مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۸۹ (۴۱۱-۴۰۳)

اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های اسید و آلکالین فسفاتاز محور جنینی در مراحل اولیه جوانه‌زنی بذر دو رقم گندم نان

فرح لقا رازقی یدک[۱]، رضا توکل افشاری[۲]* و فرزاد شریف زاده[۳]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۲- تاریخ تصویب: ۸۸/۱۱/۷)

چکیده

شوری آب و خاک یکی از مهمترین عوامل محیطی محدودکننده برای تولید محصول می‌باشد. آنزیم‌های فسفاتاز به طور وسیعی در گیاهان یافت می‌شوند و دفسفریلاسیون فسفات آلی و تبدیل آن به فسفات معدنی را بر عهده دارند. هدف از انجام این آزمایش ارزیابی فعالیت آنزیم‌های اسید و الکالین فسفاتاز در محور جنینی دو رقم گندم نان بود. در مرحله اول، به منظور ارزیابی تحمل به شوری در ارقام مورد بررسی، آزمایش جوانه‌زنی بذر دو رقم گندم نان اینیا۶۶ و قدس در پتانسیل‌های مختلف NaCl انجام گرفت. تنش شوری باعث کاهش درصد، سرعت و شاخص جوانه‌زنی گردید. در مرحله دوم، به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های اسید و الکالین فسفاتاز در بذرهای مقاوم و حساس تحت تنش شوری آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول رقم، فاکتور دوم شوری و فاکتور سوم زمان آبگیری بود. نتایج نشان داد که تنش شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های اسید و الکالین فسفاتاز شدند و با افزایش سطح تنش تا ۱۲- بار فعالیت آنزیم‌ها افزایش یافت. این افزایش فعالیت آنزیم در رقم مقاوم به تنش شوری (اینیا۶۶) بیشتر از رقم حساس (قدس) بود. فعالیت اسید و الکالین فسفاتاز در هر دو رقم مقاوم و حساس به شوری با افزایش زمان آبگیری افزایش یافت. در این آزمایش بیشترین میزان فعالیت آنزیم اسید و الکالین فسفاتاز مربوط به ۱۸ ساعت آبگیری بود. میزان اسید فسفاتاز در مقایسه با الکالین فسفاتاز در محور جنینی بذر هر دو رقم به طور محسوسی بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی: تنش شوری، اسید فسفاتاز، الکالین فسفاتاز، گندم نان، جوانه‌زنی.

مقدمه

گندم یکی از محصولات مهم و استراتژیک در ایران می‌باشد. تولید این گیاه در سال زراعی ۸۷-۸۶ حدود ۹ میلیون تن بوده است (Anonymous, 2008). کاهش عملکرد گندم تحت تأثیر تنش‌های محیطی بسیار معنی‌دار می‌باشد. پاسخ گیاه به تنش‌ها بستگی به عوامل مختلف مثل نوع، مدت و شدت تنش، مرحله رشد و زمان وقوع تنش دارد (Angelove, 2003). از آن جا که شرایط تنش زا سبب اختلال و تغییر فعالیت‌های گیاهی می‌شوند، بنابراین ممکن است این تنش‌ها به عنوان ابزاری برای مطالعه بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه مورد استفاده محققان قرار گیرند (Grattan & Grieve, 1999). تنش شوری از جنبه‌های مختلف بر رشد و متابولیزم گیاه اثر می‌گذارد. بین تنش شوری و کمبود آب رابطه مثبت و معنی‌داری وجود دارد. گیاهانی که در معرض تنش شوری قرار دارند علاوه بر تأثیر اسمزی

* نویسنده مسئول: رضا توکل افشاری تلفن: ۰۲۶۱-۲۲۴۶۰۷۴ E-mail: tavakkol@ut.ac.ir

تنس شوری که باعث اختلال در روابط آبی گیاه می‌شود، تحت تأثیر اثر اختصاصی تنش شوری که به صورت تأثیر یون‌ها روی متابولیزم سلولی و در بعضی از موارد سمیت ناشی از تجمع یون‌ها نیز قرار می‌گیرند (Barret-Leanard et al., 1982).

راهکارهایی که سبب سازگاری گیاه به تنش‌هایی مثل شوری، خشکی، سرما و گرما می‌شوند بر رشد و تولید گیاه اثر می‌گذارند و گیاه در پاسخ به این تنش‌ها با مکانیزم‌های مختلف مثل تغییر مورفولوژیک و الگوی نموی و پاسخ های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سازگار می‌شود (Sarapatka et al., 2004). سازگاری به این تنش‌ها با تنظیم متابولیت‌هایی که منجر به تغییر آنزیم‌های مختلف می‌شود در ارتباط است (Ehsanpous & Amini, 2003). در میان این آنزیم‌ها، فسفاتازها مهمترین آنزیم‌هایی هستند که فرایندهای فیزیولوژیک مثل تنظیم فسفات محلول، متابولیسم انرژی و تنظیم متابولیک سلول را بر عهده دارند (Bewley, 1997; Sharma et al., 2004).

فسفات یک ترکیب ضروری در ساختار مولکول‌های DNA و RNA، فسفولیپیدهای دیواره سلولی، ATP و تعدادی از متابولیت‌های دیگر است (Sharma et al., 2004). آنزیم‌های فسفاتاز از مهمترین آنزیم‌های گیاهی به شمار می‌روند که در فضای درون و برون سلول فعالیت دارند و نقش آنها دفسفریلاسیون فسفات آلی و تبدیل آن به فسفات معدنی است. فسفاتازها به طور سنتی بسته به pH بهینه برای فعالیت آنزیم به اسید و الکالین فسفاتازها تقسیم می‌شوند و pH بالای ۷ برای فعالیت الکالین فسفاتاز و پایین ۷ برای فعالیت اسید فسفاتاز مناسب می‌باشند (Pan & Chen, 1988). فعالیت اسید و الکالین فسفاتاز با کاهش کلسیم، فسفر، عناصر کم‌مصرف و آهن افزایش می‌یابد. علت این افزایش، نگهداری فسفر معدنی در سطح عادی می‌باشد تا فرایندهای حیاتی گیاه انجام گیرد. این آنزیم‌ها سازگار کننده گیاه با تغییر شرایط محیطی است که با تنظیم متابولیت‌ها سبب تغییر در فعالیت آنزیم می‌شود. بنابراین مطالعه این آنزیم‌ها و عوامل مؤثر بر فعالیت آنزیم امری ضروری به نظر می‌رسد (Sharma et al., 2004).

جوانه‌زنی بذر زنده با جذب آب شروع می‌شود و با خروج محورهای جنینی پایان می‌یابد. برای درک بهتر تأثیر تنش شوری، جوانه‌زنی را می‌توان به سه مرحله تقسیم نمود: ۱- شروع جذب آب، ۲- آغاز فعالیت‌های متابولیک و ۳- ظهور و طویل شدن محورهای جنینی. Bewley (1997) جوانه‌زنی به مفهوم واقعی آن را منحصر به مرحله یک و دو دانسته و مرحله سه را یک مرحله بعد از جوانه‌زنی می‌داند.

آنزیم‌های فسفاتاز نقش فیزیولوژیک مهمی را در سازگاری بذرهای در حال جوانه‌زنی با تغییر شرایط محیط دارند. در تحقیقی توسط Centeno et al. (2003) فعالیت اسید فسفاتاز در زمان جوانه‌زنی بذر گندم زمستانه و بهاره مورد بررسی قرار گرفت. در هر دو رقم فعالیت این آنزیم به مقدار قابل ملاحظه‌ای (به ترتیب ۲۵۰ و ۲۷۵ درصد) در طی جوانه‌زنی افزایش یافت و افزایش اسید فسفاتاز همبستگی مثبت و معنی‌داری با کاهش مقدار فیتات فسفر داشت (Belcher & Miller, 1974). به ترتیب در گزارش‌های Sharma et al. (2005) و Ehsanpour & Amini (2003) فعالیت این آنزیم‌ها تحت شرایط تنش و اثر هورمون‌های گیاهی افزایش یافت. Liao et al. (2003) گزارش کردند که تحت تنش شوری در ریشه و برگ سویای زراعی و وحشی فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز افزایش یافت. آنها نقش این این آنزیم‌ها را کنترل رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ایجاد سیگنال‌های مؤثر در تحمل به تنش دانستند. همچنین Sharma et al. (2004) فعالیت بالای اسید و الکالین فسفاتاز را در محورهای جنینی بذر سورگوم تحت تنش شوری گزارش کردند به طوری که در آندوسپرم سورگوم تنها مقدار اسید فسفاتاز افزایش یافت.

با توجه به اینکه ارتباط تنوع فعالیت این آنزیم‌ها در مراحل جوانه‌زنی با فرایند جوانه‌زنی و بنیه بذر کمتر مورد توجه قرار گرفته، همچنین فعالیت این آنزیم‌ها در محور جنینی بذر گندم تحت تنش‌های محیطی و احتمال نقش آن در افزایش تحمل به تنش‌ها کمتر بررسی شده، هدف این تحقیق بررسی اثر تنش شوری بر آنزیم‌های اسید و الکالین فسفاتاز محورهای جنینی در مراحل اولیه جوانه‌زنی بذر گندم است. بررسی این آنزیم‌ها تحت تنش شوری نیز می‌تواند به شناسایی نحوه

عمل مکانیزم‌های فیزیولوژیک تحمل به شوری در مراحل جوانه‌زنی کمک نماید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به منظور بررسی اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های اسید و الکالین فسفاتاز بذر دو رقم گندم بهاره اینیا ۶۶ و قدس در دو مرحله در آزمایشگاه بذر، بیوتکنولوژی و فیزیولوژی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران در سال ۱۳۸۶ اجرا گردید. بدین منظور از بذرهای تولید سال ۱۳۸۴ مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج استفاده گردید.

در مرحله اول به منظور بررسی تحمل به شوری در مرحله جوانه‌زنی بذر ارقام مورد مطالعه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل:دو رقم بذر گندم اینییا ۶۶ و قدس و اعمال تنش شوری با ایجاد پتانسیل اسمزی با استفاده از NaCl (تهیه شده از شرکت مرک[1] آلمان) در چهار سطح ۴-، ۸-،۱۲- و ۱۶- بار و تیمار بدون تنش (پتانسیل اسمزی صفر) به عنوان شاهد، بودند. بنابراین با استفاده از رابطه ۱ محلول‌هایی با پتانسیل‌های مورد نظر تهیه شد (Lang, 1967):

۱) معادله لانگ: $\Psi = -m\ I\ R\ T$

که در آن:

Ψ: پتانسیل(بار)

m: مولالیته محلول

I: ضریب یونیزاسیون

R: ثابت گازها برابر ۰/۰۸۳۱

T: دما (کلوین)

آزمایش به صورت کشت بذرها روی کاغذ صافی در ظرف‌های پتری استریل یکبار مصرف به قطر ۹/۵ سانتی‌متر انجام شد. کاغذهای صافی درون پتری‌ها به مدت ۲ ساعت در آون در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد استریل شدند. محلول‌های تهیه شده با استفاده از معادله لانگ به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند.

قبل از کشت بذرها به مدت سه دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد استریل و سپس سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. سپس تعداد ۱۰۰ عدد بذر(۴ تکرار ۲۵ بذری) از هر تیمار درون ۴ ظرف پتری استریل روی کاغذهای صافی استریل قرار گرفتند. درون هر ظرف پتری حدود ۵ میلی‌لیتر از محلول‌های مورد نظر ریخته شده و ظرف‌های پتری درون ژرمیناتور (ساخت شرکت گروک ایران) در شرایط تاریکی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ روز قرار داده شدند.

جهت تعیین سرعت جوانه‌زنی بذر هر روز یک بار تا پایان روز هشتم آزمایش، تعداد بذرهای جوانه زده برای هر تکرار ثبت شد و داده‌های حاصل از شمارش بذرهای جوانه زده در آخرین روز شمارش برای محاسبه درصد جوانه‌زنی استفاده گردید. برای محاسبه شاخص جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی از رابطه ۲ استفاده گردید (Walker-Simmons & Sessing, 1990):

۲) معادله والکر- سیمونز:

$$GI=[7n_1+6n_2+5n_3+4n_4+3n_5+2n_6+1n_7] / 7\times N$$

$$Le=\frac{100[\sum ni]}{[\sum ni*ti]}$$

که در آن:

n: تعداد بذرهای جوانه زده

ni: تعداد بذرهای جوانه زده روز

i و ti: روز جوانه‌زنی است.

شاخص بنیه بذر با استفاده از رابطه ۳ تعیین گردید (Abdul-Baki & Anderson, 1973):

۳) شاخص بنیه بذر= درصد جوانه‌زنی×طول گیاهچه (cm)

آزمایشی در مرحله دوم به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز در بذرهای متحمل و حساس به شوری انجام گرفت. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول دو رقم مورد بررسی، فاکتور دوم تنش شوری با چهار سطح پتانسیل ۴-، ۸-، ۱۲- و ۱۶- بار و تیمار بدون تنش(پتانسیل اسمزی صفر) و فاکتور سوم مدت آبنوشی با سه سطح ۶، ۱۲ و ۱۸ ساعت بودند.

1. Merck

ابتدا بذرها به روش اجرا شده در مرحله اول آزمایش استریل شدند. بررسی هر تیمار با کشت ۲۰ بذر در هر تکرار انجام گرفت. بذرها روی کاغذ صافی استریل در درون ظرف‌های پتری استریل قرار داده شده و ۵ میلی لیتر از محلول با پتانسیل اسمزی مورد نظر به آن اضافه شد. که با استفاده از معادله Lang (1967) تهیه شده بودند. بذرها در سه سطح زمان آبنوشی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی در ژرمیناتور قرار گرفتند.

محلول بافر استخراج جنین شامل آب مقطر استریل و ۱۰۰ میلی مولار تریس[1] (تهیه شده از شرکت بیورد[2] آلمان) با pH=7 بود. استخراج پروتئین جنین به منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های فسفاتاز به روش Lee (2000) انجام گرفت. همچنین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز از روش Pan & Chen (1988) استفاده شد. واکنش با افزودن ۵ میلی‌مولار پارا نیتروفنل فسفات[3] (تهیه شده از شرکت مرک[4] آلمان) و ۱۰۰ میلی‌مولار بافر استات سدیم (تهیه شده از شرکت مرک آلمان) با pH=۵/۴ به ۵ میکرو لیتر نمونه استخراجی در اندازه کل ۲۰۰ میکرو لیتر شروع شد. و این محلول برای هر تکرار آزمایشی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به آن ۵۰ میکرو لیتر KOH (مرک آلمان) یک مولار اضافه شد. میزان جذب پارا نیترو فنل فسفات آزاد شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (ساخت شرکت شیماتسو ژاپن) اندازه‌گیری شد. برای فعالیت الکالین فسفاتاز واکنش با افزودن ۱۰ میلی‌مولار پارا نیترو فنل فسفات و ۱۰۰ میلی‌مولار Tris - HCl (بیورد آلمان) بافر با pH=۸/۳ به ۵ میکرو لیتر نمونه استخراجی در اندازه کل ۲۰۰ میکرو لیتر شروع شد. و میزان جذب pNP آزاد شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۰/۰۰۱ انجام گرفت. برای کنترل فرضیات مورد نیاز برای تجزیه واریانس، مقایسه میانگین از نرم‌افزار آماری SAS و MSTAT – C و برای تجزیه همبستگی صفات از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. همچنین به منظور نرمال کردن داده‌ها از نرم‌افزار MINITAB استفاده شد. تجزیه واریانس برای داده‌های تبدیل شده انجام گردید، ولی مقایسه میانگین‌ها با استفاده از داده‌های اصلی (میانگین‌های تبدیل نشده) انجام شد. برای رسم شکل‌ها از نرم‌افزار Excel 2003 استفاده شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی و همچنین اثر متقابل بین رقم و تیمار شوری معنی‌دار بودند (جدول۱). روند واکنش ارقام گندم در سطوح متفاوت پتانسیل اسمزی از نظر درصد، شاخص و سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر یکسان نبود (جدول ۲). به طوری که مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و تنش شوری بر درصد جوانه‌زنی نشان داد، که با افزایش سطح تنش شوری میانگین درصد جوانه‌زنی هر دو رقم کاهش یافت (جدول ۲). تفاوت بین حداقل و حداکثر درصد جوانه‌زنی در تنش شوری در رقم اینیا۶۶ و قدس به ترتیب ۹۱ و ۹۹/۳ درصد بود. کاهش درصد جوانه‌زنی در رقم قدس نسبت به رقم اینیا۶۶ محسوس‌تر بود. اثر متقابل رقم و تنش شوری بر شاخص و سرعت جوانه‌زنی نیز معنی‌دار شدند. به طوری که با اعمال تنش شوری میانگین شاخص و سرعت جوانه‌زنی کاهش یافتند (جدول ۲).

اثر متقابل رقم و تنش شوری از نظر شاخص بنیه بذر در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار شد (جدول ۱). تفاوت بین حداقل و حداکثر شاخص بنیه بذر در تنش شوری در رقم اینیا ۲۰۰/۵ و در رقم قدس ۱۹۷ بود. همچنین کاهش شاخص بنیه بذر در رقم اینیا۶۶ نسبت به رقم قدس محسوس‌تر بود (جدول ۲).

نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز نشان داد که اثر متقابل رقم، تنش شوری و زمان آبنوشی در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود (جدول ۳). فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز دو رقم در سطوح متفاوت تنش شوری و زمان‌های مختلف آبنوشی یکسان نبود (جدول ۴). به طوری که مقایسه میانگین اثر متقابل رقم، تنش شوری و زمان آبنوشی بر فعالیت آنزیم اسید

1. Hydroxy methyl Aminomethan (Tris)
2. Biorad
3. P-nitrophenol phosphate (p-NPP
4. Merck

فسفاتاز نشان داد، که رقم اینیا۶۶ فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز بیشتری نسبت به رقم قدس داشت. بذرها در سطح پتانسیل صفر (شاهد) فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز کمتری نسبت به سایر سطوح پتانسیل شوری نشان دادند. سطح پتانسیل ۱۲- بار بیشترین فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز را نسبت به سایر سطوح پتانسیل شوری داشت. یعنی تا پتانسیل شوری ۱۲- بار فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز افزایش و پس از آن کاهش یافت(جدول ۴). بذرهای هر دو رقم در زمان ۶ ساعت آبنوشی فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز کمتری نسبت به سایر ساعات آبگیری نشان دادند و ۱۸ ساعت آبگیری بیشترین فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز داشتند. در ۵ سطح پتانسیل شوری با افزایش زمان آبگیری میزان فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز افزایش یافت (جدول۴). کمترین فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در ۶ ساعت آبگیری و شاهد (تنش شوری صفر بار) به ترتیب در اینیا۶۶ و قدس ۳/۸۰ و ۰/۹۲ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود. همچنین بیشترین فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در ۱۸ ساعت آبگیری و تنش شوری ۱۲- بار به ترتیب در اینیا۶۶ و قدس ۱۱/۷۷ و ۸/۲۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود (جدول ۴).

نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز نشان داد که اثر متقابل رقم، تنش شوری و زمان آبگیری در سطح احتمال ۰/۰۱ تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول۳). رقم اینیا۶۶ فعالیت الکالین فسفاتاز بیشتری نسبت به رقم قدس داشت. فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز دو رقم در سطوح متفاوت تنش شوری و زمان‌های مختلف آبگیری یکسان نبود (جدول ۵). به طوری که مقایسه میانگین اثر متقابل رقم، تنش شوری و زمان آبنوشی بر فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز نشان داد، که در بذرهای هر دو رقم با افزایش زمان آبگیری میزان فعالیت الکالین فسفاتاز افزایش یافت. با افزایش تنش شوری نیز میزان فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز افزایش یافت و بذرها در سطح پتانسیل صفر (شاهد) فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز کمتری نسبت به سایر سطوح پتانسیل شوری نشان دادند. سطح پتانسیل ۱۲- بار بیشترین فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز را نسبت به سایر سطوح پتانسیل شوری داشت. یعنی تا پتانسیل شوری ۱۲- بار فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز افزایش و پس از آن کاهش یافت (جدول۵). کمترین فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز در ۶ ساعت آبنوشی و شاهد (تنش شوری صفر بار) به ترتیب در اینیا۶۶ و قدس ۰/۳۲ و ۰/۲۸ واحد بر میلی گرم پروتئین بود. همچنین بیشترین فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز در ۱۸ ساعت آبنوشی و تنش شوری ۱۲- بار به ترتیب در اینیا۶۶ و قدس ۱/۵۳ و ۱/۳۳ واحد بر میلی گرم پروتئین بود.

با مقایسه جداول۴ و ۵ مشخص شد میزان فعالیت اسید فسفاتاز در مقایسه با فعالیت الکالین فسفاتاز بسیار بیشتر بود.

پاسخ آنزیم اسید و الکالین فسفاتاز تحت تنش شوری به ترتیب از یک روند خطی با R^2 = ۰/۸۳۱ و R^2 = ۰/۸۵ پیروی می‌کنند. تجزیه همبستگی بین صفات جوانه‌زنی و آنزیم فسفاتاز در تیمارهای ۱۲- و ۱۶- بار پتانسیل شوری انجام شد (جدول۶). فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز همبستگی مثبت و بالایی با فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و همبستگی مثبت با صفاتی نظیر سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر داشت. فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز همبستگی مثبت با شاخص جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر دارد.

جدول۱ - خلاصه تجزیه واریانس(میانگین مربعات) صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش جوانه‌زنی بذر ارقام گندم نان تحت تنش شوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	شاخص جوانه‌زنی	شاخص بنیه بذر
رقم	۱	۱۰۳۲/۵۳**	۵۰۵/۹۴**	۰/۰۶**	۵۷۴/۶۵**
تنش شوری	۴	۹۶۱۸/۱۳**	۷۴۳۵/۲۹**	۰/۸۸**	۴۱۳۸۶/۷۰**
رقم×تنش شوری	۴	۱۲۲/۵۳**	۴۶/۴۷**	۰/۰۰۴**	۷۱/۰۰*
اشتباه آزمایش	۲۰	۰/۸۳	۰/۷۹	۰/۰۰۱	۸/۹۹
ضریب تغییرات (درصد)		۱/۶۳	۲/۰۶	۴/۰۴	۴/۹۳

** و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

جدول۲- مقایسه میانگین برخی صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش جوانه‌زنی بذر ارقام گندم نان تحت تنش شوری

تنش شوری	درصد جوانه‌زنی		سرعت جوانه رنی		شاخص جوانه‌زنی		شاخص بنیه بذر	
(بار)	اینیا۶۶	قدس	اینیا۶۶	قدس	اینیا۶۶	قدس	اینیا۶۶	قدس
۰	۹۹/۰۰a	۹۹/۳۳a	۸۸/۳۳a	۸۸/۷۷a	۰/۹۵a	۰/۹۵a	۲۰۲/۷۰a	۱۹۷/۰۰a
-۴	۹۸/۰۸a	۸۹/۰۱b	۷۹/۲۰b	۶۵/۳۳c	۰/۹۰a	۰/۷۹b	۸۳/۰۱b	۶۶/۶۷c
-۸	۵۸/۱۹c	۳۵/۳۱e	۳۷/۱۰d	۲۳/۰۰f	۰/۴۰c	۰/۲۷d	۳۱/۲۲d	۱۵/۰۴e
-۱۲	۴۵/۲۵d	۲۷/۲۲f	۲۹/۲۰g	۱۹/۰۹g	۰/۳۸c	۰/۲۶d	۷/۱۷f	۳/۶۵f
-۱۶	۹/۲۱g	۰/۰۴h	۶/۳۳h	۰/۰۲i	۰/۰۹e	۰/۰۴e	۲/۲۰f	۰/۰۵f
LSD1%	۲/۱۲		۲/۰۷		۰/۰۷		۶/۹۶	

حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد است.

جدول ۳- خلاصه تجزیه واریانس(میانگین مربعات) فعالیت آنزیم اسید و الکالین فسفاتاز بذر ارقام گندم نان تحت تنش شوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		فعالیت اسید فسفاتاز	فعالیت الکالین فسفاتاز
رقم	۱	۱۴۰/۵۷۷۵**	۰/۲۹۸۵**
تنش شوری	۴	۲۵/۴۴۲۴**	۰/۱۴۷۳**
زمان آبگیری	۲	۹۳/۴۶۴۱**	۶/۲۳۰۳**
رقم × تنش شوری	۴	۲/۷۷۷۱**	۰/۰۰۰۴^{ns}
رقم × زمان آبگیری	۲	۳/۴۸۷۷**	۰/۰۵۳۳**
تنش شوری × زمان آبگیری	۸	۰/۰۹۰۸**	۰/۰۰۳۱**
رقم × تنش شوری × زمان آبگیری	۸	۰/۰۶۲۵**	۰/۰۰۱۹**
اشتباه آزمایش	۶۰	۰/۰۱۶۳	۰/۰۰۰۶
ضریب تغییرات (درصد)		۱/۹۲۷۱	۳/۰۰۳۵

** و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد ns غیر معنی‌دار

جدول۴- میانگین فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز دو رقم گندم تحت تیمارهای تنش شوری در مراحل اولیه آبنوشی

مدت زمان آبنوشی (ساعت)	فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز (واحد/میلی گرم پروتئین)									
	اینیا۶۶					قدس				
	شاهد (صفر بار)	۴- بار	۸- بار	۱۲- بار	۱۶- بار	شاهد (صفر بار)	۴- بار	۸- بار	۱۲- بار	۱۶- بار
۶ ساعت	۳/۸۰o	۵/۰۶m	۶/۴۸i	۷/۳۹h	۷/۱۰h	۲/۹۲p	۳/۶۵o	۴/۳۰n	۵/۱۶lm	۴/۴۹n
۱۲ ساعت	۵/۳۱lm	۶/۵۸i	۷/۹۴g	۹/۰۶de	۸/۹۴e	۳/۸۴o	۵/۱۰m	۵/۲۷lm	۶/۰۷j	۵/۴۴l
۱۸ ساعت	۷/۹۰g	۹/۲۷d	۱۰/۵۸c	۱۱/۷۷a	۱۱/۱۸b	۵/۷۹k	۶/۴۰i	۷/۱۷h	۸/۲۷f	۷/۳۳ h
LSD1%	۰/۲۵۷									

حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد است.

جدول۵- میانگین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز دو رقم گندم تحت تیمارهای تنش شوری در مراحل اولیه آبنوشی

مدت زمان آبنوشی (ساعت)	فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز (واحد/میلی گرم پروتئین)									
	اینیا۶۶					قدس				
	شاهد (صفر بار)	۴- بار	۸- بار	۱۲- بار	۱۶- بار	شاهد (صفر بار)	۴- بار	۸- بار	۱۲- بار	۱۶- بار
۶ ساعت	۰/۳۲op	۰/۴۱mn	۰/۴۶۱m	۰/۴۹kl	۰/۵۵k	۰/۲۸p	۰/۳۷no	۰/۴۲lmn	۰/۴۴lmn	۰/۴۴lmn
۱۲ ساعت	۰/۷۴i	۰/۸۳h	۰/۸۷gh	۰/۹۶ef	۰/۹۱fg	۰/۶۵j	۰/۷۴i	۰/۸۰hi	۰/۸۷gh	۰/۸۶gh
۱۸ ساعت	۱/۲۹c	۱/۳۹b	۱/۴۸a	۱/۵۳a	۱/۴۸a	۱/۰۲e	۱/۱۷d	۱/۲۷c	۱/۳۳bc	۱/۲۸c
LSD1%	۰/۰۶۹									

حروف غیر مشابه بیانگر معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد است.

جدول۶- ضرایب همبستگی ساده بین صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش جوانه‌زنی بذر و فعالیت آنزیم فسفاتاز جنین بذر تحت تنش شوری

		X۱	X۲	X۳	X۴	X۵	X۶
شاخص جوانه‌زنی	X۱	۱					
سرعت جوانه‌زنی	X۲	۰/۹۹۵**	۱				
درصد جوانه‌زنی	X۳	۰/۹۹۰**	۰/۹۸۵**	۱			
شاخص بنیه بذر	X۴	۰/۸۶۸**	۰/۹۰۶**	۰/۸۲۵**	۱		
فعالیت اسید فسفاتاز	X۵	۰/۹۴۲**	۰/۷۷۱^{ns}	۰/۷۷۱^{ns}	۰/۸۲۹*	۱	
فعالیت الکالین فسفاتاز	X۶	۰/۷۷۱^{ns}	۰/۹۴۳**	۰/۹۴۳**	۰/۸۲۹*	۰/۸۵۷*	۱

** معنی‌دار بودن در سطح احتمال۰/۰۱ * معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۰/۰۵ ns غیرمعنی‌دار بودن است.
همبستگی بین صفات جوانه‌زنی و آنزیم فسفاتاز در تیمارهای ۱۲- و ۱۶- بار پتانسیل شوری انجام شد.

بحث

بررسی تحمل به تنش شوری بذر دو رقم گندم مورد بررسی در مرحله جوانه‌زنی مشخص کرد که تیمار تنش شوری سبب کاهش معنی‌دار درصد، سرعت و شاخص جوانه‌زنی وشاخص بنیه بذر شد. این کاهش در رقم قدس بیشتر از رقم اینیا۶۶ بود. فرایندهای بیولوژیکی تحت تنش نیاز به انرژی بیشتری دارد تا مسیرهای بیوشیمیایی و فعالیت‌های فیزیولوژیکی ادامه یافته و رشد بدست آید. روند فعالیت‌های زیستی در شرایط محیطی بهینه رشد با شرایط تحت تنش شوری متفاوت خواهد بود، و در نتیجه رشد نیز در شرایط مذکور با هم تفاوت خواهد داشت. بذر رقم اینیا۶۶ که به تنش شوری متحمل تر بود توانست، با آبنوشی سریعتر زودتر جوانه بزند و از سرعت جوانه‌زنی بالاتری برخوردار بود.

نتایج نشان داد که سرعت جوانه‌زنی بذر دو رقم بیشتر از درصد جوانه‌زنی تحت تاثیر تنش شوری قرار گرفت. چنین استنباط می‌شود که تنش شوری ابتدا سرعت آبنوشی بذر را کاهش می‌دهد، ولی در مدت زمان بیشتر آبنوشی بذر انجام می‌گیرد و در نتیجه بذر جوانه می‌زند. این کاهش آبنوشی باعث کاهش سرعت جوانه‌زنی می‌شود و بدین طریق سرعت جوانه‌زنی بیشتر از درصد جوانه‌زنی تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرد. احتمالاً با افزایش تنش آب، پتانسیل اسمزی محلول نیز کاهش یافته و در نتیجه آبنوشی توسط بذر به کندی صورت گرفته و جوانه‌زنی به تأخیر افتاده است.

یکی از اثرات تنش شوری بر ریشه رسوب مواد لیگنینی روی عناصر آوندی می‌باشد. چنین تأثیری با افزایش یا سنتز پروتئین‌های تنش شوری میزان لیگنینی شدن دیواره سلول‌های ریشه افزایش می‌یابد. این امر در ارقام مقاوم نسبت به حساس نمود بیشتری پیدا می‌کند (Sarapatka et al., 2004). کاهش سرعت جوانه‌زنی تحت شرایط تنش شوری ممکن است یک راهکار سازگاری بذر تحت شرایط تنش محیطی برای استقرار بهتر گیاهچه باشد.

جوانه‌زنی بذر یکی از بهترین فرایندهای رشد ونموی است که به طور مشخص القا تولید آنزیم‌های فسفاتاز و فیتاز را باعث می گردد (Murray & Collier, 2006). فعالیت اسید و الکالین فسفاتاز در هر دو رقم متحمل و حساس به شوری با افزایش زمان آبنوشی افزایش یافت. ممکن است این افزایش به علت افزایش تنفس و تولید بیشتر آنزیم باشد. مشاهده این پدیده به خوبی گویای این موضوع است که واکنش سلول‌های گیاهی به شرایط کشت، تنش شوری و مقاومت، پایداری و حساسیت آنها به شرایط محیطی کاملاً وابسته به نوع گیاه، جنس، گونه و اصولاً ژنوتیپ است. چون بخشی از فعالیت آنزیم فسفاتاز مربوط به اسید فسفاتاز خارج سلولی است، بنابراین ممکن است میزان این نوع فسفاتاز در اینیا۶۶ بیشتر از قدس باشد و به دلیل وابستگی ساختار دیواره سلولی به ژنوتیپ گیاه، طبیعتاً ساختار دیواره آنها نیز متفاوت باشد.

تنش شوری باعث افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز می‌شود. این افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز در دیواره سلولی و کمپلکس گلژی در گیاه نخود فرنگی نیز گزارش شده است (Murray & Collier, 2006). برخی از پژوهشگران اختلاف فعالیت اسید فسفاتاز را به جذب

فسفر نسبت می‌دهند (Duff et al., 2006). ممکن است این موضوع در نتایج بدست آمده از این آزمایش نیز مؤثر بوده باشد. ولی برخی از شواهد دلالت بر عدم دخالت نقل و انتقال و مصرف فسفر و فعالیت اسید فسفاتاز دارد. به عنوان مثال مشاهده شده وقتی ماده متیل‌جاسمونات[1] به محیط کشت برگ برنج اضافه می‌شود، بدون تغییر در میزان فسفر، فعالیت اسید فسفاتاز افزایش می‌یابد (Shin, 1998). همچنین در این گزارش مشاهده شد تنش شوری موجب افزایش فعالیت اسید فسفاتاز می‌شود ولی این افزایش فعالیت آنزیم همراه با کاهش میزان فسفر محیط خارج و یا داخل سلول نیست (Shin, 1998).

نتایج نشان داد که فعالیت الکالین فسفاتاز در زمان‌های مختلف آبنوشی به طور محسوسی پایین‌تر از فعالیت اسید فسفاتاز بود، با وجود الگوی مشابه افزایشی در فعالیت این دو آنزیم، اسید فسفاتاز فعالیت بیشتری در تمام سطوح تیماری از خود نشان داد. در نتایج بدست آمده از این تحقیق، فعالیت آنزیم اسید و الکالین فسفاتاز با افزایش سطح تنش تا ۱۲- بار افزایش یافت یعنی روند صعودی داشت و پس از آن روند نزولی داشت. افزایش فعالیت اسید فسفاتاز در ارقام مختلف یکسان نیست. این تغییرات در رقم اینیا ۶۶ نسبت به رقم قدس محسوس‌تر بود. این یافته خود تأکیدی است بر اینکه، پاسخ‌های گیاهان به تنش مستقل از ژنوتیپ نیست. رقم اینیا۶۶ در همه سطوح آبنوشی دارای فعالیت آنزیم‌های اسید و الکالین فسفاتاز بیشتری نسبت به رقم قدس بود.

با توجه به نتایج افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز در شرایط تنش شوری چنین استنباط شد، که رقم اینیا نسبت به رقم قدس مقاوم‌تر بوده و یکی از مکانیزم‌های تحمل به شوری در ژنوتیپ‌های با تحمل بیشتر، افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز باشد.

1. Methyl Jasmonate

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران که بخشی از هزینه پژوهشی این پایان نامه را به شماره ۷۱۰۱۰۲۷/۶/۰۷ فراهم نمودند تقدیر و تشکر می گردد.

REFERENCES

1. Anonymous. (2008). *Commodity Intelligence Report*. USDA foreign Agricultyral Service. (http://www.pecad.fas.usda.gov/highlights/2008/05/Iran_may2008.htm)
2. Abdul- Baki, A. A. & Anderson, J. D. (1973). Vigour deterioration in soybean seeds by multiple criteria. *Crop Science*, 13, 630-633.
3. Angelov, G. B. (2003). Isoenzyme variation of esterase and acid phosphatase and genetic affinities among *Dasypyrum villosum*. *Turkish Journal of Botany*, 27, 249-254.
4. Barret-Lenard, E. G., Robson, A. D. & Greenway, H. (1982). Effect of phosphorus deficiency and water definition on phosphatase activity from wheat leaves. *Journal of Experimental Botany*, 33, 682-693.
5. Belcher, E. M. & Miller, L. (1974). Influence of substrate moisture level on the germination of sweet gnu and pine seed. *Turkish Journal of Botany*, 65, 88-89.
6. Bewley, D. J. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9, 1055-1060.
7. Centeno, C., Viveros, A., Brenes, A., Lozano, A. & De La Cuadra, C. (2003). Effect of several germination conditions on total P, phytate P, phytase, acid phosphatase activities and inositol phosphate esters in spring and winter wheat. *The Journal of Agricultural Science*, 141, 313-321.
8. Duff, S. M. G., Sarath, G. & Plaxton, W. C. (2006). The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum*, 90, 791-800.
9. Ehsanpour, A. A. & Amini, F. (2003). Effect of salt and drought stress on acid phosphatase activities in *alfalfa (Medicago sativa)* explants under in vitro culture. *African Journal of Biotechnology*, 2, 133-135.
10. Grattan, S. R. & Grieve, C. M. (1999). Salinity- mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 78, 127-157.
11. Jbir, N., Chaibi, W., Amar, S., Jemmali, A. & Ayadi, A. (2001). Root growth and lignification of two wheat species differing in their sensitivity to NaCl, in responses to salt stress. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Series III Sciences de la Vie*, 324, 863-868.
12. Lang, A. R. G. (1967). Osmotic coefficients and water potentials of sodium chloride from 0 to 40 ^{o}C. *Australian Journal of Chemistry*, 20, 2017-2020.
13. Lee, T. M. (2000). Phosphate starvation induction of acid Phosphatase in *Ulva lactuca* L. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39, 29-32.

14. Liao, H., Wong, F., Phang, T., Cheung, M., Li, W. F., Shao, G., Yan, X. & Lam, H. (2003). GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorous deficiency. *Gene*, 318, 29-32.
15. Murray, D. R. & Collier, M. D. (2006). Acid phosphatase activities in developing seeds of *Pisum satirum*. *Plant Biology*, 31, 227-238.
16. Pan, S. M. & Chen, Y. R. (1988). The effects of salt stress on acid phosphatase activity of *Zea maysa* seedling. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 29, 33-38.
17. Sarapatka, B., Dudova, L. & Kroskova, M. (2004). Effect of pH and phosphate supply on acid phosphatase activity in cereal roots. *Biologia Bratislova*, 59, 127-131.
18. Sharma, A. D., Thakur, M., Rana, M. & Singh, K. (2004). Effect of plant growth hormones and abiotic stresses on germination, growth and phosphates activities in *Sorghum biocolor* L. Moench seeds. *African Journal of Biotechnology*, 6, 308-312.
19. Sharma, A. D., Singh, N. & Kong, J. K. (2005). Short-term water logging-induced changes in phosphatase activities in shoots and roots of sorghum seedling: role of phosphatase during water logging in relation to phosphorus. *Plant of Physiology*, 31, 71-79.
20. Shin, C.Y. (1998). Induction of acid phosphatase in rice leaves under stress conditions. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39, 29-32.
21. Walker-Simmons, M. K. & Sesing, J. (1990). Effect temperature on embryonic of wheat grain dormancy during development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 9, 51-56.