بررسی میانکنش آسکوربات و نمک بر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان و برخی از پارامترهای رشد در دانه رست سویا (*Glycine max*) رقم DPX

*آتنا دیانسایی، مریم نیاکان، آرین ساطعی

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

چکیده

در استرس‌های مختلف از جمله استرس شوری،اکسیدان‌های قوی نظیر گونه‌های اکسیژن فعال تولید می‌شود که به ساختار غشاء در گیاه آسیب می‌رساند. در بین آنتی اکسیدان ها، آسکوربات دارای نقش حیاتی در سلول‌های زنده بوده و سبب از بین رفتن گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود.در این تحقیق دانه رست‌های سویا رقم DPX تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آسکوربات (۱و۲میلی مول) و نمک (۵۰ میلی‌مول) قرار گرفت واثر آنها بر روی درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نظیر کاتالاز،پلی فنل اکسیداز،آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز ارزیابی شد.نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در فقدان آسکوربات و در حضور نمک میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان افزایش یافته و لیکن با افزودن آسکوربات میزان فعالیت آنها کاهش یافت. همچنین در صد جوانه‌زنی در حضور نمک کاهش، ولیکن در حضور نمک و آسکوربات در صد جوانه‌زنی افزایش معنی داری حاصل کرد.

کلمات کلیدی: آسکوربات، آنزیم‌های آنتی اکسیدان، رشد، سویا، شوری

مقدمه

آسکوربات یکی از آنتی اکسیدان‌های قوی می‌باشد که در اکثر سلول‌های گیاهی واندامک هایی نظیرکلروپلاست و آپوپلاست وجود دارد (Arrigoni and Tulli,2000).

نقش آن در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی باعث شده که آسکوربات به عنوان یک ترکیب مهم در رفع سمیت ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) معرفی شود (Smirnoff et al. 2001).

آسکوربات به طور مستقیم رادیکال‌های سوپر اکسید و هیدروکسیل را حذف کرده و H_2O_2 را با کمک آسکوربات پر اکسیداز به آب احیا می‌کند (Noctor and Foyer, 1998). همچنین آسکوربات باعث تولید مجدد توکوفرول از طریق رادیکال توکوفروکسیل می‌شود و به این ترتیب از غشاء

*e.mail: atena_bio79@yahoo.com

حمایت می‌کند.تحقیقات نشان داده است که این اسید آلی به عنوان یک سوبسترا برای سنتز اسید تارتاریک و اسید اکسالیک به کار گرفته می‌شود (Thomas et al. 1992). علاوه بر این آسکوربات انجام بسیاری از فعالیت‌های غیر آنتی اکسیدانی را نیز بر عهده دارد.به عنوان مثال باعث تنظیم تقسیم سلولی و فرایند چرخه سلولی از فاز G_1 به S می‌گردد (Liso et al. 1998). همچنین گزارش شده است که آسکوربات رشد طولی سلول ها را تنظیم می‌کند (Detullio et al. 1999).

تحقیقات نشان داده است که استرس شوری فرایند پیچیده ای می‌باشد که منجر به تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌گردد.

این گونه‌های اکسیژن فعال سمی بوده و به راحتی متابولیسم طبیعی سلول ها را از طریق خسارت‌های اکسیداتیو به لیپیدها،پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک بر هم می‌زنند (Halliwell and Gutteridge, 1998) عنوان شده است در گیاهان تحت تنش شوری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی که علیه گونه‌های اکسیژن فعال وارد عمل می‌شو ند افزایش معنی داری می‌یابد (Asada, 1997). تحقیقات نشان داده است که گونه‌های بسیاری از گیاهان در شرایط غیر شوربهترین در صد جوانه‌زنی را داشته و جوانه‌زنی آنها با افزایش شوری کاهش قابل ملاحظه ای می‌یابد (Gulzar, 2002). سرعت جوانه‌زنی به شکل خطی با افزایش شوری در برخی گیاهان کاهش می‌یابد (Zia and Khan, 2002).

دراین بین آسکوربات به عنوان یک آنتی اکسیدان به بهبود جوانه‌زنی کمک می‌کند (Khan and Gul, 2005; Derminal and Turkan, 2005). عنوان شده است که فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر کاتالاز،آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز طی تنش شوری افزایش معنی داری می‌یابد و آسکوربات از طریق کاهش ROS سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های نامبرده می‌شود (Benavides et al 2000).

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر غلظت‌های مختلف آسکوربات بر درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی دانه رست سویا رقم DPX تحت تنش شوری می‌باشد.

مواد و روشها

در ابتدا بذر سویا رقم DPX با آب ژاول ۲ درصد به مدت ۲ دقیقه ضد عفونی گشت و سپس در پلیت‌های استریل در ژرمیناتوردر دمای ۲۳ درجه سانتی گراد قرار داده شد.در این آزمایش ۲ غلظت از آسکوربات (۱و۲ میلی مول) و یک غلظت از نمک (۵۰ میلی مول) به همراه آب مقطر به عنوان شاهد جهت تیمار دانه‌های سویا با توجه به نتایج پیش آزمایش در نظر گرفته شد.دانه‌های سویا یک روز در میان با غلظتهای مختلفی از نمک (۵۰ میلی مولار) و آسکوربات(۱و۲ میلی مولار) به میزان ۳ میلی لیتر (۱/۵ میلی لیتر نمک و ۱/۵ میلی لیتر آسکوربات) آبیاری شدند. برای تعیین درصد جوانه‌زنی تا ٤ روز وضعیت جوانه‌زنی دانه ها بررسی و درصد جوانه‌زنی از فرمول PG =100 n/N محاسبه شد.لازم به ذکر است دانه ها یی که طول ریشه چه آنها کمتر از یک سانتی متر بود به عنوان بذرهای جوانه زده در نظر گرفته شدند. از بذرهای ۵ روزه برای تعیین سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز،پلی فنل اکسیداز،آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز استفاده شد. به این ترتیب که از هر پلیت ۱ گرم نمونه انتخاب شد و با ٤ میلی لیتر محلول عصاره گیری شامل ۱/۲ گرم تریس، ۲ گرم اسید آسکوربیک، و ۳/۸ گرم بوراکس، ۲ گرم EDTANa2 و ۵۰ گرم پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ و در حجم ۱۰۰ میلی لیتر همگن گردید. سپس محلول‌های تهیه شده به مدت ٢٤ ساعت در یخچال قرار داده شد. بعد از ٢٤ ساعت هر کدام از محلول‌های تهیه شده دردورg ٤۰۰ به مدت نیم ساعت سانتریفوژ گردید.محلول بالایی که بسیار شفاف بود برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

سپس میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های نامبرده خوانده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب واحد $ODmin^{-1}g^{-1}Fw$ به روش Chance & Maehly (۱۹۹۵) فعالیت پراکسیداز به روش Koroi، (۱۹۸۹)، فعالیت پلی فنل اکسیداز به روش Manoranjan & Dinabandhu (۱۹۷۵) و فعالیت آسکوربات پراکسیداز به روش Arrigoni (۱۹۹۲) و همکاران و واحد $ODmin^{-1}g^{-1}Fw$ مورد سنجش قرارگرفت.

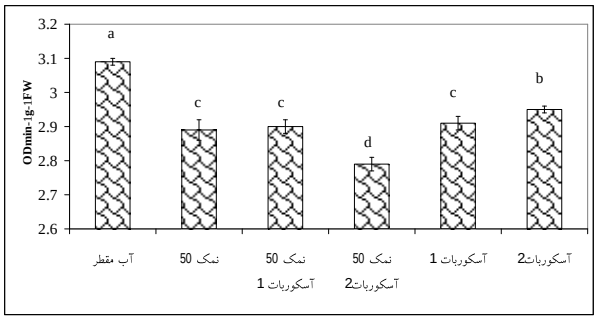
محاسبات آماری

در این آزمایش محاسبات آماری در طرح کاملا تصادفی توسط نرم افزار SAS انجام شد. مقایسه بین تیمارها (برای هر تیمار ٤ تکرار در نظر گرفته شد) و شاهد بر اساس آزمون دانکن در سطح $p<0.05$ بررسی و شکلها نیز با نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج

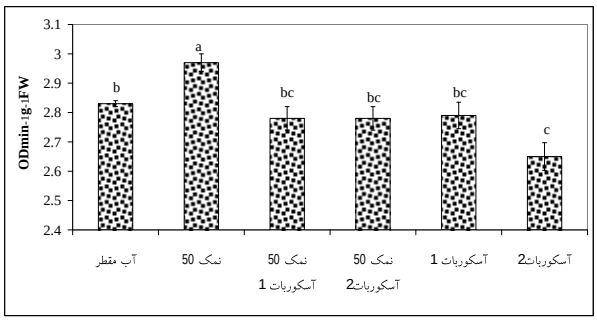
اثر تیمارهای مختلف نمک و آسکوربات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

کاتالاز: نتایج حاصل از این تحقیق با تیمارهای مختلف نمک و آسکوربات نشان داد که در حضور نمک ۵۰mM همچنین غلظت ترکیبی از نمک ۵۰mM و آسکوربات ۱mM میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافته و تفاوت معنی‌داری با غلظت ترکیبی نمک ۵۰mM و آسکوربات ۲mM دارد.کمترین فعالیت آنزیم در نمک ۵۰mM و آسکوربات ۲mM مشاهده شد. بین آسکوربات ۱mM با آسکوربات ۲mM تفاوت معنی‌داری دیده شد (شکل ۱).



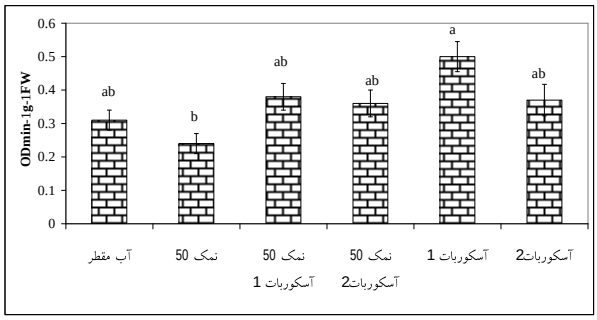
شکل ۱: اثر نمک (۵۰ میلی مول) و آسکوربات (۱و۲ میلی‌مول) بر فعالیت آنزیم کاتالاز در دانه رست سویا رقم DPX

آسکوربات پراکسیداز: در این تحقیق بیشترین فعالیت آنزیم در نمک ۵۰mM مشاهده گردید. فعالیت آنزیم در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM و آسکوربات ۱mM و نمک ۵۰mM و آسکوربات ۲mM تفاوت معنی داری با نمک ۵۰mM نشان داد به طوریکه به میزان قابل توجهی فعالیت آنزیم کاهش یافت.فعالیت آنزیم نامبرده در تیمار ۲ میلی مولار روند نزولی را طی کرد (شکل ۲).



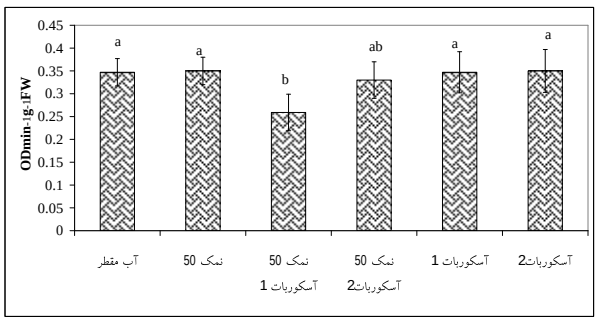
شکل ۲: اثر نمک (۵۰ میلی مول) و آسکوربات (۱و۲ میلی مول) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دانه رست سویا رقم

پراکسیداز: فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور نمک ۵۰mM نسبت به غلظتهای ترکیبی از نمک و آسکوربات کاهش یافت، ولی این کاهش معنی داری نبود (شکل ۳).



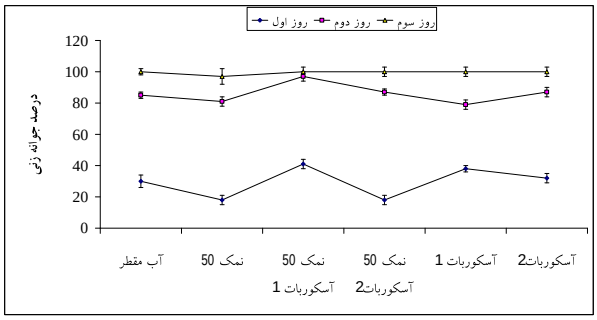
شکل ۳: اثر نمک (۵۰ میلی مول) و آسکوربات (۱و۲ میلی مول) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در دانه رست سویا

پلی فنل اکسیداز: تغییرات میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تیمارهای مختلف نمک و آسکوربات و نیز آب مقطر (شاهد) در شکل ٤ نشان داده شده است.کمترین فعالیت آنزیم در تیمار نمک ۵۰و آسکوربات ۱mM و بیشترین آن در آسکوربات ۲mM مشاهده شد (شکل ٤).



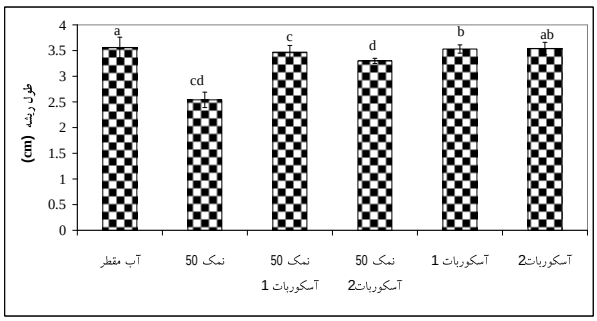
شکل ٤: اثر نمک (۵۰ میلی مول) و آسکوربات (۱و۲ میلی مول) بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در دانه رست سویا

درصد جوانه‌زنی :پس از گذشت ٢٤ ساعت کمترین میزان جوانه‌زنی مربوط به نمک ۵۰mM و آسکوربات ۲mM و بیشترین جوانه‌زنی مربوط به نمک ۵۰mM و آسکوربات ۱mM می‌باشد. در روز دوم هم بیشترین جوانه‌زنی در حضور نمک ۵۰mM و آسکوربات ۱mM و کمترین جوانه‌زنی در حضور آسکوربات ۱mMرخ داد.بین تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. در روز سوم بین تیمارها اختلاف معنی‌دار حاصل نشد و تقریبا همه دانه‌ها به صورت ۱۰۰ درصد جوانه زده بودند (شکل۵).



شکل ۵: اثر نمک (۵۰میلی مول) وآسکوربات(۱و۲میلی مول) بر درصد جوانه‌زنی سویا

طول ریشه چه: در این تحقیق کمترین طول ریشه چه مربوط به نمک ۵۰mM بود.بیشترین طول ریشه چه را تیمار شاهد به خود اختصاص داد.بین تیمارهای ترکیبی نمک ۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱mM و ۲mM) اختلاف معنی داری دیده شد.بین تیمارهای آسکوربات ۱mM و آسکوربات ۲mM تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل ٦).



شکل ٦: اثر نمک (۵۰ میلی مول) و آسکوربات(۱و۲ میلی مول) بر طول ریشه چه سویا

بحث

استرس شوری یک فاکتور مهم محیطی می‌باشد که رشد و تولید گیاه را محدود می‌کند. اثرات زیانبار شوری روی گیاهان یا به صورت مرگ گیاه و یا به صورت کاهش در رشد مشخص شده است (Allakhverdies et al., 2000).

گیاهانی که در معرض استرس شوری قرارمی گیرند دستخوش یک سری تغییرات می‌گردند. توانایی گیاهان در مقاومت به استرس شوری بوسیله چندین مسیر بیوشیمیایی تعیین می‌گردد که از آن جمله می‌توان به حفظ و استفاده از

آب، حمایت از عملکردهای کلروپلاست و حفظ هومئوستازی یونها اشاره کرد (Wilson and Shannon, 1995) تحقیقات نشان داده است که طی استرس شوری گونه‌های فعال اکسیژن تولید گشته که خسارت‌های فراوانی به گیاه وارد می‌کند.گیاه برای اینکه بتواند با استرس شوری مقابله کند سیستم‌های آنتی اکسیدانی مختلفی را به کار می‌گیرد. آسکوربات یکی از آنتی اکسیدان‌های قوی می‌باشد که در اکثر سلول‌های گیاهی و اندام‌هایی نظیرکلروپلاست و آپوپلاست وجود دارد (Arrigoni and Tulli,2000). همانطور که در این تحقیق مشخص شد فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در حضور نمک افزایش و با کمک آسکوربات کاهش یافت.تحقیقات نشان داده است که آسکوربات به طور مستقیم رادیکال‌های سوپر اکسید،هیدروکسیل و اکسیژن فعال را از بین برده و پراکسید هیدروژن را از طریق فعل وانفعال با آسکوربات پراکسیداز به آب احیا می‌کند (Noctor and Foyer, 1998). مشخص شده است که آسکوربات با از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن، مقاومت گیاه را به شوری افزایش می‌دهد و باعث تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌گردد (Smirnoff, 2000).

همچنین در این تحقیق بیشترین درصد جوانه‌زنی در تیمار شاهد و تیمار نمک ۵۰ میلی مولار با آسکوربات ۱ میلی مولار و کمترین در صد جوانه‌زنی در تیمار نمک ۵۰ میلی مولار مشاهده شد. تحقیقات نشان داده است که جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی به شکل خطی با افزایش شوری کاهش می‌یابد و بیشترین جوانه‌زنی در شرایط کنترل یعنی بدون شوری می‌باشد (Zia and Khan, 2002).

مشخص شده است که گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده در طی استرس شوری می‌تواند از جوانه‌زنی دانه رست ها جلوگیری کند.در این میان استفاده از آسکوربات به بهبود جوانه‌زنی کمک می‌کند که این کا ر را از طریق از بین بردن رادیکال‌های سوپر اکسید و یا اکسیژن فعال انجام می‌دهد (Amor et al. 2005). بنابر این تحت شرایط استرس نظیر استرس شوری سیستم‌های آنتی اکسیدان کارایی لازم را نداشته و منجر به شکست در جوانه‌زنی و حتی مرگ دانه رست می‌گردد. افزایش آسکوربات به شکل اگزوژن در بهبود مقاومت به شوری در سطح جوانه‌زنی مفید و موثر می‌باشد (Ogawa and Iwabuchi, 2001).

آسکوربات باعث تولید مجدد توکوفرول از طریق رادیکال توکوفروکسیل می‌شود و به این ترتیب از غشاء حمایت کرده و این امر موجب بهبود جوانه‌زنی می‌شود (Thomas et al. 1992). دیده شده است که جوانه‌زنی با جذب آب توسط دانه خشک آغاز می‌شود که در نهایت منجر به توسعه جنین می‌گردد. این مسئله به خصوص به هنگام تخریب لایه‌های پوششی و ظهور ریشه چه به حداکثر میزان خود می‌رسد (Manz et al. 2005).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن آسکوربات به شکل اگزوژن سمیت ناشی از نمک کلرید سدیم را بر جوانه‌زنی و رشد را کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد یکی از علل بهبود رشد در حضور آسکوربات تحت شرایط تنش شوری،کاهش گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد زیرا با افزایش جوانه‌زنی و رشد از فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاسته می‌شود که این مطلب خود گویای کاهش سوبسترای آنزیم‌های فوق در حضور آسکوربات است.

منابع

لطیفی، ن. و قاسمی، م. (۱۳۷۷). دانه‌ها و مصارف آنها. انتشارات دانشگاه علوم و کشاورزی منابع طبیعی گرگان.

Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata,N. (2000b). Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivationof photosystems I and II *in Synechococcus sp*. Plant Physiol. 123, 1047–1056

Amor, N.B., Hamed, K.B.,Debez, A., Grignon, C., Abdelly, C., (2005). Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. Plant Science 168, 889–899

Arrigoni,O.(1994). Ascorbate system in plant development.J. Bioenergy.Biomember,26,407-419.

Arrigoni, **O., De Tullio MC. (2000)**. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology* 157, 481–488

Asada, K., (1997). The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H2O2 scavenging in plants. In: Scandalios, J.G. (Ed.), Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defense, Monograph Series, vol. 34. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 715–735

Benavides, M.P., Marconi, P.L., Gallego, S.M., Comba, M.E.,Tomaro, M.L., (2000). Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. Aust. J. Plant Physiol. 27, 273–278

Chance ,B., and Maehly, C. (1995). Assay ctalase and peroxidase methods enzymol. 11,764-775

Demiral, T., Turkan, I., (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environmental and Experimental Botany 53, 247–257

De Tullio ,**MC., Paciolla, C., Dalla Vecchia,F., Rascio., N, D'Emerico, S., De Gara, L., Liso, R., Arrigoni, O. (1999).** Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* 209, 424–434

Gulzar, S.(2002). Effect of salinity on germination, dormancy, growth, and osmoregulation of perennial halophytes. Ph.D. dissertation, University of Karachi, Karachi, Pakistan

Halliwell , B., Gutteridge, JMC. (1998). iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection.Trends Biochemical Science 11,375

Khan, M.A., Gul, B., (2005). Halophyte seed germination. In: Khan, M.A., Weber, D.J. (Eds.), Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants. Springer, Netherlands, pp. 11–30

Koroi,S. A.(1989). Gel elektrophers tische and spectralphotometris choe unter unchngen zomein fiuss der temperature auf straktur and aktritat der amylase and peroxidase isoenzyme ,physiol veg 20,15-23

Liso, R., Innocenti, AM, Bitonti, MB., Arrigoni, O. (1998). Ascorbic acid-induced progression of quiescent centre cells from G1 to S phase. *New Phytologist* 110, 469–471

Manoranjan Kar and Dina Bandhu Mishra. (1976). Catalase ,peroxidase and poly phenol oxidase activites during rice leaf senescence.Plant Biochemistry and Enzymology ,57,pp.315-319

Manz, B., Mu¨ ller, K., Kucera, B., Volke, F. and Leubner-Metzger, G. (2005). Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. Plant Physiology138, 1538–1551

Noctor, **G., and Foyer, CH. (1998)**. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 249–279 **دیانسایی و همکاران**

Ogawa, K., Iwabuchi, M., (2001). A mechanism of promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. Plant, Cell and Physiology 2, 286–291.

Smirnoff ,**N., Conklin ,PL., Loewus ,FA. (2001)**. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 437–467

Smirnoff N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3,229–235

Thomas, CE., McLean, LR., Parker, RA., Ohlweiler, DF. (1992). Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids* 27, 543–550

Wilson, C., and Shannon ,MC. (1995). Salt-induced Na^+/H^+ antiport in root plasma membrane of a glycophytic species of tomato. Plant Science 107**,** 147–157

Study of ascorbate and NaCl interaction on germination, growth and enzymes antioxidant activity in Soybean (*Glycine max* L. cv DPX) seedling

Diansaii, A., Niakan, M., Sateei, A.

Department of biology, Islamic Azad university–Gorgan Branches Iran.

Abstract

In different stress such as salinity, strong oxidant as Reactive Oxygen Species is produced that damages to membrane structure in plant. Different antioxidant as ascorbate scavenger them. In this research Soybean (*Glycine max* L. cv DPX) in different concentrations of ascorbate (1,2mM) and NaCl (50mM) and the effect of them on germination percentage, radicle length and antioxidant enzymes such as catalase, peroxidase, polyphenol oxidase and ascorbate peroxidase was evaluated. The results of this research showed that in absence of ascorbate and present of NaCl activity of enzymes increased but with increasing of ascorbate, activity of them decreased. Also in present of NaCl germination decreased but in NaCl and ascorbate germination increased significantly.

Keyword: Ascorbate, Antioxidant, Enzyme, Growth, Salt, Soybean