بررسی تغییرات حاصل از القای تنش شوری بر میزان پروتئین کل و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برگ در دو رقم انجیر، 'کشکی ' و 'رونو'در شرایط کشت بافت

نجمه مداحی نسب[۱]، فاطمه زهرا امیرمحمدی[۲]*

[۱،۲]گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت

*نویسنده مسئول: fz.amirmohamadi@gmail.com

چکیده

در این پژوهش اثر سطح‌های مختلف شوری در شرایط کشت بافت بر دانهال‌های دو رقم انجیر 'کشکی' و 'رونو' با هدف ارزیابی میزان تحمل آن‌ها به تنش شوری و بررسی برخی فعالیت آنتی‌اکسیدانی دانهال‌ها انجام شد.تیمارهای مورد استفاده شامل ۴ سطح شوری شامل۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در محیط کشت MS و۲ رقم انجیر، به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۵ تکرار و در هر تکرار ۲ دانهال انجام شد. پس از گذشت ۲۰ روز از انجام آزمایش، اندازه‌گیری‌های مختلف انجام شد و نتایج نشان داد با افزایش غلظت نمک کلرید سدیم در محیط کشت، فعالیت آنزیم‌هایSOD ، CAT، GPX، افزایش داشت، و میزان پروتئین کل کاهش یافت. با توجه به یافته‌های این پژوهش رقم 'کشکی' نسبت به رقم 'رونو' از تحمل بیشتری نسبت به تنش شوری برخوردار بود

***کلمات کلیدی:* انجیر، تنش شوری، کلرید سدیم ، آنزیم SOD، CAT، GPX**

مقدمه

بسیاری از زمین‌های دیم و آبی کشور به دلیل کاهش میانگین بارندگی طی سالیان اخیر و تغییر در شرایط اقلیمی تبدیل به زمین‌های شور شده‌اند و این روند ادامه دارد. ازاین‌رو ضروری است که متخصصین علوم باغبانی به دنبال راهکارهایی برای مقابله با این پدیده باشند. گزینش و ایجاد ارقام متحمل به شوری به‌صورت استفاده مستقیم و یا به‌عنوان پایه برای ارقام تجاری از طریق انجام آزمایش‌های مختلف یکی از این راهکارهاست که می‌تواند در آینده مفید واقع شود. درخت انجیر با نام علمی .*Ficus carica* L متعلق به خانواده *Moraceae* است،که به‌صورت وحشی در بسیاری از نواحی کوهستانی و کوهپایه‌ای ایران وجود دارد. به دلیل تحمل زیاد انجیر به شرایط خشکی می‌توان در مناطق مستعد به‌صورت دیم اقدام به پرورش آن کرد (Faghih sarvestani& Sabet, 2001).

به‌منظور انتخاب بهترین پایه‌های متحمل به شوری این گیاه، انجام پژوهش‌های علمی امری لازم است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی تنش شوری روی دانهال‌های دو رقم انجیر، 'رنو(' **Rounou'**) و 'کشکی (Kushki') مشخص کردن میزان تحمل به شوری دانهال‌های این ارقام است.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از محیط کشت پایه MS بهینه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول، ۲ میلی‌گرم بر لیتر گلایسین، ۱ میلی‌گرم بر لیتر نیکوتینیک اسید، ۰,۱ میلی‌گرم بر لیتر تیامین، ۰,۵ میلی‌گرم بر لیتر پیریدوکسین ، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و ۰/۸٪ آگار استفاده شد پس از آماده‌سازی محیط کشت MS بهینه شده، بذرهای دو رقم انجیر، رقم 'کشکی' و 'رنو' برای جوانه‌زنی و رشد اولیه، روی محیط کشت قرار گرفت. (میوه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شد تا بذرها از آن به‌راحتی جدا شود . پس از جوانه‌زنی بذرها و رسیدن دانهال‌ها به مرحله ۸ برگ کامل،

دانهال‌های یکسان از نظر طول و وضعیت ظاهری گیاهچه، انتخاب شد و برای اعمال تیمارهای شوری به محیط کشت MS بهینه شده جدید، همراه با غلظت‌های مختلف نمک NaCl منتقل شد.

اعمال تیمار شوری (کلرید سدیم) بر دانهال‌ها

برای اعمال تنش شوری در شرایط کشت بافت از محیط کشت MS بهینه شده همراه با غلظت‌های ۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار نمک NaCl از دانهال‌های انجیر رقم 'کشکی' و 'رنو' در مرحله ۸ برگی استفاده شد. جهت سازگار کردن گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت با محیط بیرون ، پس از شستشوی ریشه جهت حذف ترکیبات محیط کشت، به گلدان‌هایی حاوی ترکیب محیط کشت پیت ماس، پرلایت، کوکوپیت انتقال داده شدن، آبیاری با محلول مغذی ms به‌صورت یک روز در میان انجام شد. پوشش گلدان‌ها را به‌تدریج برداشته درنهایت نهال‌های سازگار شده پس از ۴ هفته در شرایط گلخانه کشت شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

اثر تیمارهای مختلف شوری بر میزان پروتئین کل برگ در شرایط کشت بافت انجیر

نتایج اثر تیمارهای شوری نشان داد با افزایش غلظت نمک در محیط کشت میزان پروتئین نیز به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد(جدول ۱). در هر دو رقم بیشترین میزان پروتئین در تیمار شاهد و کمترین میزان آن در تیمار ۱۲۰میلی‌مولار نمک مشاهده شد و بین دو رقم تفاوت معنی‌داری وجود داشت. به‌طوری‌که رقم 'کشکی' با میانگین ۱۱۴/۶۴ میزان تجمع بیشتری نسبت به رقم 'رونو' با میانگین ۱۰۹/۲۸ داشت و تفاوت معنی‌دار بود. نتایج برهمکنش تیمارهای شوری و رقم نشان داد بیشترین میزان پروتئین کل در تیمار شاهد هر دو رقم مشاهده شد و کمترین میزان آن در دانهال‌های رقم 'رونو' در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان دادند.

جدول ۱- اثر تیمارهای شوری بر میزان پروتئین کل برگ($mg\ g^{-1}$ Fw) دو رقم انجیر'رونو' و 'کشکی' در شرایط کشت بافت

غلظت نمک(mM)	۰	۴۰	۸۰	۱۲۰	میانگین†
'رونو'	۱۲۶/۵۴a	۱۱۵/۹۶bc	۱۰۶/۵۹d	۸۸/۰۲f	۱۰۹/۲۸B
'کشکی'	۱۲۸/۳۸a	۱۱۹/۳۰b	۱۱۲/۸۷c	۹۸/۰۱e	۱۱۴/۶۴A
میانگین	۱۲۷/۴۶A	۱۱۷/۶۳B	۱۰۹/۷۳C	۹۳/۰۱D	

†میانگین‌هایی که دارای حرف یکسان (کوچک برای برهمکنش‌ها و بزرگ برای اثرهای اصلی)هستند، در سطح ۵ درصد آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.

اثر تیمارهای مختلف شوری بر میزان سوپراکسید دیسموتاز(SOD) برگ در شرایط کشت بافت انجیر

نتایج نشان داد به‌طور کلی با افزایش غلظت نمک در محیط کشت میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز افزایش داشت(جدول ۱). طبق نتایج به دست آمده در میزان فعالیت آنزیم SOD تفاوت معنی‌داری بین دو رقم مشاهده شد به‌نحوی‌که آنزیم SOD در رقم کشکی با میانگین ۲۷/۷۰ نسبت به رقم رونو با میانگین ۲۴/۷۹ فعالیت بیشتری داشت که تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد. نتایج برهمکنش تیمارها و ارقام نشان داد بیشترین میزان فعالیت آنزیم SOD با میانگین ۳۶/۰۵ در دانهال‌های رقم کشکی در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها دارد. کمترین میزان فعالیت آنزیم SOD در هر دو رقم در تیمار شاهد مشاهده شد که نسبت به سایر دانهال‌ها تفاوت آماری معنی‌داری نشان دادند.

جدول۲- اثر تیمارهای شوری بر میزان سوپراکسید دیسموتاز (U/mg protein) دو رقم انجیر’رونو‘ و ’کشکی‘ در شرایط کشت بافت

غلظت نمک(mM)	۰	۴۰	۸۰	۱۲۰	میانگین†
’رونو‘	۱۹/۴۱f	۲۲/۷۱e	۲۶/۴۵c	۳۰/۵۸b	۲۴/۷۹B
’کشکی‘	۲۱/۰۸ef	۲۴/۴۵d	۲۹/۲۴b	۳۶/۰۵a	۲۷/۷۰A
میانگین	۲۰/۲۵D	۲۳/۵۸C	۲۷/۸۴B	۳۳/۳۱A	

†میانگین‌هایی که دارای حرف یکسان (کوچک برای برهمکنش‌ها و بزرگ برای اثرهای اصلی)هستند، در سطح ۵ درصد آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.

یکی از مؤثرترین آنتی‌اکسیدان‌های درون‌سلولی آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) است (Sarvajeet and Tuteja, 2010). بسیاری از پژوهشگران آن را قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان شناخته شده می‌دانند که می‌تواند بسیاری از گیاهان را در مقابل حمله رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایمن نگه دارد و سبب پایداری گیاه در برابر بسیاری از تنش‌های محیطی شود(Wise and Naylor, 1987). در این پژوهش با افزایش شوری میزان آنزیم SOD نیز افزایش یافته است به نظر می‌رسد میزان نمک تا ۱۲۰ میلی‌مولار حد محدودکننده‌ای برای تولید و فعالیت آنزیم SOD نیست و یا این‌که به دلیل وجود عناصر مورد نیاز به میزان کافی در شرایط کشت بافت برای تولید آیزوفرم‌های مختلف SOD مانند (MnSOD، ZnSOD، CuSOD، FeSOD)، تنش شوری حتی در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار نتوانسته مانع از تولید و فعالیت آنزیم SOD شود.

اثر تیمارهای مختلف شوری بر میزان کاتالاز(CAT) برگ در شرایط کشت بافت انجیر

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک در محیط کشت فعالیت آنزیم کاتالاز نیز افزایش زیادی داشته است (جدول ۳) و بین دو رقم نیز اختلاف معنی‌داری وجود دارد به‌نحوی‌که رقم ’کشکی‘ با میانگین فعالیت ۲/۴۴ و رقم ’رونو‘ با میانگین فعالیت ۱/۶۱ از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان دادند. همچنین بین تیمارهای مختلف شوری اختلاف معنی‌داری وجود دارد، بیشترین فعالیت کاتالاز در تیمار۱۲۰ میلی‌مولار و کمترین میزان فعالیت هم مربوط به تیمار شاهد است که نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری دارند. نتایج برهمکنش تیمارهای شوری و رقم نشان داد بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با میانگین ۴/۵۱ در دانهال‌های رقم ’کشکی‘ در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد و کمترین میزان فعالیت در دانهال‌های هر دو رقم در تیمار شاهد مشاهده شد.

جدول ۳- اثر تیمارهای شوری بر میزان آنزیم کاتالاز(U/mg protein) دو رقم انجیر ’رونو‘ و ’کشکی‘ در شرایط کشت بافت

غلظت نمک(mM)	۰	۴۰	۸۰	۱۲۰	میانگین†
’رونو‘	۰/۹۰e	۱/۳۵d	۱/۵۵cd	۲/۶۳b	۱/۶۱B
’کشکی‘	۰/۸۰e	۱/۷۵c	۲/۷۲b	۴/۵۱a	۲/۴۴A
میانگین	۰/۸۵D	۱/۵۵C	۲/۱۳B	۳/۵۷A	

†میانگین‌هایی که دارای حرف یکسان (کوچک برای برهمکنش‌ها و بزرگ برای اثرهای اصلی)هستند، در سطح ۵ درصد آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند

کاتالاز (CAT) یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر در سیستم دفاعی اکثر گیاهان در مقابله با تنش‌های غیر زنده است. این آنزیم می‌تواند به‌طور مستقیم پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل کند و سمیت این رادیکال آزاد اکسیژن را به‌طور کامل حذف نماید (Sarvajeet and Tuteja, 2010). کاتالاز یکی از سریع‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده است که می‌تواند در کمتر از یک دقیقه، شش میلیون رادیکال آزاد پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل نماید(Azpilicueta *et al.*, 2007).

اثر تیمارهای مختلف شوری بر میزان گایاکول پراکسیداز(GPX) برگ در شرایط کشت بافت

به‌طور کلی نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک در محیط کشت میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز افزایش داشت (جدول ۴). میزان فعالیت آنزیم در رقم 'کشکی' با میانگین ۲/۱۸ بیشتر از رقم 'رونو' بود که دو رقم از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند. بیشترین میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز در بین تیمارهای مختلف شوری با میانگین ۲/۴۷ مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌مولار است که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارد و کمترین میزان فعالیت آنزیم با میانگین ۱/۴۹ نیز در تیمار شاهد مشاهده شد.، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تا شوری ۸۰ میلی‌مولار افزایش یافت و در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار کاهش داشت. همچنین نتایج برهمکنش تیمارهای شوری و رقم نشان داد بیشترین فعالیت آنزیم GPX در تیمار ۸۰ میلی‌مولار و در دانهال‌های رقم 'کشکی' و کمترین فعالیت GPX مربوط به دانهال‌های رقم 'رونو' در تیمار شاهد بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند.

جدول ۴- اثر تیمارهای شوری بر میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز(U/mg protein) دو رقم انجیر'رونو' و 'کشکی' در شرایط کشت بافت

غلظت نمک(mM)	۰	۴۰	۸۰	۱۲۰	میانگین†
'رونو'	۱/۴۴e	۱/۴۶e	۲/۱۰c	۱/۸۲d	۱/۷۰B
'کشکی'	۱/۵۴e	۱/۹۹cd	۲/۸۳a	۲/۳۷b	۲/۱۸A
میانگین	۱/۴۹D	۱/۷۲C	۲/۴۷A	۲/۰۹B	

†میانگین‌هایی که دارای حرف یکسان (کوچک برای برهمکنش‌ها و بزرگ برای اثرهای اصلی)هستند، در سطح ۵ درصد آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.

آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) که دارای فرم‌های متنوعی می‌باشد مسئول حذف پراکسید هیدروژن از سیستم‌های بیولوژی است(Hodges *et al.*, 1997). به دلیل توانای این آنتی‌اکسیدان در اکسیداسیون گایاکول آن را گایاکول پراکسیداز (GPX) می‌نامند (Asada, 1999). گایاکول پراکسیداز دارای توالی نوکلئوتیدی و نقش فیزیولوژیک متفاوتی نسبت به سایر آنتی‌اکسیدان‌ها شناخته شده می‌باشد. این آنزیم با تجزیه ایندول تری استیک اسید (IAA)، داشتن نقش مؤثر در تولید لیگنین و مصرف پراکسید هیدروژن باعث تحمل گیاهان در برابر بسیاری از تنش‌های زنده و غیر زنده می‌شود(Radotic *et al.*, 2000). آنزیم گایاکول پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنلی مانند گایاکول، به‌منظور سم‌زدایی و تجزیه آب‌اکسیژنه استفاده می‌کند.

منابع

Abbaspour, H. 2012. Effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes, and proline accumulation in pistachio plants. J. Medic. Plants Res. 6(3). 526-529. (in Persian)

Asada, K. 1999. The waterewater cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 601-639

Azpilicueta, C.E., M.P. Benavides, M.L. Tomaro and S.M. Gallego. 2007. Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves. Plant Physiol. Biochem. 45: 589-595.

Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutases: improved assays and an assay predictable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44: 276–287.

Bowler, C., M.V. Montagu and D. Inze. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 83-116.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principles of protein dyebinding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Chance, B. and A. C. Maehly. 1995. Assay of catalase and peroxidase. PP. 764-765 In: S. P. Culowic, and N. O. Kaplan (eds). Methods in enzymology Vol. 2. Academic Press. Inc. New York.

Chartzoulakis, K. 2005. Salinity and olive: Growth, salt tolerance, photosynthesis and yield. Agric. Water Manag. 78: 108–121.

Faghih,H.,Sabet,j.Sarvestani. 2001. Planting a fig harvest. rahgosha Publish. 292 pages. (in Persian)

Farsi, M &Zolala,j,. 2008.Principles of Plant Biotechnology (Translation). University of Mashhad. 495 pages. (in Persian)

Halliwell, B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. Chem. Phys. Lipids. 44: 327-340

Heath, R.L. and. Packer, L. 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189-198.

Hodges, D. M., C.J. Andrews, D.A. Johnson and R.I. Hamilton. 1997. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbreed maize lines. J. Exp. Bot. 48: 1105–1113.

Kafi,M., E, Damghani mahdavi.,2000. Mechanisms of plant resistance to environmental stress (Translation). Ferdowsi University of Mashhad Publications page 467. (in Persian)

Kar, M. and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, polyphenol oxidase activities during rice senescence. Plant Physiol 57: 315-319.

Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22: 867–880.

Passioura, J.B. 1996. Drought and drought tolerance. Plant Growth Regul. 20: 79-83.

Radotic, K., T. Ducic and D. Mutavdzic. 2000. Changes in perxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. Env. Exp. Bot. 44: 105-113.

Sarvajeet, S. and N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48: 909-930

Van, C.W., C. Bowler, R. Villarroel, E.W.T. Tsang, M.V. Montagu and D. Inze. 1990. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 3820-3824.

Wise, R.R. and A.W. Naylor. 1987. Chilling enhanced peroxidation. The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultra- structure. Plant Physiol. 83: 272-277.

Salt Stress-Induced Changes in F Antioxidant Activity, and Total Protein Content in 'Kushki' and 'Rounou' ‘Fig Seedlings in the Tissue Culture

Fatemehzahra amirmohamadi[1*], najmeh madahi nasab[2]
Azad University of Jiroft, Department of agriculture
[*]Corresponding Author: amirmohamadi@gmail.com

Abstract

The effect of different salinity levels in the tissue culture seedlings of two varieties of figs 'Kushki' and 'Rounou' to evaluate their tolerance to salinity and check out some of antioxidant activity and total protein seedlings were carried out. the treatments consisted of four salinity levels (0, 40, 80 and 120 mM sodium chloride in the medium MS) and two varieties of figs, factorial experiment in a completely randomized design with five replicates per treatment and two seedlings was performed. After 20 days of testing, various measurements were conducted results showed that by increasing the concentration of NaCl in the medium, enzyme activity of SOD, CAT, GPX, increased and the total protein was reduced. According to the findings, the 'Kushki' tolerance to salt stress was greater than 'Rounou'.

Keywords: **fig, salinity, sodium chloride, enzymes SOD, CAT, GPX**