

بررسی صفات مورفولوژیک، میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ژنوتیپ‌های نخود (*Cicer arietinum* L.) در شرایط تنش خشکی

پروانه ابریشم‌چی^۱، علی گنجعلی^{۱*} و هسان ساکنی^۲

۱- اعضای هیئت علمی دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۷/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۱۵

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی واکنش ژنوتیپ‌های نخود به تنش خشکی از نظر صفات مورفولوژیک و تغییرات بیوشیمیایی ایجادشده، برای درک بهتر ساز و کارهای مقاومت به خشکی و دستیابی به منابع ژنتیکی مطلوب انجام گرفت. ژنوتیپ‌های نخود شامل MCC877 و MCC696 (متحمل به خشکی) و MCC776 و MCC588 (حساس به خشکی) در چهار رژیم رطوبتی خاک شامل ظرفیت زراعی (شاهد)، ۷۵ درصد، ۵۰ درصد و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در محیط کنترل شده، در سال ۱۳۸۸ با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که اغلب صفات مورفولوژیک، مانند ارتفاع بوته، زیست توده اندام هوایی و ریشه، مجموع طول ریشه‌ها و سطح برگ، عمدتاً تحت تأثیر تنش‌های شدید خشکی قرار گرفتند. تنش‌های متعادل خشکی (رطوبت ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و بالاتر)، تأثیر معنی‌داری بر صفات فوق نداشت. در این بررسی، با کاهش رطوبت خاک، میزان پرولین در تمام ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. ژنوتیپ بومی کانیدا برای تحمل به خشکی (MCC696) از بیشترین مقدار پرولین در شرایط تنش شدید خشکی برخوردار بود. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز، تحت تأثیر تنش خشکی، افزایش یافت و این افزایش در ژنوتیپ حساس به خشکی MCC588، بیش از سایر ژنوتیپ‌های نخود بود. احتمالاً عدم وجود مقاومت و اجتناب از تنش خشکی در ژنوتیپ MCC588، باعث واکنش گیاه به تولید بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این ژنوتیپ شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پرولین، تنش خشکی، ژنوتیپ‌های نخود، صفات ریشه و اندام هوایی

مقدمه

نیز همزمان با مرحله‌ای است که رطوبت خاک به طور فزاینده با گذشت زمان کاهش می‌یابد (Ganjeali & Nezami, 2008). بنابراین در راستای افزایش بازدهی تولید نخود در مناطق دارای تنش خشکی، بهبود سازگاری و تحمل به تنش، مورد نیاز است. در این ارتباط، صفات مورفوفیزیولوژیک متعددی وجود دارد که می‌توان از آنها برای بهبود مقاومت و تحمل به خشکی استفاده نمود (Singh & Saxena, 1993). در شرایط تنش خشکی، ارتفاع بوته و گسترش سطح برگ، کاهش یافته و برگ‌های جدید سطح کمتری داشته (ضحیم‌تر) و ریزش می‌کنند (Ludlow & Munchow, 1990). از آنجایی که عامل اصلی محدودکننده رشد در محیط‌های خشک، آب قابل دسترس می‌باشد، لذا بیشترین بازده از نظر رشد و تولید محصول، زمانی به دست می‌آید که از آب محدود موجود در خاک، حداکثر جذب صورت پذیرد. این خصوصیت تنها از طریق مکانیسم‌های سازگاری مرتبط با

نخود (*Cicer arietinum* L.)، یک منبع مهم پروتئینی در رژیم غذایی بسیاری از مردم کشورهای در حال توسعه می‌باشد که اغلب به‌عنوان مکمل پروتئین غلات در رژیم غذایی جای می‌گیرد (Singh & Saxena, 1993). این گیاه در دامنه وسیعی از شرایط آب‌وهوایی از نواحی نیمه‌گرمسیری تا مناطق مدیترانه‌ای غرب آسیا، شمال آفریقا، جنوب و جنوب‌غربی اروپا کشت می‌شود (FAO, 2005). بررسی‌ها نشان داده است که تنش خشکی به‌تنهایی علت کاهش ۵۰ درصد عملکرد نخود است (Gupta, 1997). این مشکل در ایران، جدی‌تر است چرا که نخود اغلب به‌صورت سنتی در انتهای فصل باران (اسفند یا فروردین) براساس رطوبت ذخیره‌شده در خاک کشت می‌شود و رشد سریع گیاه

* نویسنده مسئول: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، همراه: ۰۹۱۵۳۰۵۷۶۴۵، ganjeali@um.ac.ir

(Gregory, 1988; Pardo *et al.*, 2000). متأسفانه اطلاعات در مورد حبوبات و به‌ویژه نخود برای فهم بیشتر سازوکارهای مقاومت به خشکی، زیاد نیست. بنابراین، این تحقیق با اهداف بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ریشه و اندام هوایی و تغییرات بیوشیمیایی و آنزیمی ژنوتیپ‌های نخود در واکنش به تنش خشکی به‌منظور گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی نخود، انجام شده است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی صفات مورفوفیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های نخود در واکنش به تنش خشکی و نیز بررسی تغییرات بیوشیمیایی و آنزیمی ناشی از آن، آزمایشی با چهار ژنوتیپ نخود شامل MCC877 و MCC696 (متحمل به خشکی) و MCC588 و MCC776 (حساس به خشکی) در محیط کنترل‌شده با دمای روز و شب، به‌ترتیب ۲۷ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی و تاریکی به‌ترتیب ۱۳ و ۱۱ ساعت، در چهار رژیم رطوبتی خاک شامل ظرفیت زراعی^۲ (شاهد)، ۷۵ درصد، ۵۰ درصد و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه تحقیقاتی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۸۸ اجرا شد. به‌منظور سهولت مطالعه ریشه و بازیافت آن، از ماسه شسته‌شده به‌عنوان بستر کاشت و از محلول غذایی هگلند برای تغذیه گیاهان استفاده شد. ظرفیت زراعی و سطوح تنش خشکی، بر اساس درصد رطوبت وزنی ایجاد شدند و از طریق توزین روزانه گلدان‌ها (دو کیلوگرم) و تأمین کسری آب موجود در محیط، میزان رطوبت گلدان‌ها در طول دوره رشد، به‌طور ثابت حفظ گردید. ده روز پس از کاشت، سطوح مختلف تنش خشکی بر روی ژنوتیپ‌ها اعمال شد و تا پایان دوره رشد، ادامه یافت. حدود هفت هفته پس از کاشت که تقریباً مصادف با پایان دوره رشد رویشی و آغاز مرحله گلدهی بود، نمونه‌های گیاهی، تخریب و به دو بخش ریشه و اندام هوایی تفکیک شدند. ریشه‌های هر گیاه به‌طور کامل و با حداقل آسیب‌دیدگی شسته و به‌منظور جلوگیری از پلاسیدگی، بلافاصله به یخچال انتقال داده شدند. صفاتی مانند مجموع طول ریشه‌ها (TRL)^۳، سطح ریشه‌ها (RA)^۴ و وزن خشک ریشه (RDW)^۵،

Gupta, 1997; Saxena, 2003). از آنجایی که نسبت بالاتر ریشه به اندام‌های هوایی (اندام‌های جذب‌کننده آب نسبت به اندام‌های مصرف‌کننده)، توان گیاه را برای افزایش تحمل به خشکی بهبود می‌بخشد، لذا اغلب، این نسبت به‌عنوان یک معیار برای گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی پیشنهاد می‌شود.

تنظیم اسمزی، تجمع فعال مواد محلول توسط گیاه در واکنش به افزایش کمبود آب خاک می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که همبستگی معنی‌داری بین توانایی تنظیم اسمزی یک گیاه و رشد آن در شرایط تنش خشکی وجود دارد (Valentovic *et al.*, 2006). در عین حال، بسیاری از گیاهان به‌منظور تنظیم اسمزی و تحمل بیشتر تنش، از اسمولیت‌های آلی مثل پرولین استفاده می‌کنند. پرولین، یک منبع ذخیره برای کربن، نیتروژن و نیز جاروکننده^۱ رادیکال‌های آزاد می‌باشد. همچنین، پرولین ساختمان‌های فراسلولی (از جمله غشاءها و پروتئین‌ها) را تثبیت و پتانسیل ردوکس سلولی ایجادشده در اثر تنش را از بین می‌برد (Chen & Murata, 2000). سنتز پرولین در بسیاری از گونه‌های گیاهی در مواجهه با تنش‌های خشکی، شوری، دماهای بالا و شدت‌های بالای نور، افزایش می‌یابد (Mansour, 2000). این ماده، فسفولیپیدهای غشای سلول را در مقابل تخریب، حفظ و به‌عنوان خنثی‌کننده رادیکال هیدروکسیل عمل می‌نماید (Samaras *et al.*, 1995). گیاهان مقاوم به تنش، از توانایی بیشتر سنتز پرولین و متعاقب آن از پایداری بیشتر غشاء برخوردار هستند که نتیجه آن، هدررفت کمتر آب از طریق غشاهای سلولی می‌باشد (Valentovic *et al.*, 2006).

سازوکارهایی که تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند، نقش مهمی در بهبود تحمل به خشکی ایفا می‌کنند (Sairam *et al.*, 2002). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو، دارای سیستم دفاعی کارآمدی هستند که می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند. این سیستم دفاعی شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) می‌باشد (Blokhina *et al.*, 2003).

درک صفات مورفوفیزیولوژیکی و بررسی تغییرات بیوشیمیایی ایجادشده در محیط تنش برای فهم بیشتر سازوکارهای مقاومت به خشکی در گیاه و دستیابی به منابع ژنتیکی آن برای برنامه‌های اصلاحی، ضروری است

2- Field Capacity
3- Total Root Length (TRL)
4- Root Area (RA)
5- Root Dry Weight (RDW)

1- Scavenger

برگی را با ۵ میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد (w/v) در حمام یخ، ساییده تا هموژن شوند. آن‌گاه، همگنای حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از روشناور را برداشته و ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰mM با pH=7 و ۱ میلی‌لیتر یدورپتاسیم (KI) ۱ مولار به آن اضافه گردید. در نهایت، جذب نمونه در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد و سپس با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار آباکسیژنه در نمونه محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌ها

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۲ میلی‌لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار (pH=5) با ۰/۲ میلی‌لیتر آب‌اکسیژنه ۰/۳ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر بنزیدین ۰/۲ مولار محلول در متانول ۵۰ درصد در حمام یخ مخلوط شدند و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد و سپس جذب نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه یا بیشتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و منحنی تغییرات جذب آن رسم گردید. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین، محاسبه شد (Holy, 1972).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش Giannopolitis & Ries (1997) و به کمک سنجش مهار احیای نوری^۴ نیتروبلوترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر، انجام گرفت. برای این منظور، ابتدا محلول بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=7.5 تهیه و سپس برای تهیه محلول واکنش، ترکیبات EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، نیتروبلوترازولیوم (NBT) ۷۵ میکرومولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و ریوفلاوین ۴ میکرومولار به ترتیب اضافه و محلول حاصل در تاریکی نگهداشته شد. از هر نمونه عصاره، ۱۰۰ میکرولیتر در هر لوله آزمایش ریخته و ۳ میلی‌لیتر از محلول فوق به آن اضافه گردید و با قراردادن آنها تحت روشنایی لامپ فلورسنت (۴۰W) بلافاصله واکنش آغاز گردید. پس از ۸ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم، نیاز به شاهد روشنایی است. این نمونه، شامل ۳ میلی‌لیتر از محلول واکنش (فاقد عصاره) است که در روشنایی قرار می‌گیرد. به این ترتیب، میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه‌ها در مقایسه با شاهد روشنایی

اندازه‌گیری و محاسبه شدند. اندام‌های هوایی نیز به دو بخش برگ و ساقه تفکیک شده و پس از اندازه‌گیری سطح برگ (LA)^۱، به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۲ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و سپس وزن خشک برگ (LDW)^۲ و وزن خشک ساقه (SDW)^۳ با ترازوی AND مدل GT-300 با دقت ۰/۰۱ گرم تعیین شد. ارتفاع بوته توسط خط‌کش، سطح برگ توسط دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ، طول و سطح ریشه‌ها پس از رنگ‌آمیزی، با یک اسکنر متصل به کامپیوتر بررسی و سپس با استفاده از نرم‌افزار (ROOT EDGE, Root Edge, 1999)، طول و سطح ریشه برای هر گیاه محاسبه شد (Ganjeali et al., 2007).

بررسی‌های بیوشیمیایی

چهل روز پس از اِعمال تنش خشکی (شروع گلدهی)، به منظور بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی، از برگ ژنوتیپ‌های نخود، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها پس از توزین، در بسته‌های مشخص در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و به تدریج در سنجش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج و سنجش پرولین

برای استخراج و سنجش پرولین از روش Bates (1973) *et al* استفاده شد. برای این منظور، ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ در ۱۰ ml اسید سولفوسالیسیلیک آبدار ۳ درصد (w/v) کاملاً ساییده شد تا محلول همگن ایجاد شود. دو میلی‌لیتر از محلول حاصل با دو میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال در یک لوله آزمایش مخلوط شدند و به مدت یک ساعت در حمام آب ۱۰۰ درجه، قرار گرفتند. به محتویات لوله، ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت به هم زده شدند. این عمل موجب دوفاز شدن محتویات لوله (فاز تولوئن رنگی حاوی پرولین در بالا و فاز آبی شفاف در پایین لوله) می‌شود. پس از مدت ۲۰ دقیقه، جذب نوری محلول در ۵۲۰ نانومتر با استفاده از تولوئن به عنوان شاهد خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین در محلول محاسبه گردید.

استخراج و سنجش آب اکسیژنه (H₂O₂)

برای اندازه‌گیری میزان آب‌اکسیژنه، از روش Velikova (2000) استفاده شد. برای این منظور، ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت

- 1- Leaf Area (LA)
- 2- Leaf Dry Weight (LDW)
- 3- Stem Dry Weight (SDW)

4- Photoreduction

ارتفاع بوته در ژنوتیپ‌های فوق نسبت به همین ژنوتیپ‌ها در شرایط بدون تنش (FC)، معنی‌دار نبود (جدول ۲). بیشترین ارتفاع بوته، به ژنوتیپ MCC588 در تیمار شاهد و کمترین آن به ژنوتیپ MCC776 و در بالاترین سطح تنش خشکی (FC ۲۵ درصد)، تعلق داشت. در یک آزمایش، با کاهش رطوبت خاک از ظرفیت زراعی (FC ۱۰ درصد) به FC ۲۵ درصد، ارتفاع گیاهچه‌های نخود از ۲۰/۲ به ۳/۷ سانتی‌متر کاهش یافت (Majnoon Hossieini et al., 2009b). کاهش فاصله میانگره‌ها و متعاقب آن ارتفاع کمتر بخش هوایی، یک سازوکار مهم سازگاری گیاهان در شرایط تنش خشکی است (Gupta, 1997).

وزن خشک اندام هوایی

مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که تفاوت‌های معنی‌داری میان ژنوتیپ‌ها از نظر وزن خشک اندام هوایی وجود نداشت (جدول ۱) و تأثیرپذیری آنها از حیث این صفت به تنش خشکی، یکسان بود. در مراحل اولیه رشد تا شروع گل‌دهی، اولویت اختصاص مواد فتوسنتزی در گیاه نخود، عمدتاً به سمت ریشه‌ها است تا اندام هوایی (Ganjeali & Kafi, 2007)، بنابراین تفاوت‌های ژنوتیپی از نظر بیوماس اندام‌های هوایی عمدتاً در مراحل نهایی رشد ظاهر می‌شوند. نتایج حاصل از برهم‌کنش ژنوتیپ و تنش خشکی نشان داد که کاهش وزن خشک اندام هوایی نسبت به شاهد در هر چهار ژنوتیپ، فقط در بیشترین سطح تنش خشکی (FC ۲۵ درصد) معنی‌دار است ($P \leq 0.05$).

شدت کاهش وزن خشک اندام هوایی در بالاترین سطح تنش در ژنوتیپ حساس MCC588، بیش از سایرین بود (جدول ۲). (Majnoon Hossieini et al., 2009a). کاهش وزن خشک اندام هوایی را در شرایط رطوبت محدود (FC ۲۵ درصد) نسبت به شاهد (FC ۱۰ درصد) برای نخودهای تیپ کابلی ۸۵-۷۹ درصد و برای تیپ دسی، ۷۹-۷۷ درصد گزارش کردند. عدم وجود تفاوت‌های معنی‌دار میان ژنوتیپ‌ها در اغلب سطوح تنش خشکی و تیمار شاهد از نظر وزن خشک اندام هوایی (جدول ۲)، ممکن است تا حدی به این موضوع مرتبط باشد.

سطح برگ

تفاوت‌های معنی‌داری میان ژنوتیپ‌ها از نظر سطح برگ وجود نداشت ($p < 0.05$). بیشترین و کمترین سطح برگ در گیاه به ترتیب به ژنوتیپ‌های MCC776 و MCC558 تعلق داشت، ولی تفاوت موجود، معنی‌دار نبود (داده‌ها ارائه نشده

سنجیده می‌شود. به دلیل عدم وجود آنزیم در شاهد روشنایی، احیای NBT در حضور نور به‌طور ۱۰۰ درصد انجام گرفته و تمام نیتروبولوترازولیوم موجود در محلول واکنش، به فورمازون^۱ تبدیل می‌شود. میزان جذب این شاهد در ۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده ۱۰۰ درصد احیای نوری NBT است و نیمی از آن، معادل یک واحد آنزیمی می‌باشد. بنابراین، یک واحد آنزیمی^۲ سوپراکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیای نوری NBT می‌گردد. اختلاف جذب نمونه‌ها و شاهد روشنایی در ۵۶۰ نانومتر، نشان‌دهنده مهار احیای نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه می‌باشد. با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه‌ها، محاسبه شده و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره به دست آمده مطابق روش (Lowry et al., 1951) بیان گردید.

تجزیه آماری

تجزیه واریانس داده‌ها توسط نرم‌افزارهای آماری Mstat-C و JMP، ترسیم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چنددامنه ای دانکن ($P < 0.05$) انجام شد.

نتایج و بحث

صفات اندام هوایی

ارتفاع بوته

نتایج مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که با افزایش تنش خشکی، ارتفاع بوته در تمامی ژنوتیپ‌ها کاهش یافت اما کاهش ارتفاع بوته نسبت به شاهد، تنها در سطح تنش FC ۲۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین و کمترین ارتفاع بوته، به ترتیب به ژنوتیپ‌های MCC588 و MCC776 تعلق داشت (داده‌ها نشان داده نشده است). مقایسه میانگین مشاهدات مربوط به برهم‌کنش ژنوتیپ و تنش خشکی، نشان داد که در تمامی ژنوتیپ‌ها، ارتفاع بوته با کاهش رطوبت خاک کاهش یافت (جدول ۲). ارتفاع بوته در بالاترین سطح تنش خشکی (FC ۲۵ درصد)، نسبت به شاهد (FC ۱۰ درصد) به‌طور متوسط، حدود ۲۱ درصد کاهش یافت. گرچه ارتفاع بوته در ژنوتیپ‌های حساس به خشکی MCC776 و MCC588 با کاهش درصد رطوبت خاک کاهش یافت، اما درصد کاهش

1- Furmazone
2- Enzyme unit

است. برهمگنش ژنوتیپ و تنش خشکی، تأثیر معنی‌داری بر سطح برگ گیاه داشت (جدول ۱). با کاهش آب قابل‌دسترس، سطح برگ، تقریباً در تمامی ژنوتیپ‌ها کاهش یافت (جدول ۲).

این نتایج با روند وزن خشک اندام هوایی (برگ+ساقه) مطابقت دارد. اختصاص بیشتر مواد فتوسنتزی به ریشه‌ها در مراحل اولیه رشد گیاه تا شروع گل‌دهی، احتمالاً دلیل اصلی عدم وجود تفاوت‌های معنی‌دار میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تأثیر ژنوتیپ و تنش خشکی بر صفات مورفولوژیکی گیاه نخود

Table 1. Data Analysis of variance showing the effect of genotype and stress levels on morphological characteristics of chickpea

وزن خشک ریشه Root dry weight	سطح ریشه Root area	مجموع طول ریشه‌ها Total root length	سطح برگ Leaf area	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	ارتفاع گیاه Plant height	درجه آزادی df	منابع تغییر (S. O. V.)
0.399 ns	53249597*	24762590 ns	1264.257*	0.118 ns	243.101*	3	ژنوتیپ Genotype
0.132**	282456344*	43110037.3*	2385.326*	0.724*	55.672 ns	3	تنش Stress
0.128 ns	87749070.6*	53676949*	192.99*	0.023 ns	1.928 ns	9	ژنوتیپ×تنش Genotype×Stress
0.167	50944470	48214258	88.867	0.0362	12.926	32	خطا Error

ns, *, ** به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد.
ns, * and **: no significant and significant at 5 and 1% levels of probability, respectively.

جدول ۲- اثر ژنوتیپ و تنش خشکی بر میانگین خصوصیات ریشه و اندام هوایی گیاه نخود

Table 2. Effect of genotypes and drought stress on root and shoot mean characteristics of chickpea

سطح ریشه Root area (cm ² /pl)	مجموع طول ریشه‌ها Total root length (mm/pl)	وزن خشک ریشه Root dry weight (mg/pl)	سطح برگ Leaf area (cm ² /p)	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (mg/pl)	ارتفاع Height (cm)	سطوح تنش Stress levels (%FC)	ژنوتیپ Genotype
27036 a-d	28309 a-c	0.611 a-c	102.4 a	1.10 bc	21 d-g	100	MCC776
31844 a-d	32697 a-c	0.707 ab	91.4 ab	1.180 a-c	19.8 e-g	75	
33467 a-c	33084 a-c	0.715 ab	93.4 ab	1.200 a-c	17.9 fg	50	
18378 cd	19538 bc	0.418 bc	73.9bc	0.590 d	15.5 g	25	
2169 a-d	30477 a-c	0.658 abc	65.2 cd	1.450 ab	32 a-c	100	MCC877
31454 a-d	33602 a-c	0.727 ab	79 bc	1.610 a	30 a-c	75	
26356 a-c	28475 a-c	0.614 abc	62.3 cd	1.140 bc	27 a-e	50	
20028 b-d	22602 bc	0.486 bc	44.7 de	0.840 cd	24.8 c-f	25	
42239 a	44734 a	0.971 a	54 de	1.290 a-c	28.5 a-d	100	MCC696
28456 a-d	30144 a-c	0.651 abc	62.8 cd	1.200 a-c	27 a-e	75	
28720 a-d	34447 ab	0.745 ab	53.1 de	0.970 cd	25.5 b-f	50	
18005 cd	19262 bc	0.412 cd	36 e	0.650 d	24.3 c-f	25	
36763 ab	44152 a	0.958 a	62.4 cd	1.290 a-c	34 a	100	MCC588
29491 a-d	32201 a-c	0.696 abc	77.7 bc	1.260 a-c	33 ab	75	
26516 a-d	28657 a-c	0.618a-c	62.6 cd	0.920 cd	32.3 a-c	50	
15580 d	17290 c	0.369d	36.2 e	0.520 d	26.5 a-f	25	

میانگین‌هایی که در هر ستون، حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.
Similar letters in each column indicate no significant difference according to Duncan Multiple Range Test ($p < 0.05$) between treatments.

این ارتباط نشان می‌دهند که واکنش ریشه بسته به شدت تنش، گونه گیاهی و مرحله فنولوژی گیاه، متفاوت است (Saxina, 2003; Fageria *et al.*, 2006).

مجموع طول ریشه‌ها

مشابه وزن خشک ریشه، ژنوتیپ‌های نخود از نظر مجموع طول ریشه‌ها، تفاوت‌های معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۱). در این ارتباط، همبستگی مثبت و بسیار معنی‌داری میان مجموع طول ریشه‌ها و وزن خشک ریشه در گیاه نخود گزارش شده است (Ganjeali & Kafi, 2007). با کاهش درصد رطوبت محیط کشت، مجموع طول ریشه‌ها کاهش یافت، اما مجموع طول ریشه‌ها، تنها در سطح رطوبتی FC۲۵ درصد نسبت به تیمار شاهد (FC) معنی‌دار بود (داده‌ها نشان داده نشده است). به نظر می‌رسد سطوح خشکی معادل ۵۰ درصد و FC۷۵ درصد به راحتی توسط گیاه، تحمل شده و گیاه هیچ واکنش مشهودی را از نظر تغییر در صفات مربوط به ریشه اتخاذ نکرده است. برهمکنش تنش خشکی و ژنوتیپ، تأثیر معنی‌داری بر مجموع طول ریشه‌ها داشت (جدول ۱). تمامی ژنوتیپ‌های نخود، به‌جز ژنوتیپ‌های MCC696 و MCC588 که طول مجموع ریشه‌ها در این ژنوتیپ‌ها در پایین‌ترین سطح رطوبتی خاک (FC۲۵ درصد) با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند، از نظر مجموع طول ریشه‌ها در تمامی سطوح تنش، یکسان بودند و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۲). بنابراین مجدداً تأیید می‌شود که نخود، یک گیاه کارآمد از نظر جذب آب و عناصر غذایی است و عکس‌العمل صفات مربوط به ریشه این گیاه، حتی در مواجهه با تنش‌های شدید، ملایم است. ژنوتیپ‌های منتخب در این آزمایش، حاصل انتخاب از توده‌های بومی هستند که طی سالیان متمادی به‌خوبی به شرایط سخت محیطی سازگار شده‌اند.

سطح ریشه‌ها

افزایش سطح ریشه‌ها از طریق افزایش نقاط ورودی آب و عناصر غذایی و همچنین افزایش سطح جذب می‌تواند کارایی جذب آب و عناصر غذایی را افزایش دهد. در این آزمایش، مشابه وزن خشک و مجموع طول ریشه‌ها، ژنوتیپ‌های نخود از نظر سطح ریشه‌ها، تفاوت‌های معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p \leq 0.05$). همبستگی‌های مثبت و معنی‌داری بین مجموع طول ریشه‌ها و سطح ریشه‌ها در آزمایش‌های متعدد، تأیید شده است (Ganjeali & Kafi, 2007).

این نتایج با مطالعات (Neumann, 1995) در شرایط تنش خشکی که بیان داشت سطح برگ‌ها به دلیل بسته شدن روزنه‌ها کاهش می‌یابد، مطابقت دارد. Majnoun Hossieni *et al.* (2009b) کاهش سطح برگ، سطح ویژه برگ و تعداد شاخه در گیاهچه‌های نخود را با کاهش رطوبت خاک گزارش کردند. Lecoer & Sinclair (1996) بیان داشتند فرایندهایی در گیاه که وابسته به حجم سلول می‌باشند، مخصوصاً به کمبود آب حساس هستند. آنها اظهار داشتند رشد برگ و سرعت تبادل CO_2 دو فرایند حساس در گیاه هستند که وابسته به حجم سلول‌های محافظ و بطور کلی آماس سلولی می‌باشند، بنابراین در شرایط تنش خشکی بایستی کاهش شاخص سطح برگ و تولید اسیمیلات در گیاه را انتظار داشت. بیشترین و کمترین کاهش سطح برگ با کاهش آب قابل دسترس به ترتیب به ژنوتیپ‌های MCC588 و MCC877 تعلق داشت (جدول ۲). ژنوتیپ مقاوم به خشکی MCC877 از نظر سطح برگ در تمام سطوح تنش، یکسان بود. به عبارت دیگر، تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر کاهش سطح برگ این ژنوتیپ نداشت (جدول ۲). حفظ آماس سلولی و پتانسیل فشاری آب برگ با وجود کاهش آب خاک، یک ویژگی مهم گیاهان متحمل به خشکی است (Turner *et al.*, 2003).

صفات ریشه

وزن خشک ریشه

ژنوتیپ‌های نخود از نظر وزن خشک ریشه، تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p \leq 0.05$). سطوح مختلف تنش خشکی، تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه داشت و با کاهش مقدار رطوبت، وزن خشک ریشه در تمام ژنوتیپ‌ها کاهش یافت (جدول ۲). وزن خشک ریشه در سطوح رطوبتی ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند، اما ژنوتیپ‌های MCC696 و MCC588 در شرایط FC۲۵ درصد، از نظر بیوماس ریشه تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند. به نظر می‌رسد کاهش رطوبت تا FC۵۰ درصد، تأثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های ریشه نخود نداشته و سطوح رطوبتی کمتر از این میزان برای رشد ریشه اغلب ژنوتیپ‌های نخود، محدودکننده است. کاهش سطح برگ، اولین واکنش گیاه در مواجهه با تنش خشکی است، بنابراین با افزایش تداوم تنش، همزمان با کاهش فتوسنتز گیاه و افزایش نیاز گیاه به کربوهیدرات برای تنظیم اسمزی سلول، دسترسی به مواد فتوسنتزی کاهش یافته و در نتیجه، رشد ریشه کاهش و در نهایت، متوقف خواهد شد (Lu *et al.*, 1998). بررسی‌ها در

ثبات یا افزایش رشد ریشه در شرایط کمبود آب، یک امتیاز مهم برای آن گیاه محسوب می‌شود.

تغییرات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان میزان پرولین برگ

نتایج تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که ژنوتیپ، تنش خشکی و برهمکنش آنها، تأثیر معنی‌داری بر میزان پرولین برگ گیاه داشت (جدول ۳). بیشترین و کمترین مقدار پرولین، با مقادیر ۶/۷۸ و ۳/۲۴ میکرومول در گرم وزن تر، به ترتیب به ژنوتیپ‌های MCC696 و MCC776 تعلق داشت که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و با سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی داشتند (جدول ۴). در این آزمایش، مقدار پرولین در ژنوتیپ مقاوم به خشکی (MCC877) بیشتر از ژنوتیپ حساس به خشکی (MCC776) و کمتر از ژنوتیپ بومی کاندیدا برای تحمل به خشکی (MCC696) بود. با کاهش میزان رطوبت خاک، مقدار پرولین در تمام ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. بالاترین مقدار پرولین، به ژنوتیپ MCC696 در شرایط ۲۵FC درصد اختصاص داشت که تفاوت آن با سایر ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف رطوبتی، معنی‌دار بود. در پایین‌ترین سطح رطوبتی، ژنوتیپ MCC696 از نظر پرولین، تفاوت معنی‌داری با ژنوتیپ MCC588 نداشت. در این آزمایش، کمترین میزان پرولین به ژنوتیپ MCC877 در شرایط بدون تنش (FC) اختصاص داشت (جدول ۴).

تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر سطح ریشه‌های نخود داشت ($p \leq 0.05$). با کاهش درصد رطوبت خاک، سطح ریشه‌ها کاهش یافت، اما کاهش سطح ریشه‌ها در سطوح تنش خشکی معادل ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی نسبت به شاهد، معنی‌دار نبود، ولی تفاوت آن با پایین‌ترین سطح رطوبتی (۲۵FC درصد)، معنی‌دار بود (داده‌ها نشان داده نشده است). برهمکنش تنش خشکی و ژنوتیپ، تأثیر معنی‌داری بر سطح ریشه‌ها داشت (جدول ۱). مشابه مجموع طول ریشه‌ها، تمامی ژنوتیپ‌های نخود، به جز ژنوتیپ‌های MCC588 و MCC696 که طول مجموع ریشه‌ها در این ژنوتیپ‌ها در پایین‌ترین سطح رطوبتی خاک (۲۵FC درصد) با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند، سایر ژنوتیپ‌ها از نظر سطح ریشه‌ها در تمامی سطوح تنش، یکسان بودند و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۲).

در ارتباط با عکس‌العمل ریشه گیاه به تنش آب، نقطه‌نظرات متفاوتی وجود دارد. در حالی که بسیاری از متخصصان نشان داده‌اند که رشد ریشه در شرایط تنش خشکی محدود می‌شود، سایر دانشمندان اعتقاد دارند که رشد ریشه در شرایط تنش خشکی می‌تواند بدون تغییر باشد یا حتی افزایش یابد (Wu & Cosgrove, 2000; Neumann, 1995; Gregory, 1988). به هر حال، توانایی یک گیاه برای

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تأثیر ژنوتیپ و تنش خشکی بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاه نخود
Table 3. Data Analysis of variance showing the effect of genotype and stress levels on biochemical characteristics of chickpea

فعالیت آنزیم	فعالیت آنزیم	میزان	میزان پرولین	درجه آزادی	منابع تغییر
Peroxidase activity	Super oxide dismutase enzyme activity	آب‌اکسیژنه Hydrogen peroxide	Proline	df	(S. O. V.)
2.982*	43.458*	0.00024*	18.158*	3	ژنوتیپ Genotype
0.87 ns	7.949*	0.00012*	29.907*	3	تنش Stress
0.0715 ns	26.823*	0.0023*	10.622*	9	ژنوتیپ × تنش Genotype × Stress
0.302887	0.1515	0.000072	0.8337	32	خطا Error

ns, * و **، به ترتیب بیانگر عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد می‌باشد.
ns, * and ** indicating non significant and significant at 5 and 1% levels of probability, respectively.

Menconi *et al.* (1995) بیان داشتند گیاهانی که در معرض تنش خشکی ملایم قرار دارند، میزان پراکسید هیدروژن در سطح کنترل، حفظ می‌شود. شاید در تنش‌های ملایم خشکی، عملکرد خوب سیکل آسکوربات/گلوتاتیون به گیاه اجازه می‌دهد تا با وجود توانایی بالای غشاء تیلاکوئیدی برای هدایت الکترون‌ها به سمت اکسیژن، میزان پراکسید هیدروژن خود را در این سطح حفظ نمایند. در مطالعه دیگر روی گیاه گندم، مشاهده شد گیاهانی که در معرض خشکی ملایم قرار گرفتند، هیچ‌گونه تنش اکسیداتیو مشخصی در آنها ایجاد نگردید و افزایشی نیز در مقدار H_2O_2 مشاهده نشد (Bartoli *et al.*, 1998). نتایج مقایسه میانگین پراکسید هیدروژن در ژنوتیپ‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی (MCC696 و MCC877) از کمترین مقدار پراکسید هیدروژن برخوردار بودند (جدول ۵) که مؤید این است که این ژنوتیپ‌ها از قابلیت اجتناب و یا تحمل به خشکی برخوردار هستند و لذا به‌نظر می‌رسد القای تنش اکسیداتیو ناشی از ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش خشکی (Perdomo *et al.*, 1996) در این ژنوتیپ‌ها، در حداقل مقدار بوده و یا ایجاد نشده است.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که ژنوتیپ، تنش خشکی و برهمکنش ژنوتیپ و تنش خشکی، تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ داشتند (جدول ۳). بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، به ژنوتیپ MCC588 تعلق داشت که تفاوت معنی‌داری با ژنوتیپ‌های MCC877 و MCC696 داشت. در این آزمایش، ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی (MCC877 و MCC696) از نظر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، ولی اختلاف آنها با سایر ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود (جدول ۶).

به‌طور کلی، با افزایش تنش خشکی، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت. افزایش رادیکال‌های آزاد مثل سوپراکسید، نتیجه مواجهه گیاه با تنش‌های محیطی مانند خشکی است. در این راستا، واکنش بعدی گیاه، سنتز و فعالیت بیشتر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در جهت خنثی‌سازی هرچه بیشتر آنیون مخرب سوپراکسید می‌باشد. نتایج تحقیقات مؤید این است که همبستگی

تجمع پرولین و سایر اسمولیت‌ها برای حفظ تورژسانس سلول‌های گیاهی، قسمتی از مکانیسم‌های مقاومت در برابر تنش خشکی است (Huang *et al.*, 2000). به‌علاوه، شواهد دیگری مبنی بر تجمع زیاد این ترکیبات در گیاهان به جهت جلوگیری از برخی آسیب‌های ناشی از تنش خشکی که منجر به اختلال در استحکام غشاء می‌شوند، وجود دارد (Schwab & Gaff, 1990). در یک مطالعه روی دو گونه ذرت^۱، میزان پرولین در گونه حساس آنکورا^۲ به صورت معنی‌داری کمتر از گونه مقاوم نوا^۳ بود (Valentovic *et al.*, 2006). این نتایج در ارقام حساس به شوری برنج نیز گزارش شده است (Lutts *et al.*, 1996). انباشت پرولین در شرایط تنش، ممکن است به‌علت فعال‌سازی آنزیم‌های بیوسنتزی پرولین، کاهش تخریب آن در اثر اکسیداسیون و تبدیل آن به گلوتامات، کاهش استفاده از پرولین در سنتز پروتئین‌ها و افزایش واژگردی پروتئین‌ها باشد.

پراکسید هیدروژن

ژنوتیپ، تنش خشکی و برهمکنش ژنوتیپ و تنش خشکی، تأثیر معنی‌داری بر تولید پراکسید هیدروژن در برگ گیاه نخود داشتند (جدول ۳). بیشترین و کمترین مقدار پراکسید هیدروژن، به ترتیب به ژنوتیپ حساس MCC776 و ژنوتیپ کاندیدای متحمل به خشکی MCC696 تعلق داشت (جدول ۵). مقدار پراکسید هیدروژن در بالاترین سطح تنش خشکی (۲۵FC درصد)، بیشترین مقدار بود که تفاوت آن با سایر سطوح تنش خشکی (۵۰FC درصد و ۷۵FC درصد) و تیمار شاهد، معنی‌دار بود، اما سایر سطوح تنش خشکی با یکدیگر و با شاهد، تفاوت معنی‌داری نداشتند (جدول ۵). افزایش مقدار رادیکال‌های آزاد مثل سوپراکسید، نتیجه مواجهه گیاه با تنش‌های شدید خشکی است. در این راستا، واکنش بعدی گیاه، سنتز و فعالیت بیشتر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در جهت خنثی‌سازی هرچه بیشتر آنیون مخرب سوپراکسید می‌باشد. بدیهی است محصول این واکنش، تولید پراکسید هیدروژن است. مطالعات نشان داده است که میزان پراکسید هیدروژن در گیاه، به شدت تنش خشکی که گیاه با آن مواجه است، وابسته است (Samaras *et al.*, 1995).

1- Zea mays
2- Ankora
3- Nova

نتیجه‌گیری

نخود، معمولاً در اراضی حاشیه‌ای و مناطقی که رطوبت خاک محدود است، کشت می‌شود. در چنین مناطقی، سیستم ریشه‌ای مناسب برای جذب حداکثر آب موجود در خاک و کاهش سطح برگ به منظور تلفات کمتر آب، می‌تواند در بهبود تحمل به خشکی گیاه، مؤثر باشد. به علاوه، تنش‌های اکسیداتیو ناشی از وقوع متناوب دوره‌های خشکی در طول فصل رشد، احتمالاً علت بعدی کاهش رشد و عملکرد این گیاه در منطقه است. لذا شناخت صفات و درک مکانیسم‌هایی در گیاه که موجب بهبود تحمل گیاه به خشکی می‌شوند، امیدبخش به نظر می‌رسد. نتایج این مطالعه نشان داد که اغلب صفات مورفولوژیکی مانند ارتفاع بوته، بیوماس اندام هوایی و ریشه، مجموع طول ریشه‌ها و سطح برگ، عمدتاً تحت تأثیر تنش‌های شدید خشکی قرار می‌گیرند. تنش‌های ملایم خشکی (رطوبت ۵۰FC درصد و بالاتر)، تأثیر معنی‌داری بر صفات فوق نداشت. این موضوع مجدداً تأیید می‌کند که گیاه نخود، یک گیاه سازش‌یافته به شرایط سخت محیطی است که طی سالیان متمادی، تکامل یافته است. ژنوتیپ حساس MCC588 از ارتفاع بوته، سطح برگ و به‌طور کلی، بیوماس اندام هوایی بیشتری نسبت به ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی برخوردار بود. شاید تلفات بیشتر آب به‌صورت تبخیر و تعرق در این ژنوتیپ و سیستم ریشه‌ای ضعیف آن برای جبران تلفات آب، علت حساسیت این ژنوتیپ به تنش خشکی است.

در این بررسی با کاهش رطوبت خاک، میزان پرولین در تمام ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. ژنوتیپ بومی کاندیدا برای تحمل به خشکی، از بیشترین مقدار پرولین در شرایط تنش شدید خشکی برخوردار بود، گرچه تفاوت معنی‌داری با ژنوتیپ MCC588 نداشت که نشان از توانایی گیاه برای تجمع پرولین و سایر اسمولیت‌ها برای حفظ تورژسانس سلول‌های گیاهی است که تنها قسمتی از مکانیسم‌های مقاومت در برابر تنش خشکی را نشان می‌دهد.

سازوکارهای گیاه کاهش تنش اکسیداتیو، نقش مهمی در سازگاری گیاه به محیط‌های تنشی دارد. نتایج بررسی‌ها مؤید آن است که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز، تحت تأثیر تنش خشکی افزایش یافتند. در شرایط تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های فوق در ژنوتیپ حساس به خشکی MCC588 بیشتر از سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. عدم وجود و یا کارایی ضعیف سازوکارهای مقاومت و

مثبت و بسیار بالایی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو، که به دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود، و افزایش غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان وجود دارد (Sairam *et al.*, 2000). در این ارتباط، بررسی‌ها نشان داده است که در تنش‌های شدید، غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تا دو برابر افزایش یافته است که نتیجه آن، مقاومت بیشتر گیاه به تنش‌های اکسیداتیو می‌باشد (Gambel *et al.*, 1984). بنابراین، مکانیسم‌هایی در گیاه که باعث کاهش تنش اکسیداتیو می‌شوند، می‌توانند نقش مهمی در سازگاری گیاه به محیط‌های دارای تنش ایفا نمایند (Sairam *et al.*, 2002).

آنزیم پراکسیداز

ژنوتیپ، تأثیر معنی‌داری بر فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز موجود در برگ‌های نخود داشت (جدول ۳). کمترین و بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز، به ترتیب به ژنوتیپ مقاوم MCC877 و ژنوتیپ حساس MCC855 تعلق داشت که تفاوت معنی‌داری از این حیث با یکدیگر داشتند (جدول ۷). فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز موجود در برگ‌های ژنوتیپ حساس MCC855، به‌صورت معنی‌داری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود (جدول ۷). شاید عدم وجود سازوکارهای مقاومت و یا تحمل به خشکی و یا کارایی ضعیف آنها، موجب درک بیشتر تنش خشکی و القای بیشتر تنش‌های اکسیداتیو در این ژنوتیپ شده است که واکنش گیاه در این شرایط، تولید بیشتر آنزیم پراکسیداز است.

بررسی‌ها، مؤید این است که گونه‌های سازگار به محیط‌های خشک در شرایط بروز تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان خود را مانند پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، در جهت خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تولیدشده، افزایش می‌دهند. در این ارتباط، بالاترین فعالیت آنزیم پراکسیداز، به ژنوتیپ حساس MCC855 در بالاترین سطح تنش خشکی تعلق داشت که تفاوت آن با ژنوتیپ مقاوم به خشکی MCC877 در همین سطح تنش خشکی، معنی‌دار بود (جدول ۷). گرچه با افزایش تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش پیدا کرد، ولی افزایش فوق در سطوح مختلف تنش خشکی، معنی‌دار نبود.

اجتناب از خشکی در ژنوتیپ MCC588، احتمالاً باعث القای تنش‌های اکسیداتیو در این بیشتر خشکی و متعاقب آن، تنش‌های آنتی‌اکسیدان است. ژنوتیپ شده است که واکنش گیاه در این شرایط، تولید بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است.

جدول ۴- اثرات اصلی و متقابل ژنوتیپ و تنش خشکی بر میانگین میزان پرولین (میکرومول در گرم وزن تر) در برگ گیاهان نخود

Table 4. Main and interaction effects of drought stress and genotypes on leaf proline content of chickpea

میانگین (Mean)	سطوح تنش (درصد از ظرفیت زراعی) Stress levels (percent of field capacity)				سطوح ژنوتیپ Genotype
	25%	50%	75%	100% (Control)	
3.24 D	2.66 efg	2.18 fg	1.74 g	6.38 bc	MCC776
4.32 C	6.18 b	4.93 b-d	3.83 d-g	1.73 g	MCC877
6.78 A	11.73 a	4.99 b-d	4.3 c-f	6.13 bc	MCC696
5.31 B	9.96 a	4.23 c-f	4.55 cde	2.5 e-g	MCC588
	7.79 A	4.08B	3.61 B	4.18 B	میانگین (Mean)

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف می‌باشند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p < 0.05$) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند. حروف بزرگ در هر ستون و ردیف، به‌طور جداگانه به‌ترتیب برای مقایسه ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش خشکی می‌باشند.

Similar letters in each column and row indicate no significant difference according to Duncan Multiple Range Test ($P < 0.05$) between means. Capital letters in row and column are for comparing genotypes and drought stress, respectively, and they should be comparing separately.

جدول ۵- اثرات اصلی و متقابل ژنوتیپ و تنش خشکی بر میانگین میزان آب‌اکسیژنه (گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر) در برگ گیاهان نخود

Table 5. Main and interaction effects of drought stress and genotypes on H₂O₂ amount (g per 100 g leaf fresh weight)

میانگین (Mean)	سطوح تنش (درصد از ظرفیت زراعی) Stress levels (percent of field capacity)				سطوح ژنوتیپ Genotype
	25%	50%	75%	100% (Control)	
0.176 A	0.135 d-g	0.151 cd	0.107 a	0.211 a	MCC776
0.149 B	0.172 b	0.137 d-g	0.123 g	0.165 bc	MCC877
0.134 C	0.177 b	0.127 fg	0.148 cde	0.085 h	MCC696
0.157 B	0.183 b	0.146 c-f	0.17 b	0.129 efg	MCC588
	0.167 A	0.14 B	0.102 B	0.147 B	میانگین (Mean)

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف می‌باشند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p < 0.05$) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند. حروف بزرگ در هر ستون و ردیف، به‌طور جداگانه به‌ترتیب برای مقایسه ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش خشکی می‌باشند.

Similar letters in each column and row indicate no significant difference according to Duncan Multiple Range Test ($P < 0.05$) between means. Capital letters in row and column are for comparing genotypes and drought stress, respectively, and they should be comparing separately.

جدول ۶- اثرات اصلی و متقابل ژنوتیپ نخود و تنش خشکی بر میانگین فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (واحد آنزیمی در یک میلی‌گرم پروتئین) در برگ نخود

Table 6. Main and interaction effects of drought stress and chickpea genotypes on special activity of super oxide dismutase (enzyme per mg protein)

میانگین (Mean)	سطوح تنش (درصد از ظرفیت زراعی) Stress levels (percent of field capacity)				سطوح ژنوتیپ Genotype
	25%	50%	75%	100% (Control)	
8.56 C	11.59 e	7.2 i	8.99 gh	6.44 i	MCC776
11.6 AB	9.94 f	14.08 a	12.81 cd	9.56 cd	MCC877
11.94 B	11.66 e	8.26 h	11.9 b	11.9 de	MCC696
13.39 A	13.01 c	18.48 a	9.41 fg	12.67 cd	MCC588
	11.55 AB	13.26 A	10.78 B	10.1 C	(Mean) میانگین

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف می‌باشند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p < 0.05$) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند. حروف بزرگ در هر ستون و ردیف، به‌طور جداگانه به‌ترتیب برای مقایسه ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش خشکی می‌باشند.

Similar letters in each column and row indicate no significant difference according to Duncan Multiple Range Test ($P < 0.05$) between means. Capital letters in row and column are for comparing genotypes and drought stress, respectively, and they should be comparing separately.

جدول ۷- اثرات اصلی و متقابل ژنوتیپ و تنش خشکی بر میانگین فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز (تغییرات جذب در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین) در برگ نخود

Table 7. Main and interaction effects of drought stress and chickpea genotypes on special activity of peroxides (absorption per minute per mg protein)

میانگین (Mean)	میانگین فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز Special activity of peroxides (absorption per minute per mg protein)				سطوح ژنوتیپ Genotype
	25%	50%	75%	100% (Control)	
1.154 B	1.217 a-d	1.217 a-d	1.527 a-d	0.655 cd	MCC776
0.655 B	0.952 bcd	0.706 cd	0.645 cd	0.357 d	MCC877
1.256 B	1.641 a-d	1.099 bcd	1.669 a-d	0.617 cd	MCC696
2.131 A	2.516 a	2.134 ab	2.134 ab	1.742 abc	MCC588
	1.582 A	1.289 A	1.493 A	0.842 A	(Mean) میانگین

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف می‌باشند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p < 0.05$) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند. حروف بزرگ در هر ستون و ردیف، به‌طور جداگانه به‌ترتیب برای مقایسه ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش خشکی می‌باشند.

Similar letters in each column and row indicate no significant difference according to Duncan Multiple Range Test ($P < 0.05$) between means. Capital letters in row and column are for comparing genotypes and drought stress, respectively, and they should be comparing separately.

منابع

- Bartoli, C.G., Simontacchi, M., Tambussi, E., and Beltrano, J. 1999. Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. Journal of Experimental Botany 50: 375-383.
- Bates, L.S., Waldern, R.P., and Tear, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil 39: 205-207.

3. Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann. Bot.* 91: 179-194.
4. Chen, T.H.H., and Murata, N. 2000. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biology* 5: 250-257.
5. Fageria, N.K., Baligar, V.C., and Clark, R.B. 2006. *Physiology of Crop Production*. Food Products Press. pp. 363.
6. FAO. 2005. <http://faostat.fao.org/>
7. Gambel, P.E., and Burke, J.J. 1994. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system. I. Alterations in glutathione reductase activity. *Plant Physiology* 76: 615-621.
8. Ganjeali, A., and Kafi, M. 2007. Genotypic differences for allometric relationships between root and shoot characteristics in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Pak. J. Bot.* 39: 1523-1531.
9. Ganjeali, A., and Nezami, A. 2008. Ecophysiology and yield barriers in pulse crops. In: M. Parsa and A. Bagheri (Eds.). *Pulses*. Jehad Daneshgahi Mashhad Publisher, pp. 522.
10. Ganjeali, A., Palta, J., and Turner, N.C. 2007. Spatial and temporal patterns of chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) root growth under waterlogging stress. *Iranian Journal of Field Crops Research* 5: 343-355 (in Persian).
11. Giannopolitis, C.N., and Ries, S.K. 1997. Superoxid dismutase. I. occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59: 309-314.
12. Gupta, U.S. 1997. *Crop Improvement: Vol II. Stress Tolerance*. Oxford and IBH Publishing. CO. PVT. LTD.
13. Holy, M.C. 1972. Indole acetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. *Plant Physiology* 50: 15-18.
14. Huang, J., Hirji, R., Adam, L., Rozwadowski, K.L., Hammerlindl, J.K., Keller, W.A., and Selvaraj, G. 2000. Genetic engineering of glycinebetain production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* 122: 747-756.
15. Lecoer, J., and Sinclair, T.R. 1996. Field pea transpiration and leaf growth in response to soil water deficits. *Crop Sci.* 36: 331-335.
16. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., and Rand, R.J. 1951. Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
17. Ludlow, M., and Munchow, R.C. 1990. A critical evaluation of traits for improving crop yield in water-limited environments. *Advances in Agronomy* 43: 107-153.
18. Lutts, S., Kinet, J.M., and Bouharmont, J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annual of Botany* 78: 389-398.
19. Majnoun Hosseini, N., Siddique, K.H.M., Palta, J.A., and Berger, J. 2009a. Effect of soil moisture content on seedling emergence and early growth of some chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *J. Agric. Sci. Technol.* 11: 401-411.
20. Majnoun Hosseini, N., Siddique, K.H.M., Palta, J.A., and Berger, J. 2009b. Sowing soil water content effects on chickpea (*Cicer arietinum* L.): Seedling emergence and early growth interaction with genotype and seed size. *Agricultural Water Management* 96: 1732-1736.
21. Mansour, M.M.F. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant* 43: 491-500.
22. Menconi, M., Sgherri, C.L.M., Pinzino, C., and Navarri-Izzo, F. 1995. Activated oxygen production and detoxification in wheat plants subjected to a water deficit programme. *J. of Exp. Bot.* 46: 1123-1130.
23. Neumann, P.M. 1995. The role of cell wall adjustment in plant resistance to water deficits. *Crop Sci.* 35: 1258-1266.
24. Pardo, A., Amato, M., and Chiaranda, F.Q. 2000. Relationships between soil structure, root distribution and water uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.), plant growth and water distribution. *Euro. J. of Agron.* 13: 39-45.
25. Perdomo, P., Murphy, J.A., and Berkowitz, G.A. 1996. Physiological changes associated with performance of Kentucky bluegrass cultivars during summer stress. *Hort. Science* 31: 1182-1186.
26. Sairam, R.K., and Srivastava, G.C. 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science* 162: 897-904.

27. Samaras, Y.R., Bressan, A., Csonka, L.N., Garcia-Rios, M.G., Paino, D., Urzo, M., and Rhodes, D. 1995. Proline accumulation during drought and salinity. In: N. Smirnoff (Ed.). Environment and Plant Metabolism. Bios. Scientific Publisher, Oxford, p. 161-187.
28. Saxena, N.P. 2003. Management of Agriculture Drought "Agronomic and Genetic Options". Science Publishers Inc, NH, USA.
29. Schandalios, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiol. 101: 7-12.
30. Schwab, K.B., and Gaff, D.F. 1990. Influence of compatible solutes on soluble enzymes from desiccation-tolerant *Sporobolus stapfianus* and desiccation-sensitive *Sporobolus pyramidalis*. Journal of Plant 137: 208-215.
31. Singh, K.B., and Saxena, M.C. 1993. Breeding for stress tolerance in cool-season food Legumes. The Hague, The Netherlands: Martinus Nijhoff/Junk.
32. Turner, N.C., Wright, G.C., and Siddique, K.H.M. 2003. Adaptation of grain legumes to water-limited environment: Selection for physiological, biochemical and yield component characteristics for improved drought resistance. pp. 43-80. In: N.P. Saxena (Ed.). Management of Agriculture Drought "Agronomic and Genetic Options". Science Publishers Inc, NH, USA.
33. Valentovic, P., Luxova, M., Kolarovic, L., and Gasparicova, O. 2006. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. Plant Soil Environmental 52: 186-191.
34. Velikova V., Yordanov I., and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. Plant Science 151: 59-66.
35. Wu, Y., and Cosgrove, D.J. 2000. Adaptation of root to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. J. Experimental Botany 51: 1543-1553.

Evaluation of morphological traits, proline content and antioxidant enzymes activity in chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) under drought stress

Abrishamchi¹, P., Ganjeali^{1*}, A. & Sakeni², H.

1- Contributions from College of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad

2- MSc. in Biology, Plant Physiology

Received: 25 September 2010

Accepted: 05 January 2011

Abstract

This study aimed to assess the response of chickpea genotypes to drought stress in terms of morphological traits and subsequent biochemical changes to further understanding of drought resistance mechanisms in plants and access to better genetic resources. The chickpea genotypes including MCC776, MCC877, MCC696 and MCC588 evaluated at four soil moisture regimes with field capacity (control), 75%, 50% and 25% of field capacity through a factorial experiment in a completely randomized design with three replications at physiology laboratory in Research Center for Plant Science, during 2009. The results showed that most of the morphological traits such as plant height, shoot and root biomass, total root length and leaf area, were mainly affected by severe drought stress. Moderate drought stress (50% FC moisture and above) had no significant effect on these traits. Reduced soil moisture increased the stem proline content in all genotypes. The highest proline obtained in native genotype candidate (MCC696) at severe drought stress. Enzymes activity of super oxide dismutase and peroxidase increased in drought- sensitive genotype MCC588 than other genotypes. Absence or poor performance of drought tolerance or avoidance mechanisms in MCC588 genotype possibly caused induction of oxidative stress and produced antioxidant enzymes.

Key words: Antioxidant enzymes, Chickpea genotypes, Drought stress, Proline, Root & shoot traits

*Corresponding Author: ganjeali@um.ac.ir, Mobile: 09153057645