تاثیر هورمون ۲۴-اپی براسینولید بر هموستازی یون و پراکسیداسیون لیپید در دو رقم حساس و مقاوم کتان تحت تنش شوری

لیلا امرایی*[۱]، فاطمه رحمانی[۱]، بابک عبدالهی مندوالکانی[۲]
[۱*] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
[۲] گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
*نویسنده مسئول: l.amraei@urmia.ac.ir

چکیده

شوری یکی از مهم‌ترین چالش‌های محیطی می‌باشد که چندین فرآیند فیزیولوژیکی در گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. براسینواستروئیدها گروه جدیدی از فیتوهورمون‌ها هستند که بر رشد و توسعه گیاهان اثر گذاشته و اثرات مخرب تنش‌های زیستی و غیر زیستی را در گیاهان کاهش می‌دهند. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر هورمون ۲۴-اپی براسینولید (10^{-8} M) بر هموستازی یون‌ها و پراکسیداسیون لیپید در دو رقم حساس و مقاوم گیاه کتان تحت تنش (۱۵۰mM NaCl) صورت گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که شوری باعث افزایش محتوای یون‌های سدیم و کلرشد، درحالی که محتوای یون پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم در گیاهان تحت تنش کاهش یافت. اعمال هورمون ۲۴-اپی براسینولید اثر افزایشی شوری بر یون‌های سدیم و کلر را کاهش داده و محتوای یون پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم را در گیاهان تحت شوری افزایش داد. از طرف دیگر تنش شوری اثر معنی‌داری بر محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2)نداشت و محتوای مالون- دی آلدئید (MDA) را /به طور معنی‌داری در هر دو رقم حساس و مقاوم افزایش داد. استفاده از هورمون ۲۴-اپی براسینولید در شرایط تنش، محتوای H_2O_2 را کاهش داده و در نتیجه باعث کاهش /پراکسیداسیون لیپید در ارقام کتان شد. بطور کلی رقم حساس (TN-97-1) نسبت به رقم مقاوم (TN-97-106)، در پاسخ به هورمون ۲۴-اپی براسینولید در شرایط تنش شوری، سطح بالاتری از نسبت پتاسیم به سدیم (K^+/Na^+) را نشان داد و هم‌چنین پراکسیداسیون لیپید نیز به میزان بیشتری نسبت به شرایط تنش شوری در این رقم کاهش یافت.

کلمات کلیدی: ۲۴-اپی براسینولید، شوری، کتان، هموستازی یون

مقدمه

گیاه کتان (*Linum usitatissimum* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات غذایی از نظر اقتصادی می‌باشد که از سالیان قبل کشت داده می‌شود. این گیاه معمولا به خاطر بذر، فیبر و روغن مفید آن مورد توجه قرار دارد. روغن کتان سرشار از امگا-۳ (آلفا-لینولنیک) و امگا-۶ (لینولئیک) می‌باشد. هم‌چنین گزارش شده است که مصرف روغن و بذر کتان اثرات مفیدی بر سلامت قلبی-عروقی داشته و در درمان بیماری‌هایی مانند سرطان، بیماری‌های عصبی و هورمونی و هم‌چنین بیماری‌های التهابی بکار می‌رود (Muhammad and Hussain, 2010).

تنش شوری یکی از از مهم‌ترین چالش‌های محیطی هست که کشت محصولات کشاورزی را محدود کرده و به همین خاطر به یک بحران جدی در سال‌های آینده تبدیل شده است (Yu *et al.*, 2016). شوری زیاد که بالای ۲۵٪ در خاک‌های جهان را تشکیل می‌دهد، باعث اعمال تنش‌های اسموتیکی و یونی می‌شود. تنش‌های اسمزی توانایی گیاهان در دریافت آب و مواد مغذی را کاهش می‌دهد (Efimova *et al.*, 2014).

براسینواستروئیدها (BRs) یک گروه جدیدی از هورمون‌های گیاهی هستند که از نظر ساختمانی مشابه هورمون‌های استروئیدی جانوری بوده و بر روی رشد و نمو گیاهان تاثیر گذاشته و هم‌چنین اثر کاهش دهنده بر روی خسارات ناشی از تنش‌های زیستی و غیر زیستی در گیاهان دارند (Shu *et al.*, 2015). اعمال خارجی این هورمون طیف وسیعی از

پاسخ‌های فیزیولوژیکی مانند توسعه سلول، تمایز آوندی[۱]، توسعه باروری[۲] و هم‌چنین اجتماع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان در غلظت‌های کم را موجب می‌شود. اپی براسنولیدها (EBL)، یک مشابه سنتزی بسیار فعال از براسینواستروئیدها، دارای یک اثر محرک بر رشد و متابولیسم گیاه بوده و پایداری زیادی در گیاه در شرایط متفاوت ایجاد می‌کنند (Sun *et al.*, 2015).

افزایش تقاضا برای تولید کتان و سازگاری این گیاه با خاک‌های نامناسب، نیازمند مطالعات گسترده در زمینه مکانیسم‌های پاسخ دهنده به تنش شوری در این گیاه مهم صنعتی می‌باشد. در این مطالعه اثر هورمون ۲۴-اپی براسینولید ($۱۰^{-۸}$ M) بر هموستازی یون و اکسیداسیون لیپید در دو رقم حساس و مقاوم کتان در شرایط تنش شوری (۱۵۰mM NaCl) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

موادگیاهی

بذور مربوط به دو رقم کتان مورد استفاده در آزمایش، TN-97-1 (Var. usitatissimum, Khalkhal, West azarbayejan) و TN-97-106 (Var. humil, Meshgin Shahr, Ardabil) از مرکز تحقیقات کشاورزی (آذربایجان غربی، ارومیه، ایران) تهیه شد. بر اساس یک غربالگری اولیه دو رقم TN-97-1 و TN-97-106 به ترتیب به عنوان ارقام حساس و مقاوم به شوری شناسایی شدند (نتایج نشان داده نشده است). از طرف دیگر طبق تحقیق صورت گرفته توسط قریشی و همکاران (۲۰۱۷) ارقام TN-97-1 و TN-97-106 به ترتیب به عنوان ارقام حساس و مقاوم به سرما هم معرفی شدند. بعد از استریل کردن بذرها (قریشی و همکاران، ۲۰۱۷)، بذرها در دو گروه جداگانه در آب مقطر و محلول ۲۴-اپی براسینولید ($۱۰^{-۸}$ M) (سیگما، آلمان) به مدت ۸ ساعت خیسانده شدند. پس از جوانه زنی در پتری دیش، دانه‌رست‌ها در گلدان‌های پلاستیکی در اتاق کشت (پژوهشکده زیست فناوری، ارومیه) در شرایط ۲۵۰ µmol $m^{-2}S^{-1}$ شدت نور، رطوبت نسبی ۹۰٪-۸۰، دمای ۱±۲۳ درجه سانتی گراد و دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت داده شدند. سه هفته پس از کشت، گیاهان به ۴ دسته تقسیم شدند و تیمارها به صورت زیر اعمال شد: ۱- گیاهان گروه شاهد که با (۰mM NaCl) آبیاری شدند ۲- گیاهان تیمار داده شده با (۱۵۰ mM NaCl) ۳- بذرهای تیمار داده شده با ۲۴-اپی براسینولید ($۱۰^{-۸}$ M) که با (۰mM NaCl) آبیاری شدند و ۴- بذرهای تیمار داده شده با ۲۴-اپی براسینولید ($۱۰^{-۸}$ M) که با (۱۵۰ mM NaCl) آبیاری شدند. پس از گذشت ۲۱ روز ، EC یا هدایت الکتریکی[۳] برای آب زهکشی شده از گلدان‌ها برای تیمار (۰ mM NaCl) و (۱۵۰ mM NaCl) اندازه گیری شد که به ترتیب (dS m^{-1}) ۱ و (dS m^{-1}) ۱۷ را نشان داد، سپس نمونه‌ها جمع آوری شد و در یخچال ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد و در هر گلدان ۱۵ گیاهچه کشت داده شد.

سنجش محتوای یون‌ها

به منظور سنجش محتوای سدیم و پتاسیم، ۵۰ میلی‌گرم از بافت خشک از اندام هوایی را وزن کرده و در فالکون ریخته، سپس به میزان ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به هر کدام اضافه کرده و در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت جوشانده شد. پس از سرد شدن در دمای اتاق، سانتریفیوژ انجام شد و محلول رویی به فالکون جدید منتقل شد. عصاره بدست آمده با استفاده از کاغذ صافی (واتمن) فیلتر شد و سپس برای سنجش محتوای سدیم و پتاسیم با استفاده از فلیم فتومتر (Fater electronic 405, Iran) مورد استفاده قرار گرفت (حاتمی نیا و همکاران، ۲۰۱۳). سنجش

[۱] *Vascular differentiation*
[۲] *Reproductive development*
[۳] *Electrical conductivity*

IrHC2019

کلر نیز با استفاده از کلر آنالیزر (Model 926, Sherwood scientific, UK) مطابق روش حاتمی نیا و همکاران (۲۰۱۳) صورت گرفت.

سنجش محتوای H_2O_2 و MDA

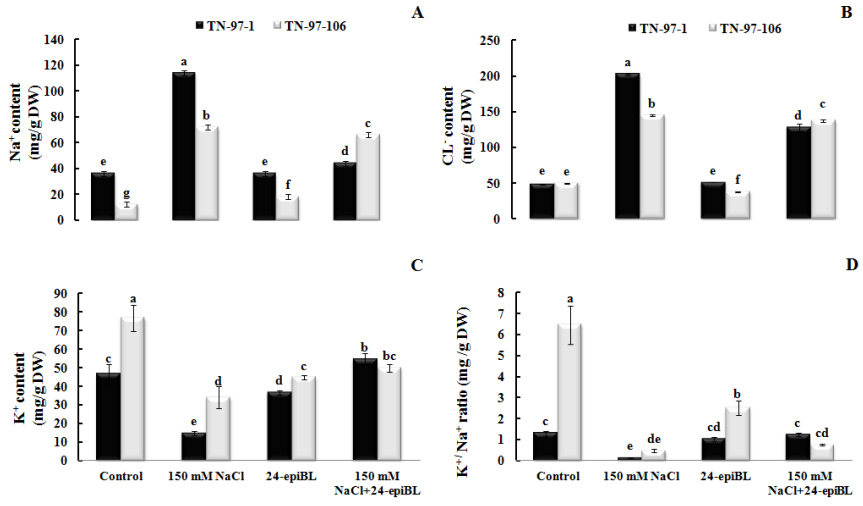
به منظور سنجش محتوای H_2O_2 بر اساس روش Jiang و همکاران (۲۰۱۵) در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانش صورت گرفت. بررسی میزان پراکسیداسیون لیپید با استفاده از سنجش محتوای مالون‌دالدئید با استفاده از تیوباربیتیوریک اسید (TBA) مطابق روش Meir و همکاران (۱۹۹۲) با کمی تغییرات انجام شد. جذب محلول رنگی بدست آمده در طول موج ۵۳۲ نانومتر صورت گرفت. هم‌چنین به منظور برطرف کردن جذب‌های غیر اختصاصی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از جذب نمونه‌ها کم شد. ضریب خاموشی Mcm^{-1} ۱/۵۶×۱۰۵ برای محاسبه محتوای مالون- دی آلدئید استفاده شد (Meir *et al.*, 1992).

آنالیز آماری

همه پارامترها در سه تکرار اندازه‌گیری شد. آزمایش به صورت فاکتوریل و در طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 و بر اساس آزمون دانکن انجام شد. از ضریب خطای $P \leq ۰/۰۵$ استفاده شد و نمودارها بر اساس میانگین داده‌ها و خطای استاندارد رسم شدند.

نتایج و بحث

شوری باعث افزایش معنی‌داری در محتوای سدیم و کلر در هر دو رقم حساس و مقاوم شد. طبق نتایج بدست آمده در شرایط شوری محتوای سدیم به ترتیب به میزان ۳/۱ و ۶ برابر در ارقام TN-97-1 و TN-97-106 افزایش یافت. هم‌چنین محتوای کلر نیز به میزان ۴/۱ و ۲/۸ برابر به ترتیب در ارقام TN-97-1 و TN-97-106 افزایش یافت. این در حالی است که تحت شرایط شوری، محتوای پتاسیم کاهش ۶۸٪ و ۵۵٪ را در ارقام TN-97-1 و TN-97-106 نشان داد (شکل ۱). تغییرات ایجاد شده در محتوای سدیم و پتاسیم باعث کاهش نسبت پتاسیم به سدیم در هر دو رقم حساس و مقاوم در شرایط شوری شد. اعمال تیمار هورمون ۲۴-اپی براسینولید (10^{-8} M) در شرایط تنش NaCl (۱۵۰ mM) باعث کاهش محتوای سدیم (۶۱٪ و ۸٪) و کلر (۳۶٪ و ۴٪) به ترتیب در ارقام حساس و مقاوم شد (شکل ۱). از طرفی تیمار ۲۴-اپی براسینولید باعث افزایش محتوای پتاسیم به ترتیب به میزان ۳/۷ برابر و ۴۷٪ در ارقام حساس و مقاوم در شرایط شوری شد. بطور کلی کاربرد هورمون ۲۴-اپی براسینولید باعث افزایش نسبت پتاسیم به سدیم در گیاهان تحت شوری شد که این نسبت در گیاه حساس (۹/۶ برابر) و در گیاه مقاوم (۱/۶ برابر) بود (شکل ۱).

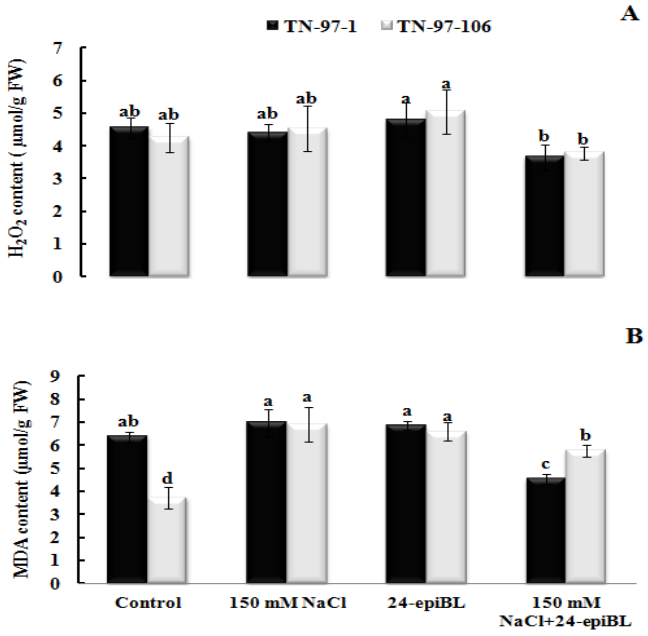


شکل «۱» محتوای یونی در گیاه کتان (*Linum usitatissimum* L.): محتوای سدیم (a): محتوای کلر (b): محتوای پتاسیم (c): نسبت پتاسیم به سدیم (d). از ضریب خطای $P \leq ۰/۰۵$ استفاده شد و نمودارها بر اساس میانگین داده‌ها و خطای استاندارد رسم شدند

IrHC2019

محتوای بالای سدیم باعث عدم تعادل یونی و هموستازی یونی در گیاهان می‌شود. هموستازی یون برای فعالیت‌های متنوع بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی کنترل کننده رشد گیاهان ضروری است (Shu *et al.*, 2015). بنابراین، حفظ پایداری یونی درون سلولی، مخصوصا هموستازی سدیم و پتاسیم، برای سازگاری گیاه با شوری لازم و ضروری است (Hu *et al.*, 2016). نتایج ما نشان داد که تیمار هورمون براسینولید باعث کاهش محتوای سدیم و کلر و افزایش محتوای پتاسیم شد. این نتایج با نتایج Efimova و همکاران (۲۰۱۴) همخوانی داشت. گزارش‌ها حاکی از آن است که هورمون براسینواستروئید با تنظیم ناقل‌های سدیم و پتاسیم و بنابراین پایدار کردن هموستازی یون در شرایط تنش شوری باعث کاهش خسارات ناشی از تنش می‌شود (Efimova *et al.*, 2014).

در مطالعه حاضر میزان پراکسیداسیون لیپید تحت تنش شوری افزایش یافت که با کاربرد هورمون براسینولید کاهش را نشان داد (شکل ۲). بر اساس نتایج ما اعمال هورمون براسینولید باعث کاهش محتوای H_2O_2 و به دنبال آن پراکسیداسیون لیپید شد. مطالعات پیشین افزایش میزان H_2O_2 و MDA در شرایط تنش شوری را نشان داده‌اند (Jan *et al.*, 2018). افزایش محتوای H_2O_2 در شرایط تنش شوری می‌تواند به دلیل کاهش محتوای نسبی آب و محدود کردن انتشار H_2O_2 از محل تولید به اطراف باشد (Ahmad *et al.*, 2018). هم‌چنین ممکن هست که کاهش در فعالیت و محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، CAT و APX باعث تجمع هیدروژن پراکسید و در نتیجه پراکسیداسیون لیپید در شرایط تنش شوری بشود (Ahmad *et al.*, 2018). طبق نتایج بدست آمده، اعمال هورمون براسینولید باعث کاهش محتوای H_2O_2 و در نتیجه پراکسیداسیون لیپید شد (شکل ۲). احتمالا هورمون براسینولید باعث افزایش درونی محتوای هورمون‌هایی مانند اتیلن و سالیسیلیک اسید شده و در نتیجه تعامل بین هورمون‌ها باعث ایجاد تحمل به شوری می‌شود (Jan *et al.*, 2018).



شکل «۱» محتوای H_2O_2 و MDA در گیاه کتان (*Linum usitatissimum* L.): محتوای H_2O_2 (A): محتوای MDA (B). از ضریب خطای ۰/۰۵≥ P استفاده شد و نمودارها بر اساس میانگین داده‌ها و خطای استاندارد رسم شدند.

IrHC2019

منابع

Ahmad, P., Abd_Allah, E.F., Alyemeni, M.N., Wijaya, L., Alam, P., Bhardwaj, R. and Siddique, K.H. 2018 Exogenous application of calcium to 24-epibrassinosteroid pre-treated tomato seedlings mitigates NaCl toxicity by modifying ascorbate–glutathione cycle and secondary metabolites. Scientific reports, 8: 13515.

Efimova, M.V., Savchuk, A.L., Hasan, J.A., Litvinovskaya, R.P., Khripach, V.A., Kholodova, V.P. and Kuznetsov, V.V. 2014. Physiological mechanisms of enhancing salt tolerance of oilseed rape plants with brassinosteroids. Russian Journal of Plant Physiology, 61: 733-743.

Ghoreishi, M., Rahmani, F., Mandoulakani, B.A. and Gorttapeh, A.H. 2017. Impact of variety on resistance to cold stress at physiological levels in *Linum usitatissimum*. Plant Omics, 10: 269.

Hatamnia, A.A., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R., Rahmani, F. and Heidari R. 2013. Effect of salt stress on growth, ion content and photosynthesis of two oriental Tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivars. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 6: 757-761.

Hu, Y., Xia, S., Su, Y., Wang, H., Luo, W., Su, S. and Xiao, L. 2016. Brassinolide Increases Potato Root Growth in Vitro in a Dose-Dependent Way and Alleviates Salinity Stress. BioMed Research International 11 pages.

Jan, S., Alyemeni, M.N., Wijaya, L., Alam, P., Siddique, K.H. and Ahmad, P. 2018. Interactive effect of 24-epibrassinolide and silicon alleviates cadmium stress via the modulation of antioxidant defense and glyoxalase systems and macronutrient content in *Pisum sativum* L. seedlings. BMC Plant Biology, 18: 146.

Jiang, L., Jin, P., Wang. L., Yu, X., Wang, H. and Zheng, Y. 2015. Methyl jasmonate primes defense responses against *Botrytis cinerea* and reduces disease development in harvested table grapes. Scientia Horticulturae**,** 192: 218-23.

Meir, S., Philosoph-Hadas, S. and Aharoni, N. 1992. Ethylene-increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. Journal of the American Society for Horticultural science**,** 117: 128-32.

Muhammad, Z. and Hussain, F. 2010. Vegetative growth performance of five medicinal plants under NaCl salt stress. Pakistan Journal of Botany, 42: 303-316.

Shu, H., Ni, W., Guo, S., Gong, Y., Shen, X., Zhang, X., Xu, P. and Guo, Q. 2015. Root-applied brassinolide can alleviate the NaCl injuries on cotton. Acta Physiologiae Plantarum, 37: 1-11.

Sun, S., An, M., Han, L. and Yin, S. 2015. Foliar Application of 24-Epibrassinolide Improved Salt Stress Tolerance of Perennial Ryegrass. Hort Science, 50: 1518-1523.

Yu, Y., Wu, G., Yuan, H., Cheng, L., Zhao, D., Huang, W., Zhang, S., Zhang, L., Chen, H., Zhang, J. and Guan, F. 2016. Identification and characterization of miRNAs and targets in flax (*Linum usitatissimum*) under saline, alkaline, and saline-alkaline stresses. BMC Plant Biology, 16: 124-137.

IrHC2019

Evaluation of the Effect of 24-epibrassinolide on Ion Homeostasis and Lipid peroxidation in Two Sensitive and Resistant Flax Cultivars Under Salinity Stress

Leila Amraee[1 *], Fatemeh Rahmani[1], Babak Abdollahi Mandoulakani[2]

[1]Department of Biology, Faculty and Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

[2]Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

[*]*Corresponding Author: l.amraei@urmia.ac.ir*

Abstract

Salinity is one of the major environmental challenges affecting several physiological processes. Brassinosteroids are a novel group of phytohormones that affect plant growth and development and reduce the deleterious effects of biotic and abiotic stresses /. The present investigation was conducted in greenhouse to evaluate the effect of 24-epibrassinolide (24-epiBL) on ion homeostasis and lipid peroxidation in two NaCl-stressed flax cultivars. Salt stress altered the ion homeostasis and induced malondialdehyde (MDA) contents in two flax cultivars. 24-epiBL declined stimulatory effects on the accumulation of Na^+ and Cl^- contents at 150 mM NaCl and increased K^+ content and K^+/Na^+ ratio in salt-stressed plants. Application of 24-epiBL further declined H_2O_2 and subsequently reduced level of lipid peroxidation in 24-epiBL+NaCl-treated group, as well. Finally, TN-97-1 cultivar showed the higher level of K^+/Na^+ ratio and lower level of lipid peroxidation than TN-97-106 cultivar in 24-epiBL+NaCl-treated plants.

Keywords: *24-epiBL, Ion himeostasis, Linum, Salinity.*

IrHC2019