

مقایسه اثر نمک بر رویش دانه و رشد دانه رست، میزان پروتئین، لیپید و فعالیت پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز گیاه بادام زمینی (*Arachis hypogaea*) در پیش تیمارهای اکسینی

عدرا عطائی عظیمی^۱، شهرزاد نصیری سمنانی^۲، بابک دلنواز هاشملویان^۱

۱-دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه. attaei@iau-saveh.ac.ir
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۴ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۳

چکیده

بادام زمینی (*Arachis hypogaea* L.) یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی، خوراکی در دنیا بوده و شوری یکی از تنش‌های محیطی موثر در مراحل رشد و محصول دهی است. هدف از این پژوهش بررسی مقایسه‌ای اثر نمک بر روی برخی از عوامل موثر آنزیمی بر روی رشد و رویش دانه و دانه رست‌های گیاه پیش تیمار شده با اکسین می‌باشد. در این پژوهش در ابتدا به هنگام جوانه زنی برداری بادام زمینی را در غلظت‌های ۰، ۱/۴، ۲/۸، ۵/۶، ۱۱/۲ و ۲۲/۴ گرم بر لیتر نمک طعام در محیط پایه MS، بررسی و در مرحله بعدی دانه‌ها قبل از جوانه زنی با اکسین ۲۰ میلی گرم بر لیتر پیش تیمار و سپس آنالیزهای رشد، تعیین غلظت پروتئین، فعالیت آنزیم‌های اکسیدازی و پراکسیدازی انجام گردید. نتایج مشخص نمود که تنش نمک در همه تیمارها رویش را به تأخیر انداخته و با افزایش غلظت طول ریشه چه و محور زیر لپه کاهش و رشد دانه رست کم‌تر گردیدند. تغییر میزان پروتئین و لیپید کل، فعالیت آنزیم پراکسیداز تابع افزایش غلظت نمک نبوده ولی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز با افزایش مقدار نمک کاهش پیدا کرد. در آزمایش ۱۲ این پژوهش مشخص شد که پیش تیمار دانه‌ها (پاساژ) با اندول استیک اسید مقاومت دانه رست‌ها را به نمک افزایش و سبب افزایش طول عمر این گیاه گردید. کلید واژه: مقاومت به نمک، جوانه زنی، پیش تیمار اکسین، بادام زمینی.

مقدمه

بدون تلقیح با ریزوبیوم به راحتی با نیتروژن محلول رشد (۶۵)، و با ثابت نگه داشتن pH از بروز کمبود آهن در سطح وسیعی جلوگیری نماید (۲). برخی از پژوهشگران از کشت هیدروپونیک بادام زمینی، برای تولید میوه‌هایی با وزن بیش از ۳۵ گرم در مناطق شور استفاده می‌نمایند (۵). فعالیت آنزیم پراکسیداز تابع غلظت کلسیم می‌باشد. این آنزیم سبب کاهش کشش پذیری دیواره سلولی و از این طریق موجب کاتابولیسم هورمون اکسین می‌شود (۹و۸). نمک باعث کاهش رشد ریشه و کاهش جذب آب و مواد معدنی از خاک می‌شود (۱۰). رشد ریشه بادام زمینی

گیاه بادام زمینی (*Arachis hypogaea*) از تیره نخود یکی از گیاهان روغنی در جهان است که برای تولید روغن و کره بادام زمینی در سطح وسیعی از کشورهای دنیا از جمله ایران کشت می‌شود. همه اجزای گیاه از نظر داشتن روغن، پروتئین و مواد معدنی برای انسان و جانوران قابل استفاده است. مقدار لیپید دانه‌های بادام زمینی ۵۲-۴۲٪ و مقدار پروتئین آن ۳۲-۲۵٪ است (۱). این گیاه حساس به نمک (۲) به ویژه در مرحله رویش دانه و رشد رویشی می‌باشد (۷). کشت هیدروپونیک بادام زمینی در محیط هو گلند موجب گردیده که بادام زمینی

انجام شد.

- اندازه یری فعالیت پراکسیداز با استفاده از مخلوط ۲ میلی لیتر بافر استات سدیم ۱/۴٪ (۱/۴ گرم استات سدیم با ۰/۶ میلی لیتر اسید استیک مخلوط و با آب مقطر به حجم در ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد)، pH=۵ با ۰/۲ میلی لیتر بنزیدین ۰/۰۱ مولار (حل شده در ۹۸ میلی لیتر الکل ۵۰٪ + ۰/۲ میلی لیتر آب اکسیژنه) و اضافه کردن ۰/۱ میلی لیتر عصاره پروتئینی و اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر، در فواصل ۳۰ ثانیه به مدت ۶ دقیقه صورت گرفت.

- برای اندازه گیری فعالیت پلی فنل اکسیداز، از مخلوط ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۲ مولار، pH=۶/۸ را با ۰/۴ میلی لیتر محلول ۳ و ۴- دی هیدروکسی فنیل آلانین (۰/۵٪) و عصاره آنزیم (۰/۲ میلی لیتر) استفاده شد. ۳-۲ دقیقه بعد از آماده شدن مخلوط، تغییر جذب در طول موج ۴۸۰ نانومتر و فواصل زمانی ۳۰ ثانیه به مدت ۴ دقیقه با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

فعالیت آنزیم‌ها بر حسب میلی جذب بر محتوای پروتئین ۱۰۰ گرم ماده تر در دقیقه ($\text{mAb}(\text{pr} * 100 \text{g} * 100 \text{fw})^{-1} \text{min}^{-1}$) حساب شد.

آزمایش ۲:

پوست بذرهاى بادام زمینی پس از ۶ ساعت غوطه وری در آب مقطر کنده و به دو گروه تقسیم شدند (یک گروه به مدت ۵ ساعت در محلول ۲۰ میلی گرم در لیتر اندول استیک اسید (پیش تیمار اکسین) و گروه دوم در شرایط مناسب در آب مقطر).

بعد از ۵ ساعت گروه‌ها به ۶ گروه تقسیم و هر گروه در ۱۰ پتری کشت شدند. ۳ گروه شامل بذرهاى پیش تیمار داده شده با اکسین و ۳ گروه هم بدون پیش تیمار بودند. در هر یک از ۲۰ پتری اول با و بدون پیش تیمار ۱۰ میلی لیتر آب مقطر، در ۲۰ پتری دوم ۱۰ میلی لیتر محلول ۲/۵ گرم در لیتر نمک و در ۲۰ پتری سوم ۱۰ میلی لیتر محلول ۵ گرم در لیتر نمک ریخته شد. نتایج رویش و رشد دانه

در خاک‌های شور کاهش می‌یابد (۱۱). از آنجایی که دانه‌های بادام زمینی غنی از پروتئین و لیپید بوده و ارزش غذایی بالایی دارد، امروزه برای به دست آوردن ارقام مقاوم به نمک بررسی‌های بسیاری در حال انجام است. یکی از روش‌های مطالعه پرتودهی به دانه رست‌ها و به دست آوردن ارقام جدید است (۱۲، ۱۳ و ۱۴). در این پژوهش بررسی مقایسه‌ای اثر نمک و پیش تیمار اولیه با اکسین بر روی رویش دانه و رشد دانه رست، تغییر پروتئین کل و لیپید، فعالیت پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش برای مشخص شدن نقش اکسین در افزایش مقاومت گیاه بادام زمینی به نمک دو آزمایش انجام گرفت:

آزمایش ۱ - تاثیر نمک بدون پیش تیمار اکسین و آزمایش ۲ تاثیر نمک با پیش تیمار اکسین

پس از تهیه میوه‌های بادام زمینی از آستانه اشرفیه گیلان دانه‌ها را از میوه جدا و با الکل ۹۶٪ به مدت ۲ دقیقه استریل و پس از کندن پوست آن‌ها روی کاغذ صافی در پتری دیش‌های محتوی ۷ میلی لیتر محیط MS بدون آگار با غلظت‌های مختلف نمک (NaCl) (۰، ۴/۱، ۸/۲، ۱۶/۵، ۲/۱۱ و ۲۲/۴ گرم بر لیتر) کشت شد (۱۵). بعد از ۲ هفته درصد جوانه زنی و رویش دانه‌ها، میزان پروتئین، لیپید کل، فعالیت پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز مورد بررسی قرار گرفت.

- استخراج پروتئین با آسیاب کردن ۲ گرم برگ یا دانه در حضور ۱۰ میلی لیتر بافر تریس-گلیسین (۱/۵ گرم تریس + ۷/۲ گرم گلیسین + ۲/۵ میلی لیتر گلیسرول در حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) pH=۸/۳ در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت (۳۹).

- استخراج لیپید با روش آسیاب کردن نمونه گیاهی در حضور کلروفرم - متانول به نسبت ۵ به ۱ به مدت ۵ دقیقه، اضافه کردن آب، جدا کردن کلروفرم با دکانتور، تبخیر کلروفرم و اندازه گیری وزن خشک لیپید باقی مانده

کاهش یافت. از غلظت صفر تا ۵/۸ گرم در لیتر نمک به تدریج اندازه و تعداد برگ‌ها کاهش یافت به طوری که در دو غلظت ۱۱/۲ و ۲۲/۴ گرم در لیتر برگ‌ها و بخش هوایی هم تشکیل نشده و در غلظت‌های ۲/۸ گرم در لیتر و بالاتر، فقط تشکیل ریشه چه مشاهده می‌شود. پروتئین کل در غلظت‌های مختلف نمک متغیر بوده و تابع افزایش غلظت نمک نیست. ولی میزان لیپید تا غلظت ۵/۶ گرم بر لیتر متغیر ولی بشتر از آن ثابت می‌گردد. میزان فعالیت پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز مانند میزان پروتئین متغیر و در غلظت ۵/۶ گرم در لیتر نمک به بیشترین مقدار خود می‌رسد (جدول ۱).

نتایج آزمایش ۲ نشان داد که دانه رست‌های کشت شده در محیط مایع دارای ۲/۵ و ۵ گرم در لیتر دو هفته بعد از کشت کاملاً از بین رفته ولی نمونه‌های پیش تیمار شده با اکسین در هر دو غلظت ۲/۵ و ۵ گرم در لیتر نمک بعد از شش هفته از بین رفتند. مقایسه درصد پروتئین و لیپید، فعالیت پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز نشان داد که در کل نمونه‌های پیش تیمار شده با اکسین نسبت به بدون پیش تیمار اکسینی، پروتئین بیشتر، لیپید کمتر، فعالیت

رست‌ها بعد از ۱۰ روز مطالعه شد. دانه رست‌ها بعد از ۱۰ روز مانند آزمایش اول در محیط MS مایع کشت و طی دو ماه اثر نمک و پیش تیمار اکسین بر روی درصد جوانه زنی و رویش دانه‌ها، میزان پروتئین، لیپید کل، فعالیت پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز مطالعه گردید.

نتایج

نتایج آزمایش ۱ نشان داد که دانه‌های بادام زمینی در همه تیمارهای نمک رویش دارند ولی زمان رویش با افزایش غلظت نمک را از یک هفته تا دو هفته بیشتر گردید. مقایسه میانگین‌ها رشد دانه رست‌ها، چهار گروه مشاهده می‌شود. گروه اول شامل غلظت‌های ۰ و ۱/۴ گرم در لیتر نمک با بیشترین رشد و گروه چهارم شامل غلظت‌های ۱۱/۲ و ۲۲/۴ گرم لیتر با کمترین رشد است. دو گروه دیگر در غلظت‌های میانی قرار می‌گیرند. با افزایش نمک، رشد بخش هوایی کم و در غلظت ۱۱/۲ و ۲۲/۴ گرم بر لیتر نمک به حدود صفر رسید. میانگین طول دانه رست‌ها (ریشه چه و محور زیر لپه) با افزایش غلظت نمک از ۱۵ سانتی‌متر در محیط شاهد به ۲ و ۲/۲۵ سانتی‌متر در غلظت‌های ۱۱/۲ و ۲۲/۴ گرم در لیتر

جدول ۱- اثر غلظت‌های نمک درصد رویش، رشد دانه رست، پروتئین و لیپید کل، و فعالیت (ف) پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در بادام زمینی

۲۲/۴	۱۱/۲	۵/۶	۲/۸	۱/۴	۰	نمک (mg/l)
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	٪ رویش
۲/۲ d	۲ d	۵/۵ c	۷ b	۱۱/۵ a	۱۵ a	طول دانه رست (سانتی متر)
-	-	++	+	++	++	تعداد برگ
۱۲/۵ b	۱۰ d c	۱۴/۲ a	۱۱ c d	۱۴/۱ a	۹/۷۴ c	٪ پروتئین
۳۵ a	۳۵ a	۳۰ b	۱۵ d	۱۸ d c	۲۰ c	٪ لیپید
۶۹ d	۴۶/۴ e	۱۲۸/۸۴ a	۱۷/۲ f	۹۵ b	۸۷ b c	ف- پراکسیداز
۱/۲۵ c	۱/۰۱ c	۵۶۰ a	۲۲۹ b	۵۶۴ a	۲۹۲ b	ف- پلی فنل اکسیداز

جدول ۲- اثر غلظت نمک بر روی دانه رست‌های تیمار شده و غیر تیمار با اکسین

تیمار با اکسین		بدون تیمار با اکسین			غلظت نمک	
۵	۲/۵	۰	۵	۲/۵		۰
۱۴/۲	۱۱	۱۰/۴۷	۱۵/۵۲	۱۲/۵	۹/۷۴	٪ پروتئین
۳۰	۲۳/۲	۲۱/۵	۲۸/۲۲	۱۷	۲۰	٪ لیپید
۱۲۸/۸۴	۹۷/۲	۱۰۹	۱۰۸/۰۸	۱۹/۸	۸۷	فعالیت پراکسیداز
۵۶۰	۲۳۳	۲۹۷	۵۶۹/۱	۲۲۹	۲۹۲	فعالیت پلی فنل اکسیداز

می‌باشد. با آن که فعالیت پراکسیداز با افزایش شوری باید افزایش یابد ولی همان طور که در این پژوهش مشاهده می‌شود تغییر فعالیت پراکسیداز بیشتر به وضعیت فیزیولوژی دانه بستگی دارد و افزایش فعالیت پراکسیداز در غلظت ۵/۶ گرم در لیتر می‌تواند ناشی از روشن شدن ژن‌های مقاومت به نمک در این گیاه باشد. آنزیم پراکسیداز، یکی از آنزیم‌هایی است که ساختمان آن در اکثر گیاهان عالی مثل بادام زمینی مشخص شده است. فعالیت این آنزیم تابع غلظت کلسیم بوده و بر روی کاتابولیسیم هورمون اکسین اثر دارد (۹ و ۸). احتمالاً افزایش فعالیت این آنزیم در پیش تیمار اکسینی ناشی از این امرست و اکسین تشکیل این آنزیم را در بادام زمینی القا می‌کند. نتایج این آزمایش نشان داد که پیش تیمار اکسینی می‌تواند مقاومت به نمک را در بادام زمینی افزایش دهد.

منابع

1. FAO. (2005). <http://www.faostat.org>.
2. WWW.Irrigation Business & Technology online. (2007). Iron deficiency of crops.
3. Puntase, J., Senthong, C. (2000). Southeastern Peanut farmer. Page.htm, Peanut Farmer magazine, 43 (2).
4. Eaton, L., Dave, K., Gallhager, E. (1994). Mechanism of Aflatoxin carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 34; 135-172.
5. Mackowiak, C.I., Wheeler, R. (1998). A recirculating hydroponic system of studying Peanut. *Pubmed*. 33(4); 650-651.
6. Trotman, Hamilton, C.A. (2000). The 4th International conference on life support & Biosphere science, v:7, P; 23-83.
7. Nautiyal, P.C., Ravindra, V., Joshi, Y.C. (1989). Germination and early seedling growth of some Groundnut cultivars under salt stress. *Indian J. plant Physiol*, 32; 251-253.

پراکسیداز خیلی بیشتر داشته ولی فعالیت پلی فنل اکسیداز تغییر نمی‌کند (جدول ۲).

بحث و نتیجه گیری

بر خلاف گزارش برخی پژوهشگران (۷ و ۱۱)، افزایش غلظت نمک بر روی رشد اندام‌های هوایی دانه رست‌ها نسبت به اندام زیرزمینی بیشتر موثر است. پروتئین کل در غلظت‌های مختلف نمک متغیر بوده و تابع افزایش غلظت نمک نیست، ولی میزان لیپید در دو غلظت آخری نمک به حدود ۳۵٪ می‌رسد که هم راستا با گزارش‌های دیگر پژوهشگران است (۱). اگرچه گزارش شده است که بادام زمینی گیاهی بسیار حساس به شوری است (۲۱ و ۲۲) ولی با توجه به پژوهش اخیر می‌توان گفت که نمک روی رویش دانه بادام زمینی بی‌تأثیر است ولی روی رشد آن اثر زیادی داشته و افزایش غلظت نمک همراه با کاهش رشد

8. Hu, C. (1989). Biosynthesis and localization of Peanut peroxidase. *Plant Physiol*, 135(4); 391-397.

9. Rayle, D.L., Cleland, R.E. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is a live and well. *Plant Physiol*, 1271-1274.

10. Lauter, D.J., Meiri, A. (1990). Peanut pod development in pegging and root zone salinized with sodium chloride. *Crop Sci*, 30; 660-664.

11. Girdhar, I.K. (2005). Performance of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) as influenced by soil salinity and saline water irrigation in black clay soils. *J. Oil seeds Res*, 22; 183-187.

12. Ahmed, M.S.H., Mohamed, S.M.S. (2009). Improvement of Groundnut productivity under salin condition. *World Journal of*

Agriculture Science, 5(6); 680-685.

13.Kale, D.M., Mouli, C., Murty, G.S.S. , Rao, M.V.P. (1997). Development of a new Groundnut variety, TG-26 by using induced mutations in cross breeding. Mutation Breeding Newsl,43; 25-27.

14.Patil, S.H. (1995). Semi-dwarf, early maturing and high yielding new groundnut

variety, TAG-24. J. Oilseed Res, 12; 254-257.

15.Razdan, M.K.(2003).Plant tissue culture, Science Publishers, Inc., 25.

16.Bradford, M.M.(1976). Rapid and sensitive method for quantification of proteins. Anal.Bioche,72;248-254.

