رستنیها، جلد3،
1381

اثر تنش شوری بر متابولیسم پرولین در دو رقم گندم[1]

The effect of salinity stress on proline metabolism in two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars

فریبا میقانی و حسن ابراهیم زاده

بخش تحقیقات علف های هرز، موسسه تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی و دانشکده علوم، دانشگاه تهران

دریافت 1381/1/31 پذیرش 1381/9/19

چکیده

در ایـن پـژوهش، اثـر تیمارهـای متفـاوت کلریـد سـدیم (0، 50، 100، 200 و 300 میلی مولار) در مراحل مختلف رشد و نمو (پنجه زنی ، تورم غلاف ، گلدهی و گرده افشـانی) دو رقم گندم (قدس : حساس به شوری و بولانی : مقاوم به شـوری) بـر غلظـت پـرولین و فعالیـت سینتیکی آنزیم پرولین دهیدروژناز در شرایط گلخانه ای مورد بررسی قرار گرفت.

در مجموع، در پاسخ به تیمارهای شوری مشاهده شد که افزایش غلظت پرولین و کـاهش فعالیـت آنـزیم پـرولین دهیـدروژناز در بـرگ قـدس بیشـتر از بـولانی بـود. بنـابراین، یکـی از سازوکار های بیوشیمیایی موثر در پاسخ متفاوت رقم های قدس و بـولانی بـه تـنش شـوری را می توان به تفاوت آنها از نظر متابولیسم پرولین نسبت داد.

واژه های کلیدی: تنش شوری، متابولیسم پرولین، گندم

مقدمه

پاسخ گیاهان به شوری یکی از موضوعاتی است که در فیزیولوژی گیاهی بسـیار مـورد مطالعه قرار گرفته و بعد از فتوسنتز دومین موضوع مورد توجه اسـت (Munns 1992). سـازش

[1] بخشی از رساله دکتری نگارنده اول به راهنمایی دکتر حسن ابراهیم زاده ارایه شده به دانشگاه تهران.

گیاهان گلدار و بی گل (نهانزادان آوندی و ریسه داران)، باکتری ها، پروتوزوآ، بی مهرگان دریایی و سخت پوستان به تنش های شوری و خشکی با انباشتن متابولیت هایی نظیر ترکیبات نیتروژن دار (پرولین، سایر اسید های آمینه، پلی آمین ها) و هیدروکسیل دار (ساکارز، سایر اولیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها) انجام می گیرد (Mccu & Hanson 1990). از آنجا که این متابولیت ها تعارضی با واکنش های بیوشیمیایی ندارند، به "متابولیت های سازگار" معروفند (Bohnert *et al*. 1995).

افزایش غلظت پرولین فراوانترین و عمومی ترین پاسخی است که به محض آبکشی ناشی از کمبود آب یا افزایش فشار اسمزی مشاهده می شود. پرولین به جز تنظیم اسمزی، نقش های دیگری نیز دارد، از قبیل : جاروب کردن رادیکال های هیدروکسیل، تنظیم pH سلولی ، پایدار کردن ساختار پروتئین (Aspinall & Paleg 1981) و محافظت در برابر سرما و تنظیم پتانسیل ردوکس.

مسیرهای بیوسنتز و کاتابولیسم پرولین مورد بررسی زیادی قرار گرفته است، اما درباره کده بندی (compartmentation) پرولین بین سیتوپلاسم زمینه و واکوئل گیاهان عالی یافته های محدودی در دسترس است. پرولین عمدتاً در سیتوپلاسم زمینه انباشته می شود تا پتانسیل اسمزی واکوئل را که درآنجا موادی نظیر یون سدیم انباشته می شوند، متوازن نماید(Aubert *et al*. 1999).

هدف پژوهش حاضر، بررسی نقش متابولیسم پرولین در القای مقاومت به تنش شوری در دو رقم گندم (قدس و بولانی به عنوان رقم های به ترتیب حساس و مقاوم به شوری) است. مقاله حاضر، نخستین گزارش درباره اثر شوری بر فعالیت سینتیکی آنزیم پرولین دهیدروژناز در ایران محسوب می شود.

روش بررسی

برای انجام پژوهش حاضر، دو رقم گندم (قدس : حساس به شوری و بولانی : مقاوم به شوری) از انبار غلات موسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر انتخاب شدند. (حساس و مقاوم بودن آنها مورد تایید بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر می باشد). حتی الامکان بذور هم اندازه و عاری از آسیب یا بیماری مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور جلوگیری از آلودگی قارچی، بذور قبل از کشت با قارچ کش vitavax به نسبت 200 گرم به ازای هر 100 کیلوگرم بذر مخلوط شدند (Dell Aquila & Spada 1993).

کشت بذور در گلدان های پلاستیکی به قطر تقریبی 20 سانتی متر انجام گرفت. هر گلدان محتوی حدود سه کیلوگرم مخلوطی از خاک با بافت متوسط، ماسه وکود به ترتیب با

نسبت 2 : 1 : 1 بود . بذور در عمق 3-2 سانتی‌متری از سطح خاک کشت شدند سپس آبیاری سطحی انجام شد تا شرایط جوانه زنی فراهم گردد.

گلدان های محتوی گیاه در گلخانه ای با شرایط کنترل شده (دما : 25/20 درجه سانتی گراد، شدت روشنایی : 3500 لوکس، دوره روشنایی : 16/8 ساعت، رطوبت نسبی : 45-40 درصد) نگهداری شدند. در هر گلدان ده بذر کاشته شد و 16 روز بعد به چهار گیاه تنک شدند. درطی پنجه زنی و تورم غلاف، گیاهان با محلول غذایی محتوی 200 ppm نیتروژن ، 92 ppm فسفر و 200 ppm پتاسیم (به ترتیب به صورت نیترات آمونیوم، سوپر فسفات و نیترات پتاسیم) آبیاری شدند (Rascio *et al.* 1992). علاوه براین، آبیاری هفته ای دوبار انجام گرفت. چهار تیمار شوری، علاوه بر شاهد (بدون کلرید سدیم) در نظر گرفته شد : 50، 100، 200 و 300 میلی مولار کلرید سدیم (Huang *et al*. 1993). گلدان ها شرایط زهکشی مناسبی داشتند. گیاهان در مراحل پنجه زنی، تورم غلاف، گلدهی و گرده افشانی تحت تاثیر تیمارهای شوری قرار گرفتند که مطابق کد *زادوکس* و همکاران (Zadoks *et al*. 1974) این مراحل به ترتیب 22، 45، 58 و 69 روز پس از بذر افشانی (DAS) بودند. در هر یک از مراحل چهارگانه فوق، تیمارهای شوری یکباره (نه به طور تدریجی) به کار رفتند و اندازه گیری غلظت پرولین و فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز در تمامی مراحل، دو هفته پس از افزودن نمک انجام گرفت. نمونه برداری از برگ ششم (22 روز پس از بذرافشانی)، برگ هفتم (45 روز پس از بذرافشانی) و برگ پرچم (58 و 69 روز پس از بذرافشانی) انجام گرفت.

سنجش پرولین نیاز به تهیه معرف " اسید ـ نین هیدرین " دارد. پس از تهیه این معرف، غلظت پرولین با استفاده از روش *بیتس* و همکاران (Bates *et al*. 1975) سنجیده شد.

جهت استخراج پروتئین برگ، بافر تریس- HCl (0/05 مولار با pH=7/5) مورد استفاده قرار گرفت. نسبت بافر 3 : 1 مناسب تشخیص داده شد. پس از استخراج در سردخانه با دمای 4-0 درجه سانتی گراد، سانتریفوژ نمونه ها تحت شرایط زیر انجام گرفت : 19000 rpm، زمان 45 دقیقه ، دما ی 4-2 درجه سانتی گراد (Gomori 1995). محلول روشناور برای سنجش فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز مورد استفاده قرار گرفت.

برای سنجش فعالیت آنزیم مورد نظر، 3 میلی لیتر معرف زیر مورد استفاده قرار گرفت:

بافر استات (0/1 M ، pH=10/3) : 2 میلی لیتر L- پرولین (20 mM) : 0/5 میلی لیتر

NAD (10 mM) : 0/ 4 میلی لیتر عصاره آنزیمی : 0/1 میلی لیتر

محلول شاهد شامل همه ترکیبات فوق بود به جز NAD . منحنی تغییرات جذب در طول موج 340 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. سرانجام فعالیت آنزیمی

برحسب واحد جذب در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه گردید (Rena & Splittstoesser 1975).

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمارهای شوری (5 تیمار) به عنوان فاکتور A، ارقام گندم(2 رقم) به عنوان فاکتور B و مراحل مختلف رشد و نمو (4 مرحله) به عنوان فاکتور C بودند. داده های آزمایش با استفاده از روش تجزیه واریانس مورد تحلیل قرار گرفتند و سپس مقایسه میانگین ها با استفاده از روش دانکن انجام شدند.

نتیجه

در پاسخ به تیمارهای شوری و با افزایش غلظت کلرید سدیم مشاهده شد که :

الف) مرحله پنجه زنی : غلظت پرولین برگ ششم افزایش یافت (5٪ > P)، به طوری که در تیمار 300 میلی مولار در برگ قدس و بولانی، مقدار پرولین به ترتیب تا 13/6 و 8/8 برابر شاهد زیاد شد (شکل1 و2). فعالیت پرولین دهیدروژناز برگ ششم کاهش قابل توجهی نشان داد (5٪ > P). در حضور تیمار 300 میلی مولار این فعالیت در برگ قدس و بولانی به ترتیب تا 6٪ و 14٪ شاهد کاهش یافت (شکل3 و4).

ب) مرحله تورم غلاف : پاسخ برگ هفتم مشابه برگ ششم بود، زیرا غلظت پرولین در تیمار 300میلی مولار دربرگ قدس و بولانی به ترتیب تا 10/5 و 7/9 برابر شاهد افزایش یافت. البته تیمار 50 میلی مولار درقدس اثر معنی داری نداشت (شکل1 و2). پاسخ برگ هفتم، کاهش فعالیت سینتیکی پرولین دهیدروژناز بود (5٪> P). در پاسخ به تیمار 300 میلی مولار، فعالیت آنزیم اخیر در برگ قدس و بولانی به ترتیب تا 11٪ و20٪ شاهد افت کرد (شکل3 و4).

ج) مرحله گلدهی : 58 روز پس از بذرافشانی، غلظت پرولین برگ پرچم افزایش نشان داد (5٪> P). بیشترین اثر فزاینده مربوط به تیمار 300 میلی مولاربود که غلظت پرولین برگ قدس و بولانی را به ترتیب تا 6/8 و 4 برابر افزایش داد (شکل1 و2). پاسخ پرولین دهیدروژناز برگ پرچم مشابه موارد قبل بود (5٪ > P). فعالیت این آنزیم در حضور تیمار 300 میلی مولار در برگ قدس و بولانی به ترتیب تا 25٪ و 39٪ شاهد کاهش یافت (شکل3 و4).

د) مرحله گرده افشانی : در پاسخ به تیمار 300 میلی مولار، غلظت پرولین برگ پرچم قدس و بولانی به ترتیب تا 1/ 4 و 2 برابر شاهد افزایش نشان داد (شکل1 و2). اما فعالیت پرولین دهیدروژناز برگ قدس و بولانی به ترتیب تا 50٪ و 65٪ شاهد کاهش یافت (شکل3 و4).

بحث

سازوکارهای متعددی برای حفظ تورژسانس در گیاهان تحت تنش شوری وارد عمل می شوند. یکی از آنها انباشتگی پرولین است. به گزارش *ارسکین* و همکاران (Erskine *et al*. 1996) پرولین انباشته شده در پاسخ به شوری، نقش مهمی در تنظیم اسمزی درون سلولی ایفا می‌کند وآنزیم های سلولی و پروتئین های غشایی را در برابر واسرشتگی(denaturation) حفظ می نماید. در پاسخ به تیمارهای شوری، پرولین بیشتری دربرگ قدس وبولانی انباشته شد. بنابر پژوهش *استوری* و همکاران (Storey *et al.* 1997) نیز پرولین درحضور تنش شوری افزایش می یابد. دوازده ساعت پس از تیمار با کلرید سدیم، غلظت پرولین نسبت به گیاهان شاهد به 2/9 برابر می رسد (Savoure *et al*. 1999). *دمیتریو* و همکاران (Dmitriev *et al*. 1996) و *کوزنتسو* و *شویاکووا* (Kuznetsov & Shevyakova 1997) معتقدند که کلرید سدیم، مسیر بیوسنتزی پرولین و توانایی آنتی اکسیدانی سلول گیاهی را تحریک می کند.

در بررسی حاضر، انباشتگی پرولین در پاسخ به تیمارهای شوری دربرگ قدس به طور قابل ملاحظه ای بیشتر از برگ بولانی بود. *کانو* و همکاران(Cano *et al*. 1996) نیز معتقدند پرولین اسید آمینه ای است که در پاسخ به شوری در رقم های حساس، افزایش بیشتری نشان می دهد و انباشتگی آن باعث القای مقاومت به شوری می گردد. به گزارش *استوری* و همکاران (Story *et al*. 1997) نیز سنتز پرولین درگیاهان حساس به شوری بیشتر از گیاهان مقاوم به شوری صورت می گیرد. به اعتقاد *کینگسبوری* و همکاران (Kingsbury *et al*. 1984) تفاوت اخیر بین کالوس های رقم های حساس و مقاوم به شوری نیز مشاهده می شود . بنابراین، تفاوت بین گونه ها و رقم ها از نظر مقاومت به شوری ممکن است ناشی از تفاوت در سنتز محلول های سازگاری نظیر پرولین باشد (Kohl 1997). با توجه به نتایج حاضر از لحاظ متابولیسم پرولین می توان به مقاوم تر بودن و سازش پذیرتر بودن بولانی به تنش شوری در مقایسه با قدس تاکید نمود.

اکسیداسیون پرولین با دو آنزیم کاتالیز می گردد: پرولین اکسیداز و پرولین دهیدرو ژناز. اولی در غشای درونی میتوکندری مستقر است و به عنوان پذیرنده الکترون به اکسیژن نیاز دارد، اما دومی در سیتوسل مستقر است.

در پژوهش حاضر، ضمن افزایش غلظت پرولین، بازدارندگی فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز در پاسخ به تیمارهای شوری مشاهده شد و این بازدارندگی دربرگ قدس بیشتر از بولانی بود. تفاوت اخیر سبب انباشتگی بیشتر پرولین در برگ قدس در مقایسه با بولانی

گردیده است. در تایید نتایج حاضر، گزارش های متعددی بیانگر بازدارندگی اکسایش پرولین در گیاهان تحت تنش شوری است. به عنوان مثال در اسفناج، فعالیت پرولین دهیدرو ژناز در پاسخ به شوری کاهش چشمگیری نشان می دهد و در برگ و ریشه توت سفید 75 ٪ بازداشته می شود (Kumari *et al.* 1996). *گرنارد* و همکاران (Gernard *et al.* 1991) افزایش غلظت پرولین را در پاسخ به تنش شوری به سه عامل زیر نسبت داده اند: تحریک سنتز آن از گلوتامات، کاهش اکسایش آن و کاهش اتصال پرولین به پروتئین.

سرانجام، هم افزایش غلظت پرولین و هم کاهش فعالیت سینتیکی آنزیم پرولین دهیدروژناز در پاسخ به تیمارهای شوری، در مرحله پنجه زنی (22 روز پس از گرده افشانی) آشکارتر از مراحل دیگر بود (شکل های4 -1). نگارندگان مقاله این تفاوت را انباشتگی بیشتر یون سدیم درطی پنجه زنی در رقم های مورد مطالعه در پاسخ به تنش نمکی می دانند (*ابراهیم زاده* و همکاران 2000) که توانسته بیوسنتز پرولین را بیش از سایر مراحل تحریک نماید.

مطالعه تغییرات غلظت پرولین و آنزیم پرولین دهیدروژناز برای مقایسه رقم های مختلف از لحاظ مقاومت یا حساسیت به شوری، ابزار بیوشیمیایی مناسبی به نظر می رسد .

نشانی نگارندگان: دکتر فریبا میقانی، بخش تحقیقات علف های هرز، موسسه تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی و دکتر حسن ابراهیم زاده، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران.

THE EFFECT OF SALINITY STRESS ON PROLINE METABOLISM IN TWO WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM*) CULTIVARS

F. MAIGHANY and H. EBRAHIMZADEH

Department of Weed Research, Plant Pests & Diseases Research Institute
and Faculty of Science, Tehran University

Received 20.04.2002 Accepted 10.12.2002

The effect of various NaCl treatments (0, 50, 100, 200 and 300 mM) at different growth and development stages (tillering, boot swelling, flowering and polination) of two wheat cultivars (Ghods : salt-sensitive; Boolani : salt-resistant) on proline concentration and the kinetic activity of proline dehydrogenase was studied under greenhouse conditions. Generally, in response to salinity treatments, the increase of proline level and the decrease of proline dehydrogenase activity in Ghods leaves were greater than in Boolani leaves. It is therefore concluded that, proline metabolism is probably one of the biochemical mechanisms influencing the response of these cultivars to salt stress.

Key words: salt stress, proline metabolism, wheat

References

ASPINALL, D. and PALEG, L. G. 1981. Physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Academic Press, New York.

AUBERT, S., HENNION, F., BOUCHEREAU, A., GOUT, E., BLIGNY, R. and DOME, A. J. 1999. Subcellular compartmentation of proline in the leaves of the subantarctic kerguelen cabbage *Pringlea antiscorbutica* R.Br. *in vivo* ^{13}C-NMR study. Plant Cell. Environ. 22: 255-259.

BATES, L. S., WALDREN, R. P. and TEARE, I. D. 1975. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-208.

BOHNERT, H. J., NELSON, D. E. and JENSEN, R. G.1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell, 7, 1098-1111.

CANO, E. A., PEREZ-ALFOCEA, F., MORENO, V. and BOLARIN, M. 1996. Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus cultures. Plant Cell Rep. 15: 791-794.

DELL'AQUILA, A. and SPADA, F. 1993 . The effect of salinity stress upon protein synthesis of germinating wheat embryos . Ann. Bot. 72: 97-101.

DMITRIEV, A., DJATSOK, J. and GRODZINSKY, D. 1996. The role of Ca^{2+} in elicitation of phytoalexin synthesis in cell culture of onion. Plant Cell Rep. 15: 945-948.

EBRAHIMZADEH, H., MAIGHANY, F. and RAHIMIAN, H. 2000. Role of mineral ions in salt tolerance of two wheat cultivars. Pak. J. Bot. 32(2): 265-271.

ERSKINE, P. D., STEWART, G. R., SCHMIDT, S., TURNBULl, M. H., UNKOVICH, M. and PATE, J. S. 1996. Water availability - a physiological constraint on nitrate utilization in plants of Australian semi-arid mulga woodlands. Plant Cell Environ. 19: 1149-1159.

GERNARD, H., SAOS, J., BILLARD, J. P., TREMOLINERS, A. and BOUCAUD, J. 1991. Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine and photosynthetic activity in choroplasts *Suaeda maritima*. Plant Physiol. Biochem. 29: 421-427.

GOMORI, G. 1955 . Preparation of buffers for use in enzyme studies. Methods in enzymology, vol . 1, 138-146.

HUANG, L., MURRAY, F. and YANG, X. 1993. Responses of Nitrogen metabolism parameters to sublethal SO_2 pollution in wheat under mild NaCl stress. Environ. Exp. Bot. 33 (4): 479-493.

KINGSBURY, R. W., EPSTEIN, E. and PEARCY, R. W. 1984. Physiological responses to salinity in selected lines of wheat. Plant Physiol. 74: 417-423.

KOHL, K. I. 1997. NaCl homeostasis as a factor for the survival of the evergreen halophyte *Armeria maritima* under salt stress in winter. Plant Cell Environ. 20: 1253.

KUMARI, B. D. R. and VEERANJANEYULU, K. 1996. Changes in leaf water potential, osmotic, adjustment, and proline metabolism in Mulberry during water stress. Isr. J. Plant Sci.15: 135-141.

KUZNETSOV, V.V. and SHEVYAKOVA, N. I . 1997. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity, proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. Physiol. Plant. 10: 320-326.

MCCU, K. F. and HANSON, A. D. 1990. Drought and salt tolerance : Toward under standing and application. Trends Biotechnol. 10 (8): 358-362.

MUNNS, R. 1992. A leaf elongation assay detects an unknown growth inhibitor in xylem sap from wheat and barley. Aust. J. Plant Physiol. 19: 127-135.

RASCIO, A., PLANTANI, C., DI FONZO, N. and WITTMER, G. 1992. Bound water in durum wheat under drought stress. Plant Physiol. 98: 906-912.

RENA, A. B. and SPLITTSTOESSER, W. E. 1975. Proline dehydrogenase and pyroline–5–carboxylate reductase from pumpkin cotyledons. Phytochem. 14: 657-661.

SAVOURE, A., THORIN, D. and DAVEY, M. 1999. NaCl and $CuSO_4$ treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. Plant Cell Environ. 22: 387-396.

STOREY, R. and JONES, R. G. W. 1977. Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance. Phytochem. 16: 447-453.

ZADOKS, J. C., CHANG, T. T. and KONZAK, C. F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Res. 14: 415-421.

Addresses of the authors: Dr. F. MAIGHANY, Department of Weed Research, Plant Pests & Diseases Research Institute, Tehran and Dr. H. EBRAHIMZADEH, Department of Biology, Faculty of Sciences, Tehran University, Tehran, Iran.