

بررسی مقایسه ای بردباری دو وارسته گندم (*Triticum aestivum*) در تولید کلروفیل و انتقال الکترون نسبت به تنش شوری

محمد رضا امیرجانی Ph.D.*^۱

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۴

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۱۰

چکیده

هدف: هدف از پژوهش حاضر بررسی دو وارسته گندم *Triticum aestivum* با بردباری متفاوت نسبت به تنش شوری، در غلظت‌های مختلف نمک بود.

مواد و روش‌ها: گیاهانی از دو وارسته Seds 1 و Giza 168 به مدت هفت روز در محیط غذایی هوگلند رشد داده شدند و تعدادی نیز در محیط غذایی دارای ۲۰۰ میلی مول نمک اضافی قرار گرفتند. قطعات برگ‌گی جدا شده از این گیاهان در محیط دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی قرار داده شدند. برای بررسی میزان کلروفیل به گیاهان اتیوله پیش تیمار شده در محیط دارای ۲۰۰ میلی مول نمک اضافی از هر دو وارسته، نور تابیده شد.

نتایج: حداکثر کارایی فتوشیمیایی، F_v/F_m بدون تغییر معنی‌دار باقی ماند. اندازه گیری میزان انتقال الکترون (ETR) نشان داد که وارسته مقاوم، Seds 1 دارای ETR بیشتری نسبت به وارسته حساس Giza 168 بود. این اندازه گیری همچنین نشان داد که نمونه‌های مقاوم و حساسی که قبلاً در محیط تنش قرار گرفته بودند ایستادگی بهتری را در محیط شور نسبت به نمونه‌های رشد یافته در محیط معمولی داشتند. میزان کلروفیل در وارسته مقاوم نسبت به وارسته حساس بالاتر بود. گیاهان وارسته حساس که قبلاً پیش تیمار شده بودند و سپس در معرض شوری بالا قرار گرفته تجمع کلروفیل بیشتری داشتند.

نتیجه گیری: عملکرد فتوسیستم II تحت تاثیر تنش شوری قرار نمی‌گیرد. وارسته مقاوم سازگاری فتوسنتزی بهتری با تنش شوری دارد. به نظر می‌رسد این امر به دلیل کارایی بالاتر دستگاه فتوسنتزی آن باشد.

واژگان کلیدی: انتقال الکترون، تنش شوری، کلروفیل، گندم

مقدمه

ملکول‌های کلروفیل مانند سایر رنگدانه‌ها از جمله کاروتنوئیدها به پروتئین‌ها متصل هستند (۱). مجموعه‌های جمع‌کننده نور (Light Harvesting Complex, LHC) دارای کلروفیل و کاروتنوئید هستند و مرکز واکنش را که حاوی ترکیبات انتقال الکترون است احاطه می‌کند (۲). طرز قرار گرفتن مجموعه‌های پروتئین - رنگدانه برای فعالیت آنها بسیار مهم است زیرا نهایتاً انرژی اولیه از کاروتنوئیدها به مرکز واکنش منتقل می‌شود که جدایی بار فتوشیمیایی در آنجا اتفاق می‌افتد (۳-۴). مجموعه‌های پروتئین - رنگدانه به غشا تیلاکوئید کلروپلاست وابسته‌اند و به صورت دو مجموعه بزرگ فتوسیستم I و فتوسیستم II سازماندهی شده‌اند. انتقال الکترون در مرکز واکنش فتوسیستم II به زنجیره انتقال الکترونی متصل است که به فتوسیستم I هدایت می‌شود. این پیوند برای انتقال الکترون از آب در بخش اکسیدکننده فتوسیستم II به فردوکسین و نهایتاً به NADP^+ در بخش احیا کننده فتوسیستم I ضروری است. بخش اعظم فلورسانس کلروفیل که از فتوسیستم II منشاء می‌گیرد (۵) می‌تواند به عنوان ابزاری برای سنجش دستگاه فتوسنتزی مورد استفاده قرار گیرد. بازتاب فلورسانس کلروفیل با توجه به کارایی فتوسنتزی تغییر می‌کند (۶). اولین گیرنده الکترون، Q_A ، در شرایط تاریکی به حالت اکسید شده است. بنابراین بازتاب فلورسانس در این شرایط به عنوان فلورسانس صفر یا زمینه F_0 در نظر گرفته می‌شود. وقتی بخشی از Q_A در اثر تابشی نور احیا می‌شود، فلورسانس حاصل اصطلاحاً فلورسانس متغیر F_v نامیده می‌شود. در صورتیکه Q_A کاملاً احیا شود، حداکثر فلورسانس F_m دیده خواهد شد (۷). این حالت عملاً هنگامی اتفاق می‌افتد که نمونه‌های اتیوله تحت تابش فلاش‌های نوری قرار گیرند. این اطلاعات می‌تواند برای محاسبه کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II مورد استفاده قرار گیرد. میزان انتقال الکترون (Electron transfer rate, ETR) تحت تاثیر بازده کوانتومی فتوسیستم II قرار دارد. این پارامترها همچنین تمامیت مجموعه PSII/LHC را نشان می‌دهد (۸-۹). میزان حداکثر کارایی فتوشیمیایی برای برگ‌های سالم معمولاً بین ۰/۷۹ تا ۰/۸۴ است (۱۰). تغییر قابل ملاحظه نسبت F_v/F_m نشان دهنده عملکرد ضعیف فتوسیستم II است.

در پژوهش حاضر تأثیر شدت کم نور بر حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II و میزان انتقال خطی الکترون فتوسنتزی قطعات برگی جدا شده از گیاهان گندم مقاوم و

حساس به شوری که در معرض تنش شدید شوری ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی قرار گرفته‌اند بررسی می‌شوند.

شوری یکی از مشکلاتی است که کشت گیاهان را در قسمتهای عمده‌ای از جهان با مشکل مواجه کرده است. غلظت بالای نمک منجر به عدم تعادل یونی و تنش اسمزی بیش از حد در گیاهان می‌شود. به دنبال آن اغلب واکنش‌های تنش ثانویه از جمله تخریب اکسیداتیو اتفاق می‌افتد (۱۱-۱۲).

عدم تعادل یونی به علت تجمع زیاد Na^+ و Cl^- بوجود می‌آید و منجر به کاهش جذب سایر ترکیبات معدنی از جمله Ca^{2+} و K^+ می‌شود (۱۳-۱۴). یکی از جنبه‌های بسیار مهم مقاومت به شوری تجمع محلول‌های مورد نیاز برای برقراری تعادل یونی سیتوپلاسم در واکوئل است. گیاهان نامقاوم اغلب چنین ظرفیتی را ندارند و فرایندهای متابولیکی آنها به علت عدم تعادل یونی تنش خشکی مختل می‌شود (۱۵). از آنجا که کلروزه شدن یکی از نتایج رشد گیاه در تنش شوری است (۱۶)، بررسی تجمع کلروفیل در گیاهان تحت تنش شوری فرایند مناسبی برای مطالعه اثرات متابولیکی تنش شوری می‌باشد. شوری نوعی تنش غیر زیستی است که رشد و متابولیسم گیاه را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد (۱۷). تنش شوری منجر به تخریب ساختار کلروپلاست و ناپایداری مجموعه‌های پروتئین رنگدانه می‌شود (۱۸-۱۹). بنابراین میزان کلروفیل و به دنبال آن مشخصات فلورسانس کلروفیل تحت تاثیر شوری قرار می‌گیرند. گیاهان رشد یافته در تاریکی فاقد کلروفیل‌اند اما بعد از تابش نور، کلروفیل تولید شده افزایش می‌یابد. نکته قابل توجه این است که تنش شدید شوری باعث کاهش انباشتگی کلروفیل و محدود شدن فلورسانس فتوسیستم II می‌شود (۲۰).

بسیاری از گیاهان می‌توانند در برابر شوری مقاومت کنند مقاومت این گیاهان به علت توانایی حفظ تعادل Na^+ بین واکوئل و سیتوزول از طریق فعالیت کانال‌های یونی است (۲۱-۲۳). این عمل بوسیله انتقال نمک اضافی به بخش‌هایی از گیاه که فعالیت کمتری دارند (۲۴-۲۶) یا جلوگیری اسمزی مانند افزایش تولید گلیسین در کلروپلاست انجام می‌شود. تنش شوری در گیاهانی که در نور قرار می‌گیرند نسبت به گیاهانی که در تاریکی هستند تاثیر بیشتری دارد (۲۷). تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS, Reactive Oxygen Species) نیز در تورم غشا دخالت دارند (۲۸) و آنتی اکسیدانت‌ها می‌توانند نقش تشکیل ترکیبات اکسیژن واکنش‌گر را کم رنگ‌تر کنند. همچنین مشخص شده است که میزان کلروفیل، نوزانتین، لوتئین و

NaCl و KCl به نسبت مولی مساوی به عنوان نمک اضافی به محیط غذایی هوگلند اضافه شدند. تعدادی از گیاهان قبل از شناور شدن در محیط آزمایش، به مدت دو ساعت در محیط دارای ۲۰۰ میلی مول نمک پیش تیمار شدند.

میزان انتقال الکترون و بازده کوانتومی فتوسیستم II:

فلورومتری PAM (Pulse-amplitude modulated) یکی از روشهایی است که به طور وسیع برای بررسی کارایی فتوسیستم II مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷-۸). به این منظور قطعات برگی گیاهان رشد یافته در روشی به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند (۳۴) و سپس حداکثر کارایی فتوشیمیایی F_v/F_m فتوسیستم II و میزان انتقال الکترون خطی ETR بوسیله فلورومتر PAM-2000, walt, Effeltrich بررسی شد. نسبت F_v/F_m و ETR مشاهده شده میانگین حداقل ۵ تکرار می باشد.

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 شیشه‌ای ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۷ دقیقه در ۳۰۰۰ (Labofuge, Labofuge 200 دستگاه از دستگاه VWR, Stockholm, Sweden) سانتریفوژ شد و 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) اندازه‌گیری و میزان رنگدانه مطابق روش بروز (۳۵) محاسبه شد. جذب نوری محلول در طول موج‌های ۶۲۶، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر ثبت و میزان کلروفیل بر اساس معادله‌های ۱، ۲ و ۳ محاسبه گردید.

معادله ۱

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/ml}) = 12.68 \text{ OD}_{663} - 2.65 \text{ OD}_{645} + 0.30 \text{ OD}_{626}$$

معادله ۲

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/ml}) = -4.23 \text{ OD}_{663} + 23.62 \text{ OD}_{645} - 3.26 \text{ OD}_{626}$$

معادله ۳

$$\text{Pchl } (\mu\text{g/ml}) = -4.00 \text{ OD}_{663} - 6.76 \text{ OD}_{645} + 29.62 \text{ OD}_{626}$$

اسپکتروفلورومتری: طیف فلورسانس قطعات برگی بوسیله اسپکتروفلورومتر فلورولوگ ۳ تاو (Fluorolog 3 tau, Spex Instrument S.A Inc NJ, USA) *in vivo* و در دمای پایین،

بتا کاروتن با افزایش غلظت نمک تغییری نمی‌کند (۲۸-۲۹). به طور کلی گیاهان مقاوم در هنگام تنش، توسط مکانیسم‌های مختلفی از غشاء سلولی مراقبت می‌کنند. مکانیسم‌های مختلف مراقبت در گیاهان مقاوم منجر به کاهش غلظت Na^+ و Cl^- (تا زیر غلظت بحرانی) در سلول‌ها می‌شوند (۳۰). بنابراین گیاهان قادرند که اثر تنش شوری را بهبود بخشند. غلظت نمک و مدت تنش از عوامل تعیین کننده زمان لازم برای بهبودی گیاهان محسوب می‌شوند (۳۱).

عوامل محیطی ترکیب رنگدانه‌ای و سازماندهی ساختاری تیلاکوئیدهای کلروپلاست را نیز تغییر می‌دهند. غلظت بالای کاتیون‌ها می‌توانند باعث تخریب اجسام تیغه‌ای ابتدایی (Prolamellar body, PLB) شوند و طیف جذبی پرتوکلروفیلید، پیش ساز بی واسطه کلرفیل که فاقد زنجیره فیتولی است، را تغییر دهند. مشخص شده است که تنش شوری منجر به تشکیل پروتیلاکوئیدها و تیلاکوئیدهای متورم می‌شود (۳۲). در تنش شوری میزان تجمع کلروفیل در برگ‌ها کاهش می‌یابد و همزمان نمو طبیعی کلروپلاست نیز مختل می‌شود (۱۸). در پژوهش حاضر سعی شده است تا با بررسی گیاهان رشد یافته در محیطی طبیعی یا تحت تنش شوری تاثیر شوری بر دو رقم گیاه گندم نان مشخص شود.

مواد و روش‌ها

گیاه و شرایط رشد آن: دانه‌های گندم (*Triticum aestivum*) وارپته حساس، Giza 168، و مقاوم، Seds 1، دارای توانایی رشد در محیط ۶۰۰ میکرومول نمک که از مؤسسه گیاه‌شناسی دانشگاه گوتنبرگ (سوئد) تهیه شد مورد استفاده قرار گرفتند. دانه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی و در آب شهری خیس خوردند. سپس دانه‌های خیس خورده روی توری‌های فلزی استیل که در دهانه ظرف پلاستیکی با ابعاد $10 \times 22 \times 7$ سانتی‌متر ثابت شده بود قرار گرفتند. دانه‌ها به مدت ۷ روز در محیط هوگلند (۳۳)، در دمای معمولی اتاق و در اتاقک رشد در تاریکی و یا روشنایی ممتد با شدت $50-30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ رشد داده شدند.

یک سانتی‌متر انتهایی برگ اولیه قطع شد و دو سانتی‌متر زیر آن برای بررسی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. قطعات برگی در پتری دیش‌های محتوی محیط هوگلند فاقد نمک اضافی، به عنوان شاهد، یا دارای غلظت‌های مختلف نمک اضافی ۲۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مول، به عنوان نمونه آزمایش، شناور شدند. مخلوطی از

نتایج

تاثیر شوری بر حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II
 حداکثر کارایی فتوشیمیایی F_v/F_m فتوسیستم II در برگ گیاهان مقاوم و حساسی مورد ارزیابی قرار گرفت که قبلا در محیط دارای ۲۰۰ میلی مول نمک اضافی و یا بدون آن قرار گرفته بودند. اندازه گیری‌ها نشان دادند که بطور کلی میزان مشاهده شده برای نسبت F_v/F_m در تمام تیمارهای مورد استفاده بدون توجه به مقاوم یا حساس بودن گیاه مورد بررسی عددی بین ۰/۸۱۰ تا ۰/۸۳۰ بود (جدول ۱). گیاهانی که قبل از قرارگرفتن در محیط دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی با محیط غذایی دارای ۲۰۰ میلی مول نمک اضافی پیش تیمار شده بودند و همچنین برگ گیاهانی که بعد از پیش تیمار در محیط غذایی معمولی قرار گرفتند تغییر معنی‌داری در این نسبت نشان ندادند (جدول ۱).

۱۹۶- درجه سانتی‌گراد، و طول موج برانگیختگی ۴۴۰ نانومتر ثبت شد. به منظور حذف تفاوت حساسیت فتومولتی پلایر، طیف‌های فلورسانس با استفاده از نرم افزار GRAM 32 مورد تصحیح قرار گرفتند. قطر منافذ تابش و سنجش نور به اندازه ۴ نانومتر تنظیم شده بود. 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 پیک‌های پرتوکلروفیلید و کلروفیلید، کلرفیل فاقد زنجیره فیتولی، در هر آزمایش میانگین فلورسانس حاصل از تمام برگ‌ها بود.

آنالیز اطلاعات: نتایج مورد استفاده در این پژوهش میانگین حداقل ۵ تکرار در هر آزمایش است. اطلاعات بدست آمده توسط روش ANOVA با استفاده از نرم افزار SPSS v.16 و $P < 0/05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جدول ۱: میزان F_v/F_m در وارپته‌های مقاوم و حساس گندم که به مدت ۷-۹ روز در روشنایی با شدت $30-50 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ رشد کرده‌اند.

F_v/F_m	تیمار (میلی مول)	وارپته / پیش تیمار (میلی مول)
۰/۸۲۴ ± ۰/۰۰۷	۰	مقاوم / ۰
۰/۸۲۶ ± ۰/۰۰۹	۲۰۰	مقاوم / ۰
۰/۸۱۴ ± ۰/۰۱۸	۶۰۰	مقاوم / ۰
۰/۸۱۶ ± ۰/۰۱۱	۶۰۰ + ترمیم	مقاوم / ۰
۰/۸۱۴ ± ۰/۰۰۶	۰	مقاوم / ۲۰۰
۰/۸۲۳ ± ۰/۰۰۴	۲۰۰	مقاوم / ۲۰۰
۰/۸۲۴ ± ۰/۰۱۱	۶۰۰	مقاوم / ۲۰۰
۰/۸۳۰ ± ۰/۰۱۲	۶۰۰ + ترمیم	مقاوم / ۲۰۰
۰/۸۱۸ ± ۰/۰۱۳	۰	حساس / ۰
۰/۸۱۵ ± ۰/۰۱۷	۲۰۰	حساس / ۰
۰/۸۱۷ ± ۰/۰۱۴	۶۰۰	حساس / ۰
۰/۸۱۰ ± ۰/۰۱۸	۶۰۰ + ترمیم	حساس / ۰
۰/۸۱۳ ± ۰/۰۱۲	۰	حساس / ۲۰۰
۰/۸۲۱ ± ۰/۰۰۷	۲۰۰	حساس / ۲۰۰
۰/۸۲۶ ± ۰/۰۰۸	۶۰۰	حساس / ۲۰۰
۰/۸۲۳ ± ۰/۰۱۱	۶۰۰ + ترمیم	حساس / ۲۰۰

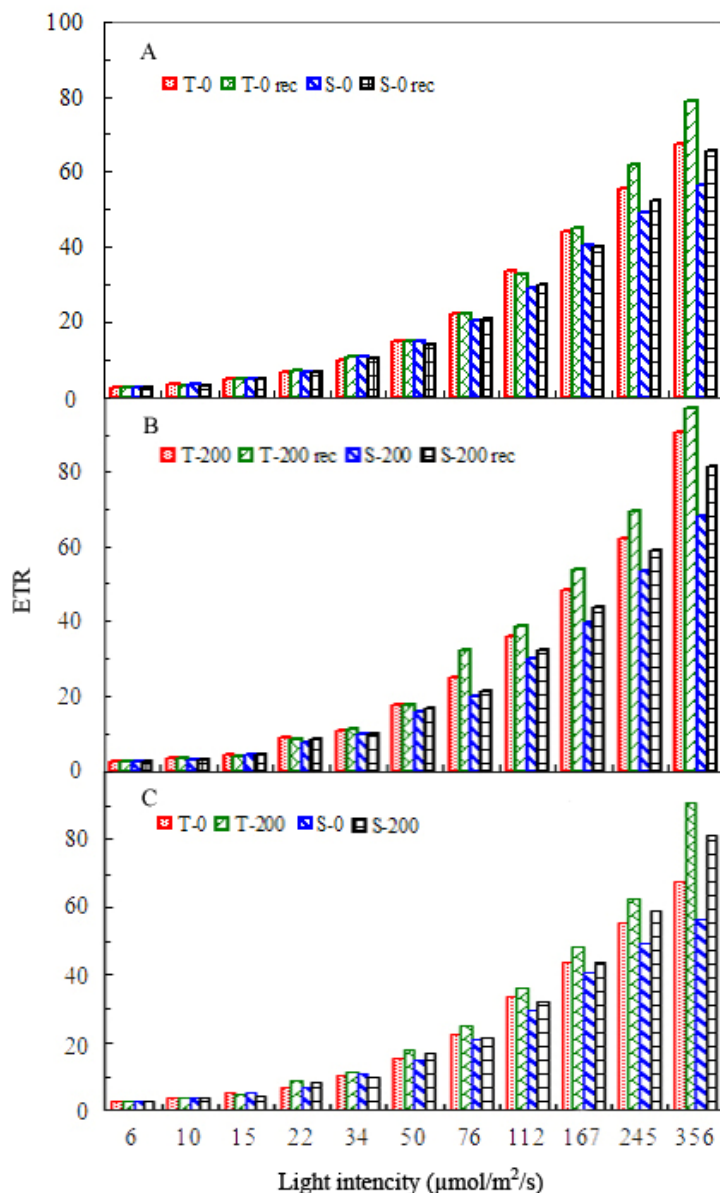
میزان انتقال الکترون ETR

بررسی میزان انتقال الکترون ETR نمونه‌های تحت تنش نشان می‌داد که گیاهان پیش تیمار شده در محیط دارای ۲۰۰ میلی مول نمک اضافی مقاومت بهتری را در شرایط شوری دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی داشتند (شکل ۱).

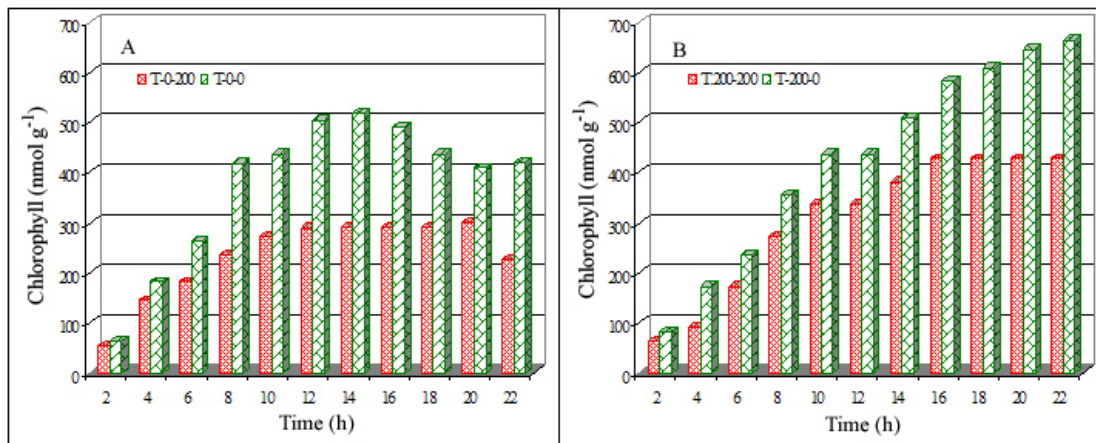
میزان کلروفیل در برگ‌های تحت تنش

برگ‌های اتیوله هر دو وارپته رشد یافته در محیط هوگلند دارا یا فاقد نمک اضافه در حالیکه روی محیط شناور بودند در معرض

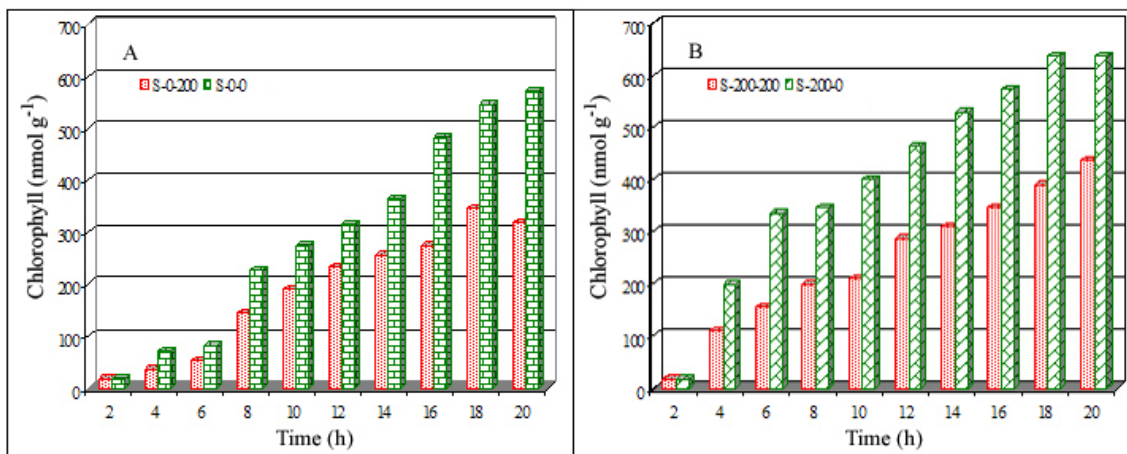
نور ممتد قرار گرفتند. میزان کلروفیل a برگ‌ها هر دو ساعت یکبار اندازه گیری شدند (شکل ۲ و ۳). تولید کلروفیل a برگ‌های تحت تنش وارپته حساس وقتی در محیط فاقد نمک اضافی شناور می‌شدند افزایش چشمگیری داشت. وقتی برگ‌های شناور شده در محیط دارای نمک اضافی از گیاهان شاهد گرفته می‌شدند، تولید کلروفیل a تفاوت معنی داری با وقتی که برگ‌ها از دانه‌رست‌های تحت تنش گرفته شدند، نشان نداد (شکل A, B, C).



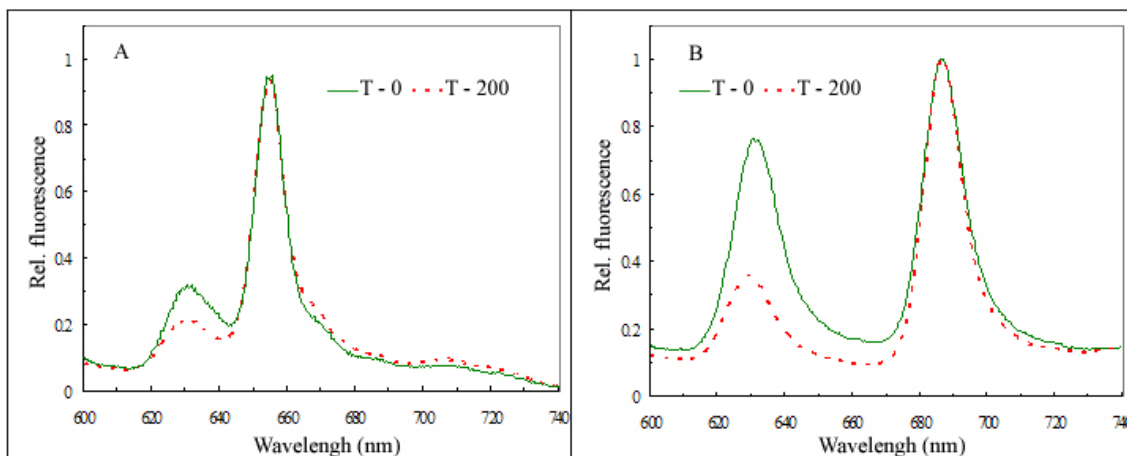
شکل ۱. انتقال الکترون در گیاهان گندم. وارپته‌های مقاوم و حساس گندم. گیاهان به مدت ۷-۹ روز در (A) محیط فاقد (0) یا (B) دارای ۲۰۰ میلی مول نمک اضافی (200) پیش تیمار شدند و سپس در محیط تنش دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی قرار گرفتند. برخی از آنها به مدت ۱ ساعت در محیط غذایی فاقد نمک اضافی ترمیم شدند (بهبود یافتند) (rec). مقایسه اطلاعات بخش A و B در بخش C شکل قابل مشاهده است.



شکل ۲: میزان کلروفیل تولید شده در برگ دانه‌رست‌های وارپته مقاوم به شوری گندم، دانه‌های گندم در محیط هوگلدن فاقد (الف) یا دارای ۲۰۰ میلی‌مول نمک اضافی (ب) و در تاریکی رشد کردند. قطعات برگ سپس در پتری محتوی هوگلدن فاقد (T-0-0, T-200-0) یا دارای ۲۰۰ میلی‌مول نمک اضافی (T-0-200, T-200-200) شناور شده در معرض نور قرار گرفتند.



شکل ۳: میزان کلروفیل تولید شده در برگ دانه‌رست‌های وارپته حساس به شوری گندم، دانه‌های گندم در محیط هوگلدن فاقد (الف) یا دارای ۲۰۰ میلی‌مول نمک اضافی (ب) و در تاریکی رشد کردند. قطعات برگ سپس در پتری محتوی هوگلدن فاقد (S-0-0, S-200-0) یا دارای ۲۰۰ میلی‌مول نمک اضافی (S-0-200, S-200-200) شناور شده در معرض نور قرار گرفتند.



شکل ۴: طیف فلورسانس گیاهان ۹ روزه گندم در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد قبل (الف) یا بعد از تابش فلاش (ب). دانه‌های گندم در محیط هوگلدن فاقد یا دارای ۲۰۰ میلی‌مول نمک اضافی و در تاریکی رشد کردند. وارپته‌ها و تیمارها: مقاوم در محیط فاقد نمک اضافی (T-0)، مقاوم در محیط دارای ۲۰۰ میلی‌مول نمک اضافی (T-200)، حساس در محیط فاقد نمک اضافی (S-0)، حساس در محیط دارای ۲۰۰ میلی‌مول نمک اضافی (S-200).

تأثیر تنش شوری بر طیف فلورسانس

میزان انتقال الکترون ETR

نتایج مشخص شده در شکل ۱ نشان می‌دهند که گیاهان پیش تیمار شده در محیط دارای ۲۰۰ میلی مول نمک اضافی مقاومت بهتری را در شرایط شوری دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی نشان دادند. ETR تنها در پیوند با فتوسیستم II نیست بلکه با مجموعه‌های دیگری از جمله سیتوکروم b₆f، فتوسیستم I، پلاستوکینین و پلاستوسیانین نیز مربوط است. بنابراین کاهش میزان ETR نسبت به شاهد نشان دهنده عدم بهینه بودن دستگاه فتوسنتزی است.

میزان کلروفیل در برگ‌های تحت تنش

بررسی میزان کلروفیل در برگ دانه‌رست‌ها نشان داد که 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 دانه‌رست‌های تحت تنش نسبت به برگ تهیه شده از دانه‌رست‌های شاهد بود. برگ‌های تهیه شده از دانه‌رست‌های مقاوم تحت تنش وقتی در محیط دارای نمک اضافی شناور می‌شوند میزان کلروفیل بیشتر از دانه‌رست‌های شاهد در شرایط مشابه تولید می‌کردند. تولید کلروفیل a برگ‌های تحت تنش وارپته حساس وقتی در محیط فاقد نمک اضافی شناور می‌شدند افزایش چشمگیری داشت.

برخی پژوهشگران تأثیر پیش تیمار نمک با غلظت کم خطر را بر سازگاری و زنده ماندن دانه‌رست‌ها در تنش متوسط یا حتی بسیار بالای نمک مورد بررسی قرار دادند (۳۷-۳۹). بررسی‌ها نشان داده‌اند که پیش تیمار نمک سازگاری دانه‌رست‌ها به تنش شوری و افزایش K⁺ در ریشه و بخش هوایی را زیاد می‌کند. در پژوهش حاضر مشاهده شد که تولید کلروفیل a در برگ گیاهان در محیط فاقد نمک اضافی تحت تابش نور قرار گرفتند بیشتر بود، بویژه 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 وارپته مقاوم که قبلاً تحت تنش قرار داشتند نسبت به دانه‌رست‌هایی که قبلاً تحت تنش نبودند بیشتر بود. وارپته حساس وضعیت متفاوتی داشت میزان کلروفیل a در دانه‌رست‌هایی که در محیط تنش تحت تابش نور بودند تقریباً به اندازه نمونه‌های پیش تیمار شده با نمک (شاهد) بود. البته کلروفیل a انباشته شده در برگ‌های پیش تیمار شده وارپته

ثابت طیف فلورسانس نشان داد که طیف فلورسانس پرتوکلروفیلید در برگ‌های اتیوله دارای قله‌هایی در ۶۳۳ و ۶۵۵ نانومتر بود (شکل ۴A). پرتوکلروفیلید 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 ۴B) که معرف کلروفیلید تازه تشکیل شده است. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود پرتوکلروفیلیدی که طیف آن در منطقه ۶۳۳ نانومتر نسبت به ۶۵۵ نانومتر در برگ گیاهان تحت تنش کاهش می‌یابد.

بحث

تأثیر شوری بر حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II

اندازه‌گیری فلورسانس برای بررسی عملکرد داخلی سیستم فتوسنتزی بسیار ارزشمند است. این روش یکی از معمول‌ترین روش‌ها برای تحقیقات فتوسنتزی است. فتوسیستم II پدیده‌ای به نام فلورسانس قابل تغییر دارد که در آن شدت فلورسانسی، خصوصیات مجموعه مرکز واکنش و زنجیره‌ی انتقال الکترون وابسته را به تفصیل قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد. اگر گیاه با نور شدیدی روشن شود، فلورسانس به حداکثر (F_m) می‌رسد (۴). بنابراین تأثیر شوری بر بیوسنتز کلروفیل با اندازه‌گیری دو پارامتر مختلف فلورسانس کلروفیل توسط فلورومتري PAM، که یکی از روش‌هایی متداول برای بررسی کارایی فتوسیستم II است، بررسی شد (۷-۸). این دو پارامتر عبارت بودند از فلورسانس ماکزیمم، F_m، و فلورسانس متغیر، F_v. قطعات برگ‌ی که مستقیماً از گیاهان موجود در محیط پیش تیمار جدا شدند نسبت مشابهی را با نمونه‌هایی که بعد از پیش تیمار در محیط به مدت ۲ ساعت در محیط معمولی قرار گرفتند نشان دادند. بنابراین طول دوره تیمار در میزان مشاهده تأثیری ندارد. نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان می‌دهد که فتوسیستم II حتی در شرایط تنش شوری کارایی فتوشیمیایی بالایی دارد. هرچند این نتایج با گزارشی دیگری که کاهش F_v/F_m را در محیط شور نشان می‌دهد (۳۶) متفاوت است. با اینکه میزان F_v/F_m علی‌رغم تیمارهای متفاوت در محدوده مشابهی هستند نمی‌توان متاثر نبودن دستگاه فتوسنتزی را از آن نتیجه گرفت. میزان یکسان مشاهده شده F_v/F_m تنها تشابه کارایی فتوسیستم II را به طور مستقل نشان می‌دهد اما نمی‌تواند معیاری برای میزان انتقال الکترون به فتوسیستم II باشد.

وارپته مقاوم از نظر تولید کلروفیل و فتوسنتز، سازگاری بهتری با تنش شوری دارد. این امر احتمالاً به دلیل کارایی بالاتر دستگاه فتوسنتزی آن می باشد.

منابع

1. Van Amerongen H R. Van Grondelle and Valkunas L. Photosynthetic Excitons. 2000; Singapore: World Scientific Publishers.
2. Britt RD. The Light Reactions. In Oxygenic Photosynthesis(ed). DR Ort and CF Yocum; 1996; Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
3. Govindjee R. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. Aust J Plant. Physiol. 1995; 22: 131-160.
4. Amirjani MR, Iranbakhsh A and Abnosi MH. Molecular mechanism of photosynthesis. 2009; Arak: Arak university.
5. Krause GH and Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 1991; 42: 313-349.
6. Kromkamp JC and Forster RM. The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. Review Eur. J. Phycol. 2003; 38: 103-112.
7. Klughammer C and Schreiber U. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. PAM Application Notes. 2008; 1: 27 -35.
8. Baker NR. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. Annu Rev Plant Biol. 2008; 59: 89-113.
9. Rosenqvist E and van Kooten Ov, Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. Practical application of chlorophyll fluorescence in plant biology, ed. J.R. Dell and P.M.A. Toivonen. 2003; Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
10. Björkman O and Barbara D, Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plant of diverse origins. Planta. 1987; 170: 489-504.
11. da Silva EC, RJMC. Nogueira FP. de Araujo, de Melo NF, et al. Physiological responses to salt stress in young umbu plants Environmental & Experimental Botany. 2008; 63: 147-157.
12. Zhu X and Zhang J. Anti-transpiration and anti-growth activities in the xylem sap from plants under different types of soil stress. New Phytologist. 1997; 137: 657-664.

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 A, B, ۳). 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. در نتیجه به نظر می‌رسد ضمن مراحل اولیه نمو دانه‌رست‌های گندم اتیوله در محیط تنش مقادیر بیشتری پرتوکلروفیلید تولید می‌شود که عمده آن پرتوکلروفیلید بلند موج است. این حالت در هر دو وارپته مقاوم و حساس مشابه بود اما در وارپته مقاوم نمود بیشتری داشت. با تابش نور به برگ حاضر در محیط تنش وارپته حساس کلروفیل کمتری نسبت به وارپته مقاوم تولید می‌کرد. بنابراین ممکن است افزایش تشکیل پرتوکلروفیلید بلند موج در هر دو وارپته به علت مکانیسم حمایتی برضد تنش شوری باشد.

تأثیر تنش شوری بر طیف فلورسانس

همانطور که شکل ۴ نشان می‌دهد طیف فلورسانس پرتوکلروفیلید برگ‌های اتیوله دارای قله‌هایی در ۶۳۳ و ۶۵۵ نانومتر است که پس از تابش نور قله ۶۵۵ نانومتری حذف و به جای آن قله‌ای در ۶۸۵ نانومتر پدید می‌آید. این تغییر نشان دهنده تشکیل کلروفیلید است.

بررسی‌های قبلی نشان داده‌اند که همزمان با نمو گیاه در نسبت اندازه فلورسانس پرتوکلروفیلید (۶۳۳ / ۶۵۵) افزایش سریعی دیده می‌شود (۴۰). این افزایش در شرایط مختلف آزمایش مشاهده شد اما در وارپته مقاوم در محیط تنش نمو بیشتری داشت (اطلاعات منتشر نشده). هنگامی که نسبت فلورسانس با طول بخش هوایی در نظر گرفته شد، این افزایش در وارپته حساس نمود کمتری داشت. بعد از تابش نور نسبت بزرگی فلورسانس در ۶۸۵ نانومتر به ۶۳۳ نانومتر محاسبه شد که نسبت میزان کلروفیلید تازه تشکیل شده به پرتوکلروفیلید نافع‌ال نوری را نشان می‌دهد. نتایج مشابه نسبت‌های انواع پرتوکلروفیلید بود. بدین معنی که این نسبت در محیط تنش در هر دو وارپته افزایش نشان می‌دهد. این افزایش حتی در مقایسه آن با طول بخش هوایی قابل مشاهده است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج فوق الذکر به نظر می‌رسد که عملکرد فتوسیستم II تحت تاثیر تنش شوری قرار نمی‌گیرد. همچنین

13. Lutts S, Majerus V and Kinet JM. *Physiologia Plantarum*, NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. 1999; 105: 450-458.
14. Ji-Ping G, Dai-Yin C and Hong-Xuan L, Understanding Abiotic Stress Tolerance Mechanisms: Recent Studies on Stress Response in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2007; 49: 742-750.
15. Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, et al, Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J*. 2006; 45: 523-539.
16. Yousfi S, Wissal Ms, Mahmoudi H, Abdelly C, et al. Effect of salt on physiological responses of barley to iron deficiency. *Plant Physiology & Biochemistry (Paris)*. 2007; 45: 309-314.
17. Allahverdiev SR, Mavituna M, Ganieva R and Nafisi S. Effects of salt stress and synthetic hormone polystimuline K on photosynthetic activity of *Trianea bogotensis*. *Turkish J. Bot*. 1998; 22: 19-23.
18. Abdelkader AF, Aronsson H and Sundqvist C. High salt stress induces swollen prothylakoids in dark-grown wheat and altered both prolamellar body conversion and reformation after irradiation. *J. Exp. Bot*. 2007; 58: 2553 - 2564.
19. Zaman B, Arshad A, Salim M and Khawer H, Growth of wheat affected by sodium chloride and sodium sulphate salinity. *Pakistan J. biol. Sci*. 2002; 5: 1313.
20. Abdelkader AF, Aronsson H and Sundqvist C. High salt-stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*) causes retardation of chlorophyll accumulation due to a limited rate of protochlorophyllide formation. *Physiol Plant*. 2007; 130: 157-166.
21. Maathuis FJM and Amtmann A. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: The basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios *Ann. Bot*. 1999; 84: 123-133.
22. Amtmann A, Fischer M, Marsh EL, Stefanovic A, et al. The wheat cDNA LCT1 generates hyper sensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiology & Biochemistry (Paris)*. 2001; 126.
23. 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 Physiol*. 2000; 122: 1249-126.
24. Sakamoto A, Murata A, Murata N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol. Biol*. 2004; 38: 1011-1019.
25. Sakamoto A and Murata N. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ*. 2002; 2: 163-171.
26. Schachtman DP, Tyerman SD and Terry BR. The K⁺/Na⁺ selectivity of a cation channel in the plasma membrane of root cells does not differ in salt-tolerant and salt-sensitive wheat species. *Plant Physiol*. 1991; 97: 598-605.
27. Mitsuya S, Takeoka Y and Miyake H. Effects of sodium chloride on foliar ultrastructure of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) plantlets grown under light and dark conditions in vitro. *Plant Physiol*. 2000; 157: 661-667.
28. Chinnusamy V, Jagendorf A and Zhu JK. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*. 2005; 45: 437-448.
29. Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gomez-Rodriguez MV, et al. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell & Environment*. 2006; 29: 1449-1459.
30. Hu Y, Burucs Z and Schmidhalter U. Short-term effect of drought and salinity on growth and mineral elements in wheat seedlings. *J. Plant Nutrition*. 2006; 29: 2227-2243.
31. Cramer GR, Lauchli A and Epstein E. Effects of NaCl and CaCl₂ on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton. *Plant Physiol*. 1986; 81: 792-797.
32. Sam O, Ramirez C, Coronado MJ, Testillano PS, et al. Changes in tomato leaves induced by NaCl stress: leaf organization and cell ultrastructure. *Biol. Plant*. 2003; 47: 361-366.
33. Hoagland DR and Arnon DI. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*. Vol. 347. 1950; Berkeley: University of California.
34. Genty B, Briantais JM and Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. biophys. acta*. 1989; 990: 87-92.
35. Brouers M and Michel MR Wolwertz. Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts, re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyllide. *Photosynth Res*. 1983; 4: 265.
36. Ranjbarfordoei A, Samson R and Van Damme P. Chlorophyll fluorescence performance of sweet almond [*Prunus dulcis* (Miller) D. Webb] in response to salinity stress induced by NaCl. *Photosynthetica*. 2006; 4: 513-522.
37. Srikanthbabu V, Kumar G, Krishnaprasad BT, Gopalakrishna R, et al. Identification of pea genotypes with enhanced thermotolerance using temperature induction response (TIR) technique. *J. Plant Physiol*. 2002; 159: 535-545.

38. Senthil-Kumar M, Srikanthbabu V, Mohan Raju B, Kumar G, et al. Screening of inbred lines to develop a thermotolerant sunflower hybrid using the temperature induction response (TIR) technique: a novel approach by exploiting residual variability. *J Exp Bot.* 2003; 54: 2569-2578.
39. Umezawa T, Shimizu K, Kato M and Ueda T. Enhancement of salt tolerance in soybean with NaCl pre-treatment. *Physiol. Plant.* 2000; 110: 59-63
40. Amirjani MR, Sundqvist K and 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: 751-762.

Comparative study of relative tolerance of chlorophyll biosynthesis and ETR of two wheat (*Triticum aestivum*) varieties in response to salt stress

Amirjani MR, Ph.D.^{1*}

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

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

Received: 1 Mar. 2011

Accepted: 25 Jun. 2011

Abstract

Aim: In this study we have used two wheat varieties with different tolerance to salt in different concentration of salt.

Material and Methods: Giza 168, Seds 1 plants have been grown for seven days in Hoagland solution and some of them were grown in Hoagland solution supplemented with 200 mM extra salt. Cutted leaf segments from these plants incubated with 600 mM salt. Dark-grown pre-adapted, with 200mM extra salt, plants were illuminated to determine the chlorophyll accumulation in two varieties.

Results: The maximum photochemical efficiency, F_v/F_m , stayed the same for all measurements. Measurement of relative ETR showed that the tolerant variety, Seds 1, had higher values for ETR than the susceptible variety (Giza 168). Also the measurement showed that the salt adapted samples of both varieties better withstood the excess of salt applied than the non-adapted samples.

The chlorophyll content was higher for the tolerant variety compared to the susceptible. The chlorophyll accumulation of the tolerant samples pre-adapted with or without salt showed no dramatic differences. The susceptible sample, Giza 168, however, accumulated more chlorophyll if pre-adapted to salt before being exposed to high salt concentration.

Conclusion: PSII seems to be stable and unaffected at the functional level by salt stress. The tolerant variety is better adapted to salt stress. It seems to be due to the advantage of having a more efficient photosynthetic apparatus.

Keywords: Chlorophyll, ETR, Salt stress, Wheat