بررسی اثر تنش نمکی (NaCl)، $CaCl_2$ و اسید آسکوربیک بر فیزیولوژی و ویژگی‌های رافیدی گیاه سه گوش (*Carpobrotus edulis* L.)

*محمدعلی رضایی[۱]، سیده‌زهرا حسینی کلبادی[۲]، مریم صفایی کتولی[۲]، فریبا امیرلطیفلی[۳]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
۲. باشگاه پژوهشگران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان.
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان.

چکیده

به منظور بررسی اثرات شوری بر گیاه سه گوش (*Carpobrotus edulis* L.)، سه نمونه خاک با هدایت الکتریکی ۱، ۸ و ۱۲ دسی زیمنس بر متر برای انجام آزمون‌های گلدانی انتخاب گردید و پس از تکثیر رویشی گیاه، تیمار اسید اسکوربیک قبل از تیمارهای NaCl و $CaCl_2$ در دو غلظت ۲/۵ و ۵ میلی مول روی برگ ها پاشیده شد و تیمارهای $CaCl_2$ نیز به میزان ۲۵ و ۵۰ درصد تیمارهای نمک به خاک اضافه گردید. نتایج نشان داد که با افزایش شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات در مقایسه با تیمار شاهد مقدار سدیم، کلر، کلسیم و پتاسیم برگ ها افزایش معنی‌داری داشتند. تیمارهای $CaCl_2$ و آسکوربات بر شدت تنش شوری و جذب سدیم اثر کاهنده نداشته اند. گیاه از قندهای محلول و پرولین به عنوان اسمولیت برای افزایش فشار اسمزی استفاده نکرد. مقدار گلیسین بتائین و پروتئین کل با افزایش شوری افزایش یافته و گیاه در زمره گیاهان با استراتژی تولید و تجمع تنها گلیسین بتائین قرار گرفت و از پرولین به عنوان اسمولیت استفاده ننمود. تیمار کلسیمی مناسب برای بهبود فعالیت آنزیم پراکسیداز جهت پاک سازی انواع اکسیژن فعال در شوری متفاوت بود. مورفولوژی اکسالات کلسیم، رافیدها و تعداد دسته‌های رافید در مقطع عرضی برگ‌های گیاه سه گوش و تعداد سوزن‌های رافید در واحد حجم از روند فیزیولوژیکی خاصی تبعیت نکرده و تغییرات معنی‌داری نداشته و تحت تاثیر شوری خاک، غلظت کلسیم و تیمارهای آسکوربات قرار نگرفت.

کلمات کلیدی: اسکوربات، پراکسیداز، پروتئین کل، پرولین، رافید، شوری، قند محلول، کلسیم، گیاه سه گوش، گلیسین بتائین

*e.mail: mohalirezaei@yahoo.com

مقدمه

گیاه سه گوش (*Carpobrotus edulis* L.) متعلق به تیره Aizoaceae، گوشتی و هالوفیت است. مطالعات نشان می‌دهد که بسیاری از گیاهان کلسیم زیادی جذب شده از محیط را بصورت نمک غیر محلول مانند اکسالات کلسیم ذخیره می‌سازند (Franceschi and Loewus, 1995; Horner et al., 1995). تولید کلسیم اکسالات سلول های گیاهی در پاسخ به مقادیر مازاد بر نیاز کلسیم القا می‌شود و در واکوئل ها ذخیره می‌گردد (Keates et al., 2000)، لذا پیشنهاد شده است که مسیر سنتز کلسیم اکسالات در گیاهان میتواند با افزایش کلسیم القا شود. مورفولوژی بلورهای اکسالات کلسیم در گیاهان مختلف متفاوت است و در گونه های مختلف گیاهی مورفولوژی خاصی به نمایش گذاشته می‌شود (Baran and Monje, 2002). وجود اکسالات کلسیم در واکوئل های گیاه سه گوش به شکل خاص رافید مشاهده شده است. مکانیزمی که گیاه از طریق آن مورفولوژی بلورهای اکسالات را تعیین می‌کند هنوز مشخص نشده است (Nakata and Mcconn, 2002). ولی به نظر می‌رسد عوامل مختلف محیطی خصوصا تنش های نمکی بر میزان و مورفولوژی تشکیل آن موثر می‌باشند که از جمله آنها تنش املاح مانند غلظت بالای سدیم و کلسیم هستند (Abdelmottaleb, 1989). همچنین مشخص شده است که اسید اسکوربیک در شروع تشکیل بلورهای اگزالات کلسیم به عنوان هسته مرکزی نقش ایفا می‌کند (Horner et al, 2000).

از طرفی شوری خاک دامنه وسیعی از اختلالات را در سلول ها و اندام های گیاه ایجاد می‌کند و باعث ایجاد سلسله ای از فرایندهای معین می‌شود که منجر به تجمع کاتیون سمی Na^+ و یون Cl^- می‌گردد و مقاومت به نمک شامل سلسله ای از صفات پیچیده‌ای است که به مختصات فیزیولوژیک درون سلولی در گیاه بستگی دارد (Mohammad et al., 1998; Bruria and Arie, 1998). از جمله این مکانیسم ها ممانعت از تجمع یون‌های Na^+ تحت تنش شوری می‌باشد (Francisco et al., 2002). یون‌های اصلی خاک‌های شور شامل Na^+ و Cl^- در شرایط شوری بر جذب مواد غذایی از طریق اثر متقابل رقابتی و یا نفوذپذیری انتخابی یون ها در غشاءها اثر می‌گذارد. برای مثال یون Na^+ کمبود یون K^+ را در گیاه القاء می‌کند و مطالعات بسیاری حاکی از کاهش غلظت یون K^+ در گیاه تحت شرایط تنش شوری می‌باشند (Grattan and Grieve, 1992; Francisco et al., 2002). کاهش K^+ در گیاه به دلیل فرایند رقابتی آن با Na^+ در ریشه گیاهان به خوبی شناخته شده است (Mittal and Dubey, 1991). ولی افزایش مقدار K^+ در برگ‌های برخی از گیاهان تحت تنش تنش نیز مشاهده شده است (Garcia-Lidon et al., 1998). یکی از آثار شوری در گیاه کاهش فعالیت فتوسنتزی در آن است که موجب کاهش مقدار کلروفیل (Tari et al., 2002; Francisco et al., 2002) و کاهش جذب CO_2 و ظرفیت فتوسنتز می‌گردد (Francisco et al., 2002). از تغییرات بیوشیمیایی که تحت تنش شوری اتفاق می‌افتد تولید انواع اکسیژن فعال است. الکترون‌های تراوش شده از زنجیره انتقال الکترونی می‌توانند با اکسیژن مولکولی واکنش نشان داده و تولید انواع اکسیژن فعال مانند سوپر اکسید (O^{-2}) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) نمایند. این انواع اکسیژن برای سلول بسیار واکنش‌گر و سمی هستند و در غیاب یک مکانیسم حفاظتی قوی ایجاد شده، به متابولیسم عادی لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه می‌زنند و مخصوصاً باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند (Fridovich, 1986; Davies, 1987). مطالعات بر روی چهار واریته برنج نشان داده است که فعالیت پراکسیدازی در کولتیوارهای حساس به تنش شوری در نتیجه پراکسیداسیون بالای لیپیدها افزایش می‌یابد، در حالی که فعالیت پراکسیدازی در کولتیوار مقاوم Pokkali کاهش داشت (Marible and Satoshi, 1988). مطالعه کولتیوارهای حساس به پنبه نشان می‌دهد که فعالیت پراکسیدازی در آنها تحت تنش شوری افزایش دارد و در برخی از موارد وابسته به کولتیوار است و پروتئین کل در گیاه تحت تنش شوری قرار می‌گیرد و مقدار آن از شاخص‌های فیزیولوژیک است که تحت تنش شوری کاهش می‌یابد (Bruria and Arie, 1988).

از جمله استراتژی گیاهان برای مقاومت در برابر تنش شوری تجمع محلول‌های سازشی است. این ترکیبات در اثر تنش شوری در گیاهان تجمع می‌یابند (Nuccio et al., 1999).

علاوه بر آن طی یک تقسیم‌بندی گیاهان تحت شرایط تنش شوری به سه دسته گیاهان با استراتژی مقاومت از طریق تجمع پرولین یا گلیسین بتائین و یا هر دو تقسیم می‌شوند (Larher et al., 1996). از آنجایی که بررسی جنبه‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مقاومت به تنش شوری از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (Flower and Yeo,1995). بدین منظور در نظر است اثر غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک، کلسیم ($CaCl_2$) و سدیم (NaCl) خاک بر فیزیولوژی گیاه و مورفولوژی تشکیل اکسالات در گیاه سه گوش مورد بررسی و دقت نظر قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاه سه گوش در گلدان‌ها

برای انجام سنجش‌های گلدانی، اواخر فروردین ماه سال ۸۶ تکه‌های ۱۵ سانتی متری از گیاه سه گوش تهیه و درون خاک گلدان‌هایی به قطر ۳۰ سانتی متر و عمق ۴۰ سانتی متر به صورت تکثیر رویشی کشت شدند و سپس در محیط آزاد قرار گرفتند.

اعمال تیمارها

تیمار اسید اسکوربیک با دو غلظت ۲/۵ و ۵ میلی مول انجام شد. بدلیل نقش احتمالی آسکوربات به عنوان هسته مرکزی برای تشکیل بلور ها، تیمار آن از نظر زمانبندی قبل از تیمار سایر تیمارها و ۱۵ روز بعد از کاشت گیاه و مشاهده ریشه دهی و استقرار گیاه در خاک بوده و در دو مرحله به فاصله یک هفته روی برگ‌های گیاه پاشیده شدند.

تیمارهای $CaCl_2$ استاندارد و خالص بصورت ۲۵ و ۵۰ درصد نمک‌های NaCl مصرفی برای تهیه Ec ها، برای هر تیمار نمک به همراه NaCl و همزمان با آن در یک لیتر آب مقطر حل شده و یک هفته بعد از تیمارهای اسید آسکوربیک به خاک اضافه گردید (جدول ۱).

جدول ۱: تیمارهای اعمال شده به گیاه سه گوش در تحقیق حاضر

بدون آسکوربات	Asc0	بدون کلرید کلسیم	Ca0	هدایت الکتریکی ۱	EC1
۲/۵ میلی مول آسکوربات	Asc2.5	کلرید کلسیم ۲۵ درصد NaCl	Ca25	هدایت الکتریکی ۸	EC8
۵ میلی مول آسکوربات	Asc5	کلرید کلسیم ۵۰ درصد NaCl	Ca50	هدایت الکتریکی ۱۲	EC12

سنجش ها

اندازه‌گیری یون‌های گیاه

مقدار ۵ گرم از برگ تازه گیاه را به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد داخل آون قرار داده شد و سپس ۸ ساعت دیگر در دمای ۷۰۰ درجه سانتی گراد در داخل کوره الکتریکی گذاشته و در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. در پایان مقدار سدیم و پتاسیم با استفاده از روش فلیم فتومتری (مدل دستگاه f.e ۴۰۵) اندازه گیری شدند (Williams and Twine,1960). سنجش میزان کلسیم با استفاده از ۱۰ گرم وزن خشک و تهیه خاکستر آن به روش کمپلکسومتری از طریق تیتراسیون با EDTA یک صدم نرمال انجام پذیرفت (منطقی، ۱۳۶۵).

اندازه‌گیری پرولین

۰/۲ گرم وزن تازه برگ در ۵ میلی لیتر اسید سولفو سالیسیلیک ۳٪ ساییده شد و به یک میلی لیتر ازآن ۱ میلی لیتر اسید نین هیدرین و ۱ میلی لیتر اسید استیک خالص اضافه شد. سپس به مدت یک ساعت در حمام آ ب گرم قرار داده شد. بعد ۲ میلی لیتر تولوئن به آن اضافه شد و پس از ۲۰ ثانیه تکان شدید جذب بخش رنگی بالایی در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد (Bates et al., 1973).

اندازه‌گیری مقدار قندها

مقدار ۰/۲ گرم ماده خشک برگ گیاه تهیه و به ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه شد و به مدت یک هفته در یخچال نگهداری گردید. برای ارزیابی قندهای محلول به ۲ میلی‌لیتر از آنها ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شده و ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس در طول موج ۴۸۵ نانومتر جذب آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومترخوانده شد (Helluburst and Craigie,1978).

اندازه‌گیری گلیسین بتائین

یک گرم از پودر خشک شده برگ گیاه در ٤٠ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل گردید و پس عبور از کاغذ صافی به نسبت ۱:۱ با اسید سولفوریک ۲N رقیق شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از آن ۰/٤ میلی لیتر از معرف یدید - یدین پتاسیم سرد اضافه شده، شدیداً ورتکس گردید. بعد نمونه‌ها در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. ۱ میلی لیتر از فاز بالایی با میکروپیپت جدا، با ۹ میلی لیتر ۱،۲ دی کلرو اتان مخلوط کرده، بعد جذب آن در طول موج ۳٦٥ نانومتر با دستگاه اسپکترو متر Visible–UV خوانده شد (Sairam et al., 2002).

اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل

۰/۲ گرم ماده خشک از برگ گیاه در یک بوته چینی به کمک ۰/۵ میلی‌لیتر با فرتریس خوب ساییده شد و بعد از ۵ دقیقه محتویات به درون لوله سانتریفوژ منتقل و دوباره با ۰/۵ میلی‌لیتر دیگر با فرتریس بوته‌چینی شسته شده و با دور ۵۰۰۰g سانتریفوژ شد. بخش رویی به یک لوله آزمایش منتقل گردید و به ۵۰ میکرولیتر از عصاره حاصل، ۹۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. به محلول فوق ۱ میلی‌لیتر از معرف لوری اضافه شد. سپس ۳ میلی‌لیتر معرف فولین به محلول فوق اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Lawry, et al., 1951) خوانده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

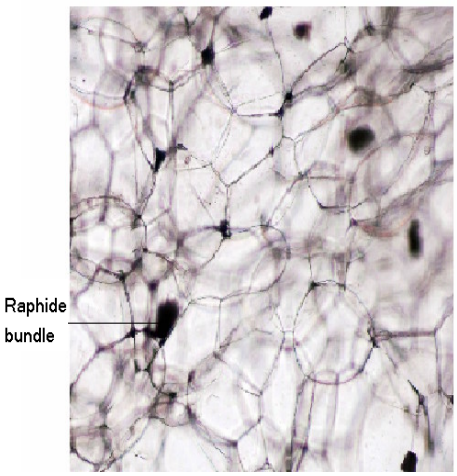
یک گرم از برگ گیاه توزین و در ٤ میلی لیتر محلول عصاره‌گیری شامل ۱/۲ گرم تریس، ۲ گرم اسید آسکوربیک، ۳/۸ گرم بوراکسی، ۵۰ گرم پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ و ۲ گرم Na_2 EDTA و در حجم ۱۰۰ میلی لیتر همگن گردید و بعد به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شد، سپس به مدت ۰/۵ ساعت در g ٤۰۰ سانتریفوز گردید. محلول بالایی برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. جذب نمونه در طول موج nm ۵۳۰ در دستگاه اسپکترو فتومتر بر حسب بر دقیقه بر گرم وزن تر به ازاء هر میلی‌گرم پروتئین خوانده شد (Chance and Maehly, 1995; Nickel and Cunningham, 1969).

تعداد دسته‌های رافید

شمارش تعداد دسته‌های رافید در مقطع عرضی برگ‌های گیاه در بزرگ نمای ۱۰ میکروسکوپ نوری انجام شد.

تعداد سوزن‌های رافید در لام نئوبار

برای شمارش تعداد سوزن‌های رافید، ابتدا از برگ‌های گیاه برش‌های یکسان برداشته و از محلول هموژنیزه آن برای در حجم میکروسکوپی ۰/۱ میلی متر مربع از لام نئوبار استفاده گردید.



شکل ۱: دسته‌های رافید برگ گیاه سه گوش

شکل ۲: سوزن‌های رافید گیاه سه گوش

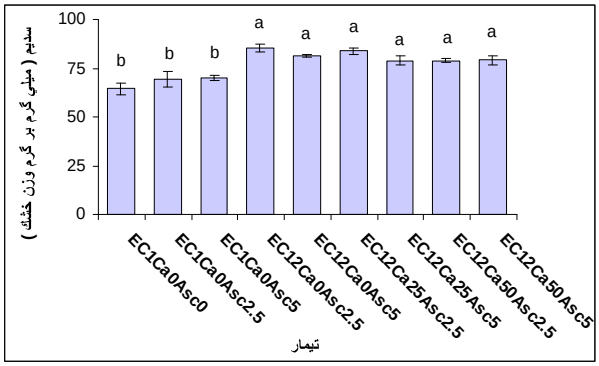
محاسبات آماری

محاسبات آماری داده ها با توجه به یک رقم از گیاه سه گوش و سه سطح شوری خاک، سه سطح غلظت کلرید کلسیم، سه سطح از غلظت‌های آسکوربات، بصورت فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی و با سه تکرار توسط نرم‌افزار SPSS انجام پذیرفت و مقایسه میانگین ها با استفاده از روش دانکن انجام شد. تنظیم متن و رسم شکل ها به ترتیب با استفاده از نرم افزارهای Word و Excel انجام شدند.

نتایج

سدیم

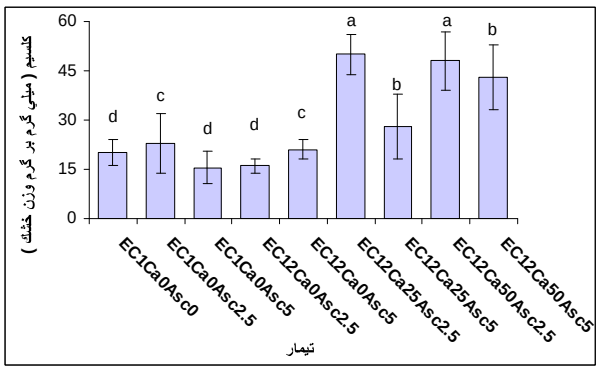
شکل ۳، تغییرات مقادیر سدیم برگ گیاه سه گوش را در شوری‌های مختلف خاک نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات مقدار سدیم جذب شده در مقایسه با تیمار شاهد (EC1Ca0Asc0) بطور معنی‌داری افزایش داشته است و تیمارهای کلسیمی و آسکوربات بر میزان جذب سدیم اثر کاهنده نداشته اند. این نتایج برای جذب کلر نیز مشابه بوده است (اطلاعات نشان داده نشده است).



شکل ۳: مقدار سدیم برگ‌های گیاه سه گوش در تیمارهای مختلف شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات.

کلسیم

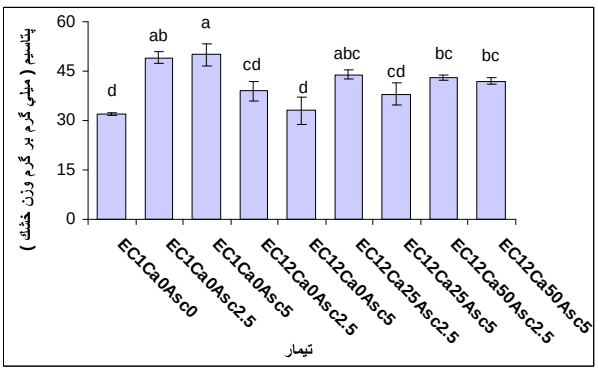
شکل ٤، تغییرات مقدار کلسیم را در برگ‌های گیاه سه گوش در شوری‌های مختلف خاک نشان می‌دهد. بطور کلی نتایج نشان می‌دهد که با افزایش شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات مقدار کلسیم جذب شده در مقایسه با تیمار شاهد (EC1Ca0Asc0) بطور معنی‌داری افزایش داشته است. در تیمارهای بدون کلسیم EC1Ca0Asc5، EC12Ca0Asc2.5 و EC12Ca0Asc5 افزایش معنی‌داری در میزان جذب و تجمع کلسیم در برگ ها مشاهده شد.



شکل ٤: مقدار کلسیم در گیاه سه گوش در تیمارهای مختلف شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات.

پتاسیم

شکل ٥، تغییرات مقدار پتاسیم را در برگ‌های گیاه سه گوش در شوری‌های مختلف خاک نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات مقدار پتاسیم جذب شده در مقایسه با تیمار شاهد (EC1Ca0Asc0) بطور معنی‌داری کاهش داشته است. بیشترین جذب پتاسیم در تیمار آسکوربات بدون کلسیم (EC1Ca0Asc2.5 و EC1Ca0Asc5) مشاهده شد که نشان می‌دهد آسکوربات در جذب پتاسیم در ریشه یا انتقال آن از ریشه به برگ ها و تجمع آن موثر است، ولی اثر آن در حضور CaCl2 و افزایش شوری کاهش می‌یابد.

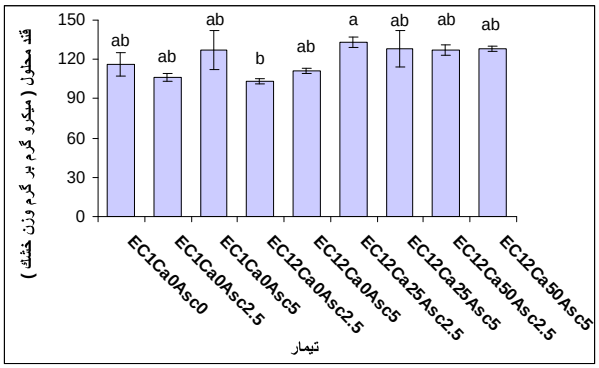


شکل ٥: مقدار پتاسیم در گیاه سه گوش در تیمارهای مختلف شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات.

قندهای محلول

شکل ٦، تغییرات مقدار قندهای محلول را در برگ‌های گیاه سه گوش در شوری‌های مختلف خاک نشان می‌دهد.

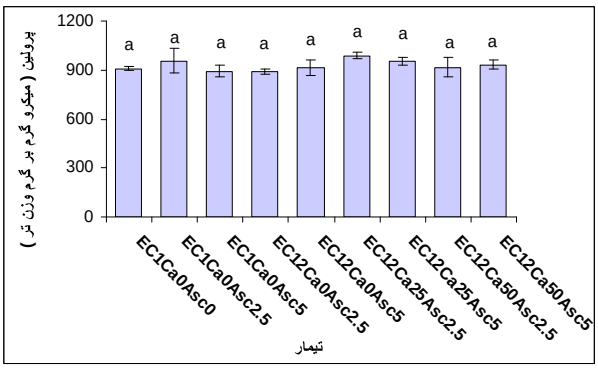
نتایج نشان می‌دهد که با افزایش شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات مقدار قندهای محلول جذب شده در مقایسه با تیمار شاهد (EC1Ca0Asc0) تفاوت معنی‌داری نداشته است. که نشان می‌دهد گیاه سه گوش در شرایط تنش شوری از قندهای محلول برای افزایش نیروی اسمزی استفاده نمی کند. یعنی آنکه افزایش شوری خاک تاثیر چندانی بر تولیدات قندی این گیاه در فتوسنتز نداشته است.



شکل ٦: مقدار قندهای محلول گیاه سه گوش در تیمارهای مختلف شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات.

پرولین

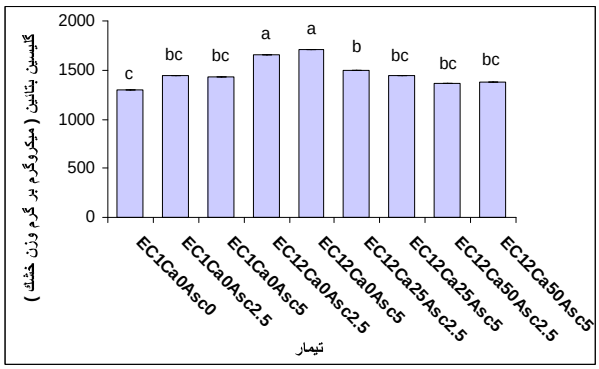
شکل ۷، تغییرات مقدار پرولین را در برگ‌های گیاه سه گوش در شوری‌های مختلف خاک نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات مقدار پرولین در مقایسه با تیمار شاهد (EC1Ca0Asc0) تفاوت معنی‌داری نداشته است. که نشان می‌دهد گیاه سه گوش در شرایط تنش شوری از پرولین بعنوان یک اسمولیت برای افزایش نیروی اسمزی استفاده نمی کند.



شکل ۷: مقدار پرولین گیاه سه گوش در تیمارهای مختلف شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات.

گلیسین بتائین

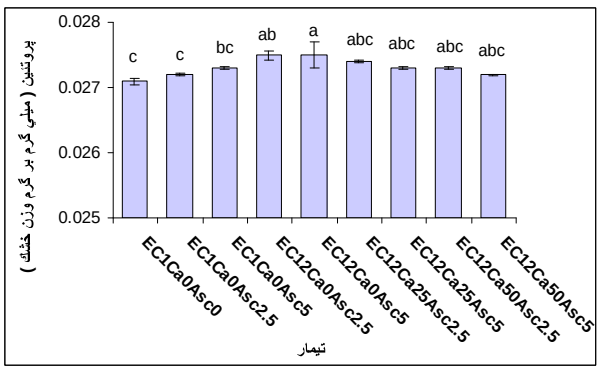
شکل ۸، تغییرات مقدار گلیسین بتائین را در برگ‌های گیاه سه گوش در شوری‌های مختلف خاک نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات مقدار گلیسین بتائین در مقایسه با تیمار شاهد (EC1Ca0Asc0) بطور معنی‌داری افزایش داشته است. بیشترین گلیسین بتائین در تیمارهای با شوری ۱۲ مشاهده گردید.



شکل ۸: مقدار گلیسین بتائین گیاه سه گوش در تیمارهای مختلف شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات.

پروتئین کل

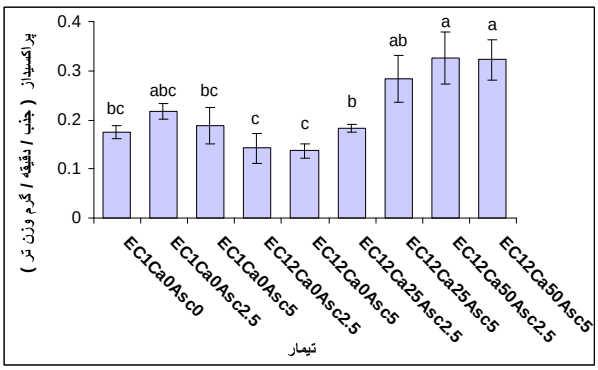
شکل ۹، تغییرات مقدار پروتئین کل را در برگ‌های گیاه سه گوش در شوری‌های مختلف خاک نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات مقدار پروتئین کل در مقایسه با تیمار شاهد (EC1Ca0Asc0) بطور معنی‌داری افزایش داشته است. بیشترین پروتئین کل در EC12 و در تیمارهای بدون کلسیم به آسکوربات ۲/۵ و ۵ میلی مول تولید گردید.



شکل ۹: مقدار پروتئین کل در گیاه سه گوش در تیمارهای مختلف شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات.

فعالیت آنزیم پراکسیداز

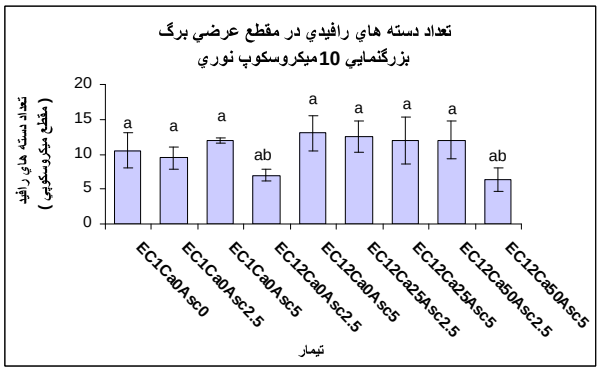
شکل ۱۰، میزان تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز را در برگ‌های گیاه سه گوش در شوری‌های مختلف خاک نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با تیمار شاهد (EC1Ca0Asc0) در برخی از تیمار ها افزایش معنی‌داری داشته است. بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در EC12 و در تیمارهای با کلسیم ۵۰ درصد و آسکوربات ۲/۵ و ۵ میلی مول تولید گردید. افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز EC12 در تیمارهای با کلسیم بالاتر یعنی EC12Ca50Asc2.5 و EC12Ca50Asc5 مشاهده شد، که نشان می‌دهد نیاز کلسیمی برای بهبود فعالیت این آنزیم جهت پاک سازی انواع اکسیژن فعال در شوری‌های مختلف با افزایش شوری افزایش می‌یابد.



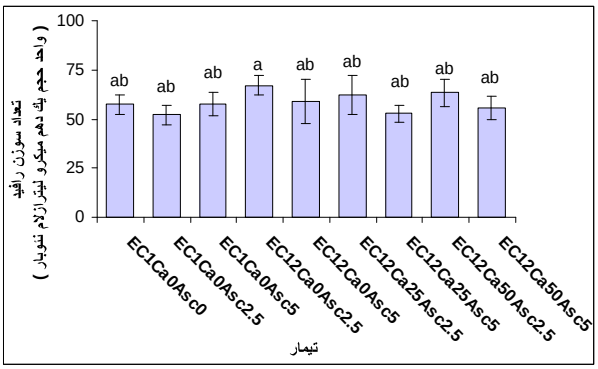
شکل ۱۰: فعالیت پراکسیدازی گیاه سه گوش در تیمارهای مختلف شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات.

تعداد دسته‌های رافید

شکل ۱۱ و ۱۲، به ترتیب تعداد دسته‌های رافید را در مقطع عرضی برگ‌های گیاه سه گوش و تعداد سوزن‌های رافید را در حجم یک دهم میکرو لیتر از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ نوری و در شوری‌های مختلف خاک نشان می‌دهند. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات تعداد دستجات رافیدی در مقطع عرضی گیاه سه گوش و تعداد سوزن‌های رافید در واحد حجم در مقایسه با تیمار شاهد (EC1Ca0Asc0) تغییرات معنی‌داری نداشته‌اند. این نشان می‌دهد که تشکیل رافیدها در گیاه سه گوش در شرایط آزمایش اخیر چندان به شوری خاک، غلظت کلسیم و آسکوربات وابستگی ندارد و از روند تفاوت‌ها معنی فیزیولوژیک خاصی قابل اقتباس نبوده است.



شکل ۱۱: تعداد دسته‌های رافید برگ گیاه سه گوش در تیمارهای مختلف شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات



شکل ۱۲: تعداد سوزن رافید برگ گیاه سه گوش در تیمارهای مختلف شوری (EC)، $CaCl_2$ و آسکوربات.

بحث

همانطور که از نتایج مشخص است شوری خاک باعث افزایش جذب Na^+ و Cl^- (اطلاعات کلر نشانداده نشده است) توسط گیاه سه گوش شده است (شکل ۳). همین نتیجه در آزمایشات دیگر (Drennan and Zakrzewski, 2005) بدست آمده است. مطالعات حاکی از آن است که شوری بالای خاک موجب جذب بالای Na^+ توسط گیاهان می‌شود و از این طریق باعث کاهش رشد می‌گردد. کاهش رشد به علت اثر شوری بر میزان تولید ماده خشک، روابط یونی، میزان آب، واکنش‌های و ترکیبات بیوشیمیایی و فاکتورهای فیزیولوژیکی گیاه است (Zajicek et al.,1999). امروه اثرات متقابل بین Na^+ و Ca^{+2} (Rengel, 1992) و اثر ممانعت کننده آسکوربات بر جذب بالای Na^+ و Cl^- (دیانسانی، ۱۳۸٦) مشخص شده

است. مطالعات نشان می‌دهد که از اثرات مهم Na^+ تخریب غشاء است که در محیط شور با جانشینی Na^+ به جای Ca^{+2} در غشاها اعمال می‌گردد (Cramer et al., 1985 ; Lynch et al., 1987) و غلظت بالای Ca^{+2} از سلول ها محافظت می‌کند (Perera et al., 1995). اخیراً مشخص شده است که Ca^{+2} خارجی علائم تنش شوری را در تعدادی از گونه‌های گیاهی بهبود می‌بخشد. اضافه کردن Ca^{+2} تحت شرایط تنش شوری از اتصال Na^+ به دیواره سلول و غشاء پلاسمایی می‌کاهد (Stassart et al., 1981). بنابر این جذب بیشتر Ca^{+2} (شکل ٤) میتواند بعنوان یک مکانیزم مقاومت در برابر شوری و اضافه سازی کلسیم بعنوان عامل تعدیل کننده اثرات شوری باشد (Wright et al., 1993 ; Rengel,1992). یون‌های اصلی خاک‌های شور شامل Na^+ و Cl^- در شرایط شوری بر جذب مواد غذایی از طریق اثر متقابل رقابتی و یا نفوذپذیری انتخابی یون ها در غشاءها اثر می‌گذارند. برای مثال یون Na^+ کمبود یون K^+ را در گیاه القاء می‌کند (شکل ٥) و مطالعات بسیاری حاکی از کاهش غلظت یون K^+ در گیاه تحت شرایط تنش شوری می‌باشند (Grattan and Grieve, 1992; Francisco et al., 2002). کاهش K^+ در گیاه به دلیل فرایند رقابتی آن با Na^+ در ریشه گیاهان به خوبی شناخته شده است (Mittal and Dubey, 1991). ولی افزایش مقدار K^+ در برگ‌های برخی از گیاهان تحت تنش مشاهده شده است (Garcia-Lidon et al., 1998). یکی از آثار شوری در گیاه کاهش فعالیت فتوسنتزی در آن است که حاصل کاهش مقدار کلروفیل (Tari et al., 2002; Francisco et al., 2002)، کاهش جذب CO_2 و ظرفیت فتوسنتز (Francisco et al., 2002) می‌گردد. کاهش میزان کلروفیل در گیاهان مقاوم به شوری یا گیاهان شوری پسند اتفاق نمی افتد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (اطلاعات کلروفیل ها نشانداده نشده است). آزمایش روی ۱۰ ژنوتیپ گندم نشان داد که مقاومت به تنش خشکی با افزایش کلروفیل a+b همراه بوده است (Shao et al., 2005). از تولیدات مهم فتوسنتز در گیاهان تولید قندهای محلول است. چنانچه در شکل ٦ مشخص شده است میزان تولید قندهای محلول تحت تاثیر تیمارهای مختلف شوری، اضافه سازی کلسیم و آسکوربات تغییر معنی‌داری نداشته است. این بدان معنی است که سیستم فتوسنتزی گیاه تحت شرایط تحقیق حاضر از مقاومت کافی برخوردار بوده و در نتیجه منجر به کاهش تولید قندهای محلول نشده است. همچنین میتوان بیان داشت که گیاه از قندهای محلول بعنوان مکانیزمی برای افزایش نیروی اسمزی یا افزایش مقاومت استفاده ننموده است. تغییرات مشابه با قندهای محلول برای تولید پرولین بعنوان یک اسمولیت اتفاق افتاده است (شکل ۷). که توسط برخی از گزارشات تائید می‌شود و افزایش پرولین در شرایط تنش شوری و کاهش آن با اضافه سازی $CaCl_2$ گزارش شده است (Smith et al., 2002). در حالیکه تغییرات معنی دار میزان گلیسین بتائین در تیمارهای مختلف شوری، کلسیم و آسکوربات (شکل ۸) حاکی از آن است که گیاه از استراتژی تولید گلیسین بتائین استفاده می‌نماید (Larher et al., 1996). در مطالعات اسمیت و همکاران (۲۰۰۲) افزایش میزان گلیسین بتائین در تیمار توام NaCl و $CaCl_2$ مشاهده شده و افزایش آن حتی از تیمار NaCl به تنهایی هم بیشتر بوده است و تولید گلیسین بتائین در تیمار $CaCl_2$ نسبت به شاهد بالاتر بوده است (شکل ۸). مشخص شده است محلول‌های سازشی مانند پرولین و گلیسین بتائین بعنوان محافظان اسمزی برای پروتئین‌ها عمل می‌کنند (Gorham 1995; Bohnert and Jenson, 1996). بنابراین گونه‌های مقاوم میتوانند در شرایط شوری به افزایش پروتئین بعنوان یک مکانیزم مبادرت ورزند از اینرو افزایش میزان پروتئین کل در ازای افزایش تنش شوری فرایندی معنی دار محسوب می‌شود (شکل ۹). مطالعه کولتیوارهای حساس به پنبه نشان می‌دهد که پروتئین کل در گیاه تحت تنش شوری قرار می‌گیرد و مقدار آن از شاخص‌های فیزیولوژیک است ولی مقدار آن تحت تنش شوری کاهش می‌یابد (Bruria and Arie, 1988). افزایش میزان پروتئین در گیاهان با توان فیزیولوژیک بالاتر مشاهده می‌گردد. انواع اکسیژن فعال برای سلول بسیار واکنش‌گر و سمی هستند و در غیاب یک مکانیسم حفاظتی قوی ایجاد شده، به متابولیسم عادی لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه می‌زنند و مخصوصاً باعث پراکسیداسیون

لیپیدهای غشاء می‌شوند (Fridovich, 1986; Davies, 1987). فعالیت پراکسیدازی در گیاهان تحت تنش شوری افزایش می‌یابد و برخی از موارد وابسته به کولتیوار است (Bruria and Arie, 1988). در گیاه سه گوش فعالیت پراکسیدازی با افزایش شوری افزایش داشته است (شکل ۱۰). در سویا نتایج مشابه در تیمارهای آسکوربات و شوری بدست آمده است که در آن با افزایش نمک فعالیت پراکسیدازی افزایش داشته و با حضور آسکوربات کاهش آن مشاهده شده است (دیانسانی، ۱۳۸٦). از آنجایی که در تیمار با EC معادل ۱۲ در تیمارهای فاقد کلسیم کاهش نشان داد (حتی کمتر از شاهد). بنابر این میتوان گفت فعالیت این آنزیم در شرایط تنشی مختلف متغییر می‌باشد. شاید علت آن باشد که نوع غالب اکسیژن فعال تولید شده در گیاه تغییر می‌کند. همچنین نتایج نشان داد با افزایش شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات تعداد دستجات رافیدی در مقطع عرضی گیاه سه گوش و تعداد سوزن‌های رافیدی در واحد حجم لام نئوبار (شکل‌های ۱۱ و ۱۲) در مقایسه با تیمار شاهد (EC1Ca0Asc0) تغییرات معنی‌داری نداشته است. این نشان می‌دهد که تشکیل رافید ها در گیاه سه گوش در شرایط آزمایش اخیر چندان به شوری خاک، غلظت کلسیم و آسکوربات وابستگی نداشته است. البته بین تیمارهای مختلف شوری (EC)، تیمار کلسیمی ($CaCl_2$) و آسکوربات از نظر تعداد دستجات رافیدی و تعداد سوزن‌های رافیدی در واحد حجم اختلاف معنی‌داری وجود داشت، ولی از روند تفاوت ها معنی فیزیولوژیک خاصی قابل اقتباس نبوده است. مطالعه روی گوجه فرنگی در محیط NaCl (۳۰۰ ml، ۹ ساعت) نشان داد که اضافه سازی گلوکز، گلیسین بتائین، لوسین و پرولین به محیط ریشه به مقدار ۰/۵ میلی مول بر بقای گیاهچه بی تاثیر بوده و یا تاثیر اندکی داشته است، ولی در حضور آسکوربات تا ۵۰ درصد افزایش داشته است، این نشان می‌دهد که آسکوربات بیشتر از آنکه نقش سوبسترای آلی یا انرژی متابولیسم تنفسی داشته باشد، فعالیت آنتی اکسیدانی دارد (Neumann and Shalata, 2001). اما گزارش شده است که اسید اسکوربیک در شروع تشکیل بلورهای اگسالات کلسیم بعنوان هسته مرکزی نقش ایفا می‌کند (Horner et al., 2000). بسیاری از گیاهان کلسیم زیادی جذب شده از محیط را به صورت نمک غیر محلول مانند اکسالات کلسیم ذخیره می‌سازند (Franceschi and Loewus, 1995). تولید کلسیم اکسالات سلول های گیاهی در پاسخ به مقادیر مازاد بر نیاز کلسیم القا می‌شود و در واکوئل سلول‌هایی بنام ایدیوبلاست ذخیره می‌گردد که برای این کار اختصاص یافته‌اند (Keates et al., 2000) لذا پیشنهاد شده است که مسیر سنتز کلسیم اکسالات در گیاهان میتواند با افزایش کلسیم القا شود. مورفولوژی بلورهای اکسالات کلسیم در گیاهان مختلف متفاوت است و در گونه‌های مختلف گیاهی مورفولوژی خاصی (Baran and Monje, 2002) از آن به نمایش گذاشته می‌شود. محقق در آزمایشگاه فیزیولوژی و زیست گیاهی واحد گرگان بعنوان یک تجربه عملی وجود اکسالات کلسیم در واکوئل های گیاه *Carpobrotus edulis* به شکل خاص رافید (Raphides) مشاهده کرده است (شکل ۱ و ۲). در گیاهان دیگر نیز اشکال مورفولوژیکی دیگری از اکسالات کلسیم مانند منشوری، شنی و دروس یا ماکل وجود دارد (Franceschi and Horner. 1980). مکانیزمی که گیاه از طریق آن مورفولوژی بلورهای اکسالات را تعیین می‌کند هنوز مشخص نشده است (Nakata and Mcconn, 2002). ولی به نظر می‌رسد عوامل مختلف محیطی خصوصا تنش‌های نمکی بر میزان و مورفولوژی تشکیل آن موثر می‌باشند که از جمله آنها تنش املاح مانند غلظت بالای سدیم و کلسیم (Abdelmottaleb, 1989) هستند. اگر چه در تحقیق حاضر چنین نتیجه ای حاصل نشده است.

نتیجه‌گیری نهایی

تیمارهای $CaCl_2$ و آسکوربات در تنش شوری بر میزان جذب سدیم و کلر در گیاه سه گوش اثر کاهنده ندارند. بیشترین جذب پتاسیم در تیمار آسکوربات و بدون کلسیم مشاهده شد که نشان داد آسکوربات در جذب پتاسیم در ریشه یا انتقال آن از ریشه به برگ‌ها و تجمع آن موثر است، ولی اثر آن در حضور $CaCl_2$ و افزایش شوری کاهش می‌یابد. این گیاه در شرایط تنش شوری از قندهای محلول و پرولین به عنوان یک اسمولیت برای افزایش نیروی اسمزی استفاده

نکرد. با بیشترین گلیسین بتائین در تیمارهای با شوری ۸ و ۱۲ مشاهده گردید که نشان می‌دهد گیاه از استراتژی تولید گلیسین بتائین استفاده می‌کند و از استراتژی تولید پرولین استفاده نمی‌کند. مشخص گردید که نیاز کلسیمی برای بهبود فعالیت آنزیم پراکسیداز در شوری‌های مختلف، متفاوت است و با افزایش شوری افزایش می‌یابد. نوع بلورهای اکسالات کلسیم در این گیاه فقط از نوع رافید بوده است و تعداد دسته‌های رافید در مقطع عرضی برگ‌های گیاه سه گوش و تعداد سوزن‌های رافید در واحد حجم تفاوت معنی‌داری نداشتند و تغییرات این فاکتور از روند فیزیولوژیکی خاصی تبعیت نکرد و نشان داد تعداد دسته‌های رافید و سوزن‌های رافیدی در گیاه سه گوش در تحقیق حاضر چندان به شوری خاک، غلظت کلسیم و آسکوربات وابستگی ندارد.

منابع

دیانسانی، آ. (۱۳۸٦). بررسی اثر آسکوربات بر تنش اکسیداتیو حاصل از تنش شوری و نیز پاسخ مورفوفیزیولوژی گیاه سویا. پایاننامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان. ٥٦-٩٤.

منطقی، ن. (۱۳٦٥). تشریح روش ها و بررسی‌های آزمایشگاهی روی نمونه‌های خاک و آب. موسسه تحقیقات خاک و آب. نشریه شماره ١٦٨.

Abdelmottaleb A.M. (1989). Ultrastructural and biochemical studies on formation of calcium oxalate in plants. Thesis (Ph. D.). Washington State Univ., Pullman, WA (USA).

Baran, M. and Monje, P.V. (2002). Characterization of Calcium Oxalates Generated as Biominerals in Cacti. Plant Physiol. 128 (2): 707–713.

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

Bohnert, H.J., and Jensen, R.G.(1996). Strategies for engineering Water stress tolerance in plants. Trends in Biotechnolegy, 14: 89-97.

Bruria H, Arie N. (1998). Physiological response of potato plants to soil salinity and water deficit, Plant Sci. 137: 43-51.

Chance B., Maehly C. (1995). Assay of Catalase and Peroxidase , Methodes Enzymol. 11: 764- 775.

Cramer, G.R., Lauchli, A., Polito, V.S. (1985). Displacement of Ca^{+2} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? Plant Physiology. 47: 207-211.

Davies, K.J.A. (1987). Protein damage and degradation by oxygene radicales, I. General Aspects. J. Biol. Chem. 262. 9895 – 990.

Drennan, M. P., and Zakrzewski, L. M. (2005). Carpobrotus edulis (L.) N.B.BR: Implications for its spread into the Ballona Wetlands. Department of Biological, Loyola Marymount Unit. Los Angeles, CA 90045.

Flower, T. J. and Yeo, A. R. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants : where next, Aust. J. Plant Physiol, 22: 875 – 885.

Franceschi, V. R., Horner H. T. (1980). Calcium oxalate crystals in plants. Bot. Rev. 46: 361–427.

Franceschi, V. R. Loewus, F. A. (1995). Oxalate biosynthesis and function in plants. In : Khan SR., editor. Calcium Oxalate in Biological Systems. Boca Raton, FL: CRC Press; pp. 113–130.

Francisco, G., Jhon, L., Jifon, S., Micaele, C., Tames, P.S., (2002). Gas exchange, chlorophyll and nuntrient content in relation to Na+ and Cl^{-} accumulation in “sunburst” mandarine grafted on different root stocks. Plant Sci. 35: 314-320.

Fridovich, I., (1986). Biological effects of the superoxide radical. Arch. Biochem. Biophys. 247: 1-11.

Garcia– lidon, J.M. , Ortis, J.M., Garcia– legaz, M.F., Cerda A.,(1998). Role of reotstock , and scion on root and leaf in accumulation in lemon trees grown under saline condition , Fruites, 53 : 89-97.

Gorham , J. , (1995). Mechanisms of salt tolerance in halophytes. In : Chouker-Allah, C.V., Malcolm, C.V., Hamdy, A.(Eds), Halophytes and Biosaline Agriculture. Marced Dekker, New Yourk, pp. 207-223.

Grattan S. R., Grieve C. M. (1992). Mineral element acquisition and growth response of plant grown in saline environment, Agric. Ecosyst. Envir. 38 : 275-300.

Helluburst J. A. and Craigie J.S. (1978). Handbook of Physilogical and Biochemical Method. Cambridge Univ. Press.

Horrner H.T., Kausch A.P., Wagner B.L. (2000). Ascorbic acid : A precursor of oxalate in crystal idioblasts of Y*ucca torreyi* in liquid root culture.

Rengel, Z. (1992). The role of Ca^{+2} in salt toxcity. Plant Cell and Envronment, 15: 625-632.

Sairam, R.K., Rao K.V., Srivastava G.C. (2002). Diferential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Sci.163: 1037 - 1046.

Shao, H.B., Liang, Z.S., Shao, M.A., and Wang, B.C., (2005). Changes of anti-oxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficit among 10 wheat genotypes at seedling stage. Colloids surf B Biointerface, 42(2): 107-113.

Smith, B.N. Girija, C., Swamy, P.M. (2002). Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycine betaine in peanut (*Arachis hypogea* L.). Environmental and experimental Botany. 47: 1-10.

Stassart, J.M., Neirncks , L. and Dejaegere , R.(1981). The interactions between monovalent cations and Ca^{+2} during their absorption on isolated cell walls and absorption by intact barley roots. Annals of Botany, 47: 647-652.

Tari, I., Csiszar, J., Szalai, G., Horvath, F., Pcsvaradi, A., Kiss, G., Szepesi, A., Szabo, M., Erdei, L.(2002). Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatmemt. Acta Biologica Szegediensis, Proceedings of the 7th Congress on plant physiology, 46, p. 55-56.

Williams, S. and Twine, N. (1960). Flame photometric method for sodium, potassium and calcium in modern methods of plant analysis by K. peach and M V Tracey, Vol, V, Springer , Verlag, Berline.

Wright, G.C., Patten, K.D., Drew, M.C.(1993). Gas exchanges and chlorophyll content of tifblue rabbiteye and sharpblue southern highbush blueberry exposed to salinity and supplement calcium. J. Am. Soc. Hertic. Sci. 118 : 456-463.

Zajicek, J., Sohan, D., Jasoni, R. (1999). Plant - water relation of NaCl and calcium treated sunflower plants. Environmental and experimental Botany. 42 : 105-111.

International Journal of Plant Science 161: 861–868.

Keates, S.A., Tarlyn, N., Loewus, F.A., Franceschi, V.R. (2000). L-Ascorbic acid and L-galactose are sources of oxalic acid and calcium oxalate in Pistia stratiotes, Phytochemistry 53 , pp. 433–440

Larher, F., Rotival – Garnier, N., Lemesle P., Plasman, M., Bouchereau, A. (1996). The glycinebetaine inhibitory effect on the osmoinduced proline response of rape leaf discs. Plant Science.113 : 21-31.

Lawry O.D., Reserbrough N., Foil A. L. and Romdall R.J. (1951). Protein measurment with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Lynch, T., Cramer, G.R., Lauchli, A. (1987). Salinity reduces membrane-associated calcium in corn root protoplast. Plant Physiology. 83 : 390-394.

Maribel, L. D–S., Satoshi, T., (1998). Antioxidant response of rice seedling to salinity stress. Plant Sci , BS : 1-9.

Mittal R., Dubey R. S. (1991). Behaviour of peroxidase in rice : Changes in enzymes activity and isoforms in relation to salt tolerance, Plant Physiol. Biochem. 19: 31- 40.

Mohammad, B., Kinet, J-M., Lutts, S.(1998). Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding cal (U) cultures. Plant Sci. 137: 131-142.

Nakata, P.A and Mcconn, M.M. (2002). Calcium Oxalate Crystal Morphology Mutants From *Medicago Truncatula*. Planta. 215(3): 380-386.

Nickel, R.S., and Cunningham, B.A. (1969). Improved peroxidase assay method and application to comparative measurments of peroxidase catalysis. Ann. Biochem. 27: 292-299.

Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., and Hanson, A. (1999). Metabolic engineering of plant for osmotic stress resistance. Curr. Opin . plant Biol. 2: 128-134.

Neumann, P.M., Shalata, A.(2001). Exogenous ascorbic acid (Vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany. Vol. 52, No. 364, pp, 2207-2211.

Perera, L.K.R.R., Robinson, M.F., Mansfield, T.A.(1995). Responses of the stomata of *Aster trifolium* to calcium and sodium ions in relations to salinity tolerance. J. Exp. Bot. 46 : 623-629.

The study of salty stresses (NaCl & $CaCl_2$) and ascorbic acid on physiological charecterestics of *Carpobrotus edulis* L.

Rezaei, M.A[1]., Hosseini, S.Z[2]., Safaei, M[2]., Amirlatifi, F[3].

1. Department of biology, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran.
2. Member of Yong Researchers Club, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Iran.
3. Islamic Azad University, Gorgan Branch, Iran.

Abstract

In order to study of effects of salinity stress on Ice plant (*Carpobrotus edulis* L.), three kind of soil with 1, 8 and 12ds/m selected for poted experiments. Before NaCl and $CaCl_2$ treatments and after vegetative generation, ascorbate was treated in two concentrations of 2.5 and 5 mmol. $CaCl_2$ treatments supplemented as 25 and 50 percent of salt treatment. Results indicated that with increasing of salinity (EC), calcium and ascorbate treatments, Na^+, Cl^-, Ca^{+2} and K^+ of leaves increased significantly, in comparison with control. $CaCl_2$ and ascorbate treatments have no diminishing effects on salinity stress intensity and Na^+ absorption. Plant did not use soluble sugar and proline as an osmolyte for increasing osmotic pressure. Glycine betaine and total protein contents increased with increasing of salinity stress and plant got included among plants with the strategy of production and accumulation of glycine betaine and did not use proline. Suitable need of calcium for amelioration of peroxidase activity for scavenging of reactive oxygen species was different in salinities. Calcium oxalate and raphide morphology and raphide bundles number in cross section of leaves and raphides needles number in volume unit had no specific physiological trend and did not change significantly and was not affected by soil salinity, calcium concentration and ascorbate treatments.

Key words: Ascorbate, Calcium, Glycine Betaine, Ice Plant, Peroxidase, Proline, Raphide, Salinity, Soluble Sugar, Total Protein