فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۱، شماره ۲، سال ۱۳۹۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۵/۱۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۹/۱۲

اثر پیش تیمار اسپرمیدین و متیلن بلو بر برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه بابونه (*Matricaria recutita L.*) به تنش شوری

***فاطمه نصیبی[۱]، خسرو منوچهری کلانتری[۱]، نسرین فاضلیان[۱]**
[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

چکیده:
شوری یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی محدود کننده رشد و تولید در گیاهان در سراسر دنیا است. شناسایی و به کاربردن ترکیباتی که بتوانند تحمل گیاهان را به تنش‌های محیطی از جمله شوری افزایش دهند از نقطه نظر تئوری و عملی حایز اهمیت است. در این پژوهش، اثرات پلی آمین اسپرمیدین در افزایش تحمل به شوری در گیاه بابونه مورد بررسی قرار گرفت. تنش شوری در گیاه بابونه باعث کاهش رشد گردید و مقدار پراکسیدهیدروژن، مالون‌دآلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز و گایاکل پراکسیداز را به طور چشمگیری افزایش داد. پیش تیمار گیاهان بابونه با اسپرمیدین اثر معنی‌داری بر رشد ساقه و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نداشت در حالی‌که مقدار پراکسیدهیدروژن و مالون‌دآلدئید را به میزان معنی‌داری کاهش و رشد ریشه و فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. کاربرد اسپرمیدین توام با متیلن بلو (به عنوان بازدارنده مسیر عملکرد نیتریک اکسید از طریق گوانیلات سیکلاز) اثر اسپرمیدین در افزایش رشد ریشه، کاهش مقدار پراکسیدهیدروژن و مالون‌دآلدئید و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را خنثی نمود در حالی‌که اثر معنی‌داری بر میزان رشد ساقه و فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز نداشت. بنابراین به نظر می رسد که اثرات Spd بر این پارامترهای فیزیولوژیکی به احتمال زیاد از طریق تولید نیتریک اکسید و مسیر سیگنالینگ گوانیلات سیکلاز صورت می‌گیرد اما مطالعه بیشتر برای بررسی جزئیات لازم است.

کلمات کلیدی: اسپرمیدین، تنش اکسیداتیو، شوری، متیلن بلو، نیتریک اکسید

مقدمه:

فاکتورهای محیطی متعددی بر رشد و نمو و تولید محصول در گیاهان تاثیر می‌گذارند. خشکی، شوری، عدم تعادل مواد معدنی، گرما و سرما از جمله مهمترین عواملی هستند که تولید محصول را تحت تاثیر قرار می‌دهند. شوری و خشکی وسیع‌ترین عوامل ایجاد کننده تنش در سطح جهان می‌باشند (Chinnusamy *et al.*, 2005). بارندگی کم، سطح تبخیر بالا، هوازدگی سنگ‌ها، آبیاری با آب‌های شور یا کیفیت پایین، زهکشی ضعیف خاک به خصوص در مناطق خشک و عوامل انسانی از عوامل دخیل در افزایش شوری می‌باشند (Manchanda and Garg, 2008). Gama و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند گیاهانی که در شرایط شوری رشد می‌کنند از سه طریق اساسی تحت تنش قرار می‌گیرند:

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: nasibi2002@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]

کاهش پتانسیل آبی در ناحیه ریشه که منجر به کم آبی می شود، سمیت یونی یون‌هایی مثل Na^+ و Cl^- و عدم تعادل تغذیه‌ای که با کاهش جذب و یا انتقال به اندام هوایی صورت می‌گیرد. در مورد اثرات سمیت یونی درتنش شوری، بیشتر به یون Na^+ پرداخته شده است. سمیت متابولیکی Na^+ به علت توانایی آن برای رقابت با K^+ در اتصال به جایگاه‌های ضروری برای اعمال سلول می‌باشد. همچنین میزان بالای سدیم خارج از سلول‌های ریشه (خاک) موجب مهار فعالیت پمپ H^+-ATPase، بر هم زدن شیب الکتروشیمیایی و مهار فعالیت سیستم آنتی پورت Na^+/H^+ می‌گردد (Tester and Venport, 2003). در تنش شوری تولید گونه‌های فعال اکسیژن در محیط سلول، موجب ایجاد تنش ثانویه‌ای به نام تنش اکسیداتیو نیز می گردد (Chinnusamy *et al*., 2005). گونه‌های فعال اکسیزن شامل مولکول‌های سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) و اکسیژن یکتایی ($^1O_2$) می‌باشند. این گونه‌ها بسیار سمی و واکنش گر بوده و واکنش سریع آنها می‌تواند به ملکول‌های زیستی مثل لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و رنگیزه‌های فتوسنتزی و غشاها آسیب جدی وارد کند و حتی منجر به مرگ سلولی شود (Abdul Jaleel *et al*., 2009). گیاهان با فعال سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گایاکل پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل فنلها، کاروتنوییدها و یا آسکوربیک اسید و غیره امکان سم زدایی و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن را فراهم می‌نماید (Shi *et al*., 2007). بسیاری از گیاهان برای مقاومت در برابر تنش خشکی و شوری ترکیبات اسمولیت را سنتر می‌کنند. از جمله اسمولیت‌ها می‌توان به پرولین، بتائین و پلی‌آمین‌ها اشاره نمود (Orcutt and Nilsen, 2000). پلی آمین‌ها (PAs)، پلی‌کاتیون‌های مهمی هستند که معمولا در گیاهان عالی به فرم دی‌آمین (پوترسین)، تری‌آمین (اسپرمیدین) و تترا‌آمین (اسپرمین) یافت می‌شوند. پلی آمین‌ها در بافت گیاهان به شکل آزاد یا باند شده به درشت مولکول‌ها وجود دارند (Tabor and Tabor, 1984). طبیعت پلی‌کاتیونی این ترکیبات باعث می‌شود که پلی‌آمین‌ها بتوانند به آسانی با گروه‌های دارای بار منفی فسفولیپیدها و یا جایگاه‌های آنیونی دیگر روی غشا واکنش دهند و در نهایت باعث تغییر در پایداری و نفوذپذیری غشا گردند. این ترکیبات قادرند به پلی‌آنیون‌های سلولی مانند DNA، RNA، پروتئین‌ها و اجزای دیواره سلولی باند شوند و از این طریق سنتز، ساختار و عملکرد درشت مولکول‌ها را تحت تاثیر قرار دهند (Pandey *et al*., 2000). گزارش شده است که پلی‌آمین ها همچنین به عنوان جاروب کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و ماهیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات احتمالا مربوط به مهار آنزیم NADPH اکسیداز و ممانعت از تجمع رادیکال‌های $O_2^{\cdot-}$ می‌باشد (Pang *et al*., 2007). این ترکیبات همچنین در رشد و نمو، القای تقسیم سلولی، ریخت زایی، پیری و پاسخ به تنش های محیطی نقش مهمی ایفا می‌کنند (Liu *et al*., 2007). مطالعات انجام شده نشان داده است که افزایش فعالیت و یا رونویسی آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز (ADC) باعث افزایش مقدار PA_s در گیاهان تحت تنش شوری شده و تجمع PA_s باعث افزایش مقاومت گیاهان به تنش شوری گردیده است (Pang *et al*., 2007). در سال‌های اخیر نقش PA_s اگزوژن در القای مقاومت در گیاهان تحت تنش بررسی شده است. در اکثر گونه‌های گیاهی مشاهده شده است که نسبت افزایش یافته اسپرمیدین (Spd) و اسپرمین (Spm) به پوتریسین (Put) در پاسخ به شوری باعث افزایش تحمل به شوری گردیده است (Gill and Tuteja, 2010). در مطالعات اخیر گزارش شده است که بسیاری از اثرات پلی‌آمین‌ها در بهبود تنش‌ها احتمالا مربوط به تولید نیتریک اکسید (NO) می‌باشد و در حقیقت مسیر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]

سیگنالینگ NO، باعث القا پاسخ‌های گیاهی می‌گردد (Tun *et al*., 2006). یکی از مسیرهای اصلی عملکرد NO، تحریک آنزیم گوانیلات سیکلاز و تولید پیامبر ثانویه cGMP است (Stamler, 1994). بنابراین این احتمال داده می‌شود که پلی‌آمین‌ها از طریق تولید NO و فعال کردن مسیر گوانیلات سیکلاز عملکرد خود را اعمال نمایند. از طرف دیگر مطالعات انجام شده نشان داده که متیلن بلو (MB) مهار کننده آنزیم گوانیلات سیکلاز می‌باشد و در نهایت مانع عملکرد NO و cGMP می‌گردد (Keaney *et al*., 1994; Paciullo *et al*., 2010). با توجه به مطالب بیان شده، هدف از این پژوهش مطالعه نقش اسپرمیدین در افزایش تحمل به شوری در گیاه بابونه بوده است. در این بررسی برای مطالعه نقش احتمالی پلی‌آمین ها از طریق NO و آنزیم گوانیلات سیکلاز، متیلن بلو به عنوان بازدارنده این مسیر استفاده شده است.

مواد و روش‌ها:

در پژوهش حاضر، بذرهای بابونه (*Matricaria recutita*) از موسسه پاکان بذر اصفهان تهیه شد و در ظروف یکبار مصرف حاوی پرلیت و کوکوپیت کاشته شدند. بعد از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها با محلول غذایی لانگ-اشتون (Meidner 1984) با رقت ۱:۲ هفته‌ای سه بار آبیاری شدند. اسیدیته (pH) محلول‌ها توسط سود و اسید کلریدریک بر روی ۶/۵ تنظیم گردید. گیاهان بابونه دو ماهه به مدت ۱۰ روز به طور جداگانه با محلول غذایی حاوی اسپرمیدین (۰/۵ میلی مولار)، متیلن بلو (۱۰۰ میکرومولار) و اسپرمیدین و متیلن بلو (Spd + MB) پیش تیمار شدند. در این مرحله گروهی از گیاهان به عنوان کنترل با محلول غذایی تنها بدون Spd و MB پیش تیمار گردیدند. هر کدام از گیاهان کنترل و گیاهان تیمار شده به دو زیر گروه تقسیم شدند که یک زیرگروه از گیاهان به مدت ۱۲ روز در معرض تنش شوری قرار گرفتند (محلول کلرید سدیم با غلظت ۲۰۰ میلی مولار به محلول غذایی اضافه گردید) و زیر گروه دیگر با محلول غذایی تنها به عنوان گیاهان شاهد در برابر تنش شوری در نظر گرفته شدند.

اندازه‌گیری پارامترهای رشد: برای اندازه‌گیری پارامترهای رشد در این پژوهش طول ساقه و طول ریشه در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری غلظت مالون دآلدئید: به منظور سنجش غلظت مالون دآلدئید، به عنوان شاخص واکنش پراکسیداسیون لیپیدها، از روش هیت و پاکر (Heath and Packer, 1968) استفاده گردید. ۲/. گرم بافت برگی را در ۵ میلی‌لیتر تری-کلرواستیک اسید (TCA) ۱/. درصد سائیده و عصاره را به مدت ۵ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی-لیتر از محلول رویی، ۴ میلی لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی ۵/. درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس در یخ سرد گردید. جذب ماده مورد نظر (TBA-MDA) در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155\ M^{-1}\ Cm^{-1}$ استفاده گردید و نتایج حاصل ازاندازه گیری برحسب میکرومول برگرم وزن تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری مقدار پراکسیدهیدروژن: مقدار پراکسید هیدروژن براساس واکنش H_2O_2 با یدید پتاسیم (KI) تعیین گردید. در این روش ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه برگ در ۵ میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد در حمام یخ سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در g ×۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار (pH=۷) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]

گیری گردید. برای محاسبه غلظت آب اکسیژنه از منحنی استاندارد استفاده شد(Alexieva *et al*., 2001).

استخراج عصاره و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها: ۰/۵ گرم از برگ منجمد شده در ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی پلی‌وینیل پیرولیدون ۱٪ و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) یک میلی مولار همگن گردید. همگنای حاصل در ۲۰۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید و بخش رویی برای سنجش آنزیم‌های مورد نظر برداشته شد(Gapinska *et al*., 2008)

فعالیت گایالول پراکسیداز با استفاده از گایاکول به عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، آب اکسیژنه ۱٪ و گایاکول ۴٪ بود. واکنش با افزودن ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی آغاز گردید. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی معادل $26.6\ mM^{-1}Cm^{-1}$ محاسبه گردید (Plewa *et al*., 1999).

فعالیت آسکوربات پراکسیداز با استفاده از اسپکتروفتومتر و براساس اکسیداسیون آسکوربات اندازه گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، آب‌اکسیژنه ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۵۰ میکرلیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم APX براساس کاهش جذب آسکوربات در مدت ۱ دقیقه در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش مقدار آسکوربات برجای مانده با استفاده از ضریب خاموشی معادل $2.8\ mM^{-1}\ Cm^{-1}$ محاسبه گردید (Nakano and Asada, 1981).

سنجش مقدار پروتئین کل: محتوای پروتئین کل با روش برادفورد و استفاده از آلبومین گاوی به عنوان محلول استاندارد اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976).

آنالیز داده‌ها: تجزیه و تحلیل‌های آماری در این مطالعه با آزمایش فاکتوریل و طبق طرح کاملا تصادفی با سه تکرار صورت گرفته و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز گردیدند. اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با در سطح احتمال $p<0.05$ مقایسه شدند.

نتایج:

پارامترهای رشد:

با توجه به شکل ۱، تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار طول ساقه نسبت به گیاهان شاهد گردید و پیش تیمار گیاهان تحت تنش با Spd اثر معنی‌داری بر طول ساقه نداشت. کاربرد همزمان Spd و MB نیز تغییر معنی‌داری در این شاخص رشد ایجاد نکرد. طول ریشه نیز در گیاهان تحت تنش شوری کاهش معنی‌داری داشت (شکل۲). پیش تیمار گیاهان با Spd طول ریشه را افزایش داد (البته فقط در شرایط شوری) اما کاربرد Spd همراه با MB اثر Spd را در افزایش طول ریشه خنثی نمود. در شرایط کنترل (بدون شوری)، پیش تیمار Spd تغییر معنی داری در طول ساقه و ریشه نداشت.

مقدار پراکسیدهیدروژن:

تنش شوری به طور معنی‌داری مقدار پراکسیدهیدروژن را نسبت به گیاهان شاهد افزایش داد و پیش تیمار با Spd باعث کاهش چشمگیری در مقدارH_2O_2 درگیاهان تحت تنش گردید. پیش تیمار گیاهان باSpd توام با MB اثر Spd را در کاهش پراکسیدهیدروژن در شرایط تنش شوری کم کرد (شکل۳).

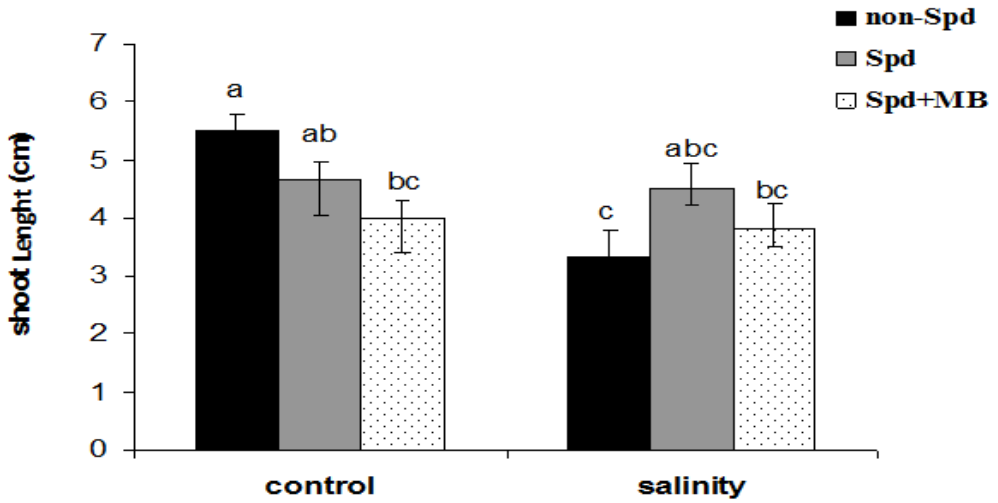
مقدار مالون‌دآلدئید:

آنالیز داده‌ها نشان داد که مقدار مالون دآلدئید در گیاهان تحت تنش شوری نسبت به گیاهان با Spd باعث کاهش مقدار مالون‌دآلدئید نسبت به گیاهان در معرض شوری و.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]

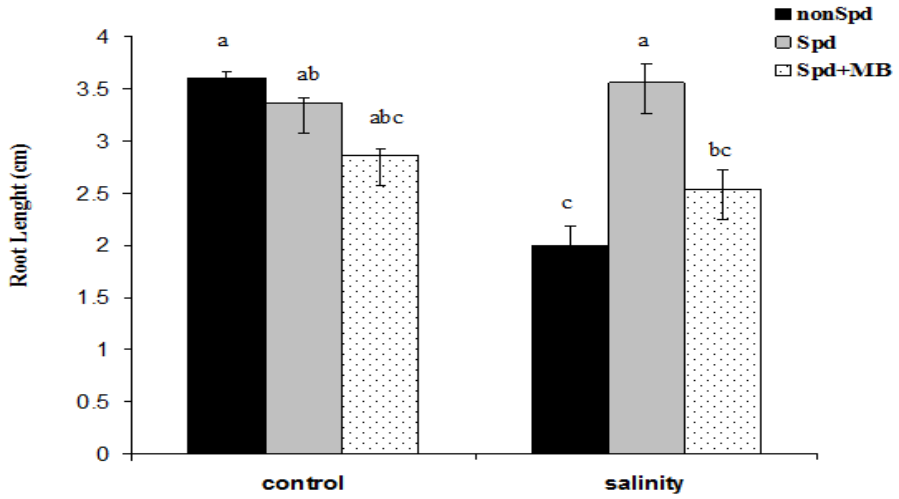
[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]



شکل ۱- اثر اسپرمیدین و متیلن بلو بر طول ساقه گیاهان بابونه تحت تنش شوری.

مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای معیار (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<0.05$ است.



شکل ۲- اثر اسپرمیدین و متیلن بلو بر طول ریشه گیاهان بابونه تحت تنش شوری.

مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای معیار (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<0.05$ است.

.

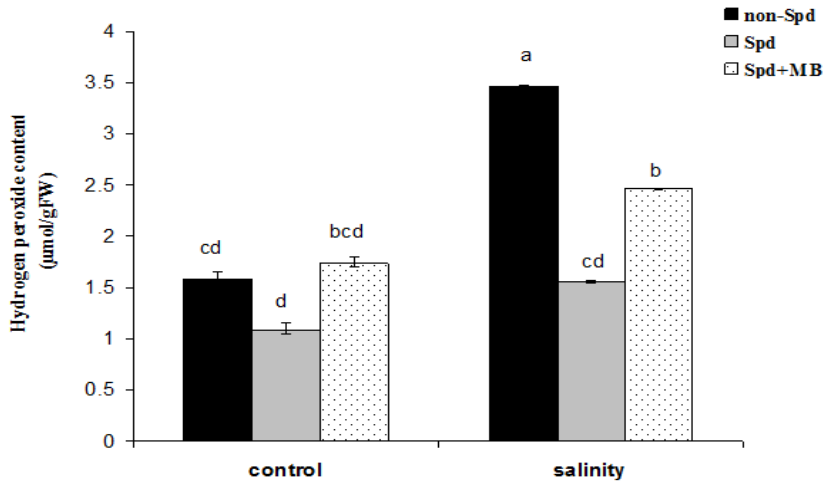
فاقد Spd گردید. در شرایط تنش شوری مقدار مالون دآلدئید در گیاهانی که با Spd توام با MB پیش تیمار شده بودند در مقایسه با گیاهانی که تنها با Spd پیش تیمار شده بودند افزایش یافت (MB اثر اسپرمیدین را در کاهش مالون دآلدئید خنثی نمود) (نمودار۴).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز:

تنش شوری به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم GPX را افزایش داد و پیش تیمار گیاهان بابونه تحت تنش شوری با Spd، باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم گردید (شکل ۵). فعالیت این آنزیم در گیاهانی که با Spd توام با متیلن بلو پیش تیمار شده

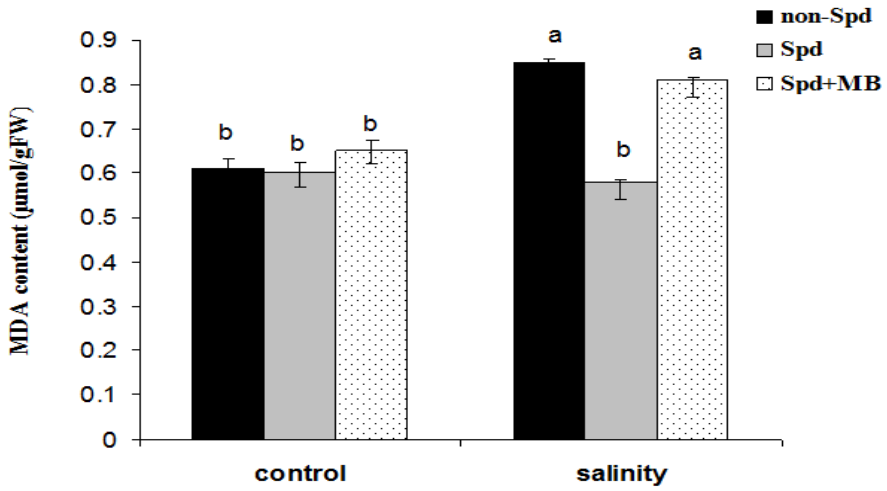
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]



شکل ۳- اثر اسپرمیدین و متیلن بلو بر مقدار پراکسیدهیدروژن در گیاهان بابونه تحت تنش شوری.

مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای معیار (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<0.05$ است.



شکل ۴- اثر اسپرمیدین و متیلن بلو بر مقدار مالون‌دآلدئید درگیاهان بابونه تحت تنش شوری.

مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای معیار (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<0.05$ است.

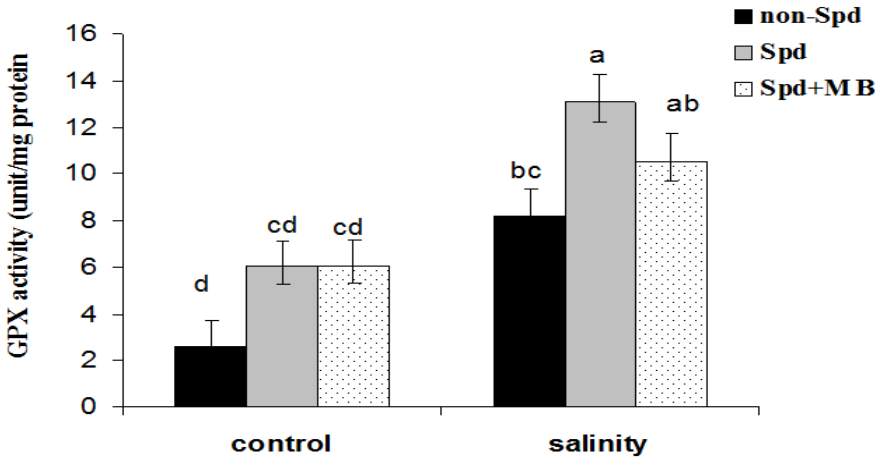
بودند، نسبت به گیاهانی که با Spd پیش تیمار شده بودند تفاوت معنی‌داری نداشت. . در شرایط کنترل، تغییر معنی داری در هیچ یک از تیمارها مشاهده نگردید.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:

با توجه به شکل۶، تنش شوری، فعالیت این آنزیم را به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد افزایش داد و پیش تیمار Spd تاثیر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم نداشت اما تیمار Spd+MB فعالیت این آنزیم را در مقایسه با گیاهانی که که فقط با Spd پیش تیمار شده بودند افزایش داد. تیمارهای Spd، MB و (Spd +MB) در گیاهان شاهد نیز اثر معنی‌دار بر فعالیت آنزیم نداشت.

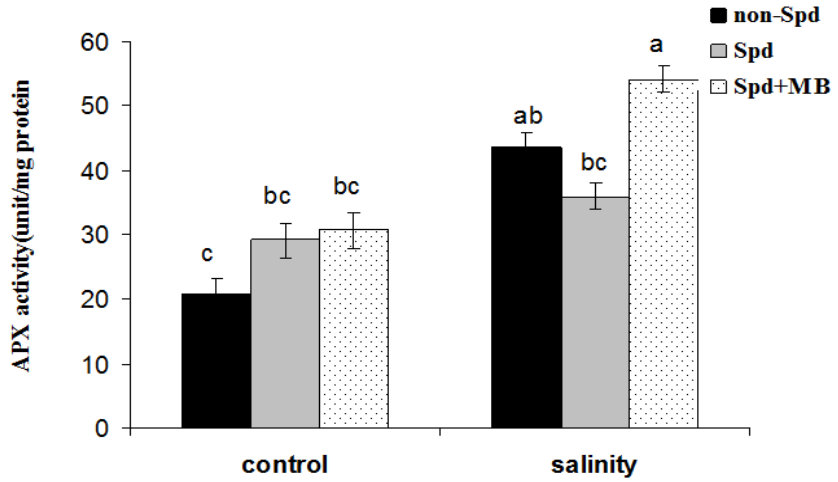
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]



شکل ۵- اثر اسپرمیدین و متیلن بلو بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاهان بابونه تحت تنش شوری.

مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای معیار (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<0.05$ است.



شکل۶- اثر اسپرمیدین و متیلن بلو بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان بابونه تحت تنش شوری.

مقادیر میانگین ۳ تکرار ± خطای معیار (SE) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<0.05$ است.

بحث :

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تنش شوری باعث کاهش رشد در گیاه بابونه گردیده است. کاهش میزان رشد در شرایط تنش شوری می‌تواند به دلیل دخالت در فرآیندهای مربوط به تولید انرژی مانند فتوسنتز و تنفس باشد. گزارش شده است که تغییر نسبت K^+/Na^+ بر فعالیت‌های بیوانرژیتیک سلول تاثیر می‌گذارد (یون پتاسیم به عنوان کوفاکتور بسیاری از آنزیم‌های فتوسنتزی و تنفسی می‌باشد (Kao *et al.*, 2006). کاربرد Spd باعث بهبود رشد ریشه در گیاهان تحت تنش شوری گردید اما اثر معنی داری بر رشد ساقه نداشت (شکل ۱ و ۲). البته رشد ریشه در گیاهان تحت تنش شوری که با Spd همراه با متیلن بلوتیمار شده بودند کمتر از رشد ریشه در گیاهانی بود که با Spd تنها پیش تیمار شده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]

بودند . بررسی های متعددی در مورد اثر پلی آمینها بر گیاهان تحت تنش انجام گرفته است و این مطالعات نشان داده است که کاربرد اگزوژن برخی از انواع این ترکیبات مانند Put باعث کاهش تجمع خالص یون‌های Na^+ و Cl^- در اندام های مختلف گیاه *Atropa belladonna* تحت تنش شوری گردیده است و اثرات NaCl در طی جوانه-زنی و رشد اولیه این گیاهچه‌ها را بهبود بخشیده است (Ali, 2000). بررسی مقدار H_2O_2 و MDA در گیاهان بابونه نشان داد که تنش شوری در این پژوهش باعث افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن و القای تنش اکسیداتیو گردیده است (شکل‌های ۳ و ۴). تولیدگونه‌های فعال اکسیژن منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تغییر در نفوذپذیری غشا و خسارت به سلول می‌گردند و نشان می‌دهد حذف، جاروب کردن یا خاموش نمودن رادیکال‌ها خارج از توان گیاه بوده است و مکانیسم های دفاعی ایجاد شده در گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو کافی نبوده است(Sudhakar *et al*., 2001). افزایش مقدار H_2O_2 و MDA نیز می‌تواند یکی از دلایل کاهش رشد در گیاهان بابونه در معرض شوری باشد. کاربرد Spd توانست مقدار H_2O_2 و MDA را در گیاهان بابونه تحت تنش شوری به طور چشم‌گیری کاهش دهد (شکل ۳ و ۴) . نقش پلی‌آمینها در کاهش صدمات اکسیداتیو ناشی از تنش‌های متعدد گزارش شده است. به طور مثال در گیاه *Beijing jietou* گزارش شده است که پیش تیمار Put و Spd باعث کاهش مقدار MDA ناشی از تنش سرما در این گیاه گردیده است (Zhang *et al*., 2009) که با نتایج ما روی گیاهان بابونه تحت تنش شوری مطابقت دارد. Yiu و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کرده اند که Put اگزوژن، تخریب اکسیداتیو القا شده در گیاه *Allium fistulosum* را از طریق افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه، کاهش می‌دهد. آنها دریافتند که کاربرد اگزوژن Put منجر به کاهش رادیکال سوپراکسید و مقدار H_2O_2 می گردد و در نهایت تنش اکسیداتیو گیاه را کاهش می دهد (Yiu *et al*., 2009). کاربرد (MB + Spd) اثر Spd بر گیاهان تحت تنش شوری را خنثی نمود و مقدار H_2O_2 و MDA را نسبت به گیاهان پیش تیمار شده با Spd، به طور چشم‌گیری افزایش داد (شکل ۳ و ۴) این اثر می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که اسپرمیدین احتمالا از طریق تولید NO و مسیر سیگنالینگ گوانیلات سیکلاز باعث کاهش MDA و H_2O_2 گردیده است. در گیاه آرابیدوپسیس نیز افزایش محتوی NO پس از تیمار با 1mM Spm گزارش گردیده است (Tun *et al*.,2006). فعالیت آنزیم‌های APX و GPX در گیاهان بابونه تحت تنش شوری به طور معنی داری نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت و پیش تیمار Spd باعث افزایش فعالیت GPX گردید در حالی‌که تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم APX ایجاد نکرد. گزارش شده است که در گیاه *Brassica juncea* تنش شوری باعث کاهش رشد و میزان بیوماس و افزایش سطوح $O_2^{\cdot-}$، H_2O_2و مقدار MDA گردیده است و PA_s این اثرات مخرب را خنثی نموده و با کاهش رادیکال‌های آزاد و مقدار MDA، باعث تحمل این گیاه در برابر شوری گردیده‌اند. همچنین PA_s فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاروتنوئیدها را در بافت برگی این گیاه تحت تنش شوری افزایش داده‌اند (Verma and Mishra, 2005). این نتایج پیشنهاد می‌کنند که PA_s ممکن است آنزیم‌های آنتی-اکسیدان را افزایش دهند و تولید رادیکال‌های آزاد را کنترل نمایند و در نهایت از پراکسیداسیون غشا و تخریب مولکول‌های زیستی ممانعت کنند و باعث بهبود رشد گیاهچه-های تحت تنش شوری گردند (Verma and Mishra, 2005). در این پژوهش نیز فعالیت آنزیم GPX در گیاه بابونه تحت تنش در اثر پیش تیمار با Spd افزایش یافت که کاهش مقدار H_2O_2 در اثر Spd می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت این آنزیم باشد. کاربرد (MB + Spd)، تغییر معنی داری برفعالیت آنزیم GPX ایجاد نکرد در حالی که

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]

فعالیت آنزیم APX را نسبت به گیاهان پیش تیمار شده با Spd به طور معنی داری افزایش داد. به نظر می‌رسد با وجودی که اسپرمیدین اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم APX نداشته اما ممکن است از طرق دیگری میزان تنش را کاهش داده است که وقتی اسپرمیدین با متیلن بلو توام استفاده شده است این اثرات حفاظتی کاهش یافته است و موجب افزایش فعالیت آنزیم APX گردیده است. در بررسی‌های اخیر گزارش شده است که پلی‌آمینها برخی اثرات خود را از طریق تولید نیتریک اکسید اعمال می‌نمایند (Tune *et al*., 2006). وقتی عملکردهای عمومی NO و پلی آمین‌ها در نمو گیاهان و در برابر تنش‌های زیستی و غیر-زیستی مورد توجه قرار گرفته است این فرضیه که NO می‌تواند یک واسطه برای عملکرد پلی‌آمینها باشد را مطرح نموده و تولید نیتریک اکسید در نتیجه کاتابولیسم پلی-آمینها توسط دی‌آمین اکسیداز و پلی‌آمین اکسیداز این نظر را تقویت کرده است. (Wimalasekera *et al*., 2011). در گیاه آرابیدوپسیس مشاهده شده است که بسیاری از اثرات اپرمین در حضور ماده ۲- فنیل-۴ و ۴ و ۵ و ۵ تترامتیل ایمیدازولین- ۱-اکسیل- ۳- اکسید(PTIO) به عنوان جاروب کننده NO کاهش یافته یا کاملاً از بین رفته است (Tune *et al*., 2006). از آنجایی‌که یکی از مسیرهای عملکرد سیگنالینگ NO ، مسیر گوانیلات سیکلاز می‌باشد در این مطالعه متیلن بلو به عنوان بازدارنده این مسیر به‌کار رفت و مشاهده گردید که در برخی پارامترها اثر Spd را تحت تاثیر قرار می‌دهد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این اثرات Spd بر پارامترهای فیزیولوژیکی به احتمال زیاد از طریق تولید NO و مسیر سیگنالینگ گوانیلات سیکلاز صورت می‌گیرد اما برای مطالعه جزئیات بیشتر و کسب نتایج دقیق‌تر در این مورد، مطالعات تکمیلی را در این زمینه لازم است.

منابع:

Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z. and Panerselvam, R. (2009) Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. Acta Physiologia Plantarum 31: 427-436.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultra violet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell & Environment 24: 1337- 1344.

Ali, R. M. (2000) Role of putrescine in salt tolerance of *Atropa belladonna* plant. Plant Sciences 152: 173-9.

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

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J. K. (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Sciences 45: 437-448.

Gama, P. B., Inanana, S., Tanaka, K. and Nakazawa, R. (2007) Physiological responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) seedlings to salinity stress. African Journal of Biotechnology 6:79-88.

Gapinska, M., Sklodowska, M., Gabara, B. (2008) Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. Acta Physiologia Plantarum 30:11-18.

Gill, S. S., and Tuteja, N. (2010) Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signaling and Behaviors 5: 26-33.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archive of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Kao, W. Y., Tsai, T. T., Tsai, H. C., Shih, C. N. (2006) Response of three *Glycine* species to salt stress. Environmental and Experimental Botany 56:120–125.

Keaney, J. F., Puyana, J. C., Francis, S., Loscalzo, J. F., Stamler, J. S. and Loscalzo, J. (1994) Methylene blue reverse endotoxin-induced hypotension. Circadian Research 74: 1121-1125.

Liu, H. H., Dong, B. H., Zhang, Y. Y., Liu, Z. P. and Liu, Y. L. (2004) Relationship between osmotic stress and the levels of free, conjugated

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]

Shi, Q., Ding, F., Wang, X. and Wei, M. (2007) Exogenous nitric oxide protects cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. Plant Physiology& Biochemistry 45:542-550.

Stamler, J. S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. Cell 78: 931-936.

Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S. (2001) Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science 161: 613-619.

Tester, M. and Venport, R. D. (2003) Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Annals of Botany 91:503-527.

Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. and Scherer, G. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant Cell Physiology 47: 346-354.

Verma, S., and Mishra, S. N. (2005) Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica Juncea* by inducing antioxidative defense system. Journal of Plant Physiol 162: 669-77.

Wimalasekera R., Tebartz F and Scherer G. (2011) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. Plant Science 181:593-603.

Yiu, J., Juang, L. D., Fang, D., Liu, W. and Wu, J. (2009) Exogenous putrescine reduces flooding-induced oxidative damage by increasing the antioxidant properties of Welsh onion. Scientiae Horticultural 120: 306-14.

Zhang, W., Jiang, B., Li, W., Song, H., Yu, Y. and Chen, J. (2009) Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating antioxidative system. Scientiae Horticultural 122: 200-8.

and bound polyamines in leaves of wheat seedlings. Plant Sciences 166: 1261-7.

Liu, J. H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y. and Moriguchi, T . (2007) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. Plant Biotechnology 24: 117-126.

Manchanda, G. and Garg, N. (2008) Salinity and its effects on the functional biology of legumes. Acta Physiologia Plantarum 30:595-618.

Meidner, H. (1984) Class experiments in Plant Physiology. George Allen &unwin. Pp: 156.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach choloroplast. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

Orcutt, D. M. and Nilsen, E. T. (2000) The physiology of plants under stress, soil and biotic factors. John Wiley and Sons New York. pp: 177-235.

Paciullo, C. A., McMahon Horner, D., Hatton, K. W. and Flynn, J. D. (2010) Methylene blue for the treatment of septic shock. Pharmacotherapy 30: 702-715.

Pandey, S., Ranande, S. A., Nagar, P. K. and Kumar, N. (2000) Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. Indian Academy of Science 25: 291-299

Pang, X. M., Zhang, Z. Y., Wen, X. P., Ban, Y. and Moriguchi, T. (2007) Polyamines, all-purpose players in response to environment stresses in plants. Plant Stress 1: 173-188.

Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wanger, E. D. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation Research 247: 57-64.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]

The effects of spermidin and methylene blue pretreatment on some physiological responses of *Matricaria recutita* plants to salt stress

[*]Fatemeh Nasibi[*1], Khosrow Manouchehri Kalantari[1], Nasrin Fazelian[1]
Biology Department, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman
***Corresponding Author: nasibi2002@yahoo.com**

Abstract:

Salinity is one of the most important factors that limit plant growth and production in the whole world. Identification and application of compounds, which are able to reduce the damaging effects of various stresses such as salinity, should be of great importance. In this investigation, the effects of spermidine on salt tolerance of *Matricaria recutitaa* were investigated. The results showed that, salt stress in chamomile plants caused the reduction of growth but increased the amounts of hydrogen peroxide, malondialdehyde and the activity of ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase. Pre-treatment of chamomile plants with spermimdine had no significant effects on shoot growth and the activity of ascorbate peroxidase enzyme, while considering reduced the content of hydrogen peroxide and malondialdehyde, and increased the root growth and activity of guaiacol peroxidase significantly. Application of spermidine with methylene blue reduced the effect of spermidine on the increment of root growth, decreased hydrogen peroxide, malondialdehyd and ascorbate peroxidase activity while had no significant effects on shoot growth and guaiacol peroxidase activity. Therefore, it seemed that Spd effects on these physiological parameters were through nitric oxide and guanylate cyclase pathway. However, more studies are required for detailed investigations.

Key words: Methylene blue, Nitric oxide, Oxidative stress, Salinity, Spermidine.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-05-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1391.1.2.6.5]