مقاله کامل پژوهشی

نقش آمونیوم به عنوان عامل تنش زا در گیاه نیترات پسند چغندرقند

معصومه عابدینی*
استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران.

چکیده

آمونیوم یکی از اشکال مهم ازت برای تغذیه تعدادی از گیاهان می‌باشد، ولی تأثیر آن به‌عنوان عامل تنش‌زا در برخی گیاهان مشاهده شده است. در این پژوهش تأثیر آمونیوم به‌عنوان منبع ازت روی برخی شاخص‌های رشدی، تولید لیگنین و توسعه بافت گزیلم، فعالیت آنزیم پراکسیداز، مقدار قندها، پروتئین و رنگیزه‌های فتوسنتزی درگیاه نیترات‌پسند چغندرقند در شرایط کشت هیدروپونیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد رشد گیاه چغندر قند به شدت توسط آمونیوم مهار می‌شود. غلظت قندهای محلول و نامحلول در گیاهان تغذیه شده با آمونیوم به‌طور معنی‌داری کمتر از گیاهان تغذیه شده با نیترات بود، ولی غلظت پروتئین محلول کل و کلروفیل در گیاهان رشد یافته در حضور آمونیوم بیشتر بود. گیاهان تغذیه شده با آمونیوم دارای بافت گزیلمی توسعه یافته‌تری در مقایسه با گیاهان تغذیه شده با نیترات بودند. هم‌چنین آمونیوم باعث افزایش بیوسنتز لیگنین از طریق تحریک فعالیت پراکسیدازها شد که با کاهش گسترش پذیری دیواره سلولی می‌تواند یکی از عوامل مهار رشد در این گیاه باشد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، پروتئین، کلروفیل، گزیلم، نیترات

مقدمه

ازت یکی از مهم‌ترین عناصر ضروری برای رشد گیاهان می‌باشد که در ساختار ترکیبات مختلفی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، کلروفیل و ترکیبات ثانویه وارد می‌شود. کمبود، مقادیر فرابهینه و یا عدم فراهمی اشکال مناسب برای جذب این عنصر، همه باعث تغییرات قابل توجه در متابولیسم گیاه می‌شود [۸، ۱۷، ۲۳].

ازت به دو شکل نیترات و آمونیوم توسط گیاهان جذب می‌شود. اگرچه استفاده از نیترات در مقایسه با آمونیوم به‌علت فرآیند احیاء به مصرف انرژی بیشتری نیاز دارد [۲۸]، ولی بسیاری از گونه‌های گیاهی شکل نیتراتی ازت را ترجیح می‌دهند و استفاده از آمونیوم به‌عنوان منبع انحصاری ازت باعث مهار رشد آن‌ها می‌شود [٦، ۸، ۹، ۱۷، ۱۹، ۲۱ و ۲٤]. از آن‌جا که جذب آمونیوم توسط ریشه با آزاد شدن پروتون همراه است، یکی از علل کاهش رشد در تغذیه انحصاری آمونیومی کاهش pH محیط کشت می‌باشد که منجر به اختلال در جذب عناصر غذایی می‌شود [٦]. بعضی از گونه‌های گیاهی مانند گیاهان تیره اریکاسه و تعدادی از مخروطیان که به محیط‌هایی با pH پائین سازش یافته‌اند، آمونیوم را به‌عنوان تنها منبع ازتی ترجیح می‌دهند [۱ و ۹].

لیگنین بعد از سلولز فراوان‌ترین بیوپلیمر در گیاهان آوندی می‌باشد و به‌طور عمده در بافت‌های آوندی و نگهدارنده وجود دارد [١٤]. لیگنینی شدن دیواره‌ها بخشی از فرآیند طبیعی رشد می‌باشد ولی القاء این پدیده تحت تأثیر عوامل محیطی مختلف از قبیل تنش‌های زیستی و غیرزیستی گزارش شده‌است [۲، ۳، ۱۰ و ۱۸]. لیگنین دارای ساختار سه بعدی می‌باشد که از پلیمریزه شدن رادیکال‌های آزاد الکل‌های فنیل‌پروپانوئیدی در دیواره سلول‌ها تشکیل می‌شود [۲۰]. الکل‌های فنیل‌پروپانوئیدی در دیواره‌های سلولی در یک

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: ms_abedini@pnu.ac.ir

فرآیند آنزیمی دهیدروژناسیون که توسط پراکسیدازها کاتالیز می‌شود، به رادیکال‌های آزاد تبدیل شده و در ساختار لیگنین وارد می‌شوند [۷، ۱۸و۲۰].

تأثیر غلظت ازت در بیوسنتز لیگنین در تعداد معدودی از گیاهان مورد بررسی قرار گرفته ولی با نتایج متفاوتی همراه بوده‌است. کمبود ازت در گیاه توتون باعث افزایش بیوسنتز لیگنین می‌شود که با افزایش فعالیت آنزیم‌های مسیر فنیل‌پروپانوئیدی مانند فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز همراه بوده است. در شبدر و برنج غلظت ازت تأثیری روی مقدار لیگنین گیاه نداشت ولی در گیاه *فستوکا* افزایش ازت باعث افزایش لیگنین گردید [۲]. در مورد اثر شکل ازت (آمونیوم در مقایسه با نیترات) روی مقدار لیگنین، بررسی منتشر شده‌ای وجود ندارد.

چغندرقند یکی از مهم‌ترین منابع گیاهی برای تأمین قند و شکر در دنیا محسوب می‌شود. ایران از نظر تولید این محصول جایگاه چهاردهم را در سطح جهان دارد که حدود ۱/۷٪ کل شکر تولیدی جهان را شامل می‌شود [۳۲]. هم‌چنین این گیاه به‌عنوان یک منبع غذایی با ارزش برای دام محسوب می‌شود، به‌طوری‌که علاوه‌بر برگ، تفاله آن نیز پس از استحصال قند مورد استفاده تغذیه دام قرار می‌گیرد [۲۷]. اندام اصلی ذخیره کننده ساکاروز در گیاه چغندرقند منطقه زیرلپه می‌باشد. افزایش بیوسنتز لیگنین در منطقه زیرلپه علاوه بر این‌که اثر نامطلوبی بر کمیت و کیفیت قند می‌گذارد، باعث کاهش قابلیت هضم تفاله توسط دام نیز می‌شود [۱۲].

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر آمونیوم به‌عنوان تنها منبع ازت در گیاه چغندرقند که یک گونه نیترات پسند می‌باشد، انجام گرفته است. به منظور ارزیابی تاثیر آمونیوم، علاوه بر رشدگیاه، غلظت پروتئین و قندهای گیاه نیز گزارش شده و تغییر در سنتز لیگنین با استفاده از چند رهیافت، از جمله فعالیت آنزیم پراکسیداز، غلظت لیگنین و مطالعه میکروسکوپی گسترش بافت گزیلم مورد مطالعه قرار گرفته است.

نیترات‌کلسیم (تیمار نیتراتی) و کلریدآمونیوم (تیمار آمونیومی) رشد یافتند (جدول ۱). دانه‌رست‌ها در اتاقک کشت با حداکثر دمای روزانه ۱±۳۳ و حداقل دمای شبانه۱±۲۲ درجه‌سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۵٪ به مدت ۳۰ روز رشد داده شدند. طول دوره روشنایی و تاریکی به ترتیب ۱۶ و ۸ ساعت تنظیم گردید. تعویض محلول غذایی گلدان‌ها هر شش روز یک‌بار و تنظیم pH محلول غذایی هر دو روز یک‌بار انجام گرفت.

مواد و روشها

شرایط کشت و نگه‌داری گیاهان

بذور چغندر قند (*Beta vulgaris* var. BR1) از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. پس از جوانه‌زنی، دانه‌رست های جوان در محیط هوگلند ۵۰٪ به‌مدت ده روز پیش تیمار شده سپس به محیط کشت اصلی انتقال داده شدند. گیاهان در محیط هوگلند ۱۰۰٪ با غلظت ازت برابر (پنج میلی‌اکی‌والان در لیتر) ولی به یکی از دو شکل

جدول ۱ ترکیب عناصر پرمصرف محیط کشت چغدرقند.

	غلظت (میلی‌اکی‌والان در لیتر)					
نمک	NH_4Cl	$Ca(NO_3)_2$	$CaCl_2$	KH_2PO_4	K_2SO_4	$MgSO_4$
نیترات	–	۲/۵	۲/۵	۱	۱/۵	۲
آمونیوم	۵	–	۵	۱	۱/۵	۲

برداشت گیاهان و اندازه گیری غلظت کلروفیل

در پایان دوره رشد اندام هوایی، منطقه زیر لپه و ریشه گیاهان تفکیک شده و وزن تر آن‌ها تعیین شد. پس از قرار دادن نمونه‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، وزن خشک آن‌ها نیز تعیین گردید. اندازه گیری غلظت کلروفیل در برگ‌ها به روش موران انجام گرفت [۲۶] و با واحد میلی‌گرم در گرم وزن تر بیان شد.

بررسی کیفی و کمی فعالیت آنـزیم پراکسـیداز در منطقـه زیرلپه

بررسی کیفی و کمی فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس آزمایش تبدیل گایاکول به تتراگایاکول در حضور پراکسیدهیدروژن انجام گرفت [۵]. برای بررسی کیفی، برش‌های نازک از منطقه زیرلپه تهیه و پس از آغشته شدن به گایاکول در یک پتری حاوی چند قطره پراکسیدهیدروژن ۳٪ قرار داده شدند. شدت رنگ قرمز خرمائی ایجاد شده که ناشی از تشکیل تتراگایاکول در حضور پراکسیدهیدروژن و گایاکول توسط آنزیم پراکسیداز می‌باشد، به‌عنوان معیاری از فعالیت آنزیم در نظرگرفته شد. برای سنجش کمی فعالیت آنزیم، عصارهٔ آنزیمی از منطقه زیرلپه در بافر فسفات پتاسیم با غلظت۱۰میلی‌مول (mM) و pH=۷ تهیه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سنجش فعالیت آنزیم در بافر فسفات پتاسیم (۱۰ mM) حاوی H_2O_2 (۵ mM) و گایاکول (٤ mM) به انجام رسید. واکنش با افزودن عصارهٔ آنزیمی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد آغاز شد و جذب نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در طول موج ٤۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu) اندازه گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ظریب خاموشی تتراگایاکول ($۲٦/٦mM^{-1}$ cm^{-1}) بر حسب واحد میکرومول تتراگایاکول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

بررسی بافت گزیلم در منطقه زیرلپه

برش‌های نازک با ضخامت ۳۵ میکرومتر از منطقه زیر لپه توسط تیغ تهیه وپس از آماده‌سازی برای مطالعات میکروسکپی با محلول رنگ آمیزی کارمن وسبزمتیل رنگ‌آمیزی شدند [۱۵] و توسط میکروسکپ نوری (Olympus, CX-21) مورد مطالعه قرار گرفتند. اندازه گیری سطح بافت گزیلمی در مقاطع میکروسکپی با استفاده از پلانیمتر دیجیتال (Placom, Kuizumi, KP-90) انجام گرفت.

سنجش لیگنین

برای سنجش لیگنین در منطقه زیر لپه، روی یک گرم ماده خشک ۲۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۲۵ نرمال ریخته شد که باعث حل شدن ترکیبات اطراف لیگنین و آزاد شدن آن می‌شود، سپس از پرمنگنات پتاسیم ۰/۱ نرمال برای اکسید کردن لیگنین استفاده شد. مقدار پرمنگنات پتاسیم مصرف شده برای اکسیدکردن لیگنین، توسط تیتراسیون با تیوسولفات‌سدیم و طبق رابطه زیر محاسبه گردید [۲۹]. حجم پرمنگنات‌پتاسیم (۰/۰۲ مولار) مصرف شده برای اکسیداسیون لیگنین از تفاضل حجم پرمنگنات تیتر شده با تیوسولفات از کل پرمنگنات استفاده شده به دست آمد (مقدار A). مقدار لیگنین در یک گرم نمونه طبق رابطه «عدد A × ۰/۱۳» گزارش شد.

اندازه‌گیری قندهای محلول و نامحلول

اندازه‌گیری قندها به روش فنل–اسیدسولفوریک انجام گرفت [۱۱]. استخراج قندهای محلول توسط اتانل ۸۰٪ انجام شد. پس از صاف کردن، مایع حاصل برای اندازه‌گیری قندهای محلول استفاده شد و رسوب روی کاغذ صافی برای سنجش قندهای نامحلول مورد استفاده قرار گرفت. برای استخراج قندها از کاغذ صافی، آن‌ها به مدت پانزده دقیقه در آب مقطر جوشانده شدند. محلول‌های بدست آمده با دو میلی‌لیتر هیدروکسید باریم (۲ mM) و دو میلی‌لیتر سولفات‌روی (۵٪) مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در g ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. به هر کدام از نمونه‌ها یک میلی‌لیتر محلول فنل (۵٪) و پنج میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه جذب در طول موج ٤۸۵ نانومتر خوانده شد. غلظت قند با استفاده از محلول‌های استاندارد گلوکز و با واحد میلی‌گرم در گرم وزن خشک محاسبه گردید.

سنجش پروتئین محلول کل

سنجش پروتئین محلول کل به روش فولین- لوری انجام گرفت [۲۲]. غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از محلول‌های استاندارد آلبومین و با واحد میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه شد.

بررسی‌های آماری

آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کاملا تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم افزار (Sigma stat(3.02 و با استفاده از آزمون توکی(Tukey) در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت.

نتایج

رشد چغندر قند به‌شدت از شکل ازت عرضه شده متأثر شد، به‌طوری‌که وزن تر و وزن خشک اندام‌هوایی، ریشه و منطقه زیرلپه (جدول ۲)، هم‌چنین تعداد و سطح برگ‌ها، طول ریشه و منطقه زیرلپه و قطر این منطقه (جدول ۳) در محیط حاوی آمونیوم به‌طور معنی‌داری از محیط حاوی نیترات کمتر بود (p≤۰/۰۵).

غلظت کلروفیل‌های a، b و کل در گیاهان تغذیه شده با آمونیوم از گیاهان رشد کرده در محیط حاوی نیترات بیشتر بود که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵) (شکل ۱).

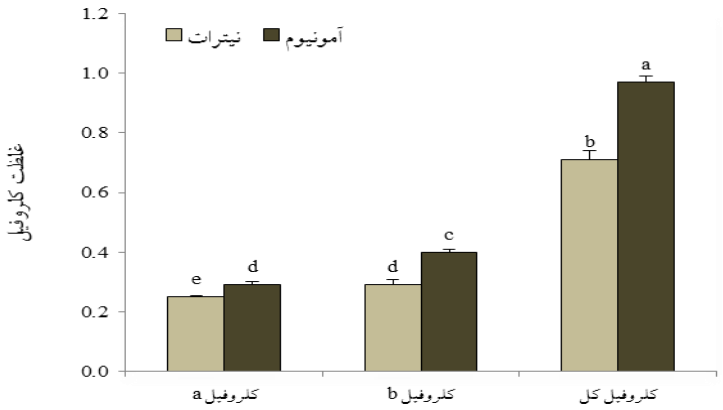
فعالیت آنزیم پراکسیداز در منطقه زیرلپه در دانه‌رست های تغذیه‌شده با آمونیوم به‌طور قابل توجهی ازدانه‌رست‌های تغذیه‌شده با نیترات بیشتر بود (جدول ٤). بررسی کیفی فعالیت آنزیم نیز این نتیجه را تأیید کرد (شکل ۲).

جدول ۲ تأثیر نیترات و آمونیوم بر روی وزن تر و خشک اندام‌های مختلف گیاه چغندر قند. اختلاف بین مقادیر (mean±SD) مربوط به هر شاخص که دارای حروف غیرمشترک است، از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (n=٤، p≤۰/۰۵).

شکل ازت مصرفی	وزن تر اندام‌های مختلف گیاه (گرم به ازای گیاه)			وزن خشک اندام‌های مختلف گیاه (گرم به ازای گیاه)		
	زیر لپه	ریشه	اندام هوایی	زیرلپه	ریشه	اندام‌هوایی
نیترات	۱/۵۵±۰/۰۸ a	۳/۰۵±۰/۲ a	۲۳/۹۳±۱/۵ a	۰/۱۳±۰/۰۱ a	۰/۱۵±۰/۰۲ a	۱/٦٤±۰/۰٤ a
آمونیوم	۰/۳۷±۰/۰۳ c	۱/۱۳±۰/۰۵ c	۷/۵±۰/۳ c	۰/۰٤±۰/۰۰۵ c	۰/۰۷±۰/۰۰۵ c	۰/٦۲±۰/۰۵ c

جدول ۳ تأثیر نیترات و آمونیوم روی تعدادی از شاخص‌های رشدی گیاه چغندر قند. اختلاف بین مقادیر (mean±SD) مربوط به هر شاخص که دارای حروف غیرمشترک است، از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (n=٤، p≤۰/۰۵).

شکل ازت مصرفی	سطح برگ (cm^2)	تعداد برگ (گیاه)	قطر زیرلپه (cm)	طول(cm)	
				زیرلپه	ریشه
نیترات	۳۷۸±۱٦/۸ a	۸/۵±۰/۲ a	۰/۷±۰/۰۲ a	۵/۵±۰/۲ a	۲۷/٦±۱/۵ a
آمونیوم	۱٦٦±۷/٤ c	۵±۰/۵ b	۰/۳۸±۰/۰۳ c	٤/۷۳±۰/۱ b	۱۹/۹±۰/۷ c

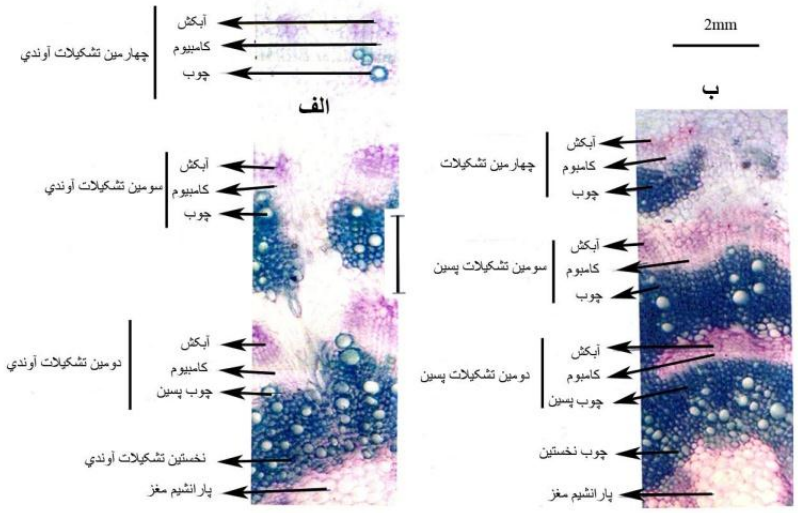


شکل ۱ تأثیر نیترات و آمونیوم روی غلظت کلروفیل‌های a، b و کل ($mg\ g^{-1}\ FW$) در گیاه چغندرقند. اختلاف بین مقادیر مربوط به ستون‌هایی که دارای حروف غیرمشترک است، از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (n=٤، p≤۰/۰۵).

شکل۲ نمایش کیفی فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقطع زیرلپه گیاه چغندرقند تغذیه شده با نیترات و آمونیوم.

تصاویر میکروسکوپی منطقه زیرلپه، توسعه قابل‌توجه بافت گزیلم را در گیاهان تغذیه‌شده با آمونیوم نسبت به آن با نیترات نشان داد (شکل ۳). اندازه‌گیری سطح بافت گزیلم نسبت به کل سطح مقطع برش، این موضوع را مورد تأیید قرار داد، به‌طوری‌که نسبت سطح بافت گزیلم به سطح کل مقطع در گیاهان تغذیه‌شده با آمونیوم نسبت به آن با نیترات به‌طور معنی‌داری بیش‌تربود ($p\leq$۰/۰۵) (جدول ٤).

مقدار لیگنین منطقه زیر لپه در گیاهان تغذیه‌شده با آمونیوم به‌طور قابل‌تو جهی بیش از آن در گیاهان تغذیه‌شده با نیترات بوده و این اختلاف معنی‌دار بود ($p\leq$۰/۰۵) (جدول ٤).



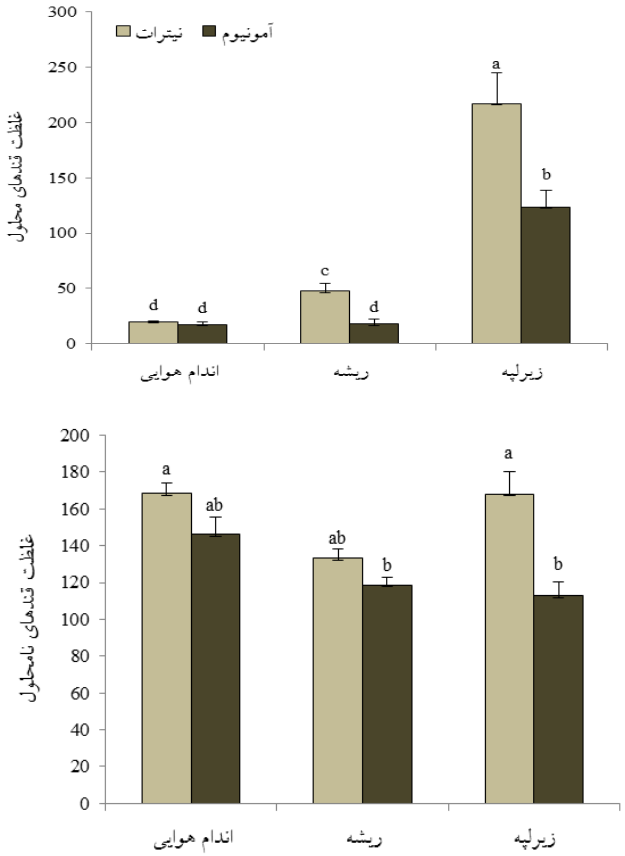
شکل ۳ برش میکروسکوپی منطقه زیرلپه گیاه چغندرقند تغذیه شده با نیترات (الف) و آمونیوم (ب).

جدول٤ تأثیر نیترات و آمونیوم روی مقدار لیگنین، سطح بافت گزیلم و فعالیت آنزیم پراکسیداز در منطقه زیرلپه چغندرقند. اختلاف بین مقادیر(mean±SD) مربوط به هر پارامتر که دارای حروف غیرمشترک است، از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ($p\leq$۰/۰۵ ،n=٤).

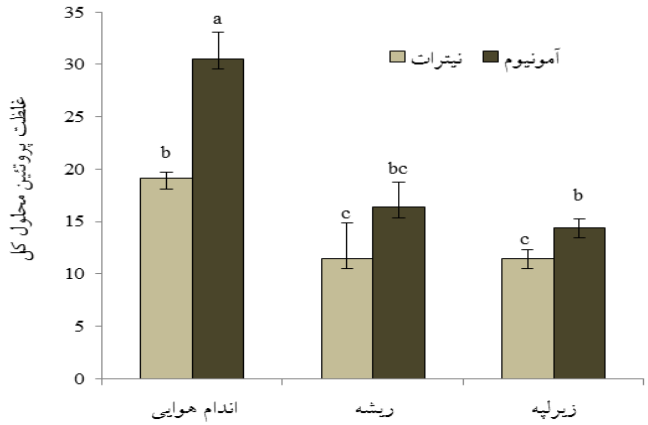
شکل ازت مصرفی	درصد لیگنین نمونه (درصد)	سطح گزیلم (نسبت به کل مقطع)	فعالیت پراکسیداز (µM tetraguaiacol min^{-1} mg^{-1} pro.)
نیترات	۳/٦٤±۰/۲۰۸^{b}	۰/۰۸۷±۰/۰۰۳^{c}	۰/۲۲۳±۰/۱۱^{b}
آمونیوم	۵/۰۷±۰/۳٦٤^{a}	۰/۲۹۸±۰/۰۲۳^{a}	۰/٤۹۸±۰/۱٦^{a}

استفاده از آمونیوم به‌عنوان منبع ازت در محیط کشت گیاه چغندرقند باعث کاهش غلظت قندهای محلول و نامحلول گیاه شد که این کاهش برای قندهای محلول در ریشه و منطقه زیرلپه و برای قندهای نامحلول در منطقه زیرلپه از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) (شکل ٤).

تغذیه آمونیومی در گیاه چغندرقند باعث افزایش غلظت پروتئین محلول کل در اندام‌هوایی، ریشه و منطقه زیرلپه شد که این افزایش در اندام‌هوایی و منطقه زیرلپه معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) (شکل ٦).



شکل ٤ تأثیر نیترات و آمونیوم روی غلظت قندهای محلول و نامحلول (mg g^{-1} DW) در گیاه چغندرقند. اختلاف بین مقادیر مربوط به ستون‌هایی که دارای حروف غیرمشترک است، از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (n=٤، p≤۰/۰۵).



شکل ٥ تأثیر نیترات و آمونیوم روی غلظت پروتئین محلول کل (mg g^{-1} DW) درگیاه چغندرقند. اختلاف بین مقادیر مربوط به ستون‌هایی که دارای حروف غیرمشترک است، از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (n=٤، p≤۰/۰۵).

بحث

اگرچه آمونیوم منبع اصلی ازت برای بعضی از گیاهان مانند برنج و سیب زمینی و گیاهان تیره اریکاسه محسوب می‌شود [۱، ۹ و ۲۳] ولی کاهش رشد القاء شده توسط این ترکیب ازتی که در این بررسی در گیاه چغندرقند مشاهده شد، برای تعدادی از گیاهان دیگر نیز گزارش شده است. استفاده از آمونیوم به‌عنوان تنها منبع ازتی در محدوده غلظت‌های بهینه ازت برای رشد، در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس [۸، ۱۹ و ۲۱]، منداب [۳۰]، کدو [٦] و گوجه‌فرنگی [۲٤و۱۷] باعث کاهش رشد شده است. سازوکارهای تاثیر آمونیوم در کاهش رشد زمانی که به‌عنوان تنها منبع ازتی مورد استفاده قرار می‌گیرد، هنوز به‌طور کامل شناخته نشده‌است. در این بررسی کاهش رشد می‌تواند به دلایل مختلف از جمله ناشی از مصرف بخش مهمی از فرآورده‌های فتوسنتزی برای همانندسازی آمونیوم و نیز سم‌زدایی آمونیوم آزاد در گیاه [۲۵ و ۳۰] بوده باشد. هم‌چنین سازوکارهای دیگری که (در شرایط کشت غیر از بررسی حاضر) می‌تواند نقش داشته باشد، افت pH محیط کشت و جذب کم آب و عناصر می‌باشد [٦]. درمطالعه انجام گرفته توسط گارنیکا و همکاران [١٦] درگیاه گندم تغذیه شده با غلظت پنج میلی مولار آمونیوم، افزایش سطح پلی‌آمین پوترسین گزارش شده است. افزایش بیوسنتز پوترسین روشی برای سم‌زدایی آمونیوم آزاد در بافت‌های گیاهی است ولی انباشته شدن پوترسین آزاد در بافت‌ها می‌تواند اثرات منفی روی رشد و نمو گیاه داشته باشد [١٦]. به‌علاوه نتایج پژوهش‌های اخیردر این زمینه، نقش فیتوهورمون‌هایی مانند اکسین و اتیلن را نیز به‌طور آشکار مشخص کرده‌اند. مطالعات انجام گرفته توسط لی و همکاران [۱۹] القاء هورمون اتیلن و افزایش بیان ژن گزارشگر اتیلن را در گیاه آرابیدوپسیس در پاسخ به غلظت یک میلی مولار آمونیوم نشان داده‌است. کاهش بیان ژن‌های دو ناقل مهم اکسین یعنی AUX1 و PIN2 توسط آمونیوم در گیاه آرابیدوپسیس توسط لیو و همکاران [٤، ۲۱] گزارش شده است. آمونیوم منجر به کاهش پاسخ ژئوتروپیسمی و کاهش رشد طولی ریشه با کاهش طول مریستم ریشه و منطقه تطویل در ناحیه زیر انتهایی ریشه می‌شود. البته کاهش رشد مشاهده شده در گیاه چغندرقند در این پژوهش تا حدی نیز در ارتباط با القاء بیوسنتز لیگنین توسط آمونیوم بوده است. ورود لیگنین در ساختار دیواره با کاهش قابلیت گسترش پذیری دیواره و در نتیجه کاهش رشد سلول همراه است [۱۳ و ۱۸].

توسعه بافت گزیلم، افزایش بیوسنتز لیگنین و فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه چغندر قند تغذیه شده با آمونیوم در مقایسه با گیاهان تغذیه شده با نیترات احتمالاً یک پاسخ به شرایط نامناسب تغذیه‌ای می‌باشد. افزایش بیوسنتز لیگنین در پاسخ به تنش‌های مختلف محیطی شامل تنش‌های غیرزیستی مثل خشکی [۱۳]، شوری [۳]، دمای پائین [۲]، پرتو فرابنفش [۳۳]، سمیت عناصر فلزی سنگین [۷]، غلظت نامناسب مواد معدنی [۲] و تنش‌های زیستی [۱۰] گزارش شده‌است که در بیشتر موارد با تغییر در الگوی تمایز بافت گزیلم و افزایش رسوب لیگنین در پروتوگزیلم و متاگزیلم همراه می‌باشد. افزایش لیگنین در دیواره سلولی گیاهان مختلف در پاسخ به تنش‌های محیطی با افزایش فعالیت پراکسیدازها همراه است [۱۸]. پراکسیدازهای دیواره با تبدیل پیش‌سازهای منولیگنولی به رادیکال‌های فنوکسی به‌طور مستقیم در بیوسنتز لیگنین نقش دارند [۲۰].

افزایش غلظت کلروفیل توسط آمونیوم که در این بررسی مشاهده شد، در گیاهانی مانند کاسنی و منداب نیز در پاسخ به وجود آمونیوم در محیط کشت گزارش شده است که به احتمال زیاد از کاهش رشد گیاه و غلیظ شدن کلروفیل برگ ناشی می‌شود [۳۰]. هم‌چنین افزایش غلظت کلروفیل در تغذیه آمونیومی می‌تواند ناشی از افزایش بیوسنتز اسیدهای آمینه باشد که به‌عنوان پیش‌ساز کلروفیل عمل می‌کنند [۳۱].

غلظت قندهای محلول و نامحلول در بخش‌های مختلف گیاه چغندرقند در تغذیه آمونیومی نسبت به نیترات کمتر بود. این یافته مشابه نتیجه به‌دست آمده برای گیاهانی مانند گوجه فرنگی و کدو در تغذیه آمونیومی می‌باشد [٦ و ۱۷]. همانندسازی آمونیوم و وارد شدن آن در ساختار آمینواسیدها به اسکلت‌های کربنی نیاز دارد که این فرآیند با مصرف ذخایر نشاسته و ساکاروز گیاه همراه است.

هم‌چنین تغذیه آمونیومی باعث افزایش مقدار پروتئین در بخش‌های مختلف گیاه چغندرقند شد. آمونیوم پس از جذب بلافاصله متابولیزه شده و در ساختمان آمینواسیدها و پروتئین‌ها وارد می‌شود، و از این نظر نسبت به نیترات که می‌تواند تا حد قابل توجهی قبل از احیاء و همانندسازی در واکوئل‌ها ذخیره گردد، متفاوت است [۲۳]. تغذیه آمونیومی در تعدادی از

گیاهان مانند کاسنی، سویا و منداب نیز منجر به افزایش مقدار پروتئین می‌شود [۳۰ و ۳۱]. افزایش مقدار پروتئین که با کاهش قندها همراه بود، نشان دهنده تغییر در توازن متابولیسم ازت و کربن به نفع ازت در گیاهان تغذیه شده با آمونیوم بود. از بین رفتن این توازن می‌تواند دلیل دیگری برای کاهش رشد گیاه نیترات پسند چغندر قند در تغذیه انحصاری آمونیوم باشد.

منابع

1. Balkos KD, Britto DT, Kronzucker HJ (2010) Optimization of ammonium acquisition and metabolism by potassium in rice (*Oryza sativa* L. cv. IR-72) plant. *Cell and Environment* **33**: 23–34.
2. Cabane M, Afif D, Hawkins S (2012) Lignin and Abiotic Stress. In: Jovanin L, Lapierre C (eds), Lignin: Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering. 1th edition. London, UK, Academic Press.
3. Cachorro P, Ortiz A, Barcelo AR., Cerda A (1992) Lignin deposition in vascular tissues of *Phaseolus vulgaris* roots in response to salt stress and Ca^{2+} ions. *Tree Physiology* **33**: 33-40.
4. Cao Y, Glass ADM, Crawford NM (1993) Ammonium inhibition of Arabidopsis root growth can be reversed by potassium and by auxin resistance mutations aux1, axr1, and axr2. *Plant physiology* **102**: 983-9.
5. Chance B, Maehly A (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* **2**: 764-817.
6 Chance OW, Somda ZC, Mills HA (1999) Effect of nitrogen form during the flowering period on zucchini squash growth and nutrient element uptake. *Journal of Plant Nutrition* **22**: 597-607.
7. Chen EL, Chen YA, Chen LM, Liu ZH (2002) Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 439-444.
8. Cheng QIN, Ke-ke YI, Ping WU (2011) Ammonium effects cell viability to inhibit root growth in Arabidopsis. *Journal of Zhejiang University-Science* B. **12**: 477-484.
9. Claussen W, Lenz F (1999) Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant and Soil* **208**: 95-102.
10. Donnini S, Dell'Orto M, Zocchi G (2010) Oxidative stress responses and root lignification induced by Fe deficiency conditions in pear and quince genotypes. *Tree Physiology* **31**: 102-13.
11. Dubois MKA, Gilles JK, Hamilton Rebers PA, Fred S (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annals ofChemistry* **28**: 350-356
12. Fadel JG, DePeters EJ, Arosemena A (2000) Composition and digestibility of beet pulp with and without molasses and dried using three methods. *Animal Feed and Technology* **85**: 121-129.
13. Fan L, Linker R, Gepstein S, Tanimoto E, Yamamoto R, Neumann PM (2006) Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stellar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiology* **140**: 603-612.
14. Francisco J, Ruiz-Duenas, Martinez AT, (2009) Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial biotechnology* **2**: 164–177.
15. Gahan PB (1984) Plant Histochemistry and Cytochemistry: An Introduction. London, UK, Academic Press.
16. Garnica M, Houdusse F, Yvin JC, Garcia-Mina JM (2009) Nitrate supply induces changes in polyamine content and ethylene production in wheat plant grown with ammonium. *Journal of Plant Physiology* **166**: 363-374.
17. Horchani F, Hajri R, Aschi-Smiti S (2010) Effect of ammonium or nitrate nutrition on photosynthesis, growth, and nitrogen assimilation in tomato plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **137**: 610-617.
18. Lee BR, Kim KY, Jung WJ, Avice JC, Ourry, A, Kim TH (2007) Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* **58**:1271-9.
19. Li G, Li B, Don G, Feng X, Kronzucker HJ, Shi W (2013) Ammonium-induced shoot ethylene production is associated with the inhibition of lateral root formation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1-13.
20. Li X, Chapple C (2010) Understanding lignification: challenges beyond monolignol biosynthesis. *Plant Physiology* **154**: 449-452.
21. Liu Y, Lai N, Gao K, Chen F, Yuan L, Mi G (2013) Ammonium inhibits primary root growth by reducing the length of meristem and elongation zone and decreasing elemental expansion rate in the root apex in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* **8**: 61031.
22. Lowry OH, Rosebough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol regeant. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
23. Marchner H (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2th edition, London, UK, Academic Press.
24. Martínez-Andújar C, Ghanem ME, Albacete A, Pérez-Alfocea F (2013) Response to nitrate/ammonium nutrition of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants overexpressing a prokaryotic NH4 (+)-dependent asparagine synthetase. *Journal of Plant Physiology* **170**: 676-87.
25. Mengel K, Kirkby EA (2001) Principles of plant nutrition. *Annals of Botany* **93**: 479-480.
26. Moran R (1982) Formulae for determination if chlorophyllous pigments extracted with N, N-dimethylformamide. *Plant Physiology* **69**: 1376-1381.
27. Rauf-Khan M, Yaqoob M (1997) Sugar beet by product as a potential source of dietary fiber. *Journal of Chemical Society of Pakistan***19**: 83-84.
28. Rothstein DE, Cregg BM (2005) Effects of nitrogen form on nutrient uptake and physiology of Fraser fir (*Abies fraseri). Forest Ecology and Management* **219**: 69–80.
29. Samar KB, Kate LW, Raymond CF, Masakazu A (1998) Lignin analysis by permanganate oxidation, I. native spruce lignin. *Holzforschung* **52**: 297-303.
30. Santamaria P, Elia A, Papa G, Serio F (1998) Nitrate and ammonium nutrition in chicory and rocket salad plants. *Journal of Plant Nutrition* **21**: 1779-1789.
31. Smolov AP, Semenova GA (2008) Effect of ammonium concentration on protein and chlorophyll contents and the number of ribosomes in the cells of

soybean mixotrophiccallus. *Russian Journal of Plant Physiology* **55**: 359-364.

32. Soltanpanahi S, Kammardi TNP, Ghaderzadeh H (2013) Analysis of input-output energy use in sugar beet production in Iran. *World Applied Sciences Journal* **28**: 1252-1261.

33. Yamasaki S, Noguchi N, Mimaki K (2007) Continuous uv-b irradiation induces morphological changes and the accumulation of polyphenolic compounds on the surface of cucumber cotyledons. *Journal of Radiant Research* **48**: 443-454.

Effect of ammonium as a stress factor in sugar beet, a nitrate-preferring species

Masoomeh Abedini*

Department of Biology, Payame Noor University, Iran

Abstract

Ammonium is an important form of nitrogen for most plant species, but it can be toxic for many others. The mechanisms involved in ammonium stress are still obscure. In the present investigation, the effects of ammonium as the sole nitrogen source on growth parameters, lignin content, development of xylem, activity of peroxidase and concentrations of chlorophyll, soluble proteins and carbohydrates were studied in sugar beet plants in hydroponic culture medium. Results showed that plants growth was strongly influenced by nitrogen form; ammonium as the sole nitrogen source inhibited growth of sugar beet plants. Concentrations of soluble and insoluble carbohydrates were lower, while total soluble proteins and chlorophyll concentrations were higher in ammonium-fed plants compared with nitrate-fed ones. Microscopic studies revealed that ammonium-fed plants had more developed xylem tissues than the nitrate-fed ones. Ammonium treatment increased lignin content via an increased activity of peroxidase. This could result in growth inhibition via reduction of wall extensibility and cell expansion.

Key words: peroxidase, protein,chlorophyll, xylem, nitrate.

* Corresponding author, Email: ms_abedini@pnu.ac.ir