



بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فلورسانس کلروفیل، میزان کلروفیل (a, b) و کارتنوئید برگ تحت تاثیر دوره غرقابی و رژیم‌های مختلف تغذیه‌ای در گیاه سویا

* محمد خادم‌پیر^۱، سراله گالشی^۲، افشین سلطانی^۲ و فرشید قادری‌فر^۳

^۱دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، استاد و دانشیار گروه زراعت

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: غرقاب به شرایطی گفته می‌شود که قسمتی از ساقه گیاه در زیر سطح آب باشد. غرقابی باعث بسته شدن روزنه‌ها و کاهش غلظت اکسیژن در ریشه گیاه می‌شود، که این عمل تشکیل انواع گونه‌های اکسیژن فعال را در پی دارد. گونه‌های اکسیژن فعال باعث تنش اکسیداتیو می‌شوند. تنش اکسیداتیو در صورت شدید بودن منجر به آسیب غشا، پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود. این عمل باعث نشت مواد از سلول و در صورت ادامه داشتن مرگ سلول را به همراه دارد. از طرف دیگر دوره غرقابی میزان کلروفیل‌های a و b به ویژه کلروفیل b را در گیاه کاهش می‌دهد. مجموع این عوامل باعث کاهش عملکرد در گیاه در اثر دوره غرقابی می‌شود. تغذیه مناسب می‌تواند اثرات مخرب تنش غرقاب را در گیاه کاهش دهد، بنابراین به منظور بررسی اثر تنش غرقابی و رژیم‌های مختلف تغذیه‌ای بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، فلورسانس کلروفیل، میزان کلروفیل (a, b)، کارتنوئید برگ و عملکرد دانه در گیاه سویا (*Glycine max* (L.) Merr) رقم DPX این پژوهش انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت گلدانی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل، در سه تکرار در سال ۱۳۹۱ انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل تیمار تغذیه نیتروژنی در سه سطح (۱-عدم تلقیح به اضافه کود نیتروژنه ۲-تلقیح با باکتری

*مسئول مکاتبه: m.khadempir87@yahoo.com

Bradyrhizobium japonicum) ۳- عدم تلقیح بدون کود)، شدت تنش غرقابی در چهار سطح (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز) و زمان اعمال تنش غرقاب مرحله زایشی (R2) بود. در این آزمایش صفاتی از جمله میزان فعالیت آنتی اکسیدان‌ها (آنزیم کاتالاز، آنزیم پراکسیداز، آنزیم اسکوربات پراکسیداز و آسکوربیک اسید)، میزان کلروفیل (a, b)، کارتنوئید برگ، فلورسانس کلروفیل و عملکرد دانه در گیاه سویا اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج این آزمایش حداکثر فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز در تیمار عدم تلقیح به اضافه کود در صفر روز غرقاب مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز در تمام سطوح تغذیه‌ای تا ۵ روز غرقاب روند افزایشی نشان داد اما در ۱۰ و ۱۵ روز غرقاب روند فعالیت این دو آنزیم رو به کاهش گذاشت. میزان تولید اسید آسکوربیک طی تنش غرقاب (از ۰ تا ۱۵ روز) در هر سه سطح تغذیه نیتروژنی روند افزایشی داشت. میزان فلورسانس کلروفیل، میزان کلروفیل (a, b) و کارتنوئید در طول تنش غرقاب روندی کاهشی را نشان می‌داد. میزان کاهش کلروفیل b با افزایش زمان غرقابی بسیار بیشتر از کلروفیل a بود، که باعث شد نسبت کلروفیل b به کلروفیل a به شدت کاهش پیدا کند. همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که بیشترین میزان عملکرد در تیمار صفر روز غرقاب عدم تلقیح به اضافه کود (۳۲/۳۰ گرم در بوته) و کمترین میزان عملکرد در تیمار ۱۵ روز غرقاب عدم تلقیح بدون کود (۲/۱۰ گرم در بوته) بدست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج این آزمایش نشان‌دهنده رابطه بسیار قوی بین میزان نیتروژن در دسترس گیاه و میزان کارکرد سازوکارهای مقابله با تنش (تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، رنگیزه‌های کمکی و...) در گیاه سویا طی تنش غرقاب است، به این صورت که هرچه میزان نیتروژن بیشتری در اختیار گیاه قرار بگیرد گیاه بهتر می‌تواند غرقابی را تحمل کرده و خسارات ناشی از آن بر عملکرد گیاه را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدانت، تلقیح با باکتری، سویا، غرقاب، فلورسانس کلروفیل

مقدمه

سویا (*Glycine max* (L.) Merr.) گیاهی یک‌ساله از تیره بقولات (Fabaceae) که به صورت بوته‌ای استوار و نسبتاً پر شاخ و برگ رشد می‌کند. دانه خشک سویا دارای ۱۸-۲۵ درصد روغن و ۳۰-۵۰ درصد پروتئین می‌باشد که از لحاظ تولید پروتئین و روغن بسیار با ارزش است (۲۱). غرقاب^۱ به شرایطی گفته می‌شود که قسمتی از ساقه گیاه در زیر سطح آب باشد، اما در صورتی که فقط منافذ بزرگ خاک اشباع از آب باشد آب‌ماندگی^۲ اتفاق می‌افتد (۱۹). گیاهان زراعی برای فتوسنتز و تنفس به تبادلات گازهای اتمسفری نیاز دارند. معمول‌ترین مانع برای انتشار گاز، آب است که محیط ریشه را اشباع می‌کند. در خاک‌های غرقاب فضای مخصوص هوا از آب پر شده و چون انتشار گاز در آب ده هزار مرتبه کاهش می‌یابد، در این حالت اکسیژن موجود در ریزوسفر توسط ریشه تخلیه شده و خاک دارای مشکل کاهش اکسیژن^۳ و یا فقدان اکسیژن^۴ می‌شود. تخلیه اکسیژن محلول در خاک‌های غرقاب بسته به دما، فعالیت تنفسی گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و فراوانی و تداوم اشباع بودن خاک متغیر است، که این امر منجر به کاهش یا عدم وجود اکسیژن طی چند ساعت الی چند روز می‌شود (۱۳). عوامل متعددی موجب غرقاب می‌شوند که برخی از آنها عبارتند می‌باشند از: بارندگی‌های شدید، طغیان رودخانه‌ها، آبیاری زیاد، نفوذ پذیری کم و وجود لایه‌های غیر قابل نفوذ در خاک، عدم وجود زهکش مناسب، سیلاب‌های بهاره و غیره (۱۲).

کاهش غلظت اکسیژن (تنش آنوکسیک) با تشکیل انواع گونه‌های اکسیژن فعال همراه است. گونه‌های اکسیژن فعال باعث تنش اکسیداتیو می‌شوند. تنش اکسیداتیو در صورت شدید بودن منجر به آسیب به غشا، پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود. یورداناوا و همکاران (۲۰۰۳) در جو تحت تنش غرقابی بیان داشتند که فقدان یا کمبود اکسیژن در ریشه گیاه سبب تخریب فتواکسیداتیو برگ‌های جو و افزایش تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال مثل سوپراکسید (O_2°)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل شده که با آسیب به کلروپلاست برگ سبب زردی و پیری برگ می‌شوند (۳۸). فعالیت‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های گیاهی غالباً در مواجهه با تنش‌های محیطی افزایش یافته و از این طریق گیاهان قادرند از خسارات رادیکال‌های آزاد اکسیژن

-
- 1- Flooding
 - 2- Waterlogging
 - 3- Hypoxia
 - 4- Anoxia

ایجاد شده بکاهند. سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلو تانین از جمله آنزیم‌های آنتی اکسیدانت هستند که نقش اساسی در متابولیسم کردن ترکیبات فعال اکسیژن و جلوگیری از خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو را بر عهده دارند (۱۴).

تنش غرقابی سبب کاهش مواد معدنی، کاهش نیتروژن در خاک یا کاهش جذب نیتروژن، افزایش ترکیبات سمی در خاک نظیر متان، اتیلن، یون‌های آهن و منگنز، افزایش عوامل بیماری‌زا، عدم توازن هورمونی، چرخه‌های متابولیکی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (۳۸). وجود عناصر غذایی به‌ویژه نیتروژن به مقدار مطلوب در خاک موجب رشد بهینه گیاه شده که در نهایت باعث کاهش اثرات سوء تنش‌های محیطی می‌شود (۱۳). احمد و همکاران (۲۰۰۲) در ماش تحت تنش غرقابی گزارش نمودند که سلول‌های فتوسنتزی به شدت در معرض تجمع گونه‌های اکسیژن فعال و مواد سمی هستند (۱). برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی با کارایی بالا در گیاه وجود دارد که می‌تواند از گیاه در برابر رادیکال‌های آزاد حمایت کند (۶).

در سلول‌های گیاهی اندامک‌هایی مانند کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها تولید کننده‌ی اصلی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در طی فرآیند فتوسنتز و تنفس می‌باشند. زنجیره انتقال الکترون در غشای تیلاکوئید مهم‌ترین منبع تولید گونه‌های فعال اکسیژن هستند، که سبب پراکسیداسیون چربی‌های غشاء می‌گردد. اولین آنزیم پالایند گونه‌های اکسیژن فعال سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد، که باعث تبدیل O_2 به H_2O_2 (پراکسید هیدروژن) شده و پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز زدوده می‌شود (۱۳).

بررسی‌های انجام شده در گندم (۱۶) و ذرت (۲۷، ۳۹) نشان داد که تنش غرقابی میزان کلروفیل‌های *a* و *b* به‌ویژه کلروفیل *b* را کاهش می‌دهد. سایرین و همکاران (۲۰۰۹) در ماش تحت تنش غرقابی مشاهده نمودند که نسبت کلروفیل *a* به *b* در این گیاه افزایش می‌یابد (۳۰). زرد شدن و کاهش کلروفیل برگ‌های گندم در اثر تنش غرقابی به علت کاهش و زوال رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌باشد (۴۱). زو و لین (۱۹۹۵) در کلزا گزارش کردند که در چهار مرحله رشدی گیاهچه‌ای، ساقه رفتن، گلدهی و پرشدن دانه طی ۳۰ روز غرقابی محتوای کلروفیل برگ به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. آن‌ها بیشترین میزان کاهش کلروفیل برگ را در برگ‌های پایین بوته مشاهده کردند (۴۲). ملک محمدی و همکاران (۲۰۰۵) در گیاه فلفل گزارش نمودند که میزان کلروفیل *b* در گیاهان تحت تیمار ۵ و ۷ روز تنش غرقابی در مرحله گیاهچه‌ای نسبت به شاهد در سطح ۵ درصد کاهش نشان داد (۲۳). همچنین آن‌ها بیان نمودند که تنش غرقابی باعث کاهش معنی‌دار مقدار کارتنوئیدها نسبت به شاهد می‌گردد. توانایی گیاه برای حفظ کلروفیل خود در شرایط غرقاب به عنوان یک مکانیسم تحمل گیاه

تحت این شرایط محسوب می‌شود. در گیاهان حساس کلروز و پیری برگ‌ها، واکنش‌های معمول به تنش غرقاب محسوب می‌شود (۱۰). رسولی و همکاران (۲۰۱۱) بیان داشتند غرقابی باعث کاهش کلروفیل a و b و کارتنوئیدها در گیاه کلزا شده که این کاهش کلروفیل باعث کاهش ظرفیت فتوسنتزی در گیاه می‌شود. همچنین آن‌ها گزارش کردند که علاوه بر کاهش کلروفیل، مقدار کارتنوئیدها نیز به میزان کمتری نسبت به کلروفیل کاهش پیدا می‌کند (۲۹).

به‌طور کلی فلورسانس کلروفیل برگ در تنش‌های محیطی نظیر شوری و نور زیاد افزایش می‌یابد (۱۸). از پارامترهای فلورسانس برای نشان‌دادن مقاومت در برابر تنش‌ها مثل تنش شوری در جو، گندم و ذرت استفاده شده است (۹). احمد و همکاران (۲۰۰۲) در ماش طی هشت روز اعمال تنش غرقاب در دو مرحله رویشی و زایشی گزارش نمودند که نسبت F_v/F_m روند کاهشی را نشان داد و به پایین‌ترین میزان خود در روز هشتم رسید. همچنین بیان داشتند که کاهش سریع نسبت F_v/F_m در اثر تنش غرقابی و کاهش سریع فتوسنتز در ارتباط با بازدارندگی فتوسیستم II می‌باشد (۱). همچنین بلخودجا و همکاران (۱۹۹۹) گزارش نمودند که هیچ تغییر معنی‌داری در عملکرد کوانتوم فتوسنتز در پاسخ به تیمارهای NaCl وجود نداشت و F_v/F_m نشانگر مفیدی برای شوری نبود (۹). هدف از این آزمایش پاسخ به این دو سوال است اول سازوکارهای مقاومتی در گیاه سویا تا چه حد می‌تواند از خسارت تنش غرقاب جلوگیری کند؟ دوم اینکه آیا شدت‌های متفاوت تنش و سطوح مختلف تغذیه-ای در مرحله گلدهی اثرات متفاوتی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فلورسانس کلروفیل، میزان کلروفیل (a, b) و کارتنوئید برگ گیاه سویا می‌گذارند؟

مواد و روش‌ها

این پژوهش در دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان سال ۱۳۹۱ با آرایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار به صورت گلدانی و در هوای آزاد انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل سطوح تغذیه‌ای در سه سطح (۱- تلقیح با باکتری *japonicum* *Bradyrhizobium* ۲- عدم تلقیح به اضافه کود نیتروژنه (اوره) ۳- عدم تلقیح بدون کود نیتروژنه) و فاکتور دوم عبارت از مدت‌های تنش غرقابی (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز) بود. دوره غرقاب بوته‌های سویا در مرحله رشد زایشی (R2) اعمال گردید.

بدین منظور رقم DPX سویا که به‌عنوان رایج‌ترین رقم مورد استفاده کشاورزان می‌باشد، استفاده گردید. بذر مورد نیاز از مرکز کشت و توسعه‌ی دانه‌های روغنی گرگان تهیه گردید که دارای قدرت

جوانه‌زنی بالای ۹۰ درصد بود. گلدان‌های مورد استفاده از جنس پلاستیک، به قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۷ سانتی‌متر و دارای زهکش مناسب بودند. خاک گلدان‌ها دارای بافت شنی رس لوم (۵۰ درصد شن، ۳۰ درصد رس و ۲۰ درصد سیلت) بود. در قسمت کف گلدان سوراخ‌هایی برای تخلیه آب مازاد (زهکشی) ایجاد گردید. در تاریخ ۱۸ اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۱ نسبت به کشت بذور مورد نظر در گلدان اقدام گردید و در ۲۹ اردیبهشت‌ماه پس از استقرار کامل بوته‌ها تعداد آن‌ها با حذف بوته‌های اضافی به ۳ بوته در هر گلدان کاهش داده شد. مراحل فنولوژیک گیاه بعد از اعمال تنش نیز با استفاده از نشانه‌گذاری ۱۰ بوته در هر یک از تیمارها و اندازه‌گیری صفات در این بوته‌ها به‌عنوان شاخص انجام شد در سطح اول (تلقیح بذور با باکتری برادی‌رایزوبیوم ژاپونیکوم) علاوه بر تلقیح بذور قبل از کاشت، ۵۰ کیلوگرم در هکتار کود اوره به‌عنوان آغازگر به خاک گلدان‌ها اضافه شد و در سطح دوم (تغذیه با کود نیتروژنه) کود اوره به میزان ۲۰۰ کیلوگرم در ۴ مرحله به خاک اضافه شد و در سطح سوم تیمار تغذیه نیتروژنی (عدم مصرف کود و باکتری) از هیچ نوع نیتروژن کودی و باکتری تثبیت‌کننده استفاده نگردید.

به منظور اعمال تنش غرقاب، از گلدان‌های تمام تیمارها به تعداد لازم درون تشت‌های بزرگ که قبلاً تعبیه شده بود قرار داده شد، به طوری که تا ارتفاع ۲ سانتی‌متر از ساقه بوته‌ها را آب فرا گرفت. بعد از طی هر یک از تیمارهای دوره غرقاب (۵، ۱۰ و ۱۵ روز) گلدان‌ها از درون آب خارج شده و بعد از نمونه‌گیری به‌منظور اندازه‌گیری پارامترهای مورد مطالعه، نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند اندازه‌گیری مقدار اسیدآسکوربیک به روش ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) انجام گرفت (۴۰). استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز به روش مورتی و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد (۲۴). برای استخراج آنزیم کاتالاز از روش کار و میشرا (۱۹۷۶) استفاده شد (۲۰).

جهت سنجش میزان کلروفیل برگ، از برگ‌های کاملاً توسعه یافته در مرحله (R2) نمونه‌برداری شد و سپس از روش آرنون (۱۹۴۹) و اردکانی و نادور (۲۰۰۹) استفاده گردید (۴، ۳). میزان کلروفیل a و b و کارتنوئید با استفاده از روابط ۱، ۲ و ۳ محاسبه گردید.

$$\text{Chl}_a = 12/7 (A_{663}) - 2/69 (A_{645}) \times \frac{V}{1000 \times W} \quad \text{رابطه (۱)}$$

$$\text{Chl}_b = 22/9 (A_{645}) - 4/68 (A_{663}) \times \frac{V}{1000 \times W} \quad \text{رابطه (۲)}$$

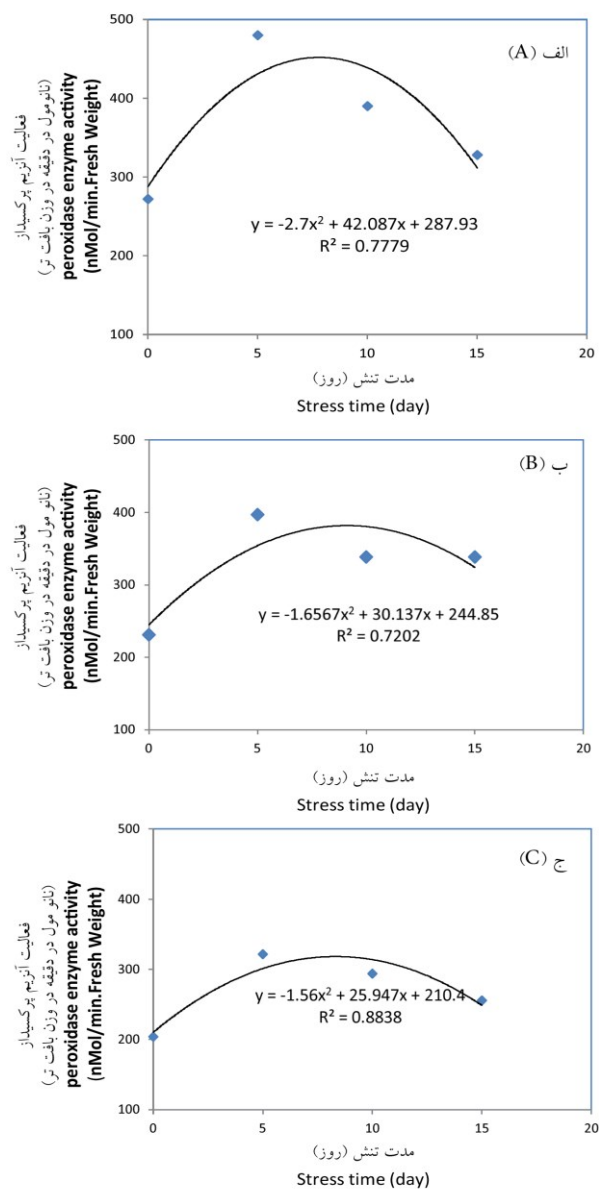
$$C = 7/6 (A_{480}) - 1/49 (A_{510}) \times \frac{V}{1000 \times W} \quad \text{رابطه (۳)}$$

که در این روابط V حجم عصاره مصرف شده، W وزن نمونه و Chl_a ، Chl_b و C به ترتیب غلظت کلروفیل a، b و کارتنوئید برحسب (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) می‌باشد.

اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل: میزان فلورسانس کلروفیل برگ‌ها با استفاده از دستگاه فلورسانس سنچ (OPTI-SCIENCES) مدل OS-30 در انتهای دوره غرقابی در برگ‌های انتهایی کاملاً توسعه یافته اندازه‌گیری شد. داده‌های به‌دست آمده از آزمایش به کمک نرم‌افزار SAS (۳۳) تجزیه و تحلیل شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد، برای مقایسه بین سطوح تغذیه‌ای (معدلات) در طی تنش غرقاب از حدود اطمینان استفاده شد و رسم نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel انجام شد.

نتایج و بحث

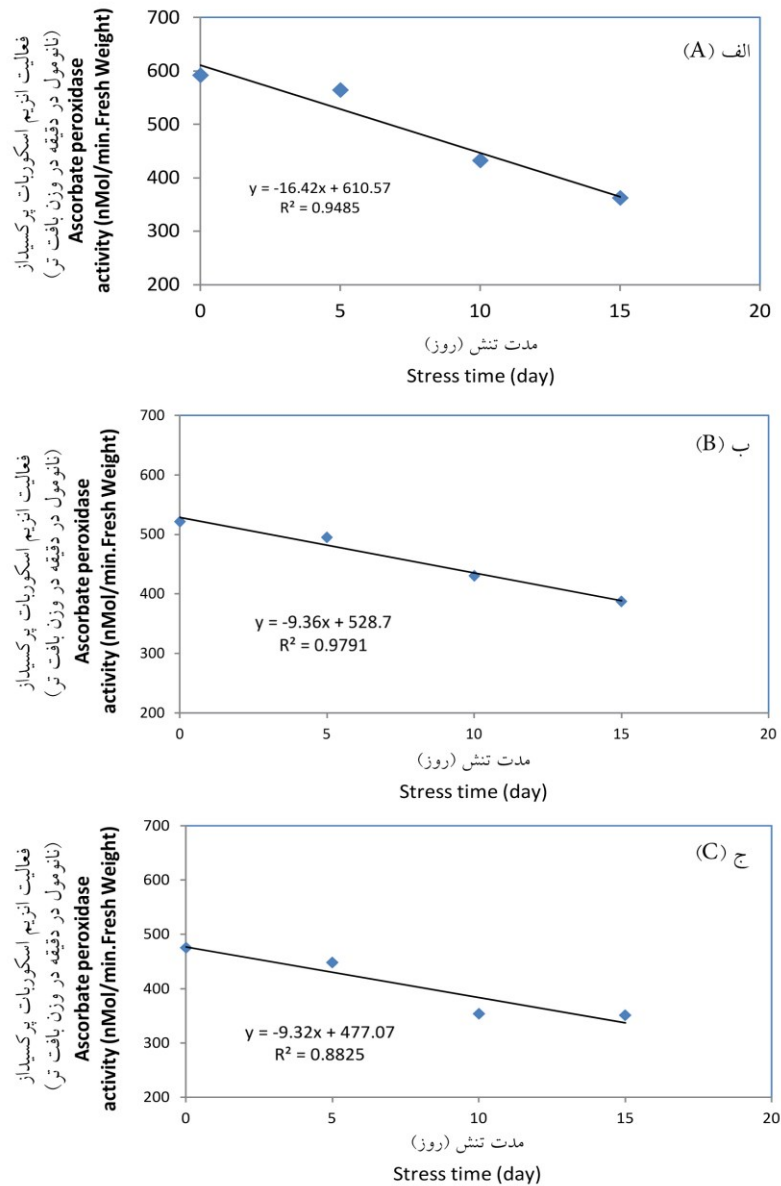
آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم پراکسیداز در طی تنش غرقاب از معادله‌ای درجه دو تبعیت می‌کرد، که در ابتدای تنش با روندی افزایشی و بعد از آن روندی کاهشی داشت. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمارهای عدم تلقیح به اضافه کود، تلقیح بدون کود، عدم تلقیح بدون کود در ۵ روز غرقاب روند افزایشی را نشان داد، اما در تیمار ۱۰ و ۱۵ روز غرقاب روندی کاهشی را نشان داد. همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌گردد، بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار عدم تلقیح به اضافه کود در ۵ روز غرقاب مشاهده (۴۷۹/۶۶) نانومول بر دقیقه بر بافت (تر) و کمترین مقدار فعالیت آنزیم در صفر روز غرقاب تیمار عدم تلقیح عدم کود (۲۰۳/۶۶) نانومول بر دقیقه بر بافت (تر) مشاهده شد. غرقابی سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۵ روز اول گردید احتمال می‌رود که یکی از دلایل افزایش فعالیت پراکسیداز به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد به ویژه پراکسید هیدروژن تحت تنش غرقاب باشد، که مطابق با یافته‌های احمد و همکاران (۲۰۰۲) در ماش تحت تنش غرقاب می‌باشد آنها اظهار داشتند که میزان فعالیت پراکسیداز (خشی‌کننده‌ی رادیکال اکسیژن آزاد) در اوایل تنش غرقاب افزایش یافته و مانع از صدمه به سلول‌های گیاه ماش گردید (۱). بنابراین توازن بین رادیکال‌های آزاد و پالاینده‌ها برای ادامه حیات ضروری می‌باشد. از آنجا که پراکسیداز آنزیمی موثر در تجزیه پراکسید هیدروژن می‌باشند بعد از ۵ روز غرقاب بدلیل افزایش بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال و تخریب ساختار پراکسیداز، میزان پراکسیداز رو به کاهش می‌گذارد. بر اساس اطلاعات جدول ۲ بین سطوح مختلف تغذیه‌ای در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. این امر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار از نظر تولید آنزیم پراکسیداز در طی تنش غرقاب بین سطوح تغذیه‌ای است.



شکل ۱. اثر سطوح مختلف تغذیه‌ای طی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ روز تنش غرقاب بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

(الف: عدم تلقیح به اضافه کود ب: تلقیح بدون کود ج: عدم تلقیح بدون کود)

Figure 1. Effect of different Levels nutrition during 0, 5, 10, 15 days of flooding stress on peroxidase enzyme activity (A: non-inoculated of plus fertilizer. B: inoculation without fertilizer .c: non-inoculated without fertilizer)



شکل ۲. اثر سطوح مختلف تغذیه‌ای طی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ روز تنش غرقاب بر فعالیت اسکوربات پراکسیداز. (الف: عدم

تلقیح به‌اضافه کود ب: تلقیح بدون کود ج: عدم تلقیح بدون کود)

Figure 2. Effect of different Levels nutrition during 0, 5, 10, 15 days of flooding stress on Ascorbate peroxidase activity (A: non-inoculated of plus fertilizer. B: inoculation without fertilizer. C: non-inoculated without fertilizer)

آنزیم آسکوربات پراکسیداز: فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز در طی تنش غرقاب از معادله‌ای خطی پیروی می‌کرد. میزان فعالیت اسکوربات پراکسیداز در تمام سطوح مختلف تغذیه‌ای و مدت‌های مختلف تنش غرقابی (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز) روندی کاهشی داشت. همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌گردد، بیشترین میزان فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز در تیمار عدم تلقیح به‌اضافه کود و در صفر روز غرقاب (۵۹۱/۶۶ نانو مول بر دقیقه بر گرم بافت تر) و کمترین میزان فعالیت آن در تیمار عدم تلقیح بدون کود در ۱۵ روز غرقاب (۳۵۱/۳۳ نانو مول بر دقیقه بر گرم بافت تر) مشاهده شد. مقدار تولید آسکوربات پراکسیداز در طی تنش غرقاب بین سطح تغذیه‌ای عدم تلقیح به‌اضافه کود و دو سطح تغذیه‌ای دیگر دارای اختلاف معنی داری در سطح ۱ درصد بود. اما بین سطح تغذیه‌ای تلقیح بدون کود و سطح تغذیه‌ای عدم تلقیح بدون کود اختلاف معنی‌داری از نظر تولید آسکوربات پراکسیداز در طی تنش غرقاب مشاهده نشد (جدول ۱).

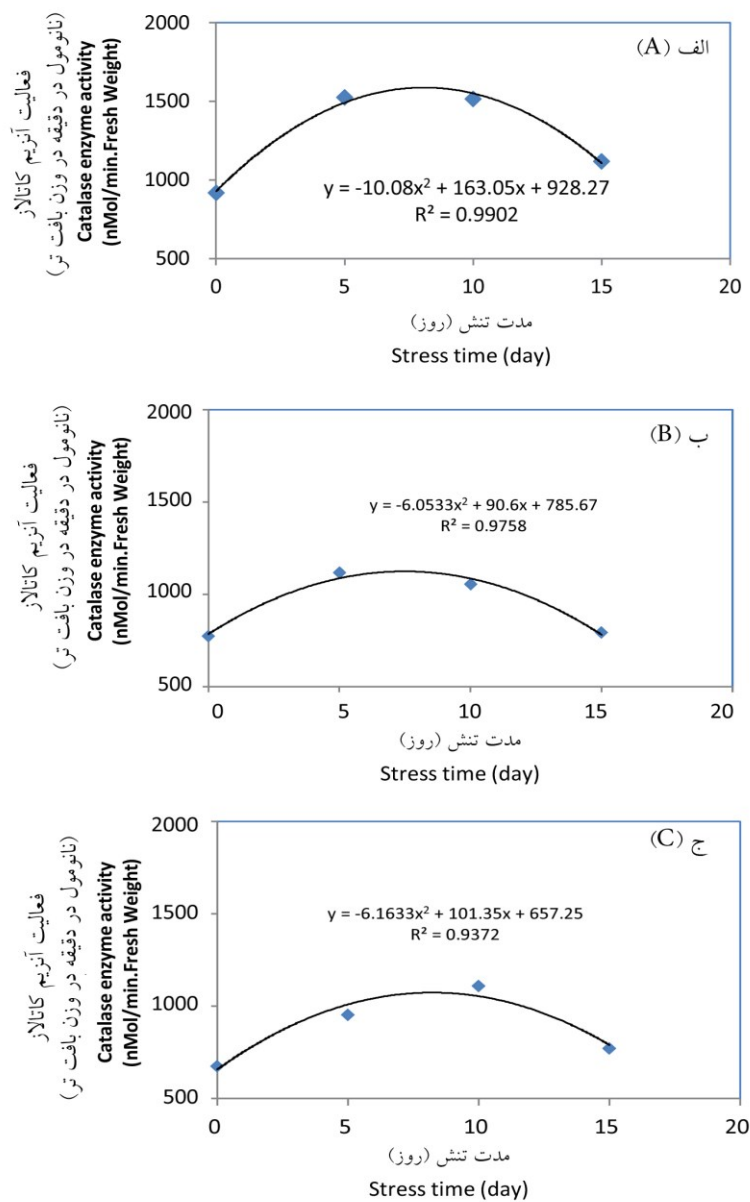
آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز آنزیم‌هایی موثر در تجزیه پراکسید هیدروژن می‌باشند. آسکوربات دهنده‌ی الکترون بوده و سبب کاهش پراکسید هیدروژن به آب می‌شود. رسولی و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش نمودند که با طولانی شدن دوره غرقاب (۷ روز) فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کاهش و فعالیت رادیکال آزاد اکسیژن به طوری چشمگیری (۴-۳ برابر) افزایش یافت (۲۹). آنها بیان داشتند یکی از دلایل افزایش اکسیژن آزاد با طولانی شدن دوره غرقاب به فعالیت بازدارنده آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز مربوط می‌باشد که سبب تشدید تولید اکسیژن آزاد و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌گردد.

آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز در طی تنش غرقاب از معادله‌ای درجه دو تبعیت می‌کرد. همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌گردد، فعالیت آنزیم در تیمار عدم تلقیح به‌اضافه کود و تلقیح بدون کود در ۵ روز غرقاب افزایش پیدا می‌کند و سپس در ۱۰ و ۱۵ روز کاهش پیدا می‌کند، اما در تیمار عدم تلقیح بدون کود در ۵ و ۱۰ روز غرقاب روندی افزایشی دارد و بعد از آن در ۱۵ روز غرقاب میزان فعالیت آنزیم کاهش پیدا می‌کند. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار عدم تلقیح به‌اضافه کود در ۵ روز غرقاب بالاترین میزان (۹۱۶/۶۶ نانو مول بر دقیقه بر بافت تر) را نشان داد و در تیمار عدم تلقیح بدون کود در صفر روز غرقاب کمترین (۶۷۶ نانومول بر دقیقه بر بافت‌تر) میزان فعالیت آنزیم را نشان داد. به نظر می‌رسد با افزایش مدت تنش غرقاب میزان گونه‌های اکسیژن فعال به شدت افزایش پیدا کرده که باعث تخریب ساختار آنزیم کاتالاز شده که این خود باعث کاهش مقدار کاتالاز با

افزایش مدت تنش غرقاب می‌شود. کاتالاز آنزیمی حاوی آهن است که تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را سرعت می‌بخشد. این آنزیم در تمام یوکاریوت‌های هوازی یافت می‌شود و در حذف پراکسید هیدروژن تولیدی در پروکسی‌زوم‌ها (میکرو بادی‌ها) توسط اکسیدازهای دخیل در β اکسیداسیون اسیدهای چرب، چرخه گلی‌اگسالات (تنفس نوری) نقش مهمی دارد (۱۳). تغییرات متعدد در ساختار مولکول‌های بزرگ آنزیم‌ها در اثر فعالیت رادیکال‌های آزاد ممکن است کاهش اثر بخشی آنها را به همراه داشته باشد. این تغییرات شامل از دست دادن یا گرفتن گروه‌های فعال بوده که به واسطه اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل و یا تبدیل اسیدهای آمینه در ساختمان پروتئینی آنزیم‌ها رخ می‌دهد. همچنین ممکن است شکل هندسی آنها تغییر کند، که در قالب ۱- تاخوردگی قسمتی از ساختمان آنزیم و یا از هم باز شدن فراساختاری آنزیم ۲- متراکم شدن به صورت پلی‌مر و یا تقسیم به اجزای کوچکتر می‌باشد (۲). پراکسید هیدروژن توسط کاتالاز زدوده می‌شود. آنزیم کاتالاز این مولکول را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. کاهش فعالیت آنزیم در طی تنش غرقاب مورد تأیید با نتایج احمد و همکاران (۲۰۰۲)، سایرام و همکاران (۲۰۰۹) و یاردوناوا و همکاران (۲۰۰۳) می‌باشد (۱، ۳۰، ۳۸).

بر اساس جدول ۱ میزان تولید کاتالاز در طی تنش غرقاب بین سطوح مختلف تغذیه‌ای دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد بود. با توجه به این نکته می‌توان اشاره کرد که زمانی که نیتروژن به‌صورت آماده در اختیار گیاه قرار می‌گیرد گیاه می‌تواند انرژی بیشتری را صرف تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت برای مقابله با تنش تولید کند.

اسید آسکوربیک: میزان اسید آسکوربیک در طی تنش غرقاب از معادله‌ای درجه دو تبعیت می‌کرد. میزان فعالیت اسید آسکوربیک در تمام سطوح تغذیه‌ای و سطوح مختلف تنش غرقابی (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز) روند افزایشی را نشان داد، بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار عدم تلقیح به‌اضافه کود در ۱۵ روز غرقاب (۳۲/۶۶ درصد اسید اسکوربیک در ۱۰۰ میلی‌گرم بافت تر) و کمترین میزان فعالیت آن در تیمار صفر روز غرقاب (۱۶/۳۳ درصد اسید اسکوربیک در ۱۰۰ میلی‌گرم بافت تر) عدم تلقیح بدون کود بدست آمد (شکل ۴). اسید آسکوربیک (ویتامین ث) یک ویتامین مهم در رژیم غذایی انسان بوده و در بافت‌های گیاهی به وفور یافت می‌شود. برگ‌های سبز نیز حاوی مقادیر مشابه اسکوربات نظیر کلروفیل می‌باشند. بدلیل اهمیت تغذیه‌ای آن، توزیع اسکوربات در گیاهان به صورت



شکل ۳. اثر سطوح مختلف تغذیه‌ای طی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ روز تنش غرقاب بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز. (الف: عدم

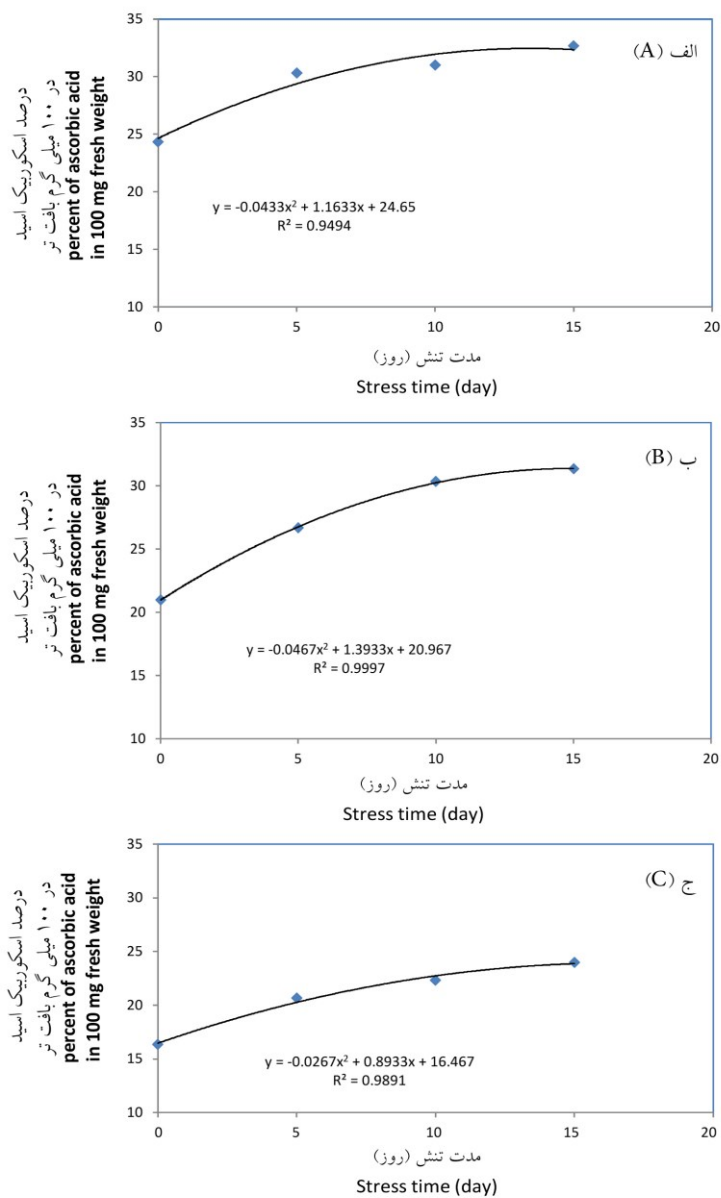
تلقیح به‌اضافه کود ب: تلقیح بدون کود ج: عدم تلقیح بدون کود)

Figure 3. Effect of different Levels nutrition during 0, 5, 10, 15 days of flooding stress on Catalase enzyme activity (A: non-inoculated of plus fertilizer. B: inoculation without fertilizer .c: non-inoculated without fertilizer)

گسترده‌ای اندازه‌گیری شده است، هر چند فعالیت آن در گیاه کمتر مورد توجه واقع شده است. عمل اسکوربات به عنوان احیا کننده بسیاری از رادیکال‌های آزاد از طریق به حداقل رساندن آسیب وارد شده ناشی از تنش‌های اکسیداسیونی می‌باشد (۱۳). میزان تولید اسکوربیک اسید بین سطوح مختلف تغذیه‌ای در طی تنش غرقاب دارای اختلاف معنی داری در سطح ۱ درصد بود (جدول ۱). میزان تولید اسکوربیک اسید در تیمار عدم تلقیح به اضافه کود بیشتر از دو سطوح تغذیه‌ای دیگر است که به نظر می‌رسد هر چه نیتروژن بیشتر در اختیار گیاه قرار بگیرد گیاه توان بیشتری برای تولید اسکوربیک دارد.

اسید اسکوربیک در سمیت‌زدایی رادیکال‌های سوپراکسید، اکسیژن آزاد به‌ویژه پراکسید هیدروژن نقش دارد. همچنین می‌تواند به‌طور مستقیم سبب کاهش انواع اکسیژن فعال ناشی از تنش گردد. اسید اسکوربیک خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن را از طریق مصرف این اکسیژن‌های فعال و تولید مونو‌هیدرو اسکوربات از بروز آسیب به سلول و چربی‌های غشاء جلوگیری می‌نماید. غرقابی فعالیت اسید اسکوربیک (غیرآنزیمی) را نظیر پراکسیداز و کاتالاز کاهش داده بود اما آهنگ کاهش اسید اسکوربیک بسیار کندتر از پراکسیداز و کاتالاز بود (۲۹). یان و همکاران (۱۹۹۶) نیز کاهش کندتری در سیستم غیرآنزیمی اسید اسکوربیک و گلوکاتیون بیان داشتند. آنها بیان داشتند که افزایش پراکسید هیدروژن در برگ‌های تحت تنش کمتر از رادیکال آزاد اکسیژن بود. به جهت اینکه که کاهش سوپراکسید دسموتاز (پالاینده رادیکال اکسیژن) قبل از خنثی‌کننده‌های پراکسید هیدروژن رخ می‌دهد (۳۷).

گزارش‌های متعدد حاکی از آن است که با کاهش فعالیت آنزیم‌های پالاینده اکسیژن فعال، میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد (۷، ۱۱، ۲۸ و ۳۶). در شرایط معمول فعالیت رادیکال اکسیژن آزاد در سلول‌های گیاهی به‌وسیله فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها کنترل می‌شود (۱). آنزیم‌های این سیستم دفاعی شامل سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، اسکوربات پراکسیداز، گلوکاتیون ردوکتاز است و سیستم غیرآنزیمی شامل اسید اسکوربیک، گلوکاتیون، آلفاتوکوفرول (ویتامین E) و کارتنوئید می‌باشند (۱، ۲۹). در شرایط تنش اکسیداتیو موازنه بین تولید رادیکال‌های آزاد و این سیستم دفاعی مختل می‌گردد و در نتیجه میزان رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد.



شکل ۴. اثر سطوح مختلف تغذیه‌ای طی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ روز تنش غرقاب بر درصد آسکوربیک اسید. (الف: عدم

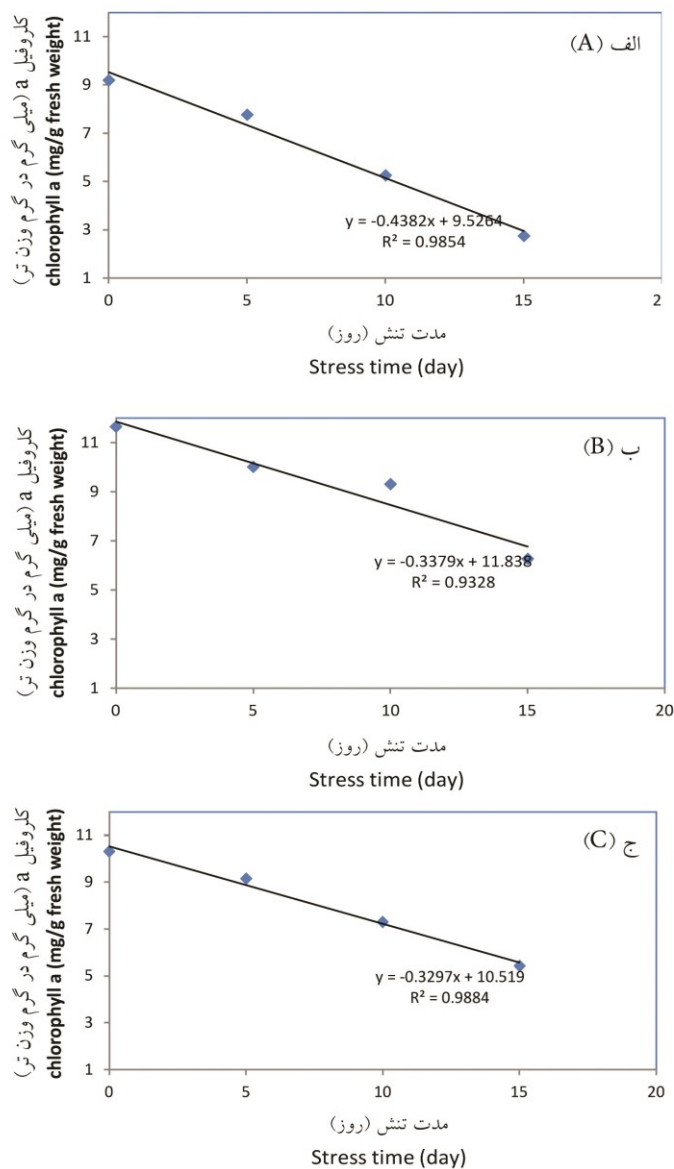
تلقیح به اضافه کود ب: تلقیح بدون کود ج: عدم تلقیح بدون کود)

Figure 4. Effect of different Levels nutrition during 0, 5, 10, 15 days of flooding stress on Percentage of ascorbic acid (A: non-inoculated of plus fertilizer. B: inoculation without fertilizer .c: non-inoculated without fertilizer)

جدول ۱. پارامترهای برآورد شده (a, b, c) با حدود اطمینان و ضریب تبیین (R²) در معادلات برازش داده شده برای آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، اسید آسکوربیک و کاتالاز

Table 1. estimated parameters (a, b, c) with the confidence and the coefficient of determination (R²) in equations fitted for ascorbate peroxidase, peroxidase, ascorbic acid and catalase

R ²	c ± SE	b ± SE	a ± SE	منبع تغییرات (S.O.V)
آسکوربات پراکسیداز				
ascorbate peroxidase				
0/86	-	610/5±25/31	-16/42±2/71	عدم تلقیح به اضافه کود
non-inoculated of plus fertilizer				
0/75	-	528/7±15/61	-9/36±1/67	تلقیح بدون کود
inoculation without fertilizer				
0/79	-	477/0±13/89	-9/33±1/48	عدم تلقیح بدون کود
non-inoculated without fertilizer				
پراکسیداز				
peroxidase				
0/69	-	42/0±7/22	-2/77±1/45	عدم تلقیح به اضافه کود
non-inoculated of plus fertilizer				
0/49	-	30/13±10/62	-1/65±0/67	تلقیح بدون کود
inoculation without fertilizer				
0/65	-	25/94±6/30	-1/56±0/42	عدم تلقیح بدون کود
non-inoculated without fertilizer				
اسید آسکوربیک				
ascorbic acid				
0/86	24/65±1/38	1/16±0/44	-0/04±0/02	عدم تلقیح به اضافه کود
non-inoculated of plus fertilizer				
0/58	20/96±3/72	1/39±1/19	-0/40±0/07	تلقیح بدون کود
inoculation without fertilizer				
0/66	16/46±1/51	0/89±0/49	-0/02±0/03	عدم تلقیح بدون کود
non-inoculated without fertilizer				
کاتالاز				
catalase				
0/94	928/26±50/56	163/05±16/24	-10/08±1/08	عدم تلقیح به اضافه کود
non-inoculated of plus fertilizer				
0/77	785/66±53/06	90/65±17/04	-6/05±1/08	تلقیح بدون کود
inoculation without fertilizer				
0/83	675/25±47/41	101/35±15/22	-6/13±0/97	عدم تلقیح بدون کود
non-inoculated without fertilizer				

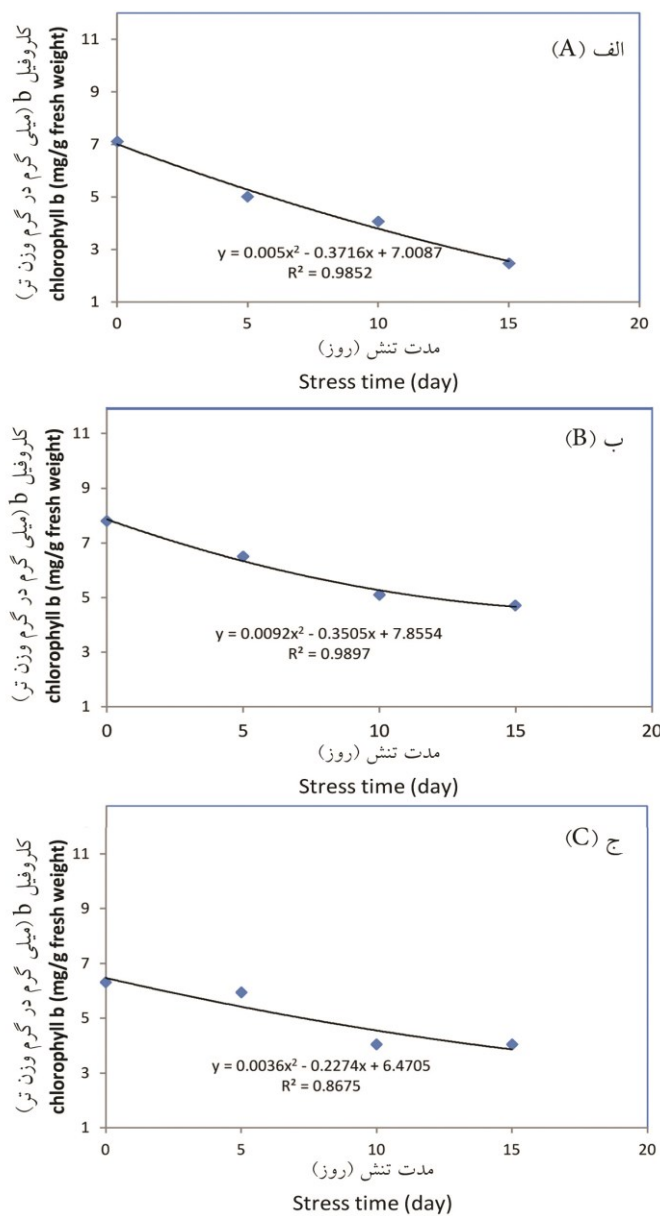


شکل ۵. میزان کلروفیل a طی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ روز تنش غرقاب در سطوح مختلف تغذیه‌ای.

(الف: عدم تلقیح به اضافه کود ب: تلقیح بدون کود ج: عدم تلقیح بدون کود)

Figure 5. The amount of chlorophyll a during 0, 5, 10, 15 days of flooding stress in different Levels nutrition. (A: non-inoculated of plus fertilizer. B: inoculation without fertilizer. C: non-inoculated without fertilizer)

کلروفیل a: میزان کلروفیل a در تیمارهای مختلف تغذیه‌ای و سطوح مختلف غرقاب در شکل ۵ نشان داده شده است. با افزایش سطوح غرقاب میزان کلروفیل a در سطوح مختلف تغذیه‌ای روند کاهشی در طی تنش غرقاب را نشان داد. بیشترین میزان کلروفیل a در سطح تغذیه‌ای تلقیح بدون کود (۱۱/۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین (۲/۷۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) آن مربوط به سطح تغذیه‌ای عدم تلقیح به‌اضافه کود مشاهده شد. براساس اطلاعات جدول (۲) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین سطوح تغذیه‌ای از نظر میزان کلروفیل a وجود دارد. به نظر می‌رسد کاهش میزان کلروفیل a در طی تنش غرقاب در اثر تخریب کلروفیل a توسط رادیکال‌های آزاد باشد که باعث کاهش کلروفیل a می‌شود. در طی تنش غرقاب رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال بدلیل فتو اکسیداسیون افزایش پیدا می‌کند، که باعث تخریب غشاها و پروتئین‌ها می‌شود. رسولی و همکاران (۲۰۱۱)، هانگ و همکاران (۱۹۹۵) و سلامتی و همکاران (۲۰۱۱) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند (۲۹، ۱۷، ۳۱). بررسی‌های انجام شده در گندم (۱۶) و ذرت (۳۹، ۲۷) نشان دادند که تنش غرقابی میزان کلروفیل‌های a و b به ویژه کلروفیل b را کاهش داد. سایرام و همکاران (۲۰۰۹) در ماش تحت تنش غرقابی مشاهده نمودند که نسبت کلروفیل a به b تحت تنش غرقابی افزایش یافته بود. این افزایش به‌دلیل تخریب بیشتر کلروفیل b بود (۳۰). کلروفیل b: میزان کلروفیل b در تیمارهای مختلف تغذیه‌ای و سطوح مختلف غرقاب در شکل ۶ نشان داده شده است. با افزایش سطوح غرقاب میزان کلروفیل b در سطوح مختلف تغذیه‌ای روند کاهشی را نشان داد. بیشترین میزان کلروفیل b در تمام سطوح تغذیه‌ای در تیمار صفر روز غرقاب مشاهده شد (بیشترین میزان آن با ۷/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در سطح تغذیه‌ای تلقیح بدون کود مشاهده شد) و کمترین میزان کلروفیل b در تمام سطوح تغذیه‌ای در ۱۵ روز غرقاب مشاهده شد (کمترین آن با ۲/۴۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مربوط به سطح تغذیه‌ای عدم تلقیح به‌اضافه کود بود). بین سطوح مختلف تغذیه‌ای از نظر تولید کلروفیل a در طی تنش غرقاب اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۲). به نظر می‌رسد کاهش میزان کلروفیل b در طی تنش غرقاب در اثر اکسیداسیون نوری باشد که شبیه تخریب کلروفیل a که باعث کاهش کلروفیل b در طی تنش غرقاب می‌شود. تورانی و همکاران (۲۰۱۳)، اشرف و رحمان (۱۹۹۹) و طهماسبی و همکاران (۲۰۱۱) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند (۳۵، ۵، ۳۴). غرقابی باعث کاهش محتوی کلروفیل برگ‌ها به‌دلیل تخریب کلروپلاست گردید (سیف‌لد و همکاران، ۲۰۰۲).



شکل ۶. میزان کلروفیل b طی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ روز تنش غرقاب

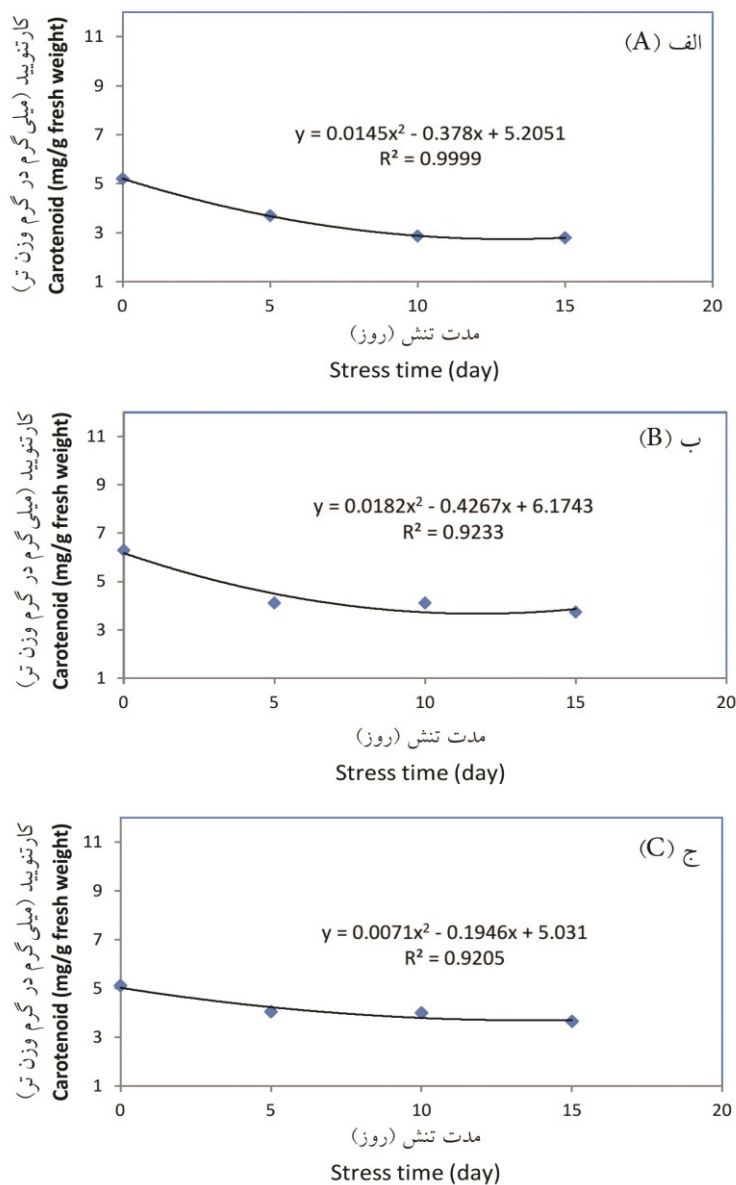
(الف: عدم تلقیح به اضافه کود ب: تلقیح بدون کود ج: عدم تلقیح بدون کود)

Figure 6. The amount of chlorophyll b during 0, 5, 10, 15 days of flooding stress. (A: non-inoculated of plus fertilizer. B: inoculation without fertilizer. c: non-inoculated without fertilizer)

زرد شدن و کاهش کلروفیل برگ‌های گندم در اثر تنش غرقابی به علت کاهش و زوال رنگدانه‌های فتوسنتزی بود (۴۰). زو و لین (۱۹۹۵) در کلزا در چهار مرحله رشدی گیاهچه‌ای، ساقه رفتن، گلدهی و پرشدن دانه طی ۳۰ روز غرقابی محتوی کلروفیل برگ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین میزان کاهش کلروفیل برگ در برگ‌های پایین مشاهده شد (۴۲). ملک محمدی و همکاران (۲۰۰۵) در گیاه فلفل گزارش نمودند که میزان کلروفیل b در گیاهان تحت تیمار ۵ و ۷ روز تنش غرقابی در مرحله گیاهچه‌ای نسبت به شاهد در سطح ۵ درصد کاهش نشان داد (۲۳). همچنین بیان نمودند که تنش غرقابی باعث کاهش معنی‌دار مقدار کارتنوئیدها نسبت به شاهد گردید. یوردانوا و همکاران (۲۰۰۳) در گیاه ذرت تحت تنش غرقابی نتیجه گرفتند که غرقابی کلروفیل a و b و به ویژه کلروفیل b را کاهش می‌دهد (۳۸).

کارتنوئید: میزان کارتنوئید در تیمارهای مختلف تغذیه‌ای و سطوح مختلف غرقاب در شکل ۷ نشان داده شده است. با افزایش مدت غرقاب میزان کارتنوئید در سطوح مختلف تغذیه‌ای روند کاهشی را نشان داد، با این تفاوت که روند کاهشی در کارتنوئید بعد از ۵ روز غرقاب بسیار کم است (تقریباً بعد از ۵ روز غرقاب میزان کارتنوئید ثابت می‌ماند)، اما میزان کاهش کلروفیل a و b در تمام طول تنش غرقاب با شیبی زیاد ادامه دارد. بیشترین میزان کارتنوئید در تمام سطوح تغذیه‌ای در تیمار صفر روز غرقاب مشاهده شد (بیشترین میزان آن در سطح تغذیه‌ای تلقیح بدون کود) و کمترین میزان کارتنوئید در تمام سطوح تغذیه‌ای در ۱۵ روز غرقاب مشاهده شد (کمترین آن مربوط به سطح تغذیه‌ای عدم تلقیح به اضافه کود بود).

میزان کاهش کارتنوئیدها بین سطوح تغذیه‌ای طی تنش غرقاب دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بود (جدول ۲). کارتنوئیدها نقش آنتی‌اکسیدان را در تنش‌ها دارند. در بافت‌های فتوسنتزی کارتنوئیدها اختصاصاً وظیفه‌ی حفاظت از فتوسیستم‌ها را برعهده دارند، کارتنوئیدها از طریق فروکش کردن سریع وضعیت برانگیخته کلروفیل، حفاظت نوری را انجام می‌دهند. همان‌طور که در شکل (۷) مشاهده می‌گردد مقدار کارتنوئیدها کاهش یافته، ولی کاهش آنها نسبت به کلروفیل‌ها کمتر است. کاهش محتوی کارتنوئیدی می‌تواند بدلیل اکسیده شدن آنها توسط اکسیژن فعال و تخریب ساختار آنها باشد. کاهش کارتنوئید به دلیل تنش می‌تواند کاهش کلروفیل را در پی داشته باشد (۲۹).



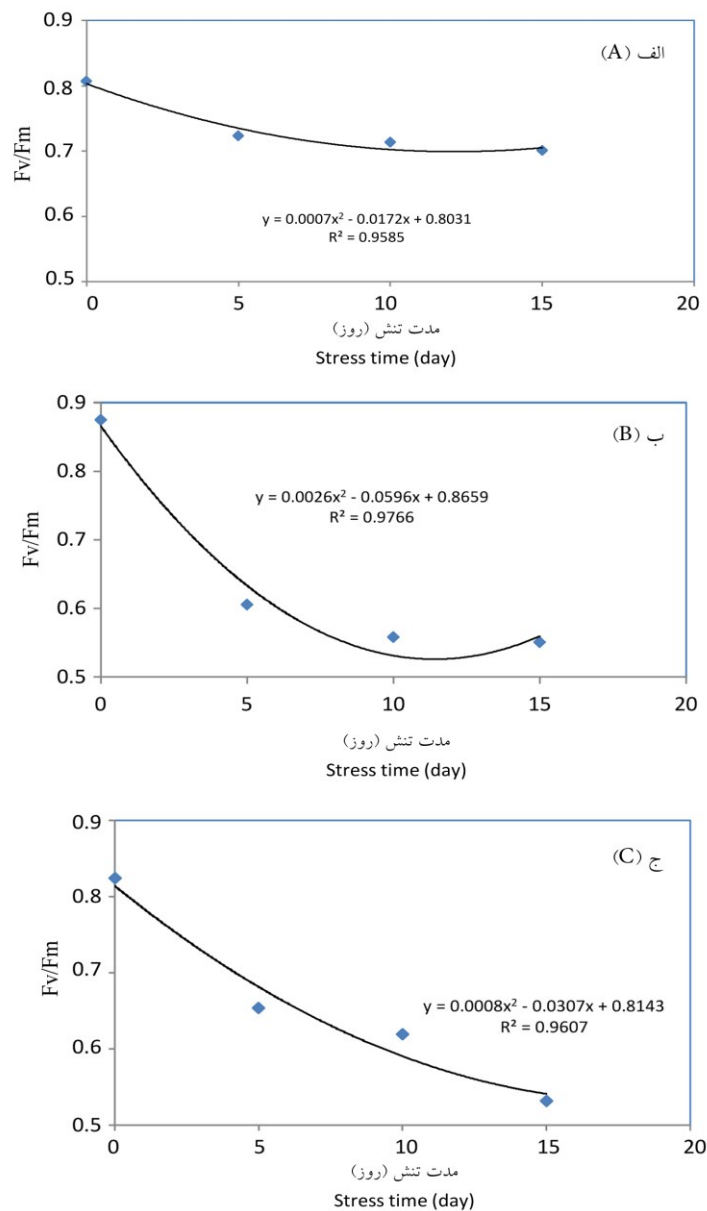
شکل ۷. میزان کارتنوئید طی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ روز تنش غرقاب

(الف: عدم تلقیح به اضافه کود ب: تلقیح بدون کود ج: عدم تلقیح بدون کود)

Figure 7. The amount of Carotenoid during 0, 5, 10, 15 days of flooding stress. (A: non-inoculated of plus fertilizer. B: inoculation without fertilizer .c: non-inoculated without fertilizer)

به‌طور کلی کاهش کلروفیل (a و b) تحت تنش غرقابی ممکن است بدلیل آهسته‌تر شدن سنتز و یا شکسته شدن و تخریب سریع رنگیزه‌های کلروفیلی باشد. تنش باعث ایجاد اختلالات متابولیکی در گیاه از طریق کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو، کاهش فسفوریلاسیون نوری، تغییر نسبت کلروفیل a به کلروفیل b در فتوسیستم دو گردید و در نهایت میزان و سنتز مجدد کلروفیل کاهش یافت. کاهش در میزان کلروفیل همراه با کاهش غلظت نیتروژن در برگ بود، تخریب کلروفیل b بعنوان یکی از اجزای کمپلکس دریافت کننده‌ی نور می‌باشد در نتیجه کاهش کلروفیل b کارایی مراکز فتوشیمیایی بدلیل بازدارندگی نوری کاهش یافت. کاهش کلروفیل b تحت شرایط غرقابی احتمالاً به شدت تحت تأثیر کمپلکس LHCI که حاوی کلروفیل b در غشای تیلاکوئید می‌باشد قرار دارد (۲۹). حفظ رنگیزه‌ها بخصوص کارتنوئیدها در طی تنش غرقاب به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی است، که باعث می‌شود میزان فتو سنتز کمتر کاهش پیدا کند (۳۸).

فلورسانس کلروفیل: حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در طی تنش غرقاب از معادله‌ای درجه دو تبعیت می‌کند. حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم در سطوح مختلف تغذیه‌ای و مدت‌های مختلف تنش غرقابی (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ روز) روند کاهشی را نشان داد (شکل ۸)، که بر اساس جدول شماره (۲) اختلاف معنی‌داری بین سطوح تغذیه‌ای وجود دارد. بالاترین حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در تیمار شاهد تلقیح بدون کود (۰/۸۷) و کمترین آن در تیمار ۱۵ روز غرقاب عدم تلقیح بدون کود (۰/۵۳) مشاهده گردید. برخی محققین کاهش میزان حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II کلروفیل را تحت تنش گزارش نمودند. کاهش مقدار F_m به علت تنش تحت تأثیر قرار گرفتن احیای کوپنین است، که علت این امر هم به تجمع یون‌ها برمی‌گردد (۲۹، ۳۱). برخی نیز کاهش حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II را در اثر بازدارندگی نوری فتوسیستم II و نیز کاهش میزان کلروفیل (شکل ۵ و ۶) بیان کردند (۳۵). به‌نظر می‌رسد که کاهش بیشتر حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در مرحله گلدهی به‌دلیل تخریب بالاتر آن در این مرحله باشد. بر اساس جدول ۲ اختلاف بین سطوح تغذیه‌ای معنی‌دار بود.



شکل ۸. حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) کلروفیل طی تنش غرقابی (۰، ۵، ۱۰، ۱۵ روز).

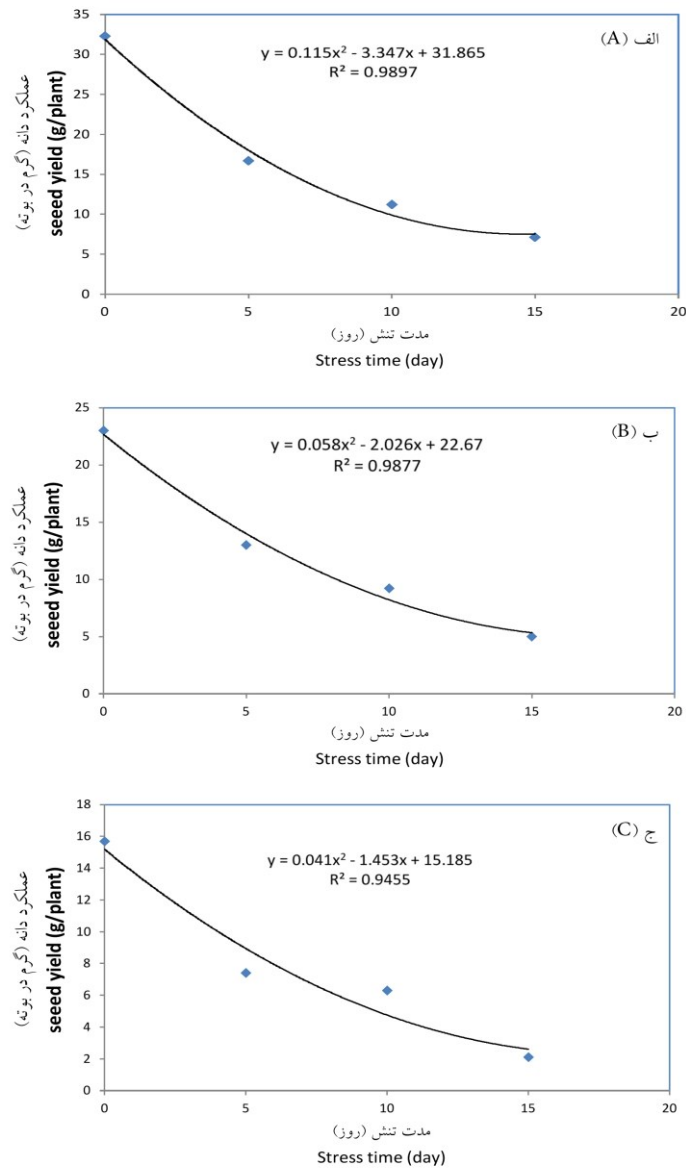
(الف: عدم تلقیح به اضافه کود ب: تلقیح بدون کود ج: عدم تلقیح بدون کود)

Figure 8. The maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm) chlorophyll during 0, 5, 10, 15 days of flooding stress. (A: non-inoculated of plus fertilizer. B: inoculation without fertilizer. C: non-inoculated without fertilizer)

جدول ۲. پارامترهای برآورد شده (a, b, c) با حدود اطمینان و ضریب تبیین (R²) در معادلات برآزش داده شده برای کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئید، Fv/Fm و عملکرد دانه
 Table 2. estimated parameters (a, b, c) with the confidence and the coefficient of determination (R²) in equations fitted for Chlorophyll a, chlorophyll b, Carotenoids, Fv/ Fm and Seed Yield

R ²	c ± SE	b ± SE	a ± SE	منبع تغییرات (S.O.V)
کلروفیل a				
Chlorophyll a				
0.98	-	9.52±0.35	-0.43±0.03	عدم تلقیح به اضافه کود non-inoculated of plus fertilizer
0.92	-	11.83±0.59	-0.33±0.06	تلقیح بدون کود inoculation without fertilizer
0.98	-	10.51±0.23	-0.32±0.02	عدم تلقیح بدون کود non-inoculated without fertilizer
کلروفیل b				
Chlorophyll b				
0.98	7.00±0.50	-0.37±0.02	0.005±0.001	عدم تلقیح به اضافه کود non-inoculated of plus fertilizer
0.98	7.85±0.60	-0.35±0.01	0.009±0.001	تلقیح بدون کود inoculation without fertilizer
0.86	6.40±0.30	-0.22±0.01	0.003±0.001	عدم تلقیح بدون کود non-inoculated without fertilizer
کارتنوئید				
Carotenoids				
0.99	5.20±0.02	-0.37±0.001	0.014±0.001	عدم تلقیح به اضافه کود non-inoculated of plus fertilizer
0.97	6.17±0.54	-0.42±0.171	0.018±0.001	تلقیح بدون کود inoculation without fertilizer
0.96	5.03±0.32	-0.19±0.091	0.007±0.006	عدم تلقیح بدون کود non-inoculated without fertilizer
Fv/ Fm				
0.95	0.8±0.01	-0.01±0.01	0.0007±0.0003	عدم تلقیح به اضافه کود non-inoculated of plus fertilizer
0.97	0.8±0.03	-0.05±0.01	0.002±0.0008	تلقیح بدون کود inoculation without fertilizer
0.96	0.8±0.04	-0.03±0.01	0.008±0.0007	عدم تلقیح بدون کود non-inoculated without fertilizer
عملکرد دانه				
Seed Yield				
0.98	-	-0.09±0.001	30.21±2.4	عدم تلقیح به اضافه کود non-inoculated of plus fertilizer
0.98	-	-0.09±0.001	22.66±1.2	تلقیح بدون کود inoculation without fertilizer
0.92	-	-0.12±0.005	15.86±0.9	عدم تلقیح بدون کود non-inoculated without fertilizer

عملکرد دانه: تغییرات عملکرد دانه در طی تنش غرقاب از معادله‌ی نمایی تبعیت می‌کند (شکل ۹). در این معادله a و b ضرایب معادله هستند که a نشان دهنده عملکرد اولیه در صفر روز غرقاب و b نشان دهنده سرعت نسبی کاهش عملکرد طی تنش غرقاب است. x و y هم به ترتیب نشان دهنده مدت تنش غرقاب و مقدار عملکرد در بوته به گرم هستند. میزان عملکرد دانه در تیمار عدم تنش غرقاب (صفر روز غرقاب) در تیمار عدم تلقیح به اضافه کود، تلقیح بدون کود و عدم تلقیح بدون کود به ترتیب برابر $۳۲/۳۰$ ، ۲۳ و $۱۵/۷۰$ گرم در بوته و در انتهای تیمار ۱۵ روز تنش غرقابی برابر با $۷/۱۰$ ، ۵ و $۲/۱۰$ گرم در بوته بود. بر اساس اطلاعات جدول (۲) تفاوت معنی‌داری بین سطوح تغذیه‌ای برای عملکرد در طی تنش غرقاب وجود داشت. بیشترین میزان عملکرد در تیمار صفر روز غرقاب عدم تلقیح به اضافه کود ($۳۲/۳۰$ گرم در بوته) و کمترین میزان عملکرد در تیمار ۱۵ روز غرقاب عدم تلقیح بدون کود ($۲/۱۰$ گرم در بوته) بدست آمد. میزان عملکرد در بوته در سطح تغذیه‌ای عدم تلقیح به اضافه کود به مراتب بیشتر از دو سطح تغذیه‌ای دیگر (تلقیح بدون کود و عدم تلقیح بدون کود) در صفر روز غرقاب (شاهد) بود که این نشان دهنده دو امر مهم است، اول اینکه زمانی که نیتروژن بصورت آماده در اختیار گیاه قرار می‌گیرد، گیاه انرژی کمتری را صرف اسیمیلایون نیتروژن کرده و انرژی اضافی را صرف افزایش عملکرد می‌کند، دوم اینکه بالا بودن عملکرد در تیمار عدم تلقیح به اضافه کود نسبت به تیمار تلقیح بدون کود نشان دهنده این است که تثبیت بیولوژیک نیتروژن به تنهایی نمی‌تواند تامین کننده نیازهای گیاه برای رسیدن به حداکثر عملکرد باشد. شدت کاهش عملکرد در مرحله‌ی گلدهی به دلیل سقط شدن و ریزش گل و سقط شدن، ریزش و تسریع در زوال غلاف‌ها و کاهش مدت پر شدن دانه بیشتر است. کاهش عملکرد در بوته با افزایش سطح غرقابی توسط محققان دیگری (۳۵، ۲۹، ۲۵، ۲۶، ۱۵، ۸، ۲۲، ۴۲) نیز گزارش شده است.



شکل ۹. عملکرد دانه طی تنش غرقابی (۰، ۵، ۱۰، ۱۵ روز). الف: عدم تلقیح به اضافه کود ب: تلقیح بدون کود ج: عدم تلقیح بدون کود

Figure 9. seed yield during 0, 5, 10, 15 days of flooding stress. (A: non-inoculated of plus fertilizer. B: inoculation without fertilizer. c: non-inoculated without fertilizer)

نتیجه گیری کلی

در شرایط تنش اکسیداتیو که در نتیجه تنش غرقابی ایجاد می شود، موازنه بین تولید رادیکال های آزاد و سیستم دفاعی مختل می گردد و در نتیجه میزان رادیکال های آزاد افزایش می یابد که باعث کاهش فعالیت انتی اکسیدانی آنزیم ها، کلروفیل a, b، کارتنوئیدها و فلورسانس کلروفیل می شود، این کاهش همان طور که در شکل های بالا مشاهده می گردد در تیمار عدم مصرف کود نیتروژنه و عدم تلقیح به بیشترین مقدار رسید. نتایج این تحقیق نشان داد که در تمام فاکتورهای اندازه گیری شده در بالا بیشترین میزان تولید در سطح تغذیه ای عدم تلقیح به اضافه کود بود. این امر نشان دهنده رابطه بسیار قوی بین میزان نیتروژن در دسترس گیاه و میزان کارکرد سازوکارهای مقاومتی (تولید آنزیم های آنتی اکسیدانت، رنگیزه های کمکی و...) در گیاه سویا در طی تنش غرقاب است، به این صورت که زمانی که نیتروژن به صورت کودی در اختیار گیاه قرار می گیرد، گیاه انرژی را که صرف تثبیت بیولوژیک نیتروژن می کند را صرف ساختن بیشتر انواع ترکیبات لازم از جمله پروتئین ها (آنتی اکسیدانت ها، انواع کلروفیل ها و...) می کند. از طرف دیگر با قرار گرفتن نیتروژن به حد مطلوب در اختیار گیاه، میزان تولید پروتئین در برگ افزایش یافته که این باعث می شود گیاه به صورت کارآمدتری با تنش غرقاب مقابله کند. ضمناً باید اشاره شود در این آزمایش در دو تیمار عدم تلقیح به اضافه کود و عدم تلقیح بدون کود گره تثبیت کننده نیتروژن روی ریشه تشکیل نشد، اما در تیمار تلقیح بدون کود گره های تثبیت کننده نیتروژن روی ریشه تشکیل شد و این تنها منبع تامین نیتروژن (بدون کود نیتروژنه استارتر) در این تیمار تغذیه ای در طول فصل رشد بود. این نتایج نشان دهنده آنست که با تأمین نیتروژن مورد نیاز سویا در حد مطلوب در طول فصل رشد می توان تا حد زیادی از خسارات وارده بر گیاه طی تنش غرقاب جلوگیری کرد.

منابع

1. Ahmed, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y., and Sakuratani, T. 2002. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Sci.* 163: 117-123.
2. Akramghaderi, F., Kamkar, B., Soltani, A. 2008. *Seed Science and Technology*. Mashhad University Press. 640p. (In Persian)
3. Ardakani, M. and Nadur, A. 2009. *Principles and Techniques for Plant Scientists*. Tehran University Press. 270p. (In Persian)
4. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-24.

5. Ashraf, M., and Rehman, H. 1999. Interactive effects of nitrate and long-term waterlogging on growth, water relations, and gaseous exchange properties of maize (*Zea mays* L.). *Plant Sci.* 144:35-43
6. Ashraf, M. 2003. Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of Blue panic grass (*Panicum antidotale* Retz.) under salinity or waterlogging. *Plant Sci.* 165: 69-75.
7. Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., and Come, D. 1996. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Plant Physiol.* 97: 04-110.
8. Bange, M.P., Milroy, S.P., and Thongbai, P. 2004. Growth and yield of cotton in response to waterlogging. *Field Crop Res.* 88: 129-142.
9. Belkhodja, R., Morales, F., Abadia, A., Gomez-Aparisa, J., and Abadia, J. 1999. Effects of salinity on chlorophyll fluorescence and Photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under a triple –line – source sprinkler system in the field. *Photosynthetica.* 36: 375-387.
10. Borumand reza, Z, and Nezami, A. 2007. Morphological and physiological responses of plants to Flooding stress. *Zeyton*, 183: 42-43. (In Persian)
11. Chiu, K.Y., Wang, C.S., and Sung, J.M. 1995. Lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes associated with accelerated aging and hydration of watermelon seeds differing in ploidy. *Plant Physiol.* 94: 441-446.
12. Dennis. E.S., Doferus. R., Ellis. M., Rahman. M., Wu, Y., Hoeren. F.U., Grover. A., Ismond. K.P., Good. A.G., and Peacock. W.J. 2000. Molecular strategies for improving water logging tolerance in plants. *J. Exp. Bot.* 51: 89-97.
13. Galeshi, S., Torabi, B., Resam, G.H., RahemiKarizaki, A., and Barzegar, A. 2009. Stress management in plants. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources press. 307 p. (Translated in Persian)
14. Hamrahi, S., Hbib, D., Madani, H., and Mashhadi, M. 2008. Cycocel effect on enzymes and micro-nutrients anti as indices of oxidant stress resistance in oilseed rape. *The new data agricultural.* 3: 2. 14 p. (In Persian)
15. Henshaw. T. L., Gilbert, R.A., Scholberg, J.M.S. and Sinclair, T.R. 2007. Soya Bean (*Glycine max* L. Merr.) Genotype Response to Early-season Flooding: II. Aboveground Growth and Biomass. *Japan J. Crop Sci.* 193: 189-197.
16. Huang, B. R., and Johnson, J.W. 1993. Less waterlogging damage with long season wheats. *Cereal Res. Commun.* 21:337-343
17. Huang, B., Nesmith, D.S., Bridges, D.C., and Johnson, J.W. 1995. Responses of squash to salinity, waterlogging, and subsequent drainage: I. Gas exchange, water relations, and nitrogen status. *J. Plant Nutr.* 56:42-68.
18. James E.K. and Crawford, R.M.M. 1998. Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two Lotus species under flooded conditions. *J Exp Bot.* 49: 599–609.
19. Kafí, m., Borzouei, A., Kamandi, A., and Nabati, J. 2008. Environmental Stress Physiology of Plants. Publications Jihad Mashhad University. 235p. (In Persian)
20. Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57: 315-319

21. Khajepour, M. 2007. Industrial Production Plants. Isfahan University Press. 186 p. (In Persian)
22. Lichtenthaler, H.K., Burkart, S., Schlinder, C. and Stober, F. 1992. Changes in photosynthetic pigment and in vivo chlorophyll fluorescence parameters under photoinhibitory growth conditions. *Photosynthetica*. 27: 343-353.
23. Malekmohammadi, F., Manuchehri klantari, KH., and Torkzade, M. 2005. Flooding effects on the induction of oxidative stress concentrations in pepper plants (*Capsicum annum* L.). *J. Biol. Iran*. 18:2, 110-119. (In Persian)
24. Murthy, U.M.N., Liang, Y., Kumar, P.P., and Sun, W.Q. 2002. Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiate*. *Physiol. Plant*. 21:457-465.
25. Musgrave, M.E., and Ding, N. 2002. Evaluation wheat cultivars for waterlogging tolerance. *Plant Sci*. 38: 90-97.
26. Palta, J.A., Ganjeali, A., Turner, N.C., and Siddique, K.H.M. 2010. Effects of transient subsurface waterlogging on root growth, biomass and yield of chickpea. *Agri. Water Manage*. 97: 1469-1476.
27. Prasad, S., Ram, P.C., and Uma, S. 2004. Effect of waterlogging duration on chlorophyll content, nitrate reductases activity, soluble sugar and grain yield of maize. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 18:1-5.
28. Rao, R.G.S., Singh, P.M., and Rai, M. 2006. Storability of onion seeds and effects of packaging and storage conditions on viability and vigour. *Sci. Hort*. 110: 1-6.
29. Rasoli, F., Galeshi, S., Pirdashti, H., Zeinali, E. 2011. Physiological reaction to the reaction of rapeseed (*Brassica napus* L.) to be flooded. Proceedings of the First Conference of strategies to achieve sustainable agriculture. 2011. Ahvaz. (In Persian)
30. Sairam, R.K., Dharmar, K., Chinnusamy, V., and Meena, R. 2009. Waterlogging induced increase in sugar mobilization, fermentation, and related gene expression in the roots of mungbean (*Vigna radiata*). *J. Plant Physiol*. 166: 602-616.
31. Salamati, N., and Galeshi, S. 2011. Morphological and physiological characteristics of cotton in response to flooding and temperature effects. Proceedings of the Third International Seminar between seed oilseeds and edible oil. (In Persian)
32. Seefeldt, S.S., Kidwell, K.K. and Waller, J.E. 2002. Base growth temperatures, germination rates and growth response of contemporary spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars from the US Pacific Northwest. *Field Crop Res*. 75: 47-52.
33. Soltani, A. 2007. The SAS Statistical Analysis Software Application. Mashhad University Press. 182 p. (In Persian)
34. Tahmasbi, M., Galeshi, S., and Sadegheipour, H. 2011. Morphological and physiological characteristics of wheat in response to flooding and temperature effects. Proceedings of the First Conference of strategies to achieve sustainable agriculture. Ahvaz. (In Persian)
35. Toorani, M., Galeshi, S., Zeinali, E., and GHaderifar, F. 2013. Investigating effect of flooding stress on anti-oxidant enzymes activities in vegetative growth stage of soybean. Second National Conference on Agriculture for Sustainable Development and Healthy Environment. September 12. Hamedan. (In Persian)

36. Torres, M., De Paula, M., Perez-Otaola, M., Darder, M., Frutos, G., and Martinez-Honduvilla, C.J. 1997. Aging-induced changes in glutathione system of sunflower seeds. *Plant Physiol.* 101: 807-814.
37. Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, Sh., and Wang, Z. 1996. Flooding induce membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in Corn leaves. *Plant and Soil* 179:261-268.
38. Yordanova, R., Christork, K., and popora, L.P. 2003. Antioxidative oenzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ. Exp. Bot.* 51: 93- 101.
39. Younis, M.E., El-Shahaby, O.A., NematAlla, M.M., and Bastawisy, Z.M. 2003. Kinetin all eviates the influence of waterlogging and salinity on growth and affects the production of plant growth regulators in *V.sinensis* and *Zea mays*. *Agro. J.* 23:277-85.
40. Zhang, H., Jing, L., Kui, W., Xinzhen, D., and Quanmin, L. 2009. A simple and sensitive assay for ascorbate using potassium ferricyanide as spectroscopic probe regent. *Ann. Biochem.* 388: 40-46
41. Zhang, J. and Davies, W.J. 1987. ABA in roots and leaves of flooded pea plants. *J. Exp. Bot.* 38:649-659.
42. Zhou, W., and Lin, X. 1995. Effects of waterlogging at different growth stages on physiological characteristics and seed yield of winter rape (*Brassica napus* L.). *Field Crop Res.* 44: 103-110.

