۰۲). سوپراکسید دیسموتازها و APXها در کلروپلاست‌ها همراه با دیگر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مکانیسم دفاعی اصلی در مقابل AOS تولید شده بوسیله زنجیره انتقال الکترون واقع در کلروپلاست را تشکیل می‌دهند(Asada، ۱۹۹۹). کاتالازها که آنزیم‌های حاوی آهن بوده و خصوصا در گلی اکسیزوم‌ها فراوانترند، پراکسید هیدروژن تولید شده بوسیله اکسیدازهای دخیل در بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب را در پراکسیزوم‌ها سم زدایی کرده، همچنین پراکسید هیدروژن حاصل از اکسیداسیون گلیکولات تولیدی در تنفس نوری را نیز هضم می‌نمایند. APXها هم در سلول و هم در آپوپلاست، پراکسید هیدروژن را سم زدایی می‌کنند و بطور اختصاصی از آسکوربات بعنوان دهنده الکترون استفاده می‌نمایند (Mehlhorn و همکاران، ۱۹۹۶). ایزوآنزیم‌های PPO، مونواکسیژنازهای حاوی مس هستند که O- هیدروکسیلاسیون فنل‌ها و اکسیداسیون O- دی فنل‌ها را با مصرف مولکولهای اکسیژن به O- کینون‌های مربوط کاتالیز می‌کنند(Kuwabara و Kateh، ۱۹۹۹). بیوسنتز آسکوربات (Asc) و نقش آن بعنوان آنتی اکسیدان سلولی، عامل پاسخ به تنش و کوفاکتور آنزیم، موضوع بسیاری از مقالات مروری طی سالهای اخیر بوده است (Arrigoni و همکاران، ۲۰۰۰).

هر جا که Asc تولید می‌شود فرایندهای آنزیمی وجود دارد که به خوبی مشخص شده است، چون خاصیت آنتی اکسیدانی و ردوکسی سلول را حفظ می‌کند که در پلاستیسیته کلی متابولیکی گیاه نقش دارد(Debolt و همکاران، ۲۰۰۷)..*Pimpinella anisum* L یا آنیسون از تیره Apiaceae، گیاه علفی یکساله ای است که از مهمترین گیاهان دارویی بشمار می‌رود و رشد آن از دانه که همان میوه گیاه محسوب می‌شود، صورت می‌گیرد. منبع جنس *Pimpinella anisum* از کشور اسپانیا و مصر و حوالی کشورهای مدیترانه ای است (Paola و همکاران، ۱۹۹۸) و بومی ایران نیز می‌باشد و در ایران حدود ۲۰ گونه دارد و اغلب در نواحی شمال و شمال غرب ایران پراکنده است (عسگری و همکاران، ۱۳۸۲).

مواد تشکیل دهنده اصلی اسانس روغنی دانه انیسه، ترانس آنتول است و اثرات برجسته دیورتیک، ضداسپاسم، سوهاضمه، آرام بخش، ضدسرفه‌های خشک داشته و دارای خاصیت آنتی باکتریال، ضدعفونی کننده دهان و ریه هابوده و مهارکننده اغلب درماتوفیت‌ها، گال، شپش و بیماریهای مختلف پوستی بصورت موضعی است (Tirapelli و همکاران، ۲۰۰۶؛ Kosales و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین با دارا بودن خواص شبه استروژنی برای ضدقاعدگی، در ازدیاد شیر انسان و دام بکار می‌رود. دارای اسیدهای چرب غیراشباع بوده و خاصیت آنتی اکسیدانی قوی آن بدلیل دارا بودن ویتامین‌های A، E، C، B1، B2، B3 و فلاونوییدها (کومارین) در ترکیبات دانه ای می‌باشد(Stephens، ۲۰۰۳ ). از اینرو این گیاه ارزش صادراتی فراوانی دارد تا در صنایع غذایی(نوشیدنی‌ها و ادویه‌جات)، دارویی، Oleochemistry، دامپروری و بهداشتی(مواد شوینده) بکار گرفته شود. برای بهره برداری از این امر تصمیم گرفته شد این گیاه را در شرایط تنش خشکی پرورش داده تا تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن را مورد بررسی قرار گیرد. همچنین با اعمال آسکوربات بعنوان یک آنتی اکسیدان قوی و فراوان در طبیعت به گیاهان تنش دیده و گیاهان شاهد، فعالیت نسبی بعضی از آنزیم هاهای آنتی اکسیدانی از جمله CAT، APX، PPO را مطالعه شد.

## روش کار

### تهیه بذر

از آنجاییکه گیاه آنیسون یکساله است، بذرها حتما باید تازه باشند و بدلیل دارا بودن مواد آنتی اکسیدانی فراوان، خیلی به سرعت اکسیده می‌شوند و درصد جوانه زنی آنها بسیار کاهش می‌یابد. بذرها از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد که مشخصات بذر و زمان دقیق برداشت آن مشخص شده است. همچنین از لحاظ فیزیولوژی نهفته، بذرها بررسی شده بودند. روش کاشت به صورت گلدانی و با خاک کاملا زهکشی شده و نرم(چون دانه‌های ۱/۵ تا ۲ میلی متری آنیسون با ذرات

خاک ارتباط قوی داشته باشند تا درصد جوانه زنی آنها کاهش نیابد) انجام گرفت. سنجشها به صورت کاملا تصادفی با سه تکرار در شاهد و تیمارها (با دو عامل خشکی و آسکوربات) دنبال شد، بطوریکه عامل خشکی در دو سطح ٦٠درصد و ٢٥در صد ظرفیت زراعی و عامل آسکوربات در یک سطح موثر (بعد از پیش آزمایشهای متوالی) با غلظت ١/٤ mM در نظر گرفته شدند.

**سنجش آنتی اکسیدانهای آنزیمی:**

**الف: روش سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز:**

به منظور سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز از مخلوط واکنش زیر استفاده شد: بافر پتاسیم فسفات (٥٠ میلی مولار، PH =٧) بمیزان ٢/٥ میلی لیتر و آب اکسیژنه (٣٪ v/v) بمیزان ٠/٣ میلی لیتر. مواد فوق را در یک لوله آزمایش در درون یخ با یکدیگر مخلوط کرده، بلافاصله ٥٠ میکرولیتر عصاره آنزیمی بدان افزوده شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ٢٤٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین و بر اساس تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر گیاهی محاسبه گردید (Aebi، ١٩٧٤).

**ب: روش سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:**

برای سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم آسکوربات پراکسیداز از مخلوط واکنش زیر استفاده شد: بافر پتاسیم فسفات (٠/٥ مولار، PH =٧) بمیزان ٢ میلی لیتر، آب اکسیژنه (٣٪ v/v) بمیزان ٠/٢ میلی لیتر، آسکوربات (٥٠ میکرومولار) بمیزان ٠/٢ میلی لیتر. مواد فوق در یک لوله آزمایش و در محیط واجد یخ با ٥٠ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط و منحنی تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین و بر اساس تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر گیاهی محاسبه گردید(Nakano و Asada، ١٩٨١).

**ج: روش سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز:**

برای سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم پلی فنل اکسیداز از مخلوط واکنش زیر استفاده شد: بافر پتاسیم فسفات (٠/٢ مولار، PH =٦/٨) بمیزان ٢/٥ میلی لیتر، پیروگالل (٠/٠٢ مولار) بمیزان ٠/٢ میلی لیتر. مواد فوق به ترتیب به یک لوله آزمایش که در دمای ٤٠ درجه سانتی گراد قرار داشت، اضافه شدند و بلافاصله منحنی تغییرات جذب در طول موج ٢٤٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. سرانجام فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین و بر اساس تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر گیاهی محاسبه گردید (Raymond و همکاران، ١٩٩٣).

برای تهیه عصاره آنزیمی یا پروتئینی از بافت‌های تر اندام‌های هوایی و ریشه‌ها برای هر تکرار از شاهد و هر تکرار از هر ٥ تیمار یک گرم برداشته شد و با محلول عصاره گیری در نهایت دقت در ٣٠ دقیقه ساییده شد. این عصاره‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای یخچال ($3^{o}c$) نگهداری شدند.

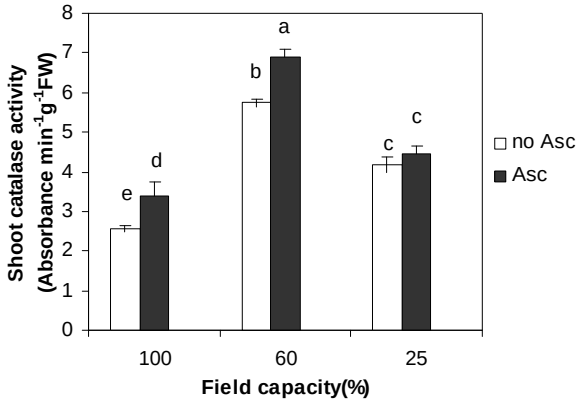
**روش تهیه محلول عصاره گیری**

١/٢ گرم تریس، ٢ گرم آسکوربیک اسید، ٣/٨ گرم بوراکس، ٢ گرم EDTANa2 و ٥٠ گرم پلی اتیلن گلیکول ٢٠٠٠ را با همدیگر مخلوط نموده و کم کم با آب مقطر مخلوط را به صورت محلول درآورده، به حجم ١٠٠ ml رسانده شد. بهتر است تا موقع استفاده در یخچال نگهداری شود.

محاسبات آماری به صورت فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی و با ٣ تکرار صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها در تمام سطوح تنش خشکی در حضور و در عدم حضور آسکوربات با استفاده از روش مقایسه چندگانه‌ای Tukey در سطح احتمال $\alpha<$٠/٠٥ انجام شد و با استفاده از نرم افزار Excel شکلها را رسم شدند.

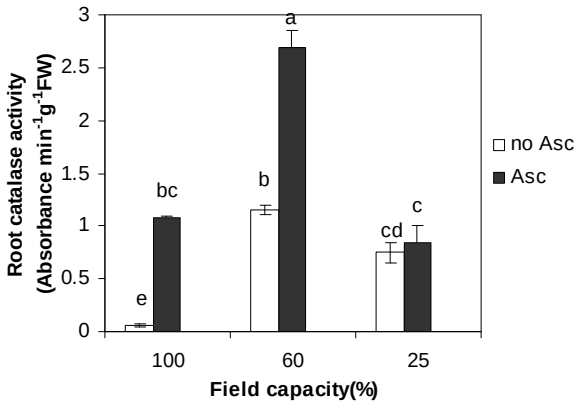
## نتایج

با توجه به جدول شماره ١ و ٢ بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در سطوح مختلف تنش خشکی بطور جداگانه در اندام هوایی و ریشه‌ها در حضور و عدم حضور آسکوربات در گیاه آنیسون مورد بررسی قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها در ٦ شکل ارائه شده است.




**شکل ۱:** تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات(Asc) و عدم حضور آن(no Asc) بر فعالیت آنزیم کاتالاز اندام هوایی گیاه آنیسون.

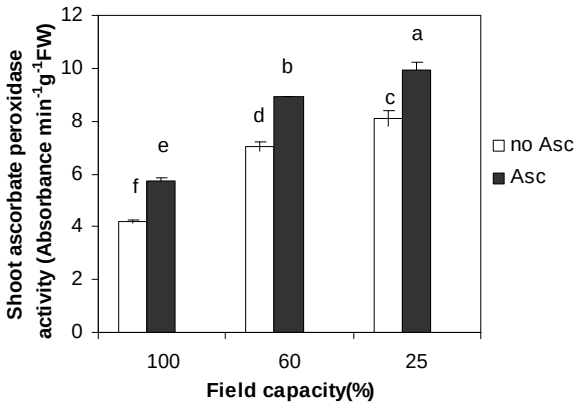
با کم شدن ظرفیت زراعی، فعالیت آنزیم کاتالاز در حضور و عدم حضور آسکوربات در ابتدا در سطح ۶۰درصد نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد و سپس در سطح ۲۵درصد ظرفیت زراعی از اوج فعالیت آنزیم کاتالاز کاسته شد(شکل ۱).




**شکل ۲:** تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات(Asc) و عدم حضور آن(no Asc) بر فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه گیاه آنیسون

البته در سطح ۲۵درصد نیز نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را در حضور و عدم حضور آسکوربات مشاهده نمودیم. از طرفی در مقایسه بین میانگین‌ها در هر یک از سطوح مشابه، در حضور و عدم حضور آسکوربات در صورت اعمال آسکوربات در هر یک از سطوح تنش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شرایط بدون آسکوربات روند افزایشی داشت که این افزایش تنها در سطح ۲۵درصد ظرفیت زراعی معنی‌دار نبود(شکل ۱).

فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه گیاه آنیسون نیز با افزایش تنش خشکی در عدم حضور آسکوربات ابتدا با افزایش معنی‌دار میانگین در سطح ۶۰ درصد نسبت به شاهد روبرو شد و سپس در سطح ۲۵ درصد، میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در غیاب آسکوربات افت معنی‌داری را نسبت به سطح ۶۰ درصد پیدا کرد (جدول ۲).

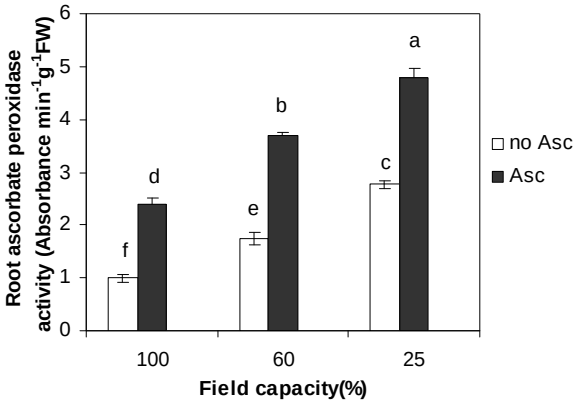



**شکل ۳:** تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (Asc) و عدم حضور آن (no Asc) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز اندام هوایی گیاه آنیسون.

این در حالی است که در هر دو سطح ۶۰ و ۲۵ درصد میزان فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری دارد. همچنین در مقایسه میانگین‌ها در بین سطوح مختلف در حضور آسکوربات، با افزایش تنش خشکی ابتدا با افزایش معنی‌دار میانگین در سطح ۶۰ درصد نسبت به شاهد و سپس با کاهش آن در سطح ۲۵ درصد نسبت به سطح ۶۰ درصد به صورت معنی‌دار روبرو شد. در مقایسه بین سطوح مختلف خشکی در حضور آسکوربات بین سطوح ۲۵ درصد و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در مقایسه بین میانگین‌ها در هر کدام از سطوح مشابه تنش خشکی در بود و نبود

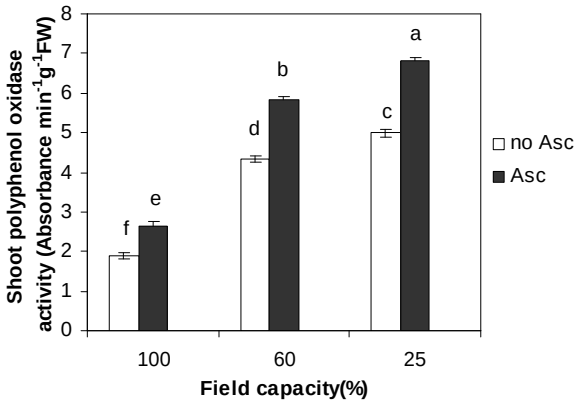
آسکوربات با اعمال آسکوربات، در هر سطح به میزان فعالیت این آنزیم افزوده شد و این افزایش فقط در دو سطح ۶۰ درصد و ۱۰۰ درصد معنی‌دار بود (شکل ۲).

همگام با افزایش تنش خشکی، در مقایسه بین میانگین‌ها در تمام سطوح مختلف خشکی در غیاب آسکوربات، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بطور معنی‌داری افزایش یافت(جدول ۱). همچنین افزایش معنی‌دار در ادامه تنش خشکی در مقایسه بین میانگین‌ها در تمام سطوح مختلف خشکی در حضور آسکوربات نیز صادق بود. در ضمن در مقایسه بین میانگین‌ها در هر یک از سطوح مشابه در بود و نبود آسکوربات، در تیمار با آسکوربات نسبت به غیاب آسکوربات افزایش معنی‌داری داشته است(شکل ۳).




**شکل ٤:** تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (Asc) و عدم حضور آن(no Asc) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ریشه گیاه آنیسون.

همزمان با پیشرفت تنش خشکی در نبود آسکوربات در مقایسه میانگین‌ها در بین سطوح مختلف روند افزایشی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را به صورت معنی‌دار مشاهده شد. همچنین در مقایسه میانگین‌ها در بین سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات نیز با کاهش ظرفیت زراعی، نتایج افزایش معنی‌داری را نسبت به سطح شاهد نشان داد (جدول ۲). در صورت مقایسه بین میانگین‌ها در هر یک از سطوح مشابه، بین بود و نبود آسکوربات، با اعمال آسکوربات میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ریشه نسبت به عدم حضور آسکوربات افزایش معنی‌داری را بیان نمود (شکل ٤).

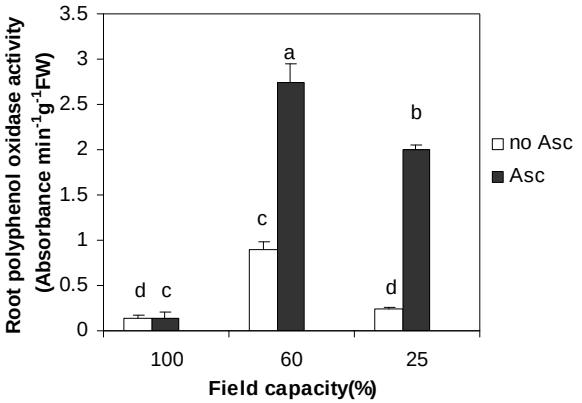



**شکل ٥:** تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (Asc) و عدم حضور آن(no Asc) بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز اندام هوایی گیاه آنیسون.

با کاهش ظرفیت زراعی و افزایش تنش خشکی در نبود آسکوربات در مقایسه بین میانگین‌ها در بین تمامی سطوح مختلف، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد وجود داشت. همچنین در حضور آسکوربات نیز در بین سطوح مختلف خشکی، میانگین‌ها روند افزایشی معنی‌داری را پیش رو گرفتند. از طرفی با توجه به شکل ٥ در مقایسه بین میانگین‌ها در بین هر یک از سطوح مشابه بین بود و نبود آسکوربات در شرایط تیمار با آسکوربات افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط عدم حضور آسکوربات در فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاه آنیسون مشاهده شد.

همراه با پیشرفت تنش خشکی در حضور آسکوربات در مقایسه میانگین‌ها در بین سطوح مختلف خشکی ابتدا با افزایش معنی‌دار در سطح ٦٠ درصد ظرفیت زراعی نسبت به شاهد و سپس با کاهش معنی‌داری در سطح ٢٥ درصد نسبت به سطح ٦٠ درصد روبرو شد. اگر چه در این آزمایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ریشه این گیاه یک سیر صعودی و سپس نزولی را طی می‌نماید اما در هر دو سطح، هم تنش

خشکی متوسط و هم شدید نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را در حضور آسکوربات دارا می‌باشد.




**شکل ٦:** تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات(Asc) و عدم حضور آن(no Asc) بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز ریشه گیاه آنیسون.

از طرفی در مقایسه میانگین‌ها در بین سطوح مختلف خشکی در عدم حضور آسکوربات بین سطح ۲۵ درصد و شاهد تفاوت معنی‌داری ملاحظه نشد و تنها سطح ٦۰ درصد ظرفیت زراعی در عدم حضور آسکوربات نسبت به شاهد معنی‌دار بود (شکل ٦). همچنین در مقایسه بین میانگین‌ها در هر یک از سطوح مشابه تنش خشکی بین بود و نبود آسکوربات، با حضور آسکوربات بر میزان فعالیت این آنزیم در ریشه بطور معنی‌داری نسبت به غیاب آسکوربات مشاهده شد.

## بحث

تحت شرایط غیر استرس، AOS بطور موثری بوسیله آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی حذف می‌شود، در حالیکه در طول شرایط خشکی تولید AOS اضافی ظرفیت سیستم‌های آنتی اکسیداتیو برای پاک کردن آنها کاهش می‌یابد و منجر به استرس اکسیداتیو می‌گردد (Noctor و Foyer، ۱۹۹۸). سازگاری گیاهان با خشکی اغلب با سطوح افزایش یافته گونه‌های اکسیژن فعال (AOS)، نظیر آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن یکتایی که برای سلولها سمی هستند، مرتبط است (Smirnoff، ۱۹۹۳؛ Chaves، ۲۰۰۳). از طرفی تولید و انباشتگی AOS پاسخ دفاعی چندگانه ای را فعال می‌کند، از جمله فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) می‌باشد که تبدیل سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن کاتالیز می‌نماید. همچنین شامل کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) که برای از بین بردن $H_2O_2$ تولید شده، عمل می‌نمایند (Horemans، ۲۰۰۰؛ Chaves، ۲۰۰۳؛ Sudhakar و همکاران، ۲۰۰۱).

خشکی باعث افزایش سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در گیاه *Coffea canephora* شد (Pinheiro و همکاران، ۲۰۰٤) . در بین چهار هیبرید گیاهان *Pranus* بین گونه ای بعد از کمبود آب، فعالیت آنزیم APX، گلوتاتیون ردوکتاز(GR) افزایش یافت(Sofo و همکاران، ۲۰۰۵ ) . همچنین افزایش آنزیم‌های APX و CAT طی استرس خشکی در درختان میوه نظیر زردآلو و زیتون گزارش شده است و فعالیت‌های CAT، APX، SOD با توجه به شدت استرس خشکی در برگها و ریشه‌های *Oleo europaea* .L نیز افزایش قابل توجهی داشت (Sofo و همکاران، ۲۰۰٤؛ Scebba و همکاران، ۲۰۰۱ ). عمکرد تنظیمی PPO نقش مهمی در جنبه‌های فیزیولوژیکی گیاهان در معرض کمبود آب بازی می‌کند(Kuwabara و Kateh، ۱۹۹۹). در ریشه گیاه آنیسون فعالیت PPO در خشکی متوسط در نبود Asc نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داده، ولی در خشکی شدید میزان فعالیت آن تا حد شاهد کاهش یافته است (جدول ۲). در *Oleo europaea* .L هم میزان فعالیت PPO در ابتدای تنش افزایش و سپس در تمام بافت‌ها با پیشرفت تنش خشکی کاهش یافت (Sofo و همکاران، ۲۰۰۵ ). استرس خشکی می‌تواند عملکرد آنتی اکسیدانی فنل‌ها را با مهار فعالیت PPO و در نتیجه پایداری منابع ترکیبات فنلی در وضعیت احیا در خشکی شدید بهبود ببخشد، PPO علاوه بر فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت پروتئولیتیکی نیز دارد(Kuwabara و

Kateh، ۱۹۹۹). بنابراین می‌توان از این موضوع استنباط نمود که کاهش فعالیت آنزیمی PPO در خشکی شدید بدلیل شرکت در متابولیسم ترکیبات فنلی و یا حذف پروتئین‌های آسیب دیده باشد. از طرفی فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیم PPO در برگ‌های گیاه آنیسون تحت تنش در نبود Asc همگام با کاهش میزان ظرفیت زراعی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند، بعبارتی در برگها بر خلاف ریشه‌ها هر چه تنش بیشترشد، فعالیت PPO بیشتر نمایان شد(شکل ۵و٦). همچنین فعالیت این آنزیم به نوع و گونه گیاهی بستگی دارد و تعداد ایزوآنزیم‌های پلی فنل اکسیداز در بافت‌های مختلف متفاوت است(Takeuchi و همکاران، ۱۹۹۲). افزایش در فعالیت آنزیم PPO در اندام هوایی تحت تنش شوری در گیاه Aegiceras sp. و در دانه رست‌های لوبیا نیز به اثبات رسیده است(Kumar و همکاران، ۲۰۰٤؛ Demir، ۲۰۰۱). فعالیت PPO با اعمال آسکوربات در برگها و ریشه‌های گیاه آنیسون در تمام سطوح مختلف تنش نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت. ضمنا در مقایسه میانگین‌ها در هر یک از سطوح مشابه نیز در صورت حضور Asc، فعالیت PPO قابل ملاحظه تر از عدم حضور Asc ، بود. می‌توان حدس زد که وجود Asc بعنوان منبع آنتی اکسیدانی غیرآنزیمی و آنزیمی به نجات سیستم آنتی اکسیداتیو این گیاه شتافته است. بطور مثال ممکن است در مسیرهای متابولیکی ثانویه با متابولیسم ترکیبات فنلی و یا در تغییر تابیدگی پروتئین‌های آسیب دیده نقش داشته باشد تا PPO در سایه Asc، فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری داشته باشد.

افزایش فعالیت کاتالاز در گیاهان یک خصوصیت سازشی محسوب می‌شود که با کاهش دادن میزان هیدروژن پراکسید حاصل از متابولیسم سلولی از آسیب رسیدن به بافت جلوگیری می‌کند (Bhargava و Jagtap، ۱۹۹۵). در تنش کوتاه مدت یا تنش متوسط فعالیت کاتالاز در برگ‌های *Poa pratensis* و *Festuca arundinacea* حفظ شد و در تنش خشکی شدید موجب کاهش فعالیت آنزیم گردید(Auge، ۲۰۰۱). نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد که در بود و نبود آسکوربات فعالیت کاتالازی در برگ‌ها و ریشه‌های آنیسون ابتدا نسبت به شاهد در خشکی متوسط افزایش معنی‌دار و سپس در خشکی شدید نسبت به خشکی متوسط کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل۱و۲). طبق نظریه Feierabend و همکاران (۱۹۹۲) نیز فعالیت بالای کاتالاز بعد از افزایش خفیف و متوسط کمبود آب در برگها و ریشه‌ها نسبتا ثابت ماند و در کمبود شدید آب به میزان کمی کاهش یافت که احتمالا بعلت غیر فعال شدن و تخریب کاتالاز در خشکی شدید می‌باشد(Asada، ۱۹۹۹) و یا آنکه ممکن است آنزیم‌های آنتی اکسیدانی دیگری در حذف $H_2O_2$ دخیل باشد. در حالیکه در بافت‌های گیاه آنیسون با بودن آسکوربات میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هر یک از سطوح مشابه نسبت به نبود آن افزایش یافت که این افزایش در برگها و ریشه‌ها تنها در سطح خشکی شدید معنی‌دار نبود(جدول ۱و۲)، ممکن است به این دلیل باشد که حضور آسکوربات بخصوص در خشکی شدید باعث شده است که آنزیم APX گوی رقابت را از آنزیم کاتالاز برباید، چون طبق مطالعه Mehlhorn و همکاران (۱۹۹٦) آنزیم APX بطور اختصاصی از آسکوربات بعنوان دهنده الکترون استفاده می‌نماید و بارها تاکید شده است که آسکوربات درون سلولی بعد از مصرف می‌تواند توسط چرخه گلوتاتیون -آسکوربات مجددا تولید شود (Foyer و همکاران، ۱۹۹۸؛ Smirnoff، ۲۰۰۰؛ Smirnoff، ۱۹۹۳؛ Horemans و همکاران، ۲۰۰۰). بنابراین آسکوربات می‌توانسته نقش بسیار مثبتی در افزایش فعالیت قابل ملاحظه آنزیم APX در سطوح مختلف تنش داشته باشد. از طرفی طبق نظریه Asada (۱۹۹۹) میل ترکیبی به $H_2O_2$ در آنزیم APX نسبت به کاتالاز بیشتر است. در مطاله حاضر نیز میزان فعالیت APX در برگها و ریشه‌ها در حضور و عدم حضور APX در تمام سطوح نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد(شکل ۳و٤) و در گیاه

زیتون، *Prunus sp.* و *Coffea sp.* نیز بر اثر تنش خشکی میزان فعالیت APX افزایش یافته است (Sofo و همکاران، ۲۰۰۵؛ Pinheiro و همکاران، ۲۰۰٤). در گیاه آنیسون در تمام سطوح تنش فعالیت APX در ریشه‌ها نسبت به برگ‌ها بسیار کمتر بود (جدول ۱و۲)، که این امر در گیاهان زیتون نیز صادق بود این مطلب نشان می‌دهد که فعالیت APX، عمدتا مربوط به APX کلروپلاستی بافت‌های برگ باشد و این افزایش در کلروپلاست‌ها با اطمینان بیشتر می‌تواند از برگ‌ها محافظت نماید (Asada، ۱۹۹۹).

بنابراین تحمل به خشکی در این گیاه با فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی همبستگی مستقیمی دارد، اگرچه این امر در سطح بیوشیمیایی در آنزیم‌های مختلف و در بافت‌های مختلف نسبت به هم متفاوت است و این می‌تواند بخاطر بیان افزایشی ایزوآنزیم‌های مختلف در بافت‌ها و گیاهان متفاوت از هم باشد. در گیاه آنیسون آنزیم APX نسبت به دو آنزیم دیگر بیشترین نقش را در بردباری این گیاه برعهده داشته است. از سوی دیگر در طی شرایط کمبود آب در گیاه آنیسون آسکوربات توانست فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را در سطح سلولی به نحو مطلوبی تقویت نماید.

**جدول ۱:** میانگین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز اندام هوایی گیاه آنیسون بر اساس (Absorbance $g^{-1}min^{-1}FW$) در سطوح مختلف تنش خشکی در حضور و عدم حضور آسکوربات.

| عامل مورد بررسی | تیمار | ظرفیت زراعی (٪) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | ٪۱۰۰ | ٪٦۰ | ٪۲۵ |
| کاتالاز | عدم حضور آسکوربات | ۲/۵٦±۰/۰٤۷e | ۵/۷۳±۰/۰۵۲b | ٤/۱۸±۰/۱۱٦c |
| | حضور آسکوربات | ۳/۳۹±۰/۲۰۷d | ٦/۸۹±۰/۱۰۲a | ٤/٤۵±۰/۱۰٦c |
| آسکوربات پراکسیداز | عدم حضور آسکوربات | ٤/۲۰±۰/۰۳۹f | ۷/۰۵±۰/۱d | ۸/۰۹±۰/۱٦۳c |
| | حضور آسکوربات | ۵/۷٤±۰/۰٤۸e | ۸/۹۰±/۰۲٦b | ۹/۹۵±۰/۱٦۱a |
| پلی فنل اکسیداز | عدم حضور آسکوربات | ۱/۸۹±۰/۰٤f | ٤/۳۳±۰/۰۵٤d | ٤/۹۹±۰/۰۵۲c |
| | حضور آسکوربات | ۲/٦٤±۰/۰٦۱e | ۵/۸۱±۰/۰٤۹b | ٦/۸۲±۰/۰٤٤a |

**جدول ۲:** میانگین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز ریشه گیاه آنیسون بر اساس (Absorbance $g^{-1}min^{-1}FW$) در سطوح مختلف تنش خشکی در حضور و عدم حضور آسکوربات.

| عامل مورد بررسی | تیمار | ظرفیت زراعی (٪) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | ٪۱۰۰ | ٪٦۰ | ٪۲۵ |
| کاتالاز | عدم حضور آسکوربات | ۰/۰۵۷±۰/۰۰٦e | ۱/۱۵±۰/۰۲٤b | ۰/۷۵±۰/۰۵۵cd |
| | حضور آسکوربات | ۱/۰۸±۰/۰۰۹bc | ۲/٦۹±۰/۰۸۹a | ۰/۸۳±۰/۰۹۹c |
| آسکوربات پراکسیداز | عدم حضور آسکوربات | ۰/۹۹±۰/۰٤٤f | ۱/۷۵±۰/۰٦۸e | ۲/۷۷±۰/۰٤۳c |
| | حضور آسکوربات | ۲/٤۰±۰/۰۵۵d | ۳/٦۸±۰/۰٤٦b | ٤/۷۷±۰/۱۰٤a |
| پلی فنل اکسیداز | عدم حضور آسکوربات | d۰/۱۳±۰/۰۲۱ | ۰/۸۹±۰/۰۵۵c | ۰/۲۳±۰/۰۱۲d |
| | حضور آسکوربات | ۰/۸۵±۰/۰٤c | ۲/۷٤±۰/۱۱۸a | ۱/۹۹±۰/۰۲۹b |

## نتیجه‌گیری

با بررسی مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که توانایی گیاه آنیسون در تنظیم افزایشی سیستم آنتی اکسیدان آنزیمی بمیزان زیادی با تحمل آن نسبت به خشکی بستگی دارد. این مساله می‌تواند آسیب سلولی ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال را در طی کمبود آب محدود سازد و تیمار با آسکوربات تا حد قابل ملاحظه ای به توان آنتی اکسیدانی این گیاه می‌افزاید.

## منابع


**عسگری، ف.، سفیدکن، ف.، میرزا، م. و مشکی زاده، س. (۱۳۸۲).** مقایسه اسانس *Pimpinella aurea* DC. از دو رویشگاه در استان تهران. فصلنامه پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، ج ۱۹، ش ۳، ص ۲۳۹.

**Aebi, H., Bergmeyer, H.U. (1974)** Catalases: Methods of enzymatic analysis. Academic press. New York 2, 673-684.

**Asada, K., (1999)** The water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annal Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50, 601-639.

**Arrigoni, O., De Tullio, M.C. (2002)** Ascorbic acid much more than just an antioxidant. Biochemia and Biophysics Acta 1569, 1-9.

**Auge, R.M., Moore, J.L. (2002)** stomatal response to non hydraulic root-to-shoot communication to partial soil drying in relation to foliar dehydration tolerance. Environmental and Experimental Botany 42, 217-229.

**Chaves, M.M., Maroco, J.P. and Preira, J.S. (2003)** Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. Funct. Plant Biol. 30, 239-264.

**Debolt, S., Melino, V., and Ford, C.M. (2007)** Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. Annals of Botany 99, 3-8.

**Demir, Y. (2001)** Effects of NaCl and praline on polyphenol oxidase activity in bean seedlings. Biologica Plantarum 44, 607-609.

**Feierabend, J., Schaan, C. and Hertwig, B. (1992)** Photoinactivation of catalase occurs under both high and low temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. Plant Physiology 100, 1554-1561.

**Horemans, N., Foyer, C.H. and Asard, H. (2000)** Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. Trends Plant Sci. 5 (6) 263–267.

**Ingram, J., Bartels, D., (1996)** The molecular basis of the hydration tolerance in plants. Annal Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47, 377-403.

**Jagtap, V., Bhargava, S. (1995)** Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor* L. exposed to high light, low water and high temperature stress. Journal of Plant Physiology 145, 195-197.

**Kosales, I., Pepeljnjak, S. and Kustrak, D. (2005)** Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). Acta Pharm. 55, 377-385.

**Kumar, A., Das, A.B., Sanada, Y. and Mohanty, P. (2004)** Effects of salinity biochemical components of the mangrove, *Aegiceras cornicolatum*. Aquatic Botany 80, 77-87.

**Kuwabara, T., Katoh, Y., (1999)** Involvement of the binuclear cupper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. Plant and Cell physiology 40, 1029-1035.

**Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G. and Foyer, CH., (1996)** Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. FEBS Letters 378, 203-206.

**Nakano, Y., Asada, K. (1981)** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in Spinach chloroplasts. Plant, Cell and Environment 20, 1193-1198.

**Noctor, G., Foyer, C.H. (1998)** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 249-279.

**Paola, M., Santos, A., Cristina Figueiredo, M., Margarida Oliveria, J.G., Barroso, L.G., Pedro, S.G., Deans, A.K.M. and Johannes, J.C.S. (1998)** Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *Pimpinella anisum* L. Phytochemistry 48(3), 455-460.

**Pinheiro, H.A., Da Matta, F.M., Chaves, A.R.M., Fontes, E.P.B. and**

**Loureiro, M.E. (2004)** Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. Plant Science 167, 1307-1314

**Raymond, J., Pakariyanthan, N. And Azanza, J.L. (1993)** Purification and some properties of polyphenol oxidases from Sunflowers seed. Phytochemistry 34, 927-931.

**Scebba, F., Sebastiani, L. and Vitagliano, C. (2001)** activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves. Biol. Plant 44(1), 41-46.

**Smirnoff, N. (1993)** The role of active oxygen in the response to water deficit and desiccation. New Phytol. 125, 27–58.

**Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. And Masia, A. (2004)** effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in Olive tree. Plant Science 166(2), 293-302.

**Sofo, A., Tuzio, A.C., Dichio, B. And Xiloyannis, C. (2005)** Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. Plant Science 169, 403-412.

**Stephens, J. (2003)** Anise – *Pimpinella anisum* L. University of FLORIDA, IFAS Extension.

**Takeuchi, W., Takahashi, H. and kijima, M. (1992)** purification and characterization of the main isozyme of polyphenol oxidase in mung bean (*Vigna mungo*) seedling. Bioscience, Biotechnology and biochemistry 59, 1135-1137.

**Tombesi, A., Proietti, P. and Nottiani, G., (1986)** Effect of water stress on photosynthesis, transpiration, stomatal resistance and carbohydrate level in olive tree. Olea 17, 35-40.

**Triapelli, C.R., De Andrade, C.R., Cassano, A.O., De Souza, F.A., Ambrosio, S.R., Da Costa,, F.B. and De Oliveira, A.M. (2006)** Antispasmodic and relaxant effects of the hydroalcoholic extract of *Pimpinella anisum* L.(Apiaceae) on rat anococcygeus smooth muscle. Journal of Ethnopharmacology 4378

**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, 405-414.

# Effect of drought stress and ascorbic acid on some of antioxidant enzymes in antioxidative defense in *Pimpinella anisum* L.

**Asadi kavan, Zh., Ghorbanli, M., Sateei A.**

Dep. of biology. Islamic Azad University, Gorgan Branch , Gorgan. Iran.

## Abstract

Drought stress is one of the abiotic stresses that induces reactive oxygen species(ROS) formation in plant tissues. ROS signaling promotes complex networks of antioxidant enzymes. Ascorbic acid is an important buffer protects cellular structures against oxidative attack in plants. Effect of drought stress on catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and polyphenol oxidase (PPO) enzyme activities was evaluated in the presence and absence of ascorbate in herbal aromatic plant *Pimpinella anisum* L. with great value of export that exposed to controlled water deficit. This study was done in flower pot condition. Biochemical and physiological properties measured randomly in control groups and treatments (with drought 60% and 25% of field capacity and ascorbate with concentration of 1.4 mM). Results showed that with increasing stress levels in leaves CAT, APX and PPO enzyme activities increased significantly in the presence and absence of ascorbate. Activity of root CAT and APX with and without ascorbate at the level of drought 60% increased significantly and at the level 25% of field capacity decreased to the level of control. However ascorbate treatment increased significantly the root enzymatic activities in whole stress levels.

**Keywords**: drought stress, ascorbate, catalse, ascorbate peroxidase, polyphenol oxidase, *Pimpinella anisum* L.