

## پاسخ فیزیولوژیکی، آنتی اکسیدانی و عملکرد سه ژنوتیپ رازیانه به استعمال خارجی پرولین در شرایط تنش رطوبتی

علی غلامی زالی و پرویز احسانزاده\*

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۲/۰۷)

### چکیده

نقش اسید آمینه پرولین به عنوان یک ملکول تعدیل کننده تنش های محیطی از جمله تنش خشکی در گیاهان بسیار حائز اهمیت است. به منظور مطالعه اثر استعمال خارجی پرولین بر پاسخ به تنش خشکی در گیاه رازیانه، اثر دو سطح آبیاری شاهد (بدون تنش) و تنش خشکی (به ترتیب ۳۵ تا ۴۵ و ۷۵ تا ۸۵ درصد تخلیه مجاز رطوبت خاک)، دو سطح پرولین (شاهد (صفر) و ۲۰ میلی مولار) بر سه ژنوتیپ رازیانه (ارومیه، شیراز و کرمان) به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کاملاً تصادفی با چهار تکرار به صورت گلدانی بررسی شد. تنش خشکی سبب کاهش غلظت رنگیزه های فتوستزی، محتوای نسبی آب برگ، فعالیت آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز، عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته و پتانسیل آب برگ، و افزایش غلظت پلی فنل ها و پرولین و فعالیت کاتالاز شد. استعمال پرولین سبب افزایش شاخص پایداری غشا، محتوای نسبی آب برگ، پتانسیل آب برگ، غلظت پلی فنل ها و پرولین، فعالیت آسکوربات پراکسیداز، عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته و کاهش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز شد. ژنوتیپ ارومیه از بیشترین محتوای رنگیزه های فتوستزی، شاخص پایداری غشا، فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برخوردار بود. در شرایط تنش تجمع پرولین درونزاد همبستگی مثبت و معنی داری با عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته نشان داد. اثر پرولین خارجی بر غلظت رنگیزه های فتوستزی بسته به سطح آبیاری و بر عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته بسته به ژنوتیپ متفاوت بود. استعمال پرولین باعث افزایش عملکرد دانه تک بوته ژنوتیپ های ارومیه (۱/۵ برابر) و شیراز (۱/۱ برابر) و کاهش آن در ژنوتیپ کرمان (۴۲/۵ درصد) شد. می توان چنین نتیجه گرفت که اگر چه تنش خشکی اثر منفی بر بسیاری از صفات رازیانه دارد ولی استعمال پرولین می تواند اثرات نامطلوب تنش را از طریق افزایش غلظت رنگیزه های فتوستزی، پلی فنل ها و پرولین و بهبود روابط آبی و فعالیت آنتی اکسیدانی در ژنوتیپ های نظیر ارومیه و شیراز تعدیل کند.

کلمات کلیدی: آنتی اکسیدان ها، پرولین، خشکی، رنگیزه های فتوستزی، عملکرد تک بوته

### مقدمه

نویا بودن کشت گسترده گیاهان دارویی و از همه مهمتر وجود ارقام و توده های محلی مقاوم به تنش های محیطی حمایت از کاشت گیاهان دارویی را ضروری می سازد. مطالعه شرایط اکولوژیکی، نیاز آبی و بررسی توجیه اقتصادی این گیاهان در

با توجه به وقوع تغییر اقلیم جهانی، در آینده بیش از پیش کمبود آب به عنوان مهمترین عامل محدود کننده تولید مطرح می شود (Chaves et al., 2009). محدودیت شدید منابع آبی و

(2014). این مکانیسم‌ها به صورت سازوکارهای انطباقی خاصی در طول زمان در گیاهان تکامل یافته‌اند. تنظیم اسمزی یکی از مکانیسم‌های کارآمد است که گیاه برای حفظ آماس سلول در شرایط کمبود آب از آن بهره می‌برد. تنظیم اسمزی حاصل تجمع مقدار زیادی از ترکیبات با جرم مولکولی کم به نام مواد محلول سازگار به خصوص اسید آمینه پرولین در سلول‌های گیاهی است (Hayat et al., 2012; Hsu et al., 2003). نقش مواد محلول سازگار در مقاومت به تنش خشکی قابل توجه است، چرا که در تنظیم بسیاری از فرآیندهای متابولیکی از جمله حمل و نقل یون‌ها نقش بسزایی دارند. پرولین در شرایط تنش با مهار گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی در حفظ ساختار پروتئینی، غشایی، کارکرد سلول و کاهش نشت الکترولیت دارد (Kaur and Asthir, 2015). مطالعات متعدد حکایت از آن دارند که در بین مواد محلول سازگار، پرولین نقش کلیدی در تنظیم اسمزی و حفظ ساختار سلولی و مهار گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌کند (Kaur and Asthir, 2015; Hsu et al., 2003)، و حتی ممکن است به عنوان منبع کربن و نیتروژن در این شرایط به کار گرفته شود (Demiral and Turkan, 2004). در سلول‌های گیاهی پرولین نقش تنظیمی مهمی در فعالیت و عملکرد آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز و مشارکت آنها در توسعه پاسخ‌های متابولیک به عوامل محیطی ایفا می‌کند (Rejeb et al., 2014). در این راستا، علی و همکاران (Ali et al., 2007) در مطالعه خود در گیاه ذرت بیان داشتند که استعمال خارجی پرولین سبب بهبود برخی پارامترهای فیزیولوژیک از جمله فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه‌ای این گیاه C<sub>4</sub> می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر، موستاکاس و همکاران (Moustakas et al., 2011) با مطالعه بر روی گیاه آرابیدوپسیس بیان داشتند که استعمال خارجی پرولین به واسطه افزایش میزان پرولین و دیگر قندهای محلول سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و نهایتاً سبب تعدیل تنش خشکی می‌شود. اسمولیت‌هایی مانند گلاسیسین بتائین، پرولین و کربوهیدرات محلول به واسطه تجمع در سلول‌های گیاهی و حفظ پتانسیل

مناطق نظیر کشورمان می‌تواند از اهمیت بالایی برخوردار باشد (عسکری و احسان‌زاده، ۱۳۹۴). رازیانه با نام علمی (*Foeniculum vulgare* Mill.) یکی از مهمترین گیاهان دارویی خانواده چتریان می‌باشد، که وجود منابع ژرم پلاسم گسترده، وجود تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها، نیاز آبی کم و مقاومت به خشکی بر اهمیت این گیاه افزوده است (Askari and Ehsanzadeh, 2015c; Charles et al., 1993). در این میان، مطالعه آثار تنش خشکی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی این گیاه در انتخاب ارقام مقاوم به خشکی و همچنین ذخیره و مصرف کارآمد آب مؤثر خواهد بود (Chaves, 2009; Askari and Ehsanzadeh, 2015 b, c). چراکه شناخت جامع از پاسخ گیاهان به تنش خشکی و معرفی ارقام یا توده‌های با مقاومت نسبی بالا به تنش از اهمیت بالایی برخوردار است.

گیاهان در طول دوره رشد خود در معرض تنش‌های محیطی مختلفی از قبیل خشکی، شوری، دماهای بسیار بالا و پایین و اشعه‌ی ماورابنفش قرار می‌گیرند. هر یک از این عوامل محیطی رشد و بهره‌وری گیاهان را بسته به شدت و مدت تنش تحت تأثیر قرار می‌دهند (Hayat et al., 2012). یکی از اثرات این تنش‌ها تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن است (Moustakas et al., 2011; Rejeb et al., 2014). این گونه‌های فعال از طریق پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تأثیر بر ماکرومولکول‌های مختلف سبب آسیب به ساختار سلولی می‌شوند (Hayat et al., 2012; Rejeb et al., 2014). مطالعات متعددی کاهش قابل توجه پتانسیل آب برگ و میزان فتوسنتز در اثر تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و تجزیه کلروفیل در شرایط تنش خشکی را گزارش کرده‌اند (Hayat et al., 2012; Rejeb et al., 2014; Iqbal et al., 2008). بر این اساس، گیاهان برای مقابله با این اثرات نامطلوب حاصل از تنش خشکی مکانیسم‌های خاصی از جمله فعال شدن آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و گلوتاتیون‌ریدوکتاز) و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند کاروتنوئیدها، گلوتاتیون، اسید اسکوربیک و پرولین را به کار می‌گیرند (Rejeb et al.,

آمده است. بر اساس نتایج تجزیه خاک به هر گلدان بعد از استقرار کامل یک گرم در لیتر کود کامل (N-P-K) اضافه شد. از ابتدای آزمایش تا استقرار کامل گیاهچه‌ها همه گلدان‌ها بسته به نیاز، یکسان آبیاری شدند و تیمارهای آبیاری پس از استقرار کامل گیاهان (۲۰ اردیبهشت ۱۳۹۶) اعمال شد. با داشتن میزان رطوبت وزنی در زمان ظرفیت مزرعه (۲۰/۹ درصد) و نقطه پژمردگی دائم (۹/۸ درصد)، میزان آب قابل استفاده محاسبه گردید. رطوبت قابل استفاده و حجم آب آبیاری خاک مورد نیاز برای تیمارهای آبیاری با استفاده از رابطه (۱ و ۲) بدست آمد (Askari and Ehsanzadeh, 2015).

رابطه (۱)

$$P = (\theta_{FC} - \theta_{PWP}) \times \rho_b \times V_{pot}$$

رابطه (۲)

$$P \times \text{رطوبت قابل استفاده خاک} = \text{حجم آب آبیاری}$$

$\theta_{FC}$ : درصد رطوبت وزنی آب خاک در ظرفیت مزرعه؛  $\theta_{PWP}$ : درصد رطوبت وزنی آب خاک در نقطه پژمردگی دائم؛  $\rho_b$ : جرم حجمی خاک (گرم بر سانتی‌متر مکعب)،  $V_{pot}$ : حجم گلدان (متر مکعب)؛  $P$ : درصد تخلیه مجاز رطوبتی (۳۵ تا ۴۵ درصد و ۷۵ تا ۸۵ درصد).

چهار هفته پس از اعمال تیمار آبیاری، در دو نوبت و به فاصله ده روز از یکدیگر پرولین با دو سطح (آب مقطر به عنوان شاهد و ۲۰ میلی‌مولار) محلول پاشی شد (۱۸ خرداد ماه ۱۳۹۵). میزان پرولین بکار برده شده برای محلول پاشی بر اساس جرم مولکولی آن برابر با ۲/۳ گرم در لیتر آب مقطر بود. گیاهان داخل گلدان‌های صفر (شاهد) نیز با مقدار مساوی آب مقطر محلول پاشی شدند. چهار هفته پس از اولین محلول پاشی پرولین (۱۵ تیرماه ۱۳۹۵) نمونه‌گیری برگ جهت اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک و آنتی‌اکسیدانی انجام شد. غلظت کلروفیل‌های  $a$ ،  $b$  و کاروتنوئیدها، کلروفیل کل، شاخص پایداری غشا، پتانسیل آب برگ، محتوای نسبی آب برگ، غلظت پلی‌فنل‌ها و پرولین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز بر روی برگ‌های کامل و

فشاری سلول امکان مقاومت به تنش خشکی را در بافت‌های گیاهی فراهم می‌کنند (Iqbal et al., 2008). اما با این حال، اثرات مطلوب استعمال خارجی پرولین ممکن است بسته به نوع گیاه، مرحله رشدی گیاه، زمان استعمال و غلظت محلول متفاوت باشد (Ashraf and Foolad, 2007). بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر متقابل استعمال خارجی پرولین و تنش خشکی بر پاسخ فیزیولوژیکی، آنتی‌اکسیدانی و عملکرد سه ژنوتیپ رازیانه انجام شد.

### مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت گلدانی (هوای آزاد) در مزرعه تحقیقاتی چاه‌اناری دانشگاه صنعتی اصفهان (عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۳۸ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۳۹ دقیقه شرقی با ۱۶۲۰ متر ارتفاع از سطح دریاهای آزاد) انجام شد. تیمارهای آزمایش به صورت فاکتوریلی سه عاملی از دو سطح آبیاری (۳۵ تا ۴۵ و ۷۵ تا ۸۵ درصد تخلیه مجاز رطوبتی)، دو سطح تیمار پرولین (صفر (فقط پاشش آب مقطر) و ۲۰ میلی‌مولار) و سه ژنوتیپ رازیانه (ارومیه، شیراز و کرمان) در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در چهار تکرار بود. برای اجرای آزمایش از بذور برداشت شده از شرایط بدون تنش مزرعه استفاده شد (برداشت شده در شهریور ماه ۱۳۹۵). بذرها بعد از ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم در عمق یک سانتی‌متری چاله‌های سینی‌های نشا (محیط کشت پیت مس) در فضای داخلی گلخانه نشا شدند (اوایل اسفند ماه ۱۳۹۵). نشاها بعد از رسیدن به ارتفاع ۷ تا ۱۲ سانتی‌متری (۴۵ روز بعد از کشت) به داخل گلدان‌های از پیش تهیه شده انتقال داده شدند. هر واحد آزمایشی شامل دو گلدان و در هر گلدان نیز دو بوته جود داشت. کاشت در گلدان‌هایی به قطر دهانه ۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر انجام شد (خاک مورد نیاز برای پر کردن گلدان‌ها از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان واقع در لورک نجف‌آباد تهیه شد). خاک تهیه شده با نسبت ۳:۱ با ماسه شسته شده مخلوط شد. مشخصات فیزیکوشیمیایی خاک استفاده شده در گلدان‌ها در جدول ۱

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی شیمیایی خاک استفاده شده در گلدان‌ها

دانه بندی (%)	رس	سیلت	شن	بافت خاک	فسفر (میلی‌گرم / کیلوگرم)	پتاسیم	نیترژن کل (%)	کربن آلی (%)	pH	هدایت الکتریکی
										(dS/m)
۴	۵۰/۴	۴۵/۶	لوم سیلتی در مرز لومی شنی	۵۴	۱۰۶	۰/۰۵۵۷	۱/۳	۷/۴	۱/۱	

a, b, کارت‌نویدها و وزن نمونه برگ می‌باشند. کلروفیل کل از مجموع کلروفیل a و b بدست آمد.

**شاخص پایداری غشا:** چهار هفته پس از استعمال خارجی پرولین برای اندازه‌گیری شاخص پایداری غشا ۰/۱ گرم برگ داخل ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر شده قرار گرفت. بعد از آن نمونه را به مدت ۳۰ دقیقه داخل آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و میزان هدایت الکتریکی (EC) آن با کمک دستگاه EC متر قرائت شد (C<sub>۱</sub>). سپس نمونه را به مدت ۱۵ دقیقه داخل حمام بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و برای بار دوم هدایت الکتریکی آن قرائت شد (C<sub>۲</sub>). بر اساس روابط (۹) درصد شاخص پایداری غشا (MSI) محاسبه شد (Sairam, 1994).

$$\text{رابطه (۹)} \quad \text{MSI} (\%) = \left(1 - \frac{C_1}{C_2}\right) \times 100$$

**پتانسیل آب برگ:** چهار هفته پس از استعمال خارجی پرولین با استفاده از دستگاه پمپ فشار OSK (مدل DIK-7000) هنگام طلوع آفتاب با استفاده از سه نمونه تصادفی از هر واحد آزمایشی اندازه‌گیری شد.

**محتوای نسبی آب برگ:** چهار هفته پس از محلول پاشی با استفاده از قطعاتی کوچک از قسمت‌های سالم از برگ‌های کامل و شاداب با کمک ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) توزین شد. در مرحله‌ی بعد، قطعات به لیوان‌های پلاستیکی حاوی آب مقطر منتقل و به مدت ۴ ساعت در دمای محیط (۲۳ درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی قرار داده شدند. پس از خارج کردن قطعات از آب مقطر، جهت حذف رطوبت اضافی، قطعات برگ در بین دو لایه کاغذ صافی قرار گرفت و سپس وزن آماس آنها اندازه‌گیری شد. بعد از این مرحله، قطعات برگ به مدت ۴۸ ساعت به آون ۷۰ درجه سلیسیوس منتقل و وزن خشک آنها تعیین شد. سپس با استفاده از رابطه (۱۰)

شاداب چهارم و پنجم انتهای بوته گیاه دو گلدان هر واحد آزمایشی انجام شد. عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته نیز با برداشت بوته دو گلدان هر واحد آزمایشی در ۹۰ درصد رسیدگی فیزیولوژیک و خشک شدن در هوای آزاد (به مدت یک هفته) به کمک ترازو تعیین شد.

**محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a, b, کارت‌نویدها و کلروفیل کل):** چهار هفته پس از استعمال خارجی پرولین محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی بر اساس روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱) و اندازه‌گیری میزان جذب نور عصاره‌ها در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۶۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Hitachi-japan U1800) انجام شد. میزان کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها بر حسب میلی‌گرم در گرم پس از قرار گرفتن در رابطه‌های (۳)، (۴)، (۵)، (۶)، (۷) و (۸) محاسبه شدند:

$$\text{رابطه (۳)} \quad \text{Ca} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = (12.25 \times A663.2) - (2.79 \times A646.8)$$

$$\text{رابطه (۴)} \quad \text{Cb} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = (21.50 \times A646.8) - (5.10 \times A663.2)$$

$$\text{رابطه (۵)} \quad \text{Ccarot} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{(1000 \times A470) - (1.82 \times \text{Ca}) - (85.02 \times \text{Cb})}{198}$$

$$\text{رابطه (۶)} \quad \text{Ca} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right) = \left[\frac{\text{Ca}(\frac{\text{mg}}{\text{L}})}{\text{weight}(\text{g})}\right] \times \left[\frac{10(\text{ml})}{1000}\right]$$

$$\text{رابطه (۷)} \quad \text{Cb} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right) = \left[\frac{\text{Cb}(\frac{\text{mg}}{\text{L}})}{\text{weight}(\text{g})}\right] \times \left[\frac{10(\text{ml})}{1000}\right]$$

$$\text{رابطه (۸)} \quad \text{Ccarot} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right) = \left[\frac{\text{Ccarot}(\frac{\text{mg}}{\text{L}})}{\text{weight}(\text{g})}\right] \times \left[\frac{10(\text{ml})}{1000}\right]$$

Ca, Cb, و Ccarot و weight به ترتیب نشان دهنده میزان کلروفیل

موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Hitachi-japan U1800) اندازه‌گیری شد. از تولوئن به عنوان محلول شاهد (بلانک) استفاده شد.

#### سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: سنجش فعالیت

آنزیم‌ها و محتوای پروتئین با عصاره‌گیری از ۰/۱ گرم از برگ تازه تهیه شده در چهار هفته پس از استعمال خارجی پرولین، بر اساس جزئیات مطالعه عسکری و احسان‌زاده (۱۳۹۴) تعیین شد.

#### سنجش فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز

با استفاده از روش Chance و Maehly (۱۹۹۵) به صورت اسپکتروفتومتری و با اندازه‌گیری کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۲/۹۵ میلی‌لیتر بافر واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۷) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار، با ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم مخلوط گردید. فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز از تقسیم فعالیت حجمی کاتالاز بر میزان پروتئین عصاره که به روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین شده بود، محاسبه گردید. یک واحد از فعالیت کاتالاز بیانگر مقدار آنزیمی است که باعث تجزیه یک میکرومول  $H_2O_2$  و تبدیل آن به اکسیژن و آب در مدت یک دقیقه می‌شود. (ضریب خاموشی کاتالاز =  $3.9/4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### سنجش فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز:

فعالیت آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) به صورت اسپکتروفتومتری و با اندازه‌گیری کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای شروع واکنش، ۲/۹۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، پراکسید هیدروژن نیم میلی‌مولار، آسکوربات پنج میلی‌مولار با ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم مخلوط گردید. یک واحد از فعالیت آسکوربات پراکسیداز بیانگر مقدار آنزیمی است که برای اکسید کردن یک میکرومول آسکوربات در یک دقیقه نیاز است. (ضریب خاموشی آسکوربات پراکسیداز =  $2/8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم

پراکسیداز با استفاده از روش Herzog و Fahimi (۱۹۷۳) به

محتوی نسبی آب برگ محاسبه شد (Smart and Bingham, 1974).

رابطه (۱۰)

$$100 \times \left( \frac{\text{وزن برگ خشک} - \text{وزن برگ تازه}}{\text{وزن برگ خشک} - \text{وزن برگ آماهی}} \right) = \text{محتوی نسبی آب برگ (\%)}$$

#### سنجش غلظت پلی‌فنل‌ها: چهار هفته پس از استعمال

خارجی پرولین غلظت پلی‌فنل‌ها با استفاده از نمونه‌های نیم گرمی برگ به کمک واکنش گر فولین و بر اساس روش Singh و همکاران (۲۰۰۲) اندازه‌گیری شد. در این روش ابتدا نیم گرم از برگ تازه گیاه در داخل ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد عصاره‌گیری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده با یک میلی‌لیتر واکنشگر فولین با غلظت ۱۰ درصد مخلوط گردید و سپس ۸۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن اضافه شد. محلول به مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس جذب محلول آبی رنگ در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Hitachi-japan U1800) اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول استاندارد اسید گالیک ان‌هیدروس استفاده شد.

#### سنجش غلظت پرولین: چهار هفته پس از استعمال

خارجی این اسید آمینه غلظت پرولین درون‌زاد با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) و معرف نین هیدرین تعیین شد. مقدار نیم گرم از بافت گیاهچه، در هاون چینی در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک سه درصد به خوبی ساییده شد. ماده همگن حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس، دو میلی‌لیتر از عصاره صاف شده به لوله درب دار منتقل گردید و به آن دو میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک، اضافه شد. سپس به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس در زیر هود، به هر نمونه مقدار چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و تکان داده شد تا کاملاً مخلوط شوند. پس از چند لحظه دو فاز حاصل شد که فاز رویی که به رنگ قرمز در آمده و حاوی پرولین محلول در تولوئن بود، جدا گردید. استانداردهایی از پرولین از غلظت صفر تا ۰/۱ میکرومول بر میلی‌لیتر تهیه گردید و نهایتاً میزان جذب محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها در طول

شاخص پایداری غشا، فعالیت آسکوربات پراکسیداز، عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته از نظر آماری معنی دار بود (جدول ۳). تنش خشکی به ترتیب سبب کاهش ۲۴، ۲۶، ۲۳ و ۲۴ درصدی غلظت کلروفیل a، b، کارتنوئیدها و کلروفیل کل نسبت به سطح شاهد شد (جدول ۳). رنگیزه‌های فتوستتزی برگ یکی از مهم‌ترین فاکتورهای تعیین کننده فتوستتزی عملکرد ماده خشک و دانه در گیاهان هستند. مطالعات متعددی کاهش قابل توجه میزان فتوستتزی در شرایط تنش خشکی را به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن، پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و تجزیه کلروفیل ارتباط داده‌اند (Hayat et al., 2012; Rejeb et al., 2014; Iqbal et al., 2008). نتایج مشابهی مبنی بر کاهش غلظت رنگیزه‌های فتوستتزی در شرایط تنش توسط سایر محققان گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (Askari and Ehsanzadeh, 2015 b; Ahmed et al., 2010). ژنوتیپ ارومیه بیشترین و ژنوتیپ‌های کرمان و شیراز کمترین محتوای رنگیزه‌های فتوستتزی (کلروفیل a، b، کارتنوئید و کلروفیل کل) را داشتند (جدول ۳). اثر استعمال خارجی پرولین بر محتوای رنگیزه‌های فتوستتزی بسته به سطح آبیاری متفاوت بود، به طوریکه میزان آنها با استعمال خارجی پرولین در سطح شاهد آبیاری به ترتیب ۱۵/۵، ۱۴/۸، ۱۲/۱ و ۱۵/۶ درصد کاهش و در سطح تنش آبی ۲۰/۸، ۳۲/۶، ۲۰/۴ و ۲۳/۵ درصد افزایش یافت (شکل ۱- A، B، C، D). مطالعات متعددی افزایش میزان رنگیزه‌های فتوستتزی و میزان فتوستتزی با استعمال خارجی پرولین در شرایط تنش را در گزارش کرده‌اند (Ahmed et al., 2010; Ahmed et al., 2011; Moustakas et al., 2011). اما مطالعه حاضر نشان داد که اثر استعمال خارجی پرولین بر محتوای رنگیزه‌های فتوستتزی در شرایط عدم تنش متفاوت است. به نظر می‌رسد، این تفاوت بیان کننده نقش بارزتر پرولین در شرایط تنش باشد، چرا که، اگر چه در شرایط عدم تنش میزان آنها کاهش یافته اما درصد افزایش آنها در شرایط تنش بالاتر از کاهش یاد شده در شرایط عدم تنش بود (شکل ۱- A، B، C، D). در شرایط تنش‌های محیطی پرولین محافظت از دستگاه فتوستتزی را با ایجاد پایداری در کارکرد

صورت اسپکتروفتومتری و با اندازه‌گیری افزایش جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد از فعالیت پراکسیداز بیانگر مقدار آنزیمی است که برای اکسید کردن یک میکرومول گایاکول در یک دقیقه نیاز است. (ضریب خاموشی پراکسیداز =  $2676 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

**تعیین پروتئین نمونه‌ی عصاره‌ی گیاهی:** غلظت پروتئین همان عصاره‌ای که برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده شده بود بر اساس روش Bradford (۱۹۷۶) و اندازه‌گیری جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر (و مقایسه با منحنی استاندارد) بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

**عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته:** عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته با توزین و بوجاری هر واحد آزمایشی در ۹۰ درصد رسیدگی فیزیولوژیک و خشک شدن در هوای آزاد (به مدت یک هفته) تعیین شد.

**تجزیه و تحلیل آماری:** داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۲) مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. رسم نمودارها با نرم‌افزار (Excel-2010) انجام شد. میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد، اثر آبیاری از نظر آماری بر روی تمامی صفات مورد مطالعه معنی دار بود (جدول ۲). علاوه بر این، اثر استعمال پرولین بر روی تمامی صفات به استثنا غلظت رنگیزه‌های فتوستتزی (کلروفیل a، b، کارتنوئیدها و کلروفیل کل) و اثر ژنوتیپ بر تمامی صفات به استثنا پتانسیل آب برگ، محتوای نسبی آب برگ، غلظت پرولین و عملکرد دانه تک بوته از نظر آماری معنی دار بود (جدول ۲). اثر متقابل آبیاری × ژنوتیپ بر پتانسیل آب برگ، فعالیت کاتالاز و پراکسیداز از نظر آماری معنی دار بود (جدول ۳). اثر متقابل آبیاری × ژنوتیپ بر محتوای نسبی آب برگ و غلظت پلی‌فنول‌ها از نظر آماری معنی دار بود (جدول ۳). اثر متقابل پرولین × ژنوتیپ بر

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر آبیاری و استعمال خارجی پرولین بر برخی صفات فیزیولوژیکی، آنتی اکسیدانی و عملکرد سه ژنوتیپ رازیانه در شرایط گلدانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	کلروفیل کل	شاخص پایداری غشا	محتوای نسبی آب برگ	پتانسیل آب برگ
بلوک	۳	۰/۰۶۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۷	۰/۱۰۹	۷/۰۲	۲۵/۳	۰/۰۷۱
آبیاری	۱	۰/۴۳۱**	۰/۰۴۰**	۰/۰۵۵**	۰/۷۳۴**	۳۹۶**	۳۰۹**	۳/۹۰**
پرولین	۱	۰/۰۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۱ <sup>ns</sup>	۹۳/۸**	۶۶۲**	۰/۳۰۴*
ژنوتیپ	۲	۰/۱۰۲*	۰/۰۰۸*	۰/۰۱۲*	۰/۱۶۹*	۱۶۸**	۲۶/۸ <sup>ns</sup>	۰/۱۴۵ <sup>ns</sup>
آبیاری × پرولین	۱	۰/۱۸۱*	۰/۰۲۰**	۰/۰۱۸*	۰/۳۲۵*	۹/۸۲ <sup>ns</sup>	۱۱۶*	۰/۰۱۶ <sup>ns</sup>
آبیاری × ژنوتیپ	۲	۰/۰۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۴ <sup>ns</sup>	۵/۶۲ <sup>ns</sup>	۱۰۶*	۰/۰۰۴ <sup>ns</sup>
پرولین × ژنوتیپ	۲	۰/۰۳۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۶۱ <sup>ns</sup>	۵۸/۶**	۳۹/۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۵ <sup>ns</sup>
آبیاری × پرولین × ژنوتیپ	۲	۰/۰۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۹ <sup>ns</sup>	۱۶/۹ <sup>ns</sup>	۹۶/۹*	۰/۰۱۲ <sup>ns</sup>
خطای آزمایشی	۳۳	۰/۰۲۸	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۴۷	۲/۲۶	۲۶/۸	۰/۰۵۷
کل	۴۷							

ns، \* و \*\* به ترتیب بیانگر معنی دار نبودن و معنی دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می دهد.

ادامه جدول ۲-

منابع تغییرات	درجه آزادی	غلظت پلی فنل ها	غلظت پرولین	کاتالاز	غلظت پرولین	پراکسیداز	عملکرد بیولوژیک تک بوته	عملکرد دانه تک بوته
بلوک	۳	۰/۳۴۲	۲۰/۲	۰/۰۹۲	۲۰/۲	۱/۴۴	۲۲/۸	۱/۶۳
آبیاری	۱	۱۲/۲*	۳۰۱**	۳۲/۷**	۳۰۱**	۶۰/۷**	۸۹۰**	۱۲۷**
پرولین	۱	۱۶/۳*	۹۲۹**	۱۰/۴**	۹۲۹**	۱۱/۰**	۸۱/۸**	۱۲/۹**
ژنوتیپ	۲	۷/۹۲*	۱۵/۱ <sup>ns</sup>	۴/۱۰**	۱۵/۱ <sup>ns</sup>	۱۴/۰**	۶۰/۱**	۰/۰۶۳ <sup>ns</sup>
آبیاری × پرولین	۱	۳۹/۶**	۹۸/۴**	۰/۷۵۸ <sup>ns</sup>	۹۸/۴**	۱/۳۷ <sup>ns</sup>	۱۷/۳ <sup>ns</sup>	۱/۹۷ <sup>ns</sup>
آبیاری × ژنوتیپ	۲	۸/۵۶*	۰/۵۹۵ <sup>ns</sup>	۰/۵۹۵ <sup>ns</sup>	۰/۵۹۵ <sup>ns</sup>	۴/۰۳ <sup>ns</sup>	۷/۶۷ <sup>ns</sup>	۲/۴۲ <sup>ns</sup>
پرولین × ژنوتیپ	۲	۰/۹۷۹ <sup>ns</sup>	۰/۲۱۴ <sup>ns</sup>	۰/۸۶۰ <sup>ns</sup>	۰/۲۱۴ <sup>ns</sup>	۱/۹۵ <sup>ns</sup>	۱۲۳**	۲۳/۸**
آبیاری × پرولین × ژنوتیپ	۲	۳/۷۷ <sup>ns</sup>	۱۷/۱ <sup>ns</sup>	۰/۴۸۹ <sup>ns</sup>	۱۷/۱ <sup>ns</sup>	۱/۱۴ <sup>ns</sup>	۷۴/۸**	۱۵/۳**
خطای آزمایشی	۳۳	۲/۳۵	۰/۱۱	۰/۷۴۳	۰/۱۱	۱/۳۸	۹/۸۵	۱/۱۵
کل	۴۷							

ns، \* و \*\* به ترتیب بیانگر معنی دار نبودن و معنی دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می دهد.

کلروپلاست ها، میتوکندری و پراکسیزوم تولید می شوند، اما در شرایط تنش میزان تجمع این ترکیبات در سلول افزایش می یابد که نتیجه آن خسارت به اجزای تشکیل دهنده سلول (کلروفیل، لیپید غشا، پروتئین و DNA) و نهایتاً مرگ سلول است

زنجیره انتقال الکترون، غشاها، پروتئین ها و فعالیت آنزیم هایی مانند رایبوسکو، مهار گونه های فعال اکسیژن و تنظیم فعالیت های آنتی اکسیدانی فراهم می کند (Ahmed et al., 2010). در شرایط عدم تنش گونه های فعال اکسیژن در مقادیر کم در

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر آبیاری و استعمال خارجی پرولین بر برخی صفات فیزیولوژیکی، آنتی اکسیدانی و عملکرد سه ژنوتیپ رازیانه در شرایط گلدانی.

صفات	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	کلروفیل کل	شاخص پایداری غشا	محتوای نسبی آب برگ	پتانسیل آب برگ (-MPa)
آبیاری							
شاهد	۰/۷۸۷	۰/۲۲۵	۰/۲۹۴	۱/۰۱	۸۹/۶ <sup>a</sup>	۸۳/۷	۱/۲۵ <sup>b</sup>
تنش	۰/۵۹۸	۰/۱۶۷	۰/۲۲۷	۰/۷۶۵	۸۳/۹ <sup>b</sup>	۷۸/۶	۱/۸۲ <sup>a</sup>
LSD <sub>(0.05)</sub>	۰/۰۹۸	۰/۰۳۰	۰/۰۳۳	۷/۱۲۹	۱/۴۷	۳/۰۴	۰/۱۴۰
پرولین							
۰	۰/۶۹۷	۰/۱۹۳	۰/۲۶۰	۰/۸۹۰	۸۵/۴	۷۷/۵	۱/۴۵ <sup>b</sup>
۲۰ mM	۰/۶۸۸	۰/۱۹۹	۰/۲۶۱	۰/۸۸۷	۸۸/۱	۸۴/۹	۱/۶۱ <sup>a</sup>
LSD <sub>(0.05)</sub>	۰/۰۹۸	۰/۰۳۰	۰/۰۳۳	۰/۱۲۷	۱/۴۷	۳/۰۴	۰/۱۴۰
ژنوتیپ							
ارومیه	۰/۷۸۳ <sup>a</sup>	۰/۲۲۲ <sup>a</sup>	۰/۲۹۲ <sup>a</sup>	۱/۰۰ <sup>a</sup>	۸۹/۵	۸۲/۲	۱/۴۲ <sup>b</sup>
کرمان	۰/۶۳۳ <sup>b</sup>	۰/۱۷۷ <sup>b</sup>	۰/۲۴۰ <sup>b</sup>	۰/۸۱۰ <sup>b</sup>	۸۳/۲	۸۱/۶	۱/۶۰ <sup>a</sup>
شیراز	۰/۶۶۱ <sup>b</sup>	۰/۱۸۹ <sup>ab</sup>	۰/۲۵۰ <sup>b</sup>	۰/۸۵۱ <sup>ab</sup>	۸۷/۶	۷۹/۸	۱/۵۷ <sup>ab</sup>
LSD <sub>(0.05)</sub>	۰/۱۲۰	۰/۰۳۶	۰/۰۴۱	۰/۱۵۸	۱/۸۰	۳/۷۳	۰/۱۷۲

در هر ستون و برای هر عامل آزمایشی میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

ادامه جدول ۳-

صفات	غلظت پرولین (μmol/g FW)	غلظت پلی فنل‌ها (mg galic/ g FW)	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	عملکرد بیولوژیک تک بوته (gr)	عملکرد دانه تک بوته
آبیاری							
شاهد	۸/۵۵	۷/۴۶	۲/۶۱ <sup>b</sup>	۷/۷۷	۵/۹۴ <sup>a</sup>	۱۷/۸ <sup>a</sup>	۵/۲۲ <sup>a</sup>
تنش	۱۳/۶	۸/۴۶	۴/۲۶ <sup>a</sup>	۴/۷۶	۳/۶۹ <sup>b</sup>	۹/۳۷ <sup>b</sup>	۱/۹۰ <sup>b</sup>
LSD <sub>(0.05)</sub>	۱/۹۵	۰/۹۰۰	۰/۵۰۶	۰/۹۸۹	۰/۶۹۱	۲/۰۵	۰/۶۹۸
پرولین							
۰	۶/۶۶ <sup>b</sup>	۷/۳۷	۳/۹۰ <sup>a</sup>	۴/۴۰	۵/۳۰ <sup>a</sup>	۱۲/۰	۲/۹۸
۲۰ mM	۱۵/۵ <sup>a</sup>	۸/۵۴	۲/۹۷ <sup>b</sup>	۸/۱۳	۴/۳۷ <sup>b</sup>	۱۵/۴	۴/۲۴
LSD <sub>(0.05)</sub>	۱/۹۵	۰/۹۰۰	۰/۵۰۶	۰/۹۸۹	۰/۶۹۱	۲/۰۵	۰/۶۹۸

در هر ستون و برای هر عامل آزمایشی میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

جهت حفاظت تنش اکسیداتیو کافی می‌باشد، اما در شرایط تنش سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی جهت تعدیل اثرات تنش ایفای نقش می‌کنند (Ozden et al., 2009).

(Ozden et al., 2009). تعادل بین تولید و حذف این ترکیبات توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی کنترل می‌شود (Hayat et al., 2012; Rejeb et al., 2014). در شرایط عدم تنش سیستم آنتی‌اکسیدانی



ادامه جدول ۳-

صفات	غلظت پرولین	غلظت پلی فنل‌ها	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	عملکرد بیولوژیک تک بوته	عملکرد دانه تک بوته
تیمار	( $\mu\text{mol/g FW}$ )	(mg galic/ g FW)		(Unit/mg protein)	(gr)		
ژنوتیپ							
ارومیه	۱۰/۸	۷/۹۵	۳/۹۹ <sup>a</sup>	۷/۳۳	۴/۶۱ <sup>b</sup>	۱۴/۴	۴/۰۰
کرمان	۱۲/۱	۷/۲۶	۳/۰۰ <sup>b</sup>	۶/۰۴	۵/۸۴ <sup>a</sup>	۱۴/۶	۳/۱۳
شیراز	۱۰/۲	۸/۶۷	۳/۳۲ <sup>b</sup>	۵/۴۱	۴/۰۰ <sup>b</sup>	۱۲/۲	۳/۸۰
LSD <sub>(0.05)</sub>	۲/۳۸	۱/۱۰	۰/۶۲۰	۱/۲۱	۰/۸۴۶	۴/۲۹	۰/۸۵۶

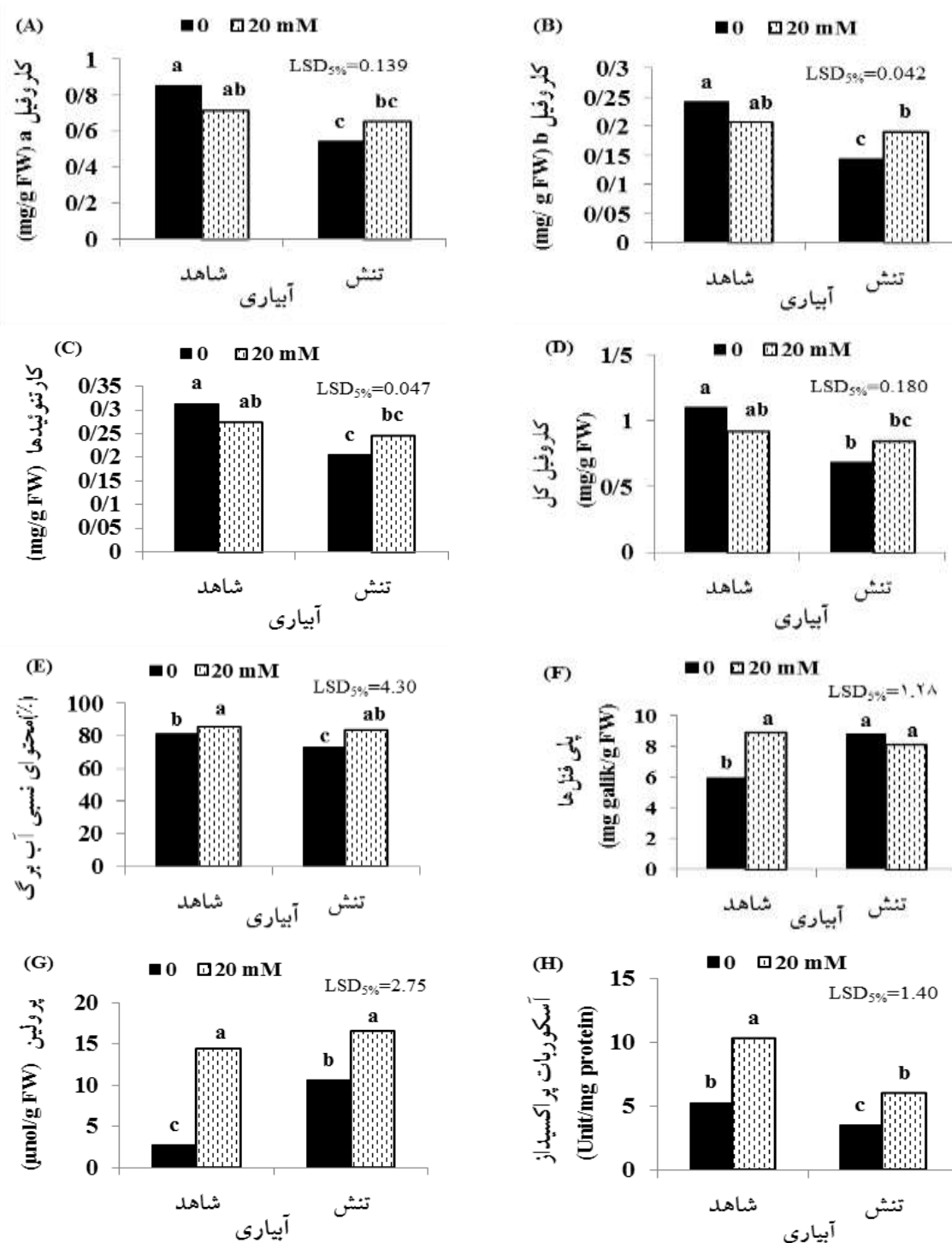
در هر ستون و برای هر عامل آزمایشی میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

تجمع پرولین یکی از پاسخ‌های فیزیولوژیک (غیر آنزیمی) گیاهان به تنش‌های محیطی است که استعمال خارجی آن در شرایط بدون تنش ممکن است منجر به سمیت و مرگ سلول شود. چراکه تعادل بین بیوستنز و تجزیه آن مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده نقش تنظیم‌کننده اسمزی و بهبود دهنده‌گی رشد آن است (Verbruggen and Hermans, 2008). استعمال خارجی پرولین در شرایط عدم تنش ممکن است سبب افزایش تجمع پیروولین ۵- کربوکسیلات به عنوان پیش‌ساز پرولین شود که کاهش رشد سلول را به واسطه افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تأثیر بر بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت به تنش را باعث می‌شود (Verbruggen and Hermans, 2008). علاوه بر این، استعمال خارجی پرولین در شرایط عدم تنش باعث تجزیه بخشی از آن و نهایتاً تبدیل آن به NADPH می‌شود. انباشت NADPH سبب احیا بیش از حد مخزن پلاستوکوئینون و در نتیجه محدودیت فعالیت زنجیره انتقال الکترون فتوسنتز می‌شود (Sperdouli and Moustakas, 2015).

تنش خشکی و استعمال خارجی پرولین به ترتیب سبب کاهش ۶ درصدی و افزایش ۳ درصدی شاخص پایداری غشا نسبت به سطح شاهد شدند (جدول ۳). در شرایط تنش شاخص پایداری غشا کاهش و میزان نشت الکترولیت افزایش می‌یابد، اما استعمال خارجی پرولین در این شرایط می‌تواند به واسطه مهار گونه‌های فعال اکسیژن و ممانعت از لیپیدپراکسیداسیون منجر به کاهش نشت الکترولیت و افزایش

شاخص پایداری غشا شود (Ozden et al., 2009). به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر نیز بهبود شاخص پایداری غشا در شرایط استعمال خارجی پرولین با مهار گونه‌های فعال اکسیژن در ارتباط باشد. ژنوتیپ‌های ارومیه و کرمان به ترتیب بیشترین و کمترین شاخص پایداری غشا را داشتند (جدول ۳). اثر استعمال خارجی پرولین بر شاخص پایداری غشا بسته به ژنوتیپ متفاوت بود. به طوریکه میزان شاخص پایداری غشا با استعمال خارجی پرولین نسبت به سطح شاهد در دو ژنوتیپ ارومیه (۶ درصد) و شیراز (۵/۶ درصد) افزایش و در ژنوتیپ کرمان تغییر معنی‌داری نیافت (شکل ۳- A).

تنش خشکی و استعمال خارجی پرولین به ترتیب سبب کاهش ۶ درصدی و افزایش ۱۱ درصدی محتوای نسبی آب برگ نسبت به سطح شاهد شدند (جدول ۳). نتایج مشابهی مبنی بر کاهش محتوای نسبی آب برگ در شرایط تنش (خشکی و شوری) سایر محققان گزارش شده است (Ahmed et al., 2011; Moustakas et al., 2011; Askari and Ehsanzadeh, 2015 b, c). تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها برای محتوای نسبی آب برگ وجود نداشت (جدول ۳). محتوای نسبی آب برگ در هر دو شرایط تنش و شاهد آبیاری با استعمال خارجی پرولین افزایش یافت، اما افزایش یاد شده در سطح شاهد آبیاری (۵/۳ درصد) کمتر از سطح تنش آبی (۱۴/۳ درصد) بود (شکل ۱- E). نتایج مشابهی مبنی بر افزایش محتوای نسبی آب برگ در شرایط استعمال خارجی پرولین



شکل ۱- اثر متقابل آبیاری × پرولین بر غلظت کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کارتنوئیدها (C)، و کلروفیل کل (D)، محتوای نسبی آب برگ (E)، غلظت پلی فنل ها (F) و پرولین (G) و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (H). میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

آمیننه نقش مهمی در حفاظت و بهبود آب گیاهان در شرایط تنش دارد (Ozden et al., 2009; Ahmed et al., 2011; Moustakas et al., 2011). استعمال خارجی پرولین در شرایط

توسط سایر محققان گزارش شده است (Ahmed et al., 2011; Moustakas et al., 2011). این محققان افزایش یاد شده را به پتانسیل اسمزی برگ ارتباط دادند. پرولین به عنوان یک اسید

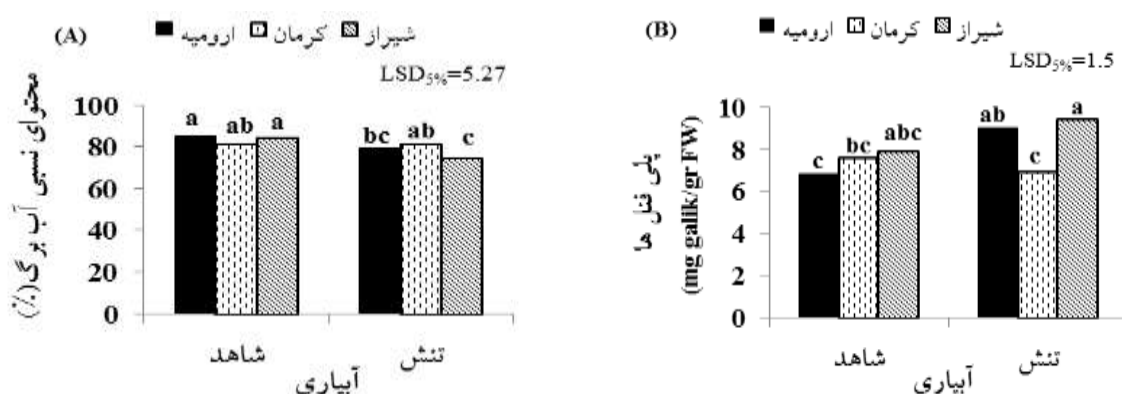
(Hayat et al., 2012; Hsu et al., 2003). ژنوتیپ‌های کرمان و ارومیه به ترتیب پایین‌ترین و بالاترین پتانسیل آب برگ را در بین ژنوتیپ‌ها داشتند (جدول ۳).

تنش خشکی و استعمال خارجی پرولین به ترتیب سبب افزایش ۱۳ و ۱۶ درصدی غلظت پلی‌فنل‌ها نسبت به سطح شاهد شدند (جدول ۳). تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها برای غلظت پلی‌فنل وجود نداشت (جدول ۳). اثر استعمال خارجی پرولین بر غلظت پلی‌فنل‌ها بسته به سطح آبیاری متفاوت بود. به طوریکه با استعمال خارجی پرولین میزان پلی‌فنل‌ها در سطح شاهد آبیاری ۴۹/۹ درصد افزایش و در سطح تنش آبی ۷/۴ درصد کاهش یافت ولی کاهش یاد شده از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۱-F). اثر آبیاری بر غلظت پلی‌فنل‌ها بسته به ژنوتیپ متفاوت بود. به طوریکه، در شرایط تنش آبی نسبت به شاهد آبیاری میزان آن در دو ژنوتیپ ارومیه و شیراز به ترتیب ۳۱/۵ و ۱۹/۱ درصد افزایش اما در ژنوتیپ کرمان ۸/۶ درصد کاهش یافت ولی کاهش یاد شده از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۲-B).

تنش خشکی و استعمال خارجی پرولین به ترتیب سبب افزایش ۵۹ و ۱۳۲ درصدی غلظت پرولین نسبت به سطح شاهد شدند (جدول ۳). تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها برای غلظت پرولین وجود نداشت (جدول ۳). غلظت پرولین در هر دو شرایط تنش و شاهد آبیاری با استعمال خارجی پرولین افزایش یافت، اما افزایش یاد شده در سطح شاهد آبیاری (۲۶/۴ برابر) به مراتب بیشتر از سطح تنش آبی (۳۵/۴ درصد) بود (شکل ۱-G). زمانی که گیاهان در معرض شرایط تنش قرار می‌گیرند، مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه، به‌ویژه اسیدهای آمینه در آنها تجمع می‌یابد. اسیدهای آمینه‌ها به عنوان پیش‌ساز ترکیبات پروتئینی نقش مهمی در متابولیسم رشد و توسعه گیاهان دارند (Hayat et al., 2012). پرولین به عنوان یک آمینو اسید نقش مهمی در تعدیل تنش خشکی ایفا می‌کند. این ایفای نقش به واسطه حفظ آماس یا پتانسیل اسمزی، حفظ پایداری غشا و جلوگیری از نشت یونی، مهار گونه‌های فعال اکسژن و نهایتاً جلوگیری از تنش اکسیداتیو در گیاهان است

تنش روابط آبی گیاه و آب را با حفظ آماس سلولی و افزایش میزان فتوسنتز بهبود می‌بخشد (Khalil and El-Noemani, 2012; Ahmed et al., 2010). استعمال خارجی پرولین در شرایط تنش رطوبتی رشد و سایر ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاهان را بهبود می‌دهد. افزایش تجمع پرولین یکی از مکانیسم‌های گیاهان در شرایط تنش رطوبتی است که به واسطه افزایش پتانسیل اسمزی منجر به افزایش توانایی گیاه در حفظ آب می‌شود (Khalil and El-Noemani, 2012). به نظر می‌رسد، در مطالعه حاضر افزایش یاد شده در محتوای نسبی آب برگ در شرایط تنش با نقش پرولین در حفظ پتانسیل اسمزی و افزایش پتانسیل آب برگ در ارتباط باشد (جدول ۳). اثر آبیاری بر محتوای نسبی آب برگ بسته به ژنوتیپ متفاوت بود. به طوریکه میزان آن در شرایط تنش آبی نسبت به شرایط شاهد آبیاری در دو ژنوتیپ ارومیه (۶/۸ درصد) و شیراز (۱۱/۶ درصد) کاهش و در ژنوتیپ کرمان تغییر معنی‌داری نیافت (شکل ۲-A).

تنش خشکی و استعمال خارجی پرولین به ترتیب سبب کاهش ۴۶ و ۹ درصدی پتانسیل آب برگ نسبت به سطح شاهد شدند (جدول ۳). در گیاه رازیانه نتایج مشابهی مبنی بر کاهش پتانسیل آب برگ در شرایط تنش رطوبتی توسط سایر محققان گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (Askari and Ehsanzadeh, 2015 b, c). علاوه بر این، سایر محققان نتایج مشابهی مبنی بر کاهش پتانسیل آب برگ در شرایط تنش و استعمال خارجی پرولین را گزارش کردند (Ahmed et al., 2011; Ahmed et al., 2011; Moustakas et al., 2011). این محققین کاهش پتانسیل آب برگ را به پتانسیل اسمزی برگ ارتباط دادند. به نظر می‌رسد، در مطالعه حاضر کاهش پتانسیل برگ در شرایط استعمال خارجی پرولین نیز با تنظیم اسمزی (منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی سلول) در ارتباط باشد. تنظیم اسمزی یکی از مکانیسم‌های کارآمد گیاه برای حفظ آماس سلول در شرایط کمبود آب است که حاصل تجمع مقدار زیادی از ترکیبات با جرم مولکولی کم به نام مواد محلول سازگار به خصوص پرولین در سلول‌های گیاهی است



شکل ۲- اثر متقابل آبیاری × ژنوتیپ بر محتوای نسبی آب برگ (A) و غلظت پلی فنل ها (B). میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی داری با هم ندارند.

پراکسیداز نسبت به سطح شاهد شد (جدول ۳). استعمال خارجی پرولین سبب کاهش ۳۱ و ۱۷ درصدی فعالیت کاتالاز و پراکسیداز و افزایش ۸۵ درصدی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به سطح شاهد شد (جدول ۳). در مطالعه‌ای مشابه نتایج مشابهی مبنی بر اثر افزایشی استعمال خارجی پرولین بر کلروفیل کل، کارتنوئیدها، پرولین، پتانسیل آب برگ، محتوای رطوبت نسبی آب برگ و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گزارش شده است که با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت دارد (Ahmed *et al.*, 2010). همین محققین افزایش فعالیت کاتالاز را با استعمال خارجی پرولین گزارش کردند که با مطالعه حاضر همخوانی نداشت. به طور کلی، نتایج ضد و نقیضی در ارتباط با اثرات تنش و استعمال خارجی پرولین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است. به عنوان مثال، Islam و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه خود در گیاه تنباکو بیان کردند که در شرایط تنش کادمیوم فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش و پراکسیداز افزایش می‌یابد و استعمال خارجی پرولین در این شرایط منجر به کاهش فعالیت پراکسیداز و افزایش فعالیت کاتالاز می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر، Hoque و همکاران (۲۰۰۷) بیان داشتند که در شرایط تنش شوری فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز کاهش می‌یابد و با استعمال خارجی پرولین فعالیت کاتالاز و پراکسیداز افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای دیگر، Nounjan و Theerakulpisut (۲۰۱۲) بیان داشتند که استعمال خارجی پرولین در شرایط تنش شوری

(Kaur and Asthir, 2015; Hayat *et al.*, 2012; Verbruggen, and Hermans, 2008; Hsu *et al.*, 2003) مطالعات متعددی همبستگی مثبت بین تجمع پرولین و مقاومت به تنش را در گیاهان گزارش کرده‌اند (Khalil and El-Noemani, 2012; Hayat *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2010; Verbruggen and Hermans, 2008). همچنین، در مطالعات متعدد نتایج مشابهی مبنی بر افزایش غلظت پرولین با استعمال خارجی پرولین در شرایط تنش خشکی و شوری گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (Khalil and El-Noemani, 2012; Ahmed *et al.*, 2011). علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استعمال خارجی پرولین حتی در شرایط عدم تنش منجر به افزایش تجمع پرولین می‌گردد. به نظر می‌رسد، با توجه به اینکه استعمال خارجی پرولین در شرایط عدم تنش می‌تواند منجر به سمیت در گیاه شود (Verbruggen and Hermans, 2008)، ممکن است اثر معکوس استعمال خارجی پرولین بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط عدم تنش با غلظت بالای پرولین در سلول در ارتباط باشد (شکل ۱- A, B, C, D). همبستگی (پیرسون) صفات نشان داد غلظت پرولین برگ در شرایط تنش همبستگی بالای با عملکرد بیولوژیک ( $r^2=0/65^{**}$ ) و دانه تک بوته ( $r^2=0/65^{**}$ ) داشت که حکایت از همبستگی مثبت بین تجمع پرولین و ایجاد مقاومت به تنش دارد (جدول ۴). تنش خشکی سبب افزایش ۶۳ درصدی فعالیت کاتالاز و کاهش ۳۹ و ۳۸ درصدی فعالیت آسکوربات پراکسیداز و

جدول ۴- همبستگی ساده (پیرسون) برخی صفات فیزیولوژیکی، آنتی‌اکسیدانی و عملکرد سه ژنوتیپ رازیانه در شرایط گلدانی بالای قطر (شاهد) و پایین قطر (تنش).

صفت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
۱ کلروفیل a	۱	۰/۹۸**	۰/۹۵**	۰/۹۹**	۰/۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۷ <sup>ns</sup>	-۰/۱۵ <sup>ns</sup>
۲ کلروفیل b	۰/۹۷**	۱	۰/۹۵**	۰/۹۸**	۰/۰۷ <sup>ns</sup>	-۰/۰۰۶ <sup>ns</sup>	-۰/۱۳ <sup>ns</sup>
۳ کارتنوئید	۰/۹۷**	۰/۹۴**	۱	۰/۹۶**	۰/۱۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۶ <sup>ns</sup>	-۰/۱۱ <sup>ns</sup>
۴ کلروفیل کل	۰/۹۹**	۰/۹۸**	۰/۹۷**	۱	۰/۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۴ <sup>ns</sup>	-۰/۱۴ <sup>ns</sup>
۵ شاخص پایداری غشا	۰/۲۵ <sup>ns</sup>	۰/۲۶ <sup>ns</sup>	۰/۳۱ <sup>ns</sup>	۰/۲۵ <sup>ns</sup>	۱	۰/۴۵*	-۰/۱۱ <sup>ns</sup>
۶ محتوای نسبی آب برگ	۰/۱۲ <sup>ns</sup>	۰/۲۰ <sup>ns</sup>	۰/۱۴ <sup>ns</sup>	۰/۱۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۶ <sup>ns</sup>	۱	۰/۱۲ <sup>ns</sup>
۷ پتانسیل آب برگ	۰/۱۷ <sup>ns</sup>	۰/۲۴ <sup>ns</sup>	۰/۲۱ <sup>ns</sup>	۰/۱۹ <sup>ns</sup>	-۰/۱۴ <sup>ns</sup>	۰/۳۰ <sup>ns</sup>	۱
۸ غلظت پلی‌فنل‌ها	۰/۰۲ <sup>ns</sup>	-۰/۰۸ <sup>ns</sup>	۰/۴۱*	-۰/۰۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۴۸*	-۰/۴۴*	-۰/۱۲ <sup>ns</sup>
۹ غلظت پرولین	۰/۲۹ <sup>ns</sup>	۰/۴۰ <sup>ns</sup>	۰/۳۷ <sup>ns</sup>	۰/۳۲ <sup>ns</sup>	۰/۲۰ <sup>ns</sup>	۰/۳۵ <sup>ns</sup>	۰/۱۳ <sup>ns</sup>
۱۰ کاتالاز	۰/۰۵ <sup>ns</sup>	-۰/۰۲ <sup>ns</sup>	-۰/۰۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۴ <sup>ns</sup>	-۰/۱۰ <sup>ns</sup>	-۰/۳۶ <sup>ns</sup>	-۰/۲۲ <sup>ns</sup>
۱۱ آسکوربات پراکسیداز	۰/۳۸ <sup>ns</sup>	۰/۴۴*	۰/۴۰ <sup>ns</sup>	۰/۳۹ <sup>ns</sup>	۰/۲۴ <sup>ns</sup>	۰/۵۲**	-۰/۰۱ <sup>ns</sup>
۱۲ پراکسیداز	-۰/۳۴ <sup>ns</sup>	-۰/۳۰ <sup>ns</sup>	-۰/۳۷ <sup>ns</sup>	-۰/۳۳ <sup>ns</sup>	-۰/۴۴*	۰/۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۳۵ <sup>ns</sup>
۱۳ عملکرد بیولوژیک تک بوته	۰/۲۸ <sup>ns</sup>	۰/۳۴ <sup>ns</sup>	۰/۳۷ <sup>ns</sup>	۰/۳۰ <sup>ns</sup>	-۰/۰۷ <sup>ns</sup>	۰/۴۱*	۰/۵۰**
۱۴ عملکرد دانه تک بوته	۰/۴۲*	۰/۴۹*	۰/۴۸*	۰/۴۴*	۰/۱۳ <sup>ns</sup>	۰/۵۷**	۰/۵۱**

ns، \* و \*\* ترتیب بیانگر معنی‌دار نبودن و معنی‌دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهد.

ادامه جدول ۴-

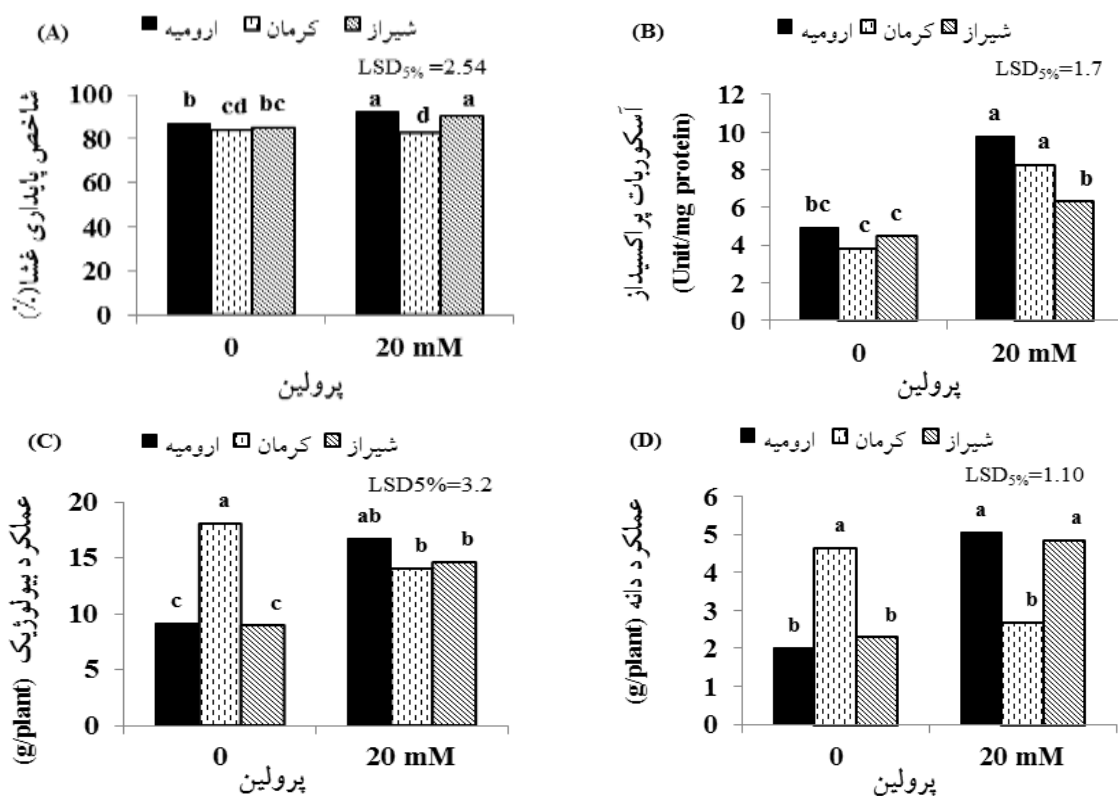
صفت	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
۱ کلروفیل a	-۰/۲۳ <sup>ns</sup>	-۰/۳۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۵ <sup>ns</sup>	-۰/۳۸ <sup>ns</sup>	-۰/۰۵ <sup>ns</sup>	-۰/۰۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۵ <sup>ns</sup>
۲ کلروفیل b	-۰/۲۴ <sup>ns</sup>	-۰/۳۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۳ <sup>ns</sup>	-۰/۳۵ <sup>ns</sup>	-۰/۱۱ <sup>ns</sup>	-۰/۰۰۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۶ <sup>ns</sup>
۳ کارتنوئید	-۰/۱۸ <sup>ns</sup>	-۰/۳۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۴ <sup>ns</sup>	-۰/۳۳ <sup>ns</sup>	-۰/۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۵ <sup>ns</sup>
۴ کلروفیل کل	-۰/۲۴ <sup>ns</sup>	-۰/۳۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۴ <sup>ns</sup>	-۰/۳۷ <sup>ns</sup>	-۰/۰۷ <sup>ns</sup>	-۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۲ <sup>ns</sup>
۵ شاخص پایداری غشا	-۰/۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۱۶ <sup>ns</sup>	۰/۲۴ <sup>ns</sup>	۰/۳۳ <sup>ns</sup>	-۰/۲۴ <sup>ns</sup>	۰/۳۲ <sup>ns</sup>	۰/۴۵*
۶ محتوای نسبی آب برگ	۰/۵۱**	۰/۲۴ <sup>ns</sup>	-۰/۰۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۹ <sup>ns</sup>	-۰/۲۱ <sup>ns</sup>	۰/۲۷ <sup>ns</sup>	۰/۳۰ <sup>ns</sup>
۷ پتانسیل آب برگ	۰/۴۴*	۰/۵۰*	-۰/۴۰*	۰/۳۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۱۷ <sup>ns</sup>	۰/۲۰ <sup>ns</sup>
۸ غلظت پلی‌فنل‌ها	۱	۰/۷۲**	-۰/۴۸*	۰/۴۶*	-۰/۲۲ <sup>ns</sup>	۰/۱۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۸ <sup>ns</sup>
۹ غلظت پرولین	-۰/۲۷ <sup>ns</sup>	۱	-۰/۵۱	۰/۶۸**	-۰/۱۵ <sup>ns</sup>	۰/۱۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۵ <sup>ns</sup>
۱۰ کاتالاز	-۰/۰۱ <sup>ns</sup>	-۰/۲۱ <sup>ns</sup>	۱	-۰/۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۳۶ <sup>ns</sup>	-۰/۰۷ <sup>ns</sup>	-۰/۰۴ <sup>ns</sup>
۱۱ آسکوربات پراکسیداز	-۰/۲۳ <sup>ns</sup>	۰/۴۶*	-۰/۰۳ <sup>ns</sup>	۱	-۰/۰۷ <sup>ns</sup>	۰/۳۵ <sup>ns</sup>	۰/۲۰ <sup>ns</sup>
۱۲ پراکسیداز	-۰/۲۹ <sup>ns</sup>	-۰/۲۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۳ <sup>ns</sup>	-۰/۰۹ <sup>ns</sup>	۱	-۰/۰۲ <sup>ns</sup>	-۰/۳۰ <sup>ns</sup>
۱۳ عملکرد بیولوژیک تک بوته	-۰/۴۲*	۰/۶۵**	-۰/۳۷ <sup>ns</sup>	۰/۴۱*	۰/۱۲ <sup>ns</sup>	۱	۰/۸۳**
۱۴ عملکرد دانه تک بوته	-۰/۴۸*	۰/۶۵**	-۰/۲۱ <sup>ns</sup>	۰/۵۰*	۰/۰۹ <sup>ns</sup>	۰/۸۶**	۱

ns، \* و \*\* ترتیب بیانگر معنی‌دار نبودن و معنی‌دار بودن در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهد.

بوته در شرایط تنش به موازات کاهش غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی، شاخص پایداری غشا، محتوای نسبی آب برگ و افزایش پتانسل آب برگ و فعالیت کاتالاز بود (جدول ۳). کمبود رطوبت در مراحل مختلف نمو به‌ویژه مرحله زایشی سبب کاهش طول دوره فتوسنتزی و افت در انتقال مواد حاصل از فتوسنتز جاری به دانه می‌شود. به نظر می‌رسد این کاهش به واسطه پیری زودرس برگ‌ها، کاهش سطح برگ و کاهش سهم انتقال مجدد مواد ذخیره شده در ساقه به دانه می‌باشد که منجر به کاهش عملکرد دانه در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله اسفرزه (Bannayan et al., 2008) و گلرنگ (Goksoy et al., 2004) نیز شده است. استعمال خارجی پرولین به ترتیب سبب افزایش ۲۸ و ۴۲ درصدی عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته نست به سطح شاهد شد (جدول ۳). در مطالعه حاضر افزایش عملکرد بیولوژیک و دانه ناشی از استعمال خارجی پرولین به موازات افزایش شاخص پایداری غشا، محتوای نسبی آب برگ، غلظت پلی‌فنل‌ها و پرولین بود (جدول ۳). مطالعات متعددی نتایج مشابه مبنی بر کاهش وزن ماده خشک در شرایط تنش و افزایش آن را در شرایط استعمال خارجی پرولین گزارش کردند. در این راستا، Khalil and El-Noemani (۲۰۱۲) به منظور بررسی اثر تنش خشکی و محلول پاشی پرولین بر گیاه شاهی نتایج مشابهی مبنی بر کاهش عملکرد ماده خشک در شرایط تنش خشکی را گزارش کردند. این کاهش به موازات افزایش غلظت پرولین، قندهای محلول بود که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (جدول ۲). همین محققان نتایج مشابهی مبنی بر افزایش عملکرد ماده خشک و دانه در شرایط استعمال خارجی غلظت متوسط پرولین را گزارش کردند (Khalil and El-Noemani, 2012). تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های از نظر عملکرد بیولوژیک تک بوته وجود نداشت، اما ژنوتیپ ارومیه بالاترین و ژنوتیپ کرمان کمترین عملکرد دانه تک بوته را داشتند (جدول ۳). اثر استعمال خارجی پرولین بر عملکرد بیولوژیک تک بوته بسته به نوع ژنوتیپ متفاوت بود. به طوریکه، با استعمال خارجی پرولین میزان آن نسبت به سطح شاهد در ژنوتیپ‌های ارومیه و

منجر به افزایش فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز می‌شود. در بین ژنوتیپ‌ها، بالاترین فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ ارومیه و بالاترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ کرمان به‌دست آمد (جدول ۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بر خلاف کاتالاز و پراکسیداز، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به استعمال خارجی پرولین و ژنوتیپ حساسیت بالای نشان داد (جدول ۲ و شکل ۳-B). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استعمال خارجی پرولین در هر دو شرایط تنش و شاهد آبیاری افزایش یافت، اما افزایش یاد شده در سطح شاهد آبیاری (۹۴/۷ درصد) بیشتر از سطح تنش آبی (۶۹/۷ درصد) بود (شکل ۱-H). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استعمال خارجی پرولین در همه ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. اما میزان افزایش یاد شده در ژنوتیپ‌های شیراز (۴۲/۳ درصد) و ارومیه (۹۸/۸ درصد) کمتر از ژنوتیپ کرمان (۱۱۶ درصد) بود (شکل ۳-B). تحت شرایط تنش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز افزایش می‌یابد (Ozden et al., 2009). اما نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روابط بین تنش، استعمال خارجی پرولین و ژنوتیپ پیچیده است، چرا که پاسخ آسکوربات پراکسیداز برای تعدیل شرایط تنش در پاسخ به استعمال خارجی پرولین و ژنوتیپ متفاوت بود. به طوریکه در شرایط تنش با استعمال خارجی پرولین فعالیت این آنزیم در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت. به نظر می‌رسد درصد بالای افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ کرمان با حساسیت بالای این ژنوتیپ به شرایط تنش در ارتباط باشد (شکل ۳-B، C، D). کاهش شاخص پایداری غشا این ژنوتیپ در شرایط تنش می‌تواند گواهی دیگری بر حساس بودن این ژنوتیپ به استعمال خارجی پرولین باشد (شکل ۳-A).

تنش خشکی به ترتیب سبب کاهش ۴۷ و ۶۴ درصدی عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته نست به سطح شاهد شد (جدول ۳). عملکرد بیولوژیک و دانه حاصل تغییرات روابط آبی ناشی حاصل از تغییرات فیزیولوژیکی و آنتی اکسیدانی است. در مطالعه حاضر کاهش عملکرد بیولوژیک و دانه تک



شکل ۳- اثر متقابل ژنوتیپ × پرولین بر شاخص پایداری غشا (A)، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (B)، عملکرد بیولوژیک تک بوته (C) و عملکرد دانه تک بوته (D). میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

شاخص پایداری غشا (شکل ۳- A) و فعالیت بالای آسکوربات پراکسیداز (شکل ۳- B) در شرایط تنش می‌تواند گواهی بر حساسیت این ژنوتیپ به استعمال خارجی پرولین باشد. همبستگی (پیرسون) صفات نشان داد که در شرایط تنش، محتوای نسبی آب برگ  $(r^2=0/41^*)$ ، پتانسیل آب برگ  $(r^2=0/51^*)$ ، غلظت پرولین  $(r^2=0/65^{**})$  و فعالیت آسکوربات پراکسیداز  $(r^2=0/41^*)$  همبستگی مثبت و معنی‌داری با عملکرد بیولوژیک تک بوته داشتند (جدول ۴). علاوه بر این در شرایط تنش، کلروفیل a  $(r^2=0/42^*)$ ، b  $(r^2=0/49^*)$ ، کارتنوئید  $(r^2=0/48^*)$ ، کلروفیل کل  $(r^2=0/44^*)$ ، محتوای نسبی آب برگ  $(r^2=0/57^{**})$ ، پتانسیل آب برگ  $(r^2=0/51^{**})$ ، غلظت پرولین  $(r^2=0/65^{**})$  و عملکرد بیولوژیک  $(r^2=0/86^{**})$  همبستگی مثبت و معنی‌داری با عملکرد تک بوته داشتند، اما این همبستگی برای غلظت پلی‌فنل‌ها  $(r^2=0/48^*)$  منفی بود (جدول ۴). همبستگی مثبت و معنی‌دار بین تجمع پرولین و عملکرد

شیراز به ترتیب ۸۲/۹ و ۶۳/۴ درصد افزایش و در ژنوتیپ کرمان ۲۲/۹ درصد کاهش یافت (شکل ۳- C). علاوه بر این، اثر استعمال خارجی پرولین بر عملکرد دانه تک بوته بسته به ژنوتیپ متفاوت بود. به طوریکه میزان آن با استعمال خارجی پرولین نسبت به سطح شاهد در ژنوتیپ‌های ارومیه و شیراز به ترتیب ۱/۵ و ۱/۱ برابر افزایش و در ژنوتیپ کرمان ۴۲/۵ درصد کاهش پیدا کرد (شکل ۳- D). اثرات مطلوب استعمال خارجی پرولین ممکن است بسته به نوع گیاه، مرحله رشدی گیاه، زمان استعمال و غلظت محلول متفاوت باشد (Ashraf and Foolad, 2007). مطالعات متعددی نتایج مشابهی مبنی بر پاسخ متفاوت ژنوتیپ‌ها به استعمال خارجی پرولین را گزارش کرده‌اند. به نظر می‌رسد، پاسخ متفاوت ژنوتیپ کرمان بیانگر این امر باشد که غلظت استفاده شده پرولین مطلوب مکانیسم‌های دخیل در پایداری غشا نبوده است (شکل ۳- A). پایین بودن محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی (جدول ۳)، کاهش

عملکرد دانه تک بوته یاد شده با استعمال خارجی پرولین بسته به ژنوتیپ متفاوت بود، به طوریکه استعمال خارجی آن باعث افزایش عملکرد دانه تک بوته ژنوتیپ‌های ارومیه (۱/۵ برابر) و شیراز (۱/۱ برابر) و کاهش آن در ژنوتیپ کرمان (۴۲/۵ درصد) نسبت به سطح شاهد شد. بر اساس یافته‌های بالا می‌توان بیان کرد پرولین می‌تواند اثرات نامطلوب تنش را به واسطه افزایش غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی، پلی‌فنل‌ها و پرولین، بهبود روابط آبی و آنتی‌اکسیدانی گیاه در ژنوتیپ‌های نظیر ارومیه و شیراز را تعدیل کند. همبستگی بالایی بین تجمع پرولین و عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته در شرایط تنش رطوبتی نیز گواهی بر همبستگی مثبت تجمع پرولین و ایجاد مقاومت به تنش خشکی در گیاه رازیانه است.

بیولوژیک و دانه در شرایط تنش همبستگی مثبت بین تجمع پرولین و مقاومت به تنش را بیان می‌کند (جدول ۴)

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی، شاخص پایداری غشا، محتوای نسبی برگ و افزایش غلظت پلی‌فنل‌ها، پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز) و در نتیجه کاهش عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته شد. در نقطه مقابل، استعمال خارجی پرولین با افزایش شاخص پایداری غشا، محتوای نسبی آب برگ، پتانسیل آب برگ، غلظت پلی‌فنل‌ها و پرولین، فعالیت آسکوربات پراکسیداز و کاهش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز باعث افزایش عملکرد بیولوژیک و دانه تک بوته شد. افزایش

### منابع:

- عسکری، ا.، پ. احسان‌زاده و زینعلی، ح.، (۱۳۹۴) پاسخ فیزیولوژیکی و رشدی دوازده ژنوتیپ رازیانه به پتانسیل آب در مرحله جوانه‌زنی. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۱۶: ۱-۱۴.
- Ahmed, C. B., Rouina, B. B., Sensoy, S., Boukhriss, M., and Abdullah, F. B. (2010) Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4216-4222.
- Ahmed, C. B., Magdich, S., Rouina, B. B., Sensoy, S., Boukhris, M., and Abdullah, F. B. (2011) Exogenous proline effects on water relations and ions contents in leaves and roots of young olive. *Amino acids* 40: 565-573.
- Ali, Q., Ashraf, M. and Athar, H. R. (2007) Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions. *Pakistan Journal of Botany* 39: 1133-1144.
- Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206-216.
- Askari, E. and Ehsanzadeh, P. (2015a) Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid and their interactive effects on physiological characteristics of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 1-14.
- Askari, E. and Ehsanzadeh, P. (2015b) Osmoregulation-mediated differential responses of field-grown fennel genotypes to drought. *Industrial Crops and Products* 76: 494-508.
- Askari, E. and Ehsanzadeh, P. (2015c) Effectiveness of exogenous salicylic acid on root and shoot growth attributes, productivity, and water use efficiency of water-deprived fennel genotypes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 56: 687-696.
- Bannayan, M., Nadjafi, F., Azizi, M., Rastgoo, M. and Tabrizi, L. (2008) Yield and seed quality of *Plantago ovate* and *Nigella sativa* under different irrigation treatments. *Industrial Crops and Products* 27: 11-16.
- Bates, L. S., Waldaren, R. P. and I. Teare, D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Journal of Plant and Soil* 39: 205-208.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Charles, D. J., Morales, M. R. and Simon, J. F. (1993) Essential oil content and chemical composition of finocchio fennel In: *New crops* (eds. Janick, J. and Simon J. E.) Pp. 570-573. Wiley, New York.
- Chaves, M., Flexas, J. and Pinheiro, C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Journal of Annals of Botany* 103: 551-560.



- Demiral, T. and Turkan, I. (2004) Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment? *Journal of Plant Physiology* 161: 1089-1100.
- Goksoy, A. T., Demir, A. O., Turan, Z. M. and Dagustu, N. (2004) Responses of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to full and limited irrigation at different growth stages. *Field Crops Research* 87: 167-178.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. and Ahmad, A. (2012) Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling and Behavior* 7: 1456-1466.
- Herzog, V., Fahimi, H. (1973) Determination of the activity of peroxidase. *Analytical Biochemistry* 55: 554-562.
- Hoque, M. A., Okuma, E., Banu, M. N. A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and Murata, N. (2007) Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidants enzyme activity. *Journal of Plant Physiology* 164: 553-561.
- Hsu, S., Hsu, Y. and Kao, C. (2003) The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biologia Plantarum* 46:73-78.
- Iqbal, N., Ashraf, M. and Ashraf, M. Y. (2008) Glycinebetaine, an osmolyte of interest to improve water stress tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.): water relations and yield. *South African Journal of Botany* 74: 274-281.
- Islam, M. M., Hoque, M. A., Okuma, E., Banu, M. N. A., Shimoishi, Y., Nakamura, Y. and Murata, Y. (2009) Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology* 166: 1587-1597.
- Kaur, G. and Asthir, B. (2015) Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum* 59: 609-619.
- Khalil, S. E. and El-Noemani, A. A. (2012) Effect of irrigation intervals and exogenous proline application in improving tolerance of garden cress plant (*Lepidium sativum* L.) to water stress. *Journal of Applied Science and Research* 8: 157-167.
- Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: *Current protocols in food analytical chemistry*. Wiley, New York.
- Moustakas, M., Sperdouli, I., Kouna, T., Antonopoulou, C. I. and Therios, I. (2011) Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Plant Growth Regulation* 65:315-325.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Nounjan, N. and Theerakulpisut, P. (2012) Effects of exogenous proline and trehalose on physiological responses in rice seedlings during salt-stress and after recovery. *Plant, Soil and Environment* 58: 309-315.
- Ozden, M., Demirel, U. and Kahraman, A. (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Scientia Horticulturae* 119: 163-168.
- Rejeb, K. B., Abdelly, C. and Savoure, A. (2014) How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry* 80: 278-284.
- Sairam, R. K. (1994) Effect of moisture stress on physiological activities of two contrasting wheat genotypes. *Indian Journal of Experimental Biology*. 32: 594-597.
- Singh, R. P., Murthy, K. N. C. and Jayaprakasha. G. K. (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 81-86.
- Smart, R. E. and Bingham, G. E. (1974) Rapid estimates of relative water content. *Journal of Plant Physiology* 53: 258-260.
- Sperdouli, I. and Moustakas, M. (2015) Differential blockage of photosynthetic electron flow in young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* by exogenous proline. *Photosynthetica* 53: 471-477.
- Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753-759.

## Physiological, antioxidative and yield responses of three fennel genotypes to exogenous proline under drought stress condition

Ali Gholami Zali and Parviz Ehsanzadeh\*

Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received: 07/01/2018, Accepted: 27/04/2018)

### Abstract

Proline is an amino acid with a crucial role in ameliorating environmental stresses, including drought. In order to study the effect of external proline on the response of fennel to drought stress, three fennel genotypes (namely Urmia, Shiraz, and Kerman) were exposed to two levels of irrigation, i.e. control (34-45% of maximum allowable depletion in soil water) and drought (75-85% of maximum allowable depletion in soil water) and two levels of foliar-applied proline (0 and 20 mM) in a 4-replicate factorial randomized complete block pot experiment. Drought led to significant decreases in chlorophyll (Chl) and carotenoids (Cars) concentrations, leaf relative water content (RWC), ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POX) activities, leaf water potential ( $\psi_w$ ), plant dry mass (DM) and seed weight but significant increases in leaf proline and polyphenols concentrations, and catalase (CAT) activity. Foliar-applied proline resulted in significant increases in membrane stability index (MSI), RWC,  $\psi_w$ , proline and polyphenols concentrations, APX activity, plant DM and seed weight but it led to significant decreases in CAT and POX activities. Genotype Urmia out-numbered the remaining genotypes in terms of Chl and Cars concentrations, MSI, CAT and APX activities. There were significant correlations between leaf proline concentration and plant DM and seed weight under drought condition. Foliar-applied proline affected Chl and Cars differently in the drought-stressed and non-stressed plants. Furthermore, it affected plant seed weight in a genotype-dependent manner, as evidenced by 150% and 110% increases in Urmia and Shiraz and a 42.5% decrease in Kerman. It may be concluded that drought suppresses fennel growth, but foliar-applied proline is potent to mitigate the depression through increasing the leaf Chl, Cars, proline, and polyphenols concentrations, RWC and certain antioxidative enzymes activities in genotypes such as Urmia and Shiraz.

**Key Words:** Antioxidant enzymes, Proline, Drought, Photosynthetic pigments, Seed weight

Corresponding author, Email: ehsanzadehp@gmail.com