مجله علوم دانشگاه تهران
جلد سی‌ام (۱۳۸۳) شماره ۳ (۴۰۱-۳۹۳)

اثر تنش شوری بر فعالیت سینتیکی آنزیم نیترات ردوکتاز در دو رقم گندم

فریبا میقانی[۱]، حسن ابراهیم زاده[۲]
۱- مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی
۲-دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
(دریافت: ۸۱/۱۱/۲۷ ؛ پذیرش:۸۲/۴/۴)

چکیده

اثر تیمارهای متفاوت شوری سدیم کلرید (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی مولار) در مراحل مختلف رشد و نمو (پنجه‌زنی، تورم غلاف، گلدهی و گرده افشانی) دو رقم گندم (قدس: حساس به شوری؛ بولانی: مقاوم به شوری) بر فعالیت سینتیکی آنزیم نیترات ردوکتاز برگ در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. درمجموع، در پاسخ به تیمارهای شوری مشاهده شد که کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز برگ و ریشه قدس قابل ملاحظه‌تر از بولانی است. شاید کده‌بندی افتراقی (differential compartmentation) یون‌ها و نیترات ردوکتاز و انباشتگی کمتر سدیم در رقم مقاوم به شوری، عامل حفظ این آنزیم در برابر سدیم کلرید، باشد. مؤلفان مقاله حاضر در پژوهش دیگری دریافتند که در پاسخ به تیمارهای شوری، سدیم بیشتری در قدس نسبت به بولانی، انباشته می‌گردد. بنابراین، یکی از علل بیوشیمیائی مقاوم‌تر بودن بولانی را به شوری درمقایسه با قدس، می‌توان افت کمتر فعالیت نیترات ردوکتاز در اندامهای بولانی در پاسخ به شوری دانست.

واژه های کلیدی: *تنش شوری، فعالیت سینتیکی، آنزیم نیترات ردوکتاز، گندم*

مقدمه

نیتـرات ردوکتـاز(NR)، آنـزیم تنظیمـی و محـدود کننـده میـزان در مصـرف نیتـرات اسـت و عملکردهای کاتالیزوری آن مورد بررسیهای متعددی قرار گرفتـه اسـت. درگیاهـان عـالی، یـک کمپلکس اولیگومری وابسته به NAD(P)H محتوی FAD، هِم (سیتوکروم b۵۵۶) و یک گـروه مولیبدن- پترین پروستتیک است. حضور سه شکل مولکولی نیترات ردوکتاز در ریشه‌های گندم ثابت شده است (Kenjebavea and Rakova,1995). نیترات ردوکتاز یک عامل محدود کننـده رشد و نمو و تولید پروتئین درگیاهان معرفی می‌شود. این آنزیم تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد. بررسیهای فیزیولوژیکی بیانگر سیستم تنظیمی پیچیده‌ای است کـه بیـان ژن نیتـرات ردوکتاز را درپاسخ به علائم محیطی کنتـرل مـی‌کنـد (Botella *et al*., 1993). فعالیـت آنـزیم نیترات ردوکتاز در پاسخ به دمای پائین، شوری یا تنش اسمزی بسرعت تغییـر مـی‌کنـد. البتـه اینکه چگونه فعالیت این آنزیم در پاسخ به تنشهای متفاوت تنظیم می‌شود، هنوز شناخته نشده است. برحسب گونه، گیاهان عـالی دارای ۴-۱ ژن بـرای رمزگـذاری نیتـرات ردوکتـاز هسـتند (Bungard *et al*., 1999). یافته‌هـای محـدودی دربـاره اثـر سـدیم کلریـد بـر فعالیـت NR در دسترس است (Botella *et al*., 1993) زیرا گزارشهای مربوط به اثر شوری بر فعالیت این آنـزیم پیچیده‌اند (میقانی، ۱۳۷۴).

پژوهش حاضر دو هدف را دنبال می‌کند: الف) بررسی اثر شوری بر فعالیت سـینتیکی آنـزیم نیترات ردوکتاز رقمهای قدس و بولانی و ب) ارزیـابی نقـش آنـزیم نیتـرات ردوکتـاز در القـای مقاومت به شوری در قدس و بولانی (بعنوان رقمهای به ترتیـب حسـاس و مقـاوم بـه شـوری). مقاله حاضر، تاکنون نخستین گزارش درباره اثر شوری بر فعالیت آنزیم مذکور در رقمهای فـوق در ایران محسوب می‌شود.

مواد و روشها

الف) کشت گلخانه‌ای: برای انجام پژوهش حاضر دو رقـم گنـدم (قـدس: حسـاس بـه شـوری؛ بولانی: مقاوم به شوری) از انبار غلات واقع در مؤسسـه تحقیقـات تهیـه و اصـلاح نهـال و بـذر انتخاب شدند. کشت بذرها در گلدانهای پلاستیکی محتوی سه کیلوگرم مخلـوطی از خـاک بـا بافت متوسط، ماسه و کود به نسبت بترتیب ۱:۱:۲ انجام گرفت (Rascio *et al*., 1992). گلدانها درگلخانه‌ای با شرایط کنترل شده (دمای: ۲۵-۲۰ درجه سـانتی‌گـراد، شـدت روشـنائی: ۳۵۰۰ لوکس، دوره روشنائی: ۱۶/۸ ساعت، رطوبـت نسـبی: ۴۵-۴۰ درصـد) نگهـدای شـدند. درطـی پنجه‌زنی و تورم غلاف، گیاهان با محلول غذائی محتوی ppm ۲۰۰ نیتروژن، ۹۲ppm فسـفر و

۲۰۰ppm پتاسیم آبیاری شدند (Yeker and Weller, 1996). چهار تیمار شوری، علاوه بر شاهد (بدون سدیم کلرید) درنظر گرفته شد: ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار سدیم‌کلرید (Huang *et al*., 1993). گیاهان در مراحل پنجه زنی، تورم غلاف، گلدهی و گرده افشانی تحت تاثیر تیمارهای شوری قرار گرفتند. مطابق Zadoks (۱۹۷۴) این مراحل بترتیب ۲۲، ۴۵، ۵۸، ۶۹ روز پس از بذر افشانی (day after sowing 1DAS) بودند.گیاهان پس از یک هفته رشد در خاک شور برداشت شدند. نمونه‌برداری از برگ ششم (۲۲ روز پس از بذر افشانی)، برگ هفتم (۴۵ روز پس از بذر افشانی) و برگ پرچم (۵۸ و ۶۹ روز پس از بذر افشانی) انجام گرفت.

ب) استخراج پروتئین: بافرفسفات (۰/۱ مولار، pH =۷/۵) ، EDTA (۱ میلی مولار)، دی تیوترئیتول (۱ میلی‌مولار) و کازئین (۲/۲ درصد؛ وزن به حجم) به نسبت ۱:۳ مورد استفاده قرار گرفت (Gomori, 1995). پس از استخراج پروتئین در سردخانه با دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد و سانتریفوژ نمونه‌ها با دستگاه سانتریفوژ یخچالدار Beckman مدل J_2=21M (با دور ۲۹۲۰۰g، مدت ۴۵ دقیقه، دمای ۴-۲ درجه سانتی گراد) (صبورا، ۱۳۷۴) محلول روشناور برای سنجش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز مورد استفاده قرار گرفت.

ج) سنجش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز: بدین منظور از معرف زیر استفاده شد:

بافرفسفات (۷/۵ = pH ، ۱M)	۰/۱ میلی لیتر
NADH (1mg/ml)	۰/۱ میلی لیتر
پتاسیم نیترات (M ۰/۱)	۰/۲ میلی لیتر
آب مقطر	۱/۲ میلی لیتر
عصاره آنزیمی	۰/۱ میلی لیتر

لوله‌های آزمایش محتوی مواد فوق ۲۰ دقیقه در حمام ۲۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. واکنش با افزودن ۱ ملی لیتر سولفانیلامید (۱ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر کلریدریک اسید نرمال) متوقف شد . ۵ دقیقه بعد، ۱ میلی‌لیتر N- نفتیل اتیلن دی‌آمین دی‌کلرید (w/v، ۰/۰۱ ٪) اضافه شد و پس از ۵ دقیقه، نمونه‌ها سانتریفوژ شدند (با دورg. ۲۹۲۰ ، مدت ۱۵ دقیقه، دمای۲ درجه سانتی گراد). منحنی تغییرات جذب در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu (مدل UV-160) خوانده شد. فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز بصورت µmol NO2-h-1g-1FW بیان گردید (Botella *et al*., 1993).

د) بررسی آماری داده‌ها: آزمایش بصورت فاکتوریل درقالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. در این آزمایش تیمارهای شوری (۵ تیمار) بعنوان فاکتور A ، ارقام گندم (دو رقم) بعنوان فاکتورB ، و مراحل مختلف رشد و نمو (۴ مرحله) بعنوان فاکتور C بودند. داده‌های

آزمایش با استفاده از روش تجزیه واریانس مورد تحلیل قرار گرفتند. سپس میانگین‌های حاصل از ۳ تکرار با استفاده از روش دانکن مقایسه شدند.

نتایج

الف) مرحله پنجه زنی: ۲۲ روز پس از بذر افشانی، فعالیت سینتیکی نیترات ردوکتاز برگ ششم قدس (به جز در تیمار۳۰۰) و بولانی در پاسخ به شوری افزایش یافت (p < ۰/۰۵) . فعالیت نیترات ردوکتاز برگ در تیمار۳۰۰ در قدس و بولانی بترتیب ۴۹٪ کاهش و ۱/۵ برابر افزایش نشان داد (شکلهای۱و۲) .

فعالیت نیترات ردوکتاز ریشه درحضور تنش شوری کاهش یافت (p< ۰/۰۵) . در تیمار ۳۰۰ این فعالیت در ریشه قدس و بولانی بترتیب تا ۵۲٪ و ۵۴٪ شاهد کاهش نشان داد (شکلهای۳و۴).

ب) مرحله تورم غلاف: ۴۵ روز پس از بذر افشانی، فعالیت نیترات ردوکتاز برگ هفتم، رابطه‌ای منفی با غلظت نمک نشان داد (p< ۰/۰۵). بنابراین در تیمار۳۰۰ ، فعالیت این آنزیم در برگ قدس و بولانی بترتیب تا ۴۱٪ و ۶۵٪ شاهد کاهش نشان داد (شکلهای۱و۲).

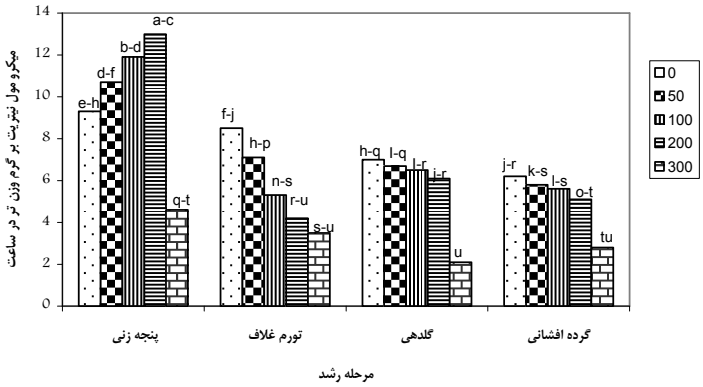
پاسخ ریشه قدس و بولانی در این مرحله افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز در تیمارهای۵۰ و ۱۰۰ و کاهش آن در تیمارهای ۲۰۰ و ۳۰۰ بود. در تیمار۳۰۰، این فعالیت در قدس و بولانی بترتیب ۶۹٪ و ۷۳٪ شاهد کاهش نشان داد (شکلهای۳و۴).

پ) مرحله گلدهی: ۵۸ روز پس از بذر افشانی، فعالیت نیترات ردوکتاز برگ پرچم با افزایش غلظت سدیم کلرید خاک کاهش نشان داد (p< ۰/۰۵). فعالیت اخیر در تیمار۳۰۰ دربرگ قدس و بولانی بترتیب تا ۳۰٪ و ۵۷٪ شاهد کاهش یافت (شکلهای۱و۲).

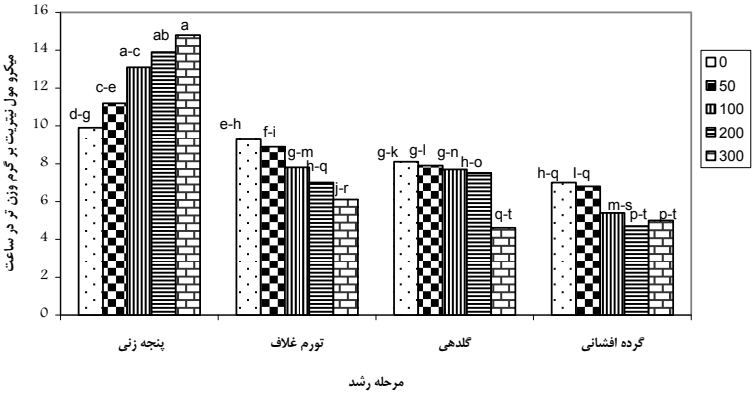
فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه قدس با افزایش غلظت نمک (به جز تیمار ۵۰) کاهش یافت (p< ۰/۰۵). فعالیت این آنزیم در ریشه بولانی درتیمارهای۵۰ و ۱۰۰ افزایش اما در تیمارهای۲۰۰ و۳۰۰ کاهش نشان داد (p < ۰/۰۵). در تیمار۳۰۰، فعالیت نیترات ردوکتاز ریشه قدس و بولانی بترتیب ۵۹٪ و ۶۴٪ شاهد کاهش یافت. در قدس، اثر تیمارهای۱۰۰ و ۲۰۰ از نظر آماری مشابه بود (شکلهای۳و۴).

ت) مرحله گرده افشانی: ۶۹ روز پس از بذر افشانی، پاسخ برگ پرچم به شوری، کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز قدس و بولانی بود (p< ۰/۰۵). در قدس در تیمار۳۰۰ و در بولانی در تیمار ۲۰۰، فعالیت این آنزیم بترتیب ۴۵٪ و ۶۷٪ شاهد کاهش نشان داد. در بولانی اثر تیمارهای ۲۰۰ و۳۰۰ از نظر آماری مشابه بود(شکلهای۱و۲). پاسخ ریشه برخلاف برگ، افزایش فعالیت

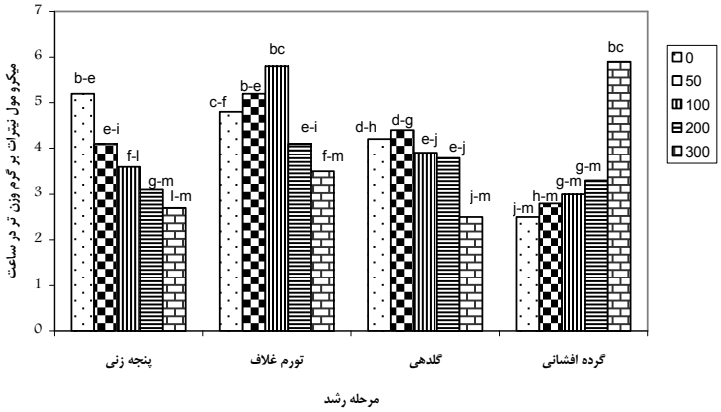
نیترات ردوکتاز بود ($p< ۰/۰۵$) . این فعالیت در ریشه قدس و بولانی در تیمار ۳۰۰ بترتیب تا ۲/۴ و ۲/۵ برابر شاهد افزایش نشان داد. در قدس، تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ اثر مشابهی داشتند و در بولانی اثر تیمار ۵۰ قابل توجه نبود (شکلهای ۳و۴).



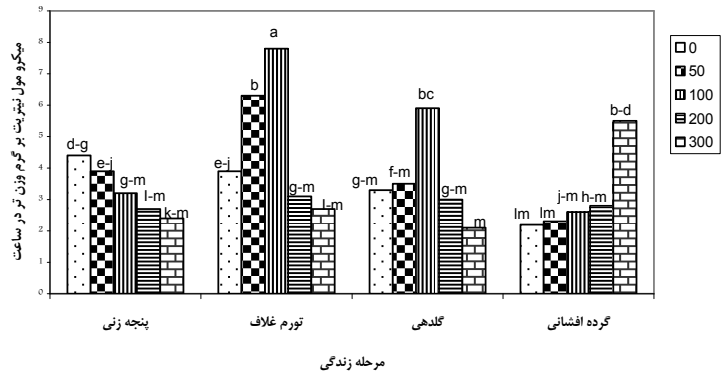
شکل۱- تغییرات فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ قدس در پاسخ به غلظتهای مختلف نمک. مقادیر، میانگین۳ تکرار می‌باشند. در این شکل و سایر شکلها مقایسه میانگینها با آزمون دانکن انجام شده است. حروف مشترک، بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار است.



شکل۲- تغییرات فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ بولانی در پاسخ به غلظتهای مختلف نمک.مقادیر، میانگین۳ تکرار می‌باشند.



شکل۳- تغییرات فعالیت نیترات ردوکتاز ریشه قدس در پاسخ به غلظت‌های مختلف نمک. مقادیر،میانگین۳ تکرار می‌باشند.



شکل۴- تغییرات فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه بولانی در پاسخ بـه غلظتهـای مختلـف نمـک. مقادیر، میانگین۳ تکرار می‌باشند.

بـحـث

نتایج بررسی حاضر نشان داد که در گیاهان شاهد: الـف) تفـاوت بـین قـدس و بـولانی از نظـر فعالیت نیترات ردوکتاز کمتر از تفاوتهای القا شده بوسیله شوری در فعالیـت ایـن آنـزیم اسـت. Kondrat'ev و Lebedinskaya (۱۹۹۵) نیز نتیجه مشابهی را در سایر رقمهای گنـدم گـزارش داده‌اند و معتقدند فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز تحت کنترل ژنتیکی شدیدی نیسـت و عوامـل محیطی نقش مهمتری دارند، ب) درطی نمو، فعالیت نیترات ردوکتاز بـین انـدامهای قـدس و

بولانی توزیع می‌شود، یعنی کاهش فعالیت آن در برگ همزمان با افزایش فعالیت آن در ریشه روی می‌دهد، پ) فعالیت نیترات ردوکتاز اندامها با افزایش سن گیاه، کاهش می‌یابد. در سویا نیز گزارش مشابهی درسال ۱۹۹۶بوسیله Nelson-Schreiberh وSchreiber بیان شده که معتقدند چنین کاهشی مربوط به یک عامل درونی (پیری) است، ت) فعالیت نیترات ردوکتاز برگ قدس و بولانی بیشتر از ریشه است. بعقیده Botella و همکاران (۱۹۹۳) و همچنین Cramer و همکاران (۱۹۹۵) در غلات، احیای نیترات عمدتاً در برگ روی می‌دهد.

مشاهده شد که فعالیت سینتیکی آنزیم نیترات ردوکتاز برگ قدس و بولانی، بویژه قدس (باستثنای مرحله پنجه‌زنی) در پاسخ به تیمارهای شوری کاهش می‌یابد. در تایید نتایج ما، Huang و همکاران (۱۹۹۳) نیز گزارش داده‌اند که درگندم تیمارشده با سدیم کلرید، فعالیت نیترات ردوکتاز برگ درمراحل پس از پنجه‌زنی نظیر تورم غلاف و گلدهی کاهش می‌یابد. بنظر Botella و همکاران(۱۹۹۳) اثر شوری بر فعالیت نیترات ردوکتاز گندم ممکن است یا مربوط به کاهش جذب نیترات باشد، زیرا کاهش غلظت نیترات در برگ و ریشه‌ها در تنش شوری گزارش شده است، یا ممکن است ناشی از مقدار زیاد یون کلر در برگ باشد که انتقال نیترات را از واکوئل به سیتوپلاسم، تحت تاثیر قرار می‌دهد زیرا نیترات ردوکتاز یک آنزیم سیتوپلاسمی است. Erskine و همکاران(۱۹۹۶) کاهش فعالیت نیترات ردوکتاز را در پاسخ به شوری، یک سازش بیوشیمیائی می‌دانندکه انباشتگی نیتریت یا آمونیوم را محدود می‌کند و بطور کلی نیازهای کربن و انرژی گیاهان را در شرایط تنش شوری کاهش می‌دهد، زیرا مصرف نیترات فرایندی است که به مقادیر قابل توجهی انرژی نیاز دارد. به اعتقاد Bungard و همکاران (۱۹۹۹) جذب و انتقال نیترات و تبدیل آن از حالت اکسیداسیون ۵+ در نیترات به ۳- در آمونیوم می‌تواند بخش زیادی از الکترونهای تولید شده در فتوسنتز را مصرف نماید. Gouia و همکاران (۱۹۹۴) معتقدند که فعالیت نیترات ردوکتاز تحت تاثیر یونهای سدیم و کلر قرار می‌گیرد، زیرا کاهش پتانسیل اسمزی بوسیله مانیتول اثری بر فعالیت این آنزیم ندارد . فعالیت نیترات ردوکتاز برنج تحت تاثیر غلظت پائین سدیم کلرید قرار نمی‌گیرد، اما در غلظتهای بالای نمک، کاهش می‌یابد. شوری، فعالیت نیترات ردوکتاز را دربرگ کدو و گوجه‌فرنگی کاهش اما دربرگ چغندر قند افزایش می‌دهد. بنابراین اثر شوری بر فعالیت نیترات ردوکتاز با تضادهائی همراه است، زیرا هم بازدارندگی هم تحریک فعالیت این آنزیم گزارش شده است. بنظر می‌رسد تغییر فعالیت این آنزیم درپاسخ به شوری به گونه (یا رقم) مورد مطالعه، مرحله زندگی گیاه و شرایط استخراج آنزیم بستگی دارد.

۴۰۰ ـــــــ

References

Botella, M.A., Cruz, C., Martins-Loucao, M.A., and Cerda, A.L. (1993) *Nitrate reductase activity in wheat seedlings as affected by NO_3^-/NH_4^+ ratio and salinity*. J. Plant Physiol., **142,** 531-536.

Bungard, R.A., Wingler, A., Morton, J.D., Anderws, M., Press, M.C., and Scholes, J.D. (1999) *Ammonium can stimulate nitrate and nitrite reductase in the absence of nitrate in* Clematis vitalba. Plant Cell Environ, **22,** 859-866.

Cramer, M.D., Schierholt, A., Wang, Y.Z., and Lips, S.H. (1995) *The influence of salinity in the utilization of root anaplerotic carbon and nitrogen metabolism in tomato seedlings*. J.Exp. Bot., **46(29),** 1569-1572.

Erskine, P.D., Stewart, G.R., Schmidt, S., Turnbull, M.H., Unkovich, M., and Pate, J.S. (1996) *Water availability – a Physiological constraint on nitrate utilization in plants of Australian semi-arid mulga woodlands*. Plant Cell Environ., **19,** 1149-1159.

Gomori, G. (1995) *Preparation of buffers for use in enzyme studies*. Methods in enzymology, **1,** 138-146.

Gouia, H., Ghorbal, M.H., and Touraine, B. (1994) *Effect of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO_3^- reduction rate within whole plant of salt-sensitive bean and salt – tolerant cotton*. Plant Physiol., **105,** 1409-1418.

Huang, L., Murray, F., and Yang, X. (1993) *Responses of nitrogen metabolism parameters to sublethal SO_2 pollution in wheat under mild NaCl stress*. J.Exp. Bot., **33(4),** 479-493.

Kenjebavea, S., and Rakova, N. (1995) *Multiple forms of nitrate reductase and their role in nitrate assimilation in roots of wheat at low temperature or high salinity*. Physiol. Plant., **93,** 249-252.

Kondrat'ev, M.N., and Lebedinskaya, S.O. (1995) *Nitrate redutase and protease activities in wheat during reproductive growth*. Russ. J.Plant Physiol., **42(3),** 399-407.

Nelson-Schreiber, B.M., and Schweitzer, L.E. (1986) *Limitation of leaf nitrate reductase activity during flowing and podfill in soybean*. Plant Physiol., **80,** 454-458.

Rascio, A., Plantani, C., Di Fonzo, N., and Wittmer, G. (1992) *Bound water in durum wheat under drought sterss*. Plant Physiol., **98,** 906-912.

Yerkes, C.D., and Weller, S.C. (1996) *Diluent volume influences susceptibility of field bindweed biotypes to glyphosate*. Weed Technol., **10,** 565-569.

Zadoks, J.C., Chang, T.T., and Konzak, C.F. (1974) *A decimal code for the growth stages of cereals*. Weed Res., **14,** 415-421.

صبورا، عذرا (۱۳۷۴) *بررسی مقدماتی اونتوژنی و فیلوژنی برخی گونه‌های زعفران ایران*، پایان نامه کارشناسی‌ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.

میقانی، فریبا (۱۳۷۹) بررسی فیزیولوژی مقاومت به شوری در گندم، رساله دکترا، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.