افزایش تحمل آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از خشکی در گردو چندلر با پیش تیمار تنش شوری

حدیث کرمی، سهیل کریمی*، کورش وحدتی
گروه علوم باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران.
*نویسنده مسئول: skarimi@ut.ac.ir

چکیده

حساسیت شدید گردو (*Juglans regia*) به تنش خشکی باعث از بین رفتن بخشی از درختان جوان به‌محض انتقال به محیط باغ می‌شود. در پژوهش حاضر تلاش شد با اعمال تنش شوری کنترل‌شده (کاربرد ۱۰۰ میلی مولار سولفات سدیم، کلرید کلسیم یا نیترات پتاسیم در محلول غذایی) بر نهال‌های گردو چندلر یک‌ساله که در بستر کشت بدون خاک و با محلول هوگلند تغذیه می‌شدند نسبت به تنش خشکی تحمل سیستمیک القاء گردد. کارایی تیمارها در ایجاد تحمل به خشکی با ارزیابی آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی، و ارزیابی غلظت پروتئین کل، فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز، و محتوای کارتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنولی در برگ گیاهان پس از یک دوره ۳۰ روزه توقف آبیاری بررسی شد. تیمارهای نیترات پتاسیم و سولفات سدیم شاخص پایداری غشاء را در شرایط تنش خشکی افزایش دادند. در گیاهان پیش تیمار شده غلظت مالون دی آلدهید و پراکسیدهیدروژن کاهش یافت و از طرفی میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نسبت به شاهد افزایش یافت. در این خصوص سولفات سدیم بیشترین کارایی در کاهش آسیب ناشی از تنش اکسیداتیو را نشان داد. محتوای آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنولی گیاهان پیش تیمار شده نیز افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. در این راستا بیشترین افزایش آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی در تیمار نیترات پتاسیم مشاهده شد. درمجموع مشخص شد که افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برگ با پیش تیمار تنش شوری می‌تواند به بهبود تحمل به خشکی گردو کمک نماید.

کلمات کلیدی:* آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پراکسیدهیدروژن، پایداری غشاء، مالون دی الدهید، *Juglans regia

مقدمه

کم‌آبی و تنش خشکی از مهم‌ترین موضوعات در بسیاری از نقاط جهان است و پیش‌بینی می‌شود این امر با توجه به شرایط آب و هوایی در سال‌های آینده روند افزایشی داشته باشد (Cavin *et al.*, 2013).در شرایط تنش خشکی، با بسته شدن روزنه‌ها میزان فتوسنتز کاهش می‌یابد. با توسعه خشکی، در کلروپلاست تثبیت گاز دی‌اکسید کربن به دلیل تغییرات بیوشیمیایی کاهش بیشتری پیدا می‌کند (Pinheiro *et al.*, 2004). در چنین شرایطی کاهش تثبیت گاز دی‌اکسید کربن باعث احیای شدید زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی و نشت الکترون به مولکول اکسیژن می‌گردد. در نتیجه انواع اکسیژن فعال تشکیل می‌شود (Bhattacharjee, 2005). گونه‌های فعال اکسیژن فعال در غلظت‌های بالا با تخریب اکسیداتیو لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به متابولیسم و فعالیت طبیعی سلول آسیب می‌رسانند. گیاهان دارای سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی) برای مقابله با تنش اکسیداتیو هستند (Anjum *et al.*, 2011). آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل بتاکاروتن‌ها، آلفا توکوفرول، آسکوربات و گلوتاتیون و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربیت پراکسیداز، پراکسیداز، و گلوتاتیون ردوکتاز می‌باشند، که آسیب به سلول در شرایط تنش به حداقل می رسانند. سیستم‌های دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی تحمل به خشکی در گیاهانی که در معرض تنش خشکی طولانی‌مدت تضمین می‌کنند (Sharma *et al.*, 2012). Farooq و همکاران (۲۰۰۹) به این نتیجه رسیدند افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به دلیل پاک‌سازی اکسیژن‌های فعال تحمل به خشکی را افزایش می‌دهند.

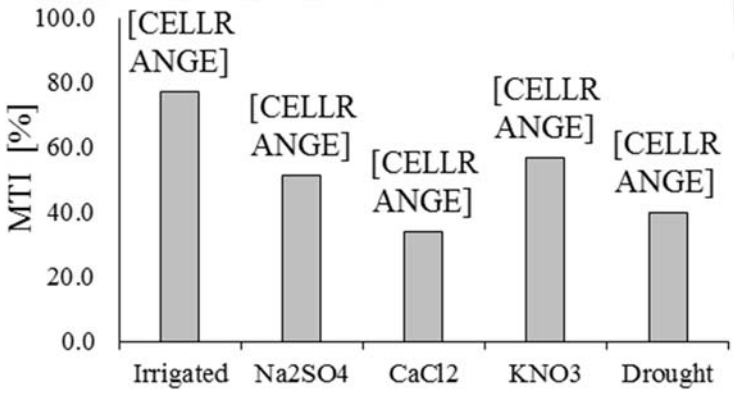
جهت ایجاد آمادگی در گیاه برای مواجه‌شدن با چنین شرایطی می‌توان از روش‌های مختلفی که جهت پیش تیمار گیاه (پرایمینگ) توسعه یافته‌اند استفاده نمود. در این روش‌ها با استفاده از تیمارهای فیزیکی یا شیمیایی، بیان ژن‌های مرتبط با تحمل تنش در گیاه افزایش داده می‌شود و به‌این‌ترتیب گیاه قادر خواهد بود سریع‌تر و با قدرت بیشتری به تغییرات محیطی پاسخ دهد (Karimi *et al*., 2017). در پژوهش حاضر فرض شد که اگر سیستم دفاعی گیاه با کمک تنش شوری کنترل‌شده تحریک گردد، گیاه را قادر خواهد ساخت تا نسبت به شرایط تنش‌های چندگانه‌ای که پس از انتقال به محیط باغ با آن روبرو می‌گردد تحمل بیشتری نشان دهد. تنش شوری یک تنش محیطی پیچیده است و ازاین‌رو می‌تواند مکانیسم‌های دفاعی متنوعی را در گیاه فعال نماید (Karimi *et al*., 2009). به‌عنوان نمونه، فعال شدن مکانیسم‌های تنظیم اسمزی، تشدید فعالیت عوامل آنتی‌اکسیدان، افزایش کارایی مصرف آب، و تغییرات مورفوفیزیولوژیک برگ در پاسخ به تنش شوری گزارش شده است (Vahdati and Lotfi, 2013).

مواد و روش‌ها

نهال‌های کشت بافتی گردو چندلر در محیط گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۳۰ درصد در بستر کشت کوکوپیت و پرلیت (نسبت ۱ به ۳) مستقر شدند. گیاهان با محلول هوگلند تغذیه شدند و پس از پنج ماه، تحت تأثیر نمک‌های مختلف (سولفات سدیم، نیترات پتاسیم و کلرید کلسیم به غلظت ۱۰۰ میلی مولار) جهت ایجاد تحمل به خشکی پیش تیمار شدند. تنش خشکی با متوقف کردن آبیاری گیاهان برای یک دوره ۳۰ روزه اعمال گردید. جهت ارزیابی کارایی تیمارهای مختلف بر ایجاد تحمل به آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از خشکی در گیاهان، شاخص‌های زیر در انتهای دوره تنش خشکی ارزیابی شد: شاخص پایداری غشاء (Karimi *et al*., 2009)، غلظت مالون دی آلدهید (Heath and Parker, 1968) و غلظت پراکسید هیدروژن در برگ (Velikova *et al*., 2000)، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل آسکوربات پراکسیداز (Nakano and Asada, 1981) و کاتالاز (Dhindsa *et al*., 1981). آزمایش‌های مربوط به این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. تجزیه تحلیل‌های آماری با استفاده از SPSS v. 21 انجام شد. جهت تجزیه میانگین از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

تنش خشکی سبب بروز آسیب به غشاء و تراوش یون‌ها از سلول به فضای بین سلولی است (Møller *et al*., 2007). این پدیده نتیجه تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است که منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، تغییر نفوذپذیری غشاء و خسارت به سلول است، که درمجموع تحت عنوان تنش اکسیداتیو شناخته می‌شود. اندازه‌گیری شاخص پایداری غشاء و محصولات ناشی از پراکسیداسیون غشاء یکی از معمولی‌ترین روش‌های اندازه‌گیری صدمات تنش اکسیداتیو به سلول است. در این پژوهش، شاخص پایداری غشاء در شرایط تنش خشکی به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت؛ ولی گیاهان گردو پیش تیمارشده با تنش شوری کنترل‌شده، تحت تنش خشکی پایداری غشاء بیشتری داشتند (شکل ۱). می‌توان گفت که پیش تیمار تنش شوری پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو را به حداقل رسانده است. در این راستا پیش تیمارهای نیترات پتاسیم و سولفات سدیم کارایی بیشتری در افزایش پایداری غشاء تحت تنش خشکی داشتند.



شکل ۱- اثر تنش شوری کنترل‌شده بر شاخص پایداری غشاء در برگ گردو در ۳۰ روز پس از توقف آبیاری. میانگین‌های مشابه در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

کاهش پایداری غشاء ناشی از پراکسیداسیون لیپید توسط گونه‌های اکسیژن فعال در پژوهش‌های مختلف نشان داده شده است (Karimi *et al.*, 2016). تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن همچون پراکسید هیدروژن توسط تنش خشکی منجر به افزایش محتوای مالون دی آلدهید (MDA) می‌شود. MDA فرآورده جانبی پراکسیداسیون لیپیدها است و افزایش آن در سلول بیانگر شدت آسیب تنش اکسیداتیو است (Moller *et al.*, 2007). همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است تنش خشکی مقدار MDA و H_2O_2 در برگ گردو رقم چندلر افزایش داد. پیش تیمار تنش شوری موجب کاهش محتوای پراکسید هیدروژن نسبت به گیاهان بدون پیش تیمار شد. به صورتی که کمترین میزان آن در تیمار سدیم سولفات (۲۱/۱ میکرو مول برگرم بافت تازه) مشاهده شد. همچنین پیش تیمار شوری به‌صورت معنی‌داری موجب کاهش غلظت MDA شد. کمترین میزان MDA بعد از تیمار شاهد (۲۲/۶ میکرو مول در گرم بافت تازه) در تیمار سولفات سدیم (۲۵/۴ میکرو مول در گرم بافت تازه) مشاهده شد. این کاهش در سطح آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از خشکی می‌تواند ناشی از افزایش بیوسنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان پیش تیمار شده با تنش شوری باشد. در این راستا، غلظت پروتئین در گیاهان پیش تیمار شده بیشتر از گیاهان دیگر بود (جدول ۱). بخشی از این پروتئین‌ها به‌عنوان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مرتبط با تحمل تنش عمل نمایند. برای مقابله با تنش اکسیداتیو آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز فعال می‌شوند. این آنزیم‌ها مشخصاً در حذف H_2O_2 در سلول نقش دارند. در این پژوهش پیش تیمار تنش شوری به‌صورت معنی‌داری موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد. به صورتی که بیشترین میزان آنزیم کاتالاز در تیمار سولفات سدیم (۶/۳۴۶ واحد گرم در دقیقه) مشاهده شد. همچنین پیش تیمار تنش شوری در گیاه گردو رقم چندلر و موجب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شد. در این خصوص بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمارهای نیترات پتاسیم (۲۹۹/۹ واحد گرم در دقیقه) و سولفات سدیم (۲۲۳/۲واحد گرم در دقیقه) مشاهده شد.

جدول ۱- اثر تنش شوری کنترل‌شده بر غلظت مالون دی آلدهید (MDA)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و پروتئین‌های محلول و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (A-POX) در برگ گردو چندلر در ۳۰ روز پس از توقف آبیاری.

Treatments	MDA [µmol g^{-1} FM]	H_2O_2 [µmol g^{-1} FM]	Proteins [mg g^{-1} FM]	CAT [Unit g^{-1} min^{-1}]	A-POX [Unit g^{-1} min^{-1}]
Irrigated	22.6^{c}	24.9^{b}	7.26^{d}	0.280^{c}	49.4^{d}
Na	25.4^{c}	21.1^{b}	22.91^{a}	6.346^{a}	223.2^{a}
Ca	38.9^{b}	29.6^{ab}	16.90^{b}	1.811^{b}	136.5^{b}
K	31.4^{bc}	24.9^{b}	19.18^{ab}	3.725^{ab}	299.9^{a}
Drought	50.2^{a}	34.4^{a}	15.56^{cd}	2.216^{b}	60.08^{c}
ANOVA	*	**	**	*	**

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد. میانگین‌های مشابه در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

تغییرات غلظت آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل کارتنوئیدها (CRTs)، آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنولی در برگ گردو رقم چندلر در شرایط تنش خشکی در جدول ۲ نشان داده شده است. غلظت کارتنوئیدها تحت تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. ولی تنش خشکی محتوای آنتوسیانین‌ها را تا حدودی نسبت به شاهد افزایش داد، هرچند که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند و اثر محافظتی طی تنش خشکی دارند و مقادیر بیشتر آن‌ها برای افزایش تحمل تنش خشکی مطلوب است (Hoekstra *et al.*, 2001). پیش تیمار تنش شوری به گونه معنی‌داری سبب افزایش آنتوسیانین‌ها در برگ گیاهان تحت تنش شد و بیشترین میزان در تیمار نیترات پتاسیم (۲۱۷/۸میلی مول در گرم بافت تازه) مشاهده شد. میزان ترکیبات فنولی برگ در گیاهان پیش تیمار شده به‌صورت معنی‌داری افزایش نشان داد ولی در گیاهان پیش تیمار نشده در سطح شاهد باقی ماند. بیشترین میزان آن در تیمارهای سولفات سدیم (۵۹/۱۱ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه) و نیترات پتاسیم (۴۸/۶۷ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه) مشاهده شد. ترکیبات فنولی از مهم‌ترین و مؤثرترین آنتی‌اکسیدان‌های سلول هستند که می‌توانند آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی را در سلول مهار نمایند (Bhattacharjee, 2005).

جدول ۲- اثر تنش شوری کنترل‌شده بر غلظت کاروتنوئیدها (CRTs)، آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنولی در برگ گردو چندلر در ۳۰ روز پس از توقف آبیاری.

Treatments	CRTs [µg g^{-1} FM]	Anthocyanins [µmol g^{-1} FW]	Phenols [mg GA g^{-1} FM]
Irrigated	156.7	155.3^{c}	27.70^{b}
Na	106.5	202.1^{b}	59.11^{a}
Ca	139.2	198.84^{b}	25.48^{b}
K	144.3	217.8^{a}	48.67^{a}
Drought	138.2	186.6^{bc}	29.12^{b}
ANOVA	ns	*	*

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد. میانگین‌های مشابه در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش شوری کنترل‌شده می‌تواند موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (آنتوسیانین و ترکیبات فنولی) در برگ گیاهان گردو تحت تنش خشکی شود. این اثر تنش شوری کنترل‌شده می‌تواند سبب القاء تحمل به خشکی در گردو شده و از این راهکار می‌توان برای ایجاد آمادگی در نهال، پیش از انتقال به باغ استفاده گردد.

منابع

Anjum, S., Wang, L., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L. and Zou, C. 2011. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. Journal of Agronomy and Crop Science, 197: 177-185.

Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal. Curr. Sci, 89: 1113-1121.

Cavin, L., Mountford, E. P., Peterken, G. F. and Jump, A. S. 2013. Extreme drought alters competitive dominance within and between tree species in a mixed forest stand. Functional Ecology, 27: 1424-1435.

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S.M.A., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In Sustainable agriculture. Springer Netherlands. pp. 153-188

Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. and Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends in plant science, 6: 431-438.

Karimi, S., Eshghi, S., Karimi, S. and Hasan-Nezhadian, S., 2017. Inducing salt tolerance in sweet corn by magnetic priming. Acta Agriculturae Slovenica, 109(1): 89-102.

Moller, I. M., Jensen, P. E. and Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Annu. Rev. Plant Biol., 58: 459-481.

Pinheiro, H. A., Damatta, F. M., Chaves, A. R., Fontes, E. P. and Loureiro, M. E. 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of coffea canephora subjected to long-term drought. Plant Science, 167: 1307-1314

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. and Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany, 2012.

Vahdati, K. and Lotfi, N. 2013. Abiotic stress tolerance in plants with emphasizing on drought and salinity stresses in walnut. INTECH Open Access Publisher.

Improving Tolerance of Walnut 'Chandler' Against Drought Induced Oxidative Damages by Salt Stress Pretreatment

Hadis Karami, Soheil Karimi*, and Kourosh Vahdati
Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran.
** Corresponding author: skarimi@ut.ac.ir*

Abstract

Great sensitivity of Walnut (*Juglans regia*) to drought causes death of major portion of young plants after transplantation to orchard. In this study we tried to induce systemic drought tolerance in one year old walnut 'Chandler' trees grown in soilless medium by imposing controlled salt stress (100 mM Na_2SO_4, $CaCl_2$, or KNO_3) in Hoagland's nutrient solution. The effectiveness of the treatments in development of drought tolerance was evaluated by determining oxidative damages, and evaluation of the total protein concentration, the activity of catalase and ascorbate peroxidase, and the content of carotenoids, anthocyanin and phenolic compounds in the leaves after withholding irrigation for a 30 days. Na_2SO_4, and KNO_3 improved membrane stability index under drought stress condition. Under drought stress, concentration of MDA and hydrogen peroxide decreased by the pretreatments and higher protein concentration and antioxidant enzyme activity were observed in these plants. In particular, Na_2SO_4 was the most efficient treatment in reducing oxidative stress damages. The content of non-enzymatic antioxidants including anthocyanins and phenolic compounds also significantly increased in pretreated plants in comparison to the non-pretreated plants under drought stress. In this regard, the greatest increase in non-enzymatic antioxidants were observed in KNO_3 treated plants. In conclusion, higher antioxidative activity in the leaves of the salinity-pretreated plants was found to be key response for improving walnut drought tolerance.

Keywords: Antioxidant enzymes, Hydrogen peroxide, Membrane stability, Malondialdehyde, *Juglans regia.*