مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۰ شماره ۱ صفحه‌های ۱۰۱ تا ۱۱۲ (۱۳۹۸)
مقاله پژوهشی

ارزیابی الگوی بیان ژن نیترات ردوکتاز و ویژگی‌های کیفی و فیزیولوژیک در شرایط تنش اکسیداتیو در اسفناج[1]

Assessment of Nitrate Reductase Gene Expression Pattern and Qualitative and Physiological Characteristics Under Oxidative Stress Conditions in Spinach (*Spinacea oleracea* L.)

سعید نواب‌پور*، گزل کاظمی، ابوالفضل مازندرانی[2]

چکیده

اسفناج از جمله سبزی‌های مهم با خواص تغذیه‌ای بالا بوده و تولید آن در مناطق شمالی کشور جایگاه ویژه‌ای دارد. تنش‌های مختلف محیطی با رشدی فزاینده تهدیدی جدی بر جنبه‌های کیفی تولید این محصول محسوب می‌شوند. این تنش‌ها بیشتر با افزایش مقدار رادیکال‌های فعال اکسیژن موجب خسارت‌هایی جدی و حتی جبران‌ناپذیری می‌گردند. در این پژوهش با اعمال تنش اکسیداتیو مصنوعی توسط محلول‌پاشی نیترات نقره (غلظت‌های صفر، ۱ و ۲ میلی‌مولار) و اعمال پیش تیمار اسکوربیک‌اسید (صفر و ۲۰ میلی‌مولار) بر اسفناج (*Spinacea oleracea* L. (New Persian cultivar، ویژگی‌های رشدی مورد ارزیابی قرار گرفت. این ویژگی‌ها شامل پدیدگان ظاهری، سطح برگ، مقدار ماده خشک، سرعت رشد و ویژگی‌های کیفی شامل مقدار پروتئین، کلروفیل (a و b)، سطح تنش اکسیداتیو یاخته‌ای (سنجش TBARM و LOX) بود. صفات مورد نظر پس از اعمال تیمار در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی تیمارها ارزیابی گردید. این مطالعه در شرایط گلخانه در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. اعمال تیمارهای آزمایشی به‌صورت محلول‌پاشی و در محدوده آغازین بیشینه رشد رویشی صورت پذیرفت. نتیجه‌ها نشان داد محلول‌پاشی اسکوربیک‌اسید هیچ‌گونه اثر منفی بر ویژگی‌های مورد بررسی نداشت در حالی‌که محلول‌پاشی نیترات نقره منجر به کاهش چشمگیر در بیشتر ویژگی‌های مطلوب و هم‌چنین افزایش مقدار سطح اکسیداسیون یاخته‌ای و فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز گردید. نتیجه بررسی مقدار بیان نسبی ژن نیترات ردوکتاز نشان داد که کاربرد اسکوربیک‌اسید باعث افزایش مقدار بیان ژن نیترات ردوکتاز نسبت به شاهد گردید و از سویی کاربرد نیترات نقره مقدار بیان ژن نیترات ردوکتاز را کاهش داد. کاربرد محلول‌پاشی اسکوربیک‌اسید ۲ ساعت قبل از تیمار نیترات نقره منجر به بهبود نسبی ویژگی‌های مورد مطالعه گردید.

واژه‌های کلیدی: اسفناج، مقدار پروتئین، ویژگی‌های رشدی، مقدار کلروفیل، اکسیداسیون یاخته‌ای.

مقدمه

اسفناج با نام علمی *Spinacea oleracea* L. یکی از سبزی‌های مهم تیره چغندرسانان[3] است. با توجه به مصرف بالای این سبزی، تولید محصولی سالم حائز اهمیت می‌باشد. یکی از فاکتورهای مهم و مؤثر برای تشخیص مقدار سلامت این محصول، غلظت عنصرهای سنگین و نیترات در برگ آن می‌باشد زیرا سبزی‌های برگی قابلیت بالایی در جذب و ذخیرهٔ فلزهای سنگین

---

۱ - تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۱

۲- به‌ترتیب دانشیار، دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد و دانشجوی دکترای اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (s.navabpour@gau.ac.ir).

۳- Chenopodiaceae

دارا بودن انواع ویتامین‌ها، مواد معدنی، مواد پروتئینی و مواد سلولزی نقش بسیار مهمی در تغذیه و سلامتی انسان ایفا می‌کنند (۲۵). روند تغییرات اقلیمی از یک طرف و آلودگی‌های زیست محیطی از سوی دیگر، بستر مناسبی را برای تشدید تأثیر تنش‌های محیطی در جهت افزایش ریسک تنش اکسیداتیو فراهم آورده است؛ از این‌رو ضرورت انجام بررسی‌های مربوط به تأثیر تنش‌های اکسیداتیو دو چندان می‌نماید. شایان ذکر است که بسیاری از تنش‌های زنده و غیر زنده در سطح یاخته‌ای و مولکولی منجر به بروز تنش اکسیداتیو می‌شوند. از این‌رو انجام بررسی‌های مربوط به افزایش فرآیند اکسیداسیون یاخته‌ای (TBARM)[1] به عنوان وجه مشترک بسیاری از تنش‌های محیطی مورد تاکید می‌باشد. انواع اکسیژن فعال مانند ^{-}OH، O_2^{-}، H_2O_2 در یاخته‌های زنده طی متابولیسم طبیعی در طول واکنش‌های متوالی تبدیل O_2 به H_2O به وجود می‌آیند، ولی سطوح طبیعی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای پاکسازی گونه‌های فعال کافی است و آن‌ها را به متابولیت‌های بی‌ضرر تبدیل می‌کنند (۲). تنش اکسیداتیو زمانی بروز پیدا می‌کند که مقدار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[2] در یاخته از مقدار ترکیب‌های سمیت‌زدا و آنتی‌اکسیدان تجاوز کند که نتیجه آن انباشت بیش از حد انواع اکسیژن فعال در بافت‌های گیاهی می‌باشد. این امر منجر به آسیب به غشای یاخته و خسارت به انواع مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌گردد (۱۴، ۳۰، ۳۶).

فلزهای سنگین عنصرهایی هستند که دارای وزن اتمی ۶۳/۵۴ تا ۲۰۰/۵۹ گرم بر مول بوده و وزن مخصوص آن‌ها بیشتر از ۴ گرم بر سانتی‌متر مکعب است. این عنصرها در غلظت‌های بالا منجر به بروز آسیب‌های اکسیداتیو در گیاه می‌شوند. نقره یک فلز سمی و سنگین است که نقش زیست‌شناسانه ناشناخته‌ای دارد. نقره در غلظت‌های بالا خاصیت سمیت‌زایی برای گیاه دارد و منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود. هم‌چنین، این فلز می‌تواند جایگزین فلزهای ضروری در آنزیم‌ها و رنگدانه‌ها شود. در نتیجه، فرآیندهای فیزیولوژیکی متعدد از جمله فتوسنتز و رشد را به طور مستقیم و غیرمستقیم زیر تأثیر قرار می‌دهد (۹).

غشاهای یاخته‌ای و غشاهای درونی (غشاء کلروپلاست و غشاء میتوکندری) از دو لایه فسفولیپیدی تشکیل شده‌اند. یکی از واکنش‌هایی که در حضور انواع اکسیژن فعال سرعت می‌یابد، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است (۲۰). در شرایط تنش فلزهای سنگین، عنصرهای سنگین با فعال نمودن آنزیم لیپوکسیژناز (LOX)[3] موجب پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌شوند. این آنزیم به عنوان آغازکننده پراکسیداسیون لیپید شناخته می‌شود. با افزایش فعالیت این آنزیم و در نتیجه تجزیه اسیدهای چرب اشباع نشده، مالون‌دی آلدئید تولید می‌شود (۱۹). مقدار مالون‌دی آلدئید که در بافت‌ها زیر شرایط تنش به وجود می‌آید به عنوان شاخص مناسبی برای پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و برآورد تنش اکسیداتیو در گیاهان محسوب می‌شود (۲۳). در پژوهشی، Jiang و Hung (۱۵) افزایش غلظت MDA[4] را نشان دهنده افزایش واکنش پراکسیداسیون لیپیدها و اکسیدشدن اسیدهای چرب غشائی می‌دانند. افزایش پراکسیداسیون چربی و به دنبال آن کاهش شاخص پایداری غشاء یاخته در گیاهان گندم (۲۸)، لوبیا (۳۲) و باریک‌برگ‌های چمنی (۱۵) نیز گزارش شده است. تغییرهای روند سطح اکسیداسیون و مقدار رادیکال‌های اکسیداتیو از جمله وقایع مهم و مشترک تنش‌های محیطی محسوب می‌گردد (۳۵). با توجه به سرعت تبدیل رادیکال‌های یاد شده و پیچیدگی فعل و انفعالات زیست‌شیمیایی در این زمینه، اندازه‌گیری مقدار تغییرات اکسیداتیو بسیار مشکل و پرهزینه می‌باشد. در عین حال سنجش TBARM که در آن مالون دی‌آلدئید (محصول نهایی و با ثبات نسبی پراکسیداسیون چربی‌ها و اکسیداسیون یاخته‌ای)، اندازه‌گیری می‌شود، به عنوان شاخصی از مقدار اکسیداتیو در سطح یاخته‌ای و مولکولی قابل ارزیابی می‌باشد.

پژوهش‌های Chaoui و Ferjani (۶) نشان داده است که قرارگیری گیاهان در معرض غلظت‌های سمی فلزهای سنگین موجب کاهش مقدار فتوسنتز و زیست‌ساخت کلروفیل می‌شود، که در نتیجه آسیب بیشتر به فتوسنتز در اثر کاهش کلروفیل و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها رخ می‌دهد. پراکسیداسیون غشاهای کلروپلاست‌ها و تیلاکوئیدها باعث بر هم زدن شیب pH و نفوذپذیری غشا می‌شود و فتوسنتز را مختل و منجر به کاهش تولید در گیاهان می‌شوند (۳۵). افزایش مقدار تنش بخش‌های

۱- Thiobarbituric Acid Reactive Materia
۲- Reactive Oxygen Species
۳- Lipoxygenase
۴- Malondialdehyde

مختلف گیاه را زیر تأثیر قرار می‌دهد. به‌دلیل اهمیتی که برگ در رشد گیاه بر عهده دارد، این اندام گیاهی از جنبه‌های مختلف از جمله سطح، وزن و مقدار کلروفیل مورد بررسی قرار می‌گیرد (۳۳). انواع اکسیژن فعال سبب بی‌رنگ شدن یا از بین رفتن رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل و دیگر ترکیب‌های رنگدانه‌ای می‌شوند کاهش محتوای کلروفیل زیر تنش اکسیداتیو ممکن است به‌دلیل آهسته‌تر شدن ساخت و یا شکستن و تخریب سریع رنگدانه‌های کلروفیلی توسط آنزیم کلروفیلاز باشد (۱۸). طی پژوهشی Prassad (۲۷) بیان نمود در شرایط تنش فلزهای سنگین، کاهش غلظت کلروفیل تنها به‌علت جلوگیری از زیست‌ساخت کلروفیل نمی‌باشد بلکه جانشینی منیزیم موجود در ساختار کلروفیل به وسیله فلزهای سنگین از عمده‌ترین اثرهای تخریبی عنصرهای سنگین بر ساختار کلروفیل محسوب می‌گردد.

بافت‌های گیاهی، برای کنترل مقدار گونه‌های فعال اکسیژن و برای محافظت از یاخته‌های گیاهی در شرایط تنش دارای مجموعه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌ها با وزن مولکولی پایین مانند اسکوربیک‌اسید می‌باشند (۲۱). اسکوربیک‌اسید یکی از مهمترین و فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های قوی‌گیاهی است که در بسیاری از یاخته‌های گیاهی، اندامک‌ها و در آپوپلاست یافت می‌شود. این آنتی‌اکسیدان در بسیاری از فرایندهای یاخته‌ای مانند فتوسنتز، حفاظت نوری، رشد و تقسیم یاخته‌ای و مقاومت به تنش‌های محیطی نقش اساسی دارد و یکی از عامل‌های ایجاد کننده تعادل ردااکس[1]در یاخته است (۹). اسکوربیک‌اسید می‌تواند با انواع مختلف اکسیژن فعال ترکیب شده و از بسیاری از آسیب‌های ناشی از افزایش گونه‌های سمی اکسیژن مانند پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، تخریب پروتئین‌ها و تجزیه کلروفیل، کارتنوئیدها و توکوفرول بکاهد (۲۹). آسکوربات می‌تواند به‌طور مستقیم (بدون آنزیم‌های کاتالیزوری) و یا به صورت غیر مستقیم گونه‌های فعال اکسیژن را شکسته و به کمک توکوفرول به شکل احیا شده آن‌ها، پاک‌سازی کند. آسکوربات در اثر واکنش با اکسیژن فعال نسبت به ترکیب‌های آبدار دیگر بهتر می‌تواند بزرگ‌مولکول‌های مهم را از خسارت اکسیداتیو محافظت نماید (۳، ۸). این بررسی به منظور ارزیابی برخی ویژگی‌های رشدی شامل پدیدگان ظاهری، سطح برگ، مقدار ماده خشک، سرعت رشد و ویژگی‌های کیفی شامل مقدار پروتئین، مقدار کلروفیل (a و b)، سطح تنش اکسیداتیو یاخته‌ای (سنجش TBARM و LOX) و مقدار بیان ژن نیترات ردوکتاز در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی تیمارهای اکسیداتیو و پاد اکسیدان انجام شد.

مواد و روش‌ها

روش کاشت

آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار در گلخانه پژوهشی دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تیمارها شامل نیترات نقره در سه سطح (۰، ۱و ۲ میلی‌مولار) به‌عنوان عامل ایجاد تنش اکسیداتیو، اسکوربیک‌اسید به‌عنوان آنتی اکسیدان در دو سطح (۰ و۲۰میلی‌مولار) در رقم نیو پرشین[2] گیاه اسفناج بود. کاشت در گلخانه و در داخل شاسی‌هایی به ابعاد ۳۰×۳۰ با گنجایش حدود هفت کیلوگرم خاک صورت گرفت. در هر شاسی ده بذر بعد از گندزدایی کشت شد.

اعمال تنش اکسیداتیو

تنش اکسیداتیو در مرحله آغازین بیشینه رشد رویشی با محلول‌پاشی نیترات نقره در غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی‌مولار صورت گرفت. هم‌چنین به‌منظور بررسی روش افزایش مقدار مقاومت به تنش اکسیداتیو تعداد دیگری از -شاسی‌ها دو ساعت قبل از کاربرد نیترات نقره به‌طور جداگانه با غلظت‌های ۰ و ۲۰ میلی‌مولار اسکوربیک‌اسید به‌عنوان آنتی‌اکسیدان محلول‌پاشی گردید.

نمونه‌برداری برای ویژگی‌های ریخت‌شناسی

پس از رسیدن گیاهان به مرحله رشدی مورد نظر (بیشینه رشد رویشی، ۷ برگی)، برای اندازه‌گیری ویژگی‌های وزن خشک گیاه و سطح برگ از هر واحد آزمایشی در هر مرحله نمونه برداری دو بوته برداشت شد. تکرار نمونه‌برداری در زمان ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارها صورت گرفت. نمونه‌های برداشت شده برای تعیین وزن خشک، در آون ۷۰ درجه سلسیوس

۱- Redox Balance

۲- New Perssian

به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. برای محاسبه شاخص سطح برگ از دستگاه سطح برگ سنج DELTA-T و نرم‌افزار DIAS استفاده گردید. چهار بوته باقیمانده در هر واحد آزمایشی برای اندازه‌گیری دیگر ویژگی‌ها شامل کلروفیل، پروتئین، TBARM و LOX استفاده شد.

جدول ۱- امتیازدهی پدیدگان ظاهری بر اساس جدول زیر از ۱ تا ۹ صورت گرفت.

Table 1. Scoring by apparent phenotype based on the following table from 1 to 9.

امتیاز Score	پدیدگان ظاهری Phenotype appearance	
9	کنترل Control	
8	90 percent similar to control	۹۰ درصد شبیه کنترل
7	80 percent similar to control	۸۰ درصد شبیه کنترل
6	70 percent similar to control	۷۰ درصد شبیه کنترل
5	60 percent similar to control	۶۰ درصد شبیه کنترل
4	50 percent similar to control	۵۰ درصد شبیه کنترل
3	40 percent similar to control	۴۰ درصد شبیه کنترل
2	30 percent similar to control	۳۰ درصد شبیه کنترل
1	20 percent similar to control	۲۰ درصد شبیه کنترل

اندازه‌گیری کلروفیل

برای اندازه‌گیری کلروفیل از روش Porra و همکاران (۲۶) استفاده گردید. مقدار ۰/۵گرم نمونه برگ (به صورت منجمد) به‌طورکامل خرد و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ مخلوط شد. پس از سانتریفوژ مقدار جذب (A) در طول موج‌های ۶۴۶/۶ و ۶۶۳/۶ و ۷۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل BT 600) ثبت گردید. مقدار کلروفیل a (chla) و کلروفیل b (chlb) و کل کلروفیل بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

$Chla(mgml^{-1})=12.25A_{663.6}–2.55A_{646.6}$

$Chlb\ (mgml^{-1}) = 20.31A_{646.6} – 4.91A_{663.6}$

$کلChl\ (mgml^{-1}) = 16.76A_{646.6} – 6.34A_{663.6}$

اندازه‌گیری TBARM

در این بخش برای سنجش مقدار فرآیند سطح اکسیداتیو یاخته، مقدار مالون دی آلدئید (ماده نهایی که در فرآیند اکسیداسیون یاخته‌ای دارای ثبات بالایی است) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بدین منظور از روش تغییر یافته Hagege و همکاران (۱۱) به شرح زیر استفاده گردید. مقدار ۰/۴ گرم برگ تازه کوبیده و همگن گردید و به مقدار یک میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۱۰ درصد به آن افزوده شد. محلول با ۱۰ میلی‌لیتر استون شستشو شده و پس از ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۷۵۰g در دقیقه سانتریفیوژ شد. لکه ایجاد شده با ۵ میلی‌لیتر استون شستشو شد و چهار مرتبه دیگر سانتریفیوژ با همان سرعت تکرار شد. سپس مقدار سه میلی‌لیتر اسید فسفریک (۱٪) و یک میلی‌لیتر اسید تیوباربیوتیک (۰/۶٪) افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از آن واکنش با سرد کردن سریع متوقف و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۵۵۰۰g در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت مقدار جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۵۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل BT 600) خوانده شد.

اندازه‌گیری پروتئین

مقدار ۰/۴ گرم نمونه برگ منجمد به‌طورکامل پودر شد و در ۱/۵ میلی‌لیتر محلول بافر استخراج (50mM Tris [tris(hydroxylmethyl) aminomethane]-HCl , pH 7.5, 2mM EDTA, pH 8, 0.4% [7.7] mercaptoethanol) به‌طورکامل مخلوط و در دمای ۴ ^{o}c به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس با استفاده

از محلول سنجش پروتئین کوماسی (Coomasie protein assay reagent from Pierce chemical, Rackford,Il) اندازه‌گیری پروتئین انجام شد.

سنجش LOX

به منظور اندازه‌گیری مقدار LOX از روش Zhang و همکاران (۳۵) با تغییراتی استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ در آب سرد خالص مخلوط گردید. پس از آن با دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول فوقانی حذف گردیده و بقیه با کمک ستون ژل PD 10 خالص گردید. به مقدار مساوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM (pH = ۶) اضافه گردید. محلول حاصل شده با بافر نمک سدیم و اسیدلینولئیک (۸۰ nmol) همگن شده و با کمک اسپکتوفتومتر (مدل BT 600) در طول موج ۲۳۴ nm قرائت شد.

استخراج RNA و ارزیابی بیان ژن

در مراحل مختلف نمو، ۵ گرم برگ تیمارهای مختلف برای اندازه‌گیری مقدار بیان ژن نیترات ردوکتاز برداشت شد و در نیتروژن مایع منجمد و تا مرحله استخراج RNA به فریزر ۸۰- منتقل گردید. استخراج RNA توسط کیت Rnx-plus از نمونه‌های برگ یخ زده، صورت گرفت. کیفیت RNA استخراج شده، توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین گردید. برای بررسی کمی مقدار استخراج، از اسپکتروفتومتر استفاده گردید. مقدار جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد و درصد خلوص آن محاسبه گردید. ساخت cDNA با استفاده از تیمار DNase و جهت تست cDNA، از آغازگرهای عمومی استفاده نموده و به وسیله PCR، از روی cDNA تکثیر شد و کیفیت آن روی ژل آگارز بررسی گردید. برای ارزیابی الگوی تظاهر ژن نیترات ردوکتاز از دستگاه iQ5 شرکتBio Rad و کیت سایبر بیوپارس (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) استفاده شد که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد. این دستگاه در هر چرخه از فعالیت قادر است که مقدار محصول واکنش پلیمراز را نشان دهد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار GAPDH که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها می‌باشد استفاده شد. در این دستگاه از آغازگر اختصاصی طراحی شده بر اساس انتهای '۳ ژن نیترات ردوکتاز استفاده شد. ارزیابی مقدار بیان ژن توسط نرم‌افزار REST و با استفاده از Randomization test انجام شد و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید. رنگ مورد استفاده جهت ردیابی تکثیر نمونه، سایبر گرین[۱](کیت سایبر بیوپارس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) بود.

جدول ۲- توالی آغازگر ژن نیترات ردوکتاز و ژن خانه‌دار.

Table 2. Primer details of nitrate reductase and GAPDH house-keeping genes.

آغازگرها primers	نوکلئوتید شروع Start nucleotides	نوکلئوتید پایان Nucleotide end	توالی آغازگر Sequencing primer	طول محصول واکنش Reaction Product length	دمای ذوب Cº Melting temperature
Nir For	78	101	5′- CCTAYTGGCCGCCRCART -3’	116bp	62.4
Nir Rev	193	174	5′- CGTTGAACTTRCCGGT -3’		60.50
GAPDH For	113	132	5′-TCACCACCGACTACATGACC-3’	121bp	60
GAPDH Rev	233	214	5′-ACAGCAACCTCCTTCTCACC-3’		60

واکاوی آماری

مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی با واکاوی آماری و با استفاده از آزمون t[۲] و با نرم افزار SPSS صورت پذیرفت. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2013 رسم شد.

۱- SYBER Green ۲- T student

نتایج و بحث

تغییرات پدیدگانی

محلول‌پاشی تیمار نیترات نقره به‌عنوان عامل ایجاد کننده تنش اکسیداتیو به‌ویژه در غلظت ۲ میلی‌مولار تأثیر منفی چشمگیری بر پدیدگان ظاهری گیاه اسفناج ایجاد نمود. مقدار این تأثیر ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی به بالاترین حد رسید (جدول ۳). در حالی‌که محلول‌پاشی با غلظت ۱ میلی‌مولار در فاصله ۱۲ ساعت پس از محلول‌پاشی تفاوت چشمگیری نسبت به شاهد ایجاد ننمود، با این‌حال در زمان ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی افت پدیدگان ظاهری محسوس بود. اسپری پیش تیمار آنتی‌اکسیدان اسکوربیک‌اسید (۲۰ میلی‌مولار)، دو ساعت قبل از محلول‌پاشی $AgNO_3$ منجر به بهبود معنی‌دار وضعیت ظاهری برگ‌های اسفناج شد. به طوری که تیمار ترکیبی اسکوربیک‌اسید + نیترات نقره (۱ میلی‌مولار) تفاوت ظاهری مشهودی در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی با شاهد (محلول‌پاشی آب) نشان نداد (جدول ۳).

جدول ۳- تغییرات ظاهری برگ اسفناج (رقم نیوپرشین) در اثر محلول‌پاشی تیمار نیترات نقره ($AgNO_3$) و اعمال پیش‌تیمار اسکوربیک‌اسید (ASA 20mM).

Table 3. Appearance changes of spinach leaves (New Persian cultivar) treatment by spraying silver nitrate (AgNO3) and actions of ascorbic acid pretreatment (ASA 20mM).

تیمار (محلول‌پاشی) Treatment (spraying)	زمان پس از محلول‌پاشی (ساعت) Time after spraying (hour)		
	48	24	12
Control (water) شاهد (آب)	9	9	9
Ascorbic Acid اسکوربیک‌اسید	9	9	9
$AgNO_3$ 1mM	5	7	8
$AgNO_3$ 2mM	3	6	7
ASA + $AgNO_3$ 1mM	6	8	9
ASA + $AgNO_3$ 2mM	5	7	8

Rated based on the 1 and 9 respectively. score 9 in control, Points 1, 20% of eligible control surface and intermediate values any 10% difference in the take. 1 point of difference was not statistically significant by t test at $\alpha = 0.05$.

امتیاز دهی از ۱ تا ۹ انجام گرفت. امتیاز ۹ درحد شاهد، امتیاز ۱ حدود ۲۰٪ از نظر ظاهری مشابه شاهد و مقادیر حد واسط هریک ۱۰٪ اختلاف را در بر می‌گیرند. مقدار اختلاف ۱ امتیاز از نظر آماری بر اساس آزمون t در سطح $\alpha=0.05$ معنی‌دار است.

تغییرات مقدار ماده خشک و سطح برگ

روند تغییرات ماده خشک اندام هوایی و مقدار سطح برگ در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به این‌که بیشترین مصرف گیاه اسفناج از برگ آن می‌باشد، واکنش برگ به تنش اکسیداتیو و تیمار آنتی‌اکسیدان اهمیت قابل توجهی دارد. بر اساس نتیجه‌های حاصل مقدار ماده خشک و سطح برگ در نتیجه محلول‌پاشی اسکوربیک‌اسید به تنهایی هیچ اثر سویی بر مقدار ماده خشک و سطح برگ نداشت. با این وجود مقادیر ماده خشک و سطح برگ در نتیجه محلول‌پاشی نیترات نقره روند کاهشی نشان دادند که در برخی موارد این کاهش نسبت به شاهد معنی‌دار ($\alpha=0.05$) بود. در عین حال مقدار ماده خشک در تیمار ۱ میلی مولار نیترات نقره فقط در زمان ۴۸ ساعت پس از نمونه‌برداری نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان داد. در حالی‌که در تیمار ۲ میلی مولار نیترات نقره این تفاوت در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی تفاوت معنی‌داری را نسبت به شاهد ایجاد نمود (جدول ۴). در مورد سطح برگ نیز وضعیت به‌طورکامل مشابهی حاصل گردید. محلول‌پاشی پیش‌تیمار اسکوربیک‌اسید دو ساعت قبل از نیترات نقره موجب بهبود قابل ملاحظه در جلوگیری از تأثیر سوء نیترات نقره بر مقدار وزن خشک و بویژه سطح برگ شد (جدول ۲). این نتیجه‌ها با وضعیت پدیدگان ظاهری گیاه تشابه قابل توجهی نشان داد.

جدول ۴- تغییرات مقدار ماده خشک اندام هوایی (گرم) و سطح برگ (سانتی‌متر مربع) در واحد بوته در گیاه اسفناج (رقم نیوپرشین) زیر محلول‌پاشی تیمارهای نیترات نقره و اسکوربیک‌اسید.

Table 4. The changes of shoot dry mater (g) and leaf area (m^2) in spinach per plant (Newpersian cultivar) under spraying silver nitrate ($AgNO_3$) and pretreatment of ascorbic acid (ASA 20mM).

تیمار (محلول‌پاشی) Treatment (spraying)	سطح برگ Leaf area (m^2 per plant			وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (g)		
	۴۸ 48 (hour)	۲۴ 24 (hour)	۱۲ 12 (hour)	۴۸ 48 (hour)	۲۴ 24(hour)	۱۲ 12 (hour)
Control (water) شاهد (آب)	0.062	0.062	0.061	7.100	6.900	6.900
AscorbicAcid اسکوربیک‌اسید	0.067*	0.065*	0.060	7.200	7.100*	6.900
$AgNO_3$ 1mM	0.051*	0.061*	0.057*	6.200*	6.500*	6.600*
$AgNO_3$ 2mM	0.047*	0.050*	0.053*	6.000*	6.300*	6.500*
ASA + $AgNO_3$ 1mM	0.055*	0.060*	0.069	6.500*	6.700*	6.800
ASA + $AgNO_3$ 2mM	0.055*	0.054*	0.055*	6.100*	6.500*	6.600*

The asterisk represents a significant reduction compared to the control (α=۰/۰۵).

علامت ستاره نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد می‌باشد (α=۰/۰۵).

تغییر سرعت رشد محصول

سرعت رشد محصول به بهترین شکل مفهوم رشد را می‌رساند و سرعت تولید را در واحد سطح زمین در زمان مشخص ساخته و برهمکنش تنفس و فتوسنتز را نشان می‌دهد (۱۶). روند تغییرات سرعت رشد گیاه اسفناج زیر تأثیر تنش اکسیداتیو ناشی از محلول‌پاشی نیترات نقره و هم‌چنین تأثیر پیش‌تیمار اسکوربیک‌اسید در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به اختلاف جزیی تغییرات سرعت رشد در فاصله نمونه‌برداری‌های انجام شده ناشی از تأثیر تیمارهای آزمایشی، روند این تغییرات به طور متوسط در قالب میانگین اثر تیمار نیترات نقره (۱ و ۲ میلی‌مولار)، تیمار ترکیبی (پیش‌تیمار اسکوربیک‌اسید با هر یک سطوح نیترات نقره) و شاهد (متوسط محلول‌پاشی آب، اسکوربیک‌اسید) در شکل ۱ تنظیم شده است. لازم به ذکر است که چنانچه نتیجه‌های این پژوهش و برخی بررسی‌های دیگر نیز ثابت نموده است محلول‌پاشی اسکوربیک‌اسید در اصل هیچ اثر سویی بر فرآیندهای متابولیک گیاه ندارد (۱۲).

مقدار سرعت رشد محصول زیر تأثیر تیمار اکسیداتیو نیترات نقره روند کاهشی داشت. مقدار این کاهش در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان داد. این نتیجه تقریباً با آنچه که در مورد وزن خشک و سطح برگ حاصل گردید مطابقت داشت (جدول ۲). محلول‌پاشی پیش‌تیمار اسکوربیک‌اسید دو ساعت قبل از تیمارهای نیترات نقره تأثیر مثبتی بر مقدار سرعت رشد نشان داد و مقدار آن در زمان ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی در سطح ۵ درصد و در زمان ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی در سطح ۱۰ درصد اختلاف معنی‌داری را با تیمارهای نیترات نقره نشان داد (شکل ۱).

تغییرات مقدار پروتئین

تغییرات مقدار پروتئین زیر تأثیر محلول‌پاشی تیمارهای اکسیداتیو نیترات نقره و تیمارهای ترکیبی در شکل ۲ نشان داده شده است. در هر یک زمان‌های نمونه‌برداری پس از محلول‌پاشی تیمارهای آزمایشی بیشترین کاهش مقدار پروتئین مربوط به تیمار نیترات نقره ۲ میلی‌مولار بود. روند کاهش مقدار پروتئین ناشی از تأثیر نیترات نقره با گذشت زمان نمونه‌برداری شدت یافت به گونه‌ای که کمترین مقدار پروتئین در کل آزمایش در ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی نیترات نقره ۲ میلی‌مولار حاصل گردید. اعمال پیش‌تیمار اسکوربیک‌اسید از مقدار کاهش پروتئین ناشی از اثر نیترات نقره به‌طور چشمگیری جلوگیری نمود. این موضوع که در مورد بیشتر ویژگی‌های مطلوب دیگر نیز در این آزمایش رخ داد توسط برخی پژوهشگران دیگر نیز گزارش شده است (۳۴). همبستگی مثبت و معنی‌داری (r=۰/۸۳**) بین ویژگی‌های مقدار پروتئین و مقدار ماده خشک محاسبه گردید. این مسئله به‌عنوان یک نتیجه مطلوب و نقطه قوت در این مطالعه قابل ارزیابی می‌باشد.

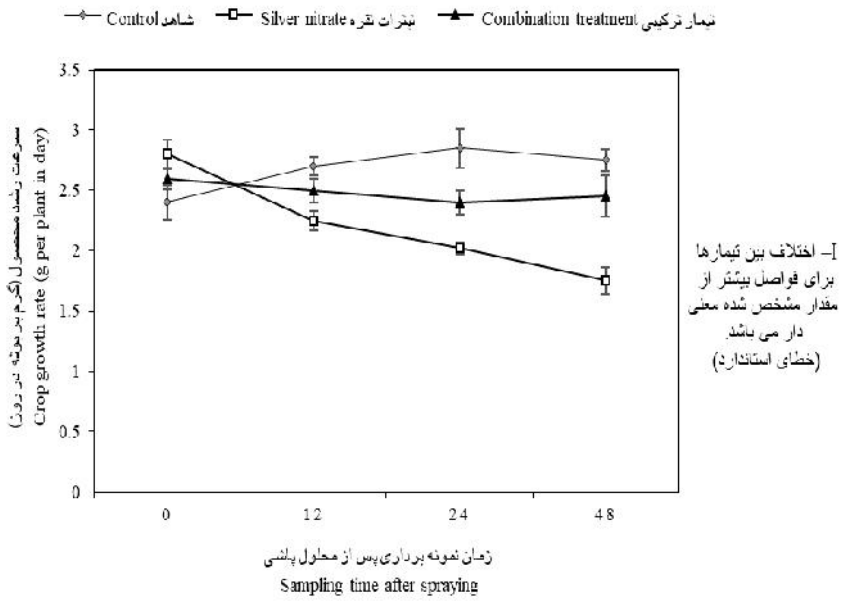

Fig. 1. The changes growth rate of spinach plant (the New persian) measured values affected by treatments, including spraying water + ascorbic acid as a control, silver nitrate levels 1 and 2 mM spraying treatments and combination treatments applied ascorbic acid pretreatment (mM 20) two hours before spraying silver nitrate (values are average).

شکل ۱- تغییرات مقدار سرعت رشد گیاه اسفناج (رقم نیوپرشین) در زمان‌های نمونه‌برداری زیر تأثیر تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی آب + اسکوربیک‌اسید به عنوان شاهد، محلول‌پاشی تیمارهای نیترات نقره غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار و تیمار ترکیبی: اعمال پیش‌تیمار اسکوربیک‌اسید (۲۰ mM) دو ساعت قبل از محلول‌پاشی نیترات نقره (مقادیر به صورت میانگین است).

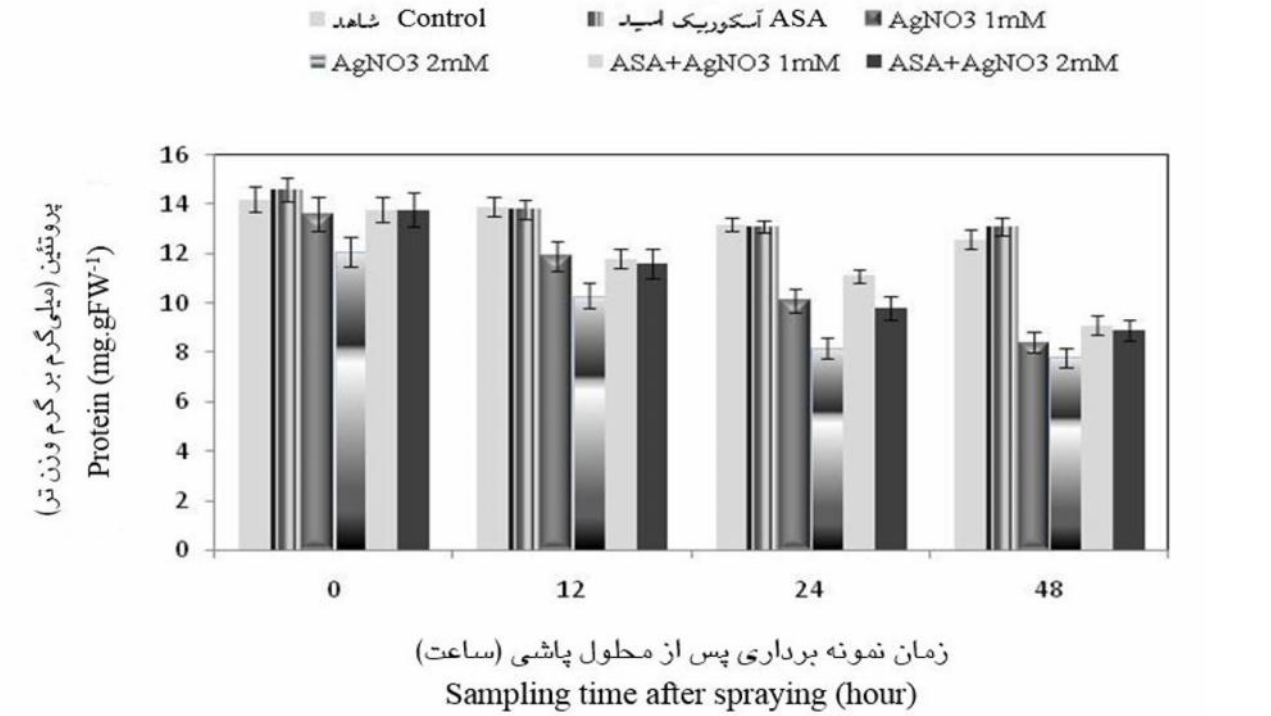

Fig. 2. Changes in the protein content of spinach leaves under the influence of the measured values after foliar spraying treatments. As mean values and standard error values shown above each column.

شکل ۲- تغییرات مقدار پروتئین برگ اسفناج زیر تأثیر محلول‌پاشی تیمارهای آزمایشی طی زمان‌های نمونه‌برداری پس از محلول‌پاشی. مقادیر به صورت میانگین بوده و مقدار خطای معیار بالای هر ستون نشان داده شده است.

مقدار کلروفیل

تغییرات مقادیر کلروفیل a و b زیر تأثیر تیمارهای آزمایشی در جدول ۵ آورده شده است. مقدار کلروفیل زیر تنش‌های اکسیداتیو کاهش می‌یابد. نتیجه‌های این پژوهش نیز نشان داد مقدار کلروفیل به شدت زیر تأثیر تیمارهای اکسیداتیو نیترات نقره کاهش یافت (جدول ۵). مقدار نسبی (نسبت به شاهد) و مطلق این کاهش در مورد کلروفیل a بیشتر از کلروفیل b بود. به نظر می‌رسد کلروفیل a حساسیت بیشتری به تنش نشان داده است. کاهش محتوای کلروفیل زیر تنش اکسیداتیو ممکن است به‌دلیل آهسته‌تر شدن ساخت و یا شکستن و تخریب سریع رنگدانه‌های کلروفیلی توسط آنزیم کلروفیلاز باشد (۱۸). فلزهای سنگین از طریق بازدارندگی دو آنزیم آمینولوولینیک‌اسید دهیدروژناز و پروتوکلروفیل ردوکتاز باعث کاهش زیست‌ساخت کلروفیل و تجزیه آن می‌شوند. در پژوهشی، Prasad (۲۸) بیان نمود در شرایط تنش فلزهای سنگین کاهش غلظت کلروفیل تنها به علت جلوگیری از زیست‌ساخت کلروفیل نمی‌باشد بلکه، جانشینی منیزیم موجود در ساختار کلروفیل به وسیله فلزهای سنگین از عمده‌ترین اثرات تخریبی عنصرهای سنگین بر ساختار کلروفیل محسوب می‌گردد.

جدول ۵- مقدار کلروفیل a و b نسبت به شاهد در برگ اسفناج (رقم نیوپرشین) پس از محلول‌پاشی به‌وسیله تیمارهای آزمایشی.

Table 5. Chlorophyll a and b compared with control values in spinach leaves (New Persian cultivar) after spraying by treatments.

تیمار (محلول‌پاشی) Treatment (spraying)	کلروفیل a Chlorophyll a			کلروفیل b Chlorophyll b		
	۱۲ (ساعت) 12 (hour)	۲۴ (ساعت) 24 (hour)	۴۸ (ساعت) 48 (hour)	۱۲ (ساعت) 12 (hour)	۲۴ (ساعت) 24 (hour)	۴۸ (ساعت) 48 (hour)
شاهد (آب) Control (water)	100	100	100	100	100	100
اسکوربیک‌اسید Ascorbic Acid	99	100	98	100	99	99
AgNO3 1mM	87*	83*	65*	91*	86*	70*
AgNO3 2mM	80*	73*	60*	85*	70*	66*
ASA + AgNO3 1mM	95	92	74*	96	93	79*
ASA + AgNO3 2mM	85*	81*	66*	93	80*	73*

Chlorophyll values (percent compared control) is on average. The asterisk represents a significant reduction compared to the control (05/0 = α).

مقادیر کلروفیل (درصد نسبت به شاهد) به صورت میانگین می‌باشد. علامت ستاره نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد می‌باشد (α=۰/۰۵).

محلول‌پاشی پیش‌تیمار اسکوربیک‌اسید، موجب القای مقاومت نسبی در گیاه از طریق کنترل سطح کلروفیل و عدم کاهش آن، گردید. به گونه‌ای که مقدار کلروفیل a و b در تیمار ترکیبی $ASA+AgNO_3$ 1mM در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان ندادند.

تغییرات سطح اکسیداسیون یاخته‌ای سنجش TBARM و لیپوکسیژناز (LOX)

همان‌طور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود با کاربرد اسکوربیک‌اسید مقدار آنزیم لیپوکسی‌ژناز در ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی نسبت به شاهد کاهش یافت و هم‌چنین سطح اکسیداسیون یاخته‌ای در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از محلول‌پاشی نسبت به مقدار آن در تیمار شاهد کاهش نشان داد ولی این اختلاف نسبت به شاهد معنی دار نبود. با کاربرد نیترات نقره هم در مقدار ۱ میلی مول و هم در مقدار ۳ میلی مول مقدار آنزیم لیپوکسیژناز و سطح اکسیداسیون یاخته‌ای با گذشت زمان افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. نکته قابل ملاحظه این بود که با کاربر توأم اسکوربیک‌اسید با نیترات نقره موجب کاهش معنی دار مقدار آنزیم لیپوکسی‌ژناز و سطح اکسیداسیون یاخته‌ای گردید که حاکی از نقش مثبت اسکوربیک‌اسید در تعدیل و ایجاد تحمل در گیاه به تنش می‌باشد.

جدول ۶- تغییرات مقدار سطح اکسیداسیون یاخته‌ای (TBARM) و فعالیت آنزیم لیپوکسی‌ژناز (LOX) در برگ گیاه اسفناج (رقم نیوپرشین) زیر تأثیر تیمارهای آزمایشی.

Table 6- Changes in the oxidation level cell (TBARM) and lipoxygenase activity (LOX) in spinach plant leaves (New Persian cultivar) affected by treatments.

تیمار (محلول‌پاشی) Treatment (spraying)	LOX (nmol $min^{-1}mg^{-1}$ protein)			TBARM (µmol g^{-1} FW)		
	۱۲ 12 (hour)	۲۴ 24 (hour)	۴۸ 48 (hour)	۱۲ 12 (hour)	۲۴ 24 (hour)	۴۸ 48 (hour)
شاهد (آب) Control (water)	1.9	2.7	2.5	3.5	3.9	3.3
اسکوربیک‌اسید Ascorbic Acid	2.1	2.5	2.6	4	3.7	3.1
AgNO3 1mM	5.9*	7.3*	9.1*	10.1*	13.9*	15*
AgNO3 2mM	8.1*	10.5*	11.9*	14.3*	17*	16.6*
ASA + AgNO3 1mM	4.1	5.7	8.1*	6.1	7.0	9.7*
ASA + AgNO3 2mM	5.9	8.9*	9.3*	8.1*	10.5*	11.3*

Data are mean. The asterisk represents a significant reduction compared to the control (05/0 = α).

داده‌ها به صورت میانگین می‌باشند. علامت ستاره نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد می‌باشد (α=۰/۰۵).

تغییرات بیان ژن نیترات ردوکتاز

نتیجه‌های بیان ژن نیترات ردوکتاز در شکل ۳ نشان داده شده است. نتیجه‌ها نشان داد با اعمال تیمار اسکوربیک‌اسید مقدار بیان این ژن نسبت به شاهد (آب) افزایش یافت. چنین به نظر می‌رسد که علت این افزایش به‌دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی اسکوربیک‌اسید بود. اما کاربرد تیمار نیترات نقره موجب کاهش مقدار بیان این ژن گردید و مقدار آن در شرایط کاربرد ۲ میلی مولار نیترات نقره نسبت به تیمار ۱ میلی مولار کاهش بیشتری نشان داد. کاربرد تیمار ترکیبی نیترات نقره و اسکوربیک‌اسید نیز سبب کاهش مقدار بیان ژن نیترات ردوکتاز نسبت به شاهد گردید اما این کاهش به مراتب کمتر از تیمار جداگانه نیترات نقره بود. اسکوربیک‌اسید یک ماده متابولیکی است که به مقدار فراوان در یاخته‌های گیاهی موجود می‌باشد و در بعضی مواقع مقدار آن تا ۱۰ درصد محتویات کربوهیدرات گیاه می‌رسد. اسکوربیک‌اسید نقش مهمی در پاسخ به تنش در گیاه ایفا می‌کند به گونه‌ای که این توانایی را دارد تا چندین گونه اکسیژن فعال از جمله سوپراکسید را پاکسازی نماید (۲۴). با توجه به نقش شناخته شده اسکوربیک‌اسید می توان بیان داشت در زمان کاربرد توأم آن با نیترات نقره نقش تعدیل کننده اثرات نیترات نقره را داشته و موجب شده مقدار بیان ژن نیترات ردوکتاز نسبت به شاهد کاهش کمتری پیدا کند.

تنش‌های مختلف محیطی شامل تنش‌های زنده و غیرزنده سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند. مهمترین این رادیکال‌های فعال شامل اکسیژن اتمی، یون سوپراکسید، پراکسیدهیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌باشند. افزایش غلظت این رادیکال‌ها موجب آسیب رساندن به لیپیدهای غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (۵، ۲۲). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های فعال اکسیژن دارای سازوکارهای ضداکسنده آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند (۱۳). با توجه به اهمیت شادابی و طراوت برگ اسفناج در زمان مصرف، ارزیابی مقدار شاخص اکسیداتیو یاخته‌ای (TBARM) که مبین مقدار پیشرفت فرایند پیری و تغییر در بافت یاخته‌ای می‌باشد حائز اهمیت بسیاراست. درحال حاضر بررسی‌های وسیعی روی سیستم‌های دفاع ضداکسنده زیر شرایط نامساعد محیطی صورت گرفته است. Hodges و Forney (۱۲) و Hsu و Kao (۱۳) گزارش کردند که در زمان پیری فعالیت آنزیم‌های اکسنده در برگ‌های اسفناج کاهش می‌یابد. اسکوربیک‌اسید در مسیر اسکوربات- گلوتاتیون در پاک‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال در کلروپلاست (۹) و سیتوسول (۳) نقش داشته و به عنوان عامل اصلی عمل می‌کند. مشخص شده که اسکوربیک‌اسید به‌طور مستقیم می‌تواند یون سوپراکسید و هیدروکسیل را خنثی کند (۳).

یکی از سیستم‌های آنزیمی مهم در رابطه با تغییر چربی‌های غشاهای یاخته‌ای، سیستم آنزیمی لیپوکسی‌ژناز (LOX) می‌باشد. آنزیم لیپوکسی‌ژناز واکنش ترکیب بین مولکول اکسیژن و اسیدهای چرب غیر اشباع و تولید هیدروپروکسیدهای اسیدچرب اشباع نشده را کنترل می‌کند (۱۰). اکسیداسیون اسیدهای چرب ناشی از فعالیت این آنزیم موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (۱۰). گزارش گردیده است که تنش موجب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند

پراکسیدهیدروژن در یاخته‌های گیاهی شده (۳۲) و به دنبال آن پراکسیدهیدروژن به‌دست آمده موجب افزایش آنزیم لیپوکسی‌ژناز در یاخته‌های گیاهی می‌شود (۱۸).

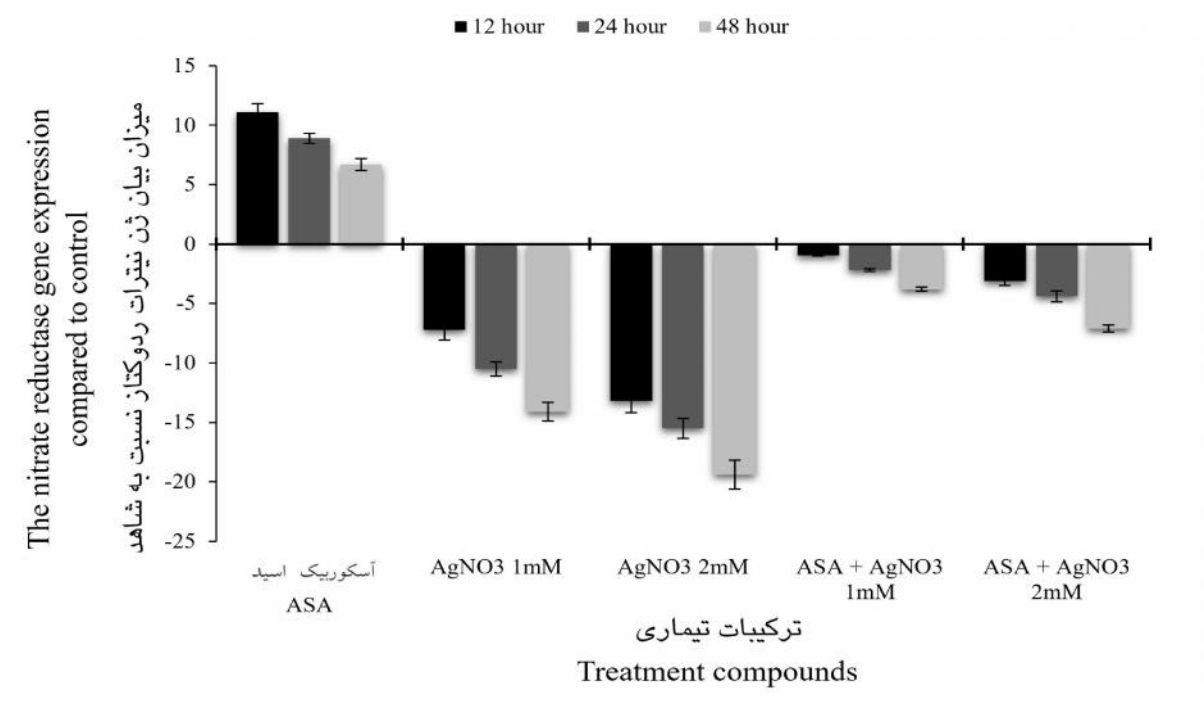

Fig. 3. The nitrate reductase gene expression compared to control at different times after sampling

شکل ۳- مقدار بیان ژن نیترات ردوکتاز نسبت به شاهد در زمان های مختلف بعد از نمونه برداری.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش مقدار شاخص زیست‌شیمیایی سنجش سطح اکسیداسیون یاخته‌ای (TBARM) زیر تأثیر تیمارهای اکسیداسیونی نیترات نقره افزایش یافت. این مسئله در غلظت ۲ میلی‌مولار نیترات نقره بیشتر بود. جالب این‌که اعمال پیش‌تیمار اسکوربیک‌اسید قبل از محلول‌پاشی نیترات نقره به نحو مؤثر و معنی‌داری موجب کاهش مقدار TBARM در تیمارهای ترکیبی گردید. به گونه‌ای که تیمار ترکیبی $ASA+AgNO_3$ 1mM در دو زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از محلول‌پاشی تفاوت معنی‌داری در مقدار TBARM با شاهد نشان نداد. مقدار فعالیت آنزیم لیپوکسی‌ژناز نیز از تیمارهای تنش‌زای نیترات نقره تأثیر پذیرفت و مقدار LOX به‌طور معنی‌داری در تیمارهای $AgNO_3$ نسبت به شاهد افزایش یافت و پیش‌تیمار اسکوربیک‌اسید در کاهش سطح LOX کاملا مؤثر بود.

References منابع

1. Ainswor, S. 1990. Vegetable production training manual. Asian Vegetable Search and Development Center. AVRDC, Publication. 447pp.
2. Almeselmani, M., P.S. Deshmukh, R. K. Sairam, S. R. Kushwaha and T. P. Singh. 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. Plant Sci.171: 382-388.
3. Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase- hydrogen peroxide-scavering enzyme in plants. Physiol. Plant. 85:41-235.
4. Asada, K. 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50:601–639.
5. Becana, M., J. F. Moran and I. Iturbe-Ormaetxe. 1998. Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. Plant Soil. 201:137-147.
6. Chaoui, A and E. Ferjani. 2005. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradiation in leaves of Pea (*Pisium sativum* L.) seedlings. Competes Rendus Biol. 328:23-31.

7. Fergusson, J. 1990. The heary elements: chemistry, environmental impact and health effects. Mc Graw Hill, Newyork.
8. Foyer, C. 1993. Ascorbic acid, CRC Press, Boca Raton, Pp: 31-58.
9. Gallego, S. M., M. P. Benavides and M. L. Tomaro. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunfiower leaves: Evidence for involvement of oxidative stress. Plant Sci. 121: 151-159.
10. Grechkin, A. N. and A. Tarchevsky. 1999. The lipoxygenase signaling system. Russ. J. Plant Physiol. 49(1): 114-123.
11. Hagege, D., A. Nouvelot, J. Boucard and T. Gaspar. 1990. Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. Phytochem. Anal. 1:86-89.
12. Hodges, D. M and C. F. Forney. 2000. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. J. Exp. Bot. 344:645-655.
13. Hsu, S.Y and C. H. Kao. 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol and antioxidant enzymes in rice leaves. Plant Growth Reg. 39: 83-90.
14. Inze, D and M. V. Montago. 2002. Oxidative stress in plants, Taylor and Froncis: PP: 321.
15. Jiang, Y and B. Hung. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turf grasses in relation to antioxidant metabolism lipid peroxidaion. Crop Sci. 41:436-442.
16. Karimi, M. M and K. H. M. Siddique. 1991. Crop growth and relative growth rates of old and modern wheat cultivars. Aust. J. Agr. Res., 42:13-20.
17. Maccaron, M., G. V. Zadelhoff, G. A. Vegdink, F. G. Vliegenthart and A. Finazzi- Agro. 2000.Early activation of lipoxygenase in lentil root protoplasts by oxidative stress induced programmed cell death. Eurp. J. Biochem. 267: 5078 – 5084.
18. Mauchamp, A. and M. Methy. 2004. Submergence–induced damage of photosythetic apparatus in *Phragmite saustralis*. Environ. Exp. Bot. 51: 227-235.
19. Mittler, R. 2002. Oxidative stress. Antioxidant and stress tolerance. Ann. Rev. Plant Sci., 7: 405-415.
20. Nasibi, F. 2003. The effect of different UV bands on some growth parameters and induction of oxidative stress in canola (*Brassica napus*). Thesis of M.SC. Bahonar university of Kerman.
21. Niaee fard, S. A. S. J. Tabatabaee, J. Hajilou, M. Seifi kalhor. 2008. Vegetative and physiological responses of olive trees to antioxidants and salinity. J. Hort. Sci. Technol. 9(4): 275-284.
22. Noctor, B and C. H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49: 249-279.
23. Ozdamir, F., M. Bor, T. Demiral and I. Turkan. 2004. Effect of epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation. Proline content and antioxidative system of rice (*Oriza Sativa* L.) under salinity stress. Plant Growth Reg. 42: 203-211.
24. Padh, H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. Biocem. Cell Biol. 68:1166-1173.
25. Peivast, GH. A. 2002. Olericulture. Agriculture of Science Press. 348 P.
26. Porra, R. J., W.A. Thompson and P. E. Kriedmann. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochem Biophys Acta., 975: 384-394.
27. Prasad, M. N. V. 1995. The inhabitation of maize leaf chlorophylls, carotenoids and gas exchange functions by cadmium. Photosynthetica, 31: 635-640.
28. Sairam, R. K and D. C. Saxena. 2000. Oxidative stress and antioxidant in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. J. Agron Crop Sci. 184: 55-61.
29. Smirnoff, N and G. L. Wheeler. 2000. Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. Critic. Rev. Plant Sci. 19(4): 267-290.
30. Stadtman, E. R. 1986. Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turn over, gaining and neutrophil function. Trends Biochem., Sci., 11: 2-11.
31. Sudhakar, C., A. Lukshmi and C. Giridarakumar. 2001. Changes in antioxidant enzymes efficacy in two high yielding genotypes of mulberry under NACL salinity. Plant Sci. 161:613-619.
32. Turkan, I. M., F. Bor, M. Ozdemir and H. Koca. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Sci., 168: 223-231.
33. Wang, D., M. C. Shannon and C. M. Grieve. 2001. Salinity reduces radiation absorption and use efficiency in soybean. Field Crops Res. 69: 267-277.
34. Wang, Y. T. C. Y. Yang, Y. T. Chen, Y. Lin and J. F. Shaw. 2004. Characterization of senescence-associated proteases in postharvest broccoli florets. Plant Physiol. Bioch. 42:663-670.
35. Zhang, J and M. B. Kirkham. 1996. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedling as affect ascorbic acid, benzoic acid, and prophyle gallate. J. Plant Physiol. 149: 489-493.
36. Zhong, L., Y. Xu and J. Wang. 2009. DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. African J. Biotech. 8 (22): 6201-6207.

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 20 (1): 101-112 (2019)
Research article

Assessment of Nitrate Reductase Gene Expression Pattern and Qualitative and Physiological Characteristics Under Oxidative Stress Conditions in Spinach (*Spinacea oleracea* L.)

S. Navabpour*, G. Kazemi and A. Mazandarani[1]

Spinach is one the most important vegetables with high qualities that is widely cultivated in northern region of Iran. Environmental stresses are excessively grown up and they are serious threat in quality of cultivated spinach. These stresses generally cause dreadful damages in plant cells via increasing reactive oxygen species (ROS). In this study oxidative stress has been applied by using $AgNO_3$ (0, 1, 2 mM) spray, also pre-treatment of ascorbic acid (0, 20 mM) was used followed by $AgNO_3$ treatment. The measured traits included phenotypic performance, leaf area, dry mass, growth index, leaf protein, chlorophyll and oxidative cellular levels (LOX and TBARM assay) during sampling period (12, 24, 48 h) after sprayed treatments. The New Persian cultivar was used in greenhouse condition with 6 treatments in RBCD design with 4 replications. The results showed spraying ascorbic acid had no detrimental effect on studied traits. Whereas, sprayed of $AgNO_3$ caused some decline in the amount of most traits as well as some increase in the content of TBARM and LOX. Nitrate reductase gene expression relatively increased by ascorbic acid compared with control (water spray). Whereas, applying $AgNO_3$ significantly decline nitrate reductase gene expression. However, applying pre-treatment of ascorbic acid followed by $AgNO_3$ after 2 h retrieved mostly all studied traits.

Keywords: Cellular oxidation, Chlorophyll content, Growth parameters, Protein content, Spinach.

1. Associate Professor, Former M.Sc. Student and Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.

* Correspond author Email: (s.navabpour@gau.ac.ir).