تغییرات فیزیولوژیکی وبیوشیمیائی القاء شده با نوع نیتروژن در گیاه برنج (رقم طارم)

غلامرضا حدادچی و معصومه منصوری

گروه زیست شناسی – دانشکده علوم – دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

برنج از محصولات کشاورزی ارزشمند است که باتوجه به مصرف آن بعد از گندم در مرتبه دوم اهمیت قرار دارد. بر روی این گیاه تحقیقات فراوانی صورت گرفته است که از آن جمله آثار تغذیه ای انواع ترکیبات ازت دار بخصوص نیترات و آمونیوم است. باتوجه بنوع ازتی که این گیاه مصرف می کند مسیرهای سوخت و سازی خاصی شروع به فعالیت می کنند که مرتبط با ظهور پدیده های فیزیولوژیکی همچون پیری و تغییر ترکیبات آلی است. در این پژوهش مشخص گردید که در قیاس با آمونیوم ، تیمار نیتراتی موجب افزایش رشد بخش هوائی شده لیکن به لحاظ آماری (درسطح ۵٪) معنی دار نبوده ولی برای ریشه معنی دار است. در قیاس با نیترات تیمار آمونیاکی موجب افزایش نسبت وزن بخش هوائی به ریشه می شودکه مؤید بازدارندگی رشد توسط آمونیوم است و در ریشه شدیدتر از بخش هوائی است. در تیمار آمونیاکی نسبت به نیتراتی مقدار کربوهیدراتهای محلول و نامحلول در بخش هوائی و ریشه کاهش معنی داری نشان دادند. گرچه مقدار کلروفیل در تیمار آمونیاکی نسبت به نیتراتی دارای افزایش معنی داری بود، لیکن در نسبت کلروفیل های a و b دو تیمار تفاوت معنی داری مشاهده نشد. احتمالا" باتوجه به نقش ازت در سنتز کلروفیل، تسریع در جذب ازت آمونیاکی موجب سنتز بیشتر کلروفیل شده است. در تیمار آمونیاکی پروتئین در هر دو بخش هوائی و ریشه، و پرولین فقط در بخش هوائی افزایش معنی دار نشان داد. احتمالا" در تنش با آمونیوم افزایش پرولین و برخی از پروتئینها ضرورت پیدا کرده که مرتبط با سم زدائی آمونیوم می باشد. افزایش مقدار فنل کل در هوگلند نیتراتی نسبت به آمونیاکی مشاهده گردید، اما به لحاظ آماری معنی دار نبود.

واژه های کلیدی : برنج ، تغییرات متابولیسمی ، نیترات ، آمونیوم .

مقدمه

دانه برنج و فرآورده های حاصل از آن نزدیک به ٤٠ درصد غذای مورد نیاز نیمی ازجمعیت جهان را تشکیـــــل می دهد و نزدیک به ۹۰ درصد سطح زیر کشت و تولید برنج به کشورهای خاور دور اختصاص دارد، زراعت برنج در ایران سابقه طولانی داشته و به زمان هخامنشیان می رسد (۲).

ازت یکی از مهم ترین عناصر در تغذیه گیاهان محسوب می شود (۲۵). هنگامی که در تغذیه گیاه مقدار ازت و نوع آن مناسب باشد، ساخت مواد پروتئینی شدت می یابد، قدرت حیات گیاه زیاد می شود، رشد برگها تسریع می گردد و پیری آنها کند می شود (۳۵ و ۳۸). در خاک ازت بصورت نیترات و آمونیوم در اختیار ریشه گیاهان عالی قرار می گیرد. یون نیترات دارای بار منفی است و به ذرات رس و هوموس متصل نمی شود و چنانچه توسط ریشه جذب گیاه نشود ممکن است توسط آب شسته شده و به اعماق خاک منتقل شود. یون آمونیوم کاتیون است و با بار مثبت خود به ذرات رس و

Archive of SID

www.SID.ir

هوموس متصل می شود و احتمال اندکی وجود دارد که توسط آب شسته شود (۸).

برخی گیاهان نظیر گندم ، جو ، یولاف و چغندر قند ازت را به شکل نیترات ترجیح می دهند و در بعضی دیگر همانند سیب زمینی ارجحیت با آمونیوم است، لیکن در بیشتر این گیاهان برتری جذب نیترات بر آمونیوم و یا عکس آن برحسب شرایط کشت و مرحله خاصی از رشد و نمو گیاه است. گیاهان جوان معمولاً آمونیوم را ترجیح می دهند. با آنکه نیترات بعنوان منبع اصلی ازت است، لیکن بسیاری از گیاهان قادرند ازت آمونیاکی را به آسانی جذب نموده و مورد استفاده قرار دهند. بخصوص هنگامی که شرایط محیطی برای افزایش شدت فتوسنتز و در نتیجه افزایش سرعت رشد مساعد باشد (۵).

جذب نیترات و آمونیوم تحت تأثیر افزایش غلظت گازکربنیک تغییر می یابد، بطوریکه افزایش غلظت آن در محیط میزان جذب نیترات را در ریشه ها افزایش می دهد ولی بر روی جذب آمونیاک تأثیری ندارد، در ضمن افزایش جذب نیترات همراه با افزایش غلظت گازکربنیک موجب افزایش غلظت کربوهیدراتها در ریشه می شود (۹). نسبت جذب نیترات و آمونیوم به محل تثبیت منبع نیتروژنی ارتباط دارد، بنحویکه همه آمونیوم جذب شده در ریشه تثبیت می شود لیکن نیترات مراحل احیاء وتثبیت خود را دربرگ انجام می دهد (١٤ و ٢٩). جذب ازت مرتبط با pH محیط نیـــز می باشد. استفاده از کودهای آمونیاکی pH محیط اطراف ریشه را اسیدی می سازد و علت آن همراه بودن جذب آمونیوم با ورود H^+ به محیط است (۸). عامل pH در جذب ازت اهمیت دارد. از اینرو کاهش pH جذب و احیای نیترات را متناسب می سازد در صورتیکه افزایش آن جذب آمونیوم را تسهیل می نماید. در گیاهانی که از آمونیوم بعنوان منبع ازت استفاده می شود، بلافاصله ازت در اسکلتهای کربنی تثبیت شده و اسیدهای آمینه و آمیدهای تولید شده به برگ منتقل می شود (۱۱ و ۲۰). اما نیترات مراحل تثبیت خود را در برگ انجام می دهد (۲۹). برخی تحقیقات نشان داده است که ورود آمونیاک در ساخت آمینواسیدها سریعتر و زمان آن کوتاهتر از نیترات است (۱۰). مصرف نیتروژن آمونیاکی در گندم سبب بروز پیری زودرس و کاهش کلروفیل می گردد و مصرف نیتروژن مانع آن می شود (۱). نقش آمونیوم در رشد و نمو گیاه و تغییر مقدار پرولین از طریق گلوتامات دهیدروژناز است، زیرا فعالیت این آنزیم با سمیت آمونیوم افزایش یافته و تجمع گلوتامات را سبب می شود که این ماده خود بعنوان پیش ماده ای جهت ساخت پرولین بکار می رود. در نتیجه هنگام تنش آمونیوم، مقدار پرولین افزایش می یابد (١٦). طی پیری میزان فنل کل افزایـش یافته که بعلت پروتئولیز، آمینواسیدهای فنلی آزاده شده و از واکوئل خارج می شوند. این حالت درگیاه جو گزارش شده است (٣٦). همچنین گزارش شده استکه در حضور مقدار بالای نیتروژن آمونیومی، ترکیبات فنلی بسرعت شکسته شده و مقاومت مکانیکی گیاه کاهش پیدا می کند (٣٣).

در این مطالعه، اثر تغذیه با نیتروژن نیتراتی و آمونیاکی بر تغییرات رشد، مقدار کلروفیل، مقدار قند، پروتئین، پرولین و ترکیبات فنلی برنج مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

تعدادی بذر برنج از رقم طارم دم سیاه پس از ضدعفونی با سدیم هیپوکلریت بمدت ۱۰ دقیقه جهت جوانه زنی در داخل حوله کاغذی نمدار پیچیده شد. پس از ٤ روز ، جوانه های حاصل به گلدان های حاوی ماسه شسته شده منتقل گردید. در هر گلدان ٤ گیاهچه قرار گرفت سپس هر ٤ گلدان در داخل یک تشتک محتوی غذائی و بصورت غرقاب قرار داده شد. محلول غذائی سه تای

Archive of SID

www.SID.ir

این تشتک ها از هوگلند(۱۹) و سه تای دیگر هوگلند است.
آمونیاکی بوده است. ترکیب اجزاء در جدول ۱ آمده

جدول۱- محیط کشت هوگلند*

محیط کشت برحسب نوع نیتروژن	نوع ماده شیمیائی	مولاریته	مقدار (گرم در لیتر)
هوگلند (نیتراتی)	KNO_3	۰/۰۱	۰/۲۵۲
محلول ماکرو	$Ca(NO_3)_2$	۰/۰۰۳	۰/٤٥٤
	KH_2PO_4	۰/۰۰۲	۰/۰٦۸
	$MgSO_4.7H_2O$	۰/۰۰۲	۰/٦۰۱
هوگلند(آمونیاکی)	$CaCl_2$		۰/۲۳۹
محلول ماکرو	NH_4Cl		۰/۳٦۲
	KCl		۰/۱۸۵
	KH_2PO_4		۰/۰٦۸
	$MgSO_4.7H_2$		۰/٦۰۱

* در مقدار نمک تغییراتی داده شده و در ضمن بجای فسفات آمونیوم از فسفات پتاسیم استفاده گردید.

اجزاء محلول میکرو عبارت اند از : $CuSO_4.5H_2O$, H_3BO_3, $MnCl_2O.4H_2$, $ZnSO_4.7H_2O$ و $H_2MoO_4.H_2O$ که مقادیر آنها به ترتیب ۲/۸٦، ۱/۸۱ ، ۰/۲۲ ، ۰/۰۸ و ۰/۰۲ گرم درلیتر است. محلـول Fe-EDTA حاوی، ۲/۷۸ گرم در لیتر سولفات آهن و ۳/۷۲۵ گرم درلیتر Na-EDTA می باشد. به هر لیتـــر از محلولهای غذائی هوگلند، یک میلی لیتر محلول میکرو و یک میلی لیتر محلول Fe-EDTA اضافه شده است.

ظروف مذکور در دمای گلخانه ای (حدود$25^{\circ}c$) نگهداری و در طول هفته، pH محلول غذائی در حدود ۷- ٦/۵ ثابت نگه داشته شد و در انتهای هرهفته نیز محلول غذائی تعویض گردید. بعد از ٦ هفته گیاهان مورد آزمایش قرار گرفتند. برای هرکدام از محیطهای غذائی مذکور محتوی NO_3^- ویا NH_4^+ سه تکرار درنظر گرفته شد. آزمایشها با طرح کاملا" تصادفی و بررسیهای آماری اطلاعات نیز برحسب آزمون LSD و نرم افزار SPSS صورت گرفت و آنالیز واریانس در سطح احتمال ۵ ٪ انجام شد.

اندازه گیری قند محلول: این اندازه گیری با روش فنل سولفوریک اسید (۱۲) انجام گرفت. ۰/۱ گرم از ماده خشک اندام گیاهی (ریشه و بخش هوائی جدا از هم) که کاملاً پودر شده در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد ریخته شد و پس از یک هفته از بخش روئی محلول برای بخش هوائی ۰/۵ میلی لیتر و برای ریشه۱ میلی لیتر برداشته و با آب مقطر به ۲ میلی لیتر رسانده شد. سپس به آن ۱ میلی لیتر فنل ۵ درصد اضافه و بعد از آنکه خوب بهم زده شد به آن ۵ میلی لیتر سولفوریک اسید غلیظ افزوده گردید، حدود نیم ساعت پس از خنک شدن کامل محلول، جذب آن توسط اسپکتروفتومتر(Shimadzu-UV 160A) در طول موج ٤۸۵ نانومتر خوانده شد. برای اندازه گیری مقدار قند از منحنی استاندارد تهیه شده از گلوکز استفاده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج پروتئین براساس روش Manovanjan (۲٤) (1976) و اندازه گیری مقدار آن با روش Lowry (۲۳) (1951) بوده است.

به ۲۰۰ میلی گرم بافت تر (اندام هوائی و یا ریشه)، ۵ میلی لیتر بافرفسفات با pH مساوی ٦/۸ اضافه شد و آنگاه توسط پوتردستی بطور کامل سائیده شد. آنگاه به آن ۲۰ میلی لیتر الکل ۹٦° افزوده و بمدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. سپس بعد از ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ ۱۵۰۰ دور در دقیقه قسمت رسوبی جدا گردید و ۳ مرتبه با اتانول گرم شستشو داده شد. رسوب بدست آمده بترتیب با محلولهای الف- تری کلرو استیک اسید (۱۰٪ وزن درحجم)، ۲ مرتبه. ب- اتیل الکل، ۱ مرتبه. ج- اتیل الکل- کلروفرم به نسبت ۳ : ۱ حجمی) ۲ مرتبه. د- اتیل الکل- اتر به نسبت (۳ : ۱ حجمی) ۱ مرتبه و هـ- اتر، ۱ مرتبه شستشو داده شد. برای انجام هرمرحله از سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰ در دقیقه و مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. به رسوب نهائی ۲۰ میلی لیتر اتر اضافه شد و آنگاه در دمای آزمایشگاه خشک گردید. به رسوب خردشده ۵ میلی لیتر سود یک نرمال اضافه نموده و در حمام آب گرم بهم زده شد. بعد از ۵ دقیقه سانتریفوژ در ۱۰۰۰ دور در دقیقه ، از محلول روئی جهت اندازه گیری غلظت پروتئین استفاده شد. مقدار جذب در دستگاه اسپکتروفتوکتر و درطول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استانداردی که توسط آلبومین خالص تهیه شده بود، مقدار پروتئین بدست آمد.

استخراج کلروفیل و اندازه گیری کلروفیلهای a و b:
این اندازه گیری برحسب روش Arnon(1994) انجام گرفت. مطابق این روش، یک گرم برگ را با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد کاملا" سائیده و پس از صاف کردن با کاغذ واتمن شماره ۲ بخش باقیمانده روی کاغذ فیلتر را با همان نوع استون دوباره بطور کامل سائیده و پس از صاف کردن مجدد به حجم ۲۰ میلی لیتر رساندیم و آنگاه مقدار جذب را توسط اسپکتروفتومتر در طول موجهای ٦٦۳ و ٦٤۵ نانومتر خواندیم و از روابط زیر برای تعیین غلظت کلروفیلهای a و b استفاده نمودیم.

$$\text{کلروفیل کل (mg/g.FW)} = \frac{۲۰/۲(A_{۶۵٤nm}) + ۸/۰۲ (A_{۶۶۳nm})}{FW. ۱۰۰۰} * V$$

غلظت کلروفیل a = ۰/۰۱۲۷ $A_{۶۶۳}$ – ۰/۰۰۲۶۹ $A_{۶٤۵}$

غلظت کلروفیل b = ۰/ ۰۲۲ $A_{۶٤۵}$ – ۰/۰۰۶٤۸ $A_{۶۶۳}$

غلظت کلروفیل a و b = ۰/۲۰۲ $A_{۶٤۵}$ – ۰/۰۰۸۰۲ $A_{۶۶۳}$

V = حجم نهائی محلول کلروفیلی بر حسب میلی لیتر.

$A_{۶۶۳}$ = مقدار جذب نور در طول موج ٦٦۳ نانومتر

$A_{۶٤۵}$ = مقدار جذب نور در طول موج ٦٤۵ نانومتر

FW = وزن تر بافت استفاده شده برای اندازه گیری کلروفیل.

اندازه گیری پرولین مطابق روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انجام گرفت. براین اساس، ۰/۵ گرم بافت تر بخش هوائی را در ۱۰ میلی لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید سائیدیم تا مخلوط همگنی بدست آید. سپس آنرا با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۲ صاف نموده و به ۲ میلی لیتر آن، ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال افزوده شد. مخلوط را بهم زده و بمدت یک ساعت در بن ماری جوش گذاشتیم و پس از قرار دادن لوله ها در آب یخ به آن ٤ میلی لیتر تولوئن اضافه نموده بعد از آنکه لوله ها را بشدت بهم زدیم، بعد از حدود ۲۰ ثانیه دو لایه مجزا تشکیل شد. لایه رنگی بالائی در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و جذب آن درطول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و آنگاه با استفاده از منحنی استانداردی که با استفاده از پرولین خالص تهیه شده بود، غلظت پرولین مشخص گردید.

اندازه گیری ترکیبات پلی فنلی مطابق روش (۳۲) Singlton(1965) انجام گرفت. براساس آن ۵ گرم از

Archive of SID
www.SID.ir

بافت تر اندام هوائی به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰ میلی لیتر متانول جوشان قرار داه شد. پس از سردشدن محلول با اضافه نمودن ۳۰ میلی لیتر متانول جوشان بافت مذکور کاملا" کوبیده و له شد. پس از عصاره گیری، حجم آن با متانول به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ در دقیقه، محلول روئی جهت اندازه گیری پلی فنل کل مورد استفاده قرار گرفت. عصاره مذکور با آب مقطر ، ۱۰ بار رقیق شد، سپس به یک میلی لیتر از آن، ۲۰ میلی لیتر کربنات سدیم ۱۵ درصد و ۵ میلی لیتر فولن اضافه شد و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. محلول را بمدت دو ساعت به حال خود گذاشته و پس از آن بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مقدار جذب در ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. برای تعیین مقدار ترکیبات پلی فنلی از منحنی استانداردی که با استفاده از گالیک اسید تهیه شده بود، اقدام گردید.

نمودارهای استاندارد مختلفی که از آنها نام برده شد با استفاده از معادله R^2 =۰/۹۹ و نرم افزار Excell رسم شده است. برای قندها معادله خط $Y = ۱۷۲/٦٤_x - ۱۰/۵۱$ ، پرولین $Y = ٤۵۱/۰۷_x + ۱۲۰/۲۵$ و برای پلی فنل کل $Y = ۰/۸۱٤۲_x$ بوده است که در آنها X مقدار جذب و Y شاخص غلظت است.

نتایج و بحث

در خصوص تأثیر نوع ازت بر وزن تر بخش هوائی، نتایج نشان داد که وزن تر بخش هوائی و ریشه در هوگلند آمونیاکی کمتر از نیتراتی است، لیکن از نظر آماری در مورد ریشه معنی دار است. در ضمن نکته جالب توجه این است که نسبت وزن تر بخش هوائی به ریشه در هوگلند آمونیاکی بیشتر بوده که معنی دار هم می باشد.

Gonzalez (2001) و Erdei نشان دادند که وقتی نیترات و آمونیاک بعنوان منبع نیتروژنی مورد استفاده قرار می گیرند، اثرات متفاوتی را بر رشد گیاه و مقدار و نوع ترکیبات شیمیائی ایجاد می کنند. با مطالعات این افراد بر روی گیاه ذرت و آفتاب گردان مشاهده شد که در هر دو گیاه میزان رشد بخش هوائی و ریشه در تیمار آمونیاکی نسبت به نیترات کمتر بوده و میزان تجمع مواد آلی در تیمار نیترات بیشتر از تیمار آمونیاکی است. درضمن ملاحظه نمودند، دراین دوگیاه نسبت بخش هوائی به ریشه در تیمار آمونیاکی بیشتر از نیترات است (۳۰). بنابراین نتایج تحقیق حاضر و گیاهانی همچون ذرت و آفتابگردان دلالت بر آن دارد که آمونیاک رشد ریشه را بیشتر از بخش هوائی محدود می کند.

اثرات متفاوت نیترات وآمونیوم بررشد، بطور عمده برحسب محلهای تثبیت در گیاه است. بیشترین فعالیت نیترات ردوکتاز دربخش هوائی صورت گرفته و نیترات بطور عمده در برگ احیاء می شـــود (۲۱) و قندهای موجود دربخش هوائی برای تثبیت نیترات بکار رفته و قندهای ریشه بیشتر جهت رشد ریشه مورد استفاده واقع می شوند. بهمین دلیل در تیمار نیترات نسبت وزن بخش هوائی به ریشه کم می شود ولی درتغذیه با آمونیاک، کربوهیدراتهای موجود در ریشه جهت تثبیت آمونیاک مورد استفاده قرار می گیرند، زیرا بعلت خاصیت سمی آمونیاک این ترکیب نمی تواند در ریشه تجمع یابد (٤ و ٦). بهمین دلیل رشد ریشه درتیمار آمونیاکی نسبت به بخش هوائی کمتر می گردد ونسبت وزن بخش هوائی به ریشه افزایش می یابد.

نهایت اینکه در این بررسی مشخص گردید رشد بخش هوائی و ریشه برنج در هوگلند بیشتر از هوگلند آمونیاکی است که افزایـــش رشد بخش هوائی معنی دار نبوده اما افزایش رشـــد ریشه در سطح ۵ ٪ معنـــــی دار است (جدول های ۲و۳). همچنین نسبت وزن تر

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲- اثر نوع ازت بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی برنج رقم طارم

منابع تغییر	وزن‌تربخش هوایی (gr)	وزن‌تر ریشه (gr)	نسبت وزن تربخش هوایی به ریشه	قندمحلول بخش هوایی ($mg.g^{-1}$ dw)	قندمحلول ریشه ($mg.g^{-1}$ dw)	قندنامحلول بخش هوایی ($mg.g^{-1}$dw)	قند نامحلول ریشه ($mg.g^{-1}$dw)	پروتیین بخش هوایی ($mg.g^{-1}$dw)	پروتیین ریشه ($mg.g^{-1}$ dw)	کلروفیل کل ($mg.g^{-1}$ Fw)	نسبت کلروفیل a به b	پرولین بخش هوایی µmol/kgFw	فنل کل بخش هوایی gr/100g.Fw
نوع ازت													
نیترات	۱۵/۰۵٦^{a}	٤/۹^{a}	۳/۰٦۳^{a}	۸/۲۹^{a}	۰/۹^{a}	٤/۰۸^{a}	۳/۱٦^{a}	۱۲/۳^{a}	۸/٤۳^{a}	۰/۷۳۹^{a}	۲/۲۱۷^{a}	۱۲٤/٤٤٦^{a}	۱۹/۲۷^{a}
آمونیوم	۱٤/۲۸^{a}	۳/۱٤^{b}	٤/۱۹^{b}	۷/۳^{b}	۰/٦۱^{b}	۲/۳٦ ^{b}	۱/۸^{b}	۱٤/۱^{b}	۱۰/۹٤^{b}	۲/۰۱٤^{b}	۲/۱۳۷^{a}	۱۷۸/٤۸^{b}	۷/۸۸^{b}

میانگینهای هرستون که دریک حرف مشترک می باشند با آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارد

جدول۳- تجزیه واریانس میانگین مربعات مقادیروزن تر، نسبت وزن تربخش هوایی به ریشه،قندهای محلول، قندها ی نامحلول، پروتئین، کلروفیل کل، نسبت کلروفیل aبهb، پرولین وفنل درگیاه برنج

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن‌تربخ ش هوایی	وزن‌تررِ شه	نسبت وزن تربخش هوایی به ریشه	قندمحلول بخش هوایی	قندمحلو ل ریشه	قندنامحلول بخش هوایی	قند نامحلو ل ریشه	پروتیین بخش هوایی	پروتیین ریشه	کلروفیل کل	نسبت کلروفیل a به b	پرولین بخش هوایی	فنل کل بخش هوایی
ازت	۱	۸۸۹/۲۵^{ns}	۳/۳۳ *	۱/۹۰٤ *	/۰۷۱** ۱۸٦	/۵٦٦** ۱۲	/۵۷٤** ٤٤۲	/۹۹٦* ۱۸	/۲٤۵** ۵۰۸	/۷۹۲ ** ۹۵۱	۹۷۱** ۲٤۳/	۹/٦۰ ^{ns}	۲۳ ** ٤۲۹۵/٦	ns ۱۹٤/٤۸
خطا	٤	۱/۰۵۲	۰/۰۸۵	۰/۳۳۳	۰/۲۷۸	۰/۰۰۰۷	۰/۰۲٤۵	۰/۰۱۲	۰/۱۰۱	۰/۰۹۱	۰/۱۷۹	۰/۲۸۷	۳۵/٤۸	٤۲/۳۵
کل	۵													

میانگینهای هرستون که دریک حرف مشترک می باشند با آزمون LSD تفاوت معنی داری ندارد

Archive of SID
www.SID.ir

جدول٤- همبستگی صفات اندازه گیری شده درتیمار نوع ازت

	وزن تر بخش هوایی	وزن تراریشه	نسبت وزن تربخش هوایی به ریشه	کربوهیدرات محلول بخش هوایی	کربوهیدرا ت محلول بخش ریشه	کربوهیدرات نامحلول بخش هوایی	کربوهیدرات نامحلول بخش ریشه	پروتئین بخش هوایی	پروتئین ریشه	کلروفیل کل	نسبت کلروفیل aبه b	پرولین	فنل
وزن تربخش هوایی	۱	٪٤٩ns	٪٢٦ns	٪١٣ns	٪٥١ns	٪٢٩ns	٪٢٤ns	-٪٣٢ns	-٪٤٧ns	-٪٤٣ns	٪٤٢ns	٪٤٣ns -	-٪٠٦ ns
وزن تراریشه		۱	-٪٧٠ ns	٪٦٣ ns	٪٩٤**	٪٩٢**	٪٧٦ ns	-٪٨٧*	-٪٩٧**	-٪٩٦**	٪٦ ns	٩٢** -٪	٪٧٣ ns
نسبت وزن تربخش هوایی به ریشه			۱	-٪٦٣ ns	-٪٦٤ ns	-٪٨٠ ns	-٪٦٧ ns	+ ٪٧٠ ns	+٪٧٠ ns	+٪٧٢ ns	+٪١٨ ns	ns +٪٦٨	-٪٨٧ ns
کر بوهیدرات محلول بخش هوایی				۱	٪٦٦ ns	٪٦٤ ns	٪٧٤ ns	-٪٥٤ ns	-٪٧٤ ns	-٪٦٤ ns	+٪٤٥ ns	ns -٪٧٤	٪٨٧*
کربوهیدرات محلول ریشه					۱	٪٩٥**	٪٩٠*	-٪٩٥**	-٪٩٨**	٪٩٨** -	٠٪٠٠٢ ns	٩٩** -٪	٪٧٠ ns
کربوهیدرات نامحلول بخش هوایی						۱	٪٨٦*	-٪٩٥**	-٪٩٥**	٪٩٨** -	-٪١٩ ns	٩٦** -٪	٪٧٤ ns
کربوهیدرات نامحلول ریشه							۱	-٪٩٢**	-٪٨٦*	-٪٨٦*	٪٣٤ ns	٩٣** -٪	٪٨٠ ns
پروتیین بخش هوایی								۱	٪٩٠ ns	٪٩٥**	٪١٨ ns	٩٣** ٪	-٪٧٠ ns
پروتیین ریشه									۱	٪٩٨**	-٪١٨ ns	٩٥** ٪	-٪٧٧ ns
کلروفیل کل										۱	٪٧ ns	٩٧** ٪	-٪٧٢ ns
نسبت کلروفیل aبه b											۱	ns -٪٢٠	+٪٢٥ ns
پرولین												۱	-٪٧٦ ns
فنل													۱

ns معنی دارنیست * و **باترتیب درسطح ۵٪ و ۱٪ معنی داراست

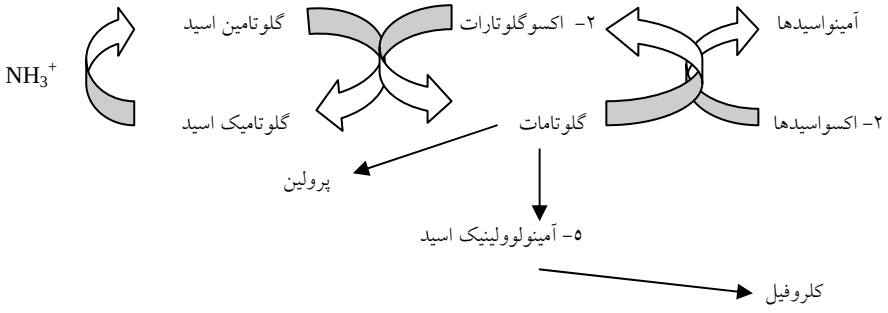
بخش هوائی به ریشه در تیمار هوگلند آمونیاکی در سطح ۵ ٪ افزایش معنی داری نشان می دهد که با یافته های Gozales و همکاران (2001)(۱۷) مطابقت دارد. نتایج مربوط به اندازه گیری مقدار قند محلول در بخش هوائی و ریشه که در جدول ۳ نشان داده شده است، مبین اثر نوع ازت برقند محلول بخش هوائی است که در تیمارهای مختلف در سطح ۱ ٪ معنی دار می باشد. مقدار قند محلول در بخش هوائی و ریشه در محیط کشت نیتراتی نسبت به آمونیاکی بیشتر بوده و تفاوت معنی دار است. در خصوص قندهای نامحلول نیز همین برتری مشاهده گردید (درسطح ۵ ٪). در این ارتباط می توان بیان داشت که چون در گیاهان ازت نیتراتی نسبت به آمونیاکی با سرعت کمتری جذب و تثبیت می شود مورد استفاده قرارگرفتن ازت نیتراتی نسبت به آمونیاکی

Archive of SID
www.SID.ir

موجب آن می شود که کربوهیدرات کمتری در گیاه کاهش یابد (۱۲ و ۳۷). در این ارتباط Chaillou و همکاران (۱۹۹٤)(۱۱) نشان داده اند که در گیاه سویا به هنگام جذب و تثبیت ازت، کربوهیدراتها بعلت مورد استفاده قرارگرفتن در اسکلت کربنی، کاهش می یابند (۱۱).

نتایج مربوط به اندازه گیری پروتئین در جدولهای ۳و۲ نشان داد که در ریشه و بخش هوائی، محیط کشت آمونیاکی نسبت به نیتراتی موجب افزایش معنی دار (در سطح ۱ ٪) مقدار پروتئین می گردد. در این خصوص گزارشهای گوناگونی ارائه شده است که از آن جمله اند، افزایش مقدار آمونیاک در محیط ، بعلت سمیت آن سبب ایجاد شرایط تنش می شود و مقدار پروتئین کل گیاه در مقابله با آن افزایش می یابد که برخی از آنها بعنوان یک عامل عکس العمل کننده فوری اند (۳۱). جذب ازت آمونیاکی نسبت به نیتراتی با صرف انرژی کمتری صورت گرفته و مراحل تبدیل آمونیاک به ترکیبات آمینواسیدی سریعتر و کوتاه تر از نیترات است (۱۰). گزارش دیگری حاکی از آنست که مقدار نیتروژن بخش هوائی در تیمار آمونیاکی بیش از نیتراتی است (۲۸). از سوی دیگر در جدول شماره ٤ مشاهده می شود که بین پروتئین و پرولین همبستگی مثبت وجود دارد. در این خصوص اندازه گیری مقدار پرولین نشان داده بود که در تیمار آمونیاکی نسبت به نیتراتی مقدار پرولین افزایش معنی داری درسطح ۱ ٪ دارد. در این خصوص Givan و همکاران (۱۹۷۹)(۱٦) نشان داده بودند که یکی از شرایط تنش افزایش آمونیاک، سم زدائی آن با تجمع پلی آمینها و پرولین است. در این گزارش آمده است که گلوتامات دهیدروژناز یک آنزیم مهم در سم زدائی آمونیاک است که متناسب با آن فعالیت این آنزیم فزونی پیدا کرده و گلوتامات زیاد می شود و از آنجایکه این ترکیب بعنوان پیش ماده لازم برای ساخته شدن پلی آمینها و پرولین است، افزایش این ترکیبات رخ می دهد (۱٦).

اندازه گیری مقدار کلروفیل کل و کلروفیلهای a و b : از علائم پیری برگ، شکسته شدن کلروپلاستها، تخریب کلروفیل کل و بطور معمول پائین آمدن نسبت کلروفیل a/b است (۳٤). در مراحل ابتدائی آغاز پیری نسبت مذکور افزایش آهسته روبه بالا دارد و در مراحل پیشرفته تر پیری سقوط ناگهانی پیدا می کند (۲۲). مطالعات بر روی گندم نشان داده است که مصرف نیتروژن آمونیاکی سبب پیری زودرس در آن شده و مصرف نیتروژن نیتراتی مانع آن می گردد (۱). نتایج بررسی ما نشان داد (جدول های ۲و۳) که در تیمار آمونیاکی افزایش معنی داری (درسطح ۱٪) در مقدار کلروفیل کل وجود دارد و نسبت کلروفیل a/b در دو تیمار آمونیاکی و نیتراتی معنی دار نیست. در این راستا نشان داده شده است که در گیاه سویا جذب و تثبیت آمونیاک نسبت به نیترات با سرعت بیشتر و صرف انرژی کمتری انجام می شود. از طرف دیگر تبدیل آمونیاکی در چرخه فعالیت گلوتامین سنتاز و گلوتامات سنتاز مطابق روابطی که در زیر آمده است، خیلی سریع می تواند میزان کلروفیل را بالا ببرد (۱۸).



Archive of SID
www.SID.ir

با احتمال قوی می توان بیان داشت که در پژوهش حاضر نیتروژن آمونیاکی موجب افزایش کلروفیل در مرحله خاص رشد برگ برنج رقم طارم (هفته ششم) شده است و شاید در مرحله مسن تر مطابق گزارشی که Loren در سال (۱۹۹٤)(۲۲) درمورد گیاه گندم نتیجه تغییر کرده و کاهش کلروفیل پدید آید. در راستای آن نسبت کلروفیل a/b هم افزایشی پیدا کند که به لحاظ آماری معنی دار باشد.

اثر نوع نیتروژن بر مقدار ترکیبات فنلی: درخصوص ارتباط نوع نیتروژن نیتراتی و آمونیاکی با مقدار نرکیبات فنلی و نقش این ترکیبات در پیری گیاه، گزارشهای گوناگون و حتی مخالف یکدیگر آمده که از آنجمله اند. برخی محققین براین عقیده اند که پلی فنلها بخصوص تاننها به لحاظ آنکه توانائی اتصال به فلزات سنگینی همانند Fe را دارند بعنوان عامل آنتی اکسیدان عمل نموده و مانع از مسمومیت گیاه که ناشی از بالابودن اینگونه فلزات است، می شوند (۲۷)، بعضی دیگر گزارش نموده اند تجمع ترکیبات فنلی زمینه های کاهش جذب آب، جذب یون، فشار تورژسانس وپتانسیل اسمزی را فراهم آورده و موجب کاهش رشد گیاه می شوند (۱۵). در راستای پیری گیاه، (1975) Manoranjan (۲٤) درگیاه برنج گزارش نموده است. با فعالیت پروتئولیزی واکوئلها، آمینواسیدهای حلقوی آزاد شده و زمینه تشکیل سایر ترکیبات فنلی را فراهم می آورند و در نتیجه اینگونه ترکیبات افزایش پیدا می کنند. این افزایش درگیاه جو نیز گزارش شده است (۳٦). محققینی همانند Yang(2002) (۳۹) درگیاه برنج نشان داده اند که افزایش غلظت برخی ترکیبات فنلی سنتز کلروفیل را در گیاه برنج کاهش و حتی متوقف می کند. این محقق اثر متوقف کنندگی این نوع ترکیبات را بطور احتمالی بر آنزیمهائی همچون Mg^{2+}– کلاتاز دانسته است :

پروتوپرفرین (PBG) ← پروتوپرفرین IX ← Mg– پروتوپرفرین ← پروتوکلروفیلید

- محل احتمالی توقف فعالیت آنزیم تحت تأثیر ترکیبات فنلی.

بنابراین با کاهش کلروفیل پیری هم بروز می کند. سالها قبل Sridhar(1972) (۳۳) درگیاه برنج گزارش نموده، درحضور نیتروژن آمونیاکی، ترکیبات پلی فنلی شکسته می شوند و ضمن کاهش اثر سمیت آنها، فعالیت پلی فنل اکسیدازها نیز کاهش می یابد و در نتیجه در اثر کاهش ترکیبات پلی فنلی مقاومت مکانیکی گیاه نیز پائین می آید.

در پژوهشی که ما بر روی برگ برنج (هفته ششم) انجام دادیم، مشخص گردید مقدار ترکیبات فنلی در محیط کشت نیتراتی نسبت به آمونیاکی بیشتر است (منتهی تجزیه واریانس و مقایسه میانگینها نشان داد این تفاوت معنی دار نیست). بنابراین در این مرحله از رشد گیاه، با احتیاط می توان بیان را دخیل دانست (۳۳). زیرا در برگهای هفته ششم نوع ازت بر مقدار کل فنل چندان تأثیر گذار نیست. شاید با پیرشدن برگ، نیتروژن آمونیاکی موجب افزایش ترکیبات فنلی شود.

از جمع بندی برخی نتایج بدست آمده می توان این ایده را مطرح نمود که در مراحل اولیه رشد ونمو برنج رقم طارم استفاده از ترکیبات نیتروژنی آمونیاکی (اضافه کردن اوره به خاک) نه تنها ابزار اصلی مسئول فتوسنتز نظیر کلروفیل را کاهش نمی دهد، بلکه موجب فزونی آنهم شده و در ضمن ترکیبات دیگری نظیر پروتئین و

Archive of SID
www.SID.ir

پرولین را هم افزایش می دهد که این اسید آمینه می تواند در مقابل تنشهائی نظیر کم آبی در برنج مقاومت ایجاد کند. از جانب دیگر در قیاس با گیاهانی که در این مبحث از آنها نام برده شد به احتمال قوی می توان بیان داشت مصرف نیتروژن آمونیاکی بعد از دوران جوانی برنج نباید ادامه پیدا کند و لازمست جای خود را بنوع نیتراتی بدهد. امید است با ادامه و تکمیل این چنین پژوهشهائی بتوان خصوصاً در ارتباط با گیاهان زراعی عمده نظیر برنج برنامه مدون خاصی را از لحاظ نوع کود نیتروژن ارائه نمود تا در امر بهزراعی مؤثر واقع شود.

منابع

۱) امینی راد ، م. وص.فرهی آشتیانی.(۱۳۷۸) . تأثیر کلروکولین کلرید برمیزان فعالیت آنزیم کاتالاز ، کسیداز و اسید فسفاتاز درطی پیرشدن برگ گیاه گندم ، علوم پایه ،ج ۱۲، ص ۱۸-۹

۲) کاظمی اربط ، ح .(۱۳۷٤). زراعت خصوصی ، ج ۱ ، مرکز نشر دانشگاه تهران.

3) Arnon, D.L. (1994). Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. **24**:1-15

4) Aslam, M. (1996). Effect of ammonium on the regulation of nitrate and nitrite transport system in roots of intact barley seedlings. Planta, **200**: 58-63

5) Baligar, V.C.and R.E. Schanffert. (1993). Growth and nutrient uptake parameters in sorghum as influenced by aluminum. Agronomy Journal, **58**:1068-1074

6) Balsevich, M.A., A. Cerda, V. Matinez, and S.H. Lips. (1994).Nitrate and ammonium uptake by wheat seedling as affected by salinity and light.Journal Plant Nut.**17**:839-850

7) Bates, L., S., R.P. Waldren, and I.D. Teare. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, **39**: 205-207

8) Bernardo, L.M., R.B.Clark and J.W Maranville. (1984). Nitrate/ammonium ratio effects on mineral element uptake by sorghum. Journal Plant Nut.**2**:577-589

9) Bloom, A.J., S.S.Sukrapanna, and R.L.Warner. (1992). Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley.Plant Physiol, **99**:1294-1307

10) Botella, M.A., A.Cerda, U. Martinz, and S.H.Lips. (1994). Nitrate and ammonoum uptake by wheat seedling as affected by salinity and light. J. Plant Nut.**17** (5):539-580

11) Chaillou, S., W.James, C.Rideout, J.R.D. Raper, and Jean-Francois Morot-Gaudry. (1994). Responses of soybean to ammonium and nitrate supplied in combination to the whole root system or separately in a split- root system. Physiol. Plant. **90**:250-268

12) Chapin, M.F., and G.F. Kennedy. (1987). Carbohydrate analysis, Lloydia. **22**:111-115

13) Febre F., and C., Planchon. (2000). Nitrogen nutrition yield and Protein content in soybean. Plant. Sci. **125**: 51-58.

14) Fentem, P.A., P.J.Lea and C.R. Strwart. (1983). Ammonium assimilation in the roots of nitrate and ammonium grown *Itordume Vulgare (C.V.Golden promis).*Plant Physiol.**77**: 496-501

15) Gerald, F., L. Booker, U. Blum, and E. L. Fiscus. (1992). Short- term effects of ferulic acid on ion uptake and water relations in cucumber seedlings. J. EXP. Bot. **43**: 649-655.

16) Givan, C.V. (1979).Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. Phytochem.**18**:375-382

17) Gonzalez, K., L. Erdei, and S. Herman. (2001). The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflowers seedlings as affected by salinity and different nitrogen source. Plant Sci. **163**: 923-930

18) Harborne j. B., and Dey P. M., (1997). Plant Biochemistry,. Academic Press, New york. Chapter **7**: 283-286.

19) Haogland. D. R., Arnon, D.I., (1950). The water-Culture method of growing Plants without soil. Calif. Agric. EXP. Stn. Circ., **347**: 1-32.

20) Krikby, E.A. (1987). Plant growth in relation to nitrogen supply. Plant Physiol.**33**:239-267

Archive of SID

www.SID.ir

21) Lewis, O.A.M., M.Cramer and T.Uanderleij. (1990). The influence of nitrogen source on carbon distribution in plants exhibiting the C_3 and C_4 photosynthetic pathway. Ann. Bot. 329-35

22) Lorene, J., and A.Nothnagel. (1994). Photosynthetic light-harvesting during leaf senescence in *Panicum miliaceum* .Plant Sci. **95**: 141-152

23) Lowry O. H., et al (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**: 265-275.

24) Manoranjan, K., and D., Mishra. (1976). Catalase, Peroxidase, and Polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol. **57**: 315-319.

25) Neyra, C.A, and D.H.Hangeman. (1975). Nitrate uptake and induction of nitrate reductase in excised corn roots.Plant Physiol.**56**: 692-695

26) Rice, E.L. (1984). Allelopathy. 2nd ed. Orlando, Florida, USA, Academic press.

27) Rice- Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1996). Structure- antioxidant activity relationships of flavonoid and phenolic acid. Free Radical Biol. Med. **20**: 933-956.

28) Rune, J., F.Zhang, and M.Weng. (2000). Effect of nitrogen form and rhizosphere soil property on *Camellia sinensis* L. Plant and Soil, **223**: 63-71

29) Salsac, L., S.Chaillou, J.F.Morot Gaudry, C.Lesaint,and E.Jolivet. (1987). Nitrate and ammonium nutrition in plant. Plant Physiol Biochem. **25**: 805-812

30) Shelp, P.J. (1987). Plant characteristics and nutrient composition and mobility of *Broccoli (Brassica.oleracea.var.italica)* supplied with NH^+_4, NO^-_3 or NH_4NO_3. Juornal of Experimental Botany. **38**: 1603-1618

31) Singh, N.K., A.K.Handa,P.M.Hasegawa,and R.A.Brassan. (1985). Protein associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. Plant Physiol. **79**: 126-137

32) Singlton,V.L., and JR.JA.Rossi. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungartic reagent. Am. J. Enol. Vitic. **16**: 144-158

33) Sridhar, R. (1972). Influence of nitrogen fertilization and *piricularia oryza* development on some oxidase, their substrates and respiration of rice plants. Acta Phytopatological Academica. Scientiarum Hungarica. **7**(1-3): 57-70

34) Takamiya K-I, et al. (2000). Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? ,. Trends Plant Sci. **5**: 426-431

35) Tatsumi, J. (1982). Growth of crops and transport nitrogen. Growth of crop roots and transport of nitrogen Agricul. Hortical. **57**: 637 – 638

36) Udvardy, J. and M. Horuath. (1964). Role of root system in the regulation of oxidative metabolism in barely leaves. Acta Boil. Acad. Sci. Hunge. **15**: 65 – 75

37) Ulrich, W. R. (1992). Inorganic nitrogen in plants and microorganism uptake and metabolism. Springer. NewYork. **21**: 81 – 93

38) Yamashita, K., K. M. Kasseri, Y. Yoammoto and H. Matsumoto. (1994). Stimulation of plasma membrane H^+ transport activity in barely roots by salt stress soil. Sci. Plant Nut. **40**: 555 – 563

39) Yang, C.M., et al (2002). Effects of three allelopathic Phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*oryza Sativa*) seedling: I. Inhibition of supply- orientation. Bot. Bull. Acad. Sin. **43**: 299-304.

Archive of SID

www.SID.ir

Nitrogen induced Physiological and Biochemical changes in rice (*Oryza sativa* L.cv Tarom)

Haddadchi Gh. R., and Mansouri M.

Biology Dept.,, Faculty of Scince, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources

Abstract

Rice is one of the most important crops in agriculture and it has the highest production in whole world after wheat. Several investigators have worked on nitrogen nutrition in rice especially on ammonium and nitrate nutrition. The metabolic pathways and assimilation of ammonium and nitrate is not similar in plants and under some circumstances may lead to senescence. In this research, Effects of ammonium and nitrate nutrition on senescence of rice was investigated. Our data indicated that nitrate treatment induced the higher growth of shoots and roots. The shoot/ root ratio increased in ammonium fed plants that indicated higher inhibition of root growth in compare to shoot. The soluble and non- soluable carbohydrates content increased signifcantly in nitrate fed plants in compare to ammonium fed ones in both roots and shoots. The chlorophyll concentration was significantly higher in ammonium treatment in compare to nitrate ones. However, the chlorophyll a/b ratio did not changed significantly. The protein content increased significantly in ammonium fed plants in compare to nitrate fed ones in both roots and shoots. Also the proline concentration was significantly higher in ammonium fed plants than in nitrate ones. On the contrary, total phenolics concentration increased in nitrate treatment but not in ammonium ones. Howere, the increase in phenolics was no statistically significant in nitrate– fed plants as compared with the ammonium– fed plants.

Keywords: Rice; Nitrate; Ammonium

Archive of SID

www.SID.ir