

## پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، لیپیداسیون غشاء و مرگ سلولی ارقام برنج به تنش شوری

محمد رضا مرادی تلاوت، خلیل عالمی سعید، عزیز کرملاجعب\* و حدیث حسونند

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۱۲/۱۵)

### چکیده:

به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، لیپیداسیون غشاء و مرگ سلولی گیاهچه‌ی برخی ارقام برنج شامل آمل ۳، دانیال (LD183)، شفق، فجر و عنبری قرمز تحت سطوح مختلف شوری، آزمایشی آبکشت به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در تابستان ۱۳۹۳ انجام گردید. شوری در سه سطح صفر، ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر، با استفاده از کلرید سدیم اعمال گردید. صفات مورد بررسی شامل پراکسید هیدروژن، مالون‌دی‌آلدئید، کاتالاز، آسکوربیک پراکسیداز، گواپکول پراکسیداز، نشت الکترولیتی، سدیم اندام هوایی و وزن خشک گیاهچه‌ها بود. نتایج نشان داد شوری تأثیر معنی‌داری بر صفات داشت و سبب کاهش وزن خشک گیاهچه‌ها و افزایش سایر صفات مورد بررسی گردید. واکنش ارقام برنج به شوری متفاوت بود، به طوری که در ارقام عنبری قرمز و آمل ۳ فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپید کمتر مشاهده شد. دو رقم مذکور در شرایط بدون شوری دارای کمترین وزن خشک اندام هوایی (به ترتیب ۵/۱۵ و ۵/۵۱ گرم در بوته) بودند ولی در شوری شدید (۸ دسی‌زیمنس بر متر) تفاوت معنی‌داری با سایر ارقام نداشتند. از طرفی بیشترین کاهش در وزن خشک اندام هوایی در بالاترین سطح شوری (۸ دسی‌زیمنس بر متر) در ارقام دانیال (۵۱/۹ درصد) و فجر (۴۹/۴ درصد) دیده شد. بنابراین در شرایط تنش شوری ارقام عنبری قرمز و آمل ۳، فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتر و پراکسید هیدروژن و نشت مواد الکترولیتی کمتری داشتند و کاهش در وزن خشک آنها کمتر بود و بر این اساس، تنش شوری را در مرحله گیاهچه‌ای بهتر تحمل کردند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پراکسیداسیون غشاء سلولی، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، مالون‌دی‌آلدئید.

### مقدمه:

منجر می‌شود. گیاهان برای جلوگیری از خسارت رادیکال‌های آزاد اکسیژن، با یک سری سیستم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی با تنش سازگار می‌شوند (Renu and Devarshi, 2007). الکترون‌هایی که در اثر فلورسانس کلروفیل از زنجیره انتقال الکترون نشت می‌کنند، با اکسیژن درون سلول واکنش داده و گونه‌های فعال اکسیژن، نظیر سوپراکسید ( $O_2^-$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) و اکسیژن را تولید می‌نمایند. این مواد بسیار واکنش‌گر و برای سلول سمی هستند و در صورت عدم کارایی برخی

در زراعت برنج، شوری در شرایط غرقابی و تحت تأثیر انواع و مقادیر مختلفی از نمک‌ها، ایجاد می‌شود. از میان نمک‌ها مقادیر بالای یون سدیم و کلر، باعث کاهش پتانسیل آب، بهم خوردن تعادل یون‌ها یا اختلال در هموستازی یون و سمیت می‌شوند (Hayashi and Murata, 1998). شوری با تأثیر بر تغییرات پتانسیل اسمزی بر محدوده وسیعی از فعالیت‌های متابولیکی گیاهان اثر می‌گذارد و با تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن از قبیل سوپراکسیدها و رادیکال‌های پراکسید هیدروژن به تنش اکسیداتیو

(داداشی و همکاران، ۱۳۸۶). علی‌رغم این‌که گیاهان در میزان تحمل به شوری متفاوت هستند اما در نهایت شوری سبب کاهش رشد آن‌ها خواهد شد. این کاهش به‌طور عمده ناشی از افزایش میزان نشت مواد الکترولیتی سلول و مرگ سلولی است (آذری و همکاران، ۱۳۹۱). پژوهش حاضر با هدف ارزیابی تحمل شوری از نظر سیستم آنتی‌اکسیدانی و لیپیداسیون غشاء سلولی برخی ارقام برنج در حال کشت در خوزستان در مرحله گیاهچه‌ای به اجرا در آمد.

### مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به صورت آبکشتی در اتاقک رشد (درجه حرارت ۲۰ تا ۲۲ در روز و ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد در شب، رطوبت نسبی ۷۵ درصد و ۱۲ ساعت دوره روشنایی)، در تابستان ۱۳۹۳ در دانشگاه کشاورزی و منابع رامین خوزستان به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. شوری در سه سطح بدون تنش، تنش ملایم و تنش شدید (به ترتیب هدایت الکتریکی محلول صفر، ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) با استفاده از نمک کلرید سدیم (مؤمنی و همکاران، ۲۰۱۲) به عنوان فاکتور اول و ارقام مختلف مورد کشت استان خوزستان (آمل ۳، دانیال LD 183)، شفق، فجر، عنبروی قرمز) به‌عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد. در هر گلدان پلاستیکی ۵ لیتری به ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر، سه بوته برنج در شرایط آبکشتی با رژیم نوری ۱۲ ساعته پرورش داده شدند. بذرها، به‌وسیله هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی شدند. سپس در حفره‌های ایجاد شده در یونلیت و روی توری پارچه‌ای استریل روی سطح آب خالص کشت شدند، به‌طوری‌که سطح آب گلدان‌ها، حدود نصف قطر بذرها را فراگرفته بود.

پس از گذشت پنج روز از رشد، یک چهارم غلظت فرمول غذایی Yoshida و همکاران (۱۹۷۶) استفاده شد و با بزرگتر شدن بوته‌ها این غلظت بعد از ۵ روز به یک دوم، سه چهارم و محلول کامل افزایش یافت. تیمار تنش شوری نیز به‌صورت تدریجی حدوداً ۲۵ روز بعد از استقرار گیاهچه‌ها در داخل

سازوکارهای محافظ، اختلال جدی در ساختار و سوخت و ساز گیاه ایجاد می‌کند. این پدیده عمدتاً از طریق اکسیداسیون لیپیدهای غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ایجاد می‌شود (Davies, 1987). رادیکال هیدروکسیل سمی‌ترین شکل فعال احیای ناقص اکسیژن از طریق واکنش هابر-ویس (Haber-Weiss) است که میل ترکیبی شدیدی با ماکرومولکول‌های حیاتی سلول دارد (Yamazaki et al., 2003). گیاهان متحمل به شوری سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی کارآمدتری نسبت به گیاهان حساس دارند. آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربیک پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در عین وزن مولکولی کم خود نقش بسیار مهمی در غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول گیاهان دارند، که بسته به رقم گیاهی و شدت تنش، میزان فعالیت آن‌ها متغیر است (حبیب‌الهی و همکاران، ۱۳۹۱). میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن، بازتابی از شدت تنش در سطح سلولی است و از میزان مالون‌دی‌آلدهید، به عنوان شاخصی برای تعیین میزان خسارت اکسیداتیو استفاده می‌شود (Jain et al., 2001). پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء توسط گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش شوری منجر به خسارت و کاهش شاخص پایداری غشاء می‌گردد (Dhindsa, 2012) تجمع گونه‌های فعال اکسیژن که در طی تنش تولید می‌شوند باعث خسارت به بسیاری از ترکیبات سلولی از جمله DNA، پروتئین، چربی، کلروفیل و از همه مهم‌تر غشاء سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شوند (هاشمی‌نسب و همکاران، ۱۳۹۲). در شرایط تنش شوری تجمع همزمان مالون‌دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن در گیاه و مقادیر بیشتر آن در ارقام حساس در مقایسه با ارقام متحمل به شوری مشاهده شده است (آذری و همکاران، ۱۳۹۱). نتایج تحقیقات Bor و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که فعالیت این آنزیم‌ها در برگ‌های ارقام حساس و متحمل به شوری بسیاری از گونه‌های گیاهی افزایش می‌یابد.

انتخاب رقم‌های متحمل به تنش شوری به دو روش مستقیم (اندازه‌گیری عملکرد) و غیر مستقیم (اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک مرتبط با تحمل تنش) انجام می‌شود

مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام بن‌ماری حرارت داده شد. بعد بلافاصله روی یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ و شدت جذب یک میلی‌لیتر از محلول رویی آن با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد.

**آنزیم کاتالاز:** بر اساس روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج را با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری کاتالاز شامل ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات و ۱۵ میلی‌مول پراکسید هیدروژن مخلوط نموده، سپس جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. یک واحد آنزیمی کاتالاز برابر با تجزیه یک میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در یک دقیقه است.

**آنزیم آسکوربیک پراکسیداز:** بر اساس روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج را با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری آسکوربیک پراکسیداز شامل ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم، ۰/۱ میلی‌مول اتیلن‌دی آمین‌تترا استیک اسید، ۰/۵ میلی‌مولار اسید آسکوربیک و ۰/۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن مخلوط نموده، سپس جذب آن در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت گردید.

**آنزیم پراکسیداز:** بر اساس روش Maehly و Chance (۱۹۹۵) میزان اکسید شدن گایاکول توسط این آنزیم اندازه‌گیری شد. در این روش ۳۳ میکرولیتر از عصاره استخراج را با یک میلی‌لیتر از محلول پراکسیداز شامل ۱۳ میلی‌مولار گویاکول، ۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات، مخلوط و جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر، قرائت گردید.

**میزان نشت الکترولیتی:** یک گرم برگ در داخل ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده و بعد از مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد میزان هدایت الکتریکی آن به کمک دستگاه هدایت الکتریکی سنج قرائت گردید (C<sub>1</sub>). سپس نمونه را به مدت ۲۰ دقیقه داخل اتوکلاو با دمای ۱۰۰ درجه قرار داده و برای با دوم هدایت الکتریکی آن قرائت (C<sub>2</sub>)، و با تقسیم C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> میزان نشت الکترولیتی تعیین شد.

**غلظت سدیم:** جهت اندازه‌گیری غلظت یون سدیم در اندام

ظروف، اعمال گردید تا گیاهچه‌ها فرصت تطابق با محیط شور را پیدا کنند. محلول‌دهی و تعویض آب گلدان‌ها هر هفته یک-بار و همراه با تیمار تنش شوری با تنظیم هدایت الکتریکی محلول صورت گرفت. آب تبخیر و تعرق شده نیز با محلول‌های آماده به‌صورت روزانه جایگزین می‌گردید. دمای روزانه ۲۶-۲۴ و شبانه ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد تنظیم گردید. گیاهان بعد از گذشت ۳۵ روز از کشت در مرحله پنجه‌زنی (مصادف با مرحله بعد از انتقال نشاء) برداشت شدند (Liang, 1999).

صفات وزن خشک اندام هوایی، یون سدیم، فعالیت آنزیم‌ها و لیپیداسیون غشاء سلولی اندازه‌گیری شدند. برای این منظور تعداد سه برگ سبز توسعه یافته بالایی برداشت و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج آنزیم‌ها، نیم گرم برگ فریز شده را با سه میلی‌لیتر بافر فسفات شامل یک میلی‌مولار سدیم متابای و یک درصد پیل‌ونیل‌پیروبیدین-۴۰ کاملاً هم‌زده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ نموده و از محلول رویی برای قرائت فعالیت آنزیم‌ها به‌روش زیر استفاده شد:

**پراکسید هیدروژن:** طبق روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) مقدار ۰/۲۵ برگ برنج در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد سائیده و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار و ۵۰۰ میکرولیتر یدید پتاسیم یک مولار مخلوط کرده و جذب آن در ۳۹۰ نانومتر قرائت شد.

**مالون‌دی‌آلدهید:** بر اساس روش Heath و Packer (۱۹۶۹) تجمع مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان میزان لیپیداسیون غشاء مورد سنجش قرار گرفت. طبق این روش ۰/۲۵ گرم برگ برنج در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ و سپس ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی با یک میلی‌لیتر محلول مالون‌دی‌آلدهید حاوی تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد و تیوباریتوریک اسید ۰/۵ درصد، مخلوط گردید.

در حالی که، در ارقام شفق (۹۸ درصد)، دانیال (۹۰ درصد) و فجر (۶۳ درصد) افزایش معنی‌دار بود. وجود اثر متقابل بین رقم و تنش نشان می‌دهد که تنش شوری در ارقام مختلف برنج، سیستم‌های کنترل‌کننده خسارت به سلول را به‌طور متفاوتی تحت تأثیر قرار می‌دهد و ارقام متحمل مانند آمل ۳ و عنبوری قرمز با استفاده از سیستم‌های ژنتیکی کارآمدتری قادر هستند خسارت شوری به سلول‌های خود را کاهش بدهند.

در شرایط بدون تنش شوری و شوری ۴ دسی‌زیمنس بر متر تفاوت معنی‌داری بین میزان کاتالاز ارقام مورد بررسی مشاهده نشد (جدول ۲). به‌طوری‌که، فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط بدون حضور نمک کلریدسدیم، ۲۳ واحد جذب به ازای هر گرم پروتئین، و در شرایط شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب ۲۵ و ۶۸ درصد افزایش نشان داد. از آنجا که کاتالاز با حذف پراکسیدهایروژن نقش مؤثری در تحمل به خشکی و شوری دارد فعالیت بیشتر این آنزیم می‌تواند نشان دهنده تحمل بیشتر رقم باشد (امجد و همکاران، ۲۰۱۱). واکنش متفاوت آنزیم کاتالاز ارقام مختلف نسبت به تنش شوری می‌تواند ناشی از تفاوت مکانیزم‌های ژنتیکی پاسخ ارقام باشد، به‌طوری‌که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش شوری شدید، از ارقام آمل ۳ و عنبوری قرمز به‌دست آمد (جدول ۳). این آنزیم، تجزیه پراکسیدهایروژن تولید شده طی تنفس نوری در پراکسی‌زوم‌ها یا طی بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب در گلی‌اکسی‌زوم‌ها را بر عهده دارد و باعث سازش گیاه برای غلبه بر آسیب‌های ناشی از سطوح سمی و احیاکننده پراکسیدهایروژن می‌شود (رهنما و همکاران، ۱۳۹۰).

تنش شوری باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آسکوربیک‌پراکسیداز شد. این افزایش در ارقام فجر، شفق و دانیال به صورت خطی و در عنبوری قرمز بسیار شدید و به ازای هر دسی‌زیمنس بر متر ۲/۲۷ واحد جذب به ازای هر گرم پروتئین وزن تر برگ بود، ولی رقم آمل ۳، تا شوری ۴ دسی‌زیمنس بر متر افزایش نشان نداد و هنگامی که شوری به ۸ دسی‌زیمنس بر متر رسید به یکباره فعالیت آنزیم آن به بالاترین مقدار در بین ارقام مورد بررسی رسید (جدول ۳).

هوایی گیاه از روش خاکستر خشک با اسیدکلریدریک استفاده گردید که در نهایت غلظت آن توسط دستگاه فلیم فتومتر (Jenway, PFP-7) قرائت و محاسبه شد.

پس از انجام آزمون نرمال بودن داده‌ها، کلیه تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم افزار SAS v 9.2 انجام گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد استفاده گردید.

### نتایج و بحث:

تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد تنش شوری، تمامی صفات مورد بررسی را تحت تأثیر قرار داده است. همچنین صفات پراکسیدهایروژن، مالون‌دی‌آلدئید، گویکول پراکسیداز، نشأت الکترولیتی، سدیم اندام هوایی و وزن خشک گیاهچه‌ها تحت تأثیر اثر ساده رقم قرار گرفته‌اند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت مکانیسم‌های سلولی پاسخ دهنده به شوری سبب تغییر صفات مورد بررسی در گیاه برنج می‌شوند.

**فعالیت آنزیمی:** نتایج برش‌دهی (جدول ۲) نشان داد که در شرایط بدون تنش، تفاوت معنی‌داری بین میزان پراکسیدهایروژن ارقام مختلف وجود نداشت، اما در شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر بین ارقام مورد بررسی از این نظر اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. به طوری‌که ارقام عنبوری قرمز و آمل ۳ توانستند میزان آن را بین ۶/۵ الی ۷/۷ نگه‌دارند، در حالی که در سایر ارقام، شوری به‌شدت میزان آن را افزایش داده و به ۱۴/۵ تا ۲۰/۲ میکرومول بر گرم وزن تر برگ برساند. (جدول ۳). همان‌طور که Sarvajeet و Narendra (۲۰۱۰) در مورد گندم نیز گزارش کردند، میزان تجمع رادیکال آزاد اکسیژن، حساسیت رقم به تنش شوری را نشان می‌دهد و پایین بودن میزان پراکسیدهایروژن در ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس دلیل آن است. نتایج جدول ۳ نشان داد که افزایش شوری با افزایش در اکسیداسیون چربی‌های غشاء سلولی، محتوی مالون‌دی‌آلدئید در برگ را افزایش داده ولی شدت این افزایش در ارقام آمل ۳ و عنبوری قرمز در مقایسه با سایر ارقام کمتر و غیر معنی‌دار و به‌ترتیب در حدود ۲۸ و ۲۹ درصد بود،

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی گیاهچه‌های ارقام مختلف برنج تحت تیمار تنش شوری

| میانگین مربعات   |            |                      |                      |                      |                       |                       |                      |                        |                     |
|------------------|------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|---------------------|
| منابع تغییرات    | درجه آزادی | پراکسید هیدروژن      | مالون دی‌آلدئید      | کاتالاز              | آسکوربیک پراکسیداز    | گوایکول پراکسیداز     | نشست الکترولیتی      | سدیم اندام هوایی       | وزن خشک اندام هوایی |
| بلوک             | ۲          | ۱/۵۰ <sup>ns</sup>   | ۴/۸۰ <sup>ns</sup>   | ۱۸/۵۶ <sup>ns</sup>  | ۱۲/۴۸ <sup>ns</sup>   | ۳۰/۹۰ <sup>ns</sup>   | ۱۹/۹۵ <sup>ns</sup>  | ۳۵۷/۵۳ <sup>*</sup>    | ۰/۱۷ <sup>ns</sup>  |
| تنش شوری         | ۲          | ۱۹۴/۴۲ <sup>**</sup> | ۱۸۳/۰۷ <sup>**</sup> | ۹۱۹/۲۶ <sup>**</sup> | ۱۰۶۸/۵۲ <sup>**</sup> | ۲۰۰۷/۸۱ <sup>**</sup> | ۵۱۳/۸۸ <sup>**</sup> | ۱۴۱۲۶/۴۱ <sup>**</sup> | ۲۸/۵۲ <sup>**</sup> |
| رقم              | ۴          | ۱۲۱/۷۰ <sup>**</sup> | ۴۶/۶۰ <sup>**</sup>  | ۲۶/۸۸ <sup>ns</sup>  | ۱۲/۱۱ <sup>ns</sup>   | ۳۷۰/۲۴ <sup>**</sup>  | ۹۴/۲۱ <sup>**</sup>  | ۴۱۹/۰۳ <sup>**</sup>   | ۱/۰۲ <sup>*</sup>   |
| رقم * شوری       | ۸          | ۲۰/۱۹ <sup>*</sup>   | ۱۱/۹۵ <sup>*</sup>   | ۳۵/۳۰ <sup>*</sup>   | ۳۰/۹۷ <sup>*</sup>    | ۲۸/۷۴ <sup>ns</sup>   | ۹/۷۱ <sup>ns</sup>   | ۱۰۹/۰۱ <sup>ns</sup>   | ۰/۷۲ <sup>*</sup>   |
| خطای آزمایشی     | ۲۸         | ۵/۳۲                 | ۴/۱۳                 | ۱۱/۳۹                | ۱۰/۴۸                 | ۴۱/۲۶                 | ۱۱/۳۹                | ۷۸/۲۷                  | ۰/۲۸                |
| ضریب تغییرات (%) |            | ۲۴/۴۶                | ۱۳/۹۰                | ۱۱/۱۸                | ۳/۲۰                  | ۱۰/۸۶                 | ۹/۶۵                 | ۲۱/۰۲                  | ۷/۵۹                |

\* و \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد و ns غیر معنی‌دار.

جدول ۲- برش‌دهی اثر تیمارها در سطوح تنش شوری بر برخی صفات مورد بررسی ارقام برنج

| تنش شوری                          | درجه آزادی | پراکسید هیدروژن     | مالون دی‌آلدئید    | کاتالاز            | آسکوربیک پراکسیداز | وزن خشک اندام هوایی |
|-----------------------------------|------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| بدون تنش (۰ dS.m <sup>-1</sup> )  | ۴          | ۷/۹ <sup>na</sup>   | ۰/۶ <sup>na</sup>  | ۱۴/۱ <sup>na</sup> | ۱۰/۹ <sup>na</sup> | ۱/۹۶ <sup>**</sup>  |
| تنش ملایم (۴ dS.m <sup>-1</sup> ) | ۴          | ۴۳/۸ <sup>**</sup>  | ۲۲/۶ <sup>**</sup> | ۱۹/۹ <sup>na</sup> | ۲۵/۱ <sup>*</sup>  | ۰/۴۱ <sup>ns</sup>  |
| تنش شدید (۸ dS.m <sup>-1</sup> )  | ۴          | ۱۱۰/۳ <sup>**</sup> | ۴۷/۳ <sup>**</sup> | ۶۳/۴ <sup>**</sup> | ۳۸/۰ <sup>*</sup>  | ۰/۰۹ <sup>ns</sup>  |

\* و \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال خطای پنج و یک درصد و ns غیر معنی‌دار.

مختلفی در لوکوس‌های کنترل کننده این سیستم‌ها است. پراکسیدازهای گیاهی در تمامی گیاهان عالی گسترش دارند و نقش مهمی در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول دارند. آنزیم گوایکول پراکسیداز یکی از آنزیم‌های اکسید کننده ترکیبات فنلی بوده و نقش مهمی در افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول دارد (مؤمنی و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۴) نشان داد که فعالیت این آنزیم در شرایط بدون تنش شوری حدود ۵۱ واحد جذب به ازای هر گرم پروتئین وزن تر برگ بود که در شرایط شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب ۶/۴ و ۴۲ درصد افزایش نشان داد. از طرفی ارقام امل ۳ و فجر دارای بیشترین فعالیت این آنزیم نسبت به سایر ارقام مورد مطالعه است. با توجه به نقش آنزیم پراکسیداز در کاهش یا مهار اتواکسیداسیون لیپیدها، جاروب کردن رادیکال‌های

سکوربیک پراکسیداز با کمک اسیدآسکوربیک باعث حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود، همچنین این آنزیم در چرخه گلوکاتایون-آسکوربات با استفاده از آسکوربیک به عنوان دهنده الکترون باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌گردد (رهنما و همکاران، ۱۳۹۰)، به علاوه، این آنزیم با استفاده از مواد فنولیک به عنوان دهنده الکترون باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌گردد. همان‌طور که Moradi و Abdelbaghi (۲۰۰۷) نیز گزارش کردند میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک پراکسیداز حدود ۳ برابر کاتالاز است، لذا می‌توان گفت فعالیت آن در مقایسه با کاتالاز، در تحمل به شوری از اهمیت بیشتری برخوردار است. همچنین این پژوهشگران بیان داشتند که واکنش متفاوت ارقام از نظر این آنزیم‌ها نشان می‌دهد سیستم‌های تنظیم تولید آن آنزیم‌ها تحت کنترل آل‌های

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی بر برخی صفات مورد بررسی ارقام برنج

| تنش شوری                              | ارقام برنج   | پراکسید هیدروژن     | مالون دی آلدئید    | کاتالاز                        | آسکوربیک پراکسیداز  | وزن خشک اندام هوایی      |
|---------------------------------------|--------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------|
|                                       |              |                     |                    | (U.g <sup>-1</sup> Protein FW) |                     | (g.plant <sup>-1</sup> ) |
| بدون تنش<br>(۰/۱ dS.m <sup>-1</sup> ) | آمل ۳        | ۴/۷۲ <sup>a</sup>   | ۱۰/۹۰ <sup>a</sup> | ۲۵/۵۶ <sup>a</sup>             | ۹۴/۷۰ <sup>a</sup>  | ۵/۵۱ <sup>b</sup>        |
|                                       | دانیال       | ۷/۴۶ <sup>a</sup>   | ۱۱/۲۰ <sup>a</sup> | ۲۰/۴۶ <sup>a</sup>             | ۹۰/۴۷ <sup>a</sup>  | ۶/۷۷ <sup>a</sup>        |
|                                       | شفق          | ۷/۲۳ <sup>a</sup>   | ۱۱/۳۰ <sup>a</sup> | ۲۴/۰۳ <sup>a</sup>             | ۹۵/۰۳ <sup>a</sup>  | ۶/۴۹ <sup>a</sup>        |
|                                       | فجر          | ۷/۴۳ <sup>a</sup>   | ۱۲/۰۰ <sup>a</sup> | ۲۱/۹۳ <sup>a</sup>             | ۹۱/۹۳ <sup>a</sup>  | ۷/۰۰ <sup>a</sup>        |
|                                       | عنبروری قرمز | ۴/۱۵ <sup>a</sup>   | ۱۰/۹۳ <sup>a</sup> | ۲۲/۲۳ <sup>a</sup>             | ۹۳/۰۶ <sup>a</sup>  | ۵/۱۵ <sup>b</sup>        |
| تنش ملایم<br>(۴ dS.m <sup>-1</sup> )  | آمل ۳        | ۵/۹۹ <sup>c</sup>   | ۱۰/۹۷ <sup>b</sup> | ۲۸/۳۰ <sup>a</sup>             | ۹۴/۹۷ <sup>b</sup>  | ۴/۹۰ <sup>a</sup>        |
|                                       | دانیال       | ۱۴/۶۲ <sup>a</sup>  | ۱۷/۲۷ <sup>a</sup> | ۲۹/۶۳ <sup>a</sup>             | ۹۹/۶۳ <sup>a</sup>  | ۵/۸۰ <sup>a</sup>        |
|                                       | شفق          | ۷/۸۷ <sup>bc</sup>  | ۱۵/۲۳ <sup>a</sup> | ۳۱/۰۰ <sup>a</sup>             | ۱۰۲/۳۳ <sup>a</sup> | ۵/۸۹ <sup>a</sup>        |
|                                       | فجر          | ۱۰/۳۴ <sup>b</sup>  | ۱۶/۳۷ <sup>a</sup> | ۳۰/۹۳ <sup>a</sup>             | ۱۰۰/۹۳ <sup>a</sup> | ۵/۴۵ <sup>a</sup>        |
|                                       | عنبروری قرمز | ۵/۱۴ <sup>c</sup>   | ۱۲/۰۳ <sup>b</sup> | ۲۴/۷۷ <sup>a</sup>             | ۱۰۱/۳۳ <sup>a</sup> | ۵/۰۷ <sup>a</sup>        |
| تنش شدید<br>(۸ dS.m <sup>-1</sup> )   | آمل ۳        | ۷/۶۷ <sup>c</sup>   | ۱۳/۹۷ <sup>b</sup> | ۴۳/۶۷ <sup>a</sup>             | ۱۱۴/۳۴ <sup>a</sup> | ۳/۵۶ <sup>a</sup>        |
|                                       | دانیال       | ۲۰/۲۰ <sup>a</sup>  | ۲۱/۲۳ <sup>a</sup> | ۳۴/۲۷ <sup>b</sup>             | ۱۱۰/۶۰ <sup>a</sup> | ۳/۲۴ <sup>a</sup>        |
|                                       | شفق          | ۱۷/۷۶ <sup>ab</sup> | ۲۲/۳۷ <sup>a</sup> | ۳۷/۷۳ <sup>b</sup>             | ۱۰۸/۳۷ <sup>b</sup> | ۳/۴۱ <sup>a</sup>        |
|                                       | فجر          | ۱۴/۴۶ <sup>b</sup>  | ۱۹/۵۳ <sup>a</sup> | ۳۴/۱۰ <sup>b</sup>             | ۱۰۴/۷۳ <sup>b</sup> | ۳/۵۴ <sup>a</sup>        |
|                                       | عنبروری قرمز | ۶/۴۹ <sup>c</sup>   | ۱۴/۱۰ <sup>b</sup> | ۴۳/۲۰ <sup>a</sup>             | ۱۱۱/۰۳ <sup>a</sup> | ۳/۷۱ <sup>a</sup>        |
| LSD                                   |              | ۳/۸۶                | ۳/۴۰               | ۵/۶۴                           | ۵/۴۱                | ۰/۸۹                     |

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر سطح تنش برای هر صفت تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر ندارند

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سطوح مختلف تنش شوری و ارقام مختلف بر برخی صفات فیزیولوژیکی مورد بررسی برنج

| تیمارها                        | سطوح         | گوایکول پراکسیداز<br>(U.g <sup>-1</sup> Protein FW) | نشت الکترولیتی<br>(%) | سدیم اندام هوایی<br>(mg.g <sup>-1</sup> DW) |
|--------------------------------|--------------|---|-----------------------|---|
| تنش شوری<br>(دسی‌زیمنس بر متر) | ۰            | ۵۰/۹۳ <sup>b</sup>                                  | ۲۹/۴۲ <sup>c</sup>    | ۱۰/۴۳ <sup>c</sup>                          |
|                                | ۴            | ۵۴/۱۸ <sup>b</sup>                                  | ۳۴/۴۲ <sup>b</sup>    | ۴۴/۱۵ <sup>b</sup>                          |
|                                | ۸            | ۷۲/۳۹ <sup>a</sup>                                  | ۴۱/۰۹ <sup>a</sup>    | ۷۱/۷۰ <sup>a</sup>                          |
| ارقام برنج                     | آمل ۳        | ۶۵/۱۲ <sup>a</sup>                                  | ۳۲/۷۳ <sup>bc</sup>   | ۳۴/۱۸ <sup>c</sup>                          |
|                                | دانیال       | ۵۲/۰۴ <sup>b</sup>                                  | ۳۸/۳۰ <sup>a</sup>    | ۴۸/۸۶ <sup>a</sup>                          |
|                                | شفق          | ۵۸/۱۵ <sup>b</sup>                                  | ۳۷/۵۷ <sup>a</sup>    | ۴۷/۷۴ <sup>a</sup>                          |
|                                | فجر          | ۵۴/۱۳ <sup>b</sup>                                  | ۳۵/۶۲ <sup>ab</sup>   | ۴۴/۰۷ <sup>ab</sup>                         |
|                                | عنبروری قرمز | ۶۶/۳۸ <sup>a</sup>                                  | ۳۰/۶۵ <sup>c</sup>    | ۳۵/۶۲ <sup>bc</sup>                         |
| میانگین                        |              | ۵۹/۲  | ۳۵/۰                  | ۴۲/۱  |

میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر ندارند

تکثیر و پیشروی زنجیره اکسیداتیو و دفاع در برابر گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کنند (مؤمنی و همکاران، ۱۳۹۲).

آزاد، خاموش کردن اکسیژن اتمی یا تجزیه پراکسیدها، این آنزیم به عنوان آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت در برابر

برگ و کاهش فعالیت فتوسنتزی و در نهایت میزان آسیمیلایسیون کربن و تولید شود (Husain et al., 2004).  
تنها در شرایط بدون تنش شوری بین ارقام مختلف از نظر وزن خشک اندام هوایی تفاوت معنی‌دار بود. به طوری که ارقام عنبوری قرمز و آمل ۳ دارای حداقل وزن خشک اندام هوایی بودند (جدول ۲). با افزایش سطوح تنش شوری، وزن خشک تمام ارقام مورد بررسی کاهش یافت. ارقام آمل ۳ و عنبوری قرمز از جمله ارقام دارای ارتفاع کم و دوره رشد نسبتاً طولانی هستند، به همین دلیل رشد اولیه آن‌ها کند و تولید ماده خشک کمتر بود. بنابراین، در شرایط بدون تنش شوری دارای کمترین وزن خشک اندام هوایی بودند. با این وجود، به دلیل دارا بودن سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمد و لیپیداسیون غشاء سلولی پایین‌تر، وزن خشک آن‌ها در شرایط تنش شوری نسبت به سایر ارقام کاهش کمتری یافت و حتی در شرایط شوری شدید ماده خشک تولید آن‌ها با سایر ارقام تفاوتی نداشت (جدول ۳). این امر نشان می‌دهد ژنتیک دو رقم، آن‌ها را قادر ساخته تا بهتر بتوانند در شرایط تنش شوری وزن خشک خورد را حفظ نمایند.

#### نتیجه‌گیری:

اگر چه تأثیر مخرب شوری بر نشت الکترولیتی و سدیم اندام هوایی ارقام برنج یکسان بود ولی کاهش وزن اندام هوایی آن‌ها به‌علت کنترل متفاوت تولید پراکسید هیدروژن و تخریب غشای ناشی از آن متفاوت بود. احتمالاً آنزیم گایاکول اکسیداز با توجه به نقش آن در اکسیداسیون ترکیبات فنلی در تحمل برنج نقش کمی برعهده دارد، در حالی که آنزیم کاتالاز و آسکوربیک پراکسیداز با توجه به نقش آن‌ها در حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش اصلی را در تحمل برنج به تنش شوری دارند و ارقام برنج دارای مکانیزم‌های متفاوتی برای جلوگیری از نقش آن‌ها در اختیار دارند، به طوری که ارقام آمل ۳ و مخصوصاً عنبوری قرمز که بومی مناطق جنوبی عراق و ایران است از مکانیزم تنظیمی کارآمدتری نسبت به ارقام حساس دانیال، شفق و فجر هستند. شناسایی الگوی کنترل

**نشت الکترولیتی:** شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر باعث افزایش به ترتیب ۱۴ و ۲۸ درصدی میزان نشت الکترولیتی نسبت به تیمار بدون شوری شد. تیمار تنش شوری سبب کاهش یکپارچگی غشای سلولی و آزاد شدن الکترولیت‌ها و مواد درون سلول گردید. این نتایج با یافته‌های رهنما و همکاران (۱۳۹۰) و آذری و همکاران (۱۳۹۱) مطابقت دارد. بیشترین و کمترین میزان نشت الکترولیتی به ترتیب در ارقام دانیال (۳۸/۳ درصد) و عنبوری قرمز (۳۰/۶ درصد) حاصل گردید (جدول ۴). همچنین با نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید این آزمایش رابطه مثبت دارد و این می‌تواند نشان دهنده مؤثر بودن اندازه‌گیری لیپیداسیون غشاء سلولی در تخمین میزان مرگ سلول باشد. مطالعات نشان می‌دهد که اسید چرب‌های غیراشباع موجود در غشاء سلولی در سیالیت آن بسیار مهم است و تنش شوری باعث تغییر سیالیت غشاء و به دنبال افزایش آن نشت یونی می‌گردد. گیاهان و ارقام بومی مناطق گرم با داشتن اسیدهای چرب اشباع بیشتر در غشاء خود، قادر به تحمل بیشتر تنش‌های مخرب غشاء سلول هستند (Taiz and Zeiger., 2010). به‌علاوه، گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط تنش می‌توانند با اسیدهای چرب واکنش دهند و سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و مرگ سلول شوند (Mahajan, and Tuteja., 2005).

**سدیم و وزن خشک اندام هوایی:** نتایج، یک روند افزایشی در غلظت یون سدیم تحت تأثیر شوری را نشان دادند. به طوری که غلظت یون سدیم در شرایط بدون تنش شوری در اندام هوایی گیاه ۱۰/۴ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بود، و در شرایط تنش ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب ۳۲۳ و ۵۸۷ درصد افزایش پیدا کرد. همچنین ارقام مختلف مقدار یون سدیم متفاوتی جذب کردند. بیشترین غلظت یون سدیم در ارقام دانیال، شفق و فجر و کمترین آن در ارقام آمل ۳ و عنبوری قرمز مشاهده گردید (جدول ۴). مقادیر بالای یون سدیم ارتباط مستقیم با لیپیداسیون غشاء سلولی و ارتباط عکس با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارد. به‌همین علت وجود مقادیر زیاد سدیم در گیاه می‌تواند سبب پیری زودرس

کننده این ارقام می‌تواند در اصلاح برنج‌های متحمل به شوری بالا مفید باشد. از سوی دیگر با توجه به اینکه رقم عبوری قرمز توده است، نتایج بالا متوسط آن را نشان می‌دهد. بنابراین

شاید بتوان در میان لاین‌های تشکیل دهنده آن، لاین‌های متحمل‌تری به تنش شوری را نیز غربال کرد.

#### منابع:

- آذری، آ.، مدرس‌ثانوی، ع. م.، عسکری، ح.، قناتی، ف.، ناجی، ا. م. و عزیزاده، ب. (۱۳۹۱) اثر تنش شوری بر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک دو گونه کلزا و شلغم روغنی (*Brassica napus* and *B. rapa*). مجله علوم زراعی ایران ۱۴: ۱۲۱-۱۳۵.
- حبیب‌الهی، ن.، مهدیه، م. و انیرجانی، م. ر. (۱۳۹۱) اثر تنش شوری بر رشد، پرولین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کارایی فتوسیستم II در ارقام حساس و مقاوم برنج، زیست‌شناسی گیاهی ایران ۴: ۸۵-۹۶.
- داداشی، م. ر.، مجیدی هراوان، ا.، سلطانی، ا. و نوری‌نیا، ع. (۱۳۸۶) ارزیابی واکنش لاین‌های مختلف جو به تنش شوری، مجله علوم کشاورزی ۱۳: ۱۸۱-۱۹۱.
- راهنما، ا.، پوستینی، ک.، توکل افشار، ر. و رسول‌نیا، ع. (۱۳۹۰) بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون چربی‌ها در برگ پرچم ارقام حساس و متحمل گندم به شوری، مجله علوم گیاهان زراعی ایران ۴۲: ۳۷۱-۳۵۹.
- مؤمنی، ن.، آروین، م. ج.، خواجه‌نژاد، غ.، کرامت، ب. و دانشمند، ب. (۱۳۹۲) اثر کلریدسدیم و سالیسیلیک اسید بر برخی شاخص‌های فتوسنتزی و تغذیه معدنی گیاه ذرت (*Zea mays* L.)، زیست‌شناسی گیاهی ۵: ۲۹-۱۵.
- هاشمی‌نسب، ح.، آساد، م. ت. و امام، ی. (۱۳۹۲). تأثیر تنش خشکی بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و صفات مرتبط با مرگ سلولی در مرحله پر شدن دانه در ارقام مقاوم و حساس گندم، مجله تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی ۳: ۱۳-۱.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environment* 4: 1337-1344.
- Amjad, H., Noreen, B., Javed, A. and Nayyer, I. (2011) Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 178-185.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1995) *Assay of Catalase and Peroxidase*. Academic Press, New York. pp: 173-189.
- Davies, K. J. A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *Journal of Biology and Chemistry* 262: 9895-9901.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T. A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 32: 93-101.
- Hayashi, H. and Murata, N. (1998) Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. *Molecular Mechanisms and Molecular Regulation*. Elsevier Amsterdam, pp: 133-148.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Husain, S., Caemmerer, S. and Munns, R. (2004) Control of salt transport from roots to shoots of wheat in saline soil. *Functional Plant Biology* 31: 1115-1126.
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S. and Sarin, N. B. (2001) Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Plant Cell Republic* 20: 463-468.
- Liang, Y. (1999) Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barely under dry stress. *Plant and Soil* 209: 217-224.
- Mahajan, S. h. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stress: An Overveiw. *Journal of Biochemistry and Biophysics* 446: 139-158.
- Momeni, N., Arvin, M. J., Khagoei nejad, G. R., Daneshmand, F. and Keramat, B. 2012. The effect of sodium chloride and salicylic acid on antioxidant defense system in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Biology* 4: 23-35.
- Moradi, F. and Abdelbaghi, M. I. (2007) Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany* 99, 1161-1173.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.



- Renu, K. C. and Devarshi, S. (2007) Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought resistant than susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany* 60 : 276–283.
- Sarvajeet, S. G. and Narendra, T. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in a biotic stress tolerance in crop plants. *Annual Review. Plant Physiology and Biochemistry* 3: 1-22.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2010) *Plant physiology* (6th Ed.). Sinauer Associates, p: 782.
- Yamazaki, J., Ohashi, A., Hashimoto, Y., Negishi, E., Kumagai, S., Kubo, T., Oikawa, T., Maruta, E. and Kamimura, Y. (2003) Effects of high light and low temperature during harsh winter on needle photodamage of *Adies mariesii* growing at the forest limit on Mt. Norikura in Central Japan. *Plant Science* 165: 257-264.
- Yoshida, S., Forno, D. A., Cock, J. H. and Gomez, K. A. (1976) *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. IRRI, Los Banos, Phillipine. pp: 34- 46.

