

تأثیر IAA بر تحمل به تنش شوری گیاه‌چه‌های تنباکو (*Nicotiana plumbaginifolia*) در شرایط کشت در شیشه

سحر قاسمی، M.Sc.، علی اکبر احسانپور، Ph.D.*

- اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اصفهان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۷

چکیده

هدف: هدف این مطالعه بررسی ارتباط بین IAA و برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به‌منظور تحمل به تنش شوری است. **مواد و روش‌ها:** بذره‌های استریل تنباکو در محیط کشت MS کشت شدند. گیاه‌چه‌های تنباکو (*Nicotiana plumbaginifolia*) تکثیر شده در شرایط کشت بافت به‌مدت ۴ هفته تحت تیمار IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و شوری (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) قرار گرفتند و بعد از ۴ هفته برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نظیر کلروفیل، H_2O_2 ، پرولین، پروتئین، کربوهیدرات و آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی اندازه‌گیری شدند.

نتایج: در تنش شوری افزایش H_2O_2 ، پرولین، آنتی‌اکسیدانت‌هایی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و بر عکس کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی، کربوهیدرات کربن و پروتئین کل مشاهده شد. در گیاه‌چه‌های تحت تنش شوری، تیمار اکسین باعث افزایش میزان پرولین و H_2O_2 شد. کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی و کربوهیدرات محلول و آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و پروتئین کل شد. اما میزان کاتالاز در حضور تیمار اکسین افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: تیمار اکسین در گیاه‌چه‌های تنباکو به تغییر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی بهبود تحمل تنش شوری را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: تنش شوری، اکسین، گیاه تنباکو

مقدمه

اکسین‌ها دسته‌ای از هورمون‌های گیاهی هستند که نقش ضروری در هماهنگی فرایندهای رشدی چرخه زندگی گیاه ایفا می‌کنند و نام خود را از کلمه یونانی auxano به معنی رشد کردن می‌گیرند. واژه اکسین برای مواد شیمیایی طبیعی و مصنوعی که رشد کولتوپتیل و ساقه را موجب می‌شود، استفاده می‌شود. اکسین در رشد گیاهان و تشکیل مریستم‌های راسی نقش دارد و برای تمایز ریشه ضروری هستند. همه اکسین‌ها ترکیباتی با حلقه آروماتیک و گروه اسید کربوکسیلیک هستند (۱). تصور می‌شود که اکسین پمپ پروتون غشا پلاسمایی را فعال و پروتون را از سیتوزول به آپوپلاست پمپ می‌کند، که در سست شدن دیواره سلولی و افزایش گسترش سلول نقش دارد (۲). در شرایط تنش شوری با اینکه توانایی گیاه برای مصرف آب کاهش می‌یابد (۳)، اما فشار تورگر سلول عامل محدود کننده رشد نیست. علاوه بر این، نشان داده شده است که تورگر اندام‌های هوایی و رشد آن‌ها، در هیبریدهای مقاوم در برابر نمک در شرایط تنش شوری حفظ شده است، که به‌واسطه افزایش اسمولیت‌ها در عصاره اندام‌های هوایی صورت می‌گیرد. در شرایط تنش (خشکی و شوری)، سیستم ریشه‌ای خوب و گسترده می‌تواند تاثیر بسیاری را در گیاه داشته باشد (۴). بهبود سیستم ریشه‌ای گیاه (افزایش طول و تعداد ریشه اولیه) نه تنها منجر به افزایش عملکرد گیاه در شرایط طبیعی می‌شود، بلکه توانایی تحمل گیاه به شوری و خشکی را افزایش می‌دهد (۵). مشاهده شده که محدوده وسیعی از اکسین‌های مصنوعی می‌توانند موجب افزایش طولی شدن سلول‌ها در ساقه‌های لوبیا شوند. در محیط‌های شور به‌کارگیری یک یا مخلوطی از تنظیم‌کننده‌های رشد، از قبیل ایندول استیک اسید، ایندول بوتیریک اسید، نفتالین استیک اسید و ۲-۴ دی کلروفونوکسی استیک اسید، به‌صورت برگ پاشی و یا تیمار با بذر در القا و افزایش توان

ریشه‌دهی و در نتیجه افزایش رشد گیاه آثار معنی‌داری در پی داشت (۶).

نقش اکسین در غلبه بر تنش‌ها شناسایی شد است، تنش شوری می‌تواند بر هومئوستازی اکسین از طریق تغییر متابولیسم و توزیع آن اثر بگذارد (۷). بر طبق تئوری رشد اسیدی، اسیدی شدن به‌واسطه ی اکسین در آپوپلاست برگ، برای افزایش توسعه دیواره سلولی ضروری می‌باشد (۸) همچنین شواهدی نشان می‌دهد که ABA (آبسزیک اسید) به‌واسطه IAA از طریق بتا اکسیداسیون، در مقاومت به شوری عمل می‌کند (۹). اکسین‌ها اولین گروه هورمون‌های گیاهی هستند که پس از کشف به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد و طولی کردن سلول استفاده شدند. بارزترین ویژگی اکسین‌ها، اثر بر رشد طولی سلول‌های ساقه، کلتوپتیل و ریشه است. با این حال، در تشکیل ریشه‌های جانبی و ریشه‌های نابجا، تقسیم سلولی در کشت بافت و در بیوسنتز پروتئین و RNA هم نقش دارند، اعتقاد بر این است که اکسین با تغییراتی در بیان ژن موجب فعالیت‌های مذکور می‌شود (۱۰). همچنین گزارش شده است هورمون‌های گیاهی از جمله اکسین نقش مهمی را در تعدیل رشد گیاه بازی می‌کنند و کاربرد ایندول استیک اسید در ناحیه طولی شدن (Elongation zone) مهار رشد ریشه القا شده از طریق تنش را تعدیل می‌کند، که نشان دهنده نقش ایندول استیک اسید در محافظت گیاه در برابر تنش‌ها می‌باشد. اکسین احتمالاً نفوذپذیری غشا را برای انتشار آب افزایش می‌دهد که این عمل را یا از طریق فعال‌سازی پروتئین‌های موجود یا سنتز آنزیم‌های هیدرولیتیک انجام می‌دهد. هورمون‌های گیاهی از جمله اکسین نقش القای ژن‌های ویژه در سنتز پروتئین‌ها را دارند. همچنین گزارش شده که اکسین در گیاهان تحت تنش باعث افزایش میزان پرولین شده، که افزایش این متابولیت نشان‌دهنده نقش هورمون اکسین در پاسخ به تنش می‌باشد (۱۱). با توجه اینکه نقش فیزیولوژیکی هورمون اکسین در میزان تحمل گیاه نسبت به تنش شوری به خوبی شناخته نشده است لذا، در این پژوهش گیاهچه‌های تنباکو به‌عنوان یک

چینی بر روی یخ ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm درون سانتریفیوژ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار با pH=۷ و ۱ میلی‌لیتر KI (پتاسیم یدور) یک مولار مخلوط شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط کووت شیشه‌ای و با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل AE-UV1600 خوانده شدند.

اندازه‌گیری پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates و همکاران (۱۳) استفاده شد. در این روش ابتدا ۳۰ میلی‌گرم از بافت‌های تازه برگ و ریشه گیاهان وزن شد. هر نمونه با ۱/۷ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالیسیلیک ۳ درصد (حجم/وزن) به خوبی ساییده شد. عصاره‌های حاصل درون اپندورف‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته و داخل لوله‌های آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شد. بعد ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین به هر لوله اضافه شد. پس درب هر لوله با فویل آلومینیومی محکم بسته شد و لوله‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد داخل بن ماری حرارت داده شدند. پس از خارج نمودن لوله‌ها از بن ماری و سرد شدن بر روی یخ، در زیر هود به هر لوله ۲ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۲۰ ثانیه به شدت مخلوط شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط آزمایشگاهی به صورت ثابت قرار داده شد. در این مرحله در لوله‌های آزمایش فاز آلی (قرمز) در بالا و فاز بی‌رنگ و شفاف در پایین تشکیل شد. و سپس از هر لوله ۱ میلی‌لیتر از فاز بالایی برداشته و داخل کووت شیشه‌ای ریخته شد. جذب ترکیب رنگی هر نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Shimadzu UV-160A، ساخت کشور ژاپن، خوانده شد.

اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول: به منظور اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول مقدار ۱۰ میلی‌گرم بافت خشک از هر تیمار توزین شد و با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر گرم در هاون سائیده شد و سپس با کمک کاغذ صافی صاف شد.

گیاه مدل تحت تیمار IAA قرار گرفتند تا با بررسی برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی و رشد گیاه نقش اکسین در رابطه به شوری بهتر شناخته شود.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و رشد گیاهچه: بذرهای تنباکوی تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان پس از استریل شدن روی محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ) کشت شدند. سپس شیشه‌های حاوی بذر در اتاق کشت با دمای $1 \pm$ ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه قرار داده شدند. جهت بررسی و مقایسه مقاومت به شوری گیاهچه‌های تنباکو تکثیر شده در شرایط کشت بافت در محیط کشت حاوی نمک ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک و IAA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. (لازم به ذکر است که بر اساس آزمایشات اولیه از بین دامنه صفر تا ۳ میلی‌مولار اکسین بهترین غلظت IAA مقدار ۱ میلی‌گرم بر لیتر انتخاب شد). محیط کشت بدون تیمار IAA و نمک به عنوان شاهد استفاده شد. گیاهچه‌های تنباکو بعد از ۴ هفته جهت آنالیزهای لازم استفاده شدند. کلیه آزمایشات با حداقل ۳ تکرار انجام شده و آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون Duncan انجام و سطوح معنی‌داری تیمارها در سطح $p \leq 0.05$ محاسبه شد.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک: پس از چهار هفته، گیاهچه‌های رشد یافته در غلظت‌های مختلف نمک و اکسین، از محیط کشت خارج شد و به منظور حذف آگار، ریشه‌ها با آب مقطر شستشو داده شد و سپس به کمک کاغذ صافی خشک شد. وزن تر گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد. نمونه‌های وزن شده در مرحله قبل به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری H_2O_2 : اندازه‌گیری H_2O_2 بر اساس روش Velikova و همکاران (۱۲) صورت گرفت. ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ تازه را با ۵ میلی‌لیتر (تری کلرواستیک اسید) TCA با غلظت ۰/۱ درصد در هاون

کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز) در برگ گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت‌های حاوی نمک و اکسین توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Shimadzu UV-160، ساخت کشور ژاپن، اندازه‌گیری شد.

استخراج عصاره آنزیمی: ۱۰۰ میلی گرم از بافت تازه برگ و ۱ میلی لیتر بافر فسفات (pH= ۷/۸) به تدریج به آن اضافه شده و ساییده و به‌طور کامل هم‌وزن نیز شد (تمام مراحل روی یخ صورت گرفت). عصاره‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس از محلول رویی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت استفاده شد.

اندازه‌گیری و تهیه بافر استخراج پروتئین: اندازه‌گیری پروتئین کل طبق روش برادفورد (۱۶) انجام گرفت. جهت تهیه بافر استخراج، ابتدا محلول A شامل نمک اسیدی $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ و محلول B شامل نمک بازی Na_2HPO_4 تهیه و سپس حجم ۱۰۰ میلی لیتر از مخلوط دو محلول A و B به نسبت ۸/۵ و ۹۱/۵ با غلظت ۱۰۰ میلی مولار pH= ۷/۸، خاوی PVP، ۲ درصد و گلیسرول ۱۰ درصد و EDTA 1 mM و DTT 4 Mm تهیه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش Aebi (۱۷) انجام شد. بر این اساس مقدار ۹۰۰ میکرو لیتر از بافر واکنش بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH=۷ و ۱۰ میکرو لیتر از عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۲ مولار داخل کووت مخلوط و کاهش جذب ناشی از مصرف H_2O_2 در اثر فعالیت کاتالاز موجود در عصاره آنزیمی در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت ۶۰ ثانیه خوانده شد. سپس فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$EA = \frac{\frac{\Delta A}{\varepsilon \times v} \times V}{\Delta T \times p}$$

ΔA = تغییر در جذب نور در طول موج مربوطه (اختلاف جذب در ۶۰ ثانیه)

سپس ۵۰ میکرو لیتر از عصاره گیاهی استخراج شده را با ۵۰ میکرو لیتر فنل ۵ درصد وزنی مخلوط کرده و سپس ۲/۵ میلی لیتر اسیدسولفوریک غلیظ به‌صورت عمود بر سطح مایع به آن اضافه شد. این مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شده و پس از آن جذب محلول در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد (۱۴).

استخراج و سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: میزان کلروفیل a و کلروفیل b و کلروفیل کل بر اساس روش Lichtenthaler (1987) اندازه‌گیری شد (۱۵). ۱۰۰ میلی گرم از بافت برگ از هر تیمار وزن شد و سپس با استفاده از ۲ میلی لیتر استون ۸۰ درصد حجمی در محیطی تاریک و در روی یخ درون‌هاون چینی ساییده شد تا در نهایت محلولی همگن به دست آمد. سپس عصاره حاصل در دور rpm ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس حجم محلول روشن‌آور به کمک استون ۸۰ درصد در لوله‌های آزمایش به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس جذب محلول به دست آمده به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Shimadzu UV-160A، ساخت کشور ژاپن، در سه طول موج ۶۶۳ و ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر به ترتیب برای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها خوانده شد و از استون ۸۰ درصد به عنوان محلول شاهد استفاده شد. میزان کلروفیل a و کلروفیل b و کلروفیل کل و کاروتنوئید طبق فرمول بر حسب mg.g-1 FW محاسبه گردید.

$$\text{chl a}(\text{mg/g}) = [12.21(A663) -$$

$$2.81(A646)] \times \frac{V}{1000} \times \frac{1}{W}$$

$$\text{chl b}(\text{mg/g}) = [20.13(A646) -$$

$$5.03(A663)] \times \frac{V}{1000} \times \frac{1}{W}$$

$$\text{Total chl}(\text{mg/g}) = \text{chl a} + \text{chl b}$$

$$\text{Car}(\text{mg/g}) = \frac{1000A_{470} - 3.27\text{chl a} - 104\text{chl b}}{229}$$

A = میزان جذب نوری عصاره

V = حجم نهایی عصاره بر حسب میلی لیتر

W = وزن بافت گیاهی بر حسب گرم

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت: چهار

هفته پس از اعمال تیمار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

$$\Delta T = \text{زمان بر حسب دقیقه}$$

$$V = \text{حجم بافر واکنش (میلی لیتر)}$$

$$p = \text{میلی گرم پروتئین در میلی لیتر}$$

$$\varepsilon = \text{ضریب خاموشی آنزیم } \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 0.36$$

مقدار پروتئین کل هر عصاره آنزیمی نیز بر طبق روش Bradford (1976) (۱۶)، بر حسب میلی گرم پروتئین بافت گیاهی اندازه گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پر اکسیداز:

فعالیت آنزیم APX بر اساس روش Nakano and Asada (۱۸) اندازه‌گیری شد. محلول واکنش آنزیم شامل بافر فسفات سدیم با حجم کلی ۵۰ میلی لیتر و غلظت ۵۰ میلی مولار و $\text{pH} = 7$ که حاوی EDTA ۰/۲ میلی مولار و آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی مولار تهیه شد. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم APX مقدار ۸۵۰ میکرولیتر از بافر واکنش با ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۰/۲ میلی مولار مخلوط گردید و فعالیت آنزیم در طول موج جذبی ۲۹۰ نانومتر و با کووت کوارتز در مدت زمان ۶۰ ثانیه خوانده شد. سپس با استفاده از فرمول مشابه برای کاتالاز با توجه به ضریب خاموشی $\text{APX } \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 2/8$ فعالیت آنزیم گزارش شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز:

فعالیت آنزیم SOD با استفاده از روش Beauchamp and Fridovich (۱۹) توسط مهار احیای نوری NBT صورت گرفت. به منظور سنجش فعالیت آنزیم ابتدا بافر واکنش حاوی فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با $\text{pH} = 7/8$ (بافر شامل Na_2HPO_4 و $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) متیونین ۱۳

$$V = \text{حجم عصاره آنزیمی (میلی لیتر)}$$

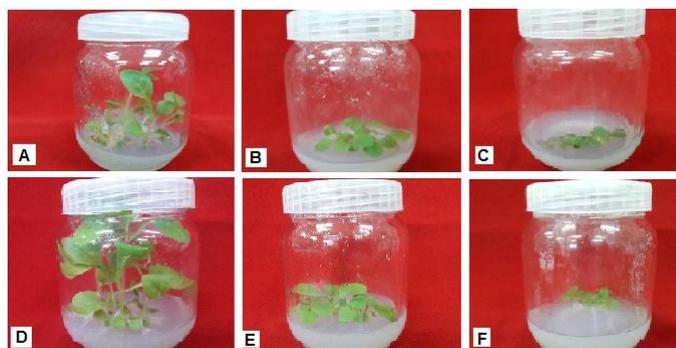
میلی مولار، NBT (نیترو بلو تترا زولیوم) ۷۵ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار، ریبوفلاوین ۲ میکرومولار و دور از نور تهیه گردید. برای انجام آزمایش ۱/۵ میلی لیتر از بافر واکنش با ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی را در تریکی مخلوط نموده سپس در مقابل نور ۵۰۰۰ لوکس به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. سپس از نمونه‌ها به تریکی منتقل گردید و بلافاصله جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان جذب در کنترل در ۵۶۰ نانومتر نشان دهنده ۱۰۰ درصد احیای نوری NBT می‌باشد و نیمی از آن معادل یک واحد آنزیمی است. سپس میزان فعالیت آنزیم SOD در مقایسه با کنترل سنجیده شد. اختلاف جذب نمونه‌ها و کنترل در ۵۶۰ نانومتر بر حسب واحد آنزیمی در میلی گرم پروتئین کل موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی گزارش شد.

نتایج

الگوی رشد گیاه تنباکو و تغییرات وزن و خشک

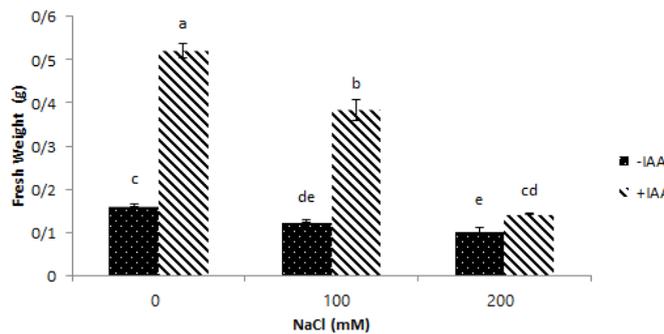
گیاه تنباکو

همانطور که شکل ۱ نشان می دهد الگوی رشد گیاه تنباکو تحت تنش شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک در حضور تیمار اکسین نسبت به عدم اکسین بهتر شد و اکسین توانست اثرات تنش نمک را تا حدودی در الگوی رشد کاهش دهد (شکل ۱).



شکل ۱: اثر IAA بر الگوی رشد گیاهچه‌های تنباکو *Nicotiana plumbaginifolia* پس از چهار هفته. A: محیط MS (شاهد)، B: محیط کشت حاوی نمک ۱۰۰ میلی مولار، C: ۲۰۰ میلی مولار، D: محیط MS حاوی ۱ mg/l IAA، E: محیط MS حاوی ۱۰۰ + ۱ mg/l IAA، F: محیط MS حاوی ۲۰۰ + ۱ mg/l IAA

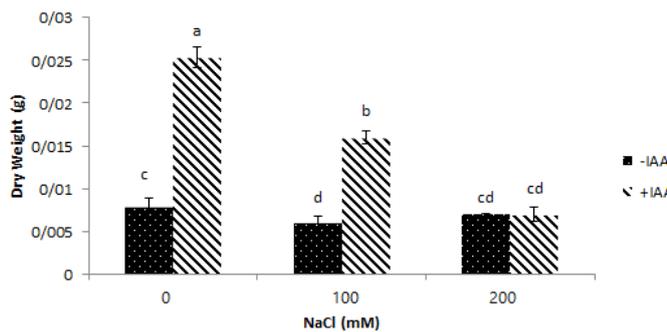
در محیط کشت بدون نمک موجب کاهش وزن تر شد اگر چه تفاوتی بین وزن تر گیاه در تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک در محیط کشت فاقد اکسین مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۲: اثر IAA بر وزن تر گیاهچه‌های تنباکو *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

معنی داری نشان نداد ولی همچنان اکسین توانست وزن خشک گیاه را در تنش نمک حداقل تا ۱۰۰ میلی مولار افزایش دهد (شکل ۳).

تغییرات وزن خشک گیاهان تنباکو تحت تیمار نمک و اکسین کم و بیش از الگوی تغییرات وزن تر تبعیت نمود با این تفاوت که تیمار اکسین در غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک در مقایسه با محیط کشت بدون اکسین تاثیر



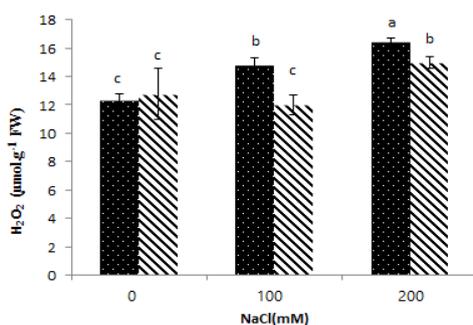
شکل ۳: اثر IAA بر وزن خشک گیاهچه‌های تنباکو *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

کشت فاقد نمک و اکسین (شاهد) بود که اختلاف آن‌ها معنی‌دار نبود به‌هر حال کاهش پراکسید هیدروژن در اثر توسط اکسین در تنش نمک به‌وضوح دیده شد (شکل ۴)

اثر تیمار IAA و تنش شوری بر میزان H_2O_2

میزان H_2O_2 در محیط کشت حاوی نمک ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار و فاقد اکسین در مقایسه با محیط کشت حاوی اکسین افزایش معنی‌دار نشان داد. البته تنها استثنا غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک همراه با اکسین و محیط

H_2O_2 اندام هوایی گیاهچه‌های تنباکو *plumbaginifolia* تحت تنش شوری. std و حروف غیرمشترک بیانگر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

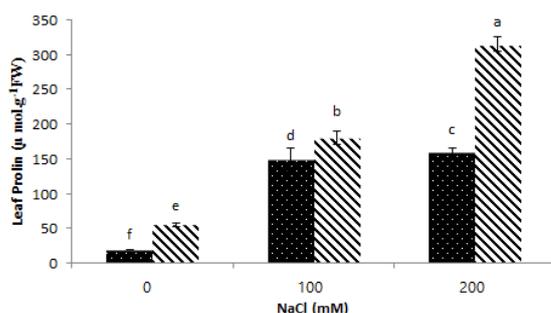


شکل ۴: اثر IAA بر میزان گونه *Nicotiana glauca* داده‌ها میانگین سه تکرار \pm معنی‌دار بودن $p \leq 0.05$ بر

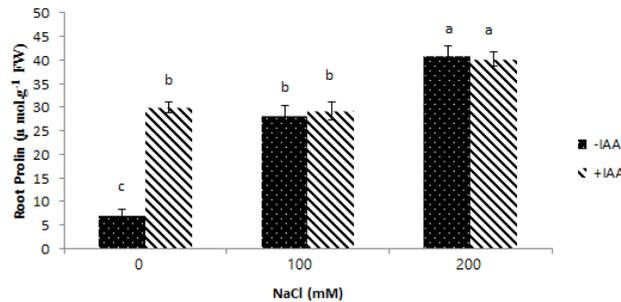
میزان پرولین ریشه در مقایسه با برگ متفاوت بود به‌عنوان مثال دامنه تغییرات پرولین در برگ بین صفر تا ۳۰۰ میکرومول بر گرم بود در حالی‌که این دامنه در ریشه بسیار کمتر و بین صفر تا حداکثر حدود ۴۰ میکرومول بر گرم مشاهده شد. علاوه بر این، افزایش غلظت نمک در محیط کشت میزان پرولین ریشه را بدون اکسین و با حضور اکسین نسبت به شاهد افزایش داد میزان پرولین ریشه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک اختلاف معنی‌دار نشان نداد (شکل ۶).

اثر IAA و تنش شوری بر پرولین

میزان پرولین برگ در حضور و عدم حضور IAA با افزایش نمک به ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. نکته جالب این‌که افزایش پرولین برگ در حضور IAA در مقایسه محیط کشت فاقد اکسین نیز اختلاف معنی‌داری را نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵: اثر IAA بر میزان پرولین برگ گیاهچه‌های تنباکو گونه *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی‌دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

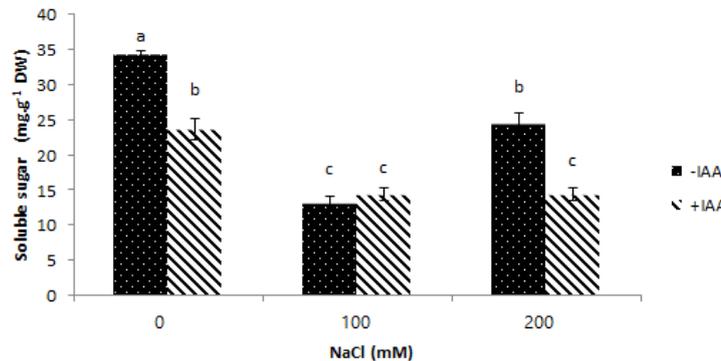


شکل ۶: اثر IAA بر میزان پرولین ریشه‌های گیاهچه‌های تنباکو گونه *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی‌دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

درصد) مقایسه میزان کربو هیدرات محلول در محیط کشت حاوی اکسین و بدون اکسین در تمام غلظت‌ها به استثناء ۱۰۰ میلی‌مولار نکته قابل توجه بود (شکل ۷).

اثر IAA و تنش شوری بر کربوهیدرات‌ها

در حضور و عدم حضور IAA با افزایش میزان نمک در محیط کشت (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) کاهش میزان هیدرات کربن محلول با تغییراتی مشاهده شد (کاهش ۳۹



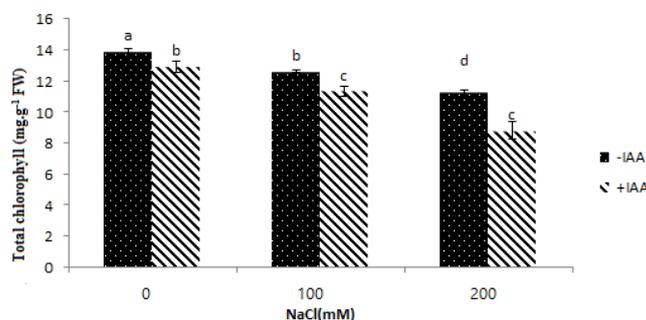
شکل ۷: اثر IAA بر میزان کربن محلول اندام هوایی گیاهچه‌های تنباکو گونه *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی‌دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

میلی‌مولار است که در مقایسه با شاهد به ترتیب ۱۹ و ۳۱ درصد کاهش نشان داد (شکل ۸). بیشترین کاهش کاروتنوئید در عدم حضور تیمار IAA و حضور IAA در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار است که در مقایسه با شاهد به ترتیب ۶۱ و ۵۶ درصد کاهش نشان داد (شکل ۹). تیمار اکسین در محیط کشت اثر منفی

اثر IAA و تنش شوری بر کلروفیل و کاروتنوئید

در حضور و عدم حضور IAA میزان کلروفیل کل و کاروتنوئید در شوری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار در مقایسه با محیط کشت فاقد نمک کاهش معنی‌دار مشاهده شد. بیشترین کاهش کلروفیل در عدم حضور تیمار IAA و حضور IAA در شوری ۲۰۰

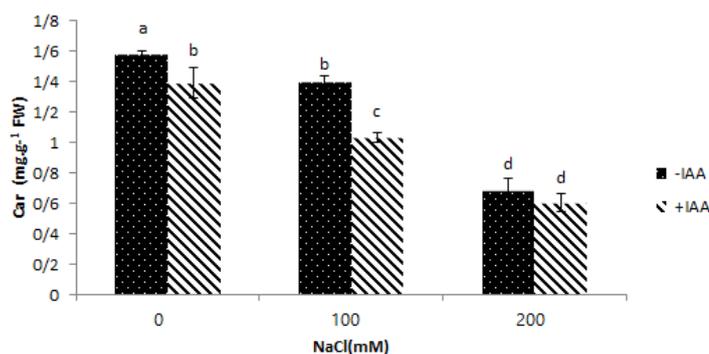
بر میزان کلروفیل و کاروتنوئید در حضور و یا عدم حضور نمک نشان داد.



شکل ۸: اثر IAA بر میزان

کلروفیل کل اندام هوایی

گیاهچه‌های تنباکو گونه *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی‌دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

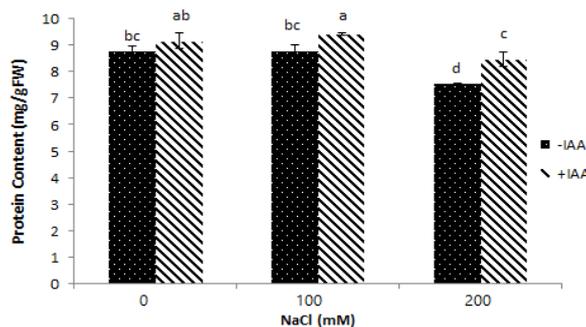


شکل ۹: اثر IAA بر میزان کاروتنوئید اندام هوایی گیاهچه‌های تنباکو گونه *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی‌دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

پروتئین محلول گیاه در ۲۰۰ میلی‌مولار نمک بدون اکسین نسبت به سایر غلظت‌های نمک کاهش معنی‌دار نشان داد. بنابراین اکسین در مجموع توانست پروتئین گیاه را در تنش نمک افزایش دهد (شکل ۱۰).

اثر IAA و تنش شوری بر پروتئین‌های محلول

افزودن تغییرات میزان پروتئین‌های محلول برگ با افزایش نمک نامحسوس بود. در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک حضور اکسین در محیط کشت توانست میزان پروتئین گیاه را افزایش دهد. میزان



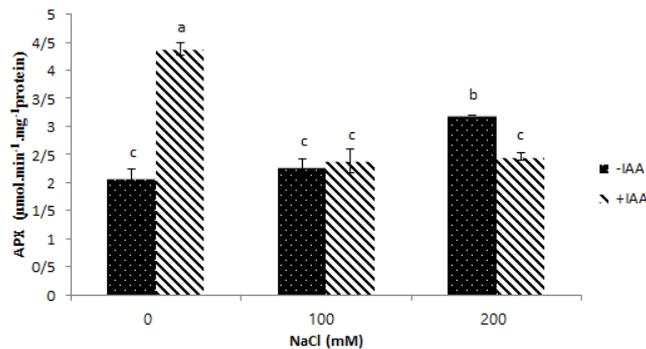
شکل ۱۰: اثر IAA بر میزان پروتئین کل اندام هوایی گیاهچه‌های تنباکو گونه *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

اکسین افزایش معنی‌داری نشان داد با این توضیح که در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار فعالیت آنزیم در شرایط تنش نمک بیشتر از محیط کشت دارای اکسین گزارش شد (شکل ۱۲). وقتی فعالیت آنزیم SOD بررسی شد مشاهده شد که تنها تنش نمک بدون اکسین در محیط کشت فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد ولی اکسین به همراه نمک در هیچ غلظتی از

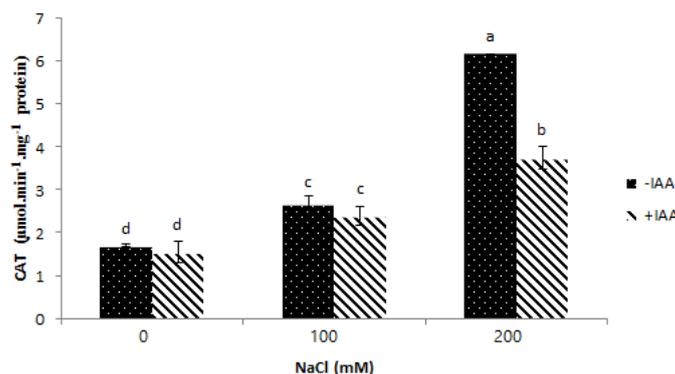
اثر IAA و تنش شوری بر آنزیم های آنتی اکسیدانت

افزودن اکسین به محیط کشت تنها در شرایط غیر تنش نمک توانست میزان فعالیت APX را افزایش دهد در حالیکه در شرایط تنش نمک تاثیر معنی داری بر فعالیت این آنزیم نشان نداد (شکل ۱۱). فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش غلظت نمک در حضور

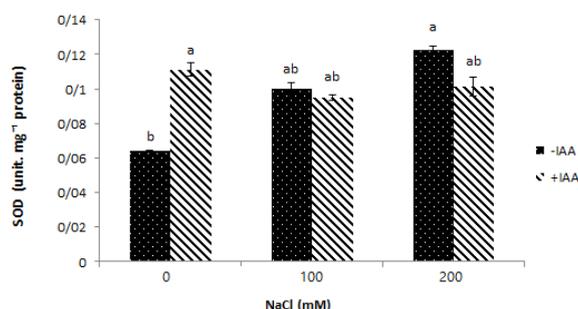
نمک تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم نشان نداد (شکل ۱۳).



شکل ۱۱: اثر IAA بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز اندام هوایی گیاهچه‌های تنباکو گونه *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۱۲: اثر IAA بر فعالیت آنزیم کاتالاز اندام هوایی گیاهچه‌های تنباکو گونه *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۱۳: اثر IAA بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز اندام هوایی گیاهچه‌های تنباکو گونه *Nicotiana plumbaginifolia* تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm std و حروف غیرمشترک بیانگر معنی دار بودن $p \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

کلروفیل، افزایش فلورسانس کلروفیل، اختلال در فرایندهای متابولیکی و بسته شدن دهانه روزنه‌ها می‌باشد (۲۴). به نظر می‌رسد که با افزایش شدت تنش شوری به علت منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی و کاهش فراهمی آب گیاه دچار تنش خشکی فیزیولوژیک شده و در این شرایط یکی از بارزترین واکنش‌هایی که در گیاهچه‌های مشاهده می‌شود کاهش محتوی نسبی آب برگ است. پژوهش‌گران دیگر نیز تایید کرده‌اند که بین تنش شوری و محتوی نسبی آب گیاه یک رابطه منفی برقرار است و با افزایش شدت تنش شوری محتوی نسبی آب گیاه کاهش می‌یابد (۲۵). اکسین رشد طولی ساقه‌ها و کولتوپتیل را تحریک می‌کند و تقسیم سلولی را افزایش می‌دهد. در مطالعه حاضر غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA استفاده شد که غلظت بهینه در فرایند رشد و نمو تحمل به شوری در گیاه تنباکو بود. غلظت بالاتر از حد مطلوب اکسین از رشد ممانعت می‌نماید که علت آن اثر تحریک‌کنندگی اکسین برای تولید هورمون گیاهی اتیلن است که رشد طولی را کاهش می‌دهد. به‌طور کلی گیاهچه‌های حاوی تیمار IAA وزن‌تر و خشک‌تر و بیشتر در مقایسه با گیاهچه‌های فاقد تیمار IAA نشان دادند. که نشان دهنده نقش اکسین به‌عنوان هورمون رشد در افزایش رشد و تقسیم سلولی در گیاه است (۲۶).

گونه‌های فعال اکسیژن یا (ROS)ها اغلب جز فرآورده‌های جانبی متابولیسم طبیعی سلول در جریان مسیر انتقال الکترون در کلروپلاست و میتوکندری می‌باشند که در تمام گیاهان در مقادیر مختلف تولید می‌شوند (۲۷). تنش شوری به‌عنوان یک تنش غیر

بحث

یکی از ویژگی‌های مطلوب جهت ارزیابی تاثیر تنش شوری در گیاهچه‌های گیاهان، تعیین وزن تر و خشک گیاه می‌باشد. روند عمومی که گیاهچه‌های در شرایط تنش با آن روبرو هستند، کاهش تولید، وزن تر و خشک می‌باشد (۲۰). طبق نتایج این پژوهش

وزن تر و خشک گیاهچه‌های تنباکو با افزایش غلظت نمک کاهش معنی‌داری را در مقایسه با نمونه‌های شاهد نشان دادند. نتایج مشابه در آزمایشات سایر پژوهشگران نیز مشاهده شده است. به‌عنوان مثال گزارش منتشر شده توسط Dogan (۲۱) نشان می‌دهد که افزایش شوری باعث کاهش وزن تر و خشک گیاه سویا در مقایسه با گیاه شاهد شد.

یکی از دلایل کاهش وزن تر و خشک در گیاهچه‌های تحت تنش‌های غیرزیستی، تولید ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) می‌باشد که در نهایت باعث غیر فعال شدن آنزیم‌ها و یا تجزیه پروتئین‌های سلولی و کلروپلاستی و کاهش شدید میزان کلروفیل و در نهایت کاهش فتوسنتز و تولید بیوماس می‌شود (۲۲). برگ‌ها به‌عنوان اندام تولیدکننده مواد فتوسنتزی، مواد غذایی لازم را برای گیاه به‌ویژه ریشه تهیه و به آن‌ها منتقل می‌کنند. میزان مواد انتقال یافته به گیاه به سطح فتوسنتز کننده و راندمان فتوسنتز در واحد سطح برگ بستگی دارد (۲۳). فتوسنتز و رشد سلول و به تبع آن رشد برگ از جمله فرایندهایی است که در ابتدا توسط شوری تحت تاثیر قرار می‌گیرد. علت کاهش فتوسنتز، کاهش میزان

مسیره‌های سیگنالینگ در سیتوزول و میتوکندری می‌شود و در نهایت توسط آنزیم گلوتامات دهیدروژناز، گلوتامات پیش ساز سنتز پرولین در میتوکندری تولید می‌شود. بنابراین بیوسنتز پرولین طی تنش شوری و سایر تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد (۳۲) در مطالعه حاضر اکسین موجب افزایش میزان پرولین برگ شد ولی در ریشه تغییرات کمی را نشان داد. مسیر اصلی القا بیوسنتز پرولین توسط اکسین مشخص نشده است ولی به نظر می‌رسد اکسین از طریق تحریک تقسیم سلولی و القای رشد مسیر سنتز پرولین را تحریک نموده باشد. از طرف دیگر میزان پرولین سنتز شده در برگ نسبت به ریشه بسیار بیشتر می‌باشد. این خود می‌تواند دلیلی بر تحریک سنتز پرولین در اندام هوایی در نتیجه اثر اکسین و تنش شوری باشد. البته این‌که آیا افزایش میزان پرولین در برگ نتیجه سنتز آن در برگ بوده و یا انتقال بخشی از پرولین از ریشه به برگ هنوز مشخص نشده است و نیاز به مطالعات دقیق تری در آینده دارد.

به‌منظور فهم این‌که آیا میزان کلروفیل گیاهچه‌های تحت تاثیر تنش شوری آسیب می‌بیند و آیا تیمار اکسین بر میزان کلروفیل اثر دارد، مقدار کلروفیل کل و نیز کاروتنوئید در گیاهچه‌های تنباکو اندازه‌گیری شد. از آنجا که محتوای کلروفیل و فتوسنتز برگ به‌عنوان یکی از شاخص فیزیولوژیک تحمل به نمک در گیاه محسوب می‌شود این سنجش انتخاب شد. خشکی فیزیولوژیکی حاصل از تنش شوری ممکن است موجب محدودیت در جذب آب شود، از سوی دیگر افزایش جذب نمک توسط گیاه، سبب اختلال در کارکرد سلولی و آسیب رساندن به فرآیندهای فیزیولوژیکی از قبیل فتوسنتز و تنفس می‌شود. یکی از دلایل احتمالی کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در تنش شوری رقابت و پیشی گرفتن گلوتامین کیناز (آنزیم کاتالیز کننده پرولین) به هنگام تنش شوری از آنزیم

زنده منجر به افزایش میزان ROS کل و به تبع آن H_2O_2 می‌شود. در مقایسه با دیگر ROSها، H_2O_2 نسبتاً پایدار بوده و می‌تواند آزادانه در میان بخش‌های سلولی و بین سلول‌ها به‌راحتی از طریق کانال‌های غشایی آکواپورین (aquaporin) حرکت کند. در مطالعه حاضر میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در تنش نمک افزایش یافت داده‌های آنزیم SOD نیز تایید کننده این افزایش می‌باشد. ولی تیمار اکسین مقدار آنرا کاهش داد. آنجایی‌که پراکسید هیدروژن اثرات مخربی در رشد و نمو گیاه دارد بنابراین به‌نظر می‌رسد اکسین تا حدود زیادی باعث مهار آن شده است. علاوه بر این، در برخی از گیاهان گزارش شده که H_2O_2 باعث کاهش طول ریشه شده و کاهش انقباض سلولی و رشد ریشه می‌شود و از این فرضیه حمایت می‌کند که H_2O_2 یک جزء پایین دست از اکسین در مهار طول شدن ریشه است (۲۸).

سازوکارهای متعددی برای حفظ تورژسانس در گیاهان تحت تنش شوری وارد عمل می‌شوند. یکی از آن‌ها انباشتگی پرولین است. پرولین انباشته شده در پاسخ به شوری، نقش مهمی در تنظیم اسمزی درون سلولی ایفا می‌کند و آنزیم‌های سلولی و پروتئین‌های غشایی را در برابر واسرشتگی (denaturation) حفظ می‌نماید (۲۹). در پژوهش‌های پیشین اغلب خاصیت اسمولیتی پرولین در گیاهچه‌های تحت تنش جهت حفظ تعادل آب بیان شده است (۳۰). علاوه بر این گزارش شده است که پرولین به‌خوبی می‌تواند به‌عنوان یک انتی‌اکسیدانت رادیکال‌های آزاد اکسیژن را حذف نموده و به این ترتیب ماکرومولکول‌های اساسی مثل پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA را از خطرات رادیکال‌های آزاد حفظ نماید (۳۱) در مطالعه ای بر روی گیاهچه‌های تنباکو تحت تنش شوری Skopelitis و همکاران (۳۲) نشان دادند که ROS تولید شده طی تنش سبب فعال شدن

انرژی در تعدیل اسمزی، ذخیره کربن و تصفیه رادیکال‌های آزاد در تنش‌های محیطی عمل می‌نمایند (۳۷). گزارش شده که در برگ‌های گیاه گوجه محتوای قند محلول تحت تنش شوری افزایش می‌یابد (۳۸). علاوه بر گزارش‌های بسیاری که بیانگر افزایش غلظت قندهای محلول در اثر تنش اسمزی می‌باشد، گزارش‌هایی نیز مبنی بر کاهش غلظت قندهای محلول در اثر تنش شوری در گیاهچه‌های مختلف وجود دارد. در این پژوهش نیز کاهش میزان قند تحت تنش شوری مشاهده شد. کاهش مقدار قند می‌تواند به علت کاهش فتوسنتز باشد، زیرا کاهش آب موجب کاهش آماس شده و از دست دادن فشار آماس به بسته شدن روزنه‌ها در نتیجه کاهش فتوسنتز منجر می‌شود (۳۹). البته در شرایط کشت بافت ممکن است کاهش کربوهیدرات‌های محلول به دلیل عدم سنتز آن باشد زیرا از یک طرف در محیط کشت مقدار مناسبی قند وجود دارد و از طرف دیگر گیاه در شیشه کشت نوعی میکسوتروفیک است. بنابراین نیاز چندانی به افزایش قند در بافت برگ ندارد.

غلظت‌های بالای نمک با اختلال در هومئوستازی یون باعث ایجاد سمیت یونی، تنش اسمزی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (۴۱). گیاهان در برابر آسیب اکسیداتیو مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی و غیر آنزیمی مختلفی را به کار می‌گیرند. از میان ROSها رادیکال‌های سوپر اکسید برای ساختارهای سلولی مخرب‌ترین گونه می‌باشند. سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) یک آنزیم کلیدی در دفاع سلولی، تبدیل رادیکال‌های سوپر اکسید به H_2O_2 و O_2 را به عهده دارد (۴۱). افزایش تولید H_2O_2 متعاقباً توسط فعالیت سمیت‌زدایی پراکسیدازها و یا کاتالاز خنثی می‌شود (۴۲). افزایش فعالیت آنزیم‌های پاکسازی کننده ROSها به میزان زیادی با تحمل گیاه به تنش شوری ارتباط دارد (۴۳). آنزیم CAT نسبت به APX تمایل کمتری به حذف H_2O_2 دارد و در حضور غلظت‌های بالای H_2O_2 فعالیت

گلوتامات لیگاز (اولین آنزیم مسیر بیوسنتز کلروفیل) است که باعث می‌شود تا پیش ساز گلوتامات (پیش ساز مسیر سنتز کلروفیل و پرولین) بیشتر به مصرف پرولین برسد و بنابراین بیوسنتز کلروفیل با محدودیت مواجه می‌شود (۳۳). علت دیگر آن نیز احتمالاً به دلیل سست شدن اتصال کلروفیل با پروتئین‌های کلروپلاستی، با افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز (متلاشی کننده ساختار کلروپلاست) در اثر افزایش غلظت یون‌های سمی سدیم و کلر و تنظیم کننده‌های رشدی مانند اسید آسزیک و اتیلن تحت تنش شوری می‌باشد. محتوای کلروفیل برگ می‌تواند به دلیل کمبود یون‌های منیزیم و پتاسیم به عنوان عناصر اصلی در سنتز کلروفیل و کاهش نسبت پتاسیم به سدیم و همچنین تخریب ساختمان کلروفیل کاهش یابد (۳۴). اکسین سنتز آنزیم ADP گلوکز-فسفریلاز را القا می‌نماید (از طریق تأثیر بر ژن APS) که یک آنزیم کلیدی در سنتز نشاسته است و بازدارنده عمل آنزیم بتا-آمیلاز ($At\beta$ -Amy) می‌باشد. همچنین بازدارنده ساخت زیرواحد کوچک آنزیم روبیسکو است (از طریق تأثیر بر آنزیم RBCS که کد کننده زیر واحد کوچک آنزیم روبیسکو است) و در نتیجه کاهش میزان فتوسنتز اتفاق می‌افتد (۳۵). بنابراین ممکن است به نحوی عدم سنتز یا تخریب کلروفیل دلیل بر کاهش کلروفیل باشد. تفسیر دیگری که می‌توان نمود این است که اکسین محرک تقسیم سلولی است و موجب افزایش رشد برگ می‌شود بنابراین ممکن است میزان کلروفیل در واحد حجم کاهش یافته است و در واقع پدیده رقت اتفاق افتاده است.

تجمع کربوهیدرات‌های محلول در گیاه علی‌رغم کاهش چشمگیر نرخ تثبیت خالص CO_2 به گستردگی به عنوان پاسخی به شوری و خشکی گزارش شده است (۳۶). کربوهیدرات‌ها (گلوکز، فروکتوز، سوکروز و فروکتان) و نشاسته تحت تنش شوری تجمع می‌یابند و به عنوان اسمولیت و منبع

کاهش H_2O_2 ، کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی و کربوهیدرات محلول و افزایش نسبی فعالیت آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز شد.

منابع

1. Pacurar DI, Perrone I, Bellini C. Auxin is a central player in the hormone cross talks that control adventitious rooting. *Physiologia plantarum*. 2014; 151(1):83-96.
2. Le Gall H, Philippe F, Domon JM, Gillet F, et al. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*. 2015; 4(1): 112-66.
3. Munns R, James RA, Läuchli A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of experimental botany*. 2006; 57(5): 1025-43.
4. Pencik A, Simonovik B, Petersson SV, Henykova E, et al. Regulation of auxin homeostasis and gradients in Arabidopsis roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *The Plant Cell*. 2013; 25(10): 3858-3870.
5. Sponchiado BN, White JW, Castillo JA, Jones PG. Root growth of four common bean cultivars in relation to drought tolerance in environments with contrasting soil types. *Experimental Agriculture*. 1989; 25(2): 249-57.
6. Fahad S, Hussain S, Matloob A, Khan FA, et al. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*. 2015; 75(2): 391-404.
7. Pencik A, Simonovik B, Petersson SV, Henykova E, et al. Regulation of auxin homeostasis and gradients in Arabidopsis roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *The Plant Cell*. 2013; 25(10): 3858-70.
8. Pitann B, Schubert S, Mühling KH. Decline in leaf growth under salt stress is due to an inhibition of H^+ -pumping activity and increase in apoplastic pH of maize leaves. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2009; 172(4): 535-43.

می‌کند، اما APX به دلیل تمایل بیشتر در غلظت‌های پایین H_2O_2 عمل می‌نماید. بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت H_2O_2 در تعیین مقدار فعالیت هر یک از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و نوع آنزیم غالب موثر باشد (۴۴). در مطالعه حاضر به طور متوسط در تنش شوری هورمون اکسین موجب افزایش فعالیت بیشتر آنزیم‌های CAT و APX شد. بنابراین بخشی از تحمل به شوری گیاه تنباکو می‌تواند نتیجه عمل این آنزیم‌ها در حضور اکسین باشد. البته راه کاره‌های دیگری نیز در افزایش تحمل به شوری در گیاه وجود دارد از جمله افزایش میزان پرولین و سایر آنتی اکسیدانت‌های غیر آنزیمی را می‌توان نام برد. علاوه بر این از آنجایی که اکسین موجب بیوسنتز اتیلن می‌شود و اتیلن نیز از مسیرهای متنوعی در میزان تحمل گیاه به تنش موثر است (۴۵). بنابراین با توجه به پیچیدگی تنش شوری در گیاه به نظر می‌رسد گیاه تنباکو مجموعه‌ای از مسیر مختلف را برای مقابله با شوری به کار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش به منظور بررسی اثر اکسین بر گیاهچه‌های تنباکو (*Nicotiana glauca*) در تنش شوری، گیاهچه‌ها تحت تنش شوری و تیمار IAA قرار گرفتند و برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی شامل شاخص‌های بیوشیمیایی و رشد و نموی بررسی شدند. تیمار اکسین در گیاهچه‌های تحت تنش شوری اثرات فیزیولوژیکی خود را نشان داد. در تنش شوری افزایش H_2O_2 ، پرولین، آنتی اکسیدانت‌هایی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز مشاهده شد. کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی، کربوهیدرات و پروتئین کل مشاهده شد. اما در گیاهچه‌های تحت تنش شوری و تیمار اکسین، اکسین باعث افزایش میزان پرولین شد. اکسین باعث

- in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant science*. 2000; 151(1): 59-66.
13. Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*. 1973; 39(1): 205-7.
14. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*. 1956; 28(3): 350-6.
15. Lichtenthaler HK. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic Ecotoxicology and environmental safety. 2005; 60(3): 324-49.
16. biomembranes. In *Methods in enzymology*; 1987; (350-382).
17. Aebi H. Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*. 1984 ;105: 121-126.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-54.
19. Nakano Y, Asada K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and cell physiology*. 1987; 28(1): 131-40.
20. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 1971 ; 44(1): 276-87.
21. Jaleel CA, Manivannan PA, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, et al. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 2009; 11(1): 100-5
22. Doğan M. Antioxidative and proline potentials as a protective mechanism in soybean plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10(32): 5972-8.
23. Wang Y, Nii N. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and
9. Zolman BK, Bartel B. An Arabidopsis indole-3-butyric acid-response mutant defective in PEROXIN6, an apparent ATPase implicated in peroxisomal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(6): 1786-91.
10. Guilfoyle T, Hagen G, Ulmasov T, Murfett J. How does auxin turn on genes?. *Plant physiology*. 1998; 118(2): 341-7.
11. Strader LC, Chen GL, Bartel B. Ethylene directs auxin to control root cell expansion. *The Plant Journal*. 2010; 64(5): 874-84.
12. Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2000; 75(6): 623-7.
24. Askari H, Edqvist J, Hajheidari M, Kafi M, Salekdeh GH. Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics*. 2006; 6(8): 2542-54.
25. Ashraf MP, Harris PJ. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*. 2004; 166(1): 3-16.
26. Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Woodward AW, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany*. 2005; 95(5): 707-35.
27. Shao HB, Chu LY, Lu ZH, Kang CM. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*. 2008; 4(1): 8.
28. Ivanchenko MG, den Os D, Monshausen GB, Dubrovsky JG, Bednářová A, Krishnan N. Auxin increases the hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth. *Annals of botany*. 2013; 112(6): 1107-16.
29. Delauney AJ, Hu CA, Kishor PB, Verma DP. Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline

- biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(25): 18673-8.
30. Iqbal N, Umar S, Khan NA, Khan MI. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. *Environmental and Experimental Botany*. 2014; 100: 34-42.
31. Kuznetsov VV, Shevyakova NI. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiologia Plantarum*. 1997; 100(2): 320-6.
32. Skopelitis DS, Paranychianakis NV, Paschalidis KA, Pliakonis ED, et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The Plant Cell*. 2006; 18(10): 2767-81.
33. Dmitriev A, Djatsok J, Grodzinsky D. The role of Ca²⁺ in elicitation of phytoalexin synthesis in cell culture of onion (*Allium cepa* L.). *Plant cell reports*. 1996; 15(12): 945-8.
34. Orabi SA, Salman SR, Shalaby MA. Increasing resistance to oxidative damage in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants by exogenous application of salicylic acid and paclobutrazol. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2010; 6(3): 252-9.
35. Santos CV. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae*. 2004; 103(1): 93-9.
36. Ohto MA, Hayashi S, Sawa S, Hashimoto-Ohta A, Nakamura K. Involvement of HLS1 in sugar and auxin signaling in *Arabidopsis* leaves. *Plant and cell physiology*. 2006; 47(12): 1603-11.
37. Murakeözy ÉP, Nagy Z, Duhazé C, Bouchereau A, Tuba Z. Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. *Journal of Plant Physiology*. 2003; 160(4): 395-401.
38. Parida A, Das AB, Das P. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *Journal of Plant Biology*. 2002; 45(1): 28-36.
39. Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP, Prasad SM. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015; 22(6): 4056-75.
40. Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*. 2005; 45(2): 437-48.
41. Raza SH, Athar HR, Ashraf M, Hameed A. Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 2007; 60(3): 368-76.
42. Foyer CH, Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia plantarum*. 2003; 119(3): 355-64.
43. Gossett DR, Banks SW, Millhollon EP, Lucas MC. Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine, and exogenous glutathione. *Plant Physiology*. 1996; 112(2): 803-9.
44. Mittova V, Guy M, Tal M, Volokita M. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free radical research*. 2002; 36(2): 195-202.
45. Nounjan N, Nghia PT, Theerakulpisut P. Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. *Journal of plant physiology*. 2012; 169(6): 596-604.

The effect of IAA on stress resistance of tobacco seedlings (*Nicotiana plumbaginifolia*) under in vitro culture conditions

Ghasemi S, M.Sc., Ehsanpour AA, Ph.D.*

- Department of Biology, University of Isfahan, Isfahan

* Email corresponding author: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

Received: 28 May. 2018

Accepted: 11 Sep. 2018

Abstract

Aim: In this study, the effect of IAA on salt tolerance of tobacco plants (*Nicotiana plumbaginifolia*) was investigated under in vitro culture conditions.

Material and Methods: Sterile seeds of *N. plumbaginifolia* were cultured in MS medium. In vitro propagated seedlings under tissue culture conditions were treated with IAA (mg / l) and salinity (0, 100 and 200 mM) for 4 weeks. Physiological and biochemical parameters including H₂O₂, chlorophyll, soluble carbohydrate, protein and antioxidant enzyme activity were measured.

Results: Salt stress increased H₂O₂, proline, catalase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase, while reverse patterns were observed for photosynthetic pigments, soluble carbohydrates and also total protein. In salt-treated seedlings, application of auxin increased proline, catalase and H₂O₂, but decreased photosynthetic pigmentation, soluble carbohydrates, total protein and some enzymes such as superoxide dismutase and ascorbate peroxidase.

Conclusion: Auxin treatment in salt-treated tobacco seedlings improved salinity tolerance by changes in some physiological parameters.

Key words: Auxin, Salinity stress, Tobacco