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]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان، [۲]استاد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان،
[۳]استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان، [۴]استادیار گروه آمار، دانشگاه گلستان

تاریخ دریافت: ؛ تاریخ پذیرش:

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: seyyedmohsen_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 به‌وسیله فرآیند پیری تکوینی برداشت شوند (بوکانان- والاستون و همکاران، ۲۰۰۳). در جریان پیری، سلول‌های برگ متحمل تغییرات شدید متابولیسمی می‌شوند. قابل‌توجه‌ترین 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).

نیتروژن یک ماده غذایی معدنی است که گیاهان به مقدار زیاد به آن نیاز دارند. یون‌های نیترات و آمونیوم دو شکل اصلی نیتروژن هستند که به‌وسیله گیاهان جذب می‌شوند. هر چند که نیترات پس از جذب و قبل از ورود به ترکیبات نیتروژن‌دار آلی به آمونیوم احیا می‌شود اما مدتهاست این عقیده مطرح می‌باشد که آمونیوم و نیترات به‌عنوان منابع نیتروژن 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 نیتروژن است به‌خوبی رشد کنند. بیشتر گونه‌های زراعی وقتی در محیط دارای آمونیوم قرار می‌گیرند علایم مسمویت 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 سینو (۱۹۶۵)

دریافتند که تغذیه نیترات برروی رشد و بازدهی گیاه اثـر مفیـدی دارد و فعالیـت متـابولیکی و جـذب کاتیون را در ریشه‌های برنج افزایش می‌دهد. یافته‌ها نـشان مـی‌دهـد کـه رشـد و بـازدهی گیاهـان 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 بـرنج نـشان دادند که افزایش رشد و بازدهی گیاه در تغذیه هم‌زمان از نیترات و آمونیوم می‌تواند ناشـی از افـزایش جذب آمونیوم و افزایش انتقال نیتروژن به اندام هوایی در نتیجـه تحریـک همگـون‌سـازی[1] آمونیـوم و افزایش فعالیت چرخه GS/GOGAT[2] در حضور نیترات باشد کـه بـه لحـاظ زراعـی اهمیـت دارد. همگون‌سازی آمونیوم تقریباً به‌صورت اختصاصی به‌وسـیله چرخـه GS/GOGAT انجـام مـی‌شـود (لنشن و همکاران، ۲۰۰۰).

گزارش‌هایی که در مورد جذب و احیای نیترات وجود دارد نشان می‌دهـد کـه جـذب نیتـرات در ریشه نیازمند انرژی است که از طریق واکنش‌های تنفـسی تـأمین مـی‌شـود (کرافـورد، ۱۹۹۵). آنـزیم نیترات‌ردوکتاز علاوه‌بر احیای نیترات به نیتریت، واکنش احیای نیتریت 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 پروسـتتیک فلاویـن‌آدنـین‌دی‌نوکلئوتیـد هِـم و یـک کوفاکتور مولیبدن می‌باشد (کرافـورد و همکـاران، ۱۹۸۸). براسـاس گـزارش اوجـی و ایـزاوا (۱۹٦۸) 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 بـا آمونیـوم نـشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز در گیاه *Catharanthus roseus* در تغذیه با نیترات به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهانی است که با آمونیـوم تغذیـه مـی‌شـوند. هـم‌چنـین، فعالیت این آنزیم در ریشه‌ها بیشتر از برگ‌ها است (میسرا و گوپتا، ۲۰۰٦). نتایج بررسـی لـین و کیـو (۲۰۰۱) در ریشه‌های برنج نـشان مـی‌دهـد کـه میـزان پراکـسیدهیدروژن و فعالیـت آنـزیم NADH اکسیداز[3] تحت تیمار کلریـد آمونیـوم افـزایش مـی‌یابـد. NADH اکـسیداز نـوعی پراکـسیداز کـه 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 نیترات است. نتایج بررسی اروزکو- کاردناس و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که انباشتگی پراکسیدهیدروژن 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 نیترات 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 ٤٨ 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 نیترات‌کلسیم، در تیمارهای دوم و چهارم نیتروژن به‌صورت مخلوطی از نیترات‌کلسیم و کلریدآمونیوم و به‌ترتیب با نسبت سه به یک و یک به سه، در تیمار سوم نیتروژن به‌صورت نمک نیترات‌آمونیوم و در تیمار پنجم نیتروژن به‌صورت نمک کلریدآمونیوم در اختیار گیاهان قرار داده شد. غلظت سایر نمک‌ها در محلول غذایی به‌صورت ۰/۵ میلی‌مولار K_2SO_4، ۰/۳۲ میلی‌مولار $NaH_2PO_4.2H_2O$، ۱/۳ میلی‌مولار Mg_2SO_4، ۱/٤ میلی‌مولار $CaCl_2$، ۱۰ میلی‌مولار FeNaEDTA، ۹/۵ میکرومولار $MnCl_2.4H_2O$، ۰/۰۷۵ میکرومولار $(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$، ۱۸/۹ میکرومولار H_3BO_3، ۰/۱۵ میکرومولار $ZnSO_4.7H_2O$، ۰/۱۵ میکرومولار $CuSO_4.5H_2O$ و ۱۲ میکرومولار $C_6H_8O_7$ در نظر گرفته

شد (یوشیدا و همکاران، ۱۹۷٦). دانه‌رست‌ها به مدت ۱٤ 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 ٦ تنظیم شد و محلول غذایی ۳ بار با فاصله ٤ روز، تعویض گردید. پس از پایان ۱٤ روز، گیاهان در مرحله ٤ برگی برداشت شدند و برای بررسی‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری سرعت واکنش هیل[1] در کلروپلاست‌ها: استخراج کلروپلاست با استفاده از روش اصلاح‌شده جداسازی استاندارد واتلی و آرنون (۱۹٦۲) (۳۸) و اندازه‌گیری سرعت واکنش هیل براساس روش تریست (۱۹۷۲) انجام شد. نمونه‌ی شاهد به‌ترتیب شامل ۲/۱ میلی‌لیتر بافر تریس‌کلرید، ۰/٦ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۳ میلی‌لیتر سوسپانسیون کلروپلاست و نمونه مورد آزمایش به‌ترتیب شامل ۲/۱ میلی‌لیتر بافر تریس‌کلرید، 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ٦۰۰ 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 (۱۹٤۹) 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 به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. به یک میلی‌لیتر از سوپرناتانت ٤ 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 ٤٤۰ و ٦۰۰ نانومتر برای مالون‌دی‌آلدئید[2] نسبت به شاهد ثبت گردید

1- Hill Reaction
2- Malondialdehyde

و سپس براساس ضریب خاموشی[1] $mM^{-1}.cm^{-1}$ ١٥٦ مقدار مالون‌دی‌آلدئید در نمونه اندازه‌گیری شد (دو و براملاگ، ١٩٩٢).

استخراج عصاره پروتئینی برگ: استخراج عصاره پروتئینی برگ براساس روش هیونگ و کائو (٢٠٠٣) انجام شد. برای این منظور از ٧ سانتی‌متری انتهای سومین برگ گیاه برنج، ٠/٠٥ گرم توزین گردید و با یک میلی‌لیتر بافر فسفات ٥٠ میلی‌مولار pH= ٦/٨ در یک هاون چینی و در حمام یخ هموژنیزه شد. هموژنات همراه با یک میلی‌لیتر از محلول حاصل از شستشوی هاون داخل لوله سانتریفوژ ریخته شد و مدت ٢٠ دقیقه در ١٧٦٠٠ گرم در دمای ٤ 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 (١٩٧٦) انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس روش چنس و مهلی (١٩٥٥) انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی ٣ میلی‌لیتر برای پراکسیداز شامل ٢/٧٩ میلی‌لیتر بافر فسفات‌سدیم ٢٥ میلی‌مولار با pH= ٧، ١٠٠ میکرولیتر گایاکول ٠/٦ مولار، ١٠٠ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ١/٢ مولار و ١٠ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش در طول موج ٤٧٠ 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 میشرا (١٩٧٦) همراه با تغییراتی انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی ٣ میلی‌لیتر برای پلی‌فنل‌اکسیداز شامل ٢/٨ میلی‌لیتر بافر فسفات‌سدیم ٢٥ میلی‌مولار با pH= ٦/٨، ١٠٠ میکرولیتر پیروگالول ٠/٣ مولار و ١٠٠ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ٤٢٠ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم براساس میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

1- Extinction Coefficient

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 میلی‌لیتر برای کاتالاز شامل ۲/۸۵ میلی‌لیتر بافر فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۰/٤٥ مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم براساس میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز براساس روش بوچمپ و فریدویچ (۱۹۷۱) انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی یک میلی‌لیتر برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز شامل ۸۳۵ میکرولیتر بافر فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۸، ۳۳ میکرولیتر اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید ۳ میلی‌مولار، ۳۳ میکرولیتر نیتروبلوتترازولیوم ۰/۷۵ میلی‌مولار، ۳۳ میکرولیتر زانتین ۳ میلی‌مولار، ۳۳ میکرولیتر محلول رقیق شده آنزیم زانتین‌اکسیداز و ۳۳ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٥٦۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز براساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

جداسازی و تشخیص آنزیم کاتالاز برروی ژل پلی‌اکریل‌آمید غیردناتوره‌کننده[1]: جداسازی آنزیم کاتالاز برروی ژل پلی‌اکریل‌آمید غیردناتوره‌کننده براساس روش جوردی و همکاران (۲۰۰۰) همراه با تغییراتی انجام شد. برای این منظور، الکتروفورز عصاره آنزیمی برروی ژل جداکننده ۷ درصد انجام شد. تشخیص آنزیم کاتالاز برروی ژل پلی‌اکریل‌آمید براساس روش اندرسون و همکاران (۱۹۹۵) انجام شد. برای این منظور، ژل مدت ۲۵ دقیقه در محلول ۳/۲۷ میلی‌مولار آب اکسیژنه و به دنبال آن برای رنگ‌آمیزی، در محلول تازه پتاسیم فری‌سیانید ۱ درصد و کلریدفریک ۱ درصد قرار داده شد.

جداسازی و تشخیص آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برروی ژل پلی‌اکریل‌آمید دناتوره‌کننده[2]: جداسازی آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برروی ژل پلی‌اکریل‌آمید دناتوره‌کننده براساس روش لملی و همکاران (۱۹۷۰) همراه با تغییراتی انجام شد (فلینگ و گرگرسون، ۱۹۸٦). برای این منظور، الکتروفورز عصاره آنزیمی برروی ژل جداکننده ۱۰ درصد انجام شد. مقدار چهار حجم از عصاره بافتی با یک حجم از بافر نمونه شامل بافر تریس ۰/۰٦ مولار با pH= ٦/۸، ۲ درصد

1- Native-PAGE
2- SDS-PAGE

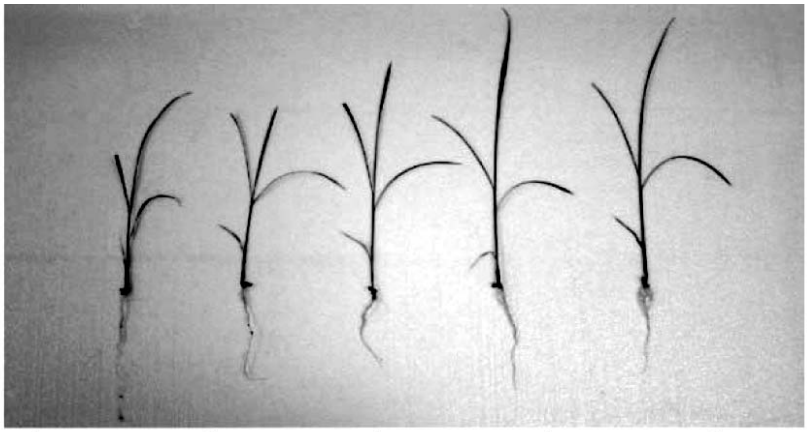
سدیم‌دودسیل‌سولفات، ۲۵ درصد گلیسرول و ۰/۱ درصد بروموفنل بلو مخلوط گردید. سپس، حجمی از این مخلوط که دارای ۱۰۰ میکروگرم پروتئین بود در چاهک‌های ژل متراکم‌کننده بارگیری شد (هاو و همکاران، ۲۰۰۳). تشخیص آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برروی ژل پلی‌اکریل‌آمید براساس روش ریو و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. بدین‌منظور، ژل به‌ترتیب ابتدا به‌مدت ۲۰ دقیقه در۱۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار pH= ۷/۹ 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 pH= ۷/۸ دارای ریبوفلاوین ۲۸ میکرومولار و تترامتیل‌اتیلن‌دی‌آمین 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 سوپراکسیددیسموتاز بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید، دو ژل دیگر آماده شد. این دو ژل ابتدا مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار pH= ۷/۹ دارای ۲۵ درصد ایزوپروپانل قرار داده شدند. سپس، یکی از ژل‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی، در بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار pH= ۷/۸ دارای سیانیدپتاسیم ۳ میلی‌مولار و ژل دیگر به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار pH= ۷/۸ دارای پراکسیدهیدروژن 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.



۲/۸ میلی مولار آمونیوم و صفر میلی مولار نیترات | ۲/۱ میلی مولار آمونیوم و ۰/۷ میلی مولار نیترات | ۱/٤ میلی مولار آمونیوم و ۱/٤ میلی مولار نیترات | ۰/۷ میلی مولار آمونیوم و ۲/۱ میلی مولار نیترات | صفر میلی مولار آمونیوم و ۲/۸ میلی مولار نیترات

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

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

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر	وزن خشک	واکنش هیل	کلروفیل کل	نسبت کلروفیل a به کلروفیل b
نیتروژن	٤	٤۲/۰۷۱*	۰/٦٤۲۹*	۰/۰۰۰۳۱**	۱/۱۸۸۵**	۰/۰۷۵۱**
خطا	۱۰	۷/۱۹٦	۰/۱۷٤۰	۰/۰۰۰۰٤	۰/۱۰۷۵	۰/۰۰٦٤
کل	۱٤					

nsتغییرات معنی‌دار نیست، *معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، **معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

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

منابع تغییر	پروتئین محلول	فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز	فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز	فعالیت ویژه آنزیم‌سوپراکسید دیسموتاز	فعالیت ویژه آنزیم پلی‌فنل اکسیداز	پراکسیداسیون لیپید
نیتروژن	٦۰/۹۹٤٤*	۰/۰۳۷۹*	۰/۰۰۲۲ns	۲۳٦٦/۳٦۵۲**	۰/۰۲۳۲۳ns	۲۱/۰۷۸۷ns
خطا	۱٦/۵۷۹۹	۰/۰۱۰۹	۰/۰۰۱۹	۳٦۳/۰۲۱۰	۰/۰۱٤۵	۵۰۵/۱۰٤٤
کل						

nsتغییرات معنی‌دار نیست، *معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، **معنی‌دار 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 (میلی‌گرم بر گرم بافت تر)	نسبت کلروفیل a به کلروفیل b
صفر میلی‌مولار آمونیوم و ۲/۸ میلی‌مولار نیترات	۲۰/۷۶۷^{c}	۳/۱۲۷۳^{c}	۰/۰۳۸۶۶۷^{c}	۱/۷۴۳۱^{b}	۲/۹۸۹۸۸^{a}
۰/۷ میلی‌مولار آمونیوم و ۲/۱ میلی‌مولار نیترات	۲۳/۷۶۷^{bc}	۳/۴۵۶۷^{bc}	۰/۰۴۴۰۰۰^{c}	۲/۲۸۲۶^{b}	۲/۷۳۴۱۲^{b}
۱/۴ میلی‌مولار آمونیوم و ۱/۴ میلی‌مولار نیترات	۲۳/۸۰۰^{bc}	۳/۴۶۰۳^{bc}	۰/۰۴۷۳۳۴^{bc}	۳/۰۹۰۰^{a}	۲/۶۱۹۴۴^{b}
۲/۱ میلی‌مولار آمونیوم و ۰/۷ میلی‌مولار نیترات	۳۰/۴۶۷^{a}	۳/۹۸۷۳^{a}	۰/۰۵۹۴۴۴^{ab}	۳/۰۵۶۴^{a}	۲/۶۰۰۵۲^{b}
۲/۸ میلی‌مولار آمونیوم و صفر میلی‌مولار 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 (میلی‌گرم بر گرم بافت‌تر)	فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)	فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)	فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	فعالیت ویژه آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین)	پراکسیداسیون لیپید (نانومول بر گرم بافت تر)
صفر میلی‌مولار آمونیوم و ۲/۸ میلی‌مولارنیترات	۴۷/۲۷۹^{b}	۰/۴۹۵۳۴^{b}	۰/۳۴۸۲۲^{a}	۱۴۳/۳۵^{a}	۰/۵۲۶۹۴^{a}	۴۳/۵۸^{a}
۰/۷ میلی‌مولار آمونیوم و ۲/۱ میلی‌مولارنیترات	۵۴/۴۰۰^{ab}	۰/۶۸۱۶۱^{ab}	۰/۳۱۰۴۴^{a}	۱۱۲/۸۲^{ab}	۰/۳۹۱۹۴^{ab}	۴۵/۶۹^{a}
۱/۴ میلی‌مولار آمونیوم و ۱/۴ میلی‌مولارنیترات	۵۰/۵۳۲^{ab}	۰/۵۹۰۲۵^{ab}	۰/۳۲۲۸۹^{a}	۱۰۲/۸۰^{bc}	۰/۴۳۲۰۵^{ab}	۴۹/۰۲^{a}
۲/۱ میلی‌مولار آمونیوم و ۰/۷ میلی‌مولارنیترات	۵۸/۴۱۵^{a}	۰/۷۸۱۴۶^{a}	۰/۲۸۶۴۰^{a}	۶۹/۶۰^{c}	۰/۲۸۳۵۰^{b}	۴۹/۱۴^{a}
۲/۸ میلی‌مولار آمونیوم و صفر میلی‌مولارنیترات	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 معنی‌دار بین وزن تر با میزان کلروفیل کل و سرعت واکنش هیل و همچنین، بین وزن خشک و مقدار کلروفیل کل در گیاه می‌تواند بدین‌معنی 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 یافته‌های جی و پنگ (۲۰۰۵) در مورد افزایش مقدار کلروفیل کل و قندهای محلول کل در گیاهان برنج تغذیه شده باآمونیوم در مقایسه با گیاهان تغذیه نموده از نیترات هم‌خوانی دارد. از سوی دیگر، وجود همبستگی مثبت معنی‌دار بین وزن تر و خشک با فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز و همبستگی منفی معنی‌دار با فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسیدازدیسموتاز به منزله انباشتگی بیشتر پراکسیدهیدروژن در محیط نیتراتی و احتمالاً اثر انباشتگی آن برروی کاهش فعالیت‌های فتوسنتزی در گیاه خواهد بود که کاهش رشد رویشی را در محیط نیتراتی در پی خواهد داشت (جدول ۳).

فعالیت‌های فتوسنتزی: نتایج نشان داد که با افزایش مقدار نیترات و کاهش مقدار آمونیوم در محلول غذایی، سرعت واکنش هیل و مقدار کلروفیل کل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت در حالی‌که نسبت کلروفیل a به کلروفیل b افزایش معنی‌داری را نشان داد (جدول‌های ۱ و ۲). از آنجایی که این تغییرات مشابه تغییراتی است که در جریان پیری ایجاد می‌شوند بنابراین به‌نظر می‌رسد تغذیه بوته‌های برنج با نیترات می‌تواند 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 معنی‌داری و بین میزان پروتئین محلول و نسبت کلروفیل a به کلروفیل b یک همبستگی منفی معنی‌داری وجود داشت (جدول ۳). از این رو، احتمالاً تغذیه بوته‌های برنج با آمونیوم با افزایش میزان پروتئین‌ها در گیاه از جمله پروتئین‌های مربوط به فتوسیستم‌ها و آنزیم‌های مسیر بیوسنتز کلروفیل و به دنبال آن، افزایش فعالیت‌های فتوسنتزی همراه خواهد بود.

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

	وزن تر گیاه	وزن خشک گیاه	سرعت واکنش هیل	کلروفیل کل	نسبت کلروفیل a به کلروفیل b	پروتئین محلول	فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز	فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز	فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز	فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداسیون لیپید
وزن تر گیاه	۱	۰/۹۵۹*	۰/۵۷٤*	۰/٦۹۹**	-۰/۵۵۸*	۰/۳۳۳ns	۰/۸٤۳**	-۰/۷۷۰**	-۰/٤۸۰ns	-۰/۷۹۸**	-۰/۰۳۹ns
وزن خشک گیاه		۱	۰/۳۸۸ns	۰/٦٦۱**	-۰/٤۰۵ns	۰/۱۲۱ns	۰/۸۷۸**	-۰/۷۰۹**	-۰/۵۵۹*	-۰/٦۸۷**	-۰/۰٦۷ns
سرعت واکنش هیل			۱	۰/۵۵٤ns	-۰/۵۸۱*	-۰/۷٤۳**	۰/۳۳۳ns	-۰/٤۷۷ns	-۰/۱۰۱ns	-۰/۷۲۹**	-۰/۲۵۳ns
کلروفیل کل				۱	-۰/۷۲٦**	۰/۲۳۱ns	۰/٦۱۲*	-۰/۳۷٤ns	-۰/۵۲٦*	-۰/۵۸۱*	۰/۲۸٦ns
نسبت کلروفیل a به کلروفیل b					۱	-۰/٦٦۰**	-۰/٤۸۵ns	۰/٤۲٤ns	۰/۲۷٦ns	۰/٦۵۲**	۰/۰۲۱ns
پروتئین محلول						۱	۰/۲۳٤ns	-۰/۲۸۲ns	-۰/۰۹۲ns	-۰/۵۲۷*	-۰/۲۰۵ns
فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز							۱	-۰/٦۷۱**	-۰/۵۹۷**	-۰/٦۵۷**	۰/۱۲۱ns
فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز								۱	۰/۱۲۱ns	۰/۸۳۵**	۰/٤٤۰ns
فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز									۱	۰/۲٦۰ns	-۰/۷٦۲**
فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز										۱	۰/۲۷۵ns
پراکسیداسیون لیپید											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 نیترات 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- اکسوگلوتارات 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- اکسوگلوتارات 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 نیترات، گلوتامات و محدودیت کربن سبب واکنش کاتابولیک آمین‌زدایی (تشکیل ۲- اکسوگلوتارات) می‌شوند (لنشن و همکاران، ۲۰۰۰). از این رو، تغذیه بوته‌های برنج با آمونیوم فعالیت آنزیم گلوتامات‌دهیدروژناز را به سوی تولید گلوتامات افزایش می‌دهد و گلوتامات به‌منظور تولید گلوتامین توسط آنزیم GS مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدین‌ترتیب، تولید اسیدآمینه گلوتامین افزایش می‌یابد و به دنبال آن، می‌تواند به افزایش تولید اسیدآمینه‌های دیگر و افزایش تولید پروتئین در گیاه منجر شود. نتایج بررسی مارواها و جولیانو (۱۹۷۶) در دانه‌رست‌های برنج تحت تیمار با نیترات یا آمونیوم نشان داد که فعالیت آنزیم‌های گلوتامات‌دهیدروژناز و گلوتامین سینتتاز در تغذیه با آمونیوم بیشتر از تغذیه با نیترات است. هم‌چنین، آنها نتیجه گرفتند که فعالیت بیشتر آنزیم گلوتامین سینتتاز به معنی همگون‌سازی سریع‌تر نیتروژن در تغذیه با آمونیوم است. کرونزوکر و همکاران (۱۹۹۹) نیز در تغذیه هم‌زمان گیاه برنج با نیترات و آمونیوم، افزایش فعالیت چرخه GS/GOGAT و تحریک همگون‌سازی آمونیوم در حضور نیترات 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 سوپراکسیددیسموتاز در برگ‌های برنج معنی‌دار است به‌طوری‌که با افزایش نیترات 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 نیترات ناشی از افزایش میزان سوبسترای آن یعنی آنیون سوپراکسید می‌باشد. دلایل مختلفی را می‌توان در مورد افزایش آنیون سوپراکسید در تغذیه با نیترات مد نظر قرار داد. جذب نیترات در ریشه

نیازمند انرژی است که از طریق واکنش‌های تنفسی تأمین می‌شود (کرافورد، ١٩٩٥). 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، ١٩٧٦). 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. به‌دلیل وجود مراکز اکسایش و کاهش در این آنزیم (کرافورد و همکاران، ١٩٨٨)، تولید آنیون سوپراکسید ضمن نقل و انتقال الکترون، همانند زنجیر انتقال الکترون میتوکندریایی محتمل است. یافته‌های یاماساکی و ساکی‌هاما (٢٠٠٠) مبنی بر تولید آنیون سوپراکسید توسط آنزیم نیترات‌ردوکتاز مؤید این فرضیه است. اوجی و ایزاوا (١٩٦٨) نشان دادند که فعالیت ویژه آنزیم نیترات‌ردوکتاز در ساقه‌ها و برگ‌های گیاهان ٢١ روزه برنج از فعالیت آن در سویا و گندم بیشتر است. مارواها وجولیانو (١٩٧٦) نیز افزایش فعالیت این آنزیم را در اندام‌های هوایی گیاه برنج نسبت به 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 ٢٤، ٢٩ و ٥٣ کیلو دالتون است. استفاده از سیانید پتاسیم ٢ میلی‌مولار که ممانعت‌کننده آنزیم Cu/Zn-SOD است و پراکسیدهیدروژن ٥ میلی‌مولار که ممانعت‌کننده آنزیم‌های Cu/Zn-SOD و Fe-SOD می‌باشد، نشان داد که همگی ایزوزیم ها از نوع Cu/Zn-SOD هستند. با توجه به عدم مشاهده ایزوزیم‌های Fe-SOD و Mn-SOD برروی 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 ٢).

نتایج نشان داد که اثر نوع نیتروژن برروی فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز در برگ‌های برنج معنی‌دار نمی‌باشد (جدول‌های ١ و ٢). بنابراین، تغذیه نیتروژن با نسبت‌های متفاوت آمونیوم و نیترات برروی

تولید و یا تخریب این آنزیم در برگ‌های برنج اثری ندارد. یافته‌های مارواها و جولیانو (۱۹۷٦) 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. به‌نظر می‌رسد فعالیت آنزیم کاتالاز در تغذیه با نیترات و یا آمونیوم به گونه گیاهی وابسته باشد به‌طوری‌که 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.

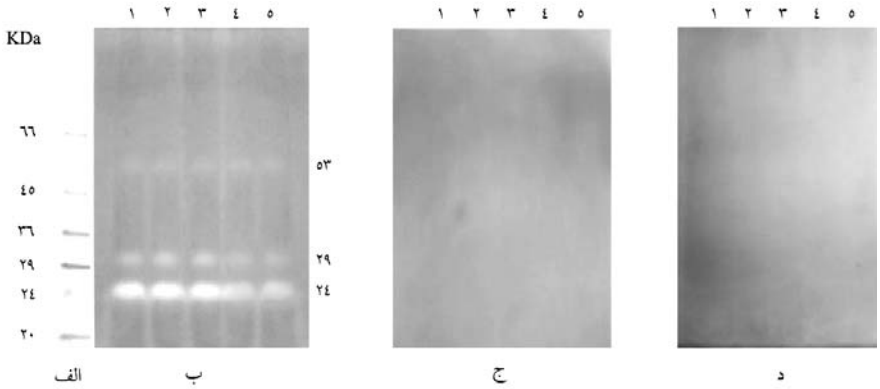
بررسی الگوی الکتروفورزی آنزیم کاتالاز بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید غیردناتوره‌کننده تحت تیمارهای مختلف نیتروژن نشان داد که در همه تیمارها تنها یک ایزوزیم قابل تشخیص است. به‌عبارت دیگر، تحت تیمارهای مختلف نیتروژن ایزوزیم جدیدی القا نمی‌شود (شکل ۳).

با توجه به این نتایج، اثر نوع نیتروژن بر فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در برگ‌های برنج معنی‌دار بود به‌طوری‌که با افزایش آمونیوم و کاهش نیترات در محلول غذایی، فعالیت این آنزیم افزایش یافت (جدول‌های ۱ و۲). نتایج بررسی ریوس- گنزالس و همکاران (۲۰۰۲) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در دانه‌رست‌های 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 به‌طور معنی‌داری بیشتر از برگ‌ها است. نتایج بررسی میسرا و گوپتا (۲۰۰٦) در گیاه *Catharanthus roseus* نشان داد که فعالیت این آنزیم فعالیت آن در تغذیه با نیترات به‌طور 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 پراکسیدهیدروژن توسط آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در این محیط می‌باشد. ظاهراً تناقضی بین نتایج ما با نتایج ریوس- گنزالس و همکاران (۲۰۰۲) و میسرا و گوپتا (۲۰۰٦) وجود دارد. علت افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان برنج در تغذیه با آمونیوم را باید در افزایش میزان سوبسترای آن یعنی پراکسیدهیدروژن جستجو نمود. براساس نتایج لین و کیو (۲۰۰۱) تیمار ریشه‌های برنج با کلریدآمونیوم

سبب افزایش فعالیت آنزیم NADH به‌عنوان دهنده الکترون استفاده می کنند و NADH اکسیدازها نامیده می‌شوند نقش مهمی در تشکیل پراکسیدهیدروژن مورد نیاز برای ساخت لیگنین دارند (۱۱). لین و کیو (۲۰۰۱) اثر کلریدآمونیوم را بر روی فعالیت آنزیم NADH اکسیداز و میزان پراکسیدهیدروژن می‌گردد. بنابراین، منبع تولید پراکسیدهیدروژن در بوته‌های برنج تحت تیمار آمونیوم، فعالیت آنزیم NADH اکسیداز دیواره‌ای است. از آنجایی‌که 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.

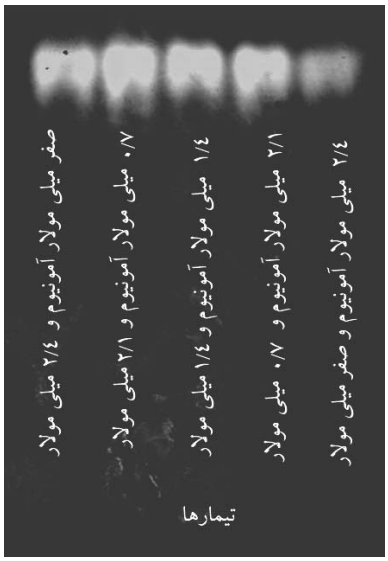
اثر نوع نیتروژن بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در برگ گیاه برنج: نتایج نشان داد که اثر نوع نیتروژن برروی فعالیت ویژه آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز معنی‌دار نمی‌باشد اما مقایسه اختلاف میانگین‌ها نشان داد که فعالیت ویژه این آنزیم در تیمار ۲/۱ میلی‌مولار آمونیوم و ۰/۷ میلی‌مولار نیترات به‌طور معنی‌داری از تیمار صفر میلی‌مولار آمونیوم و ۲/۸ میلی‌مولار نیترات کمتر است (جدول‌های ۱ و۲). بنابراین، چنان‌چه تنها منبع نیتروژن در دسترس گیاه نیترات باشد فعالیت ویژه آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج اروزکو- کاردناس و همکاران (۲۰۰۱) در مورد اثر انباشتگی پراکسیدهیدروژن ناشی از جراحت برروی بیان ژن پلی‌فنل‌اکسیداز، به‌نظر می‌رسد فعالیت بالای آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در محیط نیتراتی و تولید پراکسیدهیدروژن توسط این آنزیم، سبب افزایش نسبی فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در محیط نیتراتی شده است. اما در محیط آمونیوم فعالیت بالای گایاکول پراکسیداز از میزان پراکسیدهیدروژن می‌کاهد و فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در این محیط از محیط نیتراتی کمتر خواهد بود.

اثر نوع نیتروژن بر پراکسیداسیون لیپید: گزارشی که اثر نوع نیتروژن را برروی میزان پراکسیداسیون لیپید بیان نماید در دست نیست. نتایج بررسی‌های ما برروی 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 و۲). 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 برروی ژل پلی‌اکریل‌آمید دناتوره‌کننده (SDS-PAGE).

الف) نشانگرهای وزن مولکولی، ب) تشخیص ایزوزیم‌های مختلف SOD، ج) تیمار ژل با سیانیدپتاسیم ۲ میلی‌مولار، د) تیمار ژل با پراکسیدهیدروژن ۵ میلی‌مولار، نوارهای ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ به‌ترتیب تیمارهای ۲/۸ میلی‌مولار نیترات و صفر میلی‌مولار آمونیوم، ۲/۱ میلی‌مولار نیترات و ۰/۷ میلی‌مولار آمونیوم، ۱/٤ میلی‌مولار نیترات و ۱/٤ میلی‌مولار آمونیوم، ۰/۷ میلی‌مولار نیترات و ۲/۱ میلی‌مولار آمونیوم، و صفر میلی‌مولار نیترات و ۲/۸ میلی‌مولار آمونیوم می‌باشند.



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی آنزیم کاتالاز برروی ژل پلی‌اکریل‌آمید در تیمارهای مختلف نیتروژن.

نتیجه‌گیری

یون‌های آمونیوم و نیترات به‌عنوان منابع نیتروژن از نظر اثر برروی 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 سوپراکسیددیسموتاز 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 سوپراکسیددیسموتاز و فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز در گیاهان برنج تحت تیمارهای متفاوت نیترات و آمونیوم همبستگی منفی معنی‌داری مشاهده می‌شود به‌طوری‌که فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسیددیسموتاز 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 دیسموتاز و تولید پراکسیدهیدروژن همراه است. افزایش تولید پراکسیدهیدروژن در این گیاهان با افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز همراه نیست بنابراین انباشتگی پراکسیدهیدروژن 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 پراکسیدهیدروژن تولید شده توسط آنزیم NADH اکسیداز برروی 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 پلی‌فنل‌اکسیداز افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در تغذیه

با آمونیوم و افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در تغذیه با نیترات را نشان داد اما نتایج آنالیز واریانس تفاوت معنی‌داری را در فعالیت این آنزیم‌ها تحت تیمارهای متفاوت نیترات و آمونیوم نشان نداد. از آنجایی که پراکسیداسیون لیپید یکی از شاخص‌های مهم پیری است به‌نظر می‌رسد عدم تغییر پراکسیداسیون لیپید در تیمارهای متفاوت نیترات و آمونیوم بدین‌معنی 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 به‌دست آمده علت کاهش رشد و بازدهی گیاهان برنج در تغذیه با نیترات در مقایسه با تغذیه با آمونیوم 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]**

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