مطالعه نقش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی در عکس‌العمل به خشکی در توت‌فرنگی

فرزانه رضوی*
استادیار، موسسه باغبانی سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی (*AREEO*)
*نویسنده مسئول: f.razavi@areeo.ac.ir

چکیده

گیاهان تحت تأثیر تنش‌های محیطی به‌وسیله مکانیسم‌های دفاعی مختلف قادر به حفظ حیات خود و یا حتی قادر به تولید محصول با کارآیی بالا می‌باشند، لذا شناسایی این مکانیسم‌ها و مسیرهای متابولیکی و مولکولی آن در سطح سلولی و کل گیاه، گامی ضروری جهت احیای تولیدات کشاورزی تحت اقلیم‌های خشک می‌باشد. رادیکال‌های سمی اکسیژن یا ROS (Reactive Oxygen Species) حاصل از تنش خشکی به‌عنوان یک تنش اکسیداتیو، باعث صدمات شدید به ارگانل‌های سلولی، اکسیداسیون ترکیبات سلولی و درنهایت باعث از هم گسستگی چرخه‌های متابولیکی و سلولی می‌شوند، لذا خنثی‌سازی این رادیکال‌ها از طریق مکانیسم‌های دفاعی - آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی و غیر آنزیمی از مهم‌ترین سیستم‌های دفاعی گیاه در مقابل تنش خشکی می‌باشند. در مطالعه حاضر نقش آنتی اکسیدانت‌های گیاهی در سطوح مختلف ژنتیکی و متابولیکی تحت تنش خشکی در گیاه توت‌فرنگی به‌عنوان گیاه مدل خانواده رزاسه بر اساس آزمایشات و آنالیزهای مختلف بررسی شده‌اند.

کلمات کلیدی: **تنش خشکی، رزاسه، آنتی‌اکسیدانت‌ها، رادیکال‌های اکسیژن**

مقدمه

عکس‌العمل گیاه به خشکی بسیار پیچیده بوده، شناخت همه جانبه این تنش جهت حفاظت از تولیدات کشاورزی تحت شرایط خشک‌سالی ضروری می‌باشد. تنش خشکی باعث کاهش پتانسیل آب برگ، کاهش هدایت گازی روزنه‌ها، کاهش کارایی جذب آب در گیاه، افزایش دمای سطح برگ و در نهایت اختلال در بالانس آبی گیاه می‌شود (۱). تنش خشکی به‌عنوان یک تنش اکسیداتیو، باعث اختلال در سیستم‌های فتوسنتزی - تنفسی گیاه، به هم زدن روند طبیعی مکانیسم‌های فتوشیمیایی و متابولیکی درون کلروپلاست و میتوکندری سلول گیاهی و نهایتاً تجمع رادیکال‌های فعال سمی اکسیژن ROS (Reactive Oxygen Species) در این اندامک‌های سلولی می‌شود (۲، ۳، ۴). این رادیکال‌های اکسیژن تجمع یافته باعث صدمات شدید به ارگانل‌های سلولی و اکسیداسیون ترکیبات سلولی نظیر پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلنیک شده، در نهایت باعث از هم گسستگی چرخه‌های متابولیکی درون‌سلولی می‌شوند (۵، ۶). شدت تولید این رادیکال‌ها، همبستگی شدیدی با میزان و شدت تنش خشکی داشته، اندامک‌های سلولی شامل کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها مکان‌های اصلی ایجاد این ترکیبات سمی بوده و خود اولین هدف حمله تخریبی این ترکیبات سمی تحت تنش خشکی می‌باشند (۳). مهم‌ترین مکانیسم دفاعی گیاه در مقابل صدمات اکسیدی تنش خشکی، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی بوده که در جهت خنثی‌سازی سمیت ROS به دو صورت آنزیمی و غیر آنزیمی عمل می‌کنند.ازجمله آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی می‌توان به آنزیم‌های سوپراکسید دیموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) اشاره کرد و از آنتی اکسیدانت‌های غیر آنزیمی می‌توان به اسید آسکوربیک (ASA)، گلوتاتیون (GSH) ، کارتنوئیدها، فنول‌ها و غیره اشاره نمود (۴). همچنین قندهای ساکاروز، گلوکز و فروکتوز، پرولین و گلی سین بتائین نه‌تنها در ایجاد تعادل اسمزی و حفظ بالانس آبی گیاه تحت تنش خشکی نقش دارند بلکه به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانت نیز در سم‌زدایی و حذف ROS ها می‌توانند نقش مؤثری

داشته باشند و از سلول‌های گیاهی در برابر خشکی محافظت کنند. گونه‌های مختلف گیاهی، پتانسیل دفاعی-آنتی‌اکسیدانتی متفاوتی را در مهار کردن صدمات اکسیداتیوی تنش خشکی دارا می‌باشند. همچنین تفاوت‌های درون‌گونه‌ای نیز در میزان کارایی سیستم دفاعی- آنتی‌اکسیدانتی گیاه تحت تنش خشکی مشاهده می‌گردد. به‌عنوان یک قاعده کلی، پتانسیل دفاعی-آنتی اکسیدانتی گیاه (آنزیمی و غیر آنزیمی)، تحت تنش خشکی در ژنوتیپ‌های مقاوم بالاتر از ژنوتیپ‌های حساس به خشکی می‌باشد و یا برعکس مکانیسم‌های قوی‌تر آنتی‌اکسیدانتی در گیاه، باعث افزایش مقاومت به تنش خشکی می‌گردد (۴، ۶).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طریقه اعمال تیمار خشکی

این مطالعه بر اساس سه آزمایش کلی انجام گرفت: در آزمایش اول، مطالعه‌ای گلخانه‌ای با استفاده از گیاهان توت‌فرنگی رقم "Elsanta" انجام گرفت. در این آزمایش تیمار خشکی به‌صورت تدریجی و با قطع آبیاری در گیاهان استرس اعمال گردید. نمونه‌گیری و اندازه‌گیری‌های مختلف در طی ۶ مرحله مختلف خشکی شامل ۱، ۱۶، ۲۷، ۴۰، ۴۴ و ۵۱ روز بعد از اعمال تیمار خشکی از هر دو تیمار کنترل و تنش انجام گرفت و در هر مرحله پتانسیل آب برگ به‌عنوان شاخص خشکی در نظر گرفته شد. در هر مرحله نمونه‌های برگ به‌صورت راندوم و نمونه مرکب جمع‌آوری و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آزمایش دوم در طول تابستان و با اعمال تیمار خشکی شدید در گیاهان توت‌فرنگی "Elsanta" انجام گرفت و نمونه‌های برگ در یک مرحله و با همان روش نمونه‌گیری در آزمایش اول برداشت شده و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در آزمایش سوم تیمار خشکی تدریجی در ۴ ژنوتیپ مختلف توت‌فرنگی شامل: *Fragaria* × *ananassa* "Ventana", *F.* × *ananasa* "Figaro", *F. chiloensis* , *F. vesca* انجام گرفت. در این آزمایش از هر ژنوتیپ در سه مرحله متفاوت خشکی از هر تیمار کنترل و تنش نمونه‌گیری و نمونه‌ها در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در طول هر آزمایش شرایط دما، رطوبت نسبی و تابش فعال فتوسنتزی در محیط گلخانه اندازه‌گیری و ثبت گردید.

فاکتورهای مورداندازه‌گیری شده در برگ: فاکتورهای اندازه‌گیری شده در برگ توت‌فرنگی

در گیاهان تحت تیمار خشکی و نیز گیاهان کنترل شامل۱) پتانسیل آب برگ، ۲) میزان کربوهیدرات‌ها ۳) میزان پرولین، ۴) ظرفیت کامل آنتی‌اکسیدانتی برگ (TAC)، ۵) میزان ترکیب MDA (Malondialdehyde)، ۶) فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) بوده، کلیه آنالیزها در این مطالعه بر اساس پروتکل‌های استاندارد بر اساس روش رضوی (۲۰۱۲) انجام گرفت (۴).

نتایج و بحث

در آزمایش اول، از مرحله چهار به بعد (۴۰ روز پس از قطع آب) ، تفاوت معنی‌دار در پتانسیل آب برگ بین تیمار کنترل و خشکی مشاهده شد. در طی سه مرحله آخر خشکی (مراحل ۴، ۵، ۶) پتانسیل آب برگ بین ۱/۴- و ۱/۶- Mpa در تیمار خشکی تغییر کرد درحالی‌که در گیاهان کنترل بین ۱- تا ۱/۲- Mpa تغییر کرد (شکل ۱).

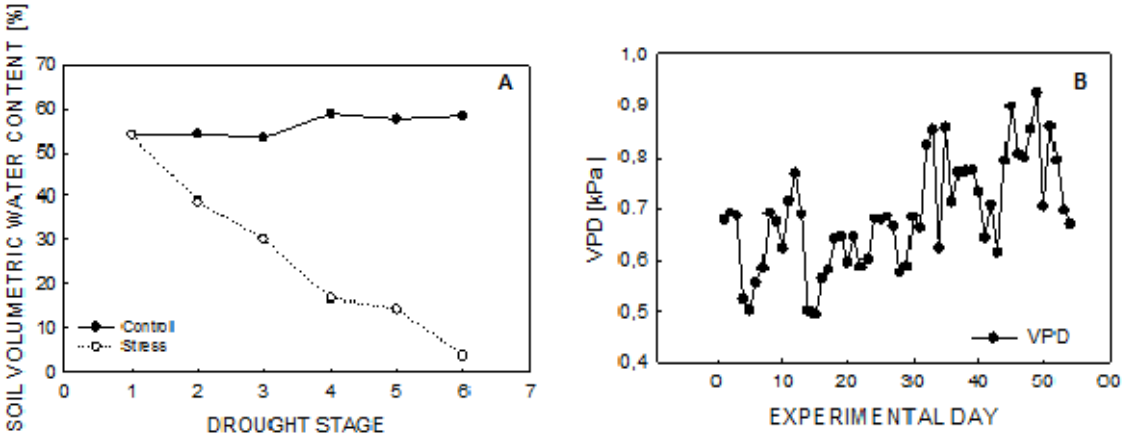

Fig 1: Substrate volumetric water content (A) and Vapour Pressure Deficit (VPD), throughout the experiment (B). Vapour pressure deficit is calculated from temperature and relative humidity data. (means ± SE, n= 3, ($p \leq 0.05$))

در دو آزمایش دوم و سوم نیز تفاوت معنی‌داری در پتانسیل آب برگ در بین تیمارهای کنترل و استرس در مراحل مختلف تنش خشکی خصوصاً تنش طولانی‌مدت مشاهده گردید. تنش خشکی تدریجی در آزمایش اول باعث ایجاد مکانیسم مقاوم‌سازی و سازگاری به خشکی در توت‌فرنگی "Elsanta" گردید، به‌طوری‌که ساکاروز تحت تنش خشکی از مرحله چهارم خشکی به بعد افزایش معنی‌داری را نشان داد. در آزمایش دوم (تنش خشکی شدید) و نیز در آزمایش سوم (تنش خشکی تدریجی)، میزان ساکاروز به‌صورت معنی‌داری در برگ گیاهان تحت تنش افزایش یافته درحالی‌که میزان نشاسته کاهش یافت. نتایج فوق، نقش تغییر در توزیع قندها، به‌صورت تبدیل نشاسته به ساکاروز را در مکانیسم‌های دفاعی گیاه توت‌فرنگی تحت تنش خشکی در هر دو نوع تنش تدریجی و سخت ثابت می‌کند که با نتایج گزارشات قبلی در توت‌فرنگی و سیب مطابقت دارد (۴و ۶). تجمع ساکاروز تحت تنش خشکی، نقش آن را در ایجاد تعادل اسمزی سلولی، کنترل مسیرهای سیگنالینگ خشکی و نیز به‌عنوان نوعی آنتی‌اکسیدانت دفاعی تحت تنش خشکی در توت‌فرنگی اثبات می‌کند. نتایج فوق با سایر نتایج که در آن‌ها تجمع ساکاروز در توت‌فرنگی *F. chiloensis* تحت تنش خشکی را اثبات کرده‌اند مطابقت دارد (۴). معمولاً میزان پرولین در بافت‌های گیاهی تحت تنش خشکی افزایش یافته، این متابولیت نقش‌های متعددی را در مکانیسم دفاعی گیاه تحت تنش خشکی اعمال می‌کند، از جمله ایجاد تعادل اسمزی، حفاظت از تمامیت عملکردی و ساختمانی سلول‌ها، خنثی‌سازی رادیکال‌های اکسیژن ROS به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت و غیره. در آزمایش اول و سوم (تنش خشکی تدریجی)، تجمع چشمگیری از پرولین در بافت برگ توت‌فرنگی مشاهده نشد. البته در آزمایش اول در مراحل ۴ و ۵ خشکی میزان پرولین تا حدودی در گیاهان تحت تنش افزایش یافت که در واقع نشان دهنده نقش پرولین درایجاد تعادل اسمزی در توت‌فرنگی بوده، اگرچه ممکن است پرولین نقش کلیدی در ایجاد تعادل اسمزی تحت تنش خشکی در این گیاه نداشته باشد. نتایج این آزمایش با نتایج مطالعات قبلی هماهنگ می‌باشد (۴)، ولی در آزمایش دوم تجمع پرولین به صورت چشمگیری در بافت برگ گیاهان توت‌فرنگی تحت تنش خشکی شدید مشاهده گردید. بنابراین تجمع پرولین در توت‌فرنگی تحت تنش خشکی بسته به‌شدت خشکی و نوع روش خشکی متفاوت می‌باشد. در آزمایش اول میزان TAC از مرحله چهارم خشکی به بعد یعنی از روز ۴۰ام به بعد از قطع آب افزایش یافت. این افزایش در سطح TAC نشان دهنده تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت‌ها در توت‌فرنگی تحت تنش خشکی می‌باشد که با نتایج گزارشات قبلی در مورد افزایش TAC در گوجه‌فرنگی تحت تنش خشکی ملایم مطابقت دارد (۴). میزان TAC در برگ توت‌فرنگی به‌احتمال قوی به‌طور غیرمستقیم تحت تأثیر میزان اسید آسکوربیک (ASA) بوده که یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های قوی در سم‌زدایی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال‌های سمی هیدروکسیل (OH) می‌باشد. بنابراین سطح TAC برگ و در نهایت

میزان اسید آسکوربیک به‌طور قطع در مقاوم‌سازی گیاه توت‌فرنگی به تنش خشکی مؤثر می‌باشد. در آزمایش دوم و سوم TAC افزایش معنی‌داری تحت تنش خشکی نشان نداد. در آزمایش سوم MDA که نشان دهنده شدت اکسیداسیون چربی‌های غشایی سلول می‌باشد افزایش معنی‌داری در برخی از ژنوتیپ‌ها نشان داد. افزایش میزان MDA به‌عنوان مارکری برای تنش‌های اکسیداتیو، نشان دهنده نقش تنش خشکی به‌عنوان یک تنش اکسیداتیو در توت‌فرنگی می‌باشد. تحت شرایط تنش خشکی طولانی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر تجزیه بیشتر از احیای آنزیم در واکنش با H_2O_2 کاهش می‌یابد (۴). در این آزمایش، فعالیت کاتالاز تحت تنش خشکی کاهش یافته که می‌تواند به دلیل تجزیه آنزیم توسط غلظت بالای H_2O_2 تحت تنش اکسیداتیو خشکی باشد. به‌طورکلی عکس‌العمل آنزیم CAT در واکنش به H_2O_2 بسته به میزان مقاومت گیاه به تنش خشکی متفاوت است. آنزیم APX مانند آنزیم CAT در قسمتی از چرخه بیوشیمیایی گلوتاتیون- آسکوربات (ASA) ، نقش مهمی در تجزیه H_2O_2 دارد. فعالیت APX در توت‌فرنگی تحت تأثیر تنش خشکی قرار نگرفت، اما به صورت کلی، تمایل به کاهش را نشان داد که مشابه کاهش فعالیت آن در ارقام حساس برنج تحت تنش خشکی می‌باشد (۶). فعالیت SOD نیز تحت تأثیر تنش خشکی قرار نگرفت، اگرچه تحت خشکی طولانی در آزمایش اول (مرحله ششم یعنی ۵۱ روز پس از قطع آب)، فعالیت ن تمایل به کاهش داشت که مشابه کاهش فعالیت آن در ارقام حساس برنج تحت تنش خشکی می‌باشد (۶).

نتیجه‌گیری

نقش مؤثر ساکاروز به‌عنوان ترکیب اصلی در ایجاد تعادل اسمزی و نیز آنتی‌اکسیدانتی دفاعی در توت‌فرنگی در این مطالعه اثبات شده است درحالی‌که نقش پرولین به‌عنوان یک اسمولیت یا آنتی‌اکسیدانت در گیاه توت‌فرنگی تحت تنش خشکی، به‌احتمال قوی بسته به‌شدت خشکی متفاوت می‌باشد. تأثیر تنش خشکی بر آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی در گیاه توت‌فرنگی قویاً بستگی به مرحله و شدت خشکی دارد. در خاتمه نتایج مطالعات مذکور نقش مهم آنتی اکسیدانت‌ها را در عکس‌العمل گیاه توت‌فرنگی به خشکی تأیید نمود.

منابع

Egilla J.N., Davies Jr F.T., Boutton T.W. (2005). Drought stress influences leaf water content, photosynthesis, and water-use efficiency of *Hibiscus rosa-sinensis* at three potassium concentrations, Photosynthetica 43: 135–140.

Wahid A., Rasul E. (2005). Photosynthesis in leaf, stem, flower and fruit, in: Pessarakli M. (Ed.), Handbook of Photosynthesis, 2nd ed., CRC Press, Florida, pp. 479–497.

Farooq et al. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management

Razavi F. (2012). Molecular and physiological responses to drought stress in *Fragaria sp.* PhD thesis dissertation, Ghent Uniuversity.

Loutfy N., et al. (2012). Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). J Plant Res, 125: 173-184.

Gue Z., et al. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Plant Physiol Biochem, 44: 826-836.

The Study of Antioxidative Defense Mechanisms in Plant Response to Drought stress in Strawberry

F. Razavi *
Institute of Horticulture
*Corresponding Author: f.razavi@areeo.ac.ir

Abstract

Abiotic stresses such as water deficit cause the accumulation of reactive oxygen species (ROS). ROS accumulate in different tissues and sub-cellular compartments as the results of disruption in electron flux homeostasis in different cellular compartments by drought stress. The main source for ROS production in the cells are chloroplast, mitochondria and peroxisomes with highly oxidizing metabolic activity and intense rate of electron flow. Uncoupling of electron metabolism pathways in cellular compartments under drought stress causes the high energy electron transfer to the molecular oxygen (O_2) to form ROS like H_2O_2, $^1O_2$, $O_2^{\bullet-}$ and $HO^{\bullet}$. ROS are highly reactive and toxic, cause damage to the proteins (protein oxidation), carbohydrates, DNA and lipid peroxidation. Plant capacity for scavenging of ROS plays a critical role to cope with oxidative stress like water deficit and tolerance induction. ROS detoxification is based on non-enzymatic and enzymatic antioxidant mechanisms. The main non-enzymatic antioxidants include ascorbate (vitamine C/AsA), glutathione (GSH), tocopherol (vitamin E), flavonoids, alkaloids and carotenoids whereas enzymatic antioxidants including superoxide dismutase (SOD), peroxidases (POX), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), etc. In present research the effect of drought stress in strawberry 'Elsanta' as the model of Rosaceae is studied. The possible role of some enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms under different levels of water deficit are discussed here. Our results indicate the absolute contribution of antioxidant metabolism in *Fragaria* response to water deficit.

***Keywords*: Strawberry, Water Deficit, ROS, Antioxidants**