

## تأثیر شوری بر اتیوپلاست و غشاهای داخلی آن

محمد رضا امیرجانی\*

اراک، دانشگاه اراک، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۱۶

## چکیده

قطعات برگ گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) که ۸ روز در تاریکی رشد کرده بودند در معرض تنش شوری (۶۰۰ میلی مولار) قرار گرفتند. آرایش طبیعی رنگدانه‌ها و نیز فراساختمان پلاستیدها با استفاده از اسپکتروفلورومتري در دمای پایین و میکروسکپی الکترونی گذاره مورد بررسی قرار گرفتند. پلاستیدهای برگهای گیاهان تیمار شده با نمک دارای پیش‌تیلاکوئیدها و اجسام پیش تیغه‌ای متورم اما منظم بودند. همچنین کاهش مختصری در فرم کوتاه موج پروتوکرووفیلید با قله نشری ۶۳۳ نانومتر مشاهده شد. با این حال تأثیر عمده‌ای در فرم بلند موج پروتوکرووفیلید با قله نشری ۶۵۶ نانومتر دیده نشد. بعد از تابانیدن نور تیلاکوئیدهای تازه تشکیل شده متورم به صورت متقاطع در استروما مشاهده شدند. از پراکنندگی جسم پیش تیغه‌ای تا حدودی کاسته شده و ساختارهای الکترون - چگالی تشکیل شده بود که بعد از ۸ ساعت روشنایی نیز باقی ماند. تفاوت در قله نشری کلروفیل در برگهای تحت تیمار شوری (۶۸۱ نانومتر) و شاهد (۶۸۳ نانومتر) محدودیت در تشکیل دستگاه فتوسنتزی را نشان داد. تولید کلی کلروفیل در روشنایی محدود شده بود. برگهای تحت تیمار شوری که بعد از ۳ ساعت روشنایی دوباره به تاریکی منتقل شدند در مقایسه با شاهد بازتشکیل پروتوکرووفیلید و جسم پیش تیغه‌ای کمتری داشتند. اما اندازه ساختارهای الکترون - چگال افزایش نشان می‌داد. در این پژوهش متورم شدن پیش‌تیلاکوئیدها و آرایش عرضی تیغه‌های استرومایی تحت تأثیر شوری گزارش شده است. هر چند بعد از تنش شوری در تاریکی اجسام پیش تیغه‌ای و طیف نشری پروتوکرووفیلید تغییری نکرده بودند، نمو پلاستید به کلروپلاست در روشنایی به شدت محدود شده بود.

واژه‌های کلیدی: گندم، شوری، اتیوپلاست، طیف نشری فلورسنس، پروتوکرووفیلید

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۶۱-۴۱۷۳۴۰۶، پست الکترونیکی: m-amirjani@araku.ac.ir

## مقدمه

شوری زیاد یکی از مشکلات اساسی کشاورزی در بسیاری از نقاط جهان است و بیش از نیمی از سیستمهای آبیاری در جهان تحت تأثیر شوری قرار دارند (۴۷ و ۵۳). غلظت زیاد نمک باعث عدم توازن یون و تنش اسمزی در گیاهان می‌شود و اغلب منجر به واکنشهای تنش ثانویه مانند تنش اکسیداتیو (۵۳) می‌شود. تجمع بیش از حد یونهای  $\text{Na}^+$  و  $\text{Cl}^-$  منجر به عدم تعادل یونی می‌شود که به نوبه خود باعث کاهش جذب مواد معدنی دیگر، مانند  $\text{K}^+$ ،  $\text{Ca}^{2+}$  و  $\text{Mn}^{2+}$  می‌گردد (۳۱). یکی از جنبه‌های مهم تحمل نمک تجمع املاح مختلف در سیتوپلاسم برای ایجاد توازن اسمزی بین

گیاهان در محیط زندگی خود تحت تأثیر تنشهای مختلفی از قبیل شوری، خشکی، صدمات بافتی (زخم)، گاز اوزن، اشعه ماوراء بنفش و غیره هستند. تنش شوری یکی از مهم ترین عوامل محیطی در کاهش تولید محصولات گیاهی است (۴۸). این امر به دلیل اثر شوری بر فیزیولوژی، رشد و تکامل گیاه می‌باشد. به هر حال تجمع نمک در گیاه وابسته است به مدت زمان و مکان کشت گیاه (۴۴) که به نوبه خود وابسته به نوع خاک، کیفیت آب، روش آبیاری و شرایط آب و هوایی منطقه می‌باشد (۱۱).

برعکس، به نظر می‌رسد فرم کوتاه موج پروتوکلروفیلید در پیش‌تیلاکوئیدها (prothylakoid, PT) متمرکز هستند (۱۰) اما ممکن است در پوشش کلروپلاست نیز یافت شوند (۸).

قله طیف نشری کلروفیلید تازه تشکیل شده از ۶۹۴ ن م به ۶۸۰ ن م تغییر مکان می‌دهد (جا به جایی شیباتا، Shibata shift). جا به جایی شیباتا به عوامل مختلفی از جمله سن برگ و دما بستگی دارد (۲۰، ۲۱ و ۴۳). به موازات جا به جایی شیباتا کلروفیلید تشکیل شده به رنگدانه استری، کلروفیل a و کلروفیل b، تبدیل می‌شود (۳۹).

غشای درونی اتیوپلاست دارای دو سیستم ساختاری مختلف است که عبارتند از جسم پیش تیغه‌ای و پیش‌تیلاکوئید. جسم پیش تیغه‌ای: جسم پیش تیغه‌ای از لوله‌های غشایی متصل به هم، بسیار منظم و سه بعدی ساخته شده است و پیش‌تیلاکوئیدها: غشاهایی هستند که از پوشش پلاستید منشأ گرفته‌اند (۳۸).

پرولامار بادی ساختاری کم و بیش کروی با قطر حدود ۱ میکرومتر است که حدود ۹۰ درصد پروتئینهای موجود در آن را آنزیم POR تشکیل داده است (۳۹). واحد ساختاری جسم پیش تیغه‌ای یک چهار وجهی متقارن بلور مانند است (۵۱). ساختارهای غشایی دو لایه تشکیل دهنده واحدهای چهار وجهی در سرتاسر جسم پیش تیغه‌ای ادامه دارد و روزن آن را از استرومای اتیوپلاست جدا می‌کند (۴۲). در اطراف ساختار منظم پرولامار بادی ساختارهای غشایی مسطحی یافت می‌شوند که به اطراف پراکنده شده‌اند. این ساختارها پیش‌تیلاکوئید نامیده می‌شوند. پیش‌تیلاکوئیدها و تیلاکوئیدهای جدا شده مانند غشاهای معمولی رفتار می‌کنند و با توجه به پتانسیل اسمزی محیط جداسازی می‌توانند کم و بیش متورم شوند در حالی که اجسام پیش تیغه‌ای قادر به عکس‌العمل به صورت تورم نیستند (۳۶).

یونهای انباشته شده در واکوئول است (۲۴). گیاهان نابردبار معمولاً توانایی این عمل را ندارند و فرآیندهای متابولیک آنها به دلیل عدم توازن یونی و واکنشهای تنش آب مختل می‌شود (۴۰). با توجه به کلروز گیاهان رشد کرده در شرایط شوری بالا (۱۶) تجمع کلروفیل در برگهای رشد یافته در تاریکی بعد از تابانیدن نور، فرآیند مناسبی برای مطالعه اثرات متابولیک تنش شوری است. به علاوه اختلالات متابولیک کمک شایانی است به روشن شدن سازوکار تنظیم تمایز کلروپلاست (۱).

نهان‌دنگان رشد یافته در تاریکی توان تولید کلروفیل را ندارند. این گیاهان در عوض دارای مقادیر زیادی پروتوکلروفیلید (Pchl) هستند که توسط آنزیم نور-فعال پروتوکلروفیلید اکسیدو ردکتاز (POR, EC. 1.3.1.33) به کلروفیلید (Chl) تبدیل می‌شود. کلروفیلید سپس استری شده و کلروفیل را تشکیل می‌دهد. البته در نور مداوم میزان کلروفیل تا حدود صد برابر افزایش می‌یابد. تولید پروتوکلروفیلید در گیاهان رشد یافته در تاریکی به دلیل برهم کنشهای مولکولی ناهمگن بوده، دارای فرمهای مختلف طیفی است (۴، ۵ و ۶). ضمن رشد و نمو گیاه میزان پروتوکلروفیلید برگ افزایش می‌یابد و تناسب فرمهای مختلف آن تغییر می‌کند (۶). قله نشری فلورسنس فرم کوتاه موج پروتوکلروفیلید در محدوده ۶۳۱-۶۴۳ نانومتر (ن م) قرار دارد. این فرم با روشنایی ممتد می‌تواند به کلروفیلید تبدیل شود. قله نشری فلورسنس فرم بلند موج پروتوکلروفیلید در حدود ۶۵۶ ن م واقع است که می‌تواند با فلاش نور در مقیاس زمانی میلی ثانیه به کلروفیلید تبدیل می‌گردد. تنش شوری می‌تواند بر تجمع پروتوکلروفیلید و تشکیل فرمهای مختلف آن نیز موثر باشد.

فرم بلند موج پروتوکلروفیلید مجموعه‌ای بزرگ از گروههای سه تایی تشکیل شده از NADPH، پروتوکلروفیلید و POR است که در جسم پیش تیغه‌ای (prolamellar body, PLB) قرار دارند (۱۰ و ۳۷).

به عنوان یک مشخصه قابل استفاده در ایجاد تحمل شوری در همه انواع گیاهان باشد (۱۱).

گیاهان از مسیرهای فیزیولوژیک مختلفی برای مقابله در برابر تنشها استفاده می‌نمایند. تا کنون حداقل ۴ مسیر فیزیولوژیک برای مقابله با تنش خشکی در گیاهان شناخته شده است (۱۴). فرمهای مختلف تنش ممکن است عوامل مشابهی را فعال نمایند که از میان آنها می‌توان به پروتئینهای درگیر در مسیر فیزیولوژیک تنش خشکی اشاره کرد. پروتئینها پلیمرهای زیستی هستند که در مسیرهای فیزیولوژیک متنوعی در گیاهان دخالت دارند (۲۷). برگی حضور پروتئینهای دفاعی را در صدمات بافتی گیاه گزارش کرده است (۹). از طرف دیگر گزارشهای متنوعی در رابطه با تغییر در بیان ژنهای مختلف در رابطه با انواع تنشها وجود دارد (۱۴). هرگونه تغییر در بیان یک ژن مستقیماً در میزان پلی پپتد حاصل از آن ژن تأثیر خواهد گذاشت و از آنجا که پروتئینها در فعالیتهای متفاوت از قبیل تشکیل کانالهای مختلف، آنزیمها و غیره در یک سلول نقش دارند لذا این تغییرات باعث تغییر در پروفیل پروتئینی یک سلول و در نهایت یک گیاه خواهد شد. تیمار بذرهاي گندم با نمک در یک پروسه زمانی خاص در مراحل جوانه زنی این بذر نقش دارد. دلاکوالی به تغییر در پروفیل پلی پپتیدی / پروتئینی بذر گیاه گندم در رابطه با تنش اسمزی و تأثیر شوری در سنتز پروتئینها در گندم اشاره می‌کند (۱۲) و (۱۳). باید توجه داشت که از طرفی تأثیر شوری بر پروفیل پلی پپتیدی / پروتئینی در گونه‌های مختلف بذر گندم متفاوت و از طرف دیگر وابسته به مدت زمان تیمار می‌باشد.

### مواد و روشها

**کشت گیاه:** بذرهاي گیاهان گندم (رقم شهریار، مرکز تحقیقات کشاورزی، جهاد کشاورزی، اراک) به مدت ۶ ساعت در ظروف شیشه‌ای و در آب شهری خیس شدند. سپس بذرهاي خیس خورده روی توریهای فلزی استیل

با دادن روشنایی به گیاهان رشد یافته در تاریکی، اجسام پیش تیغه‌ای در ظرف یک تا دو ساعت در پلاستید پراکنده و به سرعت ناپدید می‌شوند (۳۲). در عین حال طول پیش‌تیلاکوئیدها افزایش می‌یابد. بخشهایی از جسم پیش تیغه‌ای به پیش‌تیلاکوئید تبدیل می‌شوند. این پیش‌تیلاکوئیدها به تدریج به غشاهای تیلاکوئیدی غیر مجتمع (non-stacked) یا مجتمع (stacked) که از نظر فتوسنتزی فعالند تغییر شکل می‌دهند. با این حال، هنگامی که گیاهان نور دیده دارای کلروپلاست نا بالغ در محیط تاریک یا با شدت کم نور نگهداری شوند جسم پیش تیغه‌ای دوباره تشکیل می‌شود. این امر تأثیر جسم پیش تیغه‌ای در تمایز کلروپلاست را نشان می‌دهد (۴۵).

در این پژوهش تأثیر تنش شوری در تشکیل رنگدانه با مطالعه فراساختار اتیوپلاست در گیاهان رشد یافته در تاریکی، نمو پلاستیدها در نور و تشکیل اتیوپلاست و کلروپلاست در گیاهانی که پس از زمان کوتاهی روشنایی دوباره به تاریکی منتقل شدند مورد بررسی قرار گرفته است. در نمونه‌های مورد مطالعه خصوصیات طیف نوری فلورنس رنگدانه‌های مختلف اتیوپلاست و کلروپلاست در حال تمایز نیز بررسی شده‌اند.

یکی از پاسخهای متابولیکی به تنش نمکی، تجمع اسمولیتها (از جمله پرولین و قندها) می‌باشد که در تنظیم اسمولالیه، محافظت از ساختار ارگانل‌های داخل سلولی و جلوگیری از صدمات حاصل از فعالیتهای اکسیداتیو تنش فعالیت دارند (۲، ۲۸، ۴۹). از طرف دیگر تعدادی پروتئین القایی توسط تنش شوری در گیاهان شناسایی شده‌اند (۷) که می‌توانند به عنوان یک مشخصه ملکولی برای بهبود قدرت تحمل گیاه نسبت به شوری توسط تکنیکهای مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گیرند (۲). البته این پروتئینها از طرفی وابسته به گونه گیاه مورد نظر هستند و از طرف دیگر کاهش تولید یا تولید یک پروتئین نمی‌تواند

به مدت ۱۵ دقیقه در بافر فسفات - سدیم (pH= ۷/۲) ۷۰ میلی مولار شستشو شدند. نمونه‌ها دوباره به مدت ۲ ساعت در محلول ۱ درصد تتراکسید اسمیوم (osmium tetroxide) در بافر فسفات - سدیم (pH= ۷/۲) ۷۰ میلی مولار تثبیت شدند. نمونه‌های تثبیت شده، سه بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با همان بافر فسفات شسته شدند. نمونه‌ها در سری غلظتی اتانول آبیگری شده در اکسید پروپیلن قرار گرفتند و سپس در رزین Durcupan ACM (Durcupan (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) قرار داده شدند. برشهای بسیار نازک (۷۰ نانومتر) به دست آمده توسط اولترامیکروتوم (Reichert Jung AG, Vienna, Austria) روی گرید سوار شدند. برشهای بسیار نازک سپس به وسیله استات یورانیل و سیترات سرب رینولد رنگ آمیزی شدند. این نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی گذاره Hitachi 7100 (Hitachi, Tokyo, Japan) در ولتاژ ۷۵ ولت مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- درصد مناطق اشغال شده از سطح برش پلاستید توسط جسم پیش تیغی و پیش تیلاکوئید.

تیمار	پلاستید	جسم پیش تیغی	پروتیلاکوئید	پیش تیلاکوئید	جسم پیش تیغی
	نسبت محوری	نسبت حجمی	نسبت حجمی	متورم	الکترون - چگال
تاریکی	۲±۰/۵	۲۰/۷±۷/۸	۴±۱/۸	-	-
شوری و تاریکی	۱/۶±۰/۴	۲۱/۹±۸/۵	۳/۵±۱/۵	۱۰±۵/۱	-
۳ ساعت نور	۱/۷±۰/۴	-	۷/۱±۳/۱	-	-
شوری و ۳ ساعت نور	۱/۲±۰/۱	۹/۲±۳/۸	۲/۵±۱/۲	۸/۶±۳/۶	۳/۲±۳/۴
۸ ساعت نور	۲/۴±۰/۷	-	۱۰/۰±۴/۱	۴/۴±۳/۰	-
شوری و ۸ ساعت نور	۱/۲±۰/۳	۹/۶±۷/۷	۵/۴±۲/۵	۱۸/۵±۷/۱	۳/۹±۲/۲
۳ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی	۱/۶±۰/۳	۱۱/۳±۴/۸	۷/۰±۳/۵	-	-
شوری، ۳ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی	۱/۳±۰/۲	۸/۶±۵/۹	۵/۰±۲/۳	۱۷/۹±۷/۶	۵/۵±۴/۷
شوری، ۳ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی و بازگشت به محیط غذایی	۱/۳±۰/۴	۱۴/۵±۸/۳	۵/۶±۳/۹	۱۰/۴±۶/۳	-

32 مورد تصحیح قرار گرفتند. قطر منافذ تابش و سنسجش نور به اندازه ۴ نانومتر تنظیم شده بودند. طول موج برانگیختگی برای ثبت طیف فلورسانس ۴۴۰ نانومتر انتخاب شد. نمونه‌های مورد استفاده متشکل از حداقل سه برگ بودند که در لوله‌های شیشه‌ای کوچکی قرار داده شدند. نمونه‌ها سپس در نیتروژن مایع قرار گرفتند.

قرار گرفتند که در دهانه ظرف پلاستیکی با ابعاد ۷×۱۰×۲۲ سانتیمتر ثابت شده بود. ظرف پلاستیکی به وسیله محلول غذایی هوگلند (۲۳) پر می‌شد. بذرها به مدت ۷ روز در محیط هوگلند، در دمای معمولی اتاق و در اتاقک رشد در تاریکی و یا نور سفید ممتد با شدت  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Osram, L20 W/30S) رشد داده شدند.

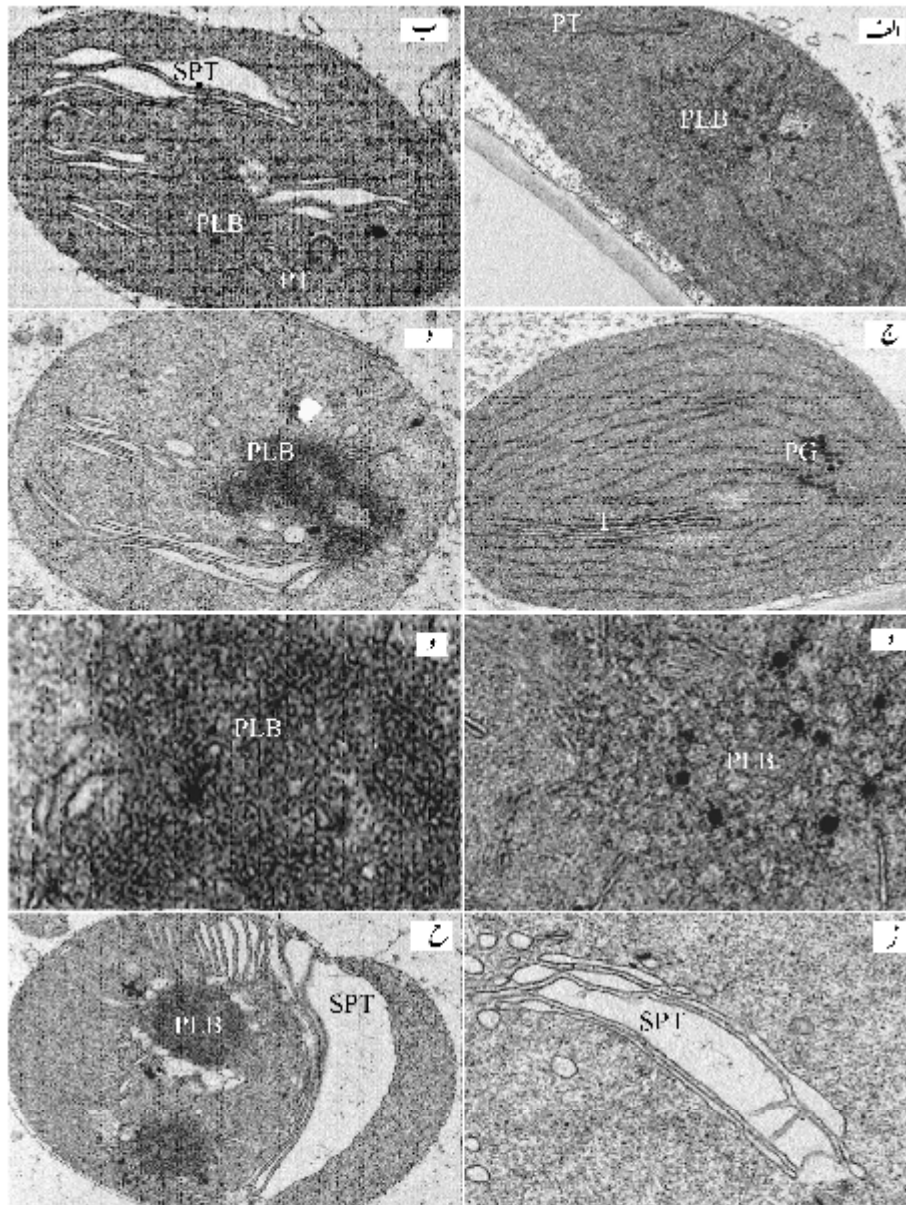
**تیمار نمک:** محیط تنش با افزودن NaCl و KCl به نسبت مولی مساوی به محلول هوگلند تشکیل شد. بذرها در محیط هوگلند فاقد نمک اضافی، به عنوان شاهد، و دارای ۶۰۰ میکرومول نمک اضافی، به عنوان نمونه آزمایش، کشت شدند. نمک در روز دوم بعد از جوانه زنی به محیط اضافه شد.

**میکروسکوپی الکترونی گذاره:** قطعات بزرگی (۱ × ۱ میلی‌متر) به مدت ۳ ساعت در گلو تارالدئید ۲/۵ درصد و درجه حرارت اتاق تثبیت شدند. نمونه‌ها سه بار و هر بار

**اسپکتروسکوپی فلورسانس:** طیف فلورسانس نمونه‌ها *in vivo* و در دمای پایین، ۱۹۶- درجه سانتی گراد، ثبت شد. این طیفها به وسیله اسپکتروفلورومتر فلورولوگ ۳ تاو (Fluorolog 3 tau, Spex Instrument S.A Inc NJ, USA) ثبت شدند. طیفهای فلورسانس برای حذف تفاوت حساسیت فتومولتی پلایر با استفاده از نرم افزار GRAM

بزرگی نسبی پیکهای پرتوکلروفیلید و کلروفیلید میانگین فلورسانس حاصل از برگها بود. نتایج مورد استفاده در این تحقیق میانگین حداقل ۵ تکرار در هر آزمایش بود. وجود تفاوت در نتایج حاصل با روش آنالیز واریانس (ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت.

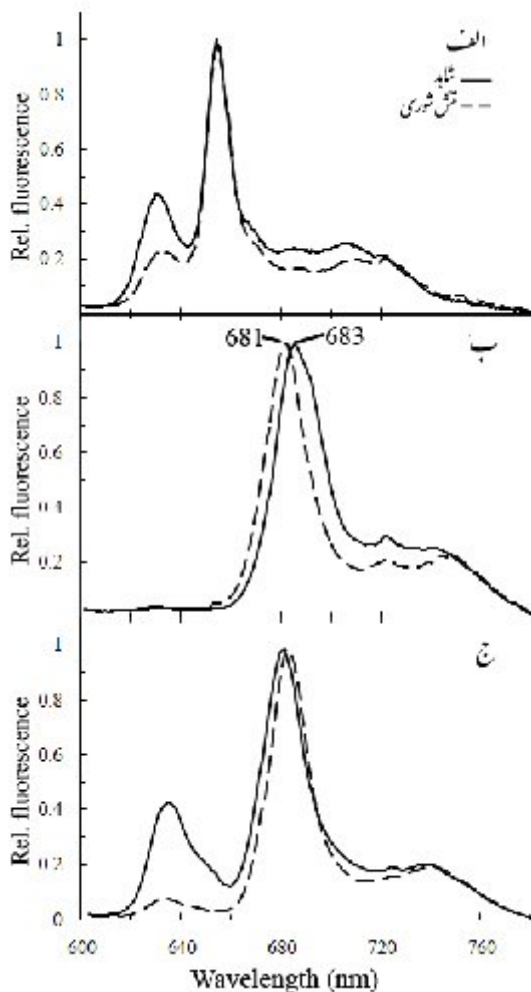
اطلاعات حاصل از فلورومتر به یک دستگاه کامپیوتر مجهز به نرم افزار GRAM 32 منتقل شدند (Galactic Industries Corporation Salem NH, USA).



شکل ۱- میکروگراف الکترونی پلاستیدهای برگ گندم رشد یافته تحت تنش زیاد نمک در تاریکی و یا بعد از آنکه در معرض نور قرار گرفتند. برگهای شناور به مدت ۴/۵ ساعت در تاریکی و در مواد غذایی فاقد (الف) و یا دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی (ب). برگهای شناور در مواد غذایی فاقد (ج) و یا دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی (د). برگها بعد از آنکه به مدت ۱/۵ ساعت در تاریکی قرار داشتند، به مدت ۳ ساعت در روشنایی قرار گرفتند. پرولاملار بادی تشکیل شده در پلاستید برگهای شناور در مواد غذایی فاقد (ه) و یا دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی (و). پیش تیلاکوئید متورم و تیغه‌های استرومایی درون آن (ز). عدم تأثیر شوری بر پرولاملار بادی به رغم تورم پیش تیلاکوئیدها (ح). تمام مراحل تیمار و نوردهی با روش مشابه انجام شد. PLB، جسم پیش تیغه‌ای؛ PT، پیش تیلاکوئید؛ SPT، پیش تیلاکوئید متورم؛ PG، پلاستوگلوبولی.

## نتایج

اثر تنش شوری بر طیف نشری فلورسانس گیاهان رشد یافته در تاریکی: طیف فلورسانس قطعات برگ‌گی در شرایط *in vivo* و در دمای پایین، ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد، ثبت شد. طیف نشر فلورسانس برگهای تیمار نمک در ۶۳۳ ن م که مربوط به پروتوکلروفیلید با نورفعال است نسبت به برگهای تیمار نشده کاهش یافته بود اما قله نشری و نیز قله اصلی طیف تغییری را نشان ندادند (شکل ۲- الف).



شکل ۲- الف) طیف انتشار برگ گیاهان رشد یافته در تاریکی و در محلول غذایی فاقد و یا دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی در درجه حرارت پایین (۱۹۶-درجه سانتی‌گراد). طول موج برانگیختگی ۴۴۰ نانومتر بود و طیفها در نقطه بیشینه نرمالایز شده‌اند. ب) طیف انتشار برگ گیاهان رشد یافته در تاریکی و در محلول غذایی فاقد و یا دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی بعد از ۳ ساعت روشنایی در درجه حرارت پایین (۱۹۶-درجه سانتی‌گراد). طول موج برانگیختگی ۴۴۰

اثر تنش شوری بر فراساختار پلاستیدها در گیاهان رشد یافته در تاریکی: از برگهایی که به مدت ۵ ساعت در تاریکی و در محلول غذایی هورگلد فاقد یا دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی شناور بودند به منظور بررسی با میکروسکوپ الکترونی نمونه برداری شد. میکروگرافهای الکترونی مورد بررسی مورفومتریک قرار گرفتند. بخشی از پلاستید که به وسیله جسم پیش تیغه‌ای اشغال شده بود در هر دو نمونه مشابه بود. در صد اشغال شده به وسیله جسم پیش تیغه‌ای در برگهای شناور در محلول غذایی فاقد و دارای نمک اضافی به ترتیب ۲۰/۷ درصد و ۲۱/۹ درصد بود (جدول ۱). با این حال فراساختار اتیوپلاست نمونه‌ها تفاوت آشکاری داشتند (شکل ۱- الف و ب). پیش‌تیلاکوئیدهای برگهای تیمار شده در محلول غذایی هورگلد فاقد نمک اضافی شکل عادی خود را حفظ کرده بودند (شکل ۱- الف). در نمونه تیمار شده با نمک اضافی (شکل ۱- ب) روزن پیش‌تیلاکوئیدها گسترش یافته بود و فضای شفاف را بین دو غشاء ایجاد کرده بود. در این حالت پیش‌تیلاکوئیدها ظاهری متورم داشتند. بخش اشغال شده پلاستید توسط پیش‌تیلاکوئیدهای متورم ۱۰ درصد بود (جدول ۱).

اجسام پیش تیغه‌ای در هر دو موقعیت فوق‌الذکر فراساختار خود را دست نخورده حفظ کرده بودند و هیچ تورمی در هیچ بخشی از آنها رخ نداده بود. این نکته قابل توجه است که حتی زمانی که پیش‌تیلاکوئیدهای بین دو جسم پیش تیغه‌ای متورم شده بودند هیچ کدام از دو جسم پیش تیغه‌ای متورم نشده بودند (شکل ۱- ه، و و ح). منطقه متورم می‌تواند تا ساختار جسم پیش تیغه‌ای ادامه یابد بدون اینکه واحدهای چهار وجهی آن را تحت تأثیر قرار دهد (شکل ۱- ح). علاوه بر این، پوشش اتیوپلاست بدون هر گونه اثری از متورم شدن و بدون تغییر باقی مانده است (شکل ۱).

نشده (شاهد) عدسی شکل و با نسبت محوری ۱/۷ بودند. طیف نشر فلورسنس برگهای تحت تیمار نمک دارای قله‌ای در ۶۸۱ ن م بود در حالی که قله طیف نشر فلورسنس برگهای تیمار نشده در ۶۸۳ ن م واقع بود (شکل ۲-ب).

به منظور پاسخ به این سؤال که آیا نتایج فوق‌الذکر نمایانگر مرحله‌هایی نمو پلاستید در برگهای تحت تنش نیز می‌باشد نمونه‌هایی از برگهای تحت تیمار نمک پس از ۸ ساعت روشنایی جمع‌آوری و بررسی شدند (شکل ۳). پلاستیدهای برگهای تیمار نشده دارای تیلاکوئیدهایی کاملاً نمو یافته بودند و شروع تشکیل گرانا در آنها مشهود بود (شکل ۳ - الف؛ جدول ۱). پلاستیدهای تحت تنش نمک حتی بعد از ۸ ساعت روشنایی دارای بقایایی از جسم پیش تیغی‌ای در قالب سازه‌های الکترون-چگال بودند (شکل ۳-ب؛ جدول ۱). در تعدادی از برشها اجسام پیش تیغی‌ای در مرحله پراکنده شدن به صورت حفره‌ها و در برخی از برشها نیز بقایای جسم پیش تیغی‌ای به صورت سازه‌های منظم و الکترون-چگال قابل مشاهده بود (شکل ۳). پلاستیدها دارای تیلاکوئیدهای بیشتری نسبت به زمانی بودند که تنها ۳ ساعت در معرض نور قرار داشتند (جدول ۱) و بسیاری از آنها به شدت متورم بودند. فاصله بین غشاهای تیلاکوئید پس از نوردهی طولانی تحت تنش نمک وسیع‌تر شده بودند. تعدادی گویچه اسمیوفیل قابل مشاهده بود اما تشکیل گرانا و بذره‌ای نشاسته دیده نشد. شایان ذکر است که تفاوت شکل پلاستیدهای تحت تیمار تنش و شاهد در مقایسه با پلاستیدهایی که ۳ ساعت در معرض نور بودند افزایش یافته بود. پلاستیدهای تحت تنش تقریباً کروی (نسبت محوری = ۱/۲) اما پلاستیدهای تیمار نشده عدسی مانند (نسبت محوری = ۲/۴) بودند (جدول ۱).

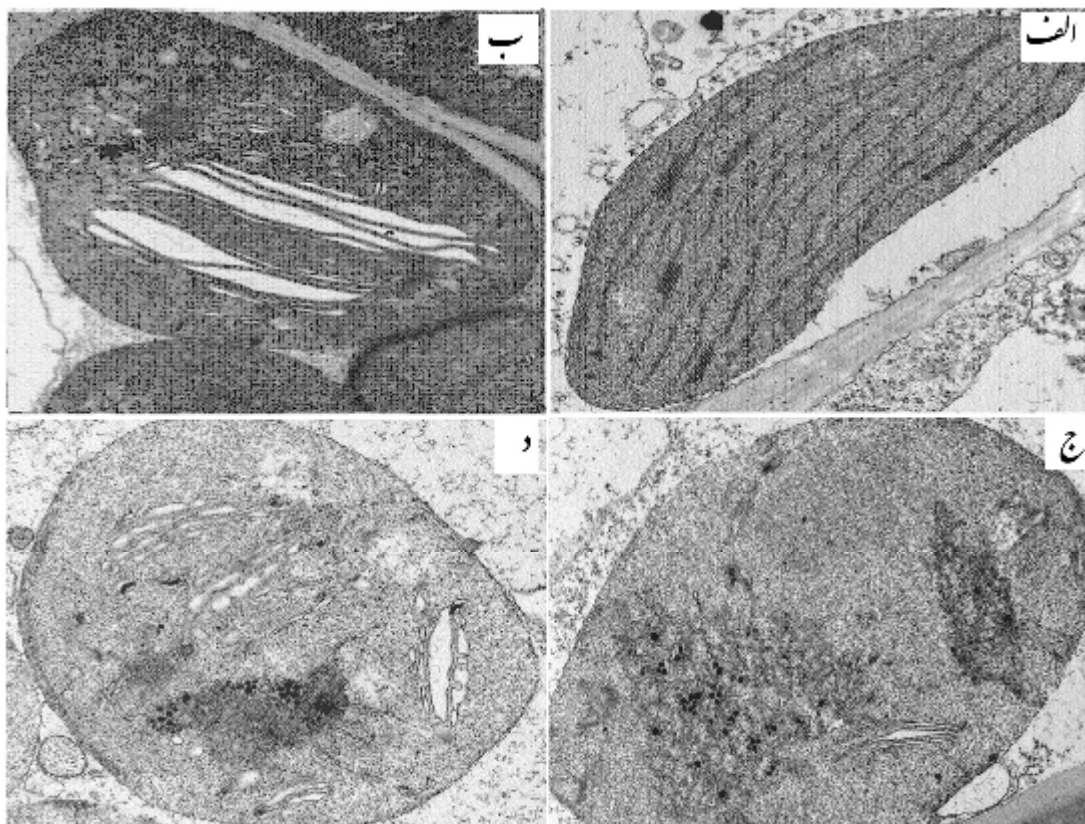
**بازتشکیل جسم پیش تیغی‌ای در پلاستیدهای ترمیم شده از تیمار شوری در تاریکی:** برای پی بردن به تأثیر تیمار

نانومتر بود و طیفها در نقطه بیشینه نرمالایز شده‌اند. ج) طیف انتشار نشان دهنده باز تشکیل پروتوکروئید در گیاهان برگردانده شده به تاریکی. برگها بعد از آنکه به مدت ۱/۵ ساعت در تاریکی قرار داشتند، به مدت ۸ ساعت در روشنایی قرار گرفتند و سپس برای ۱۲ ساعت دوباره به تاریکی برگردانده شدند. طیف انتشار برگ گیاهان رشد یافته در محلول غذایی فاقد و یا دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی و شرایط نوری فوق‌الذکر در درجه حرارت پایین (۱۹۶- درجه سانتی گراد). طول موج برانگیختگی ۴۴۰ نانومتر بود و طیفها در نقطه بیشینه نرمالایز شده‌اند

**تغییر فراساختار در پلاستیدهای تحت تنش نمک در ضمن نوردهی:** اجسام پیش تیغی‌ای در پلاستیدهای مربوط به برگهای شناور در محلول غذایی فاقد نمک اضافی پس از ۳ ساعت نوردهی کاملاً پراکنده شدند (شکل ۱ج؛ جدول ۱). همچنین تعداد زیادی غشاهای تیلاکوئیدی غیر مجتمع در کلروپلاست مشاهده شدند. در مقابل، پلاستیدهای مربوط به برگهای شناور در محلول غذایی دارای نمک اضافی پراکنده‌گی ناقصی از اجسام پیش تیغی‌ای را نشان دادند و تیلاکوئیدها به صورت طبیعی تشکیل نشده بود (شکل ۱-د؛ جدول ۱). اجسام پیش تیغی‌ای هنوز دارای مناطق متراکم و الکترون - چگال بوده و ۹/۲ درصد از سطح مورد برش پلاستید را اشغال کرده بودند. این مناطق تیره ۳/۲ پلاستیدها را اشغال کرده بود. خیلی از اتیوپلاستها در مرکز اجسام پیش تیغی‌ای تغییر شکل یافته دارای مناطق کم تراکم‌تر و کمترالکترون - چگال بودند که توسط ساختار متراکم‌تری احاطه شده بود (شکل ۱-د). منطقه مرکزی دارای سازه‌های حفره مانند بودند که نشان می‌داد تغییر شکل در لوله‌ها رخ داده است. مناطق متراکم و الکترون - چگال دارای ساختاری بی نظم بودند و گاهی لوله‌های اجسام پیش تیغی‌ای قابل تشخیص بود (شکل ۱د). این پیش تیلاکوئیدها / تیلاکوئیدها اغلب متورم بودند و گاهی تیغی‌های استرومایی قابل تشخیص بود که از روزن تیلاکوئیدهای متورم عبور می‌کردند (شکل اب و ز). پلاستیدهای تحت تنش نمک مدور و با نسبت محوری (طول به عرض) ۱/۲ بودند (جدول ۱). پلاستیدهای تیمار

پروتوکلروفیلاید بسیار کاهش یافته بود (شکل ۲-ج). به منظور روشن کردن ارتباط بین تنش نمک و کاهش فرم ۶۳۳ نانومتری پروتوکلروفیلاید برگهای تیمارشده با نمک که به مدت ۳ ساعت در معرض نور قرار داشتند به مدت ۱۲ ساعت به محلول غذایی فاقد نمک اضافی و تاریکی منتقل شدند. طیف نشری این برگها دارای هر دو باند ۶۳۳ ن م و ۶۵۶ ن م بود (شکل ۲-ج) و پلاستیدها فاقد پیش‌تیلاکوئیدهای متورم بودند (شکل ۳-ج).

نمک بر بازتشکیل جسم پیش‌تیغه‌ای و فرمهای مختلف پروتوکلروفیلاید برگهای تیمارشده با نمک و برگهای تیمار نشده را که به مدت ۳ ساعت در معرض نور قرار داشتند به مدت ۱۲ ساعت به تاریکی منتقل شدند. برگها در طول آزمایش در محلول غذایی فاقد و یا دارای نمک اضافی شناور بودند. در طیف نشری برگهای شناور در محلول غذایی فاقد نمک اضافی هر دو باند ۶۳۳ و ۶۵۶ ن م قابل تشخیص بودند. اما در طیف نشری برگهای شناور در محلول غذایی دارای نمک اضافی میزان فلورسنس



شکل ۳- میکروگراف الکترونی پلاستید برگهای شناور در مواد غذایی فاقد (الف و ج) و یا دارای ۶۰۰ میلی مول نمک اضافی (ب و د). برگها بعد از آنکه به مدت ۱/۵ ساعت در تاریکی قرار داشتند، به مدت ۸ ساعت در روشنایی قرار گرفتند (الف و ب) و سپس برای ۱۲ ساعت دوباره به تاریکی برگردانده شدند (ج و د).

قبلاً در معرض نور قرار داشتند، بازتشکیل جسم پیش‌تیغه‌ای در پلاستیدها منجر به افزایش تعداد آنها، به طور متوسط ۲/۸ جسم پیش‌تیغه‌ای در هر اتیوپلاست، گردید. در برگهای تیمار شده با نمک هیچ افزایش در تعداد اجسام پیش‌تیغه‌ای دیده نشد. در پلاستید برگهای تیمار شده

پلاستید برگهای باز اتیوله شده شناور در محلول غذایی فاقد نمک اضافی دارای جسم پیش‌تیغه‌ای با فراساختار منظم (شکل ۳-ج) بود. برگهای رشد یافته در تاریکی و محلول غذایی فاقد نمک اضافی به طور متوسط ۱/۳ جسم پیش‌تیغه‌ای در هر اتیوپلاست داشتند. در نمونه‌هایی که



پروتوکرووفیلید در پیش‌تیلاکوئیدها واقع است که در اثر تیمار نمک متورم می‌شوند (شکل ۱ و ۲-الف). هنوز مشخص نیست که تورم پیش‌تیلاکوئید منجر به تخریب رنگدانه دارای قله نشری فلورسنس ۶۳۳ ن م شده یا باعث افزایش انتقال انرژی به فرم ۶۵۶ نانومتری رنگدانه می‌شود. البته تبدیل فرم ۶۳۶ نانومتری به فرم ۶۵۶ نانومتری رنگدانه نیز محتمل به نظر می‌رسد (۳).

**فرا ساختار جسم پیش تیغه‌ای و پیش تیلاکوئید:** پرولامار بادی که به صورت ساختار غشایی مکعبی در نظر گرفته می‌شود که با غشاهای مسطح پیش‌تیلاکوئید ادامه می‌یابد (۴۲). مشاهده نتایج پژوهش حاضر این سوال را ایجاد می‌کند که آیا ارتباطی بین اجسام پیش تیغه‌ای، پیش‌تیلاکوئیدها و استروما وجود دارد؟ دولایه لیپیدی تشکیل دهنده واحد های چهار وجهی اجسام پیش تیغه‌ای در سرتاسر جسم پیش تیغه‌ای پیوسته است و دو سیستم آبی استروما و روزن داخلی جسم پیش تیغه‌ای را از یکدیگر جدا می‌کند (۴۲). استروما در منطقه جسم پیش تیغه‌ای با بقیه بخشهای استروما متصل است. این به معنی امکان انتشار یونها به داخل اجسام پیش تیغه‌ای است. روزن اجسام پیش تیغه‌ای، روزن تیلاکوئیدها و روزن پیش‌تیلاکوئیدها با یکدیگر در ارتباط هستند و فضای داخلی تشکیل می‌دهند.

میکروگرافهای الکترونی از برگهای تحت تیمار نمک اتیوپلاستهای را نشان دادند که دارای اجسام پیش تیغه‌ای معمولی بودند اما پیش‌تیلاکوئیدهایی داشتند که به طور قابل توجهی متورم بودند (شکل ۱). میتوسویا بردار مشابهی از اجسام پیش تیغه‌ای نسبت به تورم القاء شده در اثر نمک را نشان داد (۳۳). این امر نشان می‌دهد که روزن جسم پیش تیغه‌ای و روزن پیش‌تیلاکوئید بخشهایی مجزا هستند به طوری که یونها نمی‌تواند آزادانه بین دو بخش حرکت کنند. همچنین می‌توان استدلال کرد که ساختار سه بعدی جسم پیش تیغه‌ای می‌تواند مانع از تورم آن شود.

اجسام پیش تیغه‌ای بازتشکیل شده به صورت سازه‌هایی منظم، متراکم و الکترون-چگال بودند (شکل ۳-د). اغلب یک منطقه بزرگ شفاف در مجاورت اجسام پیش تیغه‌ای بازتشکیل شده دیده می‌شد. علاوه بر این در تعدادی از پلاستیدهای برگهایی که به مدت ۱۲ ساعت به تاریکی برگشته شده بودند، بخشهای بزرگ، تیره و متراکمی دیده می‌شد که فاقد ساختار داخلی (شکل ۳). پلاستید برگهایی که به مدت ۱۲ ساعت به محلول غذایی فاقد نمک اضافی و تاریکی برگشته شده بودند تقریباً به طور کامل بهبود یافتند (شکل ۳؛ جدول ۱).

### بحث

میزان کلروفیل در گیاهان رشد یافته در شرایط شوری اغلب کاهش می‌یابد (۱ و ۲۵). اخیراً نشان داده شده که برگهایی که در تاریکی و در معرض غلظت زیاد نمک رشد کرده‌اند با کاهش تولید کلروفیل، تأخیر جا به جایی شیبانات و کاهش باز تولید پروتوکرووفیلید مواجه می‌شوند (۱).

**خصوصیات طیفی مجموعه رنگدانه - پروتئین:** طیف نشری فلورسنس پروتوکرووفیلید موجود در برگهای رشد یافته در تاریکی دارای قله‌هایی در ۶۳۳ ن م و ۶۵۶ ن م است (شکل ۲-ب). به نظر می‌رسد پروتوکرووفیلید نور-فعال با قله نشری فلورسنس در ۶۵۶ ن م به تنشهای مختلف حساس است. در شرایط تنش طولانی مدت نسبت قله‌های نشری فلورسنس ۶۵۶ ن م به ۶۳۳ ن م کاهش می‌یابد (۲۹). با این حال، در برگهای شناور در محیط تنش نمک کاهش در قله نشری فلورسنس ۶۵۶ ن م رخ نداده است و برعکس کاهش نسبی در قله نشری فلورسنس ۶۳۳ ن م مشاهده شد (شکل ۲-ب).

واحدهای تشکیل دهنده گروههای سه تایی، دارای قله نشری فلورسنس در ۶۵۶ ن م، در اجسام پیش تیغه‌ای واقع شده‌اند (۱۰) که به نظر می‌رسد تحت تأثیر تیمار نمک قرار نمی‌گیرد (شکل ۱). فرم کوتاه موج

توجه به عدم تورم در پوشش پلاستید (شکل ۱ و ۳) جذب و انتشار از طریق کانالهای یونی پوشش پلاستید محتوای یونی استروما را افزایش می‌دهد (۱۹). انواعی از کانالهای یونی در تیلاکوئیدها یافت شده است (۱۷) اما کانالهای یونی در پیش‌تیلاکوئیدها شناخته نشده است. پیش‌تیلاکوئیدهای جدا شده به صورت غشاهای منظم رفتار می‌کنند و می‌توانند با توجه به پتانسیل اسمزی محیط جداسازی متورم شوند، در حالی که اجسام پیش‌تیغه‌ای جدا شده واکنش اسمزی انجام نمی‌دهند (۳۸ و ۵۲).

**تغییرات فراساختاری پس از نوردهی:** نوردهی به برگهای رشد یافته در تاریکی منجر به تغییر شکل نوری پروتوکرووفیلید به کلروفیلید و تغییر مورفولوژیکی فراساختار پلاستیدها می‌شود. اجسام پیش‌تیغه‌ای وضعیت منظم خود را از دست داده پراکنده می‌شوند (شکل ۱ ج و د). با این حال در برگهای تحت تیمار نمک بعد از نوردهی پراکنشی صورت نمی‌گیرد. مناطق مربوط به جسم پیش‌تیغه‌ای هنوز متراکم و به شدت رنگ پذیر هستند. به همین ترتیب در طول باز تشکیل پروتوکرووفیلید در گیاهانی که پس از نوردهی به تاریکی منتقل شده بودند، اجسام پیش‌تیغه‌ای متراکم و به شدت رنگ پذیر هستند که نشان دهنده تأثیر شدید تیمار نمک بر فرآیند تغییر شکل، پراکندگی و تشکیل مجدد جسم پیش‌تیغه‌ای دارد. قبلاً نشان داده شده بود که غلظت زیادی از یونها می‌تواند اثر متراکم‌کنندگی اجسام پیش‌تیغه‌ای را در تاریکی داشته باشد (۵۰) که شبیه نتایج پژوهش حاضر است. تغییر شکل و پراکندگی جسم پیش‌تیغه‌ای فرآیندهایی مرحله‌ای هستند که روی طیف نشری پروتوکرووفیلید و کلروفیلید نیز تأثیر دارند.

برگهای تحت تنشی که به روشنایی منتقل شدند دارای اجسام پیش‌تیغه‌ای با بقایای غشایی الکترون - چگال و یا در برخی از پلاستیدها یک منطقه مرکزی کمتر الکترون - چگال هستند (شکل ۱). این منطقه روشن‌تر به احتمال زیاد

البته در چنین موردی تورم در بخشهای جانبی اجسام پیش‌تیغه‌ای محتمل به نظر می‌رسد اما در این مطالعات چنین حالتی مشاهده نشد (شکل ۱). اگر فرض شود که ساختار مکعبی جسم پیش‌تیغه‌ای اجازه انتشار آزاد یونها را بدهد و ارتباطی آزاد بین روزن پیش‌تیلاکوئید و روزن جسم پیش‌تیغه‌ای وجود داشته باشد، موادی که موجب تورم پیش‌تیلاکوئید می‌شود می‌بایست به بیرون نشت کنند که در این صورت تورم پیش‌تیلاکوئید متوقف می‌شود. هنگامی که تیلاکوئیدها متورم می‌شوند استروما نیز وسیع‌تر شده و تیغه‌های استرومایی تشکیل می‌شوند که تیلاکوئیدها را قطع می‌کنند (شکل ۱ ز). تیغه‌های استرومایی احتمالاً توسط پروتئینهای سطحی در کنار هم نگه داشته می‌شوند چرا که هیچ اثری از غشاء در اطراف آنها وجود ندارد (شکل ۱ ز).

**متورم شدن پیش‌تیلاکوئید:** آیا مناطق شفاف که در ارتباط با پیش‌تیلاکوئیدها تشکیل می‌شوند واقعا پیش‌تیلاکوئیدهای متورم هستند؟ در این خصوص لازم است به چند نکته توجه گردد. اول آنکه یک غشاء اطراف منطقه شفاف را احاطه می‌کند (شکل ۲-الف). دوم آنکه پیش‌تیلاکوئیدها با درجات مختلفی از تورم در یک پلاستید یافت می‌شوند (شکل ۱). به این ترتیب مناطق شفاف با توسعه روزن پیش‌تیلاکوئیدها تشکیل می‌شوند. این حالت مشابه تورم تیلاکوئیدها در گیاهان سبز تیمار شده با نمک است (۳۳ و ۴۱) چنین تورمی را می‌توان در سیستم تیلاکوئیدی و یا در منطقه گرانیای گیاهان مختلف مشاهده کرد (۱۸ و ۳۰).

فرآیند تشکیل پیش‌تیلاکوئیدهای متورم روشن نیست. از آنجا که غلظت یونهای سدیم، پتاسیم و کلرید در محلول اطراف برگ به شدت افزایش می‌یابد، این فکر به ذهن خطور می‌کند که این یونها توسط سلولهای برگ گرفته شده، وارد پلاستیدها می‌شوند. یونها سپس در داخل پیش‌تیلاکوئیدها مجتمع و باعث جذب آب می‌شوند. با

کاهش استفاده مجدد از لیپیدهای جسم پیش تیغه‌ای برای تشکیل تیلاکوئیدها نیز می‌تواند دلیلی برای تشکیل مناطق متراکم و الکترون - چگال مشاهده شده باشد (شکل ۳).

کاهش نسبی پیش‌تیلاکوئید محتوی فرم کوتاه موج پروتوکرووفیلید با تورم پیش‌تیلاکوئیدها در تنش نمک مرتبط است. تیلاکوئیدهای متورم تازه تشکیل شده تیغه‌های استرومایی دارند که به نظر می‌رسد در افزایش ورود پروتئین به روزن تیلاکوئیدها نقش دارند که لازمه پلاستیدهای جوان در حال توسعه هستند. اجسام پیش تیغه‌ای در تنش نمک بدون تغییر مانده و دارای مجموعه سه تایی NADPH، پروتوکرووفیلید و POR با قله نشری ۶۵۶ ن م می‌باشد. اینکه پیش‌تیلاکوئیدها، اما نه اجسام پیش تیغه‌ای، تحت تأثیر تیمار نمک در تاریکی قرار دارند گویای تفاوت بین سازه‌های غشایی جسم پیش تیغه‌ای است. اختلال در پراکندگی اجسام پیش تیغه‌ای و کاهش تشکیل تیلاکوئیدها منجر به ناتوانی پلاستیدها در تولید کلروفیل در حضور نور می‌شود. این حالت همراه با تشکیل ساختارهای تیره اسمیوفیل که در روشنایی جایگزین اجسام پیش تیغه‌ای شده‌اند، نشان دهنده تغییر آرایش لیپیدی در برگهای تحت تنش نمک است. اثر مهارکننده تنش نمک بر تشکیل کلروفیل در برگ گیاهان رشد یافته در تاریکی تیره، بعد از نوردهی، با کاهش کلروفیل موجود در برگهایی که در شرایط طبیعی، به استثناء شوری، زندگی می‌کنند همخوانی دارد.

نتیجه کاهش سرعت تغییر شکل و پراکندگی اجسام پیش تیغه‌ای است. این نتیجه همچنین منطبق با تأخیر در جا به جایی شیباتا است (۱). این منطقه روشن هرگز بعد از ۸ ساعت نوردهی، که هنوز خیلی از الکترون ساختارهای الکترون - چگال حضور داشتند، دیده نشد.

**باز تشکیل جسم پیش تیغه‌ای در برگهای منتقل شده به تاریکی:** بازگرداندن برگهای شناور در محلول غذایی به تاریکی و به مدت ۱۲ ساعت منجر به باز تشکیل اجسام پیش تیغه‌ای می‌گردد (شکل ۳). در پلاستید برگهای تحت تنش نیز سازه‌های منظم، متراکم و الکترون - چگال قابل مشاهده بود (شکل ۳-ج و د). به رغم عدم تشکیل اجسام پیش تیغه‌ای طبیعی طیف فلورسنس حضور پروتوکرووفیلید باز تشکیل شده با قله نشری ۶۵۶ ن م را تأیید کرد. این امر نشان می‌دهد که علاوه بر مجموعه سه تایی NADPH، پروتوکرووفیلید و POR عوامل دیگری نیز برای تشکیل اجسام پیش تیغه‌ای لازم است. در مجموع چنین به نظر می‌رسد که متابولیسم چربی توسط تیمار نمک مختل شده باشد زیرا غشاء توانایی بازتشکیل شدن را ندارد. این سازه‌های الکترون - چگال در نمونه‌های تاریکی حضور ندارد اما بعد از نوردهی شکل می‌گیرد. کاملاً مشخص است که تیمار نمک، در روشنایی، باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود (۳۴). تنش اکسیداتیو می‌تواند در کلروپلاست القاء شده، منجر به بهم ریختگی تیلاکوئیدها و ازدیاد پلاستوگلوبولی شود (۲۲) و (۳۵). افزایش پراکسیداسیون چربی (۱۵ و ۲۶) و در نتیجه

## منابع

- Abdelkader, A.F., H. Aronsson, and C. Sundqvist, (2007) High salt-stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*) causes retardation of chlorophyll accumulation due to a limited rate of protochlorophyllide formation. *Physiologia Plantarum*. 130: p. 157-166.
- 2- Amini, F. and A.A. Ehsanpour, (2005) Soluble Proteins, Proline, Carbohydrates and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Changes in Two Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Cultivars under in vitro Salt Stress. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1: p. 212-216.
- 3- Amirjani ,M.R., A comparative study of protochlorophyllide spectral forms during development and greening of four varieties of dark-grown plants, in Department of Plant Physiology, Faculty of Science. 2004,

- Gothenburg University: Gothenburg, Sweden. p. 40.
- 4- Amirjani, M.R. and C. Sundqvist, (2004) Regeneration of protochlorophyllide in green and greening leaves of plants with varying proportions of protochlorophyllide forms in darkness. *Physiologia Plantarum*. 121: p. 377-390
  - 5- Amirjani, M.R. and C. Sundqvist, (2006) (Red region excitation spectra of protochlorophyllide in dark-grown leaves from plant species with different proportions of its spectral forms *Photosynthetica*. 44: p. 83-92.
  - 6- Amirjani, M.R., K. Sundqvist, and C. Sundqvist, (2006) Protochlorophyllide and POR development in dark-grown plants with different proportions of short-wave length and long-wavelength protochlorophyllide spectral forms. *Physiologia Plantarum*. 128: p. 751-762.
  - 7- Ashraf, M. and P.J.C. Harris, (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci*. 166: p. 3-16.
  - 8- Barthélemy, X., G. Bouvier, A. Radunz, S. Docquier, G.H. Schmid, and F. Franck, (2000) Localization of NADPH-protochlorophyllide reductase in plastids of barley at different greening stages. *Photosynthesis Research*. 64: p. 63-76.
  - 9- Bergey, D.R., G.A. Howe, and C.A. Ryan, (1996) Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: p. 12053-12058.
  - 10-Böddi, B., A. Lindsten, M. Ryberg ,and C. Sundqvist, (1989) On the aggregational stage of protochlorophyllide and its protein complexes in wheat etioplasts. *Physiologia Plantarum*. 76: p. 135-143.
  - 11-de Lacerdaa, C.F., J.e. Cambraiab, M.A. Olivab, and H.A. Ruizb, (2005) Changes in growth and in solute concentrations in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. *Environmental and Experimental Botany*. 54: p. 69-76.
  - 12-Dell'aquila, A., (1992) Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under the osmotic stress of polyethylene glycol. *Annals of Botany*. 69: p. 167-171.
  - 13-Dell'aquila, A. and P. Spada, (1992) Regulation of protein synthesis in germinating wheat embryos under polyethylene glycol and salt stress. *Seed Science Research*. 2: p. 75-80.
  - 14-Dombrowski, J.E., (200) (Salt Stress Activation of Wound-Related Genes in Tomato Plants. *Plant Physiology*. 132: p. 2098-2107.
  - 15-Elkahoui, S., J.A. Hernández, C. Abdelly, R. Ghrir, and F. Limam, (2005) Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Plant Science*. 168: p. 607-613.
  - 16-Fedina, I.S., I.D. Grigorova, and K.M. Georgieva, (2003) Response of barley seedlings to UV-B radiation as affected by NaCl. *J Plant Physiol*. 160: p. 205-8.
  - 17-Goetze, T.A., K. Philippar ,I. Ilkavets, J. Soll, and R. Wagner, (2006) OEP37 is a new member of the chloroplast outer membrane ion channels. *Journal of Biological Chemistry*. 281: p. 17989-17998.
  - 18-Hasan, R., Y. Ohnuki, M. Kawasaki, M. Taniguchi, and H. Miyake, (2005) Differential sensitivity of chloroplasts in mesophyll and bundle sheath cells in maize, an NADP-malic enzyme type C4 plant, to salinity stress. *Plant Production Science*. 8: p. 567-577.
  - 19-Heiber, T., T. Steinkamp, S. Hinnah, M. Schwarz, U.I. Flügge, A. Weber, and R. Wagner, (1995) Ion channels in the chloroplast envelope membrane. *Biochemistry*. 34: p. 15906-15917.
  - 20-Henningsen, K.W., (1970) Macromolecular physiology of plastids. VI. Changes in membrane structure associated with shifts in the absorption maxima of the chlorophyllous pigments. *Journal of Cell Science*. 7: p. 587-621.
  - 21-Henningsen, K.W. and J.E. Boynton, (1969) Macromolecular physiology of plastids. VII. The effect of a brief illumination on plastids of dark-grown barley leaves. *Journal of Cell Science*. 5: p. 7.۷۹۳-۵۷

- 22-Hernandez, J.A., E. Olmos, F.J. Corpas, F. Sevilla, and L.A. Del Rio, (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants *Plant Science*. 105: p. 151-167.
- 23-Hoagland, D.R. and D.I. Arnon, (1950) The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*. Vol. 347. Berkeley: University of California.
- 24-Inan, G., Q. Zhang, P. Li, Z. Wang, Z. Cao, H. Zhang, C. Zhang, T.M. Quist, S.M. Goodwin, J. Zhu, H. Shi, B. Damsz, T. Charbaji, Q. Gong, S. Ma, M. Fredricksen, D.W. Galbraith, M.A. Jenks, D. Rhodes, P.M. Hasegawa, H.J. Bohnert, R.J. Joly, R.A. Bressan, and J.K. Zhu, (2004) Salt cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiol*. 135: p. 1718-37.
- 25-Kahn, N.A., (2003) NaCl-inhibited chlorophyll synthesis and associated changes in ethylene evolution and antioxidative enzyme activities in wheat. *Biologia Plantarum*. 47 :p. 437-440.
- 26-Katsuhara, M., T. Otsuka, and B. Ezaki, (2005) Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxidase is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. *Plant Science* . :۱۶۹p. 369-373.
- 27-Kovtun, Y., W.L. Chiu, G. Tena, and J. Sheen, (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: p. 2940-2945.
- 28-Lacerda, C.F., J. Cambraia, M.A.O. Cano ,and H.A. Ruiz, (2001) Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. *Rev. Bras. Fisiol. Veg*. 13: p. 270-284.
- 29-Le Lay, P., B. Böddi, D. Kovacevic, P. Juneau, D. Dewez, and R. Popovic, (2001) Spectroscopic analysis of desiccation-induced alterations of the chlorophyllide transformation pathway in etiolated barley leaves. *Plant Physiology*. 127: p. 202-211.
- 30-Lechno, S. and E. Zamski, (1997) Salt stress-induced responses in cucumber plants. *Plant Physiology*. 150: p. 206-211.
- 31-Lutts, S., V. Majerus, and J.M. Kinet, (NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings) 1999. *Physiologia Plantarum*. 105: p. 450-458.
- 32-Minkov, I.N., M. Ryberg, and C. Sundqvist, (1988) Properties of reformed prolamellar bodies from illuminated and redarkened etiolated wheat plants. *Physiologia Plantarum*. 72: p. 725-732.
- 33-Mitsuya, S., Y. Takeoka, and H. Miyake, (2000) Effects of sodium chloride on foliar ultrastructure of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) plantlets grown under light and dark conditions in vitro. *Plant Physiology*. 157: p. 661-667.
- 34-Morsy, M.R., L. Jouve, J.-F. Hausman, L. Hoffmann, and J.M. Stewart, (2007) Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 164: p. 157-167.
- 35-Munne-Bosch, S., (2005) The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 162: p. 743-748.
- 36-Opanasenko, V., G. Semenova, and A. Agafonov, (1999) Changes in the structure and functional state of thylakoids under the conditions of osmotic shock. *Photosynthesis Research*. 62: p. 281-290.
- 37-Ryberg, M. and K. Dehesh, (1986) Localization of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in dark-grown wheat (*Triticum aestivum*) by immuno electron microscopy before and after transformation of the prolamellar bodies. *Physiologia Plantarum*. 66: p. 616-624.
- 38-Ryberg, M. and C. Sundqvist, (1982) Characterization of prolamellar bodies and prothylakoids fractionated from wheat etioplasts. *Physiologia Plantarum*. 56: p. 125-132.
- 39-Ryberg, M. and C. Sundqvist, Structural and functional significance of pigment-protein complexes of chlorophyll precursors, in *Chlorophylls*, H. Scheer, Editor. 1991, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 587-612.

- 40-Sairam, R.K. and A. Tyagi, (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*. 86: p. 407-421.
- 41-Sam, O., C. Ramírez, M.J. Coronado, P.S. Testillano, and M.C. Risueño, (2003) Changes in tomato leaves induced by NaCl stress: leaf organization and cell ultrastructure. *Biologia Plantarum*. 47: p. 361-366.
- 42-Selstam, E. and A. Widell-Wigge, Chloroplast lipids and the assembly of membranes. In: *Pigment-protein complexes in plastids, synthesis and assembly*, C. Sundqvist and M. Ryberg, Editors. 1993, Academic Press Inc.: San Diego. p. 241-277.
- 43-Smeller, L., K. Solymosi, J. Fidy, and B. Böddi, (2003) Activation parameters of the blue shift (Shibata shift) subsequent to protochlorophyllide phototransformation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1651: p. 130-138.
- 44-Smith, A.E., (1995) *Handbook of weed management system*. New York Marcel Dekker.
- 45-Solymosi, K., K. Martinez, Z. Kristóf, C. Sundqvist, and B. Böddi, (2004) Plastid differentiation and chlorophyll biosynthesis in different leaf layers of white cabbage (*Brassica oleracea* cv. capitata). *Physiologia Plantarum*. 121: p. 520-529.
- 46-Stadnichuk, I.N., M.R. Amirjani, and C. Sundqvist, (2005) Identification of spectral forms of protochlorophyllide in the region 670-730 nm. *Photochem Photobiol Sci*. 4: p. 230-8.
- 47-Szables, 1994, in *Hand book of plant and crop stress*, M. Pesarki, Editor. Soil and salinization, Marcel Dekker: New york. p. 3-11.
- 48-Vaughan, J.G. and P.A. Judd, (2003) *The Hand Book of Health Foods*: Oxford University Press.
- 49-Weimberg, R., H.R. Lerner, and A. Poljakoff-Mayber, (1984) A relationship between potassium and proline accumulation in salt-stressed *Sorghum bicolor*. *Physiol. Plant*. 62: p. 472-480.
- 50-Widell-Wigge, A. and E. Selstam (۱۹۹۰) , Effects of salt wash on the structure of the prolamellar body membrane and the membrane binding of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase. *Physiologia Plantarum*. 78: p. 315-323.
- 51-Williams, W.P., E. Selstam, and T. Brain, (1998) X-ray diffraction studies of the structural organisation of prolamellar bodies isolated from *Zea mays*. *FEBS Letters* 422: p. 252-254.
- 52-Zhang, L. and D. Xing, (2008) Rapid determination of the damage to photosynthesis caused by salt and osmotic stresses using delayed fluorescence of chloroplasts. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 7: p. 352-360.
- 53-Zhu, X. and J. Zhang, (1997) Anti-transpiration and anti-growth activities in the xylem sap from plants under different types of soil stress. *New Phytologist*. 137: p. 657-664

## Effect of Salinity on Etioplast and its Inner Membranes

Amirjani M.R.

BiologyDept., Faculty of Sciences, University of Arak, Arak I.R. of IRAN

### Abstract

Leaf sections from 8-d-old dark-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) were exposed to high salt stress (600 mM). Using low-temperature fluorescence spectroscopy and transmission electron microscopy the native arrangements of plastid pigments as well as the ultrastructure of the plastids were studied. Plastids from salt-treated leaves had highly swollen prothylakoids but the prolamellar bodies were regular. A slight intensity decrease of the short-wavelength protochlorophyllide (Pchl<sub>id</sub>) form fluorescing at 633 nm was observed. But the long-wavelength Pchl<sub>id</sub> form emitting at 656 nm showed no changes. The newly formed swollen thylakoids, after irradiation, has been showed traversing stromal strands. The PLB dispersal was partly inhibited and formed as an electron-dense structure, which remained after 8 h irradiation. The difference in fluorescence emission maximum of the main chlorophyll form in salt-stressed leaves (681 nm) and in control leaves (683 nm) indicated an arrested formation of the photosynthetic apparatus. Overall chlorophyll production was restricted during prolonged irradiation. Salt-stressed leaves returned to darkness after 3 h of irradiation had a reduced amount of Pchl<sub>id</sub> and reduced re-formation of regular net-like PLBs, compared to the control. Instead, the size of the electron-dense structures increased. This study reports the salt-induced swelling of PTs and reveals traversing stromal strands. Although the PLBs were intact and the Pchl<sub>id</sub> fluorescence emission spectra appeared normal after salt stress in darkness, plastid development to chloroplasts was highly restricted during irradiation.

**Keywords:** wheat, salinity, etioplast, fluorescence emission spectrum, protochlorophyllide