

ارزیابی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نسل ششم لاین‌های موتانت برنج (*Oryza sativa* L.) تحت تنش شوری

سیده رقیه قدیرنژاد شیاده^۱، محمدعلی اسماعیلی^{۲*}، همت‌اله پیردشتی^۲، قربانعلی نعمت‌زاده^۳
^۱ گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران، ^۲ گروه اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی
طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۲/۱۱)

چکیده

به‌منظور ارزیابی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نسل ششم لاین‌های موتانت متحمل برنج تحت تنش شوری، آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. فاکتور اصلی آزمایش شامل تنش شوری در سه سطح (صفر، ۴۵ و ۷۵ میلی‌مولار بر لیتر NaCl) و فاکتور فرعی شامل پنج لاین موتانت برنج بومی طارم هاشمی ۱، طارم هاشمی ۲، طارم هاشمی ۳، طارم چالوسی و اصلاح‌شده نعمت بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر متقابل شوری و لاین‌ها بر صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود. یافته‌های حاصل از پژوهش نشان داد که لاین نعمت در مقایسه با سایر لاین‌ها، در تمام سطوح شوری بیشترین مقدار وزن خشک بوته و پرولین را داشته که با کاهش میزان فعالیت پروتئین در این لاین همراه بود. مقدار فعالیت کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در لاین نعمت در شرایط تنش بالا بوده و مقدار تولید مالون دی‌آلدید و نشت یونی کمتری نیز داشت. با توجه به وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار بین وزن خشک لاین‌های برنج با مقدار پرولین ($r=0.33^*$)، کاتالاز ($r=0.49^{**}$)، و گایاکول پراکسیداز ($r=0.51^{**}$) و همبستگی منفی بین وزن خشک و مقدار پروتئین ($r=-0.29^*$) و مالون دی‌آلدید ($r=-0.33^*$) به‌نظر می‌رسد می‌توان موتانت نعمت را به‌عنوان متحمل‌ترین لاین معرفی نمود. از آنجایی که سازوکار مقاومت این لاین، تنظیم اسمزی و افزایش مقدار اسید آمینه پرولین از طریق تجزیه پروتئین و سیستم آنزیمی کاتالاز است؛ بنابراین، می‌توان صفات مذکور را به‌عنوان سازوکارهای پایه برای تحمل به شوری در نظر گرفت تا بدین وسیله بتوان یکی از راهکارهای مناسب جهت بهره‌برداری و افزایش عملکرد در هکتار در مزارع شور را محقق ساخت.

کلمات کلیدی: تنش شوری، صفات بیوشیمیایی، صفات فیزیولوژیکی، لاین موتانت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، همبستگی

مقدمه

زیر کشت آن بیش از ۶۰۰۰۰۰ هکتار برآورد شده است (FAO, 2014). مهم‌ترین مناطق کاشت برنج کشور در درجه اول استان‌های گیلان و مازندران است که حدود ۸۰ تا ۸۵ درصد محصول برنج کشور را تأمین می‌نمایند (خدابنده، ۱۳۹۱). شوری یکی از عمده‌ترین عوامل تنش‌غیرزیستی در تولید گیاهان زراعی محسوب شده و در حال حاضر بیش از

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهم‌ترین غلات در سراسر دنیا به‌ویژه در آسیا محسوب می‌شود و در حال حاضر یک سوم از منابع کربوهیدراتی لازم را فراهم نموده (Kibria et al., 2017) و عمدتاً برای مصارف انسانی کاربرد دارد (Nasin et al., 2014). کشت برنج در ایران اهمیت ویژه‌ای داشته و سطح

می‌گردند که در نهایت منجر به کاهش سیالیت و نفوذپذیری غشا می‌شود (Abdallah and Abdelgawad, 2016; Noppawan *et al.*, 2016). تخریب پروتئین و تجمع برخی آمینواسیدهای حاصل از آن می‌تواند به صورت سیستمی جهت حفظ و تنظیم فشار اسمزی در شرایط تنش عمل کند (Reddy *et al.*, 2017).

گیاهان در پاسخ به تنش شوری دارای سازوکارهای سمیت زدایی آنزیمی (کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و انواع پراکسیدازها) و غیر آنزیمی (اعم از ترکیبات فنولیکی، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها) در جهت تعدیل اثرات اکسیداتیو گونه‌های فعال اکسیژن هستند (Sairam *et al.*, 2002; Munns, 2002). اثبات شده است ارقام برنج متحمل به شوری دارای انواعی از سازوکارهای حفاظتی هستند که در طی تنش منجر به حفظ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردند (Hoang *et al.*, 2016). کارتنوئیدها می‌توانند چندین نقش را در گیاه ایفا کنند، آنها در سازوکارهای دفاعی تنش اکسیداتیو نقش داشته و فعالیت ضدتخریبی و ضداکسایشی برای حفاظت از کلروفیل دارند (Grace and Logan, 2000). در تحقیقی فرهودی و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند که تنش شوری سبب تخریب غشای سلولی برگ برنج شده و بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ارقام متحمل مشاهده گردید. با توجه به مشاهدات Kibria و همکاران (۲۰۱۷)، ارقام متحمل برنج در مقابل شوری مقدار بیشتری کلروفیل، پرولین و کاتالاز دارند. در مطالعه Sairam و همکاران (۲۰۰۲) افزایش مقدار واکنش آنتی‌اکسیدانی گیاه ارتباط مثبتی با کاهش میزان خسارت اکسیداتیو و بهبود توانایی گیاه برای تحمل در برابر تنش گزارش شد. در مطالعات Kibria و همکاران (۲۰۱۷) وجود همبستگی مثبت بین تجمع مقدار پرولین و میزان تحمل گیاه نسبت به تنش مشاهده شده است. القای جهش به وسیله موتاژن‌ها یکی از راه‌های ایجاد تنوع ژنتیکی است. از آنجا که تنوع در سطح گونه‌های گیاهی به دلیل تشدید فعالیت‌های اصلاحی به سطح پایینی رسیده است بنابراین موتاسیون به عنوان فرآیند افزایش تنوع ژنتیکی شناخته

۸۰۰ میلیون هکتار از اراضی سطح زیر کشت جهان تحت تأثیر سطوح مختلف شوری قرار داشته و پیش‌بینی می‌شود به دلیل تغییرات اقلیم و گرمایش جهانی کره زمین (Reddy *et al.*, 2017)، بارندگی‌های سطحی و کم عمق، تبخیر آب در سطح وسیع، آبیاری با آب شور، استفاده از سیستم‌های نامناسب کشاورزی-زراعی شدت و نسبت شوری خاک در این اراضی به افزایش ده درصدی در سال برسد (Kibria *et al.*, 2017; Shrivastava and Kumar, 2015).

در حال حاضر استفاده از گیاهان و ارقام متحمل به شوری یکی از مهم‌ترین روش‌های مؤثر در بهره‌برداری و افزایش عملکرد در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان است (Arzani and Ashraf, 2016). طی مطالعه گلخانه‌ای Mohammadi-Nejad و همکاران (۲۰۱۲) ۳۰ ژنوتیپ برنج را تحت تنش ۶۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار بر لیتر NaCl قرار دادند، نتایج نشان داد ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری از نظر میزان تحمل به تنش شوری داشته‌اند. در مطالعه‌ای دیگر در مناطق برنج‌کاری شمال کشور مؤمنی و همکاران (۱۳۸۸) میزان تحمل ۱۸۱ ژنوتیپ برنج به تنش شوری را مورد ارزیابی قرار داده و به نتایجی مشابه دست یافتند. شوری کاهش رشد و عملکرد گیاهان زراعی را از طریق افزایش فشار اسمزی، سمیت یونی سلول‌های گیاه به‌ویژه یون‌های سدیم و کلر، تنش اکسیداتیو و اختلال در نظام تغذیه‌ای گیاه موجب می‌شود (Arzani and Ashraf, 2016). افزایش تجمع یون‌ها درون سلول‌های گیاهی منجر به کاهش پتانسیل آبی برگ شده و با کاهش توانایی جذب آب توسط گیاه، شرایط نامساعد فیزیولوژیکی اعم از بسته‌شدن روزنه‌ها، کاهش توانایی فتوسنتز و تنفس، تخریب ساختاری پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و تخریب غشا سلولی می‌گردد (Nasin *et al.*, 2014). شوری منجر به فعال‌شدن گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species) در سلول‌های گیاهی می‌شود (Hasegawa *et al.*, 2000). گونه‌های فعال اکسیژن پایین به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان عمل می‌کنند و در غلظت‌های بالای شوری باعث کاهش فعالیت کلروپلاست، تخریب کلروفیل و پراکسیداسیون لیپیدی غشا و اکسیداسیون مولکول‌های حیاتی مانند پروتئین

برنج به صورت سه بوته در کپه با تراکم 20×20 بین و درون ردیف انجام شد. تمامی مراحل فوق در شرایط مزرعه به اجرا در آمد. براساس آزمون خاک (جدول ۲) کوددهی با استفاده از کودهای اوره، سوپرفسفات تریپل و سولفات پتاسیم صورت گرفت.

یک هفته پس از انتقال، آبیاری با آب شور (در سطوح ۴۵ و ۷۵ میلی مولار بر لیتر) به صورت غرقاب انجام، و مقادیر EC تیمارها هر دو روز متوالی اندازه گیری شد تا به سطح EC مورد نظر برسد. نمونه برداری از برگ های جوان و تازه توسعه یافته گیاه در زمان شروع پنجه زنی، سه هفته بعد از اعمال کامل تیمار شوری انجام شد. بخشی از نمونه ها جهت اندازه گیری نشت الکترولیت (Electrolyte leakage) و محتوای آب نسبی برگ (Relative water content)، محتوای کلروفیل و کاروتنوئید استفاده شدند. مابقی نمونه های برگی به طور جداگانه برداشت و در نیتروژن مایع منجمد و جهت انجام اندازه گیری آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی و مهار رادیکال آزاد (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl, DPPH)، مقدار پرولین، پروتئین، هیدروژن پراکسید، مالون دی آلدئید و آنتی اکسیدان های آنزیمی در دمای 50°C درجه سانتی گراد نگهداری شدند. نمونه برداری جهت اندازه گیری وزن خشک بوته در مرحله رسیدگی فیزیولوژیکی و همزمان با برداشت محصول انجام شد.

نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب برگ: میزان پایداری غشا از طریق اندازه گیری نشت الکترولیت به روش Sairam و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد. دیسک های برگی با اندازه یکسان در لوله آزمایش حاوی هشت میلی لیتر آب مقطر قرار گرفتند. این لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری و میزان هدایت الکتریکی اولیه محیط (EC_1) اندازه گیری شد. سپس نمونه ها در حمام آب گرم در دمای 100°C درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند تا همه محلول های الکترولیت آزاد شود. در ادامه تا دمای 25°C درجه سانتی گراد خنک شده و میزان هدایت الکتریکی نهایی (EC_2) اندازه گیری شد. نشت الکترولیت با استفاده رابطه یک بر

می شود (اولادی و همکاران، ۱۳۹۴).

معرفی و استفاده از ارقام متحمل به تنش های غیرزیستی و شناخت بهتر سازوکارهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مؤثر در تحمل گیاهان نسبت به این تنش ها، یکی از راهکارهای مناسب جهت بهره برداری از اراضی شور و افزایش عملکرد در هکتار در این مزارع است. از این رو این پژوهش با هدف ایجاد لاین متحمل به شوری و بررسی واکنش های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مؤثر در ایجاد تحمل در مقابل تنش شوری انجام شده است.

مواد و روش ها

به منظور بررسی اثرات تنش شوری بر ویژگی های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لاین های موتانت برنج جهت شناسایی لاین های متحمل به شوری و صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مؤثر، آزمایشی در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال زراعی ۹۷-۹۶ انجام شد. پنج لاین موتانت بومی برنج شامل طارم هاشمی ۱، طارم هاشمی ۲، طارم هاشمی ۳، طارم چالوسی و لاین اصلاح شده نعمت در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). لاین های موتانت مورد مطالعه نسل ششم (M6) از پایه های مادری ارقام بومی و اصلاح شده بودند که جهت ایجاد تنوع ژنتیکی در معرض اشعه کوبالت 60 (اشعه گاما) با دوز 25 گری قرار گرفته اند، و در طی آزمایش دو مرحله ای جوانه زنی و دوره گیاهچه ای از بین 100 لاین به عنوان لاین های نسبتاً متحمل انتخاب شده اند. سه سطح مختلف شوری صفر، 45 و 75 میلی مولار بر لیتر با استفاده از NaCl در این آزمایش اعمال شد. آزمایش در قالب کرت های خرد شده و براساس طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد که سطوح مختلف شوری در کرت های اصلی و لاین های برنج در کرت های فرعی قرار گرفته است. گیاهچه های سی روزه در کرتچه های (Microplots) آزمایشی نشاء شدند، بدین منظور برای هر یک از کرتچه ها از جعبه کشت گالوانیزه دارای زهکش به ابعاد 1×2 متر و عمق 50 سانتی متر استفاده شد. کشت گیاهچه لاین های

جدول ۱- کد ژنوتیپی لاین‌های مورد مطالعه در آزمایش

ردیف	لاین	نسل	والد	ارتفاع (cm)	تعداد کل پنجه	تعداد پنجه بارور
۱	طارم هاشمی ۱	M6	طارم هاشمی	۱۲۵	۱۶	۱۰
۲	طارم هاشمی ۲	M6	طارم هاشمی	۱۴۰	۱۴	۱۰
۳	طارم هاشمی ۳	M6	طارم هاشمی	۱۳۰	۱۷	۱۳
۴	طارم چالوسی	M6	طارم چالوسی	۱۲۰	۱۵	۱۰
۵	نعمت	M6	نعمت	۱۱۸	۱۰	۷

جدول ۲- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

هدایت الکتریکی (dS m ⁻¹)	اسیدیته خاک (PH)	ماده آلی (%)	نیتروژن کل (%)	فسفر (ppm)	پتاسیم (ppm)	شن (%)	رس (%)	سیلت	بافت خاک
۱/۱۷	۷/۵۲	۳/۱۵	۰/۲۳	۱۴	۲۷۸/۰۵	۱۰/۳	۴۶/۳	۴۳/۴	رسی - سیلتی

حسب درصد محاسبه شد:

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{EL} (\%) = (\text{EC}_1/\text{EC}_2) \times 100$$

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ به روش Ritchie و همکاران (۱۹۹۰) براساس رابطه ۲ برآورد شد. در فرمول (FW) برابر است با وزن تر برگ بلافاصله بعد از نمونه‌برداری، (DW) وزن خشک برگ بعد از قرارگرفتن در آون و (SW) وزن اشباع برگ بعد از قرارگرفتن در آب مقطر هستند:

$$\text{رابطه ۲} \quad \text{RWC} = \frac{\text{Fw}-\text{Dw}}{\text{Sw}-\text{Dw}} \times 100$$

وزن خشک: جهت اندازه‌گیری وزن خشک، بوته‌ها کف‌بر شده به آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت منتقل شدند.

رنگدانه‌های فتوستتزی: مقدار کلروفیل a و b و کاروتنوئید با استفاده از اسپکتروفتومتر براساس روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱) اندازه‌گیری شد. نمونه‌های برگ ۰/۰۳ گرمی در هشت میلی‌لیتر متانول قرار گرفته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۶۵ و ۶۶۲ برای کلروفیل‌ها و ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئید خوانده شد.

آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنژیومی و مهار رادیکال آزاد (DPPH): مقدار کل ترکیبات فنولیکی با روش Blainski و

همکاران (۲۰۱۳) و با استفاده از معرف فولین- سیوکالچو اندازه‌گیری شد. میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده و نتایج براساس معادل گالیک اسید بر حسب میلی‌گرم اکی‌والان گالیک اسید بر گرم وزن خشک به‌عنوان استاندارد محاسبه شدند. مقدار فلاونوئید براساس روش Zhishen و همکاران (۱۹۹۹) محاسبه شده و میزان جذب در طول موج ۴۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فلاونوئید به‌صورت معادل کاتکین (میلی‌گرم اکی‌والان کاتکین بر گرم وزن خشک) به‌عنوان استاندارد تعیین شد. فعالیت مهار رادیکال آزاد (DPPH) براساس روش Sanjukta و همکاران (۲۰۱۵) اندازه‌گیری شد. ۵۰ میکرولیتر با پنج میلی‌لیتر از محلول ۰/۱۶ DPPH میلی‌مولار ترکیب گردید. این ترکیب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

ارزیابی مقدار پرولین و پروتئین: مقدار پرولین براساس روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) ارزیابی شد. ۰/۱ گرم نمونه برگ در ۱۰۰ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳٪ هموژنیزه شده و ترکیب حاصله در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. دو میلی‌لیتر از سوپرناتانت با یک میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر استیک اسید به مدت یک ساعت در ۱۰۰ درجه

با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها برای صفات مورد بررسی نشان داد (جدول ۳) که اثرات متقابل تنش شوری و لاین‌ها برای همه صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود بجز شاخص نشت الکترولیت که در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد.

نشت الکترولیت، محتوای نسبی آب برگ: مقدار نشت الکترولیت با افزایش غلظت شوری تا ۴۵ میلی‌مولار بر لیتر در لاین‌های برنج، بجز طارم هاشمی ۱ کاهش غیرمعنی‌دار و سپس با افزایش سطح تنش تا ۷۵ میلی‌مولار افزایش داشت. در بالاترین سطح شوری بیشترین مقدار نشت الکترولیت در طارم هاشمی ۲ (۴۲/۶ درصد) و کمترین مقدار آن در طارم چالوسی و نعمت (به ترتیب ۳۴/۳ و ۳۵ درصد) مشاهده شد (جدول ۴). با افزایش سطح تنش مقدار محتوای نسبی آب برگ در همه لاین‌های برنج به استثنای طارم هاشمی ۲ و ۱ به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. این دو لاین به ترتیب با ۹۳/۳۳ و ۹۳/۳۳ درصد بیشترین مقدار محتوای نسبی آب برگ را در بالاترین سطح تنش به خود اختصاص دادند (جدول ۴). وجود همبستگی منفی (داده‌ها نشان داده نشده است) بین وزن خشک و نشت الکترولیت ($r = -0.17$) و مثبت با محتوای نسبی آب برگ ($r = 0.18$) می‌تواند نشان دهد بالاترین سطح تنش شوری منجر به آسیب پایداری غشای سلولی در همه لاین‌ها گردیده است. در مطالعه‌ای مشابه از بین لاین‌های مورد بررسی موتانت برنجی به نام *rst1* معرفی شده است که تحت تنش شوری مقدار کلروفیل و زیست‌توده اندام هوایی آن به‌طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر و نشت الکترولیتی کمتری داشته است (Li *et al.*, 2008). نتایج به‌دست آمده با یافته‌های موجود که گزارش کردند در سطح تنش بالا میزان نشت یونی افزایش می‌یابد (Lutts *et al.*, 1996; Murillo-Amador *et al.*, 2002). محتوای نسبی آب برگ میزان آب موجود در گیاه و وضعیت فعالیت متابولیکی بافت گیاهی را منعکس می‌کند با

ساتی‌گراد ترکیب و سپس به‌سرعت در حمام آب یخ سرد شد. ترکیب رنگی شده واکنش با استفاده از دو میلی‌لیتر تولوئن استخراج و میزان جذب در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین ۰/۲ گرم نمونه برگ با ۱۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) هموژنیزه شد. ترکیب هموژنیزه‌شده سانتریفیوژ و سپس از فاز رویی برای تعیین مقدار پروتئین استفاده شد. محتوای محلول پروتئین به روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین شد.

اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدهید: غلظت

هیدروژن پراکسید (H_2O_2) به روش Jana و Choudhuri (۱۹۸۱) تعیین شد. ۰/۱ گرم نمونه برگ با یک میلی‌لیتر از محلول کلرید تیتانیوم هموژنیزه شد. سپس ترکیب حاصله با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و یک میلی‌لیتر پتاسیم دیدید ترکیب شد. شدت رنگ زرد ترکیب به‌دست آمده در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار مالون دی‌آلدهید با روش Hernandez و Almansa (۲۰۰۲) تعیین شد. ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه برگ در ۱۸۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) هموژنیزه شد. ترکیب هموژنیزه‌شده حاصله سانتریفیوژ شده و ۱۲۰۰ میکرولیتر از فاز رویی با ۱۲۰۰ میکرولیتر تیوباریتوریک اسید (TBA) ترکیب شدند. میزان جذب فاز رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی: جهت ارزیابی فعالیت آنزیمی

۰/۲ گرم نمونه برگ با ۱۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) به روش RoyChoudhury و همکاران (۲۰۰۷) هموژنیزه شد. ترکیب هموژنیزه‌شده در ۲۰۰۰۰ دور به مدت ۱۸ دقیقه سانتریفیوژ شده و از فاز رویی استفاده شد. فعالیت کاتالاز با ارزیابی سرعت از بین رفتن هیدروژن پراکسید در ۲۴۰ نانومتر تعیین شد. فعالیت گایاکول پراکسیداز بعد از تشکیل شدن تترآگایاکول و با اندازه‌گیری مقدار جذب در ۴۷۰ نانومتر تعیین شد.

آزمون نرمال بودن داده‌ها به روش کولموگروف-اسمیرنوف صورت گرفت. آنالیز واریانس داده‌ها، مقایسه میانگین با روش LSD در سطح معنی‌داری پنج درصد و همبستگی بین صفات

جدول ۳- تجزیه واریانس نتایج حاصل از تأثیر تنش شوری بر صفات مورد مطالعه در لاین‌های موتانت برنج

منبع تغییرات (SOV)	تنش (S)	خطای اصلی (E _a)	لاین (L)	تنش × لاین (S × L)	خطای آزمایش (E _b)	ضرریت تغییرات (%)
درجه آزادی (df)	۲	۶	۴	۸	۳۶	
وزن خشک بوته	۵۹۸۶/۰۶**	۱۸/۹۰	۱۳۴۱/۲۷**	۳۳۱/۶۸**	۷۴/۰۴	۱۸/۰۱
نشت الکترولیت	۹۲۶/۰۵**	۱۹	۲۸۷/۲**	۱۰۹/۱*	۳۲/۶	۱۲
محتوای نسبی آب	۱۵/۲ ^{ns}	۱۴/۸	۱۰۴/۳ ^{ns}	۴۱۹/۸**	۶۱/۵	۲/۹
کلروفیل a	۰/۰۰۱۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۲۴**	۰/۰۰۸۰**	۰/۰۰۰۳	۵/۵
کلروفیل b	۰/۰۰۰۴ ^{ns}	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۴۱**	۰/۰۰۰۸	۱۳/۹
کاروتنوئید	۰/۰۰۰۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۳۵ ^{ns}	۰/۰۱۰**	۰/۰۰۰۷	۲۰
فول	۱۶۳۵/۴**	۶/۵	۱۷۴۵/۳**	۶۵۹۱**	۹/۲	۲/۰۹
فلانوئید	۱۴۷/۴**	۴/۱	۱۷۴۵/۴**	۸۱۰/۵۷**	۱۱/۱	۵/۱
DPPH	۸۹۸/۹**	۱۰/۵	۵۵۳/۸**	۳۴۶۳**	۱۴/۱	۱۰/۳
پرویلین	۰/۰۷۹**	۰/۰۰۰۲	۰/۰۱۴**	۰/۰۰۵۴**	۰/۰۰۰۷	۱۲/۳
پروتئین	۰/۰۱۳۱**	۰/۰۰۰	۰/۰۳۷**	۰/۰۱۹۱**	۰/۰۰۰	۱/۱
مالون دی‌آلدئید	۰/۰۳۴۲**	۰/۰۰۰۱	۰/۰۹۱۷**	۰/۱۳۳۶**	۰/۰۱۰	۱۱/۴
هیدروژن پراکسید	۰/۰۰۳۵**	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۲۵**	۰/۰۰۱۹**	۰/۰۰۱۴	۶/۳
کاتالاز	۰/۰۰۹۹**	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۳۸**	۰/۰۱۵**	۰/۰۰۱۷	۱۱/۲
گایاکول پراکسیداز	۰/۱۵۵**	۰/۰۰۰۷	۰/۱۹۳**	۰/۹۳۶**	۰/۰۰۲۹	۹/۴

ns، * و **: به ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی‌داری و تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد هستند.

جدول ۴- مقایسه میانگین بر همکنش تنش شوری و لاین‌های برنج بر صفات نشت الکترونیک و محتوای نسبی آب برگ و وزن خشک بوته

تیمار (میلی‌مولار بر لیتر NaCl)	طارم هاشمی ۱	طارم هاشمی ۲	طارم هاشمی ۳	طارم چالوسی	نعمت
نشت الکترولیت (%)	۳۹/۳ ± ۱/۲ ^a	۲۴/۰ ± ۰/۰۸ ^b	۲۶/۰ ± ۱/۸۰ ^b	۲۵/۶ ± ۲/۰ ^b	۲۳/۶ ± ۰/۰۶ ^b
	۳۸/۰ ± ۴/۰ ^a	۲۲/۳ ± ۱/۰ ^b	۲۱/۶ ± ۲/۰ ^c	۲۳/۶ ± ۲/۰ ^c	۱۸/۳ ± ۱/۰۹ ^c
	۳۶/۳ ± ۱/۰۷ ^b	۴۲/۶ ± ۳/۰ ^a	۳۹/۰ ± ۵/۰ ^{ab}	۳۴/۳ ± ۴/۹ ^b	۳۵/۰ ± ۱/۰۲ ^b
محتوای نسبی آب برگ (%)	۶۵/۳۳ ± ۱/۰۸ ^c	۸۳/۳۳ ± ۶/۰۷ ^b	۹۲/۳۳ ± ۲/۶ ^{ab}	۹۴/۶۶ ± ۲/۲ ^a	۸۲/۳۳ ± ۱/۲ ^b
	۸۵ ± ۱/۰۰ ^a	۷۷/۳۳ ± ۶/۲ ^b	۸۴/۳۳ ± ۲/۴ ^{ab}	۹۱ ± ۱/۴ ^a	۸۶/۳۳ ± ۳/۰ ^{ab}
	۹۳/۳۳ ± ۰/۰۶ ^a	۹۳/۶۶ ± ۲/۰ ^a	۸۷ ± ۲/۹ ^{ab}	۷۵ ± ۲/۱ ^b	۷۷/۳۳ ± ۲/۷ ^b
وزن خشک بوته (g/m ²)	۶۶/۱ ± ۱/۲ ^{ab}	۵۶/۶ ± ۱/۰ ^b	۶۵/۵ ± ۱/۰ ^{ab}	۸۴/۵ ± ۲/۵ ^a	۸۴/۸۳ ± ۰/۰۷ ^a
	۳۸/۰ ± ۱/۰ ^{ab}	۳۷/۳ ± ۱/۰ ^b	۳۵/۶ ± ۲/۱ ^b	۴۹/۳ ± ۲/۱۷ ^a	۴۳/۶ ± ۱/۰۹ ^{ab}
	۳۲/۰۱ ± ۱/۰۳ ^b	۳۱/۶ ± ۳/۰ ^b	۳۳/۰ ± ۳/۰ ^{۱b}	۴۲/۰ ± ۱/۹ ^a	۴۱/۰ ± ۱/۰۲ ^a

در هر ردیف و تیمار، میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشترک مطابق با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار LSD در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

گرم وزن تر) و کمترین مقدار آن در طارم هاشمی ۳ (۰/۱۶) میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد (جدول ۵). الگوی تغییرات کاروتنوئید نیز در پاسخ به تنش شوری متفاوت بود. با افزایش سطح شوری تا ۷۵ میلی‌مولار مقدار کاروتنوئید در لاین‌های طارم هاشمی ۲، ۳ و نعمت کاهش داشت. مقدار کاروتنوئید در طارم چالوسی تا تنش ۴۵ میلی‌مولار کاهش و سپس افزایش نشان داد، در حالیکه طارم هاشمی ۱ واکنش عکسی داشت (جدول ۵). بیشترین و کمترین مقادیر کاروتنوئید در لاین‌های طارم چالوسی و طارم هاشمی ۲ (به ترتیب ۰/۱۳ و ۰/۰۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. با توجه به اینکه بین لاین‌های برنج در بالاترین سطح شوری تفاوت معنی‌داری از نظر مقدار کلروفیل b و کاروتنوئید مشاهده نشد، به نظر می‌رسد صفات مورد نظر نمی‌توانند نقش مؤثری در افزایش میزان تحمل لاین‌ها در مقابل تنش داشته باشند. کاهش مقدار کلروفیل در گیاهان تحت تنش شوری، به‌عنوان یکی از علائم معمول تنش اسمزی محسوب می‌شود. در همین زمینه، فرهودی و همکاران (۱۳۹۵) کاهش غلظت کلروفیل با کاهش وزن خشک اندام هوایی برنج را در اثر تنش شوری گزارش نمودند. با افزایش سطح تنش محتوای کلروفیل b ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. شوری در سطوح کم می‌تواند تا اندازه‌ای منجر به تحریک تولید کلروفیل گردد اما به تدریج و با تداوم تنش محتوای این رنگدانه‌ها کاهش می‌یابد. گزارش‌های مشابهی توسط Kumar و همکاران (۲۰۰۸) در ارقام مختلف برنج ارائه شد. طی مطالعه انجام‌شده روی گیاه ذرت اثبات شده است که کلروفیل b در طی تنش حساسیت بیشتری داشته و به‌میزان بیشتری کاهش می‌یابد (Gill and Tuteja, 2010). در شرایط تنش کاروتنوئیدها می‌توانند انرژی مازاد را از طریق چرخه گزانتوفیل تجزیه کرده و به‌عنوان تثبیت‌کننده غشای کلروپلاست عمل می‌کنند که منجر به جداسازی کمپلکس‌های برداشت‌کننده نور (Light-harvesting complexes, LHCs) و فاز لیبیدی غشای تیلاکوئید می‌شوند و سیالیت غشا و حساسیت‌پذیری به پراکسیداسیون لیبیدی را کاهش می‌دهند به عبارت دیگر، کاروتنوئیدها می‌توانند یا با

قرارگرفتن گیاه تحت شرایط تنش و برهم‌خوردن تعادل فشار اسمزی و پتانسیل آبی گیاه، فشار تورگر (آماس) کاهش یافته و آسیب‌های فیزیولوژیکی رخ می‌دهد (Ritchie et al., 1990)، و به‌دنبال آن میزان تعرق گیاه بیش از میزان جذب آب گردیده و در نهایت منجر به کاهش محتوای نسبی آب برگ می‌شود (Lutts et al., 1995).

وزن خشک: مقدار وزن خشک تمامی لاین‌های برنج مورد بررسی تحت تأثیر تنش شوری کاهش یافت. در بالاترین سطح تنش شوری (۷۵ میلی‌مولار NaCl) لاین‌های طارم چالوسی و نعمت بیشترین مقدار وزن خشک (به ترتیب ۴۲ و ۴۱ گرم بر متر مربع) را به خود اختصاص دادند. با افزایش سطح تنش از ۴۵ به ۷۵ میلی‌مولار بر لیتر لاین نعمت پایین‌ترین (۴٪) و طارم هاشمی ۲ بالاترین درصد کاهش وزن خشک (۱۶٪) را نشان دادند (جدول ۴). مقدار وزن خشک گیاهان زراعی می‌تواند به‌عنوان معیاری مناسب جهت غربالگری ارقام حساس و متحمل به تنش شوری استفاده گردد (Munns, 2002). تحت تنش شوری دلایلی اعم از تجمع یون‌های سدیم و کلر در اندام‌های فتوسنتزی گیاه می‌تواند منجر به اختلال در فتوسنتز، کاهش غلظت کلروفیل و در نهایت کاهش تولید ماده خشک و کاهش شدید رشد رویشی گیاهان زراعی از جمله برنج گردد (حبیب‌اللهی و همکاران، ۱۳۹۱)

رنگدانه‌های فتوسنتزی: مقدار کلروفیل a واکنش‌های متفاوتی در پاسخ به سطوح مختلف تنش شوری در بین لاین‌های برنج داشته است (جدول ۵). با افزایش سطح تنش تا ۷۵ میلی‌مولار بر لیتر مقدار کلروفیل a در طارم چالوسی و طارم هاشمی ۳ افزایش، و در طارم هاشمی ۱ و ۲ کاهش داشته است. بیشترین مقدار کلروفیل a در طارم چالوسی (۰/۴۳) میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین مقدار در طارم‌های هاشمی ۱ و ۲ (۰/۳۲) میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بوده است. مقدار کلروفیل b تا سطح تنش ۴۵ میلی‌مولار افزایش ابتدایی داشته و سپس در سطح تنش ۷۵ میلی‌مولار در همه لاین‌های برنج به استثنای طارم هاشمی ۱ به‌طور غیرمعنی‌داری کمتر شد. بیشترین مقدار کلروفیل b در لاین نعمت (۰/۲۳) میلی‌گرم بر

جدول ۵- مقایسه میانگین بر همکنش تنش شوری و لاین‌های برنج بر صفات کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید

تیما (میلی مولار بر لیتر NaCl)	طارم هاشمی ۱	طارم هاشمی ۲	طارم هاشمی ۳	طارم چالوسی	نعمت
کلروفیل a (mg g ⁻¹ FW)	۰	۰/۳۶ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۳۰ ± ۰/۰۰ ^c	۰/۳۷ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۳۲ ± ۰/۰۰ ^b
	۴۵	۰/۳۴ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۳۳ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۳۲ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۳۶ ± ۰/۰۰ ^a
	۷۵	۰/۳۱ ± ۰/۰۰ ^d	۰/۳۱ ± ۰/۰۰ ^{dc}	۰/۴۰ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۳۴ ± ۰/۰۰ ^c
کلروفیل b (mg g ⁻¹ FW)	۰	۰/۱۸ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۲۱ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۱۸ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۱۸ ± ۰/۰۰ ^a
	۴۵	۰/۱۵ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۲۳ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۲۳ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۲۳ ± ۰/۰۰ ^a
	۷۵	۰/۲۱ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۲۲ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۱۶ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۲۳ ± ۰/۰۰ ^a
کاروتنوئید (mg g ⁻¹ FW)	۰	۰/۱۴ ± ۰/۰۰ ^{ab}	۰/۱۵ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۱۵ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۱۳ ± ۰/۰۰ ^b
	۴۵	۰/۱۷ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۱۳ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۱۱ ± ۰/۰۰ ^{bc}	۰/۱۳ ± ۰/۰۰ ^b
	۷۵	۰/۱۱ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۰۸ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۱۰ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۱۲ ± ۰/۰۰ ^b

در هر ردیف و تیمار، میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشترک مطابق با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار LSD در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

گونه‌های فعال اکسیژن القاشده در اثر تنش باشد (Gill and Tuteja, 2010). ترکیبات فنولیکی نقش مهمی در جذب و مقابله با رادیکال‌های آزاد داشته و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات می‌تواند ناشی از غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد لیپیدی و یا ممانعت از کاتالیز هیدروپراکسید به رادیکال آزاد توسط این ترکیبات باشد (Pokorny et al., 2001). فلاونوئیدها اغلب در تنش‌های غیرزیستی تولیدشده و در حفاظت از گیاهان نقش دارند (Grace and Logan, 2000). ترکیبات فلاونوئیدی در گیاهان می‌توانند برای حفاظت از آنها در مقابل تأثیرات مضر محیطی مفید و کمک‌کننده بوده و افزایش فعالیت ترکیبات فلاونوئیدی تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی در برنج گزارش شد (Ithal and Reddy, 2004). فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد (DPPH) به‌طور گسترده‌ای در جهت ارزیابی میزان توانایی پاکسازی رادیکال‌های آزاد در فرآورده‌های طبیعی مختلف کاربرد دارد و نتایج مشاهدات مختاری و همکاران (۱۳۹۵) نشان دادند تیمار تلفیقی نور و محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید تأثیر معنی‌داری در افزایش میزان فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد در ارقام برنج تحت تنش شوری داشت. در تحقیقات انجام‌شده توسط Basu و همکاران

ممانعت از تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن و یا از طریق خاموش کردن کلروفیل برانگیخته‌شده میزان آسیب ناشی از تنش را کاهش دهند (Adams Iii et al., 2002).

آنتی‌اکسیدان‌های غیرآزمیمی و به دام‌اندازی رادیکال آزاد (DPPH): با افزایش سطح تنش شوری تا ۷۵ میلی‌مولار بر لیتر، مقادیر ترکیبات فنولیکی، فلاونوئیدی و فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد (DPPH) برای همه لاین‌های برنج به استثنای طارم هاشمی ۱ افزایش بارزی داشته است. طارم هاشمی ۳ در سطح تیمار ۴۵ میلی‌مولار افزایش و در بالاترین سطح تنش برای ترکیبات مورد بررسی کاهش داشت. طارم چالوسی در بالاترین سطح تنش بیشترین مقادیر ترکیبات فنولیکی (۱۷۷/۱ میلی‌گرم اکی‌والان گالیک اسید بر گرم وزن خشک)، فلاونوئیدی (۴۹/۶ میلی‌گرم اکی‌والان کاتکین بر گرم وزن خشک) و DPPH (۶۹/۹ درصد) را در مقایسه با سایر لاین‌ها نشان داد (جدول ۶). میزان خسارت اکسیداتیو سلولی ناشی از تنش‌های غیرزیستی در گیاهان، با توانایی گیاه برای تولید عوامل آنتی‌اکسیدانی تعیین می‌شود. بنابراین به‌نظر می‌رسد میزان تحمل ارقام در مقابل شوری می‌تواند ناشی از افزایش مقدار آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی در جهت از بین‌بردن

جدول ۶- مقایسه میانگین بر همکنش تنش شوری و لاین‌های برنج بر ترکیبات فنولیکی، محتوای فلاونوئیدی و DPPH

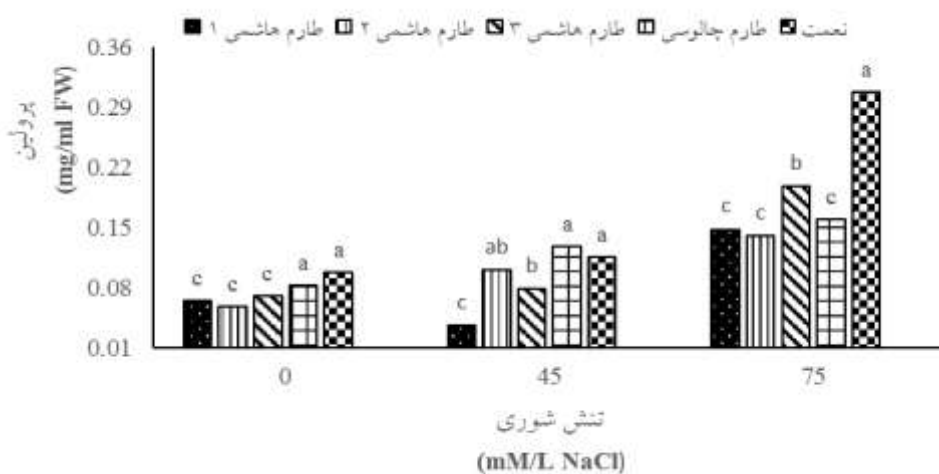
تیما (میلی مولار بر لیتر NaCl)	طارم هاشمی ۱	طارم هاشمی ۲	طارم هاشمی ۳	طارم چالوسی	نعمت
ترکیبات فنولیکی (mg eq. GA g ⁻¹)	۱۷۶/۳ ± ۱/۱ ^a	۱۳۷/۷ ± ۲/۲ ^b	۷۶/۸ ± ۲/۹ ^e	۱۰۰/۱ ± ۱/۵ ^c	۸۳/۶ ± ۰/۸ ^d
(DW)	۱۴۳/۷ ± ۰/۴ ^b	۱۱۹/۱ ± ۰/۶ ^c	۱۴۹/۵ ± ۰/۵ ^a	۹۱/۷ ± ۰/۰ ^e	۹۴/۲ ± ۰/۲ ^d
محتوای فلاونوئیدی (mg)	۸۹/۵ ± ۱/۵ ^e	۱۳۸/۳ ± ۱/۶ ^c	۱۰۴/۲ ± ۰/۴ ^d	۱۷۷/۱ ± ۰/۸ ^a	۱۵۲/۹ ± ۰/۳ ^b
(eq. C g ⁻¹ DW)	۶۶/۱۷ ± ۰/۶ ^a	۶۰/۶ ± ۰/۵ ^b	۲۴/۱ ± ۱/۷ ^d	۲۹/۴ ± ۰/۳ ^c	۱۹/۱ ± ۰/۱ ^e
(%) DPPH	۵۳/۰ ± ۱/۵ ^a	۳۲/۹ ± ۱/۵ ^c	۴۳/۱ ± ۰/۳ ^b	۳۳/۰ ± ۰/۷ ^c	۲۲/۳ ± ۰/۸ ^d
	۳۳/۱ ± ۱/۲ ^a	۶۵/۲ ± ۰/۳ ^a	۳۱/۱ ± ۱/۱ ^c	۴۹/۶ ± ۲/۰ ^b	۳۲/۵ ± ۰/۴ ^c
	۷۴/۵ ± ۱/۶ ^a	۳۵/۳ ± ۱/۵ ^b	۱۰/۶ ± ۲/۲ ^d	۲۲/۳ ± ۲/۲ ^c	۷/۶ ± ۰/۹ ^d
	۵۰/۳ ± ۰/۸ ^a	۳۸/۰ ± ۰/۷ ^b	۵۲/۶ ± ۱/۶ ^a	۱۸/۶ ± ۰/۸ ^c	۱۹/۳ ± ۰/۲ ^c
	۲۰/۳ ± ۰/۴ ^d	۵۸/۰ ± ۲/۵ ^b	۲۲/۶ ± ۱/۰ ^c	۶۹/۶ ± ۱/۴ ^a	۶۴/۶ ± ۰/۳ ^a

در هر ردیف و تیمار، میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشترک مطابق با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار LSD در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

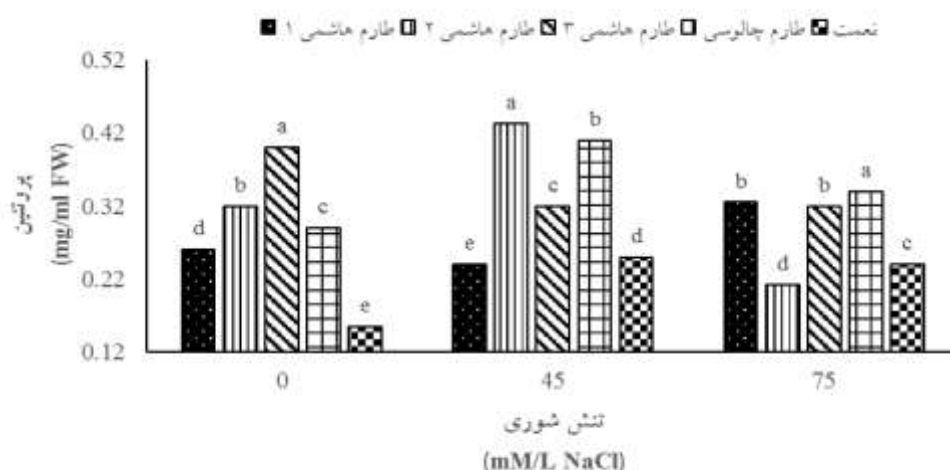
پروتئین به ترتیب 0.36^* و -0.29^* $r =$ مشاهده شد. در مشاهدات Ghosh و همکاران (۲۰۱۱) مقدار پرولین در رقم متحمل به شوری پوکالی (۰/۴۹ میلی گرم بر میلی لیتر وزن تر) بود. پرولین به عنوان ترکیبات محافظ اسمزی در گیاهان شناخته شده و در شرایط بروز تنش اسمزی ناشی از خشکی یا شوری محیط به میزان بیشتری تولید می‌گردد (Kumar et al., 2008). افزایش بارز مقدار پرولین تحت شرایط تنش می‌تواند ناشی از تغییر در متابولیسم پرولین باشد که با افزایش بیان آنزیم‌های سنتزکننده پرولین همراه است (Kibria et al., 2017). تجمع اسمولیت‌ها در سلول‌های گیاهی می‌تواند منجر به کاهش پتانسیل اسمزی گردیده و به حفظ قابلیت جذب آب و فشار تورگر، حفظ فرایندهای فیزیولوژیکی مانند بازشدن روزنه‌ای، فتوسنتز و رشد سلولی کمک می‌کند (فرهودی و همکاران، ۱۳۹۵). یافته‌های پژوهشگران نیز بیانگر افزایش میزان تجمع پروتئین با افزایش سطح تنش است (Hoai et al., 2003; Kumar et al., 2008). در مشاهدات Ghosh و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شد مقدار پروتئین در رقم متحمل به شوری پوکالی که به مدت ۴۸ ساعت در معرض تنش ۲۰۰ میلی مولار بر لیتر قرار گرفت تا ۰/۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر وزن تر افزایش

(۲۰۱۰) میزان تحمل ارقام پوکالی و IR29 تحت تنش خشکی از نظر میزان آسیب آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان داد رقم حساس IR29 ترکیبات فلاونوئیدی و فنولیکی کمتری در مقایسه با رقم متحمل پوکالی داشت.

پرولین و پروتئین: با افزایش سطح شوری تا ۷۵ میلی مولار بر لیتر مقدار پرولین افزایش یافت و بالاترین مقدار پرولین در تمام سطوح شوری در لاین نعمت مشاهده شد. در بالاترین سطح تنش بیشترین مقدار پرولین در لاین نعمت (۰/۳۳ میلی گرم بر میلی لیتر وزن تر) و کمترین مقدار نیز در طارم هاشمی ۲ (۰/۱۴ میلی گرم بر میلی لیتر وزن تر) ثبت شد (شکل ۱). واکنش مقدار پروتئین در لاین‌های برنج نسبت به شوری متفاوت بوده است و در طارم هاشمی ۲، طارم چالوسی و نعمت تا سطح شوری ۴۵ میلی مولار افزایش و سپس کاهش یافت. طارم چالوسی بیشترین مقدار (۰/۳۴ میلی گرم بر میلی لیتر وزن تر) و طارم هاشمی ۲ (۰/۲۲ میلی گرم بر میلی لیتر وزن تر) کمترین مقدار پروتئین را در بالاترین سطح تنش به خود اختصاص دادند (شکل ۲). در لاین نعمت افزایش مقدار پرولین با کاهش میزان پروتئین همراه بود. براساس یافته‌ها، همبستگی مثبت و منفی معنی‌داری بین وزن خشک با پرولین و



شکل ۱- مقایسه میانگین بر همکنش تنش شوری و لاین‌های برنج بر مقدار پرولین

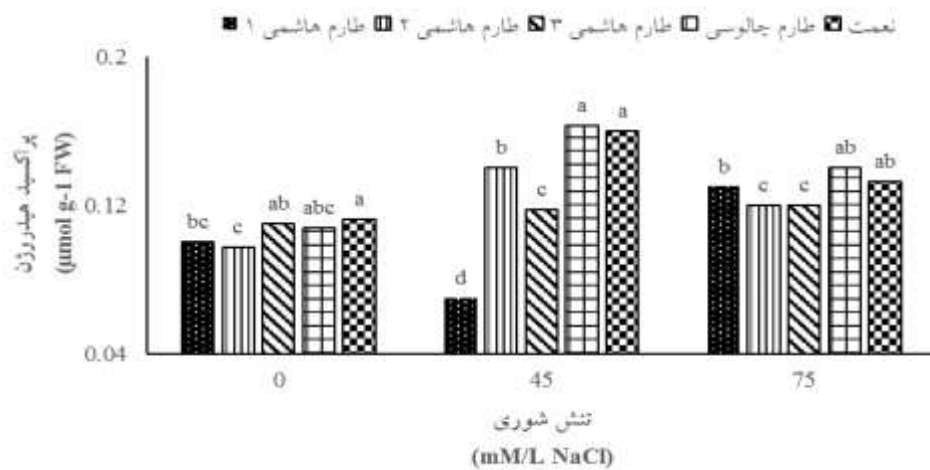


شکل ۲- مقایسه میانگین بر همکنش تنش شوری و لاین‌های برنج بر مقدار پروتئین

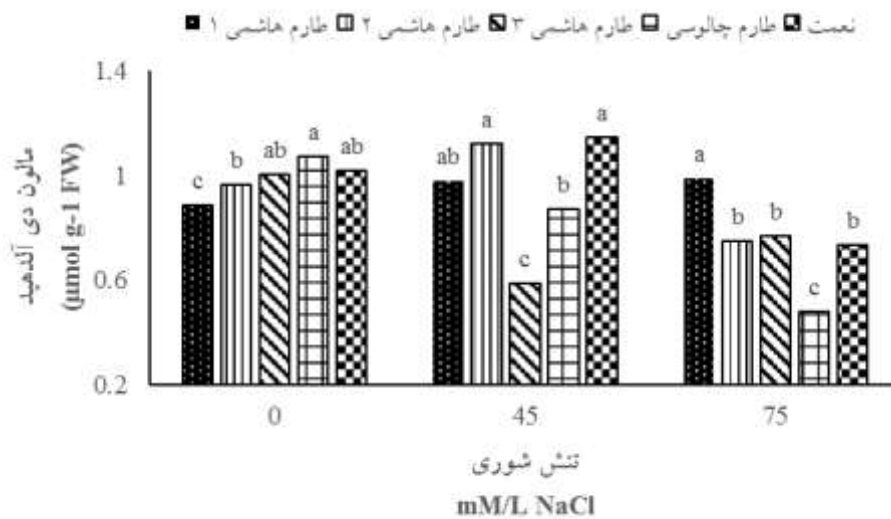
شوری افزایش یافت هر چند میزان فعالیت این افزایش در لاین نعمت در مقایسه با سایر لاین‌ها در تمام سطوح شوری بالاتر بود (شکل ۳). نتایج حاصل از همبستگی حاکی از وجود همبستگی منفی و معنی‌دار بین وزن خشک گیاهچه و هیدروژن پراکسید ($r = -0.30^*$) بود. در مقایسه، پاسخ مالون دی‌آلدهید در لاین‌های برنج متفاوت بود (شکل ۴). مقدار فعالیت مالون دی‌آلدهید در همه لاین‌ها به استثنای طارم هاشمی ۱ با افزایش سطح تنش شوری کاهش داشت اما در لاین‌های طارم هاشمی ۲ و نعمت مقدار آن در تنش ۴۵

یافت. یک روش برای مقابله با تنش شوری می‌تواند تجمع مقدار پروتئین باشد. وقتی گیاه در معرض تنش شوری قرار می‌گیرد سنتز دوباره پروتئین‌ها و یا القای متابولیسم مربوط به افزایش غلظت پروتئین‌های خاص موجود در گیاه صورت می‌گیرد (Singh et al., 1987). گیاهان می‌توانند از طریق فعال کردن پیام‌رسان حاوی آنزیم پروتئین کیناز در مقابل تنش شوری واکنش نشان دهند (Reddy et al., 2017).

هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدهید: فعالیت هیدروژن پراکسید در همه لاین‌های موتانت برنج با افزایش سطح تنش



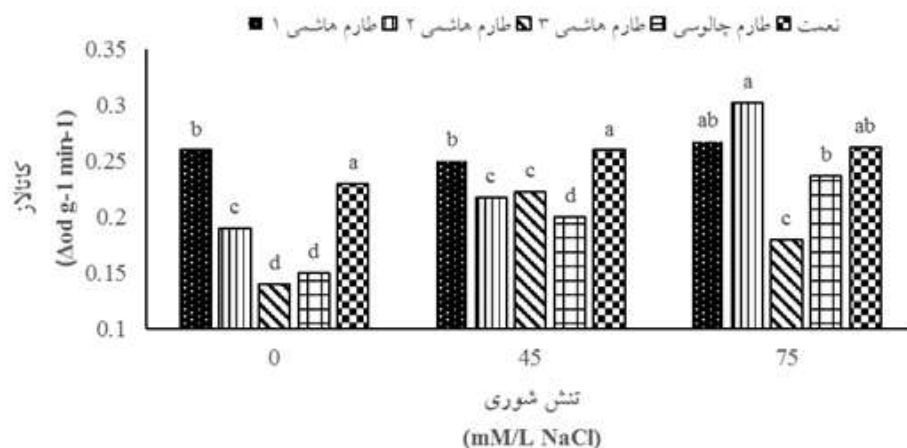
شکل ۳- مقایسه میانگین بر همکنش تنش شوری و لاین‌های برنج بر مقدار پراکسیداز هیدروژن



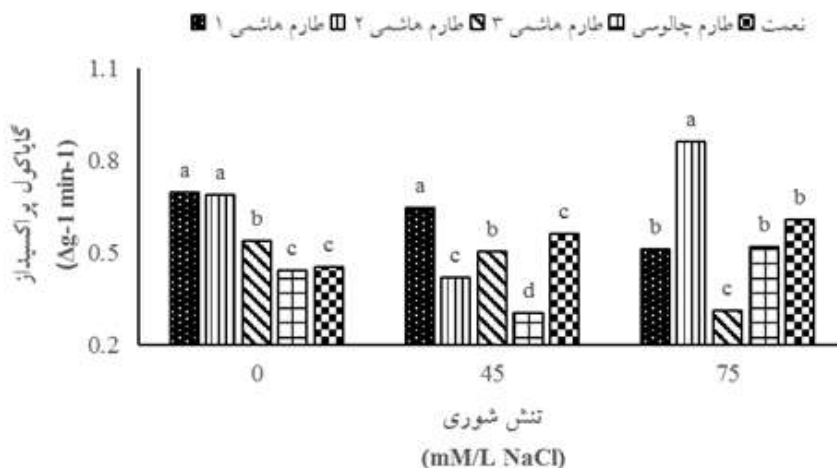
شکل ۴- مقایسه میانگین بر همکنش تنش شوری و لاین‌های برنج بر مقدار مالون دی آلدئید

یکپارچه غشای سلولی و در نتیجه افزایش حساسیت آن در برابر تنش اکسیداتیو می‌شود (He et al., 2014). مشاهدات Sairam و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی تأثیر شوری بر گندم نشان داد که فعالیت هیدروژن پراکسید با افزایش سطح شوری افزایش می‌یابد. محققان دیگر تأثیرات مشابهی را روی جو مشاهده نمودند (Li et al., 2008). در این آزمایش مقدار فعالیت مالون دی آلدئید در لاین‌های طارم چالوسی و نعمت با افزایش سطح تنش از ۴۵ به ۷۵ میلی مولار کاهش یافت و این

میلی مولار بیشتر و در طارم هاشمی ۳ کمتر از تنش ۷۵ میلی مولار بود. طارم چالوسی کمترین مقدار (۰/۴) میکرومول بر گرم وزن تر) و طارم هاشمی ۲ بیشترین مقدار (۱/۱ میکرومول بر گرم) مالون دی آلدئید را در بالاترین سطح تنش به خود اختصاص دادند. نتایج حاصل از همبستگی نشان داد همبستگی منفی و معنی دار بین وزن خشک گیاهچه و مالون دی آلدئید ($r = -0.36^*$) بود. تنش شوری با ازدیاد مقدار هیدروژن پراکسید در برگ‌های برنج باعث آسیب دیدگی بافت



شکل ۵- مقایسه میانگین بر همکنش تنش شوری و لاین‌های برنج بر مقدار کاتالاز



شکل ۶- مقایسه میانگین بر همکنش تنش شوری و لاین‌های برنج بر مقدار پراکسیداز

یافت. در میان موتانت‌های مورد مطالعه لاین نعمت از بالاترین مقدار کاتالاز در تمام سطوح شوری برخوردار بود. نتایج همبستگی حاکی از وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار ($r = 0.49^{**}$) و پراکسیداز بوده که نشان می‌دهد وجود مقدار زیاد این آنزیم‌ها بیانگر ایجاد تنش بوده و گیاه متحمل می‌تواند از این طریق به تنش واکنش نشان دهد (شکل ۵). واکنش گایاکول پراکسیداز نسبت به تنش شوری در لاین‌های برنج متفاوت بود. در لاین‌های طارم هاشمی ۱، ۳ و نعمت کاهش و در طارم هاشمی ۲ و طارم چالوسی افزایش داشت (شکل ۶). در لاین نعمت

لاین‌ها کمترین مقدار نشت الکترولیت را نیز به خود اختصاص داده‌اند که این نشان‌دهنده تخریب کمتر غشای سلولی در این لاین‌ها است. نتیجه حاصل با یافته‌های Bhattacharjee و Mukherjee (۲۰۰۲) که اظهار داشتند میزان تخریب غشای سلولی و تولید مالون دی‌آلدئید در ارقام حساس برنج به شوری بسیار بیشتر از ارقام متحمل به شوری بود همخوانی دارد. تخریب غشای سلولی تحت تأثیر تنش شوری در گندم نیز گزارش شد (فرهودی، ۱۳۹۲).

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی: فعالیت کاتالاز در همه لاین‌های برنج با افزایش غلظت شوری تا ۷۵ میلی‌مولار بر لیتر افزایش

براساس یافته‌های حاصل موتانت‌های مورد مطالعه واکنش متفاوتی به سطوح تنش شوری نشان دادند. با توجه به اینکه بین لاین‌های برنج در بالاترین سطح شوری تفاوت معنی‌داری از نظر مقدار کلروفیل b و کاروتنوئید مشاهده نشد می‌توان اظهار داشت صفات مورد نظر نقش مؤثری در افزایش میزان تحمل لاین‌های موتانت در مقابل تنش نداشته‌اند. نتایج حاصل حاکی از این است وزن خشک لاین‌های برنج با مقدار پرولین، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز همبستگی مثبت داشته و این نشان می‌دهد لاین‌های حاوی مقدار بیشتر پرولین، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز می‌توانند عملکرد بهتر در شرایط تنش داشته باشند، در مقابل همبستگی منفی بین عملکرد و مقدار پروتئین، فعالیت هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدهید مشاهده شد. به‌طور کلی نتایج آزمایش نشان داد لاین نعمت در بالاترین سطح شوری بیشترین مقدار پرولین را داشته که به همراه افزایش مقدار پرولین، میزان فعالیت پروتئین در این لاین کاهش یافت. مقدار فعالیت کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در لاین نعمت در شرایط تنش بالا بوده و میزان تولید مالون دی‌آلدهید و نشت یونی کمتری نیز داشته است. شواهد به‌دست آمده نشان می‌دهد در مقایسه با سایر لاین‌ها، موتانت نعمت متحمل‌تر بوده و به‌نظر می‌رسد می‌توان این لاین را به‌عنوان متحمل‌ترین لاین معرفی نمود. سازوکار مقاومت بهتر لاین نعمت در مقابل تنش شوری، تنظیم اسمزی و افزایش مقدار اسیدآمینو پرولین از طریق تجزیه پروتئین و سیستم آنزیمی کاتالاز است.

سپاسگزاری

از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان جهت فراهم‌نمودن امکانات لازم برای اجرای این پژوهش تشکر و سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

افزایش مقدار کاتالاز با افزایش مقدار هیدروژن پراکسید همراه بود. از آنجا که هیدروژن پراکسید به‌عنوان پیش‌ماده اولیه سنتز کاتالاز محسوب می‌شود در شرایط تنش با افزایش مقدار این ماده، کاتالاز بیشتری نیز تولید می‌گردد تا بتواند گونه‌های فعال اکسیژن را مهار کند. اثبات شده است در گندم همبستگی بالایی بین افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و میزان تحمل به تنش‌های اکسیداتیو وجود دارد (Sairam *et al.*, 2002). نشان داده شده است که در رقم متحمل برنج پوکالی فعالیت کاتالازی و آنزیم‌های پاکسازی‌کننده ROS بیشتری دارد (Hoang *et al.*, 2016). یافته‌های قبلی تأیید می‌کنند که افزایش سطح شوری می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز را در ارقام برنج حساس به شوری کاهش دهد اما در ارقام متحمل منجر به افزایش مقدار فعالیت کاتالاز می‌گردد (Kibria *et al.*, 2017).

در گزارش Kibria و همکاران (۲۰۱۷) بیان شد که افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز تحت تنش شوری رخ می‌دهد. نتایج متفاوتی در ارتباط با تأثیر تنش شوری بر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در گیاهان مختلف گزارش شده است. برای مثال کومار و همکاران (Kumar *et al.*, 2008) گزارش کردند هیچ تفاوت معنی‌داری در مقدار هیدروژن پراکسید و کاتالاز در ارقام برنج تحت تنش مشاهده نمودند، در مقابل Sairam و همکاران (۲۰۰۲) افزایش فعالیت کاتالازی را در ارقام متحمل و حساس گندم تحت تنش شوری گزارش کردند. تأثیر مثبت افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز در مشاهدات حبیب‌اللهی و همکاران (۱۳۹۱) در افزایش میزان تحمل ارقام برنج به شوری گزارش شد که با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد. در پژوهشی دیگر مقدار گایاکول پراکسیداز در ارقام برنج تحت تنش شوری کمتر شد (Kibria *et al.*, 2017).

نتیجه‌گیری

منابع

اولادی، م.، نعمت‌زاده، ق.، رحیمی، م.، افخمی قادی، ع.، قلی‌زاده، ع.، مظفری، ک. و ضیایی، ا. (۱۳۹۴) بررسی تأثیر پرتودهی اشعه گاما در ایجاد تنوع در برخی ارقام محلی و اصلاح‌شده برنج. مجله علوم و فنون هسته‌ای ۷۳: ۸۷-۸۰.

حبیب‌اللهی، ن.، مهدیه، م. و امیرجانی، م. ر. (۱۳۹۱) اثر تنش شوری بر رشد، پرولین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کارایی فتوسنتز II در ارقام حساس و مقاوم برنج. زیست‌شناسی گیاهی ۱۳: ۹۶-۸۵.

خدابنده، ن. (۱۳۹۱) غلات. انتشارات دانشگاه تهران. تهران.

فروودی، ر. (۱۳۹۲) بررسی اثر تنش شوری بر رشد و ویژگی‌های فیزیولوژیک نه رقم گندم در مرحله رشد رویشی. مجله فیزیولوژی گیاهان زراعی ۵: ۷۱-۸۶.

فروودی، ر.، جی‌لی، د. و معتمدی، م. (۱۳۹۵) بررسی رشد رویشی، پایداری غشای سلولی و تسهیم یون‌ها در ارقام برنج در شرایط تنش شوری. مجله فرایند و کارکرد گیاهی ۱۵: ۱۰۶-۹۱.

مختاری، ا. (۱۳۹۵) تأثیر تیمار سالیسیلیک اسید و طیف‌های مختلف نوری (آبی و قرمز) بر خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاه برنج تحت تنش شوری. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

مؤمنی، ع.، محمدیان، م. و نوری، م. (۱۳۸۸) ارزیابی مزرعه‌ای ژنوتیپ‌های برنج جهت تحمل به تنش شوری در مازندران. مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی ۲: ۱۴۴-۱۲۹.

- Abdallah, M. M. and Abdelgawad, Z. A. (2016) Alleviation of the adverse effects of salinity stress using trehalose in two rice varieties. *South African Journal of Botany* 103: 275-282.
- Adams Iii, W. W., Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T. N., Brightwell, A. K. and Ebbert, V. (2002) Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants. *Plant Biology* 4: 545-557.
- Arzani, A. and Ashraf, M. (2016) Smart engineering of genetic resources for enhanced salinity tolerance in crop plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 35: 146-189.
- Basu, S., Roychoudhury, A., Saha, P. P. and Sengupta, D. N. (2010) Differential antioxidative responses of indica rice cultivars to drought stress. *Plant Growth Regulation* 60: 51-59.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Bhattacharjee, S. and Mukherjee, A. K. (2002) Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. *Seed Science and Technology* 30: 279-287.
- Blainski, A., Lopes, G. C. and De Mello, J. C. P. (2013) Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 18: 6852-6865.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- FAO. (2014) FAOSTAT. Available online at: <http://faostat3.fao.org/home/index.html/>. Accessed 2 January 2019.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Ghosh, N., Adak, M. K., Ghosh, P. D., Gupta, S., Gupta, D. N. S. and Mandal, C. (2011) Differential responses of two rice varieties to salt stress. *Plant Biotechnology Reports* 5: 89-103.
- Grace, S. C. and Logan, B. A. (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of Royal Society of London B Biological Science* 355: 1499-1510.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology* 51: 463-499.
- He, J., Ren, Y., Chen, X. and Chen, H. (2014) Protective roles of nitric oxide on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108: 114-119.
- Hernandez, J. A. and Almansa, M. S. (2002) Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum* 115: 251-257.
- Hoai, N. T. T., Shim, I. S., Kobayashi, K. and Kenji, U. (2003) Accumulation of some nitrogen compounds in response to salt stress and their relationships with salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation* 41: 159-164.
- Hoang, T., Tran, T., Nguyen, T., Williams, B., Wurm, P., Bellairs, S. and Mundree, S. (2016) Improvement of salinity stress tolerance in rice: challenges and opportunities. *Agronomy* 6: 54-60.
- Ithal, N. and Reddy, A. R. (2004) Rice flavonoid pathway genes, OsDfr and OsAns, are induced by dehydration, high

- salt and ABA, and contain stress responsive promoter elements that interact with the transcription activator, OsC1-MYB. *Plant Science* 166: 1505-1513.
- Jana, S. and Choudhuri, M. A. (1981) Glycolate metabolism of three submersed aquatic angiosperms: effect of heavy metals. *Aquatic Botany* 11: 67-77.
- Kibria, M. G., Hossain, M., Murata, Y. and Hoque, M. A. (2017) Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. *Rice Science* 24: 155-162.
- Kumar, V., Shriram, V., Nikam, T. D., Jawali, N. and Shitole, M. G. (2008) Sodium chloride-induced changes in mineral nutrients and proline accumulation in indica rice cultivars differing in salt tolerance. *Journal of Plant Nutrition* 3: 1999-2017.
- Li, Q. Y., Niu, H., Bin Yin, J., Wang, M. Ben Shao, H. B., Deng, D. Z., Chen, X. X., Ren, J. P. and Li, Y. C. (2008) Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* 65: 220-225.
- Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols In Food Analytical Chemistry* 1.
- Lutts, S., Kinet, J. M. and Bouharmont, J. (1996) NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany* 78: 389-398.
- Lutts, S., Kinet, J. M. and Bouharmont, J. (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany* 46: 1843-1852.
- Mohammadi-Nejad, G., Singh, R. K., Arzani, A., Sabouri, H., Gregorio, G. B., and Rezaie, A. M. (2012) Evaluation of salinity tolerance in rice genotypes. *International Journal of Plant Production* 4: 199-208.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- Murillo-Amador, B., Lopez-Aguilar, R., Kaya, C., Larrinaga-Mayoral, J. and Flores-Hernandez, A. (2002) Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188: 235-247.
- Nasin, A. M., Yeasmin, L., Gantait, S., Goswami, R. and Chakraborty, S. (2014) Screening of rice landraces for salinity tolerance at seedling stage through morphological and molecular markers. *Physiological and Molecular Biology Plants* 20: 411-423.
- Noppawan, N., Jonaliza, L., Theerayut, S., Supachitra, T. and Piyada, T. C. (2016) Salt-responsive mechanisms in chromosome segment substitution lines of rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Plant Physiology and Biochemistry* 103: 96-105.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. H. (2001) Antioxidants in food: practical applications. CRC press.
- Reddy, I. N. B. L., Kim, B. K., Yoon, I. S., Kim, K. H. and Kwon, T. R. (2017) Salt tolerance in rice: Focus on mechanisms and approaches. *Rice Science*. 24: 123-144.
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T. and Holaday, A. S. (1990) Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing drought resistance. *Crop Science* 30: 105-111.
- RoyChoudhury, A., Roy, C. and Sengupta, D. N. (2007) Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous lea gene Rab16A from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Reports* 26: 1839-1859.
- Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. C. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
- Sanjukta, S., Rai, A. K., Muhammed, A., Jeyaram, K. and Talukdar, N. C. (2015) Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. *Journal of Functional Foods* 14: 650-658.
- Shrivastava, P. and Kumar, R. (2015) Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Science* 22: 123-131.
- Singh, N. K., Bracker, C. A., Hasegawa, P. M., Handa, A. K., Buckel, S., Hermodson, M. A., Pfankoch, E. D., Regnier, F. E. and Bressan, R. A. (1987) Characterization of osmotin A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiology* 85: 529-536.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64: 555-559.

Physiological and biochemical evaluation of sixth generation of rice (*Oryza sativa* L.) mutant lines under salinity stress

Seyede Roghie Ghadirnezhad Shiade¹, Mohammadali Esmaeili^{2*}, Hemmatollah Pirdashti² and Ghorban Ali Nematzadeh³

¹Department of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

²Department of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

³Department of Plant breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.

(Received: 16/01/2019, Accepted: 01/05/2019)

Abstract

In order to evaluate the physiology and biochemistry of sixth generation of rice mutant tolerant lines under salinity stress, an experiment was carried out as split plot arranged in a Completely Randomized Design with four replications. Main factor of experiment included three levels of salt stress (0, 45, 75 mmol/l) and sub factor included 5 local rice mutant lines contain Tarom Hashemi 1, Tarom Hashemi 2, Tarom Hashemi 3, Tarom Chalooosi and promising Nemat. The results of analysis of variance of interaction salt stress and rice mutant lines showed that affect of interaction on the studied traits was significant. In comparison with other lines, the results of experiment showed that Nemat under all levels of salt stress had the highest content of Proline that was accompanied with decrease of protein activity in this line. Catalase and Guaiacol peroxidase activity under stress condition increased and there was fewer amount of Malondialdehyde and ionic leakage. Considering the positive and significant correlation between dry weight of rice lines with Proline content ($r = 0.36^*$), Catalase ($r = 0.49^{**}$), and Guaiacol peroxidase ($r = 0.51^{**}$) and negative correlation with Protein content ($r = -0.29^*$) and Malondialdehyde ($r = -0.36^*$) it seemed to suggest that the Nemat mutant could be as the most tolerant line, since the resistance mechanism of this line involves osmotic regulation and increasing the amount of proline amino acids through protein degradation and catalase enzymatic system, so these traits can be considered as basic mechanisms for tolerance to salinity.

Keywords: Antioxidant activities, Biochemical traits, Correlation, Mutant line, Physiological traits, Salt stress