

## بررسی اثر تنش خشکی بر روی میزان قندهای محلول، پروتئین، پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز گیاه سویا رقم گرگان ۳

مه لقا قربانلی، مریم نیاکان: دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

### چکیده

برای بررسی پاسخ گیاه سویا به تنش خشکی، رقم گرگان ۳ با توجه به مقاومت بهینه آن در مقابل شرایط کم آبی برای کشت انتخاب شد. رقم مورد نظر بصورت کشت گلدانی در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد و شدت نوری ۱۴ هزار لوکس با دوره نوری ۱۴ ساعته قرار گرفته و با گسترده شدن اولین برگ مرکب، سه تیمار آبی شامل هر روز آبیاری (شاهد) و سه روز در میان (تنش ملایم) و پنج روز در میان (تنش شدید) اعمال شد. گیاهان در تیمارهای مختلف به مدت ۱۵ روز به مقدار ۱۵۰ میلی لیتر آبیاری شدند. به منظور بررسی اثر تیمارهای مختلف آبیاری بر روی میزان قندهای محلول، پروتئین کل، پرولین و ترکیبات فنلی، سه بخش ریشه، ساقه و برگ مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی نتایج حاصل از آزمایش بر اساس شاخص میانگین حساسی و انحراف معیار صورت گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در ریشه میزان قندهای محلول و پرولین هم در تنش ملایم و هم تنش شدید افزایش معنی داری یافت در حالی که در برگ و ساقه میزان این ترکیبات تنها در تنش شدید روند صعودی معنی داری را طی کرد. همچنین اعمال تنش ملایم و شدید خشکی سبب افزایش مقدار پروتئین و ترکیبات فنلی در برگ ها شد در حالی که در بخش های ریشه و ساقه این روند بر میزان پروتئین تنها در تنش شدید معنی دار بود و ترکیبات فنلی در دو اندام پادشده تغییر معنی داری را نشان نداد.

### مقدمه

بی ثباتی عوامل زیست محیطی گیاه و نیز گوناگون بودن گستره پتانسیل بالقوه در برابر این تغییرات باعث می شود که گیاهان واکنش های متفاوتی از خود بروز دهند. از مهمترین عواملی که می تواند ساختار و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد، مقدار آب قابل دسترس در گیاه و مسأله اقتصاد آن در سطح سلول است [۲۰]. [۲۸]، [۲۹]، [۳۲]. گفته شده است که گیاهان قادر به تحمل خشکی در محدوده ای خاص هستند. تجمع اسمورگولاتورها یکی از مهمترین عوامل حفظ گیاهان در مقابل استرس های غیر زنده است در این میان می توان به افزایش ترکیباتی نظیر گلوکز، فروکتوز، سوکروز و پلی اول ها اشاره کرد [۱۳]، [۱۹]، [۲۱]، [۲۴]، [۴۱].

واژه های کلیدی: تنش خشکی، سویا، قندهای محلول، پروتئین، پرولین، ترکیبات فنلی، نیترات ردوکتاز، کلروفیل

به نظر برخی از پژوهندگان تخریب نشاسته می‌تواند سبب افزایش مونوساکاریدها شود [۱۱]. تخریب پروتئین‌ها و انباشت برخی آمینو اسیدهای آزاد در جهت حفظ و تنظیم فشار اسمزی سلول و کاهش سنتز پروتئین در شرایط تنش خشکی نیز مشاهده شده است [۱۶], [۲۶].

برخی از پژوهش‌گران رکود سنتز پروتئین را به کاهش تعداد پلی‌زوم‌های سلولی نسبت داده‌اند [۸]. گزارش‌های متعددی نیز در باب افزایش پرولین آزاد تحت شرایط تنش اعلام شده است [۱۳], [۳۶]. عده‌ای از محققان علت افزایش این ماده را نتیجه تخریب پروتئین‌ها ذکر کرده‌اند [۳۶]. در مورد اثر افزایش پرولین بر عملکردهای مختلف سلولی نظریات گوناگونی مطرح شده است. برای نمونه، پرولین از طریق حفظ ظرفیت آبگیری در سیتوپلاسم سلول منجر به حفظ ماکرومولکول‌ها از جمله آنزیم‌ها می‌شود تا از تشکیل اشکال نامطلوب و یا قطعه‌قطعه شدن آن‌ها جلوگیری به عمل آید [۲], [۱۲].

ترکیبات فنلی نیز سال‌هاست که به عنوان اجزای سازنده گیاهان شناخته شده و وظایف بسیاری به آن‌ها نسبت داده شده است [۳۰]. ترکیباتی نظیر کومارین، فلاونوئیدها، کاتکول، کافینک اسید و آنتوسیانیدین از جمله ترکیبات فنلی محسوب می‌شوند. مطابق با نتایج اعلام‌شده واریته‌هایی از گیاه سویا که فاقد ترکیب فنلی کامفرول تری گلیکوزید ( $K_9$ ) هستند، دارای روزنه‌های متراکم تری بوده و این ارقام قابلیت بهتری در جذب آب و افزایش ضریب هدایت روزنه‌ای از خود نشان می‌دهند. همچنین این گیاهان تحمل بهتری نسبت به تنش آب دارند، اما عملکرد آن‌ها در مقایسه با سایر ارقام روند نزولی را نمایش می‌دهد [۶].

پژوهش‌های متعددی نیز در مورد تأثیر کاهش پتانسیل آبی خاک بر روی پروتئین و رنگیزه‌های موجود در کلروپلاست صورت گرفته است. به عنوان مثال تنش آبی سبب هیدرولیز پروتئین‌های تیلاکوئیدی شده [۹], [۳۵] و تجزیه پروتئین‌های کلروپلاستی منبع با ارزشی برای اشکال قابل تحرک نیتروژن به محض ورود به شرایط تنش است [۲۴].

یکی از آنزیم‌هایی که نقش کلیدی در سلسله فرایندهای مربوط به مصرف نیتрат دارد، نیترات ردوکتاز است. شواهد زیادی حاکی از پیچیدگی تنظیم این آنزیم وجود دارد [۱۷], [۳۸]. همچنین پژوهش‌های متعددی دال بر پاسخ‌های متفاوت این آنزیم همراه با تغییر شرایط محیطی موجود است [۱۸], [۳۸]. برای نمونه فعالیت این آنزیم در برگ به تغییرات وضعیت آبی حساس بوده و زمانی که پتانسیل آبی کاهش می‌یابد فعالیت آنزیم نیز مهار می‌شود [۷], [۱۸], [۳۷]. به نظر برخی از محققان این کاهش ناشی از میزان سنتز این آنزیم است که این عامل مهم‌تر از کاهش فعالیت آنزیم در این شرایط است. پژوهش‌هایی که در زمینه سویا صورت گرفته است نشان می‌دهد که تحت شرایط خشکی نیترات به مقدار زیاد در ریشه‌ها تجمع می‌یابد و می‌تواند منبع با ارزشی برای سنتز اسیدهای آمینه تحت شرایط شوری در نظر گرفته شود [۱۶].

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر تنش‌های ملایم و شدید خشکی به روی برخی از فرآیندهای بیوشیمیایی گیاه سویا (رقم گرگان ۳) است تا پاسخ‌های این گیاه در مقابله با تنش خشکی ارزیابی شود.

## مواد و روش‌ها

بذر گیاه سویا رقم گرگان ۳ از بخش مرکز دانه‌های روغنی گرگان تهیه و پس از انتخاب بذور همگن به گلدان‌هایی با ابعاد  $17 \times 13/6$  سانتی‌متر مربع منتقل شدند. برای هر گلدان مقدار تقریبی دو کیلوگرم خاک با نسبت ۶:۳ از خاک مزرعه و ماسه در نظر گرفته شد. قبل از جوانه‌زنی بذور، گلدان‌ها هر ۴۸ ساعت یکبار به میزان ۵۰ میلی‌لیتر آبیاری شدند. بعد از ظهور لپه‌ها، گلدان‌ها به جایگاه خود منتقل شدند. در این جایگاه ۱۲ عدد گلدان به صورت ۳ ردیف ۴ تایی (هر ردیف شامل ۳ تیمار آبیاری و هر ردیف عمودی شامل ۴ تکرار از هر تیمار) جای گرفتند. گلدان‌ها تحت شدت نوری  $14000$  لوکس و دوره نوری ۱۴ ساعته و دمای  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  قرار گرفتند.

با پدیدار شدن اولین برگ مرکب (اولین برگ سه برگچه‌ای) سه تیمار مختلف آبیاری شامل هر روز (شاهد) سه‌روز در میان (تنش ملایم) و ۵ روز در میان (تنش شدید) به مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر و در ساعت مشخصی از روز به مدت ۱۵ روز بر روی گیاه سویا اعمال شد. در طول مدت تیمار برای کاهش خطای آزمایش و نیز همگن نمودن شرایط رویش برای تمامی گیاهان، گلدان‌های هر بلوک سه بار به طور تصادفی جابه‌جا شدند.

## سنجش‌های بیوشیمیایی

### سنجش قندهای محلول

برای سنجش مقدار قندهای محلول بر روی وزن خشک ریشه، ساقه و برگ این مراحل طی شد: قرار دادن نمونه‌ها در الکل ۷۰ درصد به مدت یک هفته، برداشتن ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی، افزودن ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به نمونه‌ها و خواندن جذب نوری آن‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر. رسم منحنی استاندارد با استفاده از گلوکز و تعیین میزان قند بر حسب گرم در گرم وزن خشک نمونه [۲۲].

### سنجش پروتئین کل

برای سنجش میزان پروتئین کل در سه اندام ریشه، برگ و ساقه مراحل در مورد نمونه‌های خشک آن‌ها طی شد:

همگن‌سازی نمونه‌ها در بافر تریس اسید کلریدریک، سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها، تهیه معرف‌های A (کربنات

سدیم و سود ۰/۵ (نرمال) B (سولفات مس ۱ درصد) C (تارتارات سدیم پتاسیم ۲ درصد) D (شامل معرف‌های A و B و C)، معرف E (معرف فولن-سیوکالتو)، افزودن ۱ میلی لیتر معرف D به نمونه، اضافه نمودن ۳ میلی لیتر معرف E، قرار دادن نمونه‌ها در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، خواندن جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر در مقابل شاهد، رسم منحنی استاندارد با استفاده از سرم آلبومین گاوی و محاسبه میزان پروتئین بر حسب گرم در گرم وزن خشک گیاه [۲۳].

### سنجش فنل

برای سنجش فنل در بخش‌های مورد نظر این مراحل طی شد:

توزین نمونه‌های تر و قرار دادن آن‌ها در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد و جوشاندن آن، سانتریفیوژ نمودن نمونه‌ها، افزودن فولن رقیق شده و کربنات سدیم اشباع، سانتریفیوژ کردن و خواندن جذب در طول موج ۶۴۰ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه رسم منحنی استاندارد با استفاده از کاتکول و محاسبه میزان ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر [۲۵].

### سنجش پرولین

برای تعیین میزان پرولین در سه بخش ساقه، ریشه و برگ این مراحل انجام شد:

توزین نمونه‌های تر و همگن‌سازی آن‌ها در ۱۰ میلی لیتر اسید سولفاسالیسیلیک ۳ درصد، سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها و اضافه کردن معرف نین‌هیدرین و اسید استیک خالص به سوپرناتانت، قرار دادن در بن‌ماری به مدت یک ساعت، افزودن تولوئن، جداسازی محلول بالایی و خواندن جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه، رسم منحنی استاندارد پرولین و محاسبه میزان پرولین اندام‌های گیاه بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر نمونه [۳].

### سنجش فعالیت نیترات ردوکتاز

جهت یافتن فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در سه بخش ریشه، ساقه و برگ مراحل زیر انجام شد:

تهیه محلول‌های گریس I و II، تهیه محلول انکوباسیون (نیترات پتاسیم ۱۵۰ میلی مولار، پروپانول ۳٪ حجمی و تامپون ۱۰۰ میلی مولار)، قرار دادن نمونه گیاهی در لوله آزمایش ایجاد خلأ نسبی از طریق کشیدن هوای داخل لوله با سرنگ، قرار دادن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، برداشتن محلول بالا و افزودن گریس I و II خواندن جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر. لازم به ذکر است که برای یافتن غلظت نیتريت حاصل از احیای نیترات تحت تأثیر آنزیم نیترات ردوکتاز منحنی استاندارد نیتريت سدیم رسم و سرانجام با استفاده از مقدار نیتريت تولید شده به ازای گرم ماده تر فعالیت آنزیم محاسبه شد [۳۴].

## سنجش کلروفیل

همگن سازی نمونه‌های برگ در استن، سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها، جداسازی سوپر ناتانت و خواندن جذب در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۵۲ و ۶۶۳ در مقابل شاهد و یافتن مقدار کلروفیل a و b در میلی گرم بافت مورد نظریا استفاده از این روابط [۵]:

$$\text{Chl a mg} = \frac{(12/7 \text{OD } 663 - 2/7 \text{OD } 645) V}{1000 W}$$

$$\text{Chl b mg} = \frac{(22/9 \text{OD } 645 - 4/27 \text{OD } 663) V}{1000 W}$$

## روش محاسبه آماری

بررسی نتایج حاصل از آزمایش بر اساس شاخص میانگین و انحراف معیار صورت گرفته است. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق واریانس دو عاملی و میانگین انجام گرفت. همچنین مقایسه بین تیمارها و شاهد بر اساس آزمون دانکن<sup>۱</sup> در سطوح ۵ درصد ( $P \leq 0.05$ ) یک درصد ( $P \leq 0.01$ )، با برنامه آماری Mstat c محاسبه شد.

## نتایج

در پژوهش حاضر افزایش شدت تنش خشکی روند صعودی معنی‌داری را در مقدار قندهای محلول برگ، ساقه و ریشه گیاه سویا نشان می‌دهد. (جدول ۱، شکل ۱). همچنین داده‌های حاصل از سنجش پروتئین کل در برگ، تأثیر سطوح مختلف آبیاری را بر روی مقدار ترکیبات یاد شده نمایش می‌دهد که هم در تنش ملایم و هم در تنش شدید این اثر مثبت است در حالی که میزان پروتئین در ساقه و ریشه تنها در تنش شدید افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان می‌دهد (جدول ۱، شکل ۲). مطابق با نتایج به دست آمده، مقدار پرولین برگ و ساقه در گیاهان شاهد و تحت تنش ملایم تفاوت معنی‌داری را آشکار نداشت، اما تنش شدید به طور چشم‌گیری بر میزان این ماده اثر گذاشت (جدول ۱، شکل ۳). در ریشه میزان پرولین هم در تنش ملایم و هم در تنش شدید روند صعودی معنی‌داری را نسبت به شاهد طی کرد (جدول ۳، شکل ۳). داده‌های حاصل از اثر خشکی بر مقدار ترکیبات فنلی حاکی از عدم اختلاف معنی‌دار آن در ساقه و ریشه در سه تیمار مختلف آبیاری است. در حالی که در برگ‌ها میزان این ترکیبات تنها در تنش شدید خشکی افزایش چشم‌گیری را نسبت به شاهد نشان می‌دهد (جدول ۱، شکل ۴). در سنجش میزان کلروفیل a در برگ رقم گرگان ۳ تنش ملایم اثر قابل توجهی بر مقدار این رنگیزه گذاشت. همچنین با توجه به داده‌های حاصل از سنجش میزان کلروفیل b تیمارهای تنش آبی کاهش معنی‌داری را

<sup>۱</sup>-Duncan's multiple range test

نسبت به گیاه شاهد نشان داد (جدول ۲). همچنین کاهش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز از سطح اولیه آن در برگ گیاهان شاهد بر حسب میلی مول نیترات احیا شده به ازای هر گرم وزن تر نسبت به دو تنش ملایم و شدید معنی دار بوده که این امر حساسیت آنزیم را در تنش ملایم و شدید نمایش می دهد (جدول ۱، شکل ۵).

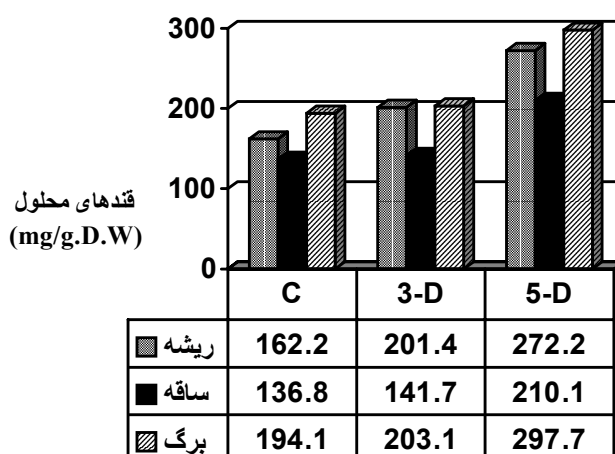
جدول ۱- اثر تیمارهای مختلف آبی بر روی مقدار قندهای محلول، پروتئین کل، پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت نیترات ردوکتاز در برگ سویا رقم گرگان ۳. اعداد نشانگر  $SE \pm X$  هستند

| ماده مورد آزمایش               | اندام | پنج روز در میان آبیاری<br>D-۵ | سه روز در میان آبیاری<br>D-۳ | شاهد (C)             |
|--------------------------------|-------|-------------------------------|------------------------------|----------------------|
| قند<br>(mg/g.F.W)              | برگ   | ۲۹۷/۷ $\pm$ ۰/۰۰۱ a)          | ۲۰۳/۱ $\pm$ ۰/۰۰۳ b)         | ۱۹۴/۱ $\pm$ ۰/۰۰۲ b) |
|                                | ساقه  | ۲۱۰/۱ $\pm$ ۰/۰۰۱ a)          | ۱۴۱/۷ $\pm$ ۰/۰۰۱ b)         | ۱۳۶/۸ $\pm$ ۰/۰۰۲ b) |
|                                | ریشه  | ۲۷۲/۷ $\pm$ ۰/۰۰۳ a)          | ۲۰۱/۴ $\pm$ ۰/۰۰۳ c)         | ۱۶۲/۲ $\pm$ ۰/۰۰۲ d) |
| پروتئین<br>(mg/g.D.W)          | برگ   | ۱۰۷/۹ $\pm$ ۰/۰۸۵ e)          | ۲۵۷/۷۳ $\pm$ ۳/۲۵۶ c)        | ۳۳۴/۴۷ $\pm$ ۴/۷۸ a) |
|                                | ساقه  | ۵۴/۳۱ $\pm$ ۰/۰۵۶۲ d)         | ۱۲۱/۷۴ $\pm$ ۰/۴۸۹ c)        | ۱۲۲/۹۱ $\pm$ ۱/۱۵ a) |
|                                | ریشه  | ۳۱/۵۵ $\pm$ ۱/۳۸۱ d)          | ۹۷/۹۳ $\pm$ ۰/۴۷۴ a)         | ۹۷/۹۳ $\pm$ ۰/۴۶۲ a) |
| پروکلین<br>( $\mu$ mol/g.F.W)  | برگ   | ۶۴/۴۷ $\pm$ ۰/۴۹۲ a)          | ۱۲/۱۸ $\pm$ ۰/۲۷۱ d)         | ۹/۷۵ $\pm$ ۱/۷۹ d)   |
|                                | ساقه  | ۵۰/۰۴ $\pm$ ۰/۴۹۲ a)          | ۲۰/۸۷۸ $\pm$ ۰/۳۹۳ d)        | ۲۰/۴۹ $\pm$ ۰/۴۶۸ d) |
|                                | ریشه  | ۶۷/۴۲ $\pm$ ۰/۴۹۸ a)          | ۳۸/۵۲ $\pm$ ۰/۳۷۱ c)         | ۲۳/۹۲ $\pm$ ۰/۳۳۶ d) |
| فنل<br>(mg/g.D.W)              | برگ   | ۱۵/۳۸ $\pm$ ۶/۱۲ a)           | ۱۰/۳۴ $\pm$ ۳/۳۳۲ bc)        | ۹/۱۶ $\pm$ ۲/۴۱ bc)  |
|                                | ساقه  | ۴/۸۸۱ $\pm$ ۳/۹۴ a)           | ۵/۷۶۲ $\pm$ ۰/۳۲۴ a)         | ۵/۷۷ $\pm$ ۰/۲۲۷ a)  |
|                                | ریشه  | ۲۰/۱۲ $\pm$ ۲/۸۱۵ ab)         | ۲۲/۵۱ $\pm$ ۲/۰۶۶ a)         | ۲۲/۵۱ $\pm$ ۳/۲۹ a)  |
| نیترات ردوکتاز<br>(mmol/g.F.D) | برگ   | ۲۹/۲۲ $\pm$ ۰/۳۹۷ d)          | ۳۳/۳۴ $\pm$ ۰/۵۱۲ a)         | ۱۰۰/۴ $\pm$ ۰/۵۵۲ a) |
|                                | ساقه  | ۷/۴۹ $\pm$ ۳/۰۸ b)            | ۷/۶۳ $\pm$ ۰/۴۶۱ b)          | ۸/۹۵ $\pm$ ۰/۱۲۹ a)  |
|                                | ریشه  | ۹/۷۲ $\pm$ ۰/۲۴ d)            | ۱۰/۸۲ $\pm$ ۰/۱۳۶ c)         | ۱۵/۵۳ $\pm$ ۰/۲۵۴ a) |

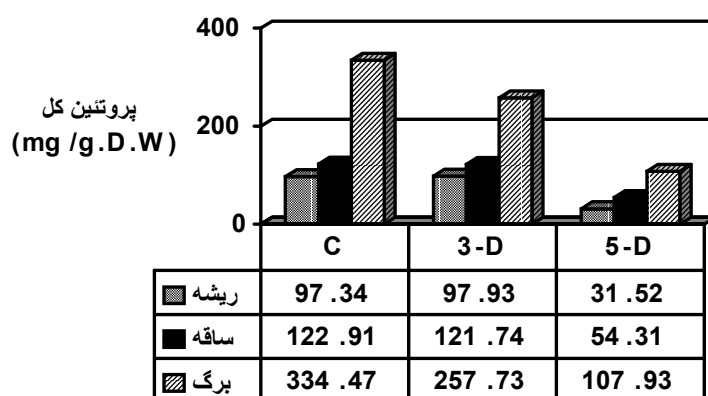
جدول ۲- اثر تیمارهای مختلف آبی بر روی مقدار کلروفیل a و b در برگ سویا رقم گرگان ۳. اعداد نشانگر

$SE \pm X$  هستند

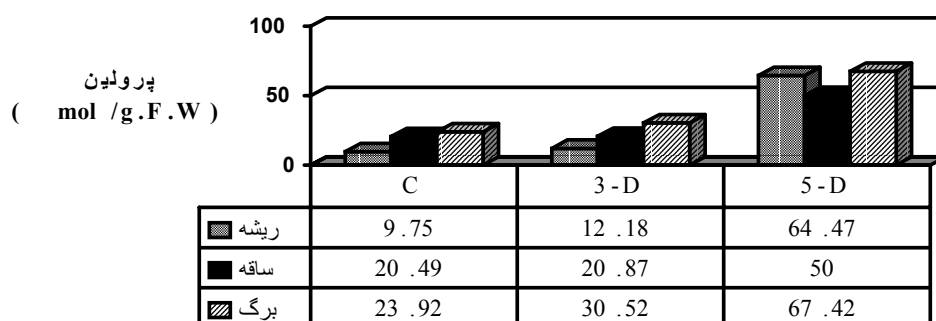
| کلروفیل a/b | کلروفیل b             | کلروفیل a            | تیمارهای آبیاری | رقم سویا |
|-------------|-----------------------|----------------------|-----------------|----------|
| ۲/۴۷۱       | ۵/۶۳۳ $\pm$ ۰/۰۵ a)   | ۱۳/۹۲ $\pm$ ۰/۰۳۳ a) | هر روز آبیاری   | گرگان ۳  |
| ۲/۳۱۲       | ۴/۲۱۷ $\pm$ ۰/۰۶۳ (c) | ۹/۷۵ $\pm$ ۰/۰۴۲ (c) | سه روز در میان  |          |
| ۲/۲۰۹       | ۴/۲۱۴ $\pm$ ۰/۰۵۶ (c) | ۹/۳۱۱ $\pm$ ۰/۱۱۸ d) | پنج روز در میان |          |



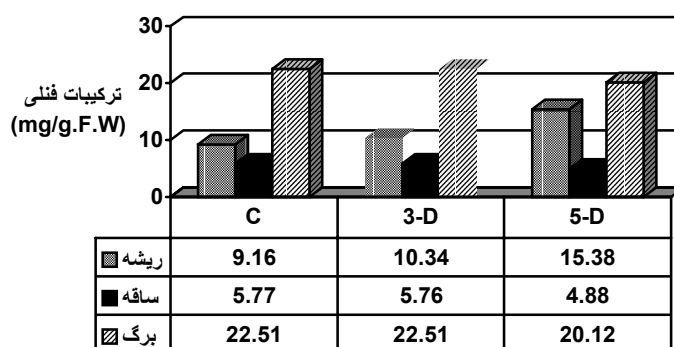
شکل ۱ - میزان قند محلول بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک در سه بخش ریشه، ساقه و برگ گیاه سویا رقم گرگان ۳، تحت سه تیمار آبیاری، C = شاهد، هر روز آبیاری، 3-D = سه روز در میان آبیاری، 5-D = پنج روز در میان آبیاری



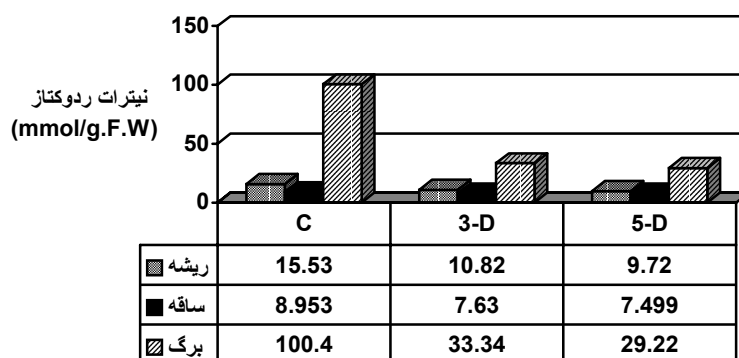
شکل ۲ - میزان پروتئین کل بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک در سه بخش ریشه، ساقه و برگ گیاه سویا رقم گرگان ۳، تحت سه تیمار آبیاری، C = شاهد، هر روز آبیاری، 3-D = سه روز در میان آبیاری، 5-D = پنج روز در میان آبیاری



شکل ۳ - میزان پرولین بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تر در سه بخش ریشه، ساقه و برگ گیاه سویا رقم گرگان ۳، تحت سه تیمار آبیاری، C = شاهد، هر روز آبیاری، 3-D = سه روز در میان آبیاری، 5-D = پنج روز در میان آبیاری.



شکل ۴ - میزان ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر در سه بخش ریشه، ساقه برگ گیاه سویا رقم گرگان ۳، تحت سه تیمار آبیاری C = شاهد، هر روز آبیاری. 3-D = سه روز در میان آبیاری. 5-D = پنج روز در میان



شکل ۵ - میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز بر حسب میلی مول در گرم وزن تر در سه بخش ریشه، ساقه و برگ گیاه سویا رقم گرگان ۳ تحت سه تیمار آبیاری C = شاهد، هر روز آبیاری. 3-D = سه روز در میان آبیاری. 5-D = پنج روز در میان

## بحث و نتیجه گیری

خشکی نه تنها رشد و نمو گیاهان را کاهش می‌دهد، بلکه موجب تغییر در مسیر برخی از فرایندهای متابولیسمی نیز می‌گردد. این تغییرات می‌تواند گیاه را در مقابل استرس مقاوم سازد. در واقع سازش با خشکی به واکنش‌هایی نیاز دارد تا از طریق آن فرایندهای متابولیسمی اولیه ادامه پیدا کند و گیاه را برای مقابله با آن آماده کند [۶]، [۳۲]. در طی خشکی دراز مدت، انتقال مواد به علت کاهش آب قابل دسترس، منجر به تغییر غلظت برخی از متابولیت‌ها می‌شود. از سوی دیگر میزان محلول‌های سازگار به خشکی نظیر قندها، قندهای الکلی، آمینو اسیدهای ویژه نظیر پرولین، گلیسین و بتائین افزایش می‌یابد [۱۱]، [۱۳]، [۴۰].

تحقیقات متعددی در زمینه نقش کربوئیدرات‌های محلول و افزایش آن‌ها تحت شرایط تنش‌های گوناگون صورت پذیرفته است که همگی بر نقش ترکیبات مذکور در تنظیم اسمزی سلول دلالت دارند [۱۳]، [۴۰] که از

جمله می‌توان به پژوهش انجام شده بر روی گیاه سویا اشاره کرد [۴۲]. مطابق با نتایج به دست آمده، تنش شدید خشکی موجب افزایش معنی‌دار قندهای محلول در ساقه و برگ رقم گرگان ۳ شد.

از سوی دیگر، بنا به گزارش اعلام شده ساقه به عنوان جایگاهی ویژه برای ذخیره کوتاه مدت کربوهیدرات‌ها در حین تنش می‌تواند نقش به سزایی ایفا کند [۱۰]. در این پژوهش نیز میزان قندهای محلول در ساقه با شدت گرفتن میزان تنش، افزایش قابل توجهی را نشان داد.

درمجموع افزایش قندهای محلول در طی تنش خشکی (به ویژه تنش شدید) را می‌توان به دلایل زیر توجیه کرد:

۱- تخریب کربوهیدرات‌های نا محلول که منجر به افزایش قندهای محلول می‌شود.

۲- سنتز این ترکیبات از مسیرهای غیرفتوسنتزی

۳- متوقف شدن رشد [۱۶].

به نظر برخی از محققان کربوهیدرات‌هایی شناسایی شدند که سبب تعدیل اثر بازدارندگی خشکی بر روی نسخه‌برداری از ژن‌های فتوسنتتیک می‌شوند؛ برای نمونه بیان ژن‌های کدکننده زیر واحدهای کوچک و بزرگ روبیسکو در طی خشکی، بیانگر مکانیسم کنترل شده‌ای است که این امر می‌تواند یکی از دلایل تجمع کربوهیدرات‌ها در برگ باشد [۲۱].

از سوی دیگر، تنش شدید خشکی سبب افزایش معنی‌دار ترکیبات فنلی در برگ‌ها شد؛ در حالی که در ساقه و ریشه رقم گرگان ۳ این روند معنی‌دار نبود. همچنین مطابق با نتایج به دست آمده، میزان پروتئین کل به ویژه در برگ‌ها، با افزایش شدت تنش خشکی کاهش یافت. گزارش شده است کاهش سنتز پروتئین منجر به افزایش ترکیبات فنلی می‌شود [۴] که مؤید پژوهش حاضر است. در برخی از لاین‌های مقاوم به خشکی سویا ترکیبات فنلی از طریق تأثیر بر روی برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی برگ (تعداد روزنه، ضریب هدایت روزنه‌ای) موجب کاهش تعرق می‌گردد و بر مقاومت گیاه به خشکی می‌افزاید [۶].

بررسی‌های انجام شده نشان داده است که هرگونه تنش برگ‌یاه، مقدار ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهد و وجود چنین ترکیباتی موجب کاهش استقرار میکروارگانیزم‌ها می‌شود [۳۰].

به نظر می‌رسد که گیاه در زمان تنش خشکی به علت تضعیف سیستم ایمنی، ترکیبات فنلی را افزایش داده تا بتواند واکنشهای دفاعی مناسبی را در برابر حمله میکروارگانیزم‌ها در پیش گیرد.

از سوی دیگر، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نمایانگر افزایش پرولین در طی تنش خشکی (به ویژه تنش شدید خشکی) در بخش‌های مختلف گیاه سویا (رقم گرگان ۳) است از آنجا که برگ‌ها همواره به عنوان جایگاه عمده فرایندهای متابولیسمی مطرحند، روندی صعودی در انباشت پرولین در برگ‌های رقم گرگان ۳ به چشم می‌خورد.

پیرامون افزایش غلظت این آمینو اسید و دخالت آن در حفظ تورژسانس سلولی گزارش‌های متعددی ارائه شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به گیاهان سویا [۸] اشاره نمود.

همچنین بر اساس پژوهش حاضر با شدت گرفتن میزان تنش، مقدار کل پروتئین‌های محلول هم در بخش هوایی ساقه و برگ و هم در ریشه کاهش می‌یابد که این روند با افزایش غلظت پرولین همراه است. این نتیجه با گزارش اعلام شده بر گوجه فرنگی [۱]، ذرت [۱۴] و سویا [۴۲] همخوانی دارد بنا بر این تحت شرایط تنش شدید افزایش چشمگیر غلظت پرولین به همراه کاهش معنی‌دار پروتئین در برگ‌های سویا را می‌توان هم به تخریب پروتئین و هم کاهش سنتز آن [۱۶] نسبت داد.

شایان ذکر است که گزارش‌هایی نیز مبنی بر ارتباط بین پرولین و کربوهیدرات‌ها مطرح شده است [۲۹] در این پژوهش نیز یک روند فزاینده در مقدار قندهای محلول و همسو با آن در پرولین مشاهده شد به نحوی که این افزایش به خصوص در ساقه و برگ در طی تنش شدید چشمگیر بود.

چنان که در جدول ۱ نمایش داده شده است مقدار کلروفیل **a** و **b** تحت تأثیر تنش خشکی واقع شدند. کاهش مقدار کلروفیل همراه با کاهش پتانسیل آبی خاک در گیاهانی نظیر آفتابگردان [۳۵] و توتون [۲۷] خود مؤید این مسئله است. از سوی دیگر نسبت کلروفیل **a/b** نیز تحت اثر تنش واقع شد. عنوان شده است که ثبوت نسبت کلروفیل در طی دوران خشکی می‌تواند به عنوان شاخصی برای ارقام متحمل به خشکی در نظر گرفته شود.

از سوی دیگر، چنان که در شکل ۵ مشخص است، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز نیز تحت تأثیر تیمارهای مختلف آبیاری قرار گرفت، به نحوی که تنش‌های ملایم و شدید خشکی سبب کاهش فعالیت این آنزیم گشت. گزارش شده است که آنزیم نیترات ردوکتاز حساس به تغییرات وضعیت رطوبت برگ بوده و با کاهش شدید پتانسیل آبی فعالیت آن در این بخش از گیاه مهار می‌شود [۳۷]. گزارش شده است فته در طی خشکی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در اندام هوایی بیش از ریشه کاهش می‌یابد که این امر به کاهش جریان نیترات از ریشه به اندام هوایی نسبت داده شده است [۳۱] نتایج به دست آمده در این پژوهش نیز حساس بودن فعالیت آنزیم را در برگ تأیید می‌کند.

گزارش شده است که در گیاه سویا در زمان کم‌آبی نیترات به مقدار زیاد تجمع می‌یابد که می‌تواند به عنوان منبع نیتروژن برای سنتز اسیدهای آمینه آزاد مورد استفاده قرار گیرد [۱۵]. در پژوهش حاضر در تیمار شدید خشکی میزان پرولین به بیش‌ترین مقدار خود و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز به کم‌ترین مقدار خود می‌رسد که با توجه به این مطاب می‌توان یکی از علل افزایش میزان پرولین در برگ سویا را به کاهش فعالین آنزیم نام‌برده نسبت داد.

در مجموع می‌توان چنین گفت که گیاه سویا رقم گرگان ۳ نسبت به تنش خشکی (به ویژه تنش شدید) پاسخ‌های سازشی مناسبی را در پیش گرفته تا از صدمات ناشی از آن محفوظ بماند.

به طور کلی، پاسخ گیاهان زراعی به شرایط نامناسب محیطی بدون بررسی و آنالیز مکانیسم‌های مربوطه غیر ممکن به نظر می‌رسد. مقدار خساراتی که خشکی بر گیاهان زراعی وارد می‌سازد منجر به کوشش بیش‌تر برای فهم اثرات تنش خشکی بر روی مکانیسم‌های مختلف گیاه می‌شود و درک پاسخ‌های سازشی مناسب را در برابر این عامل محیطی می‌طلبد. از سوی دیگر می‌توان با شناسایی ارقام زودرس گیاهان زراعی از جمله سویا و نیز کشت و برداشت آن قبل از فصل گرما و کاهش بارندگی آن‌ها را از معرض تنش دور نگه داشت [۳۳]، [۳۹].

### منابع

1. F.P. Alfocsa, M.T.Estan, A.S Crus and M.C. Bolarin.Effect of salinity on nitrate, total nitrogen ,soluble protein and free amino acid levels in tomato. Plant J of Horticul Sci,vol. 68 (1993) 1021-1027.
2. D.L. Barker, C.Y.Sullivan and L.E.Moser.Water deficits effect on osmotic potential,cell wall elasticity and prolin in five grass.Agron.J,vol. 85 (1993) 2750-275.
3. L.S. Bates, R.W.Waldern and L.D.Treare.Rapid determinatation of free proline for stress studentes.Plant and Soil,vol. 39 (1973) 205-207.
4. A.A. Bell.Biochemical mechanism of disease resistance.Annu.Rev.Plant.Physiol vol.32 (1981) 21-81.
- 5.J.Bruisma.The quantitative analysis of chlorophyll a&b in plant extract. Photochem. Photobil vol. 12 (1963) 241-249.
- 6..R.B.T. Buttery, C.S.Buzzel, J.D.Gayron and D.C.Matarish.Stomatal number of soybean and response to water stress.Plant.Soil,vol.149 (1993) 283-288.
7. H.F. Christine, M.H.Valadier, A.Migge and Th.Becker.Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA on the coordingation of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves.Plant Physiol,vol.117 (1998) 283-292.
8. R.A. Creelman, H.S. Mason, R.J Bensen, J.S.Boyer and J.E Mullet. Water deficits and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. Plant Physiol,vol.214 (1990) 92-105.

9. J.P. Cornoy, J.M. Virgon, R.M. Smillie and E.W. Barlow. Influence of drought acclimation and CO<sub>2</sub> enrichment on osmotic adjustment and chlorophyll a fluorescence of sunflower during drought, *Plant Physiol*, vol. 186 (1988) 1108-1115.
10. D.Y. Davidson. and P.M. Chevalier. Storage and remobilization of water soluble carbohydrates in stems of spring wheat. *Crop. Sci*, vol. 32 (1992) 86-190.
11. H. During. Evidence for osmotic adjustment to drought in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, vol. 23 (1992) 1-10.
12. R.D. Evan, R.A. Black, W.H. Loeshel and R.J. Follows. Osmotic relation of the drought-induced shrub *Artemisia tridentata* in response to water stress. *Plant. Cell and Environ*, vol. 15 (1992) 49-59.
13. Genetic engineering news letter. Special Issue. Transgenic drought and salt tolerant plant. (2004).
14. A.D. Hanson and W.D. Hitz. Metabolism response of mesophytes to plant water deficits. *Annu Rev. Plant. Physiol*. vol. 33 (1982) 163-203.
15. B. Heuer, Z. Plaut, E. Federman. Nitrate and nitrite reductase in wheat leaves as affected by different types of water stress. *Physiol Plant*, vol. 46 (1979) 318-323.
16. T. Hissao. Plant responses to water stress. *Annu Rev Plant Physiol*, vol. 24 (1973) 519-570.
17. S.C. Huber and J.L. Huber. Metabolic activity of spinach leaf nitrate reductase. Effects on enzymatic activity and dephosphorylation endogenous phosphatase. vol. 196 (1995) 180-189.
18. S.C. Huber, D.W. Israel. CH. Foyer, M.H. Valadier, A. Migge and T.W. Becker. Drought induced effects on nitrate reductase activity on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiol*, vol. 117 (1998) 283-292.
19. S.W. Hullgren, C.G. Tauer and J.E. Lock. Fine root carbohydrate dynamics of loblolly pine seedling growth under contrasting levels of soil moisture. *Plant. Physiol*, vol. 37 (1991) 760-780.
20. J. Ingram and D. Bartles. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, vol. 47 (1996) 377-403.
21. K.E. Koch. Carbohydrate-modulated gene expression in plant. *Annu. Rev. Plant. Physiol*, vol. 47 (1996) 509-515.

22. G. Kochert. Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method. In: Helebusht, J.A. Craig, J.S. (ed): Hand book of Phycological Method (1978) 56-97. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
23. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough and R.J. Rand. Protein measurment with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem, vol. 193 (1951) 265-273.
24. B. Martin and N.A.R. Torres. Effects of water deficits stress on photosynthesis, its components and component limitations and on water use efficiency in wheat. Plant Physiol, vol. 100 (1992) 733-739.
25. A.G. Matta and I. Gia. Accumulation of phenol in tomato plant ineffectd by different forms of *Fusarium oxysporum*. Phytphatol, vol. 50 (1969) 512-513.
26. J.F. Moran, M. Becana, I.I Ormaetxe, S. Frechilla, R.V.L. Klucasc and D.A. Tejo. Drought induces oxidative stress in pea plants. Planta, vol. 194 (1994) 346-352.
27. G.M. Pastori and V.S. Trippi. Cross resistance between water and oxidative stress in wheat leaves, J. Agri. Sci, vol. 120 (1993) 289-294.
28. G.S. Premachndra, H. Saneoka and K. Fujita, Osmotic adjustment and stomatal response to water deficits in maiz. J Exp Botany, vol. 43 (1991) 1451-1456.
29. L.V. Rensburg and G.H.J Kruger. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion :it's relationship to membrane integrity and chloroplast ultra structure in *Nicotiana tabacum* L. J Plant Physiol, vol. 141 (1993) 188-194.
30. F.B. Salisbury and C.B. Ross. Plant Physiol (1991) 316-321. Wadsworth publishing company belton California.
31. J. Silva, J. Oson, F. Fonseca and M. Correia. The effects of soil during and subsequent re-watering on the activiting of nitrate reductase in root and leaves of *Helianthus annuus*. Functional plant biology. 31(6)(2004) 611-621.
32. R. Sunka, D. Bartels and H.H. Kirch. Over expression of a stress inducible dehydrogenas gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. The Plant Journal 35 (2003).
33. D.W. Sween, J.H. Long and M.B. Kirkham. A signal irrigation to improve carly maturing soybean yeild and quality. Soil. Sci. Soc. Am. J, vol. 67 (2003) 235-240.

34. G.L.Sym. Optimisation of the *in vivo* assay conditions for nitrate reductase in barley. J.Sci.Food.Agric, vol.35 (1984) 725-730.
35. C.L.M.Synerri, C.Pizino and F.Navari-Izzo. Chemical changes and O<sub>2</sub> production in thylakoid membranes under water stress, Plant Physiol, vol.87 (1993) 211-216.
36. A.Taher. Physiology and lipid change in some upland rice (*Oryza sativa* L.) cultivars grown under drought stress. College Laguna (Philippines) (1988) 162:Leaves.
37. P.A.Tejo and M.s.Diaz. Nodule and leaf nitrate reductase and nitrogen fixation in *Medicago sativa* L. under water stress, Plant.Physiol, vol.69 (1987) 479-482.
38. M. Werner, E. Kaiser and N. Behnisch. Acid- base modulation of nitrate reductase in leaf tissue. Planta, vol. 196 (1995) 1-6.
39. A.Wood. Thriving dry, Perspectives, Research and creative activities (2002) Southern Illinois University Carbondale.
40. R.Wu and A.Garg. Engineering rice plants with trehalose producing genes improves tolerance to drought, salt and low temperature. ISB News, February (2003).
41. M.Z.Xia. Effects of soil drought during the generative development phase of faba bean (*Vicia faba*) on photosynthetic characters and biomass production. J.Agric.Sci. vol. 122 (1994) 67-72.
42. Y.Yamada and Y.Fukutoku. Effect of water stress on soybean stress. Soybean in tropical and sub tropical cropping system. The Asian vegetable research and development center Shanbue Taiwan, China chapter 48 (1986) 373-382.