



دانشگاه گلستان

مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۸۸
www.gau.ac.ir/journals

اثر نوع تغذیه نیتروژنی بر پیری برگ برنج (رقم طارم)

*سیدمحسن حسینی^۱، غلامرضا حدادچی^۲، حمیدرضا صادقی‌پور^۳ و فرهاد یغمایی^۴

^۱دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان، استاد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان،

^۲استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان، ^۳استادیار گروه آمار، دانشگاه گلستان

تاریخ دریافت: ۸۷/۸۷؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۲۰

چکیده

یون‌های نیترات و آمونیوم دو شکل اصلی نیتروژن هستند که به‌وسیله گیاهان جذب می‌شوند اما از نظر اثر بر رشد و ترکیب شیمیایی گیاه با هم متفاوت هستند. در این تحقیق، اثر نوع تغذیه بر رشد و پیری برگ‌های برنج در سطح بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌ها نشان داد که مقدار وزن تر و خشک گیاه، مقدار کلروفیل کل، سرعت واکنش هیل، مقدار پروتئین محلول و فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در گیاهانی که با نیترات تغذیه می‌شدند به‌طور معنی‌داری از گیاهان تغذیه شده با آمونیوم کمتر بود. بالعکس، نسبت کلروفیل a به کلروفیل b و فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در این گیاهان بیشتر از گیاهانی بود که با آمونیوم تغذیه می‌شدند. با توجه به عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار در میزان پراکسیداسیون لیپید تحت تیمارهای مختلف نیتروژن در برگ گیاهان برنج، این نتیجه به‌دست می‌آید که نوع تغذیه نیتروژنی نمی‌تواند سبب القای استرس اکسیداتیو در برگ گیاه برنج شود اما می‌تواند سبب کاهش شاخص‌های رشد مانند وزن تر و خشک، مقدار کلروفیل و پروتئین در گیاهان برنج تغذیه شده با نیترات گردد.

واژه‌های کلیدی: برنج، نیترات، آمونیوم، پیری برگ، آنزیم‌های اکسیداتیو

*مسئول مکاتبه: seyedmohsen_hoseini@yahoo.com

مقدمه

تکوین برگ با پیری خاتمه می‌یابد. پیری فرآیندی با فعالیت‌های تخریبی است که در نهایت به مرگ منجر می‌شود (نودن، ۱۹۸۸). هدف اصلی از پیری در گیاهان برداشت و بازچرخش مواد است. در جریان رشد و تکوین برگ‌های سبز، اندام‌های دارای مواد مغذی تولید می‌شوند. وقتی گیاه دیگر به برگ نیاز ندارد فرآیند پیری القاء می‌شود و همه مواد قابل برداشت، بازچرخ می‌شوند. مرحله نهایی پیری، مرگ برگ است اما این فرآیند فعالانه به تعویق می‌افتد تا همه مواد مغذی به وسیله فرآیند پیری تکوینی برداشت شوند (بوکانان-والاستون و همکاران، ۲۰۰۳). در جریان پیری، سلول‌های برگ متحمل تغییرات شدید متابولیسمی می‌شوند. قابل توجه‌ترین تغییر فنوتیپی، زرد شدن برگ ناشی از شکستن کلروفیل و ازکارافتادگی کلروپلاست‌هاست. با از دست دادن رنگیزه فتوسنتزی کلروفیل و از هم پاشیدن تمامیت ساختاری کلروپلاست‌ها، فعالیت‌های آنابولیکی مانند فتوسنتز و سنتز پروتئین که به انرژی نیاز دارند کند می‌شوند (وئو و همکاران، ۲۰۰۱) و کاتابولیسم کلروفیل‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک غالب می‌شود. مواد مغذی که در این میان آزاد می‌شوند به برگ‌های در حال رشد، دانه‌های در حال تکوین یا بافت‌های ذخیره‌ای انتقال می‌یابند (بوکانان-والاستون، ۲۰۰۳).

نیترژن یک ماده غذایی معدنی است که گیاهان به مقدار زیاد به آن نیاز دارند. یون‌های نیترات و آمونیوم دو شکل اصلی نیترژن هستند که به وسیله گیاهان جذب می‌شوند. هر چند که نیترات پس از جذب و قبل از ورود به ترکیبات نیترژن‌دار آلی به آمونیوم احیا می‌شود اما مدت‌هاست این عقیده مطرح می‌باشد که آمونیوم و نیترات به عنوان منابع نیترژن از نظر اثر بر رشد و ترکیب شیمیایی گیاه با هم متفاوت هستند (ریوس-گنزالس و همکاران، ۲۰۰۲). سازگاری نسبی گیاهان برای استفاده از نیترات و آمونیوم متفاوت است. متابولیسم آمونیوم نسبت به نیترات به انرژی کمتری نیاز دارد بنابراین گیاهان باید آمونیوم را ترجیح دهند اما تنها برخی از گونه‌های گیاهی می‌توانند در محیطی که آمونیوم تنها منبع نیترژن است به خوبی رشد کنند. بیشتر گونه‌های زراعی وقتی در محیط دارای آمونیوم قرار می‌گیرند علائم مسمومیت شدید به آمونیوم را نشان می‌دهند و محیط دارای نیترات برای رشد آنها مناسب‌تر است (کرانزاکر و همکاران، ۱۹۹۹).

در مورد تغذیه گیاهان برنج با نیترات و یا با آمونیوم گزارش‌های متعددی وجود دارد. براساس گزارش جی و پنگ (۲۰۰۵) مقدار کلروفیل کل و قندهای محلول کل در گیاهان برنج تغذیه نموده از آمونیوم به‌طور معنی‌داری از گیاهان تغذیه شده با نیترات بیشتر می‌باشد. یاماساکی و سینیو (۱۹۶۵)

دریافتند که تغذیه نیترات بر روی رشد و بازدهی گیاه اثر مفیدی دارد و فعالیت متابولیسمی و جذب کاتیون را در ریشه‌های برنج افزایش می‌دهد. یافته‌ها نشان می‌دهد که رشد و بازدهی گیاهان در محیط‌هایی که دارای مخلوطی از نیترات و آمونیوم هستند نسبت به محیط‌هایی که یکی از این دو منبع نیتروژن به تنهایی وجود دارد، بیشتر می‌باشد. کرانزاکر و همکاران (۱۹۹۹) با بررسی گیاه برنج نشان دادند که افزایش رشد و بازدهی گیاه در تغذیه هم‌زمان از نیترات و آمونیوم می‌تواند ناشی از افزایش جذب آمونیوم و افزایش انتقال نیتروژن به اندام هوایی در نتیجه تحریک همگون‌سازی^۱ آمونیوم و افزایش فعالیت چرخه GS/GOGAT^۲ در حضور نیترات باشد که به لحاظ زراعی اهمیت دارد. همگون‌سازی آمونیوم تقریباً به صورت اختصاصی به وسیله چرخه GS/GOGAT انجام می‌شود (لشن و همکاران، ۲۰۰۰).

گزارش‌هایی که در مورد جذب و احیای نیترات وجود دارد نشان می‌دهد که جذب نیترات در ریشه نیازمند انرژی است که از طریق واکنش‌های تنفسی تأمین می‌شود (کرافورد، ۱۹۹۵). آنزیم نیترات‌ردوکتاز علاوه بر احیای نیترات به نیتريت، واکنش احیای نیتريت به مونواکسیدنیتروژن و واکنش احیای اکسیژن و تولید آنیون سوپراکسید را نیز انجام می‌دهد (یاماساکی و ساکی‌هاما، ۲۰۰۰). این آنزیم دارای سه مرکز اکسایش و کاهش شامل دو گروه پروستتیک فلاوین‌آدنین‌دی‌نوکلئوتید هم و یک کوفاکتور مولیبدن می‌باشد (کرافورد و همکاران، ۱۹۸۸). براساس گزارش اوجی و ایزاوا (۱۹۶۸) فعالیت ویژه آنزیم نیترات‌ردوکتاز در ساقه‌ها و برگ‌های گیاهان ۲۱ روزه برنج از فعالیت آن در سویا و گندم بیشتر است.

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو در تغذیه با نیترات و یا با آمونیوم نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز در گیاه *Catharanthus roseus* در تغذیه با نیترات به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهانی است که با آمونیوم تغذیه می‌شوند. هم‌چنین، فعالیت این آنزیم در ریشه‌ها بیشتر از برگ‌ها است (میسرا و گوپتا، ۲۰۰۶). نتایج بررسی لین و کیو (۲۰۰۱) در ریشه‌های برنج نشان می‌دهد که میزان پراکسیدهیدروژن و فعالیت آنزیم NADH اکسیداز^۳ تحت تیمار کلرید آمونیوم افزایش می‌یابد. NADH اکسیداز نوعی پراکسیداز که از NADH به‌عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کند و در تشکیل پراکسیدهیدروژن مورد نیاز برای ساخت

1- Assimilation

2- Glutamine Synthetase/Glutamate Synthase

3- Nicotinamide Adenine Dinucleotide Oxidases (NADH Oxidases)

لینگین نقش مهمی دارد (فچ- کریستوفرز و همکاران، ۲۰۰۶). مارواها و جولیانو (۱۹۷۶) دریافتند که فعالیت آنزیم کاتالاز برحسب نانومول اکسیژن تولید شده بر دقیقه بر گرم وزن تر در اندام‌های هوایی گیاه برنج تغذیه نموده از آمونیوم بیشتر از گیاهان تغذیه نموده از نترات است. نتایج بررسی اروزکو- کاردناس و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که انباشتگی پراکسید هیدروژن در اثر جراحت به‌عنوان پیامبر ثانویه عمل می‌کند و مجموعه‌ای از ژن‌های مرتبط با دفاع از جمله ممانعت‌کنندگان پروتئیناز و پلی‌فنل‌اکسیداز را القا می‌کند.

با توجه به گزارش‌های متفاوت در زمینه سازگاری گیاهان برنج برای استفاده از نیتروژن معدنی به‌صورت نترات یا آمونیوم، در این تحقیق اثر نوع نیتروژن بر رشد و پیری برگ در گیاه برنج مورد بررسی قرار گرفت تا از یک سو، محیط بهینه از نظر نوع نیتروژن برای گیاه برنج تعیین شود و از سوی دیگر، علت کاهش رشد و پیری برگ در گیاه برنج در محیط نامناسب از نظر نوع نیتروژن تعیین گردد. در این خصوص، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو و استرس اکسیداتیو در تغذیه با نیتروژن مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذر گیاه برنج رقم طارم شفق از مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان تهیه شد. بذرها به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی گردیدند سپس به‌خوبی با آب مقطر شستشو داده شدند و برای جوانه‌زنی به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کشت بذرهای جوانه‌زده در محیط کشت شنی انجام شد. بذرهای جوانه‌زده از نظر منبع نیتروژن تحت ۵ تیمار مختلف قرار گرفتند. مقدار کل نیتروژن در دسترس در کلیه تیمارها ۲/۸ میلی‌مولار در نظر گرفته شد. در تیمار اول، نیتروژن به‌صورت نمک نترات کلسیم، در تیمارهای دوم و چهارم نیتروژن به‌صورت مخلوطی از نترات کلسیم و کلرید آمونیوم و به‌ترتیب با نسبت سه به یک و یک به سه، در تیمار سوم نیتروژن به‌صورت نمک نترات آمونیوم و در تیمار پنجم نیتروژن به‌صورت نمک کلرید آمونیوم در اختیار گیاهان قرار داده شد. غلظت سایر نمک‌ها در محلول غذایی به‌صورت ۰/۵ میلی‌مولار K_2SO_4 ، ۰/۳۲ میلی‌مولار $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ، ۱/۳ میلی‌مولار Mg_2SO_4 ، ۱/۴ میلی‌مولار $CaCl_2$ ، ۱۰ میلی‌مولار $FeNaEDTA$ ، ۹/۵ میکرومولار $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ، ۰/۰۷۵ میکرومولار $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ، ۱۸/۹ میکرومولار H_3BO_3 ، ۰/۱۵ میکرومولار $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۱۵ میکرومولار $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ و ۱۲ میکرومولار $C_6H_8O_7$ در نظر گرفته

شد (یوشیدا و همکاران، ۱۹۷۶). دانه‌رست‌ها به مدت ۱۴ روز در نور طبیعی در دمای متوسط ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گلخانه تحت تیمار قرار گرفتند. در طی این مدت، pH محلول غذایی هر روز روی ۶ تنظیم شد و محلول غذایی ۳ بار با فاصله ۴ روز، تعویض گردید. پس از پایان ۱۴ روز، گیاهان در مرحله ۴ برگ‌گی برداشت شدند و برای بررسی‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری سرعت واکنش هیل^۱ در کلروپلاست‌ها: استخراج کلروپلاست با استفاده از روش اصلاح‌شده جداسازی استاندارد واتلی و آرنون (۱۹۶۲) (۳۸) و اندازه‌گیری سرعت واکنش هیل براساس روش تربست (۱۹۷۲) انجام شد. نمونه‌ی شاهد به ترتیب شامل ۲/۱ میلی‌لیتر بافر تریس کلرید، ۰/۶ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۳ میلی‌لیتر سوسپانسیون کلروپلاست و نمونه مورد آزمایش به ترتیب شامل ۲/۱ میلی‌لیتر بافر تریس کلرید، ۰/۳ میلی‌لیتر معرف دی‌کلروفنل‌ایندوفنل، ۰/۳ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۳ میلی‌لیتر سوسپانسیون کلروپلاست بود. تغییرات جذب نسبت به شاهد در فواصل زمانی یک دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و میانگین تغییرات جذب طی این مدت به‌عنوان سرعت واکنش هیل بیان گردید.

اندازه‌گیری میزان کلروفیل: استخراج کلروفیل در استن ۸۰ درصد سرد صورت گرفت و میزان کلروفیل‌های a, b و کل با استفاده از روش آرنون (۱۹۴۹) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید: استخراج عصاره براساس روش پروچازکووا و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. برای این منظور از ۷ سانتی‌متری انتهای سومین برگ گیاه برنج، ۰/۰۵ گرم توزین گردید و با یک میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در یک هاون چینی و در حمام یخ هموژنیزه شد. هموژنات به همراه یک میلی‌لیتر از محلول حاصل از شستشوی هاون داخل لوله سانتریفوژ ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. به یک میلی‌لیتر از سوپرناتانت ۴ میلی‌لیتر محلول تری‌باربیتوریک اسید ۰/۵ درصد در تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد اضافه شد و مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. سوپرناتانت برای اندازه‌گیری مقدار جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار گرفت. جذب محلول در سه طول موج اختصاصی ۵۳۲ و غیراختصاصی ۴۴۰ و ۶۰۰ نانومتر برای مالون‌دی‌آلدئید^۲ نسبت به شاهد ثبت گردید

1- Hill Reaction

2- Malondialdehyde

و سپس براساس ضریب خاموشی $1 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ مقدار مالون‌دی‌آلدئید در نمونه اندازه‌گیری شد (دو و براملاگ، ۱۹۹۲).

استخراج عصاره پروتئینی برگ: استخراج عصاره پروتئینی برگ براساس روش هیونگ و کائو (۲۰۰۳) انجام شد. برای این منظور از ۷ سانتی‌متری انتهای سومین برگ گیاه برنج، ۰/۰۵ گرم توزین گردید و با یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 6/8$ در یک هاون چینی و در حمام یخ هم‌وزنیه شد. هم‌وزنات همراه با یک میلی‌لیتر از محلول حاصل از شستشوی هاون داخل لوله سانتریفوژ ریخته شد و مدت ۲۰ دقیقه در ۱۷۶۰۰ گرم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سوپرناتانت به‌عنوان عصاره پروتئینی برگ به‌منظور اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های محلول و بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز مورد استفاده قرار گرفت. **اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول:** اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول براساس روش برادفورد (۱۹۷۶) انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس روش چنس و مهلی (۱۹۵۵) انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر برای پراکسیداز شامل ۲/۷۹ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7$ ، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۰/۶ مولار، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۱/۲ مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم براساس میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز براساس روش کار و میسرا (۱۹۷۶) همراه با تغییراتی انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر برای پلی‌فنل‌اکسیداز شامل ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با $\text{pH} = 6/8$ ، ۱۰۰ میکرولیتر پیروگالول ۰/۳ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم براساس میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش چنس و مهلی (۱۹۵۵) همراه با تغییراتی انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی ۳ میلی لیتر برای کاتالاز شامل ۲/۸۵ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با $\text{pH}=7$ ، ۱۰۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۴۵ مولار و ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین بیان گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش بوچمپ و فریدویچ (۱۹۷۱) انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی یک میلی لیتر برای اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شامل ۸۳۵ میکرو لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با $\text{pH}=8$ ، ۳۳ میکرو لیتر اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۳ میلی مولار، ۳۳ میکرو لیتر نیترو بلوترازولیوم ۰/۷۵ میلی مولار، ۳۳ میکرو لیتر زانتین ۳ میلی مولار، ۳۳ میکرو لیتر محلول رقیق شده آنزیم زانتین اکسیداز و ۳۳ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس واحد بر میلی گرم پروتئین بیان گردید.

جداسازی و تشخیص آنزیم کاتالاز بر روی ژل پلی اکریل آمید غیر دناتور کننده^۱: جداسازی آنزیم کاتالاز بر روی ژل پلی اکریل آمید غیر دناتور کننده بر اساس روش جوردی و همکاران (۲۰۰۰) همراه با تغییراتی انجام شد. برای این منظور، الکتروفورز عصاره آنزیمی بر روی ژل جدا کننده ۷ درصد انجام شد. تشخیص آنزیم کاتالاز بر روی ژل پلی اکریل آمید بر اساس روش اندرسون و همکاران (۱۹۹۵) انجام شد. برای این منظور، ژل مدت ۲۵ دقیقه در محلول ۳/۲۷ میلی مولار آب اکسیژنه و به دنبال آن برای رنگ آمیزی، در محلول تازه پتاسیم فری سیانید ۱ درصد و کلرید فربیک ۱ درصد قرار داده شد.

جداسازی و تشخیص آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر روی ژل پلی اکریل آمید دناتور کننده^۲: جداسازی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر روی ژل پلی اکریل آمید دناتور کننده بر اساس روش لملی و همکاران (۱۹۷۰) همراه با تغییراتی انجام شد (فلینگ و گرگسون، ۱۹۸۶). برای این منظور، الکتروفورز عصاره آنزیمی بر روی ژل جدا کننده ۱۰ درصد انجام شد. مقدار چهار حجم از عصاره بافتی با یک حجم از بافر نمونه شامل بافر تریس ۰/۰۶ مولار با $\text{pH}=6.8$ ، ۲ درصد

1- Native-PAGE

2- SDS-PAGE

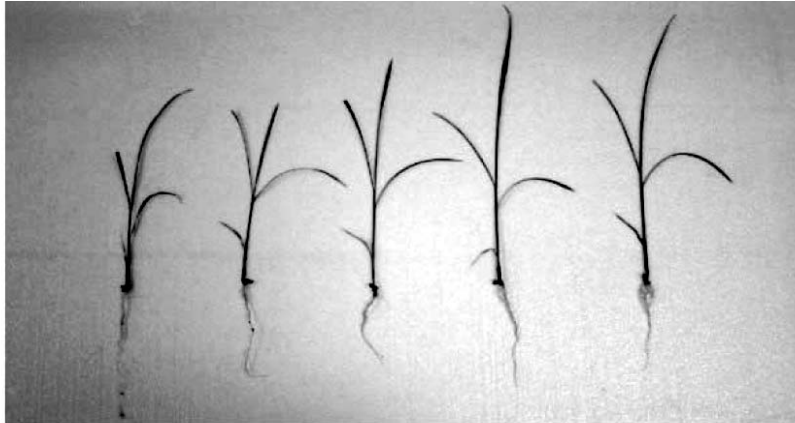
سدیم دودسیل سولفات، ۲۵ درصد گلیسرول و ۰/۱ درصد بروموفنل بلو مخلوط گردید. سپس، حجمی از این مخلوط که دارای ۱۰۰ میکروگرم پروتئین بود در چاهک‌های ژل متراکم‌کننده بارگیری شد (هاو و همکاران، ۲۰۰۳). تشخیص آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر روی ژل پلی‌اکریل‌امید براساس روش ریو و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. بدین‌منظور، ژل به‌ترتیب ابتدا به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7/9$ دارای ۲۵ درصد ایزوپروپانل (حجم/حجم) (هاو و همکاران، ۲۰۰۳)، سپس به‌مدت ۲۵ دقیقه در تاریکی، در ۲۵ میلی‌لیتر محلول نیتروبلوتترازولیوم ۲/۵ میلی‌مولار و به دنبال آن، به‌مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی در بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7/8$ دارای ریبوفلاوین ۲۸ میکرومولار و ترامتیل‌اتیلن‌دی‌آمین ۲۸ میلی‌مولار قرار داده شد. در نهایت، برای ظهور باندهای آنزیم، ژل مدت ۲۰ دقیقه در معرض نور قرار گرفت. کلیه مراحل رنگ‌آمیزی ژل در دمای آزمایشگاه انجام شد (ریو و همکاران، ۱۹۹۶).

برای تشخیص ایزوزیم‌های آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر روی ژل پلی‌اکریل‌امید، دو ژل دیگر آماده شد. این دو ژل ابتدا مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7/9$ دارای ۲۵ درصد ایزوپروپانل قرار داده شدند. سپس، یکی از ژل‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی، در بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7/8$ دارای سیانیدپتاسیم ۳ میلی‌مولار و ژل دیگر به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7/8$ دارای پراکسید هیدروژن ۵ میلی‌مولار قرار داده شدند (کوک و همکاران، ۲۰۰۳). سپس، ژل‌ها برای تشخیص ایزوزیم‌های SOD مطابق روشی که در بالا شرح داده شد (ریو و همکاران، ۱۹۹۶) رنگ‌آمیزی شدند.

روش آماری: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد به‌وسیله نرم‌افزار SAS صورت گرفت.

نتایج و بحث

وزن تر و وزن خشک گیاه: نتایج بررسی‌ها نشان داد که با افزایش میزان آمونیوم و کاهش میزان نیترات در محلول غذایی مقدار وزن تر و وزن خشک گیاهان برنج به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (شکل ۱ و جدول‌های ۱ و ۲). نتایج بررسی مارواها و جولیانو (۱۹۷۶) روی گیاهان برنج نشان داد که پس از دو هفته تیمار دانه‌رست‌های برنج با نیتروژن به‌صورت نیترات یا آمونیوم، مقدار وزن تر در گیاهانی که در محیط آمونیوم رشد می‌کردند از گیاهانی رشد یافته در محیط نیترات بیشتر بود.



شکل ۱- گیاهان برنج تحت تیمارهای مختلف نیتروژن در مرحله چهاربرگی. ۲/۸ میلی مولار آمونیوم و ۲/۱ میلی مولار آمونیوم و ۱/۴ میلی مولار آمونیوم و ۰/۷ میلی مولار آمونیوم و صفر میلی مولار آمونیوم و صفر میلی مولار نیترات ۰/۷ میلی مولار نیترات ۱/۴ میلی مولار نیترات ۲/۱ میلی مولار نیترات ۲/۸ میلی مولار نیترات

شکل ۱- گیاهان برنج تحت تیمارهای مختلف نیتروژن در مرحله چهاربرگی.

جدول ۱- تجزیه واریانس میانگین مربعات صفات اندازه گیری شده در تیمارهای مختلف نیتروژن.

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر	وزن خشک	واکنش هیل	کلروفیل کل	نسبت کلروفیل a به کلروفیل b
نیتروژن	۴	۴۲/۰۷۱*	۰/۶۴۲۹*	۰/۰۰۰۳۱**	۱/۱۸۸۵**	۰/۰۷۵۱**
خطا	۱۰	۷/۱۹۶	۰/۱۷۴۰	۰/۰۰۰۰۴	۰/۱۰۷۵	۰/۰۰۶۴
کل	۱۴					

^{NS} تغییرات معنی دار نیست، * معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.

ادامه جدول ۱- تجزیه واریانس میانگین مربعات صفات اندازه گیری شده در تیمارهای مختلف نیتروژن.

منابع تغییر	پروتئین محلول	فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز	فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز	فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز	فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز	پراکسیداسیون لیپید
نیتروژن	۶۰/۹۹۴۴*	۰/۰۳۷۹*	۰/۰۰۲۲ ^{NS}	۲۳۶۶/۳۶۵۲**	۰/۰۲۳۲۳ ^{NS}	۲۱/۰۷۸۷ ^{NS}
خطا	۱۶/۵۷۹۹	۰/۰۱۰۹	۰/۰۰۱۹	۳۶۳/۰۲۱۰	۰/۰۱۴۵	۵۰۵/۱۰۴۴
کل						

^{NS} تغییرات معنی دار نیست، * معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف نیتروژن.

تیمار	وزن تر گیاه (گرم)	وزن خشک گیاه (گرم)	سرعت واکنش هیل (تغییرات جذب بر دقیقه)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم بافت تر)	نسبت کلروفیل a به کلروفیل b
صفر میلی مولار آمونیوم و ۲/۸ میلی مولار نیترات	۲۰/۷۶۷ ^c	۳/۱۲۷۳ ^c	۰/۰۳۸۶۶۷ ^c	۱/۷۴۳۱ ^b	۲/۹۸۹۸۸ ^a
۰/۷ میلی مولار آمونیوم و ۲/۱ میلی مولار نیترات	۲۳/۷۶۷ ^{bc}	۳/۴۵۶۷ ^{bc}	۰/۰۴۴۰۰۰ ^c	۲/۲۸۲۶ ^b	۲/۸۳۴۱۲ ^b
۱/۴ میلی مولار آمونیوم و ۱/۴ میلی مولار نیترات	۲۳/۸۰۰ ^{bc}	۳/۴۶۰۳ ^{bc}	۰/۰۴۷۳۳۴ ^{bc}	۳/۰۹۰۰ ^a	۲/۶۱۹۴۴ ^b
۲/۱ میلی مولار آمونیوم و ۰/۷ میلی مولار نیترات	۳۰/۴۶۷ ^a	۳/۹۸۷۳ ^a	۰/۰۵۹۴۴۴ ^{ab}	۳/۰۵۶۴ ^a	۲/۶۰۰۵۲ ^b
۲/۸ میلی مولار آمونیوم و صفر میلی مولار نیترات	۲۷/۳۶۷ ^{ab}	۴/۲۸۰۷ ^{ab}	۰/۰۶۲۵۵۶ ^a	۳/۱۶۹۷ ^a	۲/۶۶۷۹۲ ^b

میانگین‌های هر ستون که در یک حرف مشترک باشند با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

ادامه جدول ۲- مقایسه میانگین‌های صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف نیتروژن.

تیمار	پروتئین محلول (میلی گرم بر گرم بافت تر)	فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (واحد بر میلی گرم پروتئین)	فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین)	پراکسیداسیون لیپید (نانومول بر گرم بافت تر)
صفر میلی مولار آمونیوم و ۲/۸ میلی مولار نیترات	۴۷/۲۷۹ ^b	۰/۴۹۵۳۴ ^b	۰/۳۴۸۲۲ ^a	۱۴۳/۳۵ ^a	۰/۵۲۶۹۴ ^a	۴۳/۵۸ ^a
۰/۷ میلی مولار آمونیوم و ۲/۱ میلی مولار نیترات	۵۴/۴۰۰ ^{ab}	۰/۶۸۱۶۱ ^{ab}	۰/۳۱۰۴۴ ^a	۱۱۲/۸۲ ^{ab}	۰/۳۹۱۹۴ ^{ab}	۴۵/۶۹ ^a
۱/۴ میلی مولار آمونیوم و ۱/۴ میلی مولار نیترات	۵۰/۵۳۲ ^{ab}	۰/۵۹۰۲۵ ^{ab}	۰/۳۲۲۸۹ ^a	۱۰۲/۸۰ ^{bc}	۰/۴۳۲۰۵ ^{ab}	۴۹/۰۲ ^a
۲/۱ میلی مولار آمونیوم و ۰/۷ میلی مولار نیترات	۵۸/۴۱۵ ^a	۰/۷۸۱۴۶ ^a	۰/۲۸۶۴۰ ^a	۶۹/۶۰ ^c	۰/۲۸۳۵۰ ^b	۴۹/۱۴ ^a
۲/۸ میلی مولار آمونیوم و صفر میلی مولار نیترات	۵۶/۴۸۱ ^a	۰/۷۱۹۵۷ ^a	۰/۲۸۳۰۲ ^a	۸۵/۲۵ ^{bc}	۰/۳۸۳۷۲ ^{ab}	۴۹/۶۳ ^a

میانگین‌های هر ستون که در یک حرف مشترک باشند با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

وجود همبستگی مثبت معنی دار بین وزن تر با میزان کلروفیل کل و سرعت واکنش هیل و همچنین، بین وزن خشک و مقدار کلروفیل کل در گیاه می تواند بدین معنی باشد که افزایش رشد رویشی در گیاهان برنج ناشی از افزایش فعالیت فتوسنتزی در گیاهان برنج در تغذیه با آمونیوم است (جدول ۳). این نتایج با یافته های جی و پنگ (۲۰۰۵) در مورد افزایش مقدار کلروفیل کل و قندهای محلول کل در گیاهان برنج تغذیه شده با آمونیوم در مقایسه با گیاهان تغذیه نموده از نترات هم خوانی دارد. از سوی دیگر، وجود همبستگی مثبت معنی دار بین وزن تر و خشک با فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز و همبستگی منفی معنی دار با فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز به منزله انباشتگی بیشتر پراکسید هیدروژن در محیط نیتراتی و احتمالاً اثر انباشتگی آن بر روی کاهش فعالیت های فتوسنتزی در گیاه خواهد بود که کاهش رشد رویشی را در محیط نیتراتی در پی خواهد داشت (جدول ۳).

فعالیت های فتوسنتزی: نتایج نشان داد که با افزایش مقدار نترات و کاهش مقدار آمونیوم در محلول غذایی، سرعت واکنش هیل و مقدار کلروفیل کل به طور معنی داری کاهش یافت در حالی که نسبت کلروفیل a به کلروفیل b افزایش معنی داری را نشان داد (جدول های ۱ و ۲). از آنجایی که این تغییرات مشابه تغییراتی است که در جریان پیری ایجاد می شوند بنابراین به نظر می رسد تغذیه بوته های برنج با نترات می تواند در ایجاد پیری در این گیاه نقش داشته باشد. از سوی دیگر، بررسی آزمون همبستگی نشان داد که بین میزان پروتئین محلول و سرعت واکنش هیل یک همبستگی مثبت معنی داری و بین میزان پروتئین محلول و نسبت کلروفیل a به کلروفیل b یک همبستگی منفی معنی داری وجود داشت (جدول ۳). از این رو، احتمالاً تغذیه بوته های برنج با آمونیوم با افزایش میزان پروتئین ها در گیاه از جمله پروتئین های مربوط به فتوسیستم ها و آنزیم های مسیر بیوسنتز کلروفیل و به دنبال آن، افزایش فعالیت های فتوسنتزی همراه خواهد بود.

جدول ۳- ضراب همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف نیتروژن.

پراکسیداسیون لیپید	فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسمو تاز	فعالیت ویژه کاتالاز	فعالیت ویژه آنزیم آنزیم آنزیم	فعالیت ویژه پلی فنل اکسیداز	فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز	پروتئین محلول	نسبت کلروفیل a به کلروفیل b	کلروفیل کل	سرعت واکنش هیل	وزن خشک گیاه	وزن تر گیاه
-۰/۰۳۹ ^{ns}	-۰/۷۹۸ ^{**}	-۰/۴۸۰ ^{ns}	-۰/۴۸۰ ^{ns}	-۰/۷۷۰ ^{**}	۰/۸۴۳ ^{**}	۰/۳۳۳ ^{ns}	-۰/۵۵۸ [*]	۰/۶۹۹ ^{**}	۰/۵۷۴ [*]	۰/۹۵۹ [*]	۱
۰/۰۶۷ ^{ns}	-۰/۳۸۷ ^{**}	-۰/۵۵۹ [*]	-۰/۵۵۹ [*]	-۰/۷۰۹ ^{**}	۰/۷۷۸ ^{**}	۰/۱۲۱ ^{ns}	-۰/۴۰۵ ^{ns}	۰/۶۶۱ ^{**}	۰/۳۸۸ ^{ns}	۱	۱
-۰/۴۵۳ ^{ns}	-۰/۷۲۹ ^{**}	-۰/۱۰۱ ^{ns}	-۰/۴۷۸ ^{ns}	-۰/۴۷۸ ^{ns}	۰/۳۳۳ ^{ns}	۰/۷۴۳ ^{**}	-۰/۵۸۱ [*]	۰/۵۵۴ ^{ns}	۱	۱	۱
۰/۲۸۱ ^{ns}	-۰/۵۸۱ [*]	-۰/۵۲۶ [*]	-۰/۳۷۴ ^{ns}	-۰/۳۷۴ ^{ns}	۰/۶۱۲ [*]	۰/۲۳۱ ^{ns}	-۰/۷۲۶ ^{**}	۱	۱	۱	۱
۰/۰۲۱ ^{ns}	۰/۶۵۲ ^{**}	۰/۲۷۳ ^{ns}	۰/۴۲۴ ^{ns}	۰/۴۲۴ ^{ns}	-۰/۴۸۵ ^{ns}	-۰/۶۶۰ ^{**}	۱	۱	۱	۱	۱
-۰/۴۰۵ ^{ns}	-۰/۵۳۷ [*]	-۰/۰۹۳ ^{ns}	-۰/۲۸۳ ^{ns}	-۰/۲۸۳ ^{ns}	۰/۳۲۴ ^{ns}	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۰/۱۱۱ ^{ns}	-۰/۳۵۷ ^{**}	-۰/۵۹۷ ^{**}	-۰/۳۷۱ ^{**}	-۰/۳۷۱ ^{**}	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۰/۴۴۰ ^{ns}	۰/۸۳۵ ^{**}	۰/۱۲۱ ^{ns}	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
-۰/۷۶۲ ^{**}	۰/۳۶۰ ^{ns}	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۰/۲۷۵ ^{ns}	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱

^{ns} همبستگی بین صفات معنی‌دار نیست، ^{*} همبستگی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است، ^{**} همبستگی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است.

اثر نوع نیتروژن بر مقدار پروتئین محلول در برگ گیاه برنج: نتایج نشان داد که با افزایش مقدار آمونیوم و کاهش مقدار نترات در محلول غذایی مقدار پروتئین محلول افزایش می‌یابد (جدول‌های ۱ و ۲). این افزایش را می‌توان ناشی از افزایش همگون‌سازی آمونیوم در گیاه برنج دانست. فعالیت چرخه GS/GOGAT در گیاه به‌منظور همگون‌سازی آمونیوم و تولید اسید آمینه گلوتامین، به گلوتامات و ۲-اکسوجلوتارات نیاز دارد. آنزیم گلوتامات دهیدروژناز واکنش دو سویه‌ای را انجام می‌دهد که از یک سو با مصرف آمونیوم، گلوتامات مورد نیاز برای چرخه GS/GOGAT را تولید می‌کند و از سوی دیگر، واکنش آمین‌زدایی گلوتامات و تشکیل ۲-اکسوجلوتارات را انجام می‌دهد. جهت این واکنش به منبع نیتروژن و کربن در گیاه بستگی دارد به‌طوری‌که آمونیوم، گلوتامین و قندها سبب واکنش آمیناسیون (تشکیل گلوتامات) و نترات، گلوتامات و محدودیت کربن سبب واکنش کاتابولیک آمین‌زدایی (تشکیل ۲-اکسوجلوتارات) می‌شوند (لنشن و همکاران، ۲۰۰۰). از این رو، تغذیه بوته‌های برنج با آمونیوم فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز را به سوی تولید گلوتامات افزایش می‌دهد و گلوتامات به‌منظور تولید گلوتامین توسط آنزیم GS مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدین ترتیب، تولید اسید آمینه گلوتامین افزایش می‌یابد و به دنبال آن، می‌تواند به افزایش تولید اسید آمینه‌های دیگر و افزایش تولید پروتئین در گیاه منجر شود. نتایج بررسی مارواها و جولیانو (۱۹۷۶) در دانه‌رست‌های برنج تحت تیمار با نترات یا آمونیوم نشان داد که فعالیت آنزیم‌های گلوتامات دهیدروژناز و گلوتامین سینتاز در تغذیه با آمونیوم بیشتر از تغذیه با نترات است. هم‌چنین، آنها نتیجه گرفتند که فعالیت بیشتر آنزیم گلوتامین سینتاز به معنی همگون‌سازی سریع‌تر نیتروژن در تغذیه با آمونیوم است. کرونزوک و همکاران (۱۹۹۹) نیز در تغذیه هم‌زمان گیاه برنج با نترات و آمونیوم، افزایش فعالیت چرخه GS/GOGAT و تحریک همگون‌سازی آمونیوم در حضور نترات را گزارش کردند.

اثر نوع نیتروژن بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در برگ گیاه برنج: نتایج نشان داد که اثر نوع نیتروژن بر فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ‌های برنج معنی‌دار است به‌طوری‌که با افزایش نترات و کاهش میزان آمونیوم در محلول غذایی، فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد (جدول‌های ۱ و ۲). به‌طور یقین افزایش فعالیت این آنزیم در تغذیه با نترات ناشی از افزایش میزان سوپراکسید آن یعنی آنیون سوپراکسید می‌باشد. دلایل مختلفی را می‌توان در مورد افزایش آنیون سوپراکسید در تغذیه با نترات مد نظر قرار داد. جذب نترات در ریشه

نیازمند انرژی است که از طریق واکنش‌های تنفسی تأمین می‌شود (کرافورد، ۱۹۹۵). افزایش سرعت تنفس در ریشه می‌تواند موجب افزایش تولید آنیون سوپراکسید در زنجیر انتقال الکترون میتوکندری شود. از سوی دیگر، نیترات پس از جذب باید احیا گردد و به آمونیوم تبدیل شود. در گیاه برنج، بخش زیادی از نیترات به برگ‌ها انتقال می‌یابد و در آنجا به آمونیوم احیا می‌شود (مارواها و جولیانو، ۱۹۷۶). احیای نیترات به حاملین الکترون و پروتون وابسته است که از واکنش‌های فتوسنتزی و یا تنفسی تولید می‌شوند و افزایش سرعت این واکنش‌ها سبب افزایش تولید آنیون سوپراکسید در زنجیر انتقال الکترون کلروپلاستی و میتوکندریایی خواهد شد. فرضیه دیگر در خصوص افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تغذیه با نیترات، تولید آنیون سوپراکسید توسط آنزیم نیترات‌ردوکتاز است. به دلیل وجود مراکز اکسایش و کاهش در این آنزیم (کرافورد و همکاران، ۱۹۸۸)، تولید آنیون سوپراکسید ضمن نقل و انتقال الکترون، همانند زنجیر انتقال الکترون میتوکندریایی محتمل است. یافته‌های یاماساکی و ساکی‌هاما (۲۰۰۰) مبنی بر تولید آنیون سوپراکسید توسط آنزیم نیترات‌ردوکتاز مؤید این فرضیه است. اوجی و ایزاوا (۱۹۶۸) نشان دادند که فعالیت ویژه آنزیم نیترات‌ردوکتاز در ساقه‌ها و برگ‌های گیاهان ۲۱ روزه برنج از فعالیت آن در سویا و گندم بیشتر است. مارواها و جولیانو (۱۹۷۶) نیز افزایش فعالیت این آنزیم را در اندام‌های هوایی گیاه برنج نسبت به ریشه‌ها و افزایش فعالیت آن را در تغذیه با نیترات نسبت به تغذیه با آمونیوم گزارش نمودند.

بررسی الگوی الکتروفورزی آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در برگ‌های برنج تحت تیمارهایی با نسبت‌های متفاوت آمونیوم و نیترات نشان داد که در همه تیمارها سه ایزوزیم سوپراکسیددیسموتاز وجود دارد که وزن مولکولی آنها ۲۴، ۲۹ و ۵۳ کیلو دالتون است. استفاده از سیانید پتاسیم ۲ میلی‌مولار که ممانعت‌کننده آنزیم Cu/Zn-SOD است و پراکسید هیدروژن ۵ میلی‌مولار که ممانعت‌کننده آنزیم-های Fe-SOD و Cu/Zn-SOD می‌باشد، نشان داد که همگی ایزوزیم‌ها از نوع Cu/Zn-SOD هستند. با توجه به عدم مشاهده ایزوزیم‌های Fe-SOD و Mn-SOD بر روی ژل و عدم تشکیل ایزوزیم جدیدی برای Cu/Zn-SOD، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در برگ‌های برنج تحت تیمارهای مختلف نیتروژن باید ناشی از افزایش فعالیت ایزوزیم‌هایی باشد که از قبل در گیاه وجود داشته‌اند و ایزوزیم جدیدی القا نشده است (شکل ۲).

نتایج نشان داد که اثر نوع نیتروژن بر روی فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز در برگ‌های برنج معنی‌دار نمی‌باشد (جدول‌های ۱ و ۲). بنابراین، تغذیه نیتروژن با نسبت‌های متفاوت آمونیوم و نیترات بر روی

تولید و یا تخریب این آنزیم در برگ‌های برنج اثری ندارد. یافته‌های مارواها و جولیانو (۱۹۷۶) نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم برحسب نانومول اکسیژن تولید شده بر دقیقه بر گرم وزن تر در اندام هوایی گیاه برنج در تغذیه با آمونیوم بیش از تغذیه با نیترات است. براساس نتایج بررسی ریوس-گنزالس و همکاران (۲۰۰۲)، تغذیه با آمونیوم فعالیت آنزیم کاتالاز را در دو گونه ذرت و آفتابگردان افزایش می‌دهد اما این افزایش فقط در مورد گیاه آفتابگردان معنی‌دار می‌باشد. آنها اظهار نمودند که افزایش فعالیت کاتالاز ممکن است ناشی از افزایش سرعت تولید انواع اکسیژن واکنشی در تغذیه با آمونیوم باشد اما سازوکاری مکانیسمی برای افزایش تولید انواع اکسیژن واکنشی در تغذیه با آمونیوم از سوی آنها ارایه نشد. به نظر می‌رسد فعالیت آنزیم کاتالاز در تغذیه با نیترات و یا آمونیوم به گونه گیاهی وابسته باشد به طوری که فعالیت آن در برخی گونه‌ها در محیط آمونیوم بیشتر و در برخی دیگر از گونه‌ها اختلافی بین فعالیت آن در تغذیه با نیترات و یا آمونیوم مشاهده نمی‌شود.

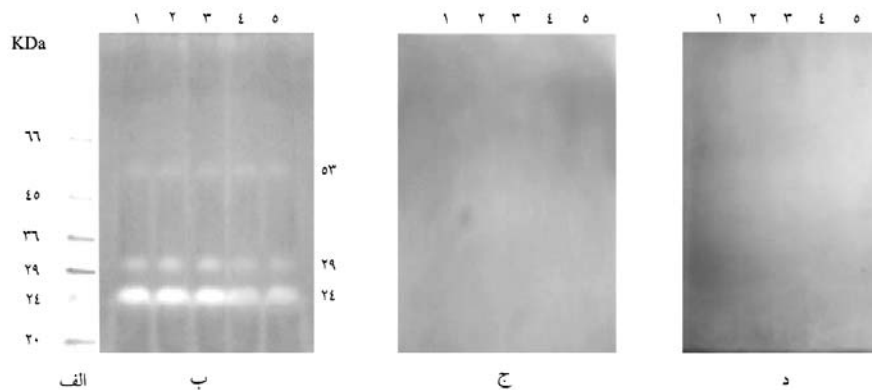
بررسی الگوی الکتروفورزی آنزیم کاتالاز بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید غیردنا توره‌کننده تحت تیمارهای مختلف نیتروژن نشان داد که در همه تیمارها تنها یک ایزوزیم قابل تشخیص است. به عبارت دیگر، تحت تیمارهای مختلف نیتروژن ایزوزیم جدیدی القا نمی‌شود (شکل ۳).

با توجه به این نتایج، اثر نوع نیتروژن بر فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در برگ‌های برنج معنی‌دار بود به طوری که با افزایش آمونیوم و کاهش نیترات در محلول غذایی، فعالیت این آنزیم افزایش یافت (جدول‌های ۱ و ۲). نتایج بررسی ریوس-گنزالس و همکاران (۲۰۰۲) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در دانه‌رس‌های ذرت و آفتابگردان نشان داد که در برگ‌ها تفاوت معنی‌داری در فعالیت این آنزیم در تغذیه با نیترات و آمونیوم مشاهده نمی‌شود اما فعالیت این آنزیم در ریشه‌های گیاهانی که با نیترات تغذیه می‌شوند به طور معنی‌داری بیشتر از برگ‌ها است. نتایج بررسی میسرا و گوپتا (۲۰۰۶) در گیاه *Catharanthus roseus* نشان داد که فعالیت این آنزیم فعالیت آن در تغذیه با نیترات به طور معنی‌داری از فعالیت آن در تغذیه با آمونیوم بیشتر بود و فعالیت آنزیم در ریشه‌ها نیز بیشتر از برگ‌ها است. آنها عنوان نمودند که افزایش فعالیت پراکسیداز در تغذیه با نیترات ناشی از افزایش تولید پراکسید هیدروژن توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در این محیط می‌باشد. ظاهراً تناقضی بین نتایج ما با نتایج ریوس-گنزالس و همکاران (۲۰۰۲) و میسرا و گوپتا (۲۰۰۶) وجود دارد. علت افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان برنج در تغذیه با آمونیوم را باید در افزایش میزان سوبسترای آن یعنی پراکسید هیدروژن جستجو نمود. براساس نتایج لین و کیو (۲۰۰۱) تیمار ریشه‌های برنج با کلرید آمونیوم

سبب افزایش فعالیت آنزیم NADH به‌عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کنند و NADH اکسیدازها نامیده می‌شوند نقش مهمی در تشکیل پراکسید هیدروژن مورد نیاز برای ساخت لیگنین دارند (۱۱). لین و کیو (۲۰۰۱) اثر کلرید آمونیوم را بر روی فعالیت آنزیم NADH اکسیداز و میزان پراکسید هیدروژن می‌گردد. بنابراین، منبع تولید پراکسید هیدروژن در بوته‌های برنج تحت تیمار آمونیوم، فعالیت آنزیم NADH اکسیداز دیواره‌ای است. از آنجایی که ما فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز را اندازه‌گیری نمودیم و این آنزیم مصرف‌کننده پراکسید هیدروژن است بنابراین علت افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ‌های گیاهان برنج را می‌توان راهی برای مقابله با افزایش فعالیت آنزیم NADH اکسیداز و افزایش تولید پراکسید هیدروژن در ریشه‌های گیاهان برنج تیمار شده با آمونیوم دانست.

اثر نوع نیتروژن بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در برگ گیاه برنج: نتایج نشان داد که اثر نوع نیتروژن بر روی فعالیت ویژه آنزیم پلی‌فنل اکسیداز معنی‌دار نمی‌باشد اما مقایسه اختلاف میانگین‌ها نشان داد که فعالیت ویژه این آنزیم در تیمار ۲/۱ میلی‌مولار آمونیوم و ۰/۷ میلی‌مولار نیترات به‌طور معنی‌داری از تیمار صفر میلی‌مولار آمونیوم و ۲/۸ میلی‌مولار نیترات کمتر است (جدول‌های ۱ و ۲). بنابراین، چنانچه تنها منبع نیتروژن در دسترس گیاه نیترات باشد فعالیت ویژه آنزیم پلی‌فنل اکسیداز افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج اروزکو- کاردناس و همکاران (۲۰۰۱) در مورد اثر انباشتگی پراکسید هیدروژن ناشی از جراحی بر روی بیان ژن پلی‌فنل اکسیداز، به‌نظر می‌رسد فعالیت بالای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در محیط نیتراتی و تولید پراکسید هیدروژن توسط این آنزیم، سبب افزایش نسبی فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در محیط نیتراتی شده است. اما در محیط آمونیوم فعالیت بالای گایاکول پراکسیداز از میزان پراکسید هیدروژن می‌کاهد و فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در این محیط از محیط نیتراتی کمتر خواهد بود.

اثر نوع نیتروژن بر پراکسیداسیون لیپید: گزارشی که اثر نوع نیتروژن را بر روی میزان پراکسیداسیون لیپید بیان نماید در دست نیست. نتایج بررسی‌های ما بر روی گیاهان برنج تحت تیمار با نسبت‌های متفاوت نیترات و آمونیوم نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپید بین تیمارهای متفاوت نیترات و آمونیوم وجود ندارد (جدول‌های ۱ و ۲). عدم تغییر در میزان پراکسیداسیون لیپید تحت تیمارهای مختلف نیتروژن به منزله عدم تحمیل استرس اکسیداتیو به گیاه تحت این تیمارها است. به عبارت دیگر، تغذیه بوته‌های برنج با منابع متفاوت ازت سبب القای پیری در گیاه نمی‌شود.



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بر روی ژل پلی اکریل آمید دنا توره کننده (SDS-PAGE).
 الف) نشانگرهای وزن مولکولی، ب) تشخیص ایزوزیم‌های مختلف SOD، ج) تیمار ژل با سیانیدپتاسیم ۲ میلی مولار، د) تیمار ژل با پراکسید هیدروژن ۵ میلی مولار، نوارهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب تیمارهای ۲/۸ میلی مولار نیترات و صفر میلی مولار آمونیوم، ۲/۱ میلی مولار نیترات و ۰/۷ میلی مولار آمونیوم، ۱/۴ میلی مولار نیترات و ۱/۴ میلی مولار آمونیوم، ۰/۷ میلی مولار نیترات و ۲/۱ میلی مولار آمونیوم، و صفر میلی مولار نیترات و ۲/۸ میلی مولار آمونیوم می‌باشند.



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی آنزیم کاتالاز بر روی ژل پلی اکریل آمید در تیمارهای مختلف نیتروژن.

نتیجه‌گیری

یون‌های آمونیوم و نیترات به‌عنوان منابع نیتروژن از نظر اثر بر روی رشد و ترکیب شیمیایی گیاه با هم متفاوت هستند. تغذیه گیاهان برنج با نیترات سبب کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک گیاه، سرعت واکنش هیل، مقدار کلروفیل کل و پروتئین و افزایش معنی‌دار نسبت کلروفیل a به کلروفیل b گردید. این فاکتورها که به‌عنوان شاخص‌هایی برای رشد و بازدهی گیاه در نظر گرفته شدند نشان دادند که تغذیه با نیترات از رشد و بازدهی گیاهان برنج جلوگیری می‌کند و احتمالاً پیری زودرس آنها را به دنبال خواهد داشت. همچنین، از آنجایی که در مورد فاکتورهایی چون وزن تر و خشک، واکنش هیل، فعالیت ویژه آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسیداسموتاز بیشترین تفاوت معنی‌دار بین تیمار ۲/۸ میلی‌مولار آمونیوم و صفر میلی‌مولار نیترات و تیمار ۲/۱ میلی‌مولار آمونیوم و ۰/۷ میلی‌مولار نیترات با تیمار صفر میلی‌مولار آمونیوم و ۲/۸ میلی‌مولار نیترات مشاهده می‌شود. بنابراین محیط‌هایی که در آنها میزان آمونیوم بیش از ۵۰ درصد نیتروژن در دسترس برای گیاه را تشکیل می‌دهد، برای رشد بهینه گیاه برنج مناسب‌تر است.

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو نشان داد که بین فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسیداسموتاز و فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در گیاهان برنج تحت تیمارهای متفاوت نیترات و آمونیوم همبستگی منفی معنی‌داری مشاهده می‌شود به‌طوری‌که فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسیداسموتاز در تغذیه با نیترات به‌طور معنی‌داری از تغذیه با آمونیوم بیشتر بود در حالی‌که فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در تغذیه با آمونیوم به‌طور معنی‌داری از تغذیه با نیترات بیشتر بود. این بدان معنا است که تغذیه با نیترات با افزایش تولید آنیون سوپراکسید و به دنبال آن، افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز و تولید پراکسید هیدروژن همراه است. افزایش تولید پراکسید هیدروژن در این گیاهان با افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز همراه نیست بنابراین انباشتگی پراکسید هیدروژن احتمالاً سبب کاهش کلروفیل و پروتئین در این گیاهان شده است و به دنبال آن، با کاهش فتوسنتز و میزان اسکلت کربنی، رشد رویشی کاهش یافته است. از سوی دیگر، تغذیه بوته‌های برنج با آمونیوم با افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز همراه است. فعالیت بالای آنزیم پراکسیداز در تغذیه با آمونیوم، از اثر پراکسید هیدروژن تولید شده توسط آنزیم NADH اکسیداز بر روی کاهش میزان کلروفیل و پروتئین می‌کاهد و این باعث افزایش فتوسنتز و رشد رویشی در این گیاهان می‌شود. هر چند بررسی اختلاف میانگین‌ها در مورد آنزیم‌های کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در تغذیه

با آمونیم و افزایش معنی دار فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تغذیه با نیترات را نشان داد اما نتایج آنالیز واریانس تفاوت معنی داری را در فعالیت این آنزیم‌ها تحت تیمارهای متفاوت نیترات و آمونیم نشان نداد. از آنجایی که پراکسیداسیون لیپید یکی از شاخص‌های مهم پیری است به نظر می‌رسد عدم تغییر پراکسیداسیون لیپید در تیمارهای متفاوت نیترات و آمونیم بدین معنی است که حتی تغذیه برنج با نیترات نیز سبب القای پیری در این گیاه نمی‌شود بلکه تنها سبب تخفیف و یا تعویق رشد در این گیاه می‌گردد. با توجه به نتایج به دست آمده علت کاهش رشد و بازدگی گیاهان برنج در تغذیه با نیترات در مقایسه با تغذیه با آمونیم ناشی از تفاوت در مسیرهای متابولیکی آنها و تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو می‌باشد.

منابع

1. Anderson, M.D., Prasad, T.K, and Stewart, C.R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109: 1247-1257.
2. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
3. Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
4. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
5. Buchanan-Wollaston, V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181-199.
6. Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., and Pink, D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence-a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 3-22.
7. Chance, B., and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 11: 764-755.
8. Crawford, N.M., Smith, M., Bellissimo, D., and Davis, R.W. 1988. Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5006-5010.
9. Crawford, N.M. 1995. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, 7: 859-868.

10. Du, Z., and Bramlage, W.J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J Agric. Food Chem.* 40: 1566-1570.
11. Fecht-Christoffers, M.M., Führs, H., Braun, H.P., and Horst, W.J. 2006. The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance. *Plant Physiol.* 140: 1451-1463.
12. Fling, S.P., and Gregerson, D.S. 1986. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris buffer system without urea. *Analytical Biochemistry*, 155: 83-88.
13. Hou, W.C., Lu, Y.L., Liu, S.Y., and Lin, Y.H. 2003. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in leaves of different cultivars of *Liriope spicata* L. on 10% SDS-PAGE gels. *Bot. Bull Acad. Sin.* 44: 37-41.
14. Hung, K.T., and Kao, C.H. 2003. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *J. Plant Physiol.* 160: 871-879.
15. Ji, X.M., and Peng, X.X. 2005. Oxalate accumulation as regulated by nitrogen forms and its relation to photosynthesis in rice. *Journal of Integrative Biology*, 47: 831-838.
16. Jordy, M.N., Danti, S., Favre, J.M., and Racchi, M.L. 2000. Histological and biochemical changes in *Pinus* spp. seeds during germination and post-germinative growth: triacylglycerol distribution and catalase activity. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 1109-1117.
17. Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57: 315-319.
18. Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., and Kirk, G.J.D. 1999. Nitrate ammonium synergism in rice: A subcellular analysis. *Plant Physiol.* 119: 1041-1046.
19. Kuk, Y.I., Shin, J.S., Burgos, N.R., Hwang, T.E., Han, O., Cho, B.H., Jung, S., and Guh, J.O. 2003. Antioxidative Enzymes Offer Protection from Chilling Damage in Rice Plants. *Crop Sci.* 43: 2109-2117.
20. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
21. Lancian, M., Gadal, P., and Hodges, M. 2000. Enzyme Redundancy and the Importance of 2-Oxoglutarate in Higher Plant Ammonium Assimilation. *Plant Physiol.* 123: 817-824.
22. Lin, C.C., and Kao, C.H. 2001. Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl- inhibited root growth of rice seedlings. *Plant Soil*, 230: 135-143.
23. Malavolta, E. 1954. Study on the nitrogenous nutrition of rice. *Plant Physiol.* 29: 98-99.

24. Misra, N., and Gupta, A.K. 2006. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. *J. Plant Physiol.* 163: 11-18.
25. Noodén, L.D. 1988. The phenomenon of senescence and aging. In *Senescence and Aging in Plants*, Noodén, L.D., and Leopold, A.C. eds (San Diego, CA: Academic Press), Pp: 2-50.
26. Oji, Y., and Izawa, G. 1968. Utilization of nitrate nitrogen in higher plants (part 7). The inducibility of NADH: nitrate oxidoreductase and the enzyme activity affected by leaf position in rice plants. *J. Sci. Soil Manure Japan*, 39: 380-386.
27. Orozco-Cárdenas, M.L., Narváez-Vásquez, J., and Ryan, C.A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding systemin, and methyl. jasmonate. *The Plant Cell*, 13: 179-191.
28. Prochazkova, D., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., and Singh, D.V. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci.* 161: 765-771.
29. Rao, M.V, Paliyath, G., and Ormrod, D.P. 1996. Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136.
30. Rios-Gonzalez, K., Erdei, L., and Lips, S.H. 2002. The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources. *Plant Sci.* 162: 923-930.
31. Trebst, A. 1972. Measurement of the Hill reaction and photoreduction. *Methods Enzymol.* 24: 146-165.
32. Whatley, F.R., and Arnon, D.I. 1962. Photosynthetic phosphorylation in plants. *Methods Enzymol* 6: 308-313.
33. Woo, H.R., Chung, K.M., Park, J.H., Oh, S.A., Ahn, T., Hong, S.H., Jang, S.K., and Nam, H.G. 2001. ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13: 1779-1790.
34. Yamasaki, H., and Sakihama, Y. 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxonitrite by plant nitrite reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of reactive nitrogen species. *FEBS Letters*, 468: 89-92.
35. Yamasaki, T., and Senio, K. 1965. Use of nitrate fertilizers for the cultivation of paddy rice (part 1). About the physiological character of rice seedlings supplied with nitrate as the source of nitrogen. *J. Sci. Soil Manure Japan*, 36: 153-158.
36. Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H., and Gomez, K.A. 1976. *Laboratory manual for physiological studies of rice*. Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 16(2), 2009
www.gau.ac.ir/journals

The effect of nitrogen-fed on rice (*Oryza sativa* L.cv.tarom) leaf Senescence

***S.M. Hoseini**¹, **Gh.R. Haddadchi**², **H.R. Sadeghipur**³ and **F. Yaghmaii**⁴

¹M.Sc. student, Dept. of Biology, Golestan University, ²Prof., Dept. of Biology, Golestan University, ³Assistant Prof., Dept. of Biology, Golestan University, ⁴Assistant Prof., Dept. of Statistics, Golestan University

Abstract

Nitrate and ammonium ions are the two major forms of nitrogen that taken up by plants, but they differ in their effects on growth and chemical composition of biochemical levels. In this research we examined the effect of nitrogen sources on growth and senescence of rice leaves in biochemical levels. Our results showed that amounts of fresh and dry weights, total chlorophyll, rate of Hill's reaction, amount of soluble proteins and specific activity of peroxidase significantly were lower in nitrate-fed plants than ammonium-fed plants. Where as, chlorophyll *a* and chlorophyll *b* ratio and specific activity of superoxide dismutase were higher in nitrate-fed plant as compared to ammonium-fed plants. Any changes in lipid peroxidation under different treatments of nitrogen means that nitrogen-fed did not induce oxidative stress and senescence in rice plant, but it can only cause reduction in growth parameters such as fresh and dry weights, amount of chlorophyll and protein in nitrate-fed rice plant.

Keywords: Rice, Nitrate, Ammonium, Leaf senescence, Oxidative enzymes

* Corresponding Author; Email: seyyedmohsen_hoseini@yahoo.com