استعمال خارجی پرولین لیپیدپراکسیداسیون غشا رازیانه در اثر تنش خشکی را برطرف می‌کند

علی غلامی‌زالی*[۱]، پرویز احسان‌زاده[۲]

[۱ و ۲] دانشجوی دکتری زراعت و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

*نویسنده مسئول: ali.gholami@iut.ac.ir

چکیده

لیپیدپراکسیداسیون غشا سلولی از جمله مخرب‌ترین اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر روی گیاهان در شرایط تنش‌زا است. تعیین شاخص‌های مرتبط با آن می‌تواند به‌عنوان معیاری برای خسارت تنش به سلول‌های گیاهی در نظر گرفته شود. با هدف بررسی اثر تنش رطوبتی و استعمال خارجی پرولین بر شاخص‌های لیپیدپراکسیداسیون غشا گیاه رازیانه آزمایشی به‌صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اصلی شامل دو رژیم آبیاری (۳۵ تا ۴۵ و ۷۵تا ۸۵ درصد تخلیه مجاز رطوبتی) و فاکتور فرعی فاکتوریلی از دو سطح تیمار پرولین (صفر (فقط پاشش آب مقطر) و ۲۰ میلی‌مولار)و دوازده ژنوتیپ رازیانه (شامل ابن‌سینا، اصفهان، اردبیل، ارومیه، بوشهر، بیرجند، شیراز، کرمان، کاشان، مشهد، همدان و یزد) بود. ژنوتیپ اصفهان بالاترین درصد خسارت به غشا سلول را در شرایط تنش داشت. علاوه بر این، استعمال خارجی پرولین به استثنا ژنوتیپ‌های کرمان و بیرجند سبب کاهش درصد نشت یونی و افزایش درصد شاخص پایداری غشا تمامی ژنوتیپ‌ها شد. ژنوتیپ اصفهان با استعمال خارجی پرولین بیشترین درصد کاهش میزان نشت یونی و بیشترین درصد افزایش شاخص پایداری غشا در بین ژنوتیپ‌ها را داشت. بر اساس نتایج بالا می‌توان بیان داشت که استعمال خارجی پرولین می‌تواند تأثیر بسزایی در تعدیل نشت یونی و پایداری شاخص پایداری غشا ژنوتیپ اصفهان (با بالاترین درصد خسارت به غشا سلول) داشته باشد.

کلمات کلیدی: **نشت یونی، شاخص پایداری غشا، درصد خسارت به غشای سلولی، پایداری غشای سلولی**

مقدمه

با توجه به وقوع تغییر اقلیم جهانی، در آینده بیش‌ازپیش کمبود آب به‌عنوان مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید غذا مطرح خواهد بود (Chaves *et al*., 2009). رازیانه با نام علمی (*Foeniculum vulgare* Mill.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی خانواده چتریان[۱] می‌باشد، که وجود منابع ژرم‌پلاسم گسترده با تنوع ژنتیکی زیاد، نیاز آبی کم و مقاومت به خشکی بر اهمیت این گیاه افزوده است (Ehsanzadeh and Askari, 2015). مطالعات متعددی کاهش قابل توجه میزان فتوسنتز را در اثر تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی غشا و تجزیه کلروفیل در شرایط تنش خشکی را گزارش کرده‌اند (Kaur and Asthir, 2015). در این راستا، عسکری و احسان‌زاده (۲۰۱۵) در بررسی تأثیر سطوح آبیاری بر گیاه رازیانه بیان داشتند که تنش خشکی سبب کاهش میزان کلروفیل، محتوای نسبی آب برگ و پتانسیل آب برگ و افزایش میزان قندهای محلول و غلظت پرولین می‌شود. لیپیدپراکسیداسیون غشای سلولی به‌عنوان نشان‌دهنده شدت تنش در گیاه، مخرب‌ترین اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر روی گیاهان در شرایط تنش‌زا است، که در نهایت باعث مرگ سلول می‌شود (Emam and Pirasteh-Anosheh, 2015). گیاهان برای مقابله با اثرات

[۱] Umbelliferae

نامطلوب حاصل از تنش خشکی مکانیسم‌های خاصی از جمله فعال شدن آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ریدوکتاز) و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند کاروتنوئیدها، گلوتاتیون، اسیداسکوربیک و پرولین را به کار می‌گیرند (Rejeb*et al*., 2014). این مکانیسم‌ها به‌صورت سازوکارهای انطباقی خاصی در طول زمان در گیاهان تکامل یافته‌اند. تنظیم اسمزی که حاصل تجمع مقدار زیادی از ترکیبات با جرم مولکولی کم به نام مواد محلول سازگار به‌خصوص پرولین است، یکی از مکانیسم‌های کارآمد است که گیاه برای حفظ آماس سلول در شرایط کمبود آب از آن بهره می‌برد (Kaur and Asthir, 2015). نقش مواد محلول سازگار در مقاومت به تنش خشکی قابل توجه است، چراکه در تنظیم بسیاری از فرآیندهای متابولیکی از جمله حمل‌ونقل یون‌ها نقش بسزایی دارند. در واقع در شرایط وجود تنش‌های محیطی پرولین از طریق سازگاری، بهبود و انتقال سیگنال تنش اثرات نامطلوب آن‌ها را تعدیل می‌کند. مطالعات متعددی افزایش مقاومت به تنش خشکی در بافت‌های گیاهی در شرایط محلول‌پاشی پرولین را به افزایش تنظیم اسمزی بافت‌های گیاهی ارتباط داده‌اند (Moustakas*et al*., 2011; Iqbal *et al*., 2008). اما بااین‌حال، اثرات مطلوب استعمال خارجی پرولین ممکن است بسته به نوع گیاه، مرحله رشدی گیاه، زمان محلول‌پاشی و غلظت محلول متفاوت باشد. علاوه بر این، اطلاعات کاملی از برهمکنش اثر پرولین و تنش رطوبتی بر شاخص‌های لیپیدپراکسیداسیون غشا گیاهان دارویی نظیر رازیانه وجود ندارد. بر این اساس، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی پاسخ لیپیدپراکسیداسیون غشا سلول ژنوتیپ‌های رازیانه به استعمال خارجی پرولین در شرایط تنش رطوبتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش حاضر در سال زراعی ۱۳۹۵ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان واقع در۴۰ کیلومتری جنوب غربی اصفهان در مزرعه تحقیقاتی لورک شهرستان نجف‌آباد (عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۳۲ دقیقه شمالی به طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۲۲ دقیقه شرقی و ارتفاع مزرعه از سطح دریا۱۶۳۰ متر) در خاکی لوم‌رسی با جرم مخصوص ظاهری ۱/۳ گرم بر سانتیمتر مکعب اجرا شد. آزمایش به‌صورت طرح کرت‌های خردشده و در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اصلی شامل دو رژیم آبیاری (۴۵تا ۳۵ و ۸۵ تا ۷۵ درصد تخلیه مجاز رطوبتی) و فاکتور فرعی فاکتوریلی از دو سطح تیمار پرولین (صفر (فقط پاشش آب مقطر) و ۲۰ میلی‌مولار) و دوازده ژنوتیپ رازیانه (شامل ابن‌سینا، اصفهان، اردبیل، ارومیه، بوشهر، بیرجند، شیراز، کرمان، کاشان، مشهد، همدان و یزد) بود. محلول‌پاشی در دو مرحله به فاصله ده روز از یکدیگر و حداقل شش هفته پس از آغاز اعمال رژیم آبیاری و بر روی کرت‌های فرعی مربوطه به‌وسیله‌ی افشانه‌ی دستی و تا مرحله‌ی چکه کردن از برگ، روی گیاهان پاشیده شد.این آزمایش بر روی ژنوتیپ‌های رازیانه جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف کشور که از چهار سال پیش در مزرعه کشت شده‌اند صورت گرفت. فاصله بین کرت‌های اصلی از هم ۱/۵ متر و هر کرت فرعی شامل پنج ردیف به فاصله ۵۰ سانتیمتر از هم و به طول یک متر بود. برای اعمال تیمار آبیاری از منحنی رطوبتی خاک مزرعه استفاده شد و دو سطح آبیاری بر اساس درصد تخلیه رطوبت قابل استفاده خاک اعمال گردیدند. اعمال سطوح آبیاری از اوایل اردیبهشت‌ماه (زمانی که گیاهان تقریباً ۲۰ سانتی‌متر ارتفاع داشتند) بعد از یک آبیاری کامل در همه کرت‌های آزمایشی انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان کمی شاخص‌های لیپیدپراکسیداسیون غشا در طول فصل زراعی حدوداً چهار هفته پس از اعمال تیمار محلول‌پاشی پرولین در هر کرت فرعی با استفاده از بوته‌های ردیف دوم هر واحد آزمایشی نمونه‌های برگی تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای ارزیابی مقدار لیپیدپراکسیداسیون غشا از شاخص‌های بیوشیمایی میزان نشت یونی، شاخص پایداری غشا، درصد خسارت به غشای سلولی و پایداری غشای سلولی استفاده شد. برای این منظور ۰/۱ گرم برگ داخل ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شده قرار گرفت. بعد از آن نمونه به مدت ۳۰ دقیقه داخل آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و میزان هدایت الکتریکی (EC) آن با کمک دستگاه EC متر قرائت شد (C۱). سپس نمونه به

مدت ۱۵ دقیقه داخل حمام بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و برای بار دوم هدایت الکتریکی آن قرائت شد (C۱). بر اساس روابط زیر شاخص‌های مورد نظر شامل میزان نشت یونی[۲](EL)، شاخص پایداری غشا[۳] (MSI)، درصد خسارت به غشای سلولی[۴](I%) و پایداری غشای سلولی[۵](CMS) بدست آمد (Emam and Pirasteh-Anosheh, 2015):

$$EL=\frac{C1}{C2} \qquad \text{(رابطه ۱)}$$

$$MSI=\left(1-\frac{C1}{C2}\right)\times 100 \qquad \text{(رابطه ۲)}$$

$$I\%=1-\left(\frac{T-D}{T-C}\right)\times 100 \qquad \text{(رابطه ۳)}$$

$$CMS=\left(\frac{1-\frac{t1}{t2}}{1-\frac{c1}{c2}}\right) \qquad \text{(رابطه ۴)}$$

در (رابطه ۳) حروف C، D و T به‌ترتیب نشان دهنده میزان نشت یونی در شرایط شاهد، تنش و کل (D+C) می‌باشد. در (رابطه ۴) حروف C و t به‌ترتیب نشان دهنده میزان هدایت الکتریکی در شرایط شاهد و تنش می‌باشد.

نتایج و بحث

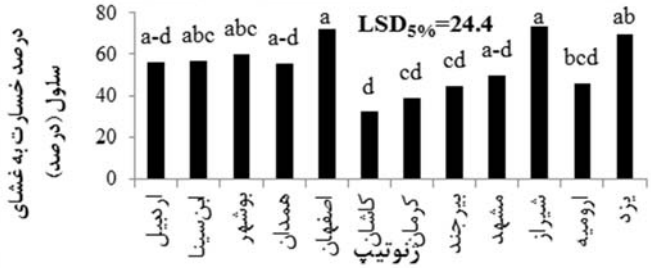
نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر آبیاری، پرولین و پرولین × ژنوتیپ بر درصد نشت یونی و درصد شاخص پایداری غشا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). اثر ژنوتیپ بر درصد شاخص پایداری غشا و درصد خسارت به غشای سلولی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). ژنوتیپ‌های اصفهان و شیراز بیشترین و ژنوتیپ کاشان کمترین درصد خسارت به غشا سلول را داشتند (نمودار ۱). علاوه بر این، اثر استعمال خارجی پرولین بر درصد نشت یونی و شاخص پایداری غشا، بسته به ژنوتیپ متفاوت بود (نمودار ۲- الف و ب). درصد نشت یونی با استعمال خارجی پرولین (۲۰ میلی‌مولار) نسبت به سطح شاهد (صفر) در تمامی ژنوتیپ‌ها به استثنا بیرجند و کرمان کاهش یافت. بیشترین و کمترین کاهش‌ها به ترتیب در ژنوتیپ‌های بوشهر (۴۳ درصد) و ابن‌سینا (۹/۵ درصد) مشاهده شد (نمودار ۲-الف). درصد شاخص پایداری غشا با استعمال خارجی پرولین (۲۰ میلی‌مولار) نسبت به سطح شاهد (صفر)در تمامی ژنوتیپ‌ها به استثنا بیرجند و کرمان افزایش یافت. بیشترین و کمترین افزایش به ترتیب در ژنوتیپ‌های اصفهان (۱۸درصد) و ابن‌سینا (۲ درصد) مشاهده شد (نمودار ۲- ب). افزایش پرولین در دوره تنش ممکن است نتیجه تجزیه پروتئین‌ها و نیز کاهش استفاده از آن‌ها به دلیل کاهش رشد گیاه باشد. ترکیبات اسمولیت همانند گلایسین بتائین، پرولین و کربوهیدرات‌های محلول به‌واسطه تجمع در سلول‌های گیاهی و حفظ پتانسیل فشاری سلول امکان مقاومت به تنش خشکی را در بافت‌های گیاهی فراهم می‌کنند (Iqbal *et al*., 2008). به نظر می‌رسد پاسخ متفاوت ژنوتیپ‌های کرمان و بیرجند ناشی از متفاوت بودن اثرات پرولین بسته به نوع گیاه، مرحله رشدی گیاه، زمان محلول‌پاشی و غلظت محلول باشد.

[2]Electrolyte leakage
[3]Membrane stability index
[4]Injury index
[5]Cellular membrane stability

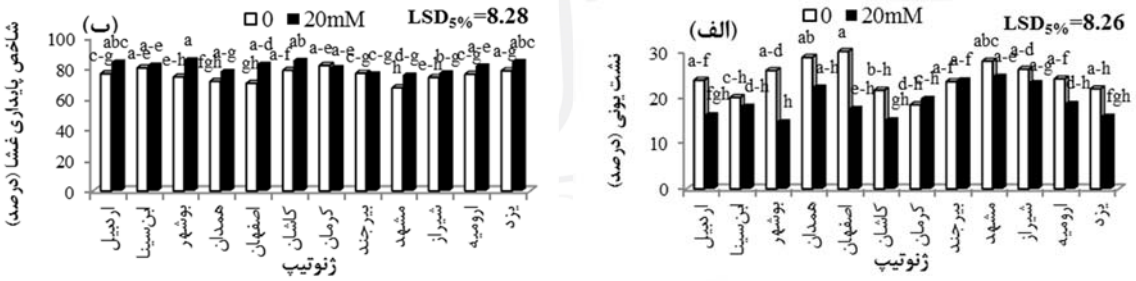
جدول ۱-تجزیه واریانس اثر استعمال خارجی پرولین و آبیاری بر نشت یونی، شاخص پایداری غشا، درصد خسارت به غشای سلولی و پایداری غشای سلولی دوازده ژنوتیپ رازیانه.

منابع تغییرات	درجه آزادی	نشت یونی	شاخص پایداری غشا	درجه آزادی	درصد خسارت به غشای سلولی	پایداری غشای سلولی
آبیاری	۱	۵۱۲۰**	۵۲۲۹**	–	–	–
خطای اصلی	۴	۱۰۹	۹۵/۳	۲۴	۵۱۵	۱۳۴
پرولین	۱	۱۰۳۶**	۱۱۱۹**	–	–	–
ژنوتیپ	۱۱	۸۹/۰^{ns}	۱۳۱**	۱۱	۲۱۰**	۲۴۷^{ns}
پرولین × ژنوتیپ	۱	۱۲۰۳**	۱۲۹۲**	–	–	–
آبیاری ×پرولین	۱۱	۴۴/۱^{ns}	۴۲/۶^{ns}	–	–	–
آبیاری × ژنوتیپ	۱۱	۵۲/۲^{ns}	۵۴/۵^{ns}	–	–	–
آبیاری ×پرولین × ژنوتیپ	۱۱	۹۷/۸*	۹۲/۱^{ns}	–	–	–
خطای فرعی	۹۲	۵۱/۹	۵۲/۱	–	–	–

ns، *و **به ترتیب بیانگر معنی‌دار نبودن و معنی‌دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهد.



نمودار ۱- مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر درصد خسارت به غشای سلول. میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



نمودار ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل پرولین × ژنوتیپ بر درصد نشت یونی (الف)، درصد شاخص پایداری غشا (ب). میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

اقبال و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه خود بر روی گیاه آفتابگردان بیان داشتند که محلول‌پاشی ترکیبات اسمولیته مانند گلایسین-بتائین در شرایط تنش خشکی به‌واسطه افزایش فشار آماس برگ سبب بهبود عملکرد دانه می‌شود. موستاکاس و همکاران (۲۰۱۱) با مطالعه بر روی گیاه آرابیدوپسیس بیان داشتند که محلول‌پاشی پرولین به‌واسطه افزایش میزان پرولین و دیگر قندهای محلول سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و نهایتاً سبب تعدیل تنش خشکی می‌شود. به نظر می‌رسد کاربرد خارجی پرولین ظرفیت تخفیف نسبی آثار مخرب تنش رطوبتی بر گیاه داروئی رازیانه را داشته باشد.

منابع

Askari, E. and P. Ehsanzadeh. 2015. Effectiveness of exogenous salicylic acid on root and shoot growth attributes, productivity, and water use efficiency of water-deprived fennel genotypes. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 56:687-696.

Chaves, M., J. Flexas and C. Pinheiro. 2009. Photosynthesis underdrought and salt stress: regulation mechanisms from whole plantto cell. Annals of Botany 103:551–560.

Emam, Y. andH. Pirasteh-Anosheh.2015. Field and laboratory in crop sciences, manual for agronomic physiology and biochemical measurement in crop plant. University of Mashhad Jahade-Daneshgahipress. (In Farsi)

Iqbal, N., M. Ashraf and M. Y. Ashraf. 2008. Glycinebetaine, an osmolyte of interest to improve water stress tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.): water relations and yield. South African Journal of Botany 74: 274–281.

Kaur, G and B. Asthir. 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. Journal of Plant Biology 59: 609-619.

Moustakas, M., I. Sperdouli, T. Kouna, C. I. Antonopoulou and I, Therios. 2011. Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant Growth Regulation 65:315-325

Rejeb, K.B., C. Abdelly and A. Savoure. 2014. How reactive oxygenspecies and proline face stress together. Plant Physiology and Biochemistry 80: 278-284.

Exogenous Proline Mitigates Lipid Peroxidation in Drought-Stressed Fennel

Ali Gholami Zali[1]*, Parviz Ehsanzadeh[2]
[1, 2 *]PhD Student, and Associate Professor, respectively, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[*]*Corresponding Author: ali.gholami@iut.ac.ir*

Abstract

In stressful situations lipid peroxidation is among the most damaging effects of oxygen free radicals on the plants. Determination of indexes related to it can be considered as a measure of the stress damage to the cells. In order to investigate the effects of moisture stress and proline exogenous on lipid peroxidation indexes of fennel a 3-replicate split-plot randomized complete block design (RCBD) field experiment was conducted. The twelve genotypes of fennel (i.e. Avicenna, Isfahan, Ardabil, Urmia, Iran, Birjand, Shiraz, Kerman, Kashan, Mashhad, Hamedan and Yazd) were sprayed in two levels of proline (zero (just spraying with water) and 20 mM) and were subjected to two irrigation levels (45 to 35 and 85 to 75 percent of available deficit). In drought stress, Isfahan genotype had the highest percentage of injury index. In addition, except for Kerman and Birjand genotypes, proline exogenous reduced the percentage of electrolyte leakage and increased the percentage of membrane stability index in all genotypes. Isfahan genotype with proline exogenous had largest percentage decrease in electrolyte leakage and the highest percentage increase in membrane stability index among the genotypes. It could be concluded that proline exogenous can be effective in modulating electrolyte leakage and membrane stability index in Isfahan genotype (with the highest percentage of injury index).

***Keywords*: Electrolyte leakage, Membrane stability index, Injury index, Cellular membrane stability.**