

مقاله پژوهشی

اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، محتوای پرولین و برخی صفات مورفولوژیک اکوتیپ‌های مختلف کرچک (*Ricinus communis* L.)

سارا شریفی سلطانی^۱، سید کمال کاظمی تبار^{۱*}، غلامعلی رنجبر^۱، علی پاکدین پاریزی^۲ و حمید نجفی زرینی^۱

^۱گروه ژنتیک و به‌نژادی دانشکده علوم زراعی دانشگاه منابع طبیعی و کشاورزی ساری

^۲پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۶/۱۳)

چکیده

خشکی یکی از جدی‌ترین تهدیدها برای تولید محصولات کشاورزی در سراسر جهان است و احتمالاً تغییرات اقلیمی این تهدید را تشدید خواهند کرد. به‌منظور بررسی تحمل خشکی اکوتیپ‌های مختلف کرچک، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. فاکتور اول ۲۲ اکوتیپ کرچک و فاکتور دوم اعمال تنش خشکی در پنج سطح، آبیاری کامل، قطع آبیاری به‌مدت (۱۱، ۲۲، ۳۳، ۴۴ روز) در اوایل مرحله رشد سنبله بود. صفات مورد بررسی شامل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، فعالیت بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی‌آلدهید، محتوای پرولین، ارتفاع بوته، قطر ساقه و تعداد برگ بود. تجزیه خوشه‌ای در شرایط نرمال و تنش خشکی اکوتیپ‌ها را به سه خوشه دسته‌بندی کرد. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، محتوای مالون دی‌آلدهید و پرولین در شرایط تنش خشکی گروه سوم (مقاوم) نسبت به گروه اول (حساس) به‌ترتیب ۸۱/۵، ۸۱/۸۷، ۷۰/۲۷، ۸۰/۰۵ و ۸۱/۸۷ افزایش داشته است. از طرفی اختلاف بین گروه مقاوم و حساس در شرایط تنش در صفات ارتفاع بوته، قطر ساقه و تعداد برگ به‌ترتیب ۷۴/۷۴، ۸۰/۵۰ و ۸۳/۳۸ درصد بود. بیشترین میزان همبستگی در شرایط تنش خشکی بین آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز ($r = ۰/۹۹۷$) و کمترین همبستگی غیر معنی‌دار بین پرولین و ارتفاع بوته ($r = ۰/۲۹۲$) مشاهده شد. با توجه به نتایج، اکوتیپ‌های ۵ و ۱۹ از نظر صفات مورد بررسی به‌عنوان اکوتیپ‌های متحمل به خشکی معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: اسمولیت، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداسیون لیپید، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز

مقدمه

در تولید روغن برای تولید بیودیزل نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Shrirame et al., 2011). توانایی کرچک برای سازگاری به شرایط رشدی نامطلوب نظیر تنش خشکی، آن را تبدیل به گیاهی بالقوه مناسب برای این مناطق می‌سازد (Weiss, 2000). تنش خشکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی به‌ویژه در

کرچک (*Ricinus communis* L.) از مهم‌ترین گیاهان زراعی و دارویی از تیره فرفیون است که از آن در کشورهای توسعه یافته در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی استفاده می‌کنند (Akpan et al., 2006). همچنین این گیاه به‌دلیل پتانسیل بالا

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: sdklkr@gmail.com

مناطق خشک و نیمه‌خشک است (Chaves *et al.*, 2003). پیش‌بینی می‌شود تا پایان قرن ۲۱ به دلیل افزایش دما خطرات مخرب خشکی افزایش یابد (Li *et al.*, 2009) و معمولاً گیاهان به دلیل تغییرات اقلیمی با نوسانات تأمین آب در طول چرخه حیات خود مواجه می‌شوند (Izabela *et al.*, 2013). گیاهان در شرایط تنش، مکانیزیم‌های مختلفی را در سطوح مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی بکار می‌گیرند (Covarrubias and Reyes, 2010) که باعث اجتناب و تحمل نسبت به تنش خشکی می‌شود. اجتناب از خشکی معمولاً از طریق تغییرات مورفولوژی در گیاه مانند کاهش در هدایت روزنه‌ای، سطح برگ و توسعه سیستم ریشه‌ای حاصل می‌شود. در گیاهان اثر تنش خشکی به دو دوره تقسیم‌بندی می‌شود یک دوره قبل از مرحله زایشی که در این مرحله تنش بر روی رشد سبزینه‌ای گیاه تأثیر دارد و مرحله بعد از زایشی است که بر تشکیل دانه و عملکرد اثر می‌گذارد (شعبانی و همکاران، ۱۳۸۸). در واقع تنش خشکی با اثرات منفی که بر روی صفاتی از قبیل ارتفاع بوته، قطر ساقه و تعداد برگ در بوته می‌گذارد منجر به کاهش عملکرد می‌شود (Ghasemi *et al.*, 2017).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن که در نتیجه تنش‌های مختلف محیطی تولید می‌شوند برای اجزای سلولی بسیار خطرناک هستند بنابراین باید به دقت تنظیم گردند. گیاهان چندین سیستم آنتی‌اکسیدانی را برای مقابله با این ترکیبات کشنده توسعه داده‌اند از جمله کاتالازها، پراکسیدازها، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و ... که در پاسخ بیوشیمیایی گیاهان در مقابل تنش خشکی فعال می‌شوند (Yang *et al.*, 2017). همچنین برخی از اسمولیت‌ها مانند پرولین، پروتئین نیز در برابر تنش خشکی نقش دارند (Mattoo *et al.*, 2014). برای ردیابی و ارزیابی کیفی انباشتگی و آسیب‌زایی گونه‌های اکسیژن فعال در تنش‌های اکسایشی از مالون دی‌آلدهید به عنوان نمایه‌ای از پاسخ گیاه به تنش استفاده می‌شود (Katalaz, 2002). یک پاسخ سازگار یافته در برابر تنش اکسیداتیو است (De Araujo Silva and همکاران ۲۰۱۶).

تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای مالون دی‌آلدهید تحت تنش خشکی با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG 6000) را در گیاه کرچک بررسی نمودند نتایج مطالعاتشان نشان داد که آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و همچنین میزان مالون دی‌آلدهید تحت شرایط تنش نسبت به شاهد افزایش یافت. فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیداز دیسموتاز و محتوای مالون دی‌آلدهید در شرایط تنش خشکی در گیاه گلرنگ نسبت به شاهد افزایش یافت (توپچی خسروشاهی، ۱۳۹۸). محمدی و همکاران (۱۳۹۴) با بررسی تأثیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تنش خشکی بر روی گیاه روغنی کلزا نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و همچنین میزان مالون دی‌آلدهید، به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش یافت. افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون ردوکتاز در گیاه روغنی گلرنگ تحت تنش خشکی مشاهده گردید (Sajedi *et al.*, 2012).

در درون سلول‌های گیاهی پرولین به عنوان ماده حفظ تعادل اسمزی بین سیتوپلاسم و واکوئل سلول عمل می‌کند به علاوه، پرولین نقش اسمولاتی به عنوان مخزن کربن و نیتروژن دارد. همچنین پرولین حفاظت گیاه را در برابر صدمات رادیکال‌های آزاد انجام می‌دهد (Matysik *et al.*, 2012).

درک مکانیسم‌های بیوشیمیایی و مورفولوژی مقاومت از مهم‌ترین اهداف در تولید مطلوب گیاهان به خصوص در شرایط تنش‌های محیطی جهت سازگار نمودن گیاهان به این شرایط است. مقاومت به تنش‌های مختلف به توانایی آنتی‌اکسیدانی گیاه وابسته است و تغییر در سطوح آنتی‌اکسیدانی می‌تواند از آسیب ناشی از تنش ممانعت نماید. از آنجایی که گیاه کرچک دارای کاربردهای دارویی و صنعتی وسیعی است، لذا شناخت و معرفی اکوتیپ‌های مقاوم این گیاه در شرایط تنش خشکی از ضرورت بالایی برخوردار است. تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر برخی از صفات مورفولوژیک و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و

محتوای پرولین و مالون دی‌آلدید در اکوتیپ‌های مختلف کرچک انجام شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش حاضر در سال ۹۸-۱۳۹۷ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی ساری به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول ۲۲ اکوتیپ کرچک (جدول ۱) و فاکتور دوم تنش خشکی با پنج سطح، آبیاری کامل (شاهد)، چهار سطح (۱۱، ۲۲، ۳۳، ۴۴ روز بعد از قطع آبیاری) بود. بذور بعد از ضدعفونی کامل با هیپوکلرید سدیم (ایتکس) و قارچکش کربوکسی تیرام (ویتاواکس)، در گلدان کشت شد. آبیاری براساس نیاز گیاه و با توجه به توصیه‌های زراعی در ابتدای کشت به صورت منظم برای جلوگیری از خشکی و آسیب به گیاهچه‌ها انجام گردید و بعد از استقرار گیاه به صورت متوسط هر هفت روز یکبار صورت گرفت. تنش خشکی در اوایل رشد سنبله اعمال شد، آبیاری به مدت ۵۰ روز (۷۰-۱۲۰ روز پس از کاشت) قطع شد.

روش‌های اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی: به منظور استخراج و اندازه‌گیری آنزیم‌ها، نمونه‌های برگ‌های جوان اکوتیپ‌های کرچک در مراحل مختلف اعمال تنش (۱۱، ۲۲، ۳۳، ۴۴ روز بعد از قطع آبیاری) و همزمان از نمونه‌های شاهد (آبیاری کامل) جمع‌آوری و بلافاصله در فلاسک حاوی ازت مایع قرار داده و سپس تا هنگام سنجش در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. در ابتدا جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها، نمونه‌های برگ‌های تهیه‌شده را در داخل هاون با ازت مایع کاملاً به صورت پودر در آورده و از آن به مقدار ۰/۲ گرم در داخل تیوپ ۲ میلی‌لیتری ریخته و سپس مقدار ۱/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات به آن اضافه و بعد تیوپ‌ها در دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و سپس فاز عصاره رویی حاصل را به میکروتیوب‌های جدید انتقال و در نهایت فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل جدول ۱- جزئیات نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در این بررسی

(SHIMADZU UV-1800) ساخت ژاپن اندازه‌گیری شد.

کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز طبق روش Aebi (۱۹۸۴) و بر پایه تجزیه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنشی شامل ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۰/۵ میلی‌لیتر از پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی بود که حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به سه میلی‌لیتر رسید. با افزودن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز گردید و کاهش در جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی از محاسبه میزان پراکسید هیدروژن تجزیه‌شده توسط آنزیم محاسبه گردید.

گایاکول پراکسیداز: جهت سنجش فعالیت پراکسیداز کمپلکس واکنشی (دو میلی‌لیتر) شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر پراکسید ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج‌شده، استفاده گردید. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی شروع شده و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی براساس میزان تترایاکول تشکیل‌شده بدست آمد (Tang and Newton, 2005).

آسکوربات پراکسیداز: کمپلکس واکنشی برای اندازه‌گیری آسکوربات پراکسیداز (یک میلی‌لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر از آسکوربات یک میلی‌مولار ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج‌شده بود. واکنش با کامل شدن اجزای ضروری آن یعنی آنزیم استخراج‌شده سوبسترا و کوفاکتور شروع به فعالیت کرد. جذب کمپلکس واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر در زمان شروع و پس از یک دقیقه یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی میزان فعالیت آنزیم محاسبه گردید. عدد

شماره اکوتیپ	منطقه جمع‌آوری شده	شماره اکوتیپ	منطقه جمع‌آوری شده
۱	ساری	۱۲	ساری-فیروزکنده
۲	ساری	۱۳	بابلسر
۳	ساری	۱۴	بابل
۴	ساری	۱۵	نجف‌آباد
۵	ساری-دانشگاه علوم کشاورزی ساری	۱۶	زابل
۶	ساری	۱۷	عراق-کربلا
۷	ساری-خزر	۱۸	خرم‌آباد
۸	ساری	۱۹	بردسیر
۹	اصفهان	۲۰	فیروزکنده-التراسوند
۱۰	ساری	۲۱	فیروزکنده-EMS 25
۱۱	ساری	۲۲	فیروزکنده-EMS 50

حاصل میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را براساس میکرومول آسکوربات اکسیدشده در دقیقه نشان داد (Yoshimura et al., 2000).

مالون دی‌آلدهید: سنجش میزان مالون دی‌آلدهید به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) انجام گرفت، اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون‌های غشایی به‌وسیله تست تیوباربتوریک اسید (TBA) انجام شد. بافت‌های تر گیاهی بعد از تعیین وزن تر (۰/۲ گرم نمونه بافت برگ) در تری‌کلرو استیک اسید ۲۰٪ (TCA) دارای ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید همگن شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵°C) در لوله آزمایش ۳۰ ml حرارت دید. سپس مخلوط حاصله بلافاصله در یخ، سرد شده و در سرعت ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب مایع رویی در دو طول‌موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. غلظت MDA براساس رابطه ۱ محاسبه و براساس واحد ($\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt.}$) بیان شد. (رابطه ۱)

$$\text{MDA } (\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1} \text{ fresh wt.}) = [(E_{532} - E_{600}) \times 155] \times 5$$

پرویلین: برای اندازه‌گیری پرویلین محتوای بافت برگ از روش Bates (۱۹۷۳) استفاده شد، بدین منظور ۰/۱ گرم ماده تر گیاهی در هاون خرد شد و درون یک تیوب ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳

درصد آماده شده را به آن اضافه نموده و نمونه را درون یخ قرار داده شد. تیوب را در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ نموده تا با تشکیل دو فاز مایع و جامد مواد اضافی از محلول جدا گردد. مقدار یک میلی‌لیتر از عصاره صاف‌شده را درون تیوب جدید ریخته و ۲ میلی‌لیتر اسید ناین‌هیدرین (۱۲۵ میلی‌گرم ناین‌هیدرین + ۲ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار + ۳ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال) به‌همراه یک میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن افزوده و سپس به‌خوبی مخلوط شد. نمونه‌ها را در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت حرارت داده و سپس در یخ قرار داده شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه نموده و آن را به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردید در ادامه از دو فاز تشکیل شده فاز رویی را برمی‌داریم. ضمناً استانداردهای پرویلین در مقادیر صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شد. نمونه‌های حاصل و استانداردها در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و همچنین منحنی استاندارد پرویلین نیز رسم گردید. در ادامه غلظت پرویلین نمونه‌ها از رابطه ۲ براساس وزن تر محاسبه و درنهایت به‌صورت میکرومول بر گرم وزن تر ارائه و براساس منحنی استاندارد تفسیر شد.

(رابطه ۲)

$$\text{Proline } (\mu\text{M. g}^{-1} \text{ fresh wt.}) = \frac{M \times T \times W}{115.5} \times 1000$$

که در آن M= عدد خوانده شده با دستگاه اسپکتروفتومتر، T= حجم تولوئن مورد استفاده (در اینجا ۲ میلی‌لیتر است) و W= وزن نمونه برگ مورد استفاده (برای نمونه هادی ما برابر ۰/۱ است).

تعداد برگ: جهت اندازه‌گیری این صفت تعداد پنج گیاه از هر تکرار به‌طور تصادفی انتخاب و تعداد برگ‌های آن شمارش و میانگین آنها به‌عنوان تعداد برگ یادداشت گردید.

ارتفاع گیاه: ارتفاع گیاه از سطح زمین تا حد آخرین برگ با استفاده از متر اندازه‌گیری و برحسب سانتی‌متر گزارش شد.

قطر ساقه: با استفاده از کولیس و برحسب میلی‌متر ثبت شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری این صفات با نرم‌افزارهای آماری SAS و SPSS آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد و سپس با خوشه‌بندی ارقام با تجزیه کلاستر اکوتیپ‌های متحمل براساس این صفات شناسایی شد.

نتایج و بحث

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس می‌توان اظهار کرد اثر اکوتیپ، خشکی و اثر متقابل آن‌ها بر تمام صفات اندازه‌گیری شده از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). این موضوع بیانگر آن است که صفات کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، محتوای مالون دی‌آلدهید و پرولین و همچنین تمامی صفات موفورلوژیک مورد بررسی تحت تأثیر اثرات اصلی فاکتورهای اعمال شده و اثرات متقابل آن‌ها قرار گرفته است.

مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و اکوتیپ‌ها مشخص کرد مقادیر کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و همچنین محتوای مالون دی‌آلدهید و پرولین با افزایش سطح تنش افزایش در حالیکه صفاتی نظیر ارتفاع بوته، تعداد برگ و قطر ساقه با افزایش سطح تنش نسبت به شاهد کاهش یافتند. مقایسه میانگین اثرات متقابل بین اکوتیپ و

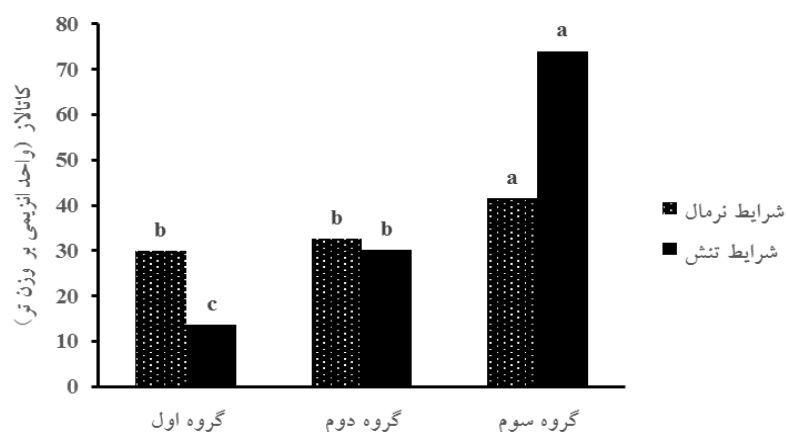
سطوح خشکی در تمام صفات مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که اکوتیپ‌های ۲، ۳، ۵، ۸ و ۱۹ که تا آخرین مرحله تنش (۴۴ روز بعد از قطع آبیاری) زنده ماندند، متحمل‌ترین اکوتیپ‌ها و اکوتیپ‌های ۶، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۸، ۲۱، ۲۲ که نتوانستند تا ۲۲ روز بعد از قطع آبیاری را تحمل کنند جز حساس‌ترین اکوتیپ‌ها قرار گرفتند که همه نتایج تجزیه خوشه‌ای و هم تجزیه بیوشیمیایی و مورفولوژیکی داده‌ها این نتایج را تأیید نمود.

آنزیم کاتالاز: مقایسه میانگین داده‌ها در شرایط تنش نشان داد کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از گروه اول (حساس) ۱۳/۶۳ واحد آنزیمی بر وزن تر و بیشترین میزان فعالیت این آنزیم از گروه سوم (مقاوم) ۷۴/۰۵ واحد آنزیمی بر وزن تر حاصل شد که به میزان ۸۱/۵ درصد فعالیت آنزیم افزایش داشته است، هم‌چنین کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط نرمال از گروه اول (حساس) ۲۹/۹ واحد آنزیمی بر وزن تر و بیشترین میزان این آنزیم از گروه سوم (مقاوم) ۴۱/۵۲ واحد آنزیمی بر وزن تر حاصل شد که به میزان ۲۷/۹ درصد افزایش داشته است (شکل ۱). افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز منجر به از بین رفتن پراکسید هیدروژن تولیدشده در سلول‌های تحت تنش می‌شود از این‌رو باعث محدود شدن آسیب سلولی و افزایش ظرفیت اکسیداتیو گیاهان جهت مقابله با تنش خشکی می‌گردد (Nojavan and Khorshidi, 2006). Zafari و همکاران (۲۰۲۰) طی مطالعه‌ای که بر روی خصوصیات بیوشیمیایی گیاه گلرنگ تحت تنش خشکی انجام دادند عنوان کردند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و میزان پرولین تحت تنش خشکی افزایش یافت. میزان فعالیت در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تحت تنش خشکی در گیاه کرچک در محیط در شیشه (In vitro) افزایش یافت (de Araujo Silva et al., 2016). در مطالعه‌ای که بر روی نخود تحت تنش خشکی صورت گرفت میزان کاتالاز با افزایش شدت تنش افزایش یافت و این افزایش

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی اکوتیپ‌های مختلف کرچک در سطوح مختلف خشکی

منابع تغییر	درجه آزادی	کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	مالون دی آلدید	پرویلین	تعداد برگ	ارتفاع بوته	قطر ساقه
خشکی	۴	۹۲۷۷/۷۸**	۱۷۴۰۳/۵۷**	۸۰۸۷/۳۲**	۵۹۲۱۱۳/۸۸**	۴/۲۰۷۵**	۳۰۲۷/۶۹**	۴۲۶۳۵/۷۷**	۸۱۲/۲۷**
اکوتیپ	۲۱	۶۵۴۹/۷۹**	۹۸۱۹/۲۷**	۶۲۰۵/۸۶**	۳۸۹۶۳۲/۴۲**	۴/۸۹۱۹**	۸۴۴/۰۷**	۷۲۸۳/۱۳**	۱۶۹/۴۰**
خشکی × اکوتیپ	۸۴	۱۲۵۷/۵۴**	۱۵۹۴/۰۲**	۱۱۶۷/۷۳**	۵۱۷۵۷/۰۵**	۰/۶۱۲۰**	۳۴/۹۲**	۱۳۳۵/۲۹**	۲۰/۵۰**
خطا	۲۲۰	۴/۷۴	۳/۲۴	۵/۲۰	۲۱/۴۰	۰/۰۰۰۴	۲/۷۱	۱۱/۴۴	۰/۳۷
ضریب تغییرات	-	۶/۴۴	۴/۲۳	۷/۰۷	۱/۸۷	۲/۵۷	۱۴/۳۹	۷/۳۵	۱۰/۰۳

** معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱ * معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵



شکل ۱- مقایسه میانگین بین گروهی آنزیم های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش خشکی و نرمال. میانگین های دارای حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد معنی دار نمی باشند.

استفاده می نماید و محل فعالیت آن در سیتوسول است (Dixon *et al.*, 1998). فعالیت این آنزیم به همراه مکانیسم های دفاعی دیگر در سیتوسول به ثبات پایداری در این بخش کمک قابل توجهی می نماید (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۸). امینی و همکاران (۱۳۹۵) در بررسی تغییرات پروتئین و سیستم آنتی اکسیدانی خیار را در پاسخ به تنش خشکی نشان دادند که میزان گایاکول پراکسیداز تحت تنش خشکی در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافت.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز: مقایسه میانگین بین گروه ها در شرایط نرمال و تنش نشان داد که کمترین میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز تحت شرایط نرمال و تنش از گروه اول (حساس) به ترتیب ۲۸/۸۵ و ۱۲/۹۵ و بیشترین میزان فعالیت نیز در شرایط نرمال و تنش از گروه سوم (مقاوم) به ترتیب ۳۸/۹۳ و ۷۱/۴۵ بدست آمد. میزان فعالیت این آنزیم در شرایط

در ارقام متحمل بیشتر از ارقام حساس بود که با نتایج این آزمایش مطابقت داشت (رضایی نیا و همکاران، ۱۳۹۸). در بررسی که بر روی گیاه گلرنگ تحت تنش کم آبی صورت گرفت، نتایج نشان داد که اثر متقابل تنش کمبود آب و رقم اثر معنی داری بر روی کاتالاز و محتوای مالون دی آلدید دارد. در واقع تنش کم آبی در مقایسه با تیمار شاهد به میزان قابل توجهی فعالیت آنتی اکسیدانی ها را افزایش داد (Sajedi *et al.*, 2012).

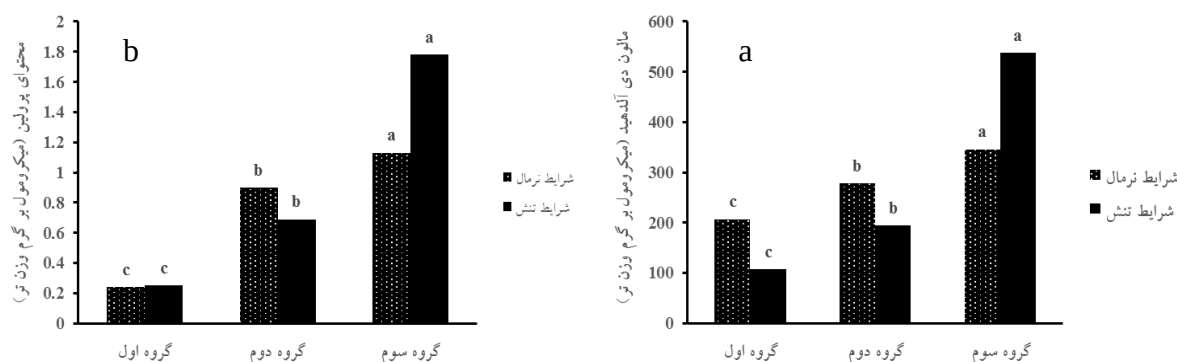
آنزیم گایاکول پراکسیداز: بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در شرایط نرمال و تنش از گروه سوم (مقاوم) به ترتیب ۶۱/۱۸ و ۸۸/۱۰ و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در شرایط نرمال و تنش از گروه اول (حساس) به ترتیب ۴۳/۴۷ و ۱۷/۸۳ حاصل گردید که افزایش فعالیت این آنزیم در شرایط نرمال و تنش به ترتیب به میزان ۲۸/۹۴ و ۷۰/۲۷ درصد بود (شکل ۱). گایاکول پراکسیداز از گلو تاتیون به عنوان کوفاکتور

نرمال ۲۵/۸۹ و تحت تنش ۸۱/۸۷ درصد افزایش نشان داد (شکل ۱). از نظر محققان یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه که احیاءکننده بسیاری از رادیکال‌های آزاد به‌ویژه پراکسید هیدروژن عمل می‌کند آنزیم آسکوربات پراکسیداز است از این رو می‌تواند خسارت‌های ناشی از تنش اکسیداتیو را به حداقل برساند (کافی و همکاران، ۱۳۹۷). Khosrowshahi و همکاران (۲۰۲۰) تغییرات آنتی‌اکسیدان‌ها و رنگدانه‌های برگ در گیاه روغنی گلرنگ (*Carthamus tinctorious* L.) را تحت تنش خشکی مطالعه نمودند و نتایج‌شان بیانگر این بود که فعالیت آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز، مالون دی‌آلدهید و محتوای پرولین تحت تنش خشکی افزایش یافت و با پژوهش حاضر همخوانی داشت. ElSayed و همکاران (۲۰۱۹) نیز در بررسی تأثیر تنش خشکی بر روی پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه دارویی خار مریم نتایج نشان دادند تحت تنش خشکی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز افزایش می‌یابد. در همین راستا سید ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۶) در بررسی اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در دو رقم حساس و متحمل در گیاه روغنی کلزا نشان دادند که میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز تحت تنش خشکی در هر دو رقم افزایش یافت.

محتوای مالون دی‌آلدهید: براساس مقایسه میانگین بین گروه‌ها کمترین میزان محتوای مالون دی‌آلدهید در شرایط نرمال و تنش از گروه اول (حساس) به‌ترتیب ۲۰۷/۰۳ و ۱۰۷/۳۵ میکرومول بر گرم وزن تر و همچنین بیشترین میزان در شرایط نرمال و تنش از گروه سوم (مقاوم) به‌ترتیب ۳۴۶ و ۵۳۸/۲۱ بدست آمد. میزان این صفت به‌ترتیب در شرایط نرمال و تنش ۴۰/۱۶ و ۸۰/۰۵ درصد میکرومول بر گرم وزن تر افزایش نشان داد (شکل ۲). مالون دی‌آلدهید فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غیراشباع سلول است. از اینرو از آن به عنوان یک بیومارکر به‌منظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تنش اکسند در سلول استفاده می‌شوند (Sofa et al., 2004). بررسی تأثیر تنش خشکی بر مقادیر مالون دی‌آلدهید

در گیاه روغنی سویا نشان داد که با افزایش تنش میزان مالون دی‌آلدهید افزایش یافت (بحرالعلومی و همکاران، ۱۳۹۸). Cao و همکاران (۲۰۱۷) پاسخ گیاه بادام را تحت تنش خشکی بررسی کردند آنها مشاهده کردند که میزان مالون دی‌آلدهید و پرولین و همچنین فعالیت آنزیم‌های مهارکننده ROS مانند آسکوربات و کاتالاز افزایش یافت. نتایج تحقیقات روی ارقام گلرنگ نشان‌دهنده افزایش مالون دی‌آلدهید در ارقام تحت تنش آبی بود بطوریکه تنش آبی با افزایش در محتوای رادیکال‌های آزاد اکسیژن، باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا سلولی شده و در نتیجه موجب افزایش در محتوای مالون دی‌آلدهید شد (Hojati et al., 2011).

محتوای پرولین: با توجه به مقایسه میانگین بین گروه‌ها می‌توان گفت که کمترین میزان پرولین در شرایط نرمال و تنش به‌ترتیب از گروه اول (حساس) ۰/۲۴ و ۰/۲۵ میکرومول بر گرم وزن تر و همچنین بیشترین میزان در این شرایط از گروه سوم (مقاوم) به‌ترتیب ۱/۱۳ و ۱/۷۸ میکرومول بر گرم وزن تر بدست آمد (شکل ۲). افزایش پرولین در گیاهانی که تحت تنش قرار می‌گیرند به‌واسطه سنتز پرولین و غیرفعال شدن تخریب آن است، همچنین در شرایط تنش، افزایش پرولین باعث محافظت غشای سلولی، آنزیم‌های سیتوپلاسمی، پروتئین‌ها و حذف رادیکال‌های آزاد می‌شود (Liang et al., 2013). بنابراین افزایش میزان پرولین و القای فعالیت آنزیم‌های ضداکسیداسیون از جمله پاسخ‌های گیاهان در برابر تنش خشکی است. در بعضی از گیاهان تغییرات محتوای پرولین با توانایی آنها به‌منظور تحمل یا سازگاری به شرایط تنش ارتباط دارد و می‌توان آنرا به‌عنوان یک شاخص برای انتخاب گیاهان مقاوم در برابر تنش استفاده نمود (Niknam et al., 2006). Emami Bistgani و همکاران (۲۰۱۷) در تحقیقی که بر روی گیاه دارویی آویشن دناپی انجام دادند نشان دادند که محتوای پرولین در شرایط تنش بیشتر از محتوای پرولین در شرایط نرمال است. نتایج این پژوهش با نتایج Karimi و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی اثرات کم آبی بر روی محتوای پرولین و



شکل ۲- مقایسه میانگین بین گروهی محتوای مالتون دی آلدئید (a) و پرولین (b) در شرایط تنش خشکی و نرمال. میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار نمی‌باشند.

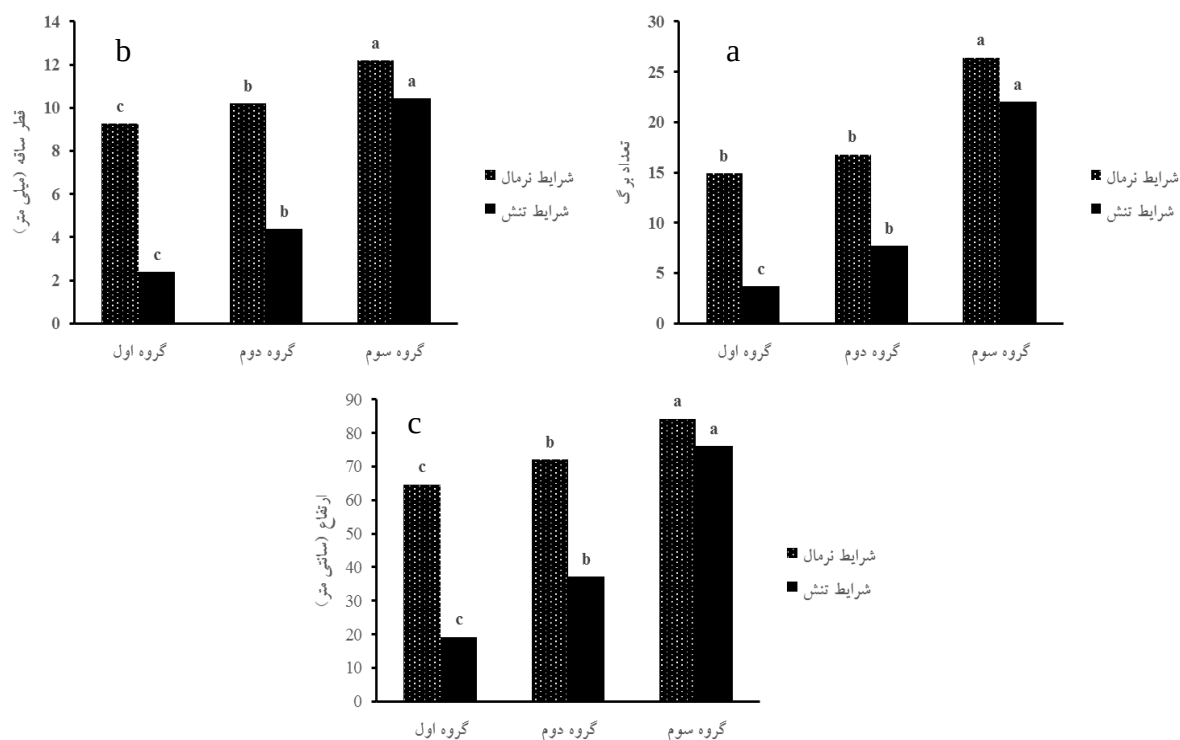
یافت. در آزمایش دیگری که بر روی گیاه کلزا محققان بیان داشتند قطع آبیاری در مراحل مختلف رشدی باعث کاهش ارتفاع بوته نسبت به تیمار شاهد (آبیاری کامل) گردید (معتکفی و همکاران، ۱۳۹۸).

قطر ساقه: نتایج مقایسه میانگین بین گروه‌ها بیانگر این است که کمترین میزان قطر ساقه در شرایط نرمال و تنش به گروه اول (حساس) ۹/۲۵ و ۲/۳۸ و بیشترین میزان به ترتیب به گروه سوم (مقاوم) ۱۲/۱۸ و ۱۰/۴۳ میلی‌متر است. به‌طورکلی می‌توان گفت اختلاف بین اکوتیپ‌های مقاوم و حساس در شرایط نرمال و حساس به ترتیب ۲۴/۰۵ و ۸۰/۵ درصد اختلاف داشتند (شکل ۳). یکی از صفات مرتبط با شدت تنش خشکی قطر ساقه می‌باشد (Sadras et al., 1993). تنش خشکی با تأثیر بر اندازه سلول‌ها در قسمت‌های حساس به کمبود آب و فشار تورژسانس بر پتانسیل آب در حال رشد، باعث کاهش قطر ساقه می‌گردد (Christian, 1997). تنش خشکی با توجه به تأثیر منفی که بر روی قطر ساقه، ارتفاع بوته و تعداد برگ در بوته می‌گذارد باعث کاهش عملکرد گیاه می‌گردد (Ghassemi et al., 2019). بررسی صفات مورفوفیزیولوژیکی در گیاه روغنی کلزا نشان داد که با افزایش سطوح تنش خشکی قطر ساقه کاهش یافت البته این نکته را بایستی متذکر شد که بین آبیاری نرمال و تنش ملایم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (مام‌نبی و همکاران، ۱۳۹۹). در تحقیقی دیگر Ohashi و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند که تنش

قندهای محلول گیاه کرچک بررسی نمودند همخوانی داشت. بین تجمع پرولین و تحمل به تنش خشکی رابطه مثبت وجود دارد بنابراین از این ویژگی می‌توان به‌اصلاح گیاهان برای تحمل به خشکی استفاده کرد (Mwenye et al., 2016).

ارتفاع بوته: کمترین میزان ارتفاع گیاه براساس مقایسه میانگین بین گروه‌ها در شرایط نرمال و تنش به ترتیب از گروه اول (حساس) ۶۴/۶۹ و ۱۹/۲۲ و بیشترین میزان به ترتیب به گروه سوم (مقاوم) با ۸۴/۳ و ۷۶/۰۹ سانتی‌متر بدست آمد. به عبارت دیگر می‌توان گفت که اختلاف بین گروه مقاوم و حساس در شرایط نرمال و تنش به ترتیب ۲۳/۲۶ و ۷۴/۷۴ درصد بود (شکل ۳). Koutroubas و همکاران (۱۹۹۹) عنوان کردند که صفت ارتفاع در گیاه کرچک اغلب به ژنوتیپ بستگی دارد ولی تحت تأثیر شرایط آزمایش نیز قرار می‌گیرد. تنش خشکی با کاهش تقسیم سلولی و همچنین توسعه و دوام سطح برگ‌ها باعث کاهش ارتفاع بوته می‌گردد (سید احمدی و همکاران، ۱۳۹۴). بررسی اکوتیپ‌های مختلف کرچک به تنش خشکی در اصفهان و شهرکرد نشان داد که با افزایش سطح تنش ارتفاع گیاه کاهش یافت (نیک‌نشان و همکاران، ۱۳۹۴).

عباسی صدر و همکاران (۱۳۹۷) در آزمایشی که به‌منظور بررسی اثر تنش خشکی بر گیاه کرچک (رقم محلی اصفهان) انجام دادند، بیان کردند اعمال تنش خشکی در سطوح مختلف باعث کاهش ارتفاع گیاه گردید و کمترین میزان ارتفاع به سطح تنش شدید (۱۳۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر) اختصاص



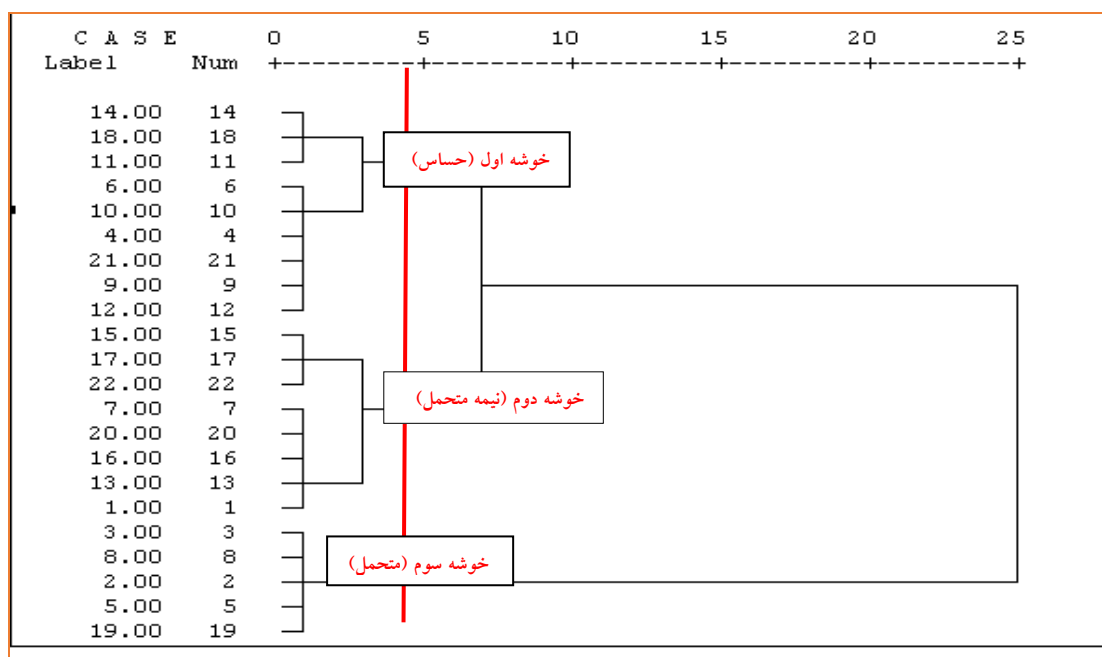
شکل ۳- مقایسه میانگین بین گروهی صفات تعداد برگ (a)، قطر ساقه (b) و ارتفاع بوته (c) در شرایط تنش خشکی و نرمال. میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار نمی‌باشند.

افزایش شدت تنش خشکی در گیاه کرچک تعداد برگ کاهش یافت (نیک نشان و همکاران، ۱۳۹۴).

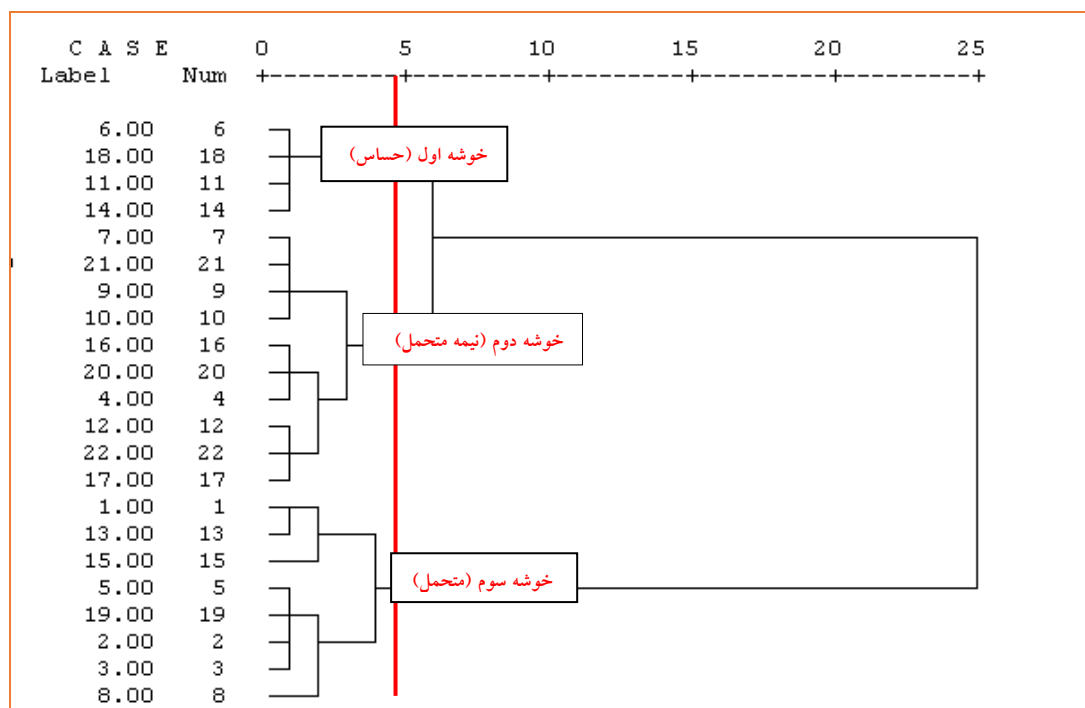
نتایج حاصل از تجزیه کلاستر (خوشه‌بندی سلسله مراتبی) در شرایط نرمال و تنش خشکی: در این تحقیق از روش تجزیه کلاستر وارد برای انتخاب محل دقیق برش و تعیین تعداد مطلوب خوشه‌ها براساس معیار فاصله اقلیدسی استفاده گردید. در شرایط خشکی تجزیه کلاستر کل ارقام در سه خوشه دسته‌بندی شدند. خوشه ارقام متحمل یک زیرخوشه شامل اکوتیپ‌های (۳، ۸، ۲، ۵، ۱۹) بود. خوشه ارقام حساس دارای دو زیرخوشه (۱۴، ۱۸، ۱۱) و (۶، ۱۰، ۴، ۲۱، ۹، ۱۲) بودند. و خوشه ارقام نیمه‌متحمل نیز دارای دو زیرخوشه (۱۵، ۱۷، ۲۲) و (۷، ۲۰، ۱۶، ۱۳، ۱) بود (شکل ۴).

در شرایط نرمال کل ارقام در سه خوشه قرار گرفتند که خوشه اول شامل اکوتیپ‌های (۶، ۱۸، ۱۱، ۱۴)، خوشه دوم شامل سه زیر خوشه (۷، ۲۱، ۹، ۱۰)، (۱۶، ۲۰، ۴) و (۱۲، ۲۲، ۱۷) و خوشه سوم شامل دو زیر خوشه (۱، ۱۳، ۱۵) و (۵، ۱۹،

خشکی منجر به کاهش قطر ساقه در گیاه روغنی سویا می‌شود که هم‌راستا با نتایج حاصل از این آزمایش است. **تعداد برگ:** کمترین میزان تعداد برگ در شرایط نرمال و تنش براساس مقایسه میانگین بین گروه‌ها از گروه اول (حساس) به- ترتیب ۱۴/۹۱ و ۳/۶۶ و بیشترین میزان این صفت از گروه مقاوم (سوم) در شرایط نرمال و تنش با میانگین ۲۶/۴۱ و ۲۲/۰۳ حاصل شد. در مجموع می‌توان اظهار داشت که اختلاف بین گروه حساس و مقاوم در شرایط نرمال و تنش ۴۳/۵۴ و ۸۳/۳۸ درصد متغیر بود (شکل ۳). رشد رویشی اولیه جهت استقرار کرچک بسیار مهم است. رشد سطح برگ و تعداد برگ مستقیماً به ظرفیت گیاه برای دریافت نور و انجام پدیده فتوسنتز مربوط است (Severino and Auld, 2013). تنش خشکی منجر به کاهش سرعت تولید برگ و سطح برگ در گیاه می‌شود که این امر بدلیل کاهش فعالیت فتوسنتزی در برگ‌های آسیب‌دیده است. به‌طور کلی تنش کم آبی باعث کاهش برگ سبز در گیاه می‌گردد (Yunusa et al., 2014). با



شکل ۴- دندوگرام حاصل از بررسی اکوتیپ‌های مختلف کرچک تحت تنش خشکی



شکل ۵- دندوگرام حاصل از بررسی ارقام مختلف کرچک تحت شرایط نرمال

۳، ۲، ۸) بود (شکل ۵).

نتایج همبستگی بین صفات: ضریب همبستگی بین صفات در شرایط بدون تنش با استفاده از مقادیر صفات هر اکوتیپ در سطح صفر (آبیاری کامل) محاسبه گردید و نتایج نشان داد بین

آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز همبستگی مثبت و معنی‌دار ($r=0/997$) وجود داشت اما بین مالون دی‌آلدهید و گایاکول پراکسیداز همبستگی معنی‌دار ($r=-0/236$) مشاهده نگردید (جدول ۴).

جدول ۴- ضریب همبستگی بین صفات در شرایط نرمال (بدون تنش)

گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	مالون دی‌آلدهید	پرولین	ارتفاع بوته	قطر ساقه	تعداد برگ
گایاکول پراکسیداز	۱						
آسکوربات پراکسیداز	۰/۶۴۴ **	۱					
کاتالاز	۰/۶۴۲ **	۰/۹۹۷ **	۱				
مالون دی‌آلدهید	۰/۴۱۱	۰/۵۰۰ *	۰/۴۸۴ *	۱			
پرولین	۰/۵۴۵ **	۰/۵۳۱ *	۰/۵۰۹ *	۰/۴۵۰ *	۱		
ارتفاع بوته	۰/۴۱۵	۰/۵۶۸ **	۰/۵۵۷ **	۰/۳۲۳	۰/۴۰۰	۱	
قطر ساقه	۰/۷۵۲ **	۰/۷۳۰ **	۰/۷۱۷ **	۰/۶۲۴ **	۰/۵۹۱ **	۰/۴۹۷ *	۱
تعداد برگ	۰/۱۸۳	۰/۵۰۸ *	۰/۴۸۱ *	۰/۴۰۱	۰/۲۳۵	۰/۷۸۲ **	۰/۴۹۶ *

** همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ * همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵

جدول ۵- ضریب همبستگی بین صفات در شرایط تنش خشکی

گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	مالون دی‌آلدهید	پرولین	ارتفاع بوته	قطر ساقه	تعداد برگ
گایاکول پراکسیداز	۱						
آسکوربات پراکسیداز	۰/۸۹۶ **	۱					
کاتالاز	۰/۸۸۵ **	۰/۹۹۷ **	۱				
مالون دی‌آلدهید	۰/۶۴۵ **	۰/۸۱۲ **	۰/۸۱۴ **	۱			
پرولین	۰/۷۹۷ **	۰/۷۹۰ **	۰/۷۸۴ **	۰/۶۳۷ **	۱		
ارتفاع بوته	۰/۴۶۰ **	۰/۴۴۵ *	۰/۴۳۵ *	۰/۲۹۲	۰/۴۰۶	۱	
قطر ساقه	۰/۸۲۱ **	۰/۸۴۲ **	۰/۸۴۴ **	۰/۶۰۴ **	۰/۶۰۰ **	۰/۴۵۳ *	۱
تعداد برگ	۰/۴۳۱ **	۰/۵۴۳ **	۰/۵۶۲ **	۰/۴۹۰ *	۰/۴۵۱	۰/۶۹۱ **	۰/۶۰۵ **

** همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ * همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵

در شرایط تنش خشکی نیز برای محاسبه ضریب همبستگی بین صفات از میانگین سطوح خشکی هر اکوتیپ استفاده گردید و مشخص شد در شرایط تنش خشکی بیشترین همبستگی مثبت و معنی‌دار بین میزان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز همبستگی مثبت و معنی‌دار ($r=0/997$) وجود داشت و کمترین همبستگی معنی‌دار و مثبت بین محتوای مالون دی‌آلدهید و پرولین ($r=-0/637$) بود، همچنین بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان مالون دی‌آلدهید همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت

این موضوع بیانگر این موضوع است که نخستین سد دفاعی در مواجهه با تنش اکسیداتیو در گیاهان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند. هنگامی که دفاع آنتی‌اکسیدانی کاهش یا رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد، در این حالت تنش اکسیداتیو ایجاد می‌شود که این تنش منجر به آسیب بافت‌ها می‌شود. زمانی که تنش اکسیداتیو اتفاق می‌افتد، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، لیپیدها افزایش می‌یابد و در اثر حمله رادیکال‌های آزاد به لیپیدها، آلدهیدهای متفاوتی از جمله مالون

دی‌آلدئید تولید می‌شود (لادن مقدم و قربانی قوژدی، ۱۳۸۴). بین قطر ساقه و ارتفاع بوته نیز در شرایط تنش همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت که می‌توان اظهار داشت قطر ساقه همانند ارتفاع بوته تحت تأثیر تقسیم و توسعه سلولی در شرایط تنش خشکی قرار می‌گیرد که احتمالاً به دلیل اختلال در فتوسنتز، تعرق و فرایندهای متابولیکی است (Sarker et al., 2005). که این نتیجه همراستا با پژوهشی که توسط نیک نشان و همکاران (۱۳۹۴) در گیاه کرچک تحت تنش خشکی انجام شد، می‌باشد (جدول ۵).

نتیجه‌گیری

در آزمایش حاضر تنش خشکی باعث افزایش معنی‌دار آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، محتوای مالون دی‌آلدئید و پرولین در تمامی اکوتیپ‌های مورد مطالعه شد، از طرفی صفات ارتفاع بوته، قطر ساقه و تعداد

منابع

- اسفندیاری، ا.، محبوب، س. و شکاری، ف. (۱۳۸۸) اصول فیزیولوژی گیاهی. انتشارات عمیدی تبریز ۱۵۹-۱۵۶.
- امینی، ف.، عسکری، م. و حقیر، م. (۱۳۹۵) تغییرات پروتئین و سیستم آنتی‌اکسیدانتی خیار رقم اصفهانی در پاسخ به تنش خشکی. سلول و بافت ۷: ۳۷۵-۳۸۵.
- بحرالعلوم، س. م. ج.، رائینی سرجاز، م. و پیردشتی، ه. ا. (۱۳۹۸) تأثیر تنش خشکی بر فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، مقادیر مالون دی‌آلدئید، پروتئین محلول و نیتروژن کل برگ سویا (*Glycine max L.*) تنش‌های محیطی در علوم زراعی ۱۲: ۲۸-۱۷.
- توپچی خسروشاهی، ژ.، صالحی لیسار، س. ی.، قاسمی گلعدانی، ک. و متفکر آزاد، ر. (۱۳۹۸) تأثیر پلی‌آمین‌ها بر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) در شرایط تنش خشکی. نشریه پژوهش‌های گیاهی ۲۶: ۱۷۱-۱۵۷.
- رضایی‌نیا، م.، بی‌همتا، م. ر.، پیغمبری، س. ع. و عباسی، ع. ر. (۱۳۹۸) تأثیر تنش خشکی بر فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و صفات فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های نخود (*Cicer arietinum L.*). پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی ۱۱: ۲۲-۱۱.
- سید ابراهیمی، ف.، حسنی کومله، ح.، اعلمی، ع. و رضادوست، م. ح. (۱۳۹۶) اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در دو رقم حساس و متحمل کلزا (*Brassica napus L.*) در کشت سوسپانسیون سلولی. دو فصلنامه فناوری تولیدات گیاهی ۹: ۱۹۱-۱۸۱.
- سیداحمدی، ع. ر.، بخشنده، ع. م. و قرینه، م. ح. (۱۳۹۴) ارزیابی خصوصیات فیزیولوژیکی و عملکرد دانه ارقام کلزا در شرایط تنش خشکی پایان فصل در شرایط آب‌وهوایی اهواز. پژوهش‌های زراعی ایران ۱۳: ۸۰-۷۱.
- شعبانی، ع.، کامگار حقیقی، ع. ا.، سپاسخواه، ع. ر.، امامی، ی. و هنر، ت. (۱۳۸۸) اثر تنش آبی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه کلزا (*Brassica napus L.*). مجله علوم آب و خاک ۱۳: ۴۲-۳۱.

برگ با افزایش سطوح تنش خشکی کاهش معنی‌دار داشت. براساس میانگین‌های بین گروهی در هر دو شرایط نرمال و تنش بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، محتوای مالون دی‌آلدئید، پرولین و صفات مورفولوژیکی (ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد برگ) از گروه سوم (مقاوم) بدست آمد که نشان‌دهنده سازوکار بهتر این گروه در تحمل به تنش خشکی نسبت به گروه اول (حساس) بوده است. با توجه به نتایج بدست آمده بیشترین مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز، گایاکول و آسکوربات پراکسیداز، ارتفاع بوته، قطر ساقه و تعداد برگ مربوط به اکوتیپ ۵ و بیشترین مقدار مالون دی‌آلدئید و پرولین مربوط به اکوتیپ ۱۹ از گروه سوم (مقاوم) بود که به‌عنوان اکوتیپ‌های مقاوم به تنش معرفی شدند. در گروه اول (حساس) اکوتیپ‌های ۱۸ و ۱۴ براساس صفات مورد مطالعه به‌عنوان حساس‌ترین اکوتیپ‌ها معرفی شدند.

- عباسی صدر، س.، شرفی، س. و حسن‌زاده قورت تپه، ع. (۱۳۹۷) اثر تنش خشکی و پرایمینگ بذر بر خصوصیات رویشی و زایشی بذر کرچک (*Ricinus communis* L.) رقم محلی اصفهان. اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی (علوم کشاورزی) ۱۲: ۸۸-۷۵.
- کافی، م.، برزویی، ا.، صالحی، م.، کمندی، ع.، معصومی، ع. و نباتی، ج. (۱۳۹۷) فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. جلد ۱۴، انتشارات جهاد دانشگاهی (دانشگاه فردوسی مشهد)، مشهد.
- لادن مقدم، ع. ر. و قربانی قوژدهی، ح. (۱۳۸۴) مقدمه‌ای بر تنش‌های اکسایشی و کرنش‌های گیاهی. چاپ اول، انتشارات دواوین.
- مام‌نبی، س.، نصراله‌زاده، ن.، قاسمی گل‌عدانی، ک. و راعی، ی. (۱۳۹۹) صفات مورفوفیزیولوژیکی، عملکرد دانه و روغن کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تأثیر تنش خشکی و کودهای شیمیایی و زیستی. دانش کشاورزی و تولید پایدار ۳۰: ۳۷۸-۳۵۹.
- محمدی، ن.، باقی‌زاده، ا. و رجایی، پ. (۱۳۹۴) تأثیر بتا آمینوبوتیریک اسید بر روی محتوای آب نسبی، تنظیم اسمزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش خشکی. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) (علمی) ۲۸: ۸۶۰-۸۴۴.
- معتکفی، م.، قنبری، ا.، موسوی‌نیک، م. و سیروس‌مهر، ع. ر. (۱۳۹۸) تأثیر محرک رشد آلی بر عملکرد، اجزای عملکرد، درصد روغن و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک کلزا تحت شرایط تنش خشکی. به‌زراعی کشاورزی ۲: ۳۷۷-۳۶۷.
- نیک‌نشان، پ.، تدین، ع.، رفیعی‌الحسینی، م. و بحرینی‌نژاد، ب. (۱۳۹۴) پاسخ اکوتیپ‌های مختلف کرچک به تنش کم آبی در شرایط آب و هوایی اصفهان و شهرکرد. به‌زراعی کشاورزی ۱۷: ۱۰۲۳-۱۰۱۵.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Akpan, U. G., Jimoh, A. and Mohammad, A. D. (2006) Extraction, characterization and modification of castor seed oil. *Leonardo Journal Science* 8: 43-52.
- Bates, L. S. (1973) Rapid determination of free proline for water- stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bistgani, Z. E., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A., Pirbalouti, A. G. and Hashemi, M. (2017) Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *The Crop Journal* 5: 407-415.
- Cao, Y., Luo, Q., Tian, Y. and Meng, F. (2017) Physiological and proteomic analyses of the drought stress response in *Amygdalus mira* (Koehne) Yu et Lu roots. *BMC Plant Biology* 17: 53.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P. and Pereira, J. S. (2003) Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Christian, K. R. (1997) Effects of environment on the growth of alfalfa. *Advances in Agronomy* 29: 183-219.
- Covarrubias, A. A. and Reyes, J. L. (2010) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environment* 33: 481-489.
- de Araujo Silva, M. M., Willadino, L., dos Santos, D. Y. A. C., Oliveira, A. F. M. and Camara, T. R. (2016) Response of *Ricinus communis* L. to in vitro water stress induced by polyethylene glycol. *Plant Growth Regulation* 78: 195-204.
- Dixon, D. P., Cummins, I., Cole, D. J. and Edwards, R. (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 258-266.
- ElSayed, A. I., El-hamahmy, M. A., Rafudeen, M. S., Mohamed, A. H. and Omar, A. A. (2019) The impact of drought stress on antioxidant responses and accumulation of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn). *Plants* 8: 611.
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S. A., Bakhshandeh, A. and Ghasemi Pirbalouti, A. (2017) The effect of drought stress and elicitor of chitosan on photosynthetic pigments, proline, soluble sugars and lipid peroxidation in *Thymus deanensis* Celak. In *Shahrekord climate. Environmental Stresses in Crop Sciences* 10: 12-19.
- Ghassemi, S., Ghassemi-Golezani, K. and Zehtab-Salmasi, S. (2019) Changes in antioxidant enzymes activities and physiological traits of ajowan in response to water stress and hormonal application. *Scientia Horticulturae* 24: 957-964.
- Heath, 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.
- Hojati, M., Modarres-Sanavy, S. A. M., Karimi, M. and Ghanati, F. (2011) Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 105-112.

- Izabela, M., Ilona, C. M., Edyta, S., Maria, F., Stanisław, G. and Maciej, T. G. (2013) Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought-susceptible and drought-resistant wheat genotypes. *Acta. Physiologiae Plantarum* 35: 451-461.
- Karimi, S., Abbaspour, H., Sinaki, J. M. and Makarian, H. (2012) Effects of water deficit and chitosan spraying on osmotic adjustment and soluble protein of cultivars castor bean (*Ricinus communis* L.). *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 8.
- Khosrowshahi, Z. T., Ghassemi-Golezani, K., Salehi-Lisar, S. Y. and Motafakkerazad, R. (2020) Changes in antioxidants and leaf pigments of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) affected by exogenous spermine under water deficit. *Biologia Futura* 71: 313-321.
- Koutroubas, S. D., Papakosta, D. K. and Doitsinis, A. (1999) Adaptation and yielding ability of Castor plant (*Ricinus communis* L.) genotypes in a Mediterranean climate. *European Journal of Agronomy* 11: 227-237.
- Li, Y., Ye, W., Wang, M. and Yan, X. (2009) Climate change and drought: A risk assessment of crop-yield impacts. *Climate Research* 39: 31-46.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K. and Becker, D. F. (2013) Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and Redox Signaling* 19: 998-1011.
- Mates, J. M. and Perez-Gomez, C. (1999) Antioxidant enzymes and human disease. *Chemical Biochemistry* 32: 595-603.
- Mattoo, A. K., Upadhyay, R. K. and Rudrabhatla, S. (2014) Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants: A functional Genomic Perspective. Springer, New York.
- Matysik, J., Alia Balu, B. and Mohanty, P. (2012) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* 82: 525-531.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mwenye, O. J., Van Rensburg, L., Van Biljon, A. and Van der Merwe, R. (2016) The role of proline and root traits on selection for drought-stress tolerance in soybeans: A review. *South African Journal of Plant and Soil* 33: 245-256.
- Niknam, V., Razavi, N., Ebrahimzadeh, H. and Sharifzadeh, B. (2006) Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents, and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two *Trigonella* species. *Biologia Plantarum* 50: 591-596.
- Nojavan, A. M. and Khorshidi, M. (2006) An investigation of vanillin imposed oxidative stress in corn (*Zea mays* L.) and the activities of antioxidative enzymes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9: 34-38.
- Ohashi, Y., Nakayama, N., Saneoka, H. and Fujita, K. (2006) Effects of drought stress on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and stem diameter of soybean plants. *Biologia Plantarum* 50: 138-141.
- Sadras, V. O., Connor, D. J. and Whitfield, D. M. (1993) Yield, yield components and sourcesink relationships in water-stressed sunflower. *Field Crops Research* 31: 27-39.
- Sajedi, N. A., Ferasat, M., Mirzakhani, M. and Boojar, M. M. A. (2012) Impact of water deficit stress on biochemical characteristics of safflower cultivars. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18: 323-329.
- Sarker, B. C., Hara, M. and Uemura, M. (2005) Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress. *Science Horticulture* 103: 387-402.
- Severino, L. S. and Auld, D. L. (2013) A framework for the study of the growth and development of castor plant. *Industrial Crops and Products* 46: 25-38.
- Shrirame, H. Y., Panwar, N. L. and Bamniya, B. R. (2011) Bio diesel from castor oil-A green energy option. *Low Carbon Economy* 2: 1.
- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. (2004) Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science* 166: 293-302.
- Tang, W. and Newton, R. J. (2005) Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation* 46: 31-43.
- Weiss, E. A. (2000) *Oilseed Crops*, Blackwell Science.
- Yang, G., Yu, L., Zhang, K., Zhao, Y., Guo, Y. and Gao, C. (2017) A ThDREB gene from *Tamarix hispida* improved the salt and drought tolerance of transgenic tobacco and *T. hispida*. *Plant Physiology Biochemistry* 113: 187-197.
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoforms in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123: 223-234.
- Yunusa, M., Ephraim, B. and Abdullahi, S. (2014) Effects of moisture stress on the growth parameters of soybean genotypes. *Discourse Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2: 142-148.
- Zafari, M., Ebadi, A., Jahanbakhsh, S. and Sedghi, M. (2020) Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) biochemical properties, yield, and oil content affected by 24-epibrassinosteroid and genotype under drought stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68: 6040-6047.

Effect of drought stress on antioxidant enzyme activities, proline content and some morphological traits in different castor bean ecotypes (*Ricinus communis* L.)

Sara Sharifi Soltani¹, Seyed Kamal Kazemitabar^{*1}, Gholam Ali Ranjbar¹, Ali Pakdin Parizi², Hamid Najafi Zarini¹

¹ Department of Genetics and Plant breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

² Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari

(Received: 06/05/2021, Accepted: 04/09/2021)

Abstract:

Drought is one of the most serious threats in agricultural production worldwide, and climate changes is likely to exacerbate this threat. In order to evaluate the drought tolerance of different castor ecotypes, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications in Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University. The first factor included 22 castor ecotypes and the second factor was drought stress with 5 levels, full irrigation, four levels (irrigation was cut at the primary of spike growth) (11, 22, 33, 44 days after Irrigation cut off). Experimental traits included the activity of the antioxidant enzymes catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase, the biochemical activity of malondialdehyde (MDA), proline content, plant height, stem diameter and number of leaves. Cluster analysis classified the ecotypes into three clusters under normal and drought stress conditions. The results showed that the activity of catalase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, Malondialdehyde and Proline content under drought stress conditions of the third group (Tolerant) compared to the first group (Sensitive) were increased 81.5, 81.87, 70.27, 80.05, and 81.87, respectively. On the other hand, the differences between tolerant and sensitive groups at stress conditions in plant height, stem diameter and number of leaves were 74.74, 80.50 and 83.38%, respectively. The highest correlation under drought stress conditions was observed between Catalase and Ascorbate peroxidase ($r = 0.997$) and the lowest non-significant correlation was observed between proline and plant height ($r = 0.292$). According to the results, in terms of the studied traits 5 and 19 ecotypes were introduced as drought tolerant ecotypes.

Keywords: Osmolite, Ascorbate, Peroxidase, Lipid Peroxidation, Catalase, Guaiacol Peroxidase

Corresponding author, Email: scklkr@ymail.com