

اثر تغذیه برگ با آسکوربیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تجمع پرولین و لیپید پراکسیداسیون کلزا (*Brassica napus* L.) در شرایط تنش شوری

آریا دولت آبادیان^۱، سید علی محمد مدرس ثانوی^{۱*} و مظفر شریفی^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۸/۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱/۱۱)

چکیده

اثر تنش شوری و تغذیه برگ با آسکوربیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تجمع پرولین و پراکسیداسیون لیپیدی غشای ریشه و برگ کلزا رقم اوکاپی، مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تنش شوری با استفاده از محلول NaCl با غلظت ۲۰۰ mM اعمال شد هم‌چنین برای تغذیه برگ با آسکوربیک اسید از محلول ۲۵ mM آسکوربیک اسید استفاده گردید. میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در اندام هوایی و ریشه مورد سنجش قرار گرفت و هم‌چنین محتوی مالون‌دی‌آلدهید پرولین و کلروفیل برگ‌ها ارزیابی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های فوق به جزء آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ریشه در اثر تنش شوری افزایش پیدا کرد. کاربرد آسکوربیک اسید به عنوان یک آنتی‌اکسیدان سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های فوق در برگ‌ها شد. ولی در ریشه‌ها غیر مؤثر بود. محتوای کل پروتئین محلول، هم در برگ و هم در ریشه در اثر تنش شوری کاهش یافت. در حالی که کاربرد آسکوربیک اسید سبب افزایش پروتئین در گیاهان تنش دیده شد. هم‌چنین تنش شوری سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و تجمع پرولین شده ولی مصرف آسکوربیک اسید پراکسیداسیون لیپیدی و میزان پرولین برگ‌ها را کاهش می‌دهد. سنجش کلروفیل نیز کاهش معنی‌داری را در سطوح تنش دیده در مقایسه با کنترل نشان داد. بر طبق نتایج به دست آمده مصرف آسکوربیک اسید می‌تواند سبب کاهش اثر مضر تنش شوری شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش شوری، آسکوربیک اسید، تغذیه برگ، کلزا

مقدمه

جمله مناطق خشک و نیمه خشک محدود می‌کند. آبیاری با آب‌های نامناسب و شور مهم‌ترین عامل افزایش نمک و شور شدن خاک و در نتیجه ایجاد تنش شوری است. پاسخ گیاهان به تنش شوری متفاوت بوده و به میزان سمیت و پتانسیل اسمزی نمک و مدت زمان تنش بستگی دارد (۱۳). دامنه پاسخ به تنش شوری از کاهش رشد تا پیری زودرس برگ‌ها،

تنش‌های مختلف محیطی شامل تنش‌های زنده و غیر زنده سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند از جمله این تنش‌ها می‌توان به تنش نور شدید، تنش خشکی و شوری و حتی عوامل بیماری‌زا اشاره کرد (۲۶). تنش شوری عاملی است که به طور جدی تولید محصولات زراعی را در مناطق مختلف از

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. استادیار علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: modaresa@modares.ac.ir

پژمردگی دائمی و مرگ گیاه متفاوت است.

تنش شوری مانند دیگر تنش‌های محیطی باعث تجمع گونه‌های اکسیژن فعال مانند یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل در سلول و آسیب رساندن به لپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (۸ و ۳۰). در سلول‌های گیاهی اندامک‌هایی مانند کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها تولید کننده‌های اصلی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در طی فرآیندهای فتوسنتز و تنفس می‌باشند (۳۵). زنجیره انتقال الکترون در غشا تیلاکوئید مهم‌ترین منبع تولید گونه‌های فعال اکسیژن هستند (۱۷). تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، در کلروپلاست به وسیله انتقال مستقیم انرژی از کلروفیل به مولکول اکسیژن و برانگیخته شدن آن و یا به وسیله کاهش تک ظرفیتی مولکول اکسیژن در فتوسیستم یک صورت می‌گیرد (۵). پراکسیداسیون چربی‌های غشا می‌تواند در اثر گونه‌های اکسیژن فعال به وجود آید و در نتیجه باعث کاهش نفوذپذیری انتخابی غشای سلولی شود (۶).

گیاهان سازوکارهای مختلفی را برای کاهش اثر مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارند از جمله این سازوکارها تولید ترکیبات آنزیمی و غیر آنزیمی است. بدین صورت که مقدار گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی به وسیله فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها کنترل می‌شود. ظرفیت کاهش اثر مخرب اکسیژن فعال بستگی به میزان تحمل گیاه به تنش دارد (۳۶). روابط گوناگونی بین تنش‌های شوری، خشکی و سطح آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و یا آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گزارش شده است (۲۱، ۳۸ و ۴۴). برای مثال گیاهچه‌های آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* L.) در شرایط تنش شوری اعمال شده با NaCl (۲۰۰mM) پژمرده شده و نتوانستند بقای خود را حفظ کنند (۳۱ و ۴۲). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با سمیت‌زدایی و از بین بردن اثر مضر گونه‌های اکسیژن فعال هم‌بستگی دارد (۲۹). افزایش سطح آسکوربیک اسید سلولی، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌تواند سبب کاهش گونه‌های اکسیژن فعال حاصل از تنش شوری شود.

آسکوربیک اسید یک آنتی‌اکسیدان کوچک قابل حل در آب است که در سمیت‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن به ویژه پراکسید هیدروژن نقش دارد به علاوه به طور مستقیم در خنثی کردن رادیکال‌های سوپراکسید، اکسیژن منفرد یا سوپراکسید و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان ثانویه در باز تولید آلفا توکوفرول و دیگر آنتی‌اکسیدان‌های چربی دوست نقش ایفا می‌کند (۳۰). آسکوربیک اسید در کلروپلاست به صورت یک کوفاکتور برای چرخه ویولاگزانتین نیز عمل می‌کند (۳۹). مصرف خارجی آسکوربیک اسید می‌تواند مقاومت به تنش شوری را افزایش و سبب کاهش اثر تنش اکسیداتیو حاصله شود (۳۷). هم‌چنین آسکوربیک اسید در فرآیندهای رشد گیاه مانند تقسیم سلولی، گسترش دیواره سلولی بر طبق فرضیه اسیدی نقش دارد (۳۳). آسکوربیک اسید همراه با گلوکاتینون و چندین آنزیم آنتی‌اکسیدان در خنثی کردن رادیکال‌های فعال اکسیژن از جمله یون سوپراکسید حاصل از چرخه مهلر نقش دارد (۳۰). آسکوربیک اسید در مسیر آسکوربات - گلوکاتینون که در پاکسازی گونه‌های اکسیژن فعال در کلروپلاست (۱۸) و سیتوسول (۵) نقش دارند به عنوان یک ماده کلیدی عمل می‌کند. مشخص شده که آسکوربیک اسید به طور مستقیم می‌تواند یون سوپراکسید و هیدروکسیل را خنثی کند (۵). غلظت آسکوربیک اسید ۲۰ میلی‌مولار در سیتوسول و ۲۰ تا ۳۰ میلی‌مولار در استروما کلروپلاست گزارش شده است (۱۷).

سیستم سمیت‌زدایی اکسیژن فعال در تمام گیاهان به دو دسته سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شود (۱۷). در پاسخ به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد ظرفیت و فعالیت سیستم دفاعی آنزیمی افزایش می‌یابد (۲۲). اولین آنزیم پاکسازی کننده گونه‌های فعال اکسیژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد که سبب تبدیل O_2^- به H_2O_2 می‌شود که پراکسید هیدروژن نیز توسط آسکوربات پراکسیداز حذف می‌شود (۳، ۴ و ۳۵). هم‌چنین پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز زدوده می‌شود (۱، ۱۳ و ۱۵). تغییر در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش شوری

شد. جهت افزایش چسبندگی محلول به اندام‌های هوایی از محلول Tween 20 به مقدار یک قطره در لیتر استفاده شد. تغذیه برگ با آسکوربیک اسید در تیمارهای تنش دیده در پایان روز ششم بعد از تنش صورت گرفت. نمونه‌برداری از برگ و ریشه ۷۲ ساعت بعد از تیمار تغذیه برگ انجام شد. بدین صورت که اندام‌های فوق پس از برداشت و شستشو با آب مقطر به طور جداگانه در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا زمان تجزیه‌های زیست شیمیایی در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۲۰).

عصاره‌گیری جهت سنجش فعالیت آنزیمی: بدین منظور 0.2 گرم بافت تازه گیاهی به وسیله هاون و دسته هاون همراه با 3 میلی لیتر بافر 25 میلی‌مولار سدیم فسفات با $\text{pH } 7.8$ عصاره‌گیری شد هم‌چنین همگن حاصل در 18000 دور در دقیقه و در دمای 4°C به مدت 30 دقیقه سانتریفیوژ شد سپس محلول شفاف رویی توسط کاغذ صافی فیلتر و برای سنجش فعالیت آنزیمی و محتوی پروتئین، در دمای 24 - درجه سانتی‌گراد و درون ویال‌های 1 میلی‌لیتری نگه‌داری شد (۱۹).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز به روش کک‌مک و هورست (۱۲) انجام شد. پس از ریختن $2/5$ میلی‌لیتر از بافر سدیم فسفات در ظرف کوارتزی دستگاه طیف سنج و اضافه نمودن میلی‌لیتر 500 آب اکسیژنه با غلظت 10 میلی‌مولار و عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش، تجزیه آب اکسیژنه با کاهش در جذب در طول موج 240 نانومتر به مدت یک دقیقه پیگیری شد و فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: سنجش فعالیت این آنزیم بر طبق روش گیانوپولیتیس و رایس (۲۰) انجام شد. مخلوط واکنش شامل: HEPES-KOH 50 میلی‌مولار بافر با $\text{pH } 7.8$ حاوی 0.1 میلی‌مولار، کربنات سدیم 50 میلی‌مولار با $\text{pH } 7.2$ ، ال-متیونین 12 میلی‌مولار و نیتروبلوتترازولیوم 75 میکرومولار، ریبوفلاوین 1 میکرومولار و 200 میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. پس از مخلوط کردن مواد

نیز گزارش شده است (۲۴).

از این رو هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تأثیر آسکوربیک اسید بر خنثی کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تأثیر بر فعالیت آنزیم‌ها در شرایط تنش شوری است.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر تنش شوری و تغذیه برگ با آسکوربیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی غشا و تجمع پرولین، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی (فاکتور اول شامل تنش شوری با دو سطح صفر و 200 mM و فاکتور دوم شامل آسکوربیک اسید در دو سطح صفر و 25 mM) با 3 تکرار در اتافک رشد آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس بر روی کلزا انجام گرفت. بذره‌های کلزا (*Brassica napus* L.) رقم اوکاپی بعد از ضدعفونی با هیپوکلرید به مدت 5 دقیقه و اتانول 96 درصد به مدت 30 ثانیه به خوبی با آب مقطر شسته و سپس بذرها در گلدان‌هایی حاوی خاک لومی شنی (60 درصد شن، 20 درصد رس و 20 درصد سیلت) کاشته شدند. گلدان‌ها (12 عدد) در اتافک رشد با دمای روزانه/شبانه $25/20^{\circ}\text{C}$ ، رطوبت نسبی 60 درصد و شدت نور 250 میکرومول بر مترمربع در ثانیه قرار داده شدند. پس از استقرار بوته‌ها تعداد آنها به 5 بوته در هر گلدان کاهش یافت.

آبیاری گلدان‌ها به طور روزانه با آبی با قابلیت هدایت الکتریکی حدود $7/5$ mS cm^{-1} انجام می‌گرفت. زمانی که گیاهچه‌ها به مرحله سه تا چهار برگگی رسیدند تیمار تنش و تغذیه برگ با آسکوربیک اسید اعمال شد. برای ایجاد تنش شوری، آبیاری گلدان‌ها با محلول NaCl با غلظت 200 mM به مدت 6 روز انجام شد (هدایت الکتریکی حدود $13/5$ mS cm^{-1}). هم‌چنین برای تغذیه برگ با آسکوربیک اسید از محلول 25 mM آسکوربیک اسید ساخت شرکت مرک آلمان استفاده

بیتس (۷) استفاده شد. نمونه‌ها بعد از عصاره‌گیری و آماده‌سازی هم‌زمان با نمونه‌های استاندارد در دستگاه طیف‌سنج قرار گرفتند و جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. غلظت پرولین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه برگ با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.

کلروفیل: برای سنجش غلظت کلروفیل از روش آرنون و استون ۸۰٪ استفاده شد (۲). جذب نوری کلروفیل a و b به ترتیب در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول مربوطه غلظت کلروفیل a و b و کلروفیل کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم برگ تازه به دست آمد.

از نرم‌افزار SAS برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده گردید و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال (P<۰/۰۵) استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس (جداول ۱ و ۲) و مقایسات میانگین (جداول ۳ و ۴) نشان داد که تنش شوری روی تمام صفات مورد ارزیابی به جز غلظت کلروفیل b و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ‌ها و محتوی مالون‌دی‌آلدئید در ریشه‌ها اثر معنی‌دار داشت. هم‌چنین تغذیه برگی آسکوربیک اسید در تمام صفات به جز فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز ریشه‌ها تأثیر معنی‌دار نشان داد. تنش شوری افزایش معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ‌ها در مقایسه با شاهد در پی داشت. کاربرد آسکوربیک اسید تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سطوح بدون تنش شوری نداشت در حالی که در شرایط شوری، سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ‌ها شد.

جدول‌های ۵ و ۶ اثرات اصلی تنش شوری و کاربرد آسکوربیک اسید را نشان می‌دهد. به طوری که ملاحظه می‌شود تنش شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در برگ و افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در ریشه شده است (جدول ۵ و ۶). این در حالی است که کاربرد آسکوربیک اسید سبب کاهش فعالیت

فوق در لوله‌های آزمایش پوشش‌دار، جهت جلوگیری از نفوذ نور و آغاز واکنش، واکنش با اضافه نمودن عصاره آنزیمی آغاز گردید در این حالت پوشش روی لوله‌ها برداشته شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور قرار داده شدند و پس از این مدت جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج قرائت شد. هم‌چنین از یک لوله آزمایش حاوی مخلوط واکنش به جزء عصاره آنزیمی به عنوان شاهد استفاده گشت. فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان گشت.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز بر طبق روش قناتی و همکاران (۱۹) تعیین شد. فعالیت آنزیمی با افزودن مقادیر مناسب از عصاره آنزیمی به مخلوط بافر، گایاکول با غلظت ۲۸ میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن با غلظت ۵ میلی‌مولار که در ظرف مخصوص دستگاه طیف‌سنج ریخته شده بود آغاز گردید و به مدت یک دقیقه تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان شد.

پروتئین: مقدار پروتئین برگ و ریشه نیز بر طبق روش ارائه شده به وسیله برادفورد (۱۱) تعیین شد. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از محلول برادفورد به همراه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی پس از مخلوط شدن کامل، در دستگاه طیف‌سنج قرار داده شد و جذب محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت شد. غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

تعیین پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء: بر اساس روش دی‌وس (۱۴) و با استفاده از اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشاء انجام گرفت. میزان مالون‌دی‌آلدئید با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=155 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}$) محاسبه شد.

پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین محتوای بافت برگ از روش

جدول ۱. تجزیه واریانس میانگین مربعات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تجمع پرولین و مالون‌دی‌آلدهید، غلظت کلروفیل و محتوای پروتئین برگ کلزا تحت تنش شوری و کاربرد آسکوربیک اسید

منابع تغییر	درجه آزادی	کاتالار	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	مالون‌دی‌آلدهید	پرولین	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	پروتئین
تکرار	۲	۷/۰۵۷	۱۰۲۹/۴۴۴	۱/۵۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۱۷	۰/۰۰۲	۰/۰۳۱	۰/۰۰۰۰۳
تنش	۱	۶۴۰/۰۶۴**	۱۳۶۳۹/۰۶۶	۱۰۷/۵۲**	۰/۱۷۱**	۰/۰۰۲**	۰/۱۲**	۰/۰۰۳	۰/۱۶۱**	۰/۱۷۰**
ویتامین	۱	۳۲/۰۷۸*	۱۰۹۷۰۶/۷۳۸*	۱۴/۸۲۹*	۰/۰۵۳*	۰/۰۰۰۰۴**	۰/۱۱۷**	۰/۰۰۴*	۰/۱۶۸**	۰/۰۱۷*
تنش × ویتامین	۱	۱۲۶/۳۶**	۷۲۳۱/۴۴۸	۴۴/۵۴۴**	۰/۰۴۶*	۰/۰۰۰۰۵**	۰/۰۹۸**	۰/۰۰۰۰۱	۰/۱۰۵*	۰/۰۶۹**
خطای آزمایشی	۶	۵/۱۸۴	۱۶۸۷۰/۷۷	۱/۳۵۸۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۶۳	۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۰۰۲۷

** و *: به ترتیب بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد، ۵ درصد هستند.

جدول ۲. تجزیه واریانس میانگین مربعات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مالون‌دی‌آلدهید و محتوای پروتئین ریشه کلزا تحت تنش شوری و کاربرد آسکوربیک اسید

منابع تغییر	درجه آزادی	کاتالار	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	مالون‌دی‌آلدهید	پروتئین
تکرار	۲	۱۶/۴۲۱	۶۱۹۶/۸۲۵	۹۴۴/۷۶۸	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۰۱
تنش	۱	۱۵۴۳/۱۴۷**	۵۶۱۲۰/۸۳۴**	۲۰۴۰۳/۹۰۲**	۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۴*
ویتامین	۱	۳/۸۷۶	۱۵۲۴۸/۲۱۸*	۴۵۱/۴۱۳	۰/۰۱۶*	۰/۰۰۰۶**
تنش × ویتامین	۱	۹۷/۵۸۴*	۱۰/۶۴۰	۱۳۴۸/۳۲	۰/۰۰۰۰۶	۰/۰۰۰۸**
خطای آزمایشی	۶	۱۵/۷۶۵	۲۴۶۵/۰۵۲	۳۷۰/۹۱۵	۰/۰۰۰۱۳	۰/۰۰۰۰۴

** و *: به ترتیب بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد، ۵ درصد هستند.

جدول ۳. مقایسات میانگین صفات مربوط به برگ کلزا تحت تنش شوری و کاربرد آسکوربیک اسید

تیمار	کاتالار	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	مالون‌دی‌آلدهید	پرولین	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	پروتئین
SOV0	۵/۵۶ ^c	۷۶۹/۸ ^a	۵/۰۳ ^c	۰/۲۵۳ ^b	۰/۰۰۶ ^c	۱/۴۱۲ ^a	۰/۴۲۲ ^{ab}	۱/۸۳۴ ^a	۰/۶۴۳ ^a
SOV1	۸/۷۸ ^c	۶۲۷/۷ ^a	۶/۶۶ ^c	۰/۲۴۳ ^b	۰/۰۰۷ ^c	۱/۴۲۹ ^a	۰/۴۵۵ ^a	۱/۸۸۴ ^a	۰/۵۶۶ ^{ab}
SIV0	۲۶/۶۶ ^a	۸۸۶/۳ ^a	۱۴/۸۷ ^a	۰/۶۱۶ ^a	۰/۰۴۸ ^a	۱/۰۳۱ ^b	۰/۳۸۳ ^b	۱/۴۱۴ ^b	۰/۲۵۳ ^c
SIV1	۱۶/۹۰ ^b	۶۴۶ ^a	۸/۷۹۳ ^b	۰/۳۵۸ ^b	۰/۰۲۲ ^b	۱/۴۱ ^a	۰/۴۳ ^{ab}	۱/۸۳۹ ^a	۰/۴۸ ^b

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهایی که با حرف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار نیستند. S بیانگر تنش شوری و ۷ بیانگر ویتامین است. اندیس‌های ۱ و ۰ به ترتیب نشانگر وجود یا عدم وجود فاکتور مربوطه هستند. فعالیت آنزیم‌ها بر حسب تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه، غلظت مالون‌دی‌آلدهید بر حسب میکرومول بر سانتی‌متر و غلظت پرولین، کلروفیل و پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه بیان گردیده است.

جدول ۴. مقایسات میانگین صفات مربوط به ریشه کلزا تحت تنش شوری و کاربرد آسکوربیک اسید

تیما	کاتالاز	سوپراکسیددیسموتاز	پراکسیداز	مالوندی آلدئید	پروتئین
S0V0	۹/۷۸ ^b	۳۳۴/۰۴ ^{bc}	۱۶۶/۵۴ ^b	۰/۲۹۷ ^{ab}	۰/۳۲ ^a
S0V1	۱۶/۶۲ ^b	۳۶۴/۶۳ ^c	۱۷۵/۴۷ ^b	۰/۲۳۷ ^b	۰/۳۱ ^a
S1V0	۳۸/۱۶ ^a	۴۷۲/۷ ^a	۲۷۰/۲۱ ^a	۰/۳۵۲ ^a	۰/۲۳ ^b
S1V1	۳۳/۵۹ ^a	۳۹۹/۵۲ ^{ab}	۲۳۶/۷۴ ^a	۰/۲۶۲ ^b	۰/۳۳ ^a

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهایی که با حرف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار نیستند. S بیانگر تنش شوری و ۷ بیانگر ویتامین است. اندیس‌های ۱ و ۰ به ترتیب نشانگر وجود یا عدم وجود فاکتور مربوطه هستند. فعالیت آنزیم‌ها بر حسب تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه، غلظت مالوندی آلدئید بر حسب میکرومول بر سانتی‌متر و پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه بیان گردیده است.

جدول ۵. اثرات اصلی تنش شوری و آسکوربیک اسید بر آنزیم‌های آنتی اکسیدان، تجمع پرولین و مالوندی آلدئید،

غلظت کلروفیل و محتوای پروتئین برگ کلزا

تیما	سطوح	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	مالوندی- آلدئید	پرولین	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	پروتئین
تنش شوری	۰	۷/۱۷۷ ^b	۶۹۸/۷۵ ^a	۵/۸۴۵ ^b	۰/۲۴ ^b	۰/۰۵۷ ^b	۱/۴۲ ^a	۰/۴۳ ^a	۱/۸۵ ^a	۰/۶۰ ^a
	۲۰۰ mM	۲۱/۷۸۳ ^a	۷۶۶/۱۸ ^a	۱۱/۸۳ ^a	۰/۴۸ ^a	۰/۰۳۵ ^a	۱/۲۲ ^b	۰/۴۰ ^a	۱/۶۲ ^b	۰/۳۶ ^b
ویتامین	۰	۱۶/۱۱ ^a	۸۲۵/۰۸ ^a	۹/۹۵ ^a	۰/۴۳ ^a	۰/۰۲ ^a	۱/۲۲ ^b	۰/۴۰ ^b	۱/۶۲ ^b	۰/۴۴ ^b
	۲۵ mM	۱۲/۸۴ ^b	۶۳۶/۸۵ ^b	۷/۷۲ ^b	۰/۳۰ ^b	۰/۰۱ ^b	۱/۴۱ ^a	۰/۴۴ ^a	۱/۸۶ ^a	۰/۵۲ ^a

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهایی که با حرف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح احتمال ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

جدول ۶. اثرات اصلی تنش شوری و آسکوربیک اسید بر آنزیم‌های آنتی اکسیدان، مالوندی آلدئید و محتوای پروتئین ریشه کلزا

تیما	سطوح	کاتالاز	سوپراکسیددیسموتاز	پراکسیداز	مالوندی آلدئید	پروتئین
تنش شوری	۰	۱۳/۲ ^b	۲۹۹/۳۴ ^b	۱۷۱/۰۰ ^b	۰/۲۶ ^a	۰/۳۱ ^a
	۲۰۰ mM	۳۵/۸۸ ^a	۴۳۶/۱۱ ^a	۲۵۳/۴۷ ^a	۰/۳۰ ^a	۰/۲۸ ^b
ویتامین	۰	۲۳/۹۷ ^a	۴۰۳/۳۷ ^a	۲۱۸/۳۷ ^a	۰/۳۲ ^a	۰/۲۷ ^b
	۲۵ mM	۲۵/۱۰ ^a	۳۳۲/۰۸ ^b	۲۰۶/۱۱ ^a	۰/۲۴ ^b	۰/۳۲ ^a

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهایی که با حرف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح احتمال ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

سه آنزیم فوق در برگ‌ها گردید. هم‌چنین تنش شوری مالون-دی آلدئید و پرولین در برگ‌ها را افزایش داد و در مقابل آسکوربیک اسید غلظت این موارد را کاهش داد. محتوای کلروفیل کل نیز با اعمال تنش شوری کاهش یافت (جدول ۵). شرایط تنش شوری یکی از مهم‌ترین ترکیبات سمی تولید شده ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسید هیدروژن است (۳۰). آنزیم کاتالاز این مولکول را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند و در طی این واکنش آسکوربات به عنوان دهنده هیدروژن عمل می‌کند (۲۳). در واقع چنین به نظر می‌رسد که افزایش آسکوربیک اسید خود عامل آنتی‌اکسیدان بوده که افزودن آن سبب کاهش احتمالی تنش و در نتیجه کاهش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز شده است. هم‌چنین افزایش فعالیت

هیدروژن با استفاده از آسکوربات بازی می‌کند. چرا که آسکوربات دهنده الکترون بوده و سبب کاهش پراکسید هیدروژن به آب می‌شود.

تغییری در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ‌ها در شرایط تنش و مصرف ویتامین مشاهده نشد. هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در ریشه‌ها در اثر تنش شوری افزایش یافت. ولی تغذیه برگی آسکوربیک اسید تأثیری بر میزان فعالیت این آنزیم‌ها در ریشه نگذاشت. اثر آسکوربیک اسید بر کاهش فعالیت آنزیم‌ها در برگ بیشتر از ریشه‌ها بوده است زیرا از آنجا که ریشه‌ها در مجاورت تنش شوری بوده‌اند تأثیرپذیری کمتری از خود نشان دادند. بالاتر بودن فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در ریشه نسبت به برگ‌ها نیز مؤید این مطلب است.

هم‌چنین مشاهده شد که مقدار پروتئین برگ‌ها و ریشه‌ها تحت تنش شوری کاهش یافت. رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده طی تنش شوری به علت میل ترکیبی زیادی که با پروتئین‌ها و لیپیدها دارند باعث تخریب غشای سلولی، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های سلول می‌شوند (۳۲). استفاده از آسکوربیک اسید، سبب افزایش محتوی پروتئین اندام هوایی و ریشه شد. در گیاهانی که در معرض تنش شوری قرار نگرفته بودند آسکوربیک اسید تأثیری در محتوی پروتئین‌های محلول آنها نشان نداد. زیرا اثر آسکوربیک اسید به صورت غیر مستقیم بوده و از تخریب پروتئین‌ها توسط رادیکال‌های اکسیژن جلوگیری کرد. گونه‌ها فعال اکسیژن عامل اصلی پراکسیداسیون لیپیدی هستند (۳۳). لیپید پراکسیداسیون و تولید مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخصی برای میزان خسارت تنش‌های اکسیداتیو به کار می‌رود (۲۵). پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه‌گیری محتوی مالون‌دی‌آلدهید در هر دو بافت سنجیده شد و یک افزایش در میزان مالون‌دی‌آلدهید به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا در اثر تنش شوری مشاهده گردید.

نتایج نشان داد که مصرف آسکوربیک اسید سبب کاهش در

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش می‌تواند به عنوان شاخصی برای افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در نظر گرفته شود. به طوری که افزایش فعالیت آنزیم‌های فوق در شرایط خشکی و شوری گزارش شده است (۲۷). در مطالعه حاضر تنش شوری سبب افزایش تولید این رادیکال‌های آزاد و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد. مشابه این نتایج در افزایش فعالیت آنزیم‌ها ناشی از تنش‌های اکسیداتیو در ارقام مختلف پنبه گزارش شده است (۳۴). با مصرف آسکوربیک اسید فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت این خود می‌تواند دلیلی بر از بین رفتن یا خنثی شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله آسکوربیک اسید و کاهش فعالیت آنزیم‌ها باشد. آسکوربیک اسید با دارا خواص آنتی‌اکسیدانی موجب پاکسازی یون سوپراکسید شده و از ایجاد پراکسید هیدروژن درون سلولی جلوگیری به عمل می‌آورد در نتیجه فعالیت آنزیم کاتالاز که تجزیه کننده پراکسید هیدروژن است کاهش می‌یابد. گزارش شده است که آسکوربیک اسید در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون در میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها یک نقش حفاظتی را در برابر گونه‌های فعال اکسیژن حاصل از تنش‌های زنده و غیر زنده بازی می‌کند (۳۰). هم‌چنین این ویتامین در ساختار آنزیم‌هایی مانند آسکوربات پراکسیداز که در تجزیه آب اکسیژنه نقش دارد به عنوان کوفاکتور عمل می‌کند (۲۸). اضافه کردن آسکوربیک اسید به صورت تغذیه برگی به محیط ریشه گوجه فرنگی ظرفیت جوانه‌زنی و حفظ گیاهچه را در شرایط تنش شوری افزایش داد و باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی غشای شد (۳۷).

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز که آنزیمی مؤثر در تجزیه پراکسید هیدروژن می‌باشد تحت تنش شوری در برگ‌ها افزایش پیدا کرد. در شرایط شوری میزان فعالیت این آنزیم در گیاهانی که با آسکوربیک اسید تیمار شده بودند به طور معنی‌داری کمتر از گیاهان تغذیه نشده بود. در شرایط بدون تنش شوری تغذیه برگی با آسکوربیک اسید تأثیری بر میزان فعالیت پراکسیداز برگ نداشت. پراکسیداز نقش مهمی را در پاکسازی پراکسید

اکسیداسیون چربی‌های غشای سلولی و کاهش محتوی مالون‌دی‌آلدئید در برگ‌ها و ریشه‌ها گردیده است. آسکوربیک اسید به وسیله خنثی‌سازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق مصرف این اکسیژن‌های فعال و تولید مونو‌دهیدروآسکوربات از بروز آسیب به سلول و چربی‌های غشا جلوگیری کرده و سبب کاهش در پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۵). مونو‌دهیدروآسکوربات توسط مونو‌دهیدروآسکوربات ریداکتاز به آسکوربات تبدیل می‌شود.

تجمع پرولین در برگ‌های گیاهان تنش دیده به طور معنی‌داری افزایش یافت. ولی در گیاهانی که علاوه بر اعمال تنش شوری آسکوربیک اسید نیز مصرف شده بود میزان پرولین کاهش داشت. استفاده از آسکوربیک اسید در گیاهان شاهد یا بدون تنش تأثیری بر محتوای پرولین نداشت. پرولین یک اسید آمینه قابل حل در آب بوده که دارای دو نقش اساسی در شرایط تنش است. ۱: افزایش سنتز و تجمع پرولین به عنوان یک پاسخ متابولیکی در گیاهان در شرایط تنش می‌باشد. ۲: افزایش پرولین محلول به عنوان یک نشانه برای سازگاری و افزایش مقاومت گیاهان به شرایط نامساعد است. هم‌چنین پرولین در تنظیم روابط آب درون سلولی نقش دارد. در شرایط تنش غلظت اسید آمینه پرولین نسبت به سایر اسیدهای آمینه افزایش می‌یابد، پرولین به عنوان مخزن ذخیره‌ای نیتروژن و یا مادهٔ محلولی که پتانسیل اسمزی سیتوپلاسم را کاهش می‌دهد عمل می‌نماید و گیاه را در تحمل به تنش یاری می‌کند (۱۰). پرولین پروتئین‌ها و غشاهای سلولی را از آسیب غلظت‌های زیاد یون‌ها حفظ می‌نماید.

آسکوربیک اسید با پاکسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب کاهش خسارت به اسیدهای چرب، پروتئین‌ها شده و در نتیجه اثر مخرب تنش را کاهش می‌دهد و لذا سنتز و تجمع پرولین به عنوان یک عکس‌العمل گیاه به تنش کاهش می‌یابد. در گیاهان علائم بروز تنش‌های اکسیداتیو شامل کاهش پروتئین‌ها، کاهش محتوای کلروفیل و نفوذپذیری غشا هستند که منجر به کاهش

فتوستنز و در نتیجه رشد گیاه می‌شوند (۴۱).

تنش شوری سبب افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در کلروپلاست شده و تخریب مولکول کلروفیل و غشای کلروپلاست را در پی دارد که خود منجر به کاهش فتوستنز و رشد می‌گردد. در گیاهان تنش دیده کاهش معنی‌داری در محتوای کلروفیل کل و کلروفیل a دیده شد. در چنین شرایطی مولکول کلروفیل به یک عامل فوتودینامیک برای کاهش اثر مخرب نیاز دارد (۴۰) در غیر این صورت تخریب کلروفیل توسط گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. هم‌چنین تخریب مولکول کلروفیل به وسیله جدا شدن زنجیره فیتولی از حلقه پورفیرین در اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا آنزیم کلروفیل‌لاز صورت می‌گیرد. در گیاهان حساس تجلی ژن‌های کد کننده آنزیم کلروفیل‌لاز افزایش می‌یابد (۹). آسکوربیک اسید به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی خود از تخریب کلروفیل جلوگیری کرده و به طور غیر مستقیم سبب افزایش آن شد چرا که در گیاهان در شرایط نرمال افزایش آسکوربیک اسید سلولی بر غلظت کلروفیل تأثیری نداشت.

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که آسکوربیک اسید به عنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌تواند اثرات مضر حاصل از تنش شوری را کاهش دهد و سبب بهبود رشد گیاه در شرایط تنش شود. از این رو می‌توان پیشنهاد نمود که مصرف این ماده در گیاهان تنش دیده عاملی برای کاهش تنش شود و به دنبال آن افزایش عملکرد می‌باشد و کاربرد آن به صورت تغذیهٔ برگی روی گیاهان در حال تنش در مزرعه توصیه می‌شود. البته تحقیقات بیشتری در خصوص استفاده از این ماده در سطح مزرعه به لحاظ مقایسه آن ضروری است.

منابع مورد استفاده

1. Anderson, M.D. T.K. Prasad and C.R. Stewart. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109: 1247-1257.
2. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-150.
3. Asada, K. and M. Takahashi. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis PP. 227-287. *In: Kyde, D.J., Osmond, C.B. and Arntun, C.J. (Eds.), Photoinhibition.* Elsevier Science, Amsterdam.
4. Asada, K. 1994. Production and action of active oxygen in photosynthetic tissues PP. 77-109. *In: Foyer, C.H., Mullineaux, P.M. (Eds.), Causes of Photooxidative Stress in Plants and Amelioration of Defence System.* CRC Press, Boca Raton.
5. Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
6. Basaga, H.S. 1989. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol.* 68:989-998.
7. Bates, L.S. R.P. Waldern and I.D. Teave. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
8. Becana, M., JF. Moran and I. Iturbe-Ormaetxe. 1998. Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil* 201: 137-147.
9. Benedetti, C.E. and P. Arruda. 2002. Altering the expression of the chlorophyllase gene *ATHCOR1* in transgenic Arabidopsis caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio. *Plant Physiol.* 128: 1255-1263.
10. Bian, Y. M., S.Y. Chen, S. K Liu and MY. Xie. 1988. Effects of HF on praline of some plants. *Plant Physiol. Commun.* 6: 19-21.
11. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Rev. Biochem.* 72: 248-254.
12. Cakmak, I. and W. Horst. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* 83: 463-468.
13. Comba, M.E. M.P. Benavides and M.L Tomaro. 1998. Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 665-671.
14. De Vos, C. H. Schat, M. De Waal, R. Vooijs and W. Ernst. 1991. Increased to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant silene cucubalus. *Plant Physiol.* 82: 523-528.
15. Dhindsa, R.A., P. Plumb-Dhindsa and T.A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: Correlated with increased permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Experimental Bot.* 126: 93-101.
16. Foyer, CH. and M.A Lelandais. 1996. Comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. *J. Plant Physiol.* 148: 391-398.
17. Foyer, C.H., M. Lelandais. and K.J. Kunert. 1994. Photooxidative stress in plants. *Plant Physiol.* 92: 696-717.
18. Foyer, CH. and J. Harbinson. 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. *In: Foyer CH and Mullneaux, P.M. (Eds), Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants.* CRC Press, Boca Raton, FL.
19. Ghanati, F. A. Morita and H.Yokota. 2002. Induction of suberin and increase of lignin content by excess Boron in Tobacco cell. *Plant Nutr.* 48: 357-364.
20. Giannopolitis, C. and S. Ries. 1977. Superoxid desmutase. I. Occurrence in higher plant. *Plant Physiol.* 59:309-314.
21. Gossett DR. EP. Millhollon and M. Cran-Lucas. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci.* 34: 706-714.
22. Gressel, J. and E. Galun. 1994. Genetic controls of photooxidant tolerance, PP. 237-274. *In: C.H. Foyer and P.M. Mullineaux (Eds.), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants.* CRC Press, Boca Raton.
23. Hegedus, A. S. Erdei and G. Horvath. 2001. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.* 160: 1085-1093.
24. Hernandez, J.A. A. Jimenez, P. Mullineaux and F. Sevilla. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23: 853-862.
25. Jagtap, V. and S. Bhargava. 1995. Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. exposed to high light, low water and high temperature stress. *J. Plant Physiol.* 145: 195-197.
26. Karpinski, S. H. Gabrys, A. Mateo B. Karpinska and P.M. Mullineaux. 2003. Light perception in plant disease defense signalling. *Current Opinion Plant Biol.* 6: 390-396.
27. Kukreja, S. A.S. Nandval, N. Kumar, S.K. Sharma, S.K. Sharma, V. Unvi and P.K Sharma. 2005. Plant water status, H₂O₂ scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by

- salinity. *Biol. Plantarum* 49: 305-308.
28. Lee, S.K. and A.A. Kader. 2000. Preharvest and post harvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Post Harvest. Biological Technol.* 20: 207-220.
 29. McKersie, B.D. S.R. Bowley and K.S. Jones. 1999. Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 119: 839-847.
 30. Noctor, G. and CH. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev of Plant Physiol and Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
 31. Pavet, V. E. Olmos, G. Kiddie, S. Mowla, S. Kumar, J. Antoniwi, M. E. Alvarez and CH. Foyer. 2005. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 1291-1303.
 32. Peltzer, D. E. Dreyer and A. Polle. 2002. Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species. *Plant Physiol. and Biochem.* 40: 141-150.
 33. Pignocchi, C. and CH. Foyer. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. *Current Opinion in Plant Biol.* 6: 379-389.
 34. Rajguru, S.N. and J.McD. Stewart. 1999. Vectoring of a bioactive peptide for cotton transformation. *Proc. Beltwide Cotton Conf., National Cotton Council, Memphis, TN.* pp. 598.
 35. Salin, M.L. 1991. Chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. - *Free Radical Research. Communication* 12-13: 851-858.
 36. Selote, D.S. and R. Khanna-Chopra. 2004. Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defense in rice panicles. *Plant Physiol.* 121: 462-471.
 37. Shalata, A. and P. M. Neumann. 2001. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *J. Experim. Bot.* 52: 2207-2211.
 38. Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication. *New Phytol.* 125: 27-58.
 39. Smirnoff, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Current Opinion Plant Biol.* 3: 229-235.
 40. Takamiya, K.I. T. Tsuchiya and H. Ohta. 2000. Degradation pathway (s) of chlorophyll: What has gene cloning revealed? *Trends Plant Sci.* 5: 426-431.
 41. Tompson, J.E., R.L. Ledge and R.F. Barber. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.* 105: 317-344.
 42. Tsugane, K. K. Koboyashi, Y. Niwa, Y. Ohba, K. Wada and H. Koboyashi. 1999. A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell* 11: 1195-1206.
 43. Upadhyaya, H. and S.K. Panda. 2004. Responses of *Camellia sinensis* to drought and rehydration. *Biologiae Plantarum.* 48: 597-600.
 44. Zhang, J.X. and M.B. Kirkham. 1996. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid and propyl gallate. *J. Plant Physiol.* 147: 489-493.