



ارزیابی میزان پرولین، کلروفیل و مالون آلدئید در ارقام حساس و متحمل برنج تحت تنش کلرید سدیم

زهرا سادات موسوی زاده^۱، حمید نجفی زرینی^۲، سید حمیدرضا هاشمی پطرودی^۳ و سید کمال کاظمی تبار^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(نویسنده مسوول: zahra_musavizadeh@yahoo.com)

۲ و ۴- استادیار و دانشیار، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۷

چکیده

توانایی گیاهان در خنثی نمودن آثار تنش شوری (کلرید سدیم) به مقدار زیادی به وضعیت درونی K^+ و Na^+ بستگی دارد. در واقع حفظ نسبت بالای K^+/Na^+ در سیتوسل از عناصر اصلی تحمل به شوری است. برنج به عنوان یکی از مهم ترین غلات و غذای اصلی یک سوم از جمعیت جهان، گیاهی حساس به شوری است، شوری بیش از حد به طور مضر همه فعالیت های متابولیک اصلی برنج را تحت تأثیر قرار می دهد. تحقیق حاضر در دانشگاه کشاورزی ساری در سال ۱۳۹۴ انجام گرفته است. بذر گیاه برنج (ارقام IR29، سنگ طارم و جلودار) پس از ضد عفونی به منظور جوانه زنی در ژرمیناتور قرار گرفتند. پس از ۱۴ روز از آغاز کشت، تیمار شوری ۱۲۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم اعمال شد. نمونه برداری به صورت Time-course در ۶ زمان (۶، ۱۰، ۲۴، ۷۲، ۱۲۰، ۱۶۸ ساعت) پس از اعمال تنش از بافت های برگ و ریشه انجام شد. نتایج آزمایشات فیزیولوژیک نشان داد که اثرات ژنوتیپ، زمان نمونه گیری و اثر متقابل روی تمامی صفات اندازه گیری شده شامل میزان مالون دی آلدئید (MDA)، کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئید و پرولین در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود، غلظت کلروفیل b و کاروتنوئید موجود در برگ در ساعات اولیه تنش کاهش یافت و در ادامه با افزایش ساعات تنش، ضخیم شدن برگ ها و افزایش نسبت کلروفیل در واحد سطح برگ (لوله ای شدن برگ) میزان کلروفیل افزایش یافت. بررسی میزان مالون دی آلدئید در برگ نشان داد بیشترین افزایش در رقم حساس (IR29) وجود داشته است. آنالیز نتایج میزان پرولین نشان داد ارقام حساس و متحمل در شرایط عادی (بدون تنش) اختلاف معنی داری نداشتند اما با قرار گرفتن در شرایط تنش میزان پرولین در رقم متحمل بیشتر از رقم حساس افزایش یافته است. میزان پرولین در ژنوتیپ سنگ طارم به عنوان یک ژنوتیپ متحمل به شوری در زمان های (۷۲، ۱۲۰، ۱۶۸ ساعت) نسبت به شاهد افزایش معنی داری نشان داد. بنابراین واکنش ارقام حساس و متحمل برنج نسبت به تنش شوری متفاوت از یکدیگر است و با اندازه گیری پارامترهایی همچون مالون دی آلدئید، کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئید و پرولین می تواند به اصلاح این گیاه در جهت تحمل به شوری کمک شایانی نماید.

واژه های کلیدی: برنج، تنش کلرید سدیم، پرولین، کلروفیل، مالون آلدئید

مقدمه

ماده خشک کل گیاه می شود (۱۳). پرولین به عنوان یک اسمولیت مهم در تعدیل فشار اسمزی سلول تحت تنش هایی مانند خشکی، شوری، نقش اساسی دارد. افزایش این ماده در شرایط تنش اسمزی علاوه بر گیاهان، در دامنه وسیعی از موجودات دیگر مثل باکتری ها، مخمرها، بی مهرگان دریایی و جلبک ها مشاهده شده است. در واقع پرولین باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین ها شده و از به هم خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیمی ممانعت می کند. پرولین عملکردهای چند گانه ای در گیاهان ایفا می کنند (۲۸). اگرچه تنش در تمام مراحل رشدی گیاه می تواند رخ دهد اما با توجه به اینکه استقرار اولیه گیاه در عملکرد نهایی تأثیر زیادی دارد، تنش شوری در مرحله گیاهچه ای برای گیاه می تواند بسیار مضر باشد (۲۲). اثر شوری روی گونه های مختلف گیاهی متفاوت است. به طوری که تنش شوری در برنج موجب کاهش فتوسنتز می شود (۲). پایداری کلروفیل به عنوان شاخصی از مقاومت گیاه به تنش است. ارقام مقاوم به شوری شاخص پایداری بالا و ارقام حساس پایین ترین شاخص پایداری را نشان می دهند (۱۲). سنگاتی ول و همکاران (۲۴) تأثیر تنش شوری در ژنوتیپ های حساس و متحمل برنج در دو سطح ۶۰ و ۱۲۰

تنش شوری یکی از معضلات رو به گسترش است که شدیداً امنیت و پایداری تولیدات کشاورزی را تهدید می کند (۲۷). تنش شوری باعث آسیب های جدی به بسیاری از فرآیندهای سلولی و فیزیولوژیک از جمله فتوسنتز، جذب مواد غذایی، جذب آب، رشد ریشه و متابولیسم سلولی می شود که همه منجر به کاهش عملکرد می شوند (۱۸). شوری دارای اثرات فیزیولوژیک از قبیل کاهش فشار تورگر در سلول ها، ممانعت از اعمال فعالیت های حیاتی غشا، تأثیر بر فعالیت آنزیم ها، ممانعت از اجرای سریع فتوسنتز، القای کمبود یون در اثر انتقال ناکافی یون ها یا مکانیسم انتخابی می باشد (۱۵). برنج یکی از غلات مهم است که به تنش شوری بسیار حساس است. گرچه درجه حساسیت به شوری در بین ارقام آن متغیر است، برخی ارقام قادرند در غلظت های بالای شوری رشد کنند (۱۱). برنج در مرحله جوانه زنی به شوری نسبتاً متحمل، در اوایل دوره گیاهای (سه برگی) خیلی حساس و مجدداً در مرحله رشد رویشی متحمل می گردد. محققان در زمینه تأثیر شوری بر رشد برنج بیان کرده اند که شوری ناشی از کلرید سدیم باعث کاهش میزان رشد نسبی و به تبع کاهش

برنج سنگ طارم (متحمل به شوری)، رقم جلودار (نسبتاً حساس به شوری) و IR29 (حساس به شوری) آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان در سال ۱۳۹۴ انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل ژنوتیپ‌های برنج (IR29، سنگ طارم و جلودار) و سری زمانی (۰، ۶، ۲۴، ۷۲، ۱۲۰ و ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تنش) بودند. پس از جوانه‌زنی بذرها در ژرمیناتور، گیاهچه‌های حاصل به گلخانه منتقل شدند و به‌صورت هیدروپونیک در محلول یوشیدا (۳۹) کشت شدند. سه هفته پس از رشد گیاه، تنش شوری (NaCl) به میزان ۱۲۰ میلی‌مولار اعمال شد و نمونه‌برداری به‌صورت سری زمانی در پنج زمان مختلف از بافت‌های برگ و ریشه انجام شد. میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی با استفاده از روش پرا (۲۱) اندازه‌گیری شد. بدین منظور مقدار ۰/۵ گرم نمونه برگ (به‌صورت یخ‌زده) کاملاً خرد و یکنواخت و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ میزان جذب و میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید محاسبه گردید. میزان پرولین از روش باتس و همکاران (۴) اندازه‌گیری شد، بدین منظور ۰/۲ گرم ماده تر گیاهی در هاون خرد شد و درون یک تیوب ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد آماده‌شده را به آن اضافه نموده و نمونه را درون یخ قرار داده شد. تیوب را در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ نموده تا با تشکیل دو فاز مایع و جامد مواد اضافی از محلول جدا گردد. مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف‌شده را درون تیوب جدید ریخته و ۲ میلی‌لیتر اسید ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن افزوده و سپس به‌خوبی مخلوط شد. نمونه‌ها را در حمام آب گرم به مدت ۱ ساعت حرارت داده و سپس درون حمام یخ قرار داده شد. مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه نموده و آن را به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. مقادیر متفاوت از پرولین محلول بعنوان نمونه‌های استاندارد به فاز تولوئن اضافه و مقدار پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و منحنی استاندارد رسم شد. سپس میزان جذب در نمونه‌های گیاهی قرائت شده و غلظت پرولین نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد پرولین و از رابطه زیر بر اساس وزن تر محاسبه و در نهایت به‌صورت میکروگرم بر گرم وزن تر ارائه گردید.

$$\text{Proline } (\mu\text{M. g-1 fresh wt.}) = \frac{M \times T \times W}{115.5} \times 1000$$

که در آن M: عدد قرائت‌شده با دستگاه اسپکتروفتومتر، T: حجم تولوئن مورد استفاده (در اینجا ۲ میلی‌لیتر است) و W= وزن نمونه برگی مورد استفاده (برای نمونه هادی ما برابر ۰/۲ است). سنجش میزان مالون دی‌آلدهید به روش هیس (۷)، اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون‌های غشایی به‌وسیله تست تیوباریتوریک اسید (TBAT) با سنجش میزان مالون دی‌آلدهید (MDA) انجام شد. بافت‌های تر گیاهی بعد از تعیین وزن تر در تری کلرواستیک اسید 20% (TCA) دارای ۰/۵ درصد تیوباریتوریک اسید همگن شده و به مدت ۳۰ دقیقه در

میلی‌مولار مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد سرعت تفرق و هدایت روزنه‌ای و به دنبال آن میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید در ۱۶۸ ساعت بعد از تنش افزایش یافت و بعد از آن در پایین‌ترین حد خود قرار گرفت. سعیدپور (۲۳) تغییرات غلظت کلروفیل گیاه برنج در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل تحت تنش ۱۰۰ میلی‌مولار را بررسی کردند و نشان دادند که غلظت اولیه کلروفیل‌های a و b طی ۱۲ الی ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش افزایش یافت ولی در ادامه و با طولانی‌تر شدن دوره تنش از غلظت کلروفیل‌ها کاسته شد. باتارچارجی و موکارچی (۵) نیز افزایش غلظت مالون دی‌آلدهید برگ تحت تأثیر تنش شوری را در گیاهچه‌های سه رقم برنج مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند که تخریب غشاهای سلولی تحت تأثیر تنش شوری و تولید مالون دی‌آلدهید برگ که ناشی از تخریب و تجزیه چربی‌های غشا سلولی است، می‌تواند به‌عنوان یک معیار مناسب برای آنالیز واکنش گیاه برنج به تنش شوری بررسی شود. بندگلو و همکاران (۳) گزارش کردند تخریب غشاهای سلولی تحت تأثیر تنش شوری و تولید MDA برگ، ناشی از تخریب و تجزیه چربی‌های غشای سلولی است. بررسی‌های جمیل و همکاران (۸) نشان داد که غلظت‌های مختلف نمک رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a و b و نیز میزان کاروتنوئید در برنج را کاهش داد. به‌طوری‌که با افزایش میزان نمک، مقدار نزول پارامترهای فوق، نیز بیشتر کاهش می‌یافت. کان ای پی و همکاران (۹) نیز تأثیر تنش شوری روی پارامترهای فیزیولوژیکی در ۱۰۶ ژنوتیپ برنج را مورد آزمایش قرار دادند و بیان کردند که پرولین می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مناسب جهت شناسایی ارقام حساس از متحمل به شوری به کار گرفته شود. کاهش فتوسنتز به نوع گیاه و غلظت نمک بستگی داشته و حتی در غلظت‌های پایین نمک بر مقدار فتوسنتز افزوده می‌شود (۱۹). کارایی فتوسنتز بستگی به‌توالی پروسه‌های متابولیکی نظیر واکنش‌های فتوشیمیایی، آنزیم‌های دخیل در تثبیت کربن، ساختار دستگاه فتوسنتزی و انتقال حد واسط‌های فتوسنتزی بین اجزای سلولی دارد. بنابراین در تنش شوری آنچه فتوسنتز را تحت تأثیر قرار می‌دهد، کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، کاهش سطح برگ (کاهش سطح فتوسنتزی)، کاهش فراهمی CO₂ به علت بسته شدن روزنه‌ها (کاهش هدایت روزنه‌ای)، کاهش هدایت مزوفیلی (به علت کاهش نفوذپذیری غشا به CO₂ به علت دهیدراته شدن غشاهای سلولی)، تغییر در فعالیت آنزیم‌ها به علت تغییرات در ساختار سیتوپلاسمی (آنزیم‌های روبیسکو و چرخه کلونین)، سمیت نمک، افزایش پیری القاشده توسط شوری و آسیب اکسیداتیو به غشاهای فتوسنتزی می‌باشد (۱۵).

هدف از پژوهش حاضر مطالعه تغییر میزان پرولین، کلروفیل a، b و مالون‌آلدهید در برخی از ارقام برنج حساس و متحمل به شوری تحت تنش کلرید سدیم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور ارزیابی میزان پرولین، کلروفیل a و b، کاروتنوئید و مالون‌آلدهید در ارقام حساس و متحمل به شوری سه رقم

مشخص نمودن گروه‌های معنی‌داری استفاده شد و پس از رسم نمودارها در نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳، تیمارهای معنی‌دار با حروف غیرمشابه مشخص شدند.

نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرات ژنوتیپ، زمان نمونه‌گیری و اثر متقابل آن‌ها روی تمامی صفات اندازه‌گیری شده شامل میزان مالون دی آلدئید (MDA)، کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئید و پرولین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود.

حمام آب گرم (۹۵°C) در بالن مخصوص مبرد انکوبه گردید. سپس مخلوط حاصله بلافاصله در حمام یخ، سرد شده و در سرعت 3000 g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب مایع رویی در ۵۳۲ نانومتر تعیین و جذب ناویژه در ۶۰۰ نانومتر از آن کسر گردید. غلظت MDA و بر اساس واحد (μmol. g-1 F.W) بیان شد. داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ در قالب آزمایش فاکتوریل با سه تکرار تجزیه شد. در صورت معنی‌داری اثرات تیمارها روی صفات مورد اندازه‌گیری، از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ جهت

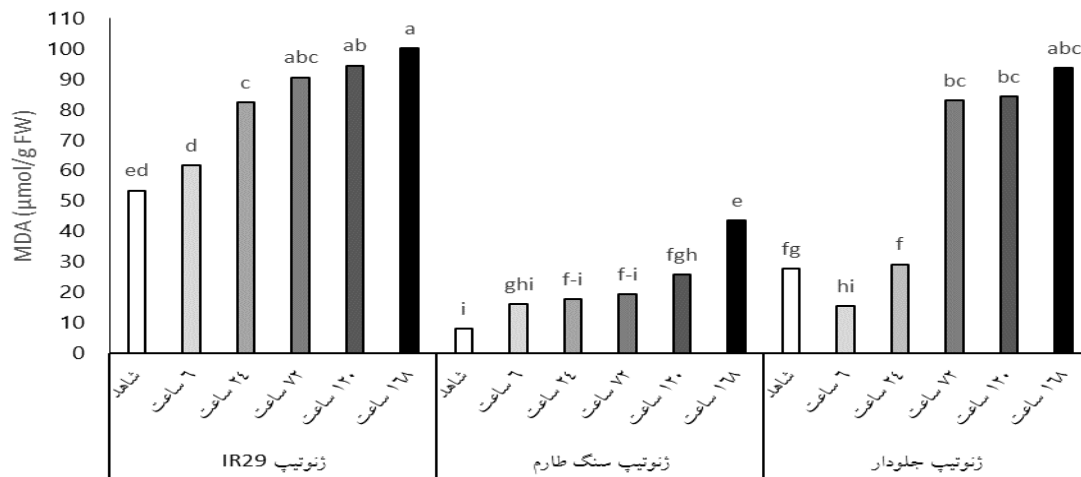
جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) شاخص‌های فیزیولوژیک ارقام برنج تحت تنش شوری

منابع تغییرات	df	MDA	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	پرولین
ژنوتیپ	۲	۱۵۴۶۰/۵**	۲۵۴/۸**	۶۷۶/۷**	۴۴۹۹۶۳۸**	۰/۰۰۰۴۸**
زمان	۵	۳۹۰۷/۱**	۷۸/۸**	۱۵۰۹/۹**	۲۰۹۳۰۸۱**	۰/۰۰۰۱۵**
ژنوتیپ × زمان	۱۰	۴۶۲/۸**	۳۹/۶**	۱۵۳/۱**	۱۶۶۰۰۹**	۰/۰۰۰۱۲**
خطا	۳۶	۵۱/۱۱	۵/۰	۸/۲	۳۷۰۲	۰/۰۰۰۰۱
ضریب تغییرات (%)		۱۳/۵	۱۳/۰	۱۱/۱	۲/۷۱	۰/۷۴

** یعنی معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

(شکل ۱). در رقم IR29 و سنگ طارم به‌طور کلی با افزایش زمان نمونه‌برداری، میزان MDA افزایش یافته اما در رقم جلودار وضع دقیقاً به این گونه نبوده است به‌طور کلی در زمان‌های بالاتر، میزان MDA بالاتر بوده است (شکل ۱).

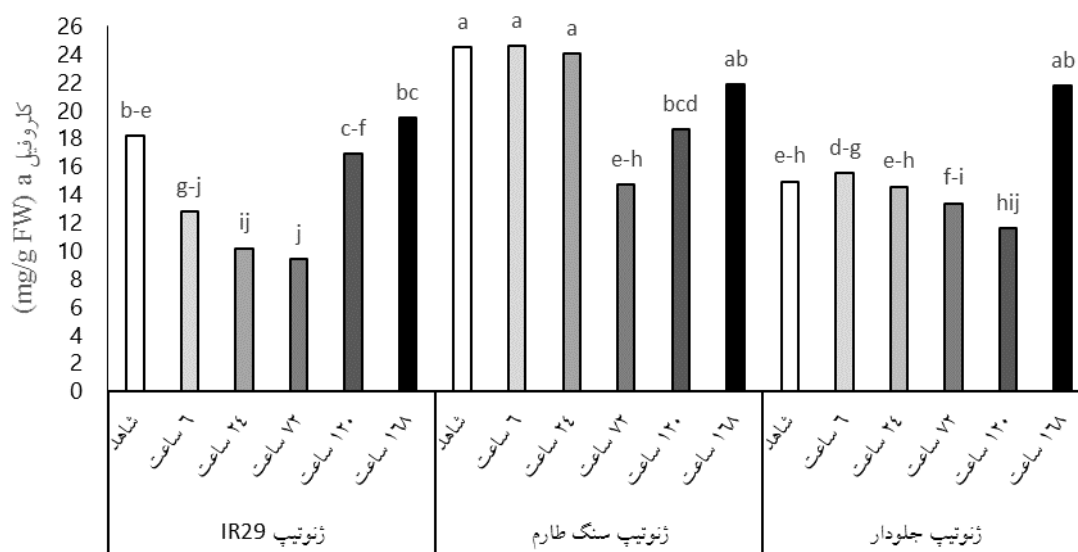
نتایج مقایسه میانگین تأثیر زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و ژنوتیپ روی میزان مالون دی آلدئید در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین مقدار MDA مربوط به زمان ۱۶۸ ساعت در رقم IR29 است که با زمان ۱۲۰ و ۷۲ در همین ژنوتیپ و زمان ۱۶۸ ساعت در ژنوتیپ جلودار اختلاف آماری معنی‌داری از نظر آزمون 5% LSD نداشت



شکل ۱- مقایسه میانگین مالون دی آلدئید
Figure 1. Comparison of mean of Malondialdehyde

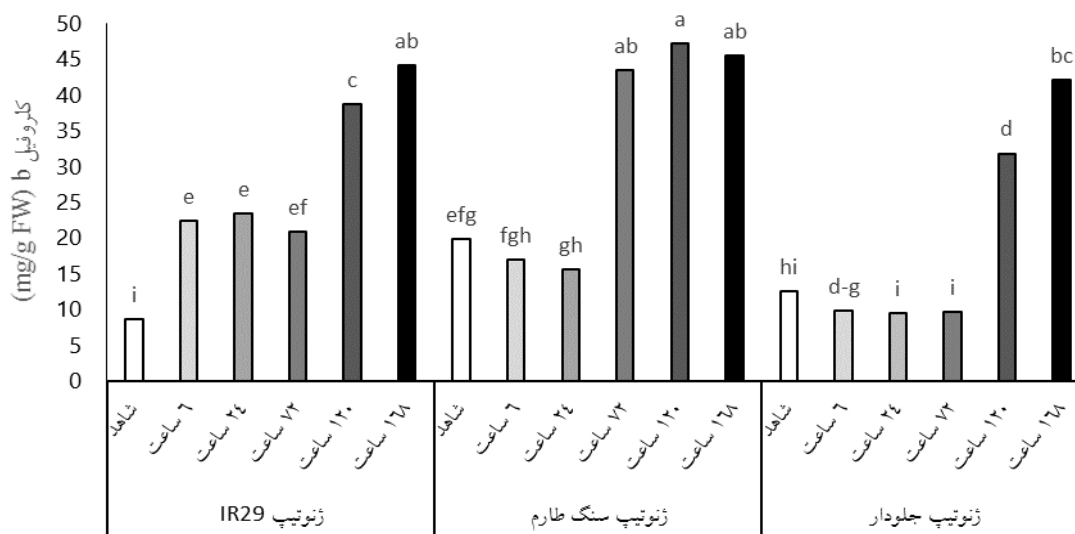
بر اساس نتایج برهم‌کنش زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و ژنوتیپ روی میزان کلروفیل a (شکل ۲)، روند خاصی در همه ژنوتیپ‌ها از نظر میزان کلروفیل a وجود نداشت. میزان کلروفیل a در رقم IR29 با افزایش زمان ابتدا کاهش یافت و

پس از افزایش نشان داد. در ژنوتیپ سنگ طارم هم تقریباً روند مشابه داشت. اما در ژنوتیپ جلودار در زمان ۱۶۸ ساعت پس از تنش میزان کلروفیل a بیشتر از دیگر زمان‌ها بود.



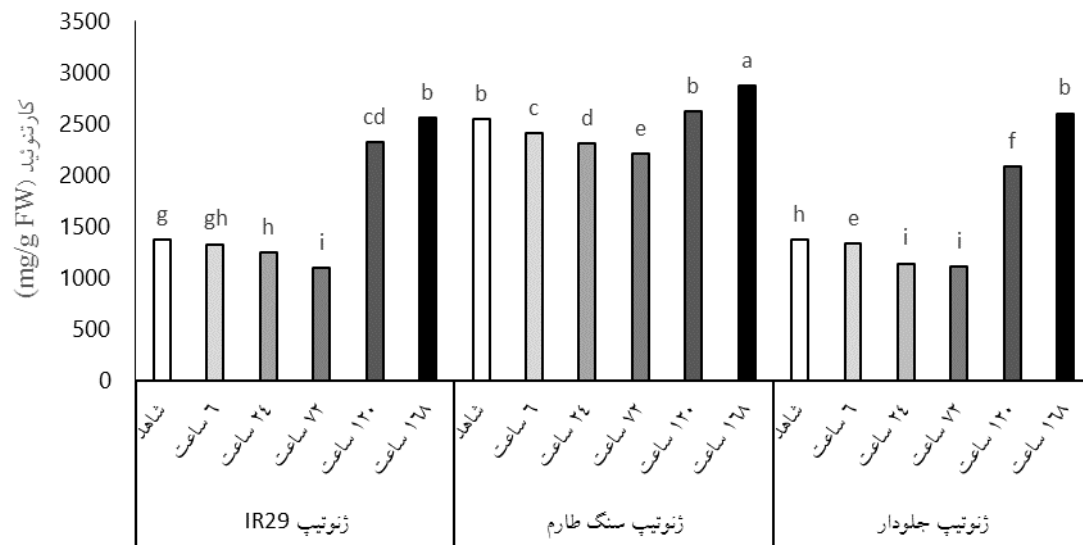
شکل ۲- مقایسه میانگین کلروفیل a
Figure 2. Comparison of mean of Chlorophyll a

نتایج اثر متقابل زمان در ژنوتیپ نشان داد. میزان کلروفیل b در زمان‌های بالاتر بیشتر بود. به طوری که در ژنوتیپ IR29 و جلودار در زمان ۱۲۰ و ۱۶۸ ساعت پس از تنش و در ژنوتیپ سنگ طارم در زمان‌های ۷۲، ۱۲۰ و ۱۶۸ ساعت پس از تنش بیشتر از دیگر زمان‌ها بود (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین کلروفیل b
Figure 3. Comparison of mean of Chlorophyll b

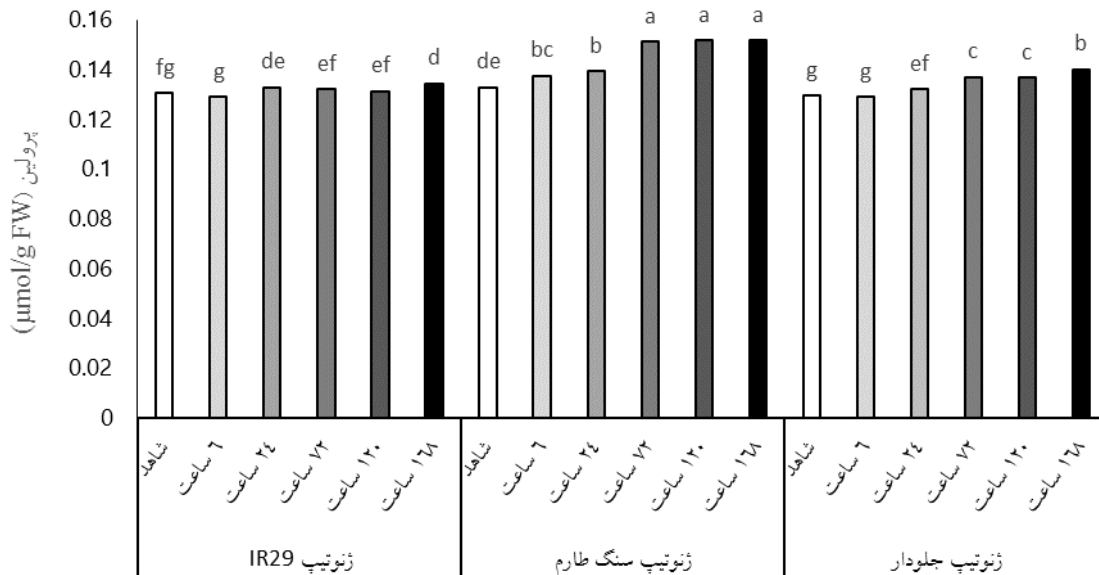
نتایج نشان داد (شکل ۴) میزان کاروتنوئید در ژنوتیپ IR29 و جلودار در زمان ۱۲۰ و ۱۶۸ ساعت پس از تنش بیشتر از دیگر زمان‌ها بود، اما در ژنوتیپ سنگ طارم میزان کاروتنوئید ابتدا کاهش و سپس افزایش یافت.



شکل ۴- مقایسه میانگین کاروتنوئید
Figure 4. Comparison of mean of Carotenoid

افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت اما این تغییر به اندازه ژنوتیپ سنگ طارم نبود و افزایش کمتری داشت. در ژنوتیپ جلودار با افزایش زمان نمونه‌برداری، میزان پرولین افزایش یافت. به طوری که فقط در زمان ۶ ساعت پس از تنش با شاهد یکسان بود ولی با افزایش زمان، میزان پرولین نسبت به شاهد افزایش بیشتری یافت.

نتایج اثر متقابل غلظت پرولین در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد (شکل ۵). میزان پرولین در ژنوتیپ سنگ طارم به‌عنوان یک ژنوتیپ متحمل به شوری در تمامی زمان‌های نمونه‌گیری نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد؛ اما در ژنوتیپ IR29 که یک ژنوتیپ حساس به شوری است، هرچند در برخی زمان‌ها



شکل ۵- مقایسه میانگین پرولین
Figure 5. Comparison of mean of Proline

از اعمال تنش افزایش یافت که حاکی از بالا بودن غلظت کلروپلاست به دلیل کوچک تر شدن حجم سلول‌ها می‌باشد ولی در ادامه و با طولانی‌تر شدن دوره تنش از غلظت کلروفیل‌ها کاسته شد، این روند نزولی در سایر ارقام ایرانی و خارجی مشاهده شد، از این رو افزایش کلروفیل‌های a و b طی ۲۴ ساعت اولیه احتمال مربوط به متراکم شدن سلول‌ها در نتیجه اعمال تنش می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج سنگاتی‌ول و همکاران (۲۴) هم‌خوانی داشت آن‌ها گزارش کردند سرعت تعرق و هدایت روزنه‌ای در ۱۶۸ ساعت بعد از تنش افزایش یافته و بعد از آن در پایین‌ترین حد خود قرار گرفت و این کاهش به دلیل آن است که بیش از ۶۰ درصد بافت برگ آسیب‌دیده است این در حالی است که در ژنوتیپ‌های متحمل این روند کاهش با تولید برگ‌های تازه کندتر پیش می‌رود. پاپ و همکاران (۱۷) گزارش کردند که در همه سطوح شوری ضخامت برگ‌ها افزایش می‌یابد و این تغییر در ضخامت برگ‌ها موجب افزایش کلروفیل می‌شود. همچنین کریشنامورتی و همکاران (۱۰) بیان کردند با افزایش نمک در محیط رشد میزان کلروفیل a و b در برگ برنج پس از کاهش در ساعات اولیه تنش افزایش یافت و همچنین این افزایش در کلروفیل b مشهودتر است در این رابطه بوری بونکاست و همکاران (۶) و نیز امیرجانی (۱) ادعا نمودند که غلظت کلروفیل a و b و نیز کارتنوئید در برنج‌های تحت تنش شوری به‌طور محسوسی کاهش یافت و به غلظت نمک و مدت تنش بستگی داشت. در آزمایش حاضر، میزان پرولین با افزایش زمان بعد از تنش به‌صورت معنی‌داری افزایش نشان داد. به‌طوری‌که این افزایش در رقم متحمل نسبت به رقم حساس بیشتر بود. پرولین که یکی از اسمولیت‌های سازگاری در گیاهان تحت تنش است، معمولاً در اثر تنش افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد در گیاهانی که تحت تنش هستند، افزایش اسیدآمینو پرولین باعث حفظ آماس و ادامه رشد سلول می‌گردد و یک نقش آنتی‌اکسیدانی در حفاظت از غشای بیولوژیک را دارد (۲۰). تجمع زیاد پرولین، گیاه را قادر می‌سازد که پدیده اسمزی را حفظ کند. وقتی که گیاه در توان آبی پایین رشد می‌کند، پرولین به‌عنوان ذخیره انرژی و نیتروژن برای استفاده در خلال تنش شوری به کار می‌رود (۲۵). باتارچاری و موکارچی (۵) نیز اظهار نمودند که در شرایط تنش شوری تجمع پرولین و کربوهیدرات‌های محلول در گیاهچه‌های برنج موجب افزایش محتوی نسبی آب برگ و کاهش اثرات منفی تنش شوری بر سلامت غشاهای سلولی شد. سامرت و همکاران (۲۶) با بررسی میزان پرولین در گیاه برنج ادعا نمودند که با توجه به تجمع بالای پرولین به نظر می‌رسد که پرولین نقش حیاتی در سلول‌های گیاهی در طول تنش شوری ایفا می‌کند.

در این پژوهش تأثیر تنش شوری حاصل از ۱۲۰ میلی‌مولار نمک بر میزان پرولین، کلروفیل a و b، کاروتنوئید و مالون‌آلدئید در سه رقم برنج سنگ طارم (متحمل به شوری)، رقم جلودار (نسبتاً متحمل به شوری) و IR29 (حساس به شوری) تا حداکثر ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تنش مورد بررسی قرار گرفت. به‌طورکلی در ارقام حساس، نیمه متحمل و متحمل به شوری مورد بررسی در این آزمایش، میزان مالون دی‌آلدئید افزایش یافت. در این رابطه باتارچاری و موکارچی (۵) نیز افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید برگ تحت تأثیر تنش شوری را در گیاهچه‌های سه رقم برنج مورد مطالعه را گزارش کردند و بیان کردند که تخریب غشاهای سلولی تحت تأثیر تنش شوری و تولید مالون دی‌آلدئید برگ که ناشی از تخریب و تجزیه چربی‌های غشا سلولی است، می‌تواند به‌عنوان یک معیار مناسب برای بررسی واکنش گیاه برنج به تنش شوری بررسی شود. همچنین گزارش کردند که تنش شوری سبب تخریب غشاهای سلولی و افزایش تولید مالون دی‌آلدئید در بافت برگ برنج شد اما میزان تولید مالون دی‌آلدئید در رقم حساس به شوری برنج بیش از رقم متحمل به شوری بود. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، به‌طورکلی می‌توان گفت پس از اعمال تیمار شوری، باگذشت زمان، ابتدا میزان کلروفیل a کاهش و سپس افزایش یافته است. همچنین میزان کلروفیل b در زمان‌های بالاتر پس از اعمال تیمار شوری، بیشتر بود. به‌طورکلی با توجه به نتایج، شوری در برنج در ساعات اولیه تنش موجب کاهش کلروفیل می‌گردد و در ادامه با افزایش ساعات پس از اعمال تیمار شوری، ضخیم شدن برگ افزایش نسبت کلروفیل در واحد سطح برگ (لوله‌ای شدن برگ) میزان کلروفیل افزایش می‌یابد. چنین به نظر می‌رسد این حالت پایدار نبوده و پس از افزایش آسیب‌دیدگی برگ، کاهش میزان تعرق و هدایت روزنه‌ای میزان کلروفیل روند کاهشی پیدا می‌کند. سرعت این روند بسته به نوع رقم (حساس یا متحمل) متفاوت است در ارقام متحمل این روند کاهش، دیرتر و با شیب ملایم‌تری رخ می‌دهد. سنگاتی‌ول و همکاران (۲۴) با مطالعه تأثیر تنش شوری در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل برنج در ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl مورد مطالعه قراردادند. نتایج آن‌ها نشان داد میزان کلروفیل a و b و نیز کاروتنوئید ۱۶۸ ساعت بعد از تنش افزایش یافت و پس از آن در پایین‌ترین حد خود قرار گرفت آن‌ها استدلال کردند که علت این امر آسیب دیده‌گی بیش از ۶۰ درصد بافت برگ بوده است. درحالی‌که در ژنوتیپ‌های متحمل این روند کاهشی، با تولید برگ‌های تازه کندتر می‌شود. همچنین سعیدپور و همکاران (۲۳) تغییرات غلظت کلروفیل گیاه برنج در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل تحت تنش ۱۰۰ میلی‌مولار نمک بررسی کردند و گزارش کردند غلظت اولیه کلروفیل a و b طی ۱۲ الی ۲۴ ساعت پس

منابع

1. Amirjani, M.R. 2011. Effect of salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. *Int J Bot*, 7: 73-81 (In Persian).
2. Asch, F., M. Dingkuhn and K. Dorffling. 2000. Salinity increases CO₂ assimilation but reduces growth in field-grown, irrigated rice. *Plant and Soil*, 218: 1-10.
3. Bandoğlu, E., F. Eyidoğan, M. Yücel and H.A. Öktem. 2004. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. *Plant Growth Regulation*, 42: 69-77.
4. Bates, L.S. 1973. Rapid determination of Free Proline for water- Stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
5. Bhattacharjee, S. and A.K. Mukherjee. 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.
6. Boriboonkaset, T., C. Theerawitaya, N. Yamada, A. Pichakum, K. Supaibulwatana, S. Cha-um and C. Kirdmanee. 2013. Regulation of some carbohydrate metabolism-related genes, starch and soluble sugar contents, photosynthetic activities and yield attributes of two contrasting rice genotypes subjected to salt stress. *Protoplasma*, 250: 1157-1167.
7. Heath, R.L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1): 189-198.
8. Jamil, M., S.A. Bashir, M.I.N.A. Anwar, S.O.M.A. Bibi, S.A.S.I.A. Bangash, F. Ullah and E.S. Rha. 2012. Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice. *Pak J Bot*, 44: 7-13.
9. Kanawapee, N.J. Sanitchon, W. Lontom and P. Threerakulpisut. 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.
10. Krishnamurthy, R., M. Anbazhagan and K.A. Bhagwat. 1987. Effect of NaCl toxicity chlorophyll breakdown in rice. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 57: 567-570.
11. Mekawy, A.M.M., D.V.M. Assaha, H. Yahagi, Y. Tada, A. Ueda and H. Saneoka. 2015. Growth, physiological adaptation, and gene expression analysis of two Egyptian rice cultivars under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 87: 17-25.
12. Mohan, M.M., S.L. Narayanan and S.M. Ibrahim. 2000. Chlorophyll stability index (CSI): its impact on salt tolerance in rice. *International Rice Research Notes*, 25(2): 38-39.
13. Moradi, F. 2002. Physiological characterization of rice cultivars for salinity tolerance during vegetative and reproductive stages. Los Baños, Laguna, Philippines, 190 pp (In Persian).
14. Moumeni, A. 2011. Geographical distribution and salinity of soil resources in Iran. *Iranian Journal of Soil Research*, 24: 203- 215 (In Persian).
15. Munns, R., R.A. James and A. Läuchli. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of experimental botany*, 57(5): 1025-1043.
16. Orcutt, D.M. and E.T. Nilsen. 2000. The physiology of plants under stress: soil and biotic factors (Vol. 2). John Wiley & Sons. New York, NY, USA. 684 pp.
17. Papp, J.C., M.C. Ball and N. Terry. 1983. A comparative study of the effects of NaCl salinity on respiration, photosynthesis, and leaf extension growth in *Beta vulgaris* L. (Sugar beet). *Plant, Cell and Environment*, 6: 675-677.
18. Pardo, J.M. 2010. Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Curr. Opin. Biotech*, 21: 185-196.
19. Parida, A.K. and A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60: 324-349.
20. Patakas, A., N. Nikolaou, E. Zioziou, K. Radoglou and B. Noitsakis. 2002. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. *Plant Science*, 163: 361-367.
21. Porra, R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, 73: 149-156.
22. Rauf, M., M. Munir, M. Hassan, M. Ahmad and M. Afzal. 2007. Performance of wheat genotypes under osmotic stress at germination and early seedling growth stage. *African journal of biotechnology*, 6 -8 pp.
23. Saeedpour, S. 2015. Effect of salinity on growth, chlorophyll content and ions uptake of rice cultivars (*Oryza sativa*) cultivars. *Agronomy Journal (Pajouhesh and Sazandegi)*, 102: 2-11 (In Persian).
24. Senguttuvel, P., C. Vijayalakshmi, K. Thiyagarajan, J.R. Kannanbapu, S. Kota, G. Padmavathi and B.C. Viraktamath. 2014. Changes in photosynthesis, chlorophyll fluorescence, gas exchange parameters and osmotic potential to salt stress during early seedling stage in rice (*Oryza sativa* L). *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 46: 120-135.
25. Sudhakar, C., P.S. Reddy and K. Veeranjaneyulu. 1993. Effect of salt stress on the enzymes of proline synthesis and oxidation in greengram (*Phaseolus aureus* Roxb.) seedlings. *Journal of plant physiology*, 141: 621-623.
26. Summart, J., P. Thanonkeo, S. Panichajakul, P. Prathepha and M.T. McManus. 2010. Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. *African Journal of Biotechnology*, 9(2).
27. Wu, T., W. Lin Kao and C.H. Hong. 2015. Gene knockout of glutathione reductase 3 results in increased sensitivity to salt stress in rice. *Plant Molecular Biology*, Volume 87, Issue, 6: 555-564.
28. Yamchi, A., F.R. Jazii, C. Ghobadi, A. Mousavi and A.A. Karkhanehee. 2005. Increasing of tolerance to osmotic stresses in tobacco *Nicotiana tabacum* cv. xanthi through overexpression of p5cs gene. *JWSS-Isfahan University of Technology*, 8: 31-40 (In Persian).
29. Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cook and K.A. Gomez. 1976. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. International Rice Research Institute, Manila, pp: 61-65.

Assessment of Proline, Chlorophyll and Malondialdehyde in Sensitive and Tolerant Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars under Salt Stress Conditions

Zahra Sadat Musavizadeh¹, Hamid Najafi Zarini², Seyyed Hamidreza Hashemi-Petroudi³ and Seyyed Kamal Kazemitabar⁴

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Agricultural Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (Corresponding Author: zahra_musavizadeh@yahoo.com)

2 and 4- Assistant Professors and Associated Professors, Department of Agricultural Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

3- Assistant Professors, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Receive: January 7, 2016

Accepted: December 24, 2016

Abstract

Salinity stress is one of the main obstacles in crop production in many parts of the world, especially in arid and semi-arid regions. Plants' ability to neutralize the effect of salinity largely depends on the internal state K^+ and Na^+ . In fact, maintaining high K^+/Na^+ ratio in Cytosol is a key element for tolerance to salinity. Rice, one of the most important food crops, a primary food source for more than one-third of the world's population. Rice is sensitive to salinity stress, so that, salt effects will extensively damage rice metabolic activities. This study has presented the effects of salinity on some physiological characteristics and genes expression patterns that coded for a number of ion channels in rice. In order to seed germination, the seeds of some cultivar (IR29, Sangtarom, and Jelodar) sterilized and then were placed in germinator. Salinity treatment (120 mM NaCl) were applied 14 days after culture. The leaf and root samples were collected at six time-courses (0, 6, 24, 72, 120 and 168 hours) after sodium chloride stress. Results of physiological assessments showed that the effects of genotype, sampling period and their interactions were significant at 1% level of probability on all measured traits including malondialdehyde (MDA), chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids and proline contents. The concentration of chlorophyll a, b and carotenoid of leaves were reduced in early hours of encountering with stress and then increasing the hours of stress, leaf thickness (leaf rolling) caused chlorophyll per leaf unit and increases the amount of chlorophyll. The measurement of MDA in the leaves showed that the greatest increase occurred in sensitive cultivar (IR29). Proline content analysis showed that there was no significant difference between proline content of sensitive and tolerant cultivars under normal condition (no stress), but by exposure to salinity stress, proline content was increased in susceptible more than tolerant cultivar. Proline content in Sangtarom, as a salt tolerant genotype, has significantly increased in comparison with the control cultivar in 72, 120 and 168 (h) times. Consequently, the responses of sensitive and tolerant rice cultivars to the salinity stress are different from each other and measuring of some parameters such as MDA, chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids, and proline can help to improve the salt tolerance of plants.

Keywords: Chlorophyll, Malondialdehyde, NaCl stress, Proline, Rice