بررسی اثر تنش خشکی بر روی میزان قندهای محلول، پروتئین، پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز گیاه سویا رقم گرگان ۳

مه لقا قربانلی, مریم نیاکان: دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

چکیده

برای بررسی پاسخ گیاه سویا به تنش خشکی، رقم گرگان ۳ با توجه به مقاومت بهینه آن در مقابل شرایط کم‌آبی برای کشت انتخاب شد. رقم مورد نظر بصورت کشت گلدانی در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و شدت نوری ۱٤ هزار لوکس با دوره نوری ۱٤ ساعته قرار گرفته و با گسترده شدن اولین برگ مرکب، سه تیمار آبی شامل هر روز آبیاری (شاهد) و سه روز در میان (تنش ملایم) و پنج روز در میان (تنش شدید) اعمال شد. گیاهان در تیمارهای مختلف به مدت ۱۵ روز به مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر آبیاری شدند. به منظور بررسی اثر تیمارهای مختلف آبیاری بر روی میزان قندهای محلول، پروتئین کل، پرولین و ترکیبات فنلی، سه بخش ریشه، ساقه و برگ مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی نتایج حاصل از آزمایش بر اساس شاخص میانگین حسابی و انحراف معیار صورت گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در ریشه میزان قندهای محلول و پرولین هم در تنش ملایم و هم تنش شدید افزایش معنی‌داری یافت در حالی که در برگ و ساقه میزان این ترکیبات تنها در تنش شدید روند صعودی معنی‌داری را طی کرد. همچنین اعمال تنش ملایم و شدید خشکی سبب افزایش مقدار پروتئین و ترکیبات فنلی در برگ‌ها شد در حالی که در بخش‌های ریشه و ساقه این روند بر میزان پروتئین تنها در تنش شدید معنی‌دار بود و ترکیبات فنلی در دو اندام یادشده تغییر معنی‌داری را نشان نداد.

مقدمه

بی ثباتی عوامل زیست محیطی گیاه و نیز گوناگون بودن گستره پتانسیل بالقوه در برابر این تغییرات باعث می‌شود که گیاهان واکنش‌های متفاوتی از خود بروز دهند. از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند ساختار و عمل‌کرد گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد, مقدار آب قابل دسترس در گیاه و مسأله اقتصاد آن در سطح سلول است[۲۰], [۲۸],[۲۹],[۳۲]. گفته شده است که گیاهان قادر به تحمل خشکی در محدوده‌ای خاص هستند. تجمع اسمورگولاتورها یکی از مهم‌ترین عوامل حفظ گیاهان در مقابل استرس‌های غیر زنده است در این میان می‌توان به افزایش ترکیباتی نظیر گلوکز، فروکتوز، سوکروز و پلی‌اول‌ها اشاره کرد[۱۳],[۱۹],[۲۱],[۲٤],[٤۱].

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، سویا، قندهای محلول، پروتئین، پرولین، ترکیبات فنلی، نیترات ردوکتاز، کلروفیل

به نظر برخی از پژوهندگان تخریب نشاسته می‌تواند سبب افزایش مونوساکاریدها شود[۱۱]. تخریب پروتئین‌ها و انباشت برخی آمینواسیدهای آزاد در جهت حفظ وتنظیم فشار اسمزی سلول و کاهش سنتز پروتئین در شرایط تنش خشکی نیز مشاهده شده است[۱٦],[۲٦].

برخی از پژوهشگران رکود سنتز پروتئین را به کاهش تعداد پلی‌زوم‌های سلولی نسبت داده‌اند[۸]. گزارش‌های متعددی نیز در باب افزایش پرولین آزاد تحت شرایط تنش اعلام شده است[۱۳],[۳٦]. عده‌ای از محققان علت افزایش این ماده را نتیجه تخریب پروتئین‌ها ذکر کرده‌اند[۳٦]. در مورد اثر افزایش پرولین بر عمل‌کردهای مختلف سلولی نظریات گوناگونی مطرح شده است. برای نمونه, پرولین از طریق حفظ ظرفیت آبگیری در سیتوپلاسم سلول منجر به حفظ ماکرومولکول‌ها از جمله آنزیم‌ها می‌شود تا از تشکیل اشکال نامطلوب و یا قطعه‌قطعه شدن آن‌ها جلوگیری به عمل آید[۲],[۱۲].

ترکیبات فنلی نیز سال‌هاست که به عنوان اجزای سازنده گیاهان شناخته شده و وظایف بسیاری به آن‌ها نسبت داده شده است[۳۰]. ترکیباتی نظیر کومارین، فلاونوئیدها، کاتکول، کافیئک اسید و آنتوسیانیدین از جمله ترکیبات فنلی محسوب می‌شوند. مطابق با نتایج اعلام‌شده واریته‌هایی از گیاه سویا که فاقد ترکیب فنلی کامفرول تری گلیکوزید(K_9) هستند, دارای روزنه‌های متراکم تری بوده و این ارقام قابلیت بهتری در جذب آب وافزایش ضریب هدایت روزنه‌ای از خود نشان می‌دهند. همچنین این گیاهان تحمل بهتری نسبت به تنش آب دارند, اما عمل‌کرد آن‌ها در مقایسه با سایر ارقام روند نزولی را نمایش می‌دهد[٦].

پژوهش‌های متعددی نیز در مورد تأثیر کاهش پتانسیل آبی خاک بر روی پروتئین و رنگیزه‌های موجود در کلروپلاست صورت گرفته است.به عنوان مثال تنش آبی سبب هیدرولیز پروتئین‌های تیلاکوئیدی شده[۹],[۳٥] و تجزیه پروتئین‌های کلروپلاستی منبع با ارزشی برای اشکال قابل تحرک نیتروژن به محض ورود به شرایط تنش است[۲٤].

یکی از آنزیم‌هایی که نقش کلیدی در سلسله فرایندهای مربوط به مصرف نیترات دارد، نیترات ردوکتاز است. شواهد زیادی حاکی از پیچیدگی تنظیم این آنزیم وجود دارد[۱۷],[۳۸]. همچنین پژوهش‌های متعددی دال بر پاسخ‌های متفاوت این آنزیم همراه با تغییر شرایط محیطی موجود است[۱۸],[۳۸]. برای نمونه فعالیت این آنزیم در برگ به تغییرات وضعیت آبی حساس بوده و زمانی که پتانسیل آبی کاهش می‌یابد فعالیت آنزیم نیز مهار می‌شود[۷],[۱۸],[۳۷]. به نظر برخی از محققان این کاهش ناشی از میزان سنتز این آنزیم است که این عامل مهم‌تر از کاهش فعالیت آنزیم در این شرایط است. پژوهش‌هایی که در زمینه سویا صورت گرفته است نشان می‌دهد که تحت شرایط خشکی نیترات به مقدار زیاد در ریشه‌ها تجمع می‌یابد و می‌تواند منبع با ارزشی برای سنتز اسیدهای آمینه تحت شرایط شوری در نظر گرفته شود[۱٦].

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر تنش‌های ملایم و شدید خشکی به روی برخی از فرآیندهای بیوشیمیایی گیاه سویا (رقم گرگان ۳) است تا پاسخ‌های این گیاه در مقابله با تنش خشکی ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

بذر گیاه سویا رقم گرگان ۳ از بخش مرکز دانه‌های روغنی گرگان تهیه و پس از انتخاب بذور همگن به گلدان‌هایی با ابعاد ۱۳/٦×۱۷ سانتی‌مترمربع منتقل شدند. برای هر گلدان مقدار تقریبی دو کیلوگرم خاک با نسبت ٦:۳ از خاک مزرعه و ماسه در نظر گرفته شد. قبل از جوانه‌زنی بذور، گلدان‌ها هر ٤٨ ساعت یک‌بار به میزان ٥٠ میلی‌لیتر آبیاری شدند. بعد از ظهور لپه‌ها، گلدان‌ها به جایگاه خود منتقل شدند. در این جایگاه ۱۲ عدد گلدان به صورت ۳ ردیف ٤تایی(هر ردیف شامل ۳ تیمار آبیاری و هر ردیف عمودی شامل ٤ تکرار از هر تیمار) جای گرفتند. گلدان‌ها تحت شدت نوری ۱٤۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱٤ ساعته و دمای ۲۳±۲°C قرار گرفتند.

با پدیدارشدن اولین برگ مرکب (اولین برگ سه برگچه‌ای) سه تیمار مختلف آبیاری شامل هر روز (شاهد) سه‌روز در میان (تنش ملایم) و ٥ روز در میان (تنش شدید) به مقدار ۱٥۰ میلی‌لیتر ودر ساعت مشخصی از روز به مدت ۱٥ روز بر روی گیاه سویا اعمال شد. در طول مدت تیمار برای کاهش خطای آزمایش و نیز همگن نمودن شرایط رویش برای تمامی گیاهان، گلدان‌های هر بلوک سه بار به طور تصادفی جابه‌جا شدند.

سنجش‌های بیوشیمیایی

سنجش قندهای محلول

برای سنجش مقدار قندهای محلول بر روی وزن خشک ریشه،ساقه و برگ این مراحل طی شد:

قرار دادن نمونه‌ها درالکل۷۰ درصد به مدت یک هفته، برداشتن ۱میلی‌لیتر از محلول رویی، افزودن ۱ میلی‌لیتر فنل ٥ درصدو٥ میلی‌لیتراسید سولفوریک غلیظ به نمونه‌ها و خواندن جذب نوری آن‌هادر طول موج ٤٨٥ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر. رسم منحنی استاندارد با استفاده از گلوکز و تعیین میزان قند بر حسب گرم در گرم وزن خشک نمونه[۲۲].

سنجش پروتئین کل

برای سنجش میزان پروتئین کل در سه اندام ریشه، برگ و ساقه مراحلی در مورد نمو نه‌های خشک آن‌ها طی شد:

همگن‌سازی نمونه‌ها در بافر تریس اسید کلریدریک، سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها، تهیه معرف‌های A (کربنات

سدیم و سود ۰/۵ نرمال) B(سولفات مس ۱ درصد) C(تارتارات سدیم پتاسیم ۲ درصد) D(شامل معرف‌های A و B و C)، معرف E(معرف فولن-سیوکالتو)، افزودن ۱ میلی لیتر معرف D به نمونه، اضافه نمودن ۳ میلی لیتر معرف E، قرار دادن نمونه‌ها در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، خواندن جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ٦٢٥ نانومتر در مقابل شاهد، رسم منحنی استاندارد با استفاده از سرم آلبومین گاوی و محاسبه میزان پروتئنی بر حسب گرم در گرم وزن خشک گیاه[۲۳].

سنجش فنل

برای سنجش فنل در بخش‌های مورد نظر این مراحل طی شد:

توزین نمونه‌های تر و قرار دادن آن‌ها در۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد و جوشاندن آن، سانتریفیوژ نمودن نمونه‌ها, افزودن فولن رقیق شده و کربنات سدیم اشباع، سانتریفیوژ کردن وخواندن جذب در طول موج ٦٤٠ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه رسم منحنی استاندارد با استفاده از کاتکول ومحاسبه میزان ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر[۲۵].

سنجش پرولین

برای تعیین میزان پرولین در سه بخش ساقه، ریشه و برگ این مراحل انجام شد:

توزین نمونه‌های تر و همگن‌سازی آن‌ها در۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفاسالیسیلیک ۳ درصد، سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها و اضافه کردن معرف نین‌هیدرین و اسید استیک خالص به سوپرناتانت، قرار دادن در بن‌ماری به مدت یک ساعت، افزودن تولوئن، جداسازی محلول بالایی و خواندن جذب آن در طول موج۵۲۰ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه، رسم منحنی استاندارد پرولین و محاسبه میزان پرولین اندام‌های گیاه بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر نمونه[۳].

سنجش فعالیت نیترات ردوکتاز

جهت یافتن فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در سه بخش ریشه، ساقه و برگ مراحل زیر انجام شد:

تهیه محلول‌های گریس I و II ، تهیه محلول انکوباسیون(نیترات پتاسیم ۱۵۰ میلی مولار، پروپانول ۳%حجمی و تامپون ۱۰۰ میلی‌مولار)، قرار دادن نمونه گیاهی در لوله آزمایش ایجاد خلأ نسبی از طریق کشیدن هوای داخل لوله با سرنگ، قرار دادن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، برداشتن محلول بالا و افزودن گریس I و II خواندن جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر.

لازم به ذکر است که برای یافتن غلظت نیتریت حاصل از احیای نیترات تحت تأثیر آنزیم نیترات ردوکتازمنحنی استاندارد نیتریت سدیم رسم و سرانجام با استفاده از مقدار نیتریت تولید شده به ازای گرم ماده تر فعالیت آنزیم محاسبه شد[٣٤].

سنجش کلروفیل

همگن سازی نمونه‌های برگی در استن، سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها, جداسازی سوپر ناتانت و خواندن جذب در طول موج‌های ٦٤٥و٦٥٢و٦٦٣ در مقابل شاهد و یافتن مقدار کلروفیل a و b در میلی‌گرم بافت مورد نظربا استفاده از این روابط[٥]:

$$\text{Chl a mg} = \frac{(١٢/٧OD\ ٦٦٣ - ٢/٦OD٦٤٥)V}{١٠٠٠W}$$

$$\text{Chl b mg} = \frac{(٢٢/٩\ OD\ ٦٤٥ - ٤/٤٦٨\ OD٦٥٢)V}{١٠٠٠\ W}$$

روش محاسبه آماری

بررسی نتایج حاصل از آزمایش بر اساس شاخص میانگین و انحراف معیار صورت گرفته است. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق واریانس دو عاملی و میانگین انجام گرفت. همچنین مقایسه بین تیمارها و شاهد بر اساس آزمون دانکن[١] در سطوح ٥ درصد ($P\leq\%٥$) یک درصد ($P\leq\%١$)، با برنامه آماری Mstat c محاسبه شد.

نتـایج

در پژوهش حاضر افزایش شدت تنش خشکی روند صعودی معنی‌داری را در مقدار قندهای محلول برگ، ساقه و ریشه گیاه سویا نشان می‌دهد. (جدول١،شکل١). همچنین داده‌های حاصل از سنجش پروتئین کل در برگ ،تأثیر سطوح مختلف آبیاری را بر روی مقدار ترکیبات یاد شده نمایش می‌دهد که هم در تنش ملایم و هم در تنش شدید این اثر مثبت است در حالی که میزان پروتئین در ساقه و ریشه تنها در تنش شدید افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان می‌دهد(جدول١، شکل٢). مطابق با نتایج به دست آمده, مقدار پرولین برگ و ساقه در گیاهان شاهد و تحت تنش ملایم تفاوت معنی‌داری را آشکار نساخت, اما تنش شدید به طور چشمگیری بر میزان این ماده اثر گذاشت(جدول١، شکل٣). در ریشه میزان پرولین هم در تنش ملایم و هم در تنش شدید روند صعودی معنی‌داری را نسبت به شاهد طی کرد(جدول٣،شکل٣). داده‌های حاصل از اثر خشکی بر مقدار ترکیبات فنلی حاکی از عدم اختلاف معنی‌دار آن در ساقه و ریشه در سه تیمار مختلف آبیاری است. در حالی‌که در برگ‌ها میزان این ترکیبات تنها در تنش شدید خشکی افزایش چشمگیری را نسبت به شاهد نشان می‌دهد(جدول ١، شکل٤). در سنجش میزان کلروفیل a در برگ رقم گرگان٣ تنش ملایم اثر قابل توجهی بر مقدار این رنگیزه گذاشت. همچنین با توجه به داده‌های حاصل از سنجش میزان کلروفیل b تیمارهای تنش آبی کاهش معنی‌داری را

١-Duncan's multiple range test

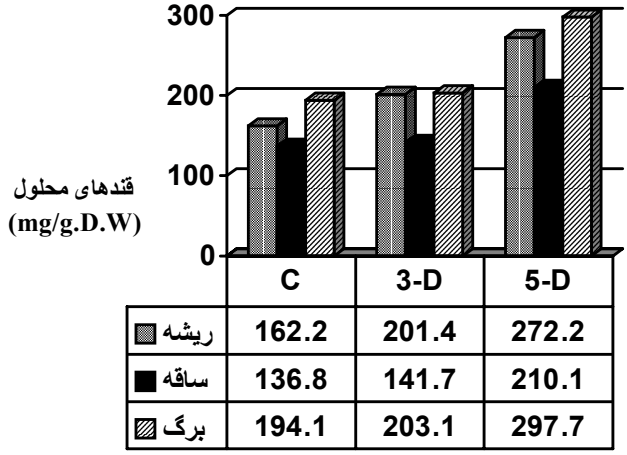
نسبت به گیاه شاهد نشان داد(جدول۲). همچنین کاهش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز از سطح اولیه آن در برگ گیاهان شاهد بر حسب میلی‌مول نیترات احیا شده به ازای هر گرم وزن تر نسبت به دو تنش ملایم و شدید معنی‌دار بوده که این امر حساسیت آنزیم را در تنش ملایم و شدید نمایش می‌دهد(جدول۱، شکل ۵).

جدول۱- اثر تیمارهای مختلف آبی برروی مقدار قندهای محلول، پروتئین کل، پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت نیترات ردوکتاز در برگ سویا رقم گرگان ۳. اعداد نشانگر $X \pm SE$ هستند

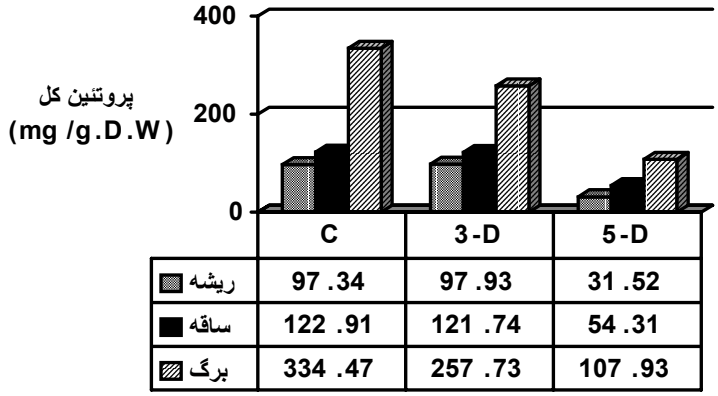
ماده مورد آزمایش	اندام	پنج روزدرمیان آبیاری D -۵	سه روز در میان آبیاری D -۳	شاهد(C)
قند (mg/g.F.W)	برگ	۲۹۷/۷ ± ۰/۰۰۱ a)	۲۰۳/۱ ± ۰/۰۰۳ b)	۱۹٤/۱ ± ۰/۰۰۲ b)
	ساقه	۲۱۰/۱ ± ۰/۰۰۱ a)	۱٤۱/۷ ± ۰/۰۰۱ b)	۱۳٦/۸ ± ۰/۰۰۲ b)
	ریشه	۲۷۲/۷ ± ۰/۰۰۳ a)	۲۰۱/٤ ± ۰/۰۰۳ c)	۱٦۲/۲ ± ۰/۰۰۲ d)
پروتئین (mg/g.D.W)	برگ	۱۰۷/۹ ۰±/۸۵ e)	۲۵۷/۷۳ ± ۳/۲۵٦ c)	۳۳٤/٤۷ ± ٤/۷۸ a)
	ساقه	۵٤/۳۱ ± ۰/۵٦۲ d)	۱۲۱/۷٤ ± ۰/٤۸۹ c)	۱۲۲/۹۱ ± ۱/۱۵ a)
	ریشه	۳۱/۵۵ ± ۱/۳۸۱ d)	۹۷/۹۳ ± ۰/٤۷٤ a)	۹۷/۹۳ ± ۰/٤٦۲ a)
پرولین (µmol/g.F.W)	برگ	٦٤/٤۷ ± /٤۹۲ a)	۱۲/۱۸ ۰±/۲۷۱ d)	۹/۷۵ ± ۱/۷۹ d)
	ساقه	۵۰/۰٤ ± ۰/٤۹۲ a)	۲۰/۸۷۸ ± ۰/۳۹۳ d)	۲۰/٤۹ ± ۰/٤٦۸ d)
	ریشه	٦۷/٤۲ ± ۰/٤۹۸ a)	۳۸/۵۲ ± ۰/۳۷۱ c)	۲۳/۹۲ ± ۰/۳۳٦ d)
فنل ((mg/g.D.W	برگ	۱۵/۳۸ ± ٦/۱۲ a)	۱۰/۳٤ ± ۳/۳۳۲ bc)	۹/۱٦ ± ۲/٤۱ bc)
	ساقه	٤/۸۸۱ ± /۳۹٤ a)	۵/۷٦۲ ± ۰/۳۲٤ a)	۵/۷۷ ± ۰/۲۲۷ a)
	ریشه	۲۰/۱۲ ± ۲/۸۱۵ ab)	۲۲/۵۱ ± ۲/۰٦٦ a)	۲۲/۵۱ ± ۳/۲۹ a)
نیترات ردوکتاز ((mmol/g.F.D	برگ	۲۹/۲۲ ۰±/۳۹۷ d)	۳۳/۳٤ ±۰/۵۱۲ a)	۱۰۰/٤ ± ۰/۵۵۲ a)
	ساقه	۷/٤۹ ± /۳۰۸ b)	۷/٦۳ ±۰/٤٦۱ b)	۸/۹۵ ± ۰/۱۲۹ a)
	ریشه	۹/۷۲ ± ۰/۲٤ d)	۱۰/۸۲ ± ۰/۱۳٦ c)	۱۵/۵۳ ± ۰/۲۵٤ a)

جدول۲- اثر تیمارهای مختلف آبی برروی مقدار کلروفیل a و b در برگ سویا رقم گرگان ۳. اعداد نشان‌گر $X \pm SE$ هستند

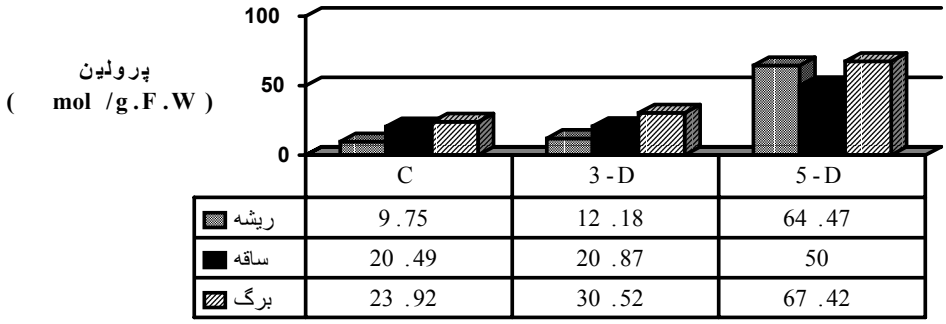
کلروفیل a/b	کلروفیل b	کلروفیلa	تیمارهای آبیاری	رقم سویا
۲/٤۷۱	۵/٦۳۳ ± ۰/۰۵ a)	۱۳/۹۲ ± ۰/۰۳۳ a)	هر روز آبیاری	گرگان ۳
۲/۳۱۲	٤/۲۱۷ ± ۰/۰٦۳ (c	۹/۷۵ ± ۰/۰٤۲ (c	سه روز در میان	
۲/۲۰۹	٤/۲۱٤ ± ۰/۰۵٦ c)	۹/۳۱۱ ± ۰/۱۱۸ d)	پنج روز در میان	



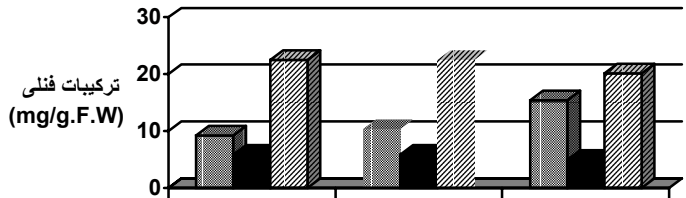
شکل۱ ـ میزان قند محلول بر حسب میلی گرم برگرم وزن خشک
در سه بخش ریشه، ساقه و برگ گیاه سویا رقم گرگان ۳، تحت سه تیمار آبیاری،
C = شاهد، هر روز آبیاری، 3-D = سه روز در میان آبیاری، 5-D = پنج روز در میان آبیاری



شکل ۲ـ میزان پروتئین کل بر حسب میلی گرم بر گرم وزن خشک
در سه بخش ریشه، ساقه و برگ گیاه سویا رقم گرگان ۳، تحت سه تیمار آبیاری
C = شاهد، هر روز آبیاری. 3-D = سه روز در میان آبیاری. 5-D = پنج روز در میان آبیاری

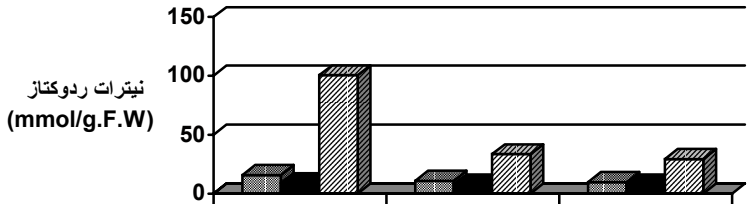


شکل۳ ـ میزان پرولین بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تردر سه بخش
ریشه، ساقه و برگ گیاه سویا رقم گرگان ۳، تحت سه تیمار آبیاری
C = شاهد، هر روز آبیاری. 3-D = سه روز در میان آبیاری. 5-D = پنج روز در میان آبیاری.



	C	3-D	5-D
ریشه	9.16	10.34	15.38
ساقه	5.77	5.76	4.88
برگ	22.51	22.51	20.12

شکل ٤ ـ میزان ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر در سه بخش ریشه، ساقه برگ گیاه سویا رقم گرگان ۳، تحت سه تیمار آبیاری
C = شاهد، هر روز آبیاری. 3-D = سه روز در میان آبیاری. 5-D = پنج روز در میان



	C	3-D	5-D
ریشه	15.53	10.82	9.72
ساقه	8.953	7.63	7.499
برگ	100.4	33.34	29.22

شکل ٥ـ میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برحسب میلی مول در گرم وزن تر در سه بخش ریشه ، ساقه و برگ گیاه سویا رقم گرگان ۳ تحت سه تیمار آبیاری
C = شاهد، هر روز آبیاری. 3-D = سه روز در میان آبیاری. 5-D = پنج روز در میان

بحث و نتیجه گیری

خشکی نه تنها رشد و نمو گیاهان را کاهش می‌دهد, بلکه موجب تغییر در مسیر برخی از فرآیندهای متابولیسمی نیز می‌گردد. این تغییرات می‌تواند گیاه را در مقابل استرس مقاوم سازد. در واقع سازش با خشکی به واکنش‌هایی نیاز دارد تا از طریق آن فرآیندهای متابولیسمی اولیه ادامه پیدا کند و گیاه را برای مقابله با آن آماده کند[٦],[٣٢]. در طی خشکی دراز مدت, انتقال مواد به علت کاهش آب قابل دسترس, منجر به تغییر غلظت برخی از متابولیت‌ها می‌شود. از سوی دیگر میزان محلول‌های سازگار به خشکی نظیر قندها، قندهای الکلی، آمینواسیدهای ویژه نظیر پرولین، گلیسین و بتائین افزایش می‌یابد[١١], [١٣], [٤٠].

تحقیقات متعددی در زمینه نقش کربوئیدرات‌های محلول و افزایش آن‌ها تحت شرایط تنش‌های گوناگون صورت پذیرفته است که همگی بر نقش ترکیبات مذکور در تنظیم اسمزی سلول دلالت دارند[١٣], [٤٠] که از

جمله می‌توان به پژوهش انجام شده بر روی گیاه سویا اشاره کرد[٤٢]. مطابق با نتایج به دست آمده, تنش شدید خشکی موجب افزایش معنی‌دار قندهای محلول در ساقه و برگ رقم گرگان ۳ شد.

از سوی دیگر, بنا به گزارش اعلام شده ساقه به عنوان جایگاهی ویژه برای ذخیره کوتاه مدت کربوهیدرات‌ها در حین تنش می‌تواند نقش به سزایی ایفا کند[١٠]. در این پژوهش نیز میزان قندهای محلول در ساقه با شدت گرفتن میزان تنش، افزایش قابل توجهی را نشان داد.

درمجموع افزایش قندهای محلول در طی تنش خشکی (به ویژه تنش شدید) را می‌توان به دلایل زیر توجیه کرد:

۱ـ تخریب کربوهیدرات‌های نا محلول که منجر به افزایش قندهای محلول می‌شود.

۲ـ سنتز این ترکیبات از مسیرهای غیرفتوسنتزی

۳ـ متوقف شدن رشد[١٦].

به نظر برخی از محققان کربوهیدرات‌هایی شناسایی شدند که سبب تعدیل اثر بازدارندگی خشکی بر روی نسخه‌برداری از ژن‌های فتوسنتیک می‌شوند؛ برای نمونه بیان ژن‌های کدکننده زیر واحدهای کوچک و بزرگ روبیسکو در طی خشکی، بیانگر مکانیسم کنترل شده‌ای است که این امر می‌تواند یکی از دلایل تجمع کربوهیدرات‌ها در برگ باشد[٢١].

از سوی دیگر, تنش شدید خشکی سبب افزایش معنی‌دار ترکیبات فنلی در برگ‌ها شد؛ در حالی که در ساقه و ریشه رقم گرگان ۳ این روند معنی‌دار نبود. همچنین مطابق با نتایج به دست آمده, میزان پروتئین کل به ویژه در برگ‌ها، با افزایش شدت تنش خشکی کاهش یافت. گزارش شده است کاهش سنتز پروتئین منجر به افزایش ترکیبات فنلی می‌شود[٤] که مؤید پژوهش حاضر است. در برخی از لاین‌های مقاوم به خشکی سویا ترکیبات فنلی از طریق تأثیر بر روی برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی برگ (تعداد روزنه، ضریب هدایت روزنه‌ای) موجب کاهش تعرق می‌گردد و برمقاومت گیاه به خشکی می‌افزاید[٦].

بررسی‌های انجام شده نشان داده است که هرگونه تنش برگیاه، مقدار ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهد و وجود چنین ترکیباتی موجب کاهش استقرارمیکروارگانیسم‌ها می‌شود[٣٠].

به نظر می‌رسد که گیاه در زمان تنش خشکی به علت تضعیف سیستم ایمنی، ترکیبات فنلی را افزایش داده تا بتواند واکنشهای دفاعی مناسبی را در برابر حمله میکروارگانیسم‌ها در پیش گیرد.

از سوی دیگر, نتایج حاصل از پژوهش حاضر نمایانگر افزایش پرولین در طی تنش خشکی(به ویژه تنش شدید خشکی) دربخش‌های مختلف گیاه سویا(رقم گرگان ۳) است از آنجا که برگ‌ها همواره به عنوان جایگاه عمده فرآیندهای متابولیسمی مطرحند، روندی صعودی در انباشت پرولین در برگ‌های رقم گرگان ۳ به چشم می‌خورد.

پیرامون افزایش غلظت این آمینواسید و دخالت آن در حفظ تورژسانس سلولی گزارش‌های متعددی ارائه شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به گیاهان سویا[۸] اشاره نمود.

همچنین بر اساس پژوهش حاضر با شدت گرفتن میزان تنش، مقدار کل پروتئین‌های محلول هم در بخش هوایی ساقه و برگ و هم در ریشه کاهش می‌یابد که این روند با افزایش غلظت پرولین همراه است. این نتیجه با گزارش اعلام شده بر گوجه فرنگی[۱]، ذرت[۱٤] و سویا[٤۲] همخوانی دارد بنا بر این تحت شرایط تنش شدید افزایش چشمگیر غلظت پرولین به همراه کاهش معنی‌دار پروتئین در برگ‌های سویا را می‌توان هم به تخریب پروتئین و هم کاهش سنتز آن[۱٦] نسبت داد.

شایان ذکر است که گزارش‌هایی نیز مبنی بر ارتباط بین پرولین و کربوهیدرات‌ها مطرح شده است[۲۹] در این پژوهش نیز یک روند فزاینده در مقدار قندهای محلول و همسو با آن در پرولین مشاهده شد به نحوی که این افزایش به خصوص در ساقه و برگ در طی تنش شدید چشمگیر بود.

چنان که در جدول۱ نمایش داده شده است مقدار کلروفیل **a** و**b** تحت تأثیر تنش خشکی واقع شدند.کاهش مقدار کلروفیل همراه با کاهش پتانسیل آبی خاک در گیاهانی نظیر آفتابگردان[۳٥] و توتون[۲۷] خود مؤید این مسئله است.از سوی دیگر نسبت کلروفیل **a/b** نیز تحت اثر تنش واقع شد.عنوان شده است که ثبوت نسبت کلروفیل در طی دوران خشکی می‌تواند به عنوان شاخصی برای ارقام متحمل به خشکی در نظر گرفته شود.

از سوی دیگر, چنان که در شکل ٥ مشخص است, فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز نیز تحت تأثیر تیمارهای مختلف آبیاری قرار گرفت, به نحوی که تنش‌های ملایم و شدید خشکی سبب کاهش فعالیت این آنزیم گشت. گزارش شده است که آنزیم نیترات ردوکتاز حساس به تغییرات وضعیت رطوبت برگ بوده و با کاهش شدید پتانسل آبی فعالیت آن در این بخش از گیاه مهار می‌شود[۳۷]. گزارش شده است فته در طی خشکی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در اندام هوایی بیش از ریشه کاهش می‌یابد که این امر به کاهش جریان نیترات از ریشه به اندام هوایی نسبت داده شده است[۳۱] نتایج به دست آمده در این پژوهش نیز حساس بودن فعالیت.آنزیم را در برگ تأیید می‌کند.

گزارش شده است که در گیاه سویا در زمان کم‌آبی نیترات به مقدار زیاد تجمع می‌یابد که می‌تواند به عنوان منبع نیتروژن برای سنتز اسیدهای آمینه آزاد مورد استفاده قرار گیرد[۱٥]. در پژوهش حاضر در تیمار شدید خشکی میزان پرولین به بیش‌ترین مقدار خود و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز به کم‌ترین مقدار خود می‌رسد که با توجه به این مطاب می‌توان یکی از علل افزایش میزان پرولین در برگ سویا را به کاهش فعالین آنزیم نام‌برده نسبت داد.

در مجموع می‌توان چنین گفت که گیاه سویا رقم گرگان ۳ نسبت به تنش خشکی(به ویژه تنش شدید) پاسخ‌های سازشی مناسبی را در پیش گرفته تا از صدمات ناشی از آن محفوظ بماند.

به طور کلی, پاسخ گیاهان زراعی به شرایط نامناسب محیطی بدون بررسی و آنالیز مکانیسم‌های مربوطه غیر ممکن به نظر می‌رسد. مقدار خساراتی که خشکی بر گیاهان زراعی وارد می‌سازد منجر به کوشش بیش‌تر برای فهم اثرات تنش خشکی بر روی مکانیسم‌های مختلف گیاه می‌شود و درک پاسخ‌های سازشی مناسب را در برابر این عامل محیطی می‌طلبد. از سوی دیگر می‌توان با شناسایی ارقام زودرس گیاهان زراعی از جمله سویا و نیز کشت و برداشت آن قبل از فصل گرما و کاهش بارندگی آن‌ها را از معرض تنش دور نگه داشت [۳۳], [۳۹].

منابع

1. F.P. Alfocea, M.T.Estan, A.S Crus and M.C. Bolarin.Effect of salinity on nitrate, total nitrogen ,soluble protein and free amino acid levels in tomato. Plant J of Horticul Sci,vol. 68 (1993) 1021-1027.
2. D.L. Barker, C.Y.Sulivan and L.E.Moser.Water deficits effect on osmotic potential,cell wall elasticity and prolin in five grass.Agron.J,vol. 85 (1993) 2750-275.
3. L.S. Bates, R.W.Waldern and L.D.Treare.Rapid determinatation of free proline for stress studentes.Plant and Soil,vol. 39 (1973) 205-207.
4. A.A. Bell.Biochemical mechanism of disease resistance.Annu.Rev.Plant.Physiol vol.32 (1981) 21-81.
5. J.Bruisma.The quantitative analysis of chlorophyll a&b in plant extract. Photochem. Photobil vol. l2 (1963) 241-249.
6. .R.B.T. Buttery, C.S.Buzzel, J.D.Gayron and D.C.Matarish.Stomatal number of soybean and response to water stress.Plant.Soil,vol.149 (1993) 283-288.
7. H.F. Christine, M.H.Valadier, A.Migge and Th.Becker.Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA on the coordingation of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves.Plant Physiol,vol.117 (1998) 283-292.
8. R.A. Creelman, H.S. Mason, R.J Bensen, J.S.Boyer and J.E Mullet. Water deficits and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. Plant Physiol,vol.214 (1990) 92-105.

9.J.P.Cornoy, J.M.Virgon, R.M.Smillie and E.W.Barlow.Influence of drought acclimation and Co2 enrichment on osmotic adjasment and chlorophyll a flurescenicof sunflower during drought, Plant Physiol, vol.186 (1988) 1108-1115.

10. D.Y. Davidson. and P.M.Chevalier.Storage and remobilization of water soluble carbohydrates in stems of spring wheat.Crop.Sci,vol.32 (1992) 86-190.

11. H. During.Evidence for osmotic adjusment to drought in grapevinse(*Vitis vinifera* L.).Vitis,vol.23 (1992) 1-10.

12. R.D. Evan, R.A.Black, W.H.Loeshel and R.J.Follows.Osmotic relation of the drought-induced shurb *Artimisia tridentatain* in response to water stress.Plant.Cell and Environ,vol.15 (1992) 49-59.

13.Genetic engineering news letter.Special Issue.Transgenic drought and salt tolerant plant. (2004).

14. A.D. Hanson and W.D Hitz.Metabolism response of mesophytes to plant water deficits. Annu Rev.Plant.Physiol.vol.33 (1982) 163-203.

15. B. Heuer, Z.Plaut, E. Federman.Nitrate and nitrit reductase in wheat leaves as affected by different types of water stress. Physiol Plant,vol. 46 (1979) 318-323.

16.T Hissao. Plant responses to water stress. Annu Rev Plant Physiol,vol. 24 (1973) 519-570.

17.S.C.Huber and J.L.Huber.Metabolic activity of spinach leaf nitrate reductase.Effects on enzymatic activity and dephosphorylation endogenous phosphatase.vol.196 (1995) 180-189.

18. S.C Huber, D.W.Israel. CH. Foyer, M.H Valadier, A. Migge and T.W Becker.Drought induced effects on nitrate reductase activity on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. Plant Physiol,vol.117 (1998) 283-292.

19.S.W.Hullgren, C.G.Tauer and J.E..Lock.Fine root carbohydrate dynamics of loblolly pine seedling growth under constrasting levels of soil moisture.Plat.Physiol,vol.37(1991)760-780.

20. J. Ingram and D. Bartles The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol,vol.47 (1996) 377-403.

21.K.E.Koch.Carbohydrate-modulated gene expression in plant. Annua .Rev. Plant. Physiol, vol. 47 (1996) 509-515.

22.G.Kochert.Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method.In: Helebust, .J.A.Craig, J.S.(ed): Hand book of Phycological Method (1978) 56-97. Cambridge Univ. Press. Cambridge.

23.O.H.Lowry,N.J.Rosebrough and R.J.Rand.Protein measurment with the folin phenol reagent.J.Biol.Chem,vol.193 (1951) 265-273.

24.B,Martin andN.A.R,Torres.Effects of water deficits stress on photosyntesis,its components and component limitations and on water use efficiency in wheat.Plant Physiol, vol. 100 (1992) 733-739.

25.A.G.Matta and I.Giai.Accumulation of phenol in tomato plant ineffected by different forms of *Fusarium oxysporum*.Phytphatol,vol.50 (1969) 512-513.

26. J.F. Moran, M. Becana, I.I Ormaetxe, S. Frechilla, R.V.L.Klucasc and D.A. Tejo.Drought induces oxidative stress in pea plants. Planta,vol.194 (1994) 346-352.

27.G.M.Pastori and V.S.Trippi.Cross resistance between water and oxidative stress in wheat leaves, J. Agri.Sci, vol.120 (1993) 289-294.

28. G.S. Premachndra, H. Saneoka and K. Fujita, Osmotic adjustment and stomatal response to water deficits in maiz. J Exp Botany,vol. 43 (1991) 1451-1456.

29. L.V. Rensburg and G.H.J Kruger.Proline accumulation as drought tolerance selecttion criterion :it's relationship to membrane integrity and chloroplast ultra stracture in *Nicotiana tabacum* L. J Plant Physiol,vol.141(1993) 188-194.

30.F.B.Salisbury and C.B.Ross.Plant Physiol (1991) 316-321.Wadsworth publishing company belton California.

31.J.Silva, J.Oson, F.Fonseca and M.Correia.The effects of soil during and subsequent re-watering on the activiting of nitrate reductase in root and leaves of *Helianthus annuus*.Functional plant biology.31(6)(2004) 611-621.

32.R.Sunka, D.Bartels and H.H.Kirch.Over expression of a stress inducible dehydrogenas gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. The Plant Journal 35 (2003).

33.D.W.Sween,J.H.Long and M.B.Kirkham.A signal irrigation to improve carly maturing soybean yeild and quality.Soil.Sci.Soc.Am.J,vol.67(2003) 235-240.

34.G.L.Sym.Optimisation of the *in vivo* assay conditions for nitrate reductase in barly.J.Sci.Food.Agri,vol.35 (1984)725-730.

35.C.L.M.Synerri, C.Pizino and F.Navari-Izzo.Chemical changes and O2 production in thylakoid membranes under water stress,Plant Physiol, vol.87 (1993) 211-216.

36. A.Taher.Physiologia and lipid change in some upland rice) *Oryza sativa* L.) cultivars grown under drought stress. College Laguna (Philippines) (1988) 162:Leaves.

37.P.A.Tejo and M.s.Diaz. Nodule and leaf nitrate reductase and nitrogen fixation in *Medicago sativa* L.under water stress, Plant.Physiol, vol.69 (1987) 479-482.

38. M. Werner, E. Kaiser and N. Behnisch.Acid- base modulation of nitrate reductase in leaf tissue .Planta,vol. 196 (1995)1-6.

39. A.Wood.Thriving dry,Perspectives,Research and creative activities (2002) Souther Illinois University Carbonoale.

40.R.Wu and A.Garg. Engineernig rice plants with trehalose producing genes improves tolerance to drought, salt and low temperature.ISB News,February (2003).

41.M.Z,Xia.Effects of soil drought during the generative development phase of faba bean (*Vicia faba*) on photosyntetic characters and biomass production. J.Agri.Sci. vol. 122 (1994) 67-72.

42.Y.Yamada and Y.Fukutoku,Effect of water stress on soybean stress.Soybean in tropical and sub tropical cropping system.The asion vegetable research and development center shanbue Taiwan,China chapter48 (1986) 373-382.