دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارزیابی برخی خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانتی اکوتیپ‌های گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.) تحت تاثیر تنش خشکی

قمر داداشی جمایران[1]، علی اصغری[2]، اصغر عبادی[3] و معصومه یوسفی آذرخانیان[4]

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی
2- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
3- استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مغان، دانشگاه محقق اردبیلی (نویسنده مسوول: asghar_ebadi@uma.ac.ir)
4- کارشناس معاونت بهبود تولیدات گیاهی، سازمان جهاد کشاورزی استان قزوین

تاریخ دریافت: 98/5/28 تاریخ پذیرش: 98/8/22
صفحه: 140 تا 149

چکیده

تنش خشکی مهم‌ترین عامل غیر زنده محدودکننده رشد گیاهان در مناطق خشک و نیمه خشک است. در این مطالعه، تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر محتوای پروتئین، پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.) مورد بررسی قرار گرفت. ده اکوتیپ رازیانه در دو سطح تنش شامل شاهد (نگهداری با آبیاری منظم در حد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (آبیاری در 40 درصد ظرفیت مزرعه) در یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین اکوتیپ‌های رازیانه از نظر تمامی صفات به غیر از پرولین اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همچنین تنش خشکی بر تمام صفات مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری داشت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز در برگ‌های هر 10 اکوتیپ در شرایط استرس افزایش یافت. میزان قند محلول و پرولین در اکثر اکوتیپ‌ها کاهش معنی‌داری را در سطح تنش خشکی (آبیاری با 40 درصد ظرفیت مزرعه) نشان داد. میزان پروتئین کل نیز در تمام اکوتیپ‌های مورد مطالعه در سطح تنش خشکی کاهش معنی‌داری نشان داد. نتایج رتبه‌بندی اکوتیپ‌ها با استفاده از روش SIIG نشان داد که اکوتیپ‌های خورشیدآباد و تتماج بیشترین میزان SIIG را نسبت به سایر اکوتیپ‌ها داشتند و این اکوتیپ‌ها به عنوان متحمل‌ترین اکوتیپ‌ها به تنش خشکی شناخته شده‌اند. اکوتیپ‌های شیروان، قاضی انتپ و ازمیر نیز به ترتیب به عنوان حساس‌ترین اکوتیپ‌های به تنش خشکی شناخته شدند. نتایج رتبه‌بندی اکوتیپ‌ها بر اساس شاخص SIIG مطابقت کامل با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس شاخص تحمل Ti داشت.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، پرولین، رازیانه، شاخص SIIG، قند محلول

مقدمه:

گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.) از خانواده Apiaceae، یکی از قدیمی‌ترین گیاهان ادویه‌ای است که به دلیل اهمیت اقتصادی و کاربرد در صنایع دارویی مورد توجه قرار گرفته است (23). وجود منابع ژرم‌پلاسم گسترده، تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها، نیاز آبی‌کم و مقاومت به خشکی بر اهمیت این گیاه می‌افزاید (10). کمبود آب در دسترس یکی از عوامل مهم اقلیمی است که بر توزیع و پراکنش گیاهان در سرتاسر جهان موثر است و می‌تواند باعث تغییرات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه شود، است (3). گیاهان به تنش خشکی در سطوح فیزیولوژیکی، سلولی و مولکولی پاسخ می‌دهند. این پاسخ به گونه و ژنوتیپ گیاه، طول دوره تنش، میزان کمبود آب، سن گیاه و مرحله نموی آن بستگی دارد. در زمان خشکی اسمولیت‌هایی نظیر پرولین و قندهای محلول به منظور تنظیم اسمزی و حفظ تورژسانس در سلول‌های گیاهی افزایش پیدا می‌کنند. پرولین در سلول نقش کلیدی برای تنظیم اسمزی و هم‌چنین پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن بازی می‌کند (22)، اما قندهای محلول برای حفظ متابولیسم سلول و ذخیره انرژی در دوره خشکی به کار می‌روند (19). رادیکال‌های آزاد و یا به عبارت دیگر گونه‌های فعال اکسیژن (ROSها) مولکول‌های سمی هستند که توانایی واکنش با مولکول‌های حیاتی، از جمله پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و کربوهیدارات‌ها را داشته و سبب آسیب به آن‌ها می‌شوند. ROSها در اندامک‌های مختلف نظیر کلروپلاست، میتوکندری، پراکسی‌زوم و فضای آپوپلاسمی تولید می‌شوند و برای گیاه تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کنند. درنتیجه میزان ROSها باید به حد متعادل برسد (27). گیاهان با ایجاد سازوکارهای حفاظتی متفاوتی از قبیل تجمع اسمولیت‌هایی مانند پرولین، قندهای محلول و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی مانع از تنش اکسیداتیو می‌شوند (32). آنتی‌اکسیدان‌ها خود به دو دسته آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی تقسیم‌بندی می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز و پلی‌فنول‌اکسیداز هستند (2). آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در طی شرایط بیماری‌های شدید و تنش محیطی در برابر رادیکال‌ها تضعیف می‌شود (36). در نتیجه، دومین سد دفاعی گیاهان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی هستند که شامل: کاروتنوئیدها، آسکوربیک اسید و پرولین‌ها بوده و با مهار آنزیم‌هایی که مسئول تولید رادیکال‌های آزاد هستند، رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند (22،34).

تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی یکی از دلایل کاهش مقدار پروتئین‌هاست. تولید رادیکال‌های سوپراکسید یا هیدروکسیل باعث اکسایش اسیدهای آمینه می‌شود و به ساختار و عملکرد پروتئین‌ها آسیب جدی وارد می‌کند.

رادیکال‌های آزاد با ایجاد تغییر در موقعیت اسیدهای آمینه در رشته‌های پروتئین تجزیه‌ی آن‌ها را با آنزیم تجزیه‌کننده موجب می‌شوند (33). خاکشور مقدم و همکاران (18) در آزمایشی بر روی شوید از خانواده رازیانه، گزارش کردند که با افزایش سطوح تنش خشکی، میزان پرولین و قندهای محلول بخش هوایی و ریشه و هم‌چنین نسبت پرولین و قندهای محلول بخش هوایی به ریشه افزایش پیدا کرد. مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ارقام مقاوم و حساس به خشکی در گیاهان مختلف نشان داده است که مقاومت به خشکی همبستگی زیادی با سیستم آنتی‌اکسیدانی مناسب دارد (6). به نظر می‌رسد که تعدادی از صفات فیزیولوژکی از قبیل مقدار اسمولیت‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی صفات دیگر نشان‌دهنده مقاومت گیاه دارویی رازیانه باشد. در این تحقیق سعی شده است تا تغییرات برخی خصوصیات آنتی‌اکسیدان و بیوشیمیایی گیاه دارویی رازیانه در شرایط تنش خشکی در 10 اکوتیپ رازیانه مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تاثیر تنش خشکی بر روی صفات بیوشیمیایی اکوتیپ‌های رازیانه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با 3 تکرار در مهر ماه سال 1396 در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. مواد گیاهی شامل 7 اکوتیپ بومی ایران به همراه 3 اکوتیپ خارجی از دو کشور آلمان و ترکیه بودند که از شرکت هرب ایران اصفهان، سازمان تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، بخش گیاهان دارویی دانشگاه آنکارا، مؤسسه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ارومیه و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی اردبیل تهیه شدند (جدول 1). بذر 10 اکوتیپ مختلف گیاه دارویی رازیانه در دو شرایط نرمال (آبیاری به مقدار ظرفیت زراعی خاک) و تنش کم‌آبی (آبیاری بعد از 60 درصد تخلیه رطوبتی) در گلدان‌هایی با وزن خاک خشک 6 کیلوگرم و تحت شرایط میانگین 14 ساعت روشنایی و 10 ساعت تاریکی و دمای روزانه 2±28 و دمای شبانه 2±16 درجه سانتی‌گراد کشت شدند. خاک گلدان‌ها حاوی رس، شن و کود دامی پوسیده به نسبت (1:2:3) بود. آبیاری با تعیین ظرفیت زراعی خاک (FC) انجام گرفت.

کمبود آب گلدان‌ها با روش وزنی تامین می‌شد. آب گلدان‌های شاهد در حد ظرفیت زراعی و گلدان‌های تحت تنش در محدوده 40 درصد ظرفیت زراعی حفظ می‌شد. نمونه‌برداری به طور متوسط 60 روز بعد از کشت و در مرحله‌ی رشد رویشی کامل و نزدیک به مرحله‌ی گل‌دهی از برگ‌ها انجام شد. در هر مرحله، از گیاهچه‌های نرمال و تنش‌کم‌آبی به طور جداگانه نمونه‌برداری و بلافاصله به فریزر 80- درجه‌سانتی‌گراد منتقل شدند.

اندازه‌گیری قندمحلول برگ با استفاده از روش ایریگوین و همکاران (14)، استخراج پروتئین کل برگ برادفورد (9) و در نهایت اندازه‌گیری میزان پرولین برگ با استفاده از روش بیتس و همکاران (7) صورت گرفت و مقدار غلظت براساس میلی‌گرم در گرم وزن‌تر گیاهی هر یک از صفات بیان شد. برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بافر تریس-کلریدریک تهیه شد (29) و سپس محلول شناور رویی برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز مورد استفاده قرار گرفت (17). میزان تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام گرفت. برای گروه‌بندی اکوتیپ‌ها، از تجزیه خوشه‌ای با روش Ward و بر اساس میانگین استاندارد شده صفات استفاده شد. انتخاب اکوتیپ‌های حساس و متحمل به تنش خشکی با محاسبه شاخص تحمل (Ti: مقدار صفت در سطح تنش تقسیم بر مقدار صفت در سطح بدون تنش) برای صفات مطالعه شده و شاخص انتخاب ژنوتیپ ایده‌آل (SIIG) (38) انجام شد. در این روش انتخاب ژنوتیپ بهتر (ژنوتیپ پایدار) بر مبنای کمترین فاصله از ژنوتیپ ایده‌آل مثبت (d^+) و بیشترین فاصله از ژنوتیپ ایده‌آل منفی (d^-) انجام می‌شود. علاوه بر استفاده از شاخص SIIG در این تجزیه، گروه‌بندی اکوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس شاخص Ti و با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش متوسط همسایگی برمبنای فاصله اقلیدسی انجام شد.

جدول 1- مشخصات اکوتیپ‌های رازیانه مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Characteristics of Fennel ecotypes used in the experiment

شماره اکوتیپ	محل جمع آوری	شماره اکوتیپ	محل جمع آوری
1	آلمان (11486)	6	قاضی‌آنتپ (ترکیه)
2	تربت جام - خراسان رضوی	7	گرینه (نیشابور)
3	خورشید آباد (مشگین شهر) – اردبیل	8	ازمیر (ترکیه)
4	خروسلو (مغان) – اردبیل	9	تتماج - کاشان
5	همدان	10	شیروان - خراسان شمالی

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین سطوح مختلف تنش خشکی، اختلاف معنی‌داری از نظر صفات میزان پروتئین کل، آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز و پرولین در سطح احتمال 1 درصد و میزان قندمحلول در سطح احتمال 5 درصد وجود دارد (جدول 2). همچنین اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها در همه صفات به غیر از پرولین مشاهده شد. صفات ارزیابی شده از ضریب تغییرات کم و دقت بالا و واریانس ژنوتیپی بیشتر و در نهایت از وراثت‌پذیری عمومی بالایی برخوردار بودند (جدول 2). اثر متقابل تنش x اکوتیپ در مورد صفات میزان پروتئین کل، آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز، پرولین و میزان قندمحلول معنی‌دار بود که نشان می‌دهد اکوتیپ‌ها پاسخ‌های متفاوتی در دو شرایط نرمال و تنش از خود نشان می‌دهند.

جدول 2- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی

Table 2. Mean squares resulted from analysis of variance for the evaluating traits

	میانگین مربعات					
منابع تغییرات	درجه آزادی	قند محلول (mg/g FW)	پرولین (mg/g FW)	پراکسیداز (AU/min/mg protein)	پلی‌فنل‌اکسیداز (AU/min/mg protein)	پروتئین (mg/g FW)
اکوتیپ	9	203/71*	0/493	105/72**	246/78**	2/31*
تنش	1	283/45*	3/239**	1008/60**	6068/60**	224/11**
اکوتیپ x تنش	9	398/49**	0/530**	213/53**	157/91**	4/23**
خطای آزمایش	40	46/86	0/017	5/33	29/48	0/63
ضریب تغییرات (%)		10/6	9/6	6/6	9/36	7/9

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد

میزان پروتئین کل

مقایسه میانگین برای میزان پروتئین کل در همه اکوتیپ‌های مورد مطالعه کاهش معنی‌داری را در سطح تنش خشکی (60 درصد تخلیه آب قابل نگهداری) نشان داد. در شرایط تنش بیشترین میزان پروتئین (9/766 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ خروسلو و کمترین مقدار (6/880 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ آلمان مشاهده شد. در شرایط بدون تنش نیز بیشترین میزان پروتئین (13/886میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ تتماج و کمترین مقدار (10/500 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ قاضی‌آنتپ مشاهده شد. به‌طور کلی، میانگین مقدار پروتئین کل در شرایط تنش و بدون تنش به ترتیب برابر 8/024 و 11/889 (میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) بدست آمد (جدول 3). در واقع کاهش مقدار پروتئین پدیده‌ای معمول در تنش‌هایی مانند تنش خشکی است. تنش خشکی موجب توقف تولید برخی پروتئین‌ها و القای سنتز پروتئین‌های جدید می‌شود.

جدول 3- مقایسه میانگین اکوتیپ‌های رازیانه در شرایط نرمال و تنش خشکی از نظر برخی خصوصیات بیوشیمیایی

Table 3. Means comparisons of fennel ecotypes in normal and drought stress conditions in terms of some biochemical properties

صفات Traits	پروتئین Protein		Polyphenol Oxidase	پلی‌فنل‌اکسیداز	پراکسیداز Peroxidase		پرولین Proline		قندمحلول Soluble sugars	
	mg/g FW		AU/min/mg protein				mg/g FW			
اکوتیپ‌ها Ecotypes	بدون تنش Without stress	تنش Stress	بدون تنش Without stress	تنش stress	بدون تنش Without stress	تنش stress	بدون تنش Without stress	تنش stress	بدون تنش Without stress	تنش stress
1	13/266^{ab}	6/880^{d}	56/203^{a}	75/003^{b}	25/106^{d}	47/384^{d}	0/600^{e}	1/080^{f}	73/806^{a}	61/410^{bcd}
2	12/660^{abc}	7/160^{d}	56/206^{a}	63/410^{bc}	24/363^{d}	46/550^{d}	0/956^{bc}	1/730^{bc}	68/076^{b}	58/733^{bcd}
3	12/003^{bc}	7/020^{d}	55/193^{a}	60/860^{cde}	34/546^{ab}	43/083^{ab}	0/816^{cd}	2/536^{a}	56/073^{d}	63/673^{bcd}
4	11/060^{cd}	9/766^{a}	43/830^{bc}	58/373de	32/97^{abc}	30/110^{abc}	1/113^{b}	1/490^{cd}	70/866^{ab}	68/573^{bcd}
5	11/250^{cd}	7/540^{d}	42/300^{bc}	69/736^{bcd}	31/163^{bc}	48/193^{bc}	0/750^{e}	1/240de	55/480^{d}	66/456^{bcd}
6	10/500^{d}	8/896^{ab}	45/403^{bc}	57/023^{e}	32/953^{abc}	30/032^{abc}	1/393^{a}	0/896^{f}	53/713de	75/043^{ab}
7	10/816^{cd}	7/440^{d}	48/126^{abc}	89/640^{a}	23/103^{d}	41/500^{d}	1/516^{a}	1/766^{bc}	54/373de	53/746^{d}
8	11/673^{bcd}	7/800^{cd}	40/446^{c}	60/373^{cde}	33/776^{abc}	20/536^{f}	1/543^{a}	1/673^{bc}	62/180^{c}	51/286^{d}
9	13/886^{a}	8/616^{bc}	50/383^{ab}	72/190^{bc}	29/546^{c}	35/307^{c}	0/936^{bcd}	1/856^{b}	50/806^{e}	90/566^{a}
10	11/816^{bcd}	9/120^{ab}	41/130^{c}	68/800^{bcde}	36/243^{a}	43/246^{a}	1/566^{a}	1/570^{c}	70/436^{ab}	69/793^{bc}
میانگین Mean	11/889	8/023	47/923	68/039	30/405	38/604	1/119	1/584	61/581	65/928

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

تنش اکسایشی ناشی از تنش خشکی یکی از عوامل کاهش مقدار پروتئین‌هاست و ممکن است تولید رادیکال‌های سوپراکسید یا هیدروکسیل باعث اکسایش اسیدهای آمینه شود و به ساختار و عملکرد پروتئین‌ها آسیب جدی وارد کند. تنش خشکی، بیان ژن‌های کدکنندهٔ پروتئازهای درون سلولی را القا می‌کند و سبب تجزیهٔ پروتئین‌ها و تحرک مجدد نیتروژن و متعاقب آن سنتز مواد محلول سازگار می‌شود. از این‌رو، کاهش محتوای پروتئین تحت تنش خشکی با کاهش سنتز و افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه کنندهٔ پروتئین مرتبط است (11). کاهش پروتئین در آزمایشی بر روی گیاه شوید توسط ستایش‌مهر و گنجعلی (26) گزارش شده است. این درحالی است که مطالعه‌ی انجام شده توسط کائو (16) نشان داد که در برگ‌های بالغ، تجزیهٔ پروتئین‌ها باعث کاهش غلظت آنها شده و باعث افزایش اسیدهای آمینه آزاد از جمله پرولین می‌شود. در نتیجه، بالا بودن میزان پروتئین کل در اکوتیپ خروسلو نسبت به سایر اکوتیپ‌ها در شرایط تنش خشکی احتمالا می‌تواند به دلیل افزایش سنتز برخی آنزیم‌ها از جمله پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز و سنتز پروتئین‌ها و اسیدآمینه‌های درگیر در سیستم دفاعی سلول‌ها باشد.

میزان پلی‌فنل‌اکسیداز

میزان پلی‌فنل‌اکسیداز در همه اکوتیپ‌ها افزایش معنی‌داری را در سطح تنش نشان داد. در شرایط تنش بیشترین میزان پلی‌فنل‌اکسیداز (89/640 تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین) در اکوتیپ گرینه و کمترین مقدار (57/023 تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین) در اکوتیپ قاضی‌آنتپ مشاهده شد. در شرایط بدون تنش نیز بیشترین میزان پلی‌فنل‌اکسیداز (56/206 تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین) در اکوتیپ تربت‌جام و کمترین مقدار (41/130 تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین) در اکوتیپ شیروان بدست آمد. میانگین میزان آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در شرایط تنش و بدون تنش به ترتیب برابر 68/039 و 47/923 بود (جدول 3). پلی‌فنل‌اکسیداز با نام‌های کاتکول‌اکسیداز، کاتکولاز و تریوزیناز، در بیشتر گیاهان عالی یافت می‌شود و وظیفه اصلی آن در سلول‌های گیاهی اکسیداسیون فنل‌ها به کئینون‌ها و تشکیل لیگنین است. پلی‌فنل‌اکسیداز در واکنش‌های دفاعی و فوق حساسیت گیاه دخالت دارد (37). در این بررسی بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز مربوط به اکوتیپ گرینه بود. بنابراین، از آنجا که تنش خشکی منجر به القای تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود و سطح بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جاروب کننده رادیکال‌های آزاد موجود در گیاهان، مبین افزایش تحمل آن‌ها به تنش‌های محیطی است (13). این نتیجه نشان‌دهنده مقاومت اکوتیپ گرینه در تنش خشکی می‌باشد.

مقدار آنزیم پراکسیداز

میانگین مقدار آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش و بدون تنش به ترتیب برابر 38/604 و 30/405 (تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین) بود (جدول 3). به طوری‌که، مقایسه میانگین میزان پراکسیداز در اکثر اکوتیپ‌ها افزایش معنی‌داری را در سطح تنش خشکی نشان داد. در شرایط تنش بیشترین میزان پراکسیداز (48/193 تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین) در اکوتیپ همدان و کمترین مقدار (20/536 میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه) در اکوتیپ ازمیر مشاهده شد. در شرایط بدون‌تنش بیشترین میزان پراکسیداز (36/243 تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین) در اکوتیپ شیروان و کمترین مقدار (23/103 تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین) در اکوتیپ گرینه مشاهده شد (جدول 3). تنش خشکی موجب افزایش تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر و در نتیجه افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود. این آنزیم‌ها نقش بسیار مهمی در غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول گیاه دارند. بسته به گونه گیاهی و شدت تنش، میزان فعالیت آن‌ها در گیاه تغییر می‌کند (4) و این مبحث با یافته‌های ما مبنی بر تغییرات در میزان افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز در اکوتیپ‌های مختلف مطابقت دارد.

اسید آمینه پرولین

میانگین اسید آمینه پرولین در شرایط تنش و بدون تنش به ترتیب برابر 1/584 و 1/119 (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود (جدول3). در همه‌ی اکوتیپ‌های مورد بررسی به غیر از اکوتیپ قاضی آنتپ میزان پرولین افزایش معنی‌داری را در سطح تنش نشان داد. در شرایط تنش بیشترین میزان پرولین (2/536 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ مشگین‌شهر و کمترین مقدار آن (0/896 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ قاضی‌انتپ مشاهده شد. در شرایط بدون‌تنش هم بیشترین میزان پرولین (1/566 میلی‌گرم بر گرم *وزن* تر) در اکوتیپ شیروان و کمترین مقدار (0/600 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ آلمان (11486) مشاهده گردید (جدول 3). پرولین به عنوان یک محافظ مولکولی، قادر به محافظت از پروتئین‌ها و افزایش فعالیت‌های مختلف آنزیمی است. هم‌چنین در پایداری ساختارهای زیر سلولی (غشاها و پروتئین‌ها)، به عنوان محلول سازگاری پروتئینی، کاهش‌دهنده pH سیتوپلاسمی و حفظ کننده نسبت مناسب $NADP^+$ و NADPH در متابولیسم، خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، تنظیم پتانسیل اکسید و احیایی در شرایط تنش نقش ویژه‌ای دارد (31). عسگری و همکاران (5) بیان کردند که با افزایش سطح تنش خشکی بر روی ژنوتیپ‌های رازیانه میزان پلی‌فنل‌ها، قندهای محلول و پرولین افزایش یافت. در این پژوهش نیز مقدار پرولین افزایش معنی‌داری را در سطح تنش نشان داد. مشخص شده‌است که پرولین محلول، می‌تواند حلالیت پروتئین‌های مختلف را تحت تاثیر قرار داده و از تغییر ماهیت آنها جلوگیری کند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز به دلیل ساختمان پروتئینی خود تحت تاثیر این سازوکار پرولین قرار گرفته و محافظت می‌شوند (20).

میزان قند محلول

در اکثر اکوتیپ‌های مورد مطالعه مقدار قند محلول افزایش معنی‌داری در سطح تنش نشان داد. در شرایط تنش بیشترین میزان قند محلول (90/566 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ تتماج و کمترین مقدار (51/286 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ ازمیر مشاهده شد (جدول 3). در شرایط بدون

تنش نیز بیشترین میزان قند محلول (73/806 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ آلمان (11486) و کمترین مقدار آن (50/806 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در اکوتیپ تتماج مشاهده شد. کربوهیدرات‌ها در گیاه ممکن است دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز باشند (21). به‌طوری که، ساکارز در غلظت‌های کم به عنوان یک مولکول علامت‌دهی و در غلظت‌های بالا به عنوان پالاینده گونه‌های فعال اکسیژنی عمل می‌کند (30). پس تجمع قندهای محلول داخل سلول‌ها در تنظیم اسمزی نقش مهمی ایفاء نموده و کمک می‌کند تا پتانسیل آب سلول کاهش یافته و آب بیشتری برای حفظ تورگر تحت تنش خشکی داخل سلول باقی بماند (15). در شرایط تنش خشکی، تنظیم کننده‌های اسمزی می‌توانند قدرت جذب آب را توسط سلول گیاهی افزایش دهند (12، 28). میزان تجمع این تنظیم‌کننده‌ی اسمزی می‌تواند با مقاومت به خشکی مرتبط باشد. رضایی چیانه (24) گزارش کرده است که بین پرولین و کربوهیدرات‌ها در گیاه تحت تنش رابطه وجود دارد. همچنین تجمع کربوهیدرات در برگ در گیاه دارویی زیره سبز که جزء تیره چتریان می‌باشد، در بررسی‌های سرتیپ و سیروس‌مهر (26) نیز گزارش شده است.

شاخص SIIG

بعد از محاسبه شاخص Ti برای اکوتیپ‌های مورد مطالعه در هر صفت و به دست آوردن بالاترین و پایین‌ترین مقدار شاخص تحمل برای هر صفت (جدول 4)، از آن‌ها جهت محاسبه فاصله هر اکوتیپ از ژنوتیپ ایده‌آل مثبت (d+) و ژنوتیپ ایده‌آل منفی (d-) استفاده شد. از این فاصله‌ها برای محاسبه شاخص SIIG استفاده شد. نتایج حاصل از رتبه‌بندی اکوتیپ‌ها با استفاده از این شاخص نشان داد که اکوتیپ‌های دارای بیشترین مقدار SIIG (به ترتیب خورشیدآباد، تتماج و همدان) در مقایسه با دیگر اکوتیپ‌ها تحمل بیشتری به تنش خشکی داشتند و اکوتیپ‌های با کمترین مقدار شاخص SIIG (به ترتیب شیروان، قاضی‌آنتپ و ازمیر) حساس‌ترین اکوتیپ‌ها به تنش خشکی بودند (جدول 5). براساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها برمبنای میانگین صفات مورد مطالعه با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایگی و ماتریس فاصله اقلیدسی بر مبنای شاخص Ti صفات، اکوتیپ‌ها به چهار گروه مجزا تقسیم شدند (جدول 6). به طوری‌که، اکوتیپ‌هایی با بیشترین (خورشیدآباد) و کمترین (شیروان) مقدار شاخص SIIG به ترتیب در گروه دوم و چهارم قرارگرفتند (شکل 1). نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها بر اساس شاخص Ti صفات مختلف بیشترین تطابق را با نتایج رتبه‌بندی شاخص SIIG داشت (جداول 5 و 6).

جدول 4- کمترین و بیشترین مقدار شاخص Ti محاسبه شده بر اساس صفات اندازه‌گیری شده در اکوتیپ‌های رازیانه

Table 4. The lowest and highest values of Ti calculated based on the traits measured in the fennel ecotypes

صفات Traits	پروتئین Protein	پلی‌فنل‌اکسیداز Polyphenol Oxidase	پراکسیداز Peroxidase	پرولین Proline	قندمحلول Soluble sugars
	mg/g FW	AU/min/mg protein		mg/g FW	
اکوتیپ‌ها	Ti_1	Ti_2	Ti_3	Ti_4	Ti_5
1	0/519	1/335	1/887	1/800	0/832
2	0/566	1/212	1/890	1/810	0/863
3	0/585	0/103	1/247	3/108	1/136
4	0/883	1/332	0/913	1/339	0/968
5	0/670	1/649	1/546	1/685	1/198
6	0/847	1/256	0/911	0/643	1/397
7	0/688	1/256	1/796	1/165	0/988
8	0/668	1/839	0/608	1/084	0/825
9	0/620	1/493	1/195	1/982	1/783
10	0/772	0/001	1/196	1/033	0/991
اکوتیپ ایده‌ال	0/883	1/836	1/890	3/108	1/783
اکوتیپ غیر ایده‌ال	0/519	0/001	0/608	0/644	0/825

جدول 5- رتبه‌بندی اکوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش خشکی بر اساس شاخص SIIG

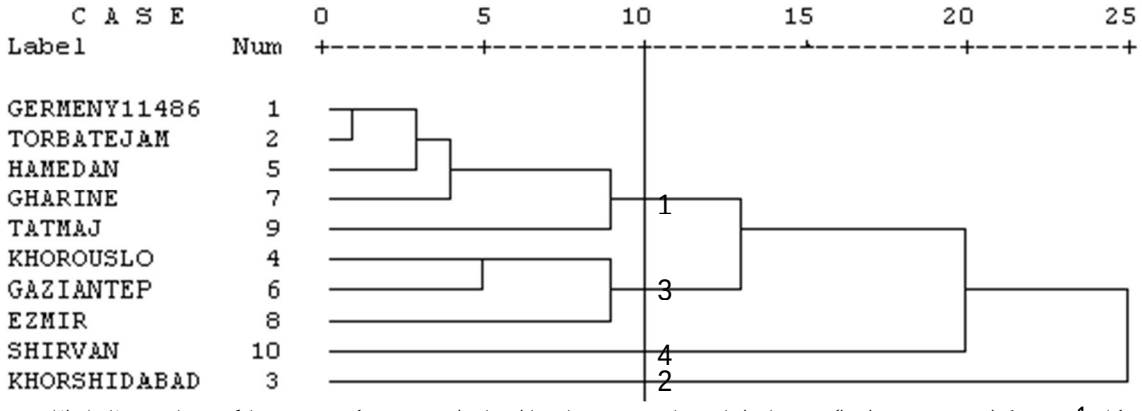
Table 5. Ranking of tolerant and susceptible drought stress ecotypes based on SIIG index

اکوتیپ‌ها	d^+	d^-	SIIG	رتبه‌بندی
خورشیدآباد	1/206	2/792	0/698	1
تتماج	1/391	2/208	0/613	2
همدان	1/629	2/180	0/572	3
آلمان (11486)	2/997	2/179	0/570	4
تربت‌جام	1/704	2/114	0/553	5
گرینه	2/265	1/820	0/445	6
خروسلو	2/236	1/581	0/414	7
ازمیر	2/588	1/893	0/415	8
قاضی‌آنتپ	2/968	1/449	0/328	9
شیروان	2/986	0/918	0/235	10

جدول 6- میانگین صفات گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش نزدیک‌ترین همسایگی و ماتریس فاصله اقلیدسی در اکوتیپ‌های رازیانه

Table 6. Mean of the traits of cluster analysis groups by nearest neighbor method and Euclidean distance matrix in fennel ecotypes

صفات		پروتئین	پلی‌فنل‌اکسیداز	پراکسیداز	پرولین	قندمحلول
		mg/g FW	AU/min/mg protein		mg/g FW	
گروه	اکوتیپ‌ها	Ti_1	Ti_2	Ti_3	Ti_4	Ti_5
گروه 1	1, 2, 5, 7, 9	0/612	1/389	1/662	1/682	1/132
گروه 2	3	0/585	1/103	1/247	3/108	1/136
گروه 3	4, 6, 8	0/597	1/474	0/810	1/022	1/063
گروه 4	10	0/772	0/001	1/196	1/003	0/991
کل		0/621	1/247	1/318	1/558	1/098



شکل 1- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها براساس شاخص Ti صفات با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایگی و ماتریس فاصله اقلیدسی

Figure 1. Ecotypic dendrogram based on Ti index of traits using nearest neighbor method and Euclidean distance matrix

گروه‌بندی اکوتیپ‌ها

برای گروه‌بندی اکوتیپ‌ها، از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward بر اساس میانگین استاندارد شده صفات بیوشیمیایی در شرایط تنش خشکی و نرمال استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان‌داد که سطح تنش خشکی، تاثیر معنی‌داری بر میانگین کلیه صفات مورد بررسی داشت. به طوری‌که، در سطح تنش میانگین اکثر صفات افزایش یافتند. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها بر مبنای میانگین صفات موردمطالعه، اکوتیپ‌ها به دو گروه مجزا تقسیم شدند. در نتیجه، در شرایط تنش و بدون‌تنش اکثر اکوتیپ‌های با بیشترین میانگین صفات نسبت به میانگین کل، در گروه اول قرارگرفتند (جدول 7). نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها براساس میانگین صفات نشان داد که بخاطر استفاده از میانگین صفات به دلیل وجود صفات‌های مختلف ارزیابی شده، تصمیم‌گیری روی اکوتیپ‌های حساس و متحمل کار راحتی نیست. در صورتی که، با تجمیع این صفات

در قالب یک شاخص تحت عنوان شاخص SIIG کار تصمیم‌گیری راحت‌تر می‌شود. لذا این گروه‌بندی براساس میانگین صفات در شرایط تنش و بدون تنش به طور مجزا با نتایج شاخص SIIG انطباق نداشت. لذا، نتایج این گروه‌بندی‌ها ارایه نشد.

جدول 7- گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش ward و میانگین گروه‌ها برای برخی صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در اکوتیپ‌های رازیانه

Table 7. Derived groups from cluster analysis using ward's method and mean of the groups for some biochemical traits measured in fennel ecotypes

صفات	اکوتیپ‌ها		پروتئین		پلی‌فنل‌اکسیداز		پراکسیداز		پرولین		محلول قند	
			mg/g FW		AU/min/mg protein				mg/g FW			
گروه‌ها	بدون تنش	تنش	بدون تنش	تنش	بدون تنش	تنش	بدون تنش	تنش	بدون تنش	تنش	بدون تنش	تنش
گروه 1	1, 2, 4,10	1, 2, 3, 5, 7, 10	0/95	0/82	8/00	9/72	5/78	2/72	0/40	0/51	2/35	5/69
گروه 2	3, 5, 6, 7, 8, 9	4, 6, 8, 9	1/21	0/81	5/42	6/94	4/21	6/16	0/36	0/42	3/78	16/25
کل	1-10		1/09	1/00	6/26	9/78	4/61	9/26	0/36	0/46	8/53	11/32

نتایج حاصل نشان داد که بین اکوتیپ‌های رازیانه از لحاظ صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌دار وجود داشت و تنش بر تمامی صفات تاثیرگذار بود. ولی تاثیر تنش خشکی بر خصوصیات بیوشیمیایی در رازیانه متفاوت بود و بین اکوتیپ‌ها و سطوح تنش اثر متقابل مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین اکوتیپ‌های رازیانه در سطح تنش خشکی برای صفات مورد مطالعه نشان داد که در بیشتر صفات مورد مطالعه اکوتیپ‌های خروسلو، گرینه، همدان، خورشیدآباد مشگین‌شهر و تتماج به ترتیب از نظر مقدار پروتئین کل، آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز، پرولین و قندمحلول دارای بیشترین میانگین بودند در واقع مقدار پروتئین کل، آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، پراکسیداز، پرولین و قندمحلول در اکوتیپ‌های متحمل به خشکی در قیاس با اکوتیپ‌های حساس به خشکی بیشتر بود. نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین صفات، شاخص Ti و رتبه‌بندی اکوتیپ‌ها بر اساس شاخص SIIG اکوتیپ خورشیدآباد مشگین‌شهر، به عنوان اکوتیپ برتر و متحمل به کم‌آبی شناخته شد که برای کشت در مناطق کم‌آبی کشور توصیه می‌شود و اکوتیپ شیروان، حساس‌ترین اکوتیپ به تنش خشکی بود.

منابع

1. Ashraf, A., M.A. Abd el Shafi, E.M.S. Gheith and H.S. Suleiman. 2015. Using different statistical procedures for evaluation drought tolerance indices of bread wheat genotypes. Advance in Agriculture and Biology, 4(1): 19-30.
2. Bagheri, A. and O. Sadeghipour. 2009. Effects of salt stress on yield, yield components and carbohydrates content in four hullness barley (*Hordeum vulgar* L.) cultivars. Journal of biological sciences, 9(8): 909-912.
3. Demiral, M.A., M. Aydin and A. Yorulmaz. 2005. Effect of salinity on growth chemical composition and anti-oxidative enzyme activity of two malting barley (*Hordeum vulgar* L.) cultivars. Turkish Journal of Biology, 29: 117-123.
4. Eskandary, M., A. Astaraei and A. Ganjali. 2009. Evaluation of salinity stress tolerance indices derived from Cl/SO4 anionic ratios and nitrogen fertilizer in barley (*Hordeum vulgar* L.). Environmental Stresses in Agricultural Sciences, 2(1): 15-27 (In Persian).
5. Fernandez, G.C.J. 1992. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In proceeding of a symposium. Taiwan, 13(18): 257-270.
6. Fischer, R.A. and R. Maurer. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars grain yield responses. Australia journal Agriculture Recourse, 29(4): 897-912.
7. Heinnrich, G.M., C.A. Francis and J.D. Eastin. 1983. Stability of grain sorghum yield components across divers environments. Crop Science, 23: 209-212.

8. Karimi, E., M.R. Ghannadha, M.R. Naghavi and M. Mardi. 2005. An evaluation of drought resistance in barley. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 36: 547-560 (In Persian).
9. Koocheki, A.R., A. Yazdansepas and H.R. Nikkhah. 2006. Effect of terminal drought on grain yield and som morphological traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Iranian Journal of Crop Sciences, 8: 14-29 (In Persian).
10. Mohammadi, R., R. Haghparast and M. Aghaee. 2006. Evaluation of breed wheat genotypes for drought tolerance under rainfed condition. Eighth International Conference on Dry land Development, Theme 10. Application of new technologies and technology transfer and crop improvement for dry areas. Beijing, China.
11. Munns, R., S. Husain, A.R. Rivelli and R.A. James. 2002. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. Plant and Soil, 247(1): 93-105.
11. Naseer, S.H. 2001. Response of barley (*Hordeum vulgar* L.) at various stages to salt stress, Journal of biological Science, 1(5): 326-329.
12. Niazian, M., M. No'mani and S.A. Sadat Noori. 2016. A Review on Biometrical Methods used for Salt Tolerance Breeding in Crops. Journal of Crop Breeding, 8(17): 24-41 (In Persian).
13. Saberi, M.H., A. Arazmjoo and A. Amini. 2016. Assessment of Diversity and Identifying of Effective Traits on Grain Yield of bread wheat Promised Lines under Salt Stress Conditions. Journal of Crop Breeding, 8(20): 31-40 (In Persian).
14. Taherian, M., A. Rasoulnia, M.R. Bihamta, A. Peyghambari and H. Alizadeh. 2017. Evaluation of stress tolerance indices in Iranian barley genotypes under salinity and drought conditions. Agricultural Communications, 5(3): 7-17.
15. Ulhaq, J.I., Sh. Akhtar, M. Akram, M. Arfan and Sh. Yasmin. 2003. Differential yield responses of barley genotypes to NaCl salinity. International Journal of Agriculture & Biology, 5(3): 233-235.
16. Yan, W. and I. Rajcan. 2002. Biplot analysis of test sites and trait relations of soybean in Ontario. Crop Science, 42: 11-20.

Evaluation of Biochemical and Antioxidant Characters in Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Ecotypes under Drought Stress

Ghamar Dadashi Jamiran[1], Ali Asghari[2], Asghar Ebadi[3] and Masoumeh Yousefi Azarkhanian[4]

1- Graduated M.Sc. Student, of Science in Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili
2- Professor of Plant Breeding Sciences Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili
3- Assistant Professor of Plant Breeding Sciences, Department of plant Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources of Moghan, University of Mohaghegh Ardabili, (Corresponding author: Asghar_ebadi@yahoo.com)
4- PhD. The expert of Jihad Agricultural Organization, Qazvin
Received: August 19, 2019 Accepted: November 13, 2019

Abstract

Drought stress is the most important abiotic factor limiting growth in arid and semiarid regions. In this study, the effects of different levels of drought stress on protein content, proline, soluble sugars and the activities of antioxidant enzymes polyphenol oxidase and peroxidase were studied in fennel (*Foeniculum vulgare* L.). Ten fennel ecotypes were subjected to two levels of water stress including control (maintained by regular watering at or close to field capacity) and drought stress (irrigation at 40% field capacity), in a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications. Results of the analysis of variance showed significant differences between the ecotypes for all measured traits except proline. Also, drought stress had a significant effect on all the studied traits. The activities of antioxidant enzymes polyphenol oxidase and peroxidase increased in the leaves of all ten ecotypes at stress conditions. Soluble sugar and proline content in most ecotypes showed a significant increase at drought stress level (irrigation at 40% field capacity). Total protein content in all studied ecotypes showed a significant decrease at drought stress level. The results of ecotypes rating using SIIG method showed that ecotypes Khorshidabad and Tatmaj had the highest SIIG in comparison with other ecotypes and these ecotypes were identified as the most tolerant ecotypes. The ecotypes Shirvan, GhaziAntpet and Izmir were also identified as the most sensitive ecotypes to drought, respectively. Results of ecotypes ranking based on SIIG index had full compliance with the results of cluster analysis based on Ti tolerance index.

Keywords: Antioxidant, Fennel, Proline, SIIG index, Soluble sugars