دانشکده علوم

بخش زیست شناسی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد علوم گیاهی (فیزیولوژی)

بررسی اثردوره های مختلف تنش غرقابی بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز (PAL) و متابولیت های ثانویه در گیاه آفتابگردان *(Helianthus annuus L.)*

اساتید راهنما:

دکتر خسرو منوچهری کلانتری

دکتر زهرا اسرار

مؤلف:

ز هره شیرخانی

شهریور ۱۳۸۸

چکیده

تنش غرقابی بر محصولات کشاورزی و گیاهان اثرات مهمی را به جای می گذارد. غرقاب شدن خاک زمانی رخ می دهد که خاک با آبیاری بیش از حد، بارندگی زیاد و یا زهکشی نامناسب روبرو شده باشد. در خاکهایی که تحت تنش غرقابی قرار می گیرند، خاک از آب اشباع شده به طوری که با پر شدن تمام فضاهای موجود به وسیله آب، خاک و ریشه ها با کمبود اکسیژن مواجه می شوند. انتشار گازها در آب ، نسبت به هوا صد هزار برابر آهسته تر است و این باعث می شود که در شرایط تنش جریان اکسیژن به داخل گیاه کند شده و در نهایت رشد گیاه بازداشته شود.

در این تحقیق، ما اثر دوره های مختلف غرقابی بر برخی از پارامترهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی را در گیاه آفتابگردان مورد بررسی قرار دادیم. این بررسی ها نشان دادند که تنش غرقابی باعث کاهش جوانه زنی در بذرهای آفتابگردان شد. اپی ناستی و تشکیل ریشه های نابجا و ائرانشیم از جمله تغییراتی بود که در این گیاه مشاهده شد؛که این امر احتمالا به دلیل افزایش تولید اتیلن در اندام هوایی این گیاه می باشد. نتایج نشان داد که در برگ های گیاه، محتوی پروتئین کاهش یافت، اما مقدار آن در ریشه ها افزایش نشان داد. افزایش پروتئین ریشه می تواند به دلیل سنتز آنزیمهای مسیر تخمیری باشد. با اندازه گیری قندهای احیا کننده، مشاهده شد که محتوی قند در برگها کاهش، ولی در ریشه ها افزایش یافت.کاهش قند به دلیل کاهش فتوسنتز در برگ می باشد.

در شرایط تنش میزان آلدئید های برگ افزایش یافت که بیانگر تولید رادیکال های آزاد در این شرایط می باشد. در کنار افزایش آلدئید ها، افزایش مقدار آسکوربیک اسید را داشتیم،که این ترکیب نقش آنتی اکسیدان را در ازبین بردن رادیکال های آزاد دارد. اندازه گیری آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز نشان داد که فعالیت آن در ریشه و اندام هوایی ، تحت شرایط تنش افزایش یافته است. افزایش در فعالیت این آنزیم، باعث افزایش غلظت آنتوسیانین و فلاوونوئید ها در برگ آفتابگردان شد. در نهایت انجام الکتروفورز ،نمایان گر ایجاد تغییرات در کیفیت و کمیت پروتئین های برگ و بذر گیاه در شرایط تنش می باشد.

واژه های کلیدی: آفتابگردان، غرقابی، متابولیت های ثانویه، آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز (PAL)

فهرست

عنوان **صفحه**

فصل اول- مقدمه

۱-۱ تغییرات خاک در اثر تنش غرقابی ۳

۱-۲ تاثیر تنش بر جوانه زنی ۵

۱-۳ کمبود اکسیژن و اثر آن بر رشد ریشه ۶

۱-۴ تاثیر تنش بر فتوسنتز و روزنه ها ۶

۱-۵ تاثیر تنش بر فتوسیستم ۲ ۶

۱-۶ ترکیبات سمی تولید شده ناشی از تنش ۸

۱-۷ تاثیر تنش بر رشد ریشه و ساقه ۸

۱-۸ چگونگی تولید اتیلن تحت شرایط تنش ۹

۱-۹ تاثیر تنش بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز و ترکیبات فنولیکی ۱۰

۱-۹-۱ فلاوونوئیدها ۱۰

۱-۹-۲ آنتوسیانین ۱۱

۱-۱۰ سازگاریهای گیاه به تنش غرقابی ۱۳

۱-۱۰-۱ چگونه ریشه در شرایط غیرهوازی حفظ می شود ۱۳

۱-۱۰-۱-۱ سازگاریهای بیوشیمیایی ۱۳

۱-۱۰-۱-۲ سازگاریهای آناتومیکی ریشه از طریق تشکیل ائرانشیم ۱۴

۱-۱۰-۲ سازگاریهای اندام هوایی در تنش غرقابی ۱۵

۱-۱۰-۲-۱ طویل شدن میانگره ها و تنظیم آن بوسیله فاکتورهای محیطی و هورمونی ۱۵

۱-۱۰-۲-۲ تشکیل ریشه های نابجا ۱۶

۱-۱۰-۲-۳ اپی ناستی ۱۸

۱-۱۰-۲-۴ هیپرتروفی ۱۸

۱-۱۱ تنش اکسیداتیو ۱۸

۱-۱۱-۱ خسارت به چربیها ۱۹

۱-۱۱-۲ خسارت به پروتئین ها ۲۰

۱-۱۱-۳ خسارت به DNA ۲۱
۱-۱۲ مکانیزم های حفاظتی در مقابل تنش اکسیداتیو ۲۱
۱-۱۳ معرفی گیاه مورد تحقیق ۲۲
۱-۱۴ هدف از انجام تحقیق ۲۳
فصل دوم- مواد و روش های آزمایشگاهی
۲-۱ گیاه مورد آزمایش ۲۵
۲-۲ مطالعه جوانه زنی ۲۵
۲-۲-۱ محاسبه درصد جوانه زنی بذر آفتابگردان ۲۵
۲-۳ کشت گیاه و انجام تیمار ۲۵
۲-۳-۱ تهیه محلول غذایی لانگ آشتون در یک لیتر ۲۵
۲-۴ زمان و روش تیمار گیاهی ۲۷
۲-۵ مطالعات مورفولوژیکی ۲۷
۲-۵-۱ تعیین وزن تر ریشه ۲۷
۲-۵-۲ تعیین وزن خشک ریشه ۲۸
۲-۵-۳ اندازه گیری سطح برگ گیاه ۲۸
۲-۵-۴ اندازه گیری زاویه خمش برگ ۲۸
۲-۶ مطالعات بیوشیمیایی ۲۸
۲-۶-۱ سنجش میزان قندهای احیاکننده به روش سوموگی نلسون ۲۸
۲-۶-۱-۱ تهیه عصاره گیاهی ۲۸
۲-۶-۱-۲ تهیه محلولهای مورد نیاز ۲۹
۲-۶-۱-۳ طریقه استفاده از این محلولها در سنجش میزان قندها ۲۹
۲-۶-۱-۴ رسم منحنی استاندارد ۳۰
۲-۶-۲ سنجش میزان پروتئین کل به روش برادفورد ۳۰
۲-۶-۲-۱ تهیه معرف بیوره ۳۰
۲-۶-۲-۲ رسم منحنی استاندارد ۳۱
۲-۶-۳ سنجش میزان رنگیزه های فتوسنتزی ۳۱

۲-۶-۴ سنجش میزان پراکسیداسیون غشا ۳۲
۲-۶-۴-۱ اندازه گیری غلظت مالون دآلدئید در برگ گیاه ۳۲
۲-۶-۴-۲ اندازه گیری سایر آلدئیدها ۳۲
۲-۶-۵ سنجش میزان آسکوربیک اسید و دی هیدروآسکوربیک اسید ۳۳
۲-۶-۵-۱ تهیه محلولهای مورد نیاز ۳۳
۲-۶-۵-۲ اندازه گیری آسکوربیک اسید ۳۳
۲-۶-۵-۳ روش اندازه گیری دی هیدرو آسکوربیک اسید ۳۴
۲-۶-۵-۴ رسم منحنی استاندارد ۳۵
۲-۶-۶ سنجش میزان آنتوسیانین ۳۵
۲-۶-۷ اندازه گیری فلاوونوئیدها به روش اسپکتروفتومتری ۳۶
۲-۶-۸ سنجش میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز ۳۶
۲-۶-۸-۱ رسم منحنی استاندارد ۳۷
۲-۶-۹ انجام الکتروفورز ۳۷
۲-۶-۹-۱ الکتروفورز با ژل پلی اکریل آمید ۳۷
۲-۶-۱۰-۲ محلولهای لازم برای الکتروفورز ۳۷
۲-۶-۱۰-۳ مراحل تهیه ژل به روش SDS-PEGE ۳۹
۲-۶-۱۰-۴ آماده سازی نمونه ها و تزریق در ژل ۴۰
۲-۶-۱۰-۵ تثبیت پروتئین ها ۴۱
۲-۶-۱۰-۶ رنگ آمیزی پروتئین ها ۴۱
۲-۶-۱۰-۷ رنکبری ژل ۴۱
۲-۶-۱۰-۸ تعیین Rm ۴۲
۲-۶-۱۱ تهیه مقطع عرضی ساقه ۴۲
۲-۶-۱۱-۲ آماده سازی برای رنگ آمیزی ۴۲
۲-۶-۱۱-۳ رنگ آمیزی مقاطع ۴۳
۲-۶-۱۱-۴ روش تهیه رنگ آبی متیل ۴۳
۲-۶-۱۱-۵ روش تهیه کارمن زاجی ۴۳

۲-۶-۱۲ آنالیز آماری ۴۳

فصل سوم- نتایج

۳-۱ مرحله جوانه زنی ۴۷

۳-۲ اندازه گیریهای حاصل از وزن تر و خشک ریشه گیاه ۴۷

۳-۳ اندازه گیری سطح برگ ۴۷

۳-۴ اندازه گیری زاویه خمش برگ ۴۷

۳-۵ نتایج حاصل از اندازه گیری قندهای احیاکننده در ریشه و برگ گیاه ۴۸

۳-۶ نتایج حاصل از اندازه گیری پروتئین در برگ و ریشه گیاه ۴۸

۳-۷ اندازه گیری رنگیزه های فتوسنتزی ۴۸

۳-۷-۱ اندازه گیری میزان کلروفیل های aوb و کلروفیل کل ۴۸

۳-۷-۲ اندازه گیری میزان کاروتنوئیدها ۴۸

۳-۸ نتایج حاصل از اندازه گیری آلدئیدهای تولید شده

طی واکنش های پراکسیداسین در برگ ۴۸

۳-۹ اندازه گیری آسکوربیک اسید و دی هیدروآسکوبیک اسید

در برگ گیاه آفتابگردان ۴۹

۳-۱۰ اندازه گیری میزان آنتوسیانین در برگ ۴۹

۳-۱۱ اندازه گیری میزان فلاوونوئیدها در برگ ۴۹

۳-۱۲ نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم PAL ۴۹

۳-۱۳ نتایج حاصل از بررسی پروتئین ها بوسیله الکتروفورز ۴۹

۳-۱۴ نتایج حاصل از بررسی برش های عرضی ساقه ۵۰

فصل چهارم- بحث و نتیجه گیری

۴-۱ تاثیر تنش بر جوانه زنی بذر گیاه ۷۸

۴-۲اثر غرقابی بر پارامترهای مورفولوژیکی ۷۸

۴-۲-۱ تاثیر تنش بر سطح برگ, وزن تر و وزن خشک ریشه ۷۸

۴-۲-۲ تاثیر تنش بر تشکیل ریشه های نابجا, ائرانشیم و اپی ناستی ۷۹

۴-۳ اثر تنش غرقابی بر میزان قندهای احیاکننده در برگ و ریشه ۸۰

۴-۴ اثر غرقابی بر محتوی پروتئین برگ و ریشه گیاه ۸۱
۴-۵ تاثیر تنش بر رنگیزه های فتوسنتزی ۸۲
۴-۶ تاثیر تنش غرقابی در القا تنش اکسیداتیو و مکانیزم های مقاومت به آن ۸۳
۴-۷ تاثیر تنش غرقابی بر میزان آنتوسیانین ها و فلاوونوئیدها ۸۵
۴-۸ تاثیر تنش غرقابی بر میزان فعالیت آنزیم PAL ۸۵
۴-۹ بحث در نتایج حاصل از الکتروفورز ۸۶
۴-۱۰ نتیجه گیری کلی ۸۷
۴-۱۱ پیشنهادها ۸۸
فصل پنجم- منابع ۹۰

۱- مقدمه

گیاهان عالی هوازی می باشند و جهت بقا و زندگی خود نیاز به اکسیژن ملکولی دارند، ولی غرقابی سدی موثر در تبادل گازی است. غرقاب شدن خاک زمانی رخ می دهد که خاک با آبیاری بیش از حد، بارندگی زیاد و یا زهکشی نامناسب روبرو شده باشد. در خاکهایی که تحت تنش غرقابی قرار می گیرند، خاک از آب اشباع شده، به طوریکه با پر شدن تمام فضاهای موجود بوسیله آب، خاک و ریشه ها با کمبود اکسیژن مواجه می شوند (Araki, 2006 . Boru et al, 2003). انتشار گازها در آب، نسبت به هوا صد هزار برابر آهسته تر است (Jackson, 1985)، به همین دلیل در شرایط تنش، جریان اکسیژن به داخل گیاه کند شده، در نتیجه باعث کاهش تنفس،کمبود انرژی و نهایتا مرگ سلولها و بافت ها در گیاهان غیر مقاوم می گردد.کاهش سرعت انتشار گازها از طریق آب باعث تجمع گازهای تولید شده درونی مثل اتیلن می شود (Jackson and Armstrong, 1999).

تنش غرقابی بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در گیاه مختل می کند،که از این تغییرات می توان به کاهش ظرفیت فتوسنتزی،کاهش هدایت روزنه ای،کاهش میزان جذب آب و مواد معدنی و تخریب رشد اشاره کرد (Bang et al. 2004).

این تنش بسیاری از خصوصیات خاک را تغییر می دهد؛که می توان به افزایش اسیدیته خاک،کاهش میزان انتشار اکسیژن و کاهش میزان پتانسیل احیایی خاک اشاره کرد (Huang and Wilkinson, 2000).

غرقابی باعث کاهش سیستم ریشه ای می شود و به طور غیر مستقیم نیز روی قسمت های هوایی گیاه تاثیر می گذارد (Blokhina, 2000).

گیاهان مکانیزم های متابولیکی و تکاملی زیادی را برای سازش در مقابل کمبود اکسیژن از خود نشان می دهند،که اینها حساسیت و مقاومت آنها را در شرایط تنش غرقابی تعیین می کند.

تغییرات تکاملی می تواند شامل تشکیل ائرانشیم در ریشه، رشد طولی میانگره ها، تشکیل ریشه های نابجا و تغییر در مورفولوژی و تخلخل ریشه باشد. نشان داده شده است که اتیلن در ایجاد این سازگاریها دخیل می باشد (Voesenek et al. 2003).

میزان خسارت وارده به گیاه از طریق این تنش به نوع گیاه ، سن، شرایط فیزیولوژیکی گیاه و نیز به شرایط خاک بستگی دارد (Huang and Wilkinson, 2000). تنش غرقابی شامل دو حالت گذراست که عبارتند از : هیپوکسی[1] و آنوکسی[2].که این دو با غلظت های مختلف اکسیژن

[1]- Hypoxia
[2]- Anoxia

مشخص می شوند. هیپوکسی بر آنوکسی مقدم است. بر طبق گزارش درو[1](۱۹۹۷)، بافتها یا سلولها زمانی دچار هیپوکسی می شوند که فشار اکسیژن کاهش یابد و میزان تولید ATP به وسیله میتوکندری محدود شود. آنوکسی نیز زمانی رخ می دهد که تولید ATP به وسیله فسفریلاسیون اکسیداتیو در مقایسه با تولید ATP از طریق تخمیر و گلیکولیز بسیار ناچیز شود (Blokhina and Olga, 2003؛ Blokhina et al. 2000).

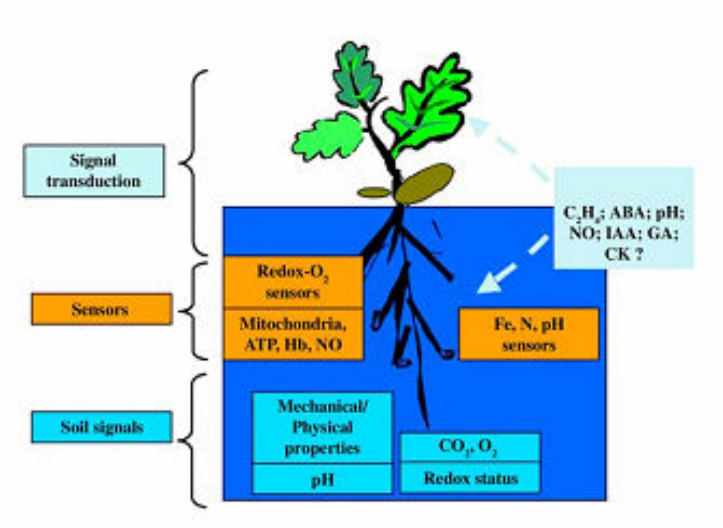
۱-۱تغییرات خاک در اثر تنش غرقابی

چون در خاک های غرقاب شده به دلیل پر شدن فضاهای موجود در بافت خاک بوسیله آب، دیگر جایی برای هوا باقی نمی ماند بنابراین، این خاکها اغلب با کمبود اکسیژن مواجه می شوند. این فقر اکسیژن به وسیله رویداد هایی که در ریزوسفر اتفاق می افتد، مثل تنفس میکروبی تشدید می شود(Jackson et al. 1996).

سه نوع از شرایط غرقابی بر اساس غلظت اکسیژن تشخیص داده شده است:

۱. Normaxia: شرایطی است که در آن تنفس هوازی و متابولیسم به صورت نرمال انجام می شود و ATP بیشتر از طریق فسفریلاسیون اکسیداتیو تولید می گردد.
۲. Hypoxia: شرایطی است که در آن کاهش اکسیژن قابل دسترس یک عامل محدود کننده در تولید ATP از طریق فسفریلاسیون اکسیداتیو است.
۳. Anoxia: شرایطی است که در آن ATP هنوز توسط گلیکولیز تولید می شود، در حالی که اکسیژن زیادی در دسترس نمی باشد.

[1]- Drew



شکل۱-۱ سیگنالهای خاک طی

تنش غرقابی.ABA: اسید آبسزیک- C_2H_4: اتیلن- CK: سیتوکینین- GA: جیبرلیک اسید-Hb: هموگلوبین- IAA: اکسین- SA: سالسیلیک اسید

بنابراین سطح های متفاوتی از کمبود اکسیژن در طول مدت غرقابی وجود دارد و در زیر یک حد آستانه از غلظت، اکسیژن می تواند یک فاکتور محدودکننده اصلی باشد و باعث ایجاد پاسخ های سازشی گردد.

دیگر تغییرات شامل تغییر در pH و پتانسیل احیائی خاک است. هنگامی که خاک احیا می شود، آهن و اکسیدهای آن احیا شده و باعث تغییر در pH خاک و نیز تعادل کاتیونی می گردد. تغییرات pH به طور مستقیم گیاه را تحت تاثیر قرار نمی دهد، بلکه تاثیرات از طریق سمیت آلومینیوم یا منگنز،کمبود کلسیم و احیا مواد آلی خاک می باشد (Probert and Keating, 2000).

در خاکهای اشباع شده به دلیل پائین بودن پتانسیل احیایی خاک ، سولفات توسط میکروارگانیزم های بی هوازی خاک به سولفید احیا می شود و باعث تولید سمیت سولفیدی می گردد. سولفیدهای محلول نظیر H_2S برای ریشه ها سمی می باشند واثر بازدارندگی روی سیتوکروم اکسیداز دارند. همچنین اثرات منفی افزایش سولفید برظرفیت فتوسنتزی برگ در چندین گونه گیاهی گزارش شده است (Pezeshki؛ 2001).

در شرایط بی هوازی گلیکوزید های سیانوژنیک در ریشه احیا شده و تولید ترکیبات سمی سیانیدی می کنند (Kozlowski؛1997).

نشان داده شده است که انتشار آهسته گازها در فاز مایع، انباشتگی فراورده های سمی متابولیسم غیر هوازی (مثل اتانول،لاکتیک اسید، دی اکسید کربن، نیتروژن، H^+ و متان) را زیاد کرده که اینها می توانند در داخل سلول تجمع یافته و یا در خاک آزاد شده و ویژگی های آن را تغییر دهند.

قابل دسترس بودن بسیاری از مواد تغذیه ای تحت تاثیر وضعیت ردوکس خاک می باشد.کاهش در ردوکس، باعث آزاد شدن کاتیون ها از طریق جذب آهن فرو روی کمپلکس های تبادلی و نیز آزاد شدن فسفر به وسیله تجزیه اکسیدها می گردد. NO_3^- تبدیل به NH_4^+ می شود و سپس روی کمپلکس های تبادل کاتیونی تثبیت می گردد. پس در کل آهن و منگنز قابل دسترس گیاه در خاک افزایش یافته و مقدار نیتروژن و فسفر کاهش می یابد، و در نتیجه متابولیسم ریشه تحت تاثیر قرار می گیرد(Huang and Wilkinson , 2000؛ Campbell and Drew, 1983). در این شرایط سولفات نیز احیا شده و از SO_4^{2-} به H_2S و S^{2-} به HS^- تغییر می یابد، این عمل که توسط باکتری ها انجام می شود، برای آنزیم های تنفسی سمی است (Dat et al. 2004).

۱-۲ اثرتنش بر جوانه زنی دانه

در تنش غرقابی جوانه زنی دانه ها کاهش می یابد و این کاهش می تواند مربوط به کمبود اکسیژن باشدکه در شرایط غرقابی به وجود می آید. تحت این شرایط تنفس و انتقال الکترون بازداشته می شود و در نتیجه تولید ATP در طول جوانه زنی کاهش می یابد.

هنگامی که تولید ATP کاهش یابد، وضعیت اکسیداسیون-احیا بین غشاهای سلولی تعادل خود را از دست می دهد و نفوذپذیری غشا افزایش یافته، در نتیجه مقدار آمینواسیدها، قندها و اسیدهای آلی در سلول زیاد شده و منجر به افزایش هدایت هیدرولیتیکی غشا و در نهایت تخریب آن می شود(Johnson؛ 1997, Tsai ؛ 1989).

۱-۳کمبود اکسیژن و اثر آن بر رشد ریشه

رشد ریشه به وسیله بسیاری از فاکتورهای محیطی تحت تاثیر قرار می گیرد و معمولا نسبت به تنش های محیطی از جمله غرقابی و کاهش میزان اکسیژن بسیار حساس است (Ito et al.1999).گرچه فقدان اکسیژن برای نوک ریشه ها کشنده است، ولی مقدار بسیار کم اکسیژن خارجی (۰/۰۰۶-۰/۰۱ مول بر متر مکعب در محلول) می تواند آنها را زنده نگه دارد.

اولین پاسخ سلولی در مقابل کمبود اکسیژن قابل دسترس، تحریک متابولیسم غیر هوازی پیروات در دو گونه حساس و مقاوم می باشد. در بافت هائی که دچار هیپوکسی یا آنوکسی شده اند، مقدار پیروات زیاد شده و فعالیت آنزیمهای گلیکولیتیک (گلیسرآلدهید۳-فسفات دهیدروژناز) و تخمیر(پیروات دکربوکسیلاز، الکل دهیدروژناز، لاکتات دهیدروژناز) افزایش یافته و کمبود ATP تولید شده ازاین طریق جبران می شود(Sato et al. 2002). فرآورده های تخمیر(استالدهید، اتانول، لاکتات) برای تولید دوباره NAD^+ از NADH مورد نیاز می باشند. برای مقاومت گیاه در شرایط تنش ،تولید دوباره NAD^+ توسط آنزیم های تخمیری ضروری است؛ چون در عدم حضور NAD^+ گلیکولیز کاملا متوقف می شود (Ismand et al. 2003).

عواملی که می توانند منجر به توقف رشد و مرگ سلولهادر شرایط آنوکسی شوند، نیاز به ATP بیش از مقداری است که تولید می شود وخود سمیت[1] به وسیله فرآورده های متابولیسم غیر هوازی مثل اتانول و استالدهید و در نتیجه اسیدی شدن سیتوپلاسم و واکوئل می باشد (Jackson, 2003).

اینکه چرا ریشه های غرقاب شده نیاز به فعالیت بالای الکل دهیدروژناز دارند، این است که:

برای جلوگیری از تجمع بیش از حد استالدهید، نسبت بالای ADH/PDC لازم است، چون این ترکیب باعث اسیدی شدن سیتوپلاسم می گردد (Waters, 1991). ثابت شده است که تاثیر سمی اتانول به دلیل تولید استالدهید است (Perata and Alpi, 1991).

بر طبق تئوری R.M.M (Crawford, 1967) مقاومت در شرایط غرقابی بوسیله به حداقل رساندن تولید اتانول به دست می آید و این امر وقتی امکان پذیر است که اتانول حاصل از تخمیر الکلی در چرخه ای به مالات تبدیل شود،که در این چرخه به.فعالیت فسفوانول پیروات دکربوکسیلاز و مالات دهیدروژناز برای سنتز نیاز می باشد (Vanlerbergll, 1990).

[1] -Self-poisoning

۱- ۴ اثر تنش بر فتوسنتز و روزنه ها

به طور کلی برای تشخیص اثر تنش غرقابی بر سرعت فتوسنتز، مقدار کلروفیل و هدایت روزنه ای را به عنوان شاخص درنظر می گیرند.

غرقاب شدن خاک باعث کاهش سرعت فتوسنتزی در بسیاری از گونه های گیاهی می شود. مطالعات نشان داده است که در استوک ریشه ۴ گونه از مرکبات، این تنش باعث کاهش شدید فتوسنتز در عرض ۲۴ ساعت شده است (Drew, 1997).

گزارش شده است که کاهش اولیه در سرعت فتوسنتزی به مقدار زیاد مرتبط با بسته شدن روزنه ها می باشد (Pezeshki, 1996). هنگامی که گیاه تحت تنش قرار می گیرد مقاومت روزنه ای اغلب گونه ها افزایش یافته، در نتیجه تبخیر آب کم شده و از دهیدراته شدن برگها به خصوص در دماهای بالا ممانعت می شود (Ball and Farquhar, 1984). بسته شدن روزنه ها و در نتیجه کاهش جذب CO_2 جزو اولین شاخص ها در تنش است (Zaerr,1983). هنگامی که تنش برطرف شود و گیاه به حالت نرمال برگردد، روزنه ها دوباره باز شده و سرعت فتوسنتز افزایش می یابد (Davies,1977). البته گنجایش گشودگی روزنه ها بستگی به گونه گیاه و طول مدت تنش دارد.

اگر تنش به صورت مداوم وبه مدت طولانی ادامه داشته باشد،کاهش سرعت فتوسنتزی می تواند در اثر فاکتورهای غیر روزنه ای باشد. این فاکتورها شامل تغییر درفعالیت آنزیم روبیسکو و فقدان سنتز یا افزایش متلاشی شدن کلروفیل و در نتیجه کلروزه شدن برگهاست (Davies and Flora , 1986).

تغییر در فعالیت روبیسکو مقدار کربوکسیلاسیون را منعکس می کند و به دلیل اینکه این آنزیم اولین واکنش در تثبیت CO_2 را کاتالیز می کند، پس می تواند نقش مهمی در تنظیم فتوسنتز داشته باشد.

فعالیت روبیسکو تحت تاثیر نور و غلظت CO_2درونی است. به طورکلی هنگامی که غلظت درونی CO_2 زیاد باشد فعالیت روبیسکو کاهش می یابد (Sage, 1988). بالا بودن غلظت CO_2 و به دنبال آن کاهش فعالیت آنزیم ریبولوز ۵-۱ بیس فسفات کربوکسیلاز، باعث افزایش غلظت فسفوگلیسرات و در نتیجه اسیدی شدن فاز استرومایی کلروپلاست می گردد و این در حالتی است که روبیسکو بهترین فعالیت خود را می تواند در pH بازی (۱۰ــ۸/۵) داشته باشد (Lorimer and Andrews,1984).

عامل دیگری که می تواند باعث کاهش سرعت فتوسنتزی شود، اثر بازدارندگی ناشی از تجمع نشاسته در برگهاست. گزارش شده است که در تنش غرقابی، انتقال آبکشی مواد فتوسنتزی به دلیل کمبود اکسیژن بلوکه شده (Sagilo,1985) و درخواست برای بارگیری ساکارز کاهش یافته و در نهایت منجر به تجمع نشاسته می گردد (Wample and Davies,1983).

۱-۵ اثر تنش غرقابی بر فتوسیستم II

فتوسیستم II یک جزء حساس در دستگاه فتوسنتزی است که تحت تنش های محیطی آسیب می بیند. تغییر در میزان فلورسانس کلروفیل ناشی از عدم عملکرد این فتوسیستم است، در نتیجه اندازه گیری فلورسانس می تواند به عنوان یک معرف جهت سنجش میزان تخریب PSII در برگهای تحت تنش غرقابی مورد استفاده قرار گیرد (Pezeshki and Goodwin, 2004؛ 2004 , Mauchamp and Methy). سلول های فتوسنتزی در مقابل تخریب حاصل از تنش اکسیداتیو بسیار حساس می باشند، چرا که جایگاه مقدار بالایی از اکسیژن هستند و محتوی مقادیر زیادی از لیپیدهای غیر اشباع در غشا تیلاکوئید می باشد (Zhang and Kirkham,1996).

۱-۶ ترکیبات سمی تولید شده ناشی از تنش غرقابی

ترکیبات سمی زیادی در خاک های غرقاب شده به وجود می آید که باعث کاهش رشد و مرگ و میر گیاهان چوبی می شوند. این آسیب به دلیل تولیدات ناشی از متابولیسم غیر هوازی مثل آلدهیدها، اسیدهای آلی و اتانول است. گرچه اتانول به میزان زیاد در برگها، ساقه ها وریشه های گیاهان تحت تنش تولید می شود، با این وجود شواهد حاکی از آن است که این ترکیب زیاد سمی نمی باشد، چون گیاهان به راحتی آن را دفع کرده و به مکان های هوازی انتقال می دهند (Kozlowki,1997).

۱-۷ اثر تنش بر رشد ریشه و ساقه

اثرات عمومی غرقابی شامل کاهش رشد ریشه، ساقه و کاهش تراکم گیاهی است (Pezeshki, 2001؛ Kozlowski, 1997).

گزارش شده است که در گیاهک گندم، کاهش رشد ریشه سریع تر از رشد ساقه است (Huang and Wilkinson, 2000؛ Pezeshki, 2001). به طور کلی می توان گفت حساسیت سیستم ریشه ای نسبت به سیستم ساقه ای بیشترمی باشد. دیده شده است که غرقاب کردن گیاه به

مدت ۲۱ روز اثری بر وزن تر ساقه نداشته ولی وزن تر ریشه گیاهک گندم را کاهش داده است (Huang and Wilkinson؛ 2000). خاک غرقاب شده در بسیاری از گیاهان چوبی به دلیل اثر بازدارندگی غرقابی برتشکیل ریشه، عریض شدن آنها و نیز جمعیت و آلودگی با میکوریز و میزان رشد ریشه کاهش می یابد (Kozlowski؛1997).

۱-۸ چگونگی تولید اتیلن تحت شرایط تنش غرقابی

اتیلن که تقریبا توسط همه گیاهان تولید می شود، مسوول بسیاری از پاسخ های گیاهی می باشد. این هورمون نقش فعال در جوانه زنی دانه، تمایز بافت ها، تشکیل پریموردیای ریشه و ساقه، طویل شدن ریشه و نیز پاسخ گیاهان به انواع تنش ها مثل ایجاد اپی ناستی و یا ریشه های نابجا و هیپرتروفی در گیاهان غرقاب شده دارد (Morgan and Drew,1997 ؛ Nilsen and Orccut,1997).

گزارش شده است که در مدت یک ساعت پس از غرقاب، فشار اکسیژن کاهش می یابد،که می تواند منجر به بدام انداختن اتیلن در بافتهای گیاهی و در نتیجه افزایش غلظت آن شود (Drew,1997, Nilsen and Orccut).

تجمع اتیلن در بافتهای گیاه غرقاب شده نتیجه دو فرایند است:

۱. اتیلن به طور فیزیکی به دام می افتد،چون ضریب انتشار آن در آب هزار برابر کمتر از هواست.
۲. در میانگره های گیاه غرقاب شده میزان سنتز اتیلن افزایش می یابد (Lorbiecke and Sauter,1999؛ Kende,1998).

ریشه های هیپوکسی شده فعالیت بالائی از ACC سنتتاز را نشان می دهند و غلظت بالائی از آن را دارا می باشند (Drew,1997). به دلیل کمبود اکسیژن، ACC تولید شده توسط گزیلم به طرف اندام هوائی، جائی که اکسیژن کافی در دسترس است منتقل شده، در آنجا اکسید می شود و تولید اتیلن می کند و به دنبال آن تغییرات مورفولوژیکی وآناتومیکی زیادی را باعث می شود. گزارش شده است که تحت شرایط غرقابی، ACC سنتز شده در ریشه گیاه گوجه فرنگی توسط آوندها به سمت برگها رفته و باعث ایجاد اپی ناستی می گردد (Bradford,1982؛ Jackson,1956). به علاوه ریشه ها مقدار زیادی از ACC را به درون خاک آزاد می کنند، (Else,1995). باکتریهائی که توانائی احیا این ترکیب را دارند در خاک فراوانند (Glick et al.1995) و می توانند با کاهش

غلظت ACC در گیاه در بهبود خسارات وارده به آن موثر باشند. این باکتریها آنزیم ACC دآمیناز را دارا می باشند (Grichko and Glick, 2001).

غرقابی می تواند با افزایش سطح CO_2 خاک بازدارندگی فعالیت ACC اکسیداز در ریشه هارا سبب شده و در نتیجه ACC در سیستم ریشه ای تجمع می یابد (Bradford et al.1982).

۱-۹ اثر تنش بر آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز(PAL) وترکیبات فنولیکی

ترکیبات فنولیکی، متابولیت های ثانویه آروماتیکی می باشندکه از طریق مسیر شیکیمیک اسید و مالونیک سنتز می شوند (Geissmaa,1969).

اعمالی را که این ترکیبات انجام می دهند شامل اندام زایی، تنظیم هورمونی، دفاع گیاه در مقابل استرس ها، سیگنالینگ در جهت هدایت گرده افشان ها یا پراکندگی میوه ها و نیز همزیستی گیاه است (Tarlings,1995).

اولین واکنش در مسیر فنیل پروپانوئیدی را آنزیمی به نام PAL کاتالیز می کندکه باعث دآمینه شدن فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید شده، در مرحله بعد آنزیم P-450، سینامیک اسید را هیدروکسیله کرده به P- هیدروکسی سینامیک اسید،که این ترکیب یک پیش ساز برای انواع متعددی از متابولیت های ثانویه است،که هم در سیستم ساختاری و هم در سیستم دفاعی گیاه نقش حیاتی دارند (Hanson, 1981).

گزارش شده است که تحت شرایط تنش مثل پاتوژن ها، زخم، غرقابی و اشعه UV فعالیت آنزیم PAL و در نتیجه مقدار ترکیبات فنولیکی که نتیجه فعالیت آن می باشند افزایش می یابد (Gassma, 1969).

۱-۹-۱ فلاوونوئیدها

سنتز فلاوونوئیدها در نزدیکی شبکه آندوپلاسمی و در سیتوزول انجام می شودکه پس از آن می توانند توسط پمپ گلوتاتیون وابسته به ATP وارد واکوئل شوند.

گزارش شده است که فلاوونوئیدها در رشد گیاه و تولید مثل اهمیت زیادی دارند (Hrazdina,1985)، و برخی از فلاونوئیدها مثل دی هیدروکسی فلاوون و یا ایزوفلاوونوئیدها در همزیستی گیاهان نقش اساسی دارند (Paiva,1994).

این ترکیبات به عنوان یک سد در برابر اشعهUV-B عمل کرده، و گیاه را در مقابل خسارات وارده بهDNA ، که ناشی از اشعه UV می باشد محافظت می کنند (Bjorn,1997).

گزارشات متعدد نشان می دهد که ترکیبات فنولیکی انباشته شده در واکوئل ها به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل می کنند (Greenberg et al. 1996؛ Olsson et al.1998). این ترکیبات با پراکسید هیدروژنی که در اثر تنش اکسیداتیو تولید می شود واکنش می دهند. برخلاف سایر گونه های فعال اکسیژن، پراکسید هیدروژن قادر است در طول غشاء انتشار یابد. سمیت این ترکیب به خودی خود ضعیف است ولی در حضور برخی از فلزات مثل آهن و مس باعث تولید رادیکال های هیدروکسیل می گردد،که می توانند خطرناک باشند. بنابراین جمع آوری H_2O_2 برای حفاظت گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو ضروری است. هنگامی که فنولیک ها به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل می کنند، به رادیکال های فنوکسی اکسیده می شوند. سپس آنها می توانند به وسیله یک واکنش غیر آنزیمی با آسکوربات به ترکیبات اولیه خود تبدیل شوند (Sakihami, 2002). دی هیدرو آسکورباتی که در نتیجه این واکنش ها به وجود می آید، در سیکل گلوتاتیون- آسکوربات تبدیل به آسکوربیک اسید می شود.

تنش غرقابی باعث القا تنش اکسیداتیو و تولید گونه های فعال اکسیژن می گردد، پس در این شرایط تولید و تجمع متابولیت های ثانویه مثل فلاوونوئید ها اهمیت زیادی دارد، به طوری که گزارش شده است مقدار فلاوونوئید ها در برگهای گیاه *Trifolium pretense* پس از یک دوره چند روزه غرقابی افزایش یافته است (Francis and Devit, 1969).

فلاوونوئید ها نقش مهمی در تنظیم انتقال هورمونهای گیاهی مثل اکسین داشته و گزارش شده است که، این ترکیبات در انتقال قطبی اکسین نقش دارند (Rubbery,1990).

به علاوه بسیاری از آنزیم هابه خصوص پروتئین کینازها، که در سیگنالینگ درون سلولی دخیل می باشند، تحت تاثیر فلاوونوئید ها می باشد (Klejdus et al. 2000؛ Paiva, 2000).

۱-۹-۲ آنتوسیانین

آنتوسیانین گیاه را در مقابل بازدارندگی ونیز اکسیداسیون نوری محافظت می کند (Stintzing and Carle, 2004). هنگامی که گیاه انرژی نوری زیادی را دریافت می کند،کلروپلاست تولید گونه های فعال اکسیژن کرده که باعث خراب شدن تیلاکوئید، تجزیه DNA و دیگر خسارات می گردد، نشان داده شده است که آنتوسیانین در بسیاری از گونه ها باعث کاهش این خسارات می شود.

این ترکیبات در جذب نور دخالت دارند و می توانند رنگ سبز و زرد (۶۰۰-۵۰۰ نانومتر) را جذب کنند. در واقع آنتوسیانین ها همانند یک فیلتر نوری عمل کرده و کوانتا با انرژی بالا را از زنجیره انتقال الکترون دور می کنند (Pietrini and Massacci,1998؛Woodall et al.1998).

به علاوه آنتوسیانین یک مکمل بسیار خوب برای دیگر مکانیزم های غیر فتوشیمیائی خاموش کننده، مثل سیکل گزانتوفیل است. مطالعات اخیر روی گیاه آرابیدوپسیس[1] ثابت کرده است که گزانتوفیل در محافظت گیاه در استرس نوری، به مدت کوتاه می تواند بسیار مفید باشد ولی آنتوسیانین برای محافظت در مدت طولانی مناسب تر است (Lee, 2002؛ Lee et al. 2003).

آنتوسیانین در جمع آوری رادیکال ها نیز اهمیت دارد.آزمایشات میکروسکوپی در برگ های برنج[2] نشان داده است که سلول های پیگمانی قرمز که حاوی مقادیر زیادی از آنتوسیانین می باشند، نسبت به سلولهای سبز H_2O_2 را بهترحذف می کنند(Gould, 2002). هم چنین مشاهده شده است که غرقاب کردن گیاه *Vigna sinensis* و ذرت باعث تجمع آنتوسیانین ها در برگ آنها می شود(Duker,1981).

پس در کل می توان گفت که آنتوسیانین در جمع آوری گونه های فعال اکسیژن و نیز محافظت از سیستم فتوسنتزی در شرایط تنش اهمیت ویژه ای دارند.

[1] -Arabidopsis
[2] -Oryza sativa