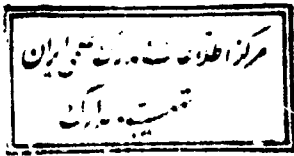


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۱۰ / ۴ / ۱۳۷۹

به نام خدا



بررسی چند عامل بیوشیمیایی در تحمل به تنش شوری  
در جو (*Hordeum vulgare L.*)

توسط:

اسد معصومی اصل

پایان نامه

ارائه شده به دانشکده تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی از فعالیتهای تحصیلی لازم برای  
اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته

اصلاح نباتات

از

دانشگاه شیراز

شیراز، ایران

۱۷۲۶۰

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه با درجه : عالی  
امضاء اعضاء کمیته پایان نامه :

.....  
دکتر حسن پاک نیت، استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات (رئیس کمیته)

.....  
دکتر محمد تقی آساد، دانشیار بخش زراعت و اصلاح نباتات

.....  
دکتر محمود امین لاری، استاد بخش علوم پایه دانشکده دامپزشکی

.....  
دکتر علی مراد شاهی، استادیار بخش زیست شناسی

اسفند ماه ۱۳۷۸

۳۰۵۶۴

تقدیم به

ساحت مقدس حضرت ولی عصر (عج)

و

شهدای گلگون کفن انقلاب اسلامی

و

پدر و مادر مهربان و فداکارم

## سپاسگزاری

سیاس خداوندی را که بنده‌اش را به شرف علم مفتخر ساخته و توفیقات روز افزون خود را نصیبم کرد. سپاس رب‌الاربابی را که پدر و مادری مهربان و فداکار به بنده عطا فرمود و استادانی دلسوز و فرزانه فرا راهم قرار داد. باشد که با کمال بخشیدن به قوه عاقله خود، آگاهانه و عالمانه قدم در راه معرفتش نهیم و شناخت مخلوقاتش را مقدمه ای برای شناخت ذات لایزالش قرار دهیم.

از باب من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق بر خود واجب می دانم که از تمام اساتید و معلمانم که بنده را از الفبای علم به مراحل جمله سازی و مفهوم سازی رساندند کمال تشکر و قدردانی را بعمل آورم. همچنین از استاد گرانقدر و صبورم جناب آقای دکتر حسن پاک نیت که در مراحل مختلف این تحقیق کمک های زیادی به بنده کردند تشکر و قدردانی می نمایم. از اساتید مشاورم آقایان دکتر محمد تقی آساد، دکتر محمود امین لاری، دکتر علی مرادشاهی نیز که بنده را در انجام هر چه بهتر این تحقیق یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایم.

از دوستان و همکلاسی های عزیزم آقایان مهندس حسین عسکری، محمد مجتبی کامل منش و علی بهپوری و سایر دوستانی که به انحاء مختلف از کمک هایشان بهره مند شده ام تشکر و قدردانی مینمایم. پروردگارا! همه ما را در مسیر علم ثابت قدم نگهدار و در مسیر تقرب خویش پایدار ساز.

انشاءالله

## چکیده

### بررسی چند عامل بیوشیمیایی در تحمل به تنش شوری در جو (*Hordeum vulgare* L.)

تحمل به شوری دو رقم جو بهاره بنامهای افضل (متحمل) و ریحان (حساس) و جمعیت‌های F<sub>1</sub> و F<sub>2</sub> آنها در سه سطح شوری (۵ و ۱۴ و ۲۵ دسی‌زیمنس بر متر) در یک آزمایش گلخانه‌ای در دانشکده کشاورزی شیراز در سال ۱۳۷۷، بصورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند.

میزان پرولین، فعالیت پراکسیداز، میزان پروتئین کل، فعالیت کاتالاز، میزان سدیم (Na<sup>+</sup>)، پتاسیم (K<sup>+</sup>) و نسبت پتاسیم (K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>) برای کنبه تیمارها اندازه‌گیری شد.

نتایج نشان داد که با افزایش سطح شوری در گیاهان متحمل میزان پرولین و همچنین فعالیت پراکسیداز در مقایسه با گیاهان حساس بطور معنی‌داری افزایش یافت (P<0.05)، ولی افزایش در میزان پروتئین و فعالیت کاتالاز در مورد گیاهان متحمل نسبت به گیاهان حساس در سطوح مختلف شوری معنی‌دار نبود.

افزایش تنش شوری باعث افزایش میزان سدیم دو رقم مقاوم و حساس و جمعیت‌های F<sub>1</sub> و F<sub>2</sub> گردید ولی میزان سدیم دو رقم متحمل در مقایسه با رقم حساس بطور معنی‌دار کمتر بود.

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فهرست شکلها.....	هفت
فصل اول: مقدمه.....	۱
فصل دوم: مروری بر پژوهشهای انجام شده.....	۶
۱-۲- مکانیسمهای مقاومت به شوری.....	۶
۲-۲- پرولین.....	۹
۳-۲- پروتئین.....	۱۲
۴-۲- آنزیم پراکسیداز.....	۱۸
۵-۲- آنزیم کاتالاز.....	۲۱
۶-۲- سدیم.....	۲۴
۷-۲- پتاسیم.....	۲۶
فصل سوم: مواد و روشها.....	۲۹
۱-۳- اندازه گیری سدیم و پتاسیم.....	۳۰
۲-۳- اندازه گیری پرولین.....	۳۱
۳-۳- اندازه گیری پروتئین.....	۳۲
۴-۳- اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز.....	۳۳
۵-۳- اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز.....	۳۵
۶-۳- الکتروفورز پروتئین کل (SDS-PAGE).....	۳۵
فصل چهارم: نتایج و بحث.....	۳۸
۱-۴- میزان یون سدیم.....	۳۸
۲-۴- میزان یون پتاسیم.....	۳۹
۳-۴- نسبت پتاسیم به سدیم.....	۴۰
۴-۴- عاملهای بیوشیمیایی مورد بررسی.....	۴۰
۱-۴-۴- پرولین.....	۴۰

۴۶	..... پروتئین	۲-۴-۴
۴۸	..... آنزیم پراکسیداز	۳-۴-۴
۵۰	..... کاتالاز	۴-۴-۴
۵۲	..... مقایسه عامل‌های بیوشیمیایی مورد بررسی	۵-۴-۴
	..... مقایسه سه شاخص انتخاب و عامل‌های	۶-۴-۴
۵۳	..... بیوشیمیایی	
۵۴	..... تعیین بهترین عامل بیوشیمیایی	۷-۴-۴
۵۵	..... بررسی تغییرات کیفی پروتئین کل برگ	۸-۴-۴
۵۸	..... پیشنهادهای	
۵۹	..... فهرست منابع	
	صفحه چکیده و صفحه عنوان به زبان انگلیسی	

## فهرست اشکال

شکل	صفحه
شکل ۳-۱- منحنی استاندارد پروتئین.....	۳۴
شکل ۴-۱- تغییرات میزان سدیم برگ جو در سطوح مختلف شوری.....	۴۱
شکل ۴-۲- تغییرات میزان پتاسیم برگ جو در سطوح مختلف شوری.....	۴۲
شکل ۴-۳- تغییرات نسبت پتاسیم به سدیم در سطوح مختلف شوری.....	۴۳
شکل ۴-۴- تغییرات میزان پرولین در سطوح مختلف شوری.....	۴۵
شکل ۴-۵- تغییرات میزان پروتئین در سطوح مختلف شوری.....	۴۷
شکل ۴-۶- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطوح مختلف شوری.....	۴۹
شکل ۴-۷- تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در سطوح مختلف شوری.....	۵۱
شکل ۴-۸- الگوی بانندی (SDS-PAGE) پروتئین کل برگ در سطوح مختلف شوری.....	۵۶
شکل ۴-۹- الگوی بانندی (SDS-PAGE) پروتئین کل برگ جهت تشخیص تفکیک در نسل دوم.....	۵۶



## فصل اول

### مقدمه

شوری همانند خشکی به عنوان یکی از قدیمی ترین و جدی ترین مشکلات زیست محیطی محسوب شده و پدیده گسترده ای بر روی زمین می باشد. در تاریخ بشر و در سیستمهای کشاورزی که بشر به آنها تکیه داشته، شوری عامل مهمی بشمار میرفته است.

تخمین زده شده که یک سوم از نواحی تحت آبیاری در جهان هم اکنون بوسیله درجات بالایی از شوری (که در اصل از زهکشی ناکافی و آبیاری بیش از حد ناشی میشود) تحت تأثیر بوده و تولید محصول در این مناطق با درجات متفاوت کاهش می یابد. همه مسائل و مشکلات مربوط به شوری تنها به نواحی خشک جهان محدود نمیشود. تقریباً ۲۰ درصد از خاکهای شور جهان که بصورت بالقوه قابل بهره برداری هستند، در نواحی مرطوب جنوب و جنوب شرقی آسیا قرار داشته و حدود نیمی از این زمین ها خاکهای شور ساحلی هستند (۴).

تمدنهای بسیاری در اثر عدم اعمال مدیریت صحیح در امر آبیاری و نتیجتاً در اثر تجمع نمک در سطح خاک، نابود شده اند. هر گاه بارندگی محدود باشد نمک در خاکی که گیاهان در آن ریشه دوانیده اند، شسته نمی شود و بهنگام افزایش شوری مقدار محصول کاهش می یابد. آبی که برای آبیاری مورد استفاده قرار میگیرد، دارای املاح محلول است که پس از مدتی در اثر تبخیر، این املاح در خاک تجمع می یابند. مناطق وسیعی از سطح زمین به دلیل درجه تحمل پایین گیاهان زراعی نسبت به نمک و نبود اطلاعات کافی در مورد مکانیسم های تحمل، برای کشاورزی غیرقابل استفاده

می باشند. در بعضی از مناطق مستعد برای کشاورزی در ارتباط با مسأله شوری، دو دیدگاه وجود دارد که می توانند مورد توجه واقع شوند:

۱- کوشش در پیدا کردن راههای مؤثر و کم هزینه در امر شیرین کردن آب دریاها برای اهداف آبیاری.

۲- گزینش گیاهان زراعی که قادر به رشد و نمو در شرایط شور باشند (۴).  
مسائل شوری در بسیاری از نواحی خشک و نیمه خشک دنیا از جمله شمال آفریقا، نواحی وسیعی از پاکستان، ایران، عراق، مصر و ایالات متحده آمریکا تولید محصولات کشاورزی را محدود می کنند. شوری خاک در بسیاری از نواحی یاد شده در حال افزایش می باشد. در این کشورها میزان بارندگی برای شستشوی املاح نمک جمع شده در قسمت بالای خاک زراعی کافی نیست.

برای مقابله با مسائل شوری خاک دو روش عمده وجود دارد. روش اول، بکاربردن روشهای غیر زیستی است. در این روش معمولاً زمین های شور را در مقیاس وسیع با آب شیرین کیفیت دار آبیاری می کنند. روش دوم، روش بیولوژیکی است که در آن از روش های اصلاح گیاهان برای ایجاد مقاومت به شوری استفاده میکنند. روش بیولوژیکی مقابله با مسائل شوری خاک بطور وسیع بکار گرفته شده است ولی موفقیت چشمگیر وقتی عاید میگردد که منابع ذخایر گیاهی که دارای تغییرات ژنتیکی مطلوب هستند در دسترس قرار گیرد (۶).

در ایران، طبق آمارهای ارائه شده در سال ۱۳۴۳، از ۱۶۵ میلیون هکتار کل اراضی ایران ۲۵ میلیون هکتار آن شور بوده و یا بنوعی دچار مسائل شوری هستند. بطور حتم با گذشت بیش از ۳۵ سال و وجود سوء مدیریت ها در سیستم آبیاری، سطح زمین های شور در ایران افزایش یافته است (۷).  
آمار سال ۱۳۵۰ نشان میدهد که حدود ۵۰ درصد کل اراضی تحت کشت آبی ایران به درجات مختلف با مشکل شوری و قلیائیت و ماندابی روبرو

بوده است و بیش بینی شده است که این میزان تا ۷۵ درصد کل اراضی قاریاب کشور پیشروی نماید (۶).

هزینه های ناشی از صدمات شوری در کشاورزی ، بسیار قابل ملاحظه است. گیاهان زراعی در میزان تحملشان به شوری تفاوت های قابل ملاحظه ای دارند لذا اثر شوری بر روی محصول تابعی از شوری حد آستانه است که بالاتر از آن میزان محصول تنزل پیدا کرده و درصد محصول به ازاء هر واحد شوری که از حد آستانه فراتر میرود کاهش نشان میدهد (۷).

تلاش قابل ملاحظه ای برای شناسایی راه های تحمل به شوری در گیاهان انجام شده است تا در شرایط شوری بتوان محصولات کشاورزی را بهبود بخشید. اگر چه دامنه وسیعی از سازش های ژنتیکی به شرایط شوری مشاهده شده است و هر چند تعدادی از پاسخ های فیزیولوژیکی مهم شناسایی شده اند با این حال در مورد مکانیسم های تحمل به شوری گیاهان هنوز هم اطلاعات کمی در دست می باشد (۲).

جو (*Hordeum vulgare L.*) گیاهی است دیپلوئید و یکساله با تعداد کروموزوم  $2n=14$  از طایفه *Hordea* این گیاه از غلات مهم جهان و ایران است. در ایران، جو از لحاظ سطح زیر کشت و میزان تولید پس از گندم در مرتبه دوم قرار دارد.

مبدأ واقعی جو هنوز نا شناخته است اما برابر نظریات هارلان (۱۹۶۸)، خاستگاه این گیاه کوه های زاگرس در غرب ایران، آناتولی جنوبی و فلسطین بوده است. بر پایه نظریه واویلوف، مبدأ جوهای ریشک دار و غلاف دار، کشور اتیوپی و شمال افریقا و مبدأ تیپ های لخت و بدون ریشک، ریشک کوتاه و کلاهک دار، آسیای جنوب شرقی بویژه چین، تبت و ژاپن است (۱۳). سطح زیر کشت دیم و آبی این محصول در ایران در سال ۱۳۶۶ بیش از ۲/۲ میلیون هکتار و میزان تولید نیز بیش از ۲/۷ میلیون تن بوده است. هر چند در سال ۱۳۷۲ سطح زیر کشت در کل کشور ۱۹۵۹۹۷۳ هکتار برآورد گردیده

است که از این مقدار ۶۵/۹۳ درصد مربوط به کشت دیم و بقیه آبی بوده است. استان خراسان با اختصاص ۱۹/۵۱ درصد از کل سطح زیر کشت جو رتبه اول را دارا بوده و استانهای لرستان، خوزستان و فارس بترتیب در رتبه‌های بعدی قرار دارند (۱۵).

اگر چه جو یکی از مقاومترین گیاهان زراعی نسبت به شوری محیط محسوب میشود با اینحال در مراحل اولیه رشد نسبت به شوری خاک تحمل کمتری نشان میدهد. NaCl در کاهش رشد برگهای جوان اثرات آشکاری دارد. شوری میتواند تغییرات ساختاری در سلولهای مرستمی ریشه های جو ایجاد کند همچنین تشکیل دانه بیشتر از رشد رویشی تحت تأثیر شوری قرار میگیرد (۷).

در کشور اسلامیمان در مورد تحمل به شوری در جو کارهای نسبتاً کمی انجام شده، از آنجمله بررسی تغییرات میزان پرولین و عناصر در اثر شوری و مقایسه واکنش تریتیکاله، گندم و جو به شوری محیط است که در دانشکده علوم دانشگاه شیراز صورت پذیرفته است (۱۴). طی این تحقیق ارقام مقاوم شناسایی شدند. این ارقام با بالا نگهداشتن نسبت یون پتاسیم به سدیم در اندامهای هوایی با اثرات مضر یون سدیم مقابله کردند. همچنین با سنتز پرولین در اندامهای هوایی باعث کاهش پتانسیل اسمزی در درون این اندامها گردیدند (۱۴).

مقالات مختلف، عاملهای انتخاب متعددی را برای ارزیابی ارقام مقاوم به شوری پیشنهاد کرده‌اند. از آن جمله:

- ۱- میزان پرولین (۱۴).
- ۲- میزان پروتئین (۱۰).
- ۳- میزان کلروفیل (۷).
- ۴- میزان عناصر معدنی همچون سدیم، پتاسیم، کلسیم و نسبت آنها (۸).
- ۵- قندهای محلول (۱۴).
- ۶- پتانسیل اسمزی برگ (۷).
- ۷- میزان هورمونها (۷).
- ۸- میزان آنزیمها (۱۰).

که بعضی از این عاملها حساستر و دقیقتر از بقیه می باشند. شاخص انتخابی که تا بحال زیاد روی آن تأکید شده، میزان عناصر معدنی سدیم، پتاسیم و نسبت آنها در گیاه است. البته باید توجه کرد که در بعضی گیاهان میزان خود عنصر و در بعضی دیگر نسبت این عناصر ارزیاب خوبی است ولی آنچه که قطعی است در مورد هیچ گیاه خاصی نمیتوان اظهار نمود که چه عنصری بهترین جواب را خواهد داد بلکه برای هر گیاهی بهتر است که طی آزمایشی بهترین مورد را مشخص کرد (۸). بهتر است علاوه بر این کار بدنبال عاملهای انتخاب دقیقتری هم باشیم. در همین راستا در مورد میزان پرولین و پروتئین کل مقالات متعددی وجود دارد. در مورد آنزیمها نیز چندین گزارش چاپ شده است که متأسفانه همه آنها در مورد درختان جنگلی می باشند ولی نکته قابل توجه این است که در اثر اعمال تنش شوری، آنزیمها هم از لحاظ کمی و هم از لحاظ کیفی تغییراتی را نشان میدهند (۱۰). لزوم بررسی این واکنش در مورد گیاهان زراعی و نیز مقایسه آن با سایر عاملهای بیوشیمیایی انگیزه اصلی ما را برای انجام این تحقیق ایجاد کردند.

این تحقیق که در سالهای ۱۳۷۷ و ۱۳۷۸ در دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انجام شد اهداف زیر را دنبال میکند :

۱- تأثیر تیمارهای مختلف شوری بر تغییرات کمی آنزیمهای پراکسیداز و کاتالاز.

۲- بررسی تغییرات میزان پرولین و پروتئین کل در ارقام مقاوم و حساس.

۳- بررسی تغییرات میزان سدیم، پتاسیم و نسبت این دو عنصر بین ارقام مقاوم و حساس.

۴- بررسی الگوی الکتروفورزی تغییرات پروتئین کل برگ.

۵- تعیین و معرفی بهترین عامل بیوشیمیایی.

## فصل دوم

### مروری بر پژوهشهای انجام شده

۲-۱- مکانیسمهای مقاومت به شوری:

برای ارزیابی ارقام اصلاح شده در ارتباط با تحمل شوری، لازم است شرایط آزمایش مشخص شود. برای سهولت امر، ابتدا شوری را اینگونه تعریف میکنیم:

شوری، هدایت الکتریکی است که با واحد دسی زیمنس بر متر در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بیان میشود و اندازه گیری آن در خاک کاملاً اشباع از آب صورت میگیرد. اگر محقق درصد رطوبت خاک را بداند، خواهد توانست از روی هدایت الکتریکی خاک، مقدار املاح موجود در آن را محاسبه کند (۵). میزان تحمل شوری توسط گیاه، در طول چرخه زندگی آن تغییر میکند. به عنوان مثال حساسترین دوره زندگی چغندر قند نسبت به شوری مرحله جوانه زنی بذر است.

با اینحال عدم تحمل شوری ممکن است بیشتر ظاهری باشد تا واقعی و ممکن است نتیجه غلظت های بسیار بالای املاح در لایه سطحی خاک به عمق ۲-۳ سانتی متر باشد که بدنبال حرکت صعودی محلول خاک و تبخیر آب از سطح خاک، رسوبی از نمک بجای گذاشته شود (۷). جلوگیری از ورود نمک، باعث کاهش سمیت یونها میشود ولی این عمل بدنبال خود کمبود آب را به همراه خواهد داشت. جذب نمک ضمن تسهیل در تنظیم وضعیت اسمزی، موجب ایجاد سمیت یونها و بهم زدن تعادل یونها میگردد. در صورتیکه، غلظت نمک به اندازه ای بالارود که پتانسیل آب بطور محسوسی کاهش یابد، تنش شوری بوقوع می پیوندد. ولی اگر غلظت نمک در حدی نباشد که

بتانسيل آب را بطور محسوسى کاهش دهد، تنش يونى ايجاد ميشود. در تنش شورى تعدادى از فرايندهاى فزيولوژيكي گياه مختل شده و منجر به کاهش رشد و ميزان محصول ميگردد. نمك از طريق القاء تغييرات در تركيبات لپيدي و پروتئين هاى غشاء، سبب از هم پاشيدن تماميت غشاء سلول شده و در نتيجه بر نفوذ پذيرى يونها تاثير ميگذارد. احتمالاً جايگزينى سديم بجاي كلسيم در پلازما لما از پاسخهاى اوليه در برابر تنش نمك باشد. غلظت بالاي نمك در محيط رشد گياه، از طريق کاهش بتانسيل اسمزي محلول خاك، سميت يونها، بهم زدن تعادل يونها و يا ايجاد كمبود عناصر ضرورى، به گياهان آسيب مي رسانند. كنورسديم و سولفات سديم از جمله نمكهاى عمده اى هستند كه در مناطق شور يافت ميشوند (۱).

مشخص شده است كه مقاومت به نمك در گياهان عالى در نتيجه يك سازش آنزيمي نمى باشد. اين مورد كه چه آنزيمها و يا چه فرايندهاى متابوليكي در ايجاد مقاومت به شورى در گياهان دخالت دارند، بخوبى روشن نشده است. حتى معلوم نشده است كه مكانيسم اصلى مقاومت به شورى در سلولهاى ريشه قرار دارد يا سلولهاى برگ. بنظر ميرسد كه در ژنوتيب هاى مقاوم به نمك فاكترهاى ژنى كنترل كننده اى در رابطه با شورى موجود باشد (۱).

تحقيقى در سال ۱۹۹۶ در روسيه نشان داده است كه سه ژن براى تحمل شورى وجود دارد كه اثرات متقابل افزايشى داشته و عملشان هم با تغيير سن گياه، تغييرى نمى كند. در اين تحقيق ارقام حساس K14220, K8758 با رقم مقاوم Polyarnyi 14 تلاقى داده شده و  $F_2$ ,  $F_1$ , BC آنها بررسى شده است (۴۸).

تحقيق ديگرى نشان داده كه توسعه سلولى توسط فيتوهورمونها كنترل شده و از طرفى شورى تعادل فيتوهورموني گياهان را بهم ميزند، پس يكي از اثرات اصلى شورى روى رشد، در نتيجه تغيير ايجاد شده در