



تخمین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز به عنوان یکی از عوامل موثر در تحمل گیاه به شوری با استفاده از عملگرهای ریاضی

نیر محمدخانی^{۱*}، مسلم ثروتی^۲

^۱ مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، n.mohammadkhani@urmia.ac.ir

^۲ مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، m.sarvati@urmia.ac.ir

چکیده

اصلاح خاک‌های شور در اغلب موارد بسیار مشکل و مقرون به صرفه نبوده لذا استفاده از ارقام مقاوم یکی از راه‌کارهای اساسی محسوب می‌گردد. در این گیاهان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز می‌تواند در افزایش مقاومت گیاه به شوری موثر باشد. از آنجایی که برآورد فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز وقت‌گیر و هزینه‌بر بوده برآورد فعالیت آن از روی محتوای یونی ریشه از اهمیت فراوانی برخوردار است. برنامه‌ریزی ژنتیک نیز به عنوان یکی از روش‌های فراکوشی رابطه بین متغیرهای ورودی و خروجی را با استفاده از عملگرهای ریاضی تخمین می‌زند. جهت نیل به اهداف دو رقم H_6 و شیرازی به ترتیب به عنوان رقم‌های مقاوم و حساس جهت مدل‌سازی با برنامه‌ریزی ژنتیک تحت سطوح مختلف شوری انتخاب شدند. مطالعات نشان داد که جذب نیترات تحت شوری کاهش یافته و در غلظت‌های بالای نیترات، کاهش در رقم شیرازی بیشتر بود. فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز با افزایش غلظت نیترات در ریشه در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت، در حالی که V_{max} تحت شوری کاهش نشان داد. مقایسه نتایج دو مجموعه عملگر ریاضی نشان داد که مدل پیش‌فرض‌ها دارای بیشترین ضریب تبیین و کمترین میانگین مربعات خطا نسبت به مدل عملگرهای اصلی می‌باشد، بنابراین به عنوان مدل کارا پیشنهاد می‌گردد. مدل پیش‌فرض‌ها در مدل‌سازی از عملگرهای سینوسی و توانی استفاده کرده است که باعث افزایش دقت مدل شده است. بر این اساس بیشترین تاثیر در مدل را به ترتیب عناصر نیترات، کلر، سدیم و پتاسیم به خود اختصاص دادند. با این وجود می‌توان با استفاده از روابط ریاضی ساده‌تر (عملگرهای اصلی) نیز مدل‌هایی با دقت نسبتاً قابل قبولی ارائه نمود.

واژه‌های کلیدی: انگور، برنامه‌ریزی ژنتیک، رقم حساس، رقم مقاوم، محتوای یونی ریشه.

۱- مقدمه

با توجه به رشد روزافزون جوامع بشری و استفاده نامناسب از اراضی، روند شورشدن اراضی رو به افزایش است. اصلاح این خاک‌ها در بسیاری از موارد بسیار مشکل بوده و مقرون به صرفه نیست، لذا استفاده از ارقام مقاوم می‌تواند یک راه‌کار مناسب محسوب گردد. در این گیاهان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز می‌تواند در مقاومت گیاهان به شوری موثر باشد. همچنین رشد و فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاهان عالی به وسیله شوری تحت تاثیر قرار می‌گیرد، به طوری که از جذب عناصر معدنی مثل نیتروژن ممانعت به عمل می‌آورد [1]. شوری با سدیم کلراید جذب نیترات در برخی گیاهان را مهار می‌کند [2]. سدیم نیز در جایگاه‌های انتقال با پتاسیم در ورود به سلول



رقابت می‌کند و احتمالاً منجر به کمبود پتاسیم می‌شود [3]. فعالیت نیترات ردوکتاز در برگ‌ها به شارش نیترات از ریشه‌ها وابسته است و شدیداً تحت تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرد [4].

انگور یکی از محصولات باغی مهم است و تنش شوری باعث کاهش محصول آن می‌شود. بنابراین مدل‌سازی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در شرایط شوری در گیاه انگور با استفاده از محتوای عناصر ریشه دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. با ادامه سیر تکاملی مدل‌های هوشمند، برنامه‌ریزی ژنتیک¹ به ابزارهای مدل‌سازی مسائل مربوط به تعیین ساختار پدیده‌ها افزوده شد. این روش جزء روش‌های الگوریتم گردشی محسوب می‌شود که مبنای تمامی آن‌ها بر اساس نظریه تکامل داروین استوار است. الگوریتم‌های یاد شده اقدام به تعریف یک تابع هدف در قالب معیارهای کیفی نموده و سپس تابع یاد شده را برای اندازه‌گیری و مقایسه روش‌های مختلف حل، در یک فرآیند گام به گام برای تصحیح ساختار داده‌ها به کار می‌گیرند و در نهایت، روش حل مناسب را ارائه می‌نمایند. روش برنامه‌ریزی ژنتیک جدیدترین شیوه از بین روش‌های الگوریتم تکاملی می‌باشد که به دلیل دارا بودن دقت کافی، مرسوم‌ترین شیوه بوده و از کاربرد بیشتری برخوردار است [5]. خاصیت غیرخطی، عدم قطعیت ذاتی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز از دلایلی بوده است که باعث شده که از مدل برنامه‌ریزی بیان ژن استفاده شود. این مدل با موفقیت توسط خطی و همکاران [5] در مدل‌سازی مسیریابی تخلیه رودخانه کیزل ایرماک ترکیه، ثروتی و همکاران [6] برآورد ظرفیت تبادل کاتیونی خاک به کار گرفته شده است. در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز با استفاده از برنامه‌ریزی بیان ژن به کمک محتوای عناصر موجود در ریشه گیاه تحت شوری ناشی از کلرید سدیم مدل‌سازی و متغیرهای ورودی که در مدل بیشترین تأثیر را داشتند، انتخاب شدند.

۲- مواد و روش‌ها

در مطالعات قبلی ۱۸ ژنوتیپ انگور بومی آذربایجان از نظر میزان تحمل به شوری غربال‌گری شدند. ژنوتیپ هیبرید H6 (*V. vinifera* cv. GharaUzum × *V. riparia* cv. Kober 5BB) به عنوان متحمل و ژنوتیپ شیرازی به عنوان حساس انتخاب شدند [7, 8]. قلمه‌های دو ژنوتیپ انگور از باغ مرکز تحقیقات کشاورزی تهیه و به گلخانه انتقال یافت. قلمه‌ها بعد از ضدعفونی با بنومیل ۱/۵٪، با ایندول بوتیریک اسید ۱۰۰ پی‌پی‌ام به مدت چند ثانیه تیمار شدند و در یک سیستم حرارتی (۲۲ تا ۲۸ درجه سلسیوس) با رطوبت کافی (۸۰ تا ۱۰۰ درصد) جهت ریشه‌زایی قرار داده شد. قلمه‌های ریشه و برگ‌دار ابتدا به گلدان‌های حاوی محلول هوگلند هواده‌ی شده انتقال یافتند. گیاهان دوماهه در محلول ۰/۲ میلی‌مولار کلسیم سولفات تحت هواده‌ی در شرایط تحت کنترل -دمای ۲۵-۳۰°C و رطوبت نسبی ۶۰-۷۰٪- در تاریکی به مدت ۶ روز قرار گرفتند. بعد از این مدت، گیاهان ۳ روز در نور مداوم (۱۵۰ μmol m⁻²s) در محلول هوگلند فاقد نیترات قرار گرفتند [9]. تیمار شوری به مدت چهار روز با افزودن سدیم کلراید در غلظت‌های ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مول به محلول‌های هوگلند فاقد نیترات اعمال شد. بعد از این مدت در روز پنجم گیاهان به مدت ۶ ساعت در گلدان‌های حاوی ۱ لیتر محلول هوگلند تحت هواده‌ی مداوم تحت تیمار همزمان نیترات و شوری قرار گرفتند. غلظت‌های ۰، ۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مول نیترات استفاده شد. نمونه‌برداری از محلول‌های حاوی ریشه گیاهان هر نیم ساعت یک‌بار انجام شد و این نمونه‌ها و نیز ریشه و اندام‌هوایی گیاهان که بعد از نمونه‌برداری در آن ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک و پودر شدند، جهت آنالیز یون‌ها استفاده شد.

۰/۵ گرم از ریشه و برگ گیاهان همه تیمارها جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در فریزر -۸۰ سلسیوس قرار گرفت. میزان کلر با استفاده از دستگاه کلراید آنالیز و میزان سدیم و پتاسیم با استفاده از فلیم‌فتمتر اندازه‌گیری شد. میزان نیترات نیز با روش سالیسیلیک اسید [10] تعیین شد. سنجش فعالیت نیترات ردوکتاز به روش جاورسکی [11] با اندکی تغییرات انجام شد. آنالیز آماری و رسم نمودارها با نرم‌افزار GraphPad Prism 5 انجام شد. تفاوت جذب یون‌ها بین تیمارهای نیترات در سطح احتمال ۵٪ با

¹- Genetic Programming



2nd International conference on sustainable development, strategies and challenges
With a focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism
23-25 Feb 2016, Tabriz, Iran

آزمون t و تفاوت جذب یونها بین ژنوتیپها با استفاده از شیب رگرسیون خطی^۲ تعیین شد. جهت تعیین سرعت جذب نیترا و پتاسیم و محاسبه V_{max} و K_m نیز دادهها با معادله سینیتیک آنزیمی میکائیلیس- منتن^۳ آنالیز شدند.

برای مدل سازی فعالیت آنزیم نیترا ردوکتاز نیز با استفاده از برنامه ریزی بیان ژن، ۸۰ درصد دادههای مربوط به غلظت عناصر (سدیم، کلر، پتاسیم و نیترا) و فعالیت آنزیم نیترا ردوکتاز در ریشه چهار ژنوتیپ انتخاب شده به عنوان دادههای آموزش و ۲۰ درصد به عنوان دادههای تست انتخاب (رابطه ۱) و بطور جداگانه آنالیز شدند. شایان ذکر است که برای هر ژنوتیپ ۸۰ سری داده انتخاب شده بود.

$$Y_t = f(x_{1n}, x_{2n}, x_{3n}, x_{4n}) \quad (1)$$

در این رابطه Y فعالیت آنزیم نیترا ردوکتاز، x_1 غلظت سدیم، x_2 غلظت کلر، x_3 غلظت پتاسیم و x_4 غلظت نیترا و n شماره نمونه می باشد. در این تحقیق برای مدل سازی فعالیت آنزیم نیترا ردوکتاز بر اساس برنامه ریزی ژنتیک از نرم افزار GeneXproTools 4.0 استفاده شد. بدین منظور، دو مجموعه از عملگرهای ریاضی به صورت زیر استفاده شده است که مجموعه یک، چهار عمل اصلی (رابطه ۲)، مجموعه دو عملگرهای پیش فرض نرم افزار (رابطه ۳) می باشد.

$$\{ \text{جمع} + \text{تفریق}, \text{تقسیم}, \text{ضرب} \} = \text{مجموعه یک} \quad (2)$$

$$\{ \text{جمع} + \text{تفریق}, \text{تقسیم}, \text{ضرب} + \text{توابع سینوسی} + \text{توان} + \text{جذر} \} = \text{مجموعه دو} \quad (3)$$

۳- نتایج

با افزایش غلظت نیترا میزان جذب کلر در ژنوتیپ متحمل (هیبرید H6) و حساس (شیرازی) به طور معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد کاهش یافت. میزان کاهش در جذب کلر با افزایش غلظت نیترا به خصوص در تیمار ۹۰ میلی مول سدیم کلراید و غلظت های بالای نیترا در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بود (جدول ۱).

با افزایش غلظت نیترا میزان جذب سدیم در هر دو ژنوتیپ کاهش یافت و در طول زمان نمونه برداری میزان جذب سدیم افزایش یافت. میزان کاهش در جذب سدیم با افزایش نیترا تحت شوری در ژنوتیپ حساس بیشتر بود. همچنین با افزایش غلظت نیترا سرعت جذب پتاسیم نیز در هر دو ژنوتیپها افزایش یافت (به دلیل استفاده از تیمار پتاسیم نیترا جذب پتاسیم نیز همراه نیترا افزایش یافت). در طول زمان نمونه برداری نیز سرعت جذب پتاسیم به خصوص در غلظت های بالای نیترا افزایش یافت.

جهت تعیین سرعت جذب نیترا و فعالیت آنزیم نیترا ردوکتاز و مقایسه ژنوتیپهای متحمل و حساس دادهها با معادله میکائیلیس- منتن آنالیز شدند. با افزایش غلظت نیترا سرعت جذب نیترا افزایش یافت. در ژنوتیپ متحمل (هیبرید H6) افزایش در تیمار صفر شوری بیشتر از تیمارهای شوری بود، یعنی با افزایش شوری جذب نیترا نسبت به شاهد کاهش یافت. میزان ثابت میکائیلیس- منتن (K_m) هم تحت شوری کاهش یافت، یعنی در تیمارهای شوری نسبت به شاهد منحنی در غلظت پایین تر نیترا به حالت اشباع رسید (جدول ۲).

¹ - t-test

² - linear regression

³ - Michaelis-Menten enzyme kinetics equation



2nd International conference on sustainable development, strategies and challenges
With a focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism
23-25 Feb 2016, Tabriz , Iran

جدول ۱- شیب رگرسیون کلر در ریشه گیاهان تحت تیمارهای شوری و غلظت‌های مختلف نیترات

شوری (میلی مول سدیم کلرید)	تیمار نیترات (میلی مول)				
	۰	۰/۵	۱	۵	۱۰
H6					
۰	۰/۸۸ ± ۰/۲۶	۰/۶۶ ± ۰/۱۹	۰/۵۴ ± ۰/۱۳	۰/۵۸ ± ۰/۱۸	۰/۷۱ ± ۰/۱۸
۳۰	۰/۹۸ ± ۰/۲۸	۰/۷۸ ± ۰/۱۹	۰/۷۱ ± ۰/۱۲	۰/۷۹ ± ۰/۱۶	۰/۷۸ ± ۰/۱۵
۶۰	۵/۱۷ ± ۰/۲۸	۴/۸۱ ± ۰/۳۳	۴/۷۱ ± ۰/۵۶	۲/۹۳ ± ۰/۴۳	۳/۲۷ ± ۰/۴۶
۹۰	۲۹/۱۹ ± ۱/۴۱	۲۱/۴۷ ± ۰/۶۸	۱۶/۳۷ ± ۱/۴۵	۱۷/۷۵ ± ۰/۹۵	۱۶/۴۷ ± ۰/۴۴
شیرازی					
۰	۴/۶۳ ± ۰/۱۹	۳/۵۴ ± ۰/۲۴	۳/۴۷ ± ۰/۲۱	۲/۴۰ ± ۰/۱۶	۲/۶۰ ± ۰/۳۰
۳۰	۶/۳۳ ± ۰/۱۵	۵/۴۹ ± ۰/۲۵	۴/۱۱ ± ۰/۲۷	۳/۵۶ ± ۰/۳۱	۲/۹۸ ± ۰/۳۲
۶۰	۱۳/۶۱ ± ۰/۴۵	۱۰/۳۳ ± ۰/۶۰	۷/۲۶ ± ۰/۴۶	۵/۰۸ ± ۰/۶۰	۵/۷۵ ± ۰/۴۴
۹۰	۴۵/۲۹ ± ۱/۶۲	۳۶/۷۳ ± ۱/۲۴	۳۶/۴۷ ± ۰/۹۶	۲۷/۵۸ ± ۱/۱۷	۲۵/۲۳ ± ۰/۸۳

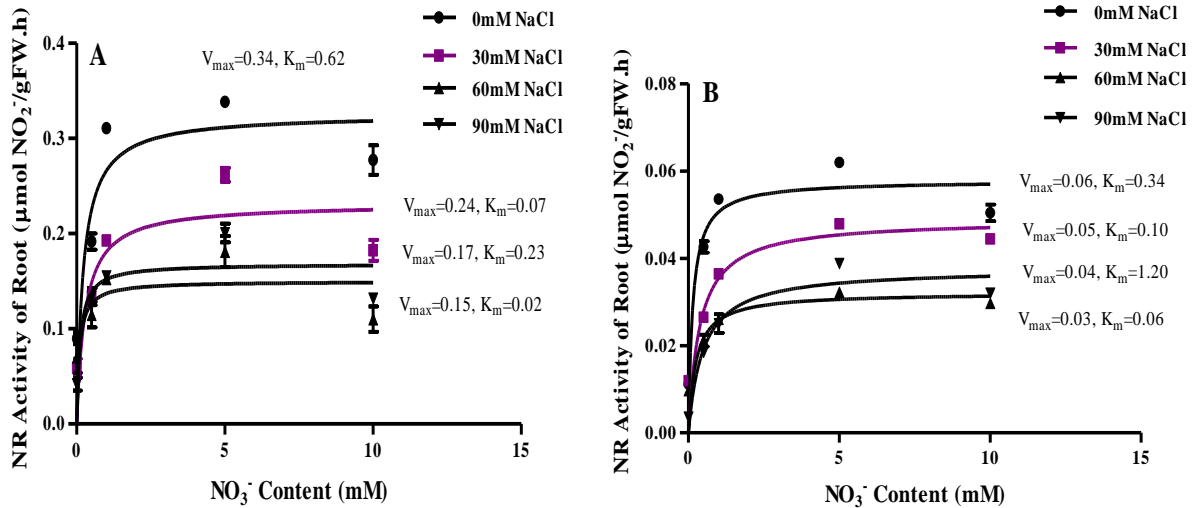
جدول ۲- V_{max} و K_m جذب نیترات در ریشه گیاهان تحت تیمارهای شوری و غلظت‌های مختلف نیترات

شوری (میلی مول سدیم کلرید)	V_{max}	K_m
H6		
۰	۰/۱۰ ± ۰/۰۲	۰/۵۹ ± ۰/۵۱
۳۰	۰/۰۷ ± ۰/۰۲	۰/۵۴ ± ۰/۵۳
۶۰	۰/۰۶ ± ۰/۰۱	۰/۳۳ ± ۰/۰۶
۹۰	۰/۰۷ ± ۰/۰۱	۰/۲۰ ± ۰/۰۴
شیرازی		
۰	۰/۱۹ ± ۰/۰۳	۰/۴۷ ± ۰/۵۱
۳۰	۰/۱۶ ± ۰/۰۳	۰/۳۲ ± ۰/۴۷
۶۰	۰/۱۳ ± ۰/۰۲	۰/۰۲ ± ۰/۰۴
۹۰	۰/۱۳ ± ۰/۰۲	۰/۰۲ ± ۰/۰۴

با افزایش غلظت نیترات فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه هر دو ژنوتیپ افزایش یافت و میزان افزایش فعالیت آنزیم (V_{max}) در تیمارهای نیترات بدون شوری بیشتر از تیمارهای شوری بود. هم ریشه ژنوتیپ متحمل (هیبرید H6) و هم ژنوتیپ حساس (شیرازی) در فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز (V_{max}) تحت شوری به طور معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد کاهش نشان دادند، میزان کاهش در ژنوتیپ حساس بیشتر بود. در ژنوتیپ هیبرید H6 میزان K_m به جز تیمار ۹۰ میلی مول شوری نسبت به شاهد کاهش یافت، یعنی منحنی‌ها زودتر به حالت اشباع رسیدند. همچنین در ژنوتیپ شیرازی میزان K_m به جز تیمار ۶۰ میلی مول شوری نسبت به شاهد کاهش یافت. سرعت بیشینه (V_{max}) فعالیت آنزیم در غلظت‌های بالای نیترات در ریشه ژنوتیپ متحمل به طور معنی داری بیشتر از غلظت‌های پایین نیترات بود. در ژنوتیپ حساس این تفاوت معنی دار نبود (شکل ۱).



2nd International conference on sustainable development, strategies and challenges
 With a focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism
 23-25 Feb 2016, Tabriz, Iran



شکل ۱- فعالیت نیترات ردوکتاز در غلظت‌های مختلف نیترات و شوری در ریشه دو ژنوتیپ هیبرید H6 (A) و شیرازی (B).

پس از انجام مدل‌سازی با این متغیرها و مجموعه عملگرهای ریاضی یک و دو روابط فعالیت نیترات ردوکتاز حاصل از مدل ژنتیک به شرح جدول ۳ بدست آمد. نتایج موید این است که عملگر ۱ دارای روابط ساده‌تری نسبت به سایر عملگرها دارد. همچنین نتایج نشان داد که روابط ارائه شده برای دو ژنوتیپ با یکدیگر از نظر کاربرد غلظت‌های محتوای عناصر ریشه باهم تفاوت دارند.

جدول ۳- روابط حاصل از مدل‌سازی با برنامه‌ریزی بیان ژن با سه عملگر ریاضی برای دو ژنوتیپ انگور

ژنوتیپ	عملگرهای ریاضی	روابط حاصل از برنامه‌ریزی بیان ژن
H6	۱	$Y = (((x(3)+9.331756) - 9.331756) + (x(3) - x(2))) - ((x(3) + x(4)) - x(2))) + (2.964905 + (((x(4) * 2.964905) + x(2)) + x(2)) - x(4))) + (-1.350403 - (((x(2) + 1.350403) + x(2)) + (x(3) + x(4))))$
	۲	$Y = \sin((\sin(((x(3)^3) - 3.728241)) / \sqrt{x(2)}) - (-3.728241 + x(1)))) + (((x(4) + \sin((x(1)^3))) + x(4)) / x(1)) + ((x(4) + \sin(\sin(x(4)))) / ((\tan(x(1)) + 1.994202)^3))$
شیرازی	۱	$Y = (x(4) / (x(3) * x(4))) + (((x(1) * -9.531799) - 7.930054) * (x(1) / x(4))) / ((x(2) - x(1)) * (x(2) * x(2))) + (((5.015563 * x(4)) + x(4)) - (x(3) - x(3))) / ((x(4) + 5.015563) * (x(2) / x(4))))$
	۲	$Y = \sin(-9.358307) + ((-0.113464 + ((-5.33194 + (-5.33194 - x(4))) / (x(2) * -0.113464))^3) + (\tan(\sin(9.339722))))$

۱=عملگرهای اصلی، ۲=پیش‌فرض‌ها

1) X(1): غلظت سدیم ریشه، X(2): غلظت کلر ریشه، X(3): غلظت پتاسیم ریشه، X(4): غلظت نیترات ریشه، Y: فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز



2nd International conference on sustainable development, strategies and challenges
With a focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism
23-25 Feb 2016, Tabriz , Iran

نتایج معیارهای ارزیابی مدل‌های حاصل از عملگرهای ریاضی یک و دو در جدول ۴ (مقادیر ضرایب تبیین (R^2) و مربع انحرافات خطا (RMSE) تا دو رقم اعشار گرد شده‌اند)، نشان داده شده است.

جدول ۴- معیارهای ارزیابی سه عملگر ریاضی مدل‌سازی شده در برنامه‌ریزی بیان ژن

RMSE	R^2	مرحله	عملگرهای ریاضی	ژنوتیپ
۰/۱۱	۰/۷۴	آموزش	۱	H6
۰/۱۳	۰/۶۸	تست		
۰/۰۷	۰/۸۱	آموزش	۲	شیرازی
۰/۰۶	۰/۷۹	تست		
۰/۰۸	۰/۸۲	آموزش	۱	شیرازی
۰/۰۹	۰/۶۹	تست		
۰/۰۸	۰/۸۹	آموزش	۲	شیرازی
۰/۰۶	۰/۸۴	تست		

۱=عملگرهای اصلی، ۲=پیش‌فرض‌ها

نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد مدل پیش‌فرض‌ها برای هر دو ژنوتیپ انگور ضریب همبستگی بیشتر و میانگین مربعات خطا کمتری نسبت به مدل عملگرهای اصلی دارد، بنابراین به عنوان مدل کارا برای مدل‌سازی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز پیشنهاد گردید. مربع انحرافات خطای محاسبه شده برای دو ژنوتیپ تفاوت چندانی نداشته و مقادیر آن نیز به صفر نزدیک بوده که نشان‌دهنده صحت بالای مدل است. ضریب تبیین محاسبه شده برای ژنوتیپ حساس بالاتر از ژنوتیپ مقاوم بوده که احتمالاً به این دلیل است که در ژنوتیپ حساس، محتوای عناصر ریشه (نیترات، کلر، سدیم و پتاسیم) بیشتر تحت تاثیر شوری قرار گرفته و فعالیت آنزیم نیترات-ردوکتاز همبستگی بیشتری با متغیرهای ورودی نشان می‌دهد.

۴- بحث

ساواس و همکاران [12] بیان کردند که همبستگی مثبتی بین غلظت سدیم کلراید بیرونی و میزان جذب یون‌های کلر و سدیم در گیاه لوبیا وجود داشت. مطالعات نشان داد که جذب سدیم و کلر یا انباشتگی یون‌ها در بافت‌های گیاهی بسته به غلظت بیرونی آن‌ها افزایش می‌یابد. مکانیسم‌های جذب سدیم و کلر در گیاهان عالی به وسیله رودریگز و رابو [13] مرور شده است. نتایج مطالعه حاضر نیز با نظرات این محققین همخوانی داشت. همچنین با مقایسه سرعت جذب کلر در تیمارهای ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مول شوری می‌توان دریافت که با افزایش غلظت شوری جذب کلر و انباشتگی آن در ریشه همه ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. در غلظت‌های مساوی شوری سرعت جذب کلر در ریشه ژنوتیپ متحمل (هیبرید H6) کمتر از ژنوتیپ حساس (شیرازی) بود. همچنین با افزایش غلظت نیترات در محیط ریشه سرعت جذب کلر کاهش یافت که میزان کاهش در ژنوتیپ متحمل بیشتر بود. بنابراین در حضور سدیم کلراید جذب نیترات به وسیله عمل رقابتی کلر مهار می‌شود [2]. از نظر سنتیک جذب بوتلا و همکاران [14] اثر سدیم کلراید را بر سینتیک



2nd International conference on sustainable development, strategies and challenges
With a focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism
23-25 Feb 2016, Tabriz, Iran

جذب نیترا در گندم تحت شوری مطالعه کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که اعمال کلر اثر منفی بر جذب نیترا دارد. در گیاهان انگور مورد مطالعه به نظر می‌رسد کاهش جذب نیترا به دلیل رقابت بین کلر و نیترا در محیط ریشه بود، در ارتباط با جذب سرزو و همکاران [2] جذب خالص نیترا را در ریشه گیاهان حساس و متحمل مرکبات در محدوده ۰/۱ تا ۱۰ میلی‌مول غلظت بیرونی نیترا مطالعه کردند. جذب نیترا تا غلظت ۱ میلی‌مول نیترا از معادله میکائلیس-منتن تبعیت کرد، ولی در غلظت‌های بالاتر (۱ تا ۱۰ میلی‌مول) سرعت جذب نیترا به‌طور خطی افزایش یافت. نتایج مطالعه حاضر نیز این یافته‌ها را تایید کرد، یعنی در هر دو ژنوتیپ با گذشت زمان افزایش خطی در جذب نیترا مشاهده شد و سرعت جذب با گذشت زمان کاهش یافت. ماسا و همکاران [3] گزارش کردند که در گیاه رز جذب نیترا در پاسخ به افزایش غلظت سدیم کلراید در محیط ریشه به‌سرعت مهار شد، مقدار نیترا ریشه کاهش یافت بدون این‌که اثر معنی‌داری بر K_m داشته باشد. آن‌ها معتقدند که مهار غیررقابتی بین کلر و نیترا اتفاق می‌افتد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در جذب نیترا در میزان K_m تحت شوری نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند، میزان کاهش در ژنوتیپ حساس (شیرازی) بیشتر بود.

احیای نیترا به نیتريت به‌وسیله نیترا ردوکتاز کاتالیز می‌شود و این مرحله محدودکننده سرعت در مسیر آسیمیلایون نیترا است. نیترا ردوکتاز به‌وسیله نیترا القا می‌شود و سرعت درون‌ریزش نیترا فاکتور اصلی کنترل‌کننده سطح فعالیت آنزیم نیترا-ردوکتاز است [9]. نتایج حاضر در ریشه انگور این الگوی القای نیترا ردوکتاز را تایید کرد و با جذب غلظت‌های بیرونی نیترا منطبق بود، یعنی فعالیت نیترا ردوکتاز به‌وسیله نیترا القا شد. فعالیت نیترا ردوکتاز در ریشه با غلظت‌های نیترا در محلول غذایی و نیز سرعت جذب نیترا در هر دو ژنوتیپ همبستگی مثبت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و ضریب تبیین بالای ۰/۵ داشت. فعالیت آنزیم نیترا ردوکتاز در ریشه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از معادله میکائلیس-منتن تبعیت کرد. مقدار V_{max} در همه تیمارهای شوری و نیز در هر دو ژنوتیپ نسبت به شاهد کاهش یافت. اثر شوری بر فعالیت نیترا ردوکتاز نتیجه انباشتگی کلر است که جذب نیترا را مهار می‌کند و باعث کاهش در شارش نیترا از ریشه به برگ می‌شود. به‌علاوه کاهش فعالیت نیترا ردوکتاز در تیمار بلندمدت شوری به دلیل کاهش سرعت سنتز آنزیم یا افزایش تخریب آن و ایجاد یک تعادل جدید بین این دو فرآیند است [15]. نتایج مطالعه حاضر نیز با یافته‌های گوئویا و همکاران [15] همخوانی داشت، همبستگی منفی معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بین انباشتگی کلر تحت شوری و کاهش فعالیت آنزیم نیترا ردوکتاز در همه ژنوتیپ‌ها وجود داشت. یعنی ژنوتیپ متحمل (هیبرید H6) که انباشتگی کلر کمتری تحت شوری داشتند، کاهش کمتری نیز در فعالیت آنزیم نیترا ردوکتاز نسبت به ژنوتیپ حساس (شیرازی) نشان دادند.

نتایج مدل‌سازی با برنامه‌ریزی بیان ژن نیز موید این مطلب است که فعالیت آنزیم نیترا ردوکتاز تحت تاثیر محتوای عناصر ریشه از جمله نیترا، کلر، سدیم و پتاسیم است که ضرایب بالای تبیین در مدل‌سازی فعالیت این آنزیم در هر دو ژنوتیپ انگور موید این مطلب است. سدیم و کلر حاصل از تیمارهای شوری نیز بر فعالیت این آنزیم تاثیر منفی داشته و غلظت نیترا باعث افزایش فعالیت این آنزیم می‌شود. بر اساس میزان حضور در مدل نیز بیشترین تاثیر در آنزیم نیترا ردوکتاز مربوط به نیترا بوده و کلر، سدیم و پتاسیم رتبه‌های بعدی را به خود اختصاص دادند. در جمع‌بندی کلی نیز با توجه به توانایی تعریف روابط صریح بر اساس پارامترهای وابسته و مستقل در برنامه‌ریزی بیان ژن، این مدل می‌تواند بعنوان مدل پیشنهادی در این تحقیق مد نظر قرار گیرد.

در مجموع انباشتگی کلر و سدیم تحت شوری در ژنوتیپ حساس بیشتر بود. با افزایش غلظت‌های نیترا در محیط ریشه تحت شوری انباشتگی کلر و سدیم کاهش یافت، شیب رگرسیون خطی جذب کلر در طول زمان و سرعت کاهش جذب با افزایش تیمارهای نیترا در ژنوتیپ متحمل (هیبرید H6) به‌طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ حساس (شیرازی) بود. جذب نیترا تحت شوری کاهش یافت و میزان کاهش در ژنوتیپ حساس بیشتر بود. با اعمال تیمارهای نیترا پتاسیم تحت شوری جذب نیترا افزایش یافت، شیب رگرسیون خطی جذب نیترا در طول زمان و سرعت افزایش جذب تحت تیمارهای نیترا در ژنوتیپ متحمل به‌طور معنی‌داری در



2nd International conference on sustainable development, strategies and challenges
With a focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism
23-25 Feb 2016, Tabriz , Iran

سطح احتمال ۵ درصد بیشتر از ژنوتیپ حساس بود. فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز با افزایش غلظت نیترات در ریشه هر دو ژنوتیپ افزایش یافت، درحالی که V_{max} در همه تیمارهای شوری و نیز در هر دو ژنوتیپ نسبت به شاهد کاهش یافت. V_{max} آنزیم در همه تیمارهای شوری و نیترات در ریشه ژنوتیپ متحمل نسبت به ژنوتیپ حساس بیشتر بود. مدل سازی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز نیز نقش بیشتر غلظت نیترات و تاثیر منفی شوری بر فعالیت این آنزیم را نشان می دهد.

مراجع

- [1] Munns R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment*, 25: 239–250, 2002.
- [2] Cerezo M., Garcia-Agustin P, Serna D, and Primo-Millo E. Kinetics of nitrate uptake by Citrus seedlings and inhibitory effects of salinity. *Plant Science*, 126: 105–112, 1997.
- [3] Massa D., Mattson NS, Lieth HJ. Effects of saline root environment (NaCl) on nitrate and potassium uptake kinetics for rose plants: a Michaelis–Menten modelling approach. *Plant Soil*, 318:101–115, 2009.
- [4] Kaiser WM, Weiner H, Kandlbinder A, Tsai CB, Rocker P, Sonoda M, Planchet E. Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of Experimental Botany*, 53: 875-882, 2002.
- [5] Khatibi R, Ghorbani MA, Hasanpour Kashani M, Kisi O. Comparison of three artificial intelligence techniques for discharge routing. *Journal of Hydrology*, 403: 201-212, 2011.
- [6] ثروتی م، جعفرزاده ع ا، رحمتی م. استفاده از روش فراکاوشی بیرنامه ریزی بیان ژنی در برآورد ظرفیت تبادل کاتیونی خاک. سیزدهمین کنگره علوم خاک ایران، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ۱۳۹۲.
- [7] Mohammadkhani N, Heidari R, Abbaspour N, Rahmani F. Comparative study of salinity effects on ionic balance and compatible solutes in nine Iranian table grape (*Vitis vinifera* L.) genotypes. *Journal of International Sciences et Vigne et Vin*, 47 (2): 99–114, 2012.
- [8] Mohammadkhani N, Heidari R, Abbaspour N, Rahmani F. Evaluation of salinity effects on ionic balance and compatible solute contents in nine grape (*Vitis* L.) genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 37: 1817-1836, 2014.
- [9] Beevers L, Hageman RH. Nitrate and nitrite reduction, in: B.J. Mifflin (Ed.), *The Biochemistry of Plants, Amino Acids and Derivatives*, vol. 5, New York: Academic Press, 115–168, 1980.
- [10] Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Youngs VL. Rapid colorimetric determination in plant tissues by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6: 71-80, 1975.
- [11] Jaworski EG. Nitrate reductase assay in intact plant tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43: 1274–1279, 1971.
- [12] Savvas D, Mantzos N, Barouchas PE, Tsirogiannis IL, Olympios C, Passam HC. Modelling salt accumulation by a bean crop grown in a closed hydroponic system in relation to water uptake. *Scientia Horticulturae*, 111: 311–318, 2007.
- [13] Rodriguez-Navarro A, Rubio F. High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1149–1160, 2006.
- [14] Botella MA, Cerdá A, Lips SH. Kinetics of NO_3^- and NH_4^+ uptake by wheat seedlings. Effect of salinity and nitrogen source. *Journal of Plant Physiology*, 144: 53–57, 1994.
- [15] Gouia H, Ghorbal MH, Touraine B. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO_3^- reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant Physiology*, 105: 1409–1418, 1994.