

## تأثیر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوای کلروفیل برگ در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به شوری گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)

سمیه کریمی، احمد ارزانی\* و قدرت الله سعیدی

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۲/۰۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۱۱/۱۹)

### چکیده:

تنش شوری از جمله عوامل مهم محیطی است که موجب کاهش رشد و عملکرد گیاهان بویژه در مناطق خشک و نیمه خشک جهان گردیده است. فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان بعنوان یکی از مکانیسم‌های دفاعی در راستای تحمل به شوری عمل می‌کند. تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز، محتوای نسبی آب و غلظت کلروفیل و کارتنوئید در هشت ژنوتیپ گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) که از نظر تحمل به تنش شوری (۴ ژنوتیپ متحمل و ۴ ژنوتیپ حساس) متفاوت بودند، مورد مقایسه قرار گرفت. این تحقیق به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای و کشت ماسه‌ای انجام شد، که تیمار شوری در پنج سطح با استفاده از کلوروسدیم در محلول غذایی هوگلند در سطوح شوری ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار اعمال گردید. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر شوری، ژنوتیپ و اثر متقابل شوری × ژنوتیپ بر همه صفات مورد مطالعه معنی‌دار بوده است. شوری منجر به افزایش محتوای کلروفیل و کارتنوئید برگ و فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاهش محتوای نسبی آب و فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. ژنوتیپ‌های حساس از میزان فعالیت کمتر آنزیم کاتالاز برخوردار بودند. تحت شرایط تنش شوری میزان کلروفیل در ژنوتیپ‌های متحمل به شوری بالاتر از میزان آن در ژنوتیپ‌های حساس به شوری بود. ژنوتیپ PI-506426 بعنوان متحمل‌ترین، حاوی بیشترین محتوای رنگدانه‌های برگ در شرایط حداکثر شوری نیز بود.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، تنش شوری، کاتالاز، کارتنوئید، کلروفیل، گلرنگ

### مقدمه:

(Lee et al., 2002). اخیراً گزارش شده است که عصاره گل گلرنگ دارای خاصیت‌های آنتی‌اکسیدان، آنتی‌باکتریال، ضدالتهاب، ضدافسردگی و همچنین ضدسرطان می‌باشد (Asgarpanah and Kazemivash, 2013). تنش شوری یکی از مهمترین عوامل محدود کننده رشد و تولید گیاهان زراعی در بیشتر مناطق خشک و نیمه خشک جهان است. آثار شوری بر گیاهان شامل ممانعت از رشد و تولید، کاهش فتوسنتز، تنفس وستز پروتئین‌ها و در نهایت، در سطوح بالاتر تنش شوری، مرگ است. بنابراین انتخاب و

گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) امروزه برای استفاده از شاخ و برگ، گل و دانه (استحصال روغن و غذای پرندگان) مورد کشت قرار می‌گیرد. خواص و ویژگی‌های بیولوژیکی گلرنگ از آن یک محصول چند منظوره مفید ساخته است (Bowles et al., 2010). به عنوان مثال روغن گلرنگ غنی از لینولئیک اسید می‌باشد که سطح کلسترول خون را کاهش می‌دهد و همچنین در درمان پوکی استخوان و دردهای مفاصل ناشی از آرتروز بسیار مفید شناخته شده است

دیگر ارقام متحمل به شوری از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های مختلف سازوکار دفاعی بهتری در برابر تنش اکسیداتیو نسبت به ارقام حساس نشان داده‌اند (Gossett *et al.*, 1994; Hernandez and Almansa, 2002; Koca *et al.*, 2007; Yildiz and Terzi, 2013; Sairam *et al.*, 2002).

ریشه‌های قوی، مستقیم و توسعه یافته و همچنین تعداد زیاد ریشه‌های جانبی در گیاه گلرنگ نه تنها یکی از عوامل مهم در ایجاد تحمل به خشکی در این گیاه می‌باشد بلکه به علت دوری از تجمع املاحی که در سطح خاک در نتیجه تعرق بیش از اندازه اتفاق افتاده است منجر به افزایش توان گیاه گلرنگ در برابر تنش شوری می‌گردد، چرا که خسارت شوری بر گیاه از طریق کاهش پتانسیل آب خاک و ایجاد خشکی فیزیولوژیک را به تعویق می‌اندازد (Maas, 1986). اگرچه عملکرد گلرنگ عموماً در سطوح بالای شوری خاک کاهش پیدا می‌کند، استفاده از آب شور به منظور آبیاری اثرات متفاوتی دارد (Francois *et al.*, 1964; Bassil and Kaffka, 2002).

گزارشات متعدد نشان می‌دهد که کاهش در رشد و عملکرد گلرنگ در اثر تنش شوری به علت برخی تغییرات در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از جمله، تعادل یونی و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان رخ داده‌است (Karray-Bourouai *et al.*, 2011; Siddiqi *et al.*, 2011). بررسی پارامترهای مناسب به عنوان معیار گزینش برای تحمل به شوری در ارقام مختلف گلرنگ نشان داده‌است که تفاوت در سرعت جذب CO<sub>2</sub> و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a و b می‌تواند به عنوان معیارهای اصلی گزینش ارقام متحمل به شوری مورد استفاده قرار بگیرند (Siddiqi *et al.*, 2009). Karray-Bourouai و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (پلی‌فنول‌ها) در دو ژنوتیپ گلرنگ بهتر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان توانسته‌است آن‌ها را از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش شوری مصون بدارد. از سوی دیگر Siddiqi و همکاران (۲۰۱۱) مقاومت بیشتر یک توده‌ی گلرنگ (safflower-39) را به خروج یون‌های Na<sup>+</sup> و Cl<sup>-</sup>، تجمع بیشتر K<sup>+</sup> و پرولین و همچنین افزایش فعالیت

شناسایی خصوصیات گیاهان متحمل به تنش شوری برای افزایش تولید گیاهان زراعی در این مناطق بسیار حائز اهمیت می‌باشد. افزایش غلظت نمک در محیط باعث عدم تعادل یونی سلولی می‌شود که در نهایت منجر به سمیت یونی، تنش اسمزی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) می‌گردد (Arzani, 2008). گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)، پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) و رادیکال‌های آزاد (OH) به طور معمول در کلروپلاست و میتوکندری تولید می‌شوند و موجب تخریب کلروفیل، پروتئین، DNA، لیپیدها و سایر ماکرومولکول‌های مهم می‌گردد که به شدت سوخت و ساز گیاهی و رشد و عملکرد را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Sairam and Tyagi, 2004). گیاهان مختلف راهکارهای متفاوتی را برای مقابله با تنش شوری در پیش می‌گیرند که می‌تواند شامل فعال سازی سیستم نقل و انتقالات یونی، تنظیمات اسمزی، ایجاد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و یا ترکیبی از سازوکارهای فوق باشد.

تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان نشان داده است که به طور بسیار کارآمدی، اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن را برطرف می‌نماید (Ashraf and Harris, 2004). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) مهمترین آنزیمی است که رادیکال سوپراکسید را منهدم می‌سازد و H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و O<sub>2</sub> تولید می‌نماید. سپس H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تولید شده توسط آنزیم کاتالاز و انواع مختلفی از پراکسیداز حذف می‌گردد (Mittler, 2002). کاتالاز که عمدتاً در پراکسیزوم‌ها یافت می‌شود اصلی‌ترین آنزیمی است که به طور مستقیم H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را به مولکول آب و O<sub>2</sub> تبدیل می‌کند. پراکسیدازها در خارج از سلول توزیع شده‌اند و تبدیل H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به آب را تسریع می‌نمایند. تعادل میان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یک فاکتور اساسی و بحرانی برای تعیین سطح پایدار رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن است. این تعادل برای جلوگیری از تشکیل بیش از اندازه رادیکال‌های هیدروکسیل بسیار مهم است (Mittler, 2002). مطالعات مختلفی نشان داده‌است که مقاومت به تنش اکسیداتیو تا حد زیادی با مقاومت به شوری در گیاهان مرتبط می‌باشد؛ به بیان

۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار با استفاده از نمک کلرور سدیم (NaCl) اعمال گردید. محلول‌ها با اضافه کردن تدریجی نمک به میزان ۵۰ میلی‌مولار در هر سطح (جهت سازگار شدن گیاهان) به غلظت نهایی رسیدند و پس از گذشت یک هفته کل تیمار شوری بر روی ژنوتیپ‌ها آغاز شد. پس از گذشت ۳۰ روز از آغاز تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار، در مرحله ۶ برگی گیاهان هر تیمار به طور همزمان و در هر تکرار ۱۰ گیاهچه برداشت شدند و به صورت توده‌ای و با یک نمونه اندازه‌گیری‌های زیر بر روی آن‌ها صورت گرفت.

#### میزان نسبی آب برگ، محتوای کلروفیل و کارتنوئید: جهت

بررسی صفات فیزیولوژیک پس از اعمال تنش شوری، از جوان‌ترین برگ‌های توسعه یافته در سطح فوقانی گیاه نمونه برداری شد. نمونه‌های برگ تازه برای اندازه‌گیری میزان نسبی آب برگ و محتوای کلروفیل استفاده گردید و سایر نمونه‌ها در ازت مایع منجمد شده و تا زمان استخراج آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

میزان نسبی آب برگ با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:

(Gonzalez and Gonzalez-Vilar, 2003)

$$\text{میزان نسبی آب برگ} = \frac{\text{وزن خشک برگ} - \text{وزن برگ تازه}}{\text{وزن خشک برگ}} \times 100$$

محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کل کلروفیل و کارتنوئید برگ با استفاده از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استخراج و اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب ۰/۵ گرم برگ در ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ هموژنیزه و از کاغذ صافی عبور داده شد. مقدار جذب مایع صاف شده در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر در دستگاه UV-اسپکتروفوتومتر (U-1800 Hitachi Japan) قرائت و با استفاده از فرمول‌های استاندارد زیر مقادیر هر کدام از صفات فوق محاسبه گردید:

$$a = [(13.36A_{663.2} - 5.19A_{646.8}) \times 8.1] / FW$$

$$b = [(27.43A_{646.8} - 8.12A_{663.2}) \times 8.1] / FW$$

$$a+b = [(5.24A_{663.2} + 22.24A_{646.8}) \times 8.1] / FW$$

$$FW = [(4.785A_{470} + 3.657A_{663.2} - 12.76A_{646.8}) \times 8.1] / \text{کارتنوئید}$$

$$A_{663.2} = \text{مقدار جذب در طول موج } 663/2 \text{ نانومتر، } A_{646.8}$$

آنزیم کاتالاز نسبت داده‌اند. جوادی‌پور و همکاران (۱۳۹۱) نشان دادند که میزان پرولین و گلیسین بتائین نسبت به سایر صفات بررسی شده توسط این محققین در اعطای مقاومت به شوری در رقم گلرنگ گلدشت مؤثرتر بوده‌اند.

تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف در فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها، مواد بیوشیمیایی و تغییرات یونی می‌تواند منعکس کننده نیازهای متفاوت برای مقابله با تنش شوری باشد. بنابراین، هدف مطالعه حاضر ارزیابی تاثیر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، محتوای رنگدانه‌ها و محتوای آب نسبی برگ در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به شوری در گلرنگ، و شناسایی معیار گزینش برای تحمل به شوری بوده است.

#### مواد و روش‌ها:

##### موادگیاهی و شرایط کشت: این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان در سال ۱۳۹۱ با متوسط دمای روز  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و دمای شب  $15/5 \pm 2/1$  درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۳ الی ۱۳/۵ ساعت انجام گرفت. هشت ژنوتیپ گلرنگ، شامل چهار ژنوتیپ متحمل به شوری (PI-301055, Kurdistan 6, PI-506426, PI-405985 PI-Arak) و چهار ژنوتیپ حساس به شوری (PI-198844, C411, 307-S6-697)، براساس عملکرد روغن شان در شرایط تنش شوری و عدم تنش در آزمایشات مزرعه‌ای در طی دو فصل زراعی ۱۳۸۷-۱۳۸۸ انتخاب شدند (Yeilaghi et al., 2012). ژنوتیپ‌های PI-301055، PI-506426 و PI-198844 به ترتیب از ترکیه، چین و فرانسه و سایر ژنوتیپ‌ها دارای منشأ ایرانی می‌باشند. تیمار شوری به عنوان کرت اصلی و ژنوتیپ به عنوان کرت فرعی در نظر گرفته شد و آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. بذور هر ژنوتیپ در یک ردیف در سینی‌های گالوانیزه به ابعاد  $150 \times 50 \times 40$  سانتی‌متری حاوی ماسه شستشو داده شده کشت و با استفاده از محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند. تیمار شوری ۲۲ روز پس از جوانه‌زنی گیاهچه‌ها، در پنج سطح مختلف شوری ۰ (به عنوان شاهد)،

(GLM) صورت گرفت و میانگین‌ها با آزمون کمترین تفاوت‌های معنی‌دار ( $LSD_{5\%}$ ) مورد مقایسه قرار گرفتند.

### نتایج و بحث:

میزان نسبی آب برگ، محتوای کلروفیل و کارتنوئید: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱ و ۲) نشان داد که اثر شوری، ژنوتیپ و اثرمتقابل شوری  $\times$  ژنوتیپ بر همه صفات مورد مطالعه معنی‌دار بوده است. با افزایش شوری کاهش معنی‌داری در محتوای نسبی آب برگ مشاهده گردید (شکل ۱). اگرچه تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در شرایط شاهد معنی‌دار نبود ولی تحت تنش شوری این تفاوت بسیار معنی‌داری بود. در شرایط تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار ژنوتیپ Arak با  $67/8$  درصد کمترین محتوای نسبی آب برگ را دارا بود (شکل ۱). اگرچه روند کاهش محتوای نسبی آب برگ در پاسخ به تنش شوری در تمام ژنوتیپ‌های مورد بررسی مشاهده شد ولی تفاوتی در روند پاسخگویی ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به تنش شوری از این نظر وجود نداشت. دیگر مطالعات انجام شده بر روی گلرنگ نیز نشان می‌دهد که اگرچه اثر تنش شوری بر کاهش محتوای نسبی آب برگ معنی‌دار بوده‌است و علاوه بر این توده‌ها و رقم‌های مختلف نیز تفاوت‌های معنی‌داری از نظر این صفت داشته‌اند، اما تفاوت میان آن‌ها چندان قابل توجه نبوده‌است (Siddiqi and Ashraf, 2008). به عبارت دیگر هیچ ارتباطی میان کاهش محتوای نسبی آب و کاهش وزن تر اندام هوایی لاین‌های گلرنگ گزارش نشده‌است.

نتایج تجزیه واریانس ارائه شده در جدول ۱ و ۲ نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری از نظر غلظت رنگدانه‌های برگ داشته‌اند. ضمن اینکه تأثیر شوری بر این صفت معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۲) نشان داد که با افزایش تنش شوری غلظت رنگدانه‌ها در همه‌ی ژنوتیپ‌ها به استثنای 307-S6-697 افزایش یافت. در سطح تنش ۵۰ میلی مولار نمک طعام بیشترین درصد افزایش کلروفیل و کارتنوئید مشاهده گردید؛ درحالی‌که در سطوح تنش بالاتر غلظت رنگدانه‌ها به طور جزئی افزایش یافت. به

مقدار جذب در طول موج  $646/8$  نانومتر،  $A_{470}$  = مقدار جذب در طول موج  $470$  نانومتر،  $FW$  = وزن تازه برگ  
**استخراج عصاره آنزیمی:** جهت تهیه عصاره آنزیمی برای تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از روش Aebi (۱۹۸۴) استفاده گردید. به همین منظور ابتدا ۱ گرم از بافت گیاهی منجمد شده با استفاده از ازت مایع در هاون چینی به طور کامل پودر شده و سپس با استفاده از یک میلی‌لیتر محلول سرد یخی شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات سدیم ( $7/8$  pH)،  $0/1$  میلی‌مولار EDTA، ۵ میلی‌مولار سیستئین، ۱ درصد (وزنی/حجمی) PVP، ۱۰۰ میلی‌مولار بافر Tris-HCl ( $7$  pH)، ۲۰ درصد گلیسرول و  $0/2$  درصد تریتون X-100 (حجمی/حجمی) هموژنیزه شدند. ماده هموژنیزه به مدت ۳۰ دقیقه در سانتیفریوژ یخچال‌دار در دمای  $4$  درجه سانتی‌گراد با دور  $18000$  g قرار گرفت. لایه شناور رویی پس از سانتیفریوژ برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت.

**سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز:** برای تعیین مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) استفاده شد. بدین ترتیب که ترکیبی از  $4/51$  میکرولیتر  $H_2O_2$  ۳۰ درصد، ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات  $0/05$  مولار ( $7$  pH) به همراه ۵۰ میکرولیتر از عصاره برگ تهیه گردید و سپس میزان جذب ترکیب حاصله در طول موج  $240$  نانومتر در مدت ۵ دقیقه هر دقیقه یکبار مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

**سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز:** جهت اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز از روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) استفاده شد. برای تهیه ترکیب واکنش از  $4/51$  میکرولیتر  $H_2O_2$  ۳۰ درصد، ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات  $0/05$  مولار ( $7$  pH)، به علاوه  $3/35$  میکرولیتر گایاکول به همراه ۵۰ میکرولیتر عصاره برگ استفاده گردید. سپس در طول موج  $470$  نانومتر در مدت ۵ دقیقه میزان جذب مخلوط واکنش فوق اندازه‌گیری شد.

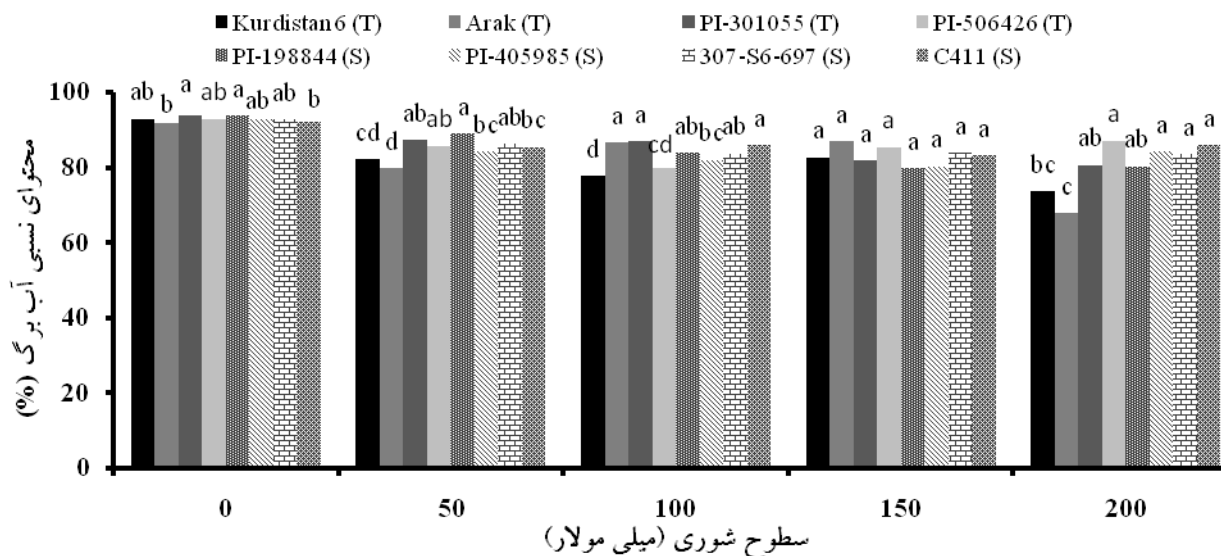
تجزیه واریانس داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (SAS Institute, 1997) و مدل عمومی خطی

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی اندازه گیری شده در ژنوتیپ‌های گلرنگ

میانگین مربعات							درجه آزادی	منبع تغییرات
آنزیم پراکسیداز	آنزیم کاتالاز	محتوای نسبی آب برگ	کارتنویید	کلروفیل a+b	کلروفیل b	کلروفیل a		
۰/۱۰	۰/۱۰×۱۰ <sup>-۳</sup>	۰/۴۲	۰/۹۸	۲۵/۱۸	۴/۰۲	۰/۷۲	۲	تکرار
۶/۱۲**	۱/۲۱×۱۰ <sup>-۳**</sup>	۵۳۱/۷۹**	۵/۲۴**	۳۵۲/۱۸**	۲۱/۲۱**	۱۸۹/۳۲**	۴	شوری
۰/۰۷	۰/۰۴×۱۰ <sup>-۳</sup>	۲۹/۴۵	۰/۶۱	۷/۳۵	۰/۹۵	۱/۸۳	۸	خطای فرعی
۷/۵۶**	۰/۸۷×۱۰ <sup>-۳**</sup>	۴۶/۶۰**	۱۱/۷۹**	۲۰۰/۴۵**	۱۵/۶۴**	۸۲/۸۲**	۷	ژنوتیپ
۲/۰۰**	۰/۳۸×۱۰ <sup>-۳**</sup>	۴۰/۴۷**	۴/۸۵**	۱۲۳/۲۴**	۹/۶۷**	۶۶/۹۷**	۲۸	شوری × ژنوتیپ
۰/۰۵	۱/۹۱×۱۰ <sup>-۳</sup>	۱۱/۲۶	۰/۸۰	۸/۹۶	۰/۹۹	۱/۴۵	۷۰	خطای اصلی
۱۱/۴۷	۲۷/۴۱	۳/۹۵	۲۲/۲۵	۱۹/۸۱	۲۰/۹۲	۱۱/۷۲		ضریب تغییرات (%)

جدول ۲- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس برش‌دهی اثر سطوح شوری بر صفات فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های گلرنگ

میانگین مربعات							درجه آزادی	شوری (میلی مولار)
آنزیم پراکسیداز	آنزیم کاتالاز	محتوای نسبی آب برگ	کارتنویید	کلروفیل a+b	کلروفیل b	کلروفیل a		
۳/۱۱**	۱/۲۰×۱۰ <sup>-۳**</sup>	۱/۳۶	۲/۵۳**	۶۹/۲۴**	۴/۹۹**	۳۲/۰۳**	۷	۰
۳/۶۵**	۰/۱۹×۱۰ <sup>-۳**</sup>	۲۵/۹۳*	۷/۵۹**	۱۸۸/۸۸**	۱۵/۷۳**	۸۴/۲۵**	۷	۵۰
۲/۵۴**	۰/۲۶×۱۰ <sup>-۳**</sup>	۳۱/۸۲*	۵/۲۵**	۷۱/۴۷**	۵/۷۵**	۲۸/۹۹**	۷	۱۰۰
۲/۴۵**	۰/۳۱×۱۰ <sup>-۳**</sup>	۱۸/۳۵	۱۰/۸۷**	۱۸۸/۳۳**	۱۴/۳۴**	۱۰۴/۴۱**	۷	۱۵۰
۳/۸۲**	۰/۴۳×۱۰ <sup>-۳**</sup>	۱۳۱/۰۰**	۴/۹۴**	۱۷۵/۴۷**	۱۳/۵۲**	۱۰۱/۲۲**	۷	۲۰۰



شکل ۱- مقایسه میانگین برهمکنش سطوح شوری و ژنوتیپ بر محتوای رنگدانه‌های برگ در گلرنگ. حروف T و S در کنار ژنوتیپ‌ها به ترتیب نشان‌دهنده تحمل و حساسیت به تنش شوری می‌باشد (در هر سطح شوری حرف مشترک نشان‌دهنده عدم تفاوت آماری در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد).

طور استثنایی در ژنوتیپ 307-S6-697 همراه با افزایش شوری رنگدانه‌های کلروفیل و کارتنوئید روند کاهش نشان دادند. این در حالی است که این ژنوتیپ در شرایط شاهد بالاترین میزان رنگدانه‌ها را دارا می‌باشد (شکل ۲). در گیاهان حساس به تنش شوری مانند گندم (Poustini; Ehsanzadeh *et al.*, 2009)؛ (Ashraf and McNeilly, 2004) و برنج (et al., 2007)، کلزا (Kanawapee *et al.*, 2012) کاهش غلظت کلروفیل، در حالی که در گیاه متحمل به شوری چغندر قند افزایش غلظت کلروفیل تحت تنش شوری گزارش شده است (Jamil *et al.*, 2007; Dadkhah, 2011). برخلاف نتایج به دست آمده در این تحقیق Siddiqi و همکاران (۲۰۰۹) کاهش غلظت کلروفیل را در اثر تنش شوری در برخی از ارقام گلرنگ مشاهده نمودند. افزایش میزان کلروفیل در ژنوتیپ‌های گلرنگ می‌تواند نتیجه‌ی معکوس شوری بر سطح مخصوص برگ باشد که ژنوتیپ‌های تحت تأثیر شوری برگ‌های بزرگ‌تر و ضخیم‌تری دارند و یا ممکن است به علت افزایش تعداد کلروپلاست‌ها در برگ‌های تحت تأثیر تنش باشد (Jamil *et al.*, 2007).

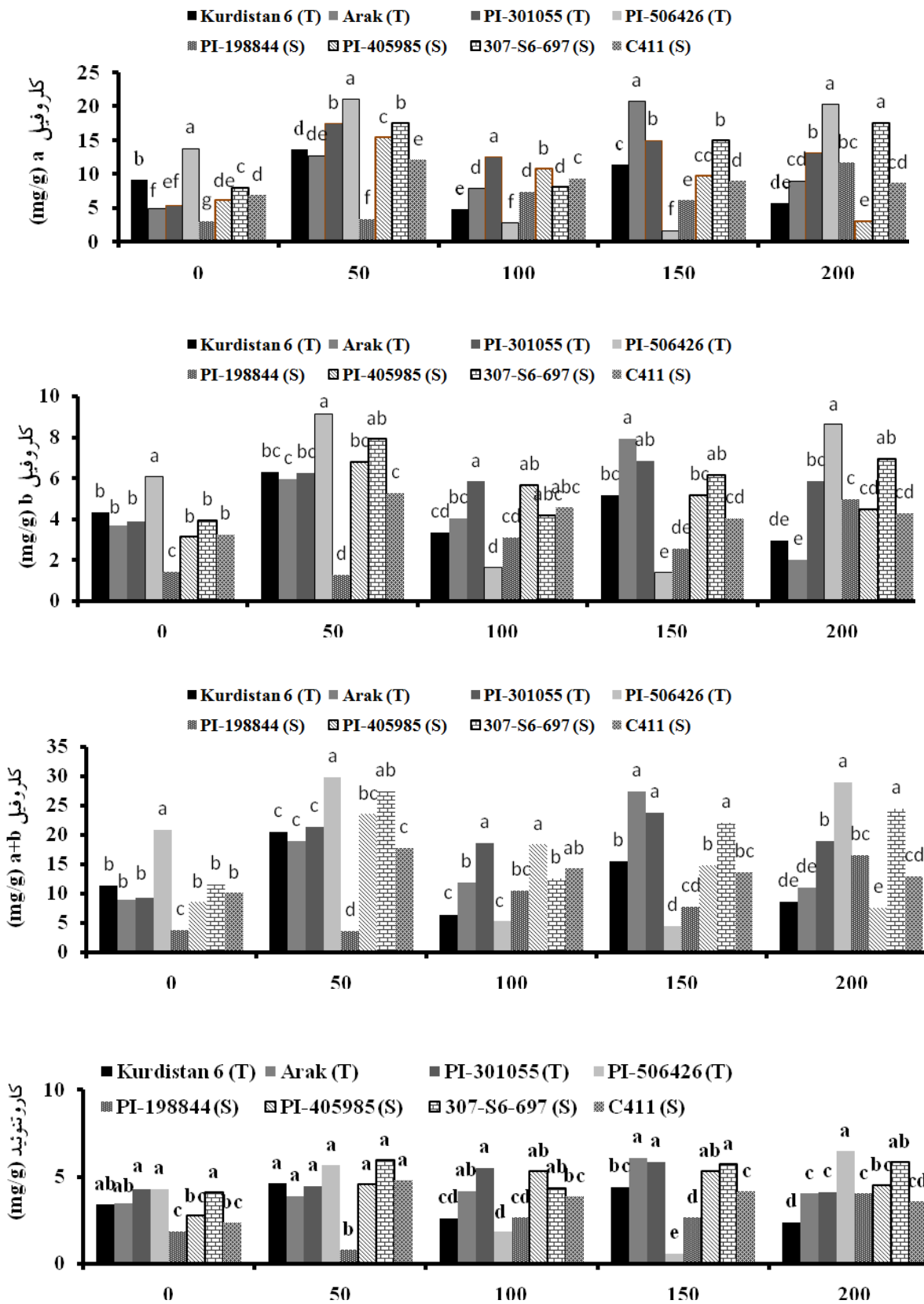
کارتنوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های بیولوژیکی نقش بسیار مهمی در حفاظت از بافت گیاهی ایفا می‌نمایند. عدم حضور کارتنوئیدها ممکن است باعث آسیب فتواکسیداتیو شدید در بافت گیاهی گردد (Gill and Tuteja, 2010). افزایش غلظت کارتنوئیدها همراه با افزایش سطح تنش شوری احتمالاً بخشی از سازوکارهای دفاعی گیاه در مقابله با تنش شوری می‌باشد. همانگونه که در ذرت و جو نشان داده شده است تحت تنش شوری ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس غلظت کارتنوئید بالاتری را دارا بودند (Kholova *et al.*, 2010)؛ (Yildiz and Terzi, 2013).

هرچند که در شرایط شاهد روند خاصی میان میزان رنگدانه‌های برگ‌گی و ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به شوری مشاهده نگردید؛ اما در تمام سطوح تنش شوری میزان کلروفیل در ژنوتیپ‌های متحمل به شوری بالاتر از میزان این صفات در ژنوتیپ‌های حساس به شوری بود. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که میزان رنگدانه‌های برگ‌گی در ژنوتیپ‌های

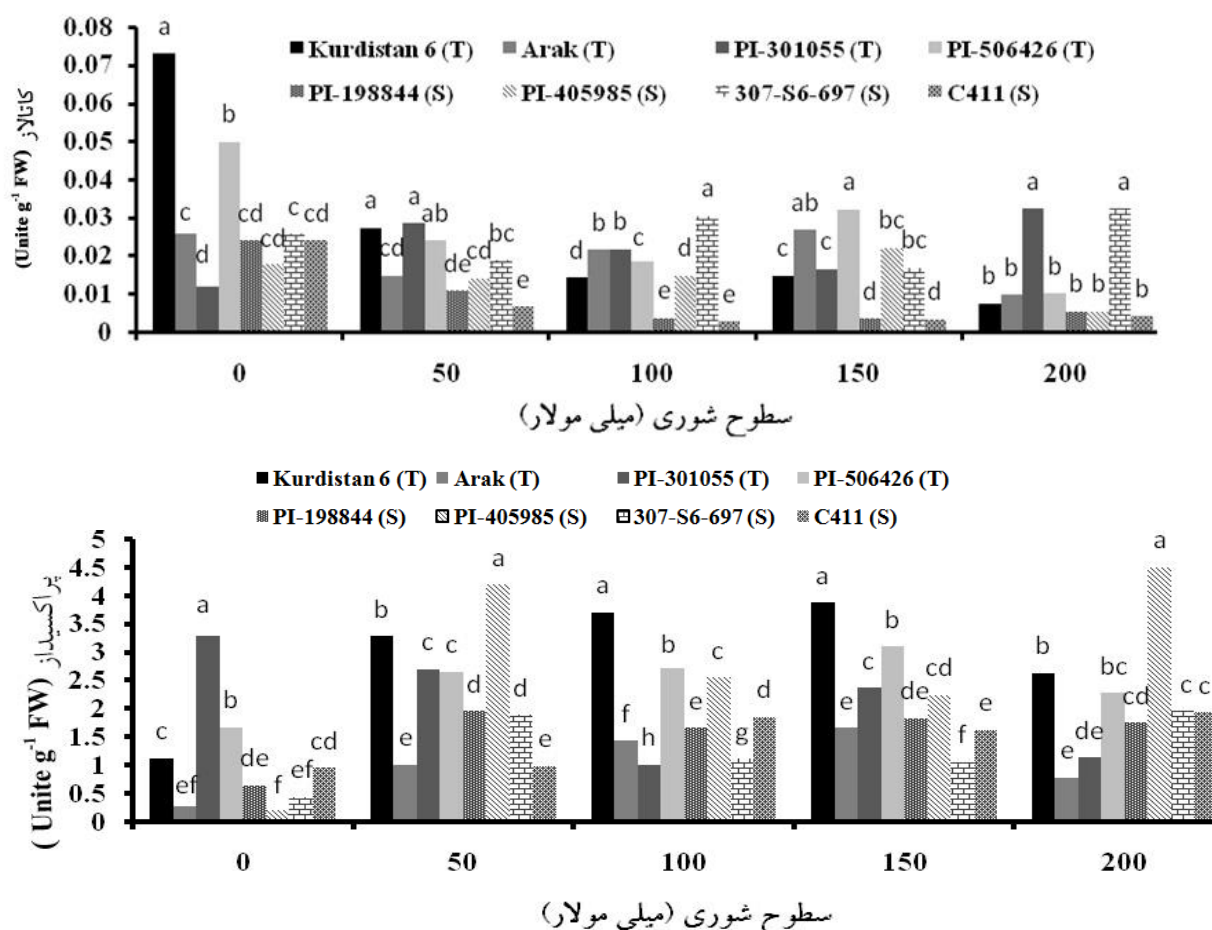
گلرنگ می‌تواند معیار خوبی برای سنجش تحمل یا حساسیت آن‌ها به تنش شوری باشد. Mittal و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده نمودند که گیاهان متحمل به شوری کلزا محتوای کلروفیل بالاتری در شرایط تنش شوری نسبت به ارقام حساس دارا بودند؛ همانگونه که در گندم و گلرنگ نیز میزان کلروفیل بالاتر در شرایط تنش شوری می‌تواند به عنوان معیار انتخاب برای اصلاح مقاومت به تنش شوری به کار گرفته شود (Cuin *et al.*, 2010; Siddiqi *et al.*, 2009).

**فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان:** نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان می‌دهد تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها، سطوح مختلف شوری و اثر متقابل این دو بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز وجود دارد. در سطوح مختلف تنش شوری، فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های گلرنگ به استثنای ژنوتیپ PI-301055 به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۳). در شرایط تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار برخلاف کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد، بالاترین میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ‌های متحمل مشاهده گردید. از سوی دیگر در تمامی سطوح تنش شوری همگام با افزایش شوری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمام ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به استثنای PI-301055 افزایش یافته است (شکل ۳). ژنوتیپ PI-301055 در شرایط شاهد کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و بالاترین فعالیت آنزیم پراکسیداز را دارا بود و با قرار گرفتن در شرایط تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار روند متفاوتی از سایر ژنوتیپ‌ها را نشان داد به طوری که بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در این ژنوتیپ مشاهده گردید.

Lee و همکاران (۲۰۰۱) با مطالعه‌ی واکنش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به تنش شوری در گیاه برنج مشاهده کردند که تنش موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز شده در حالی که فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش پیدا کرده است. Karray-Bouraoui و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند که تحت تنش شوری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم حساس به شوری گلرنگ کاهش



شکل ۲- مقایسه میانگین برهمکنش سطوح شوری و ژنوتیپ بر محتوای رنگدانه‌های برگ در گلرنگ. حروف T و S در کنار ژنوتیپ‌ها به ترتیب نشان‌دهنده تحمل و حساسیت به تنش شوری می‌باشد (در هر سطح شوری حرف مشترک نشان‌دهنده عدم تفاوت آماری در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد).



به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد که این امر می‌تواند موجب آسیب سلول‌ها و اجزای سلولی شود. در گیاهان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی هر دو در از بین بردن اثرات سوء گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارند (Munns and Tester, 2008). آنتی‌اکسیدان‌هایی با وزن مولکولی پایین، شامل توکوفرول‌ها و کارتنوئید، می‌توانند همه‌ی انواع گونه‌های فعال اکسیژن را غیرفعال نمایند (Gill and Tuteja, 2010). همچنین آنزیم‌هایی شامل سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز که با کاهش میزان  $H_2O_2$  و تبدیل نمودن آن به آب، نقش اساسی در دفع مسمومیت گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌نمایند (Munns and Tester, 2008).

چنین به نظر می‌رسد که در مطالعه‌ی حاضر در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تنش شوری باعث غیرفعال شدن

یافت در حالی که در رقم متحمل افزایش داشت، و فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو رقم به طور معنی داری افزایش یافته‌است. از سوی دیگر Siddiqi و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که فعالیت هر دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در دو رقم متحمل و حساس به شوری گلرنگ افزایش یافت در حالی که ژنوتیپ حساس فعالیت پراکسیداز بالاتر و ژنوتیپ متحمل فعالیت کاتالاز بالاتری داشتند. در هر صورت اگرچه روند فعال شدن آنزیم کاتالاز در اثر تنش شوری در مطالعات انجام شده بر روی گلرنگ متفاوت بوده ولی نتیجه کلی نشان دهنده فعالیت بیشتر آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های مقاوم تحت شرایط شور می‌باشد.

وقتی گیاه در معرض تنش‌های محیطی نامطلوب مختلف از جمله شوری قرار می‌گیرد تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)



هست تا بتوان به دلایل کاهش فعالیت این آنزیم پی برد.

### نتیجه‌گیری:

تنش شوری پدیده‌ای پیچیده است که شامل تنش اسمزی، سمیت یونی، کمبود عناصر غذایی می‌باشد و بنابراین بر سازوکارهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف مرتبط با رشد گیاه تأثیر بسزایی دارد. نتایج کریمی و همکاران (۲۰۱۴) در ارزیابی گلخانه‌ای ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به شوری گلرنگ که در مطالعه حاضر نیز استفاده شده است، تأیید کننده مطالعه غربال مزرعه شور (Yeilaghi *et al.*, 2012) بود، بدین ترتیب که ژنوتیپ‌های متحمل به شوری گلرنگ در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار از بالاترین میزان نسبت یونی  $K^+/Na^+$ ،  $Ca^{2+}/Na^+$  و وزن خشک اندام هوایی برخوردار بودند. تفاوت در واکنش به تنش شوری تأیید کننده ارزیابی‌های مزرعه‌ای در گروهبندی حساسیت و تحمل به تنش شوری در گیاهان گلرنگ مورد مطالعه بود. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نیز گروهبندی ژنوتیپ‌ها در مطالعات مزبور را تأیید کرد و نشان داد که واکنش ژنوتیپ‌های گلرنگ به تنش شوری تفاوت بسیار معنی‌داری داشت. بطوری که ژنوتیپ‌های متحمل به شوری گلرنگ بالاترین میزان رنگدانه‌های برگ و کارتنوئید را دارا بودند. ضمن اینکه فعالیت بیشتر آنزیم کاتالاز در شرایط تنش شوری در ژنوتیپ‌های متحمل مورد بررسی تأیید کننده کارا بودن مکانیسم تحمل مربوطه بوده است. بدین ترتیب که وجه تمایز در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بعنوان یکی از مکانیسم‌های تحمل تنش شوری در ژنوتیپ‌های متحمل را توجیه می‌نماید. در ضمن از میان صفات مورد مطالعه محتوای رنگدانه‌های برگ شامل کلروفیل و کارتنوئید، با توجه به سهولت سنجش و همچنین توانایی تفکیک ژنوتیپ‌های حساس و متحمل از یکدیگر، به عنوان یکی از معیارهای مناسب برای غربال ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به شوری در گلرنگ توصیه می‌شود. ژنوتیپ PI-506426 بعنوان متحمل-ترین، حاوی بیشترین محتوای رنگدانه‌های برگ در شرایط حداکثر شوری نیز بود.

آنزیم کاتالاز شده‌است در حالیکه باعث افزایش معنی داری در میزان فعالیت پراکسیداز گردید و عکس این روند در ژنوتیپ PI-301055 مشاهده می‌شود. کاهش بیشتر فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ‌های حساس گلرنگ نشان می‌دهد که فرآیند انهدام  $H_2O_2$  تولید شده در اثر تنش شوری در این ژنوتیپ‌ها از کارآمدی کمتری برخوردار است. از سوی دیگر افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان می‌دهد که فعالیت همزمان آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نقش اساسی در هضم رادیکال‌های سوپراکسید و  $H_2O_2$  ایفا می‌نماید. تفاوت روند فعالیت آنزیم‌ها در ژنوتیپ مقاوم به شوری PI-301055 نشان دهنده این واقعیت است که مشارکت فعال این آنزیم‌ها در ایجاد مقاومت به تنش شوری تا حد نسبتاً زیادی به میزان مقاومت ژنوتیپ‌هایی بستگی دارد که در معرض تنش اکسیداتیو ناشی از شوری قرار می‌گیرند (De Azevedo Neto *et al.*, 2006). بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که ژنوتیپ‌ها در پاسخ به تنش شوری فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوتی را انتخاب می‌نمایند. این تفاوت در سازوکار دفاعی نه تنها در گونه‌های گیاهی مختلف متفاوت است بلکه گاهی در ژنوتیپ‌ها و ارقام یک گونه‌ی گیاهی نیز متفاوت است. تفاوت در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ممکن است در نتیجه تفاوت ژنوتیپ‌ها در میزان بسته شدن روزنه‌ها و به تبع آن تغییر در میزان تثبیت دی‌اکسیدکربن باشد (Munns and Tester, 2008). Shim و همکاران (۲۰۰۳) عنوان کردند که کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز پدیده‌ای است که در بسیاری از گونه‌های گیاهی در اثر تنش اکسیداتیو روی می‌دهد و با تجمع سالیسیلیک اسید در گیاهان تحت تأثیر تنش مرتبط می‌باشد. این محققین نشان دادند که در ارقام گندم، برنج و خیار همبستگی بسیار بالایی بین افزایش سالیسیلیک اسید و کاهش فعالیت کاتالاز وجود دارد و چنین نتیجه‌گیری کردند که کاهش فعالیت کاتالاز در گیاهان تحت تأثیر تنش، یک امر ضروری برای غلبه بر آسیب‌های ناشی از تنش می‌باشد؛ به ویژه زمانی که فعالیت آنزیم کاتالاز یک عامل محدود کننده برای مهار گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد (Shim *et al.*, 2003). در هر صورت اطلاعات بیشتری لازم

## منابع:

- Francois, L. E., Yermanos, D. M. and Bernstein, L. (1964) Salt tolerance of safflower. *California Agriculture* 18: 12-14.
- 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.
- Gonzalez, L., and Gonzalez-Vilar, M. (2003) Determination of relative water content. In: *Handbook of plant ecophysiology techniques* (Eds. J. Manuel and R. Goger). Pp. 207-212, Kluwer Academic Publishers, London.
- Gossett, D. R., Millhollon, E. P. and Lucas, M. C. (1994) Antioxidant response to NaCl stress in salt tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. *Crop Science* 34: 706-714.
- 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.
- Jamil, M., Rehman, S. and Rha, E. S. (2007) Salinity Effect on plant growth, PSII photochemistry and chlorophyll content in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and cabbage (*Brassica oleracea capitata* L.) *Pakistan Journal of Botany* 39: 753-760.
- Karimi, S., Arzani, A., and Saeidi, G. (2014) Differential response of ion and osmolyte accumulation to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedling of safflower (*Carthamus Tinctorius* L.) *Research on Crops* 15 (in press).
- Kanawapee, N., Sanitchon, J., Lontom, W. and Threerakulpisut, P. (2012) Evaluation of salt tolerance at the seedling stage in rice genotypes by growth performance, ion accumulation, proline and chlorophyll content. *Plant and Soil* 358: 235-249.
- Karray-Bouraoui, N., Rabhi, M., Attia, H., Harbaoui, F., Jallali, I., Ksouri, R., Msilini, N. and Lachaâl, M. (2011) Different antioxidant responses to salt stress in two different provenances of *Carthamus tinctorius* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1435-1444.
- Kholova, J., Sairam, R. K. and Meena, R. C. (2010) Osmolytes and metal ions accumulation, oxidative stress and antioxidant enzymes activity as determinants of salinity stress tolerance in maize genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 477-486.
- Koca, H., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2007) The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 60 344-351.
- Lee, D. H., Kim, Y. S. and Lee, C. B. (2001) The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* 158: 737-745.
- جوادی پور، ز.، موحدی دهنوی، م. و بلوچی، ح. (۱۳۹۱) تغییرات میزان پرولین، فندهای محلول، گلیسین بتائین و پروتئین محلول برگ شش رقم گلرنگ بهاره تحت تنش شوری. *فرآیند و کارکرد گیاهی* ۱: ۱۳-۲۳.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Arzani, A. (2008) Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 44: 373-383.
- Asgarpanah, J. and Kazemivash, N. (2013) Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 19: 153-159.
- Ashraf, M. and Harris, P. J. C. (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.
- Ashraf, M. and McNeilly, T. (2004) Salinity tolerance in Brassica oilseeds. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23: 157 - 174.
- Bassil, E. S. and Kaffka, S. R. (2002) Response of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to saline soils and irrigation II. Crop response to salinity. *Agricultural Water Management* 54: 81-92.
- Bowles, V. G., Mayerhofer, R., Davis, C., Good, A. G. and Hall, J. C. (2010) A phylogenetic investigation of *Carthamus* combining sequence and microsatellite data. *Plant Systematics and Evolution* 287: 85-97.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalases and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Cuin, T. A., Parsons, D. and Shabala, S. (2010) Wheat cultivars can be screened for NaCl salinity tolerance by measuring leaf chlorophyll content and shoot sap potassium. *Functional Plant Biology* 37: 656-664.
- Dadkhah, A. (2011) Effect of salinity on growth and leaf photosynthesis of two sugar beet (*Beta vulgaris* l.) cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology* 13: 1001-1012.
- De Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., Abreu, C. E. B. d. and Gomes-Filho, E. (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 56: 87-94.
- Ehsanzadeh, P., Nekoonam, M. S., Azhar, J. N., Pourhadian, H. and Shaydaee, S. (2009) Growth, chlorophyll, and cation concentration of tetraploid wheat on a solution high in sodium chloride salt: hulled versus free-threshing genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 32: 58-70.

- SAS Institute (1997) SAS/STAT Software: Changes and Enhancements through Release 6.12. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1162 pp.
- Shim, I.-S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D.-W. and Usui, K. (2003) Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 39: 285-292.
- Siddiqi, E. H. and Ashraf, M. (2008) Can leaf water relation parameters be used as selection criteria for salt tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) *Pakistan Journal of Botany* 40: 221-228.
- Siddiqi, E. H., Ashraf, M., Al-Qurainy, F. and Akram, N. A. (2011) Salt-induced modulation in inorganic nutrients, antioxidant enzymes, proline content and seed oil composition in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 2785-2793.
- Siddiqi, E. H., Ashraf, M., Hussain, M. and Jamil, A. (2009) Assessment of inter-cultivar variation for salt tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using gas exchange characteristics as selection criteria. *Pakistan Journal of Botany* 41: 2251-2259.
- Yeilaghi, H., Arzani, A., Ghaderian, M., Fotovat, R., Feizi, M. and Pourdad, S. S. (2012) Effect of salinity on seed oil content and fatty acid composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. *Food Chemistry* 130: 618-625.
- Yildiz, M. and Terzi, H. (2013) Effect of NaCl stress on chlorophyll biosynthesis, proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive barley cultivars. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi-Journal of Agricultural Sciences* 19: 79-88.
- Lee, J. Y., Chang, E. J., Kim, H. J., Park, J. H. and Choi, S. W. (2002) Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*. *Archives of Pharmacal Research* 25: 313-319.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods Enzymol* (Eds R. Douce and L. Packer). Pp. 350-382, New York: Academic Press Inc.
- Maas, E. V. (1986) Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research* 1: 12-26.
- Mittal, S., Kumari, N. and Sharma, V. (2012) Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: Photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry* 54: 17-26.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Poustini, K., Siosemardeh, A. and Ranjbar, M. (2007) Proline accumulation as a response to salt stress in 30 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salt tolerance. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 925-934.
- Sairam, R. K. and Tyagi, A. (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* 86: 407-421.
- Sairam, R. K., Veerabhadra Rao, K. 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.