

تاثیر کاربرد اپی براسینولید و متیل جاسمونات بر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در انگور ارقام فلیم و پرلت در شرایط تنش شوری

سیده ندا سیف^{۱*}، عنایت الله تفضلی^۲، علیرضا طلایی^۳ و سیده گلنار سیف^۴

۱- دکترای تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران ۲- دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت ۳- دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی کرج ۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس
*نویسنده مسئول: nedaseif663@yahoo.com

چکیده

شوری یکی از فاکتورهای محدود کننده کشت و پرورش انگور در مناطق خشک و نیمه خشک است. محققان نشان داده اند که برخی از تنظیم کننده های رشد گیاهی مثل جاسمونیک اسید و براسینواستروئید، مقاومت گیاه را به برخی از تنش های محیطی مثل خشکی و شوری بالا می برند. از این رو به منظور بررسی تاثیر دو ماده اپی براسینولید (EBR) و متیل جاسمونات (MeJA) بر ویژگی های بیوشیمیایی دو رقم انگور (فلیم سیدلس و پرلت) در شرایط تنش شوری، پژوهشی گلدانی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. این پژوهش در قالب دو آزمایش جداگانه انجام گرفت. در آزمایش اول قلمه های ریشه دار شده هر دو رقم با ۵ سطح شوری (شوری در آب آبیاری) ۰ (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم و ۳ سطح متیل جاسمونات (محلول پاشی برگساره ای) ۰، ۳ و ۶ میلی مولار تیمار گردیدند. در آزمایش دوم قلمه های ریشه دار شده هر دو رقم با همان سطوح شوری مشابه آزمایش اول و ۳ سطح اپی براسینولید (محلول پاشی برگساره ای) ۰، ۳ و ۶ میکرو مولار تیمار شدند. نتایج نشان داد که با افزایش سطوح شوری در آب آبیاری، میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان تا سطح شوری ۷۵ میلی مولار افزایش یافت و با افزایش بیشتر سطح شوری، کاهش یافت. در شرایط تنش شوری، کاربرد ۲۴- اپی براسینولید منجر به افزایش فعالیت آنزیم های اکسیدان شد.

کلمات کلیدی: انگور، تنش شوری، آنزیم های آنتی اکسیدان، اپی براسینولید، متیل جاسمونات

مقدمه

در معرض قرار گرفتن گیاهان با استرس شوری منجر به تغییرات در اکثر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و منجر به اختلال رشد و نمو گیاه می شود. براسینواستروئیدها پاسخ به تنش را به دلیل توالی پیچیده از واکنش های بیوشیمیایی مثل فعال سازی یا کاهش واکنش های آنزیمی کلیدی، القای سنتز پروتئین و تولید ترکیبات شیمیایی دفاعی مختلف تنظیم می کنند. (Bajguz and Durigan-Sanchez, Hayat, 2009). همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که تیمار با ۲۴- اپی براسینولید اثر سمیت ایجاد شده توسط کلرید سدیم را از طریق افزایش متابولیسم کربوهیدرات، فعالیت آنتی اکسیدان ها و تجمع اسمیت ها در نخود فرنگی کاهش می دهد. جاسمونات ها ترکیبات منشاء گرفته شده از چربی هستند که در پاسخ های گیاهی به تنش های زنده و غیرزنده و همچنین در رشد و نمو گیاه نقش دارند که با کاربرد خارجی، می توانند تغییرات فیزیولوژیکی مربوط به پاسخ به استرس را القا کنند (Parra-Lobato, Francisco, 2011). همکاران در سال ۲۰۰۹ به این نتیجه دست یافتند که کاربرد خارجی متیل جاسمونات می تواند از طریق تنظیم فعالیت های آنزیم آنتی اکسیدان در فرایندهای تنش اکسیداتیو نقش داشته باشد که این نتایج نقش متیل جاسمونات را در پاسخ گیاه به تنش شوری مشخص می سازد. در شرایط طبیعی رشد (بدون تنش)، گونه های اکسیژن فعال، توسط سیستم های آنتی اکسیدانی گیاه حذف شده، اما زمانی که، گیاهان در شرایط تنش شوری شدید قرار می گیرند، میزان تولید رادیکال های آزاد اکسیژن، به شدت افزایش یافته، به طوری که بر میزان فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی غلبه نموده، در نتیجه تنش

اکسیدی رخ می‌دهد، که در نهایت، باعث صدمه به پروتئین‌ها، DNA، RNA و غشاء یاخته‌ای شده و پراکسیداسیون لیپیدی اتفاق می‌افتد (Foyer et al., 1991). برای مقابله با سمیت گونه‌های فعال اکسیژن و غلبه بر خسارت اکسیداتیو در شرایط تنش، بویژه تنش شوری، گیاهان سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی را که عمدتاً شامل سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و پراکسیداز می‌شود، توسعه می‌دهند که مقاومت را به فاکتورهای تنش‌ی مختلف بالا می‌برند (Shahid et al., 2011b; Sekmen Es et al., 2012). Shahid و همکاران (۲۰۱۴) عنوان کردند که NaCl می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدان را افزایش دهد و نتایج آنها نشان داد که تیمار اپی‌براسینولید فعالیت آنتی‌اکسیدان را هم در گیاهان نخود فرنگی تحت تنش و هم گیاهان شاهد و در هر دو رقم حساس و مقاوم افزایش می‌دهد. با توجه به این که شوری از عوامل محدود کننده رشد و تولید محصول در بسیاری از گیاهان محسوب می‌شود، بنابراین تاثیر متقابل شوری با متیل جاسمونات و نیز شوری با اپی‌براسینولید بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دو رقم انگور فلیم سیدلس و پرلت بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب دو آزمایش جداگانه انجام گرفت. در آزمایش اول قلمه‌های ریشه‌دار شده هر دو رقم با ۵ سطح شوری (شوری در آب آبیاری) صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم و ۳ سطح متیل جاسمونات (محلول‌پاشی برگساره‌ای) صفر، ۳ و ۶ میلی مولار تیمار گردیدند. در آزمایش دوم قلمه‌های ریشه‌دار شده هر دو رقم با همان سطوح شوری مشابه آزمایش اول و ۳ سطح اپی‌براسینولید (محلول‌پاشی برگساره‌ای) صفر، ۳ و ۶ میکرو مولار تیمار شدند. جهت اعمال تنش شوری از آب حاوی کلرید سدیم با درجه خلوص ۹۹/۵٪ (MERCK) در پنج غلظت ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار و به مدت ۱ ماه استفاده شد. همزمان با تیمار شوری، تیمارهای اپی‌براسینولید (در غلظت‌های صفر، ۳ و ۶ میکرومولار) و متیل جاسمونات (در غلظت‌های صفر، ۳ و ۶ میلی مولار) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) و به همراه توین ۲۰ با غلظت ۰/۱ درصد به صورت محلول‌پاشی برگگی و ۲ بار با فاصله ۱۴ روز اعمال شد. برای تهیه عصاره گیاهی جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز از روش Kang و Saltiveit در سال ۲۰۰۱ با اندکی تغییرات استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۴)، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) با اندکی تغییرات و میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Updhyaya و همکاران (۱۹۸۵) اندازه‌گیری شد.

نتایج

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان آنزیم کاتالاز، با افزایش میزان شوری تا سطح ۷۵ میلی مولار، افزایش و در سطح ۱۰۰ میلی مولار مجدداً کاهش یافت. در فلیم سیدلس، میزان آنزیم، در سطوح شوری ۵۰ و ۷۵ میلی مولار، به ترتیب ۲/۷۸ و ۳/۲۲ برابر و در شوری ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۹۴ برابر، در مقایسه با شاهد شد، اما در پرلت میزان آنزیم، در سطح شوری ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار، به ترتیب ۲/۱۸ و ۲/۳ و ۱/۵۷ برابر، در مقایسه با شاهد شد. استفاده از اپی‌براسینولید، تاثیر معنی‌داری، بر افزایش آنزیم کاتالاز داشت. با کاربرد اپی‌براسینولید، با غلظت ۶ میکرومولار، در پرلت میزان آنزیم کاتالاز در شوری ۵۰ میلی مولار، ۱/۴۳ برابر، در شوری ۷۵ میلی مولار ۱/۷۱ برابر و در شوری ۱۰۰ میلی مولار ۱/۱۹ برابر شاهد شد اما در فلیم سیدلس در تیمار مشابه اپی‌براسینولید، میزان آنزیم در سطوح شوری ۵۰ و ۷۵ میلی مولار، به ترتیب ۱/۶۲ و ۱/۷۸ برابر و در شوری ۱۰۰ میلی مولار ۱/۳۴ برابر شاهد شد. کاربرد متیل جاسمونات، تاثیر مثبتی بر افزایش میزان آنزیم کاتالاز، در هر دو رقم داشت. با کاربرد متیل جاسمونات، با غلظت ۶ میلی مولار، میزان آنزیم کاتالاز، در پرلت، در سطوح شوری ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار به ترتیب، ۲/۰۸، ۲/۶۴ و ۱/۶۲ برابر شاهد و در فلیم سیدلس، مقدار این آنزیم، در سطوح شوری ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار، به ترتیب، ۲/۵ برابر و ۲/۸۹ برابر و در شوری ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۸۶ برابر شاهد شد.

میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز با افزایش شوری افزایش یافت، اما در هر دو رقم، این افزایش تا سطح شوری ۷۵ میلی مولار بود و از این سطح شوری به بعد، یک روند کاهشی را دنبال نمود. میزان آنزیم، در فلیم سیدلس، در سطوح شوری ۵۰ و ۷۵ میلی مولار، نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۱/۱۵ و ۱/۲۳ برابر و در سطح ۱۰۰ میلی مولار ۰/۸۵ برابر شد. با کاربرد اپی براسینولید، با غلظت ۶ میکرومولار، میزان آنزیم در پرلت، در شوری ۵۰ میلی مولار ۱/۵۴ برابر، در شوری ۷۵ میلی مولار ۱/۵ برابر و در شوری ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۲۱ برابر در مقایسه با تیمار شاهد شد. کاربرد متیل جاسمونات، تاثیر معنی داری بر افزایش آنزیم، در شرایط شوری داشت. با کاربرد متیل جاسمونات، با غلظت ۶ میلی مولار، میزان آنزیم در مقایسه با شاهد در پرلت در شوری ۵۰ میلی مولار، ۱/۹۱ برابر و در شوری ۷۵ میلی مولار ۲/۰۶ برابر و در شوری ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۳۲ برابر شد. در هر دو رقم، میزان آنزیم با کاربرد متیل جاسمونات تا سطح شوری ۷۵ میلی مولار، از یک روند افزایشی و از آن سطح شوری به بعد، دارای روند کاهشی بود.

میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز، تا سطح شوری ۷۵ میلی مولار، افزایش و از آن به بعد کاهش داشت. در پرلت در سطوح شوری ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار، میزان این آنزیم، در مقایسه با شاهد به ترتیب ۱/۴۳، ۱/۵ و ۰/۷۷ برابر بود. در هر دو رقم کاربرد اپی براسینولید باعث افزایش این آنزیم گردید. در هر دو رقم، در سطوح شوری ۰ (شاهد) و ۱۰۰ میلی مولار، اختلاف معنی داری از لحاظ آماری بین غلظت های ۳ و ۶ میکرومولار اپی براسینولید دیده نشد. متیل جاسمونات، تاثیر مثبتی، بر افزایش آنزیم گایاکول پراکسیداز، در سطوح مختلف شوری داشت. در فلیم سیدلس، در سطح شوری ۱۰۰ میلی مولار و در پرلت در سطوح ۰ و ۱۰۰ میلی مولار، تفاوت معنی داری از نظر آماری، بین غلظت های ۳ و ۶ میلی مولار متیل جاسمونات، مشاهده نشد. با کاربرد ۶ میلی مولار متیل جاسمونات، میزان آنزیم در پرلت، در سطوح شوری ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی مولار، به ترتیب ۱/۹۴ و ۲/۰۶ و ۱/۴۴ برابر شاهد و در فلیم سیدلس با غلظت مشابه متیل جاسمونات، میزان آنزیم، در شوری ۵۰ میلی مولار، ۲/۰۲ برابر، در شوری ۷۵ میلی مولار، ۱/۸۹ برابر و در شوری ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۵۶ برابر شاهد شد.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش شوری، میزان آنزیم های آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده، افزایش یافتند، اما این روند افزایشی تا سطح شوری ۷۵ میلی مولار بود، از این سطح شوری تا شوری ۱۰۰ میلی مولار، میزان این آنزیم ها، رو به کاهش نهادند (جدول ۱-۳). میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی، تحت تاثیر تنش شوری افزایش می یابد، اما میزان افزایش آن ها، بین گونه های گیاهی و حتی درون گونه های مشابه، به مقدار زیادی متفاوت است (Molassiotis et al., 2006). در این پژوهش، میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، در بین دو رقم متفاوت بود و در رقم پرلت، میزان فعالیت آنزیم ها در سطوح شوری بالا بیشتر بود. Muscolo و همکاران (۲۰۰۳) بیان نمودند که در گونه های متحمل به شوری، میزان فعالیت های آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی، در پاسخ به شوری، افزایش یافت، ولی در گونه های حساس به شوری، میزان این فعالیت ها، ضعیف بود، که با نتایج این پژوهش، در مورد فعالیت بیشتر سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی در پرلت (متحمل به شوری) هم سویی دارد. در شرایط تنش شوری شدید، سیستم های آنزیمی آنتی اکسیدانی دفاعی گیاه، از هم پاشیده، در نتیجه با صدمه شدید به ترکیبات و اندامک های درون یاخته ای، باعث مرگ گیاه می گردد (Molassiotis et al., 2006). در این پژوهش، نیز در سطح شوری ۱۰۰ میلی مولار، در هر دو رقم مشاهده نمودیم که فعالیت های آنزیمی، روند نزولی پیدا نمودند که این نتایج بیانگر آن است که تعادل میان تولید و حذف گونه های فعال اکسیژن (توسط سیستم های دفاعی) در هر دو رقم بهم ریخته که این نتایج با یافته های Hirt و Apel (۲۰۰۴) مطابقت دارد. همچنین، این نتایج با یافته های Hertwig و همکاران (۱۹۹۲) هم سو می باشد، که بیان نمودند در تنش های شوری شدید، فعالیت آنزیم های پروتئاز، افزایش یافته و باعث از هم پاشیدن پروتئین کاتالاز می شوند. ROS مولکولهای سمی درون سلولی

خطرناکی هستند، اما اغلب به عنوان مولکولهای سیگنالینگ حدواسط برای تنظیم بیان ژن های مرتبط با مکانیزم های دفاعی آنتی اکسیدانی عمل می کنند (Vranova *et al.*, 2002). Banu و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که افزایش فعالیت آنتی اکسیدان از طریق ژن های خاصی کنترل می شود. بعلاوه گزارشات متعددی (Nam and Li, 2002; Mussing *et al.*, 2002) عنوان می کند که براسینواستروئیدها بیان ژن های مختلفی را در گیاهان تنظیم می کنند، بنابراین تیمار اپی براسینولید می تواند بیان ژن های تنظیم کننده فعالیت آنتی اکسیدان را افزایش دهد. براسینواستروئیدها پتانسیل قابل توجهی برای تنظیم فعالیت های آنتی اکسیدان در شرایط تنش دارند (Roychoudhury *et al.*, 2011). در پژوهشی، Li و همکاران (۲۰۰۸) در دانهال های اقاچیا، نشان دادند که پیش تیمار براسینولید، در گیاهان تحت تنش آبی، باعث افزایش معنی داری در سیستم آنتی اکسیدانی شد.

منابع

1. Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Method. Enzymol. 105: 121-126.
2. Apel, K. and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 373-399.
3. Banu, M.N.A., M.A. Hoque, M. Watanabe-Sugimoto, K. Matsuoka, Y. Nakamura, Y. Shimoishi and Y. Murata. 2009. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. J Plant Physiol. 166: 146-156.
4. Chong, T.M., M.A. Abdullah, N.M. Fadzillah, O.M. Lai and N.H. Lajis. 2005. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associates enzymic and non enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. Biochem. J. 36: 469-477.
5. Farmer, E.E. 2007. Plant biology - Jasmonate perception machines. Nature. 448:659-660.
6. Farmer, E.E. and C.A. Ryan. 1990. Interplant communication - airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase-inhibitors in plant-leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 7713-7716.
7. Foyer, C.H., M. Lelandais, C. Galap and K.J. Kunert. 1991. Effect of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. Plant Physiol. 97: 863-872.
8. Hernandez, J.A., F.J. Corpas, M. Gomez, L.A. Rio and F. Sevilla. 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. Physiol. Plant. 89: 103-110.
9. Hertwig, B., P. Streb and J. Feierabend. 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and influence of interfering stress conditions. Plant Physiol. 100:1547-1553.
10. Jung, S. 2004. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. Plant Physiol. Biochem. 42:225-231.
11. Kang, D.J., Y.J. Seo, J.D. Lee, R. Ishi, K.U. Kim, D.H. Shin, S.K. Park, S.W. Jang and I.J. Lee. 2005. Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt tolerant and salt-sensitive rice cultivars. J. Agron. Crop Sci. 191: 273-282.
12. Lijun, L., L. Xuemei, G. Yaping and M. Enbo. 2005. Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinesis* (*Orthoptera Acridoidea*). Environ. Toxicol. Pharmacol. 20:412-416.
13. Molassiotis, A.N., T. Sotiropoulos, G. Tanou, G. Kofidis, G. Diamantidis and I. Therios. 2006. Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. Biol. Plant. 50: 61-68.
14. Munns, R. and M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 651-681.
15. Muscolo, A., M. Sidari and M.R. Paccio. 2003. Tolerance of kikuyu grass to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defense. Plant Growth Regul. 41: 57-62.
16. Mussig, C., S. Fischer and T. Altmann. 2002. Brassinosteroid-regulated gene expression. Plant Physiol. 129: 1241-1251.
17. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22:867-880.

18. Roychoudhury, A., S. Basu and D.N. Sengupta. 2011. Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of indica rice differing in their level of salt tolerance. *J Plant Physiol* 168: 317-328.
19. Tani, T., H. Sobajima, K. Okada, T. Chojo, S. Arimura, N. Tsutsumi, M. Nishimura, H. Seto, H. Nojiri and H. Yamane. 2008. Identification of the *osopr7* gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Planta*. 227: 517-526.
20. Updhyaya, A., D. Sankhla, T.D. Davis, N. Sankhla and B.N. Smidh. 1985. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. *J. Plant Physiol*. 121: 453-461.
21. Veliticukova, M. and I. Fedina. 1998. Response of photosynthesis of *Pisum sativum* to salt stress as affected by methyl jasmonate. *Photosynthetica*. 35: 89-97.
22. Yoon, Y., M. Hamayun, S. Lee and I. Lee. 2009. Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean. *Crop sci biotech*. 12: 63-68.

Surveying the effect of jasmonic acid and brassinosteroid on antioxidant enzymes activity of two grapevine cultivars (Flame Seedless & Perlette) under saline conditions

S. N. Seif¹ E. Tafazzoli² A. R. Talaii³ S. G. Seif⁴

*Corresponding author: nedaseif663@yahoo.com

Abstract

Salinity is one of the limiting factor for grape growing in arid and semi-arid areas. Researchers have shown that some growth regulators such as Jasmonic acid and brassinosteroids have increased plant tolerance to some environmental stress such as salinity. For this reason the effect of two plant growth regulators, Methyl jasmonate and 24-epibrassinolide on biochemical characteristics of two seedless cultivars of grape namely Flame Seedless and Perlette under salinity stress were investigated. The design of the experiment was factorial arrangement in a complete randomized design with four replications. Two separate experiments were carried out. In the 1st experiment five levels of salinity (0, 25, 50, 75 and 100 m molar of NaCl) in irrigation water, and 3 levels of methyl jasmonate (0, 3 and 6 m molar sprayed on the leaves) were surveyed on rooted cuttings of both cultivars. In the second experiment under the same conditions of salinity 3 levels of 24-epibrassinolide (0, 3 and 6 μ Molar) were sprayed to the leaves. Results indicated that antioxidant activity were increased up to 75 m molar NaCl but that decreased with higher level of salinity.

Key words: *Vitis vinifera*, salt stress, antioxidant enzymes, Epibrassinolide, Methyl Jasmonate