تاثیر برهمکنش شوری و نیتریک‌اکساید بر روابط آبی اسپندک (*Zygophyllum fabago* L.)

رویا سعیدی‌فر و نادر چاپارزاده*

تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲۴

چکیده

اغلب تنش‌های محیطی با تاثیر نامطلوب بر روابط آبی موجب آسیب گیاهان می‌شوند. نیتریک‌اکساید به عنوان یک رادیکال آزاد، نقش تعدیل کنندهٔ اثرات تنش‌ها در گیاهان عالی را دارد. در این تحقیق روابط آبی گیاه اسپندک تحت پیش تیمار سدیم نیتروپروساید (صفر و ۰/۲ میلی‌مولار) که مولد نیتریک اکساید می‌باشد و تیمار کلریدسدیم (صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار) و برهمکنش آن‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که تحت تنش شوری کاهش معنی‌دار وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه، محتوای نسبی آب برگ‌ها، میزان آنتوسیانین‌ها، اسیدهای‌آمینه آزاد کل و افزایش معنی‌دار محتوای قندهای محلول و پرولین اتفاق افتاد. با کاربرد ریشه‌ای سدیم نیتروپروساید برون‌زا با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار از اثرات منفی شوری کاسته شد. پتانسیل اسمزی در شرایط شوری منفی‌تر شد و کاربرد سدیم نیتروپروساید آن را شدت بخشید. چنین برآورد می‌شود که با اینکه اسپندک متحمل به شوری است ولی کاربرد سدیم نیتروپروساید آستانه تحمل به شوری را با بهبود روابط آبی افزایش می‌دهد.

واژه های کلیدی: اسپندک، پتانسیل اسمزی، روابط آبی، سدیم نیتروپروساید، شوری، نیتریک‌اکساید

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۱۱۰۶۶۸ ، پست الکترونیکی: nchapar@azaruniv.ac.ir

مقدمه

گیاهان در محیط زندگی خود با انواعی از تنش‌ها از جمله تنش شوری مواجه هستند. اغلب تنش‌ها منجر به کاهش قابل‌ملاحظه در میزان رشد و تولید گیاهان می‌شوند. گیاهان بر حسب توانایی رشد در خاک‌های شور به دو دسته شیرین‌رست (گلیکوفیت) و شوررست (هالوفیت) تقسیم می‌شوند. گیاهان شوررست قادر هستند در غلظت‌های بالای نمک با حفظ فرآیندهای فیزیولوژیکی مقاومت کرده و زنده بمانند. واژه **مقاومت** بیان کننده ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه است که در شرایط تنش، بقاء گیاه را تنظیم می‌کند. در تحقیقات اخیر شورزیستی، با تاکید بر استفاده از آب‌های شور (به ویژه آب دریا)، مطالعات به طرف گیاهان مقاوم به شوری هدایت شده است (۲۶).

اسپندک گیاهی علفی پایا با توزیع گسترده، متحمل به شوری و مقاوم به خشکی، بومی آسیا و خاورمیانه و از تیره اسپند (*Zygophyllaceae*) می‌باشد (۱۹). اکثر گیاهان این تیره در مناطق خشک و نیمه‌خشک (که اغلب هم شور هستند) پراکنده‌اند (۱۷) و قادرند غلظت بالای نمک را بسته به گونه و خصوصیات ژنتیکی خود بدون بروز علائم تنش شوری و با حفظ فرآیندهای طبیعی زیستی تحمل کنند. گیاهان متحمل به شوری، علی‌رغم آثار منفی شوری بر عملکرد گیاه، از مکانیسم‌های متفاوتی به منظور دفع آثار

منفی شوری استفاده می‌کنند که این مکانیسم‌ها از سطح سلول تا واکنش‌های کلی گیاه متفاوت است (۸).

مولکول نیتریک‌اکساید (NO) یک پیامبر زیستی در گیاهان و حیوانات است و در بسیاری از شاخه‌های علمی از قبیل پزشکی، بیوشیمی، فیزیولوژی و ژنتیک دارای زمینه‌های مطالعاتی می‌باشد (۳). انتشار NO توسط گیاهان در گیاه سویا تیمار شده با علف‌کش‌ها، زودتر از جانوران مشاهده شد (۲۰). NO یک رادیکال آزاد واکنش‌پذیر با نیمه عمر نسبتاً طولانی (ثانیه ۵-۳) است. همچنین NO یکی از کوچکترین مولکول‌های دو اتمی با قابلیت انتشار زیاد (محلول در آب، گاز و چربی) بوده و از غشاهای سلولی به راحتی می‌تواند عبور کند. NO به عنوان یک پیام‌رسان - سلولی در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از قبیل خواب دانه، رشد و توسعه برگ، پیری، تنفس، فتوسنتز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و دفاع دخالت می-کند (۱۵).

سدیم نیتروپروساید یک ترکیب آزاد کننده نیتریک‌اکساید (NO) می‌باشد. در تعدادی از تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش شوری کاربرد سدیم نیتروپروساید، اثرات مضر تنش در گیاهان را کاهش می‌دهد (۳۸). اثرگذاری NO مربوط به میل ترکیبی شدید آن به آهن، اکسیژن‌های فعال و گروه‌های تیولی روی پروتئین‌های تنظیمی است (۳۷). NO تشکیل سوپراکسید را تنظیم و پراکسیداسیون لیپیدها را برای حفاظت گیاه از آسیب تنش محیطی مهار می‌کند (۶). همچنین نیتریک‌اکساید در غلظت بالا به عنوان اکسیدان عمل کرده و باعث آسیب به گیاه می‌شود. نقش حفاظتی یا سمی NO بستگی به غلظت و موقعیت عمل آن دارد (۲۲).

امروزه استفاده از گیاهان مقاوم به شوری راهکاری مناسب جهت افزایش بهره‌وری از آب‌ها و زمین‌های شور می‌باشد. اصلاح زمین‌های شور، بکارگیری روش‌های مناسب آبیاری و کشت گیاهان مقاوم و اصلاح گیاهان زراعی برای مقاومت به شوری از جمله روش‌های مقابله با شوری است. بدیهی است که استفاده از گیاهان مقاوم به شوری به همراه مدیریت مناسب، بهره‌برداری از اراضی شور را فراهم می‌سازد. با توجه به اینکه اسپندک گیاهی بیابانی و متحمل به شوری است، لذا می‌توان با ایجاد پوشش سبز برای پدیده بیابان‌زدایی اقدام کرد. شناخت راهکارهای فیزیولوژیکی تحمل شوری، از جمله روابط آبی، انسان را قادر به کشت گیاهان در مناطق شور خواهد ساخت. مهمترین هدف پژوهش حاضر بررسی برهمکنش شوری و مولکول نیتریک‌اکساید بر عملکرد و روابط آبی و اسمزی گیاه اسپندک می‌باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی و شرایط کشت: بذرهای گیاه اسپندک از منطقه آذرشهر در استان آذربایجان شرقی (عرض جغرافیایی ۳۷/۸۱، طول جغرافیایی ۴۵/۹۴ و ارتفاع ۱۳۴۰ متر از سطح دریا) جمع‌آوری شد. پس از جداسازی بذرهای سالم، با محلول هیپوکلریت ۱٪ ضدعفونی و با آب مقطر شستشو شدند. جوانه‌زنی بذرها برروی کاغذ صافی مرطوب به مدت هفت روز صورت گرفت. سپس دانه-رست‌ها به گلدان‌های حاوی پرلیت انتقال یافته و به مدت ۷ روز در شرایط نوری تنظیم شده ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی، رطوبت ۴۰-۳۰ ٪، دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد در آزمایشگاه نگهداری و به طور یک روز در میان تا روز ۱۴ با آب مقطر و محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند. تیمارها شامل دو سطح سدیم نیتروپروساید (SNP) (صفر و ۰/۲ میلی‌مولار) و سه سطح شوری (صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار) بودند. تیمار سدیم نیتروپروساید به مدت ۴۸ ساعت از روز ۱۵ به صورت افزودن به محلول غذایی اعمال شد. بعد از آن تیمارهای مورد نظر شوری تا روز ۲۴ اعمال گردید. گیاهان در روز ۲۵ برداشت شدند.

سنجش پارامترهای رشد: پس از برداشت نمونه‌ها، وزن تر ریشه‌ها و بخش‌های هوایی با ترازوی حساس توزین شدند.

سنجش محتوای نسبی آب برگ (RWC): نمونه‌های برگی پس از جداسازی از گیاه مادر وزن شده (FW) و سپس به مدت ۶ ساعت در محیطی اشباع از آب قرار داده شده و بعد از خشک کردن سطح برگ‌ها، نمونه‌ها دوباره توزین شدند (TW). در ادامه نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به منظور تبخیر آب بافت‌ها قرار گرفته و توزین شدند (DW).

از رابطه زیر برای محاسبه محتوای نسبی آب برگ ها استفاده و نتیجه برحسب درصد گزارش شد.

$$RWC= [(FW-DW)/(TW-DW)] \times 100$$

سنجش پتانسیل اسمزی در تورژسانس کامل و سازگاری اسمزی: قطعات برگی گیاه چند بار منجمد و ذوب شده و بعد از ذوب شدن آب نمونه‌ها در دمای اتاق، شیره سلولی با سانتریفیوژ جداسازی و اسمولالیته شیره سلولی با اسمومتر تعیین شد. برای تعیین پتانسیل اسمزی در تورژسانس کامل (ψ_π^{100}) ابتدا برگ‌ها به مدت ۶ ساعت در آب مقطر قرار گرفته و تمامی مراحل سنجش پتانسیل اسمزی بر روی آن‌ها انجام شد. برای محاسبه پتانسیل اسمزی از معادله وانت هوف در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد و برحسب مگاپاسگال گزارش گردید (۷).

معادله وانت هوف:

$$\Psi\pi^{100}\ (MPa) = 0.002437\ (m^3 \cdot MPa \cdot mol^{-1}) \times osmolality\ (mol/m^3)$$

سازگاری اسمزی از رابطه زیر محاسبه و بر اساس مگاپاسگال گزارش شد که در آن OA: میزان سازگاری اسمزی، ψ_{sc}^{100} : میزان پتانسیل اسمزی گیاه در شرایط شاهد در تورژسانس کامل و ψ_{ss}^{100}: میزان پتانسیل اسمزی در تورژسانس کامل گیاه تحت تنش است (Zang, 1999).

$$OA= \psi_{sc}^{100} - \psi_{ss}^{100}$$

سنجش محتوای آنتوسیانین‌ها: ۰/۲ گرم بافت برگی تر با ۶ میلی‌لیتر مخلوط متانول: اسیدکلریدریک (۱:۹۹) همگن و مخلوط حاصل در محیط آزمایشگاه و تاریکی به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. مایع رویی جمع‌آوری و جذب نوری آن در طول موج ۵۵۰ nm با اسپکتروفتومتر خوانده شد و غلظت نمونه‌ها با استفاده از ضریب خاموشی معادل $33000\ l^{-1}cm^{-1}$ محاسبه و میزان آنتوسیانین‌ها بر حسب $\mu molg^{-1}$ وزن تر گزارش گردید (۱۸).

سنجش محتوای قندهای محلول کل: ۰/۲ گرم بافت برگی تر با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ همگن و به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع رویی با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری قرار گرفت. پس از توقف واکنش در آب یخ میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری و مقدار قند هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز خالص تعیین و بر حسب mgg^{-1} وزن تر گزارش گردید (Roe, 1955).

سنجش محتوای اسیدهای آمینه آزاد کل: ۰/۲ گرم بافت برگی تر در ۶ میلی‌لیتر بافت فسفات پتاسیم سرد (۰/۰۵ مول و pH=۷/۵) همگن و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. مقادیری از مایع رویی با معرف نین‌هیدرین مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری جوشان قرار داده شد. بعد از سرد شدن جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومترتعیین گردید. با رسم منحنی استاندارد با استفاده از گلیسین، مقدار اسیدهای آمینه آزاد بر حسب mgg^{-1} وزن تر گزارش گردید (۱۴).

سنجش محتوای پرولین: مقداری بافت ریشه‌ای یا برگی تر با سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ همگن و برای ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مقداری از عصاره رویی با معرف نین‌هیدرین و اسیداستیک مخلوط و در بن ماری قرار داده شد. پس از توقف واکنش در آب یخ، افزودن تولوئن و تکان مخلوط، میزان جذب نوری فاز

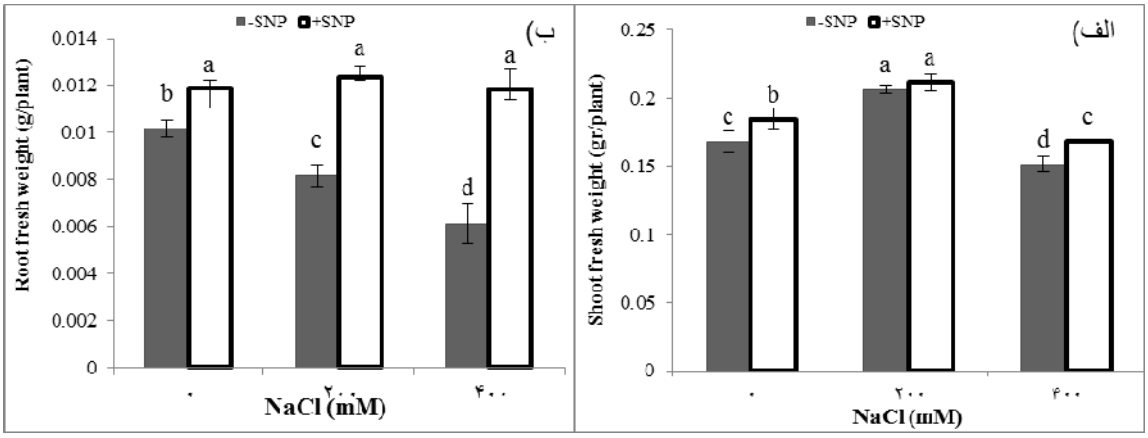
رنگی در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین و مقدار پرولین، با استفاده از منحنی استاندارد پرولین خالص، برحسب $\mu molg^{-1}$ وزن تر محاسبه گردید (۵).

سنجش محتوای ترکیبات فنولی کل: مقداری بافت برگی تر در متانول خالص همگن و به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه با ۰/۹ میلی-لیتر آب مقطر و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۱۵٪ مخلوط شد. پس از گذشت ۳ دقیقه، ۰/۱ میلی‌لیتر معرف فولین به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری با دمای $45^{\circ}C$ قرار داده شد. یک ساعت نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه قرار گرفته و میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج ۷۵۰ nm تعیین شد. میزان ترکیبات فنلی با استفاده از منحنی استاندارد اسیدگالیک تعیین و بر حسب μgg^{-1} وزن تر گزارش گردید (۳۳).

آنالیز آماری و تحلیل داده‌ها: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. برای انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

رشد: تاثیر شوری و سدیم نیتروپروساید بر وزن تر اندام هوایی معنی‌دار و تاثیر برهمکنش این دو از نظر آماری بی-معنی ظاهر شد. تیمار شوری باعث افزایش معنی‌دار وزن تر اندام هوایی در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl نسبت به شاهد شد و کاهش معنی‌دار وزن تر اندام هوایی را در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد و شوری ۲۰۰ میلی‌مولار موجب گردید.



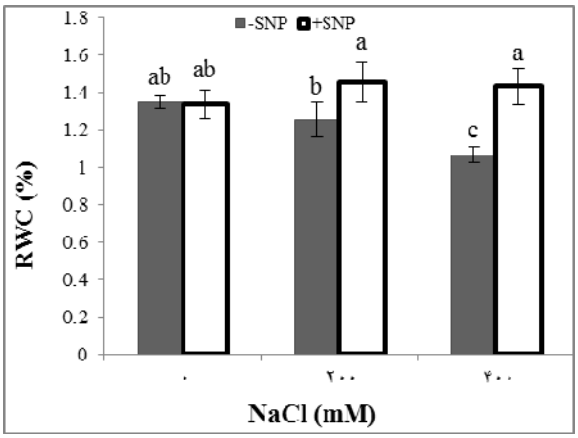
نمودار ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری و SNP بر وزن تر بخش هوایی (الف) و ریشه (ب) اسپندک. داده‌ها میانگین ۴ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.

با حضور سدیم نیتروپروساید با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار در شرایط شور، افزایش معنی‌دار وزن تر اندام هوایی در شرایط شاهد و شوری ۴۰۰ میلی‌مولار نمک مشاهده شد. SNP تاثیر معنی‌داری بر وزن تر اندام هوایی در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار نمک نداشت (نمودار ۱الف). شوری کاهش معنی‌دار وزن تر ریشه را در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد موجب گردید و با حضور سدیم نیتروپروساید با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار در شرایط شوری افزایش معنی‌دار وزن تر ریشه مشاهده شد. تاثیر بر همکنش شوری و SNP بر وزن تر ریشه معنی‌دار ظاهر شد (نمودار ۱ب).

شوری با برهم زدن فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه از جمله تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر به کاهش رشد گیاه می‌شود. کاهش رشد یک نوع سازگاری برای زنده ماندن در شرایط تنش می‌باشد. این کاهش بستگی به غلظت نمک دارد، هرچه غلظت نمک بیشتر باشد کاهش

رشد محسوس‌تر است (۳۱). به دلیل متحمل بودن گیاه اسپندک به شوری، کاهش وزن گیاه در غلظت‌های بالای نمک مشهود است به طوری که در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک حتی افزایش وزن تر اندام‌های هوایی مشاهده شد که احتمال می‌رود به دلیل جذب آب بیشتر توسط بخش‌های هوایی گیاه برای حفظ تورگور سلول باشد. کاهش وزن تر بخش‌های هوایی در این پژوهش با نتایج حاصل از گیاه چغندر قند در انطباق است (۱۲). همچنین افزایش وزن تر و خشک در گیاه ذرت تحت تیمار سدیم نیتروپروساید گزارش شده است (۹). اثر تنظیمی NO بر روی رشد احتمالاً به غلظت NO به عنوان گونه نیتروژن و برهمکنش آن با گونه های فعال اکسیژن ارتباط دارد. NO بر لایه لیپیدی غشاء و دیگر اجزاء سلولی اثر کرده و موجب سیالیت غشاء و همچنین شل شدگی و توسعه دیواره سلولی را می‌شود. افزایش رشد گیاه در غلظت پایین سدیم نیتروپروساید ممکن است با کاهش میزان چوبی شدن دیواره سلول و تسریع توسعه دیواره سلول مرتبط باشد، اما سطح بالای سدیم نیتروپروساید ممکن است نشت غشایی را به علت تنش اکسیداتیو افزایش داده و دیواره سلولی را تخریب نماید، بنابراین رشد گیاه مهار می‌گرد (۳۴). نیتریک اکساید با اثرات چند جانبه خود با اثرات منفی تنش شوری از جمله کاهش رشد مقابله می‌کند.

محتوای نسبی آب برگ‌ها (RWC): تاثیر شوری، سدیم نیتروپروساید و برهمکنش این دو بر RWC معنی‌دار بود. با افزایش غلظت شوری از صفر به ۲۰۰ میلی‌مولار محتوای نسبی آب تغییر معنی‌داری نداشت ولی با افزایش غلظت شوری از ۲۰۰ به ۴۰۰ میلی‌مولار کاهش معنی‌دار محتوای RWC مشاهده گردید. حضور SNP در شرایط شور افزایش معنی‌دار محتوای RWC را در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک موجب گردید و تاثیری بر شاهد نداشت (نمودار ۲). محتوای آب برگ یک نشانگر مفید از تعادل آب گیاه است. به عبارت دیگر پتانسیل آب وضعیت انرژتیک آب درون سلول‌های برگ را نشان می‌دهد. با جذب آب جبران کمبود آب سلول صورت گرفته و رشد اتفاق می‌افتد. وضعیت آبی برگ ارتباط نزدیکی با چندین متغیر فیزیولوژیکی مانند آماس برگ، رشد، هدایت روزنه ای، تعرق، فتوسنتز و تنفس دارد. محتوای آب و پتانسیل آب عمدتاً برای اندازه‌گیری کمبود آب در بافت‌های برگی استفاده می‌شود. از دست دادن آب سلول‌های مزوفیل موجب افزایش سنتز اسید آبسیزیک، انتقال آن به سلول‌های روزنه و بسته شدن روزنه‌ها می‌شود. نتایج پژوهش حاضر مشابه نتایج حاصل از گیاه چغندرقند می‌باشد (۱۶). کاهش محتوای نسبی آب احتمالاً به علت کاهش جذب آب یا آسیب به سیستم ریشه‌ای اتفاق می‌افتد.

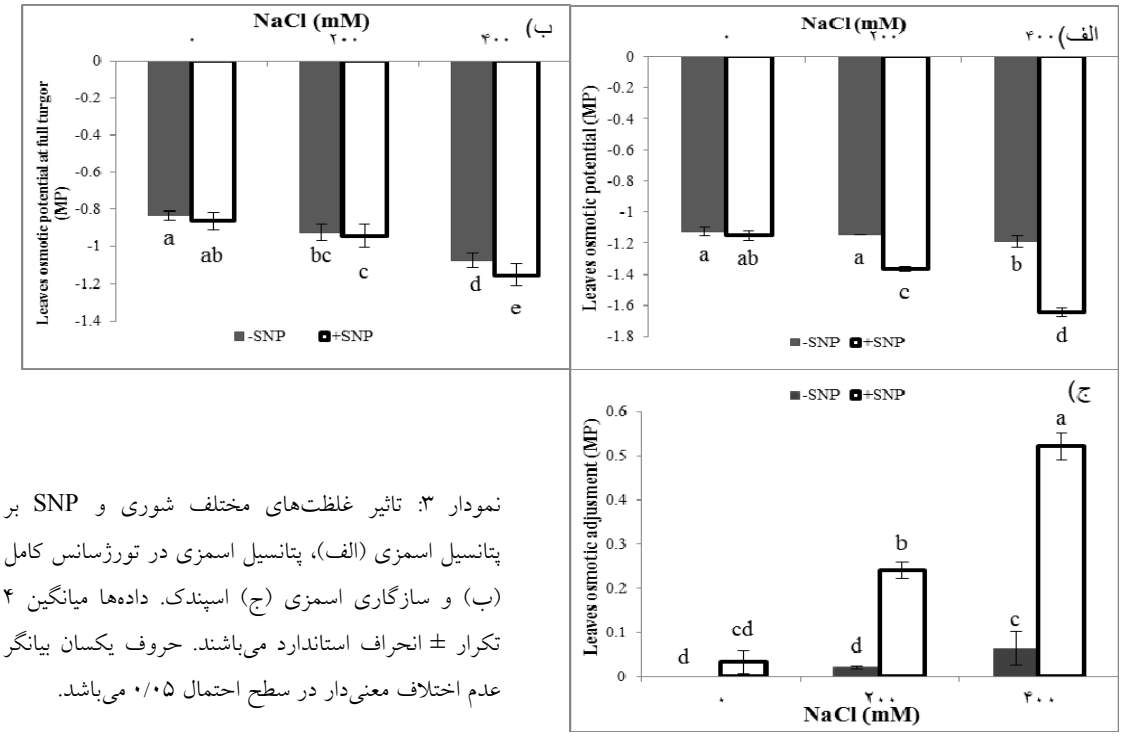


نمودار۲: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری و SNP بر محتوی نسبی آب اسپندک. داده‌ها میانگین ۴ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.

در گیاهان، NO سطوح cAMP را افزایش می‌دهد که این هم به نوبه خود بیان ژن‌های دفاعی گیاه را تحریک می‌کند، NO باعث القاء هورمون آبسیزیک‌اسید می‌شود و این هورمون به‌نوبه‌خود باعث افزایش Ca^{2+} سیتوزولی در سلول‌های نگهبان و نهایتاً منجر به بسته شدن روزنه‌ها می‌شود که از اتلاف آب جلوگیری می‌کند. افزایش محتوای نسبی آب در اثر پیش تیماری سدیم نیتروپروساید در

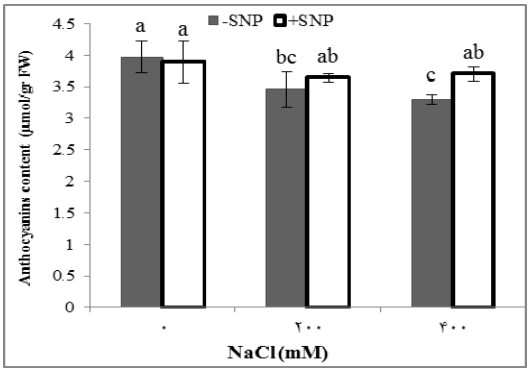
برگ‌های گندم تحت تنش خشکی مشاهده شده است (۱۱).

روابط اسمزی: با افزایش غلظت شوری منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی (نمودار۳ الف) و پتانسیل اسمزی در تورژسانس کامل (نمودار۳ب) مشاهده شد. حضور SNP در شرایط شور منفی‌تر شدن معنی‌دار پتانسیل اسمزی و پتانسیل اسمزی در تورژسانس کامل را به جز در شرایط شاهد موجب گردید. اثر متقابل شوری و سدیم نیتروپروساید بر پتانسیل اسمزی برگ‌ها معنی‌دار و بر پتانسیل اسمزی برگ‌ها در تورژسانس کامل بی‌معنی بود. نتایج این آزمایش افزایش سازگاری اسمزی را در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد نشان داد. تیمار SNP، افزایش سازگاری اسمزی را در شوری ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار موجب گردید و اثر متقابل شوری و SNP نیز معنی‌دار ظاهر شد (نمودار۳ ج). گیاهان هنگام مواجه شدن با تنش شوری پتانسیل اسمزی خود را با جذب Na^+، Cl^- و یا سنتز و تجمع اسمولیت‌های سازگار از قبیل پرولین که در تنظیم اسمزی شرکت می‌کنند، افزایش می‌دهند. منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی منجر به نگهداری تورگور در گیاهان تحت تنش شوری می‌شود. در شرایط شوری بالا گیاهان نیاز به حفظ پتانسیل آب منفی‌تر از خاک و جذب آب برای نگهداری تورگور و رشد دارند. این نیاز اسمولیتی به وسیله افزایش جذب یون‌ها و یا افزایش سنتز مواد و محلول‌های سازگارکننده صورت می‌گیرد. چون یون‌ها اثر سمّی در سیتوپلاسم دارند لذا در واکوول‌ها انبار می‌شوند. برای حفظ تعادل، مواد محلول سازگار در سیتوپلاسم تجمع می‌یابند. این ترکیبات به طور مستقیم در واکنش‌های بیوشیمیایی دخالت نمی‌کنند بلکه با منفی‌تر ساختن پتانسیل آب سیتوپلاسم، موجب جذب آب می‌شوند. این متابولیت‌ها ساختارهای سلولی را نیز حفظ می‌کنند (۲۷). در تایید نتایج ما، منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی و پتانسیل اسمزی در تورژسانس کامل در گیاه تربچه در شرایط شور گزارش شده است (۱).



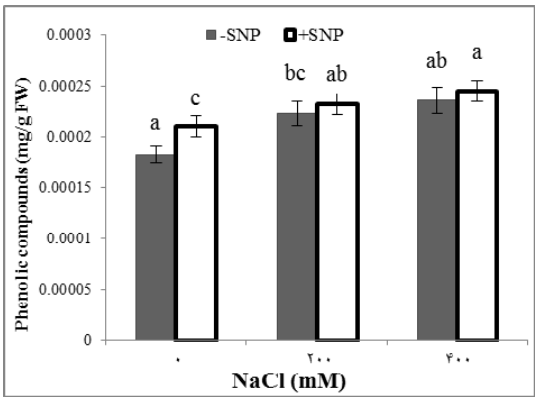
نمودار ۳: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری و SNP بر پتانسیل اسمزی (الف)، پتانسیل اسمزی در تورژسانس کامل (ب) و سازگاری اسمزی (ج) اسپندک. داده‌ها میانگین ۴ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.

آنتوسیانین: در این آزمایش شوری کاهش محتوای آنتوسیانین را در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شرایط شاهد موجب گردید و حضور SNP در شرایط شوری افزایش معنی‌دار این محتوا را فقط در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار نمک موجب گردید. به طور کلی SNP به تنهایی و بر همکنش SNP با شوری تاثیر معنی‌داری بر محتوای آنتوسیانین نداشت ولی تاثیر شوری معنی‌دار بود (نمودار۴). آنتوسیانین‌ها بخشی از گروه بزرگ متابولیت-های ثانویه گیاهی (فلاونوئیدها) هستند. این رنگدانه‌ها در ایجاد مقاومت نسبت به تنش شوری ایفای نقش می‌کنند. تعدادی از ژن‌های درگیر در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها توسط تنش های زیستی و غیرزیستی القا می‌شوند. آنتوسیانین‌ها عملکردهای مختلفی در کاهش اثرات منفی گونه‌های فعال اکسیژن دارند. کاهش میزان آنتوسیانین در برگ‌های نخود گزارش شده است که این کاهش می‌تواند به دلیل کاهش فتوسنتز و در نتیجه کاهش فراهم‌آوری انرژی جهت بیوسنتز آنتوسیانین باشد (۱۰). افزایش آنتوسیانین احتمالاً به دلیل القای فعالیت فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در برگ‌های گیاه ذرت باشد. فعالیت آنزیم PAL می‌تواند توسط هورمون-های گیاهی و مولکول‌های سیگنال، مانند NO القا شود (۲۱).



نمودار ۴: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری و SNP بر محتوای آنتوسیانین اسپندک. داده‌ها میانگین ۴ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.

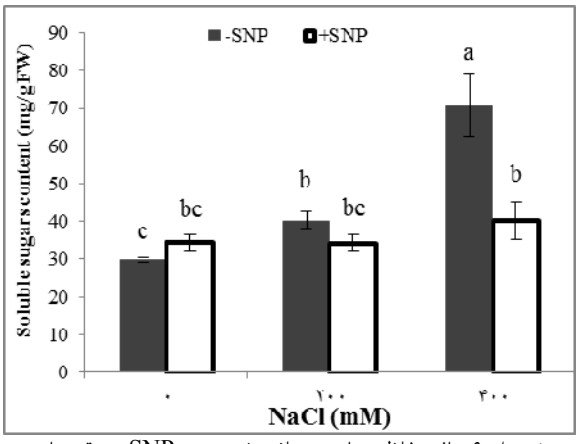
ترکیبات فنولی محلول: شوری افزایش ترکیبات فنولی محلول را در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شرایط شاهد موجب گردید. در شرایط بدون شوری و با حضور SNP افزایش معنی‌دار ترکیبات فنولی محلول در مقایسه با شاهد مشاهده گردید (نمودار ۵). تنش‌های محیطی اغلب باعث انباشتگی فنیل پروپانوئیدها می‌شوند. فنول‌ها از طریق تاثیر بر سیالیت منجر به پایداری غشاهای سلولی شده، انتشار رادیکال‌های آزاد را کم کرده و به مهار واکنش پراکسیداسیون کمک می‌کنند. در کالوس *Ginkgo biloba*، سدیم نیتروپروساید در غلظت‌های بالا موجب کاهش فعالیت آنزیم PAL و در غلظت‌های پائین افزایش فعالیت این آنزیم و در نتیجه افزایش تولید ترکیبات فنولی را موجب گردید (۱۳).



نمودار۵: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری و SNP بر محتوی ترکیبات فنلی محلول اسپندک. داده‌ها میانگین ۴ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.

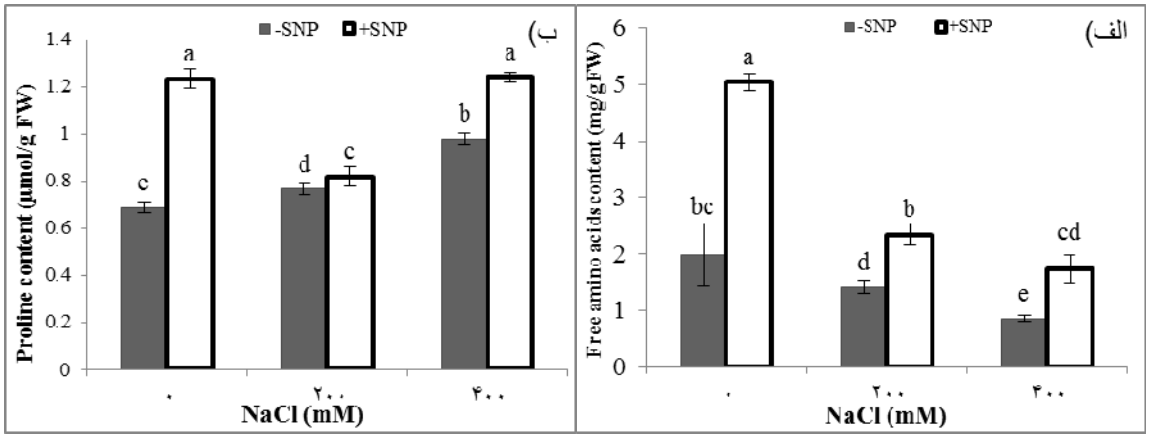
قندهای محلول کل: در این پژوهش شوری بدون حضور SNP افزایش معنی‌دار قندهای محلول (نمودار۶) را در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد موجب گردید. SNP در فقط در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار نمک، میزان قندهای محلول را کاهش معنی‌داری داد. در تایید نتایج ما افزایش قندهای محلول در سویا طی تنش شوری گزارش شده است (۳۲). مهمترین اثر انباشتگی قندهای محلول در گیاهان تحت تنش منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی

و تنظیم اسمزی می‌باشد که این فرآیند منجر به حفظ محتوای آب در سلول‌های گیاه می‌گردد (۲۵). قندها، همچنین پایداری غشاها و پروتئین‌های موجود در سلول را به عهده دارند (۲۴). نتایج مشابهی در دو گونه سالیکورنیا در پاسخ به تنش شوری گزارش شد که در آنها افزایش قندهای محلول با کاهش شدید قندهای نامحلول (مانند نشاسته) همراه بود (۲). ممکن است کاهش قندهای محلول توسط SNP در شرایط شوری، به واسطه اثرات مستقیم نیتریک اکساید بر آنزیم‌های فتوسنتزی و زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی که منجر به مهار فتوسنتز می‌شود، باشد. کاهش قند می‌تواند نتیجه‌ای از کاهش فتوسنتز باشد که موجب کاهش فشار تورگور و در نتیجه بسته شدن روزنه‌ها می‌شود تا از اتلاف آب جلوگیری شود (۲۳). احتمال دارد سدیم نیتروپروساید سیستم آنزیمی هیدرولیز کننده پلی‌ساکاریدها را مهار و سرعت تبدیل قندهای نامحلول به محلول را کاهش می‌دهد.



نمودار ۶: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری و SNP بر قندهای محلول اسپندک. داده‌ها میانگین ۴ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.

اسیدهای‌آمینه آزاد و پرولین: شوری بدون حضور SNP، کاهش معنی‌دار محتوای اسیدهای آمینه آزاد را در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد موجب گردید. حضور SNP افزایش معنی‌دار اسیدهای آمینه آزاد را در همه غلظت‌های نمک موجب گردید (نمودار ۷ الف). اسیدهای‌آمینه آزاد عملکردهای متفاوت در گیاهان دارند. تنظیم جذب یون‌ها، باز شدن روزنه‌ها، سم‌زدائی فلزات سنگین، بیان برخی ژن‌ها و آنزیم‌ها، حذف گونه‌های فعال اکسیژن و نقش اسمولیتی از جمله آنهاست (۲۹). کاهش اسیدهای‌آمینه طی تنش شوری در این پژوهش ممکن است به دلیل مصرف در جهت تولید پروتئین‌ها باشد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). کاهش میزان اسیدهای‌آمینه با تیمار سطوح بالای SNP در مقابل افزایش میزان اسیدهای‌آمینه با سطوح پائین SNP در تنباکو گزارش شده است (۳۵). احتمال دارد NO با نقش علامتی که دارا می‌باشد باعث القای سنتز آبسیزیک‌اسید شده و به تبع آن تولید اسمولیت‌ها، از جمله پرولین و گلایسین بتائین را تحریک شود. پرولین یکی از اسیدهای‌آمینه مهم در سازگاری اسمزی بیان شده است. شوری افزایش معنی‌دار محتوای پرولین در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار نمک نسبت به شاهد را موجب گردید. با حضور SNP، هم در حضور و هم در عدم حضور نمک، افزایش معنی‌دار محتوای پرولین مشاهده شد (نمودار ۷ ب). در تایید نتایج این پژوهش، تجمع پرولین توسط نیتریک اکساید در برگ‌های گیاهچه گندم تحت شرایط شوری گزارش شده است (۳۰). نقش پرولین تحت تنش اکسیداتیو، پایدار کردن کمپلکس‌های پروتئینی، تنظیم pH سیتوزولی و به عنوان جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد. پرولین محافظت کننده اسمزی است که به پایداری غشا طی تنش کمک می‌کند (۲۸). در اغلب تنش‌ها رادیکال‌های آزاد تولید می‌شوند. پرولین با حذف رادیکال هیدروکسیل موجب تشکیل هیدروکسیل پرولین می‌شود. افزایش میزان پرولین در *Suaeda nudiflora* تحت تنش شوری گزارش شده است. احتمال می‌رود این افزایش در ارتباط با فعالسازی بیوسنتز توسط آنزیم پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز و مهار تجزیه پرولین به منظور افزایش پایداری غشا و در نتیجه کاهش اثرات منفی تنش شوری باشد (۳۶).



نمودار۷: تاثیر غلظت‌های مختلف شوری و SNP بر محتوی اسیدهای‌آمینه آزاد (الف) و پرولین (ب) اسپندک. داده‌ها میانگین ۴ تکرار ± انحراف استاندارد می‌باشند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.

جمع‌بندی

به طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تنش شوری در غلظت‌های بالا رشد و بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیک گیاه شوررست اسپندک را تحت تاثیر قرار می‌دهد. کاربرد برون‌زای SNP به عنوان دهنده مولکول نیتریک اکساید ویژگی‌های فیزیولوژیک یاد شده را بهبود بخشید. در شرایط شور، اسپندک با منفی‌تر کردن پتانسیل اسمزی (افزایش فشار اسمزی) موجب تداوم جذب و حفظ آب بافت‌ها می‌گردد. کاربرد SNP به سازگاری اسمزی گیاه کمک شایانی می‌کند. سازگاری اسمزی در اثر جذب یون‌ها ویا تولید اسمولیت‌ها صورت می‌گیرد. براساس یافته‌های پژوهش حاضر، قندهای محلول، ترکیبات فنلی محلول و اسیدآمینه پرولین می‌توانند در این سازگاری دخالت معنی‌دار داشته باشند.

منابع

۱. چاپارزاده، ن. حسین زاد بهبود، ع. و دیلمقانی، ک. ا. ۱۳۹۳. اثر سالیسیلیک بر پارامترهای رشد، اسمولیت‌ها و پتانسیل اسمزی در گیاه تربچه (*Raphanus sativus* L.) تحت تنش شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی، (۱)۲۷: ۴۰-۳۲.

2. Aghaleh, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Razavi, K. (2009). Salt stress effects on growth, pigments, proteins and lipid peroxidation in *Salicornia persica* and *S. europaea*. Biologia Plantarum 53, 243-248.

3. Arasimowicz, M. and Floryszak-Wieczorek, J. 2007. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. Plant Sci. 172:876-887.

4. Ashraf, M., and Harris, P. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science 166, 3-16.

5. Bates, L., Waldren, R., Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and soil 39, 205-207.

6. Beligni, M. V. and Lamattina, L. (1999). Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. Planta 208, 337-344.

7. Chaparzadeh, N., Khavari-Nejad, R., Navari-Izzo, F., Izzo, R. (2003). Water relations and ionic balance in *Calendula officinalis* L. under salinity conditions. Agrochimica 47, 69-79.

8. Ehsanpour, A. A. and Razavizadeh, R. (2005). Effect of UV-C on Drought Tolerance of Alfalfa (*Medicago sativa*) Callus. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 1, 107.

9. Esim, N. and Atıcı, O. (2013). Nitric oxide alleviates boron toxicity by reducing oxidative damage and growth inhibition in maize seedlings (*Zea mays* L.). Australian Journal of Crop Science 7, 1085.

10. Ganjewala, D., Boba, S., Raghavendra, A. S. (2008). Sodium nitroprusside affects the level of anthocyanin and flavonol glycosides in pea

(*Pisum sativum* L. cv. Arkel) leaves. Acta Biologica Szegediensis 52, 301-305.

11. García-Mata, C. and Lamattina, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. Plant Physiology 126, 1196-1204.

12. Ghoulam, C., Foursy, A., Fares, K. (2002). Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. Environmental and Experimental Botany 47, 39-50.

13. Hao, G. P., and Zhang, J. H. (2010). The role of nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plants under abiotic stress. Nitric Oxide in Plant Physiology, 115-138.

14. Harding, V. J. and MacLean, R. M. (1916). The ninhydrin reaction with amines and amides. Journal of Biological Chemistry 25, 337-350.

15. Hayat, S., Hasan, S. A., Mori, M., Fariduddin, Q., Ahmad, A. (2010). Nitric oxide: chemistry, biosynthesis, and physiological role. Nitric Oxide in Plant Physiology, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, 1-15.

16. Hussain, A., Khan, Z. I., Ashraf, M., Rashid, M. H., Akhtar, M. S. (2004). Effect of salt stress on some growth attributes of sugarcane cultivars CP-77–400 and COJ-84. International Journal of Agriculture and Biology 6, 188-191.

17. Hussein, S. R., Marzouk, M. M., Ibrahim, L. F., Kawashty, S. A., Saleh, N. A. (2011). Flavonoids of *Zygophyllum album* L and *Zygophyllum simplex* L. (Zygophyllaceae). Biochemical Systematics and Ecology 39, 778-780.

18. Huylenbroeck, J. M. and Debergh, P. C. (1996). Impact of sugar concentration in vitro on photosynthesis and carbon metabolism during exvitro acclimatization of Spathiphyllum plantlets. Physiologia Plantarum 96,

19. Khan, S. S., Khan, A., Khan, A., Wadood, A., Farooq, U., Ahmed, A., Zahoor, A., Ahmad, V. U., Sener, B., Erdemoglu, N. (2014). Urease inhibitory activity of ursane type sulfated saponins from the aerial parts of *Zygophyllum fabago* Linn. Phytomedicine 21, 379-382.

20. Klepper, L. (1979). Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO_2) emissions from herbicide-treated soybean plants. Atmospheric Environment (1967) 13, 537-542.

21. Kong-Ngern, K., Daduang, S., Wongkham, C., Bunnag, S., Kosittrakun, M., Theerakulpisut, P. (2005). Protein profiles in response to salt stress in leaf sheaths of rice seedlings. Science Asia 31, 403-408.

22. Lamattina L, Garcia-Mata C, Graziano M, Pagnussat G. 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. Ann. Rev. Plant Biol. 54:109-136.

23. Lum, H. K., Lee, C. H., Butt, Y. K. C., Lo, S. C. L. (2005). Sodium nitroprusside affects the level of photosynthetic enzymes and glucose metabolism in *Phaseolus aureu* (mung bean). Nitric Oxide 12, 220-230.

24. Nuccio, M. L., Rhodest, D., McNeil, S. D., Hanson, A. D. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. Current Opinion in Plant Biology 2, 128-134.

25. Parida, A., Das, A. B., Das, P. (2002). NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. Journal of Plant Biology 45, 28-36.

26. Parida, A. K., and Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60, 324-349.

27. Parvaiz, A. and Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. Plant Soil and Environment 54, 89.

28. Pessarakli, M. and Szabolcs, I. (1999). Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors. Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, New York, 1-15.

29. Raiv K. 2002. Role of amino acids in plant responses to stresses. Biologia Plantarum, 45: 481-487.

30. Ruan, H. H., Shen, W. B., Xu, L. L. (2004). Nitric oxide involved in the abscisic acid induced proline accumulation in wheat seedling leaves under salt stress. Acta Botanica Sinica-English Edition- 46, 1307-1315.

31. Shannon, M., and Grieve, C. (1998). Tolerance of vegetable crops to salinity. Scientia Horticulturae 78, 5-38.

32. Sheteawi, S. (2007). Improving growth and yield of salt-stressed soybean by exogenous application of jasmonic acid and ascobin. International Journal of Agriculture and Biology 9, 473-478.

33. Singleton, V. and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16, 144-158.

34. Wang, H., Zhang, S., Zhang, W., Wei, C., Wang, P. (2010). Effects of nitric oxide on the growth and antioxidant response of submerged plants *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. African Journal of Biotechnology 9, 7470-7476.

35. Wei, X., Wang, L., Long, R., Wang, G. (2006). Effects of exogenous nitric oxide, salicylic acid and hydrogen peroxide on free amino acid and soluble protein contents in tobacco leaves Journal of plant Physiology and Molecular Biology 32, 257-260.

36. Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. Plant and Cell Physiology 38, 1095-1102.

37. Zhang, YY, Liu YL. 2004. Source and function of nitric oxide in plants. Acta Bot Boreal Occident Sin. 24: 921–929.

38. Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, Q., Wei, Q., Zhang, W. (2006). Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. Planta 224, 545-555.

Interactive effects of salinity and Nitric oxide on water relations of *Zygophyllum fabago* L.

Saeedifar R. and Chaparzadeh N.

Biology Dept., Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

Many environmental stresses can damage of plants by affecting water relations. Nitric oxide is a diffusible free radical which plays the adjustment role during stresses. In this study, the water relations of *Zygophyllum fabago* L. were investigated under pretreatments of nitroprusside (donor of nitric oxide) at two levels (0 and 0.2 mM) and treatments of sodium chloride at three levels (0 , 200 and 400 mM). The results showed that high salinity significantly decreased the fresh weights of shoots and roots, relative water content, anthocyanins contents, insoluble sugars, free amino acids, and significantly increased, soluble sugars, soluble phenolic compounds and proline. Sodium nitroprusside at the concentration of 0.2 mM improved the negative impacts of salinity. Under salinity condition, osmotic potential was more negative than control and application of sodium nitroprusside enhanced it. We concluded that benefit of exogenous sodium nitroprusside on halophyte *Zygophyllum fabago* plants by increasing tolerance threshold to salinity through improving water relations.

Key words: Nitric oxide, Osmotic potential, Salinity, Sodium nitroprusside, *Zygophyllum fabago* L., Water relations