مقاله کامل پژوهشی

اثر پیش تیمار بذر با آمینو اسیدهای آرژینین و سیستئین بر رشد و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه گندم تحت تنش شوری

فاطمه نصیبی*[۱]، خسرو منوچهری کلانتری[۱]، رویا زنگنه[۱] و قاسم محمدی نژاد[۲]

[۱]دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲]دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت

چکیده

شوری یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی محدود کننده رشد و نمو گیاهان در سراسر دنیا است. پیش تیمار بذر با برخی ترکیبات محافظت کننده روشی رایج و عملی برای افزایش تحمل به تنش شوری در گیاهان است. در این پژوهش از غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید (NaCl) برای ایجاد تنش شوری در گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) استفاده شد. بذرهای گندم به ترتیب با غلظت‌های ۰/۵ میلی مولار و ۰/۰۱ میکرومولار آرژینین و سیستئین به طور مجزا پیش تیمار شدند. تحت تنش شوری غلظت مالون دی آلدهید، پراکسید هیدروژن و پرولین افزایش یافت ولی پیش تیمار بذر با آرژینین و سیستئین، باعث بهبود شاخص‌های رشد، کاهش غلظت مالون دی آلدهید و پراکسید هیدروژن گردید. غلظت پرولین نیز در گیاهان پیش تیمار شده با آمینو اسیدها کاهش یافت. در ریشه گیاهان تحت تنش شوری غلظت گلوتاتیون احیاء افزایش یافت و در گیاهان پیش تیمار شده با سیستئین این افزایش چشمگیرتر بود. به نظر می‌رسد آمینو اسیدهای به‌کار رفته در این آزمایش از طریق القای سیستم دفاع آنتی اکسیداتیو باعث تخفیف صدمات ناشی از شوری در گیاه شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: اسمولیت‌ها، آمینواسیدها، پراکسیداسیون لیپید، پراکسید هیدروژن

مقدمه

شوری خاک یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی است و از پیامدهای اصلی آن کاهش تولیدات گیاهی می‌باشد. تنش شوری می‌تواند به‌طور مستقیم و غیرمستقیم از طریق مختل کردن متابولیسم، رشد رویشی و رشد زایشی بر فیزیولوژی گیاه تاثیر بگذارد. برخی از اثرات شوری مانند تنش اسمزی، سمیت یونی، تغییر در متابولیسم، تغییر در ساختار غشاء، کاهش تقسیم و رشد سلول باعث کاهش رشد و نمو گیاه می شود [۲٤]. در تنش شوری تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سلول نیز موجب ایجاد تنش ثانویه‌ای به نام تنش اکسیداتیو می گردد [۱۹].

شناسایی و به‌کار بردن ترکیباتی که بتوانند تحمل گیاهان را به تنش‌های محیطی از جمله شوری افزایش دهند حائز اهمیت است. تاکنون در این مورد ترکیبات متعددی جهت تخفیف تنش و بهبود عملکرد در شرایط تنش محیطی به‌کار گرفته شده است. در بین روش‌های به‌کار رفته برای افزایش تحمل به شوری و خشکی در گیاهان، پرایمینگ بذر (پیش تیمار بذر با ماده مورد نظر با خیساندن) یکی از روش‌های آسان، مقرون به

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: nasibi2002@yahoo.com

صرفه و با احتمال آسیب کمتر است. این روش برای استفاده از ترکیبات برون‌زا با هدف بر طرف کردن و یا کاهش اثرات تنش شوری و خشکی استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال در گیاه یونجه گزارش شده است که پیش تیمار بذر با براسینواستروئید باعث افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیداتیو و تحمل به شوری می‌گردد [۳۵]. در گیاه باقلا نیز پیش تیمار بذر با سالیسیلیک اسید با افزایش تحمل گیاه به تنش شوری همراه بوده است [۵]. همچنین در گیاه *آگروپیرون الانگاتوم* (*Agropyron elongatum*) پیش تیمار بذر با جیبرلین و اسید آبسیزیک باعث افزایش تحمل گیاه به تنش خشکی شده است [۹].

در مطالعات متعدد انباشتگی ترکیبات آلی نیتروژن دار با وزن مولکولی کم در گیاهانی که در معرض تنش‌های غیر زیستی قرار گرفته‌اند، گزارش شده است. این ترکیبات شامل آمینو اسیدها به خصوص پرولین، ایمینو اسیدها، ترکیبات آمونیومی و پلی آمین‌ها می‌باشد که انباشتگی هر کدام از این ترکیبات تحت تنش‌های محیطی در بین گونه‌های گیاهی متفاوت است [۱۸].

آرژنین به‌عنوان یکی از آمینو اسیدهای سلول است که پیش ماده تولید پلی آمین‌ها، پرولین و نیتریک اکسید است که می‌تواند نقش‌های فیزیولوژیکی مهمی در گیاه در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی ایفا نماید. تاثیر کاربرد برون‌زای این آمینو اسید در کاهش تنش شوری در گیاه گندم [۸] ، تخفیف تنش خشکی در گیاه گوجه فرنگی [۲۳] و کاهش تنش سرما در گیاه پسته [۲۰] گزارش شده است. تاثیر کاربرد برون‌زای محصولات حاصل از متابولیسم آرژنین شامل پلی آمین‌ها، نیتریک اکسید و پرولین نیز در مقابله با تنش‌های غیر زیستی در مطالعات متعدد گزارش شده است [۱۸، ۲۳ و۲۸].

سیستئین یک آمینو اسید تیول‌دار در گیاهان می‌باشد که در تولید چند ترکیب سلولی مهم از جمله گلوتاتیون، متالوتیونین‌ها، فیتوکلاتین‌ها و هیدروژن سولفید به‌عنوان مولکول علامت دهنده شرکت دارد. همه این ترکیبات نقش مهمی در افزایش تحمل به تنش‌ها ایفا می‌کنند. غلظت سیستئین آزاد در گیاهان پایین بوده ولی فرآورده‌های حاصل از متابولیسم آن در گیاه متعدد است که ناشی از تقاضای بالا برای این فرآورده‌ها در شرایط عادی و تنش می‌باشد [۱۲].

با وجود اینکه تاثیر دو ترکیب نیتریک اکسید و هیدروژن سولفید در کاهش تنش در مطالعات قبلی گزارش شده است اما مطالعات اندکی در مورد اثر پیش تیمار با آمینواسیدهایی که پیش‌ساز این ترکیبات باشند، در دسترس است. لذا در این تحقیق اثر پیش تیمار بذر با آمینو اسیدهای آرژنین و سیستئین در کاهش تنش شوری در گیاه گندم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

گیاه مورد استفاده در این مطالعه گیاه گندم رقم مغان (*Triticum aestivum* cv. Moghan 3) بود. بذور این گیاه از مرکز تحقیقات یزد تهیه شد و پس از سترون کردن با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، در غلظت‌های ۰/۵ میلی‌مولار آرژنین و ۰/۰۱ میکرومولار سیستئین و آب مقطر به‌عنوان شاهد به‌مدت ۲٤ ساعت خیسانده شدند. برای تعیین غلظت‌های بهینه برای اعمال تیمار یک آزمایش مقدماتی انجام شد. در آزمایش مقدماتی غلظت یک میکرومولار تا یک میلی‌مولار این آمینو اسیدها برای پیش‌تیمار بذر اعمال شد و سپس رشد گیاه و نشت یونی آن اندازه‌گیری گردید. در مورد آرژنین بهترین غلظت موثر در گیاهان تحت تنش شوری ۰/۵ میلی‌مولار بود، اما در گیاهانی که با آمینو اسید سیستئین حتی در غلظت یک میکرومولار پیش‌تیمار شده بودند، آسیب‌های تنش شوری بیشتر از گیاه شاهد بود. به‌همین دلیل دامنه بهینه‌سازی این آمینو اسید به کمتر از یک میکرومولار تغییر داده شد و از غلظت ۰/۰۰۱ میکرومولار تا یک میکرومولار استفاده شد. مناسب‌ترین غلظت سیستئین برای پیش تیمار بذر در گیاهان تحت تنش شوری غلظت ۰/۰۱ میکرومولار به‌دست آمد. پس از پیش‌تیمار، بذرها در گلدان‌های حاوی پرلیت کشت گردیدند. گیاهان به‌مدت پنج روز به‌صورت یک روز در میان با ۱۵ میلی‌لیتر آب یا محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند. پس از این مدت، یک گروه از گیاهان برای اعمال تنش با محلول هوگلند حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار نمک آبیاری شدند. در هر بار آبیاری برای هر گلدان تقریبا ۱۵ میلی‌لیتر محلول استفاده شد. گلدان‌های حاوی گیاهان تحت تنش شوری برای جلوگیری از انباشتگی نمک در هفته یک بار با آب مقطر شستشو گردیدند. گیاهان شاهد در این مرحله با محلول غذایی هوگلند بدون نمک آبیاری شدند. پس از گذشت ۱٤ روز از اعمال تنش شوری، گیاهان برداشت شدند. پس از جدا کردن اندام هوایی و ریشه از یکدیگر، نمونه‌ها توزین و در ورق آلومینیومی پیچیده شده و به‌مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. در مورد نمونه‌های دیگر، اندام

هوایی و ریشه گیاهان در ازت مایع منجمد گردید و برای تجزیه‌های بعدی به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی با استفاده از روش هیت و پاکر (۱۹۶۹) اندازه‌گیری شد. ۰/۲ گرم از بافت تازه گیاه در هاون چینی حاوی پنج میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل به‌مدت پنج دقیقه در ۵۰۰۰ g سانتریفوژ شد. برای اندازه‌گیری مالون دی آلدهید، جذب فاز رویی در طول موج ۵۳۲ خوانده شد. برای محاسبه غلظت مالون دی آلدهید از ضریب خاموشی آن معادل $۱۵۵\times۱۰^{۳}\ mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد [۱۱].

سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

غلظت پراکسید هیدروژن بر اساس واکنش H_2O_2 با پتاسیم یدید (KI) و مطابق با روش آلکسیوا (۲۰۰۱) اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم از بافت تازه گیاه در ۰/۱ TCA درصد سرد سائیده شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی، ۵۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ mM (pH=۷) و دو میلی‌لیتر پتاسیم یدید یک مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت پراکسید هیدروژن از منحنی استاندارد ترسیم شده با استفاده از غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، و ۲۵ میکرومولار پراکسید هیدروژن طبق روش بالا استفاده شد [۲] .

اندازه گیری پرولین

تعیین غلظت پرولین با استفاده از معرف نین هیدرین و با روش بیتس و همکاران (۱۹۷۳) انجام شد. در این روش از معرف نین هیدرین و اسید استیک گلاسیال برای اندازه‌گیری پرولین استفاده شد و نتایج برحسب میکرومول بر گرم وزن خشک گزارش گردید [٦].

سنجش قندهای محلول

قندهای محلول نمونه‌ها با استفاده از معرف آنترون و بر اساس روش رو (۱۹۵۵) تعیین گردید. ۰/۱ گرم بافت تر گیاه در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در دمای $۹۵\ ^{\circ}C$ به‌مدت ٦۰ دقیقه قرار گرفت و کربوهیدرات‌های محلول استخراج شدند. رسوب حاصل از تبخیر الکل در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در یک لوله آزمایش ریخته شد و پنج میلی‌لیتر معرف آنترون به آن اضافه گردید. پس از مخلوط شدن به‌مدت ۱۷ دقیقه در بن ماری $۹۰\ ^{\circ}C$ قرار گرفت و پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ٦۲۵ نانومتر خوانده شد [۲۵].

اندازه‌گیری گلوتاتیون احیاء (GSH)

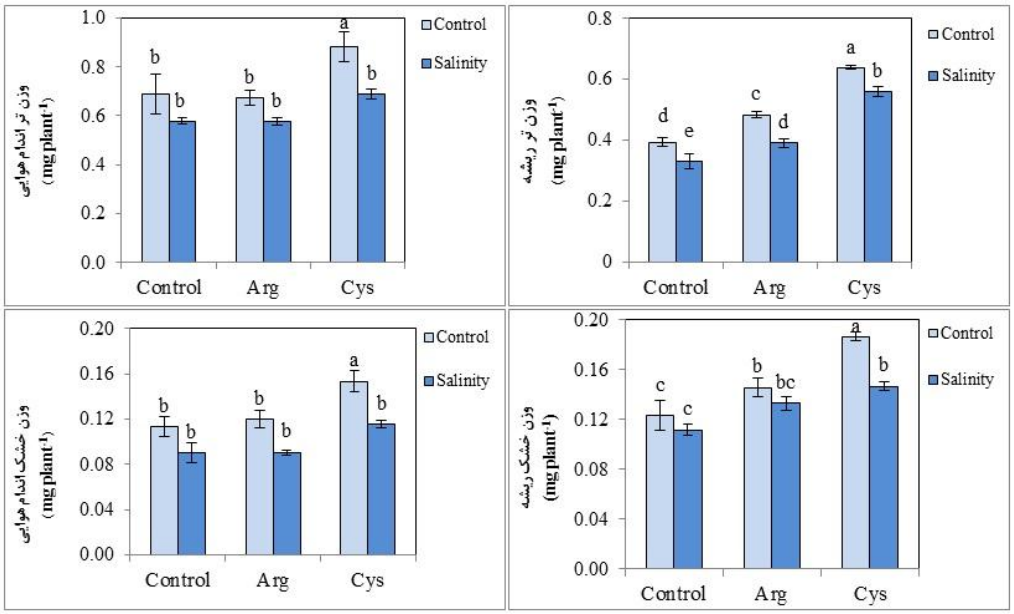
غلظت گلوتاتیون احیاء بر اساس روش المن (۱۹۵۹) محاسبه شد. ۰/۵ گرم بافت تازه اندام هوایی و ریشه در چهار میلی‌لیتر متافسفریک ۱۵ درصد سائیده شد و عصاره حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰۰۰ g در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. به ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ، ۲/٦ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات (pH =۷/۷) و ۲۰۰ میکرولیتر محلول DTNB (5,5-Dithio-bis (2-Nitrobenzoic acid)) شش میلی‌مولار اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ٤۱۲ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت گلوتاتیون احیاء از منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ٤۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار گلوتاتیون احیاء استفاده شد [۱۰].

آنالیز آماری

پژوهش در قالب یک طرح عاملی کاملا تصادفی انجام شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS تحت تجزیه واریانس یک طرفه قرار گرفتند و میانگین داده‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $P < ۰/۰۵$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

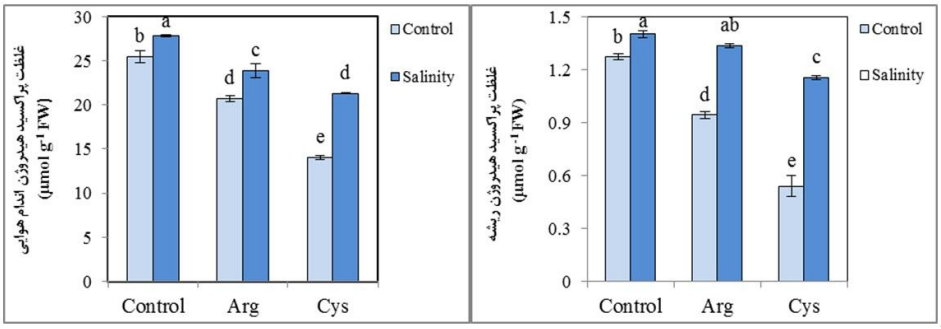
تنش شوری باعث کاهش وزن تر ریشه گیاه گندم گردید در حالیکه بر سایر شاخص‌های رشد تاثیر معنی‌داری نداشت. پیش‌تیمار بذر با آرژینین باعث افزایش وزن تر ریشه در شرایط تنش شوری گردید. پیش‌تیمار بذر با سیستئین هم وزن تر و هم وزن خشک ریشه را در گیاهان شاهد و تحت تنش شوری نسبت به گیاهان پیش تیمار نشده افزایش داد. پیش‌تیمار بذر با هر دو نوع آمینو اسید تاثیر معنی‌داری بر وزن تر و خشک اندام هوایی نداشت (شکل ۱).



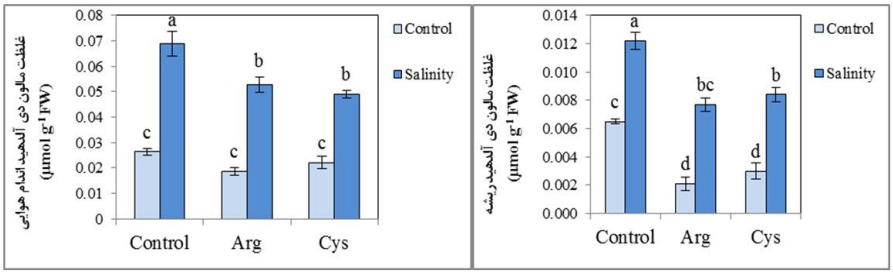
شکل ۱ اثر پیش‌تیمار آرژینین (Arg) و سیستئین (Cys) بر وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه گیاه گندم در شرایط شاهد و تحت تنش شوری. میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. تفاوت ما بین ستون‌های مربوط به هر گیاه که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (۰/۰۵≥ *p* و n=۳).

شوری باعث افزایش غلظت پراکسید هیدروژن ریشه و اندام هوایی گیاهان تحت تنش در مقایسه با گیاهان شاهد گردید. در ریشه گیاه گندم شاهد پیش‌تیمار شده با هر دو آمینو اسید آرژینین و سیستئین غلظت پراکسید هیدروژن را در مقایسه با گیاهان پیش‌تیمار نشده کاهش داد (شکل ۲)، اما در گیاهان تحت تنش شوری تنها پیش‌تیمار سیستئین باعث کاهش پراکسید هیدروژن در مقایسه با گیاهان پیش تیمار نشده گردید و آمینو اسید آرژینین اثر معنی‌داری نداشت. در اندام هوایی، پیش‌تیمار با آمینو اسیدهای آرژینین و سیستئین غلظت پراکسید هیدروژن را هم در گیاهان شاهد و هم گیاهان تحت تنش شوری کاهش داد (شکل ۲).

غلظت مالون دی آلدهید نیز در ریشه و اندام هوایی گیاهان تحت تنش شوری افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد داشت. پیش تیمار بذر با آرژینین و سیستئین موجب کاهش غلظت مالون دی آلدهید ریشه و اندام هوایی گیاه گندم شاهد و تحت تنش شوری در مقایسه با گیاهان پیش تیمار نشده گردید (شکل ۳).



شکل ۲ اثر پیش‌تیمار آرژینین (Arg) و سیستئین (Cys) بر غلظت پراکسید هیدروژن ریشه و اندام هوایی گیاه گندم در شرایط شاهد و تحت تنش شوری. میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. تفاوت ما بین ستون‌های مربوط به هر گیاه که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (۰/۰۵≥ *p* و n=۳).

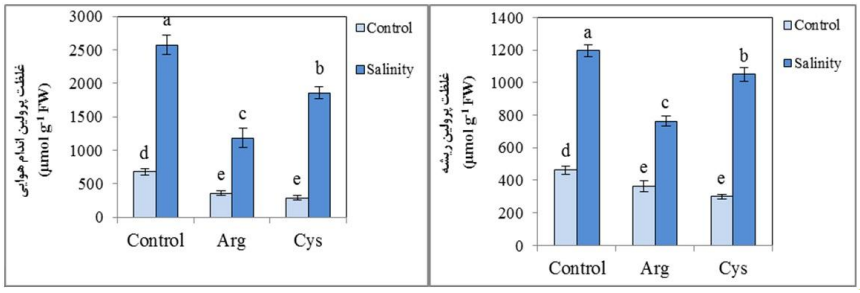


شکل ۳ اثر پیش‌تیمار آرژینین (Arg) و سیستئین (Cys) بر غلظت مالون دی آلدهید ریشه و اندام هوایی گیاه گندم در شرایط شاهد و تحت تنش شوری. میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. تفاوت ما بین ستون‌های مربوط به هر گیاه که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (۰/۰۵≤ *p* و n=۳).

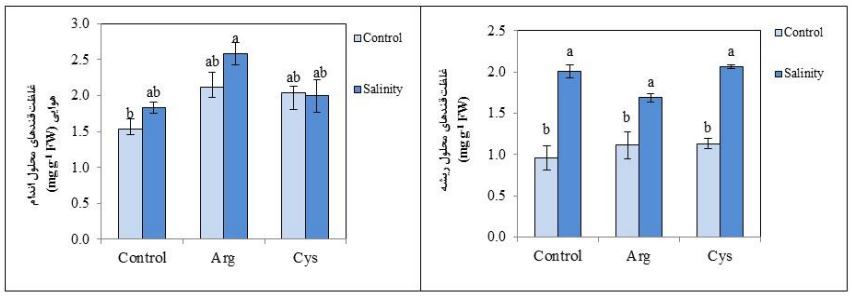
غلظت پرولین ریشه و اندام هوایی گیاهان گندم در شرایط تنش شوری افزایش معنی‌داری در مقایسه با گیاهان شاهد داشت. پیش‌تیمار بذر با آرژینین و سیستئین در شرایط تنش و غیر تنش باعث کاهش غلظت پرولین ریشه و اندام هوایی گردید (شکل ٤).

تنش شوری غلظت قندهای محلول ریشه گیاه گندم را افزایش داد، اما تاثیر معنی‌داری بر غلظت قندهای محلول اندام هوایی نداشت. پیش‌تیمار بذر با آرژینین و سیستئین تاثیر معنی‌داری بر غلظت قندهای محلول ریشه و اندام هوایی گیاه شاهد و تحت تنش نداشت (شکل ۵).

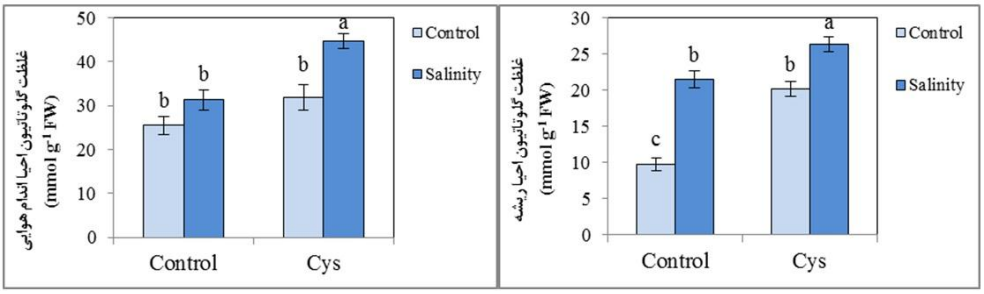
غلظت گلوتاتیون احیاء در شرایط تنش شوری در ریشه گیاه گندم در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت اما غلظت گلوتاتیون اندام هوایی تحت تنش شوری تغییر معنی‌داری نیافت. پیش تیمار بذر با سیستئین موجب افزایش غلظت گلوتاتیون احیاء ریشه و اندام هوایی گیاه در شرایط تنش شوری گردید (شکل ٦).



شکل ٤ اثر پیش‌تیمار آرژینین (Arg) و سیستئین (Cys) بر غلظت پرولین ریشه و اندام هوایی گیاه گندم در شرایط شاهد و تحت تنش شوری. میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. تفاوت ما بین ستون‌های مربوط به هر گیاه که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (۰/۰۵≤ *p* و n=۳).



شکل ۵ اثر پیش‌تیمار آرژینین (Arg) و سیستئین (Cys) بر غلظت قندهای محلول ریشه و اندام هوایی گیاه گندم در شرایط شاهد و تحت تنش شوری. میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. تفاوت ما بین ستون‌های مربوط به هر گیاه که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد (۰/۰۵≤ *p* و n=۳).



شکل ٦ اثر پیش‌تیمار سیستئین (Cys) بر غلظت گلوتاتیون احیاء ریشه و اندام هوایی گیاه گندم در شرایط شاهد و تحت تنش شوری. میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. تفاوت ما بین ستون‌های مربوط به هر گیاه که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p \leq$ ۰/۰۵ و n=۳).

بحث

اثر آمینو اسیدهای آرژینین و سیستئین بر شاخص‌های رشد

مهم‌ترین دلیل کاهش رشد گیاه در شرایط شوری به‌علت اثر نمک اضافی بر تعادل یونی، تغذیه مواد معدنی و متابولیسم کربن می باشد [۱]. تغییرات در رشد گیاهان در معرض تنش شوری، ابتدا مربوط به اثرات اسمزی می‌باشد و در مراحل بعد، رشد به‌واسطه اثرات سمی نمک اضافی در داخل گیاه کاهش می‌یابد [۱۹]. هم‌چنین کاهش میزان رشد در شرایط تنش شوری و خشکی می‌تواند به‌دلیل اختلال در فرآیندهای دخیل در تولید انرژی مثل فتوسنتز، تنفس و مهار گسترش یا تقسیم سلولی باشد [٢٤]. پژوهش حاضر نشان داد که پیش‌تیمار بذر با آرژنین و سیستئین باعث افزایش وزن تر ریشه در شرایط تنش شوری می‌شود در حالی‌که بر وزن تر اندام هوایی اثری ندارد. این در حالی است که در گیاه گندم کاربرد آرژنین باعث افزایش رشد و افزایش وزن تر و خشک گیاه شده و هم‌چنین تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئیدها را افزایش می‌دهد [٢٦]. برخلاف نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، ساتیروپولوس و همکاران [٢٧] تاثیر مثبت دو آمینو اسید سیستئین و آرژنین را بر رشد و غلظت کلروفیل اندام هوایی گیاه سیب کشت شده در محیط در شیشه گزارش کرده‌اند. اثر آمینو اسیدهای به‌کار رفته در این مطالعه بر افزایش رشد می‌تواند به‌دلیل افزایش توان آنتی اکسیداتیو گیاه از طریق افزایش تولید گلوتاتیون و یا القاء فعالیت سایر آنتی اکسیدان‌ها تحت تیمار با این آمینو اسیدها باشد که بررسی جزئیات بیشتر در این رابطه مطالعات بیشتری را می‌طلبد.

اثر پیش‌تیمار با آرژنین و سیستئین بر مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی

مالون دی آلدهید از تجزیه اسیدهای چرب دارای پیوندهای غیراشباع در غشاء تولید می‌شود و غلظت آن به‌عنوان یکی از شاخص‌های اصلی تنش اکسیداتیو محسوب می‌گردد. افزایش غلظت مالون دی آلدهید در گونه‌های گیاهی مختلف تحت تنش شوری به شدت تنش و میزان خسارت به لیپیدهای غشایی بستگی دارد [٢٦]. نتایج این تحقیق افزایش معنی‌دار غلظت پراکسید ئیدروژن و مالون دی آلدهید را در شرایط تنش شوری در گیاه گندم نشان داد. تنش شوری احتمالا موجب اختلال در فرآیند انتقال الکترون در میتوکندری و کلروپلاست شده و با تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن، موجب آسیب اکسیداتیو به غشاء و در نتیجه افزایش در پراکسیداسیون لیپیدها و تولید مالون دی آلدهید در این گیاه گردیده است. کاهش مشاهده شده در غلظت پراکسید ئیدروژن و پراکسیداسیون لیپید در گیاهان پیش‌تیمار شده با آرژنین می‌تواند به‌علت تولید نیتریک اکسید و پلی آمین باشد زیرا نقش آنتی اکسیدانی پلی آمین‌ها، نیتریک اکسید (NO) و پرولین که محصولات متابولیسم آمینو اسید آرژنین می‌باشند در مطالعات متعدد گزارش شده است. به‌عنوان مثال در گیاه گوجه فرنگی کاربرد برون‌زای NO پراکسیداسیون لیپید را در شرایط تنش خشکی کاهش داده است [٢٣]. بلیگنی و لاماتینا (۱۹۹۷) نیز گزارش کردند که نقش نیتریک اکسید در کاهش غلظت پراکسید ئیدروژن و پراکسیداسیون لیپید به‌دلیل واکنش مستقیم NO با رادیکال آزاد اکسیژن و تولید رادیکال پراکسی نیتریت

($ONOO^-$) است زیرا پراکسی نیتریت سمیت کمتری نسبت به گونه‌های فعال اکسیژن دارد [۷]. همچنین کاربرد آرژینین با تولید پلی آمین‌ها اثرات مضر ناشی از تنش شوری را در گیاه لوبیا کاهش داده است [۳٤]. عملکردهای مشابهی که NO و پلی آمین‌ها در رشد گیاه و مقابله با تنش‌های غیر زیستی و زیستی دارند باعث این تصور شده است که NO می‌تواند با پاسخ‌های تنش که با دخالت پلی آمین‌ها انجام می‌شود، مرتبط باشد [۳۲]. تون و همکاران (۲۰۰٦) گزارش کرده‌اند که احتمالا اثر پلی آمین‌ها از طریق NO باشد زیرا در گیاهان آرابیدوپسیس تیمار شده با پلی آمین‌ها، بیوسنتز NO افزایش می‌یابد [۲۹].

در این مطالعه پیش‌تیمار بذر با سیستئین نیز غلظت پراکسید ئیدروژن و مالون دی آلدهید را در شرایط تنش شوری در ریشه و برگ گیاه گندم کاهش داد. با توجه به اینکه در مطالعات اخیر بیان شده است که سیستئین در تعیین غلظت گلوتاتیون سلولی نقش مهمی ایفا می‌کند [۳۳]، به‌نظر می‌رسد کاهش شاخص‌های تنش مثل پراکسید ئیدروژن و مالون دی آلدهید در گیاهان پیش تیمار شده با سیستئین نیز به تولید گلوتاتیون و یا سولفید هیدروژن که از محصولات متابولیسم سیستئین می‌باشند مربوط باشد. افزایش غلظت گلوتاتیون احیاء در برگ و ریشه گیاهان تیمار شده با سیستئین تحت شرایط تنش شوری در این پژوهش نیز تائیدی بر این فرضیه است. علاوه بر این، مشاهده شده است که تنش شوری منجر به افزایش مقدار سیستئین درون سلولی و فعالیت آنزیم‌های γ- گلوتامیل سیستئین سنتاز، گلوتاتیون سنتاز و گلوتاتیون ردوکتاز در گیاه *Candida utilis* شده است که این آنزیم‌ها در القای انباشتگی گلوتاتیون سلولی درگیر هستند [۱٦].

اثر پیش‌تیمار با آرژینین و سیستئین بر برخی اسمولیت‌های سلولی

در تنش شوری Na^+ و Cl^- کده‌بندی شده در واکوئل، موجب کاهش پتانسیل اسمزی داخلی و دهیدراسیون جزئی سیتوپلاسم می‌شود. از دست دادن آب سیتوپلاسم به متابولیسم سلولی آسیب می‌رساند و نهایتا موجب کاهش رشد گیاه می‌شود. بنابراین اساسی‌ترین واکنش گیاهان به تنش‌های اسمزی تولید اسمولیت‌های سازگار می‌باشد [٤]. افزایش غلظت پرولین ریشه و برگ گیاه گندم در مطالعه حاضر می‌تواند به همین دلیل باشد. در مطالعه حاضر اندازه‌گیری غلظت پرولین نشان داد که در گیاهان پیش‌تیمار شده با آرژینین غلظت پرولین کاهش می‌یابد. این کاهش احتمالا به‌دلیل تولید ترکیبات دیگر ناشی از متابولیسم این آمینو اسیدها می‌باشد. به‌طور مثال گزارش شده است که NO برون‌زا غلظت پرولین را در گیاه خیار تحت تنش شوری کاهش داده است [۳]. همچنین گزارش شده است که پلی آمین‌های برون‌زا نیز مقدار پرولین را در گیاه *Nymphoides peltatum* تحت تنش مس کاهش دادند [۳۰]. در این پژوهش به‌نظر می‌رسد احتمالاً مسیر متابولیسم آرژینین بیشتر به سمت سنتز NO و پلی آمین‌ها بوده است و نقش حفاظتی آرژینین از این طریق اعمال شده است و تولید این ترکیبات شدت تنش را کاهش داده و باعث کاهش سنتز پرولین در شرایط تنش گردیده‌اند. در گیاه بنگدانه تحت تنش نیکل نیز مشاهده شد که پیش‌تیمار با آرژینین باعث کاهش غلظت پرولین در ریشه گیاهان شاهد و تحت تنش گردید [۲۱]. در مورد پیش تیمار بذر با آمینو اسید سیستئین نیز به‌نظر می‌رسد سنتز ترکیبات گوگردی و گلوتاتیون حاصل از سیستئین در طول تنش شوری به‌عنوان اسمولیت و آنتی اکسیدان افزایش یافته و باعث تخفیف تنش و متعاقبا کاهش سنتز پرولین گردیده است [۱۲].

قندهای محلول جزء اسمولیت‌هایی هستند که در پاسخ به تنش شوری و خشکی برای تنظیم اسمزی در گیاهان انباشته می‌شوند و نقش آنها در حفظ ساختار ماکرومولکول‌های سلول و ثبات بخشیدن به ساختار DNA گزارش شده است، به طوری که برخی دانشمندان غلظت قندها را به‌عنوان شاخص خوبی برای بیان مقاومت به تنش شوری و خشکی ذکر نموده‌اند [۱۳]. در این بررسی شوری باعث افزایش غلظت قندهای محلول در ریشه گیاه شد. پیش‌تیمار بذر با آرژینین و سیستئین تاثیر معنی‌داری بر غلظت قندهای محلول ریشه و برگ در شرایط تنش نداشت. در مورد اثر آرژینین بر مقدار قندهای محلول تحت تنش شوری گزارشی وجود ندارد اما گزارش شده است که آرژینین تاثیر معنی‌داری بر غلظت قندهای محلول برگ گیاه بنگدانه تحت تنش نیکل نیز نداشته است [۲۱].

با توجه به اینکه نقش آنتی اکسیداتیو دو مولکول علامت دهی NO و H_2S در تحقیقات اخیر ثابت شده است و در این بررسی این دو اسید آمینه تاثیرات مشابهی در تخفیف تنش داشتند، احتمال ارتباط این دو مولکول علامتی نیز وجود دارد.

بررسی جزئیات این فرضیه مستلزم مطالعات عمیق در آینده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از قطب تنش غلات دانشگاه شهید باهنر کرمان از بابت تامین مالی پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Aktas H, Abak K, Cakmak I (2006) Genotypic variation in the responses of pepper to salinity. *Scientia Horticulturae* **110**: 260–266.
2. Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment* **24**: 1337–1344.
3. Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Kubis J (2009) Involvement of nitric oxide in water stress-induced responses of cucumber roots. *Journal of Plant Science* **177**: 682–690.
4. Ashraf M, Foolad M (2007) Roles of glycin-betaien and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 206–216.
5. Azooz MM (2009) Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *International Journal of Agriculture and Biology* **11**: 343–350.
6. Bates LS, Waldern RP, Tare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* **29**: 205–207.
7. Beligni MV, Lamattina L (1999) Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* **208**: 337–344.
8. Chen J, Wu FH, Wang WH, Zheng C J, Lin GH, Dong XJ, He JX, Pei ZM, Zheng HL(2011) Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4481–4493.
9. Eisvand HR, Tavakkol-Afshari R, Sharifzadeh F, MaddahArefi H, Hesamzadeh Hejazi SM (2010) Effects of hormonal priming and drought stress on activity and isozyme profiles of antioxidant enzymes in deteriorated seed of tall wheatgrass (*Agropyron elongatum* Host). *Seed Science and Technology* **38**: 280–297.
10. Ellman Gl (1959) Tissue sulfydryl groups. *Archive of Biochemistry and Biophysic* **82**: 70–77.
11. Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and satoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophysic* **125**: 189–198.
12. Hell R, Jost R, Berkowitz O, Wirtz M (2002) Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* **22**: 245–257.
13. Juan M, Rivero RM, Romero L, Ruiz JM (2005) Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environmental and Experimental Botany* **54**: 193–201.
14. Jubault M, Hamon C, Gravot A, Lariagon C, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ (2008) Differential regulation of root arginine catabolism and polyamine metabolism in clubroot-susceptible and partially resistant Arabidopsis genotypes. *Plant Physiology* **146**: 2008–2019.
15. Khalil SI, El–Bassiouny HMS, Hassanein RA, Mostafa HAM, El-Khawas SA. AbdEl Monem AA (2009) Antioxidant defense system in heat shocked wheat plants previously treated with putrescine or arginine. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1517–1526.
16. Liang G, Du G, Chen J (2009) Salt-induced osmotic stress for glutathione overproduction in *Candida utilis*. *Enzyme Microbiology and Technology* **45**: 324–329.
17. Liu K, Fu HH, Bei QX, Luan S (2000) Inward potassium channel in guard cell as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiology* **124**: 1315–1325.
18. Lugan R, Niogret MF, Leport L, Guegan JP, Larher Favoure A, Kopka J, Bouchereau A (2010) Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *The Plant Journal* **64**: 215–229.
19. Munns R (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses .*Plant Cell and Environment* **16**: 15–24.
20. Nasibi F, Barand A, Kalantari KH (2013) The effect of arginine pretreatment on germination, growth and physiological parameters in the increase of low temperature tolerance in *Pistacia vera* in vitro culture. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* **5**1: 918–1925.
21. Nasibi F, Heidari T, Asrar Z (2013) Application of arginine pretreatments ameliorate oxidative stress damages and increase alkaloids content in *Hyoscyamus niger* under nickel stress. *Journal of medicinal plants and by products* **2**: 1–11.
22. Nasibi F, Kalantari KH (2009) Influence of nitric oxide in protection of tomato seedling against oxidative stress induced by osmotic stress. *Acta Physiologia Plantarum* **1**: 1037–1044.
23. Nasibi F, Yaghoobi MM, Kalantari KH (2011) Effect of exogenous arginine on alleviation of oxidative damage in tomato plant under water stress. *Journal of Plant Interaction* **6**: 291–296.
24. Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60**: 324–349.

25. Roe JH (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *Journal of Chemical Biology* **212**: 335–343.
26. Sairam RK, Srivastava GC (2002) Changes in antioxidant activity in subcellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long-term salt stress. *Plant Science* **162**: 897–904.
27. Sotiropoulos TE, Dimassi KN, Therios IN (2005) Effects of L-arginine and L-cystein on growth, and chlorophyll and mineral contents of shoots of the apple rootstock EM26 cultured in vitro. *Biologia Plantarum* **3**: 443–445.
28. Surasak Si, Samuel T, Desh Pal S, Richard T (2002) Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* **14**: 2837–2847.
29. Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh IS, Scherer GFE (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiology* **47**: 346–354.
30. Wang X, Guoxin S, Qinsong X, Jinzhao H (2006) Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1062–1070.
31. Wang Y, Li L, Cui W, Xu S, Shen W, Wang R (2012) Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant & Soil* **351**: 107–119.
32. Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer G (2011) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sciences* **181**: 593– 603.
33. Yadav SK (2010) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* **76**: 167–179.
34. Zeid M (2009) Trehalose as osmoprotectant for maize under salinity-induced stress. *Research Journal of Agricultural and Biological Science* **5**: 613–622.
35. Zhang S, Hu J, Zhang Y, Xie XJ, Knapp A (2007) Seed priming with brassinolide improves lucerne (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth in relation to physiological changes under salinity stress. *Australian Journal of Agricultural Research* **58**: 811–815.

Plant Stress Physiology Vol. 1, No. 1, September 2014 – March 2015, pp: 43-52

Effect of seed priming with arginine and cysteine on growth and some biochemical characteristics in wheat plants under salt stress

Fatemeh Nasibi*[1], Khosrow Manouchehri Kalantari[1], Roya Zanganeh[1] and Gasem Mohammadi Nejad[2]

[1] **Biology Department, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran**

[2] **Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran**

Abstract

Salinity is one of the main environmental factors limiting plant growth and development. It has been shown that seed priming with some protective compounds increases plant tolerance to salinity stress. In this research 300 mM NaCl was used for induction of salt stress in wheat (*Triticum aestivum)* plants. Seeds were pretreated either with 0.5 mM arginine or 0.01 µM cysteine. Concentration of malondialdehyde, hydrogen peroxide and proline increased under salt stress. Pretreatment of seeds with arginine and cysteine improved growth parameters and decreased malondialdehyde and hydrogen peroxide content. Proline concentration decreased in plants pretreated with both amino acids. In the roots of salt-stressed plants, the amount of reduced glutathione increased. This effect was more pronouncedly observed in plants with cysteine pretreatment. Our data suggested that application of amino acids for seed priming alleviates salt stress damages through induction of plant antioxidative defense system.

Keywords: Amino acids, Hydrogen peroxide, Osmolytes, Lipid Peroxidation

* Corresponding author, Email: nasibi2002@yahoo.com