دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

تعیین متحمل‌ترین ژنوتیپ‌های موتانت برنج هاشمی (M_3) در پاسخ به تنش خشکی با استفاده از شاخص‌های رشدی فیزیولوژی و تغییرات آنزیمی

سید الیاس میرنوری[۱]، رضا شیرزادیان خرم‌آباد[۲] و لیلا خزائی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳- محقق، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران، (نویسنده مسوول: Leila_khazaie@yahoo.com)
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۱
صفحه: ۳۱ تا ۴۲

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: تنش‌های غیرزیستی بویژه خشکی اثر منفی بر رشد و تولید محصول دارد. گیاهان واکنش‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در شرایط تنش خشکی در سطح سلولی و موجود کامل نشان می دهند. سطوح تحمل به تنش خشکی و مکانیسم‌های محافظتی آنتی‌اکسیدانت برای گیاهچه‌های ۴۱ ژنوتیپ موتانت (M_3) حاصل از ماده جهش‌زای اتیل متان سولفونات (EMS) روی رقم برنج هاشمی بررسی شدند.

مواد و روش‌ها: تنش خشکی در کشت هیدروپونیک با پلی‌اتیلن‌گلیکول 6000 (PEG 6000) در سطح ۱۰- بار به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در این آزمایش صفات مورفولویکی، محتوی رطوبت نسبی، پایداری غشاء سلولی، پرولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کاهش قابل توجهی در پارامترهای رشدی تحت تنش نشان دادند. بر اساس شاخص‌های مورفوفیزیولوژیکی، دو موتانت M_{29} و M_{122} به‌عنوان ژنوتیپ‌های موتانت امیدبخش متحمل به تنش خشکی معرفی شدند. این موتانت‌ها حداکثر افزایش را در طول ریشه بدون تغییر معنی‌دار در وزن ریشه و حجم ریشه در مقایسه با والد مادری در شرایط تنش نشان دادند و همچنین بهترین کارکرد را برای شاخص‌های فیزیولوژیکی مانند محتوی آب نسبی، پایداری غشای سلولی و محتوی پرولین در تنش آب تحت شرایط هیدروپونیک از خود نشان دادند. همزمان، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ‌های موتانت متحمل به خشکی بطور قابل توجهی در زمان تنش خشکی افزایش یافته، در حالی که با تنش خشکی در ژنوتیپ‌های موتانت حساس به خشکی کاهش داشته است. همچنین ژنوتیپ‌های موتانت M_{106} و M_{31} نیز با داشتن حداقل کارکرد در سطح تنش، به‌عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ معرفی شدند.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق مشخص شد، تجمع پرولین، افزایش زیست‌توده ریشه، افزایش پایداری غشاء و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند POX، APX وCAT در شرایط تنش خشکی در تحمل به خشکی نقش دارند و می توانند در غربالگری برای تحمل به خشکی استفاده شوند. ژنوتیپ‌های موتانت شناسایی شده در این مطالعه برای تشریح بیشتر تحمل به تنش خشکی در برنج، مفید خواهند بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، اتیل متان سولفونات، برنج، پرولین، تنوع، جهش، خشکی

مقدمه

برنج، منبع غذایی اصلی و مهم برای بیش از نیمی از جمعیت رو به رشد جهان است که بیش از ۲۰ درصد کالری مصرفی این جمعیت رو به رشد را تامین می‌کند (۲۰). تقاضا برای تولید برنج با توجه به افزایش جهانی جمعیت رو به فزونی است. لذا به منظور پاسخ به این تقاضا، تنوع ژنتیکی بیشتر برای تولید واریته‌های جدید با عملکرد بالا و متحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ضروری است. از طرف دیگر تغییرات اقلیم و دسترسی آب، دو فاکتور مهم است که بر تولید برنج در مناطق برنج خیز دنیا اثر می‌گذارد (۴۳). تغییرات جهانی اقلیم و گرما باعث تشدید بروز و شدت تنش‌های غیرزنده می‌شود که به طور جدی بر رشد و توسعه گیاهان مانند برنج و امنیت غذایی اثرگذار هستند (۲۴). با توجه به گرم شدن جهانی زمین و کاهش منابع آبی، تولید لاین‌های جدید برنج با پتانسیل عملکرد بالا و متحمل به تنش خشکی یکی از مؤثرترین روشها برای افزایش تولید برنج است. برنج به عنوان یک گیاه غرقابی، از حساس‌ترین گیاهان در برابر کمبود آب بوده و بیشترین نیاز آبی را در بین غلات دارد (۴۱). تنش خشکی می‌تواند به طور جدی رشد و توسعه بسیاری از گیاهان خاک را مختل کند و اغلب مسئول کاهش شدید عملکرد محصول در سطح جهان است (۳۶). کمبود منابع آبی، تهدید جدی برای افزایش در عملکرد محصولات زراعی حساس به آب و خشکی به‌شمار می‌رود (۳۸). برنج در مرحله رشد گیاهچه‌ای و زایشی به تنش خشکی خیلی حساس است. کاهش عملکرد برنج تحت تأثیر تنش خشکی بیش از ۵۸ درصد برآورد شده است. روش‌های آزمایشگاهی مانند کشت بافت ابزار مناسبی برای اصلاح گیاهان زراعی به‌شمار می‌رود. ارزیابی گیاهچه‌ها در شرایط آزمایشگاهی به افزایش کارایی انتخاب و غربال تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها در شرایط کنترل‌شده منجرشده و کاهش زمان و هزینه را بدنبال دارد (۱۸). غربال کردن برای تحمل به تنش خشکی در برنج در مرحله گیاهچه‌ای گزارش شده است (۴). وزن مولکولی بالای پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG[1]) به عنوان یک عامل اسمزی غیر قابل نفوذ، نقش تنش خشکی را در گیاهان بازی می‌کند (۳۱). در محصولات زراعی تحت تنش خشکی، تغییرات متعددی در سطح فیزیولوژیکی، متابولیکی و مولکولی در مقایسه با شرایط بدون تنش رخ می‌دهد (۱۵). برنج، گیاهی است حساس به خشکی و این مسئله نشان می‌دهد که کمبود آب، رشد نسبی و سرعت تقسیم سلولی برگ را کاهش داده و منجر به کاهش سطح برگ می‌شود (۲۲). در برنج، عامل لوله‌ای شدن برگ تحت تنش خشکی به‌عنوان یکی از بهترین معیارهای برآورد سطح تحمل خشکی در یک غربالگری در مقیاس بزرگ مورد بررسی قرار گرفت (۳۰). خشکی سبب کاهش رشد اندام هوایی و افزایش رشد ریشه می‌شود و بنابراین نسبت ریشه به

1- Polyethylene Glycol

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]

ساقه افزایش می‌یابد. نتیجه چنین امری کاهش سطح تعرق و افزایش مقدار جذب آب می‌باشد (۲۶). از آنجائیکه تنوع ژنتیکی در سطح گونه‌های گیاهی به دلیل شدت کارهای اصلاحی کاهش یافته است، از اینرو موتاسیون می‌تواند به عنوان یک روش کمکی جهت افزایش تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی در گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. اصلاح به کمک جهش در گیاهان زراعی ابزار موثری برای به‌نژادگران گیاهی مخصوصاً در محصولاتی که تنوع ژنتیکی محدودی دارند، می‌باشد (۳۵). تلاش‌های بی‌شماری توسط محققان مختلف در جهت تعیین، مؤثرترین تیمارهای جهش‌زایی برای القاء صفات مطلوب و تجاری در برنج صورت گرفته است. جمعیت‌های موتانت، منابع با ارزش تنوع ژنتیکی محصولات زراعی هستند. منابع تنوع ژنتیکی جدید از جهش‌زایی خودبخودی و القایی با استفاده از مواد جهش‌زای فیزیکی یا شیمیایی بدست می‌آید. کاربرد این جهش‌ها در ژنومیکس کارکردی و اصلاح مولکولی گیاهان زراعی بسیار مهم است. استراتژی اصلی در اصلاح برپایه جهش، ایجاد سریع واریته‌های گیاهی سازگار با عملکرد بالاتر و کیفیت بهتر است. تا سال ۲۰۰۰ بیش از ۲۲۰۰ واریته جدید از طریق موتاسیون به‌دست آمده است که ۴۳۴ واریته آن لاین‌های موتانت برنج با خصوصیات زراعی مطلوب است. از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۴، ۶۲ لاین موتانت برنج معرفی شده است که علاوه بر بهبود صفات زراعی، برای تحمل به تنش‌های غیر زنده نیز اصلاح شده‌اند (۳۷). تکنیک اصلاح جهش[1] به‌طور گسترده در اغلب گیاهان زراعی به‌منظور تولید و انتخاب لاین برتر استفاده می‌شود. بیش از ۳۲۰۰ واریته از طریق القاء موتاسیون تولید شده است که این‌ها در بهبود امنیت غذایی در بعضی از کشورها نقش دارند (۲۸،۲۱). در دو آزمایش جداگانه، تأثیر تنش خشکی بر صفات مربوط به جوانه زنی و برخی از صفات مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برنج رقم هاشمی (*Oryza sativa* L. cv. Hashemi) در سطوح مختلف تنش خشکی شامل (صفر، 2- (۰/۲- مگاپاسکال) ،4- (۰/۴- مگاپاسکال)، 6- (۰/۶- مگاپاسکال)، 8- (۰/۸-مگاپاسکال) و10- (۱- مگاپاسکال) بار) به‌وسیله پلی‌اتیلن‌گلیکول 6000 انجام شده است. نتایج نشان داد که در مرحله جوانه‌زنی، تنش خشکی تاثیر منفی و معنی‌داری بر درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول و وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه دارند .در مرحله رشد رویشی صفات ارتفاع، سطح برگ و ریشه در تیمار 20 درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید خشکی) و در تمام سطوح خشکی مورد بررسی میزان پرولین و پتاسیم بخش هوایی نسبت به شاهد بصورت معنی‌داری کاهش نشان دادند. نتایج این آزمایش نشان داد که سطوح خشکی معادل 80، 60 و 40 درصد ظرفیت زراعی، بر صفات مورفولوژیکی نشاهای برنج هاشمی تأثیر بارزی ندارند (۱۹). بذرهای سه رقم برنج در مرحله رشد گیاهچه و جوانه‌زنی بذر برای تحمل به تنش خشکی و شوری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد افزایش تنش خشکی باعث تأخیر و کاهش میزان جوانه‌زنی در همه واریته‌ها می‌شود. وزن خشک ریشه و ساقه، طول ریشه و ساقه و وزن تر ریشه و ساقه در همه ارقام با افزایش سطح تنش کاهش نشان داد. افزایش تنش شوری کاهش معنی‌دار صفات مورد بررسی را در همه ارقام نشان داد. این نتایج به شناسایی ارقام متحمل برای مطالعات بیشتر کمک می‌کند (۴۰). بنابراین در این مطالعه آزمایشی با هدف بررسی اثرات مقایسه‌ای تنش خشکی (PEG) بر پارامترهای رشدی، تجمع پرولین، محتوای آب نسبی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌آکسیدانت (پراکسیداز، کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز) روی ژنوتیپ‌های موتانت برنج نسل M_3 (رقم هاشمی) به‌منظور تجزیه و تحلیل اهمیت این پارامترها در تحمل به تنش خشکی و تعیین متحمل‌ترین ژنوتیپ موتانت به تنش خشکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تأثیر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ۴۱ ژنوتیپ موتانت برنج هاشمی (M_3) حاصل از ماده جهش‌زای اتیل متان سولفونات[2] (۰/۸ درصد) به‌همراه والد مادری در سال ۱۳۹۷ در موسسه تحقیقات برنج کشور در آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سطوح صفر و ۱۰- بار (۱- مگاپاسکال) به‌وسیله پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰۰۰ و به روش میچل و کافمن (۲۷) مورد بررسی قرار گرفت. بذور موتانت، ابتدا با محلول ۲ درصد هیپوکلریت سدیم برای ۱۰ دقیقه ضدعفونی و سپس بذرها به ژرمیناتور منتقل و به‌مدت پنج روز در دمای ۲۷ سانتی‌گراد قرار داده شدند تا عمل جوانه‌زنی انجام شود. بذرهای جوانه زده به صفحات یونولیت مشبک با ابعاد ۳۰×۳۴×۲ سانتی‌متر حاوی سوراخ‌های با قطر یک سانتی‌متر انتقال داده شدند. در هر سوراخ روی یونولیت دو بذر جوانه‌زده، نشاء شد، در هر ظرف ۱۱ لاین و از هر لاین ۲۰ گیاه قرار داشت. صفحه‌های یونولیت روی ظروف ۱۰ لیتری حاوی از محلول یوشیدا (۴۲) قرار داده شدند و محلول هر هشت روز یکبار تعویض شد. pH محلول (۵/۵)، هفته‌ای ۳ بار کنترل شده تا در صورت افزایش توسط HCl یک نرمال تنظیم شود. ، پس از گذشت دو هفته از نگهداری بذرهای جوانه‌دار در محلول غذایی یوشیدا، تیمار خشکی پلی‌اتیلن‌گلیکول (۶۰۰۰) با غلظت (۱۰- بار) برروی گیاهچه‌های سه برگی اعمال شد. دو هفته پس از اعمال تنش گیاهچه‌های شش برگی برداشت شدند و طول و وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه گیاهچه‌ها با استفاده از خط‌کش و ترازو اندازه‌گیری شد. سپس اندام‌های هوایی و ریشه هر تیمار بطور جداگانه در پاکت‌های مجزا قرار گرفته و در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. در نهایت وزن خشک آنها نیز اندازه‌گیری شد. بر اساس ارزیابی و غربال خصوصیات رشدی و زنده‌مانی ۴۱ گیاهچه ژنوتیپ موتانت و والد مادری در شرایط تنش خشکی، ۸ ژنوتیپ موتانت متحمل، نسبتا متحمل و حساس انتخاب تا به‌همراه رقم مادری در شرایط تنش خشکی هیدروپونیک مورد ارزیابی فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی قرار گیرند.

محتوای آب نسبی (RWC[1]) برگ

ابتدا قطعاتی از برگ انتخاب و وزن‌تر (FW) آنها تعیین شد. سپس قطعات برگ به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در داخل آب‌مقطر قرار گرفتند تا سلول‌ها به حالت

1- Mutation Breeding
2- Ethyl Methanesulfonate

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]

تورژسانس درآیند و برای اندازه‌گیری وزن تورژسانس (TW) توزین شدند. به‌دنبال آن، برگ‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت خشک شده و وزن خشک (DW) آنها نیز اندازه‌گیری شد و درنهایت RWC (برحسب درصد) از رابطه زیر به‌دست آمد (۶).

$$RWC\ (\%) = (FW - DW)(TW - DW) \times 100 \quad (۱)$$

اندازه‌گیری شاخص پایداری غشا سلولی (نشت یونی)

نشت یونی در بافت برگ، پس از اعمال تیمارخشکی و مطابق روش لیندن و همکاران (۲۳) اندازه‌گیری شد. در هر ژنوتیپ پس از اعمال تیمار، از برگ و طوقه هر بوته دیسک‌هایی به‌ترتیب به قطر یک سانتی‌متر و نیم سانتی‌متر تهیه و در قوطی۶۰ میلی‌لیتری درب‌دار، حاوی ۴۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر غوطه‌ور شد. سپس قوطی‌های حاوی نمونه به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شدند و پس از آن نشت یونی اولیه (EC1) با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج (مدل ۵۰۱–CC)، اندازه‌گیری شد. سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شده و نشت یونی ثانویه (EC2) اندازه‌گیری شد. سپس براساس رابطه زیر، درصد نشت یونی (EL) محاسبه شد.

$$EL=(EC_1/EC_2)\times 100 \quad (۲)$$

اندازه‌گیری میزان پرولین

سطح پرولین آزاد سلولی با استفاده از روش باتس و همکاران (۵) اندازه‌گیری شد، ۱ گرم بافت‌تر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی سولفوسالیسیلیک اسید (۳٪) هموژن شدند. ۱ میلی‌لیتر از محلول روشناور به‌همراه ۱ میلی‌لیتر آب‌مقطر در لوله آزمایش ریخته، سپس به هر کدام ۲ میلی‌لیتر محلول نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال اضافه شد. لوله‌ها به‌مدت یک ساعت در حمام آبجوش ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شده، پس از طی این زمان بلافاصله در حمام یخ سرد شده و پس از رسیدن به دمای محیط به هر لوله ۲ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شده و به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. محلول رنگی وارد فاز فوقانی تولوئن شد. فاز فوقانی جدا شده و جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل ۱۶۰– UV در مد Quantitative و طول‌موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی

برای ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، از بافت برگ‌های ژنوتیپ‌های مورد بررسی در شرایط تنش خشکی و نرمال عصاره آنزیمی تهیه شد. بدین منظور، ۰/۱ گرم بافت برگ در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم با pH=۷ پودر شد. عصاره حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و از مایع رویی برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها استفاده شد.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD, EC 1.11.1.7) از طریق بررسی حضور این آنزیم به روش چنس و ماهلی (۷) براساس میزان اکسید شدن گایاکول اندازه‌گیری شد. در این روش ۳۳ میکرولیتر از عصاره استخراج را با یک میلی لیتراز محلول پراکسیداز شامل ۱۳ میلی‌مولار گایاکول، ۵ میلی مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات pH=۷، مخلوط و جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر، قرائت شد. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) با استفاده از روش کلیبورن (۹) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۱۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیم و ۲۰ میکرولیتر از محلول ۳٪ H_2O_2 به ۱/۸۴ میلی‌لیتر محلول واکنش اضافه شد. ثبت تغییرات جذب نور نمونه در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه انجام شد. هر یک واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز به‌عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب کاهش یک میکرومول H_2O_2 در هر دقیقه می‌شود.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.1) بر اساس روش ناکانو و آسادا (۳۰) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. برای این منظور، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی به ۱/۸ میلی‌لیتر محلول واکنش اضافه شد و برای تعیین میزان فعالیت آنزیم APX مورد استفاده قرار گرفت. کاهش جذب در اثر فعالیت APX با استفاده از اسپکتروفتومتر (کری ۱۰۰، واریان، امریکا) در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب اکسیده‌شدن یک میکرومول آسکوربات در هر دقیقه می‌شود.

آزمایش‌ها با سه تکرار مستقل به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل رقم (رقم هاشمی، ژنوتیپ‌های موتانت نسل M_3)، تنش خشکی در دو سطح (صفر و ۱۰– بار) و زمان برای آزمایش میزان پرولین و تغییرات آنزیم در ۲ سطح (۶ و ۷۲ ساعت) بود. میانگین داده‌ها با نرم‌افزار $SAS_{9.2}$ با استفاده از تجزیه واریانس و آزمون توکی[۲] با درنظرگرفتن سطح احتمال ۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای رسم شکل‌ها و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک نشان‌دهنده اثر معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) ژنوتیپ بر صفات مورد مطالعه در دو شرایط محیطی تنش خشکی و بدون تنش است (جدول ۱). برهمکنش ژنوتیپ در تنش نیز بر کلیه صفات معنی‌دار بود، به این مفهوم که ژنوتیپ‌های موتانت مورد مطالعه واکنش یکسانی در دو شرایط نرمال و تنش نداشته و روند تغییرات آنها در دو شرایط از نظر هر خصوصیت متفاوت بود.

1- Relative Water Content
2- Tukey

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک در ژنوتیپ‌های موتانت برنج هاشمی و والد غیر موتانت
Table 1. Variance analysis of morphological traits in *Hashemi* rice mutant genotypes and non mutant parent

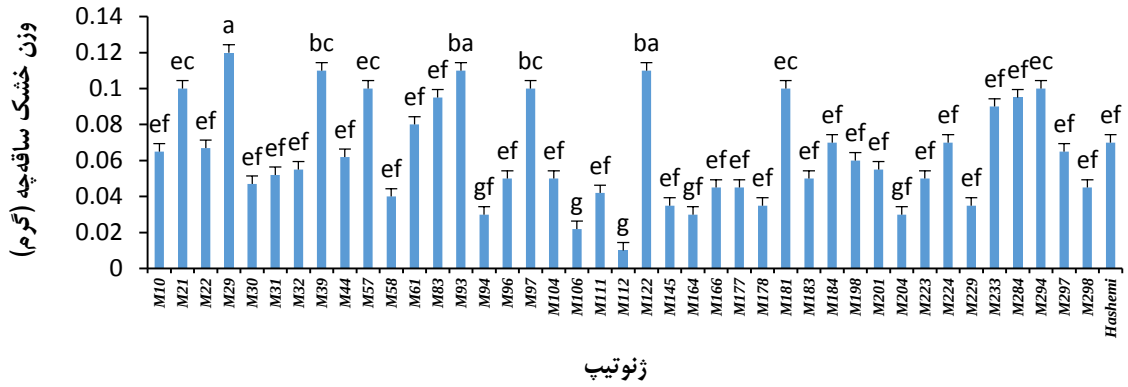
نوع	درجه آزادی	طول ساقه‌چه	طول ریشه‌چه	وزن تر ساقه‌چه	وزن تر ریشه‌چه	وزن خشک ساقه‌چه	وزن خشک ریشه‌چه	نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه	نسبت وزن تر ریشه‌چه به ساقه‌چه	نسبت وزن خشک ریشه‌چه به ساقه‌چه
ژنوتیپ	۴۱	۱۸۵/۶۱**	۱۱/۷۶**	۰/۱۲**	۰/۰۹۳**	۰/۰۰۳۱**	۰/۰۰۲**	۰/۰۱۸**	۱/۶۷**	۰/۷۱**
تنش	۱	۱۱۴۱۲/۰۷*	۱۴۵/۸۶**	۵/۱۱**	۰/۰۸۳**	۰/۰۱۶**	۰/۰۱**	۰.۱۷**	۴۶/۴۳**	۲/۰۱۹**
ژنوتیپ× تنش	۴۱	۱۱۰/۷۷**	۸/۴۷**	۰/۱۲**	۰/۰۷۸**	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۳**	۰/۰۱۷**	۱/۵۳**	۰/۷۴**
خطای آزمایش	۸۴	۱/۶۶	۱/۴۵	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۵	۰/۰۸۷	۰/۰۳۱
ضریب تغییرات		۳/۱۱	۱۱/۵۹	۲۱/۳۹	۲۱/۰۳	۲۸/۵۶	۱۸/۴۵	۸/۹۶	۲۱/۲۵	۲۸/۱۰

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ، تنش و برهمکنش آنها روی ۴۲ گیاهچه موتانت M_3 و والد هاشمی به روش توکی ($p<۰/۰۱$) تحت شرایط بدون تنش و تنش خشکی (۱۰- بار) بر روی کلیه صفات مورد بررسی معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ نشان داد گیاهچه‌های موتانت M_{122}، M_{29} و هاشمی از نظر صفت طول ساقه‌چه بیشترین میزان را دارند و همچنین کمترین طول ساقه‌چه متعلّق به گیاهچه‌های موتانت M_{31} و M_{204} بود. از نظر طول ریشه‌چه گیاهچه‌های موتانت در اثر اعمال تنش خشکی، عکس‌العمل‌های متفاوتی را از خود بروز دادند. بیشترین طول ریشه‌چه در شرایط نرمال متعلّق به گیاهچه‌های موتانت M_{178} (۱۷/۵ سانتی‌متر) و M_{284} (۱۶/۵ سانتی‌متر) و M_{39} (۱۴ سانتی‌متر)، در شرایط تنش M_{29} و M_{122} (۱۲/۵ سانتی‌متر) و کمترین طول ریشه‌چه در شرایط تنش، متعلّق به گیاهچه‌های موتانت M_{31} (۵/۵ سانتی‌متر) و M_{112} (۶/۵ سانتی‌متر) در مقایسه با هاشمی (۱۰ سانتی‌متر) بود. نتایج نشان داد که تنش خشکی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه را به‌صورت معنی‌داری کاهش داده، به‌طوریکه طول ساقه‌چه از ۶۶ میلی متر در تیمار شاهد به ۱۰ میلی متر در تیمار ۱۰- بار و طول ریشه‌چه نیز از ۱۷/۶ سانتی‌متر در تیمار شاهد به ۵/۵ سانتی‌متر در تیمار خشکی ۱۰- بار تقلیل یافت. در واقع، ریشه‌چه‌ها جزء کلیدی سازگاری برنج به محیط‌های دارای تنش خشکی هستند. چنانچه رطوبت در عمق خاک قابل دسترس باشد، عمیق بودن ریشه و نفوذ آن به درون قسمت‌های عمیق خاک برای افزایش عملکرد تحت تنش خشکی حیاتی است (۱۲). گرچه طول ریشه بیشتر از طول ساقه تحت تاثیر تنش خشکی است، اما اثر خشکی بیشتر روی ساقه و قسمت‌های هوایی گیاه که بیشتر بخش‌های اقتصادی گیاه را در بر خواهد گرفت، دیده می‌شود. از اینرو پارامترهای ساقه نیز در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر در برابر تنش خشکی به به‌نژادگر کمک می‌کند. علاوه بر طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه نیز نقش عمده‌ای در انتخاب لاین‌های متحمل به خشکی دارد (۴۴). ارقام با نسبت بالای ریشه‌چه به ساقه‌چه در اثر تنش خشکی ارجحیت دارند. برهمکنش خشکی و ژنوتیپ نیز در مورد نسبت طول ریشه‌چه به ساقه‌چه (RL/RS) در سطح تنش خشکی معنی‌دار بود. مطالعه حاضر تنوع قابل توجهی را برای نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه در بین ژنوتیپ‌های موتانت مورد بررسی نشان داد. در مقالات متعددی برای این صفت تحت تنش خشکی، افزایش معنی‌دار مشاهده شده است (۲۵،۳۲،۴۳). نتایج نشان داد که بیشترین وزن تر ساقه‌چه متعلق به گیاهچه‌های موتانت M_{122}، M_{29} و M_{284} (۰/۹ گرم) با اختلاف معنی‌دار نسبت به والد هاشمی (۰/۴۶ گرم) بود. کمترین وزن تر ساقه‌چه متعلّق به گیاهچه‌های موتانت M_{31} و M_{204} (۰/۳۵ گرم) بود. کمترین وزن خشک ساقه‌چه مربوط به ژنوتیپ M_{31} با میانگین ۰/۰۱۵ گرم و بیشترین وزن خشک ساقه‌چه مربوط به ژنوتیپ‌های M_{39}، M_{122} و M_{29} با میانگین ۰/۱۴ گرم که با اختلاف معنی‌داری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی و والد هاشمی (۰/۰۷ گرم) بود (شکل ۱). با افزایش تنش خشکی، مقدار وزن تر و خشک ساقه‌چه به شدت کاهش نشان داد. کاهش وزن خشک به دلیل کاهش رشد گیاهی، بسته شدن روزنه‌ها و متعاقب آن کاهش فتوسنتز و پیری و ریزش برگ‌ها می‌باشد (۱۷). مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش نشان داد ژنوتیپ‌های M_{29}، M_{39} و M_{122} با میانگین ۰/۹ گرم دارای بیشترین وزن تر و حجم ریشه‌چه در مقایسه با رقم هاشمی ۰/۴۹ گرم بود که از مشخصات ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی است (۱۶). مقایسه بین میانگین همه ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف تنش نشان داد که بالاترین میانگین وزن تر ریشه‌چه مربوط به سطح عدم تنش خشکی بود و با افزایش شدت تنش از وزن تر آن کاسته شد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ بر وزن خشک ساقه‌چه گیاهچه‌های موتانت و والد هاشمی در شرایط تنش خشکی با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد (میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند)

Figure 1. Mean comparing effect of genotype on shoot dry weight of mutant seedling and Hashemi parent in drought stress conditions using Tukey test (5%) (Means with the same letters in each figure have not significant difference at 5 % probability level)

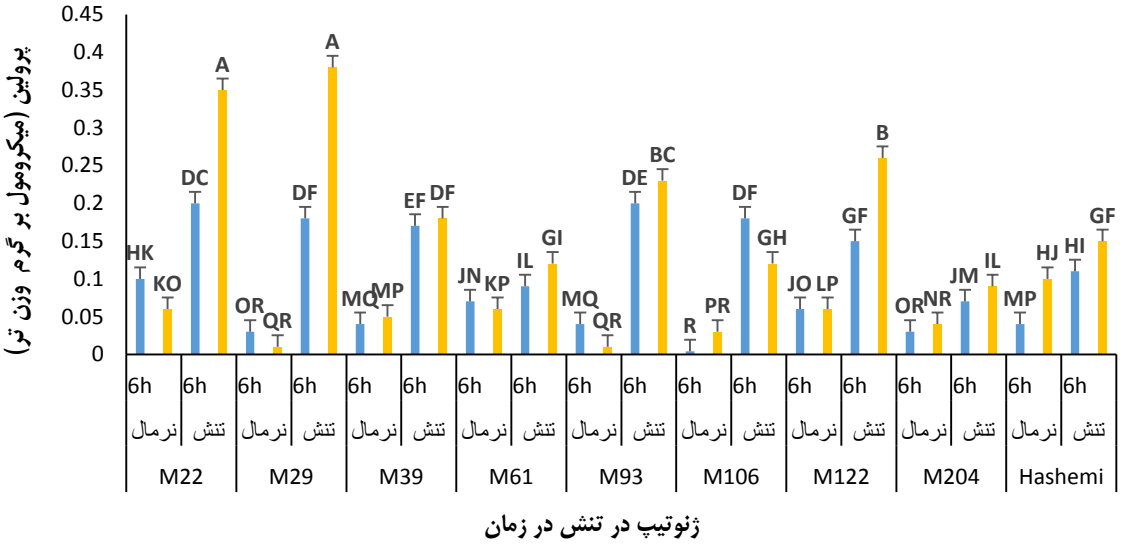
همچنین کمترین وزن خشک ریشه‌چه مربوط به ژنوتیپ M_{31} با میانگین ۰/۰۰۵ گرم و بیشترین وزن خشک ریشه‌چه مربوط به ژنوتیپ M_{284} و هاشمی با میانگین ۰/۰۸۵ گرم که با اختلاف معنی‌داری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. افزایش ماده خشک ریشه‌چه در این ژنوتیپ‌ها به احتمال زیاد به خاطر حفظ پتانسیل اسمزی، جلوگیری از پسابیدگی سلول و انتقال مواد محلول به اندام‌های هوایی می‌باشد. خشکی در مرحله رویشی برنج باعث خشکی برگ، لوله‌ای شدن برگ، کاهش شاخص سطح برگ،کاهش ارتفاع گیاه، کاهش تعداد پنجه و تولید ماده خشک می‌شود (۳۱). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمامی گیاهچه‌های موتانت در شاخص‌های رشدی کاهش معنی‌داری نشان دادند، به‌عبارتی میزان تولید ماده خشک کل در گیاه برنج تحت تنش خشکی به شدت کاهش یافت که نشان‌دهنده حساسیّت گیاه برنج به خشکی است. بر اساس داده‌های مقایسه میانگین، مشخص شد که با افزایش سطح خشکی از صفر (شاهد) تا ۱۰- بار (تنش)، میانگین کل صفات وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه و عملکرد بیولوژیک (بیوماس رویشی) همه گیاهچه‌های موتانت کاهش پیدا کردند. مقایسه میانگین صفات مورد بررسی نشان داد که گیاهچه‌های موتانت متحمل، وزن ریشه‌چه و بیوماس بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های حساس به تنش خشکی داشتند. بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی فنوتیپی ژنوتیپ‌های موتانت مورد مطالعه مشخص شد که ژنوتیپ‌های موتانت برنج در برابر تنش خشکی در ضمن حساسیت کلی و کاهش رشد، تنوع مناسبی وجود داشته و ژنوتیپ‌های موتانت در برابر این فشار محیطی واکنش نشان دادند. بنابراین با توجه به این تنوع گسترده در پاسخ به خشکی و به منظور اصلاح و تولید ارقام متحمل برنج می‌توان از ژنوتیپ‌های موتانت متحمل استفاده کرد. در تنش خشکی ژنوتیپ موتانت M_{29} دارای بیشترین میانگین وزن ریشه‌چه، وزن ساقه‌چه و بیوماس بود که نشان‌دهنده تحمل بالای این لاین به تنش خشکی می باشد. نتایج تجزیه واریانس برای همه صفات در بین ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌دار نشان داد که بیانگر تنوع ژنتیکی میزان آن‌ها بود. وزن خشک ریشه، طول ریشه و نسبت وزن ریشه به اندام هوایی ازصفات مهم در غربالگری ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی می‌باشند و نقش مهمی در انتخاب ارقام متحمل به خشکی دارند (۳). در واقع ژنوتیپ‌های موتانت M_{122}، M_{39} و M_{284} بهترین عملکرد را در سطح تنش داشتند و به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها شناسایی شدند. ژنوتیپ M_{31} با کمترین میانگین در صفات وزن تر و خشک ریشه‌چه، وزن تر و خشک ساقه‌چه و طول ساقه‌چه و ریشه‌چه تحمل بسیار کمتری نسبت به تنش خشکی نشان داد. همچنین ژنوتیپ‌های M_{204} و M_{112} نیز با داشتن حداقل عملکرد در سطح تنش به‌عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها معرفی شدند. بنابراین براساس نتایج مورفولوژیک، ۸ ژنوتیپ متحمل، نسبتا متحمل و حساس انتخاب و به همراه رقم مادری هاشمی در شرایط خشکی هیدروپونیک مورد ارزیابی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی قرار گرفتند.

بررسی صفات فیزیولوژیک تحت تنش خشکی میزان تجمع پرولین

تجزیه واریانس میزان پرولین نشان داد که ژنوتیپ‌های موتانت مورد مطالعه به تنش خشکی واکنش نشان داده و با افزایش مدت زمان تنش، میزان پرولین در اندام‌های هوایی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. در شرایط نرمال، اختلاف معنی‌داری از نظر تجمع پرولین در برگ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود نداشت، در حالی که تنوع زیادی در میزان پرولین بین ژنوتیپ‌های موتانت و والد هاشمی در شرایط تنش مشاهده شد (شکل ۲). میانگین میزان پرولین در ژنوتیپ‌های موتانت و والد هاشمی به طور چشمگیری از ۰/۰۴ میکرومول برگرم وزن تر در شرایط نرمال به ۰/۱۸ میکرومول بر گرم وزن تر در شرایط تنش افزایش یافت. نتایج مقایسه میانگین ۸ گیاهچه موتانت و والد هاشمی نشان داد که کمترین میزان پرولین مربوط به ژنوتیپ‌های M_{204} با میانگین ۰/۵۶ و بیشترین میزان پرولین مربوط به ژنوتیپ‌های M_{22} و M_{29} با میانگین ۰/۱۸ و ۰/۱۵ می‌باشد که نشان‌دهنده تنوع بالا و افزایش میزان پرولین در همه ژنوتیپ‌های موتانت تحت تنش

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]

خشکی می‌باشد. افزایش تجمع پرولین، مکانیزم اصلی تحمل به تنش است که در این ژنوتیپ‌ها فعال شده است. طبق نظر وندرسکولو و همکاران (۳۹) افزایش میزان پرولین در شرایط تنش یکی از معیارهای ایجاد تحمل در گیاه به شمار می‌رود که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. نتایج مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ × تنش × زمان بر فعالیت پرولین نشان داد که بیشترین میزان فعالیت در شرایط تنش خشکی به ژنوتیپ‌های موتانت M_{29} پس از ۷۲ ساعت تنش خشکی با میانگین ۰/۳۸ و کمترین میزان فعالیت در زمان ۶ ساعت پس از تنش خشکی مربوط به ژنوتیپ موتانت M_{106} با میانگین ۰/۰۰۴ تعلق داشت (شکل ۲). میزان پرولین برگ در ژنوتیپ موتانت M_{29} به‌طور معنی‌داری از ۰/۰۱۸ میکرومول بر گرم وزن تر در شرایط نرمال به ۰/۲۸ میکرومول بر گرم وزن تر در شرایط تنش افزایش یافته است. پرولین در تمام اندام‌های گیاه در طی تنش وجود دارد، با این وجود میزان تجمع آن در برگ‌ها سریع‌تر و بیشتر از سایر نقاط می‌باشد. تجمع پرولین با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در شرایط تنش خشکی، توانایی ترمیم آسیب‌های گیاهی را ارتقاء می‌دهد. گیاهانی که تحت تنش آبی قرار می‌گیرند، میزان پرولین نسبت به سایر اسیدهای آمینه افزایش می‌یابد و از این اثر به عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی برای انتخاب ژنوتیپ‌ها با هدف مقاومت به چنین شرایطی استفاده می‌شود (۱۱). بنابراین، میزان پرولین می‌تواند به عنوان معیاری برای غربالگری انواع برنج متحمل به تنش خشکی استفاده شود.

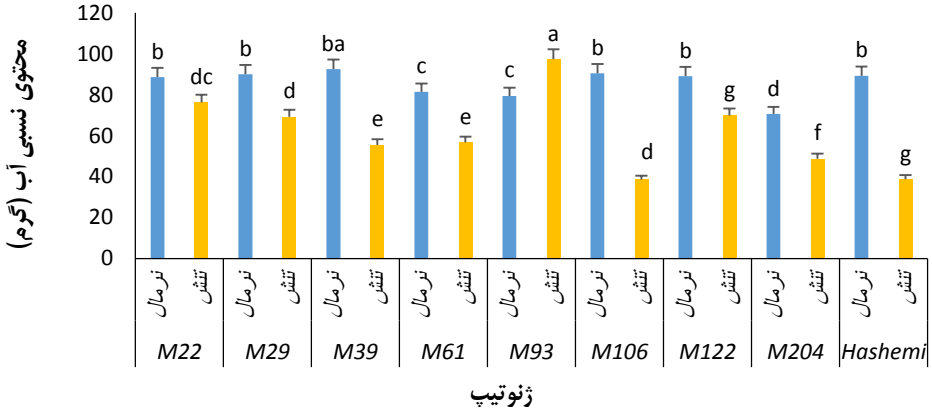


شکل ۲- اثر متقابل ژنوتیپ و تنش و زمان بر میزان پرولین ژنوتیپ‌های موتانت M_3 مورد مطالعه دو شرایط نرمال و تنش خشکی با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد (میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند)
Figure 2. The interaction between genotype and drought and time on proline content of M_3 mutant seedling and Hashemi parent two normal and drought stress conditions using Tukey test (5%) (Means with the same letters in each figure have not significant difference at 5 % probability level)

محتوی آب نسبی برگ (RWC)

میانگین محتوای آب نسبی برگ در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به طور معنی‌دار از ۸۵/۷ درصد در شرایط نرمال به ۶۱/۱۸ درصد در شرایط تنش کاهش یافت. اختلاف معنی‌داری از نظر محتوای آب نسبی بین ژنوتیپ‌ها در شرایط نرمال مشاهده نشد. به نظر می‌رسد در گیاهانی که تحت تنش هستند، افزایش اسیدآمینه پرولین باعث حفظ آماس و ادامه رشد سلول می‌گردد و یک نقش آنتی‌اکسیدانی در حفاظت از غشای بیولوژیک را دارد (۲۹). نتایج مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ × تنش بر محتوای آب نسبی نشان داد که بیشترین میزان محتوای آب نسبی در شرایط تنش به ژنوتیپ M_{93} با میانگین ۹۷/۲۷ تعلق داشت و کمترین میزان محتوای آب نسبی در شرایط تنش به ژنوتیپ M_{106} و هاشمی با میانگین ۳۸/۵۴ تعلق داشت (شکل ۳). محتوای آب نسبی ژنوتیپ M_{93} به عنوان یکی از ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی، در شرایط نرمال نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها کمتر بود. محتوای آبی برگ‌ها به عنوان فاکتوری برای تعیین سطح آب گیاه شناخته شده است که منعکس‌کننده فعالیت‌های متابولیکی در بافت‌هاست. کاهش در محتوای آب نسبی برگ نشانگر یک کاهش تورگور می‌باشد که سبب کاهش آب مورد نیاز برای فرایندهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی از قبیل طویل‌شدن سلولی، باز شدن روزنه‌ها و فرآیندهای وابسته به فتوسنتز است (۱۳).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]

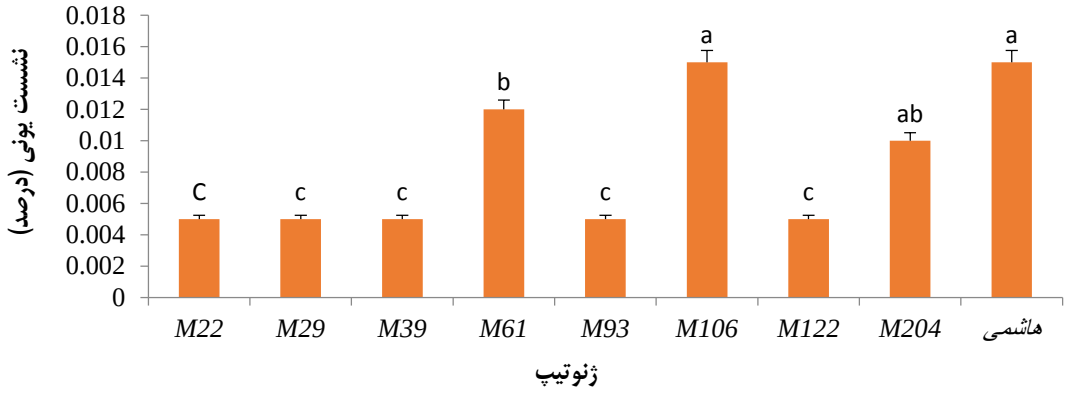


شکل ۳- اثر متقابل ژنوتیپ و تنش بر محتوای آب نسبی ژنوتیپ‌های موتانت M_3 مورد مطالعه دو شرایط نرمال و تنش خشکی با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد (میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند)

Figure 3. The interaction between genotype and drought and time on the relative water content of M_3 mutant seedling and Hashemi parent two normal and drought stress conditions using Tukey test (5%) (Means with the same letters in each figure have not significant difference at 5 % probability level)

میزان نشت الکترولیتی غشاء (EC)

نتایج تجزیه واریانس برای صفت نشت یونی نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ، محیط و برهمکنش آنها بر صفت مورد مطالعه معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) است. مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های موتانت برای این صفت در دو شرایط تنش و نرمال معنی‌دار بوده و در سه گروه آماری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که این صفت شدیداً تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفته و غشای سلول‌ها در اثر تنش خشکی تخریب و منجر به افزایش نشت یون‌ها می‌شود. نتایج به دست آمده از بررسی نشت یونی سلول نشان داد که در ژنوتیپ‌های موتانت مورد مطالعه در اثر تنش خشکی میزان نشت یونی و نفوذ پذیری سلول افزایش پیدا کرد. نتایج مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ در تنش نشان داد که بیشترین میزان نشت یونی در شرایط تنش ۱۰- به ژنوتیپ $M_{۱۰۶}$ و هاشمی با میانگین ۰/۰۳ تعلق داشت و کمترین میزان نشت یونی در تنش ۱۰- بار به ژنوتیپ M_{93} و M_{122} با میانگین ۱ ۰/۰ تعلق داشت (شکل ۴). به نظر می‌رسد ژنوتیپ‌های موتانت M_{93} و M_{122} توانایی بیشتری در حفظ ساختار غشا و جلوگیری از افزایش نفوذپذیری آن دارد. پایین‌تر بودن مقدار نشت الکترولیتی بر پایداری غشای سلولی و مقاومت بهتر گیاه در برابر تنش دلالت دارد. غشای سلولی به عنوان مکان کنترل فعالیت فرآیندهای مختلف سلولی به شمار می‌رود. در حقیقت غشاها اهداف اصلی تنش خشکی هستند که به دلیل تنش آبی حاصل شده در بافت‌ها، دچار اختلال شده و می‌توان توسعه تنش را با نشت املاح از بافت آسیب دیده اندازه‌گیری کرد (۸). به‌طور ویژه، میزان نشت یونی تابعی از نفوذپذیری غشاء است، از این رو می‌توان درجه پایداری غشا را از نظر هدایت الکترولیتی ارزیابی کرد (۱). تخریب غشاءهای سلول در ژنوتیپ‌های حساس به خشکی همانند ژنوتیپ‌های حساس به شوری بیشتر از ژنوتیپ‌های متحمل در برنج است و ژنوتیپ‌هایی که در شرایط تنش، نشت الکترولیتی کمتری داشته باشند، دارای پایداری غشاء زیادتری هستند (۲).



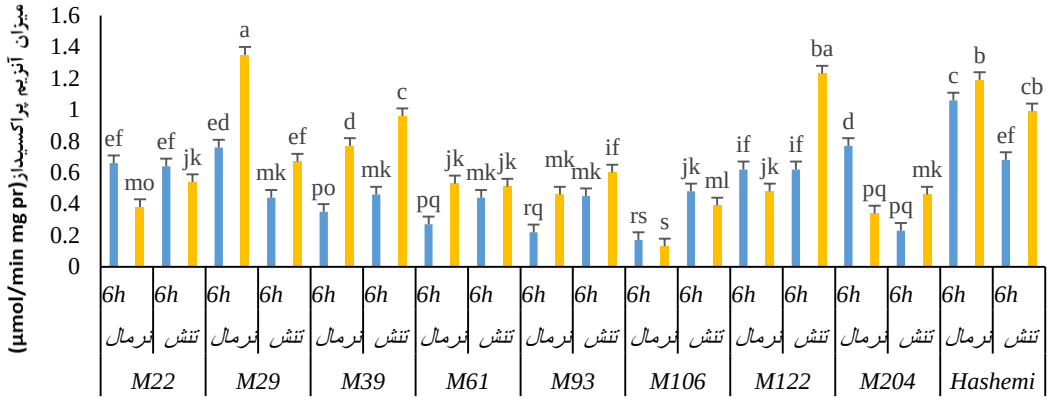
شکل ۴- اثر ژنوتیپ بر میزان نشت الکترولیت ژنوتیپ‌های موتانت M_3 مورد مطالعه و والد هاشمی در شرایط تنش خشکی با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد (میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند)

Figure 4. The effect of genotype on electrolyte leakage of M_3 mutant seedling and Hashemi parent in drought stress conditions using Tukey test (5%) (Means with the same letters in each figure have not significant difference at 5 % probability level)

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]

میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی

نتایج تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ، خشکی و برهمکنش آنها بر همه صفات پراکسیداز، کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز به جز اثر تنش بر صفت میزان کاتالاز و اثر زمان بر صفت میزان اسکوربات پراکسیداز، معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) است. اثر متداول تنش خشکی، اختلال در تولید و دفع کردن گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) است (۱۴). فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در برگ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، وقتی در معرض تنش PEG قرار می‌گیرند، تغییرات معنی‌دار داشته است. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه پاسخ یکسانی نسبت به تنش نشان ندادند. تحت شرایط تنش میزان افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و تغییرات آنها بسته به زمان مواجهه با تنش متفاوت بود. درجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاهان به گونه گیاهی، مرحله نموی، شرایط متابولیک، طول مدت و شدت تنش بستگی دارد (۳۳). آنزیم POD فعالیت بیشتری را در ژنوتیپ موتانت M_{122} نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر نشان داد که نشان‌دهنده ظرفیت بالاتر برای به دام انداختن ROS در این ژنوتیپ موتانت است و بنابراین، آسیب به لیپیدهای غشا پلاسمایی تحت تنش خشکی در این ژنوتیپ کمتر است. تنش خشکی باعث القاء تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. سطح بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجود در گیاهان)، مبین افزایش تحمل آن‌ها در برابر تنش‌های محیطی است (۱۹). نتایج مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ× تنش × زمان بر فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که بیشترین میزان فعالیت در شرایط تنش به ژنوتیپ M_{122} با میانگین ۱/۲۳ تعلق داشت و کمترین میزان فعالیت در زمان ۷۲ ساعت در شرایط نرمال مربوط به ژنوتیپ M_{106} با میانگین ۰/۱۳ تعلق داشت (شکل ۵).

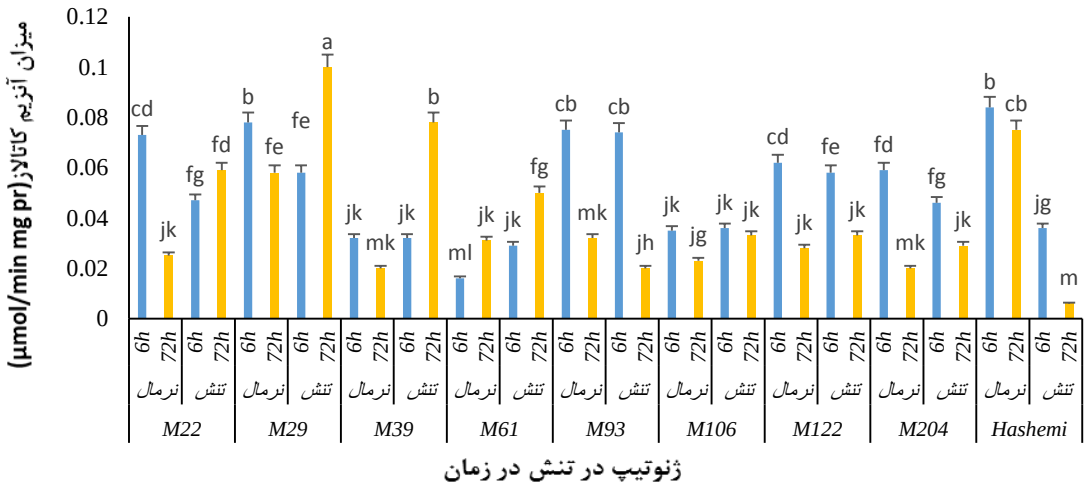


شکل ۵- اثر متقابل ژنوتیپ و تنش و زمان بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ های موتانت M_3 و والد هاشمی با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد (میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند)

Figure 5. The interaction between genotype and drought and time on peroxidase activity of M_3 mutant seedling and Hashemi parent two normal and drought stress conditions using Tukey test (5%) (Means with the same letters in each figure have not significant difference at 5 % probability level)

کاتالاز در تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن نقش دارد، تا از اثر سمی پراکسید هیدروژن جلوگیری نماید. واکنش بیوشیمیایی افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحمل به تنش خشکی را با حذف کننده‌های گونه‌های اکسیژن فعال بهبود می بخشد. افزایش در فعالیت آنزیم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی بیانگر فعالیت محافظتی برای مقابله با خسارت اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی در برنج است. تنش خشکی در این تحقیق موجب افزایش فعالیت کاتالاز شد. نتایج مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ × تنش × زمان بر فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که بیشترین میزان فعالیت در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش به ژنوتیپ M_{29} با میانگین ۰/۱ تعلق داشت. و کمترین میزان فعالیت در زمان ۷۲ ساعت و در شرایط تن به ژنوتیپ هاشمی با میانگین ۰/۰۰۶ تعلق داشت (شکل ۶). در ژنوتیپ‌های موتانت حساس M_{106}، فعالیت CAT در سطح تنش خشکی (۱۰-بار) کاهش معنی‌داری نشان داد که این کاهش در مقایسه با کاهش فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ های متحمل M_{29} تحت تنش به میزان درخور توجهی بالاتر بود. این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام متحمل به میزان قابل توجهی بیشتر است که روشنگر نقش این آنزیم در مقاومت گیاه در برابر تنش است (۱۰). بنابراین تجمع ROS در ژنوتیپ حساس بیشتر است و احتمال آسیب اکسیداتیو نیز شدیدتر است.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]



شکل ۶- اثر متقابل ژنوتیپ و تنش و زمان بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ های موتانت M_3 و والد هاشمی با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد (میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ندارند)

Figure 6. The interaction between genotype and drought and time on catalase activity of M_3 mutant seedling and Hashemi parent two normal and drought stress conditions using Tukey test (5%) (Means with the same letters in each figure have not significant difference at 5 % probability level)

تنش خشکی باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم APX در ژنوتیپ موتانت M_{29} شد. به این ترتیب القای فعالیت APX در این موتانت تحت تنش خشکی با کارآیی بالاتر مکانیسم دفاع آنتی اکسیدانی در این ژنوتیپ تحت تنش خشکی مرتبط است. نتایج مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ × تنش × زمان بر فعالیت آنزیم آسکوربات نشان داد که بیشترین میزان فعالیت در زمان ۷۲ ساعت در شرایط نرمال به ژنوتیپ M_{29} با میانگین ۰/۱۲ و در ۶ ساعت پس از تنش به ژنوتیپ‌های M_{122} و M_{93} با میانگین ۰/۰۵۷ تعلق داشت و کمترین میزان فعالیت در زمان ۶ ساعت در شرایط نرمال مربوط به ژنوتیپ M_{61} با میانگین ۰۱۱ /۰ تعلق داشت.

نتیجه‌گیری کلی

بهبود تحمل به خشکی در برنج به دلیل ماهیت پیچیده و غیرقابل پیش بینی یکی از فعالیت‌های چالش برانگیز است. برای تسهیل در بهبود ارقام متحملی که می توانند در شرایط تنش زنده بمانند و عملکرد بالاتری داشته باشند، درک کامل از خصوصیات مختلف مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مولکولی حاکم بر عملکرد برنج در شرایط تنش خشکی مورد نیاز است. بنابراین پارامترهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ۴۱ ژنوتیپ موتانت برنج به همراه والد مادری هاشمی تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که تنش خشکی ناشی از PEG باعث کاهش طول ساقه‌چه و ریشه‌چه می‌شود، در حالی که طول ریشه‌چه و نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه در ژنوتیپ‌های متحمل در مقایسه با انواع حساس افزایش می‌یابد. گرچه بسیاری از عوامل در تحمل به خشکی محصولات زراعی تأثیر می‌گذارند، اما این عوامل مستقل از هم نیستند اما با یکدیگر در تعامل هستند. از این رو، برای مطالعه تحمل گیاهان تحت تنش خشکی، نه تنها باید به شناسایی ویژگی‌های شاخص توجه کرد، بلکه به رابطه و تعامل آنها با هم دیگر نیز توجه داشت. پرولین که یکی از اسمولیت‌های سازگاری در گیاهان تحت تنش است، معمولاً در اثر تنش افزایش می‌یابد. 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. افزایش شاخص پایداری غشای ژنوتیپ‌های موتانت متحمل در شرایط تنش خشکی، کاهش خسارت غشای سلولی را نشان می‌دهد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد، نشت الکترونیکی در شرایط تنش خشکی بیشتر از شرایط نرمال است. آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسید ازکارآمدترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانت هستند. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها باعث افزایش تحمل به تنش‌ها از جمله تنش خشکی می‌شود. نتایج نشان داد که غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ژنوتیپ‌های متحمل در شرایط تنش افزایش داشته و لذا باعث افزایش تحمل در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند و از طرفی تنش خشکی (که ازجمله تنش‌های اکسیداتیو به شمار می‌رود) نیز میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز را افزایش می‌دهد. به‌طور کلی براساس نتایج، در میان ۴۲ ژنوتیپ موتانت برنج، ۲ ژنوتیپ موتانت M_{29} و M_{122} حداقل لوله شدن برگ، توانایی جبران بهتر تنش و همچنین محتوای نسبی آب، افزایش شاخص پایداری غشاء و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به جهت تحمل به تنش خشکی را نشان دادند که به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها شناسایی شدند. همچنین ژنوتیپ‌های موتانت M_{31}، M_{106} وM_{204} نیز با داشتن حداقل عملکرد در سطح تنش به عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها معرفی شدند. تجمع پرولین، افزایش زیست توده ریشه، افزایش پایداری غشاء و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند POX، APX و CAT در زمان تنش آب در تحمل به خشکی نقش دارند و می‌توانند در غربالگری برای تحمل به خشکی استفاده شوند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]

بنابراین، نتایج نشان داد که جهش القایی EMS اثر مطلوبی برای ایجاد ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی داشته است و ژنوتیپ‌های منتخب یاد شده می‌توانند در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی در توسعه ارقام جدید برنج با تحمل بیشتر به تنش خشکی، مورد توجه قرار داده شوند.

منابع

1. Agarie, S., N. Hanaoka, F. Kubota, W. Agata and B.P. Kaufman. 1995. Measurement of cell membrane stability evaluated by electrolyte leakage as a drought and heat tolerance test in rice (*Oryza sativa L.*). Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 40(1/2): 233-240.
2. Bandeoglu, E., F. Eyidogan, M. Yucel and H.A. Oktem. 2004. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. Journal of Plant Growth Regulation, 42: 69-77.
3. Bouman, B.A.M., R.M. Lampayan and T.P. Tuong. 2007. Water Management in Irrigated Rice: Copingwith Water Scarcity. IRRI. Los Banos. Philippines.
4. Basu, S., A. Roychoudhury, P.P. Saha and D.N. Sengupta. 2010. Comparative analysis of some biochemical responses of three indica rice varieties during polyethylene glycol-mediated water stress exhibits distinct varietal differences. Acta Physiologiae Plantarum, 32(3): 551-563.
5. Bates, I.S., R.P. Waldern and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress. Plant and Soil, 39: 205-207.
6. Bian, S.H. and Y. Jiang. 2008. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. Scientia Horticulturae, 120: 264-270.
7. Chance, B. and A.C. Maehly. 1995. An assay of catalase and peroxidase. In: Colowick, S.P., Kapland, N.D. (eds), Method in Enzymology, Academic Press, New York, 764-791 pp.
8. Chaturvedi, G.S., A. Singh and R. Bahadur. 2012 Screening techniques for evaluating crop germplasm for drought tolerance. Plant Archives, 12(1): 11-18.
9. Claiborne, A. 1985. Catalase activity. In: Handbook of methods for oxygen radical research (R. A. Greenwald, Ed). Boca Raton, FL, 283-284 pp.
10. Drakhshan, A., M. Salari, V. Babaeizad, N. Panjehkeh and A.H. Taheri. 2020. Study of biochemical and molecular changes of iranian rice cultivars in interaction with bacterial pathogen Xanthomonas oryzae pv. oryzae causes leaf blight disease. Journal of Crop Breeding, 12(36): 77-89.
11. Fahramand, M., M. Mahmoody, A. Keykha, M. Noori and K. Rigi. 2014. Influence of abiotic stress on proline, photosynthetic enzymes and growth. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 8(3): 257-265.
12. Farooq, M., A. Wahid, D.J. Lee, O. Ito and K.H.M. Siddique. 2009. Advances in drought resistance of rice. Critical Reviews in Plant Science, 28: 199-217.
13. Farkhondeh, R., E. Nabizadeh and N. Jalilnezhad. 2012. Effect of salinity stress on proline content, membrane stability and water relation in two sugar beet cultivars. International Journal of Agricultural Science, 2(5): 385-392.
14. Faize, M., L. Burgos, L. Faize, A. Piqueras, E. Nicolas, G. Barba-Espin, M.J. Clemente-Moreno, R. Alcobendas, T. Artlip and J.A. Hernandez. 2011. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought. Journal of Experimental Botany, 62: 2599-2613.
15. Fang, Y.J. and L.Z. Xiong. 2015. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants, Cellular and Molecular Life Sciences, 72: 673-689.
16. Fukai, S. and M. Cooper. 1995. Development of Drought-Resistant Cultivars Using Physio-Morphological Traits in Rice. Field Crops Research, 40: 67-86.
17. Gisele, A., M. Torres, A. Gimenes, V.E. de Rosa and V. Quecini. 2007. Identifying water stress-response mechanisms in citrus by in silico transcriptome analysis. Genetics and Molecular Biology, 30: 888-905.
18. Gregorio, G.B, D. Senadhira and R.T. Mendoza. 1997. Screening rice for salinity tolerance. IRRI Discussion Paper series 22(22) IRRI, Manila, 30 p.
19. Hossaini, S.V., A. Ganjeali, M. Lahouti and A. Beyk Khormizi. 2013. Effect of drought stress on seed germiniation and some morphopysiological and biochemical traits of Oryza sativa L. cv. Hashemi seedlings. Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi), 104: 182-188.
20. Huang, L., F. Zhang, F. Zhang, W. Wang, Y. Zhou, B. Fu and Z. Li. 2014. Comparative transcriptome sequencing of tolerant rice introgression line and its parents in response to drought stress. BMC Genom, 15: 1026.
21. Jankowicz-Cieslak, J. and B.J. Till. 2016. Chemical mutagenesis of seed and vegetatively propagated plants using EMS. Curr. Protoc. Plant Biol, 1: 617-635.
22. Li, Y., Y. Gao, L. Ding, L.Q. Shen and S. Guo. 2009. Ammonium enhances the tolerance of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) to drought condition. Agricultural Water Management, 96: 1746-1750.
23. Lindén, L., H. Rita and T. Suojala. 1996. Logit models for estimating lethal temperatures in apple. HortScience, 31: 91-93.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]

24. Lobell, D.B., W. Schlenker and J. Costa-Roberts. 2011. Climate trends and global crop production since 1980. Science, 333: 616-620.
25. Kim, Y.J., S. Shanmugasundaram, S.J. Yun, H.K. Park and M.S. Park. 2011. A simple method of seedling screening for drought tolerance in soybean, Korean Journal of Crop Science, 46: 284-288.
26. Marchner. H. 1995. Mineral nutrition of higher plant. Second reprint. Academic press.
27. Michel, B.E. and M.R. Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiology, 51: 914-916.
28. MVD. 2016. Mutant Variety Database, http://mvd.iaea.org.
29. Patakas, A., E. Zioziou, N. Nikolaou and K. Radoglou. 2002. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. Plant Science, 163(2): 361-367.
30. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology, 22: 867-880.
31. Pandey, V. and A. Shukla. 2015. Acclimation and tolerance strategies of rice under drought stress. Rice Science, 22(4): 147-161.
32. Rai, M.K., R.K. Kalia, R. Singh, M.P. Gangola and A.K. Dhawan. 2011. Developing Stress Tolerant Plants through in vitro Selection-An Overview of the Eecent Progress. Environmental and Experimental Botany, 71(1): 89-98.
33. Rezaeinia1, M., M.R. Bihamta, S.A. Peighambari and A. Abbasi. 2018. Effect of Drought Stress on Antioxidant Enzymes Activities and Some Physiological Traits in Chickpea (*Cicer Arietinum* L.). Journal of Crop Breeding, 11(30): 11-22.
34. Sabesan, T. and K. Saravanan. 2016. In Vitro Screening of Indica Rice Genotypes for Drought Tolerance Using Polyethylene Glycol. Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engg, 3(2): 375-380.
35. Shu, Q.Y. and P.J.L. Lagoda. 2007. Mutation techniques for gene discovery and crop improvement. Molecular Plant Breeding, 5: 193-195.
36. Shekoofa, A. and T.R. Sinclair. 2018. Aquaporin activity to improve crop drought tolerance. Cells, 7(9): 123.
37. Suprasanna. P., S.J. Mirajkar, Y.V. Patade and S.M. Jain. 2014. Induced mutagenesis for improving plant abiotic stress tolerance. Mutagenesis: exploring novel genes and pathway. Wageningen Academic. 476.
38. Thabet, S., T. Moursi, M. Karam, A. Börner and A.M. Alqudah. 2020. Natural variation uncovers candidate genes for barley spikelet number and grain yield under drought stress. Genes, 11: 533.
39. Vendruscolo, E.C.G., I. Schuster, M. Pilegg, C.A. Scapim, H.B.C. Molinari, C.J. Marur and L.G.E. Vieira. 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. Journal of Plant Physiology, 164: 1367-1376.
40. Vibhuti, S., S. Shahi, K. Bargali and S. Bargali. 2015. Seed germination and seedling growth parameters of rice (*Oryza sativa*) varieties as affected by salt and water stress. Indian Journal of Agricultural Sciences, 85(1): 102-108.
41. Yang, J.C., K. Liu, S.F. Zhang, X.M. Wang, Z.Q. Wang and L.J. Liu. 2008. Hormones in rice spikelets in responses to water stress during meiosis. Acta Agronomica Sinica, 34: 111-118.
42. Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. IRRI, Las Banos, Laguna, 83 p.
43. Zingaretti, S.M., M.C. Inácio, L.M. Pereira, T.A. Paz and S.C. França. 2013. Water stress and agriculture: responses of organisms to water stress. Responses of organisms to water stress/water stress and agriculture. IntechOpen, 179 pp.
44. Xu, W., K. Cui, A. Xu, L. Nie, J. Huang and S. Peng. 2015. Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. Acta Physiologiae Plantarum, 37(9): 1-11.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]

Determining the most Tolerant Genotypes of Hashemi Rice Mutant (M3) in Response to Drought Stress using of Physiological Growth Indices and Enzymatic Changes

Seyed Elyas Mirnouri[1], Reza Shirzadian-Khoramabad[2] and Leila Khazaie[3]

1- M.Sc. Student in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan
2- Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3- Researcher, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran, (Corresponding author: Leila_khazaie@yahoo.com)
Received: 24 December, 2020 Accepted: 2 November, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: Abiotic stresses, especially drought, have a negative effect on crop growth and production. Plants display a variety of hysiological and biochemical responses both at the cellular and whole organism level upon sensing drought stress. Drought tolerance levels and antioxidant protection mechanisms were evaluated for 41 mutant genotypes seedlings (M_3) induced of the ethyl methanesulfonate on Hashemi rice cultivar.

Material and Methods: Drought was imposed in hydroponic culture with polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) at the level of -10 bar using factorial experiment as completely randomized design. In this experiment the morphological characteristics of relative humidity content, electrolyte leakage, proline and antioxidant enzymes were investigated.

Results: All the studied genotypes showed apparent decreases in growth characteristics under drought stress. Based on different morpho- physiological parameters, two genotypes M_{29} and M_{122} were identified as promising drought tolerant mutant genotypes. They exhibited the maximum increase in root length without any significant changes in its root weight and root volume compared with the parent under stress and also showed better performance for various physiological parameters such as relative water content, cell membrane stability and proline content upon water stress under hydroponic conditions. Concomitantly, the activity of antioxidant enzymes catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase in the drought-tolerant mutant genotypes increased markedly during drought stress, while decreased by drought stress in the drought sensitive mutant genotypes. Also, M_{31} and M_{106} mutant genotypes were introduced as the most susceptible genotype with minimum performance at stress level.

Conclusion: In this study it was found, proline accumulation, increase of root biomass, increase of membrane stability and antioxidant enzymes such as POX, APX and CAT during water stress are contributing to drought tolerance conditions and could be used in screening for drought tolerance. The mutant genotypes identified in this study will be useful for further dissection of water stress tolerance in rice.

Keywords: Diversity, Drought, Enzyme, Ethyl methanesulfonate, Mutation, Prolin, Rice

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.14.42.31]