دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شیرین بیان ایران (*glycyrrhiza glabra*) تحت تنش شوری در شرایط مزرعه

مرجان السادات حسینی[۱]، داود صمصام‌پور[۲]، مرتضی ابراهیمی[۳] و مرتضی خان احمدی[۴]

۱ و ۲- دانشجو و استادیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه هرمزگان، بندر عباس، ایران
۳- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی اصفهان، اصفهان، ایران، (نویسنده مسوول: m.ebrahimi@abrii.ac.ir)
۴- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی اصفهان، اصفهان، ایران
تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲
صفحه: ۱۹۳ تا ۲۰۱

چکیده

شیرین بیان گیاهی دارویی و معطر است که به دلیل دارا بودن ترکیبات با ارزشی مانند گلیسیریزین مورد توجه قرار گرفته است. شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که تولید محصولات زراعی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این تحقیق تأثیر تنش شوری (با اعمال تیمار آبیاری با غلظت‌های مختلف نمک صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار) بر روی وزن تر ریشه، کل گیاهچه، غلظت رنگدانه‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، محتوی فنل، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسید و گلیسیریزین مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در شرایط مزرعه در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی اصفهان انجام گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد تیمارهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار سبب افزایش برگ‌های نکروزه، فنل و گلیسیریزین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تحت تنش شد. به نظر می‌رسد که گیاه شیرین بیان به‌عنوان بخشی از مکانیسم مقاومت در برابر تنش، میزان فنل و گلیسیریزین خود را افزایش می‌دهد. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهانی که در معرض تنش شوری بودند، نشان‌دهنده فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیداتیو و حفاظتی گیاه و کاهش خسارت اکسیداتیو در این گیاهان می‌باشد. ژنوتیپ‌های متحمل به شوری مانند ایلام پارامترهای رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و گلیسیریزین بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های حساس (سمنان) دارند. این مطالعه نشان می‌دهد شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری در شرایط مزرعه به‌طور موفقیت آمیزی اثرات نامطلوب تنش شوری را کاهش می‌دهد. بنابراین، به‌منظور توسعه کشت شیرین بیان در مناطق شور و یا اصلاح ارقام متحمل به شوری می‌توان از نتایج این پژوهش بهره‌مند گردید.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، مزرعه، گلیسیریزین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، تنش شوری

مقدمه

شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra*، گیاهی است از تیره پروانه‌آساها، علفی، چند ساله و ایران یکی از کشورهای صادر کننده ریشه آن محسوب می‌شود. ارزش و اهمیت ریشه و ریزوم شیرین بیان به دلیل تنوع مواد شیمیایی موجود در آن است که مهم‌ترین ماده فعال بیولوژیک در ریشه و ریزوم شیرین بیان یک تری‌ترپنوئید به نام اسید گلیسیریزیک است که به‌عنوان ماده موثره آن از اهمیت ویژه ای در صنایع غذایی، داروسازی و دخانیات برخوردار است. با توجه به ویژگی‌های متنوع شیرین بیان، از دیرباز فراورده‌های مختلفی از جمله پودر، عصاره و شیره از شیرین بیان تهیه شده است (۱۲). تنش‌های محیطی بر رشد و نمو گیاه تاثیر منفی داشته و باعث کاهش رشد و عملکرد گیاهان می‌شوند. تنش شوری از جمله تنش‌های غیر زنده است که به‌طور جدی تولید محصولات را در مناطق مختلف به ویژه در نواحی خشک و نیمه خشک محدود می‌کند (۲۸). شوری پتانسیل آب را کاهش می‌دهد و در نتیجه گیاه با کمبود آب روبه‌رو می‌شود (۲۴). همچنین گزارش شده است که با افزایش تنش شوری میزان وزن تر و طول گیاه به دلیل اختلال در تقسیم سلول بزرگ شدن سلول‌ها کاهش می‌یابد و تمام واکنش‌های متابولیکی گیاه از جمله فتوسنتز تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۴). یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش کلروفیل‌ها، تخریب توسط گونه‌های فعال اکسیژن طی تنش اکسیداتیو می‌باشد (۳۷). تنش شوری مانند دیگر تنش‌ها باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول و آسیب‌رسانی به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (۵). گیاهان سازوکارهای مختلفی را برای کاهش اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارند (۲۶). بافت گیاهان دارای آنزیم‌های حذف کننده رادیکال‌های آزاد (کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز و ...) و شبکه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های با وزن مولکولی کم (ترکیبات فنلی، کاروتنوئیدها و ...) هستند که به ترتیب سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی گیاه را تشکیل می‌دهند. در واقع این آنتی‌اکسیدان‌ها با حذف رادیکال آزاد یا ممانعت از تشکیل آن‌ها، ازسلول در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند (۱۷). همچنین گزارش شده است که با افزایش تنش شوری میزان وزن تر و طول گیاه به دلیل اختلال در تقسیم سلول بزرگ شدن سلول‌ها کاهش می‌یابد و تمام واکنش‌های متابولیکی گیاه از جمله فتوسنتز تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۴). یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش کلروفیل‌ها، تخریب توسط گونه‌های فعال اکسیژن طی تنش اکسیداتیو می‌باشد (۲۵). هدف از اجرای این آزمایش بررسی تحمل به تنش شوری سه ژنوتیپ شیرین بیان از لحاظ پارامترهای رشدی، غلظت رنگدانه‌ها، میزان آنتی‌اکسیدان آنزیمی پراکسیداز و غیر آنزیمی، فنل و گلیسیریزین ریشه تحت شرایط مزرعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تنش

ریزوم‌ها و ریشه‌های شیرین بیان در اواخر مهر ماه سال ۹۴ از استان‌های چهار محال بختیال، ایلام و سمنان برداشت

شدند. ریشه‌های مرطوب برداشت شده از هر واحد آزمایشی پس از تمیز شدن و گرفتن گل ولای آن به قطعات کوچک‌تری تقسیم شدند و در گلدان‌ها در گلخانه‌های پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی اصفهان کشت گردید و پس از ۶ ماه به زمین منتقل شدند و بعد از سه ماه از انتقال و استقرار مناسب، تیمار شوری آب آبیاری در سه سطح، بدون تنش (شاهد)، تنش متوسط (۱۵۰میلی‌مولار) و تنش شدید (۳۰۰ میلی‌مولار) اعمال شد. تنش شوری شامل ترکیبی از نمک‌های کلرید سدیم، کلرید کلسیم و سولفات منیزیم به ترتیب با نسبت ۲:۱:۱ بود. دور آبیاری همه گیاهان هفت روز یک بار بود. این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار و سه گیاه در هر واحد آزمایشی اجرا شد و در اواخر تابستان و گذر سه ماه از تنش، ریشه‌ها و برگ‌های گیاهان برداشت شدند. وزن تر ریشه و کل گیاهچه بلافاصله بعد از برداشت و تمیز کردن سطح آن‌ها توسط ترازو دیجیتال با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری شد.

غلظت رنگدانه‌ها

نیم گرم از برگ تازه در یک هاون چینی با پنج میلی لیتر استون ۸۰٪ ساییده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب عصاره در طول موج‌های ۶۴۷، ۶۶۳ و۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (مدل کری ۱۰۰، واریان آمریکا)، قرائت گردید (۱۸). نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب میلی‌گرم کلرفیل بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

تهیه عصاره آنتی‌اکسیدانی و فنل

سه میلی‌لیتر متانول ۸۵٪ به نیم گرم بافت تازه ریشه کوبیده در ازت مایع اضافه کرده، سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ده هزار دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند (۸، ۳۳).

اندازه‌گیری میزان فنل کل

۳۰۰ میکرولیتر از عصاره ریشه تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین۱۰٪ (سیگما- آلدریچ) مخلوط نموده و بعد از ۵ دقیقه با ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۷/۵٪) به آن اضافه گردید. نمونه‌ها در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه نگهداری شدند و جذب عصاره در طول موج ۷۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت گردید. نتایج حاصل از اندازه گیری بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم وزن تر محاسبه گردید (۳۳).

اندازه‌گیری میزان آنتی‌اکسیدان کل

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده را با ۵۰۰ میکرولیتر آب مخلوط شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ده هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۷۵ میکرولیتر از عصاره رویی سانتریفیوژ شده به ۰/۱ میلی‌مولار DPPH (سیگما – آلدریچ) اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار گرفت و جذب عصاره در طول موج ۵۱۷ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت گردید (۸).

تهیه عصاره آنزیمی

۵ میلی‌لیتر بافر فسفات pH ۷/۸ (۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۳.۰٪ تریتون ایکس و پلی وینیل پیرولیدین ۴٪) به نیم گرم برگ کوبیده شده در ازت مایع اضافه گردید (۲۷). غلظت پروتئین بر اساس روش برادفورد با سرم آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه گیری شد (۷).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

۶۵ میلی‌لیتر از عصاره برگی به ۱/۹۵ میلی‌لیتر مخلوط واکنش (۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات pH ۶؛ ۰/۱ میلی مولار EDTA، ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات و ۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن)، اضافه گردید. کاهش جذب آسکوربات پراکسیداز در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۴ دقیقه تعیین و به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در عصاره انزیمی بیان شد (۲۲).

تهیه عصاره و اندازه‌گیری غلظت گلیسیریزین

یک گرم از پودر خشک ریشه در ۸ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد حل شد و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه، قرار گرفت. این عمل ۵ بار تکرار شد و تغلیظ نمونه‌ها در آون تهویه‌دار با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید (۲). دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با ستون نوع C_{18} فاز معکوس، سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و طول موج آشکارساز ۲۵۴ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت. فاز متحرک شامل استونیتریل-آب-اسید استیک (۰/۵: ۶۲: ۳۸ حجمی.حجمی) می‌باشد (۳۶).

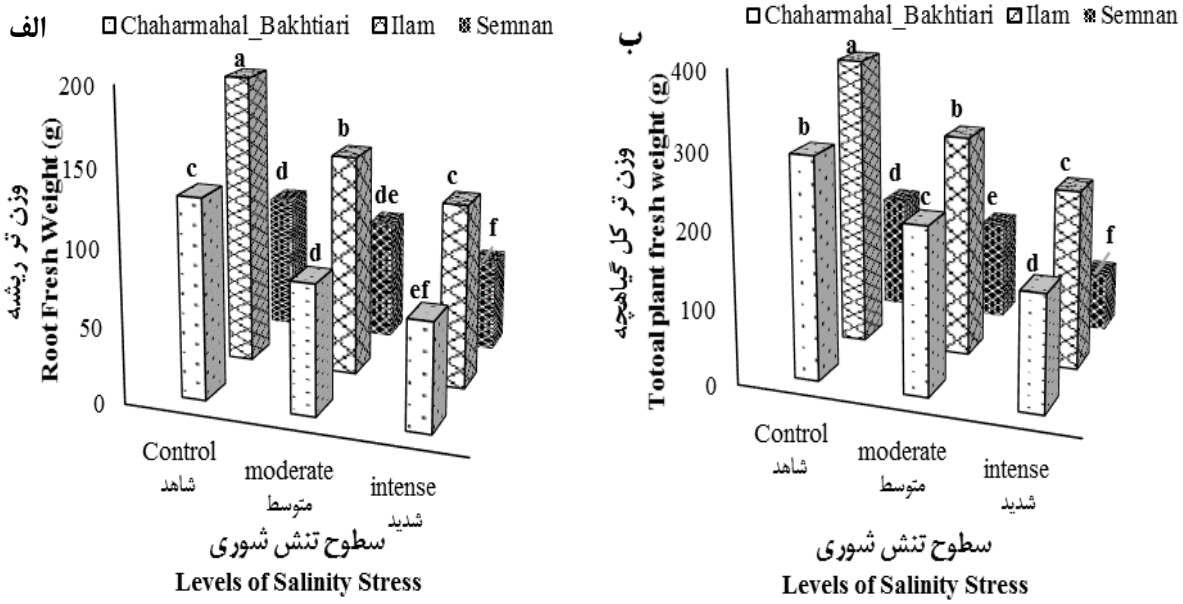
آنالیز آماری

در این تحقیق، آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

وزن تر ریشه و گیاهچه

همان‌طور که در شکل ۱ (الف و ب) مشاهده می‌شود بر همکنش شوری و ژنوتیپ بر وزن تر ریشه و کل گیاهچه اثر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد داشت. با افزایش شدت تنش وزن تر ریشه و گیاهچه در هر سه ژنوتیپ کاهش پیدا کرد و کمترین وزن تر ریشه و گیاهچه در تیمار تنش شدید مشاهده گردید. به‌طوری‌که بیشترین میزان وزن تر ریشه و گیاهچه هم در گیاهان بدون تنش و هم در طی تنش در ژنوتیپ ایلام نسبت به ژنوتیپ‌های چهار محال و بختیاری و سمنان دیده شد. به نظر می‌رسد اثر تنش اسمزی شوری ممکن است موجب بهم زدن تعادل آب گیاه، کاهش تورژسانس سلول و جلوگیری از رشد کلی گیاه شود. پژوهش‌های مختلف نشان داده است که تنش شوری باعث کاهش وزن گیاهچه می‌شود که با نتایج حاضر تطابق دارد (۱۱). همچنین سلامی و همکاران (۲۹) گزارش کرده‌اند که در دو گیاه دارویی سنبل الطیب و زیره سبز با افزایش سطح شوری، وزن تر ریشه و گیاهچه کاهش پیدا کرده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.



شکل ۱- میانگین الف) وزن تر ریشه و ب) گیاهچه در سه ژنوتیپ شیرین بیان در سطوح مختلف تنش شوری در شرایط مزرعه
(میانگین‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند)

Figure 1. Means of root and plant fresh weight in three genotypes of licorice under different levels of salinity stress in filed Condition (Means with the same letters in each figure have not significant difference at 5% probability level).

غلظت رنگدانه‌ها

مقدار کلروفیل و رنگدانه‌های فتوسنتزی از مهم‌ترین عوامل موثر در ظرفیت فتوسنتزی گیاهان هستند چرا که به طور مستقیم بر سرعت و میزان فتوسنتز و تولید زیست توده موثر هستند (۱۴). نتایج نشان داد که سطوح مختلف تنش شوری تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بر میزان کلروفیل a، b، کل و کارتنوئیدها بر روی ژنوتیپ‌های مختلف نشان دادند (جدول ۱). با افزایش تنش شوری در هر سه ژنوتیپ میزان کلروفیل a، b و کارتنوئیدها کاهش یافت، به طوری‌که بیشترین میزان این رنگیزه‌ها در تیمارهای شاهد و کمترین مقدار در تنش شدید مشاهده شد. ژنوتیپ ایلام بیشترین مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی هم در شرایط شاهد و هم در شرایط تنش نسبت به ژنوتیپ چهار محال و بختیاری و ایلام دارد و کمترین مقدار در ژنوتیپ سمنان به خصوص در شرایط تنش شدید مشاهده شد. تنش شوری سبب افزایش رادیکال‌های اکسیژن در کلروپلاست شده و تخریب مولکول کلروفیل و غشای کلروپلاست را در پی دارد که خود منجر به کاهش فتوسنتز و رشد می‌گردد (۳۷). همچنین السید (۹) و محرم نژاد و همکاران (۲۰) نشان دادند که با افزایش شوری و تنش اسمزی در گیاه ذرت کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید کاهش می‌یابد که با یافته‌های این ازمایش مطابقت دارد. تغییرات میزان کلروفیل تحت شرایط تنش شوری از نشانه‌های وجود تنش اکسیداتیو است که ممکن است باعث اکسیداسیون نوری رنگدانه و تخریب کلروفیل شود (۲۱،۱۲). کاهش و یا عدم تغییر در سطح کلروفیل در طی تنش اکسیداتیو وابسته به مدت و شدت تنش است (۱۰،۳). کاروتنوئیدها یکی از رنگیزه‌های کلیدی و مهم سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان بوده که گروه بزرگی از مولکول‌های ایزوپرنوئید را تشکیل می‌دهند و به تخریب اکسیداتیو نیز حساس می‌باشند و در خاموش کردن اکسیژن منفرد دخالت دارند (۳۳،۱۳). این قابلیت خاموش نمودن کاروتنوئیدها ناشی از بازوی زنجیره‌های ایزوپرونیک با تعداد زیادی پیوند دوگانه با دی‌الکترون‌های تغییر یافته، امکان دریافت آسان انرژی از مولکول‌های تهییج شده و اتلاف انرژی مازاد به شکل گرما را فراهم می‌آورد (۲۵).

جدول ۱- مقایسه میانگین میزان رنگدانه‌ها سه ژنوتیپ شیرین بیان تحت تنش شوری در شرایط مزرعه
Table 1.Mean comparison of pigments content in three genotypes of licorice under salt stress in filed condition

ژنوتیپ	تیمار	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید
		میلی گرم در گرم وزن تازه (mg g^{-1} F/W)			
چهار محال و بختیاری	کنترل	8/11±0/054b	3/42±0/057b	11/44±0/071b	3/047±0/062a
	استرس متوسط	7/79±0/38bc	3/15±0/021c	11/03±0/21b	2/31±0/050b
	استرس شدید	5/88±0/024d	2/16±0/053e	7/50±0/19d	1/61±0/087c
ایلام	کنترل	8/90±0/264a	4/64±0/050a	13/35±0/045a	2/95±0/058a
	استرس متوسط	7/09±0/068c	3/08±0/070c	9/99±0/25c	1/73±0/062c
	استرس شدید	4/18±0/068e	2/40±0/104d	6/89±0/38e	1/39±0/062d
سمنان	کنترل	8/34±0/085b	3/69±0/072b	13/29±0/23a	2/85±0/044ab
	استرس متوسط	7/22±0/053c	3/20±0/098c	10/33±0/16bc	2/33±0/050b
	استرس شدید	4/09±0/047e	2/82±0/084d	5/89±0/29f	1/35±0/047d

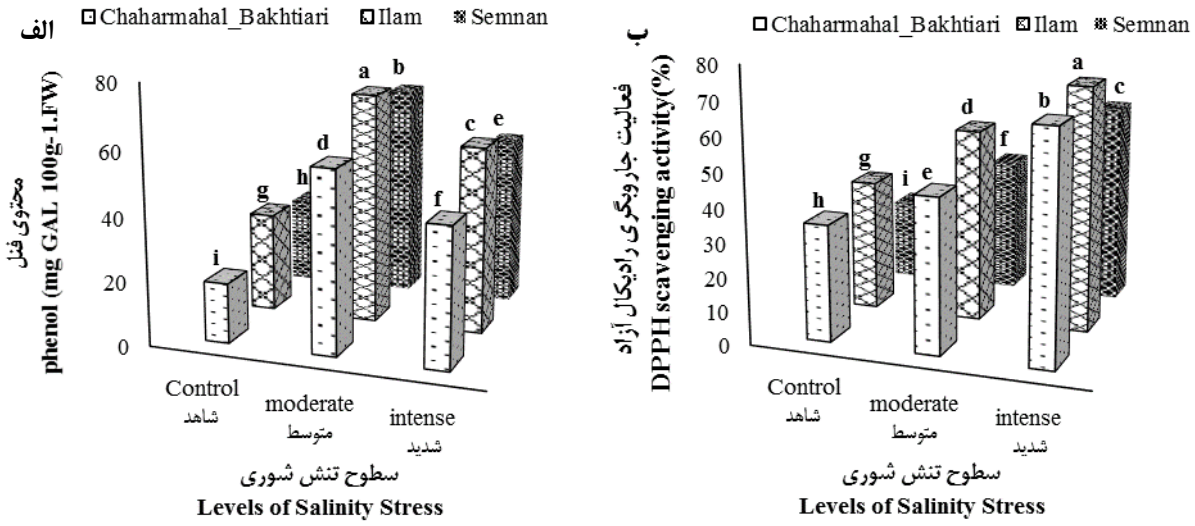
میانگین‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند

محتوای فنل کل

محتوای فنل کل در هر سه ژنوتیپ تا تنش متوسط افزایش و در تنش شدید از مقدار آن کاسته شد و مقدار فنل کل در تمام سطوح تنش در ژنوتیپ ایلام و پس از آن در ژنوتیپ سمنان بیشتر می‌باشد (شکل ۲-االف). کانول و همکاران (۱۵) بیان کردند که تیمار شوری بر روی گیاه ماش از تیره فاباسه در ابتدا افزایش و سپس کاهش یافته است که با نتایج حاضر مطابقت دارد. در گیاهان دارویی و از جمله شیرین بیان در اثر تنش، به دلیل کاهش رشد، تثبیت کربن در طی فتوسنتز صرف تولید ترکیبات احیا شده مانند فنل‌ها شده و تولید این مواد به دلیل جلوگیری از اکسیداسیون درون سلولی افزایش می‌یابد (۳۴) که این ترکیبات با مصرف $NADPH+H^+$ که در شرایط تنش تجمع یافته از تشکیل ROS اضافی جلوگیری (۳۲) و در نتیجه مقاومت گیاه به شوری را افزایش می‌دهند (۳۰). مشخص شده که بسیاری از ترکیبات فنلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند و می‌توانند به طور موثری رادیکال‌های گروه هیدروکسیل و پروکسیل را حذف کنند و از اکسید شدن چربی‌ها ممانعت به عمل آورند (۶). همچنین کاهش در میزان ترکیبات فنلی در تنش شدید ناشی از تخریب این ترکیبات در اثر واکنش با ترکیبات اکسیداتیو در شرایط تنش شوری می‌باشد و با وجود القای سنتز ترکیبات فنلی در تیمار شوری، احتمالا تنش شدیدتر می‌تواند اثر منفی روی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه داشته و باعث کاهش ترکیبات فنلی شود (۳۱).

میزان فعالیت DPPH

همان‌طور که در شکل ۲-ب مشاهده می‌شود برهمکنش اثر سطوح تنش و ژنوتیپ بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. با افزایش تنش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش و این افزایش در ژنوتیپ ایلام بیشتر از چهار محال و بختیاری و سمنان می‌باشد. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۷۵ درصد) در تنش شدید و در ژنوتیپ ایلام و کمترین مقدار (۳۵ درصد) در تیمار شاهد و در ژنوتیپ سمنان مشاهده شد. همچنین تیمار شوری در بادام زمینی و پرتقال نشان داد که تیمار شوری باعث تجمع ترکیبات فنلی و در نتیجه افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۱۶) که در تحقیق حاضر نیز صدق می‌کند، به‌طوری‌که، تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دیده شده در این تحقیق مشابه با تغییرات فنل کل بود و در هر دو مورد تا تنش متوسط (۱۵۰ میلی‌مولار) افزایش و در تنش شدید (۳۰۰ میلی‌مولار)، کاهش میزان این دو پارامتر دیده شد. تنش اکسیداتیو به عنوان یک تنش ثانویه به دنبال تنش شوری رخ می‌دهد و گیاهان برای محافظت از سامانه فتوسنتزی و ساختار سلولی خود اقدام به تولید و تجمع ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌کنند (۱). در این مطالعه، تنش شوری باعث افزایش ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد شده است که آنتی‌اکسیدان‌ها باعث مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند. با این وجود به دلیل تفاوت در ساختار شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی، ممکن است با وجود بالا بودن میزان فنل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کم باشد. یا بر عکس، میزان فنل کم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (به علت وجود سایر آنتی اکسیدان‌هایی به غیر از فنل) بالا باشد که می‌تواند توجیهی برای تفاوت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان و فنل کل در شرایط تنش شدید باشد (۹).



شکل ۲- میانگین میزان الف) فنل کل و ب) DPPH در سه ژنوتیپ شیرین بیان در سطوح مختلف تنش شوری در شرایط مزرعه
(میانگین‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند)

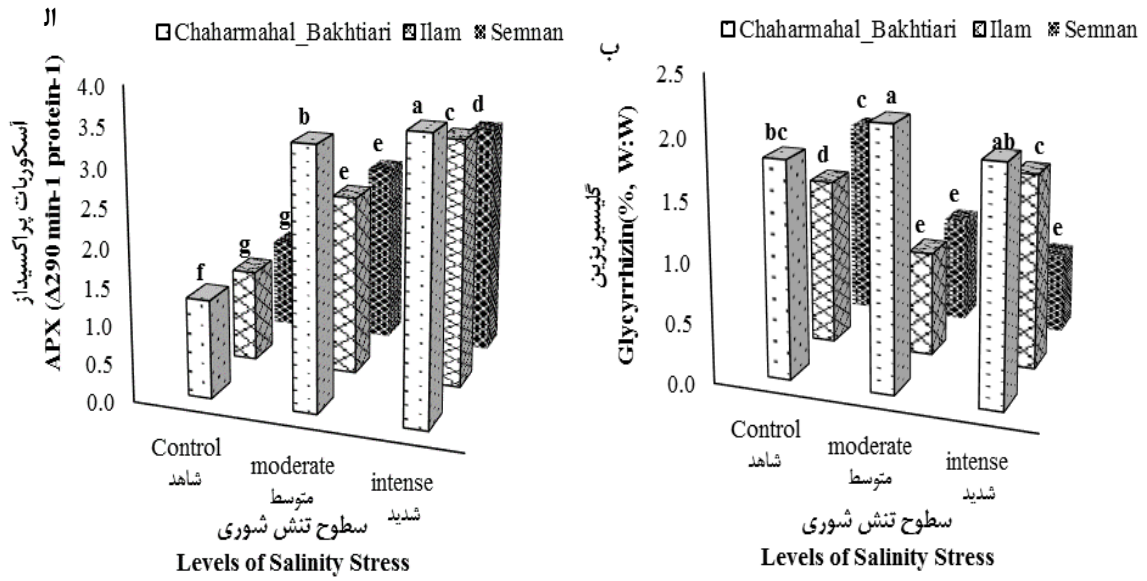
Figure 2. Means of phenol content and total antioxidant in three genotypes of licorice under different levels of salinity stress in filed Condition (Means with the same letters in each figure have not significant difference at 5% probability level).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج نشان داد که تنش شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شد (شکل ۳- الف). به طوری‌که سطح فعالیت آنزیم در نمونه‌های تحت تنش بیشتر از نمونه های شاهد می‌باشد و با افزایش سطوح تنش شوری میزان فعالیت این آنزیم بیشتر شده است و این افزایش در ژنوتیپ ایلام چشمگیرتر می‌باشد. تنش شوری منجر به القای تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. سطح بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جاروب کننده رادیکال‌های آزاد موجود در گیاهان، مبین افزایش تحمل آن‌ها به تنش‌های محیطی است که در گیاه گلرنگ و شیرین بیان نیز تحت تنش این نتایج مشاهده شد که با نتایج حاضر مطابقت دارد (۲۷،۱۳). آسکوربات پراکسیداز در سم‌زدایی هیدروژن پراکسید تولید شده در اثر فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز نقش دارد. با توجه به افزایش آنزیم آسکوربات پراکسیداز به نظر می‌رسد که تولید پراکسید هیدروژن که محصول فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز است، افزایش یافته است، بنابراین نیاز به حذف هیدروژن پراکسید به کمک آسکوربات پراکسیداز افزایش پیدا کرده است. در پژوهشی بر روی گیاه کلزا که با غلظت‌های مختلف PEG انجام گرفت، افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به صورت معنی‌داری مشاهده شد که با نتایج این آزمایش تطابق دارد (۱۹).

میزان گلیسیریزین

تنش شوری درصد تولیدات ثانویه را در گیاهان دارویی و آروماتیک افزایش می‌دهد. نتایج در شکل ۳- ب نشان می‌دهد که برهمکنش اثر سطوح تنش خشکی و ژنوتیپ بر میزان گلیسیریزین در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. میزان گلیسیریزین با افزایش تنش در ژنوتیپ چهار محال و بختیاری ابتدا افزایش و سپس در تنش شدید بدون معنی می‌باشد اما در ایلام ابتدا کاهش و سپس در تنش شدید افزایش داشته است. در ژنوتیپ سمنان با افزایش شوری ابتدا کم و سپس بدون معنی بوده است. بیشترین میزان گلیسیریزین به ترتیب در تیمار تنش خفیف در ژنوتیپ چهار محال و بختیاری (۲/۵ درصد) و کمترین میزان گلیسیریزین در تیمار شدید در ژنوتیپ سمنان (۱ درصد) مشاهده گردید. با افزایش شوری کاهش در ژنوتیپ سمنان چشمگیرتر بود و افزایش در میزان گلیسیریزین در ژنوتیپ چهار محال و بختیاری در سطوح مختلف بالاتر از ژنوتیپ دو ژنوتیپ دیگر می‌باشد. همچنین نصرالهی و همکاران (۲۳) که طی تنش خشکی مقدار گلیسیریزین افزایش می‌یابد که تا حدودی بسته به ژنوتیپ با نتایج حاضر مطابقت دارد. بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان بیان کرد احتمالا در شرایطی که میزان تولید متابولیت‌های ثانویه به سمت تولید ترکیبات فنلی هدایت شود، میزان گلیسیریزین به عنوان ماده موثره مهم گیاه کاهش شیرین بیان کاهش می‌یابد. بنابراین محتوای ترکیبات فنلی ارتباط عکس با محتوای گلیسیریزین دارد و الگوی تولید این متابولیت‌ها در شرایط متفاوت محیطی در گیاه شیرین بیان تفاوت دارد (۳۵).



شکل ۳- میانگین میزان الف) فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و ب) مقدار گلیسیریزین شیرین بیان در سه ژنوتیپ سطوح مختلف تنش شوری در شرایط مزرعه (میانگین‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ندارند)

Figure 3. Means of ascorbate peroxidase and glycyrrhizin in in three genotypes of licorice under different levels of salinity stress in filed Condition (Means with the same letters in each figure have not significant difference at 5% probability level).

نتایج این تحقیق نشان داد که تنش شوری موجب کاهش وزن تر ریشه، گیاهچه و غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی شده ولی محتوی فنل، آنتی‌اکسیدان کل، فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش می‌یابد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان‌دهنده تحمل این گیاه در سطوح بالای تنش شوری است. بر اساس نتایج حاصله از این آزمایش می‌توان در شناسایی ژنوتیپ متحمل به شوری بهره‌مند شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ ایلام در شرایط تنش شوری از پتانسیل کشت بهتری برای حفظ آب برگ خود و باز نگهداشتن روزنه‌ها برخوردار بوده است و همچنین ظرفیت حذف رادیکال‌های فعال بالاتری داشتند و از فتوسنتز بیشتری در شرایط تنش برخوردار بوده و همچنین تحمل به شوری بالاتری را در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه داشتند. همچنین ژنوتیپ‌هایی که توانایی بیشتری برای حفظ رنگدانه‌های فتوسنتزی را دارا هستند، احتمالا سرعت باززایی بهتری نیز پس از برطرف شدن شرایط تنش شوری را دارند.

تشکر و قدردانی

از مدیریت محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور-اصفهان که هزینه‌های انجام این تحقیق را تامین نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Abedi, T. and H. Pakniyat. 2010. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.), Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 46: 27-34.
2. Ahmadi-Hosseini, S.M., M.H. Souri, N. Farhadi, M. Moghadam and R. Omidbahgi. 2014. Changes in glycyrrhizin content of Iranian licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) affected by different root diameter and ecological conditions. Agriculture Community, 2: 27-33.
3. Aliu, S., I. Rusinovci, S. Fetahu, B. Gashi, E. Simeonovska and L. Rozman. 2015. The effect of salt stress on the germination of maize (*Zea mays* L.) seeds and photosynthetic pigments. Acta agriculturae Slovenica, 105: 85-94.
4. Ashraf, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnology Advance, 27: 84-93.
5. Becana, M., J. Moran and I. Iturbe-Ormaetxe. 1998. Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. Plant and Soil, 201: 137-147.
6. Boscaiu, M., M. Sanchez, I. Bautista, P. Donat, A. Lidon, J. Llinares, C. Llul, O. Mayoral and O. Vicente. 2010. Phenolic compounds as stress markers in plants from gypsum habitats. Bulletin UASVM Horticulture, 67: 44-49.
7. Bradford, M.N. 1976. A rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
8. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie, 28: 25-30.
9. El Sayed, H.E.S.A. 2011. Influence of salinity stress on growth parameters, photosynthetic activity and cytological studies of *Zea mays*, L. plant using hydrogel polymer. Agriculture Biological Journal, 2: 907-920.
10. Gaber, M.A. 2010. Antioxidative defense under salt stress. Plant Signaling & Behavior, 5: 369-374.
11. Grieve, C.M. and S.R. Grattan. 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant and Soil, 70: 303-307.
12. Harold, A. 1979. Glycyrrhizin-free fractions licorice root and process for obtaining such fraction. U.S.A, 4163067.
13. Hojati, M., S.A.M. Modarres-Sanavy, M. Karimi and F. Ghanati. 2011. Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. Acta Physiologiae Plantarum, 33: 105-112.
14. Kafi, M., A. Bagheri, J. Nabati, M. Zare Mehrjerdi and A. Masoumi. 2010. Effect of salinity stress on some physiological variables of eleven chickpea genotypes in hydroponics. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture, 4: 55-69 (In Persian).
15. Kanwel, S., M. Ashraf, M. Shahbaz and M. Yasir. 2013. Influence of saline stress on growth, gas exchange nutrients and non-enzymatic antioxidants munbean. Pakistan Journal of Botany, 45: 763-771.
16. Klimczak, I., M. Maecka, M. Szlachta and A. Gliszcyn. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. Journal of Food Composition and Analysis, 20: 313-322.
17. Kuk, Y., J. Shin, S. Burgo, R. Hwang, O. Jung and J.O. Guh. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage plants. Crop Science, 43: 2109-2117.
18. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382.
19. Mirzaei, M. 2000. The study of drought stress on germination and seedling growth in some of canola cultivars. Master's thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University,
20. Moharramnejad, S., O. Sofalian, M. Valizadeh, A. Asgari and M.R. Shiri. 2015. Proline, glycine betaine, total phenolics and pigment contents in response to osmotic stress in maize seedlings. Journal of Bioscience and Biotechnology, 4: 313-319.
21. Mozafar, A. and J.R. Goodin. 1986. Salt tolerance of two different drought-tolerant wheat genotypes during germination and early seedling growth. Plant and Soil, 96: 303-316.
22. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen Peroxide Is Scavenged by Ascorbate Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22: 867-880.
23. Nasrollahi, V., A. Mirzaie-asl, K. Piri, S. Nazeri and R. Mehrabi. 2014. The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in licorice (*Glycyrrhiza glabra*). Phytochemistry, 103: 32-37.
24. Netondo, G.W., J.C. Onyango and E. Beck. 2004. Sorghum and salinity. I: Response of growth, water relations, and ion accumulation to NaCl salinity. Crop Science, 44: 797-805.
25. Noreen, Z. and M. Ashraf. 2009. Assessment of variation in antioxidative defense system in salttreated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. Journal of Plant Physiology, 166: 1764-1774.
26. Ozgur, R., I. Turkan, B. Uzilday and A.H. Sekmen. 2014. Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, 65: 1377-1390.
27. Pan, Y., L.J. Wu and Z.L. Yu. 2006. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). Plant Growth Regulation, 49: 157-165.
28. Parida, A.K., A.B. Das, Y. Sanada and P. Mohanty. 2004. Effects of salinity on biochemical components of the mangrove, (*Aegiceras corniculatum*). Aquatic Botany, 80: 77-87.

29. Salami, M., A. Safarnejad and H. Hamidi. 1385. Effect of salinity stress on morphological characteristics of *Valeriana officinalis* and *Cuminum cyminum*. Research and Construction in Natural Resources, 19: 77-83 (In persian).
30. Selmar, D. and M. Kleinwächter. 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. Industrial Crops and Products, 42: 558-566.
31. Sidsel Fiskaa, H., I. Grethe, A. Borge, A. Knut and B. Gunnar. 2009. Effect of cold storage and harvest data on bioactive compound in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala). Postharvest Biology and Technology, 51: 36-42
32. Simkin, A.J., H. Moreau, M. Kuntz, G. Pagny, C. Lin, S. Tanksley and J. McCarthy. 2008. An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. Journal of Plant Physiology, 165: 1087-1106.
33. Singleton, V.L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.
34. Turtola, S., A. Manninen, R. Rikala and P. Kainulainen. 2003. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in scots pine and Norway spruce seedling. Journal of Chemical Ecology, 29: 1981-1995.
35. Ulumi, H. and N. Hasibi. 1391. Study of secondary metabolites of licorice root in some natural habitats of Kerman province. Journal of Medicinal Plants, 11: 137-144 (In persian).
36. Zhang, X.Y., R.J. Wu, J. Chen and D.K. An. 1989. Determination of glycyrrhizin and its metabolite glycyrrhetinic acid in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography after oral administration of licorzin. Journal of Chromatography A, 495: 343-348.
37. Zlatev, Z. and F.C. Lidon. 2012. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. Emirates Journal of Food and Agriculture, 24: 57-72.

Study of Physiological and Biochemical Changes of Iraninan Licorice (*Glycyrrhiza Glabra*) under Salinity Stress in Filed Condition

Marjan Sadat Hosseini[1], Davood Samsampour[2], Morteza Ebrahimi[3] and Morteza Khanahmadi[4]

1 and 2- PhD Student and Assistant Professor of Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
3- Assistant Professor of Institute for Agriculture Biotechnology Research - Isfahan Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, Iran,
(Corresponding Author: m.ebrahimi@abrii.ac.ir)
4- Associate Professor of Institute for Agriculture Biotechnology Research - Isfahan Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Isfahan, Iran
Received: June 3, 2018 Accepted: September 24, 2018

Abstract

Licorice is a medicinal and aromatic plant that is taken into consideration for its valuable compounds such as glycyrrhizin. Salinity is a major environmental stress that affects the crops productivity. In the present study, the effect of salinity stress (using irrigation treatment with different salt concentrations; 0, 150 and 300 mM) on fresh weight of root and total plant, concentration of pigments, total antioxidant, phenol content, ascorbate peroxide enzyme activity and glycyrrhizin content was investigated. The experiment was performed as a factorial under complete randomized block design with three replications in field assay in Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Isfahan. This experiments showed that, the irrigation treatmentswith150 and 300 mM resulted in increased necrotic leaves, phenol and glycyrrhizin in licorice, i.e. the plants increased their phenolics and glycyrrhizin content, as a part of the mechanism to resist under stress. Increasing the activity of ascorbate peroxide enzyme in plants exposed to salinity stress, indicating the activation of antioxidative and protective systems, and reduction of oxidative damage in these plants. In salinity tolerant genotypes such as Ilam growth parameters, photosynthetic pigments and glycyrrhizin content were higher than sensitive genotypes. The present study has shown that introduction of tolerant genotypes in filed condition can reduce successfully the adverse effects of salinity stress. Therefore, the results of this research can be useful for cultivation of licorice in saline fields and breeding the tolerant genotypes.

Keywords: Ascorbate peroxide, Field, Glycyrrhizin, Photosynthetic pigments, Salinity stress