اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در سیب گلدن دلیشس

مصباح بابالار،فرزاد ربیعی و احمداحمدی

بترتیب دانشیار ،کارشناس و مربی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله

خلاصه

این تحقیق طی سالهای ۷۴-۱۳۷۲ در محل گلخانه ها و آزمایشگاههای تحقیقاتی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران بر روی نهال های سیب رقم گلدن دلیشس [1] پیوند شده روی پایه مالینگ ۹ انجام شده‌است. در این آزمایش گیاهان دوساله (مالینگ ۹) در تاریخ ۷۲/۱/۱۲ در گلدان هایی به ابعاد ۲۶×۲۸ سانتی متر و در بستر ماسه و پرلایت در گلخانه کشت گردیدند. این بررسی در قالب یک طرح آزمایشی فاکتوریل با پایه کاملا" تصادفی با پنج تیمار تغذیه نیتروژنی با غلظت های مختلف آمونیوم ونیترات به صورت محلول غذایی ،باسه تکرار و چهارتیمارزمانی مختلف b3,b2,b1 و b4 برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز به روش In vivo با دو تکرار زمانی نیم و یک ساعت برای ریشه و برگ انجام گردید. در زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ، وزن تازه اندامهای مختلف گیاه و همچنین وزن خشک نیز سنجش شد. نتایج نشان می دهد فعالیت آنزیم در برگ ها قویا" از ریشه بیشتر می باشد و علاوه بر آن فعالیت آنزیم در نیم ساعت نسبت به یک ساعت بیشتر است .

مقدار فعالیت آنزیم در ماه هایی که گیاه رشد زیاد دارد (اردیبهشت و شهریور) نسبت به ماه های گرم سال افزایش نشان می دهد. در بین تیمارهای تغذیه‌ایی گیاهان رشد کرده در محلول غذایی حاوی آمونیوم و نیترات به نسبت مقدار آمونیوم به ازت کل به میزان $\frac{۲}{۱۴}$ بیشترین فعالیت آنزیم را در برگها دارا بودند.تیمار تغذیه‌ای بدون آمونیوم فعالیت کمتری رانشان می دهد،درحالی که باافزایش مقدارنسبت آمونیوم به نیتروژن کل، مقدار فعالیت آنزیم افزایش می یابد.درمجموع باافزایش غلظت آمونیوم درمحلول غذایی فعالیت آنزیم دربرگ افزایش می یابد. ضمن اینکه فعالیت آنزیم درریشه باافزایش غلظت آمونیوم درمحلول غذایی ازصفر تا ۸ میلی اکی والان کاهش یافته‌است.

مقدمه

استفاده‌بهینه‌ازمحصولات‌کشاورزی وافزایش تولید وبهره بری ازگیاهان‌بستگی‌به شناخت مادارد.این شناخت‌بخصوص در محدوده فیزیولوژی،تغذیه ومتابولیسم‌نیتروژن حائز اهمیت است . به خصوص علم به ظرفیت ها،توانائی ها و مکانیسم ها سبب استفاده بیشتر و برنامه ریزی مناسب‌تردر جهت به زراعی و به نژادی گیاهان باغی می گردد.

نیتروژن یکی از مهم ترین عناصر معدنی مورد استفاده گیاهان است و در بین فرم های قابل جذب ، نیترات به عنوان منبع اصلی نیتروژن در طبیعت است . نیترات ردوکتاز به عنوان کلید هضم نیتروژن گیاهی و اولین آنزیم جهت احیای نیتروژن معدنی و انتقال آن در چرخه متابولیسم بوده و توان فعالیت آن می تواند در رشد و نمو گیاه تاثیر مستقیم داشته باشد. (۲۸)

شانتار و تونگ و همکاران میزان نیترات جذب شده در ریشه را سه برابر میزان جذب آن دربرگ بدست آوردند،در صورتی که میزان احیای نیترات در برگ جو ۸ برابر ریشه می باشد (۱). ونس و هیکل (۳۳) اعلام نمودند در تمام قسمت های گیاه یونجه آنزیم نیترات ردوکتاز فعالیت دارد ، منتها میزان فعالیت در اندام های مختلف به صورت ریشه < ساقه < گره < برگ

1 - Golden delicious

می باشد . اگر میزان فعالیت آنزیم را در گیاه محاسبه نمائیم می توان گفت فعالیت آنزیم ریشه ۴۰٪ ، برگ ۴۰٪ ، ساقه تقریبا" ۱۰٪ از فعالیت کل را تشکیل می دهد. که سهم گره ها را نیز می توان ۱۰٪ به حساب آورد (۵ و ۲۱).کینگ و همکاران عقیده دارند که جذب نیترات و تجمع آن در واکوئول موقتی بوده و سپس به سیتوپلاسم برگشت می نماید. که نتیجتا" تنظیم کننده مقدار آمونیوم و یا اسیدهای آمینه ریشه در کوتاه مدت و تعیین کننده تغذیه نیتروژن در دراز مدت خواهد بود (۱۴).

- بطورکلی احیای نیتروژن در ریشه انجام می گیرد. در اکثر درختان به خصوص خانواده گل سرخ (مانند سیب) ، این موضوع به قدری قوی می باشد که در عصاره خام به هیچ وجه نیترات یافت نمی گردد و فقط نمک های آمونیاکی قابل ردیابی هستند. در صورتی که این عصاره غنی از اسیدهای آمینه ، اسیدها و دیگر ترکیبات آلی می باشد(۱۱).

تحقیقات انجام گرفته تاکنون بیانگر ناچیز بودن مقادیر نیترات در عصاره خام و برگ ها بوده است (۱۵ و ۲۱). بنظر می رسد که در خانواده گل سرخ صد درصد احیای نیترات در ریشه انجام می گیرد، به دلیل ناچیز بودن مقدار نیترات در خاک های تغذیه کننده این درختان ، ودر حقیقت به دلیل اشباع نشدن فعالیت آنزیم ریشه می باشد ، در حالیکه اگر مقدار غلظت نیترات در خاک و یا محلول غذایی افزایش پیدا کند سهم ریشه نسبت به اندام هوائی گیاه از اهمیت کمتری برخودار می باشد.

با قرار گرفتن گیاه در تاریکی ۷۰٪ نیتروژن جذب شده بدون احیاء شدن باقی می ماند و حدود ۸۲٪ از این نیتروژن احیاء نشده در ریشه قرار دارد (۲۷). این موضوع بیانگر این است که احیای نیترات در روشنائی بوده و نیازمند به چندین فاکتور جهت فعالیت ماکزیمم خود دارد. سه فاکتور عامل احیای نیتروژن نیتراتی در گیاه می باشند که عبارتند از (۱) مقدار آنزیم ، (۲) مقدار NADH و مواد کربنی احیاء کننده ،(۳) و وجود نیترات (۲۵). با این وجود مقدار نیترات قابل هضم آزاد در داخل سلول بسیار ناچیز است، حدود (۰/۱٪) که این مقدار برای فعالیت ماکزیمم آنزیم بسیار ناچیز می باشد (۲۴)، به عبارت ساده می توان نتیجه گرفت در صورتی که مقدار نیترات در شرائط این سیتو [1] برای احیاء ۰/۱٪ باشد ، با افزایش مقدار آن مسلما" از ریشه منتقل می گردد به اندام هوائی . نهایتا" اینکه فعالیت NR[2] با مقادیر کل کربوهیدراتهای محلول (T.S.C) [3] و سوربیتول[4] همبستگی دارد ، اضافه کردن سوربیتول و گلوکز ویا ۵۰ میلی گرم سوکروز در شرایط In vivo و در تاریکی مقدار فعالیت آنزیم را به میزان ۳۰-۳۹ ٪ افزایش می دهد (۱۸)، که نشانگر نقش فتوسنتز در احیای نیترات است . بر عکس نیترات ، آمونیوم موجود در خاک و یا کاتیون موجود در محلول غذایی به سرعت جذب متابولیسم می گردد و گیاهان بسیار نادری نیز وجود دارد که تغذیه آمونیوم برایشان امتیازی محسوب می شود و این در حالی است که سمی بودن آمونیوم اغلب تائید شده است . ضمن اینکه علت بیوشیمیایی دقیق آن مشخص نیست و آیا این که غلظت زیاد آن عامل سمیت باشد به خوبی روشن نیست (۴).

مورنو و کاریکا در وضعیت های مزرعه نیتراتها رادر شیره آوند چوبی نیافته اند و گزارش دادند که ازت در گیاهان عالی عمدتا" به صورت احیاء شده ، بخصوص امینواسیدها در آوند چوبی منتقل می گردد(۲۱). فرایت نیز گزارش کرد که فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در درختان سیب در درون ریشه صورت می گیرد (۹). در حالی که لک و همکاران و همچنین تیتوس و همکاران نظردارند در شرایطی که در سیستم ریشه مقدار نیترات بالا باشد ، در شیره خام گیاهان عالی نیتراتها قابل مشاهده می باشند (۱۷ و ۳۲) . ضمن اینکه فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ بستگی دارد به مقدار انتقال نیترات از ریشه به برگ ،نتیجتا" می توان گفت نیترات به اندام های مختلف گیاه قابل انتقال بوده و امکان احیای آن نیز فراهم است ، و میزان انتقال بستگی به غلظت این آنیون درمحلول غذایی و یا خاک دارد. با بکار بردن اندازه های مختلف نیترات و یا آمونیوم در محلول غذایی مقدار فعالیت آنزیم نیترات رودکتاز در ریشه و برگ گیاه سیب واریته گلدن دلیشس اندازه گیری شده است . مادریافتیم نیترات داخل سلول در دو مسیر قرار می گیرد(۱) مقدار کم در مسیر احیاء ودر شرایط غیر هوازی تبدیل به نیتریت می گردد ، (۲) مقدار بسیار زیاد که نمی تواند احیاء گردد که به مسیر متابولیسمی و یا مسیر تجمع نیترات نامگذاری می شود. از مقدار ۱۰۶/۳ میکرو مول نیترات جذب شده در تاریکی فقط ۵٪ آن احیای گردیده است . با اینحال در پایان زمان تغذیه بیش از ۸۵٪ نیتروژن بکلر برده شده هنوز در

1 - In situ 2- Nitrate reductase 3- Total soluble carbohydrate 4-Sorbitol

ریشه وجود داشته است و بطور کامل از طریق آونـد چـوبی مـنتقل نگردیده است و می توان نتیجه گرفت که از مقدار کل ازت جذب شده در ریشه فقط ۱۷ - ۵٪ آن احیا می گردد (۲۶).

مواد و روشها

این تحقیق در دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران در کرج و در سال های ۷۴ - ۷۲ انجام گرفته‌است . برای بررسی فعالیت آنزیم نیترات رودکتاز و همچنین یکنواختی آزمایش از رقـم سـیب گـلدن دلیشس پیوند شده روی پایه دو ساله مالینگ ۹ بهره گیری شده است.

پایه ها از سیب های استاندارد مالینگ ۹ به صورت پاجوشهای دو ساله و بوسیله مرکز اصلاح و تهیه نهال و بـذر کـرج هـدیه گـردید. پیوندک ها از درختان سیب زرد لبنانی و رقم گلدن دلیشس و از شاخه های یکساله درختان مرکز تحقیقات گروه باغبانی دانشکده کشاورزی در اسفند ماه تهیه گردیدند و تا هنگام پیوند زدن در گونی مرطوب پیچیده و در سردخانه و دمای $7^{\circ}C$ - ٦ نگهداری شدند.

بستر کاشت ماسه و پرلایت انتخاب گردید ، ماسه و پرلایت بعد از شستشوی کامل و ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم با نسبت های حجمی برابر مخلوط گردیده و در گلدان هـای پـلاستیکی بـه ابـعاد ۲۶×۲۸ سانتی متر ریخته شد. گلدان ها دارای زهکشی مطلوب بوده و در شروع آزمایش شسـتشو و ضـد عـفونی گـردیدند. در تـاریخ ۷۲/۱/۱۲ ریشه نهال های مالینگ ۹ به وسیله قارچ کش بنومیل [1] ضد عفونی شده و به ازای هر گـلدان یک نـهال کشت و سـپس در داخل گلخانه قرار گرفتند. نهالها قبل از پیوند با آب معمولی آبیاری گردیدند و در تاریخ ۷۲/۱/۲۹ پایه های مالینگ ۹ با استفاده از پیوندک های گلدن دلیشس نگهداری شـده در سـردخانه بـصورت نیمانیم پیوند شدند، و پس از آن تغذیه گیاهان بـا ۵ تـیمار مـحلول غذایی که هر کدام دارای نسبت مشخصی از آمونیوم به کل نیتروژن بودند آبیاری شدند.

a1=محلول کامل(۲meq NH4+۱۲meq NO3)[2]بعنوان محلول استاندارد (۲).

a2=محلول‌بدون‌آمونیوم(۰ meq NH4+۱۴meq NO3)

a3=محلول (۴ meq NH4 + ۱۰meq $NO\bar{3}$)

a4=محلول (٦ meq NH4 + ۸ meq NO3)

a5=محلول (۸ meq NH4 + ٦ meq $NO\bar{3}$)

آبیاری گلدان ها بوسیله محلول های غذایـی هـمه روزه بـه مقدار یک لیتر محلول غذایی برای هر گلدان انجام گرفت به طوری که بعد از آبیاری محلول غذایی از ته گلدان جاری می شد.

در این آزمایش ۱۵۰ اصله نهال سیب پـیوند شـده در سـه تکرار بصورت کاملا" تصادفی چیده شدند هر تکرار شامل ۲۵ نمونه و هر واحد آزمایش ۲ گلدان انتخاب گردید. اندازه گـیری فـعالیت آنزیم از طریق In vivo (۸ و ۱۲) با بکـار بـردن تـامپون فسـفات ۰/۱M و pH = ۷/۵ در شرایط غیر هوازی و بدون تـابش نـور (پیچیدن لوله های آزمایش بوسیله کاغذ آلومینیومی) انجام گردید. برای انجام تجزیه و تحلیل آماری چهار تیمار زمانی b1, b2, b3, b4 در نظر گرفته شد. این زمان ها عبارتند از اردیبهشت ،خرداد ماه سال ۷۳ ومرداد و شهریور سال ۷۲ و در هر مرتبه فعالیت آنزیم ریشه و برگ در سه روز متوالی و در هر روز یکی از تکرار ها اندازه گیری شدند.

جهت برداشت نمونه های برگ ، چند برگ از قسمت های مختلف گیاه چیده و به اندازه ۳۰۰-۲۰۰mg از آنها توزین شده و پس از خرد کردن به اندازه های نیم سانتی متری مورد آزمایش قرار گرفتند. برای برداشت نمونه های ریشه ، پس از خارج کردن گیاه از گلدان ، ماسه و پرلایت اطراف ریشه ها بطور کامل شسته شده و به اندازه ۳۰۰ mg - ۲۰۰ از ریشه برداشت و به انـدازه هـای ۰/۵ سانتی متری خرد شده و برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه گیری فعالیت آنزیم در دو زمـان نـیم و یک سـاعت انجام گردید. توقف فعالیت آنزیم با بکار بردن سولفانیل آمـید[3] بـه میزان ۱۰ گرم در لیتر و در محلول Hcl 3 N انجام گردید. نیتریت تولید شده بوسیله N - نفتیل - ۱ - اتیلن دی امین دی کلروهیدرات[4] (۰/۲ g/1) ایجاد رنگ صورتی نموده که ازطریق دستگاه اسپکتر و فتومتری با طول موج nm ۵۴۰ اندازه گیری شد. لازم به توضیح است لوله های آزمایش حاوی نمونه هـا از طـریق جـایگزینی ازت بجای هوا (غیر هوازی)و پیچانیدن آن در کاغذ آلومینیومی از تابش

۲ - میلی اکی والان گرم نیترات در لیتر

1- Benomyl

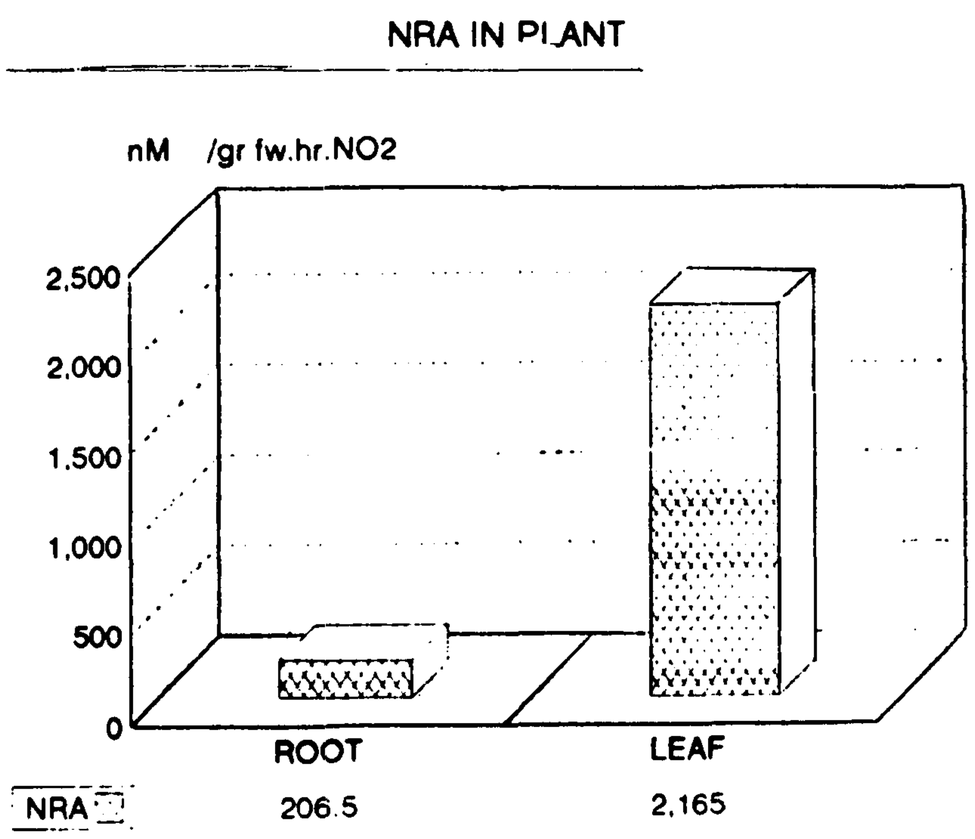
3 - Sulfanilamid 4- N-Naphtyl -1 ethylene diamine dichlorhydrate

نور به آن جلوگیری بعمل آمد تا مانع عمل تنفس و فتوسنتز گردد.

نتایج

احیای ازت در اندام های مختلف گیاه :

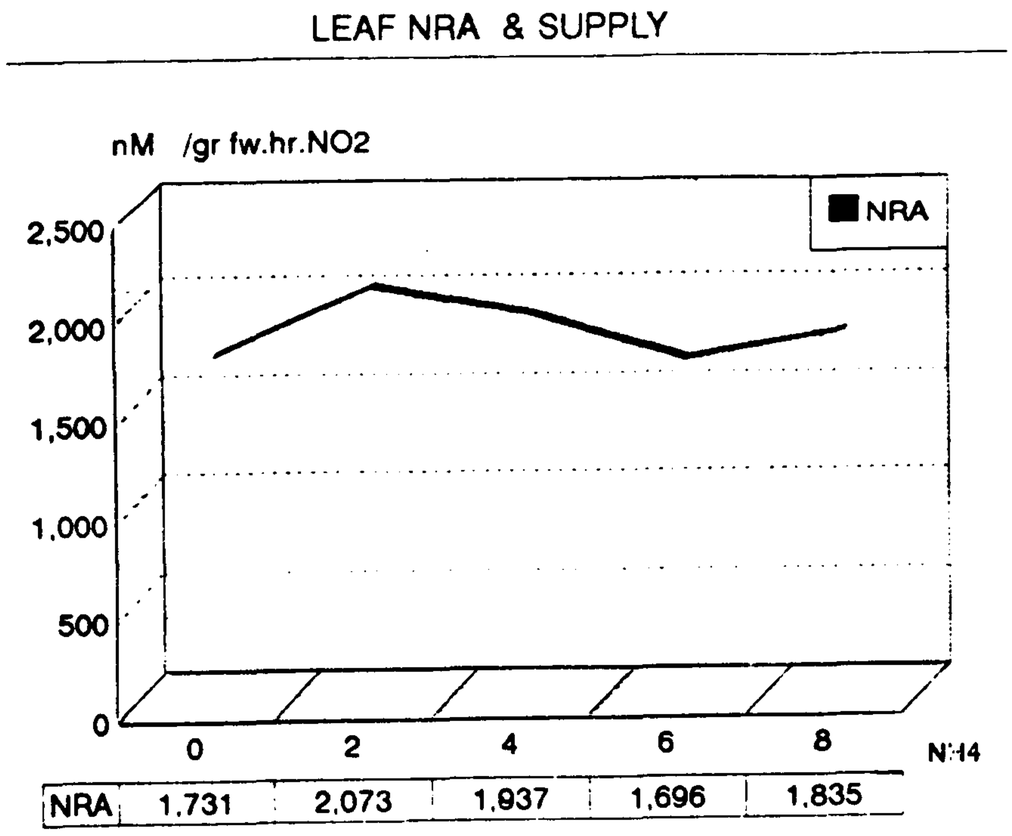
محل احیای نیترات به نوع گیاه و غلظت نیترات و منابع کربن موجود در سلول دارد. در این آزمایش تجزیه واریانس فعالیت آنزیم در اندام های مختلف نهال های سیب مورد آزمایش تفاوت بسیار معنی داری را بین ریشه و برگ نشان می دهد . در غلظت های مختلف نیترات محلول های غذایی مورد استفاده ، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ به مراتب از ریشه بیشتر است (شکل ۱).



شکل ۱ - مقایسه فعالیت نیترات ردوکتاز در ریشه و برگ درختان سیب گلدن دلیشس پیوند شده روی پایه مالینگ ۹

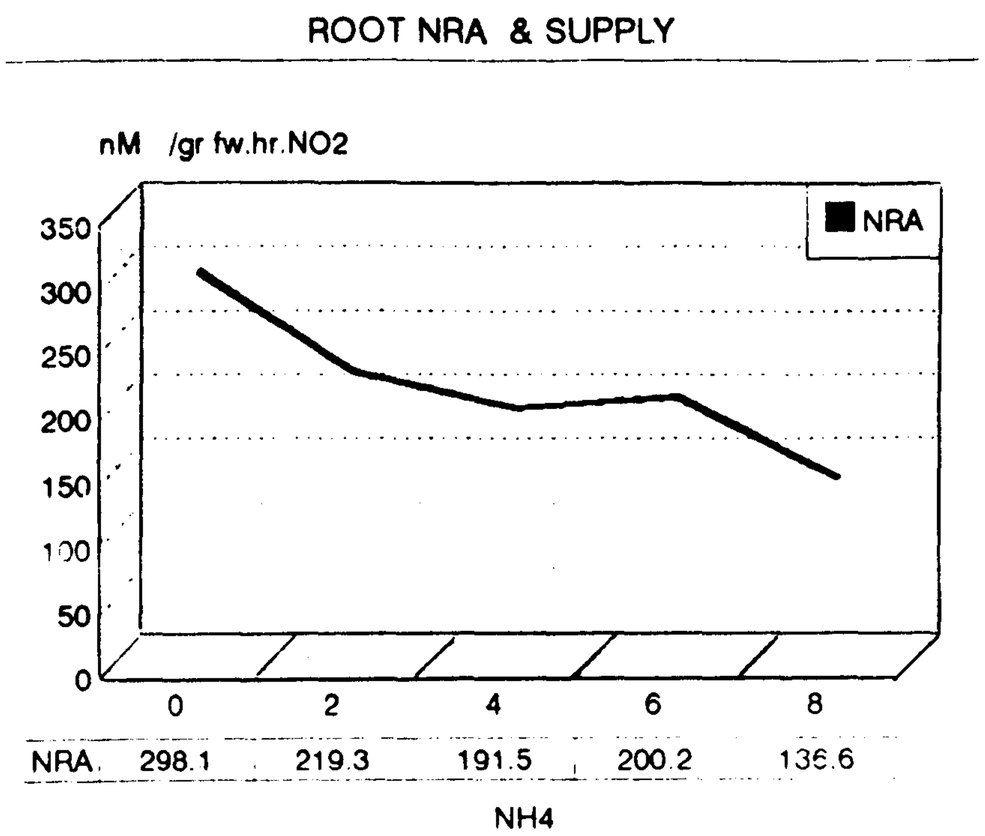
اثر نسبت های مختلف نیترات بر روی فعالیت آنزیم :

در محلول های غذایی بکار رفته مجموعا" ۱۴ میلی اکی والان گرم در لیتر نیتروژن بصورت آمونیوم و نیترات وجود دارد. نتایج بیانگر آن می باشد که تغییرات نسبت آمونیوم به مجموع امونیوم و نیترات محلول ها تفاوت معنی داری را در فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ را بوجود آورده است . مقایسه دانکن میانگین ها نشان می دهد حداکثر فعالیت آنزیم در برگ گیاهان تغذیه شده‌با محلول غذایی با نسبت آمونیوم به آمونیوم و نیترات برابر ($\frac{۲}{۱۴}$) می باشد. و به نظر می رسد این نسبت برای رشد گیاه بسیار مناسب باشد. کمترین فعالیت را نسبت $\frac{۶}{۱۴}$ دارا است . با افزایش مقدار آمونیوم و یا به عبارت دیگر کاهش مقدار نیترات محلول ، فعالیت آنزیم کاهش می یابد . نمودار ۲ سیر تغییرات فعالیت آنزیم را همراه با کاهش غلظت نیترات و یا افزایش غلظت آمونیوم نشان می دهد . در این تغییرات غلظت صفر و ۶ میلی اکی والان آمونیوم تقریبا" فعالیت یکسانی را دارند. در صورتی که با افزایش مقدار آمونیوم افزایش فعالیت آنزیم را دارا می باشیم البته کم بودن نسبی فعالیت آنزیم در برگ گیاهان تغذیه شده بوسیله محلول بدون آمونیوم را می توان به غلظت خیلی زیاد نیترات نسبت داد و یا در غلظت ۲ میلی اکی والان اثر تحریک کنندگی آمونیوم و نیاز مناسب گیاه را در یک نسبت متعادل آمونیوم به نیتروژن کل دانست .(شکل ۲)

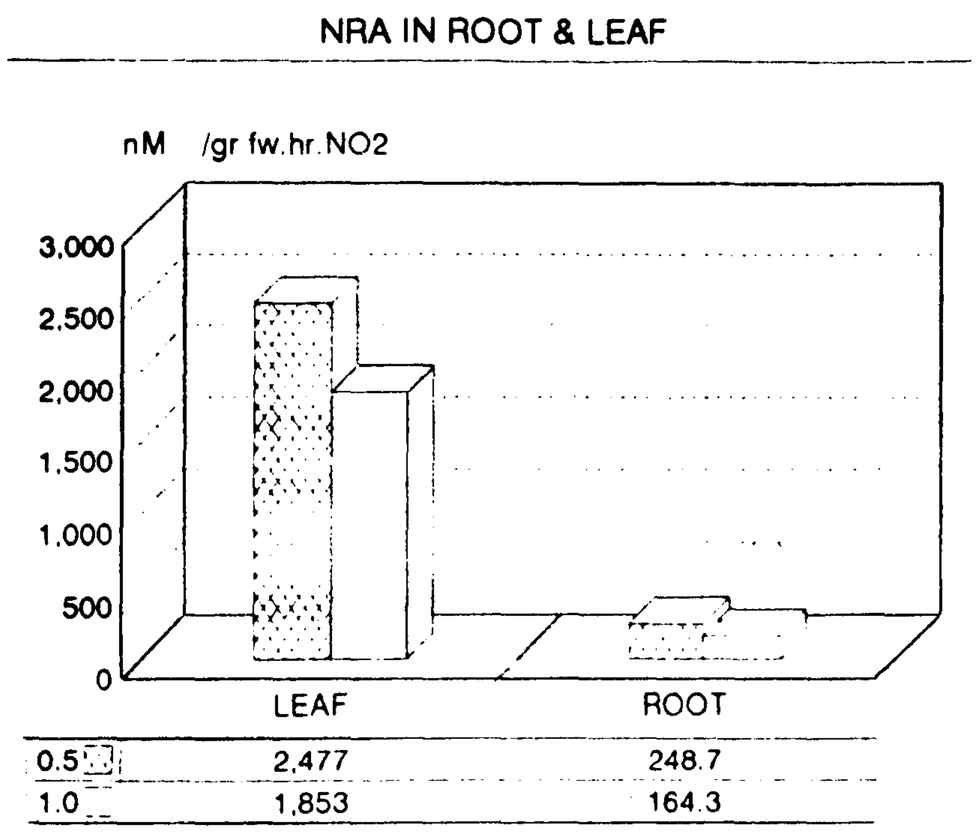


شکل ۲ - اثر نسبت NH4 در ۱۴ میلی اکی والان NO3 +NH4 عرضه شده به گیاه بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ درختان سیب رقم گلدن دلیشس

در ریشه غلظت های مختلف آمونیوم و نیترات تاثیر معنی داری روی فعالیت آنزیم دارد. بیشترین میانگین فعالیت در صفر میلی اکی والان آمونیوم (۱۴ میلی اکی والان نیترات) و کمترین فعالیت در ۸ میلی اکی والان آمونیوم (۶ میلی اکی والان نیترات) دیده می شود. در ریشه با افزایش غلظت آمونیوم و کاهش نیترات فعالیت آنزیم سیر نزولی دارد که به نظر می رسد این کاهش فعالیت از یک طرف بستگی داشته به مقدار کاهش نیترات و از طرف دیگر بازدارندگی آمونیوم (شکل ۳).مقایسه فعالیت آنزیم بیانگر تفاوت فعالیت سیستم ریشه و برگ می باشد.



شکل ۳ - اثر نسبت NH4 در ۱۴ میلی اکی والان NO3 و NH4 عرضه شده به گیاه بر فعالیت آنزیم در ریشه



شکل ۴ - اثر متقابل فعالیت آنزیم درتیمارهای زمانی نیم و یکساعت در ریشه یا برگ

مقایسه فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در زمان های مختلف برداشت نمونه گیاهی :

زمان های مختلف نمونه برداری اثرات بسیار معنی داری بر فعالیت این آنزیم در گیاه دارد. فعالیت آنزیم در اردیبهشت ماه حداکثر ودر مردادماه حداقل بوده است.این تفاوت ،همبستگی بین رشد و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز را نشان میدهد (نتایج حاصل برای وزن تازه و وزن خشک اعلام‌نشده است). در تیمارهای زمانی نیم و یک ساعت نیز نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی داری در برگ و ریشه نشان می دهد فعالیت آنزیم در تیمار زمانی نیم ساعت در برگ بیشتر است از یک ساعت و تفاوت معنی دار بوده است . کم بودن احیای نیترات بر حسب فعالیت آنزیم در واحد زمان در تیمارهای یک ساعت برگ ، گویای این است که در شرایط آزمایش In vivo با افزایش زمان ، توان آنزیم برای احیا کاهش می یابد. این کاهش فعالیت با وجود نیترات کافی بصورت نیترات پتاسیم یکدهم نرمال در تامپون مصرف شده می تواند در اثر فقدان احیاکننده ها مثل NAD(p) H + H , NAD H و یا دیگرِ عوامل باشد (۲۳). شکل ۴ بیانگر تفاوت فعالیت در زمان های نیم و یک ساعت در برگ و ریشه می باشد که در مجموع فعالیت در برگ بمراتب بیشتر است از ریشه و حدود ۵ برابر آن است ، ضمن اینکه کاهش فعالیت در زمان یک ساعت ، هم برای برگ و هم برای ریشه معنی دار می باشد.

بحث

این بررسی نشان می دهد علیرغم مقدار بالای ذخیره نیترات دربافت (۲۰ μ molg $^{-1}$ FW)[1] آنزیم نیترات ردوکتاز نمی تواند با سرعت بیشینه (Vm) [2] عمل نماید و تائید کننده این حقیقت است که سهم بسیار زیادی از نیترات در اختیار آنزیم برای احیاء قرار نگرفته و در واحد ذخیره، یعنی واکوئول تجمع می یابد(۲۴). با مقایسه فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه و برگ (تصویر ۱) ، فعالیت آنزیم در برگ ۵ برابر ریشه است . به نظر می رسد بعد از اینکه فعالیت آنزیم در ریشه به حد اشباع رسید نیترات جذب شده به اندام هوائی انتقال می یابد. با این وجود بهترین شناخت در مورد تنظیم احیای نیترات در سلول های برگ بستگی دارد به دانش ما از مقادیر موجود سوبسترا ، NADH [3] و مقدار نیترات می باشد (۲۹). سیدیکی و همکاران (۳۰) برای جذب نیترات سیستم جذب دو مرحله‌ای اپستن [4] برای پتاسیم (۷) را پیشنهاد نمودند ، یعنی سیستم جذب با غلظت کم وتوان

۱ - میکرومول بر گرم ماده تازه

2 - Vitesse maximale 3 - Nicotinamide-adenine dinucleo tide 4 - Epstein

جذب زیادوسیستم جذب با غلظت زیاد و توان جذب کم را، بطوری‌که تامرز meq ۵۰ نیترات در محلول غذایی ، سیستم جذب دوم به حداشباع نمی رسد،این محققین عقیده دارند جریان خروج [۵]نیترات ، احیای نیترات ، انتقال آن به اندام هوائی و ذخیره آن در واکوئول عامل پائین نگهداشتن مقدار نیترات در سیستوپلاسم می گردد. بنابراین نتایج حاصل از تحقیق ما بیانگر آن است که با تغذیه مقدار بالای نیترات ۱۴ meq / l [۱]مقدار زیادی از آن به اندام های هوائی انتقال می یابد. ضمن اینکه با تغییر مقدار نسبت نیترات و آمونیوم یعنی کاهش مقدار نیترات و افزایش آمونیوم تا سقف [۱] ۲ meqg / l افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز را داریم (نمودار ۲).

نیترات و امونیوم هر دو با یک نسبت مشخصی می توانند فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و نتیجتا" رشد را افزایش دهند. در صورتی که مقادیر این دو نوع نیتروژن معدنی افزایش و یا کاهش یابد، میتواند بر روی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و نهایتا" سنتز پروتئین ها اثر بگذارد . طبق گزارش لی و همکاران با بکار بردن نیترات با غلظت های ۱۰mM و ۵ و ۱ بهترین رشد و فعالیت آنزیم را با غلظت های ۱۰mM و ۵ داشته ایم ، ضمن اینکه با این غلظت ها فعالیت آنزیم بعد از ۲۴ ساعت به مقدار ثابت خود می رسد فعالیت نیترات ردوکتاز اندام هوائی نسبت به ریشه از حساسیت کمتری برخوردار است . با انتقال گیاه از محلول غذایی ۱۰mM و ۵ به محلول بدون نیتروژن فعالیت آنزیم کاهش می یابد . تجزیه و تحلیل پروتئین آنزیمی به دنبال کاهش فعالیت آن اتفاق می افتد ،و با تغذیه مجدد نیترات سنتز جدید پروتئین رادر بر دارد نه تبدیل پروتئین غیر فعال را به پروتئین فعال ،طبق این بررسی با افزایش مقدار غلظت نیترات به ۵۰nM، رشد گیاه متوقف می گردد و در گیاه ریشه های جانبی بسیار کمی ظاهر می گردد (۲۰).بنابراین می توان نتیجه گیری نمود که غلظت [۱] ۱۴ meq /l نیترات برای فعالیت آنزیم باز دارنده بوده ، و با جایگزینی NH_4^+ ۲ meq /l[-۱] بجای نیترات فعالیت آنزیم افزایش می یابد. با افزایش آمونیوم تا حد [۱] ۸ meq /l به تدریج کاهش فعالیت آنزیم در ریشه و برگ را خواهیم داشت (شکلهای ۲ و ۳).

آموینوم سبب افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز و به اندازه ۲ برابر می گردد در حالی که تاثیر چندانی بر روی آنزیم های سیکل TCA [۲]ندارد از آن جائی که آمونیوم هیچ گونه اثری بر فعالیت آنزیم به روش این ویترو [۳]ندارد.

بنابراین آمونیوم عامل سنتز آنزیم NR[۴] می گردد (۲۳). کارهای زیادی نشان می دهد که با تغذیه NH_4^+ و NO_3^- عبور کربن از سیکل TCA افزایش یافته و تا ایجاد اسکلت کربن برای سنتز اسیدهای امینه امکان پذیر گردد (۳۶،۳۵،۳۲،۱۶،۱۳ و ۶) . اضافه کردن آمونیوم در یک روز به طور انتخابی در مرحله رشد سبب افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز در فاصله ۲۴ ساعت می گردد (۲۲)، علاوه بر آن تیمار مونیوم فعالیت آنزیم GDH[۵] ریشه را تا ۵۰ برابرنسبت به GS[۶] و GOGAT [۷] افزایش می دهد (۱۰).

بنابراین در اینجا می توان نتیجه گیری نمود که برای گیاه سیب واریته گلدن دلیشس نیترات و آمونیوم ضروری بوده و بهترین نسبت برای فعالیت آنزیم برگ نسبت آمونیوم به نیتروژن کل برابر $\frac{۲}{۱۴}$ می باشد (جدول ۱). در حالی که عکس العمل ریشه بابرگ متفاوت بوده وفعالیت بیشینه آن با ۱۴ meq gr /l-۱ نیترات است (جدول ۲). ضمن اینکه در گیاه کامل نسبت $\frac{۲}{۱۴۰}$ غالب می باشد (جدول ۳). فصل رشد و چگونگی شرایط اکولوژیکی نیز بر روی فعالیت نیترات

جدول ۱ - مقایسه دانکن اثر نسبت های متفاوت آمونیوم به مجموع امونیوم و نیترات در محلول غذایی بر فعالیت آنزیم برگ

مقایسه دانکن ۰/۰۱	مقایسه دانکن ۰/۰۵	میانگین	غلظت آمونیوم
AB	B	۱۷۳۱	۰
A	A	۲۰۷۳	۲
AB	AB	۱۹۳۷	۴
B	B	۱۶۹۶	۶
AB	AB	۱۸۳۵	۸
LSD ۰/۰۱=۳۲۲/۷	LSD ۰/۰۵=۲۴۳/۸		

۱ - میلی اکی والان در لیتر

2 - Tricarboxylic acid cycle 3- In vitro 4- Nitrate reductase

5-NADH-dependent glutamate dehydrogenase 6-NH3-dependent glutamine synthetase

7-NADH-dependent glutamate synthase

جدول ۲ - مقایسه دانکن اثر نسبت های متفاوت آمونیوم به مجموع امونیوم و نیترات در محلول غذایی بر فعالیت آنزیم ریشه

مقایسه دانکن ۰/۰۱	مقایسه دانکن ۰/۰۵	میانگین	غلظت آمونیوم
A	A	۲۹۸/۱	۰
B	B	۲۱۹/۳	۲
BC	B	۱۹۱/۵	۴
BC	B	۲۰۰/۲	۶
C	C	۱۳۶/۶	۸

LSD ۰/۰۱=۷۱/۲۸ LSD ۰/۰۵=۵۳/۷۶

جدول ۳ - مقایسه دانکن اثر نسبت های متفاوت آمونیوم به مجموع امونیوم و نیترات در محلول غذایی بر فعالیت آنزیم ردوکتاز کل گیاه

مقایسه دانکن ۰/۰۱	مقایسه دانکن ۰/۰۵	میانگین	غلظت آمونیوم
B	B	۱۰۹۰	۰
A	A	۱۴۱۵	۲
AB	B	۱۱۸۵	۴
B	B	۱۰۴۵	۶
AB	B	۱۱۹۵	۸

ردوکتاز اهمیت فراوانی دارد . به طوری که (جدول ۴) نشان می دهد در شهریور (b1) و اردیبهشت (b2) حداکثر فعالیت آنزیم مشاهده می شود و به نظر می رسد فعالیت در شهریور ماه از اهمیت بیشتری نسبت به اردیبهشت برخوردار است و آن هم به دلیل وزن زیاد اندام هوائی و یا ریشه در شهریور نسبت به اردیبهشت است به عبارت دیگر در زمان اندازه گیری در جمع مقدار احیاء نیترات در شهریور به مراتب

جدول ۴ - مقایسه دانکن اثر زمان های نمونه برداری روی فعالیت آنزیم در ریشه و برگ

مقایسه دانکن ۰/۰۱	مقایسه دانکن ۰/۰۵	میانگین	اندام گیاهی	زمان نمونه برداری
A	A	۲۸۵۸	برگ	b1
C	C	۱۵۳/۳	ریشه	
A	A	۳۰۷۷	برگ	b2
C	C	۲۶۸/۳	ریشه	
B	B	۱۴۳۶	برگ	b3
C	C	۲۱۷/۶	ریشه	
B	B	۱۲۸۹	برگ	b4
C	C	۱۸۶/۸	ریشه	

بیشتر است از دیگر ماههای فصل رویش ، هرچند که توجیه آن مشکل بوده و شاید گفت از یک طرف شرایط اکولوژیکی شهریور ماه قابل مقایسه با اردیبهشت ماه است و مهمتر از آن اینکه در این ماه زمان رسیدن میوه و بلوغ فیزیولوژیکی آن است . در هر حال فعالیت آنزیم در برگ نسبت به ریشه در شهریور ماه ۱۸ برابر و در اردیبهشت ماه ۱۱برابر است . در صورتی که در خرداد و یا مردادماه این فعالیت حدود۶ برابراست (جدولهای ۴ و۵).

طبق بررسی به عمل آمده بوسیله روبن اندازه فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز به روش این سیتو[1] در حدود gr^{-1} / fw nMh^{-1}[2] ۲ ۳۰۰ بوده است و در مدت ۹۰ دقیقه این فعالیت ثابت باقی مانده است (۲۴). مفهوم آن این است که در غیاب نیترات خارجی [3]احیاء مربوط به انتقال نیترات از واکوئول به سیتوپلاسم می باشد ، با اضافه کردن نیترات خارجی افزایش مقدار فعالیت به روش این سیتو بدلیل جریان انتقال نیترات ازآوند چوبی [4] به سمت سیتوپلاسم می باشد(۲۴)

۲ - نانومول نیتریت تولید شده در ساعت و در گرم ماده تازه

1- In situ

3 - Exogene 4 - Xylem

جدول ۵ - مقایسه دانکن اثر زمان های مختلف نمونه برداری بر فعالیت آنزیم گیاه

مقایسه دانکن ۰/۰۵	مقایسه دانکن ۰/۰۱	میانگین	زمان نمونه برداری
A	A	۱۵۰۶	b۱
A	A	۱۶۷۳	b۲
B	B	۸۲۶/۸	b۳
B	B	۷۳۷/۷	b۴

LSD ۰/۰۱=۲۳۴/۵ LSD ۰/۰۵=۱۷۷/۷

جدول ٦ - مقایسه دانکن فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در تیمارهای زمانی نیم و یک ساعت در ریشه یابرگ

مقایسه دانکن ۰/۰۵	مقایسه دانکن ۰/۰۱	میانگین	تیمارهای زمانی و اندام گیاهی
A	A	۲۴۷۷	۰/۵ برگ
B	B	۱۸۵۳	۱
C	C	۲۴۸/۷	۰/۵ ریشه
C	C	۱۶۴/۳	۱

LSD ۰/۰۱=۲۳۴/۵ LSD ۰/۰۵=۱۷۷/۷

در حالی که اندازه گیری به روش این وی و[1] بیانگر این است که فعالیت آنزیم در برگ وریشه درنیم ساعت بیشتراست از یک ساعت (منحنی ۴ و جدول ٦).

نتیجه می گردد با طولانی شدن زمان توان آنزیم برای احیاء کاهش می یابد. این کاهش با وجود نیترات کافی به صورت نیتریت پتاسیم در تامپون مصرف شده می تواند بدلیل فقدان احیاء کننده هایی مثل NADH و NADPH (۲٦) و یا عدم سنتز پروتئین آنزیم در قطعات گیاهی خرد شده (۸) و یا نقش پروتئازها و تخریب پروتئین آنزیم باشد (۳،۱۹ و۲۴) . NADH-NRA ریشه نسبت به حذف NO3 بسیار حساس تراست تاNADPH-NRA[2]اندام هوائی و تقریبا" ۵۰% NADH: NRA[3] ریشه و ساقه ، ۴ ساعت بعد از حذف نیترات کاهش می یابد. علاوه بر آن NRP [4]نیز تجزیه می گردد (۲۰).

بنابراین می توان احتمال داد که کاهش فعالیت نسبت به زمان به دلیل کاهش احیاء کننده ها و منبع کربنی در شرایط اندازه گیری آزمایش باشد این تحقیق نشان می دهد گیاه سیب برای حداکثر فعالیت نیترات ردوکتاز نیازمند نسبت آمونیوم به ازت کل $\frac{۲}{۱۴}$ بوده و علاوه بر آن بهترین فصل فعالیت آنزیم اردیبهشت و شهریور ماه است درحالی که کمترین فعالیت را در مرداد ماه داشته است وسرانجام این که در شرایط آزمایشی ما فعالیت آنزیم در برگ پنج برابر فعالیت آن در ریشه می باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق با اعتبارات معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران باجرا درآمده است که بدینوسیله از آن معاونت و شورای پژوهشی دانشگاه سپاسگزاری می گردد.

REFERENCES

1 - Chantarotwong et al 1976.In vivo nitrate reduction in relation to nitrate uptake ,nitrate content, and in vitro nitrate reductase Activity in intact Barley seedlings. Plant physiol 57:519-522.

2 - Coic, Y. & Lesaint, C 1975. La nutrition minerale et en eau des plantes en Horticulture avanccee. Document technique de SCPA 23:1-22.

1 - In vivo 2 - NADH-dependent Nitrate reductase activity

3 - NADH-dependent Nitrate reductase activity 4 - Nitrate reductase protein

3 - Dennis D,U & Turpin 1992. N2 Fixation , No3 reduction and NH4⁺ assimilation . plant phisiol , Bioch and Molecular Biology eds. Layzeu D.B New York pp 389-400.

4 - Deroche M.S. 1983. Relation entre la photosynthese at l'assimilation de l'ozote. Actualites bot . (1):85-98.

5 - Deroche, M.E. & Babalar M 1984. In vivo nitrate reductase activities in different organs of lucerne (Medicago sativa) plants : effects of combined nitrogen during first vegetative growth and after shoot harvest . physiol plantarum 70:90-98.

6 - Elrifi I.R et al 1988. Rubp limitation of photosynthetic carbon fixation:interaction between photosynthesis, respiration and ammonium assimilation in N-limited green algas. plant physiol 87:395-401.

7 - Epstein & Rain D.W 1965. Carrier mediated cation Transport in barley rootes :Kinetic evidence for a spectrum of active sites. proc Natl Acad Sci USA 53:1220- 1324.

8 - Ferrari & Varner 1970.Control of nitrate reductase Activity in Barley aleuron layers . Proceedings of the National Academy of Sciences (65) pp:729-736.

9 - Frith G.J.T 1972. Effect of ammonium nutrition on the activity of nitrate reductase in the roots of apple seedlings.plant Cell physio. 13:1085-1090.

10- Groat R.G. & Vance C.P 1982. Root and nodule Enzymes of ammonia assimilation in two plant - conditioned symbiotically ineffective genotypes of alfalfa (Medicago sativa .L.) plant physiol. 69: 614-618.

11- Heller .R. 1981. physiologic vegetal deuxiems edition p 137.

12- Jaworski E.G 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. Biochemical research communication 43(6) 1274-1279.

13- Kanazwet rt al 1970. Regulatory effect of ammonia on carbon metabolism in photosynthesizing chlorella pyrenoidosa. Biohim Biophys Acta 205:401-408.

14- King et al 1993. Feedback Regulation of nitrate Influx in Barley roots by nitrate , nitrite, and ammonium . plant physiol 102:1279-1289.

15- Klepper L & Hagemen 1969. The occurrence of nitrate reductase in apple leaves plant physiol (44): 110-114.

16- Larson P.O & al 1981. Amino acide synthesis in photosynthesizing spinach cells, effects of ammonia on pool sizes and rates of labelling from Co2. Plant physiol 68:292-299.

17- Leece D.F et al 1972. The occurance of nitrate reductase in Leaves of prunus species. plant physiol . 49:725-728.

18- Lee HJ & Titus, T.S 1993. Relationship between nitrate reduction activity and level of soluble carbohydrates under prolonged darkness in MM 106 apple leaves. Journal of Hort- Science 64(4) 589-596.

19- Lillo C 1993. Magnesium & Calcium inhibition of squash leaf NADH Nitrate reductase plant cell physiol 34(8):1181-1185.

20- Li X7 & Oaks 1993.Induction and turnover of nitrate reductabe in zea mays plant physiol 102:1251-1257.

21- Moreno J & Carica-Martiner 1980. Extraction of tracheal sap from citrus and analyse of its nitrogenous compounds . physiol plantarum . 50:298-303.

22- Mohanty B & Fletcher J.S 1976. Ammonium influence on the growth and nitrate reductase activity of plant's scarlet Rose suspension culturals . plant physiol . 58:152-155.

23- Readinbaugh M.C & Campbell W.H 1981. purification an characterisation of NAD (p) H:Nitrate reductase and NADPH:

Nitrate reductase from corn roots plant physiol 68:115-120.

24- Robion P. et al 1983. Evaluation de la fraction metabolisable du nitrate par la mesure in situ de sa reduction physiol . Veg. 21 :115-122.

25- Robin p & Salsac 1985. Interaction entre approches biochimique et approches agronomiques de la nutrition Azot'ee (les colloques de l'INRA N 37) 79-99.

26- Ruftry TW et al 1982.,Relative contet of No3⁻ and reduced N in xylem exudate as an indicator of root reduction of concurrently absorbed No3.Plant physiol . 69:166-170.

27- Rufty TW et al 1987. Endogenous No3⁻ in the root as a Source of substrate for reduction in light plant physiol 84:1421-1426.

28- Salsac L et al 1984. Energy requirement of symbiotic nitrogen fixation .physiol . Veg. 22(4)509-251.

29- Sanchez J & H.W. Heldt 1990. On the regulation of spinach nitrate reductase . plant physiol 92:684-689.

30- Siddiqui M.Y et al 1990.Studies of the uptake of nitrate in Barley .plant physiol 93:1426-1432.

31- Somers D,A et al 1983. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. plant physiol 72:949-952.

32- Titus J.S & Kang S.M 1982. Nitrogen metabolisme translocation and recycling in apple Trees. Hortculturel reveiew . 4:204-246.

33- Vance & Heichel 1981.Nitrate assimilation during vegetative regrowth of alfalfa. plant physiol 68:1052- 1056.

34- Wallace W 1973. Nitrate reductase inactivation enzyme from the maize root plant physiol . 52:197-201.

35- Weger & turpin 1989. Mitochondrial respiration can support NO3⁻ and NO2⁻ reduction during photosynthesis plant physiol . 89:409-415.

36- Woo, K.C, Canvin D.T 1980. Effect of ammonia on photosunthetic carbon fixation in isolated spinach leaf cells. Can J Bot. 58:505-510.

Iranian J.Agric.Sci.Vol.27 No.3 1996.

Study of the Nitrate Reductase Activity in Golden Deliciouse Apples

M. BABALAR , F.RABIE AND A.AHMADI

Associate Professor, Technical Assistant and Instruclor, Respeclively,

Department of Horliculture, College of Agriculture,

University of Tehran, Karaj, Iran.

Accepted, 3 July.1996

SUMMARY

The effect of $NH4^+$ and $NO3^-$ supply in the nutrient solution on nitrate reductase activity (NRA) was Investigated in leaf and root of Golden delicious apple trees were grafted on M9 rootstock. This research was performed in Factorial experimental in randomized completed design during a period of three years in 1993-1995 at the research glasshouse and laboratory of agricultural college of Tehran University . Two-year-old trees were planted in plastic pots containing sand and perlite with provision for drainage, and graffted.

After two weeks. The trees were supplied with coit nutrient Solution and compared with four levels of $NH4^+$ / $NH4^+$ + $No3^-$ (0.14,2.14, 4.14, 6.14, 8.14).Sampling prosses is consist of four time in year.

Increasing $NH4^+$ / $NH4^+$ + $No3^-$ ratio significanty decreased NRA in leaves and roots , but significant an increasing in response to 8/14 and decease to 0/14 ratio in leaves as observed.

The occurrence of NRA in apple leaves was significantly greater than those of roots and it can therefore be conculded that the reduction of nitrate can occur in various organs of apple trees but that is greater in leaves.

In addition two reduction time assay resulted on activity of the enzyme per gram fresh weight per hour approximately 24 fold higher for half hours than that obtained with one hour reduction time .

A seasonal patterns study indicated that NRA were high at growth stages and declined on warm months.