DOI: http://dx.doi.org/10.22092/aj.2016.106736

نشریه زراعت شماره ۱۰۹، زمستان ۱۳۹۴

(پژوهش و سازندگی)

بررسی تاثیرتنش شوری بر پتانسیل اسمزی، میزان غلظت قندها و پروتئین های محلول در ژنوتیپ های مختلف برنج در مرحله گیاهچه ای

• سعید سعیدی‌پور، استاد یار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر، گروه زراعت و اصلاح نباتات، شوشتر، ایران (نویسنده مسئول)

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۸۹

پست الکترونیک نویسنده مسئول: saeeds79@gmail.com

چکیده

برنج یکی از گونه های نسبتاً حساس به تنش شوری است که از نظر تحمل یا حساسیت به تنش شوری، تنوع ژنتیکی زیادی در مخزن ژنتیکی انواع زراعی آن نیز دیده می شود. به منظور بررسی تغییرات غلظت قندها و پروتئین های محلول در محیط آبکشت، آزمایشی در سال۸۶ – ۱۳۸۵ در شرایط گلخانه ای در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شد. تیمار شوری در دو سطح محلول عادی یوشیدا و یا حاوی ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم ($EC=12dS\,m^{-1}$) در مرحله شش برگی به مدت یک هفته اعمال شد، و نمونه گیری طی این مدت در فواصل زمانی (صفر ، ۴، ۱۲، ۲۴، ۴۸،۹۶ و ۱۶۸ ساعت) پس از اعمال تیمار, از پهنک برگ ششم غلاف به عمل آمد وغلظت قندها و پروتئین ها پس از استخراج توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شدند. در این آزمایش غلظت قندهای محلول در رقم خارجی متحمل به شوری (IR651) طی دوره اعمال تنش به شکل بسیار معنی داری افزایش پیدا کرد، حال آنکه در سایر ارقام ایرانی و رقم حساس به شوری (IR29) غلظت قندها تحت تیمار تنش عدم تغییر و یا کاهش را نشان داد. از طرفی تغییر معنی داری در غلظت پروتئین های محلول در هیچ یک از ارقام تحت تیمار تنشی مشاهده نشد هر چند که در رقم متحمل به شوری به خلاف سایر ارقام غلظت پروتئین ها افزایش پیدا کرد. از این رو کاهش پتانسیل اسمزی تا ۱/۴۳- مگاپاسکال در رقم متحمل را می توان به توان بالای این رقم در سنتز ترکیبات سازگار جهت تنظیم اسمزی به منظور جلوگیری از پسابیدگی نسبت داد.

کلمات کلیدی: برنج, شوری, پتانسیل اسمزی،کربوهیدرات ها،پروتئین ها

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No:108 pp: 1-8

Salinity effects on osmotic potential, soluble proteins and carbohydrates concentration in rice (Oryza sativa) genotypes at seedling stage

By:

- S. Saidipour , *(Corresponding Author), Assistant Professor of Islamic Azad University - Shoushtar, Iran*

Received: February 2008 **Accepted: September 2010**

Rice (*Oryza sativa*), a salt-sensitive species, has considerable genetic variation for salt tolerance within the cultivated gene pool. To evaluate salinity effects on osmoprotectants accumulation two rice genotypes (IR29 and IR651, sensitive and tolerant respectively) accompany with two semi-tolerant Iranian rice cultivars, an experiment were carried out on the Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran in the growing season of 2006-2007 in a green house. The experiment were grown in normal condition till 6th leaf was fully expanded. Seedlings were exposed to salinity, EC 12 dS m^{-1} and normal conditions (EC = 1.65 dS m^{-1}, Ushida solution base EC) for one week. Samples were taken 0, 4, 12, 24, 48, 96 and 168 h after starting the treatments. The amount of soluble organics were measured with spectrophotometer after extraction. The concentration of soluble carbohydrates in tolerant cultivars (IR651) increased significantly compared to other cultivars under saline condition. The variation of soluble proteins were not significant in all cultivars in stress treatment, but at the end of experiment protein concentration accumulated in tolerant cultivar whereas decreased in others. So the decrease of osmotic potential till to -1.43 MPa in tolerant cultivar was related to the high ability of this cultivar to synthesis of organic matter like soluble carbohydrates to prevent of dehydration.

key Words: Rice, salinity, osmotic potential, carbohydrates, proteins

مقدمه

فرآیند نگهداری تورژسانس سلولی بوسیله افزایش کافی محلولهای سلولی جهت جبران پتانسیل اسمزی خارجی، تنظیم اسمزی و یا تعادل اسمزی نامیده می شود (مونز و ترمات، ۱۹۸۶). در پتانسیل آب برگ و تنظیم اسمزی در ارقام مختلف برنج با سابقه ژنتیکی متفاوت اختلاف ژنتیکی گزارش شده است (لیلی، ۱۹۹۶). گیاهان مقاوم به شوری باید دارای توانایی تنظیم فشار اسمزی بوسیله تنظیم اسمزی باشند. گیاهان به استثناء زمانی که شوری خیلی زیاد است، اغلب می توانند پتانسیل کاهش یافته را بدون از دست دادن آب تنظیم کنند. تنظیم اسمزی حدود یک بار در روز در گیاهان مشاهده شده است (برن استین، ۱۹۶۳)، اما میزان آن به گونه گیاهی بستگی دارد. خسارت اسمزی می تواند در نتیجه غلظت های بالای سدیم (احتمالا تا چند صد میلی مول) در اپوپلاست برگها رخ دهد، هنگامی که سدیم از طریق جریان تعرقی وارد برگ ها شده و پس از ، از دست رفتن آب در برگ ها باقی می ماند، این وضعیت بوسیله آنالیزهای اشعه X در برگ های برنج مشاهده شده است، این نویسندگان حدود ۶۰۰ میلی مول سدیم را در اپوپلاست برگ های برنج تحت تنش متوسط شوری گزارش کردند(فلورز و همکاران، ۱۹۹۱). تعادل اسمزی، جذب و تجمع یونها و سنتز محلولهای آلی را شامل می شود. بسیاری از گلیکوفیتها توانایی تعادل اسمزی را دارند و محلولهای آلی نقش اصلی را در مورد آنها بازی می کنند (گرین وی و موتر، ۱۹۸۰). تعادل اسمزی براساس سنتز محلولهای آلی است و به انرژی قابل مصرف زیادی نیاز دارند، در صورتی که تجمع یونها در درون واکوئلها از نظر انرژی، محلول خیلی ارزانی را برای تنظیم فراهم می کنند (فلورز و همکاران، ۱۹۷۷)، چون که سهم متفاوت محلولهای آلی وغیر آلی برای تنظیم اسمزی ضمانت مهمی برای تعادل انرژی است (وین جونز، ۱۹۸۱). بابو و همکاران (۱۹۹۹) با آزمایش انواع مختلف برنج در شرایط تنش خشکی دریافتند که تنوع زیادی از نظر تنظیم اسمزی وجود دارد.

تنظیم اسمزی فصلی در سورگوم و ذرت رشد یافته در مزرعه در پاسخ به تنش کم آبی دیده شده است. کاملی[1] و لوسل[2] بین تغییرات قندهای محلول و پتانسیل اسمزی در ذرت و سورگوم همبستگی بالایی را یافتند(علی و همکاران، ۱۹۹۹).

افزایش در غلظت ساکارز و سطح قند های محلول تحت شرایط تنش شوری در سازگاری و ایجاد تحمل به شوری احتمالا نقش دارد (جی هات و همکاران، ۲۰۰۵) و از بین ترکیبات آلی مختلف، قندها بیش از ۵۰٪ مجموع مواد متشکله پتانسیل اسمزی را تشکیل می دهند (کرام، ۱۹۷۶). براساس برخی مطالعات اثرات کلرید سدیم در لوبیا که گونه ای حساس است میزان ساکارز برگ افزایش یافته است، اما در برنج که مقاومتی متوسط دارد این میزان کمتر بوده؛ در حالی که در سویا که مقاومت آن هم متوسط است اندکی کاهش یافته و در پنبه که مقاوم است بیشتر کاهش داشته است (رادرت، ۱۹۸۴). متابولیسم قندها به شکل نامطلوبی در گیاهان تحت تنش شوری تحت تاثیر قرار می گیرد (دوبی، ۱۹۹۷). در برگ گلی کوفیت ها محتوای قند های محلول تحت تنش شوری (روسن و همکاران، ۱۹۹۸)، تنش رطوبتی (فویرو همکاران، ۱۹۹۸)، تنش سرما (هیوری و همکاران، ۱۹۹۵) و طی پیری (وینگلر، ۱۹۹۸) افزایش می یابد. ارقام مختلف برنج در عکس العمل به تنش شوری دامنه گسترده

ای از بسیار حساس تا متحمل را در بر می گیرد (شانون و همکاران، ۱۹۹۸)، از این رو تغییرات مورفولوژیکی میتواند با متابولیت های مختلف غیر نرمال طی مرحله جوانه زنی و گیاهچه ای همبستگی داشته باشد (دوبی و رانی، ۱۹۸۹). نتایج برخی مطالعات نشان داد که شوری موجب تجزیه نشاسته و تجمع قندها در گیاهچه های برنج شده است، این افزایش با فعالیت بیشتر آنزیم هایی نظیر نشاسته فسفریلاز، ساکارز فسفات سینتاز و کاهش فعالیت اینورتاز همراه بوده است، بعلاوه فعالیت این آنزیم ها در ارقام حساس و متحمل برنج تحت تنش شوری متفاوت بوده است (دوبی، ۱۹۹۷). پروتئین های مختلفی در گونه های گیاهی تحت اثر تنش شوری شناخته شده اند (اشرف و هریس، ۲۰۰۴). پاریک و همکاران(۱۹۹۷) پیشنهاد کرد که پروتئین ها می توانند بعنوان مارکرهای بسیار مهم جهت بهبودی تحمل شوری در تکنیک های مهندسی ژنتیک بکار روند ، هر چند که پروتئین های تولید شده تحت تنش شوری همیشه با القاء تحمل به شوری در کوتاه مدت ارتباط ندارند و بسیاری از آنها در فرایندهای نموی درگیر هستند (دی سوزا فیلو و همکاران، ۲۰۰۳). ژنهای مختلف بیان شده در عکس العمل به تنش شوری شناخته شده اند(شی نو زاکی، ۱۹۹۹ و کاواساکی و همکاران، ۲۰۰۱). برخی از این ژنها برای کد کردن پروتئینهای حفاظت کننده نظیر اسموتین(زنگ، ۲۰۰۰)،پروتئین های رویان زایی (اسپیلوند و همکاران، ۱۹۹۲)و پروتئین های ناقل(بیزل و ریوونی، ۱۹۹۴)، و برخی برای کد کردن آنزیمهای خاصی که در فرایندهای متابولیکی ویژه ای در شرایط شوری دخالت داشته بکار می روند(،کوش من،۱۹۹۲ و گونگ و همکاران،۲۰۰۱). دوبی (۱۹۹۴) نشان داد که شوری سنتز پروتئین های معینی را بالا می برد و باعث کاهش یا افزایش سطح کل ویا پروتئین های محلول شده که بستگی به قسمت مورد مطالعه گیاه دارد و منجر به افزایش فعالیت و سنتز بسیاری از آنزیمهای عمل کننده در متابولیسم پروتئین می شود. در گونه های مختلف گیاهی، کاهش در سطح پروتئین بخشهایی از گیاه که تحت اثر شوری قرار می گیرد به کاهش در سنتز پروتئین، کم شدن درجه فراهمی اسید های آمینه و ماهیت آنزیمهای دخالت کننده در سنتز پروتئین و اسیدهای آمینه ، نسبت داده می شود (لویت، ۱۹۸۰). برعکس افزایش سطح پروتئین بر اثر شوری که در چندین گیاه گزارش شده ناشی از افزایش سنتز پروتئین های قبلی و یک سری از پروتئن های جدید است (دوبی و رانی، ۱۹۸۹). اما در برخی موارد کاهش سنتز پروتئین ها ناشی از اختلال در متابولیسم اسیدهای آمینه است که این وضعیت در نهال های نخود و برگهای باقلا دیده شد(شی ویاکو و لیونووا، ۱۹۷۵). در آزمایشات انجام گرفته بر روی برنج محتوای پروتئینهای محلول تحت اثر تیمار شوری یک افزایش پس از ۱۵ روز و یک کاهش را پس از ۲۵ روز نشان داد (میسرا و همکاران،۱۹۹۷).

مواد و روش ها

محل و زمان انجام آزمایش

این آزمایش در سال‌های ۸۶-۱۳۸۵ در شرایط گلخانه ای در پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام شد.

تنظیم اسمزی

روش اعمال تنش

در این آزمایش, ۲ رقم ایرانی برنج نسبتا متحمل (موسی طارم و غریب) انتخاب و به همراه لاینهای IR651 و IR29 (به ترتیب متحمل و حساس) مجموعاً شامل چهار رقم درمرحله رویشی کشت داده شد. در این آزمایش, زمان آغاز تنش ۲۱ روز پس ازکاشت و دوره اعمال تنش نیز یک هفته بود. شوری در دو سطح نرمال وEC12 دسی زیمنس بر متر مربع اعمال شد. تعداد تکرار این آزمایش ۳ وبصورت اسپلیت پلات در زمان در قالب طرح کاملاً تصادفی اجراء شد و تا پایان یک هفته، پتانسیل اسمزی، میزان قند ها و پروتئین های محلول در زمان های ۰، ۴، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶ و ۱۶۸ ساعت در برگهای ششم اندازه گیری شد.

برای اندازه‌گیری پتانسیل اسمزی از برگ ششم هر گیاه استفاده شد نمونه های برگی را پس از جدا کردن از بوته ها درون تیوب های مملو از آب مقطر قرار داده و برای مدت ۲۴ ساعت در سردخانه، تحت شرایط تاریکی و دمای C^0 ۴به منظور حذف اختلاف ناشی از پتانسیل ترگر نگهداری شد، بعدازآن نمونه های برگی از درون تیوب ها خارج گردیدو فوراً در داخل ورق آلومینیوم پیچیده و در ازت مایع منجمد و تا فرا رسیدن زمان مناسب جهت اندازه‌گیری به فریزر منتقل شد. از دستگاه اسمومتر مدل Wescor- 5520 ساخت سال ۲۰۰۴ برای اندازه‌گیری این پارامتر استفاده شد. برای این منظور نمونه‌ها از فریزر خارج گردید و سپس با استفاده از دستگاه پرس برگ, عصاره برگ بر روی دیسک‌های کاغذی مخصوص دستگاه ریخته شد و دیسک‌ها بلافاصله در محفظهٔ دستگاه اسمومتر قرار داده شد و دستگاه مقدار اسمولایت‌ها را بر حسب واحد مول بر لیتر مشخص نمود. سپس با استفاده از فرمول وانت هوف مقدار پتانسیل اسمزی برگ محاسبه گردید (بیرس و کول،۱۹۷۰).

$$\Psi_s\ (MPa) = -\ M\ I\ R\ T$$

یا

$$\Psi_s\ (MPa) = -\ M\ (mmol\ kg^{-1}) \times 2.58 \times 10^{-3}$$

در این معادله M مولاریتهٔ محلول، I ضریب یونیزاسیون، R ثابت عمومی گازها برابر با ۰/۰۰۸۳۱۴۳ $(MPa\ mol^{-1}\ K^{-1})$، T دما بر حسب درجهٔ کلوین (C۲۷۳°) می‌باشد که در این صورت پتانسیل اسمزی Ψ_s بر حسب مگاپاسکال محاسبه می‌شود.

بر اساس روش پیشنهادی بابو و همکاران (۱۹۹۹) اندازه گیری تنظیم اسمزی به روش محاسبه اختلاف بین پتانسیل اسمزی برگ گیاه نرمال و برگ گیاه تحت تنش محاسبه می شود.

اندازه گیری میزان کل قندها

مقدار کل قندهای محلول به روش فنل- اسید سولفوریک اندازه گیری شد. پیش از شروع کار سه محلول سولفات روی ۵٪، هیدروکسید باریم ۰/۳ نرمال و محلول ۵٪ فنل تهیه گردید.

- روش کار:

۱- نمونه برگی که قبلاً خشک شده است را آسیاب نموده و آنرا از غربال مش ۸ عبور دادیم. (نمونه های برگ در دمای ۷۰c° به مدت ۴۸ ساعت خشک شد.)

۲- ۰/۱ گرم پودر غربال شده را به تیوب های در پیچ دار منتقل کردیم.

۳- مقدار ۱۵ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ را که قبلاً گرم کرده به لوله اضافه نموده و لوله را به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط کردیم.

۴- به منظور جدا کردن فاز مایع از جامد، تیوب ها را به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوز کردیم.

۵- عصاره (فاز مایع) هر نمونه را در داخل پتری ریختیم.

۶- پتری ها را به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰c° نگه داشته تا اتانل آن تبخیر شد.

۷- پس از تبخیر الکل، مقدار ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به پتری ها افزوده و این محلول را به یک ظرف ۲۵۰ میلی لیتر منتقل نمودیم.

۸- به منظور حذف رسوبات اضافی و ترکیبات دیگر، ۵ میلی لیتر سولفات روی ۵٪ و ۴/۷ میلی لیتر هیدروکسید باریم ۰/۳ نرمال را به آن اضافه کردیم.

۹- مقدار ۴۵ میلی لیتر از هر نمونه را برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ۳۰۰۰ سانتریفوژ کردیم.

۱۰- عصاره شناور را در یک ظرف دیگر جمع آوری نموده و ۲ میلی لیتر از آنرا به لوله ازمایش منتقل کردیم.

۱۱- به هر لوله آزمایش مقدار ۱ میلی لیتر محلول ۵٪ فنل افزودیم. درب لوله را بسته و آنرا به شدت تکان دادیم تا محلول کف کرد.

۱۲- زیر هود و به سرعت بوسیله سرنگ مقدار ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ به داخل هر یک از نمونه ها اضافه کردیم. پس از این مرحله قند محلول در هر یک از نمونه ها به رنگ نارنجی تغییر رنگ داد.

۱۳- پس از ۴۵ دقیقه و با تثبیت رنگ قهوه ای مایل به زرد، میزان جذب نور را با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج nm۴۸۵ قرائت کردیم.

اندازه گیری مقدار کل پروتئین

برای سنجش غلظت پروتئین محلول به روش برادفورد (Bradford) (۱۹۷۶)عمل شد، بدین ترتیب که ابتدا محلول های مورد نیاز جهت استخراج پروتئین به قرار زیر استخراج شد.

۱-بافراستخراج (Tris-HCl): برای تهیه یک لیتر محلول استخراج، میزان ۱۲۱/۴ گرم تریس در یک لیتر آب مقطر حل کرده و اسیدیته محلول توسط اسید کلریدریک نرمال به ۶/۸ رسانده شد.

۲- معرف Bradford: برای تهیه این معرف مقدار ۱۰۰ میلی گرم (Comassie Brilliant Blue G-250) را در ۵۰میلی لیتر اتانول ۹۵٪ حل کرده و به مدت یک ساعت عمل هم زدن به منظور حل شدن کامل صورت گرفت. سپس ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ قطره قطره به محلول اضافه شد و حجم محلول کل با کمک اب مقطر به یک لیتر رسانده شد، محلول از کاغذ صافی واتمن (نمره یک) عبور داده شد.

کلیه مراحل استخراج پروتئین از بافت گیاهی در سردخانه و در دمای $4\ C^0$- انجام گرفت.بافت گیاهی (برگ رفرنس)پس از انتقال از گلخانه به ازمایشگاه بوسیله فلاسک ازت مایع، سریعا توزین شده و در بسته های یک گرمی درون ورقه های آلومینیوم تا زمان عصاره گیری در فریزر $-40\ C^0$ نگه داری شد، استخراج پروتئین در هاون های چینی و میزان جذب نوری محلول حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج nm۵۹۵ قرائت شد.

نتایج

شوری و متابولیسم کربوهیدراتها

روند تغییرات میزان قندهای محلول در آزمایش انجام گرفته در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از آغاز تنش شوری میزان قندهای محلول در رقم متحمل به شوری IR651 بصورت معنی داری افزایش یافت و روند افزایش تا آخر دوره تنش ادامه یافت . بگونه ای که میزان قند محلول از $36/mgg^{-1}dw$ پیش از اعمال تنش به $87\ mgg^{-1}dw$ در پایان دوره تنش رسید و تفاوت معنی داری را با تیمار کنترل نشان داد. در سایر ارقام روند تغییرات به گونه ای دیگر بود، در رقم IR29 پس از یک افزایش نسبی طی ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش (که البته این تغییرات معنی دار هم نبوده است) مقدار قندهای محلول کاهش نشان داد و شبیه وضعیت تیمار شاهد شد. حد اکثر میزان تجمع قند در این رقم ۴ ساعت پس از اعمال تنش به میزان $45\ mgg^{-1}dw$ و در پایان دوره اعمال تنش نظیر تیمار نرمال ومقدار آن $36\ mgg^{-1}dw$ بود. میزان قند محلول در ارقام ایرانی موسی طارم و غریب تحت اثر تیمار تنش کاهش نشان داد، کاهش میزان قندهای محلول در رقم موسی معنی دار نبوده است ولی در رقم غریب کاهش میزان قندها طی ۲۴ ساعت اولیه تفاوت معنی داری را با تیمار شاهد نظیر خود داشت.

شوری و متابولیسم پروتئین

روند تغییرات پروتئین در تیمار شوری (شکل۲) بیانگر عدم تغییر و یا یک افزایش نسبی پس از ۲۴ ساعت از زمان شروع تنش نسبت به زمان صفر در IR651 و غریب بود؛ با این تفاوت که در رقم متحمل به شوری (IR651) پس از ۲۴ ساعت میزان پروتئین های محلول کاهش نیافت و میزان آن تا آخر دوره اعمال تنش (۱۶۸ ساعت) بیش از وضعیت نرمال باقی ماند. مقدار پروتئین اندازه گیری شده پس از ۲۴ و ۱۶۸ ساعت در این رقم تحت اثر تیمار شوری به ترتیب ۹۲ و ۱۰۲ میلی گرم بر گرم وزن تر بود، که البته علی رغم افزایش نسبی ولی اختلاف معنی دار نبود، حال آنکه در سایر ارقام در پایان آزمایش میزان پروتئین ها بصورت معنی داری نسبت به زمان ۲۴ ساعت کاهش داشت. در ارقام IR29 ، موسی طارم و غریب میزان پروتئین پس از ۲۴ ساعت به ترتیب ۸۹، ۱۲۰ و۱۱۳ میلی گرم بر گرم وزن تر و پس از ۱۶۸ ساعت این مقادیر به ۶۶، ۸۶ و ۹۲ میلی گرم بر گرم وزن ترکاهش یافت (شکل۲).

نکته قابل توجه اینکه میزان پروتئین در کلیه ارقام پس از ۲۴ ساعت باستثناء رقم مقاوم به شوری (IR651) روند کاهشی داشته است(شکل ۲).

پتانسیل اسمزی

روند تغییرات پتانسیل اسمزی در شکل ۳ نشان داده شده است. بررسی روند تغییرات پتانسیل اسمزی تحت شرایط تنش در ارقام خارجی و ایرانی برتری رقم مقاوم به شوری (IR651) را نشان داد. پس از یک نوسان اولیه که همراه با کاهش در پتانسیل اسمزی پس از ۴ ساعت بود، با گذشت زمان میزان پتانسیل اسمزی به شکل معنی داری افزایش (منفی تر) یافت، و این افزایش تا آخر دوره اعمال تنش ادامه داشت. روند تغییرات پتانسیل اسمزی در IR651 در شرایط نرمال عکس تیمار تنشی در این رقم بود (شکل ۳)، بطوری که در زمان قبل از اعمال تنش (صفر) پتانسیل اسمزی از۱/۰۸- به ۰/۹۵- مگاپاسکال در وضعیت نرمال (مثبت تر) اما در وضعیت تنش این مقادیربرای زمان های مذکور به ترتیب از MPa ۱/۰۸- به۱/۴۳- (منفی تر) کاهش پیدا کرد. این خصوصیت بیانگر کارآمد بودن تنظیم اسمزی در متحمل ساختن این رقم به شوری بود.

مطالعه روند تغییرات پتانسیل اسمزی در سایر ارقام IR29، موسی طارم و غریب عدم وجود اختلاف معنی دار را درمقایسه وضعیت نرمال و تنش درهر یک از ارقام را نشان داد (شکل ۳).

بحث و نتیجه گیری

از جمله عکس العمل های متابولیکی به تنش شوری سنتز اسمولیت های سازگار است. این ترکیبات آلی در تنظیم اسمزی دخالت دارند و موجب حفاظت ساختمان ارگانلهای مختلف سلول

از خسارتهای اکسیداتیو می شود (Smirnoff, 1993). نتایج آزمایش صورت گرفته نشان داد که، تفاوت معنی داری بین ارقام، سطوح شوری و اثرات متقابل آنها در صفات مطالعه شده وجود دارد (جدول ۱) و این تفاوتها طی زمان بیشتر گردید. از جمله اینکه غلظت قندهای محلول در رقم متحمل به شوری IR651 به شکل فزاینده ای تحت اثر تیمار تنش تغییر پیدا کرده است، در حالی که غلظت قندهای محلول در ارقام ایرانی کاهش یافت و در رقم حساس IR29 تغییری پیدا نکرد(شکل ۱). تغییرات قندهای محلول و فروکتان ها شاخص حساس و مناسبی جهت ارزیابی تحمل به خشکی و یا شوری جهت گزینش بین ارقام می تواند باشد (Kerepesi and Galiba, 2000). افزایش در غلظت ساکارز و سطح قند های محلول تحت شرایط تنش شوری در سازگاری و ایجاد تحمل به شوری احتمالا» نقش دارد (Gehlot *et al*., 2005) و از بین ترکیبات آلی مختلف، قندها بیش از ۵۰٪ مجموع مواد متشکله پتانسیل اسمزی را تشکیل می دهند (Cram, 1976). بررسی منحنی های پتانسیل اسمزی، کاهش پتانسیل اسمزی در رقم متحمل به شوری (IR651) را نشان داد(شکل ۳)، با توجه به افزایش معنی دار غلظت قند های محلول در این رقم کاهش پتانسیل اسمزی قابل توجیه می باشد، همانطور که پیشتر عنوان شد افزایش اسمولیت های سازگار در سلولهای گیاهی تحت تنش در جذب آب و حفظ آماس سلولی به جهت متعادل نگاه داشتن فعالیت های متابولیکی سلول نقش تعیین کننده دارند. در سایر ارقام تغییرات پتانسیل اسمزی غیرمعنی دار بوده است. از این رو مکانیسم افزایش قندهای محلول در شرایط شوری یک راه کار کارآمد در رقم متحمل تلقی می شود که سایرارقام در این آزمایش فاقد چنین مکانیسمی بودند. از دیگر تغییرات متابولیکی در شرایط تنش شوری را می توان در تغییر غلظت پروتئین های محلول جستجو کرد.

عقیده عمومی این است که تنش شوری باعث کاهش قابل ملاحظه ای در مقدار پروتئین گیاه می گردد و یا اینکه با افزایش پروتئین‌ها همراه نیست (هلال و منگال، ۱۹۷۹؛ اشرف و اولیاری، ۱۹۹۹)، در آزمایش صورت گرفته در رقم متحمل روند تغییرات بعد از ۱۲ ساعت از آغاز اعمال تنش علی رغم غیر معنی دار بودن بصورت افزایشی بوده است و در آخر دوره اعمال تنش میزان آن در حدود $mg.g^{-1}Fw$ ۱۰۰ بود، ، افزایش سنتز پروتئین هم در جو مقاوم به شوری، آفتابگردان، برنج و ارزن گزارش شده است (اوما و همکاران، ۱۹۹۵). در سایر ارقام این آزمایش پس از ۴۸ ساعت از آغاز تنش روند تغییرات پروتئین های محلول نسبت به شرایط نرمال بصورت کاهشی بوده است و حداکثر آن در سایر ارقام بین ۷۰ تا $mg.g^{-1}Fw$ ۸۰ بود(شکل ۲). البته بوضوح روشن نیست که آیا این کاهش در نتیجه تخریب پروتئین یا کم وارد شدن اسیدهای آمینه در پروتئینها می باشد (گارگ و همکاران، ۱۹۹۰). لذا روند تجمع پروتئین های محلول می تواند وجه تمایز دیگر ی در مقایسه رقم متحمل (IR651) با سایر ارقام در این آزمایش باشد.

در برخی گزارشات آمده که پروتئین ها می توانند بعنوان مارکر در تنش های مربوط به تحمل شوری در مهندسی ژنتیک بکار روند اما برخی تحقیقات نشان داده که پروتئین های سنتز شده در وضعیت شوری همیشه با القاء تحمل در ارتباط نیستند (Pareek *et al*., 1997). در تحقیق صورت گرفته شاخص تغییرات غلظت قندها بدلیل تغییرات بسیار آشکار در وضعیت تنش نسبت به تغییر غلظت پروتئین ها پاسخ مناسب تری جهت ارزیابی تحمل شوری در بین ژنوتیپ ها تلقی می شود.

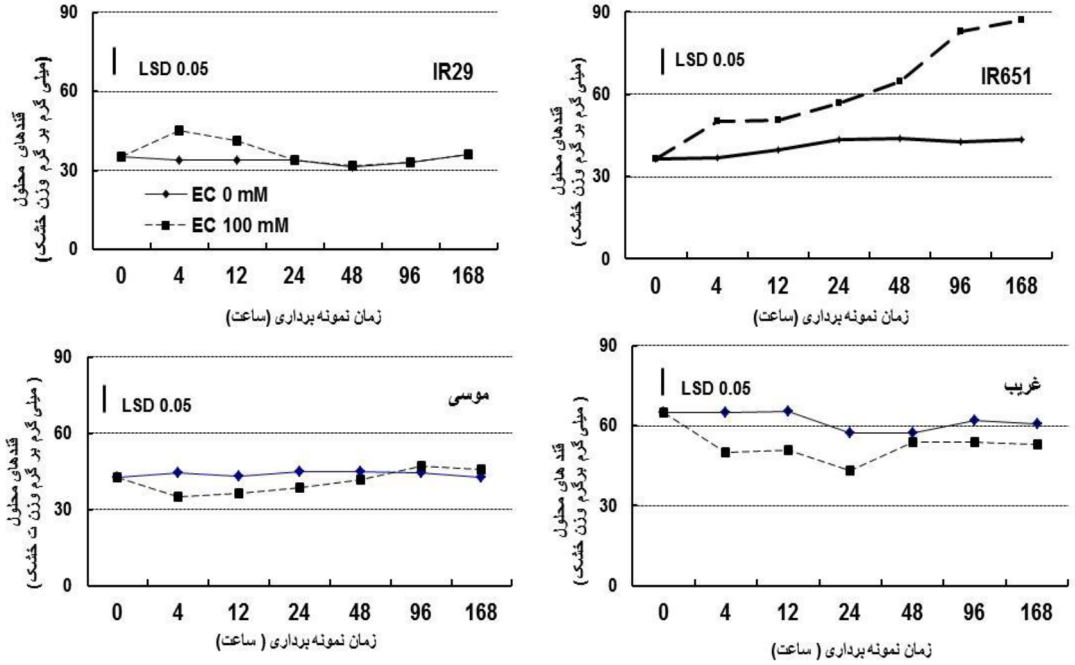
پاورقی ها

1. Kameli
2. Losel

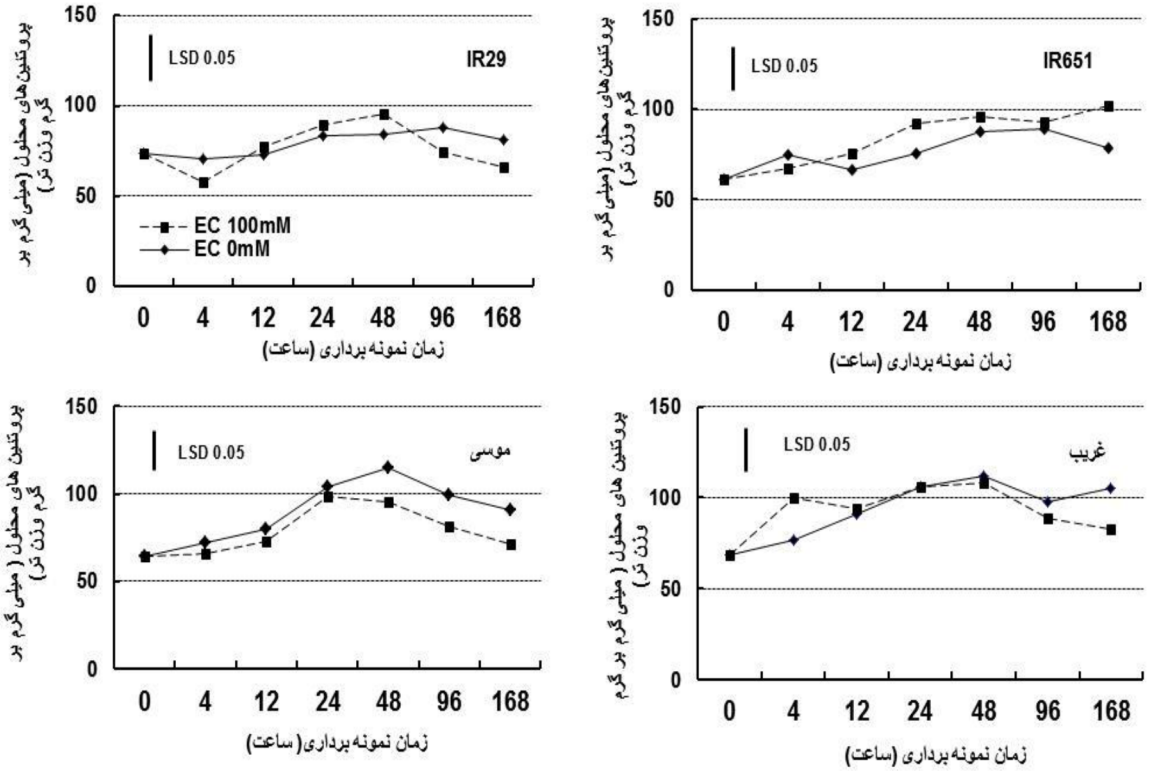
جدول۱- جدول تجزیه واریانس صفات مختلف که در آن فاکتوررقم (A) ، فاکتورشوری (B) و زمان (C) بصورت اسپلیت پلات در زمان در پایه طرح کاملا" تصادفی اجرا شده است.

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	پتانسیل اسمزی	قندهای محلول	پروتئین محلول
Factor (A) رقم	۳	۰/۲۸۳**	۳۸۶۳/۴**	۲۶۱۸/۵**
Factor(B) شوری	۱	۰/۲۳۶**	۳۱۶/۵**	۱۲۳/۴ ns
A*B	۳	۰/۱۰۵**	۱۶۷۳/۰۶**	۴۸۶/۳**
Error (a)	۱۶	۰/۰۰۲	۱۵/۷	۶۱/۶۹
Factor (c) زمان	۶	۰/۰۶۴**	۱۷۳/۰۲**	۳۵۹۳/۷**
A*C	۱۸	۰/۰۳۵**	۲۲۵/۵**	۲۵۷/۲**
B*C	۶	۰/۰۲۸**	۱۴۳/۶**	۱۳۶/۲*
A*B*C	۱۸	۰/۰۱۵**	۱۱۴/۸**	۲۰۷/۵**
Error (b)	۹۶	۰/۰۰۱	۱۰/۸	۴۸/۲۸

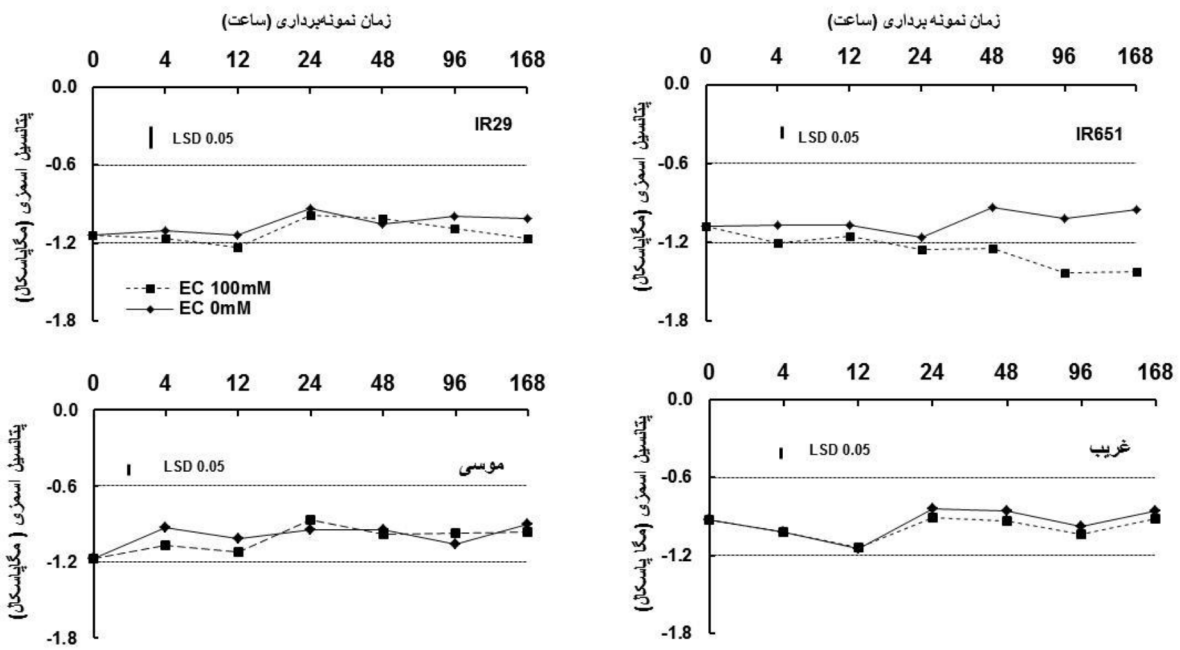
ns نشانگر غیرمعنی داربودن و ، * به ترتیب معنی داربودن در سطح ۱ و ۵ درصد**



شکل ۱: روند تغییرات قندهای محلول در برگ ششم تحت شرایط نرمال و تنش (EC=100mM) در ارقام خارجی IR651 ، IR29 و ارقام ایرانی موسی طارم و غریب، در مرحله شش برگی طی یک هفته اعمال تنش. (محور افقی زمان نمونه برداری می باشد و LSD کمترین اختلاف معنی دار بین میانگین ها را نشان می‌دهد).



شکل ۲: روند تغییرات پروتئین در برگ ششم تحت شرایط نرمال و تنش (EC=100 mM) در ارقام خارجی IR651 ، IR29 و ارقام ایرانی موسی طارم و غریب، در مرحله شش برگی طی یک هفته اعمال تنش. (محور افقی زمان نمونه برداری می باشد و LSD کمترین اختلاف معنی دار بین میانگین ها را نشان می‌دهد).



شکل ۳: روند تغییرات پتانسیل اسمزی در برگ ششم تحت شرایط نرمال و تنش ($EC=12\ dsm^{-1}$) در ارقام خارجی IR651، IR29 و ارقام ایرانی موسی طارم و غریب، در مرحله شش برگی طی یک هفته اعمال تنش. (محور افقی زمان نمونه برداری می باشد و LSD کمترین اختلاف معنی دار بین میانگین ها را نشان می‌دهد).

منابع مورد استفاده

1. Ali, M., Jensen, C.R., Mogensen, V.O., Andersen, M.N., and Henson, I.E. 1999. Root signaling and osmotic adjustment during intermittent soil drying sustain grain yield of field-grown wheat. Field Crops Res. 62: 35-52.
2. Ashraf, M., and Harris, P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants . Plant Sci. 166: 3-16.
3. Ashraf, M., and Oleary, J.W. 1999. Changes in soluble proteins in spring wheat stressed with NaCl. Plant Biol. 42: 113-117.
4. Babu, R. C., Pathan, M. S., Blum, A., Nguyen, H. T. 1999. Comparison of Measurement Methods of Osmotic Adjustment in Rice Cultivars. Crop Sci. 39:150-158.
5. Bearce, B.C., and Kohl, H.C. 1970. Measuring osmotic pressure of sap cells. Plant Physiol. 46: 515-519.
6. Bernstein, L. 1963. Osmotic adjustment of plant to saline media . Dynamic phase. Amer. J. Bot. 50; 360-370.
7. Bizel, M.L., Reuveni, M.. 1994. Cellular mechanisms of salt tolerance in plant cell. Horti.Rev. 16:33-62.
8. Bradford, M.M. 1976. Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein day binding. Analitical Bioch. 72: 248-254.
9. Cram, W.J. 1976. Negative feedback regulation of transport in cells. The maintenance of turgor, volume and nutrient supply. Springer-Verlag,, Berlin. 2: 284-316.
10. Cushman, J.C. 1992. Characterization and expression of a NADP-malic enzyme cDNAinduced by salt stress from the facultative crassulacean acid metabolism plant, Mesembryanthemum crystallinum. Eur. J. Biochem. 208: 259-266.
11. De Souza Filho, G.A., Ferreira, B.S., Dias, J.M., Queiroz, K.S., Branco, A.T., Bressan-Smith, R.E., Oliveira, J.G., Garcia, A.B. 2003. Accumulation of salt and protein in rice plants as a response to environmental stresses. Plant Sci. 164: 623-628.
12. Dubey, R.S. 1994. Protein synthesis by plants under stressful conditions. In: Handbook of plant and crop stress (Ed. M. Pessarakli) pp. 277-299.
13. Dubey, R.S. and Rani, M. 1989. Influence of NaCl salinity on growth and metabolic status of proteins and amino acids in rice seedling. J. Agron. Crop Sci. 162: 97-106.
14. Dubey, R.S. 1997. Photosynthesis in plants under stressful conditions. In: Pessarakli, M. (ed.): Handbook of Photosynthesis. Marcel Dekker, New York pp. 85: 79-875.
15. Espelund, M., Saeboe-Larssen, S., Hughes, D.W., Galau, G.A., Larsen, F., Jakobsen, K.S. 1992. Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. Plant J. 2: 241-252.
16. Flowers, T. J., Torke, P. F., and Yeo, A. R. 1977. The mechanisms of salt tolerance in halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 89-121.
17. Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A., and Yeo, A.R. 1991. Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions- evidence for the Öertli hypothesis . Plant and Environ. 14: 319-325.
18. Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A., Becker, T.W. 1998. Drought induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves . Plant Physiol. 117: 283-292.

19. Garg, B.F., Kathju, S., Vyas, S.P., and Lahiri, A.N. 1990. Effect of saline water irrigation on tolerance and sensitive wheat varieties under disparate soil fertility conditions. Ann. Arid Zone 29:179-189.
20. Gehlot, H.S., Purohit, A., and Shekhawat, N.S. 2005. Metabolic changes and protein patterns associated with adaptation to salinity in Sesamum indicum cultivars. J. of Cell and Molecular Biol. 4: 31-39.
21. Gong, Z., Koiwa, H., Cushman, M.A., Ray, A., Bufford, D., Kore-eda, S., Matsumoto, T.K., Zhu, J., Cushman, J.C., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. 2001. Gene that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. Plant Physiol. 126: 363-375.
22. Greenway, H., and Munns, R. 1980. Mecanisms of salt tolerance in non-halophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31:149-190.
23. Helal, H.M., and Mengal, K. 1979. Nitrogen metabolism of young barley plants as affected by NaCl. Plant Soil 51: 457-462.
24. Hurry, V.M., Strand, A., Tobiaeson, M., Gardestrom, P., Öquist, G. 1995. Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential on growth, carbon metabolism and carbohydrate content. Plant Physiol. 109: 697-706.
25. Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D., Bohnert, H.G. 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. Plant Cell. 13: 889-905.
26. Kerepesi, I., Galiba, H. 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate in wheat seedlings. Crop Sci. Vol. 40.
27. Levitt, J. 1980. Responses of plant to environmental stresses. Vol. 11 Water, radiation, salt and other stresses.. Academic Press Inc. New York. 607 p.
28. Lilley, J.M., Lodlow, M.M. 1996. Expression of osmotic adjustment and dehydration tolerance in diverse rice lines. Field Crops Res. 48: 185-197.
29. Misra, A.N., Sahu, S.M., Misra, M., Singh, P., Merra, I., Das, N., Kar, M., and Sahu, P. 1997. Sodium chloride induced changes in leaf growth, and pigment and protein contents in two rice cultivars. Biologia Planta .20: 257-262.
30. Munns, R., and Termat, A. 1986. Whole plants responses to salinity. Aust. J. Plant Physiol. 13:143-160.
31. Pareek, A., Singla, S.L., and Grover, A. 1997. Salt responsive proteins/genes in crop plants for improving salt tolerance. Oxford and IBH Publ. Co. New Delhi. pp: 365-391
32. Rathert, G. 1984. Sucrose and starch contents of plant parts as a possible indicator for salt tolerance of crops. Aust. J. Plant Physiol. 11: 491-495.
33. Roosen, N.H.C.J., Thu,T.T., Iskader, H.M., Jacobs, J. 1998. Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol. 117: 263-271.
34. Shannon, M.C., Rhodes, J.D., Draper, J.H., Scardaci, S.C., Spyres, M.D. 1998. Assessment of salt tolerance in rice cultivars in response to salinity problem in California. Crop Sci. 38: 394-398.
35. Shevyakova, N.I., and Leonova, T.G. 1975. Effect of sodium chloride and sodium sulfate on in vitro incorporation of carbon 14-leucine into protein. Fisiol. Rast.22: 300-305.
36. Shinozaki, K.1999. Plant response to drought and salt stress: overview, Tanpakushitsu Kakusan Koso. 44: 2186-2187.
37. Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytol. pp : 27-38.
38. Uma, S., Prasad, T.G., Kumar, M.U. 1995. Genetic variability in recovery growth and synthesis of stress proteins in response to polyethylene glycol and salt stress in finger millet. Ann. Bot. 76: 43-49.
39. Wingler, A., Von Schaewen, A., Leegood, R.C., Lea, P.J., Quick, W.P. 1998. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. Plant Physiol. 116: 329-335.
40. Wyn Jones, R. 1981. Salt tolerance. In:Physiological Processes Limiting Plant Productivity (Ed. C. B. Johnson). pp. 271-292. Butterworths. London.
41. Zheng Y.Z., Li, T. 2000. Proline levels and abscisic acid content in tolerant/sensitive cultivars of soyabean under osmotic conditions, Soyabean Gen. [Online journal].