اثر ۲۴- اپی براسینولید بر پراکسیداسیون لیپید، میزان پروتئین و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی دانهال های ازگیل ژاپنی تحت تنش شوری

فاطمه صادقی[1*] و اختر شکافنده[2]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه شیراز ۲-دانشیار بخش علوم باغبانی، دانشگاه شیراز

* نویسنده مسئول

در این پژوهش، تغییرات پراکسیداسیون لیپید، میزان پروتئین و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی (سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) دردانهال های ازگیل ژاپنی تحت تنش شوری و کار برد ۲۴- اپی براسینولید مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان با ۵ سطح نمک [۰/۵(شاهد)، ۲، ۴، ۶ و ۸ دسی زیمنس بر متر] و ۴ سطح ۲۴- اپی براسینولید [۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر] تیمار شدند. شوری فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان پروتئین را کاهش و میزان فعالیت سوپراکسیددیسموتاز و سنتز مالون دی الدهید را افزایش داد. فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی و میزان پروتئین در گیاهان تیمار شده با ۲۴- اپی براسینولید افزایش یافت. گیاهان تحت تیمار ۲۴- اپی براسینولید در مقاسیه با گیاهان تحت تیمار شوری و بدون تیمار ۲۴- اپی براسینولید میزان فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز بالاتری داشتند. کاربرد ۲۴- اپی براسینولید همچنین میزان سنتز مالون دی الدهید در شرایط شور راکاهش داد. نتایج نشان می دهد که کاربرد ۲۴- اپی براسینولید تحت شرایط تنش شوری تعادل میان تولید رادیکال های آزاد و دفاع آنزیمی را با افزایش محتوای پروتئین و مهار رادیکال های آزاد تغییر می دهد.

مقدمه

تنش شوری یکی از تنش های مهم مخرب در کشاورزی است. غلظت های بالای نمک در محیط اطراف ریشه موجب کاهش پتانسیل آبی، عدم تعادل تغذیه ای، سمیت یونی، تغییر در متابولیسم سلولی و کاهش رشد و تولید محصول می گردد. تنش شوری همچنین منجر به تنش اکسیداتیو به علت تولید گونه های فعال اکسیژن مثل رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل می شود. این گونه های اکسیژن فعال که در سلول تولید می شوند توسط سیستم انتی اکسیدانتی و غیر آنزیمی سمیت زدایی می شوند. سیستم آنتی اکسیداتیو آنزیمی شامل چندین آنزیم مثل پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و اسکوربیت پراکسیداز (APX) می باشد. همچنین تعدادی از هورمون های گیاهی مثل اتیلن، ابسایزیک اسید، سالیسیلیک اسید و استروئیدها نیز در تنظیم سیستم انتی اکسیدانتی درگیر هستند(Arora et al., 2008) .

براسینواستروئیدها از مشتقات ۵- کولستان می باشند و یک نقش ضروری در رشد ونمو گیاهان توسط تاثیر گذاری بر پاسخ های فیزیولوژیک مختلف بازی می کنند. یکی از مهمترین نقش براسینواستروئیدها توانایی آنها در افزایش تحمل گیاهان بر علیه تنش های زنده و غیر زنده از جمله شوری می باشد (Bajguz and hayat, 2009). ازدامیر و همکاران (۲۰۰۴) و نونز و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده کردند که تحمل به تنش ها توسط این گروه از هورمون ها به علت تنظیم سیستم انتی اکسیدانی است.

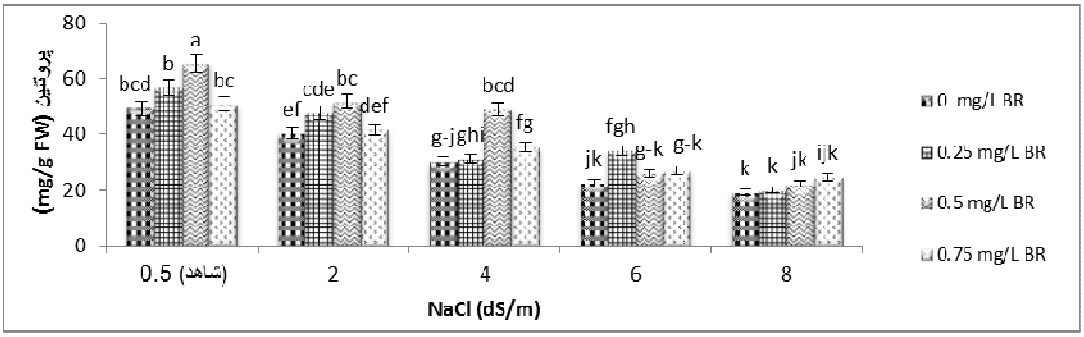
ازگیل ژاپنی با نام علمی *Eriobotrya japonca* Lindl از تیره رزاسه و بومی چین می باشد (EL-Refaey and EL-Dengawy., 2005). با توجه به اینکه در ایران به ویژه استان فارس از بذر برای تکثیر و احداث باغ استفاده می شود، و این دانهال ها می توانند به عنوان پایه برای رقم های مطلوب مورد استفاده قرار گیرند وبه دانش ما تا کنون هیچ گونه فعالیتی در ایران روی تحمل به شوری در این گیاه انجام نشده است. هدف از این پژوهش مطالعه اثر ۲۴- اپی براسینولید روی فعالیت آنزیم های انتی اکسیدانتی، پراکسیداسیون لیپید و پروتئین در گیاه ازگیل ژاپنی تحت تنش شوری بود.

مواد و روش ها

این آزمایش در گلخانه پژوهشی با دمای روز و شب به ترتیب ۳±۳۰ و۳± ۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۰٪ در سال ۱۳۹۱ انجام شد. بذرهای گیاه ازگیل ژاپنی از میوه های یکدست خریداری شده از مراکز تولید جدا کرده و حدود ۲ هفته در ۴ درجه سلسیوس سرمادهی شدند. سپس در شن مرطوب قرار داده تا روئیده شوند. پس از رشد مناسب، نهال هایی که از لحاظ اندازه دارای یکنواختی بیشتری بودند، برای آزمایش انتخاب شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. تیمارها شامل ۵ سطح شوری ۰/۵(شاهد) ، ۲، ۴، ۶ و ۸ دسی زیمنس بر متر و ۲۴-اپی براسینولید در غلظت های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر بود. تیمار ۲۴- اپی براسینولید پس از گذشت یک ماه از تیمار شوری به صورت محلول پاشی روی گیاهان به طور کامل و یکنواخت تا مرحله قطره ریزان (Run off) انجام گرفت. محلول پاشی ۳ بار به فاصله ۱ هفته انجام شد. از عصاره برگی جهت اندازه گیری شاخص های آنتی اکسیدانتی از جمله فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به روش بیچامپ و فریدوویچ (۱۹۷۱)، کاتالاز به روش چانسی و ماهلی (۱۹۹۵)، میزان پروتئین به روش برادفورد (۱۹۷۶) و مالون دی الدهید به روش هیت و پاکر (۱۹۶۸) استفاده شد. تجزیه داده ها با نرم افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین ها به روش LSD در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

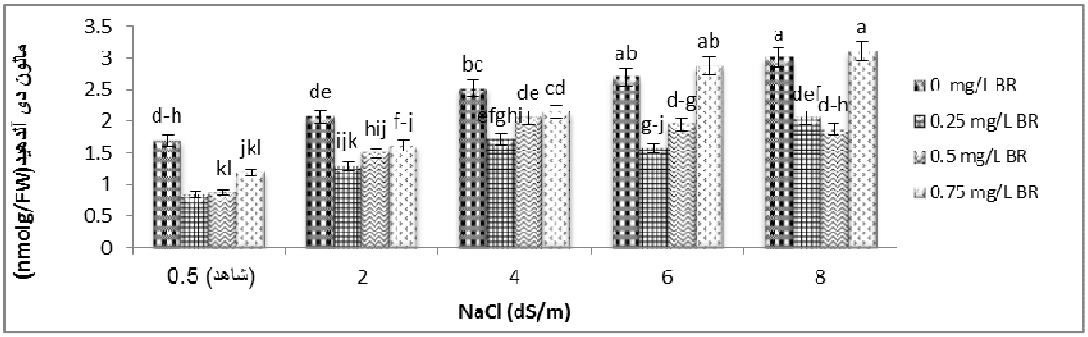
اثر تیمارهای مختلف شوری بدون محلول پاشی ۲۴-اپی براسینولید نشان داد که افزایش شوری خاک سبب کاهش معنی داری در تولید پروتئین نسبت به شاهد شد. در تیمار ۸ dS/m مقدار این کاهش ۲/۵ برابر شاهد بود. بیشترین میزان پروتئین مربوط به شاهد (۰/۵ dS/m) و غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر ۲۴-اپی براسینولید می باشد که این مقدار ۲۴/۸ درصد بیشتر از گیاهان شاهد بود. کمترین میزان پروتئین در شوری ۸ دسی زیمنس بر متر و بدون تیمار ۲۴- اپی براسینولید مشاهده شد (شکل ۱). رادیکال های فعال اکسیژن که در شرایط تنش شوری ایجاد می شوند، موجب اکسیداسیون زنجیره های آمینو اسید و تشکیل اتصالات پروتئین-پروتئین گردیده و در نهایت منجر به افزایش تجزیه پروتئین می شوند (Bartels and Sunkar, 2005). اسپری برگها با محلول ۲۴- اپی براسینولید در تنش های مختلف شوری موجب افزایش مقدار پروتئین کل در برگها گردید. به طور کلی اثرات بازدارندگی تنش شوری روی میزان پروتئین با کاربرد براسینواستروئید کم می شود. این نتایج با یافته های اروا و همکاران (۲۰۰۸) که افزایش میزان پروتئین تحت تاثیر براسینواستروئید با سنتز پروتئین های محافظ تنش در دانهال های ذرت افزایش می یابد همسویی داشت.



شکل ۱- اثر متقابل سطح های مختلف شوری و براسینواستروئید بر میزان پروتئین ازگیل ژاپنی

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند در سطح ۵٪ آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند.

مقایسه اثر متقابل شوری و تنظیم کننده رشد نشان داد که بدون محلول پاشی ۲۴- اپی براسینولید با افزایش سطح شوری میزان مالون دی الدئید افزایش یافت. بیشترین میزان (۳/۱ nmol/g FW) در شوری ۸ دسی زیمنس بر متر بدست آمد که تفاوت معنی داری با شوری ۶ دسی زیمنس بر متر نداشت. بیشترین میزان مالون دی آلدئید در سطح شوری ۸ دسی زیمنس بر متر و غلظت ۰/۷۵میلی گرم ماده ۲۴-اپی براسینولید و کمترین میزان آن در تیمار شاهد و غلظت ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر ۲۴-اپی براسینولید مشاهده گردید(شکل ۲). تنش شوری، با ایجاد تنش اکسیداتیو که منجر به افزایش تولید و تجمع رادیکال های فعال می شود موجب اکسید شدن پروتئین ها و لیپید ها شده و نهایتاً تخریب ساختار غشا را در پی دارد (Molassiotis et al., 2006). از آنجایی که پراکسیداسیون چربی های غشا بیان کننده میزان خسارت اکسیداتیو می باشد و در نهایت منجر به کاهش یکپارچگی غشاء می گردد، لذا اغلب از این ویژگی به عنوان یک شاخص جهت بیان میزان خسارت اکسیداتیو استفاده می شود. کاهش مالون دی آلدئید درمحلول پاشی با ۲۴- اپی براسینولید به دلیل حفظ لیپیدهای غشا از خسارت القاء شده به وسیله رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد.

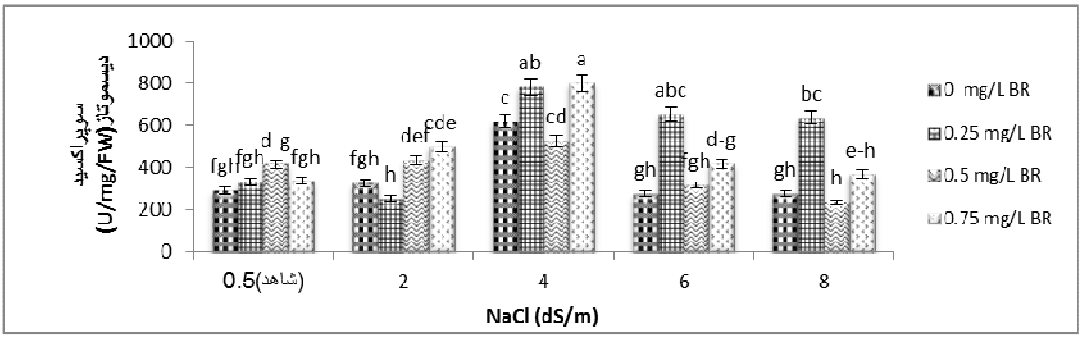


شکل۲- اثر متقابل سطح های مختلف شوری و براسینواستروئید بر میزان مالون دی الدئید در ازگیل ژاپنی

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند در سطح ۵٪ آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند.

مقایسه اثر متقابل شوری و ۲۴-اپی براسینولید نشان داد که بدون محلول پاشی ۲۴-اپی براسینولید با افزایش شوری خاک میزان این آنزیم درشوری ۴ دسی زیمنس بر متر به طور معنی داری بیشتر از شاهد و سایر سطح های شوری بود. بیشترین فعالیت SOD در تیمار ۴ دسی زیمنس بر متر و غلظت ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر ۲۴- اپی براسینولید و کمترین میزان SOD در شوری ۸ دسی زیمنس بر متر و غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر ۲۴-اپی براسینولید مشاهده شد(شکل ۳). با افزایش میزان شوری، سیستم آنتی اکسیدان گیاه فعال شده و با افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به عنوان اولین سد دفاعی در مقابل حمله رادیکال های اکسیژن، در مقابل خسارات ناشی از تنش شوری مقاومت می‌نماید.

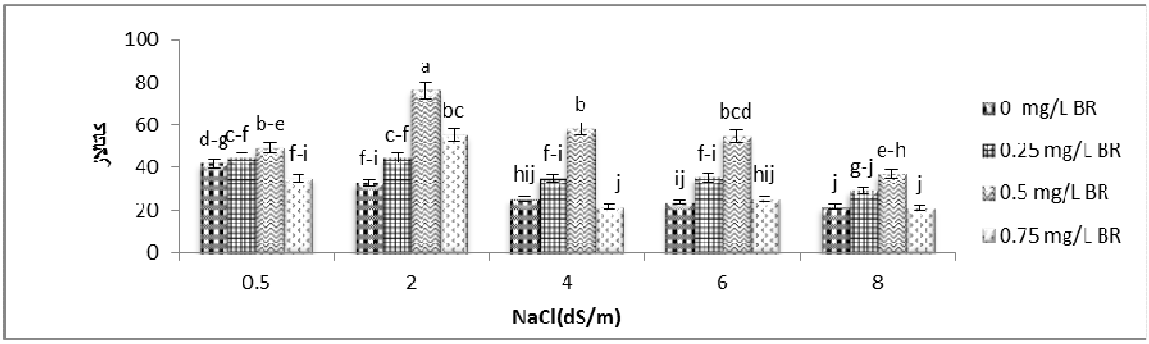
حیات و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی بوسیله براسینواستروئیدها یک پدیده تنظیم شده ی ژنی است.گزارش شده است که براسینواستروئیدها به طور موثری گونه های فعال اکسیژن را با افزایش سیستم آنزیم های آنتی اکسیدانتی از بین می برند که این دلالت بر نقش مثبت این هورمون در تمامیت غشا است (Hayat et al., 2010).



شکل ۳- اثر متقابل سطح های مختلف شوری و براسینواستروئید بر میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند در سطح ۵٪ آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند.

نتایج اثر متقابل شوری و ۲۴- اپی براسینولید نشان داد که بدون محلول پاشی ۲۴- اپی براسینولید، با افزایش شوری خاک، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. بیشترین فعالیت این آنزیم در شوری ۲ دسی زیمنس بر متر و تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر ۲۴- اپی براسینولید می باشد و کم ترین میزان آن در شوری ۸ دسی زیمنس و تیمار۰/۷۵ میلی گرم در لیتر ۲۴- اپی براسینولید مشاهده شد. تیمار با ۰/۵ میلی گرم در لیتر در تمام سطح های شوری باعث افزایش معنی داری آنزیم کاتالاز شد(شکل ۴). نتایج این پژوهش در ارتباط با افزایش کاتالاز در محلول پاشی با ۲۴- اپی براسینولید با نتایج حیات و همکاران (۲۰۰۰) که افزایش فعالیت کاتالاز را با محلول پاشی براسینواستروئید در سطوح ۰/۵، ۱ و ۳ میکرو مولار مشاهده کردند همسویی داشت. همچنین ورما و همکاران (۲۰۱۲) تایید کرد که محلول پاشی با براسینواستروئید در بادام زمینی باعث افزایش کاتالاز در شرایط نرمال می شود.



شکل ۴- اثر متقابل سطح های مختلف شوری و براسینواستروئید بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند در سطح ۵٪ آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارند.

در مجموع، براسینواستروئید تحمل گیاهان ازگیل ژاپنی به تنش اکسیداتیو ناشی از نمک را با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی افزایش می دهد. فعایت بالاتر این آنزیم ها نقش براسینواستروئید را در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری و افزایش ظرفیت تحمل در گیاهان را نشان می دهد.

منابع

Arora, N., R. Bhardwaj, P. Sharma, H.K. Arora. 2008. 28-Homobrassinolide alleviates oxidative stress in salt treated maize (*Zea mays* L.) plants. Brazilian Journal of Plant Physiology. 20:153-157.

Bajguz, A and S.H. Hayat. 2009. Effect of brassinosteroids on the plant responses to environmental stress. Plant Physiology and Biochemistry. 47:1-8.
Bartels, D and R. Sunkar. 2005. Drought and tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Science. 24: 23-58.

Beauchamp, C and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry. 44:276–287.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248–254.

Chance, M and A.C. Maehly. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol. 2: 764–775.

EL-Refaey, F.A and E.F.A. EL-Dengawy. 2005. Promotion of seed germination and subsequent seedling growth of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) by moist-chilling and GA3 applications. scientia horticulturae. 105: 331-342.

Hayat, S., S.A. Hasan, M. Yusuf, Q. Hayat and A. Ahmad. 2010. Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiate*. Environmental and Experimental Botany. 69 : 105–112.

Heat, R.L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolate chloroplast. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125:180-198.

Molassiotis, A., T. Sotiropoulos, G. Tanou, G. Diamantidis, and I. Therios. 2006. Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM 9 (*Malus domestica* Borkh). Environmental and Experimental Botany. 56:54-62.

Nunez, M., P. Mazzafera, L.M. Mazorra, W.J. Siqueira and M.A.T. Zullo.2003. Influence of brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. Biologia Plantarum. 47:67-70.

Ozdamir, F., M. Bor, T. Demiral and I. Turkan. 2004. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, prolin content and antioxidative system of rice (*Oriza sativa* L.) under salinity stress. Plant growth Regulation. 42: .203-211.

Verma, A., C.P. Malik and V.K. Gupta. 2011. In vitro effects of brassinosteroids on the growth and antioxidant enzyme activities in groundnut. ISRN Agronomy. 2012: 1-8.

Effects of 24-epibrassinolide on lipid peroxidation, protein and antioxidative enzyme activities in seedlings of loquat under salinity stress

F. Sadeghi[1*] and A. Shekafandeh[2]
1,2- Dept. of Horticultural Sciences, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

*Corresponding author

In this research, the changes in lipid peroxidation, protein content and activities of antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)] in loquat seedlings subjected to NaCl stress and 24-epibrassinolide application were investigated. Plants were treated with five levels of salt(0.5, 2, 4, 6and 8 dS/m) and four levels of 24-epibrassinolide solution (0, 0.25, 0. 5 and 0.75 mg/l). Salinity decreased CAT activity and protein concentrations and increased SOD activity and malondialdehyde synthesis. The activities of antioxidative enzymes and protein concentration increased in 24-epibrassinolide–treated plants. In comparison to salt treated plants without 24-epibrassinolide treatment, salt treated plants sprayed with 24-epibrassinolide had higher SOD and CAT activities. Exogenous application of 24- epibrassinolide decreased malondialdehyde synthesis

under saline conditions. Our results suggest that 24-epibrassinolide application under salt stress conditions alters the equilibrium between free radical production and enzymatic defence reactions in loquat by enhancing the protein content and free radical scavenging capacity.