بررسی اثر آسکوربات و نمک بر میزان سدیم، کلر و برخی ترکیبات آلی در گیاه سویا رقم DPX

*مریم نیاکان[۱]، آتنا دیانسایی[۲]، آرین ساطعی[۱]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد گرگان
۲. عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد گرگان

چکیده

استرس شوری یک فاکتور مهم محیطی است که رشد و تولید گیاه را محدود می‌کند. اثرات زیانبار شوری روی گیاهان یا به صورت مرگ گیاه و یا به صورت کاهش در رشد مشخص شده است.در طی تنش شوری انواع مختلفی از گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) تولید می‌گردد. این رادیکال ها انرژی خود را به مولکول‌های زیستی داده و یا حتی با آنها وارد واکنش گشته و سبب تخریب آنها می‌گردند. در طی تنش شوری سیستم‌های حفاظتی تحت عنوان سیستم آنتی اکسیدانی فعال شده و سطوح ROS را در گیاه کنترل می‌کنند. یکی از این سیستم‌های حفاظتی، اسید آسکوربیک می‌باشد که نقش مهمی را در از بین بردن ROS در گیاهان بازی می‌کند. در این تحقیق گیاه سویا تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آسکوربات (۱و۲ میلی‌مول) و نمک (۵۰و۱۵۰ میلی‌مول) قرار گرفت و اثر آنها بر میزان پرولین، گلیسین بتائین، ترکیبات فنلی، قندهای محلول، سدیم و کلر در دو بخش هوایی و زیر زمینی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در حضور نمک میزان سدیم، کلر و نیز ترکیبات آلی فوق افزایش یافته، ولیکن با افزودن آسکوربات از مقدار آنها کاسته شد.

کلمات کلیدی: آسکوربات، تنظیم کننده‌های اسمزی، سویا، شوری

مقدمه

استرس شوری یک فاکتور مهم محیطی می‌باشد که رشد و تولید گیاه را محدود می‌کند. اثرات زیانبار شوری روی گیاهان یا به صورت مرگ گیاه و یا به صورت کاهش در رشد مشخص شده است (Allakhvedies و همکاران، ۲۰۰۰b).

بسیاری از گیاهان دارای مکانیسم هایی می‌باشند که یا مانع از ورودنمک به سلولها گشته ویا اینکه سبب تحمل نمک توسط آنها می‌شوند. در طی هجوم و تشدید استرس شوری همه فرایندهای مهم از قبیل فتوسنتز، سنتز پروتئین و کاتابولیسم لیپید و انرژی تحت تاثیر قرار می‌گیرند

*e.mail: mnniakan@yahoo.com

(Zhifang and Loescher، ۲۰۰۳). گیاهانی که در معرض استرس شوری قرار می‌گیرند، تغییراتی را در محیط زندگی خود تحمل می‌کنند. توانایی گیاهان در مقاومت به استرس شوری بوسیله چندین مسیر بیوشیمیایی تعیین می‌گردد که می‌توان به: حفظ و استفاده از آب، حمایت از عملکردهای کلروپلاست و حفظ هوموستازی یون‌ها اشاره کرد (Wilson and Shannon، ۱۹۹۵).

سازگاری‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی به استرس شوری در سطح سلولی پاسخ‌های مهمی می‌باشند که به شناسایی شمار زیادی از ژن هایی که توسط شوری القاء می‌شوند منجر می‌گردد. مقاومت به شوری یک ویژگی چند ژنی می‌باشد و شمار زیادی از ژنها که مسئول رمزگذاری پروتئین‌های استرس شوری هستند در این مورد دخالت می‌کنند که شامل: ژنهای دخیل در سنتز آنزیم‌های فتوسنتزی؛ ژن‌های مسئول سنتز اسمولیت‌ها؛ ژن‌های سنتز آنزیم‌های صادرکننده Na^+ به واکوئل؛ ژن‌های دخیل در سنتز آنزیمهای از بین برنده رادیکال‌های آزاد (Kawasake و همکاران، ۲۰۰۱).

تحقیقات نشان داده است که در طی تنش شوری تعادل یونها در هم ریخته می‌شود و به منظور ایجاد تعادل یونی در واکوئلها، در سیتوپلاسم ترکیبات محلول سازگار با جرم مولکولی اندک انباشته می‌گردد زیرا این ترکیبات در فعل و انفعال بیوشیمیایی طبیعی دخالت نکرده، بلکه آنها آب را در این فعل و انفعال جابجا می‌کنند. این محلول‌های سازگار شامل پرولین، گلیسین بتائین ، قندها و پلی اول‌ها می‌باشد

تحقیقات نشان داده است در گیاهان تیره بقولات تحت تنش خشکی و شوری، پرولین کربوهیدرات‌ها انباشته شده که قند محلول غالب در بسیاری از آنها پینیتول بوده است (Zhifang and Loescher ۲۰۰۳).

از سوی دیگر گلیسن بتائین نیز دربرخی گیاهان در پاسخ به تنش افزایش می‌یابد این ماده در کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان نقش ایفا می‌کند. گلیسین بتائین از محلول‌های سازشی بوده و مانند یک تنظیم کننده اسمزی عمل می‌نماید و از پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌ها در زمان کمبود آب محافظت و باعث پایداری غشاها می‌گردد (Cushman، ۲۰۰۰).گفته می‌شود که گلیسین بتائین به پایداری ساختمان سوم پروتئین کمک کرده و از اختلال ساختار آنها که توسط محلول‌های غیرسازشی ایجاد می‌شود جلوگیری کرده و آن را به حالت اول بر می‌گرداند (Naidu و همکاران، ۲۰۰۶).

تحت شرایط استرس مقدار ساکارز و هگزوزها نیز افزایش یافته واز میزان نشاسته کاسته می‌شود. افزایش میزان ساکارز و هگزوز به دلیل افزایش هیدرولیز نشاسته و سنتز ساکارز بوده و انباشته شدن این دو ماده نقش مهمی در تنظیم اسمزی دارد (Pattangul and Modare، ۱۹۹۹).

همچنین دیده شده است که افزایش یون سدیم در محیط ریشه سبب کاهش میزان جذب یون پتاسیم از طریق ریشه و پایین آمدن نسبت پتاسیم به سدیم می‌گردد (Benlloch و همکاران، ۱۹۹٤). گیاهان که تحمل بیشتری نسبت به شوری دارند از جذب یون سدیم که باعث آسیب به غشاء و کاهش نسبت سدیم به پتاسیم می‌شود ممانعت به عمل می‌آورند (Basara و همکاران، ۱۹۹۷).

تحقیقات نشان داده است که استرس شوری فرایند پیچیده ای می‌باشد که منجر به تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌گردد. این گونه‌های اکسیژن فعال سمی بوده و به راحتی متابولیسم طبیعی سلول ها را از طریق خسارت‌های اکسیداتیو به لیپیدها،پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک بر هم می‌زنند (Halliwell and Gutteridge, 1987). تحقیقات نشان می‌دهد که نوعی تعادل بین تشکیل ROS و فعالیت سیستم‌های آنتی اکسیدانی وجود دارد (Mittler، ۲۰۰۲). گونه‌های فعال اکسیژن شامل اکسیژن سینگلت (O_2^-)، رادیکال سوپر اکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ورادیکال

هیدروکسیل (OH^-) و غیره می‌باشد. اکسیژن سینگلت می‌تواند انرژی خود را به مولکولهای زیستی داده و یا حتی با آنها وارد واکنش شود.رادیکال سوپر اکسید قادر به عبور از غشاء نبوده و لذا در همانجا تبدیل به پراکسید هیدروژن می‌گردد (Chang و همکاران، ۲۰۰۰). دیده شده است که ROS به اجزای مهم سلولی مثل پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها خسارت جدی وارد می‌کند. از آنجاییکه این ترکیبات اجزای اصلی تشکیل دهنده غشاء هستند. لذا خسارت‌های قابل توجهی به گیاه وارد می‌شود (Blokhina و همکاران، ۲۰۰۱).

مسیرهای مختلفی در گیاهان وجود دارد که منجر به سنتز متابولیت‌های فعال اسمزی، پروتئین‌های مخصوص و آنزیم‌های از بین برنده رادیکال‌های آزاد می‌شود.توانایی گیاهان به رفع سمیت رادیکالها تحت استرس شوری یک نیاز بحرانی و اساسی می‌باشد (Zhu، ۲۰۰۲).

همچنین در گیاهان سیستم‌های آنتی اکسیدانی متعددی وجود دارد که قادر به رفع گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشند. از جمله این آنتی اکسیدان‌ها می‌توان به آسکوربات اشاره نمود. توانایی دادن الکترون در محدوده عظیمی از واکنش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی باعث شده که اسید آسکوربیک به عنوان یک ترکیب مهم در رفع سمیت ROS در فازهای آبی معرفی شود. آسکوربات یکی از آنتی اکسیدان‌های قوی می‌باشد که به طور مستقیم رادیکال‌های سوپر اکسید وهیدروکسیل را حذف کرده و H_2O_2 را با کمک آسکوربات پر اکسیداز به آب احیا می‌کند.همچنین آسکوربات باعث تولید مجدد توکوفرول از طریق رادیکال توکوفروکسیل می‌شود و به این ترتیب از غشاء در مقابل فرایند پراکسیداسیون حفاظت می‌کند (Noctor and Foyer, 1998).

هدف از انجام این تحقیق بررسی میانکنش غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم و آسکوربات بر میزان تجمع سدیم، کلر و تنظیم کننده‌های اسمزی (پرولین، گلیسین بتائین و قندهای محلول) و نیز سیستم دفاعی گیاه (ترکیبات فنلی) در دو اندام برگ و ریشه تحت شرایط هیدروپونیک می‌باشد تا چگونگی اثرآسکوربات بر پاسخ‌های سازشی گیاه سویا به تنش شوری مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در ابتدا تعدادی بذر استریل سویا در پلیت‌های ضدعفونی شده در بین دو کاغذ صافی قرار داده و در ژرمیناتور در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. آبیاری به صورت روزانه، با آب مقطر صورت گرفت. پس از ۵ روز، زمانی که برگ‌های اصلی ظاهر شد، دانه رست‌ها به محیط کشت هیدروپونیک منتقل شدند.

جهت تعیین نسبت‌های مناسبی از تیمارهای آسکوربات و نمک از یک سو و محیط کشت هوگلند از سوی دیگر در ابتدا پیش آزمایشی با نسبت‌های متفاوتی از هوگلند و تیمارهای مورد نظر انجام و با توجه به نتیجه آن نسبت ۷۰:۱۵:۱۵ جهت انجام آزمایشات اصلی انتخاب شد که در این نسبت ۷۰mL میزان محیط کشت هوگلند، ۱۵mL میزان نمک و ۱۵mL میزان آسکوربات می‌باشد. شایان ذکر است که در تیمارهایی که صرفا نمک و یا آسکوربات وجود داشت این نسبت به ۳۰mL رسانیده شد. محلول‌های تهیه شده در ظروف پلاستیکی (۱۰ دانه رست در ظرف) قرار داده شد و دهانه ظروف با ورق آلومینیومی پوشانده شد. پس از گذشت ۲۰ روز سنجش‌های مورد نظر در دو بخش هوایی (برگ) و زیر زمینی (ریشه) اعمال گشت.

سنجش مقدار کلروفیل (a,b)

پس از جداسازی اولین برگ متقابل در گیاهان تحت تیمار سویا جدا و سپس در مورد آنها، مراحل زیر انجام شد: تعیین وزن تر اندام گیاهی(W)؛ ساییدن نمونه‌ها در ۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد و همگن نمودن آن؛ سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها به مدت ۱۵۰دقیقه در ۳۰۰g؛ جداکردن محلول رویی و رسانیدن حجم آن به ۵ میلی لیتر توسط استن ۸۰ درصد؛

خواندن جذب در طول موج‌های ٦٤٥، ٦٥٢ و ٦٦٣ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه (استن)؛ سپس با استفاده از رابطه‌های زیر مقدار کلروفیل a, b بر حسب میلی گرم در گرم بافت مورد نظر (W) به دست آورده شد (Bruinsma، ١٩٦٣).

$$Chla=(12.7OD_{663}-2.690D_{645})$$
$$Chlb=(22.9OD_{663}-4.680D_{645})$$

سنجش قندهای محلول

ابتدا یکی از برگ‌های سه تایی و بخش مشخص از ریشه جهت سنجش قندهای محلول تعیین گشت و در آون در درجه حرارت ٩٠ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت خشک شدند. پس از توزین آنها توسط ترازوی دیجیتالی به هر یک از نمونه‌ها ١٠ میلی‌لیتر الکل ٧٠ در صد افزوده و در ظروف پلی اتیلن در یخچال قرار داده شدند. سپس بر روی ١ میلی‌لیتر از محلول فوقانی ١ میلی‌لیتر آب مقطر ١ میلی لیتر فنل ٥ درصد و ٥ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده و میزان جذب در طول موج ٤٨٥ نانومتر خوانده شد. میزان قندهای محلول با استفاده از محلول استاندارد گلوکز و مطابق با روش (Kochert، ١٩٧٨) بر حسب گرم در گرم وزن خشک نمونه محاسبه گشت.

سنجش ترکیبات فنلی

ابتدا بخشی از برگ‌های سه تایی مرکب و بخش مشخصی از ریشه، از گیاهان جدا نموده و جهت سنجش ترکیبات فنلی مورد ارزیابی قرار گرفتند.مراحل زیر به ترتیب جهت سنجش ترکیبات فنلی انجام گرفت:

تعیین وزن تر نمونه‌های مورد نظر؛ قرار دادن نمونه‌ها در ١٠ میلی لیتر اتانول ٨٠ درصد و جوشاندن نمونه‌ها در الکل به مدت ١٥ دقیقه، سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها در دور g ٣٠٠ به مدت ١٥ دقیقه؛ برداشتن ٥ میلی لیتر از محلول فوق واضافه نمودن ٥ میلی لیتر فولن رقیق شده و ١٠ میلی‌لیتر کربنات سدیم اشباع؛ جدا کردن محلول رویی از نمونه‌های سانتریفیوژ شده و خواندن جذب در طول موج ٦٤٠ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه؛ برای یافتن غلظت ترکیبات فنلی از منحنی استاندارد و با استفاده از کاتکول با غلظت‌های مختلف، مقدار ابن ترکیبات بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید (Matta و همکاران، ١٩٦٣)

سنجش میزان پرولین

ابتدا تعدادی برگ‌های سه تایی مرکب و بخش مشخصی از ریشه، از گیاهان جدا و سپس موارد زیر جهت تعیین میزان پرولین به اجرا در آمد:

توزین نمونه‌ها و همگن نمودن آنها در ١٠ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ٣ در صد و صاف نمودن آنها.اضافه نمودن ٢ میلی‌لیتر معرف نینهیدرین و ٢ میلی‌لیتر اسید استیک خالص به ٢ میلی‌لیتر محلول صاف شده و قرار دادن لوله‌ها در بن ماری در دمای ١٠٠ درجه سانتی گراد به مدت ١ ساعت. انتقال لوله‌ها به حمام یخ جهت قطع انجام واکنش؛ اضافه کردن ٤ میلی لیتر تولوئن به هریک از نمونه‌ها؛ خواندن جذب محلول رنگین فوقانی (حاوی تولوئن و پرولین) در طول موج ٥٢٠ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه (تولوئن خالص)؛ پس از ترسیم منحنی استاندارد، مقدار پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید (Bates، ١٩٧٣).

سنجش گلیسین بتائین

ابتدا تعدادی از اولین برگ متقابل گیاه سویا جدا و در آون در دمای $90^{o}C$ خشک شدند. سپس ٥/. گرم از پودر خشک شده برگ گیاه در ٢٠ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شده و در دمای $25^{o}C$ شیکر گشت و از کاغذ صافی عبور و در فریزؤ قرار داده شد. در مرحله بعد، نمونه از فریزر خارج شده و پس از ذوب شدن یخ آن، به نسبت ١:١ با اسید سولفوریک N ٢ رقیق گردیدند. سپس ٥/. میلی‌لیتر از آن جدا شده در داخل لوله آزمایش و آب یخ به مدت یک ساعت نگهداری شدند. سپس به آنها ٢/. میلی‌لیتر از معرف یدید پتاسیم سرد اضافه شده و به آهستگی توسط ورتکس مخلوط

شدند. سپس محلول‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای یخچال قرار داده شدند. نمونه‌ها در دمای صفر درجه سانتی‌گراد با ۹ میلی لیتر ۱و۲ دی کلرو اتان حل شد. سپس شدیداً ورتکس شده و بعد از ۲۴ ساعت، جذب آن در طول موج ۳۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکترومتر خوانده شد. برای تهیه منحنی استاندارد، محلول‌های استاندارد گلیسین بتائین با غلظت‌های مختلف آماده و در میزان گلیسین بتائین بر حسب میکروگرم در گرم خشک نمونه محاسبه شد (Sairam، ۲۰۰۲).

اندازه‌گیری یون سدیم وکلر

جهت اندازه‌گیری یون کلر در ابتدا ۰/۲-۰/۱ گرم ماده خشک گیاهی در ۲۵-۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به۱ میلی‌لیتر از محلول فوق ۳-۲ قطره محلول ۵ درصدی دی کرومات پتاسیم اضافه و با نیترات نقره ۰/۰۲۵ نرمال تیتر گشت. پس از تعیین نرمالیته کلر میزان کلر بر حسب گرم درگرم نمونه خشک محاسبه شد. برای اندازه‌گیری سدیم از دستگاه فلیم فتومتر استفاده شد. بدین منظور محلول‌های استانداردی از کلرید سدیم تهیه شد.شاخص دستگاه با آب مقطر روی عدد صفر تنظیم شد و سپس غلظت هر یک از محلول‌های استاندارد و نیز محلو لهای حاوی یون سدیم توسط دستگاه خوانده شدو به کمک رسم منحنی و و تهیه معادله خط منحنی استاندارد، غلظت یون موجود در نمونه‌ها تعیین گردید. سپس مقدار یون موجود در نمو نه‌ها بر حسب گرم در هر گرم وزن خشک محاسبه شد (Anderson and Shariatpanahi، ۱۹۸۶).

محاسبات آماری

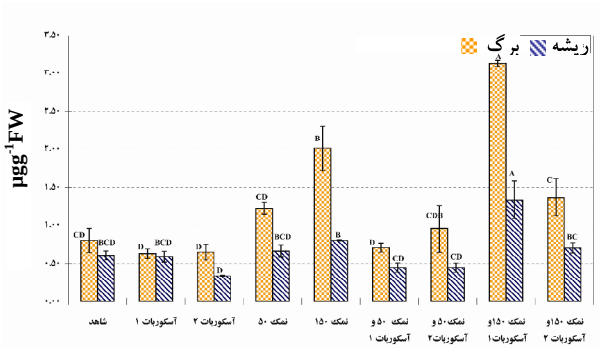
در این آزمایش محاسبات آماری در طرح کاملا تصادفی توسط نرم افزار SAS انجام شد. مقایسه بین تیمارها و شاهد بر اساس آزمون دانکن در سطح $p<0.05$ بررسی و نمودارها نیز با نرم افزار Excel رسم گردید.

نتایج

اثر نمک و آسکوربات برمیزان پرولین

برگ: میزان پرولین برگ گیاه سویا تحت تیمارهای مختلف نمک و آسکوربات قرار گرفت. بیشترین میزان پرولین در نمک ۱۵۰mM و آسکوربات ۱ mM وکمترین مقدار در آسکوربات ۱mM دیده شد. در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱mMو۲) میزان پرولین کاهش یافت.نمک ۱۵۰mM و آسکوربات ۱mM در مقایسه با نمک ۱۵۰mM افزایش معنی‌دار ونمک ۱۵۰mM و آسکوربات ۲mM در مقایسه با نمک ۱۵۰mM کاهش معنی‌داری حاصل کرد (نمودار ۱).

ریشه: بیشترین میزان پرولین ریشه در نمک ۱۵۰mM و آسکوربات ۱ mM وکمترین مقدار در آسکوربات ۱mM دیده گشت. درغلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هردو غلظت آسکوربات (۱mMو۲) میزان پرولین کاهش و در نمک ۱۵۰mM و آسکوربات ۱mM در مقایسه با نمک ۱۵۰mM افزایش معنی‌دار حاصل نمود (نمودار۱).



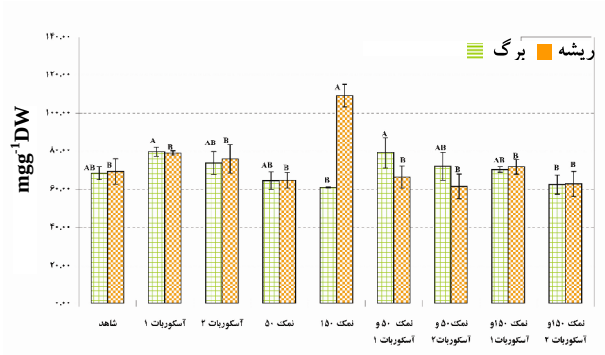
نمودار ۱: اثر تیمارهای مختلف نمک(۵۰و۱۵۰) میلی‌مولار و آسکوربات (۱و۲) میلی‌مولار برمحتوای پرولین در برگ و ریشه گیاه سویا

اثر نمک و آسکوربات برمیزان گلیسین بتائین

برگ: بیشترین میزان گلیسین بتائین در نمک ۵۰mM و آسکوربات ۱ mM و کمترین مقدار در نمک۱۵۰ mM دیده شد. در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱mMو۲) میزان گلیسین بتائین افزایش یافت. در

غلظت‌های ترکیبی از نمک ۱۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) میزان گلیسین بتائین در مقایسه با نمک ۱۵۰mMروند صعودی را طی نمود (نمودار ۲).

ریشه: میزان گلیسین بتائین ریشه گیاه سویا تحت تیمارهای مختلف نمک و آسکوربات مورد بررسی قرار گرفت. همچنان که در نمودار (۲) مشاهده می‌شود بیشترین میزان گلیسین بتائین در نمک ۱۵۰mM وکمترین مقدار در نمک ۵۰mM وآسکوربات ۱mM دیده می‌شود. در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) میزان گلیسین بتائین افزایش یافت. در غلظت‌های تر کیبی از نمک ۱۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) نیز میزان گلیسین بتائین در مقایسه با نمک ۱۵۰mM روند صعودی را طی نمود (نمودار۲).

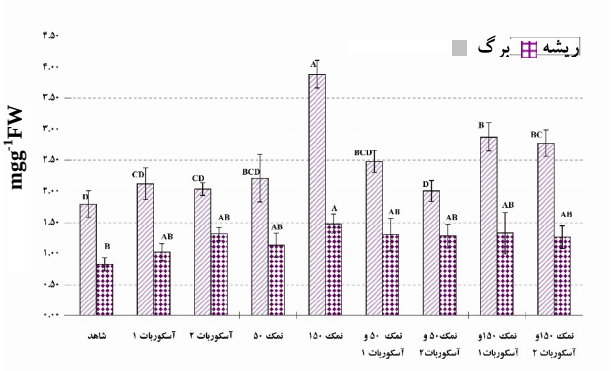


نمودار ۲: اثر تیمارهای مختلف نمک(۵۰و۱۵۰) میلی‌مولار و آسکوربات (۱و۲) میلی‌مولار برمحتوای گلیسین بتائین در برگ و ریشه گیاه سویا

اثر نمک و آسکوربات برمیزان ترکیبات فنلی

برگ: میزان ترکیبات فنلی برگ گیاه سویا نیز تحت تاثیر تیمارهای مختلف نمک و آسکوربات قرار گرفت. طبق نتایج بدست آمده در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هردو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) میزان ترکیبات فنلی در مقایسه با نمک ۵۰ mM تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در غلظت‌های تر کیبی از نمک ۱۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) مقدار ترکیبات فنلی در مقایسه با نمک ۱۵۰mMکاهش معنی‌داری دارد (نمودار۳).

ریشه: بیشترین میزان ترکیبات فنلی در نمک ۱۵۰mM و کمترین مقدار در تیمار شاهد دیده شد. در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) محتوای ترکیبات فنلی در مقایسه با نمک ۵۰mM تفاوت معنی‌داری نداشت. در غلظت‌های تر کیبی از نمک ۱۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) میزان ترکیبات فنلی در مقایسه با نمک ۱۵۰mM کاهش یافت (نمودار۳).



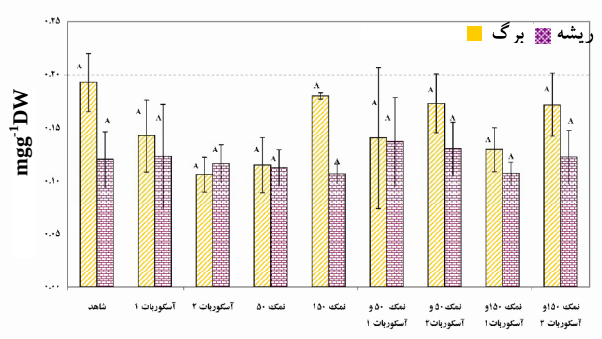
نمودار ۳: اثر تیمارهای مختلف نمک(۵۰و۱۵۰) میلی‌مولار و آسکوربات (۱و۲) میلی‌مولار برمحتوای ترکیبات فنلی در برگ و ریشه گیاه سویا

اثر نمک و آسکوربات برمیزان قندهای محلول

میزان قندهای محلول

برگ: بیشترین میزان قندهای محلول در تیمار شاهد وکمترین مقدار در تیمار آسکوربات ۱mM دیده گشت. در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هردو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) میزان قند در مقایسه با نمک ۵۰mM افزایش یافت. در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۱۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) میزان قندهای محلول در مقایسه با نمک ۱۵۰mMکاهش یافت(نمودار٤).

ریشه: در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هردو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) میزان قند در مقایسه با نمک ۵۰mM افزایش یافت اگرچه این افزایش معنی دار نبود. در غلظت‌های تر کیبی از نمک ۱۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱و۲mM) میزان قند در مقایسه با نمک mM ۱۵۰کاهش یافت (نمودار٤)



نمودار ٤: اثر تیمارهای مختلف نمک (۵۰و ۱۵۰) میلی‌مولار و آسکوربات (۱و۲) میلی‌مولار بر میزان قندهای محلول در ریشه و برگ گیاه سویا

اثر نمک و آسکوربات برمیزان سدیم و کلر

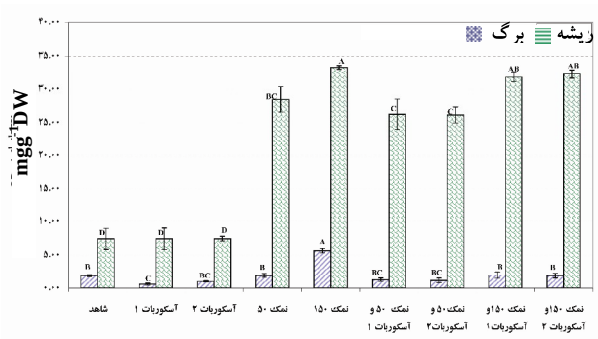
برگ: میزان سدیم برگ گیاه سویا تحت تیمارهای مختلف نمک و آسکوربات تحت بررسی قرار گرفت.بر طبق نمودار(۵) بیشترین میزان سدیم در نمک ۱۵۰mM و کمترین مقدار در آسکوربات ۱mM دیده شد.بین شاهد و آسکوربات ۱mM تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هردو غلظت آسکوربات (۱mMو۲) میزان سدیم در مقایسه با نمک ۵۰mM کاهش یافت باشد. در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۱۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱mMو۲) میزان سدیم در مقایسه با نمک mM ۱۵۰ کاهش معنی‌داری حاصل شد (نمودار ۵).

ریشه: طبق نمودار (۵) بیشترین میزان سدیم در نمک ۱۵۰mM و کمترین مقدار در آسکوربات ۱mMو۲ دیده شد. در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱mMو۲) میزان سدیم در مقایسه با نمک ۵۰mM کاهش یافت (نمودار۵)

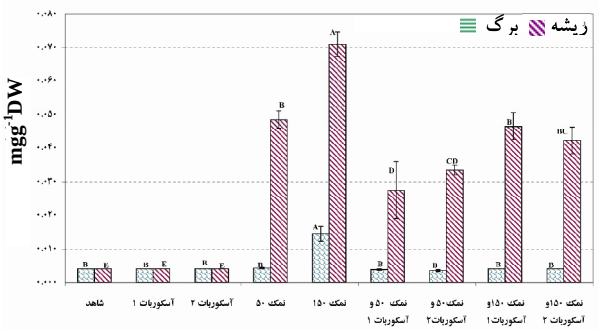
برگ: میزان کلر برگ گیاه سویا تحت تیمارهای مختلف نمک و آسکوربات مورد بررسی قرار گرفت.مطابق نتایج بدست آمده بیشترین میزان کلر مربوط به تیمار نمک ۱۵۰mM می‌باشد. در غلظت‌های تر کیبی از نمک ۱۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱mMو۲) میزان کلر در مقایسه با نمک mM ۱۵۰تفاوت معنی‌داری را به نمایش گذاشت (نمودار ٦)

ریشه:.چنانکه در نمودار (٦) دیده می‌شود بیشترین میزان کلر در نمک ۱۵۰mM و کمترین مقدار کلر در تیمارشاهد و آسکوربات mM ۱و۲ دیده گشت. در غلظت‌های ترکیبی از نمک ۵۰mM با هردو غلظت آسکوربات (۱mMو۲) میزان کلر در مقایسه با نمک ۵۰mMکاهش معنی‌داری نشان داد. در غلظت‌های

ترکیبی از نمک ۱۵۰mM با هر دو غلظت آسکوربات (۱mMو۲) میزان کلر در مقایسه با نمک ۱۵۰mMکاهش معنی‌داری حاصل شد (نمودار٦).



نمودار ۵: اثر تیمارهای مختلف نمک (۵۰و ۱۵۰) میلی‌مولار و آسکوربات (۱و۲) میلی‌مولار بر میزان سدیم در ریشه و برگ گیاه سویا



نمودار ٦: اثر تیمارهای مختلف نمک (۵۰و ۱۵۰) میلی‌مولار و آسکوربات (۱و۲) میلی‌مولار بر میزان کلر در ریشه و برگ گیاه سویا

بحث

دیده شده است که در طی تنش شوری میزان اسمولیت‌ها و ترکیبات آنتی اکسیدانی افزایش می‌یابد و باعث محافظت گیاه از اثرات مضر شوری می‌گردد (Hagemann and Murata، ۲۰۰۳).

در این پژوهش مشاهده شد که میزان یون‌های سدیم و کلر در تیمار نمک ۱۵۰mM دارای بیشترین مقدار می‌باشد و با اضافه شدن آسکوربات به محیط شور میزان این یون‌ها تا حد زیادی کاهش می‌یابد.احتمال می‌رود که آسکوربات با از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین با اثر بر روی نفوذپذیری غشاء باعث کاهش جذب یون‌های سدیم و کلر شده، به این ترتیب گیاه بهتر می‌تواند شرایط تنش را در حضور آسکوربات تحمل کند.

تحقیقات نشان می‌دهد که افزایش یون سدیم در محیط ریشه سبب کاهش میزان جذب یون پتاسیم از طریق ریشه و پایین آمدن نسبت پتاسیم به سدیم می‌گردد (Benlloch و همکاران، ۱۹۹٤). گیاهانی که تحمل بیشتری نسبت به شوری دارند از جذب یون سدیم که باعث آسیب به غشاء و کاهش نسبت سدیم به پتاسیم می‌شود ممانعت به عمل می‌آورند (Basara و همکاران، ۱۹۹۷).

از آنجایی که پتاسیم در فعالیت‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه (Haro و همکاران، ۱۹۹۳) نظیر باز وبسته شدن روزنه ها، فعال کردن آنزیم‌های مختلف، دخالت درنقل و انتقال مواد شرکت می‌کند، کاهش آن مانع از رشد و نمو طبیعی گیاه می‌شود (Chauhan و همکاران، ۱۹۸۰). در این پژوهش نیز دیده شد که در تیمار شوری رشد گیاه تا حد زیادی کاهش می‌یابد.

همچنین گزارش شده است که شوری سبب جایگزینی کلسیم موجود در غشاء توسط سدیم می‌گردد که انسجام غشاء را دستخوش خطر ساخته و نشت مواد از غشاء را سبب می‌گردد (Cramer و همکاران، ۱۹۹۵).

در این پژوهش مشاهده شد که محتوای ترکیبات فنلی در گیاهانی که تحت شوری شدید بودند افزایش یافت. پلی فنل‌ها دارای ساختار شیمیایی مناسب جهت فعالیت حذف رادیکال‌های آزاد هستند و مشخص شده است که اکسیدان‌های موثرتری در in vitro نسبت به توکوفرول‌ها و اسید آسکوربیک می‌باشد. این ترکیبات نقش آنتی اکسیدانی دارند و از عمل اکسید کننده‌های مخرب جلوگیری می‌کنند.دیده شده است که طی تنش میزان ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد تا گیاه را از آسیب محافظت کند (Rice-Evans و همکاران، ۱۹۹۷). در این پژوهش افزودن آسکوربات سبب کاهش ترکیبات فنلی گشت. به نظر می‌رسد که به علت وجود این ترکیب آنتی اکسیدانی اگزوژن گیاه تولید ترکیبات فنلی را کاهش داده است زیرا نقش هر دو حذف رادیکالهای آزاد می‌باشد.

در این پژوهش میزان پرولین و گلیسین بتائین در گیاهان تحت تیمار شوری افزایش یافت و در حضور آسکوربات این میزان روند نزولی را طی نمود. در واکنش مطالعات انجام شده بر روی گیاهانی نظیر پیاز و برنج نشان می‌دهد که گلیسین بتائین علاوه بر نقش اسموپروتکتانی، باعث پایداری غشاها و فعالیت آنزیم‌ها شده و باعث پایداری ساختار پروتئین‌های درونی کمپلکس P_{SII} می‌شود (Meloni و همکاران، ۲۰۰٤).

اسید آمینه پرولین نیز با آنزیم‌ها برهم کنش کرده و باعث محافظت ساختار و پایداری فعالیت آن می‌شود. در زمان رفع تنش پرولین به عنوان منبع ذخیره‌ای کربن و نیتروژن عمل می‌کند.تجمع پرولین به علت افزایش در میزان سنتز و کاهش تجزیه و تخریب آن و یا هر دو حالت در تنش‌های مختلفی از قبیل شوری و خشکی اشاره شده است (Kishor و همکاران، ۲۰۰۵)

همچنین میزان قندهای محلول در غلظت بالای شوری افزایش و در حضور آسکوربات از میزان آنها کاسته شد. تحقیقات نشان می‌دهد که تنش‌های مختلف از جمله تنش شوری و خشکی با عث تجمع کربوهیدرات‌های حلقوی شده که به عنوان اسموپروتکتان یا محلول‌های سازشی عمل نموده و عمل تنظیم اسمزی را در سلول‌های گیاهی انجام می‌دهند (Pattangul and Modare، ۱۹۹۹). همچنین به عنوان سرکوبگر رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شود (Yancey، ۲۰۰۵).

می‌توان گفت که در حضور آسکوربات که یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌باشد با از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن و به دنبال آن ثبات غشا، باعث بهبود شرایط و ایجاد مقاومت در گیاه تحت تیمار شوری می‌گردد، لذا در حضور آسکوربات نیاز گیاه به تنظیم کننده‌های اسمزی کاهش می‌یابد.در مجموع از نتایج این تحقیق می‌توان چنین نتیجه گیری نمود که آسکوربات سبب کاهش اثرات سمی نمک کلرید سدیم بر گیاه سویا می‌گردد.

References

Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N., 2000b. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus sp*. Plant Physiol. 123, 1047–1056.

Basara, A.S. and Basara, R.R. 1997. Mechanism of environmental stress resistance in plants. Harvard Academic publishers. P: 83-111

Bates, L.S., Waldren, R.P. and Treare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies, Plant and Soil. 39: 205-207.

Benlloch, M., Ogeda, M.A. Ramos, J. and Rodriguesnavarro, A. 1994. Salt sensitivity and low discrimination between potassium and sodium in bean plants. Plant and Soil. 166: 117-123

Blokhina, O.B, Chirkova, T.V, Fagerstedt, K.V. 2001. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1–12

Chance, B. and Maehly, C. 1955. Assay of catalase and peroxidase. methodes Enzymol. 11: 764-755

Chang, **W.W.P, Huang, L, Shen, M, Webster, C, Burlingame, A.L, Roberts, J.K.M. 2000**. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiology* **122**: 295–317.

Chauhan, R.P.S., Chauban, C.P.S. and Kumar, D. 1980. Free proline accumulation in cereals in relation to salt tolerance. Plant and Soil. 57: 167-175

Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Roderigues, M.L., Richardo, C.P.P., Osorio, M.L., Carvalho, I., Faria, T., and Pinheiro, C., 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. Ann. Bot. 89, Pp. 907-916

Cramer. M.D, Schieholt, A. Weny Y.Z. and Lips, S.H. 1995. The influence of salinity on the utilization of real a plerotic carbon and nitrogen metabolism in tomato seedlings. J. Experimental Botany. 64(291): 1569-1577

Cushman, J.C., and Bohnert, H.J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol*, 3: 117-124

Hagemann, M., Murata, N., 2003. Glucosylglycerol, a compatible solute, sustains cell division under salt stress. Plant Physiol. 131, 1628–1637.

Halliwell , B., Gutteridge, JMC.(1998). Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection.Trends Biochemical Science 11,375

Haro, R., Banuelous, M.A. Quintero, F.J. Rabio, F.and Rodrgez Navarro, A. 1993. Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plant. Plant Physiology. 89: 868-874

Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D., Bohnert, H.J., 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. Plant Cell 13, 889–905

Kishor, P.B.K., Sangam, S., Amrutha, R.N., Lamix, P.S., Naidu, K.R. Rao, K.R., S.S., Rao, S., reddy, K.J., Theriappan, P. and V asulu, S. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. Current science. Vol, 88, No, 3, Pp. 424-438.

Kochert, G. 1978. Carbohydrate determination by phenol sulfuric acid method in: Helebust, J. A. CRAIG, J. S. (ed): Hard book of method. 56-97.

Koroi, S.A.A. 1989. Gel elektrophores tische and spektral photometris choe unter zomein der temperature auf straktur and aktrits der amylase und peroxidase isoenzyme, physiol veg. 20: 15-23.

Matta, A.J. and Giai, I. 1969. Accumulation of phenol in tomato plant in effected by different forms of *Fusarium oxysporum.* planta. 50: 512-513.

Meloni, D.A., Gulotta, M.R., Martinez, C.A., and Oliva, M.A., 2004. The effect of salt stress on growth, Nitrate reductions and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. Barz. J. Plant Physiol. Vol. 16, No. 1.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7,** 405–410

Naidu, B.P., Cameron, D.F., and Konduri, S. V., 2006. Improving drought tolerant of cotton by *glycine betaine* application and selection. The Australian agronomy conference

Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249–279

Pattannagul, W., and Modare, M.A., 1999. Water dificit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in *coleus*. Plant Phisiology, Vol, 121, Pp. 987-993.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sciences* **2**: 152–159

Wilson, C., Shannon, M.C. 1995. Salt-induced Na^+/H^+ antiport in root plasma membrane of a glycophytic species of tomato. Plant Science **107,** 147–157

Yancey, P.H., 2005. Organic osmolyte as compatible metabolic and counteracting cytoprotectant in high osmolarity and other stresses. Journal of experimental biology, 208, 2819-2830

Zhifang, G., Loescher, W.H., 2003. Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimmer. Plant Cell Environ. 26, 275–283.