زیست‌شناسی گیاهی، سال چهارم، شماره سیزدهم، پاییز ۱۳۹۱، صفحه ۸۵-۹۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۲/۲۶
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۷/۰۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۱۱/۱۰
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۲/۲۰

اثر تنش شوری بر رشد، پرولین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کارآیی فتوسیستم II در ارقام حساس و مقاوم برنج

ناهید حبیب‌الهی، مجید مهدیه * و محمدرضا امیرجانی
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

چکیده

تنش شوری یکی از محدودیت‌های اصلی تولید غذا، به ویژه در مناطق آبیاری شده به حساب می‌آید. برنج به عنوان یک محصول اصلی غذایی نسبت به تنش شوری بسیار حساس است. مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیک برنج به شوری در ارقام مقاوم و حساس و همچنین، مقایسه تفاوت‌های بین این ارقام در پاسخ به شوری می‌تواند برای بهبود مقاومت به این تنش در برنامه‌های به‌نژادی استفاده شود. بدین منظور در این تحقیق، از دو رقم برنج ایرانی خزر (رقم حساس) و زاینده‌رود (رقم متحمل) که دارای مقاومت متفاوت به شوری بودند، استفاده شد. ابتدا درصد جوانه‌زنی بذرها در غلظت‌های متفاوت نمک NaCl (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) محاسبه شد. پس از آن عوامل رشد در نشاهای ۱۵ روزه محاسبه و غلظت مناسب نمک ۱۰۰ میلی‌مولار انتخاب شد. در مرحله بعد، میزان تجمع پرولین، فعالیت آنزیم کاتالاز و رنگدانه‌های فتوسنتزی و کارآیی فتوسیستم II در گیاهچه‌های ۲۵ روزه که به مدت ۹۶ ساعت تحت تنش ۱۰۰ میلی‌مولار نمک قرار گرفتند، اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک، درصد جوانه‌زنی در هر دو رقم به طور معنی‌داری کاهش یافت و این کاهش در رقم خزر چشمگیرتر بود. عوامل رشد به ویژه وزن تر و طول بخش هوایی و همچنین آب نسبی بخش هوایی در هر دو رقم در اثر تنش شوری کاهش یافت. نتایج نشان داد که تجمع پرولین در رقم زاینده‌رود نسبت به رقم خزر در اثر شوری ۱۰۰ میلی‌مولار بیشتر است. در گیاهان تحت تنش، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم زاینده‌رود به طور معنی‌داری افزایش یافت، در حالی که در رقم خزر تفاوت معنی‌دار با شاهد مشاهده نشد. میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی در رقم زاینده‌رود به طور معنی‌داری کاهش یافت، در حالی که در رقم خزر تفاوتی مشاهده نشد و برعکس، بازده کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) در شرایط تنش در رقم خزر به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت، در صورتی که در رقم زاینده‌رود تفاوت معنی‌داری بین تیمار و شاهد مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که میزان تجمع پرولین، فعالیت آنزیم کاتالاز و بازده فتوسیستم II از عوامل مؤثر بر مقاومت به شوری در برنج هستند.

واژه‌های کلیدی: برنج، پرولین، تنش شوری، کاتالاز، کارآیی فتوسیستم II

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: m-mahdiyeh@araku.ac.ir، شماره تماس: ۰۸۶۱۲۷۷۷۴۰۲

مقدمه

برنج یکی از مهم‌ترین غلات بوده، غذای اصلی یک سوم از جمعیت جهان را تشکیل می‌دهد، به طوری که در حدود یک پنجم از کل زمین‌های زیر کشت غلات را در جهان به خود اختصاص داده است (Chakravarthi and Naravaneni, 2006). برنج گیاهی حساس به شوری است (Grover and Pental, 2003). شوری بیش از حد به طور مضری همه فعالیت‌های متابولیک اصلی برنج را تحت تأثیر قرار می‌دهد که شامل خسارات دیواره سلولی، پلاسمولیز، تجزیه سیتوپلاسم و آسیب به شبکه آندوپلاسمی، تجمع سیترات، مالات و اینوزیتول در پهنک برگ، افزایش مقدار پرولین به اندازه ۴ تا ۲۰ برابر، کاهش حداکثری بازده کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm)، کاهش فتوسنتز و کاهش کلی در جوانه‌زنی و رشد نشاها، که در نهایت، به کاهش رشد و بازده دانه منجر می‌شود (Sahi *et al.*, 2006). بنابراین، تنش شوری به عنوان یکی از محدودیت‌های اصلی تولید این گیاه، به ویژه در مناطق آبیاری شده جهان در نظر گرفته می‌شود (Octávio *et al.*, 1999). تحقیقات نشان داده است که برنج در طی مراحل اولیه نشا نسبت به مراحل تولید مثلی حساسیت بیشتری به شوری دارد (Sahi *et al.*, 2006). مکانیسم‌های مقاومت به شوری در گیاهان عالی شامل تنظیم اسمزی، تعدیل یونی و تنظیم هورمونی است (Chinnusamy *et al.*, 2005). با این حال، برای بهبود مقاومت به شوری در گیاهان زراعی از طریق برنامه‌های به‌نژادی، بررسی بیشتر مکانیسم‌های دفاع در برابر شوری در ارقام حساس و مقاوم و مقایسه آنها با یکدیگر لازم است (Cha-um *et al.*, 2009). از آنجا که برنج محصول اصلی زراعی در کشور است، تحقیقات مختلفی در زمینه ارزیابی تحمل به شوری ارقام مختلف آن در کشور صورت گرفته است (صبوری و همکاران، ۱۳۸۷). در همه این مطالعات، غالباً ارزیابی مقاومت به شوری تنها در یک مرحله از حیات گیاه و اکثراً با توجه به درصد جوانه‌زنی و رشد نشا انجام شده است، لذا، هدف از تحقیق حاضر بررسی و مقایسه پاسخ‌های مختلف فیزیولوژیک در دو رقم حساس و مقاوم برنج نسبت به شوری در مراحل مختلف رشد گیاه است تا بتوان تصویر صحیحی از مقاومت این گیاه به شوری فراهم کرد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی بذر

بذرهای ارقام حساس (خزر) و متحمل (زاینده‌رود) برنج از مرکز تحقیقات برنج آمل تهیه شد. ابتدا بذرها با آب شسته شده و پوسته‌ها و بذرهای تو خالی جدا شدند، سپس بذرها با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و اتانول ۷۰ درصد برای ۵ دقیقه و کلرور جیوه ۰/۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شده، سپس بذرهای استریل به مدت یک شب در ظروف جداگانه در آب مقطر قرار گرفتند.

محاسبه درصد جوانه‌زنی

بذرهایی که به مدت یک شب در آب قرار گرفته بودند، به محیط‌های هوگلند ۱/۲ حاوی غلظت‌های مختلف نمک NaCl (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) منتقل شدند و هر روز، تعداد جوانه‌ها شمارش شد.

اندازه‌گیری عوامل رشد

به منظور سنجش عوامل رشد در شرایط تنش، پس از محاسبه درصد جوانه‌زنی و انتخاب غلظت‌های

مناسب شوری، عوامل رشد شامل طول بخش هوایی و ریشه و همچنین وزن تر و خشک در نشاهای ۱۵ روزه محاسبه شد. با توجه به نتایج درصد جوانه‌زنی و عوامل رشد، غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک به عنوان غلظت مناسب برای آزمایش‌های بیشتر بر گیاهان ۲۵ روزه و به مدت ۹۶ ساعت انتخاب شد.

مقدار آب نسبی

مقدار آب نسبی بر اساس روش Sumithra و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:

$$RWC\ (\%) = [(F_W-D_W)/(F_T-D_W)]\times 100$$

در این رابطه، RWC: آب نسبی؛ F_W: وزن تر بافت؛ D_W: وزن خشک و F_T: وزن بافت در حالت تورژسانس کامل است.

اندازه‌گیری کلروفیل

برای محاسبه مقدار کلروفیل، ۰/۱ گرم برگ تازه گیاهان شاهد و تیمار با استون ۸۰ درصد در تاریکی ساییده تا کاملاً سفید گردد. پس از صاف کردن محلول با استفاده از کاغذ صافی، عصاره حاصل با اضافه کردن استون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس جذب محلول در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت شد. با توجه به جذب ثبت شده از هر نمونه، مقدار کلروفیل a و b و کلروفیل کل بر حسب میلی‌گرم کلروفیل در گرم بافت برگ محاسبه گردید.

$$\text{کلروفیل a}=[۱۲/۷(A_{۶۶۳})-۲/۶۹(A_{۶۴۵})]\times V/۱۰۰۰\times W$$

$$\text{کلروفیل b}=[۲۲/۹(A_{۶۴۵})-۴/۶۸(A_{۶۶۳})]\times V/۱۰۰۰\times W$$

$$\text{کلروفیل کل}=[۲۰/۲(A_{۶۴۵})+۸/۰۲(A_{۶۶۳})]\times V/۱۰۰۰\times W$$

در این روابط، $A_{۶۶۳}$: میزان جذب در طول موج ۶۶۳ نانومتر؛ $A_{۶۴۵}$: میزان جذب در طول موج ۶۴۵ نانومتر؛ V: حجم محلول عصاره (بر حسب میلی‌لیتر) و W: وزن بافت گیاهی (بر حسب گرم) استفاده شده برای سنجش میزان کلروفیل است.

اندازه‌گیری کارآیی فتوسیستم II (Fv/Fm)

به منظور محاسبه کارآیی فتوسیستم II، ابتدا گیاه را به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده تا به شرایط تاریکی سازش یابد و کلروفیل‌های برانگیخته به حالت پایه خود برگردند. سپس با استفاده از دستگاه MiniPAM مدل WALZ، فلورسانس بیشینه (Fm) و فلورسانس متغیر (Fv) کلروفیل ثبت شد. در این آزمایش، برای هر تیمار سه تکرار و در هر تکرار پنج نمونه اندازه‌گیری شد.

تعیین میزان پرولین

اسید آمینه پرولین به روش Bates (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. ۰/۳ گرم بافت تازه از بخش هوایی گیاهان ۲۵ روزه که به مدت ۹۶ ساعت تحت تنش ۱۰۰ میلی‌مولار نمک قرار داشتند با ۱/۵ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد ساییده و عصاره حاصل سانتریفیوژ شد، سپس ۴۰۰ میکرولیتر از محلول شفاف رویی با ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین مخلوط شد و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم (دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد) قرار داده و سپس واکنش در حمام آب یخ متوقف شد. به این محلول ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و در حدود ۲۰ ثانیه به شدت به هم زده شد، سپس لوله‌های آزمایش برای مدتی ثابت نگه داشته شد تا دو فاز آن کاملاً از هم جدا شود. جذب فاز تولوئنی صورتی رنگ در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد میزان پرولین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز (APx)

۰/۱ گرم از برگ تازه گیاهان ۲۵ روزه که به مدت ۹۶ ساعت تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار قرار گرفته بودند، در یک میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۷/۸ حاوی یک میلی‌مولار EDTA در سردخانه ساییده شد، سپس محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و با دور g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ و از عصاره حاصل برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل و تعیین فعالیت آنزیمی استفاده شد. مقدار پروتئین کل با روش Lowry و همکارن (۱۹۵۱) تعیین و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Cakmak و Marschner (۱۹۹۲) محاسبه شد. به این منظور، سرعت مصرف H_2O_2 در ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به همراه ۲ میلی‌لیتر محلول بافر سدیم فسفات ۲۵ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ حاوی ۱۰ میلی‌مولار H_2O_2 به روش نورسنجی در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای یک دقیقه تعیین شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر طبق روش Chen و Asada (۱۹۸۹) تعیین شد. مخلوط واکنش مرکب از ۵۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم با اسیدیته ۷ حاوی یک میلی‌مولار NaN_3، ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات، ۱/۵۴ میلی‌مولار H_2O_2 و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره خام آنزیمی بود. اکسیداسیون آسکوربات توسط H_2O_2 شروع شد و کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه تعیین شد.

نتایج

با توجه به حساس بودن مرحله جوانه‌زنی برنج به شوری، به منظور بررسی پاسخ جوانه‌زنی دو رقم مختلف برنج (خزر و زاینده‌رود) به شوری، اثر غلظت‌های مختلف نمک NaCl (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) بر درصد جوانه‌زنی بذرهای برنج در مدت ۷ روز بررسی شد. نتایج نشان داد که سرعت جوانه‌زنی در هر دو رقم با افزایش غلظت نمک کاهش می‌یابد (جدول ۱). بیشترین درصد جوانه‌زنی در هر رقم گروه شاهد و غلظت ۵۰ میلی‌مولار نمک به دست آمد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار در رقم زاینده‌رود، درصد جوانه‌زنی پس از ۷ روز تیمار نسبت به شاهد کاهش یافت، با وجود این، این کاهش معنی‌دار (در سطح ۰/۰۵) نبود. در مقابل در رقم خزر، تیمار شوری ۱۰۰ میلی‌مولار، باعث کاهش معنی‌دار درصد جوانه‌زنی این رقم به میزان ۶۲ درصد شد که نسبت به شاهد خود ۳۱ درصد کاهش نشان داد. در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار، کاهش معنی‌دار (در سطح ۰/۰۵) درصد جوانه‌زنی رقم زاینده‌رود مشاهده شد (۲۷ درصد کاهش نسبت به شاهد). کمترین درصد جوانه‌زنی در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار در رقم خزر به دست آمد (۸۸ درصد کاهش نسبت به شاهد).

جدول ۱- میانگین درصد جوانه‌زنی بذرهای خزر و زاینده‌رود در محیط هوگلند شامل صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

تیمار	درصد جوانه‌زنی بذرها	
	زاینده‌رود	خزر
شاهد	۱۰۰ [a]	۹۰ ± ۵/۱ [bc]
۵۰ میلی‌مولار نمک	۱۰۰ [a]	۸۱/۱۱ ± ۳/۴ [cd]
۱۰۰ میلی‌مولار نمک	۹۷/۷۷ ± ۱/۷ [ab]	۶۲/۲۲ ± ۶/۸ [e]
۲۰۰ میلی‌مولار نمک	۷۳/۳۳ ± ۷/۸ [d]	۱۱/۱۱ ± ۳/۴ [f]

عوامل رشد

طول بخش هوایی

نتایج آزمایش، کاهش معنی‌دار طول بخش هوایی در هر دو رقم برنج تحت تنش شوری را نشان داد (شکل ۱- الف). بیشترین طول بخش هوایی به گیاهان شاهد (۱۹/۲۶ سانتی‌متر در رقم زاینده‌رود و ۱۵/۷۷ در رقم خزر) و کم‌ترین طول بخش هوایی به تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار نمک (۲/۵ سانتی‌متر در رقم خزر و ۳ سانتی‌متر در رقم زاینده‌رود) مربوط بود. غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نمک باعث کاهش معنی‌دار طول بخش هوایی در هر دو رقم خزر و زاینده‌رود (به ترتیب ۶۵ درصد و ۵۳ درصد کاهش نسبت به گیاهان شاهد) شد.

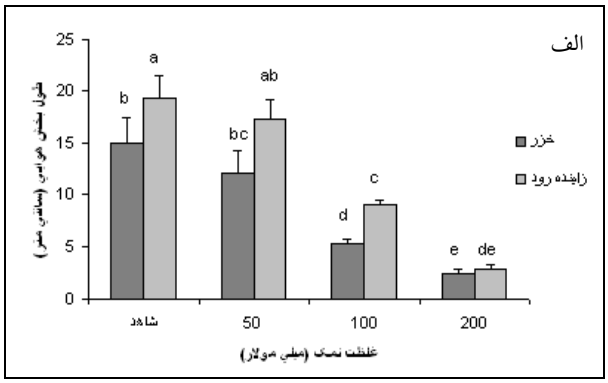
طول ریشه

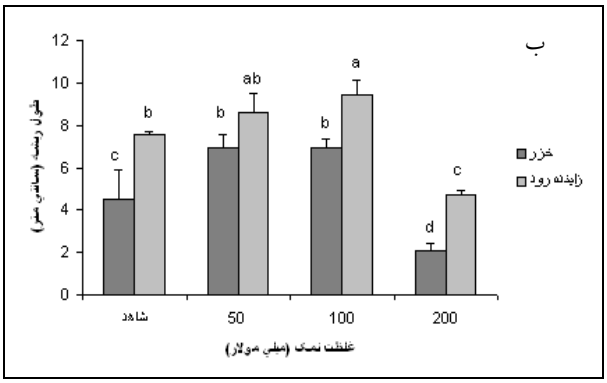
تنش شوری باعث افزایش معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) در طول ریشه در هر دو رقم برنج شد. بیشترین طول ریشه به گیاهان تحت تنش ۱۰۰ میلی‌مولار (۹/۴۶ سانتی‌متر در رقم زاینده‌رود و ۶/۹۶ سانتی‌متر در رقم خزر) و کم‌ترین طول، به تنش ۲۰۰ میلی‌مولار نمک (۴/۵ سانتی‌متر در رقم زاینده‌رود و ۲ سانتی‌متر در رقم خزر) مربوط بود. افزایش طول ریشه در اثر تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار در دو رقم خزر و زاینده‌رود به ترتیب ۵۴ درصد و ۲۶ درصد نسبت به گیاهان شاهد بود (شکل ۱- ب).

وزن تر ریشه و بخش هوایی

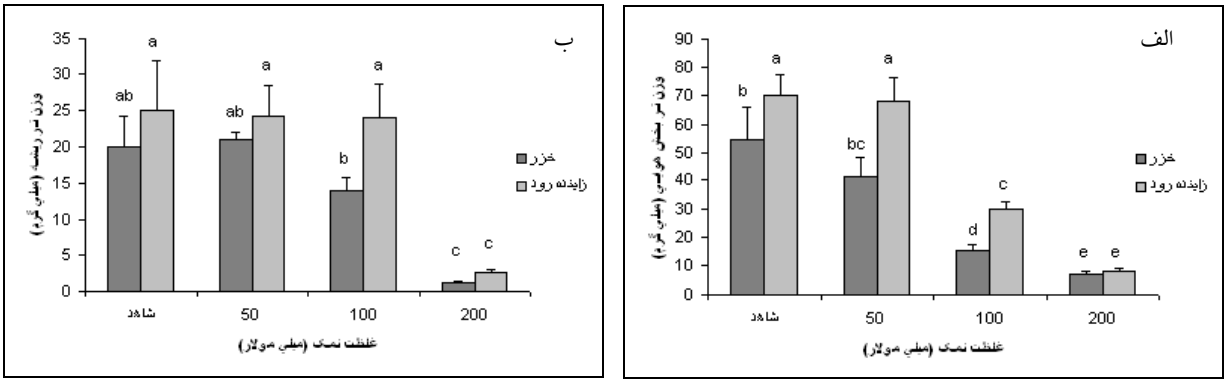
نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار (در سطح ۰/۰۵) وزن تر بخش هوایی هر دو رقم می‌شود. وزن تر بخش هوایی در گروه شاهد و گروه‌های تیماری ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار در رقم خزر به ترتیب ۵۴/۳، ۴۱/۴، ۱۵/۵ و ۶/۴ و در رقم زاینده‌رود به ترتیب ۷۰/۳، ۶۸/۱، ۳۰ و ۷/۶ میلی‌گرم به ازای هر گیاه بود (شکل ۲- الف).

در محاسبه وزن تر ریشه، تحلیل داده‌ها تفاوت معنی‌داری در وزن تر ریشه میان شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار را در هیچ یک از ارقام نشان نداد. ولی غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار شوری باعث کاهش معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) در وزن تر ریشه هر دو رقم شد (شکل ۲- ب).





شکل ۱- اثر شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl بر الف) طول بخش هوایی و ب) طول ریشه در ارقام خزر و زاینده‌رود. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۲- اثر شوری ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار NaCl بر الف) وزن تر بخش هوایی و ب) وزن تر ریشه در ارقام خزر و زاینده‌رود. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با استفاده از آزمون دانکن است.

وزن خشک ریشه و بخش هوایی

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک، وزن خشک ریشه و بخش هوایی گیاه برنج مانند وزن تر در هر دو رقم به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. کمترین وزن خشک ریشه در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار نمک در هر دو رقم حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با شاهد خود دارند (جدول ۲). به هر حال، تفاوت معنی‌داری در وزن خشک ریشه بین شوری ۱۰۰ میلی‌مولار در رقم خزر با شوری ۲۰۰ میلی‌مولار در رقم زاینده‌رود مشاهده نشد. به علاوه، تفاوت معنی‌داری در وزن خشک ریشه بین شوری ۵۰ میلی‌مولار با گروه شاهد در هر دو رقم دیده نشد.

کمترین وزن خشک بخش هوایی در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار هر دو رقم به دست آمد، هر چند که وزن خشک بخش هوایی رقم زاینده‌رود در تمام سطوح مختلف شوری به طور معنی‌داری بالاتر از رقم خزر بود (جدول ۲).

همانند ریشه نیز تفاوت معنی‌داری در وزن خشک بخش هوایی بین شوری ۵۰ میلی‌مولار و گروه شاهد در هر دو رقم مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲- اثر شوری بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه (بر حسب میلی‌گرم) ارقام خزر و زاینده‌رود برنج. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با استفاده از آزمون دانکن است.

رقم	غلظت نمک (میلی‌مولار)	وزن خشک بخش هوایی	وزن خشک ریشه
خزر	۰	۶/۹۳ ± ۱/۲۴ bc	۱/۸۲ ± ۰/۳۳ c
	۵۰	۶/۱۱ ± ۱/۱ c	۱/۶۸ ± ۰/۱۲ c
	۱۰۰	۳/۳۹ ± ۰/۴۴ d	۱/۱۸ ± ۰/۲۹ d
	۲۰۰	۲/۱ ± ۰/۲۱ e	۰/۵۶ ± ۰/۱۱ e
زاینده‌رود	۰	۹/۳۵ ± ۱/۱۱ a	۲/۳۷ ± ۰/۱۵ a
	۵۰	۹/۲۱ ± ۱/۳ a	۲/۳۳ ± ۰/۱۱ a
	۱۰۰	۶/۱۳ ± ۰/۵۹ c	۲/۱۱ ± ۰/۰۷ ab
	۲۰۰	۴/۴۳ ± ۰/۳۳ cd	۱/۱۱ ± ۰/۰۹ d

با توجه به داده‌های وزن خشک و تر گیاه و درصد جوانه‌زنی بذرهای دو رقم در شوری‌های مختلف به نظر می‌رسد شوری ۵۰ میلی‌مولار ضعیف و شوری ۲۰۰ میلی‌مولار برای هر دو رقم نسبتاً بالا است، لذا، شوری ۱۰۰ میلی‌مولار برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شد.

آب نسبی

بین آب نسبی بخش هوایی در دو رقم خزر و زاینده‌رود، هیچ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. تنش شوری باعث کاهش مقدار آب نسبی بخش هوایی رقم خزر و زاینده‌رود به ترتیب به میزان ۷۷/۵ درصد و ۷۹/۵ درصد شد. تحلیل آماری نتایج، کاهش معنی‌دار درصد آب نسبی در اثر تنش شوری را در هر دو رقم نشان داد (شکل ۳).

رنگدانه‌های فتوسنتزی

تفاوت معنی‌داری بین مقدار کلروفیل a در رقم خزر و زاینده‌رود مشاهده شد، به طوری که در گروه شاهد، مقدار کلروفیل a در برگ برنج زاینده‌رود ۳/۲۲ و در رقم خزر ۱/۳۰ میلی‌گرم کلروفیل بر گرم وزن تر بود. نتایج نشان داد که تنش شوری مقدار کلروفیل a را در هر دو رقم برنج کاهش می‌دهد. کاهش ناشی از تنش شوری در مقدار کلروفیل a رقم خزر، ۲۸ درصد بود که تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ با شاهد نشان نداد، در حالی که در رقم زاینده‌رود (۳۵ درصد کاهش نسبت به گیاهان شاهد)، کاهش معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ مشاهده شد. نتایج مشابهی برای کلروفیل b و کلروفیل کل نیز به دست آمد (جدول ۳).

کارآیی فتوسیستم II (Fv/Fm)

همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، نسبت Fv/Fm در گیاهان شاهد هر دو رقم خزر و زاینده‌رود تقریباً برابر است (۰/۸۷۵ در رقم خزر و ۰/۸۷۶ در رقم زاینده‌رود). تیمار شوری، نسبت Fv/Fm را در نشاهای برنج کاهش داد. درصد کاهش در رقم خزر ۲/۶ درصد و در رقم زاینده‌رود ۱/۳ درصد نسبت به گروه شاهد، محاسبه شد. تحلیل داده‌ها نشان داد که کاهش نسبت Fv/Fm، نسبت به گیاهان شاهد، در رقم خزر معنی‌دار ($P<0.05$) است، در حالی که در رقم زاینده‌رود معنی‌دار نیست.

جدول ۳- اثر شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نمک بر رنگدانه‌های فتوسنتزی (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در ارقام خزر و زاینده‌رود. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با استفاده از آزمون دانکن است.

رقم	تیمار	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a
خزر	شاهد	۱/۷ ± ۰/۳^{c}	۰/۴ ± ۰/۰۸^{c}	۱/۳ ± ۰/۲^{c}
	۱۰۰ میلی‌مولار	۱/۲ ± ۰/۱^{c}	۰/۳ ± ۰/۰۴^{c}	۰/۹ ± ۰/۱^{c}
زاینده‌رود	شاهد	۴/۲ ± ۰/۴^{a}	۱ ± ۰/۱^{a}	۳/۲ ± ۰/۳^{a}
	۱۰۰ میلی‌مولار	۲/۸ ± ۰/۴^{b}	۰/۷ ± ۰/۱۶^{b}	۲/۱ ± ۰/۴^{b}

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز

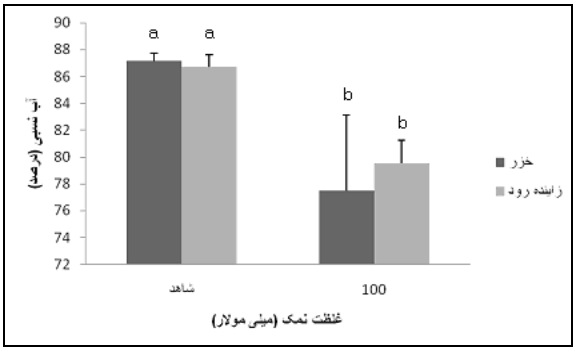
میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، در هر دو رقم در شرایط بدون تنش یکسان بوده (۲۷۵/۷۴ میکرومول H_2O_2 بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه در رقم خزر و ۲۸۴/۴۵ میکرومول H_2O_2 بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه در رقم زاینده‌رود) و تفاوت معنی‌داری بین دو رقم

مشاهده نشد (شکل ۵). در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم خزر تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداد (۲۷۵/۲۱ میکرومول H_2O_2 مصرف شده بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه)، در حالی‌که میزان فعالیت این آنزیم در رقم زاینده‌رود تحت تنش نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (۴۲۵/۳ میکرومول H_2O_2 مصرف شده بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه) (شکل ۵).

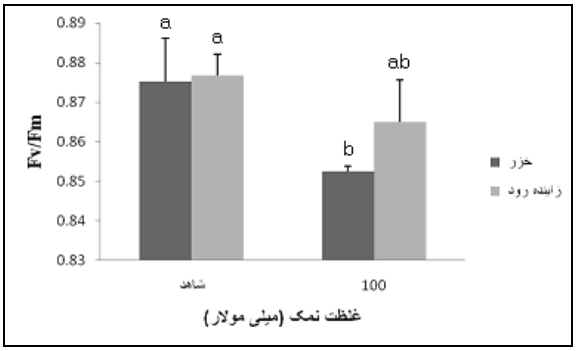
میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز در برگ رقم‌های مختلف برنج تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار اندازه‌گیری شد. هر چند شوری باعث افزایش جزیی در فعالیت این آنزیم در دو رقم شد، با این حال این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۶). از سوی دیگر، تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم بین دو رقم در گروه شاهد یا گروه تیمار مشاهده نشد.

میزان تجمع پرولین

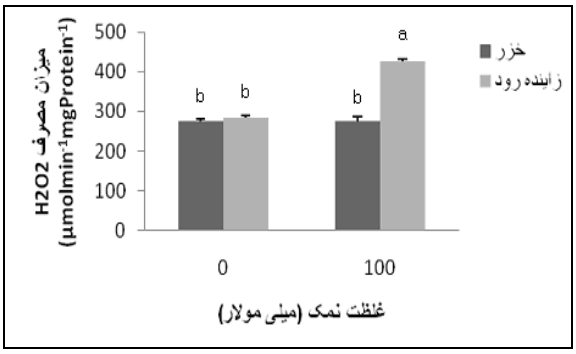
نتایج این تحقیق، هیچ تفاوت معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) در میزان پرولین موجود در بخش هوایی بین دو رقم را در گروه شاهد نشان نداد (شکل ۶)، با این حال، تنش شوری باعث افزایش معنی‌دار (در سطح ۰/۰۵) تجمع پرولین در هر دو رقم شد. در اثر تنش شوری، مقدار پرولین آزاد موجود در بخش هوایی رقم خزر تا ۶۲/۲۱ و در رقم زاینده‌رود تا ۹۴/۲۷ میکروگرم پرولین بر گرم وزن تر بافت افزایش یافت. میزان افزایش پرولین در رقم زاینده‌رود ۱۲/۷ برابر نمونه شاهد و در رقم خزر ۱۳/۶ برابر نمونه شاهد همین رقم مشاهده شد. مقدار پرولین موجود در بخش هوایی نشاهای رقم زاینده‌رود تحت تنش شوری در مقایسه با مقدار پرولین موجود در بخش هوایی نشاهای رقم خزر به مقدار معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) بیشتر بود (شکل ۷).



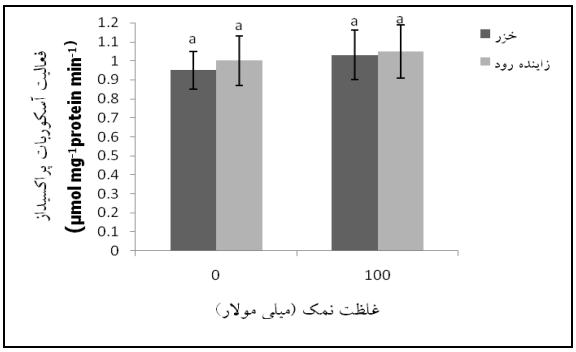
شکل ۳- اثر شوری ۱۰۰ میلی‌مولار بر آب نسبی بخش هوایی در ارقام خزر و زاینده‌رود. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با استفاده از آزمون دانکن است.



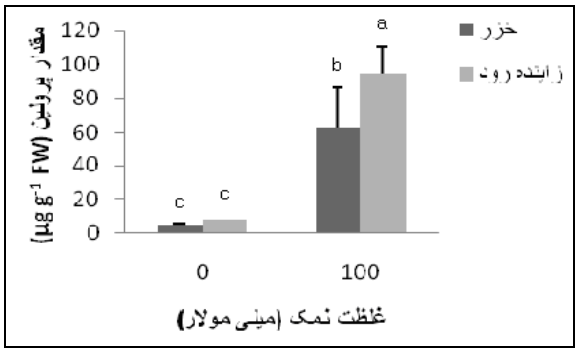
شکل ۴- اثر شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نمک بر نسبت Fv/Fm در رقم‌های خزر و زاینده‌رود. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۵- اثر تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نمک بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ رقم‌های خزر و زاینده‌رود برنج. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۶- اثر تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار نمک بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ رقم‌های خزر و زاینده‌رود برنج. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۷- اثر تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار بر میزان پرولین (میکروگرم بر گرم وزن تر) بخش هوایی رقم‌های خزر و زاینده‌رود. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ با استفاده از آزمون دانکن است.

بحث

درصد جوانه‌زنی معیاری از توانایی زیست دانه‌هاست. ممانعت از جوانه‌زنی دانه‌ها که با شوری ایجاد می‌شود، می‌تواند به علت جذب نمک توسط دانه‌ها و یا به علت کاهش جذب آب و کارآیی تحرک مواد غذایی باشد (Wang *et al.*, 2010). رقم زاینده‌رود دارای درصد جوانه‌زنی بیشتری نسبت به رقم خزر بود که بر اساس رده‌بندی صبوری و همکاران (۱۳۸۷) رقم مقاوم‌تری در برابر تنش شوری است.

به جز طول ریشه که در هر دو رقم برنج تحت تنش ۱۰۰ میلی‌مولار نمک افزایش یافت، تنش شوری به طور کلی باعث کاهش شاخص‌های رشد می‌شود (شکل‌های ۱-۳) که ممکن است بخشی از آن به علت پتانسیل آبی پایین‌تر در سلول‌هایی باشد که سبب بسته شدن روزنه و محدودیت تثبیت دی‌اکسید کربن می‌شوند (Pattanagul and Thitisaksakul, 2008). افزایش رشد ریشه باعث افزایش جریان ورودی آب به ریشه می‌شود (Perez-Alfocea and Balibrea, 1996). در گیاهان برنج، طول ریشه با میزان مقاومت به شوری مرتبط است، به طوری که در گیاهان مقاوم طول ریشه ثابت باقی مانده و یا کاهش می‌یابد که باعث کاهش ورود یون‌های سمّی شده و از طرفی، رشد بخش هوایی به رقیق‌سازی نمک در بخش هوایی و تأخیر در ایجاد سمیّت منجر می‌شود (Pattanagul and Thitisaksakul, 2008). Pattanagul و Thitisakul (۲۰۰۸) گزارش دادند که تنش شوری باعث کاهش آب نسبی و طول بخش هوایی در سه رقم برنج که از نظر مقاومت به شوری متفاوت بودند، می‌شود. طول ریشه در گیاهان تحت تنش در غلظت‌های نسبتاً پایین، در رقم حساس و نسبتاً مقاوم افزایش نشان داد، در حالی که تنش شوری در رقم مقاوم باعث کاهش طول ریشه شد. با توجه به این موضوع به نظر می‌رسد رقم زاینده‌رود رقمی نسبتاً مقاوم به شوری است، به طوری که در شوری نسبتاً پایین ۱۰۰ میلی‌مولار طول ریشه در آن افزایش می‌یابد. این نتیجه‌گیری با نتایج صبوری و همکاران (۱۳۸۷) که بر اساس درصد جوانه‌زنی، رقم زاینده‌رود را به عنوان رقم نسبتاً مقاوم معرفی نمودند، مطابقت دارد.

در این تحقیق، کاهش آب بافت توسط کاهش قابل توجه RWC نشان داده شد که در همه نشاهای تیمار شده با ۱۰۰ میلی‌مولار نمک برای ۱۵ روز رخ داد (شکل ۳). کاهش RWC در گیاهان تحت تنش از غلظت بالای نمک در محیط خارجی نتیجه می‌شود که در سطح سلولی، پتانسیل اسمزی و دهیدراسیون ایجاد می‌کند (Katsuhara *et al.* 2008) و می‌تواند باعث تخصیص مجدد مواد فتوسنتزی به ریشه شده، بنابراین به کاهش رشد بخش هوایی و افزایش رشد ریشه منجر شود.

شاید یکی از مهم‌ترین واکنش‌های سلولی که تحت تأثیر شوری قرار می‌گیرد، فرآیندهای فتوسنتزی باشد. اختلال در این فرآیندها به طور مستقیم باعث کاهش تثبیت کربن و تولید بیوماس در گیاهان می‌شود (Flowers, 1999). Wang و همکاران (۱۹۹۷) گزارش دادند که تحت تنش شوری، سدیم در اندام‌های گیاه مجتمع می‌شود، در حالی‌که غلظت پتاسیم، کلسیم و منیزیم کاهش می‌یابد و فتوسنتز نیز کاهش می‌یابد. در ساختمان مولکولی کلروفیل، اتم منیزیم نقش مهمی دارد. ممکن است که کمبود منیزیم در تیمار شوری سبب مقدار پایین کلروفیل باشد. در بین شاخص‌های فتوسنتزی، Ashraf (۱۹۹۹) Fv/Fm را شاخصی معتبر برای تعیین مقاومت به تنش پیشنهاد کرد. نتایج ما نیز این موضوع را تأیید می‌کند به طوری که نسبت Fv/Fm در اثر شوری در رقم حساس به شوری خزر به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد، در حالی که در رقم مقاوم زاینده‌رود کاهش معنی‌داری در این نسبت مشاهده نمی‌شود.

حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکی از مکانیسم‌های مهم مقاومت به شوری در گیاهان است (Motohashi *et al.*, 2010). Wi و همکاران (۲۰۰۶) نیز در بررسی اثر شوری، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در رقم‌های مقاوم برنج نسبت به رقم‌های حساس را گزارش دادند. کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز کارآمدترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هستند. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها باعث افزایش مقاومت به تنش‌ها از جمله تنش شوری می‌شود. در تحقیق حاضر، مشاهده شد که شوری باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم زاینده‌رود می‌شود، در حالی که تأثیری بر فعالیت این آنزیم در رقم خزر ندارد. از طرفی، شوری تأثیری بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو رقم نداشت. به نظر می‌رسد سطح شوری ۱۰۰ میلی‌مولار یک شوری متوسط است، به طوری که تنها افزایش فعالیت کاتالاز برای حذف رادیکال‌های آزاد کافی است.

نتایج تأثیر شوری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان مختلف متفاوت است. برای مثال Lin و Kao (۲۰۰۰) با بررسی تنش شوری در گیاهان برنج، هیچ تفاوتی در میزان H_2O_2 و آنزیم کاتالاز در برگ‌های برنج تحت تنش مشاهده نکردند. در مقابل Sairam و همکاران (۲۰۰۲) افزایش فعالیت کاتالاز را در هر دو رقم حساس و مقاوم به شوری گیاه گندم گزارش دادند.

در فیزیولوژی تنش گیاهی، عموماً نظر بر این است که تجمع مواد محلول سازگار در حفظ تعادل اسمزی سلولی نقش دارند (Valliyodan and Nguyen, 2006)، برای مثال تجمع پرولین در گیاه مقاومت به شوری را افزایش می‌دهد (Kishor *et al.*, 2005). هر چه میزان افزایش پرولین در بافت‌های گیاه بیشتر باشد، گیاه دارای مقاومت بیشتری به تنش خواهد بود. در رقم خزر میزان پرولین بسیار کمتر از رقم زاینده‌رود بوده و

بر خلاف این رقم نیز میزان آن در اثر تنش افزایش نمی‌یابد. این خود دلالت بر مقاومت بیشتر رقم زاینده‌رود نسبت به رقم خزر در برابر شوری است.

جمع‌بندی

شوری آثار منفی زیادی بر گیاه برنج دارد. گیاهان اغلب مکانیسم‌های مشترکی در پاسخ به تنش‌ها دارند. به نظر می‌رسد که تجمع اسمولیت‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بیشتر و نیز حفظ نسبت Fv/Fm در شرایط تنش در گیاه برنج باعث مقاومت بیشتر به شوری می‌شود. بنابراین، احتمال دارد که بیان بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله آنزیم کاتالاز و یا فعالیت بیشتر این آنزیم و افزایش مقدار تجمع پرولین و بالا نگه داشتن نسبت Fv/Fm با استفاده از برنامه‌های به‌نژادی و انتقال ژن، حتی در رقم‌های بسیار حساس نیز می‌توان مقاومت ایجاد کرد. البته تأیید تأثیر مثبت این شاخص‌ها به آزمایش‌های دیگری بر رقم‌های مختلف گیاه برنج و همچنین دوره‌های کوتاه مدت و بلند مدت تنش نیاز دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی و آموزشی دانشگاه اراک برای حمایت مالی این پروژه کمال تشکر را دارند. همچنین، بر خود لازم می‌بینند از کارشناس محترم آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی جناب آقای فراهانی به علت همکاری در انجام تحلیل‌ها قدردانی نمایند.

منابع

صبوری، ح.، رضایی، ع. و مؤمنی، ع. (۱۳۸۷) ارزیابی تحمل به شوری در رقم‌های بومی واصلاح شده برنج ایرانی. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۴۵: ۴۷-۶۳.

Ashraf, M. (1999) Interactive effect of salt (NaCl) and nitrogen form on growth, water relations and photosynthetic capacity of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Annals of Applied Biology 35: 509-513.

Bates, L. S. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Cakmak, I. and Marschner, H. (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascrobate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiology 98: 1222-1227.

Chakravarthi, B. and Naravaneni, R. (2006) SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L.). African Journal of Biotechnology 5: 684-688.

Cha-um, S., Trakulyingcharoen, T., Smitamana, P. and Kirdmanee, C. (2009) Salt tolerance in two rice cultivars differing salt tolerant abilities in responses to iso-osmotic stress. Australian Journal of Crop Science 3: 221-230.

Chen, G. X. and Asada, K. (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant and Cell Physiology 30: 987-998.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A. and Zhu, J. K. (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science 45: 437-448.

Flowers, T. J. (1999) Salinisation and horticultural production. Scientia Horticulture 78: 1-4.

Grover, A. and Pental, D. (2003) Breeding objectives and requirements for producing transgenic for the major field crops of India. Current Science 84: 310-320.

Katsuhara, M., Hanba, Y. T., Shiratake, K. and Maeshima, M. (2008) Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles. Functional Plant Biology 35: 1-14.

Kishor, P. B., Sangam, S. and Amrutha, R. N. (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Current Science 88: 424-438.

Lin, C. C. and Kao, C. H. (2000) Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves. Plant Growth Regulation 30: 151-155.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Motohashi, T., Nagamiya, K. and Prodhan, S. H. (2010) Production of salt stress tolerant rice by overexpression of the catalase gene, *kat*E, derived from *Escherichia coli*. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 18: 37-41.

Octávio, L. F., Joaquim, E. F., José, T. P. and Enéas, G. F. (1999) Effects of $CaCl_2$ on growth and osmoregulator accumulation in NaCl stressed cowpea seedlings. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 11: 145-151.

Pattanagul, W. and Thitisaksakul, M. (2008) effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. Indian Journal of Experimental Biology 46: 736-742.

Perez-Alfocea, F. and Balibrea, M. E. (1996) Agronomical and physiological characterization of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. Plant and Soil 180: 251-257.

Sahi, C., Singh, A. and Kumar, K. (2006) Salt stress response in rice: genetics, molecular biology and comparative genomics. Functional and Integrative Genomics 6: 263-284.

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.

Sumithra, K., Jutur, P. P., Carmel, B. D. and Reddy, A. R. (2006) Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiate*: responses of antioxidative and proline metabolism. Plant Growth Regulation 50: 11-22.

Valliyodan, B. and Nguyen H. T. (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. Current Opinion in Plant Biology 9: 189-95.

Wang, L., Showalter, A. M. and Ungar, I. A. (1997) Effect of salinity on growth, ion content, and cell wall chemistry in *Atriplex prostrata* (Chenopodiaceae). American Journal of Botany 84: 1247-1255.

Wang, Z., Wang, J., Bao, Y., Wu, Y. and Zhang, H. (2010) Quantitative trait loci controlling rice seed germination under salt stress. Euphytica 10: 267-278.

Wi, S. G., Chung, B. Y., Kim, J. H., Lee, K. S. and Kim, J. S. (2006) Deposition pattern of hydrogen peroxide in the leaf sheaths of rice under salt stress. Biologia Plantarum 50: 469-472.

Effect of salt stress on growth, proline, antioxidant enzyme activity and photosystem II efficiency in salt-sensitive and -tolerant rice cultivars

Nahid Habibollahi, Majid Mahdiyeh * and Mohammad Reza Amirjani

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Arak, Arak, Iran

Abstract

Salt stress is considered as one of the major limitations for food production especially in irrigated regions. The rice as a major food is very sensitive to salt stress. The comparison of physiological responses to salt in rice can be useful to improve resistance to this stress. For this purpose, in this study two Iranian rice cultivars with different resistances to salt stress namely, Khazar (salt sensitive) and Zayandehrood (salt tolerant) were examined. The seeds after sterilization were treated with different NaCl concentrations (0, 50, 100 and 200 mM) in Hoagland medium and germination percentage was determined. Then, the growth factors in 15 days-old seedlings and proline content, catalase activity and Photosynthetic parameters were determined in 25 days old plantlets under 100 mM NaCl. The results showed that with increasing of salt concentration, germination percentage was significantly decreased in both cultivars but this effect was more drastic in Khazar. Salt stress (100 mM) reduced length, fresh and dry matter and also the relative water content of shoot in both cultivars. The results showed more accumulation of proline in Zayandehrood than Khazar. The catalase activity was significantly increased in Zayandehrood by salinity but not in Khazar. Salt stress significantly decreased chlorophyll content in Zayandehrood but not in Khazar. Maximal quantum yield of PS II of rice leaves showed no significant difference for Zayandehrood but in Khazar, salt stress significantly decreased the ratio of Fv/Fm. It seemed that prolin content, catalase activity and Fv/Fm ratio playes essential roles in salt tolerance in rice.

Key words: Rice, Proline, Salt stress, Catalase, Photosystem II efficiency

* Corresponding Author: m-mahdiyeh@araku.ac.ir