مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، ۱۴۵-۱۳۵

تأثیر تنش شوری بر انواع پروتوکلروفیلید گندم (*Triticum aestivum*)

محمدرضا امیرجانی*

– دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، کدپستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-amirjani@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۲۷

چکیده

هدف: تأثیر تنش شوری بر مراحل اولیه نمو نهال‌های گندم اتیوله مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: دانه ارقام مقاوم و حساس گندم در تاریکی و در محیط غذایی دارا یا فاقد ۲۰۰ میکرو مول NaCl رشد کردند. میزان پروتوکلروفیلید گیاهان با روش اسپکتروسکوپی محاسبه شد. طیف فلورسانس گیاهان در دمای پایین (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) ثبت شد. فلورسانس انواع پروتوکلروفیلید، که در محدوده ۶۵۵ و ۶۳۳ نانومتر دارای قله‌هستند، محاسبه شد. همچنین نسبت کلروفیلید تازه تشکیل شده به پروتوکلروفیلید نانور فعال در برگ‌هایی که به آنها فلاش تابانیده شده بود محاسبه گردید. این محاسبه میزان تغییر شکل نوری را نشان می‌دهد. میزان کلروفیل a نیز بعد از قرار گرفتن نمونه‌ها در نور، با روش اسپکتروسکوپی، اندازه‌گیری شد. در هر آزمایش حداقل پنج تکرار مورد بررسی قرار گرفته است.

نتایج: تیمار شوری در هر دو رقم منجر به افزایش قابل ملاحظه میزان پروتوکلروفیلید در نمونه‌های اتیوله و کلروفیلید در نمونه‌های نور دیده گردید. تنش شوری بر نسبت پروتوکلروفیلید نورفعال به نانور فعال و کلروفیلید تازه تشکیل شده موثر بود. تفاوت در رشد، بین نمونه‌های تیمار شده و شاهد کاملا مشخص بود. برگ‌های حاصل از گیاهان پیش تیمار شده با شرایط تنش شوری و در تاریکی بعد از قرار گرفتن در روشنایی و در محیط تنش (دارای ۲۰۰ میکرو مول نمک اضافی) کلروفیل a بیشتری نسبت به گیاهان رشد یافته در محیط شاهد و در تاریکی که تحت شرایط مشابه نمونه‌های فوق الذکر قرار گرفتند تولید کردند.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد افزایش پروتوکلروفیلید بلند موج، بخشی از مکانیسم حمایتی در برابر تنش شوری است.

واژگان کلیدی: پروتوکلروفیلید، شوری، گندم، فلورسانس

مقدمه

کلروفیل رنگدانه‌ای است که نور را برای فتوسنتز جذب می‌کند واز پیش ساز خود، پروتوکلروفیلید، که در تاریکی مجتمع می‌شود ساخته می‌شود (۱). مواد معدنی موجود در خاک برای تولید کلروفیل اهمیت زیادی دارد و کمبود برخی یون‌های معدنی می‌تواند منجر به کاهش کلروفیل و کلروزیس شود. شوری بالا جذب یون‌های مختلف را دچار اختلال می‌کند و همچنین تنش شوری تأثیر بارزی بر جوانه زنی دانه، رشد نهال و میزان محصول دارد (۲و۳). از تاثیرات شوری علاوه بر کلروزیس می توان به کاهش کل رشد و اندازه برگ اشاره کرد (۴). ترکیبات پیام رسان دخیل درمکانیسم پیام رسانی تنش انواع متفاوتی دارند از جمله گونه های اکسیژن واکنش گر (Reactive Oxygen Species, ROS)، لیپید فسفاتاز و نوکلئوتیدهای حلقوی (۵). برخی هورمون های گیاهی به ویژه اسید آبسی سیک، اتیلن و اکسین نیز در پاسخ گیاه به تنش شوری دخیل هستند (۶). برخی هورمون‌ها طویل شدن و حجیم شدن سلولی را ضمن رشد گیاه در شرایط تنش محدود می‌کنند. ترکیب اصلی نمک در خاک‌های شور کلرورسدیم NaCl است (۷). یون Na^+ جزء عناصر ضروری برای رشد گیاه نیست و در صورت حضور بیش از حد سمی بوده، برای جذب K^+ ایجاد مزاحمت می‌کند. گیاهان روش‌های متفاوتی را برای مقابله با تجمع Na^+ در سیتوزول استفاده می‌کنند. از جمله این روش‌ها می توان به کاهش نفوذ Na^+ به درون سلول، خارج سازی Na^+ اضافی از سلول یا هدایت Na^+ اضافی به درون واکوئل نام برد. تمام این روش ها با فعالیت کانال‌های یونی انجام می‌شود (۸و ۹).

تنش شوری اغلب به دلیل کاهش پایداری غشا منجر به تخریب هومئوستازی سلول می‌شود (۱۰). تخریب هومئوستازی در سطح سلولی و نیز کل گیاه صورت می‌گیرد و تخریب‌های انجام شده در سطح سلولی می‌تواند منجر به توقف رشد و حتی مرگ گیاه شود. مقاومت به شوری تا حد زیادی مربوط به بازسازی هومئوستازی است (۱۱و۱۲). ارقام حساس به شوری در بخش هوایی Na^+ بیشتری را نسبت به ریشه جمع می‌کنند، در حالی که ارقام مقاوم، Na^+ بیشتری را در ریشه جمع می‌کنند(۱۳).

تولید کلروفیل گیاهانی که در مراحل ابتدایی رشد و از طریق ریشه در معرض تنش شوری قرار می‌گیرند، کاهش می‌یابد (۷). گیاهان رشد یافته در نور که قبلا تحت تأثیر شوری قرار گرفته‌اند دارای مقاومت بیشتری به تنش شوری هستند (۱۴). این سازگاری از طریق بهبود هومئوستازی بوسیله تنظیم غلظت Na^+ و Cl^- صورت می‌گیرد (۱۵).

دانه‌ها اغلب در تاریکی جوانه می‌زنند و اتیوله می‌شوند. اتیوله شدن گیاهان ضمن رشد در شرایط نور کم نیز انجام می‌شود. رشد برگ اولیه به تنش خشکی و شوری حساس است (۱۶). نهال‌های اتیوله جوان زرد رنگ هستند و دارای مقادیر زیادی پروتوکلروفیلید می باشند که سوبسترای آنزیم نور فعال پروتوکلروفیلید اکسیدوروکتاز (NADPH:Pchlide oxidoreductase; POR; EC l.6.99.1) است. پروتوکلروفیلید، POR و کوآنزیم NADPH مجموعه ای را تشکیل می‌دهند که در گیاهان رشد یافته در تاریکی انبار می‌شوند (۱۷). بخش عمده پروتوکلروفیلید در این مجموعه نور فعال است و در اثر تابش فلاش نور به کلروفیلید احیا می‌شود. البته مقدار کمی از پروتوکلروفیلید نور فعال نیست و بلافاصله بعد از تابش فلاش تبدیل به کلروفیلید نمی‌شود (۱۸). بعد از تغییر شکل نوری، کلروفیلید تشکیل شده به رنگدانه استری (کلروفیل a و کلروفیل b) تبدیل می‌شود (۱۹).

منطقه اصلی جذب نوری و فلورسانس پروتوکلروفیلید نور فعال به ترتیب در ۶۵۰ و ۶۵۵ نانومتری قرار دارد. در صورتیکه منطقه جذب و فلورسانس پروتوکلروفیلید نانور فعال، فرمی از پروتوکلروفیلید که تحت تأثیر یک فلاش نور به کلروفیلید تبدیل نمی‌شود، به ترتیب در ۶۲۸ و ۶۳۳ نانومتری قرار دارد (۱، ۱۹و۲۰).

در ضمن رشد و نمو گیاه، میزان پروتوکلروفیلید برگ افزایش می‌یابد و تناسب فرم های مختلف آن تغییر می‌کند (۲۱). تنش شوری علاوه بر تأثیر بر رشد برگ می‌تواند بر تجمع پروتوکلروفیلید و تشکیل فرم های مختلف آن نیز موثر باشد (۲۲).

در پژوهش حاضر به منظور بررسی تاثیر شوری بر تولید کلروفیل در ارقام حساس و مقاوم به شوری گندم، تجمع پروتوکلروفیلید و تشکیل فرم های مختلف آن در تاریکی و نیز تشکیل کلروفیلید و تجمع کلروفیل ضمن نوردهی در این ارقام حساس و مقاوم به شوری گندم بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

گیاه و شرایط رشد آن: بذرهای دو رقم گیاه گندم (*Triticum aestivum*) که یکی مقاوم به شوری Seds۱ و دیگری حساس به شوری Giza۱۶۸ بود از مؤسسه گیاه‌شناسی دانشگاه گوتنبرگ (سوئد) تهیه شدند. دانه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی و درآب شهری خیس خوردند. سپس دانه‌های خیس خورده روی توری‌های فلزی استیل که در دهانه ظرف پلاستیکی با ابعاد ۲۲×۱۰×۷ سانتی‌متر ثابت شده بود قرار گرفتند. دانه‌ها به

مدت ۱۴ روز در محیط هوگلند (۲۳) فاقد یا دارای نمک اضافی کشت شدند.

تیمار نمک: محیط تنش از افزودن NaCl و KCl به نسبت مولی ۱:۱ به محلول هوگلند تشکیل شدند. دانه‌ها در محیط هوگلند فاقد نمک اضافی به عنوان شاهد و دارای ۲۰۰ میکرومول نمک اضافی به عنوان نمونه آزمایش و در تاریکی کشت شدند. نمک در روز دوم بعد از جوانه زنی به محیط اضافی شد.

اندازه گیری طول نهال‌ها و سطح برگ: طول نهال‌ها و سطح برگی آنها از روز سوم تا چهاردهم اندازه گیری شد. طول نهال از محل دانه تا رأس کولئوپتیل یا برگ اندازه گیری شد. برای اندازه گیری سطح برگ، برگ از نهال جدا شده و کل سطح برگ اسکن و اندازه گیری شد.

تشخیص رنگدانه‌ها: قطعات برگ از گیاهان رشد یافته در تاریکی و نیز گیاهانی که تحت تأثیر سه فلاش متوالی قرار گرفته بودند مورد استفاده قرار گرفتند. یک سانتی‌متر انتهایی برگ قطع و دو سانتی متر بعدی برای محاسبات، نمونه برداری شدند. قطعات برگی مشابه برای بررسی فرم های پروتوکلروفیلید با استفاده از فلورومتری در دمای پایین، ۱۹۶- درجه سانتی گراد، مورد استفاده قرار گرفتند. در گیاهانی که تحت تأثیر فلاش قرار گرفته بودند نسبت بزرگی فلورسانس در ناحیه ۶۸۵ نانومتر نسبت به ناحیه ۶۳۳ نانومتر که نسبت کلروفیلید به پروتوکلروفیلید نانور فعال را نشان می دهد، محاسبه شد. میزان کلروفیل تولید شده در روشنایی دائمی $\mu mol\ s^{-1}\ m^{-2}$ ۵۰ در برگ گیاهان ۱۴ روزه محاسبه شده. برخی از قطعات قبل از تابانیدن فلاش به مدت ۱ ساعت در محیط هوگلند بدون نمک اضافی یا دارای ۲۰۰ میکرومول نمک اضافی قرار گرفتند.

استخراج و اندازه گیری رنگدانه‌ها: قطعات برگی با استفاده از استون ۸۰ درصد عصاره گیری شدند. حدود ۰/۱ گرم از قطعات برگی در ۴ میلی لیتر استون ۸۰ درصد با استفاده از هموژنایزر شیشه ای سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۷ دقیقه با شتاب ۳۰۰۰g سانتریفوژ و با استفاده از دستگاه Labofuge 200 (Labofuge, VWR, Stockholm , Sweden) سانتریفوژ شد و سپس محلول رویی برای اندازه گیری جذب نوری مورد استفاده قرار گرفت. جذب نوری محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Perkin Elmer Lambda 900 UV/VIS, Boston, MA, USA) سنجش و میزان رنگدانه مطابق روش برووز (۲۴) محاسبه شد.

اسپکتروسکپی فلورسانس: طیف فلورسانس نمونه‌ها *in vivo* و در دمای پایین، ۱۹۶- درجه سانتی گراد، ثبت شد. این طیف‌ها بوسیله اسپکتروفلورومتر فلورولوگ ۳ تاو (Fluorolog 3 tau , Spex Instrument S.A Inc NJ, USA) ثبت شدند. طیف های فلورسانس برای حذف تفاوت حساسیت فتومولتی پلایر با استفاده از نرم افزار GRAM 32 مورد تصحیح قرار گرفتند. قطر منافذ تابش و سنجش نور به اندازه ۴ نانومتر تنظیم شده بودند. طول موج برانگیختگی برای ثبت طیف فلورسانس ۴۴۰ نانومتر انتخاب شد. نمونه‌های مورد استفاده متشکل از حداقل سه برگ بودند که در لوله‌های شیشه‌ای کوچکی قرار داده شدند. نمونه‌ها سپس در نیتروژن مایع قرار گرفتند. اطلاعات حاصل از فلورومتر به یک دستگاه کامپیوتر مجهز به نرم افزار GRAM 32 منتقل شدند (Galactic Industries Corporation Salem NH, USA). بزرگی نسبی قله‌های پروتوکلروفیلید و کلروفیلید میانگین فلورسانس حاصل از برگ‌ها بود.

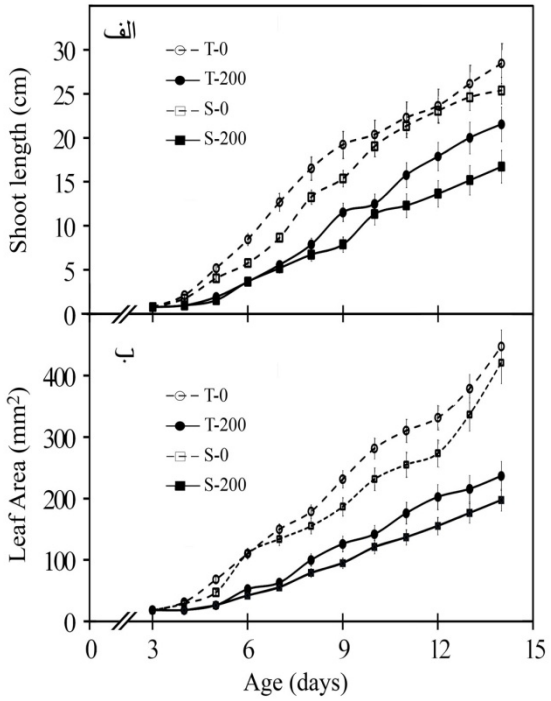
تکرار آزمایشات و بررسیهای آماری: نتایج مورد استفاده میانگین حداقل ۵ تکرار در هر آزمایش بود و نتایج توسط روش آماری آنالیز واریانس، ANOVA، و با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

مورفولوژی نهال‌ها

دانه‌ها در تاریکی کشت داده شدند و طویل شدن نهال‌ها، توسعه و نمو برگ اولیه به طور روزانه محاسبه گردیدند (شکل ۱). طول نهال‌ها در نمونه‌های شاهد (۲۸/۴ و ۲۵/۳ سانتی‌متر به ترتیب در ارقام مقاوم و حساس ۱۴ روزه) به طور معنی داری ($p<$ ۰/۰۱) بلندتر از نمونه‌های تحت تنش (۲۱/۵ و ۱۶/۷ سانتی‌متر به ترتیب در ارقام مقاوم و حساس ۱۴ روزه) بود. تفاوت کمی بین دو رقم مخصوصا در نمونه‌های تحت تنش مشاهده شد. در این مورد اختلاف طول در گیاهان مسن‌تر بیشتر قابل مشاهده بود (شکل ۱).

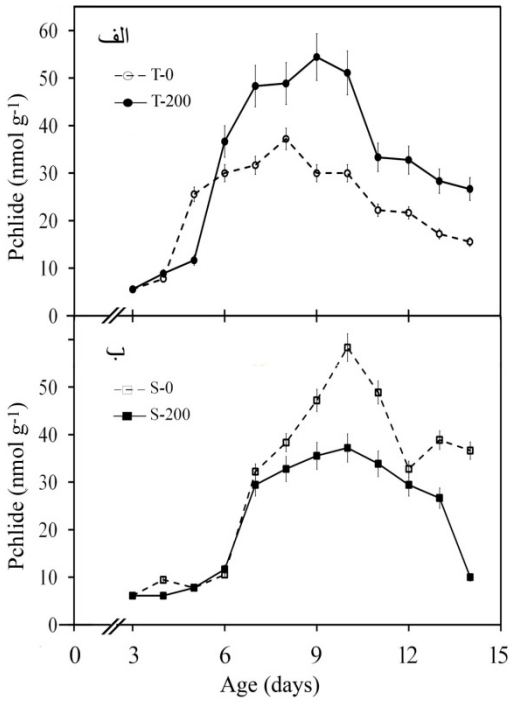
در مدت مطالعه حداکثر طول نهال‌های رقم مقاوم تحت تنش ۲۲ سانتی‌متر و در مورد رقم حساس ۱۷ سانتی‌متر بود. سطح برگی نیز هر روز محاسبه می‌شد. در محیط فاقد نمک اضافی سطح برگی در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بود (شکل ۱). سطح برگی رقم حساس و مقاوم در محیط تنش همیشه کمتر از سطح برگی در محیط فاقد نمک اضافی بود ($p<$ ۰/۰۱). بزرگترین سطح برگی در گیاهان شاهد رقم مقاوم و در روز چهاردهم ثبت شد که ۴۴۷ میلی‌مترمربع وسعت داشت. در حالیکه کمترین میزان سطح برگی مربوط به رقم حساس و در محیط تنش بود که ۱۷۶ میلی‌متر مربع وسعت داشت.



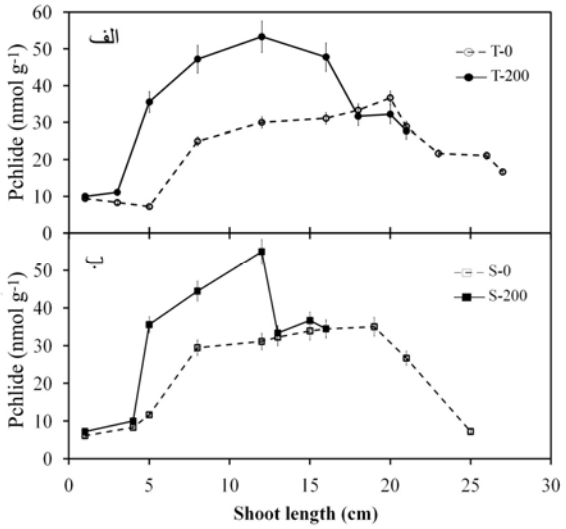
شکل ۱: طول بخش هوایی (الف) و مساحت برگ (ب) نهال‌های ارقام مقاوم و حساس به شوری گندم. دانه‌های گندم به مدت ۱۳ روز در محیط هوگلند فاقد یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی و در تاریکی رشد کردند. طول بخش هوایی از محل اتصال به دانه تا رأس نهال و مساحت اولین برگ اندازه گیری شد. ارقام و تیمارها: مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی (T-0)، مقاوم در محیط دارای ۲۰۰میلی مولار نمک اضافی (T-200)، حساس در محیط فاقد نمک اضافی (S-0)، حساس در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (S-200).

تجمع پروتوکلروفیلید در برگ‌های تحت تنش

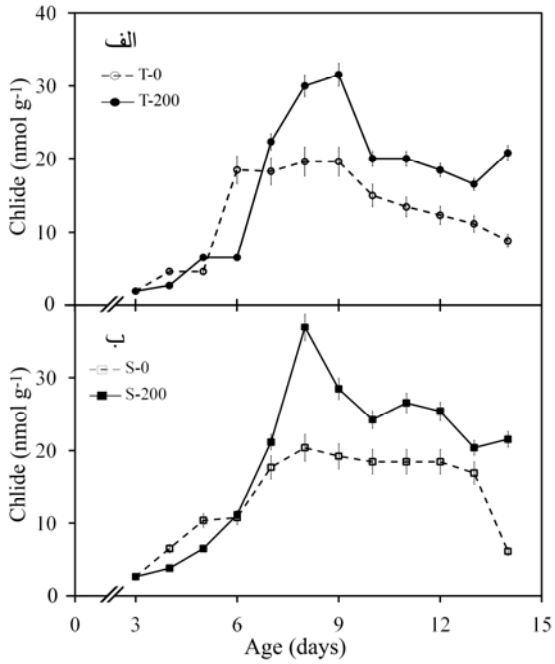
پروتوکلروفیلید پس از جوانه زدن دانه در تاریکی شروع به انباشته شدن می‌کند. در این تحقیق تمام دانه‌ها در محیط غذایی بدون نمک اضافی جوانه زنی کردند و تیمار نمک از روز دوم شروع شد. اولین بررسی رنگدانه‌ها دوازده ساعت پس از شروع تیمار صورت گرفت. نتایج نشان دادند که میزان پروتوکلروفیلید همزمان با افزایش سن تا حدود ده روزگی افزایش و سپس مجدداً کاهش می‌یافت (شکل ۲). در روز ۷ تا ۱۳ میزان پروتوکلروفیلید در نهال‌هایی که درمحیط تنش رشد کرده بودند، بیشتر از نهال‌های شاهد بود. این امر برای هر دو رقم مقاوم و حساس صادق بود (شکل۲). بیشترین میزان پروتوکلروفیلید ۵۵ نانومول بر گرم بود که در روز نهم و دهم در ارقام مقاوم و حساس اندازه گیری شد. با بررسی میزان پروتوکلروفیلید نسبت به طول بخش هوایی، تجمع بیشتر پروتوکلروفیلید در نهال‌های تحت تنش بیشتر نمایان شد (شکل۳).



شکل ۲: میزان پروتوکلروفیلید در برگ نهال‌های ارقام مقاوم (الف) و حساس به شوری (ب) گندم. دانه‌ها به مدت ۱۴ روز در محیط هوگلند فاقد یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی و در تاریکی رشد کردند. ارقام و تیمارها: مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی (T-0)، مقاوم در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (T-200)، حساس در محیط فاقد نمک اضافی (S-0)، حساس در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (S-200).



شکل ۳: میزان پروتوکلروفیلید در برگ نهال‌های ارقام مقاوم (الف) و حساس به شوری (ب) گندم نسبت به طول نهال. طول بخش هوایی از محل اتصال به دانه تا رأس نهال اندازه گیری شد. ارقام و تیمارها: مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی (T-0)، مقاوم در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (T-200)، حساس در محیط فاقد نمک اضافی (S-0)، حساس در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (S-200).



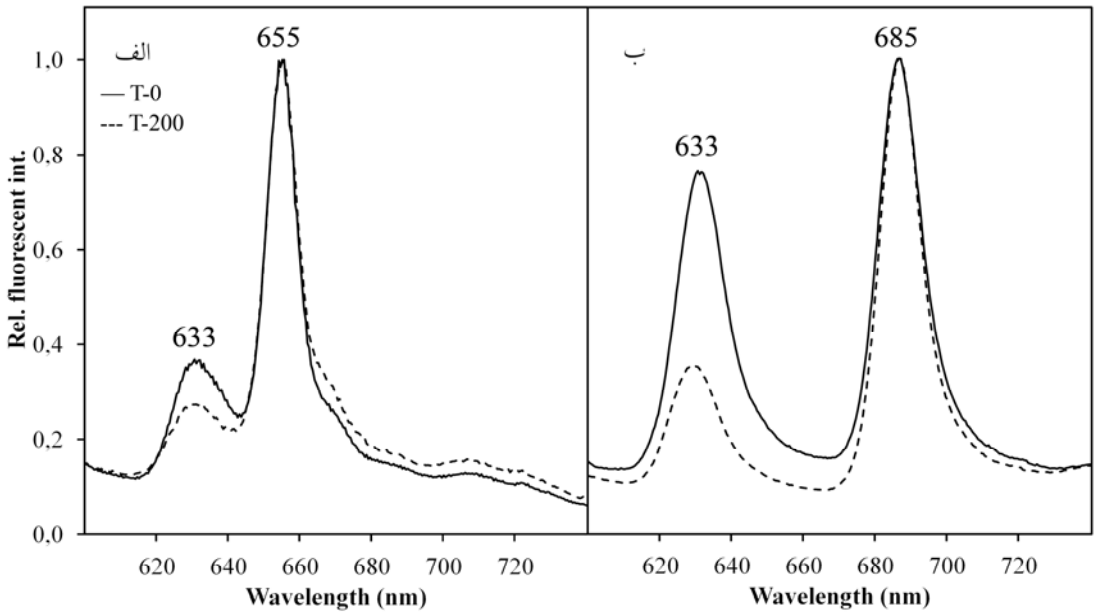
شکل ۴: میزان کلروفیلید تولید شده در برگ نهال‌های ارقام مقاوم (الف) و حساس به شوری (ب) گندم بعد از تابش فلاش. دانه‌های گندم در محیط هوگلند فاقد یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی و در تاریکی رشد کردند. طول بخش هوایی از محل اتصال به دانه تا رأس نهال اندازه گیری شد. ارقام و تیمارها: مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی (T-0)، مقاوم در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (T-200)، حساس در محیط فاقد نمک اضافی (S-0)، حساس در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (S-200).

هنگامی که طول نهال‌های تحت تنش ارقام حساس و مقاوم به ترتیب به ۱۶ و ۲۲ سانتی‌متر رسید رشد آنها متوقف شد. به هنگام متوقف شدن رشد نهال‌های تحت تنش، میزان پرتو کلروفیلید آنها مشابه با نهال‌های شاهد بود. در این زمان ارقام حساس و مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی به ترتیب ۱۵ و ۲۰ سانتی متر طول داشتند.

میزان کلروفیلید نهال‌ها بعد از تابش نور توسط سه فلاش متوالی اندازه گیری شد. در نهال‌های جوان تر میزان تقریباً یکسانی کلروفیلید در نهال‌های تحت تنش و شاهد هر دو رقم یافت شد. بالاترین میزان کلروفیلید در نهال‌های تحت تنش در برگ‌های ۱۰-۸ روزه (شکل۴) اندازه گیری شد که در نهال‌های مقاوم و حساس به ترتیب ۳۰ و ۳۶ نانومول بر گرم وزن تر بود.

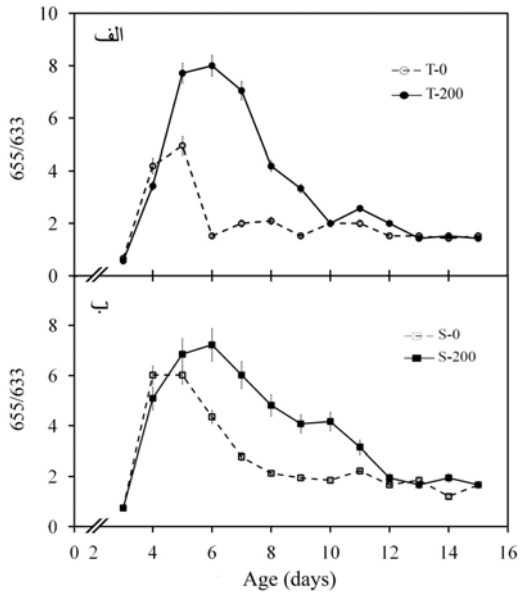
تأثیر تنش شوری بر نسبت رنگدانه‌ها

طیف فلورسانس پروتوکلروفیلید در برگ‌های اتیوله دارای قله‌هایی در ۶۳۳ و ۶۵۵ نانومتر بود (شکل ۵). پروتوکلروفیلید بعد از تابش نور به کلروفیلید تبدیل می‌شود و بنابراین قله حاضر در ۶۵۵ نانومتری حذف و به جای آن قله‌ای در ۶۸۵ نانومتر پدید می‌آید (شکل ۵) که معرف کلروفیلید تازه تشکیل شده است. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود پروتوکلروفیلیدی که طیف آن در منطقه ۶۳۳ نانومتر قرار دارد نسبت به ۶۵۵ نانومتر در گیاهان تحت تنش کاهش می‌یابد.

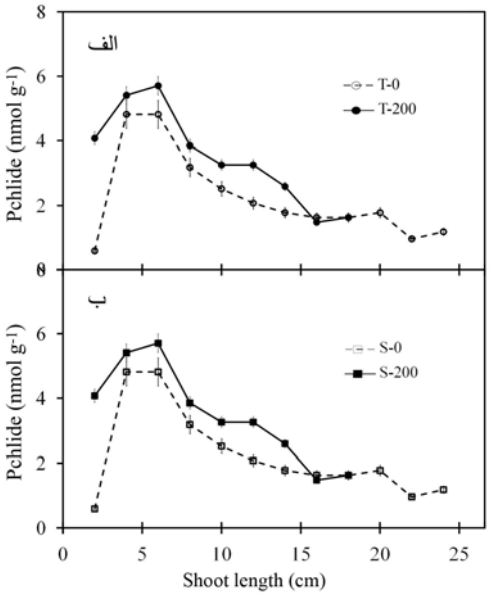


شکل ۵: طیف فلورسانس گیاهان ۹ روزه گندم در دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد قبل (الف) یا بعد از تابش فلاش (ب). دانه‌های گندم در محیط هوگلند فاقد یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی و در تاریکی رشد کردند. ارقام و تیمارها: مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی (T-0)، مقاوم در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (T-200).

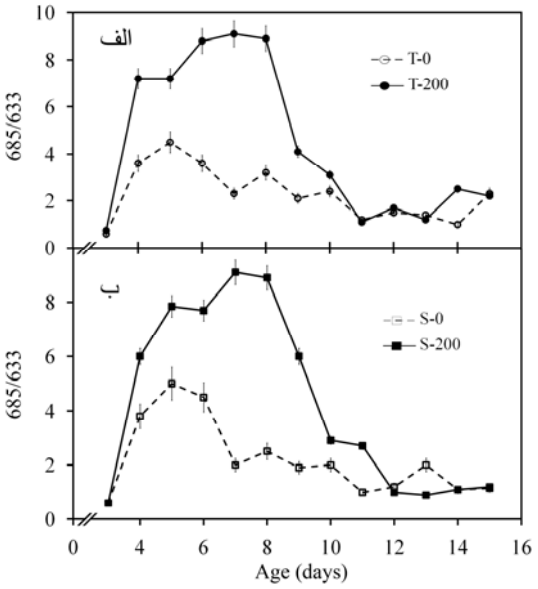
در ضمن نمو گیاه نسبت اندازه فلورسانس پروتوکلروفیلید (۶۳۳ / ۶۵۵) افزایش سریعی دیده می‌شود (شکل ۶) این افزایش در شرایط مختلف آزمایش مشاهده شد اما در رقم مقاوم در محیط تنش نمو بیشتری دارد (شکل۶ الف). هنگامی که نسبت فلورسانس با طول بخش هوایی در نظر گرفته شد این افزایش در رقم حساس نمود کمتری داشت (شکل ۷). بعد از تابش نور نسبت بزرگی فلورسانس در ۶۸۵ نانومتر به ۶۳۳ نانومتر محاسبه شد که نسبت میزان کلروفیلید تازه تشکیل شده به پروتوکلروفیلید نانورفعال را نشان می دهد. نتایج مشابه نسبت‌های انواع پروتوکلروفیلید بود. بدین معنی که این نسبت در محیط تنش در هر دو رقم افزایش نشان می دهد (شکل ۸ الف و ب). این افزایش حتی در مقایسه آن با طول بخش هوایی قابل مشاهده است (شکل ۹).



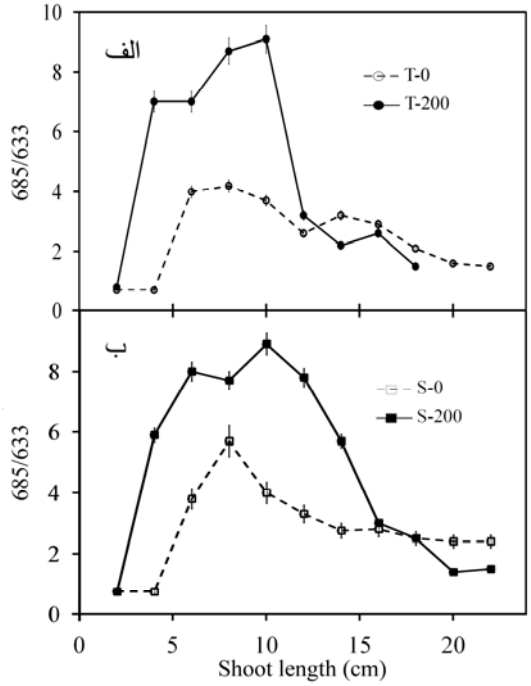
شکل ۶: نسبت بزرگی فلورسانس نهال‌های ارقام مقاوم (الف) و حساس به شوری (ب)گندم رشد یافته در محیط هوگلند فاقد یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی و در تاریکی، در منطقه ۶۵۵ نانومتر به منطقه ۶۳۳ نانومتر. نسبت‌ها بر اساس طیف فلورسانس در سنین مختلف بدست آمده‌اند. ارقام و تیمارها: مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی (T-0)، مقاوم در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (T-200)، حساس در محیط فاقد نمک اضافی (S-0)، حساس در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (S-200).



شکل ۷: نسبت بزرگی فلورسانس نهال‌های ارقام مقاوم (الف) و حساس به شوری (ب) گندم رشد یافته در محیط هوگلند فاقد یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی و در تاریکی در منطقه ۶۵۵ نانومتر به منطقه ۶۳۳ نانومتر. نسبت‌ها بر اساس طیف فلورسانس در نهال‌های دارای طول‌های مختلف بخش هوایی بدست آمده‌اند. طول بخش هوایی از محل اتصال به دانه تا رأس نهال اندازه گیری شد. ارقام و تیمارها: مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی (T-0)، مقاوم در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (T-200)، حساس در محیط فاقد نمک اضافی (S-0)، حساس در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (S-200).



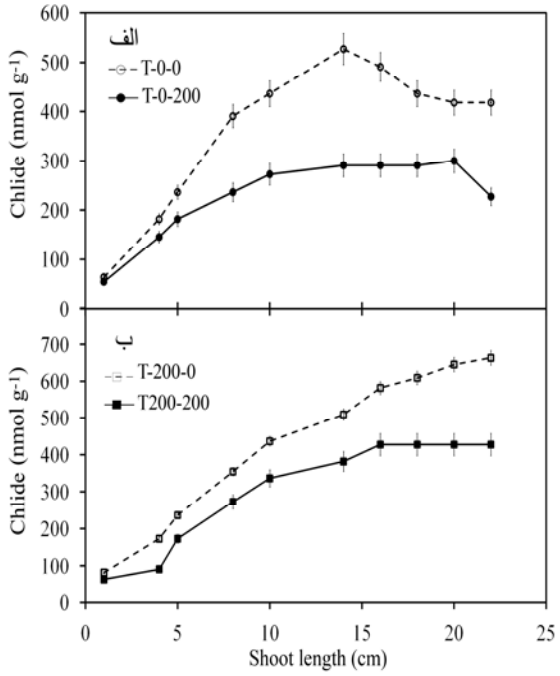
شکل ۸: نسبت بزرگی فلورسانس نهال‌های ارقام مقاوم (الف) و حساس به شوری (ب) گندم رشد یافته در محیط هوگلند فاقد یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی و در تاریکی، بعد از تابش فلاش، در منطقه ۶۸۵ نانومتر به منطقه ۶۳۳ نانومتر. نسبت‌ها بر اساس طیف فلورسانس در سنین مختلف بدست آمده‌اند. ارقام و تیمارها: مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی (T-0)، مقاوم در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (T-200)، حساس در محیط فاقد نمک اضافی (S-0)، حساس در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (S-200).



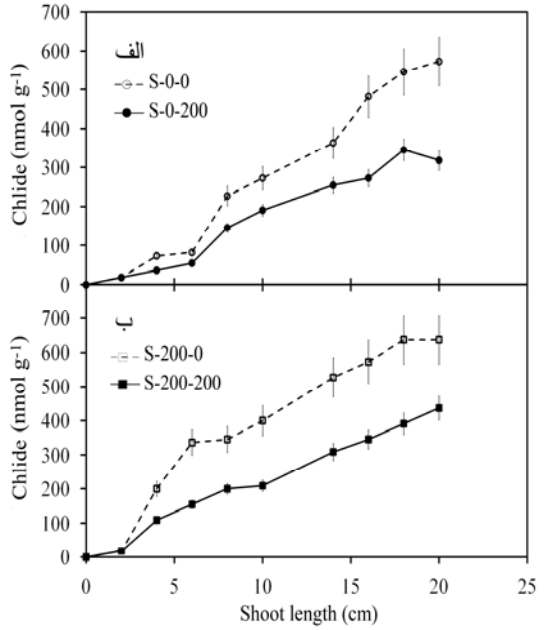
شکل ۹: نسبت بزرگی فلورسانس نهال‌های ارقام مقاوم (الف) و حساس به شوری (ب) گندم رشد یافته در محیط هوگلند فاقد یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی و در تاریکی، بعد از تابش فلاش، در منطقه ۶۸۵ نانومتر به منطقه ۶۳۳ نانومتر. نسبت‌ها بر اساس طیف فلورسانس در نهال‌های دارای طول‌های مختلف بخش هوایی بدست آمده‌اند. طول بخش هوایی از محل اتصال به دانه تا رأس نهال اندازه گیری شد. ارقام و تیمارها: مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی (T-0)، مقاوم در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (T-200)، حساس در محیط فاقد نمک اضافی (S-0)، حساس در محیط دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (S-200).

تجمع کلروفیل در برگ‌های تحت تنش

برگ‌های اتیوله هر دو رقم رشد یافته در محیط هوگلند دارا یا فاقد نمک اضافه در حالیکه روی محیط شناور بودند در معرض نور ممتد قرار گرفتند. میزان کلروفیل a برگ‌ها هر دو ساعت یکبار اندازه گیری شدند (شکل ۱۰ و ۱۱). نهال‌های شاهد مقادیر مشابهی از کلروفیل را نشان دادند. در تمام موارد برگ‌هایی که در محیط فاقد نمک اضافی شناور بودن مقادیر بیشتری کلروفیل نسبت به برگ‌های شناور در محیط دارای نمک اضافی داشتند. نکته قابل توجه افزایش میزان کلروفیل a در برگ تهیه شده از نهال‌های تحت تنش نسبت به برگ تهیه شده از نهال‌های شاهد بود. برگ‌های تهیه شده از نهال‌های مقاوم تحت تنش وقتی درمحیط دارای نمک اضافی شناور می‌شدند میزان کلروفیل بیشتری از نهال‌های شاهد در شرایط مشابه تولید می کردند. تولید کلروفیل a برگ‌های تحت تنش رقم حساس وقتی در محیط فاقد نمک اضافی شناور می‌شدند افزایش چشمگیری داشت (شکل ۱۱).



شکل ۱۰: میزان کلروفیلید تولید شده در برگ نهال‌های رقم مقاوم به شوری گندم. دانه‌های گندم در محیط هوگلند فاقد (الف) یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (ب) و در تاریکی رشد کردند. قطعات برگ سپس در پتری محتوی هوگلند فاقد (T-0-0, T-200-0) یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی(T-0-200, T-200-200) شناور شده در معرض نور قرار گرفتند.



شکل ۱۱: میزان کلروفیلید تولید شده در برگ نهال‌های رقم حساس به شوری گندم. دانه‌های گندم در محیط هوگلند فاقد (الف) یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی (ب) و در تاریکی رشد کردند. قطعات برگ سپس در پتری محتوی هوگلند فاقد (S-0-0, S-200-0) یا دارای ۲۰۰ میلی مولار نمک اضافی(S-0-200, S-200-200) شناور شده در معرض نور قرار گرفتند.

بحث

تنش شوری تأثیرات بزرگی بر نمو گیاه دارد. از نظر مورفولوژیکی کاهش اندازه برگ و رشد کلی گیاه شاخصی برای گیاهان تحت تنش است (۴ و ۹). تولید کلروفیل در گیاهانی که از طریق ریشه در معرض شوری قرار می گیرند در مراحل اولیه نمو کاهش می‌یابد (۷). ارقام مقاوم به شوری با قدرت زیادی خود را با محیط تنش سازگار می‌کنند.

اندازه‌گیری‌ها نشان دادند که دو رقم گندم با میزان مختلف مقاومت به شوری که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند دارای اندک تفاوتی در رشد بخش هوایی بودند. تنش شوری، رشد آنها را به میزان تقریبا مشابهی تحت تاثیر قرار داد. افزایش اندازه سطح برگ نیز الگوی مشابهی داشت و تأثیر شوری در هر دو رقم تقریبا یکسان بود. البته باید متذکر شد که نهال‌های رقم حساس کمترین افزایش را در طول بخشی هوایی و سطح برگ داشتند. تفاوت طول بخش هوایی در ارقام مقاوم و حساس احتمالا در ارتباط با حضور یک یا چند استراتژی مقاومت در رقم مقاوم است که در رقم حساس وجود ندارد یا با کارآیی پایین تری عمل می‌کند. برخلاف نظر Munns (۲۵) طول بخش هوایی نهال‌هایی که در محیط تنش یا محیط معمولی رشد می‌کنند در حین مراحل اولیه نمو در تاریکی اختلاف معنی داری دارند. به عقیده Munns در طی ۱۰ روز اولیه رشد در روشنایی اختلاف معنی داری بین گیاهان تحت تنش و شاهد مشاهده نمی‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که گیاهان در محیط روشنی توانایی بیشتری برای مقابله با تنش شوری داشته و بر عکس سلولهایی که در تاریکی قرار می گیرند حساسیت بیشتری به تنش شوری دارند.

زمان لازم برای انباشت حداکثر میزان پروتوکلروفیلید در هر دو رقم مشابه بود. همچنین مشخص شد برای اینکه میزان پروتوکلروفیلید انباشته شده در تاریکی در شرایط تنش به حداکثر برسد ۹ تا ۱۰ روز زمان لازم دارد (شکل ۲). این در حالی است که میزان کلروفیل نهال‌های شاهد در ۷ روزگی به حداکثر می‌رسد. تشکیل رنگدانه و انباشته کردن آن را می توان در ارتباط با طول گیاه نیز بررسی کرد. گیاهان در حین نمو تنها تا زمانی پروتوکلروفیلید تولید می‌کنند که برگ درحال رشد باشد اما هنگامی که سلول ها به طول کامل رشد کردند میزان کلروفیل ساخته شده در آنها کاهش می‌یابد. میزان پروتوکلروفیلید در برگ‌های تحت تنش زودتر از برگ گیاهان شاهد به حداکثر می‌رسند. حداکثر میزان پروتوکلروفیلید در گیاهان تحت تنش بالاتر از گیاهان شاهد بود اما با افزایش سن به سرعت کاهش پیدا کرد. کاهش مقدار پروتوکلروفیلید در گیاهان تحت تنش بارز بود اما به سختی می توان تفاوتی را بین گیاهان مقاوم و حساس تشخیص داد (شکل ۳ الف و ب). میزان کلروفیلید یا کلروفیل تولید شده بعد از تابانیدن فلاش، الگویی مشابه پروتوکلروفیلید داشت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش پروتوکلروفیلید مربوط به پروتوکلروفیلید نورفعال است.

برای تایید این مشاهدات طیف فلورسانس برگ‌های رشد یافته در شرایط مختلف در دمای پایین، ۱۹۶- درجه سانتی گراد، ثبت شد. این طیف‌ها نشان دادند که در نمونه‌های تحت تنش پروتوکلروفیلید نور فعال که در ۶۵۵ نانومتری فلورسانس دارد، افزایش یافته است. این افزایش در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس چشمگیر تر بود (شکل ۶). بعد از تغییر شکل نوری، با تابش یک فلاش، نسبت کلروفیلید تازه تشکیل شده و پروتوکلروفیلید نانورفعال باقی مانده در نمونه‌های تحت تنش بسیار بالا بود (شکل ۸). به نظر می‌رسد که نمونه‌های تحت تنش دارای سیستمی برای حمایت از تشکیل پروتوکلروفیلید بلند موج متصل به POR باشند (۲۶). اخیراً Erdei (۲۷) با نشان دادن تشکیل گونه های اکسیژن واکنش گر (ROS) بعد از تابش نور به اپی‌کوتیل نخود اتیوله چنین سیستم حمایتی را مورد توجه قرار داده است.

بررسی ها نشان داده‌اند که پیش تیمار نمک سازگاری نهال‌ها به تنش شوری و افزایش K^+ در ریشه و بخش هوایی را زیاد می‌کند (۲۸). در پژوهش حاضر به دفعات مشاهده شد که تولید کلروفیل a در گیاهان در محیط فاقد نمک اضافی تحت تابش نور قرار گرفتند بیشتر بود. به ویژه هنگامی که قطعات برگی مورد آزمایش از گیاهان تحت تنش انتخاب شده بودند. البته وقتی قطعات برگی در محیط تنش تحت تابش نور قرار می‌گرفتند انباشتگی کلروفیل a در رقم مقاوم که قبلا تحت تنش قرار داشتند نسبت به نهال‌هایی که قبلا تحت تنش نبودند بیشتر بود (شکل ۱ الف و ب). رقم حساس وضعیت متفاوتی داشت میزان کلروفیل a در نهال‌هایی که در محیط تنش تحت تابش نور بودند تقریبا به اندازه نمونه‌های پیش تیمار شده با نمک (شاهد) بود (شکل ۱۱). البته کلروفیل a انباشته شده در برگ‌های پیش تیمار شده رقم حساس که ضمن تابش نور در محیط فاقد نمک اضافی قرار گرفته بودند در مقایسه با برگ‌های پیش تیمار نشده در شرایط یکسان، افزایش چشمگیری داشت (شکل ۱۱). بنابراین گیاهان حساس به شوری در اثر پیش تیمار، سازگاری ضعیفی با شوری پیدا کردند. اما این سازگاری در حدی نبود که سبز شدن در محیط تنش را حمایت کند.

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد ضمن مراحل اولیه نمو نهال‌های گندم اتیوله درمحیط تنش مقادیر بیشتری پروتوکلروفیلید تولید می‌شود که

عمده آن پروتوکلروفیلید بلند موج است. این حالت در هر دو رقم مقاوم و حساس مشابه بود اما در رقم مقاوم نمود بیشتری داشت. با تابش نور به برگ حاضر در محیط تنش رقم حساس کلروفیل کمتری نسبت به رقم مقاوم تولید می‌کرد. بنابراین ممکن است افزایش تشکیل پروتوکلروفیلید بلند موج به علت مکانیسم حمایتی برضد تنش شوری باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با مساعدت دکتر هنریک آرونسون از گروه علوم گیاهی و محیط زیست دانشگاه گوتنبرگ سوئد انجام شده است. بنابراین بدینوسیله از ایشان سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Beale S.I. Biosynthesis of photosynthetic pigments, in Chloroplast biogenesis, N.R. Baker, J. Barber, Editors. Elsevier Science Publishers: Amsterdam. 1985; 33-205.

2. Flowers TJ. Improving crop salt tolerance. J Exp Bot. 2004; 55(396): 307-19.

3. Esechie HA. Interaction of Salinity and Temperature on the Germination of Sorghum. Journal of Agronomy and Crop Science. 1994; 172(3): 194-199.

4. Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na+/H+ antiport in Arabidopsis. Science. 1999; 285(5431): 1256-8.

5. Rai AK, Takabe T, Abiotic stress tolerance in plants: toward the improvement of global environment and food. 2006; Heidelberg: Springer.

6. Finkeistein RR, Gampala SS, Rock CD. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. Plant Cell. 2002; (14): 515-545.

7. Verslues PE, M Agarwal, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant J. 2006; 45(4): 523-39.

8. Amtmann A, Fischer M, Marsh EL, Stefanovic A, et al. The wheat cDNA LCT1 generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. Plant Physiology. 2001; 126(3): 1061-71.

9. Uozumi N, Kim EJ, Rubio F, Yamaguchi T, et al. The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na(+) currents in xenopus laevis oocytes and Na(+) uptake in Saccharomyces cerevisiae. Plant Physiology. 2000; 122(4): 1249-59.

10.Greenway H, Munns R. Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. Annual Review of Plant Physiology. 1980; 31(1): 149-190.

11. Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. Plant cellular and molecular responses to high unity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2000; 51: 463-499.

12. Zhu JK. Plant salt tolerance. Trends Plant Sci. 2001; 6(2): 66-71.

13. Leonova T, Goncharova E, Khodorenko A, Babakov AV. Characteristics of Salt-Tolerant and Salt-Susceptible Cultivars of Barley. Russian Journal of Plant Physiology. 2005; 52(6): 774-778.

14. Uma S, Prasad TG, Kumar MU. Genetic Variability in Recovery Growth and Synthesis of Stress Proteins in Response to Polyethylene Glycol and Salt Stress in Finger Millet. Annals of Botany. 1995; 76(1): 43-49.

15. Umezawa T, Shimizu K, Kato M, Ueda T. Enhancement of salt tolerance in soybean with NaCl pretreatment. Physiologia Plantarum. 2000; 110(1): 59-63.

16. Hu Y, Burucs Z, Schmidhalter U. Short-Term Effect of Drought and Salinity on Growth and Mineral Elements in Wheat Seedlings. Journal of Plant Nutrition. 2006; 29(12): 2227-2243.

17. Stadnichuk IN, Amirjani MR, Sundqvist C. Identification of spectral forms of protochlorophyllide in the region 670-730 nm. Photochem Photobiol Sci. 2005; 4(2): 230-8.

18. Franck F, Bereza B, Böddi B. Protochlorophyllide-NADP+and Protochlorophyllide-NADPH complexes and their regeneration after flash illumination in leaves and etioplast membranes of dark-grown wheat. Photosynth Res. 1999; 59: 53-61.

19. Ryberg M, Sundqvist C. Structural and functional significance of pigment- protein complexes of chlorophyll precursors, in Chlorophylls, H. Scheer, Editor. CRC press Inc. 1991; 587-592.

20. Amirjani MR, Sundqvist C. Red region excitation spectra of protochlorophyllide in dark-grown leaves from plant species with different proportions of its spectral forms Photosynthetica. 2006; 44(1): 83-92.

21. Amirjani MR, Sundqvist K, Sundqvist C. Protochlorophyllide and POR development in dark-grown plants with different proportions of short-wave length and long-wavelength protochlorophyllide spectral forms. Physiologia Plantarum. 2006; 128(4): 751-762.

22. Conceição Vieira S. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in s unflower leaves. Scientia Horticulturae. 2004; 103(1): 93-99.

23. HoaglandD, Arnon D. The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agric. Exp. St. Circ. 1950; 347.

24. Brouers M, Michel-Wolwertz MR. Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts, re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyllide. Photosynth Res. 1983; 4(265-270): 265.

25. Munns R. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment. 2002; 25(2): 239-250.

26. Sperling U, van Cleve B, Frick G, Apel K, et al. Overexpression of light-dependent PORA or PORB in plants depleted of endogenous POR by far-red light enhances seedling survival in white light and protects against photooxidative damage. Plant J. 1997; 12(3): 649-58.

27. Erdei N, Barta C, Hideg E, Boddi B. Light-induced wilting and its molecular mechanism in epicotyls of dark-germinated pea (Pisum sativum L.) seedlings. Plant Cell Physiol. 2005; 46(1): 185-91.

28. Djanaguiraman M, Sheeba JA, Shanker A, Devi DD, et al. Rice can acclimate to lethal level of salinity by pre-treatment with sublethal level of salinity through osmotic adjustment. Plant Soil. 2006; 284 :363-373.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2011; 2(2): 135-145

Research Article

Effect of Salt Stress on Different Protochlorophyllide Forms of Wheat (*Triticum aestivum*)

Amirjani MR*

- Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

* Email corresponding author: m-amirjani@araku.ac.ir

Received: 4 Oct. 2011 Accepted: 18 Dec. 2011

Abstract

Aim: In this investigation the effect of salt stress on the early developmental stages of dark-grown wheat seedling was studied.

Materials and methods: Grains of the salt tolerant (Seds1) and the susceptible (Giza168) cultivars of wheat were germinated and grown in darkness in nutrient solution supplied with or without 200 mM NaCl. The protochlorophyllide content was determined. The fluorescence emission intensity ratio of 655/633 nm was measured. The ratio of newly formed Chlorophyllide to non-photoactive Pchlide was measured after irradiation of leaf sections with one single flash to estimate the degree of phototransformation. The chlorophyll *a* content was also determined after dark-grown leaf sections were irradiated.

Results: The salt stress treatment caused a marked increase in protochlorophyllide (Pchlide) content in dark-grown material and in Chlide content after irradiation of leaf sections of both varieties. The relative ratio of phototransformable to non-phototransformable pchlide and of newly formed chlorophyllide (Chlide) was influenced by salt stresse. The results were influenced by the different growth rates found for stressed and unstressed seedlings. Leaf sections from seedlings grown under salt stress in darkness accumulates more chlorophyll *a* than leaf sections from unstressed seedlings when floating on nutrients or on a 200 mM NaCl solution in continuous white light.

Conclusion: The increased accumulation of the long-wavelength form of Pchlide is suggested to be an expression for the mobilization of a part of the protective mechanisms against salt stress.

Key words: Fluorescence, Protochlorophyllide, Salt stress, Wheat