Journal of Plant Environmental Physiology
ISSN: 7671-2423 (Print), 2783-4689 (Online) http://ecophysiologi.gorganiau.ac.ir

Doi: 10.30495/iper.2021.679565
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.66.3.8

Islamic Azad University
Gorgan Branch

Effect of foliar application of ascorbic acid on antioxidant enzyme activities of mung bean (*Vigna radiate* L.) cultivars under water-deficit Stress

Mohammad Jahanbakhshi[1], Mehdi Sadeghi[2*], Mahmood Tohidi[3], Farbod Fotouhi[4], Seyed Ali Fazel zadeh[5]

[1] Department of Agronomy, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran, Email: me.sadeghi@iau.ac.ir
[2]Department of Agronomy, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran, Email: me_sadeghi2001@yahoo.com
[3]Department of Agronomy, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran, Email: tohidi2020@yahoo.com
[4]Department of Agronomy, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran, Email: fotoohi.f@yahoo.com
[5]Department of Agronomy, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran, Email: fazelzadeh.s.a@yahoo.com

Serial 66, 17th year, Number 2, Summer 2022 (126-140)

Article type:
Research Full Paper

Article history
Received: 2020/10/31
Revised:2021/01/02
Accepted: 2021/01/12

Keywords
Ascorbic Acid
Ascorbate Peroxidase
Antioxidant System
Catalase
Glutathione Peroxidase
Foliar Application
Water Deficit Stress

Abstract

In order to investigate the effect of foliar application of ascorbic acid on the activity of antioxidant enzymes in mung bean (*Vigna radiate* L.) under water-deficit stress, a field trial was performed in a split-plot design arranged in completely randomized block design with three replications in the Education and Research Center of Natural Resources Safiabad, Dezful during the two cultivation years (2017 and 2018). Four levels of water-deficit stress treatments were considered in the main plots (25, 50, 75, and 100% of plant water requirement) and combined treatment of foliar application of ascorbic acid in three levels (control, 10, and 20 mM) and genotype including Omidbakhsh VC6173 and Partow cultivars as subplots. The results of mean comparison showed that the highest levels of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase were observed in water-deficit stress of 25% water requirement and no foliar application of ascorbic acid. The highest activity of catalase enzyme was observed under water-deficit stress of 50% water requirement and no foliar application of ascorbic acid. Also, the highest activity of guaiacol peroxidase enzyme was observed in Omidbakhsh VC6173 cultivar under water-deficit stress of 25% water requirement and no foliar application of ascorbic acid. The highest glutathione peroxidase activity was observed in VC6173 cultivar under water-deficit stress of 75% water requirement and 10 mM foliar application of ascorbic acid. Results showed that dehydration stress significantly increased the activity of antioxidant enzymes while foliar application of ascorbic acid due to its antioxidant properties reduced the effects of stress and thus reducing the activity of antioxidant enzymes.

Please cite this article as Jahanbakhshi, M., Sadeghi, M., Tohidi, M., Farbod Fotouhi, Seyed Ali Fazel zadeh. 2022. Effect of foliar application of Ascorbic Acid on Changes of Antioxidant Enzymes of Mung bean (*Vigna radiate* L.) Cultivars in Water-Deficit Stress. 65(2): 126-140.

© 2022. All Rights Reserved

نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا: (چاپی) ۲۴۲۳-۷۶۷۱ (آنلاین) ۲۷۸۳-۴۶۸۹، http://ecophysiologi.gorganiau.ac.ir
Doi: 10.30495/iper.2021.679565
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.66.3.8
دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

بررسی تاثیر محلول پاشی اسید آسکوربیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان ارقام ماش (*Vigna radiate* L.) در شرایط تنش کم آبی

محمد جهانبخشی[۱]، مهدی صادقی[۲]*، محمود توحیدی[۳]، فربد فتوحی[٤]، سیدعلی فاضل‌زاده[٥]

[۱]گروه زراعت، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران، رایانامه: me.sadeghi@iau.ac.ir
[۲]گروه زراعت، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران، me_sadeghi2001@yahoo.com
[۳]گروه زراعت، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران، tohidi2020@yahoo.com
[٤]گروه زراعت، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران، fotoohi.f@yahoo.com
[٥]گروه زراعت، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران، fazelzadeh.s.a@yahoo.com

سال هفدهم، شماره ۶۶، تابستان ۱۴۰۱ / صفحات: ۱۴۰-۱۲۶

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۰
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۱۰/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۳

واژه‌های کلیدی:
آسکوربیک اسید
آسکوربات پراکسیداز
تنش کم آبی
سیستم آنتی اکسیدان
کاتالاز
گلوتاتیون پراکسیداز
محلول پاشی

چکیده

به‌منظور بررسی اثر محلول‌پاشی آسکوربیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ژنوتیپ‌های ماش (*Vigna Radiate* L.) در شرایط تنش کم‌آبی، آزمایشی مزرعه‌ای به‌صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار طی دو سال زراعی ۱۳۹٦ و ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد دزفول به اجرا در آمد. تیمارهای تنش کم‌آبی در کرت‌های اصلی شامل چهار سطح (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد تأمین نیاز آبی گیاه) و تلفیق تیمار محلول‌پاشی آسکوربیک اسید شامل ۳ سطح (شاهد، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) و ژنوتیپ‌های امیدبخش CV 6173 و پرتو در کرت‌های فرعی بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در تنش کم آبی ۲۵ درصد نیاز آبی و عدم محلول‌پاشی بود. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش کم آبی ۵۰ درصد نیاز آبی و تیمار عدم محلول‌پاشی آسکوربیک اسید مشاهده شد. همچنین بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در رقم امید بخش VC6173 تحت تنش کم آبی ۲۵ درصد نیاز آبی و عدم محلول‌پاشی آسکوربیک اسید بدست آمد بیشترین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز به رقم امیدبخش VC6173 تحت تنش کم آبی ۷۵ درصد نیاز آبی و محلول‌پاشی ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک تعلق داشت.به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که تنش کم آبی منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان شد و محلول پاشی آسکوربیک‌اسید به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود منجر به کاهش اثرات تنش و در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گشت.

استناد: جهانبخشی، م.، صادقی، م.، توحیدی، م.، فتوحی، ف.، فاضل‌زاده، س.ع. (۱٤۰۱). بررسی تاثیر محلول پاشی اسید آسکوربیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان ارقام ماش (*Vigna radiate* L.) در شرایط تنش کم آبی. *نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ٦۵ (۲)، ۱٤۰-۱۲٦.

مقدمه

لگوم‌ها منبع حیاتی برای تامین نیازهای غذایی روزنه بشر می‌باشند. گیاهان نقش چشمگیری در رژیم غذایی اکثر کشورهای آسیایی و منطقه خاور میانه ایفا می‌نماید و لگوم‌ها حدود ۲۲ درصد نیاز پروتئینی آنها را تامین می‌نماید (Singh et al., 2018). ماش (*Vigna radiate* L.) گیاهی دیپلوئید (2n=22)، خود گشن، سریع‌الرشد و از خانواده فاباسه (*Fabaceae*) می‌باشد که به‌دلیل رشد کوتاه به‌عنوان کشت جایگزین و کشت مخلوط بسیار مناسب می‌باشد (Bangar et al., 2019). ماش یکی از حبوباتی است که در کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان کشت و کار می شود ودر این مناطق خشکسالی از تنش‌های رایج در این مناطق می‌باشد که احتمال دارد هر گیاهی در دوره‌ای از رشد و نمو خود با آن روبه رو گردد (Bharadwaj et al., 2018).

در میان تنش‌های محیطی، بدون شک تنش خشکی یکی از مخرب ترین تنش‌هایی است که منجر به اختلال در شرایط فیزیولوژیکی، ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی در بافت‌های گیاهی می‌گردد و در نهایت منجر به کاهش کیفیت و کمیت محصول و نقصان عملکرد می گردد (Basu et al., 2016). معضل خشکسالی به دلیل پراکنش نامناسب بارندگی، محدودیت منابع آب و سایر تغییرات محیطی در سراسر جهان در حال گسترش است (Fahad et al., 2017). محققان گزارش کردند که یکی از پارامترهای ومورفوفیزیولوژیک و شیمیایی برای ارزیابی تحمل به تنش خشکی در گیاهان بررسی فعالیت آنزیمی سیستم آنتی اکسیدان می‌باشد (Alderfasi et al., 2017; Swathi et al., 2017). برخی محققین گزارش کردند که هورمون‌های گیاهی نقش مهمی در تنظیم تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) و سنتز پرولین ایفا می کنند (Samota et al. 2017). تحقیقات نشان داده است گیاهان برای سرکوب آثار مخرب رادیکال‌های اکسیژن آنتی‌اکسیدان‌هایی شامل ترکیبات آنزیمی و غیر آنزیمی، فنولی و چندین هورمون گیاهی تولید می‌نمایند که غلظت رادیکال‌های اکسیژن را در حد بهینه نگه دارند (Singh et al., 2016). یکی از روش‌هایی که اخیراً برای کاهش اثرات تنش در گیاهان مورد توجه قرار گرفته است استفاده از ترکیباتی است که نقش آنتی اکسیدانی در گیاه ایفا می‌نمایند. برخی محققین گزارش کردند که فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در دوران بلوغ گیاه ماش افزایش پیدا می‌کند که بطور عمده ناشی از بیوسنتز آسیکوربیک اسید و تجمع فنول‌ها می‌باشد (Lu et al., 2019).

آسکوربیک اسید یک آنتی اکسیدان طبیعی و اصلی در گیاهان می‌باشد که نقش مهمی در کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده تحت تاثیر تنش‌های غیرزیستی دارد (Venkatesh & Park, 2014). گزارش شده است که تحت تنش کمبود آب سطوح آسکوبیک اسید در اندام هوایی ارقام متحمل گندم و در ریشه ارقام حساس به تنش کم آبی میزان آسکوربیک اسید کاهش می یابد (Singh & Bhardwaj, 2016). محققین نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه ماش تیمار شده با آسکوربیک اسید تحت تنش‌های کم آبی متوسط و شدید تفاوت معنی داری با شاهد داشتند (El-Beltagi et al., 2020).

با توجه به اینکه کشور ایران در منطقه جغرافیایی خشک و نیمه خشک واقع شده و همچنین کمبود آب بویژه در سال‌های اخیر علی الخصوص در استان خوزستان سبب شده تا گیاهان زراعی در مراحل مختلف رشد خود در معرض تنش خشکی قرار گیرند. از سوی دیگر با توجه به نقش اسید آسکوربیک در جهت کاهش خسارات ناشی از

تنش‌های اکسیداتیو القاء شده بر اثر کم آبی، هدف این تحقیق بررسی اثر محلول پاشی غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت ژنوتیپ‌های ماش تحت شرایط کم آبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به منظور مطالعه اثر محلول پاشی اسید آسکوربیک بر تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدان ژنوتیپ‌های ماش در شرایط تنش کم آبی در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد دزفول واقع در شمال خوزستان، آزمایشی طی دو سال زراعی ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ اجرا شد. با توجه به اهمیت و شرایط اجرای تحقیق جهت تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، از خاک مزرعه نمونه‌گیری به عمل آمده و مورد تجزیه قرار گرفت که نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر

هدایت الکتریکی $ds.m^{-1}$	اسیدیته کل اشباع pH	نیتروژن قابل جذب mg/Kg	فسفر قابل جذب mg/Kg	پتاسیم قابل جذب mg/Kg	درصد رس	درصد سیلت	درصد شن
۰/۹۹	۷/۱	٤۱	٦/۹	۱۰۸	۳٤	۳۵	۳۱

آزمایش به صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای مورد بررسی عامل تنش کم آبی در ٤ سطح (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد تامین نیاز آبی گیاه) (Aydinsakir et al., 2013) به‌عنوان پلات اصلی و تلفیق ۳ سطح محلول پاشی اسید آسکوربیک (شاهد، ۱۰ و ۲۰ میلی مولار) (Dolatabadian et al., 2008) و ۲ ژنوتیپ امید بخش VC 6173 و پرتو به عنوان پلات‌های فرعی اجرا شد. بعد از کاشت ضمن یادداشت مرحله سبز شدن آزمایش اعمال تیمارهای محلول پاشی در مرحله رویشی قبل از ظهور گل دهی، دو بار به فاصله ده روز صورت گرفت. آبیاری به صورت نشتی انجام پذیرفت. عملیات برداشت نهایی پس از رسیدگی فیزیولوژیک انجام شد.

برای محاسبه مقدار آب موردنیاز گیاه، تبخیر و تعرق گیاه مرجع با استفاده از داده‌های روزانه هواشناسی برگرفته از ایستگاه سینوپتیک مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد دزفول و بر اساس روش تشتک تبخیر محاسبه و با اعمال ضریب گیاهی بر مبنای نشریه ٥٦ فائو تبخیر و تعرق پتانسیل تعیین شد.

در این روش برای تعیین حجم آب مورد نیاز در هر آبیاری ابتدا تبخیر و تعرق پتانسیل با توجه به میزان تبخیر از تشتک و ظریب اصلاح آن تعیین گردید (رابطه شماره ۱).

$$ET0 = KP \times EP \quad \text{(رابطه ۱)}$$

سپس تبخیر و تعرق پتانسیل در ضریب گیاهی لوبیا چشم بلبلی در آن دوره مد نظر ضرب تا تبخیر و تعرق در آن دوره خاص به دست آید (رابطه شماره ۲).

$$ETC = KC \times ET0 \quad \text{(رابطه ۲)}$$

در روابط فوق K_P ضریب تشت تبخیر است که مقدار آن با توجه به موقعیت تشتک تبخیر به لحاظ وضعیت پوشش سبز، سرعت باد، رطوبت نسبی بین ۰/۷۵ تا ۰/۸ انتخاب شد. همچنین K_C ضریب گیاهی است که در مرحله اولیه رشد، مرحله رشد و توسعه، مرحله میانی و مرحله نهایی رشد با استفاده از روش

پنمن و مانتیث فائو ۵۶[1] (Allen et al.,1998) محاسبه شد. پس از محاسبه نیاز آبی، مقدار آب مورد نیاز آبیاری بر اساس دور آبیاری دو تا چهارروزه و با اعمال راندمان آبیاری ۹۰ تا ۹۵ درصد، برای هر تیمار محاسبه و با نصب کنتور در مسیر هر تیمار و تکرار در اختیار گیاه قرار گرفت.

استخراج عصاره: به‌منظور استخراج عصاره سلولی جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم‌ها از برگ‌های جوان و کاملا توسعه یافته گیاه استفاده شد. مقداری از این بافت‌ها را درهاون چینی ریخته و نیتروژن مایع به آن اضافه کرده و به‌خوبی کوبیده و خرد شد. نیم گرم از نمونه خرد شده را وزن کرده و بلافاصله به میکروتیوپ‌های ۲ سی‌سی دارای برچسب با ذکر مشخصات منتقل شد. با توجه به نوع آنزیم‌های موردمطالعه دو نوع بافر استخراج آنزیمی تهیه شد. ۱۰۰۰ میکرولیتر (۱ میلی‌لیتر) از بافر موردنظر را به عصاره تهیه‌شده در داخل میکروتیوپ اضافه شد و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با دور RPM ۱٤۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی با دقت برداشته شد و به میکروتیوپ دیگری منتقل شد و به مدت ۵ دقیقه به طریق قبل مجدداً سانتریفیوژ شد. محلول رویی را برداشته و به‌طور دقیق با ذکر مشخصات به میکروتیوپ‌های دیگری منتقل و در فریز ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام ادامه مراحل، ذخیره شد. لازم به ذکر است تمام مراحل استخراج روی یخ انجام شد (Chang And Kao, 1988).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز[2]: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز یک میلی‌لیتر محلول واکنشی شامل بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ و آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده تهیه شد. محلول واکنش در کووت ریخته و قبل از اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید ۱۵ میلی‌مولار به آن افزوده شد. سپس میزان جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه در ۲۵ درجه سلسیوس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر[3] قرائت شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه بیان شد (Chance and Maehly, 1995).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز[4]: جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز یک میلی لیتر محلول واکنشی شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات منوسدیک ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد، ۳ میکرولیتر محلول گایاکول ۲۰۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. محلول واکنش در کووت ریخته شد و میزان جذب طول موج ٤۷۰ نانومتر به مدت سه دقیقه و در فاصله‌های زمانی بیست‌ثانیه‌ای با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب‌اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. میزان جذب با افزایش زمان روند افزایشی داشت. میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر پایه میزان جذب ترکیب نارنجی‌رنگ تتراگایاکول در میلی‌گرم غلظت پروتئین محاسبه شد (Chance and Maehly, 1995).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز[5]: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز یک میلی‌لیتر محلول واکنش شامل بافر فسفات ۲۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته خنثی، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن ۱/۲ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکورلیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. سپس محلول واکنش در کووت ریخته شد و میزان جذب طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت سه دقیقه با

1.Penman Mantienth FAO 56 (PFM 56).
1. Catalase (Cat).

3. Pharmacia, LKB, Novaspec II.
4. Guaiacol Peroxidase (Gpx).
5. Ascorbate Peroxidase (Apx).

استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت آسکوربات پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی ۲/۸ Mm^{-1}/cm^{-1} تعیین گردید (Nakano & Asada, 1981).

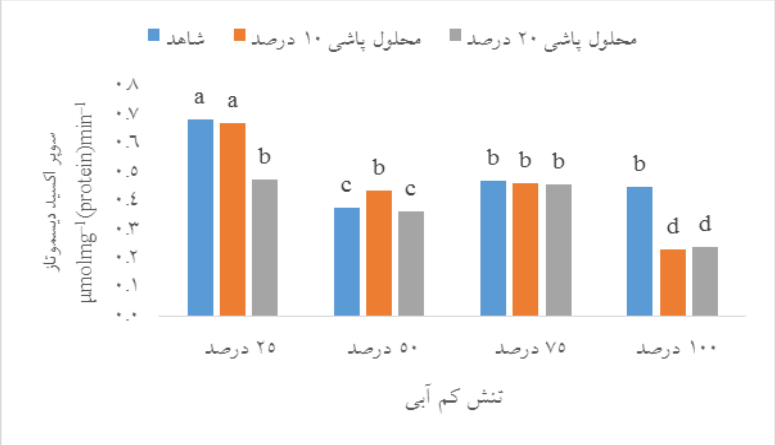
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یک میلی‌لیتر محلول واکنش شامل ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، NBT ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۰/۲۱ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. کووت‌های حاوی محلول واکنش به مدت ۱۵ دقیقه درحالی‌که به‌آرامی تکان داده شدند در معرض نور فلورسانس (۲ عدد لامپ ۲۰ وات فلورسانس) قرار گرفتند و سپس جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. هر واحد SOD عبارت است از مقداری از آنزیم که برای ۵۰ درصد مهار احیای فوتوشیمیایی NBT تحت شرایط سنجش موردنیاز می‌باشد (Giannopolitis and Rie, 1977).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز: جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم یک میلی لیتر محلول واکنش حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH= 7)؛ پیاکول ۲۵ میلی مولار، H_2O_2 ۱۰ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم تهیه شد. فعالیت این آنزیم با افزایش جذب در ۴۷۰ نانومتر به مدت ۷۰ ثانیه قرائت شد (Nickel and Cunningham, 1969).

تجزیه وتحلیل داده‌ها در قالب طرح اسپلیت فاکتوریل بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی از طریق تجزیه و واریانس و مقایسه میانگین انجام گرفت. مقایسه میانگین اثرات ساده تیمارها بر اساس آزمون LSD و اثرات متقابل تیمارها بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن صورت گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.2 استفاده شد.

نتایج

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: نتایج تجزیه واریانس مرکب داده‌ها نشان داد که تیمار تنش کم آبی و محلول‌پاشی آسکوربیک اسید و نیز اثر متقابل این دو تیمار بر فعالیت میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز داشت ($P\leq$۰/۰۱) (جدول ۱). تحت اثر متقابل تیمارهای تنش کم آبی و محلول‌پاشی آسکوربیک اسید بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تنش کم آبی ۲۵ درصد نیاز آبی و عدم محلول‌پاشی (۰/۶۸) مشاهده شد که البته با میزان فعالیت این آنزیم تحت محلول‌پاشی ۱۰ میلی مولار آسکوربیک اسید در همین سطح تنش کم آبی (۰/۶۷) تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۱).



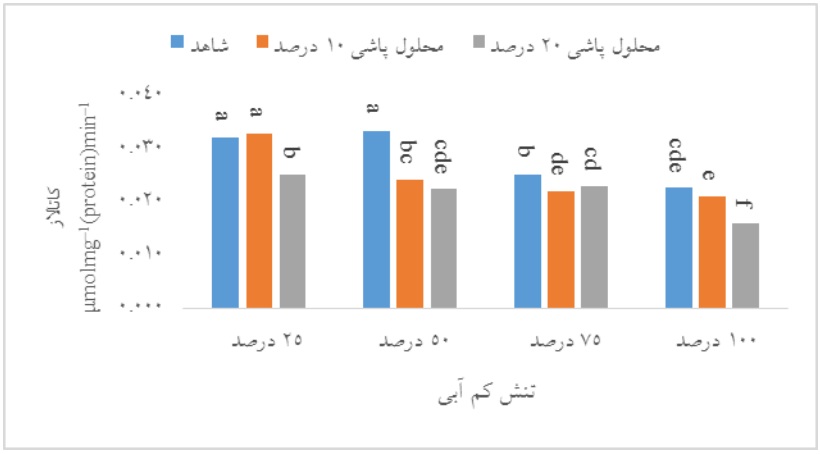
شکل ۱: مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای تنش کم آبی و محلول پاشی آسکوربیک اسید بر روی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس مقایسه میانگین LSD اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

جدول ۱: تجزیه واریانس مرکب آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ژنوتیپ‌های ماش تحت تأثیر سال، تنش کم آبی و محلول‌پاشی آسکوربیک اسید

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)				
		سوپر اکسید دیسموتاز	کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	گلوتاتیون پراکسیداز
سال	۱	۰/۰۱۷^{ns}	۰/۰۰۰۰۹*	۰/۰۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۱^{ns}
بلوک	۲	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۰۹**	۰/۰۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۰۲**	۰/۰۰۰۰۰٤^{ns}
سال*بلوک	۲	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۱^{ns}
تنش کم آبی	۳	۰/۵۹٤**	۰/۰۰۰٦^{ns}	۰/۰۰٤**	۰/۰۰۰۸**	۰/۰۰٤**
تنش کم آبی*سال	۳	۰/۰۲۱**	۰/۰۰۰۰۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۳^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۲^{ns}
تنش کم آبی*سال*بلوک	۱۲	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۰۵^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۷^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۷**	۰/۰۰۰۰۰۵^{ns}
آسکوربیک اسید	۲	۰/۱۵۲**	۰/۰۰۵**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۲**
سال* آسکوربیک اسید	۲	۰/۰۰۹^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰۰۷^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۰۰۰٤^{ns}
تنش کم آبی* آسکوربیک اسید	٦	۰/۰۷۲**	۰/۰۰۰۰۹**	۰/۰۰۰۰۰۷**	۰/۰۰۰۰۳**	۰/۰۰٦**
تنش کم آبی* آسکوربیک اسید *سال	٦	۰/۰۰۹^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰۸^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۰۰٤^{ns}
خطا	۳۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۰۰۸	۰/۰۰۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۰٤	۰/۰۰۰۰۰۷
ژنوتیپ	۱	۰/۰۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۰۰۰٦ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۰٤**	۰/۰۰۰۰۳^{ns}
ژنوتیپ*سال	۱	۰/۰۰۰۰۰۰۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰۱^{ns}
تنش کم آبی*ژنوتیپ	۳	۰/۰۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۸^{ns}	۰/۰۰۰۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۰٤**
تنش کم آبی*ژنوتیپ*سال	۳	۰/۰۰۰۰۰۳^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰۵ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۸^{ns}
آسکوربیک اسید *ژنوتیپ	۲	۰/۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۳^{ns}	۰/۰۰۰۲**
آسکوربیک اسید *ژنوتیپ*سال	۲	۰/۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰٤ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰٤^{ns}	۰/۰۰۰۰۰٦^{ns}
تنش کم آبی* آسکوربیک اسید *ژنوتیپ	٦	۰/۰۰۳۷^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۷ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۲**	۰/۰۰۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۱**
تنش کم آبی* آسکوربیک اسید *ژنوتیپ*سال	٦	۰/۰۰۳۹^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۰۹ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۳^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۸^{ns}
خطای کل	٤۸	۰/۰۰٦	۰/۰۰۰۰۰٤	۰/۰۰۰۰۰٦	۰/۰۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۱
CV	-	۱۸/٤۱	۸/۸۱	۸/۹۳	٦/۹۷	۱٦/۱۳

^{ns}، * و ** به ترتیب به مفهوم غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

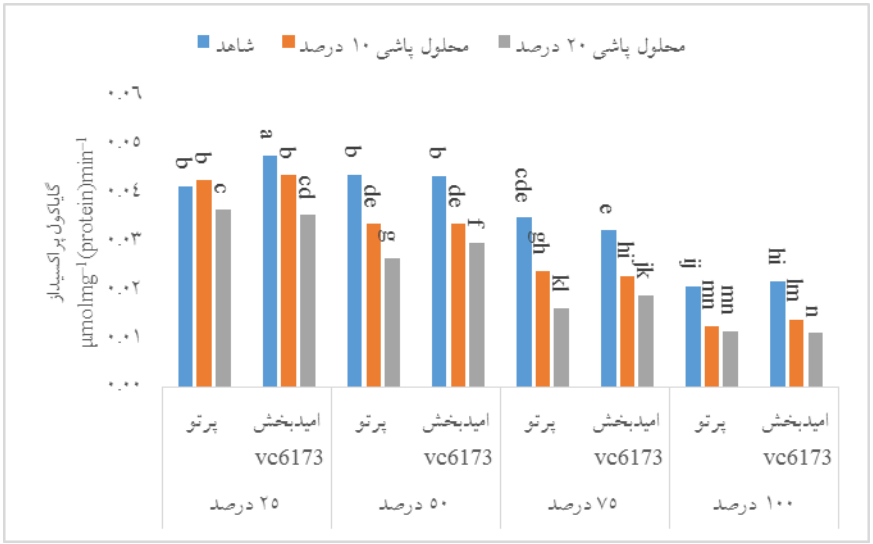
فعالیت آنزیم کاتالاز: نتایج تجزیه واریانس داده نشان داد که اثر سال ($P\leq$۰/۰۵)، محلول پاشی آسکوربیک اسید ($P\leq$۰/۰۱) و اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی آسکوربیک اسید ($P\leq$۰/۰۱) روی فعالیت آنزیم کاتالاز معنی‌دار بود (جدول ۱). تحت اثر متقابل تنش کم آبی و آسکوربیک اسید نیز بیشترین فعالیت این آنزیم کاتالاز تحت تنش کم آبی ۵۰ درصد نیاز آبی و تیمار عدم محلول‌پاشی آسکوربیک اسید (شاهد) مشاهده شد که البته با میزان فعالیت این آنزیم تحت تیمار تنش کم آبی ۲۵ درصد نیاز آبی با عدم محلول‌پاشی آسکوربیک اسید و محلول‌پاشی آسکوربیک اسید ۱۰ میلی مولار تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای تنش کم آبی و محلول پاشی آسکوربیک اسید بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز

(میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس مقایسه میانگین LSD اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

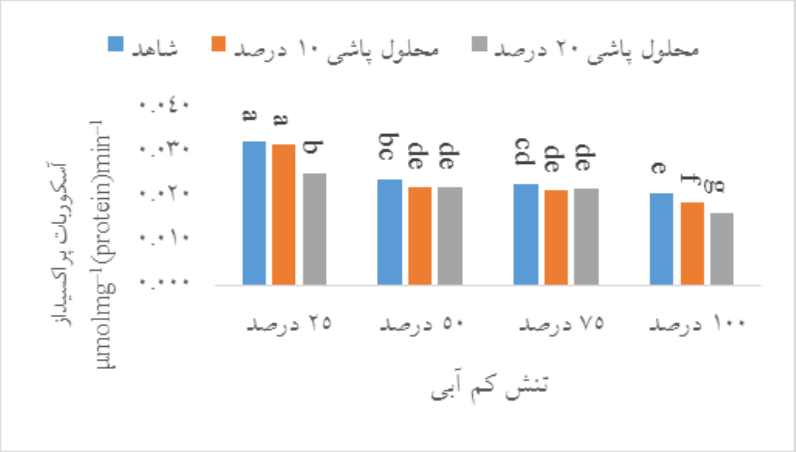
فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز تحت اثر تنش کم آبی (P≤۰/۰۱)، محلول پاشی آسکوربیک اسید (P≤۰/۰۱)، اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی آسکوربیک اسید (P≤۰/۰۱) و همچنین اثر متقابل تنش کم آبی، محلول‌پاشی آسکوربیک اسید و ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۱). بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تأثیر تنش کم آبی ۲۵ درصد نیاز آبی و عدم محلول‌پاشی در رقم امید بخش VC6173 مشاهده شد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین با توجه به نتایج کمترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در تیمار کم آبی ۱۰۰ درصد تامین نیاز آبی و محلول پاشی ۲۰ میلی مولار آسکوربیک اسید در رقم امید بخش VC6173 مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳: مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای تنش کم آبی و محلول پاشی آسکوربیک اسید و ژنوتیپ بر روی فعالیت آنزیم

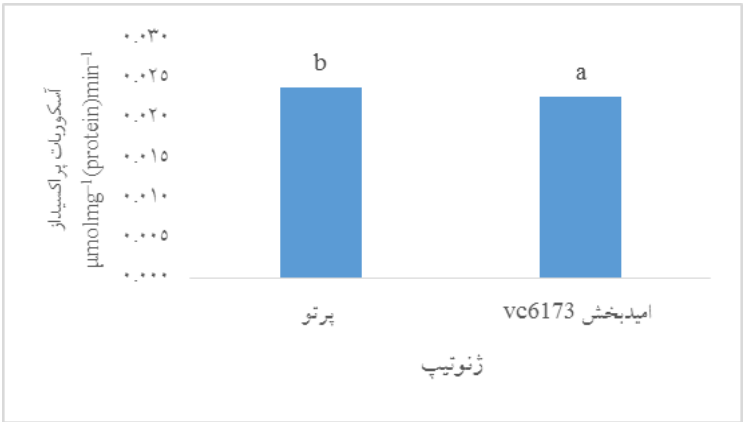
(میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس مقایسه میانگین LSD اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمار تنش کم آبی (P≤۰/۰۱)، محلول پاشی آسکوربیک اسید (P≤۰/۰۱) همچنین اثر متقابل تنش کم آبی و محلول‌پاشی آسکوربیک اسید (P≤۰/۰۱) و نیز اثر ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۱). با توجه به نتایج مقایسه میانگین بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تنش کم آبی ۲۵ درصد نیاز آبی و عدم محلول‌پاشی آسکوربیک اسید مشاهده شد که البته با میزان فعالیت این آنزیم در همین سطح از تنش و محلول‌پاشی با غلظت ۱۰ میلی مولار تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ٤). همچنین نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم پرتو مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ٤: مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای تنش کم آبی و محلول پاشی آسکوربیک اسید بر روی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

(میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس مقایسه میانگین LSD اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

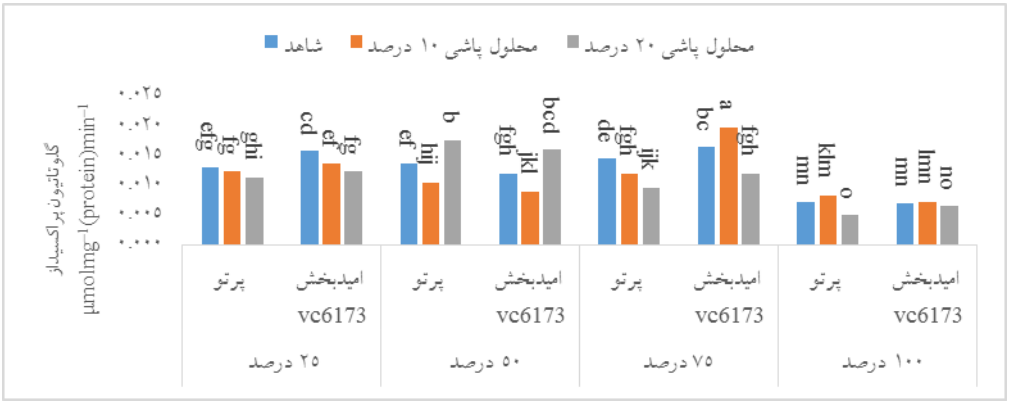


شکل ۵: مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر روی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

(میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس مقایسه میانگین LSD اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش کم آبی (P≤۰/۰۱) و آسکوربیک اسید (P≤۰/۰۱) بر روی فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل تیمار تنش کم آبی و محلول‌پاشی آسکوربیک اسید (P≤۰/۰۱)، اثر متقابل تنش کم آبی و ژنوتیپ

(P≤۰/۰۱)، اثر متقابل محلول پاشی آسکوربیک اسید و ژنوتیپ (P≤۰/۰۱) و نیز اثر متقابل تنش کم آبی، محلول‌پاشی آسکوربیک اسید و ژنوتیپ (P≤۰/۰۱) بر روی فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز تنش کم آبی ۷۵ درصد نیاز آبی و محلول‌پاشی ۱۰ میلی مولار آسکوربیک اسید در رقم امیدبخش VC6173 مشاهده شد و کمترین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز تنش کم آبی ۱۰۰ درصد نیاز آبی و محلول‌پاشی ۲۰ میلی مولار آسکوربیک اسید در رقم پرتو مشاهده شد (شکل ٦).



شکل ٦: مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای تنش کم آبی و محلول پاشی آسکوربیک اسید و ژنوتیپ بر روی فعالیت آنزیم گلوتیاتیون پراکسیداز

(میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس مقایسه میانگین LSD اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

بحث

سوپر اکسید دیسموتاز اولین آنزیم دفاعی در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که H_2O_2 را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند (Caverzan et al., 2016). تحت تنش خشکی هر گونه کاهش در فعالیت این آنزیم را به کاهش سنتز یا تخریب این آنزیم تحت تنش نسبت دادند (Gunes et al., 2006). گزارش شد که محلول پاشی آسکوربیک اسید بر روی آفتابگردان باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و در نتیجه کاهش محتوای مالون دی آلدئید و H2O2 شد (Farooq et al., 2020). همچنین نقش آسکوربات در سم زدایی پراکسید هیدروژن حاصل از تجزیه ملکول آب در مجرای لومن غشاء تیلاکوئیدی نیز اثبات شده است (Akram et al., 2017; Niu and Liao, 2016).

کاتالاز به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی عمل کرده و در حذف و جاروب کردن پراکسید هیدروژن تولید شده در پراکسیزوم‌ها و کاهش اثرات تخریبی گونه‌های اکسیژن فعال نقش مهمی بر عهده دارد (Simova et al., 2008). در مطالعه‌ای که بر روی ذرت انجام گرفت گزارش شد که افزایش فعالیت کاتالاز سبب افزایش پتانسیل دفاعی گیاه در مقابل تنش خشکی شده و میزان تحمل این گیاه نسبت به شرایط تنش خشکی بهبود یافت (Helal and Samir, 2008). در بررسی تاثیر محلول پاشی اسید آسکوربیک بر روی آفتابگردان در شرایط تنش کم آبی گزارش شد که محلول پاشی آسکوربیک اسید منجر به کاهش معنی دار محتوای آنزیم کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز گردید (El-Beltagi et al., 2020). در تحقیقی در رابطه با تاثیر تنش خشکی بر روی گیاه

لوبیا مشاهده شد که با افزایش تنش خشکی منجر به افزایش معنی دار میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شد که با محلول پاشی اسید آسکوربیک از میزان فعالیت این آنزیم کاسته شد (Ahmed et al., 2002). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان تیمار شده با آسکوربیک اسید تحت تنش خشکی را می‌توان به دلیل نقش آسکوربیک اسید در خنثی سازی و از بین بردن یون سوپراکسید و در نتیجه کاهش تولید پراکسید هیدروژن و در پی آن کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز دانست (Noctor and Foyer, 1998).

محققین گزارش کردند که فعالیت بیشتر گایاکول پراکسیداز همراه با قابلیت نگهداری آب بیشتر در برگ‌هاست (Mercado et al., 2004). افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز را از سطوح پایین تنش گزارش شد (Seyed Ebrahimi et al., 2015). در بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی رقم خیار اصفهانی در پاسخ به تنش خشکی، افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز گزارش شد (Amini et al., 2017). با توجه به نقش پراکسیدازها در پاک سازی مولکول پراکسید هیدروژن؛ به نظر می رسد که کاهش یون سوپراکسید توسط آسکوربیک اسید تولید پراکسید هیدروژن توسط سوپراکسید دیسموتاز را کاهش داده، در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز برای تجزیه پراکسیدهیدروژن کاهش می یابد (Sajid & Aftab, 2009).

تنش خشکی در سه رقم نخود باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آسکوربات پراکسیداز در ارقام آرمان و بیونیچ شد (Nasr Esfahani, 2013). افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش خشکی همانند دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بر اثر افزایش گونه‌های فعال اکسیژن است که با فعال کردن مسیرهای ترارسانی پیام باعث افزایش بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود (Mittler et al., 2004). شواهد تجربی نشان داده است که آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش اکسیداتیو نسبت به سوپراکسید دیسموتاز ناپایدارتر است (Chagas et al., 2008). اسید آسکوربیک از آنتی اکسیدان‌های بسیار قوی می‌باشد که با احیای رادیکال‌های آزاد موجب بازدارندگی آنها می شود و نقش بسیار مهمی در مسیر آسکوربات-گلوتاتیون و حذف گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست و سیتوسول دارد (Rahal et al., 2014؛ Ahmad et al., 2010). آسکوربیک اسید که خود یک آنتی اکسیدان کوچک قابل حل در آب است به طور مستقیم نیز در خنثی کردن رادیکال‌های سوپراکسید یا اکسیژن منفرد و نیز به عنوان یک آنتی اکسیدان ثانویه در تولید آلفاتوکوفرول و دیگر آنتی اکسیدان‌های چربی دوست نقش ایفا می کند (Arab et al., 2011).

افزایش میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز را در گیاه ریحان (Afkari et al., 2017) و برگ‌های کلزا (Tohidi-Moghaddam et al., 2009) و چغندر قند (Sayfzadeh and Rashidi, 2011) تحت تنش خشکی گزارش شد. پراکسیدازها ازجمله آنزیم‌هایی به شمار می‌روند که نقش بسیار مهمی در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی دارند. با توجه به نتایج مقایسه میانگین مشاهده می‌شود با افزایش سطح محلول‌پاشی آسکوربیک اسید از میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز کاسته می‌شود. گلوتاتیون یک تری پپتید (آلفا گلوتامیل سیستئینیل گلیسین) است که در تمام قسمت‌های سلول مانند سیتوسول، کلروپلاست، شبکه آندوپلاسمی، واکوئل و میتوکندری وجود دارد (Abdul Jaleel et al., 2009). گلوتاتیون در تنظیم مقدار H_2O_2 از طریق چرخه آسکوربات-گلوتاتیون و چرخه گلوتاتیون موثر است. علاوه بر این گلوتاتیون به عنوان یک آنتی اکسیدان می تواند با اکسیژن یکتایی، رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل واکنش دهد و به عنوان جاروب کننده

گونه‌های فعال اکسیژن عمل نماید. گلوتاتیون می تواند بسیاری از اجزای سلولی از جمله گروه‌های تیول پروتئین‌ها را در برابر تنش اکسیداتیو محافظت کند و همچنین در ثبات لیپیدها در غشای سلولی و قطع زنجیره پراکسیداسیون لیپیدها نیز نقش دارد (Upadhaya and Panda, 2004).

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که تنش کم آبی موجب تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان آنزیمی گیاه شد. با افزایش میزان تنش از میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز کاسته شد و محلول پاشی آسکوربیک اسید نیز تاثیر چندانی بر روی فعالیت آن نداشت. به نظر می رسد علت اصلی این امر کاهش میزان آب میانبافتی در اثر تنش کم آبی و در نتیجه کاهش سرعت فرایندهای فیزیولوژیک باشد. فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش تنش از ۲۵ درصد به ۵۰ درصد نیاز آبی اندکی افزایش یافت اما این تغیر از نظر آماری معنی دار نبود. با توجه به نتایج با افزایش شدت تنش از کارایی آسکوربیک اسید نیز در تعدیل آثار تنش کاسته شد. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز تحت تاثیر تنش افزایش یافت اما محلول پاشی آسکوربیک اسید توانست آثار مخرب تنش تقلیل دهد. بررسی ارقام نیز نشان می دهد که رقم امیدبخش VC6173 نسبت به رقم پرتو واکنش بهتری به محلول پاشی آسکوربیک اسید در شرایط تنش نشان داد. آسکوربیک اسید به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی آثار مضر تنش کم آبی و تنش اکسیداتیو حاصل از آن را کاهش داد و منجر به بهبود سیستم دفاعی گیاه در شرایط تنش شد. به نظر می رسد که در حالت کلی کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نتیجه محلول پاشی آسکوربیک اسید، به تاثیر غیر مستقیم آسکوربیک اسید بر روی آنزیم‌ها بر می‌گردد که خود به عنوان یک آنتی‌اکسیدان با خنثی سازی مستقیم رادیکال‌های آزاد تولید شده تحت تنش از افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان جلوگیری می کند. آسکوربات همچنین می تواند در واکنش مستقیم با گونه‌های فعال اکسیژن نظیر سوپراکسید، اکسیژن یکتایی یا رادیکال هیدروکسیل اکسیده شود و یا به عنوان عامل احیاکننده در بازسازی مجدد آلفا توکوفرول (آنتی اکسیدان باند شده به غشا) به کار گرفته شود و موجب حفاظت از آسکوربات، غشا در برابر تنش اکسیداتیو گردد.

References

1. **Abdul Jaleel, C. Riadh, K. Gopi, R. Manivannan, P. Ines, J. Al-Juburi, H. J. Chang-Xing, Z. Hong-Bo, S. and Panneerselvam, R. (2009).** Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. Acta Physiologia Plantarum 31: 427-436.
2. **Afkari, A. (2017).** Effect of seed priming on germination characteristics and some antioxidant enzymes activity of Basil (*Ocimum basilicum* L.) under drought stress conditions. Journal of Developmental Biology. 9(3):33-44.
3. **Ahmad, P. Jaleel, C.A. Salem, M. A. Nabi, G. and Sharma, S. (2010).** Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. Critical Reviews in Biotechnology. 30 (3):161-175.
4. **Ahmed, S. Nawata, E. Hosokawa, M. Domae, Y. and Sakuratani, T. (2002).** Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activity of mung bean subjected to waterlogging. Journal of Plant Science. 163: 117-123.
5. **Akram, N. A., Shafiq, F. and Ashraf, M. (2017).** Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress

tolerance. Frontiers in plant science. (8): 601-613.

6. **Alderfasi, A.A., Alzarqaa, A.A., Al-Yahya, F.A., Roushdy, S.S., Dawabah, A. A. and Alhammad, B. A. (2017).** Effect of combined biotic and abiotic stress on some physiological aspects and antioxidant enzymatic activity in mungbean (*Vigna radiate* L.). Africal Journal Agricalture Research. 12 (9): 700-705.
7. **Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D., and Smith, M. (1998).** Crop evapotranspiration-Guidelines for computing crop water requirements-FAO Irrigation and drainage paper 56. Fao, Rome, 300. (9). D05109.
8. **Amini, F. Askari, M. and Haghir, M. (2017).** Changes in protein and antioxidant system of Cucumis sativus cv. Isfahani in response to drought stress. Journal of Cell & Tissue (JCT). 7(4): 375-386.
9. **Arab, P. Bradaran Firouzabadi, M. Asghari, H. Gholami, A. and Rahimi, M. (2011).** The effect of ascorbic acid and sodium nitroposide spraying on some safflower characteristics under irrigation tension. Proceedings of the 12th Iranian Congress of Plant Breeding. Islamic Azad University. Karaj Branch. Karaj. 16-14.
10. **Aydinsakir, K., Erdal, S., Buyuktas, D., Bastug, R. and Toker, R. (2013).** The influence of regular deficit irrigation applications on water use, yield, and quality components of two corn (*Zea mays* L.) genotypes. Agricultural water management. (128): 65-71.
11. **Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A. and Pereira, A. (2016).** Plant adaptation to drought stress. F1000 Research, 5.
12. **Bangar, P., Chaudhury, A., Tiwari, B., Kumar, S., Kumari, R. and Bhat, K. V. (2019).** Morphophysiological and biochemical response of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] varieties at different developmental stages under drought stress. Turkish Journal of Biology. 43 (1): 58-69.
13. **Bharadwaj, N., Gogoi, N., Barthakur, S. and Basumatary, N. (2018).** Morphophysiological responses in different mungbean genotypes under drought stress. Research Journal Recent Science. 7 (7): 1-5.
14. **Caverzan, A., Casassola, A. and Brammer, S.P. (2016).** Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. SHANKER AK & SHANKER C. Abiotic and biotic stress in plants-Recent advances and future perspectives. Publisher InTech. 463-480.
15. **Chagas, R. Silveira, J. Ribeiro, R. Vitorello, V. and Ca-rrer, H. (2008).** Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate pe-roxidase in sugarcane leaves exposed to paraquatindu-ced oxidative stress. Pestic Biochemical Physiolgy Journal. (90):181-188.
16. **Chance, B. and Maehly, A.C. (1955).** Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymologist. (11): 764 - 755.
17. **Chang, C.J. and Kao, C.H. (1998).** H2O2 metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. Plant Growth Regulation Journal. 25. (1): 11-15.
18. **Dolatabadian, A., Sanavy, S.M. and Chashmi, N.A. (2008).** The effects of foliar application of ascorbic acid (vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. Journal of Agronomy and Crop Science. 194. (3): 206-213.
19. **El-Beltagi, H. S., Mohamed, H. I. and Sofy, M. R. (2020).** Role of Ascorbic acid, Glutathione and Proline Applied as Singly or in Sequence Combination in Improving Chickpea Plant through Physiological Change and Antioxidant Defense under Different Levels of Irrigation Intervals. Molecules Journal. 25. (7): 1702.
20. **Farooq, A., Bukhari, S. A., Akram, N. A., Ashraf, M., Wijaya, L., Alyemeni, M.N. and Ahmad, P. (2020).** Exogenously Applied Ascorbic Acid-Mediated Changes in Osmoprotection and Oxidative Defense System

Enhanced Water Stress Tolerance in Different Cultivars of Safflower (*Carthamus tinctorious* L.). Plants Journal. 9. (1): 92-104.

21. **Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A. and Ihsan, M. Z. (2017).** Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. Frontiers in plant science Journal. (8):, 23-47.
22. **Giannopolitis, C. N. and Rie, S. K. (1977).** Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology. (59): 309 - 314.
23. **Gunes, A. Cicek, N. Inal, A. Alpaslan, M. Eraslan, F. Guneri, E. and Guzelordu, T. (2006).** Genotypic response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars to drought stress implemented at pre-and postanthesis stages and its relations with nutrient uptake and efficiency. Journal of Plant Soil Environment. (52): 868-876.
24. **Helal, R. M. and Samir, M. A. (2008).** Comprative response of drought tolorant and drought sensitive maize genotypes to water stress. Australian Journal crops science. (1): 31-36.
25. **Lu, Y., Chang, X. and Guo, X. (2019).** Dynamic changes of ascorbic acid, phenolics biosynthesis and antioxidant activities in mung beans (*Vigna radiata* L.) until maturation. Plants, 8(3), 75.
26. **Mercado, J. A. Matas, A. J. Heredia, A. Valpuesta, V. and Quesada, M. (2004).** Changes in the water binding characteristics of the cell walls from transgenic Nicotiana tabacum leaves with enhanced levels of peroxidase activity. Plant Physiology. (122): 504-512.
27. **Mittler, R. Vanderauwera, S. Gollery, M. and Breusegem, F. V. (2004).** Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science. (9): 490-498.
28. **Nakano, Y. and Asad, K. (1981).** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. (22): 867–880.
29. **Nasr Esfahani, M. (2013).** Effect of water-deficit Stress on Growth and Antioxidant System in Three Chickpea Cultivars. Herbal Biology. 5. (15): 111-124.
30. **Nickel, K. S. and Cunningham, B. A. (1969).** Improved peroxidase assay method using leuco 2, 3′, 6-trichloroindophenol and application to comparative measurements of peroxidatic catalysis. Analytical Biochemistry. 27. (2): 292-299.
31. **Niu, L. and Liao, W. (2016).** Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. Frontiers in Plant Science. (7): 230-245.
32. **Noctor, G. and Foyer, C. H. (1998).** Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. (49): 249-279.
33. **Rahal, A. Kumar, A. Singh, V. Yadav, B. Tiwari, R. Chakraborty, S. and Dhama, K. (2014).** Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. BioMed Research International.
34. **Sajid, Z. A. and Aftab, F. (2009).** Amelioration of salinity tolerance in Solanum tuberosum L. by exogenous application of ascorbic acid. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 45. (5): 529- 540.
35. **Samota, M. K., Sasi, M., Awana, M., Yadav, O. P., Amitha Mithra, S. V., Tyagi, A., Kumar, S. & Singh, A. (2017).** Elicitor-induced biochemical and molecular manifestations to improve drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) through seed-priming. Frontiers in plant science. (8): 911-934.
36. **Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Mishra, R. K., Tripathi, D. K., Singh, V. P., Devendra, K. C. and Prasad, S. M. (2016).** Reactive oxygen species (ROS): beneficial companions of plants' developmental processes. Frontiers in plant science (7): 84-99.
37. **Swathi, L., Reddy, D. M., Sudhakar, P. and Vineela, V. (2017).** Screening of Mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) genotypes against water stress mediated through polyethylene glycol.

International Journal Curr Microbiol Application Science. 6. (10): 2524-2531.

38. **Sayfzadeh, S. and Rashidi, M. (2011).** Response of antioxidant enzymes activities of sugarbeet to drought stress. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 6. (4): 27-33.
39. **Seyed Ebrahimi, F. S. Hasani Komala, H. Alamali, A. and Rezaodoost, M. H. (2015).** Effect of water-deficit stress on morphological traits and activity of antioxidant enzymes of *Brassica Napus.* Process and Plant Yield. 4. (14): 77-91.
40. **Simova-Stoilova, L. Demirevska, K. Petrova, T. Tsenov, N. and Feller, U. (2008).** Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. Plant Soil Environment. (54): 529-536.
41. **Singh, N. and Bhardwaj, R. D. (2016).** Ascorbic acid alleviates water deficit induced growth inhibition in wheat seedlings by modulating levels of endogenous antioxidants. Biologial science. 71. (4): 402-413.
42. **Singh, R., Singh, M. K., Singh, A. K. and Singh, C. (2018).** Pulses production in India: Issues and elucidations.
43. **Tohidi-Moghaddam, H. R. Shirani-Rad, A. R. Noormohammadi, G. Habibi, D. and Boojar, M. M. A. (2009).** Effect of super absorbent application on antioxidant enzyme activities in canola (*Brassica napus* L.) cultivars under water stress conditions. American Journal of Agriculture and Biological Science. (4): 215-223.
44. **Upadhyaya, H. and Panda, S. K. (2004).** Responses of Camellia sinensis to drought and rehydration. Biologia Plantarum. 48. (4): 597-600.
45. **Venkatesh, J. and Park, S. W. (2014).** Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. Botanical studies. 55. (1): 21-38.