

## مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی گیاه ختمی تحت تنش خشکی طی دو مرحله فنولوژیک

تکتم اورعی، محمود شور\*، علی‌تهرانی‌فر و سید حسین نعمتی  
گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۱۲/۲۳)

### چکیده

به منظور بررسی اثر تنش خشکی در دو مرحله رشد بر پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه ختمی در گلخانه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل آزمایش شامل دو اکوتیپ ختمی (مشهد و تهران)، پنج سطح رطوبت خاک (شاهد (۸۰)، ۷۰، ۶۰، ۵۰ و ۴۰٪ ظرفیت زراعی) در دو مرحله رشد (گیاهچه‌ای و ساقه‌دهی) بود. پس از اعمال تنش خشکی در دو مرحله رشد، مقدار شاخص کلروفیل، نشت الکترولیت، محتوای نسبی آب، پرولین، مالون دی‌آلدهید، پروتئین، فعالیت آنزیم‌های برگ و وزن خشک کل اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان محتوای نسبی آب برگ (۸۸/۲ درصد)، وزن خشک (۳۶ گرم) و کمترین میزان نشت الکترولیت (۶/۲۳ درصد) در اکوتیپ مشهد تحت تیمار ۸۰٪ ظرفیت زراعی در زمان ساقه‌دهی به ثبت رسید. در هر دو اکوتیپ با افزایش تنش خشکی در هر دو مرحله رشد، مقدار پرولین روندی صعودی داشت، به طوری که بیشترین میزان آن در اکوتیپ مشهد تحت تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی در زمان ساقه‌دهی به ثبت رسید. در هر دو اکوتیپ بیشترین میزان مالون دی‌آلدهید در تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی و مرحله گیاهچه‌ای (به ترتیب، ۱۱/۹ و ۱۱/۴ نانومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در اکوتیپ مشهد و تهران با افزایش تنش خشکی از ۸۰ به ۴۰٪ ظرفیت زراعی در مرحله ساقه‌دهی، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب، از ۰/۴۹ به ۱/۹۸ و ۱/۹۱ واحد بر میلی‌گرم پروتئین افزایش یافت. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهانی که در معرض تنش خشکی شدید بودند، افزایش یافت. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین شاخص کلروفیل و محتوای نسبی آب برگ با وزن خشک کل گیاه به ثبت رسید. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که در مقایسه دو اکوتیپ، اکوتیپ مشهد نسبت به تهران از تحمل بیشتری در برابر کمبود آب برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: اکوتیپ، گیاه زینتی، متحمل به خشکی، مرحله ساقه‌دهی

### مقدمه

به صورت دو ساله کشت می‌شود. گل‌ها به صورت خوشه‌ای در انتهای ساقه نمایان می‌گردند و برای ایجاد گل درشت به خاک حاصلخیز نیاز دارد اما خاک‌های ضعیف را نیز تحمل می‌کند. به صورت باغچه‌ای یا درون خانه‌ای در گلدان کشت می‌شود. با کاشت بذر تکثیر می‌شود و گلدهی آن از اردیبهشت تا پاییز

گل ختمی زینتی با نام علمی *Alcea rosea* L. گیاهی چندساله می‌باشد. این گیاه بومی نواحی آسیای شرقی شامل ۷۰ گونه است که ۳۶ گونه آن در ایران می‌روید (Pakravan and Ghahreman, 2003). ختمی گیاهی زینتی و دائمی است که

(Demidchik et al., 2014). تنظیمات اسمزی یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های فیزیولوژیکی سلولی در تطابق با تنش خشکی است که تجمع محلول‌های ارگانیک و غیر ارگانیک منجر به جذب آب و حفظ پتانسیل تورگر سلولی می‌شود. این محلول‌ها مانند پرولین که تأثیر منفی بر غشاء و آنزیم‌ها ندارند به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی سبب افزایش توانایی ریشه‌ها برای جذب آب، کمک به حفظ تورژسانس سلول‌ها، بهبود هدایت روزنه‌ای، جلوگیری از تخریب غشاء و حذف رادیکال‌های آزاد می‌شوند (Turner, 2018). از جمله پارامترهایی که می‌توان در ارزیابی تحمل به تنش خشکی استفاده نمود، محتوای نسبی آب برگ است. در خشکی محتوای نسبی آب گیاه تحت تأثیر قرار می‌گیرد، به طوری که در دو گیاه علف بره (*Festuca arundinacea* L.) و چچم پایدار (*Lolium perenne* L.) اعمال تنش خشکی (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی) سبب تغییر میزان این شاخص گردید و کمترین میزان آن در تنش خشکی ۲۵٪ ظرفیت زراعی در گیاه فستوکا به میزان ۶۱/۳ درصد حاصل گردید (Shahrokhi et al., 2011).

تنش‌های زیستی و غیرزیستی منجر به شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) می‌شود که تولید گونه‌های اکسیژن فعال سبب آسیب به گیاهان می‌شود (Czarnocka and Karpineski, 2018). گونه‌های فعال اکسیژن از طریق سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان آنزیمی یا غیرآنزیمی مهار می‌شود. از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1) و آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.7) اشاره نمود (Alscher et al., 2002; Agarwal and Pandey, 2004). سوپراکسید دیسموتاز از برجسته‌ترین مکانیزم‌های حفاظتی جهت حذف گونه‌های فعال اکسیژن هستند که رادیکال‌های آزاد سوپراکسید را به پراکسید و در نهایت پراکسید هیدروژن را به اکسیژن، هیدروژن و آب تبدیل می‌نمایند (Hasanuzzaman et al., 2011).

آسکوربات پراکسیداز با استفاده از اسید آسکوربیک، پراکسید هیدروژن را به آب و مونودی هیدرو آسکوربات تبدیل

ادامه دارد (قاسمی قهساره و کافی، ۱۳۹۱). این گیاه به دلیل حضور رنگدانه‌ها و به‌منظور تولید مواد رنگی بسیار مورد توجه است. از گل‌های این گیاه به‌منظور تولید چای دارویی استفاده می‌شود. از طرفی خاصیت‌های ضدباکتریایی (Ahmed et al., 2016)، آنتی‌اکسیدانی (Hussain et al., 2014)، ضدافسردگی، دهانشویه، توقف خستگی، بهبود جریان خون (Burt and Reinders, 2003) این گیاه به اثبات رسیده است. این گیاه برای درمان سرفه در سرماخوردگی، خلط‌آور و نرم‌کننده مجاری تنفس، برای سوختگی خفیف و نیش حشرات نیز توصیه شده است (Seyyednejad et al., 2010).

با توجه به افزایش دمای کره زمین به میزان ۱/۵ درجه سانتی‌گراد (IPCC, 2018) و کاهش میانگین بارندگی در ایران به میزان ۰/۶۴ میلی‌متر (محمدی، ۱۳۹۰)، انتخاب گیاهانی با تحمل بالا به تنش خشکی به‌منظور افزایش درصد بقاء و پایداری فضای سبز از اهمیت فراوانی برخوردار است.

با بررسی توزیع و پراکنش زمانی بارندگی در ایران مشاهده شده است که این بارش‌ها از توزیع مناسبی برخوردار نیستند که این امر سبب تشدید کمبود آب در فضای سبز شده است. در چنین شرایطی علاوه بر مهارت و دقت کاربرد و مصرف این منابع آبی، بررسی و توصیه گیاهان متحمل و تعیین مرحله حساس به شرایط محیطی اهمیت و ضرورت بیشتری یافته است. تولید گیاهان فضای سبز در مناطق تجاری و مسکونی یکی از مهم‌ترین بخش‌های صنعت گلکاری و دارای پتانسیل سودآوری بالایی می‌باشد (Rahnema et al., 2019). با وجودی که قابلیت تولید در تمام سال بسیار ارزشمند است، اما پتانسیل تولید گیاهان با کیفیت تحت تأثیر گونه، رقم، اکوتیپ و شرایط محیطی قرار گرفته و در شرایط نامطلوب امکان ایجاد تأثیرات زیانباری وجود دارد (Mader, 2009).

در گیاهان سازوکارهای مقابله یا تطابق با تنش خشکی شامل پاسخ‌های فیزیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی است. غشاهای سلولی اولین مکان اصلی در سلول هستند که تحت آسیب‌های تنش قرار می‌گیرند و به دلیل تجمع گونه‌های فعال اکسیژن، افزایش درصد نشت الکتروولت‌ها منجر به مرگ سلول می‌شود

## مواد و روش‌ها

این آزمایش در مرداد ۱۳۹۴ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. تیمارها شامل دو اکوتیپ ختمی (اکوتیپ یک = مشهد و اکوتیپ دو = تهران)، پنج سطح رطوبت (شاهد (۸۰)، ۷۰، ۶۰، ۵۰، ۴۰٪ ظرفیت زراعی) در دو مرحله رشدی (گیاهچه‌ای و طول‌شدن ساقه) بود. بذور ختمی (*Alcea rosea*) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران؛ تهیه و در مردادماه در سینی‌های کشت حاوی کوکوپیت، پرلایت و پیت‌ماس با نسبت مساوی در گلخانه کشت شدند. گیاهان پنج برگی در آبان‌ماه به گلدان‌هایی (ارتفاع ۱۸ و قطر ۸ سانتی‌متر) در شرایط گلخانه منتقل شدند. سپس در اسفندماه به گلدان‌های اصلی سایز ۲۰، حاوی خاک مزرعه، ماسه و کود حیوانی پوسیده (۲:۱:۱ حجمی) در گلخانه انتقال یافتند و در فرودین‌ماه (۲۷۰ روز پس از کاشت) در مرحله گیاهچه‌ای (گیاه حالت روزت دارد) و اردیبهشت‌ماه (۳۰۰ روز پس از کاشت) در مرحله به ساقه‌رفتن (طول‌شدن ساقه که قبل از مرحله گلدهی می‌باشد) به مدت سه هفته تحت تنش خشکی قرار گرفتند.

به منظور ایجاد تنش خشکی پیش از اجرای آزمایش از خاک مورد استفاده در گلدان‌ها نمونه‌برداری و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

به منظور کنترل دقیق میزان رطوبت خاک از دستگاه TDR (Time Domain Reflectometry) استفاده شد و براساس روابط (۱، ۲ و ۳) میزان آب مورد نیاز محاسبه شد (شکل ۱). مقدار FC خاک در ظرفیت زراعی ۲۸٪ محاسبه شد (علیزاده، ۱۳۸۹):

$$V_w = FC - \theta_{TDR}/10 \quad (1)$$

$$P = W_s/V_s \quad (2)$$

$$V_w = W_w/W_s \times 100 \quad (3)$$

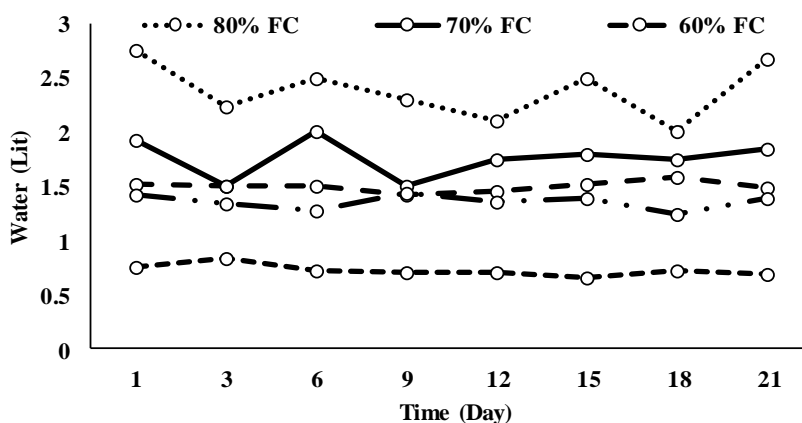
در این رابطه FC درصد وزنی ظرفیت زراعی،  $\theta_{TDR}$  درصد وزنی رطوبت خاک، P وزن مخصوص ظاهری (گرم بر سانتی‌متر مکعب)،  $W_s$  وزن خاک خشک (گرم)،  $V_s$  حجم

می‌کند و میل ترکیبی زیادی با پراکسید هیدرژن دارد (Caverzan *et al.*, 2012). تغییرات در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش‌های محیطی مختلف گزارش شده است (Faize *et al.*, 2011; Tyagia *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018a). همچنین تخریب پروتئین‌ها و انباشت برخی آمینواسیدهای آزاد در جهت حفظ و تنظیم فشار اسمزی سلول و کاهش سنتز پروتئین در شرایط تنش مشاهده شده است (Michaletti *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). یکی از واکنش‌هایی که در حضور انواع اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که باعث تولید آلدئیدهایی مثل مالون دی‌آلدئید (MDA) و ترکیباتی مثل اتیلن می‌شوند (Guo *et al.*, 2018b). اثر رادیکال‌های اکسیژن بر لیپیدها و پراکسیداسیون آن‌ها ناشی از اثر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع است که واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون را تحریک کرده و منجر به تخریب اسیدهای چرب می‌شوند. رادیکال‌های هیدروکسیل و یا اکسیژن یکتایی می‌توانند با گروه‌های متیلن اسیدهای چرب غیراشباع واکنش داده و تولید رادیکال‌های لیپید پراکسی و هیدروپراکسی کنند (El Beltagi and Mohamed, 2013).

با توجه به افزایش جمعیت روز افزون کره زمین، پایداری در فضای سبز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تشدید تنش‌های محیطی زمینه‌ساز از بین رفتن گیاهان زینتی است، لذا معرفی گیاهان مقاوم در برابر تنش‌های زیستی، جهت استقرار مناسب در فضای سبز امری ضروری است. تاکنون مطالعه‌ای بر جنبه‌های فیزیولوژیکی ختمی در طی مرحله مختلف رشد و همچنین پتانسیل تغییرات سطح آنزیمی گیاه تحت تنش خشکی صورت پذیرفته است، همچنین گزارشی در مورد مقاومت اکوتیپ‌های مختلف ختمی در برابر تنش خشکی نیز ارائه نشده است. این مطالعه با اهداف مقایسه پتانسیل مقاومتی دو اکوتیپ ختمی به تنش خشکی در مراحل مختلف رشد و بررسی توانایی شاخص‌های فیزیولوژیکی و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی فعال در تنش خشکی، در تفکیک اکوتیپ حساس و مقاوم ختمی طراحی و اجرا گردید.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد استفاده

EC ds/m	pH	K (mg/kg)	p (mg/kg)	ماده آلی	N	رس (%)	سیلت	شن
۱/۹۳	۷/۱۵	۲۳۵	۲۳	۲	۰/۱۱	۴/۲۳	۱۹/۵۲	۷۶/۲۵



شکل ۱- میزان آب مورد نیاز برای تیمارهای آبیاری

رابطه (۴) محاسبه شد (Reddy et al., 2004).

$$EL (\%) = (E_1 - E_2) \times 100 \quad (4)$$

در این معادله  $EL\%$ ،  $EC_1$  و  $EC_2$  به ترتیب نشان دهنده درصد نشت الکترولیت‌ها، نشت الکترولیت اولیه و نشت الکترولیت نهایی هستند.

**سنجش محتوای نسبی آب:** با استفاده از روش Turner (۲۰۱۸) اندازه‌گیری شد. دیسک‌هایی با قطر ۷ میلی‌متر از برگ‌ها با استفاده از ترازو توزین گردیدند (FW). سپس دیسک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در داخل آب مقطر غوطه‌ور گردیده و پس از آن وزن آماس آن‌ها اندازه‌گیری شد (TW). سپس نمونه‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در داخل آون حرارت داده و وزن خشک (DW) آن‌ها تعیین گردید. در نهایت محتوای نسبی آب برگ با استفاده از رابطه (۵) محاسبه شد:

$$RWC (\%) = ((FW - DW) / (TW - DW)) \times 100 \quad (5)$$

که در آن  $FW$  وزن تر برگ،  $DW$  وزن خشک برگ،  $TW$  وزن آماس برگ می‌باشد.

**سنجش پرولین:** میزان پرولین به روش Bates و همکاران

خاک (سانتی‌متر مکعب)،  $V_w$  درصد رطوبت وزنی،  $W_w$  وزن آب است.

تنش خشکی در مراحل گیاهچه‌ای (مرحله‌ای که گیاهان فقط دارای برگ می‌باشند) و طول‌شدن ساقه (مرحله‌ای قبل از گل‌دهی که پس از آن گیاه وارد فاز زایشی می‌گردد) به مدت سه هفته اعمال گردید و صفات ذیل مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. شاخص کلروفیل توسط دستگاه کلروفیل‌متر (کمپانی Osaka ژاپن، مدل 502 Minolta) و وزن خشک کل گیاه در پایان هر مرحله رشد، پس از قراردادن نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۵ درجه سلسیوس گزارش گردید.

**سنجش نشت الکترولیت:** دیسک‌هایی به قطر ۸ میلی‌متر تهیه و در ویال‌های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر روی شیکر قرار گرفته و بعد از شش ساعت نشت الکترولیت‌ها با استفاده از دستگاه EC متر (کمپانی Jenway انگلستان، مدل ۴۷۰) اندازه‌گیری شد ( $EC_1$ ). ویال‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو، با فشار ۱/۵ مگاپاسکال و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، قرار داده شدند و پس از آن نشت الکترولیت‌ها ( $EC_2$ ) اندازه‌گیری شد. درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از

و ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول با یک میلی‌لیتر محلول بردفورد مخلوط و ورتکس شدند. بعد از پنج دقیقه میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین کل نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

**استخراج آنزیم:** به نیم گرم برگ تازه آسیاب‌شده، ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۵۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل پلی‌پیرولیدون اضافه گردید و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس از محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد.

**سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:** برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش Asada و Nakano (۱۹۸۱) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۷۷۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر آسکوربات اسید پنج میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۰/۱ میلی‌مولار بود. میزان جذب مخلوط واکنش در طول موج ۲۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. یک واحد آنزیمی معادل تجزیه یک میکرومول آسکوربات در مدت زمان یک دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بئر لامبرت و با ضریب خاموشی آسکوربات پراکسیداز  $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه شد. فعالیت آنزیم براساس واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

**سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** فعالیت سوپراکسید دیسموتاز براساس روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) سنجیده شد. مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و نیتروبلو تترازولیوم ۷۵ میلی‌مولار، ۱۵ میکرولیتر ریپوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار بود. از هر نمونه عصاره، ۱۰۰ میکرولیتر در هر لوله آزمایش ریخته و ۳ میلی‌لیتر از محلول فوق به آنها اضافه گردید. سپس نمونه‌ها برای انجام واکنش به مدت ۳۰ دقیقه زیر نور فلورسنت با شدت ۳۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه قرار داده

(۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. به نیم گرم از بافت تر برگ، ۵ میلی‌لیتر اتانول اضافه گردید. در نهایت ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره به دست آمده، به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. یک میلی‌لیتر از عصاره الکلی انتخاب و ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر به آن اضافه شد. سپس پنج میلی‌لیتر نین‌هیدرین به نمونه‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد پنج میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به هر نمونه اضافه شد و نمونه داخل حمام آب جوش به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد و سپس در دمای محیط خنک شد. به هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان پرولین آزاد نمونه‌ها براساس میکرومول بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد.

**سنجش پراکسیداسیون لیپید:** ۰/۲ گرم بافت تر برگ در ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (TCA) همگن شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی ۴ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید بود اضافه شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت، سپس مخلوط حاصل بلافاصله در حمام یخ سرد شد. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس MDA-TBA بود. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از مقدار مورد نظر کسر شد. غلظت مالون دی‌آلدید (MDA) با استفاده از ضریب تصحیح  $0/155 \mu \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه و براساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد (Health and Packer, 1968).

**استخراج و سنجش پروتئین:** برای استخراج پروتئین کل از روش Wessel و Flugge (۱۹۸۴) استفاده شد. برای سنجش پروتئین کل از روش Bradford (۱۹۷۶) با اندکی تغییر استفاده شد. برای این منظور پروتئین‌های استاندارد با استفاده از آلبومین‌های سرم گاوی با غلظت‌های صفر، ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. جهت سنجش غلظت پروتئین ده میکرولیتر از محلول پروتئین استخراج شده را با ۴۹۵ میکرولیتر آب در فالكون‌های ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط

شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم، نیاز به شاهد روشنائی بود که حاوی ۳ میلی‌لیتر از محلول واکنش بود که در روشنائی قرار گرفت. به این ترتیب میزان فعالیت آنزیم در نمونه‌ها با شاهد روشنائی سنجیده شد. به دلیل عدم وجود آنزیم در شاهد روشنائی، احیای نیتروبلو تترازولیوم در حضور نور به طور ۱۰۰ درصد انجام شد. میزان جذب این شاهد در ۵۶۰ نانومتر نشان دهنده ۱۰۰ درصد احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم است و نیمی از آن معادل یک واحد آنزیمی می‌باشد. اختلاف جذب نمونه‌ها و شاهد روشنائی در ۵۶۰ نانومتر، نشان‌دهنده مهار احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم در حضور آنزیم موجود در نمونه است. با استفاده از این اختلاف جذب واحد آنزیمی محاسبه شده و فعالیت آنزیم براساس واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS JMP 13.2، Excel انجام شد و میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

براساس نتایج تجزیه واریانس، شاخص کلروفیل (SPAD) گیاهان به‌طور معنی‌داری تحت اثرات اکوتیپ، تنش خشکی و مرحله رشد قرار گرفت (جدول ۲). در هر دو اکوتیپ، کاهش آبیاری در دو مرحله اندازه‌گیری، منجر به کاهش شاخص کلروفیل شد. در اکوتیپ مشهد، با افزایش تنش از ۸۰ به ۴۰٪ ظرفیت زراعی، در مرحله گیاهچه‌ای و ساقه‌دهی به‌ترتیب، این شاخص ۲۵ و ۱۷ درصد کاهش یافت، اما در اکوتیپ تهران این کاهش به‌ترتیب ۲۷ و ۱۷ درصد بود. بیشینه میزان این شاخص در اکوتیپ مشهد تحت تیمار شاهد (۵۵/۲) در مرحله ساقه‌دهی و کمینه آن در اکوتیپ تهران تحت تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی در مرحله گیاهچه‌ای (۳۴/۷) به ثبت رسید (شکل ۲). کاهش محتوای کلروفیل در گیاهان تحت تنش خشکی در آزمایشات مختلفی گزارش شده است (Silva et al., 2010; Larkunthod et al., 2018).

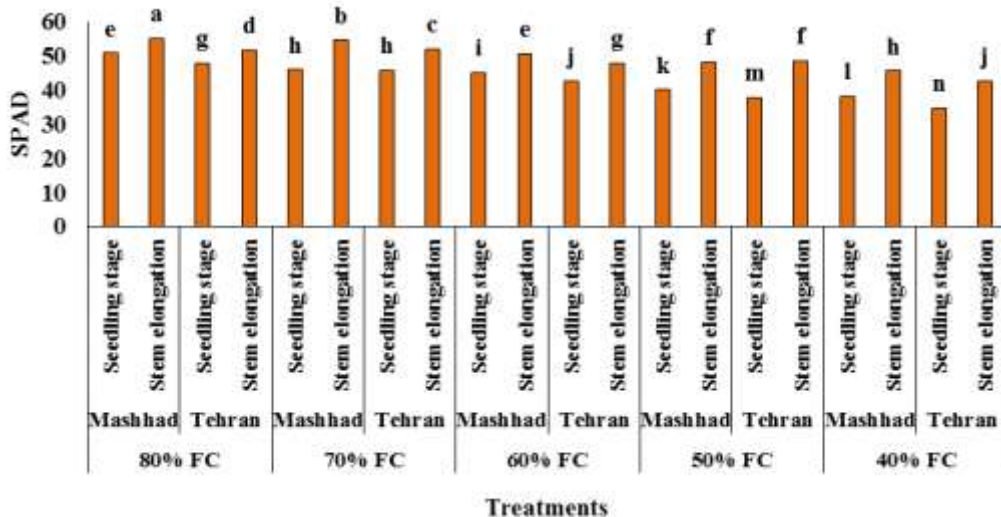
گیاهان تحت تنش خشکی مربوط به فتواکسیداسیون کلروفیل توسط گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز، انتقال مجدد نیتروژن از برگ‌ها و همچنین در اثر تغییر فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم نیتروژن می‌باشد (Kamanga et al., 2018). همچنین همبستگی منفی و معنی‌دار (جدول ۳) بین میزان کلروفیل با پرولین مطابق با نتایج ربیعی (۱۳۸۲) بود، این محقق افزایش میزان پرولین را در تنش خشکی به کاهش کلروفیل نسبت داد، زیرا پیش‌ماده سنتز هر دو گلوتامات می‌باشد و در آزمایش حاضر، با افزایش سنتز پرولین در تنش خشکی ۴۰٪ ظرفیت زراعی از مقدار شاخص سبزیگی کلروفیل کاسته شد. با افزایش تنش خشکی میزان شاخص کلروفیل نسبت به شرایط عدم تنش، کاهش یافت؛ اما در شرایط تنش اکوتیپ مشهد نسبت به تهران به‌عنوان یک اکوتیپ مقاوم از نظر شاخص کلروفیل شناخته شد زیرا سیر نزولی کاهش کلروفیل در این اکوتیپ کمتر بود. از طرفی همبستگی منفی بین فعالیت دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز با میزان کلروفیل نشان‌دهنده این مطلب است که در صورت کاهش کلروفیل، گیاه با افزایش فعالیت سیستم آنزیمی به‌منظور کاهش تولید و فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن، از خسارت بیشتر گیاهان تحت تنش خشکی می‌کاهد.

میزان نشت الکترولیت‌ها به‌طور معنی‌داری تحت اثرات اکوتیپ، تنش خشکی و مرحله رشد قرار گرفت (جدول ۲)، به‌طوری‌که نشت الکترولیت در اکوتیپ مشهد، با کاهش آبیاری از ۸۰ به ۴۰٪ ظرفیت زراعی در مرحله گیاهچه‌ای، ۱/۷ برابر و در اکوتیپ تهران ۲/۴ برابر شد و این شاخص در مرحله ساقه‌دهی در هر دو اکوتیپ دو برابر شد. بیشترین نشت الکترولیت در اکوتیپ تهران تحت تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی، در مرحله گیاهچه‌ای (۱۹/۸ درصد) و کمترین میزان این شاخص در اکوتیپ مشهد تحت تیمار ۸۰٪ ظرفیت زراعی در مرحله طویل‌شدن ساقه (۶/۲ درصد) به ثبت رسید (شکل ۳). بررسی میزان خسارت به غشاء سلولی یک شاخص تحمل به تنش خشکی است. دلیل اصلی خسارت به غشاء سلولی

جدول ۲- میانگین مربعات جدول تجزیه واریانس تیمارهای آزمایشی بر گیاه ختمی

درجه آزادی	کاهش کلروفیل	نشت الکترولیت	محتوای نسبی آب	پرولین	مالون دی آلدئید	پروتئین	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربات	وزن خشک
۱ (A)	۸۱/۱**	۱۰۹**	۸۶/۳**	۰/۰۲۷**	۳/۳۹**	۱/۶۶**	۰/۰۰۵**	۱۳۴**	۱۱۲**
۴ (B)	۲۳۸**	۱۶۶**	۲۳۵۲**	۰/۰۳۱**	۹۲/۹**	۲/۹۶**	۳/۴۵**	۳۵۹۴۹**	۵۱**
۱ (C)	۷۰۹**	۵۷/۹**	۵۳۸**	۰/۱۳۸**	۱/۲۵**	۱۰/۴**	۰/۲۵۲**	۴۹۵۷**	۳۵۷۳**
۴ (B) × (A)	۲۴/۳**	۵/۴۱۸**	۰/۲۵**	۰/۰۰۲**	۰/۰۱۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۱*	۱۸/۸**	۰/۷۲ <sup>ns</sup>
۱ (C) × (A)	۰/۰۰۰۱ <sup>ns</sup>	۲/۱۴**	۰/۲۰*	۰/۰۲۲**	۰/۳۱۴**	۰/۰۲۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۳**	۱/۲ <sup>ns</sup>	۳۳/۰۵**
۴ (B) × (C)	۱۳/۸**	۰/۳۳۸*	۱۰۴**	۰/۰۰۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۹۱**	۰/۲۴۸**	۰/۰۲۴**	۴۳۶**	۱/۰۲*
۴ (C) × (B) × (A)	۲/۳۶**	۱/۳۴**	۰/۲۳**	۰/۰۰۲**	۰/۰۹۴**	۰/۰۲۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۱*	۷/۳ <sup>ns</sup>	۱/۳۲**
خطا	۰/۰۴	۰/۱۰۷	۰/۰۴	۰/۰۰۰۳	۰/۰۱۶	۰/۰۱	۰/۰۰۰۱	۴/۶۰	۰/۳۰

\*، \*\* و <sup>ns</sup>: به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۲- اثرات تنش خشکی بر شاخص SPAD اکوتیپ‌های ختمی در دو مرحله رشد. میانگین‌های (n=۳) دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

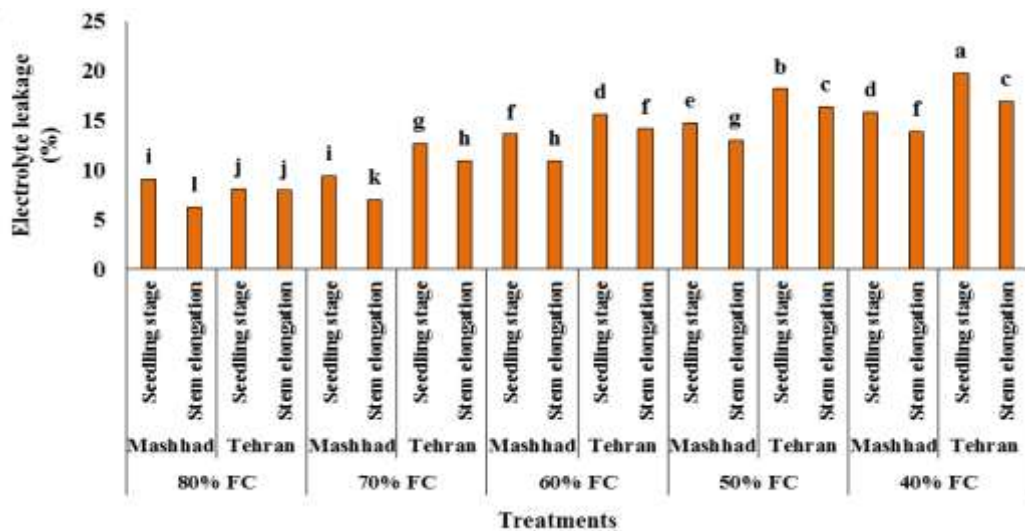
آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شده است و افزایش فعالیت سیستم‌های دفاعی از مهم‌ترین سازگاری‌های گیاهان تحت تنش است. از طرفی همبستگی منفی بین میزان نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب مشابه با نتایج Masoumi و همکاران (۲۰۱۰) بود (جدول ۳)، آن‌ها نشان دادند که با افزایش نشت الکترولیت در شرایط تنش از محتوای نسبی آب گیاه جارو (*Kochia scoparia*) کاشته شد و ژنوتیپ مقاوم‌تر محتوای نسبی آب بالاتری داشت. از طرفی در اکوتیپ مشهد که میزان نشت الکترولیت نسبت به اکوتیپ تهران تحت خشکی شدید (۴۰٪

گیاهان، افزایش سطح رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، هیدروکسیل و اکسیژن یگانه می‌باشد. هنگامی که سطح این رادیکال‌ها افزایش می‌یابد پراکسیداسیون چربی‌ها تشدید می‌شود (Gill and Tuteja, 2010). نتایج همبستگی مثبت و معنی‌دار بین میزان نشت الکترولیت با مالون دی‌آلدئید و فعالیت دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز نشان داد که در آزمایش حاضر، تنش خشکی با پراکسیداسیون چربی‌ها سیالیت غشاء را کاهش و نشت یونی را افزایش داده است که خود سبب فعال‌شدن سیستم

جدول ۳- ضرایب همبستگی بین صفات مختلف گیاه ختمی تحت تأثیر تنش خشکی

	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
۱- شاخص کلروفیل									۱
۲- نشت الکترولیت								۱	-۰/۸۵**
۳- محتوای نسبی آب							۱	-۰/۸۱**	۰/۸۵**
۴- پرولین						۱	-۰/۶۹**	۰/۴۹**	-۰/۲۸*
۵- مالون دی آلدئید					۱	۰/۷۶**	-۰/۹۳**	۰/۷۵**	-۰/۷۲**
۶- پروتئین				۱	۰/۵۷**	۰/۹۰**	-۰/۴۳**	۰/۳۲*	-۰/۰۳ <sup>ns</sup>
۷- سوپراکسید دیسموتاز			۱	۰/۹۱**	۰/۷۴**	۰/۸۹**	-۰/۸۹**	۰/۷۴**	-۰/۶۰**
۸- آسکوربات پراکسیداز		۱	۰/۹۴**	-۰/۷۸**	۰/۷۷**	۰/۸۷**	-۰/۷۹**	۰/۷۸**	-۰/۵۶**
۹- وزن خشک	۱	-۰/۲۸**	-۰/۳۲**	-۰/۴۲**	۰/۵۰**	۰/۰۸ <sup>ns</sup>	۰/۵۸**	-۰/۶۴**	۰/۸۳**

\*، \*\* و <sup>ns</sup>: به ترتیب نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.



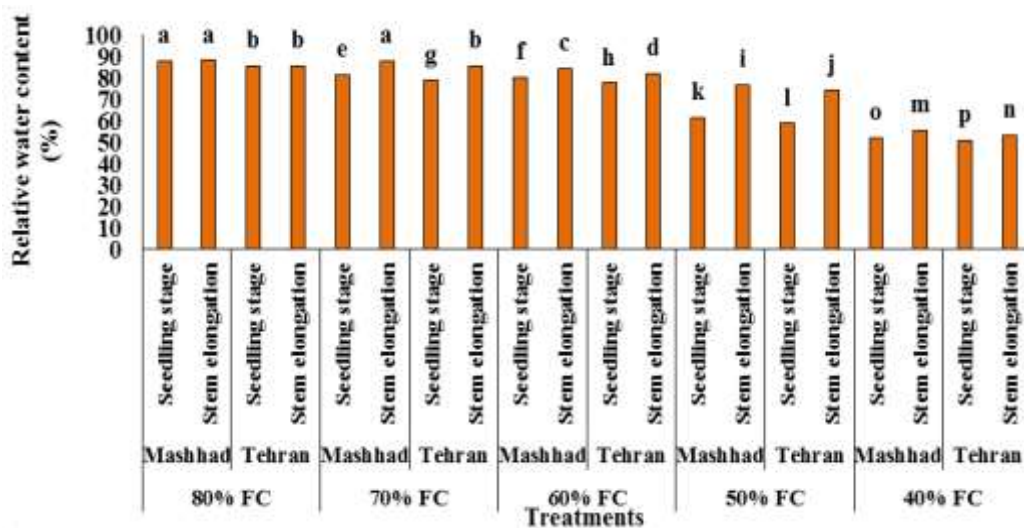
شکل ۳- اثرات تنش خشکی بر نشت الکترولیت اکوتیپ‌های ختمی در دو مرحله رشد. میانگین‌های (n=۳) دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

مرحله گیاهچه‌ای و طول شدن ساقه و در گیاهان تحت تیمار آبیاری ۷۰٪ ظرفیت زراعی در مرحله طول شدن ساقه (۸۸ درصد) به ثبت رسید. در اکوتیپ‌های مشهد و تهران با افزایش تنش خشکی در مرحله گیاهچه‌ای و ساقه‌دهی محتوای نسبی آب به ترتیب، ۴۱ و ۳۷ درصد کاهش یافت (شکل ۴). این نتایج مطابق با نتایج Ozkur و همکاران (۲۰۰۹) و قادری (۱۳۸۸) بود. محتوای نسبی آب مستقیماً تحت تأثیر وضعیت آب گیاه می‌باشد و از آن به‌عنوان شاخصی برای نشان دادن

ظرفیت زراعی)، کمتر بود از محتوای نسبی آب بیشتری نیز برخوردار بود.

محتوای نسبی آب برگ به‌طور معنی داری تحت اثرات اکوتیپ، خشکی و مرحله رشد قرار گرفت (جدول ۲). در اکوتیپ مشهد و تهران با افزایش تنش خشکی در تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی در هر دو مرحله رشد، نسبت به شاهد از محتوای نسبی آب برگ کاسته شد. بیشینه محتوای نسبی آب در اکوتیپ مشهد تحت تیمار آبیاری ۸۰٪ ظرفیت زراعی در



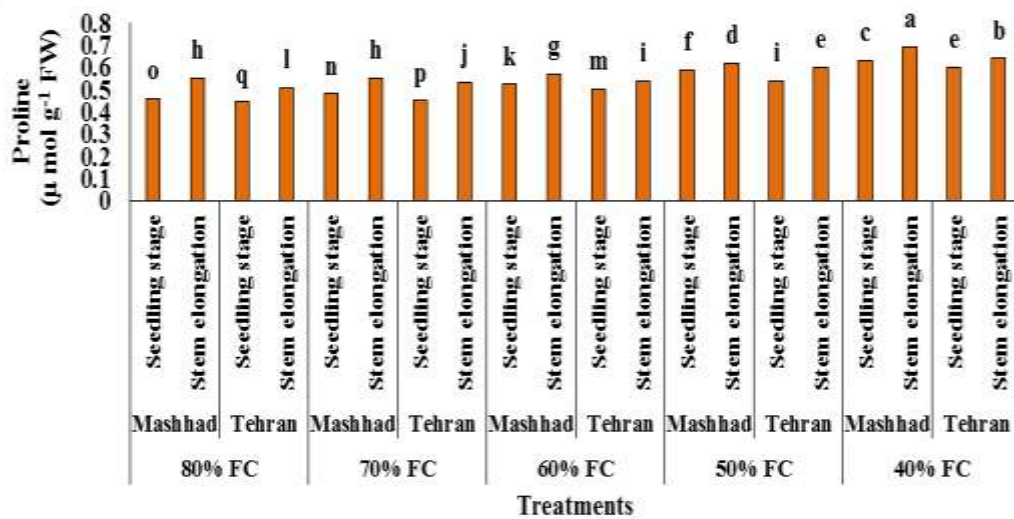


شکل ۴- اثرات تنش خشکی بر محتوای نسبی آب برگ اکوتیپ‌های ختمی در دو مرحله رشد. میانگین‌های (n=۳) دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

میکرومول بر گرم وزن تر و در اکوتیپ تهران از ۰/۴۴ به ۰/۶۰ میکرومول بر گرم وزن تر رسید (شکل ۵). پرولین با حفظ تورژسانس و تنظیمات اسمزی در طی تنش خشکی سبب بقاء سلول‌ها می‌شود (Chegah *et al.*, 2013)، همچنین افزایش میزان پرولین در طی تنش خشکی در بسیاری از مطالعات Aghaie و همکاران (۲۰۱۸)، Baloglu و همکاران (۲۰۱۲) و Man و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده است. همبستگی شدید بین تجمع پرولین و مقاومت به تنش خشکی با استفاده از بیان بالای ژن پرولین -۵- کریوکسیلات سنتتاز به اثبات رسیده است (Seki *et al.*, 2007). افزایش در محتوای پرولین تحت تنش خشکی در این مطالعه نشان از فرآیند سازگاری این گیاه با تنش خشکی از طریق تنظیم اسمزی است. در واقع با افزایش سطح تنش خشکی، محتوای نسبی آب برگ‌ها کاهش و گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌ها افزایش می‌یابد که باعث فعال‌شدن ژن‌های دخیل در سنتز و تجمع پرولین در سلول‌ها می‌شود. از آنجا که پرولین در تنظیم اسمزی نقش دارد به نظر می‌رسد که برتری اکوتیپ متحمل (مشهد) با افزایش میزان پرولین این اکوتیپ در شرایط تنش ارتباط دارد، از طرفی میزان این شاخص در مرحله گیاهچه‌ای نسبت به مرحله ساقه‌دهی کمتر بود که نشان‌دهنده حساس‌تر بودن هر دو اکوتیپ در مرحله گیاهچه‌ای می‌باشد.

شدت تنش خشکی در سطح برگ استفاده می‌شود (حدادی نژاد، ۱۳۹۲). نتایج همبستگی صفات نشان داد که محتوای نسبی آب برگ با محتوای پرولین همبستگی منفی و معنی‌داری (جدول ۳) داشت. به نظر می‌رسد، گیاهان ختمی تحت تنش خشکی شدید با کاهش محتوای نسبی آب، از طریق افزایش میزان پرولین به‌عنوان مکانسیم تنظیمی، از آسیب به گیاه در هر دو مرحله رشدی جلوگیری نموده‌اند. نتایج تحقیق Yanlei و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که در حضور تنش خشکی میزان پرولین سبب بازیابی محتوای نسبی آب سلول‌ها می‌شود و از طرفی بالا بودن میزان محتوای نسبی آب در اکوتیپ مشهد نسبت به اکوتیپ تهران در شرایط تنش خشکی بیانگر قدرت بالای این اکوتیپ در حفظ آب سلول‌ها و جلوگیری از آبکشیدگی در مواجهه با تنش کم آبی بوده است که مطابق با نتایج Dashty و همکاران (۲۰۱۴) بود.

پرولین به‌طور معنی‌داری تحت اثرات متقابل اکوتیپ، خشکی و مرحله رشد قرار گرفت (جدول ۲). مقایسه دو اکوتیپ نشان داد که پرولین در اکوتیپ مشهد تحت تیمار شاهد، در مرحله گیاهچه‌ای و مرحله ساقه‌دهی به‌ترتیب، ۴ و ۷ درصد از اکوتیپ تهران بیشتر بود. در هر دو اکوتیپ با گذشت زمان پرولین روندی صعودی به ثبت رسانید، به‌نحویکه در اکوتیپ مشهد در مرحله گیاهچه‌ای از ۰/۴۶ به ۰/۶۳



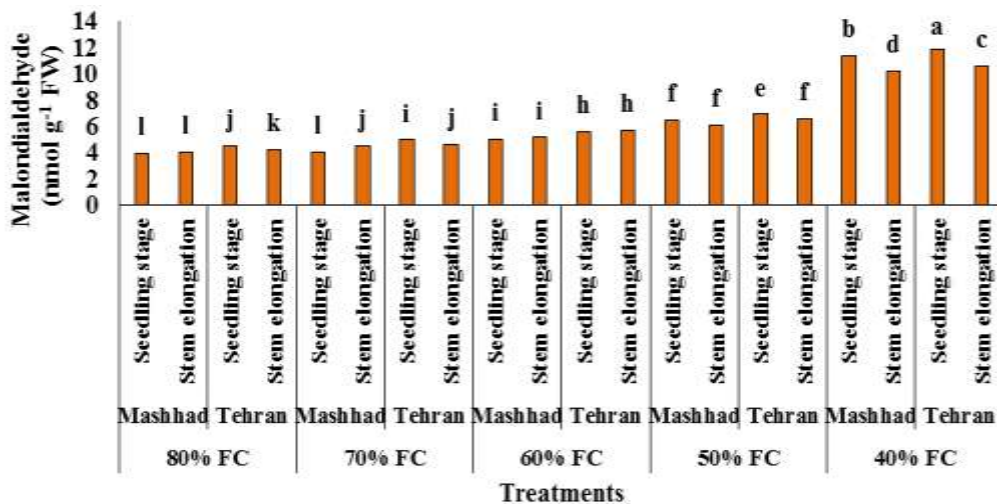
شکل ۵- اثرات تنش خشکی بر پرولین در اکوتیپ‌های ختمی در دو مرحله رشد. میانگین‌های (n=۳) دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

شاهد نشان‌دهنده این مطلب است که این گیاه در مرحله گیاهچه‌ای به تنش خشکی نسبت به مرحله طویل‌شدن ساقه حساس‌تر می‌باشد.

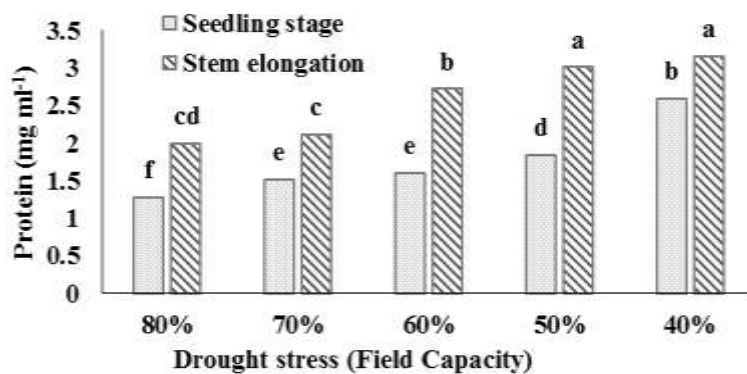
اثرات متقابل اکوتیپ، تنش خشکی و مرحله رشد بر میزان پروتئین کل معنی‌دار نبود، اما اثرات تنش خشکی با مرحله رشد بر میزان پروتئین کل معنی‌دار بود (جدول ۲). در مرحله گیاهچه‌ای و ساقه‌دهی با افزایش تنش خشکی از ۸۰ به ۴۰٪ ظرفیت زراعی میزان پروتئین کل روندی صعودی داشت، به نحویکه در هر دو مرحله میزان پروتئین دو برابر شد (شکل ۷). همبستگی مثبت بین میزان پروتئین با فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز به ثبت رسید (جدول ۳). نتایج حاضر مطابق با نتایج Gaber (۲۰۱۱) و حدادی‌نژاد و همکاران (۱۳۹۲) می‌باشد؛ که نتایج آنها حاکی از افزایش پروتئین کل در گیاهان تحت تنش است. آن‌ها عنوان نمودند که افزایش پروتئین در ارقام مقاوم و همچنین تنش‌های شدید مشهودتر است.

همچنین در بررسی فعالیت آنزیم‌ها نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت اثرات معنی‌دار اکوتیپ، تنش خشکی و مرحله رشد گرفت (جدول ۲)، به طوریکه در هر دو اکوتیپ با افزایش تنش خشکی فعالیت این آنزیم افزایش یافت. در مقایسه دو اکوتیپ، بیشترین فعالیت

اثر متقابل اکوتیپ، تنش خشکی و مرحله رشد بر میزان مالون دی‌آلدهید معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد با افزایش تنش خشکی در هر دو اکوتیپ میزان مالون دی‌آلدهید روندی صعودی به ثبت رسانید، به‌نحویکه که در اکوتیپ مشهد با کاهش سطوح رطوبتی از شاهد به ۴۰٪ ظرفیت زراعی در مرحله گیاهچه‌ای، از ۳/۸۷ به ۱۱/۴ و در مرحله ساقه‌دهی از ۴ به ۱۰/۲ نانومول بر گرم وزن تر رسید، اما این شاخص در اکوتیپ تهران از ۴/۴۷ به ۱۱/۹ در مرحله گیاهچه‌ای و از ۴/۲۳ به ۱۰/۶ نانومول بر گرم وزن تر افزایش پیدا کرد (شکل ۶). افزایش معنی‌دار مالون دی‌آلدهید تحت تنش شدید توسط Ozkur و همکاران (۲۰۰۹) و Gaber (۲۰۱۱) نیز گزارش شده است. افزایش مالون دی‌آلدهید شاخص خوبی از صدمه اکسیداتیو به چربی‌های غشاء و سایر مولکول‌های زیستی است. جدول ۳ نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌دار بین این شاخص با نشت الکترولیت‌ها وجود دارد که با نتایج Gill و Tutija (۲۰۱۰) همخوانی دارد، آن‌ها افزایش پراکسیداسیون چربی‌های غشاء را که منجر به افزایش نشت یونی از سلول گزارش نمودند. از طرفی این شاخص همبستگی مثبت و معنی‌داری با فعالیت آنزیم‌ها داشت (جدول ۳). افزایش این شاخص در مرحله گیاهچه‌ای نسبت به مرحله ساقه‌دهی تحت تنش شدید ۴۰٪ ظرفیت زراعی نسبت به



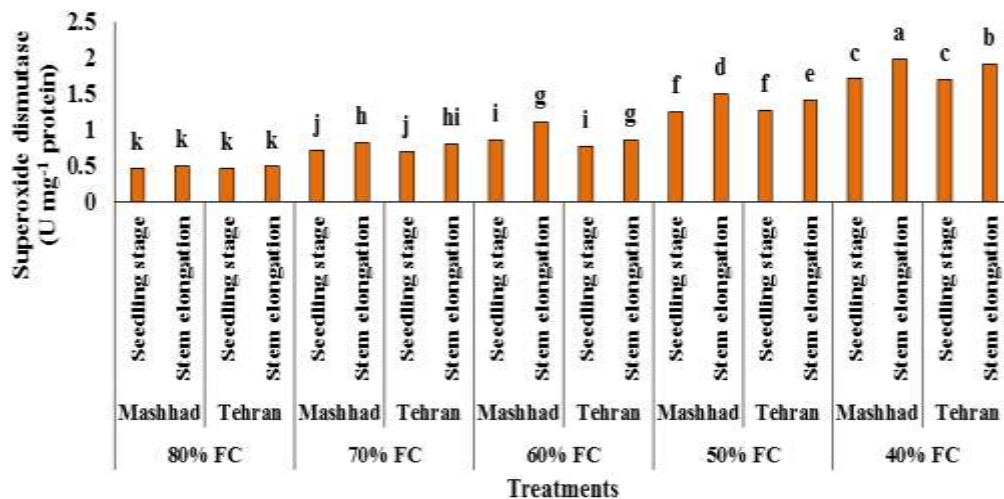
شکل ۶- اثرات تنش خشکی بر مالون دی‌آلدئید اکوتیپ‌های ختمی در دو مرحله رشد. میانگین‌های (n=۳) دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



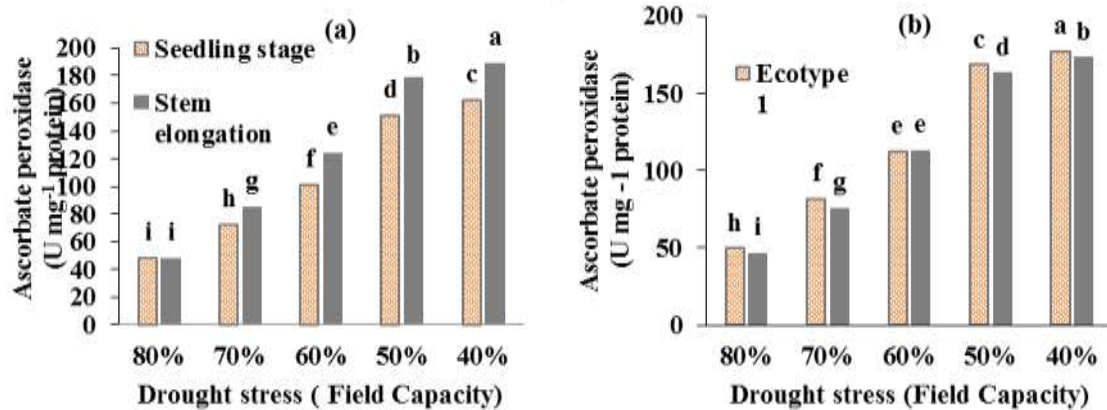
شکل ۷- اثر تنش خشکی بر میزان پروتئین گیاه ختمی در دو مرحله رشد. میانگین‌های (n=۳) دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

تنش خشکی و مرحله رشد قرار نگرفت، اما اثرات متقابل اکوتیپ با مرحله رشد و اکوتیپ با تنش خشکی بر فعالیت این آنزیم معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج اثرات متقابل اکوتیپ و خشکی نشان داد که بیشترین فعالیت این آنزیم در اکوتیپ مشهد تحت تنش خشکی ۴۰٪ ظرفیت زراعی (۱۷۷ واحد در میلی‌گرم پروتئین) و کمترین میزان این شاخص در اکوتیپ تهران تحت تیمار آبیاری ۸۰٪ ظرفیت زراعی (۴۶/۶ واحد در میلی‌گرم پروتئین) به ثبت رسید (شکل ۹ a). اثرات متقابل خشکی و مرحله رشد نشان داد که در مرحله گیاهچه‌ای و به ساقه رفتن تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای ۸۰٪ درصد ظرفیت

این آنزیم در اکوتیپ مشهد در گیاهان تحت تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی در مرحله ساقه‌دهی (۱/۹۸ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و کمترین فعالیت آن در گیاهان تحت تیمار ۸۰٪ ظرفیت زراعی در دو مرحله گیاهچه‌ای و ساقه‌دهی (۰/۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) به ثبت رسید، در اکوتیپ تهران نیز، بیشترین و کمترین فعالیت این آنزیم به ترتیب در گیاهان تحت تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی در مرحله ساقه‌دهی (۱/۹۱ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و گیاهان تحت تیمار ۸۰٪ ظرفیت زراعی در دو مرحله گیاهچه‌ای و ساقه‌دهی مشاهده شد (شکل ۸). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت اثرات اکوتیپ،



شکل ۸- اثرات تنش خشکی بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اکوتیپ‌های ختمی در دو مرحله رشد. میانگین‌های (n=۳) دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



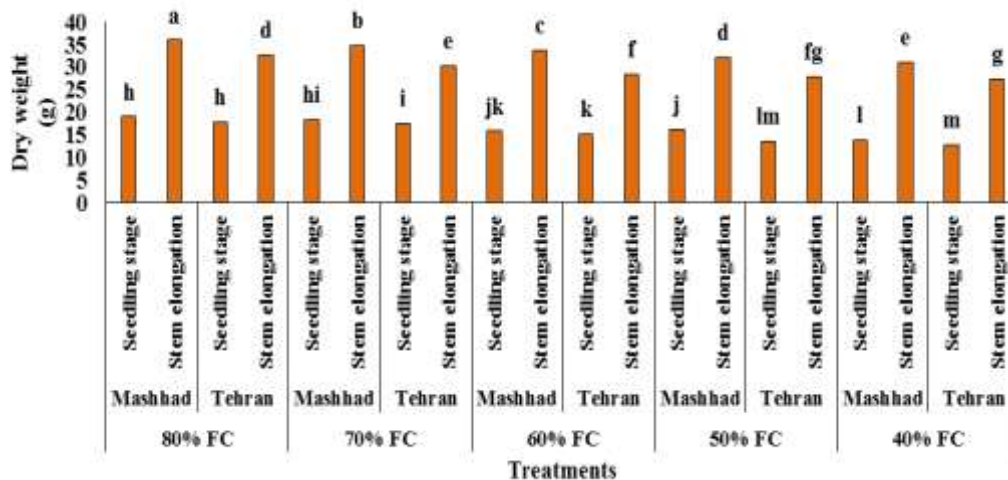
شکل ۹- اثرات متقابل تنش خشکی و مرحله رشد (a) و اکوتیپ و مرحله رشد بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز اکوتیپ‌های ختمی. میانگین‌های (n=۳) دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

زراعی مشاهده نشد اما با افزایش تنش خشکی در هر دو مرحله بر فعالیت این آنزیم افزوده شد، زیرا بیشترین میزان این شاخص در مرحله ساقه‌دهی در گیاهان تحت تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی (۱۸۹ واحد در میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد (شکل ۹ b). برخی از محققین افزایش فعالیت آنزیم‌ها را تحت تنش خشکی در گیاهان گزارش نمودند. نتایج تحقیق، اثر دو تیمار آبیاری (۱۰۰ و ۳۰٪ ظرفیت زراعی) تحت دو شرایط نوری (نور کامل خورشید و ۱۵٪ نور خورشید) بر گیاه نوتل (*Picea*

*asperata*) نشان داد که تحت شرایط نوری بالا نسبت به نور کم، تنش خشکی سبب افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز گردیده است (Yang et al., 2007). همچنین محققان در بررسی فعالیت آنزیم‌ها تحت شرایط تنش خشکی در گندم نشان دادند که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت شرایط تنش شدید ۲/۹ برابر شاهد گردید (Hosseini et al., 2017).

Amiri و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که فعالیت این آنزیم در گیاه شمعدانی عطری (*Pelargonium graveolens*)

برخی از محققین افزایش فعالیت آنزیم‌ها را تحت تنش خشکی در گیاهان گزارش نمودند. نتایج تحقیق، اثر دو تیمار آبیاری (۱۰۰ و ۳۰٪ ظرفیت زراعی) تحت دو شرایط نوری (نور کامل خورشید و ۱۵٪ نور خورشید) بر گیاه نوتل (*Picea*



شکل ۱۰- اثرات تنش خشکی بر وزن خشک کل اکوتیپ‌های ختمی در دو مرحله رشد. میانگین‌های (n=۳) دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

آنتی‌اکسیدان آنزیمی از مهم‌ترین سازگاری‌های فیزیولوژیکی گیاهان تحت تنش خشکی است؛ بنابراین افزایش ۲۷ درصدی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز تحت تنش شدید نسبت به گیاهان شاهد در مطالعه حاضر حاکی از سازگاری مطلوب این گونه نسبت به شرایط تنش می‌باشد. از طرفی در شرایط تنش شدید افزایش فعالیت آنزیم‌ها به‌عنوان سیستمی در جهت جلوگیری از کاهش بیشتر SPAD که شاخصی از میزان سبزیگی گیاه می‌باشد (Saglam *et al.*, 2011)، درستی همبستگی معنی‌دار این صفات را نشان می‌دهد.

وزن خشک گیاه به‌طور معنی‌داری تحت اثرات متقابل اثرات اکوتیپ، تنش خشکی و مرحله رشد قرار گرفت (جدول ۲)، به‌نحویکه وزن خشک، در اکوتیپ مشهد تحت تیمار آبیاری ۸۰٪ ظرفیت زراعی در مرحله گیاهچه‌ای نسبت به اکوتیپ تهران ۶ درصد و در مرحله ساقه‌دهی ۸ درصد کمتر بود؛ اما در اکوتیپ‌های مشهد و تهران، با کاهش سطوح آبیاری تا ۴۰٪ ظرفیت زراعی از وزن خشک گیاهان در مرحله گیاهچه‌ای به‌ترتیب، ۲۶ و ۲۸ درصد و در مرحله ساقه‌دهی به‌ترتیب، ۱۴ و ۱۷ درصد کاسته شد (شکل ۱۰).

همبستگی مثبت بین محتوای نسبی آب برگ و سبزیگی برگ با وزن خشک گیاه در پایان دوره نشان داد که افزایش

در تنش ۵۰٪ ظرفیت زراعی به حداکثر میزان (۰/۴۴۷ میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تر) رسید. مطالعات مختلف افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را تحت شرایط تنش خشکی نشان می‌دهد. طبق گزارش خالقی و همکاران (۱۳۹۳) فعالیت این آنزیم را در گیاهان توت آمریکایی (*Maclura pomifera*) تحت تنش شدید در هفته چهارم ۷/۲ برابر فعالیت این آنزیم در گیاهان شاهد بود.

نتایج همبستگی صفات (جدول ۳) نشان داد که این دو آنزیم با صفاتی از جمله نشت الکترولیت و پرولین همبستگی مثبت و با SPAD و محتوای نسبی آب همبستگی منفی و معنی‌داری داشت، بر این اساس در شرایط تنش خشکی، پراکسیداسیون چربی‌های غشاء افزایش یافته و این امر منجر به تضعیف سلولی و افزایش نشت الکترولیت‌ها شده است که این نتایج با نتایج Halliwell (۲۰۰۶) تطابق دارد. همچنین در شرایط تنش با افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها و مالون دی‌آلدهید در اثر پراکسیداسیون چربی‌ها فعالیت سیستم آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافته است.

با افزایش میزان رادیکال‌های سوپراکسید در سلول‌ها تحت تنش خشکی، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش می‌یابد (Gill and Tuteja, 2010) افزایش فعالیت سیستم‌های

اکوتیپ در طی مراحل رشد، منجر به کاهش محتوای نسبی آب و شاخص سبزینگی برگ شد، اما میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌ها افزایش یافت. محتوای نسبی آب برگ، وزن خشک بیشتر و نشت الکتروولت کمتر در اکوتیپ مشهد نسبت به تهران بیانگر این واقعیت است که این اکوتیپ از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پرولین، نیروی نگهدارنده آب در برگ‌ها را افزایش داده و با ایجاد تنظیم اسمزی و به تبع آن حفظ آماس و کاهش خسارت غشاء سلولی، موجب افزایش تحمل به خشکی گردیده است. کاهش بیشتر وزن خشک در گیاهان ختمی تحت تنش خشکی در مرحله گیاهچه‌ای نسبت به ساقه‌دهی، حساسیت بیشتر این گیاهان را در مراحل اولیه رشد بازگو می‌نماید. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که در مقایسه دو اکوتیپ، اکوتیپ مشهد نسبت به تهران از تحمل بیشتری در برابر کمبود آب برخوردار است.

تنش خشکی در هر دو مرحله رشد منجر به کاهش وزن خشک گیاهان ختمی گردید؛ اما در اکوتیپ مشهد با بالاتر بودن محتوای نسبی آب و سبزینگی برگ تحت تنش خشکی شدید نسبت به اکوتیپ تهران کاهش رشد کمتر بود. از طرفی در گیاهان تحت تنش نسبت به شاهد در هر مرحله، کاهش کمتر وزن خشک در مرحله ساقه‌دهی نسبت به مرحله گیاهچه‌ای و افزایش بیشتر میزان مالون دی‌آلدئید در مرحله گیاهچه‌ای نسبت به ساقه‌دهی در گیاهان تحت تنش ۴۰٪ نسبت به ۸۰٪ ظرفیت زراعی، حساس‌تر بودن مرحله گیاهچه‌ای ختمی را به تنش خشکی نشان داد. همچنین Larkunthod و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که کاهش وزن در ژنوتیپ‌های حساس‌تر بیشتر بوده است که مطابق با نتایج آزمایش اخیر است.

#### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که کاهش رطوبت خاک در هر دو

#### منابع

- حدادی نژاد، م. (۱۳۹۲) گزینش ژنوتیپ‌های انگور متحمل به خشکی با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک، روابط ژنتیکی و شاخص‌های فیزیولوژیک. رساله دکتری. گروه علوم باغبانی پردیس و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
- خالقی، ع. (۱۳۹۳) مطالعه مقاومت به دمای انجماد و پاسخ به خشکی درخت توت آمریکایی (*Maclura pomifera*) با هدف کاربرد در فضای سبز شهری. رساله دکتری. گروه علوم باغبانی پردیس و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
- ربیع، و. (۱۳۸۲) بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی برخی ارقام انگور به تنش خشکی. رساله دکتری. گروه علوم باغبانی پردیس و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
- علیزاده، ا. (۱۳۸۹) رابطه آب و خاک و گیاه. چاپ آستان قدس رضوی، دانشگاه امام رضا.
- قادری، ن. (۱۳۸۸) بررسی اثرات تنش خشکی بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی پنج رقم انگور و بررسی تنوع ژنتیکی آنها. رساله دکتری. گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
- قاسمی قهساره، م. و کافی، م. (۱۳۹۱) گلکاری علمی و عملی (جلد اول). ناشر مؤلف.
- محمدی، ب. (۱۳۹۰) تحلیل روند بارش سالانه ایران. مجله جغرافیا و برنامه‌ریزی محیطی ۴۳: ۹۵-۱۰۶.
- Agarwal, S. and Pandey, V. (2004) Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Plant Biology* 48: 555-560.
- Aghaie, P., Hosseini Tafreshi, S. A., Ebrahimi, M. A. and Haerinasab, M. (2018) Tolerance evaluation and clustering of fourteen tomato cultivars grown under mild and severe drought conditions. *Scientia Horticulturae* 232: 1-12.
- Ahmed, B., Roy, C. D., Subramaniam, S. A., Ganie, D., Kwatra, D., Dixon, D., Anant, A., Zarqar, M. A. and Umar, S. (2016) An ornamental plant targets epigenetic signaling to block cancer stem cell driven colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 37: 385-396.

- Alscher, R. A., Heath, Erturk, N. and Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Amiri, R., Nikbakht, A. and Etemadi, N. (2015) Alleviation of drought stress on rose geranium (*Pelargonium graveolens*) in terms of antioxidant activity and secondary metabolites by mycorrhizal inoculation. *Scientia Horticulturae* 197: 373-380.
- Baloglu, M. C., Kavasi, M., Aydin, G., Oktem, H. A. and Yucel, A. M. (2012) Antioxidative and physiological responses of two sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars under PEG-mediated drought stress. *Turkish Journal of Botany* 36: 707-714.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Burt, S. A. and Reinders, R. D. (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in Applied Microbiology* 36: 162-167.
- Caverzan, A., Passaia, G., Barcellos Rosa, S., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F. and Margis-Pinheiro, M. (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *genetic and molecular biology. Genetics and Molecular Biology* 35: 1011-1019.
- Chegah, S., Chehrazi, M. and Albaji, M. (2013) Effects of drought stress on growth and development franklinia plant (*Franklinia leavis*). *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 19: 659-665.
- Czarnocka, W. and Karpinski, S. (2018) Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine* 122: 4-20.
- Dashty, M., Kafi, M., Tavakoli, H. and Mirza, M. (2014) Effect of water deficit stress on water relations, photosynthesis and osmolytic accumulation in *Salvia terrifolia* Benth medicinal plant. *Iranian Journal of Field Crops Research* 12: 813-821.
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., Phozhvanov, G. A., Sokolik, A. and Yurin, V. (2014) Stress induced electrolyte leakage: the role of K<sup>+</sup> permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany* 65: 1259-1270.
- El-Beltagi, H. and Mohamed, H. I. (2013) Reaction oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 41: 44-57.
- Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M. J., Gaber, M. A. (2011) Differential regulation of photorespiratory gene expression by moderate and severe salt and drought stress in relation to oxidative stress. *Plant Science* 180: 540-547.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Guo, Y. Y., Tian Liu, S. S., Wang, S. S. and Sui, W. Q. N. (2018a) Energy dissipation and antioxidant enzyme system protect photosystem II of sweet sorghum under drought stress. *Photosynthetica* 56: 861-872.
- Guo, Y. Y., Yua, H. Y., Yangb, M. M., Konga, D. S. and Zhang, Y. J. (2018b) Effect of drought stress on lipid peroxidation, osmotic adjustment and antioxidant enzyme activity of leaves and roots of *Lycium ruthenicum* Murr. seedling. *Russian Journal of Plant Physiology* 65: 244-250.
- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
- Hasanuzzaman, M., Anwar Hossain, M., Teixeira daSilva, J. A. and Fujita, M. (2011) Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies* 261-315.
- Health, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Hosseini, F., Moghaddasi, M. R. and Dexter, A. R. (2017) Effect of the fungus *Piriformospora indica* on physiological characteristics and root morphology of wheat under combined drought and mechanical stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 118: 107-120.
- Hussain, L., Akash, M. S. H., Tahir, M., Rehman, K. and Ahmed, K. Z. (2014) Hepatoprotective effects of methanolic extract of *Alcea rosea* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 9: 322-327.
- IPCC, (2018) Summary for Policymakers. In: *Global Warming of 1.5°C. Climate Change 2014: World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland.*
- Kamanga, R. M., Mbega, E. and Ndakidemi, P. (2018) Drought tolerance mechanisms in plants: physiological responses associated with water deficit stress in *Solanum lycopersicum*. *Advances in Crop Science and Technology*

6: 362-370.

- Larkunthod, P., Nounjan, N., Siangliw, J. L., Toojinda, T., Sanitchon, J., Jongdee, B. and Theerakulpisut, P. (2018) Physiological responses under drought stress of improved drought-tolerant rice lines and their parents. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 46: 679-687.
- Mader, J. (2009) Induction of acquired stress tolerance for improving landscape survivability of *Petunia×hybrida*. M.S. Thesis. Louisiana State University, America.
- Man, D., Bao, Y. X., Han, L. B. and Zhang, X. (2011) Drought tolerance associated with proline and hormone metabolism in two tall fescue cultivars. *Horticultural Science* 46: 1027-1032.
- Masoumi, L., Kafi, M., Khazai, H. and Davari, K. (2010) Effect of drought stress on water statue, electrolyte leakage and enzymatic antioxidant of *Kochia (Kochia Scoparia)* under saline condition. *Pakistan Journal of Botany* 42: 3517-3524.
- Michaletti, N., Naghavi, M. R., Toorch, M., Zolla, L. and Rinaldocchi, S. (2018) Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific Report* 8: 5710-5728.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Ozkur, O., Ozdemir, F., Bor, M. and Turkan, I. (2009) Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. *Environmental and Experimental Botany* 66: 487-492.
- Pakravan, M. and Ghahreman, A. (2003) Some new combinations and synonyms in *Alcea* (Malvaceae) from Iran. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* 104: 713-716.
- Rahnema, Sh., Sedaghatthoor, Sh., Allahyari, M. S., Damalas, C. A. and El-Bilali, H. (2019) Preferences and emotion perceptions of ornamental plant species for green space designing among urban park users in Iran. *Urban Forestry and Urban Greening* (In press). 39: 98-108.
- Reddy, A. R., Chaitanya, K. V. and Vivekanandan, M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189-1202.
- Saglam, A., Saruhan, N., Terzi, R. and Kadioglu, A. (2011) The relation between antioxidant enzyme and chlorophyll fluorescence parameters in common bean cultivar differing in sensitivity to drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 58: 60-68.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. and Shinozaki, K. (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 296-302.
- Seyyednejad, S. M., Koochak, H., Darabpour, E. and Motamedi, H. (2010) A survey on *Hibiscus rosa sinensis*, *Alcea rosea* L. and *Malva neglecta* Wallr as antibacterial agents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3: 351-355.
- Shahrokhi, M., Tehranifar, A., Hadizadeh, H. and Selahvarzi, Y. (2011) Effect of drought stress and paclobutrazol-treated seeds on physiological response of *Festuca arundinacea* L. Master and *Lolium perenne* L. Barrage. *Journal of Biology and Environmental Science* 5: 77-85.
- Silva, E. N., Ribeiro R. V., Ferreira Silva, S. L., Viegas, R. A. and Silveira, J. A. G. (2010) Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. *Journal of Arid Environments* 74: 1130-1137.
- Turner, N. C. (2018) Turgor maintenance by osmotic adjustment – 40 years of progress. *Journal of Experimental Botany* 69: 3223-3233.
- Tyagia, J., Varma, A. and Pudake, R. N. (2017) Evaluation of comparative effects of arbuscular mycorrhiza (*Rhizophagus intraradices*) and endophyte (*Piriformospora indica*) association with finger millet (*Eleusine coracana*) under drought stress. *European Journal of Soil Biology* 81: 1-10.
- Wessel, D. and Flugge, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* 138: 141-143.
- Yang Y., Liu Q., Han C., Qiao, Y. Z., Yao, X. Q. and Yin, H. J. (2007) Influence of water stress and low irradiance on morphological and physiological characteristics of *Picea asperata* seedlings. *Photosynthetica* 45: 613-619.
- Yanlei, F., Hailing, M., Siying, C., Tianyu, G. and Jiming, G. (2018) Control of proline accumulation under drought via a novel pathway comprising the histone methylase CAU1 and the transcription factor ANAC055. *Journal of Experimental Botany* 69: 579-588.
- Zhang, T., Hub, Y., Zhangc, K., Tianc, C. and Guoa, J. (2018) Arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth of *Ricinus communis* by altering photosynthetic properties and increasing pigments under drought and salt stress. *Industrial Crops and Products* 17: 13-19.



## A study of physiological and antioxidant responses in *Alcea rosea* under drought stress during two phenological stages

Toktam Oraee, Mahmoud Shoor\*<sup>†</sup>, Ali Tehranifar, Seyyed Hossein Nemati

Department of Horticultural Science and Landscape Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad  
(Received: 17/10/2018, Accepted: 14/03/2019)

### Abstract

In order to investigate the effects of drought stress on physiological responses of *Alcea rosea* plant in greenhouse at two growth stages, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. The experiment factors included two ecotypes (Mashhad and Tehran), five moisture levels (80 (control), 70, 60, 50 and 40% Field Capacity) at two growth stages (seedling and elongation stem). After applying drought stress at two growth stages, SPAD, electrolyte leakage, relative water content, proline, malondialdehyde, enzymes activity of leaf and total dry weight were measured. The highest relative content of leaf water (88.2%), total dry weight (36 g), and the lowest electrolyte leakage (6.23%) were recorded in Mashhad ecotype under 80% FC treatment at the stage of stem elongation. In both ecotypes, with increasing drought stress, the amount of proline had a rising trend at two stages. Also, the highest amount was recorded in ecotype Mashhad under 40% FC treatment at stage of stem elongation. In both ecotypes, the highest activity of malondialdehyde was observed in 40% FC treatment at the seedling stage (11.9 and 11.4 nmol g<sup>-1</sup> FW, respectively). In the ecotype of Mashhad and Tehran, with increasing drought stress from 80 to 40% FC at stage of stem elongation, the activity of the superoxide dismutase enzyme increased, from 49.9 to 1.98, and 1.91 U mg protein, respectively. The activity of ascorbate- peroxidase increased, when plants were under severe drought stress. There was a positive and significant correlation between chlorophyll index and relative water content with total dry weight of the plant. The results of this experiment showed that compared to the two ecotypes, Mashhad ecotype compared to Tehran has more tolerance to water shortage.

Keywords: Ecotype, Ornamental plant, Drought tolerant, Stage of stem elongation.