



## تأثیر تنش خشکی بر فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و صفات فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های نخود (*Cicer Arietinum L.*)

مریم رضایی نیا<sup>۱</sup>، محمدرضا بی‌همتا<sup>۲</sup>، سید علی پیغمبری<sup>۳</sup> و علی‌رضا عباسی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه تهران

۲- استاد و عضو هیئت علمی، دانشگاه تهران، (نویسنده مسوول: mrghanad@ut.ac.ir)

۳- استاد و عضو هیئت علمی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲

صفحه: ۱۱ تا ۲۲

### چکیده

به منظور بررسی واکنش ژنوتیپ‌های نخود به تنش خشکی از نظر شاخص‌های فیزیولوژیکی و تغییرات بیوشیمیایی ایجاد شده، آزمایشی بر روی پنج ژنوتیپ نخود در سه سطح تنش ۱۰۰ (شاهد)، ۶۵ و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی در دو دوره ۷ و ۱۴ روز پس از اعمال تنش (۴ تا ۶ برگ)، به صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در زمان در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۲ صورت گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها، سطوح تنش، مدت زمان تنش و برهمکنش آن‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. تنش خشکی به طور معنی‌داری باعث کاهش محتوای آب نسبی و افزایش مقدار نشت الکترولیت گردید. میزان نشت الکترولیت در شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی معمولاً کمتر از ژنوتیپ‌های حساس است که ژنوتیپ‌های ۹۹۸ و ۶۰۶ از این نظر مقاوم و ژنوتیپ ۳۵۷ ژنوتیپی حساس بود. افزایش مدت زمان تنش میزان فعالیت آنزیم‌ها را کاهش داد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش شدت تنش در هر دو دوره افزایش یافت، ولی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز با افزایش شدت تنش کاهش یافت. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در هر دو دوره با بیشتر شدن شدت تنش تا سطح ۶۵ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافت ولی در سطح تنش ۳۰ درصد فعالیت آنزیم نسبت به سطح تنش ۶۵ درصد کاهش یافت. اما پاسخ همه ژنوتیپ‌ها یکسان نبود و برخی از ژنوتیپ‌ها روند افزایشی داشتند. ژنوتیپ ۶۰۶ و ۹۹۸ از لحاظ آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش فعالیت بیش‌تر و ژنوتیپ ۳۵۷ فعالیت کم‌تری داشتند. از لحاظ فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ژنوتیپ ۲۳۶ و ۳۵۷ به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت را داشتند. در شرایط تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهان متحمل بیش از گیاهان حساس است. با توجه به این‌که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در ژنوتیپ‌های ۶۰۶ و ۹۹۸ دارای بیش‌ترین میزان بود بنابراین به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی، و ژنوتیپ ۳۵۷ که دارای کم‌ترین میزان فعالیت آنزیمی بود به عنوان ژنوتیپ حساس به خشکی در این آزمایش معرفی شد. البته واکنش گیاهان به تنش خشکی بسته به شدت و مدت تنش، نوع گیاه و مرحله رشدی آن به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، نخود، نشت الکترولیت

### مقدمه

عملکرد رادیکال‌های آزاد شده و از تخریب سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. این مواد می‌توانند با دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد، آن‌ها را به شکل پایدار خود تبدیل کنند و مانع از اثرات مخرب آن‌ها شوند. درجه فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان افزایش آنتی اکسیدان‌ها در گیاهان به گونه گیاهی، مرحله نمو، شرایط متابولیک، طول مدت و شدت تنش بستگی دارد. سازوکارهای سمیت‌زدایی انواع اکسیژن فعال در همه گیاهان وجود دارند که به دو دسته آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و غیره) و غیر آنزیمی (ویتامین E، آسکوربات، گلوتاتیون، ملاتونین، ترکیبات فلاونوئیدی، کاروتنوئیدها و غیره) طبقه‌بندی می‌شوند. گزارش‌ها نشان می‌دهند که رقم‌های مقاوم به تنش‌های محیطی می‌توانند از طریق القا کردن سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدانی با تنش‌های محیطی مقابله کنند. بنابراین، بین سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و تحمل شرایط تنش ارتباط وجود دارد (۱۶). امروزه برخی از محققان معتقدند که افزایش میزان آنتی اکسیدان‌ها تحمل گیاه به تنش‌های محیطی را افزایش می‌دهد (۵، ۲۸).

گیاهان زراعی همواره در طول دوره رشد خود با تنش‌های محیطی مختلفی روبرو هستند. تنش خشکی سبب ایجاد اختلالات متابولیسمی در سلول‌های گیاهی می‌گردد که می‌توان به افزایش تولید انواع اکسیژن فعال به عنوان یکی از عوامل اصلی اختلالات متابولیسمی سلول اشاره کرد (۲۸). نخود (*Cicer Arietinum L.*)، یکی از بقولات دانه‌ای است و در حال حاضر در ۴۸ کشور جهان با سطحی بیش از ۱۱ میلیون هکتار و تولیدی بیش از هشت میلیون تن کشت می‌شود (۱۹). بر اساس آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۹۱-۱۳۹۰ نخود با ۶۲/۸ درصد سطح زیر کشت و ۴۲/۴ درصد تولید رتبه اول را در بین حبوبات دارا می‌باشد. بر اساس مطالعات انجام شده، از بین عوامل مختلف ایجادکننده تنش، خشکی به تنهایی عملکرد گیاه نخود را تا ۴۵ درصد کاهش می‌دهد (۴). انواع اکسیژن فعال به طور بالقوه‌ای دارای پتانسیلی هستند که توان واکنش با بسیاری از ترکیبات سلولی را داشته و سبب خسارت به غشاء و سایر ماکرومولکول‌های ضروری از قبیل رنگدانه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها می‌شوند، بنابراین میزان آن‌ها باید در سلول کنترل شود (۹). آنتی اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که مانع از

به‌عنوان عامل فرعی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۲ اجرا شد. بذور سالم انتخاب و تعداد ۵ عدد در داخل گلدان‌های دو کیلوگرمی به میزان ۳ به ۲ خاک و ماسه بادی کشت شدند. ظرفیت زراعی خاک (۲۱/۲۳ درصد) با استفاده از دستگاه دیسک صفحه فشاری مشخص و سطوح تنش ۳۰ و ۶۵ درصد این مقدار آب محاسبه و در طول دوره آزمایش برای سطوح مختلف رطوبتی گلدان‌ها مورد استفاده قرار گرفت. بعد از کاشت، آبیاری گلدان‌ها تا قبل از اعمال تنش به‌طور کامل انجام گرفت. ۱۴ روز پس از جوانه‌زنی (مرحله ۴ تا ۶ برگ)، تنش به‌صورت وزنی اعمال شد برای این منظور گلدان‌ها روزانه وزن شده و مقدار آب لازم برای رسیدن به هر کدام از سطوح اضافه شد. در نهایت ۷ و ۱۴ روز پس از تنش از گیاهان نمونه برگ‌ی گرفته شد و نمونه‌ها تا قبل از انجام آزمایشات، در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از اسپکتروفتومتر و به‌روش عائی (۲)، در طول موج ۲۴۰ نانومتر، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به روش چانچ و ماهلی (۱۲) در طول موج ۴۷۰ نانومتر و فعالیت آسکوربات پراکسیداز با روش رانیر و همکاران (۴۳) در طول موج ۲۹۰ نانومتر سنجیده شد. همچنین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز طبق روش دهیندا و همکاران (۱۷) در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری محتوای آب نسبی، از آخرین برگ توسعه‌یافته گیاه نمونه‌برداری شد. برگ‌ها به قطعات یک سانتی‌متری تقسیم شدند. وزن تازه آن‌ها تعیین و برای تعیین وزن آماسیده، قطعه‌های برگ‌ی ۱۸-۱۶ ساعت در دمای اتاق (تقریباً ۲۰ درجه سانتی‌گراد) در آب مقطر قرار داده شدند و وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس قطعه‌های برگ‌ی به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفتند و وزن خشک آن‌ها از طریق توزین به‌دست آمد. در نهایت از فرمول زیر برای به‌دست آوردن محتوای آب نسبی استفاده شد:

$$\text{نسبی آب} (\%) = \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تی})}{(\text{وزن خشک} - \text{وزن آماسی})}$$

برای اندازه‌گیری شاخص نشت الکترولیتی، ۸۰ میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ۱۰ سی‌سی آب مقطر انتقال یافت و به‌مدت ۲۴ ساعت در داخل آب در دمای اتاق (تقریباً ۲۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و بعد از این مدت میزان هدایت الکترولیتی نمونه‌ها ( $EC_1$ ) با استفاده از دستگاه  $EC$  متر قرائت شد. سپس کل محتوای لوله آزمایش به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و میزان هدایت الکترولیتی ( $EC_2$ ) تعیین شد و در نهایت مقدار شاخص خسارت براساس فرمول زیر محاسبه گردید (۵۴):

$$I = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

سلول‌های گیاهی توسط غشاهای سلولی احاطه شده‌اند یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد غشاها، نفوذپذیری انتخابی آنهاست که مانع از ایجاد تعادل بین سلول و محیط خارج سلولی می‌گردد. در شرایط تنش به‌دلیل افزایش رئونوسی ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنزیم‌های مرتبط با پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش تولید انواع اکسیژن فعال، میزان آسیب به غشاهای سلولی افزایش می‌یابد که در نتیجه آن، نفوذپذیری انتخابی غشا کاهش یافته و باعث افزایش نشت الکترولیت می‌شود. از این‌رو، نشت الکترولیت به‌عنوان یکی از معیارهای مقاومت به خشکی، به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸). بنابراین میزان تخریب غشاء در شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی معمولاً کم‌تر از ژنوتیپ‌های حساس است (۲۲). کاهش ضربیب پایداری غشاء در شرایط تنش خشکی در گیاهان دیگر از جمله گندم، زیتون و *Medicago Truncatula* نیز گزارش شده است (۷۰، ۴۰، ۲۷).

محتوای آب نسبی جذب آب به وسیله بافت‌ها و سلول‌ها را نشان می‌دهد (۵۲). صادقی‌پور و آقای (۴۵) اظهار داشتند محتوای آب نسبی منعکس‌کننده فعالیت متابولیک در بافت‌های گیاه بوده و به‌عنوان شاخصی مناسب به‌منظور شناسایی لگوم‌ها در تحمل پسابی‌دگی استفاده می‌شود. همچنین گزارش شده است که گیاهان متحمل به خشکی با جذب آب از پروتوپلاست، آب بیش‌تری را در خود نگهداری می‌کنند، بنابراین دارای مقدار بالاتری محتوای آب نسبی می‌باشند (۵۲). گیاهان عموماً سازوکارهای مختلفی برای مقابله با تنش خشکی دارند و از طریق القای انواعی از پاسخ‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی به تنش خشکی سازگار می‌شوند (۳۶). پاسخ گیاهان به تنش خشکی بستگی به شدت و مدت تنش و همچنین گونه گیاهی و مرحله وقوع تنش دارد (۶).

با توجه به اینکه خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده عملکرد گیاهان زراعی به‌شمار می‌آید و از آنجایی که در ایران کشت نخود عمدتاً به‌صورت دیم صورت می‌گیرد، بنابراین شناخت ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ایجاد شده در محیط تنش خشکی، می‌تواند ما را در شناخت ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی یاری کند. در این پژوهش اثر تنش خشکی بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات فیزیولوژیک به‌منظور تعیین نقش این آنزیم‌ها در کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی در پنج ژنوتیپ نخود مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

این آزمایش بر روی ۵ ژنوتیپ نخود (به اسامی ۹۹۸، ۴۶۶، ۳۵۷، ۲۳۶ و ۶۰۶)، و در سه رژیم رطوبتی خاک شامل ظرفیت زراعی (شاهد)، ۶۵ درصد و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی در محیط کنترل‌شده گلخانه با دمای روز و شب، به‌ترتیب ۲۴ و ۱۴ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی و تاریکی به ترتیب ۱۳ و ۱۱ ساعت، به‌صورت فاکتوریل اسپلیت‌پلات در زمان که ارقام و سطوح تنش به‌عنوان عامل‌های اصلی و زمان

تجزیه واریانس داده‌ها توسط نرم‌افزار Minitab و ترسیم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ( $P = 0.05$ ) انجام شد.

## نتایج و بحث محتوای آب نسبی (RWC)

بر اساس نتایج اثر ژنوتیپ، سطوح تنش، مدت زمان تنش و برهم‌کنش تنش و مدت زمان و ژنوتیپ و مدت زمان بر مقدار محتوای آب نسبی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه محتوای آب نسبی در سطوح مختلف آبیاری نشان داد که در هر دو دوره با افزایش شدت تنش از میزان محتوای آب نسبی کاسته می‌شود، به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار محتوای آب نسبی مربوط به شرایط شاهد یا ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان ۷۹/۹۷ درصد و کم‌ترین مقدار آن مربوط به سطح تنش ۳۰ درصد به میزان ۵۸/۱۶ درصد بود (شکل ۱). همچنین با افزایش مدت زمان کاهش محتوای آب نسبی برگ، بسته شدن روزنه‌ها را تحریک می‌کند و به دنبال بسته شدن روزنه‌ها سرعت فتوسنتز نیز کاهش می‌یابد. بنابراین محتوای آب نسبی به‌عنوان یک شاخص مفید در گزینش برای تحمل به خشکی ارزیابی شده است (۱۵).

در بین ژنوتیپ‌ها، بیش‌ترین مقدار محتوای آب نسبی به ژنوتیپ ۹۹۸ با میانگین ۷۸/۱۷ درصد که با ژنوتیپ ۶۰۶ (۷۶/۴۵) از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشت و کم‌ترین مقدار آن مربوط به ژنوتیپ ۳۵۷ (۶۷/۲۰ درصد) بود (شکل ۲). هنگامی که آب به اندازه کافی در دسترس گیاه باشد ژنوتیپ‌ها پاسخ نسبتاً یکسانی نشان می‌دهند اما با افزایش

شدت و مدت زمان تنش واکنش ژنوتیپ‌ها متفاوت بوده و ژنوتیپی که بتواند محتوای آب نسبی بیش‌تری داشته باشد مقاوم‌تر می‌باشد. تفاوت در محتوای آب نسبی در ارقام مختلف می‌تواند به توانایی آن‌ها در جذب آب از خاک یا توانایی بستن روزنه‌ها و تعرق کم‌تر در شرایط تنش خشکی مربوط گردد. در هر دو دوره تنش ۷ و ۱۴ روز با افزایش شدت تنش تا سطح ۳۰ درصد، محتوای نسبی آب کاهش معنی‌داری یافت و این شدت کاهش در تنش ۱۴ روز شدیدتر از تنش ۷ روز بود. در سطح تنش ۶۵ درصد به مدت ۷ روز میزان محتوای نسبی آب نسبت به شاهد ۶ درصد کاهش یافت اما در تنش ۱۴ روز ۹ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد. در سطح تنش ۳۰ درصد به مدت ۷ روز میزان محتوای نسبی آب به ترتیب ۱۵ و ۲۳ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد.

میزان و زمان تنش خشکی نیز روی محتوای آب نسبی گیاه تاثیر دارد به‌طوری‌که توسعه اندام‌های هوایی گیاه را مختل کرده و موجب می‌شوند که گیاهان کوچک باقی بمانند (۱۰). همچنین کنترل فعالیت‌های فیزیولوژیکی به محتوای آب نسبی گیاه وابسته بوده و تغییرات محتوای آب نسبی به‌طور مستقیم روی دستگاه فتوسنتزی تاثیر می‌گذارد (۲۶). صادقی‌پور و آقای (۴۵) اظهار داشتند محتوای آب نسبی منعکس‌کننده فعالیت متابولیک در بافت‌های گیاه بوده و به‌عنوان شاخص مناسب به‌منظور شناسایی لگوم‌ها در تحمل پسابدگی استفاده می‌شود. همچنین گزارش شده است که گیاهان متحمل به خشکی با جذب آب از پروتوپلاست، آب بیش‌تری را در خود نگه‌داری می‌کنند، بنابراین دارای مقدار بالاتری محتوای آب نسبی می‌باشند (۵۲).

جدول ۱- تجزیه اریانس شاخص‌های محتوای آب نسبی، شاخص نشت الکترولیت و آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گاپاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز

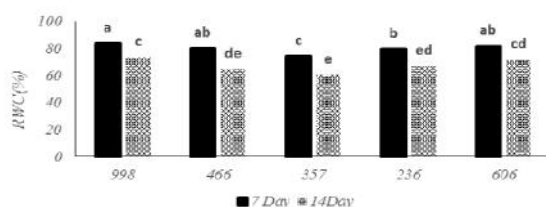
Table 1. Analysis of variance for the RWC, ELI and enzymes CAT, APX, GPX, SOD

میانگین مربعات						
منابع تغییرات	درجه آزادی	محتوای آب نسبی (%)	نشت یونی (%)	کاتالاز (mg/g)	پراکسیداز (mg/g)	سوپراکسید دیسموتاز (mg/g)
ژنوتیپ	۴	۱۹۸/۵۵**	۸۴۱/۵۲**	۰/۰۰۰۰۶۱**	۰/۰۵۲**	۱/۲۵**
تنش	۲	۸۸۷/۲۴**	۲۳۴۱/۸۱**	۰/۰۰۰۱۲**	۰/۰۹۴**	۹/۶۹**
ژنوتیپ × تنش	۸	۶۲/۲۵	۱۴۹/۲۸**	۰/۰۰۰۰۲۹**	۰/۰۳۹**	۲/۰۹**
خطا	۳۰	۱۷/۶۷	۲/۶۳	۰/۰۰۰۰۰۹۱	۰/۰۰۴	۰/۱۸۹
زمان	۱	۲۶۸/۳۹**	۲۱۶۴۷/۶۲**	۰/۰۰۱۱**	۰/۷۵۶**	۵/۳۴**
ژنوتیپ × زمان	۴	۸۶**	۷۲۱/۸۶**	۰/۰۰۰۰۲۶*	۰/۰۴۴**	۰/۵۵۴*
تنش × زمان	۲	۲۳۳/۷۴**	۱۳۰۱/۴۶**	۰/۰۰۰۰۳۳*	۰/۰۱۹**	۰/۷۴۶*
ژنوتیپ × تنش × زمان	۸	۳۶/۵۰	۱۶۶/۴۲**	۰/۰۰۰۰۷۵**	۰/۰۷۲**	۱/۲۳۰**
خطا	۳۰	۲۰/۴۳	۳/۷۴	۰/۰۰۰۰۰۹۳	۰/۰۰۳۶	۰/۱۸۷
ضرب تغییرات (%)		۵/۸۹	۹/۵۷	۱۶/۱۳	۱۸/۳۳	۱۲/۹۱

\*, \*\*: به ترتیب بیانگر عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای پنج و یک درصد

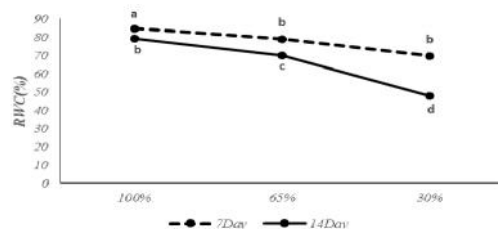
تنش خشکی و شاهد مشاهده نکردند. گیاهان عموماً سازوکارهای مختلفی برای مقابله با تنش خشکی دارند و از طریق القای انواعی از پاسخ‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی به تنش خشکی سازگار می‌شوند (۲۰، ۳۶). پاسخ گیاهان به تنش خشکی بستگی به شدت و مدت تنش و همچنین گونه گیاهی و مرحله وقوع تنش دارد (۶).

در مطالعه عمرانی و محرم‌نژاد (۴۱) بر روی هیبریدهای ذرت تحت تنش شوری نشان دادند که با بالا رفتن غلظت سدیم کلراید در محیط ریشه میزان محتوای آب نسبی در برگ کاهش می‌یابد. بسیاری از محققین دیگر کاهش محتوای آب نسبی را تحت تنش خشکی بیان کرده‌اند (۵۰، ۲۴). اما در تحقیقات مارتینز و همکاران (۳۴) و قنبری و همکاران (۲۵) بر روی لوبیا تفاوتی در مقدار محتوای آب نسبی در شرایط



شکل ۱- محتوای آب نسبی در تنش ۷ و ۱۴ روز  
Figure 1. Relative water content in stress 7 and 14 days

مقادیر با حروف غیر مشترک، اختلاف معنی‌داری با هم دارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد)  
Means by the uncommon letter are significantly different according to Duncan's multiple range tests (5%)



شکل ۲- اثر متقابل ژنوتیپ و زمان بر میزان محتوای آب نسبی  
Figure 2. The interaction between genotype and time on the relative water content  
مقادیر با حروف غیر مشترک، اختلاف معنی‌داری با هم دارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد)  
Means by the uncommon letter are significantly different according to Duncan's multiple range tests (5%)

۳۴/۳۹ درصد افزایش یافت. بنابراین مدت زمان تنش در میزان آسیبی که به غشای سلولی وارد می‌کند، موثر می‌باشد. بیش‌ترین میزان نشت الکترولیتی در هر دو دوره تنش به ژنوتیپ ۳۵۷ اختصاص داشت (۱۱/۴۳ و ۲۶/۳۴)، بنابراین آسیب بیش‌تری به غشای سلولی آن وارد گردیده است و می‌توان گفت که به تنش خشکی حساس‌تر می‌باشد. ژنوتیپ ۹۹۸ در تنش ۷ روز (۶/۶۰) و تنش ۱۴ روز (۱۶/۰۲) دارای کم‌ترین میزان نشت الکترولیت بود و بعد از آن ژنوتیپ ۶۰۶ دارای کم‌ترین میزان نشت الکترولیت در هر دو دوره تنش بود (شکل ۳). از آنجایی‌که اولین خسارت وارده در اثر تنش به گیاه در سطح غشا می‌باشد بنابراین می‌توان گفت ژنوتیپی که کم‌ترین میزان نشت الکترولیتی را داشته باشد در برابر خسارت اولیه مقاوم‌تر می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که ژنوتیپ ۹۹۸ و ژنوتیپ ۶۰۶ در اثر تنش شدید دچار آسیب سلولی کم‌تری می‌شوند. در این ارقام خشکی به غشای سلولی آسیب وارد می‌کند ولی چون مقدار آسیب کم می‌باشد ممکن است با

### شاخص نشت الکترولیت (ELI)

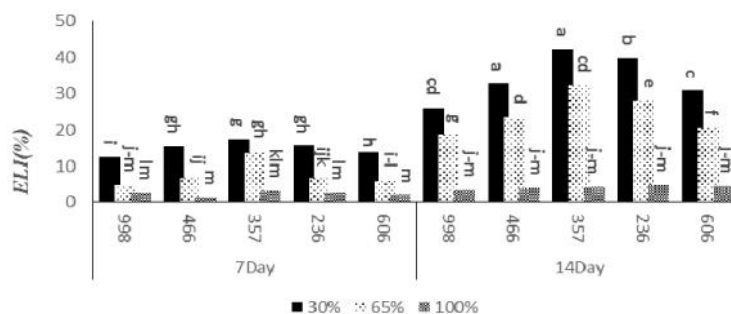
نتایج حاصل از جدول ۱ نشان داد که از نظر میزان خسارت به غشای سلولی بر اساس شاخص نشت الکترولیت تفاوت معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) بین ژنوتیپ‌ها، سطوح تنش و مدت زمان تنش وجود داشت. همچنین برهم‌کنش ژنوتیپ و مدت زمان تنش، مدت زمان تنش و سطح تنش و سطح تنش و مدت زمان تنش از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در هر دو دوره تنش (۷ و ۱۴ روز) با افزایش شدت تنش میزان نشت الکترولیت افزایش یافت اما تنش ۱۴ روز نسبت به ۷ روز آسیب بیشتری به غشای سلولی وارد می‌کند که این آسیب ناشی از افزایش مدت زمان تنش می‌باشد، که در سطح تنش ۳۰ درصد بیش‌تر از ۶۵ درصد ظرفیت زراعی بود. با افزایش مدت زمان تنش از ۷ به ۱۴ روز در سطح ۶۵ درصد ظرفیت زراعی میزان نشت الکترولیتی از ۸/۲۱ به ۲۴/۶۴ درصد می‌رسد اما در سطح تنش ۳۰ درصد میزان نشت الکترولیتی از ۱۴/۹۴ به

شدن یون‌های غشایی می‌شود، بنابراین بر میزان نشت یون‌ها نیز افزوده گردید. همچنین حفظ تمامیت غشای سلولی در طی تنش خشکی نشانه‌ای از وجود مکانیزم‌های کنترلی در تحمل به پساایدگی است بنابراین ژنوتیپ ۹۹۸ و ۶۰۶ که پایداری غشایی بالاتری دارند نسبت به ژنوتیپ ۳۵۷ در شرایط تنش کم آبی مقاوم‌تر هستند.

در موجودات زنده با افزایش سن، فعالیت‌های فیزیولوژیکی موجود زنده از بین رفته و حساسیت آن به شرایط نامساعد و مرگ افزایش می‌یابد. که چگونگی روند کاهش فعالیت‌های فیزیولوژیکی در بین گونه‌های مختلف موجودات زنده و همچنین افراد یک گونه با هم تفاوت دارند (۳۳). فرنس و همکاران (۲۱) و سیدیکو و همکاران (۵۱) در بررسی اثر تنش خشکی بر روی ارقام لوبیا و باقلا به نتایج مشابهی دست یافتند.

ایجاد شرایط مناسب و در اختیار قرار گرفتن مجدد آب برای گیاه، سلول دوباره به حالت اول بازگشته و سیالیت غشا مجدداً به‌دست آید.

افزایش تولید مواد تخریب‌کننده غشا از جمله پراکسید هیدروژن در شرایط تنش خشکی، سبب کاهش پایداری غشا می‌گردد. بنابراین گیاهانی که قادر به حذف یا کاهش میزان تولید این ترکیبات در شرایط تنش خشکی باشند، می‌توانند میزان پایداری غشای خود را در حد مطلوبی حفظ و از تخریب آن جلوگیری نمایند. بنابراین انتظار می‌رود میزان تخریب غشا در شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی کمتر از ژنوتیپ‌های حساس باشد (۲۲). نتایج نشان داد افزایش شدت و مدت زمان تنش خشکی باعث ایجاد اختلال شدیدتر در فعالیت‌های بیولوژیک غشای سلولی، کاهش سیالیت آن و غیرفعالسازی یا کاهش سرعت پمپ



شکل ۳- مقایسه تاثیر سطوح تنش بر میزان نشت الکترولیت، ۵ ژنوتیپ نخود در دو دوره ۷ و ۱۴ روز  
Figure 3. Compares the effect of stress on electrolyte leakage, 5 chickpea genotypes under two periods 7 and 14 days  
مقادیری با حروف غیر مشترک، اختلاف معنی‌داری با هم دارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد)  
Means by the uncommon letter are significantly different according to Duncan's multiple range tests (5%)

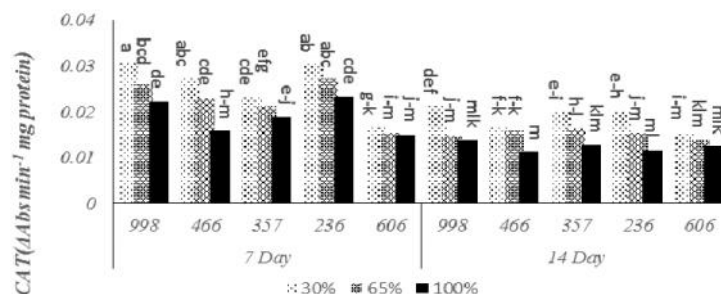
یافت. کم‌ترین میزان در این سطح تنش نیز به ژنوتیپ ۳۵۷ اختصاص داشت که میزان کاتالاز آن از ۰/۰۱۴ گرم بر میلی‌گرم در سطح شاهد به ۰/۰۱۵ گرم بر میلی‌گرم در تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافت که در این دو سطح از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. در تنش ۳۰ درصد بیش‌ترین میزان کاتالاز متعلق به ژنوتیپ ۶۰۶ با ۰/۰۲۶ میلی‌گرم بر گرم که از این نظر با ژنوتیپ ۹۹۸ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشت و کم‌ترین میزان مربوط به ژنوتیپ ۳۵۷ با ۰/۰۱۵ میلی‌گرم بر گرم اختصاص داشت (شکل ۴). کاتالاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های جمع‌آوری‌کننده پراکسید هیدروژن به‌شمار می‌آید که افزایش فعالیت این آنزیم باعث مقاومت گیاه در شرایط تنش و در نتیجه افزایش عملکرد محصول می‌شود. همان‌طور که مشاهده شد، در این آزمایش نیز تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. بنابراین ژنوتیپ ۶۰۶ و ۹۹۸ از لحاظ فعالیت آنزیم کاتالاز در مقابل تنش خشکی مقاوم و ژنوتیپ ۳۵۷ حساس می‌باشد.

#### کاتالاز (CAT)

تجزیه واریانس داده‌های کاتالاز نشان داد که بین ارقام، سطوح تنش خشکی و مدت زمان تنش بر روی مقدار کاتالاز در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). بین ارقام بیش‌ترین مقدار کاتالاز به ترتیب مربوط به ژنوتیپ ۹۹۸ و ۶۰۶ بود (۰/۰۲۱ و ۰/۰۲۰) که اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و کم‌ترین مقدار کاتالاز مربوط به ژنوتیپ ۳۵۷ با میانگین (۰/۰۱۵) بود. با افزایش شدت تنش میزان کاتالاز افزایش یافت به‌طوری‌که میزان کاتالاز از ۰/۰۱۵ میلی‌گرم بر گرم در شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) به ۰/۰۲۲ میلی‌گرم بر گرم در ۳۰ درصد تنش خشکی رسید. با افزایش مدت زمان تنش از ۷ به ۱۴ روز میزان کاتالاز کاهش نشان داد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش شدت تنش میزان کاتالاز در ارقام مختلف افزایش یافت اما این افزایش در ارقام متحمل بیش‌تر از حساس بود. در تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی بیش‌ترین مقدار کاتالاز در ژنوتیپ ۶۰۶ مشاهده گردید که مقدار آن از ۰/۰۱۴ میلی‌گرم بر گرم در شاهد به ۰/۰۲۱ میلی‌گرم بر گرم تحت تنش ۶۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش

نمودند که افزایش فعالیت کاتالاز، سبب افزایش پتانسیل دفاعی گیاه ذرت در مقابل تنش خشکی شده و میزان تحمل این گیاه به شرایط تنش خشکی را بهبود می‌بخشد. کاهش اثرات تخریبی تنش خشکی از طریق افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه لوبیا نیز گزارش شده است (۳). علاوه بر مطالعه حاضر و آزمایشات انجام گرفته شده که حاکی از افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش خشکی در گیاهان مختلف می‌باشد (۵۸، ۴۹، ۵۵)، گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد آنزیم کاتالاز در تنش خشکی کاهش می‌یابد (۱، ۴۶). بنابراین واکنش گیاهان به تنش‌های خشکی در سطوح سازمانی مختلف بسته به شدت و مدت تنش همچنین نوع گیاه و مرحله رشدی آن به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت می‌باشد (۱۴).

کاتالاز به‌عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدانی عمل کرده و در حذف و رویندگی پراکسید هیدروژن تولید شده در پراکسی‌زوم‌ها و کاهش اثرات تخریبی گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی بر عهده دارد (۳۹، ۵۳). در یک آزمایش که اثرات تنش شوری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان دو وارسته کنگد مورد بررسی قرار گرفت، بررسی‌ها حاکی از افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو وارسته در شرایط تنش بود با این تفاوت که وارسته متحمل به تنش، از فعالیت کاتالازی بیش‌تری در شرایط تنش نسبت به وارسته حساس برخوردار بود. ایشان فعالیت بیش‌تر کاتالاز در شرایط تنش و در وارسته متحمل را دلیلی بر توانایی بیش‌تر این وارسته در رویندگی گونه‌های فعال اکسیژن و توانایی آن در تحمل شرایط تنش ذکر نمودند (۳۲). هال و سمیر (۳۰) نیز گزارش



شکل ۴- مقایسه تاثیر سطوح تنش بر فعالیت آنزیم کاتالاز ۵ ژنوتیپ نخود در دو دوره ۷ و ۱۴ روز  
Figure 4. Compares the effect of stress on catalase activity 5 chickpea genotypes under two periods 7 and 14 days  
مقادیری با حروف غیر مشترک، اختلاف معنی‌داری با هم دارند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد)  
Means by the uncommon letter are significantly different according to Duncan's multiple range tests (5%)

که میزان آن از ۰/۰۱۸ میلی گرم بر گرم در شاهد به ۰/۰۲۰ میلی گرم بر گرم در تنش ۶۵ درصد رسید. با افزایش شدت تنش از ۶۵ درصد به ۳۰ درصد ظرفیت زراعی در هر دو دوره میزان گایاکول کاهش نشان داد (به جز ژنوتیپ‌های ۹۹۸ و ۲۳۶). در تنش ۳۰ درصد بیش‌ترین میزان گایاکول پراکسیداز متعلق به ژنوتیپ ۲۳۶ و ۹۹۸ به ترتیب با ۰/۰۳۳ و ۰/۰۲۹ میلی گرم بر گرم و کم‌ترین میزان به ژنوتیپ ۳۵۷ (۰/۰۱۳) میلی گرم بر گرم) اختصاص داشت (شکل ۵). بنابراین ژنوتیپ‌ها از نظر توانایی محتوای آنزیم آنتی اکسیدانی گایاکول تحت شرایط تنش با هم اختلاف دارند و ژنوتیپ‌های ۲۳۶ و ۹۹۸ با سازوکار کاراتری قادرند با افزایش میزان گایاکول پراکسیداز تحت تنش مقاومت خود را نسبت به تنش کم آبی افزایش دهند و ژنوتیپ ۳۵۷ از این نظر از مقاومت پایین‌تری برخوردار است.

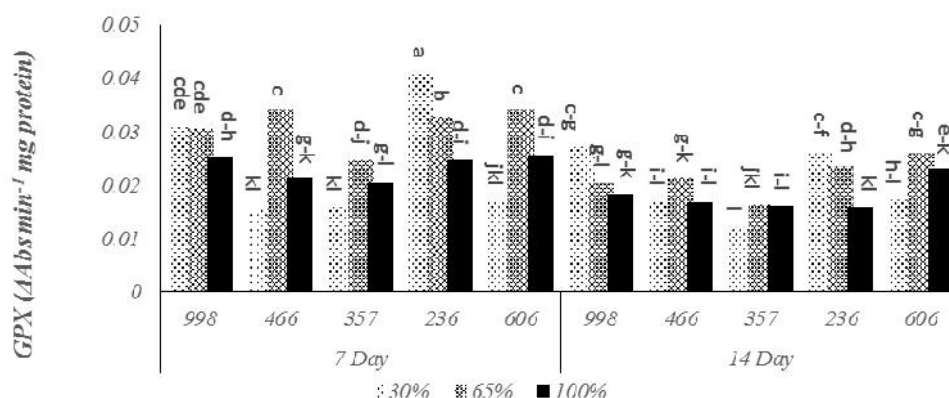
فعالیت بالای آنزیم‌های پراکسیداز باعث کاهش آسیب‌های سلولی در شرایط تنش خشکی شده و می‌تواند به‌عنوان یک مکانیسم حفاظتی موثر در برابر تنش خشکی در نظر گرفته شود (۴۴). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عموماً افزایش تنش خشکی تا سطح مشخصی با افزایش سطح فعالیت گایاکول پراکسیداز همراه بوده است. این در حالی است

#### گایاکول پراکسیداز (GPX)

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر ژنوتیپ، سطوح مختلف تنش، مدت تنش و برهمکنش آن‌ها در سطح احتمال یک درصد بر میزان گایاکول پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۱). بر اساس مقایسات میانگین بیش‌ترین فعالیت آنزیم در تنش ۷ روز بود یعنی با بیشتر شدن مدت تنش، فعالیت آنزیم در همه ژنوتیپ‌ها کاهش یافت. در هر دو دوره با بیشتر شدن شدت تنش تا سطح ۶۵ درصد ظرفیت زراعی افزایش فعالیت آنزیم مشاهده شد ولی در سطح تنش ۳۰ درصد فعالیت آنزیم نسبت به سطح تنش ۶۵ درصد کاهش یافت اما پاسخ همه ژنوتیپ‌ها یکسان نبود و برخی از ژنوتیپ‌ها روند افزایشی (ژنوتیپ ۹۹۸ و ۲۳۶ در هر دو دوره) داشتند. در بین ارقام بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار گایاکول پراکسیداز به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ ۲۳۶ (۰/۰۲۶) میلی گرم بر گرم) و ژنوتیپ ۳۵۷ (۰/۰۱۷) میلی گرم بر گرم) بود. در تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی بیش‌ترین مقدار گایاکول پراکسیداز در ژنوتیپ ۲۳۶ مشاهده گردید که مقدار آن از ۰/۰۲۰ میلی گرم بر گرم در شاهد به ۰/۰۲۸ میلی گرم بر گرم تحت تنش ۶۵ درصد افزایش یافت. کم‌ترین میزان گایاکول پراکسیداز در این سطح تنش به ژنوتیپ ۳۵۷ اختصاص داشت

به دلیل افزایش مقدار آسکوربات پراکسیداز نیز باشد. از طرف دیگر ممکن است وجود مقادیر زیاد آسکوربات بر گایاکول پراکسیداز اثر بازدارندگی داشته باشد. دلیل این امر استفاده از آسکوربات به عنوان سوبسترا به جای گایاکول می باشد (۳۵).

که افزایش شدت و مدت تنش خشکی از حد مشخصی احتمالاً به دلیل وارد شدن صدمه به سنتز پروتئین ها، موجب کاهش شدید فعالیت اکثر آنزیم های آنتی اکسیدانی از جمله گایاکول پراکسیداز شده است. کاهش فعالیت گایاکول پراکسیداز در برخی از ژنوتیپ ها می تواند



شکل ۵- مقایسه تاثیر سطوح تنش بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۵ ژنوتیپ نخود در دو دوره ۷ و ۱۴ روز  
Figure 5. Compares the effect of stress on guaiacol peroxidase activity 5 chickpea genotypes under two periods 7 and 14 days

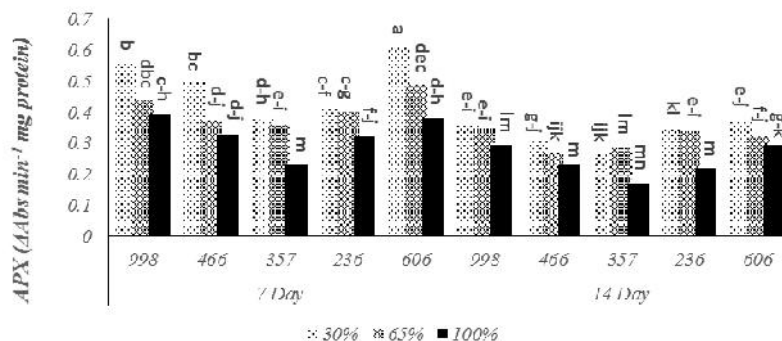
مقادیری با حروف غیر مشترک، اختلاف معنی داری با هم دارند (آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد)  
Means by the uncommon letter are significantly different according to Duncan's multiple range tests (5%)

#### آسکوربات پراکسیداز (APX)

تجزیه واریانس داده های آسکوربات پراکسیداز نشان داد که بین ژنوتیپ ها، سطوح تنش خشکی و مدت زمان تنش بر روی مقدار آسکوربات پراکسیداز در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود دارد (جدول ۱). بین ارقام بیشترین مقدار آسکوربات پراکسیداز به ترتیب مربوط به ژنوتیپ ۶۰۶ و ۹۹۸ بود (۰/۴۱ و ۰/۳۹) که اختلاف معنی داری با هم نداشتند و کمترین مقدار آسکوربات پراکسیداز مربوط به ژنوتیپ ۳۵۷ با میانگین (۰/۲۹) بود. با افزایش شدت تنش میزان آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت به طوری که میزان آسکوربات پراکسیداز از ۰/۲۹ میلی گرم بر گرم در شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) به ۰/۴۱ میلی گرم بر گرم در ۳۰ درصد تنش خشکی رسید. با افزایش مدت زمان تنش از ۷ به ۱۴ روز میزان آسکوربات پراکسیداز کاهش نشان داد. مقایسه میانگین ها نشان داد که با افزایش شدت تنش میزان آسکوربات پراکسیداز در ارقام مختلف افزایش یافت. در تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی بیشترین مقدار آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ ۶۰۶ مشاهده گردید که مقدار آن از ۰/۳۳ میلی گرم بر گرم در شاهد به ۰/۴۰ میلی گرم بر گرم تحت تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافت. کمترین میزان در این سطح تنش نیز به ژنوتیپ ۳۵۷ اختصاص داشت که میزان آسکوربات پراکسیداز آن از ۰/۲۰ گرم بر میلی گرم در سطح شاهد به ۰/۳۲ گرم بر میلی گرم در تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافت. در تنش ۳۰ درصد بیشترین میزان

آسکوربات پراکسیداز متعلق به ژنوتیپ ۶۰۶ با ۰/۴۹ میلی گرم بر گرم و کمترین میزان مربوط به ژنوتیپ ۳۵۷ با ۰/۳۲ میلی گرم بر گرم اختصاص داشت (شکل ۶).  
افزایش فعالیت آنزیم های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در شرایط تنش نشان دهنده این است که این آنزیم ها نقش کلیدی در پاکسازی گونه های فعال اکسیژن دارند. آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز از  $H_2O_2$  به عنوان سوبسترا برای واکنش استفاده می کنند. همچنین میل ترکیبی آسکوربات پراکسیداز برای ترکیب با  $H_2O_2$  نسبت به گایاکول پراکسیداز بیشتر می باشد، بنابراین می توان گفت که با افزایش شدت تنش میزان آسکوربات پراکسیداز به دلیل افزایش گونه های فعال اکسیژن افزایش پیدا کند (۳۸). کاهش فعالیت آنزیم در تنش های ملایم نیز می تواند بر اثر کاهش گونه های فعال اکسیژن باشد که در نهایت سنتز آنزیم را کاهش داده است (۴۲). افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش خشکی در تحقیقات های فراوانی گزارش شده است (۵۸، ۵۷، ۵۵، ۴۶). نتایج تحقیقات موید این است که همبستگی مثبت و بسیار بالایی بین تحمل به تنش های اکسیداتیو، که به دلیل تنش های محیطی ایجاد می شود، و افزایش غلظت آنزیم های آنتی اکسیدان وجود دارد (۴۷). در این ارتباط، بررسی ها نشان داده است که در تنش های شدید، غلظت آنزیم های آنتی اکسیدان تا دو برابر افزایش یافته است که نتیجه آن، مقاومت بیشتر گیاه به تنش های اکسیداتیو می باشد (۳۳). بنابراین، مکانیسم هایی در گیاه که باعث

کاهش تنش اکسیداتیو می شوند، می توانند نقش مهمی در سازگاری گیاه به محیط های دارای تنش ایفا نمایند (۴۷).



شکل ۶- مقایسه تاثیر سطوح تنش بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۵ ژنوتیپ نخود در دو دوره ۷ و ۱۴ روز  
Figure 6. compares the effect of stress on ascorbate peroxidase activity 5 chickpea genotypes under two periods 7 and 14 days

مقادیری با حروف غیر مشترک، اختلاف معنی داری با هم دارند (آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد)  
Means by the uncommon letter are significantly different according to Duncan's multiple range tests (5%)

### سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که ژنوتیپ، سطوح تنش، مدت زمان تنش و برهم کنش آن ها تاثیر معنی داری در سطح احتمال یک درصد بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز داشت (جدول ۱). با افزایش شدت تنش میزان سوپراکسید دیسموتاز کاهش یافت به طوری که میزان سوپراکسید دیسموتاز از ۴/۰۲ میلی گرم بر گرم در شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) به ۲/۵۸ میلی گرم بر گرم در ۳۰ درصد تنش خشکی رسید. با افزایش مدت زمان تنش از ۷ به ۱۴ روز میزان سوپراکسید دیسموتاز کاهش نشان داد. نتایج حاصل از مقایسات میانگین برهم کنش ژنوتیپ × تنش × زمان، نشان داد که در همه ژنوتیپ ها میزان فعالیت آنزیم در سطح ۳۰ درصد نسبت به سطح تنش شاهد کاهش یافته است. علت کاهش فعالیت این آنزیم عدم تعادل اجزای مکانسیم های دفاعی است که سبب عملکرد ضعیف آن ها می شود. بدین ترتیب با تجمع فرم های فعال اکسیژن، نقاط کلیدی متابولیسم و مکانسیم های دفاعی سلول مورد حمله قرار گرفته و این عوامل سبب کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شده است (۲۹). هم چنین می توان گفت که در این آزمایش این آنزیم سهم مهمی در مکانسیم های دفاعی در شرایط تنش شدید را نداشته و آنزیم ها و عوامل آنتی اکسیدانی دیگری در این شرایط برای گیاه نقش دفاعی دارند. به همین دلیل اینگونه می توان عنوان نمود که آنزیم های آنتی اکسیدانی مختلفی جهت هموستازی مناسب در غلظت های بالای  $H_2O_2$  با هم دیگر هماهنگ می شوند. به این معنی که در گستره های مختلف تنش خشکی، دسته های متفاوتی از آنزیم ها فعال می شوند (۱۳)، که به احتمال قوی در ژنوتیپ های مورد بررسی ما تحت تنش خشکی شدید سوپراکسید دیسموتاز نقش دفاعی مهمی ایفا نمی کند. آنتی اکسیدان ها در حفظ تعادل اکسیداتیو سلول ها نقش بارزی را ایفا می کنند، زیرا این متابولیت ها توانایی واکنش مستقیم با انواع اکسیژن فعال و جمع آوری آن ها را دارند (۳۱). به طوری که کاهش فعالیت

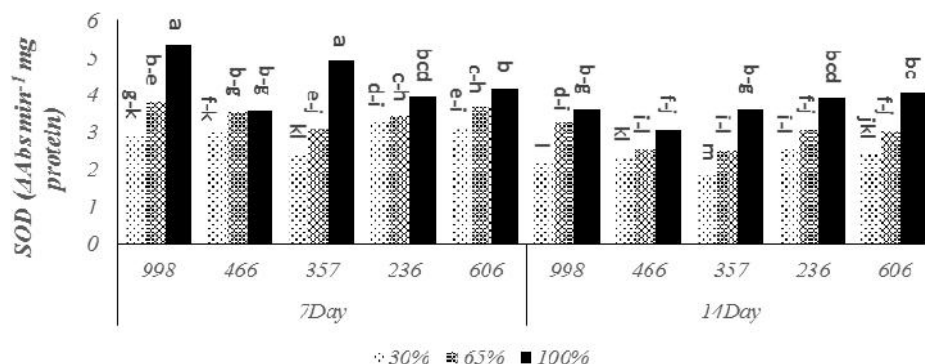
برخی از آنزیم های آنتی اکسیدانی با افزایش فعالیت آنزیم های دیگر جبران می گردد (۱۸). در آزمایشی روی گیاه *Tacitus Bellus* در مراحل اولیه اندام زایی ساقه فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کاهش و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت (۳۷).

با توجه به نتایج حاصل از مقایسات میانگین در تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی بیشترین مقدار سوپراکسید دیسموتاز در ژنوتیپ ۹۹۸ مشاهده گردید که مقدار آن از ۴/۴۹ میلی گرم بر گرم در شاهد به ۳/۵۴ میلی گرم بر گرم تحت تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی کاهش یافت. کمترین میزان در این سطح تنش نیز به ژنوتیپ ۳۵۷ اختصاص داشت که میزان سوپراکسید دیسموتاز آن از ۴/۲۶ میلی گرم بر گرم در سطح شاهد به ۲/۸۰ میلی گرم بر گرم در تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی کاهش یافت. در تنش ۳۰ درصد بیشترین میزان سوپراکسید دیسموتاز متعلق به ژنوتیپ ۶۰۶ که مقدار آن از ۴/۰۹ میلی گرم بر گرم در شاهد به ۲/۷۵ میلی گرم بر گرم تحت تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی کاهش یافت. کمترین میزان نیز مربوط به ژنوتیپ ۳۵۷ بود که میزان آن از ۴/۲۶ میلی گرم بر گرم در سطح شاهد به ۲/۰۸ میلی گرم بر گرم کاهش یافت (شکل ۷).

در حال حاضر مطالعات وسیعی روی سیستم های دفاع ناشی از تنش اکسیداتیو در زمان پیری و شرایط نامساعد محیطی صورت گرفته است، اما نتایج به دست آمده متفاوت می باشد. در حالی که فعالیت تعدادی از آنتی اکسیدان ها در بعضی از گونه ها کاهش می یابد، فعالیت همان آنتی اکسیدان ها در گونه های دیگر افزایش یافته و یا بدون تغییر باقی می ماند. مثلا یانگ و همکاران (۵۶) نشان دادند که با افزایش شدت خشکی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کاهش می یابد، ولی در آزمایشات دیگری گزارش شد که فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز با افزایش شدت تنش خشکی افزایش پیدا می کند (۲۹، ۴۸) به نظر می رسد این اختلافات ناشی از نوع



گونه گیاهی، مرحله رشد و نمو بافت گیاهی و شرایط محیطی می باشد (۱۱).



شکل ۷- مقایسه تاثیر سطوح تنش بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ۵ ژنوتیپ نخود در دو دوره ۷ و ۱۴ روز  
Figure 7. Compares the effect of stress on superoxide dismutase activity 5 chickpea genotypes under two periods 7 and 14 days

مقادیری با حروف غیر مشترک، اختلاف معنی داری با هم دارند (آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد)  
Means by the uncommon letter are significantly different according to Duncan's multiple range tests (5%)

درصد افزایش ولی در سطح ۳۰ درصد ظرفیت زراعی کاهش یافت. که ژنوتیپ ۲۳۶ و ۳۵۷ به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم بودند. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز با افزایش شدت تنش در هر دو دوره کاهش یافت. گونه های فعال اکسیژن دارای پتانسیلی هستند که می توانند با بسیاری از ترکیبات سلولی واکنش داده و سبب خسارت به غشاء و سایر ماکرومولکول های ضروری از قبیل رنگدانه های فتوسنتزی، پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها شوند، بنابراین میزان آن ها باید در سلول کنترل شود (۹). گیاهان برای مقابله با اثرات سوء ناشی از گونه های افعال اکسیژن در طی بروز تنش خشکی، از سیستم های دفاعی پیچیده استفاده می کنند. گزارش ها نشان می دهد که، رقم های مقاوم به تنش های محیطی می توانند از طریق القا کردن سیستم های دفاع آنتی اکسیدانی با تنش های محیطی مقابله کنند. بنابراین، بین سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و تحمل شرایط تنش ارتباط وجود دارد (۱۶). بنابراین ژنوتیپ ۶۰۶ و ژنوتیپ ۹۹۸ با افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز، در برابر تنش مقاوم و دارای عملکرد بالاتر و ژنوتیپ ۳۵۷ ژنوتیپی حساس از لحاظ فعالیت این آنزیم ها به شمار می آید.

تنش خشکی یکی از عوامل اصلی کاهش تولید محصولات زراعی است. این تنش با ایجاد اختلال در تعادل بین تولید گونه های فعال اکسیژن و فعالیت های دفاع آنتی اکسیدانی گیاه، باعث تنش اکسیداتیو می شود. مطالعه ای حاضر با هدف بررسی واکنش ژنوتیپ های نخود به تنش خشکی از نظر شاخص های فیزیولوژیکی و تغییرات بیوشیمیایی ایجاد شده، برای درک بهتر سازوکارهای مقاومت به خشکی و دستیابی به منابع ژنتیکی مطلوب انجام گرفت. با توجه به نتایج، تنش خشکی باعث افزایش شاخص نشت الکترولیت و کاهش محتوای آب نسبی شد. رقم جم و ژنوتیپ ۶۰۶ دارای کمترین میزان نشت الکترولیت و ژنوتیپ ۳۵۷ دارای بیشترین میزان بود. بیشترین و کمترین محتوای آب نسبی نیز مربوط به این ژنوتیپ ها بود. فعالیت آنزیم های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش شدت تنش در هر دو دوره افزایش یافت، ولی با افزایش مدت تنش فعالیت آنزیم کاهش نشان داد. ژنوتیپ ۶۰۶ دارای بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در سطح تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی بود که این سطح تنش جز تنش شدید به حساب می آمد. ژنوتیپ ۳۵۷ نیز دارای کمترین میزان فعالیت از نظر این آنزیم ها بود. میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز با افزایش شدت تنش تا سطح ۶۵

## منابع

1. Abedi, T. and H. Pakniat. 2010. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 46(10): 27-34.
2. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121-126.
3. Ahmed, S., E. Nawata, M. Hosokawa, Y. Domae and T. Sakuratani. 2002. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to water logging. *Plant Science*, 163: 117-123.
4. Allen, R.D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology*, 57: 1049-1054.
5. Asada, K. 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological Sciences*, 355(1402): 1419-1431.

6. Barnabas, B., K. Jager and A. Feher. 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell and Environment*, 31: 11-38.
7. Bayoumi, T.Y., M. Eid and E.M. Metwali. 2008. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 7: 2341-2352.
8. Beltrano, J. and M.G. Ronco. 2008. Improved tolerance of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) to drought stress and rewatering by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum*: Effect on growth and cell membrane stability. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20: 29-37.
9. Blokhina, O., E. Virolainen and K.V. Fagerstedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2): 179-194.
10. Cameron, D. 1999. The effect of different irrigations on water relation and growth in rododendron. *New Phytologist*, 137: 90-95.
11. Casano, L.M., M. Martin and B. Sabater. 1994. Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. *Plant Physiology*, 106: 1033-1039.
12. Change, B. and A.C. Maehly. 1955. Assay of catalases and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2: 764-775.
13. Chaparzadeh, N., M.L. Amico, R.K. Nejad, R. Izzo and F.N. Izzo. 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 695-701.
14. Chaves, M.M., J.P. Maroco and J.S. Pereira. 2003. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3): 239-264.
15. Dedio, W. 1975. Water relations in wheat leaves as screening tests for drought resistance. *Canadian Journal of Plant Science*, 55(2): 369-378.
16. Demiral T. and I. Türkan. 2004. Does exogenous glycine betaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment? *Journal of Plant Physiology*, 161: 1089-1100.
17. Dhindsa, R.S., P.A.M.E.L.A. Plumb-Dhindsa and T.A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32(1): 93-101.
18. Esfandiari, E. 2007. Evaluation of drought tolerance in winter wheat cultivars using physiological and biochemical parameters. PhD thesis in Agronomy (Crop Physiology), Faculty of Agriculture, University of Tabriz (In Persian).
19. FAO. 2010. FAO Statistics. From <http://faostat3.fao.org>.
20. Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita and S.M.A. Basra. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29: 185-212.
21. Franca, M.G.C., A.T.P. Thi, C. Pimentel, R.O.P. Rossiello, Y. Zuily-Fodil and D. Laffray. 2000. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 43: 227-237.
22. Fu, J. and B. Huang. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 45: 05-114.
23. Gambel, P.E. and J.J. Burke. 1994. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. I. Alterations in glutathione reductase activity. *Plant Physiology*, 76: 615-621.
24. Ghaderi, N., A.R. Talaie, A. Ebadi and H. Lessani. 2011. The physiological response of three Iranian grape cultivars to progressive drought stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13: 601-609.
25. Ghanbari, A.A., M.R. Shakiba, M. Toorchi and R. Choukan. 2013. Morpho-physiological responses of common bean leaf to water deficit stress. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1): 487-492.
26. Graça, J.P.D., F.A. Rodrigues, J.R.B. Farias, M.C.N.D. Oliveira, C.B. Hoffmann-Campo and S.M. Zingaretti. 2010. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. *Brazilian Journal of Plant*, 22(3): 189-197.
27. Guerfel, M., O. Baccouri, D. Boujnah, W. Cha and M. Zarrouk. 2008. Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 1: 1-7.
28. Guo, Z., W. Ou, S. Lu and Q. Zhong. 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 828-836.
29. Hassanpour Lescokelaye, K., J. Ahmadi, J. Daneshyan and S. Hatami. 2015. Changes in chlorophyll, protein and antioxidant enzymes on durum wheat under drought stress. *Journal of Crop Breeding*, 7(15): 76-87 (In Persian).
30. Helal, R.M. and M.A. Samir. 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*, 1: 31-36.
31. Israr, M. and S.V. Sahi. 2006. Antioxidative responses to mercury in the cell cultures of *Sesbania drummondii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 590-595.
32. Koca, H., M. Bor, F. Ozdemir and I. Turkan. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 344-351.
33. Martin, I. and M.S. Grotewiel. 2006. Oxidative damage and age related functional declines. *Mechanisms Ageing and Develop*, 127: 411-423.

34. Martínez, J.P., H.F.L.J. Silva, J.F. Ledent and M. Pinto. 2007. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). European Journal of Agronomy, 26(1): 30-38.
35. Mika, A. and S. Luthje. 2003. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. Plant Physiology, 132: 1489-1498.
36. Mirzaee, M., A. Moieni and F. Ghanati. 2013. Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica Napus* L.) cultivar. Journal of Agricultural Science and Technology, 15: 593-602.
37. Mitrovic, A., D. Janosevic, S. Budimir and J. Bogdanovic Pristov. 2012. Changes in antioxidative enzymes activities during Tacitus bellus direct shoot organogenesis. Biologia Plantarum, 56(2): 357-361.
38. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7(9): 405-410.
39. Niknam, V., N. Razavi, H. Ebrahimzadeh and B. Sharifzadeh. 2006. Effect of NaCl on biomass proline and protein contents and antioxidant enzymes in seedling and calli of two Triginella pecies. Biologia Plantarum, 50: 591-596.
40. Nunes, C., S. Ara ujo, J.M. Da Silva, M. Salema Fevereiro and A. Da Silva. 2008. Physiological responses of the legume model Medicago truncatula cv. Jem along to water deficit. Environmental and Experimental Botany, 63: 289-296.
41. Omrani, B. and S. Moharramnejad. 2018. Study of Salinity Tolerance in Four Maize (*Zea Mays* L.) Hybrids at Seedling Stage. Journal of Crop Breeding, 9(24): 86 (In Persian).
42. Polle, A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling: Computer simulation as a step towards flux analysis. Plant Physiology, 126: 445-46.
43. Ranieri, A., A. Castagna, J. Pacini, B. Baldan, A.M. Sodi and G.F. Soldatini. 2003. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. Journal of Experimental Botany, 54(392): 2529-2540.
44. Rostami, A.A. and M. Rahemi. 2013. Screening drought tolerance in Caprifig varieties in accordance to Responses of antioxidant enzymes. World Applied Sciences Journal, 21(8): 1213-1219.
45. Sadeghipour, O. and P. Aghaei. 2012. Response of common bean to exogenous application of salicylic acid under water stress conditions. Environmental Biology, 6: 1160-1168.
46. Saglam, A., N. Saruhan, R. Terzi and A. Kadioglu. 2011. The relations between antioxidant enzymes and chlorophyll fluorescence parameters in common bean cultivars differing in sensitivity to drought stress. Russian Journal of Plant Physiology, 58(1): 60-68.
47. Sairam, R.K., K.V. Rao and G.C. Srivastava. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science, 163: 1037-1046.
48. Sharma, P. and R.S. Dubey. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Regulation, 46(3): 209-221.
49. Shehab, G.G., O.K. Ahmed and H.S. El-Beltagi. 2010. Effects of various chemical agents for alleviation of drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, 38: 139-148.
50. Siddique, M.R.B., A. Hamid and M.S. Islam. 2000. Drought stress effects on water relations of wheat. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 41 pp.
51. Siddiqui, M.H., M.Y. Al-Khaishany, M.A. Al-Qutami, M.H. Al-Whaibi, A. Grover, H.M. Ali, M.S. Al-Wahibi and N.A. Bukhari. 2015. Response of different genotypes of Faba Bean plant to drought stress. International Journal of Molecular Sciences, 16: 10214-10227.
52. Silva, M.A., J.L. Jifon, J.A.G. Da Silva and V. Sharma. 2007. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. Brazilian Journal of Plant Physiology, 19: 193-201.
53. Simova-Stoilova, L., K. Demirevska, T. Petrova, N. Tsenov and U. Feller. 2008. Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. Plant Soil Environment, 54: 529-536.
54. Stuart, N.W. 1993. Comparative cold hardiness of scion roots from fifty apple varieties. Proceedings American Society for Horticultural Science, 1939(37): 330-4.
55. Terzi, R., A. Saglam, N. Kutlu, H. Nar and A. Kadioglu. 2010. Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of Phaseolus vulgaris cultivars. Turkish Journal of Botany, 34: 1-10.
56. Yong, T., L. Zongsuo, S. Hongbo and D. Feng. 2006. Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of Radix astragali at seedling stage. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 49: 60-65.
57. Zali, H., T. Hasanloo, O. Sofalian, A. Asghari and M. Zeinalabedini. 2016. Drought Stress Effect on Physiological Parameter and Amino Acids Accumulations in Canola. Journal of Crop Breeding, 8(18): 191 (In Persian).
58. Zlatev, Z.S., F.C. Lidon, J.C. Ramalho and I.T. Yordanov. 2006. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. Biologia Plantarum, 50(3): 389-394.

## Effect of Drought Stress on Antioxidant Enzymes Activities and Some Physiological Traits in Chickpea (*Cicer Arietinum* L.)

Maryam Rezaeinia<sup>1</sup>, Mohammareza Bihamta<sup>2</sup>, Seyed Ali Peighambari<sup>3</sup> and Alireza Abbasi<sup>3</sup>

1- Ph.D. Student, College of Agronomy, University of Tehran

2- Professor, College of Agronomy, University of Tehran, (Corresponding author: mrghanad@ut.ac.ir)

3- Professor, College of Agronomy, University of Tehran

Received: December 10, 2017      Accepted: September 24, 2018

### Abstract

The aims of this study to assess the response of chickpea genotypes to drought stress in terms of physiological parameters and subsequent biochemical changes for more understand of drought resistance mechanisms in plants and accession to better genetic resources. Investigation were of 5 chickpea genotypes under 100, 65 and 30 percent of field capacity at two sampling time i.e. 7 and 14 days after stress induction (in 4 to 6 leaves stage). The experiment design factorial split-plot in time experiment in a completely randomized design with three replications at greenhouse of college of agriculture and natural resource of University of Tehran in 2013. Results showed that there were significant differences among genotypes, stress levels, duration of stress and interaction among them. Drought stress reduced the relative water content (RWC) and electrolyte leakage (EL) significantly. The electrolyte leakage rate under drought stress conditions in drought-tolerant genotypes is usually less than sensitive genotypes; genotypes of 998 and 606 are resistant to this and genotype of 357 are sensitive. Increase of the duration of stress, reduced the activity of the antioxidant enzymes. According to the results, the catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) enzymes activity in both periods increased in higher drought stress. Activity of superoxide dismutase (SOD) decreased with increasing tension stress. In elevated density of stress, guaiacol peroxidase (GPX) enzyme activity increased to 65% crop capacity in both periods. However, compared to 65%, the enzyme activity decreased at 30% stress level. In regard, the responses of all genotypes were not the same and some genotypes had an elevating trend. Genotypes 606 and 998 showed more activity level in enzymes of catalase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase under stress condition and but genotype 357 had a less value. The activity guaiacol peroxidase in genotypes of 236 and 357 had the highest and lowest activity, respectively. Under drought stress conditions, the activity of antioxidant enzymes was more in tolerant plants than others. Given that the activity of catalase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase enzymes were highest in genotypes 606 and 998, so they were introduced as drought tolerant genotypes in this experiment. The genotype 357, with the lowest enzyme activity, was introduced as a susceptible genotype. Of course, the reaction of plants to drought stress varies considerably depending on the severity and duration of the stress, and also plant type and growth stage.

**Keywords:** Ascorbate Peroxidase, Catalase, Chickpea, Electrolyte Leakage Index, Superoxide Dismutase