

بررسی شاخص‌های اکسیداتیو در سه رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) در شرایط تنش خشکی

رضا سوخت‌سرای^۱، علی‌عبادی^{۲*}، سیدعلیرضا سلامی^۳ و حسین لسانی^۲
۱، ۲، ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۰)

چکیده

به منظور بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برخی رقم‌های انگور تحت تنش خشکی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه رقم انگور غیرپیوندی بی‌دانه سفید، چفته و یاقوتی و چهار تیمار خشکی در حد ۰/۳- (شاهد)، ۰/۶- (ملایم)، ۱- (متوسط) و ۱/۵- (شدید) مگاپاسکال پتانسیل آب خاک، در سه تکرار در سال ۱۳۹۲ به اجرا درآمد. در این آزمایش گیاهان دوساله انگور در گلدان‌های ۲۰ لیتری (قطر گلدان ۲۸ سانتی‌متر و ارتفاع گلدان ۶۰ سانتی‌متر) محتوای خاک لومی-شنی در فضای آزاد (مزرعه) کاشته شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که در رقم بی‌دانه با افزایش سطوح تنش خشکی، محتوای نسبی آب برگ (RWC)، میزان سبزینه (کلروفیل) a و b کاهش یافت ولی میزان نشت یونی، تجمع مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز (LOX) که مسئول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشا است به همراه میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) افزایش یافتند. همچنین در فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) شامل کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایکول پراکسیداز و ظرفیت پاداکسندگی کل (DPPH) تغییر معنی‌داری مشاهده نشد که نشان دهنده این واقعیت است که رقم بی‌دانه سفید تحت تنش خشکی کمترین میزان انسجام غشایی را دارد. رقم چفته نیز بالاترین میزان RWC و میزان سبزینه a و b در مقایسه با رقم‌های بی‌دانه سفید و یاقوتی را داشت. برخلاف رقم بی‌دانه سفید، رقم‌های چفته و یاقوتی در سطوح تنش خشکی توانایی بالاتری در حفظ انسجام غشایی داشتند و میزان بالاتری از فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی CAT، APX، GPX، به همراه تجمع پایین H_2O_2 را داشتند. با توجه به یافته‌های این پژوهش می‌توان گفت که رقم چفته و در مراحل بعد رقم یاقوتی پتانسیل بالاتری برای روبرویی با شرایط کم‌آبی در مقایسه با رقم بی‌دانه سفید دارند.

واژه‌های کلیدی: انسجام غشایی، انگور، تنش خشکی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی.

Evaluation of oxidative parameters in three grapevine cultivars under drought stress

Reza Soukhtesaraee¹, Ali Ebadi^{2*}, Seyed Alireza Salami³ and Hossein Lesani²

1, 2, 3. Former M. Sc. Student, Professor and Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Sep. 7, 2014 - Accepted: May 10, 2015)

ABSTRACT

For evaluation of physiological and biochemical response of some grapevine cultivars to drought stress, an experiment was carried out in 2014 as a factorial arranged in a randomized complete block design with three replications. Three cultivars i. e. "Bidane Sefid", "Chafte" and "Yaghooti" and four drought stress levels, including -0.3, -0.6, -1 and -1.5 MP soil water potential were employed. In this experiment, two years old grapes were cultured in pots with 28 cm in diameter and 60 cm in height, containing sandy-loam soil in field conditions. Results showed that in "Bidane sefid", under drought stress (-0.3 to -1.5 MP), RWC, chlorophyll a and b content, and antioxidant enzymes CAT, APX, GPX activity along with DPPH scavenging capacity were declined, but electrolyte leakage, MDA content, LOX enzyme activity (responsible for membrane unsaturated fatty acid peroxidation), along with H_2O_2 accumulation were increased. Results indicated that 'Bidane Sefid' under drought stress had higher oxidative damage, led to lower membrane integrity. In comparison with "Bidane sefid", "Chafte" and "Yaghooti" under drought stress, due to higher antioxidant enzymes (CAT, APX, GPX) with higher DPPH scavenging capacity, exhibited lower oxidative damage, led to higher membrane integrity. According to our results, it can be concluded that "Chafte" followed by "Yaghooti" had higher potential to tolerate drought stress compared with "Bidane sefid".

Keywords: Antioxidant enzymes, drought stress, grapevine, membrane integrity, oxidative stress.

مقدمه

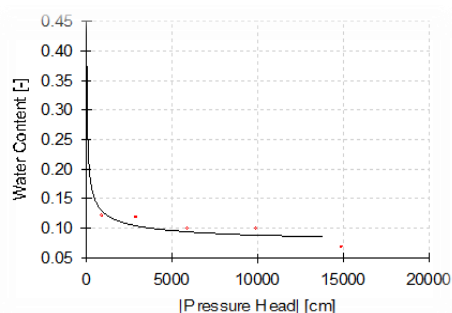
خشکی یکی از مهم‌ترین عامل‌های محدودکننده افزایش عملکرد تولیدهای باغی و زراعی است. تنش خشکی هنگامی رخ می‌دهد که تقاضای تعرق برگ‌ها از ظرفیت و توانایی ریشه‌ها برای استخراج آب از خاک بیشتر باشد (Liu *et al.*, 2003). با توجه به پراکنده بودن بیشتر انگورکاری‌های ایران در مناطق خشک و نیمه‌خشک، تنش خشکی باعث بروز مشکلاتی مانند کوتاه شدن دوره رشد، کاهش گل‌انگیزی و پیری فیزیولوژیک و در نهایت منجر به کاهش عملکرد و از بین رفتن بوته‌های انگور شده است (Esteban *et al.*, 2001). در اثر تنش خشکی، فعالیت‌های فتوشیمیایی گیاه بازداشته می‌شود، محتوای سبزینه (کلروفیل) برگ تغییر می‌کند و فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین در فرآیند نورساخت (فتوسنتز) کاهش می‌یابد (Monakhova & Chernyadev, 2002). در شرایط تنش خشکی میزان کلروفیل کاهش می‌یابد. بر پایه آزمایش‌های انجام‌شده در دو رقم انگور خوشناو و رشه افزون بر کاهش سرعت نورساخت، تعرق و هدایت روزنه‌ای در ضمن میزان کلروفیل در هر دو رقم مورد آزمایش کاهش نشان داد (Ghadery *et al.*, 2006). با کاهش میزان آب در دسترس گیاه و محتوای نسبی آب برگ، کاهش میزان سبزینه کل در نتیجه کاهش میزان هر دو سبزینه a و b در انگور گزارش شده است (Bertamini *et al.*, 2006). کاهش محتوای نسبی آب برگ در رقم‌های انگور تحت تنش خشکی نیز گزارش شده است (Rabiei *et al.*, 2003). همچنین کاهش طول شاخه، شمار برگ، وزن خشک شاخه و وزن خشک ریشه در بوته‌های انگور تحت تنش خشکی گزارش شده است (Jalili *et al.*, 2011). تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به‌ویژه H_2O_2 در پاسخ به تنش‌های مختلف غیرزنده مانند خشکی، شوری و دماهای بالا، بیشتر القا می‌شود (Rubio *et al.*, 2002). در غیاب هرگونه سازوکار حفاظتی، H_2O_2 می‌تواند از راه آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک متابولیسم طبیعی یاخته را مختل کرده، به غشا یاخته‌ای آسیب رساند که در نهایت، موجب مرگ یاخته‌ای می‌شود (Ozkur *et al.*, 2009). یکی دیگر از

آسیب‌های جدی تنش خشکی آسیب به غشای یاخته‌ای و رها شدن یون‌ها از یاخته به فضای بین‌یاخته‌ای است (Halliwell & Gutteridge, 1984). در آزمایشی که به بررسی اثر تنش خشکی در سه رقم انگور بی‌دانه سفید، فرخی و ساهانی انجام و گزارش شد، تنش خشکی باعث افزایش نشت یونی و کاهش پایداری غشای یاخته‌ای در رقم‌های کم‌تحمل به تنش خشکی شد (Gaderi *et al.*, 2009). تنش خشکی با آسیب به غشای یاخته‌ای و پراکسیداسیون لیپیدها میزان مالون‌دی‌آلدیند (MDA) را در گیاهان افزایش می‌دهد. افزایش در فعالیت آنزیم لیبوکسیژناز (LOX) در شرایط تنش خشکی نیز این مسئله را تأیید می‌کند زیرا آنزیم LOX واکنش‌های پراکسیداسیون لیپیدها را کاتالیز می‌کند (Egert & Tevini, 2002). در آزمایشی که روی برگ انگور تحت تنش خشکی انجام شد، بیان شد، رقم‌های انگور مقاوم به خشکی انگور میزان پرولین بیشتری در مقایسه با رقم‌های حساس داشتند ولی میزان MDA در رقم‌های مقاوم در مقایسه با رقم‌های حساس پایین‌تر بود و رقم‌های حساس سطح بالاتری از MDA داشتند (Xi *et al.*, 2007). در آزمایشی که بررسی فعالیت آنزیم LOX و تجمع MDA و پرولین تحت تنش خشکی روی برگ و ریشه زیتون انجام گرفت مشاهده شد فعالیت آنزیم LOX و همچنین میزان MDA و پرولین در پاسخ به تنش خشکی افزایش یافته بودند (Sofa *et al.*, 2004). همچنین تحت تنش شوری و خشکی افزایش فعالیت آنزیم LOX به همراه تجمع MDA در رقم‌های گوجه‌فرنگی حساس به تنش خشکی و شوری رخ داد (Juan *et al.*, 2005). گیاهان برای پاسخ به تنش‌های محیطی سامانه‌های مختلف پاداکسندگی آنزیمی و غیر آنزیمی دارند که تولید اضافی گونه‌های فعال اکسیژن را در شرایط تنش کنترل می‌کند (Mittler *et al.*, 2002). سامانه دفاع پاداکسنده غیر آنزیمی شامل پاداکسندهایی با وزن مولکول پایین مانند بتاکاروتن‌ها، آسکوربیک‌اسید و گلووتاتیون احیاشده (GSH) و سامانه دفاع پاداکسنده آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلووتاتیون ردوکتاز

بوته‌های انگور به‌طور مرتب به‌صورت دستی آبیاری و تغذیه گیاهان از اواخر فروردین‌ماه ۱۳۹۲ تا پیش از اعمال تنش خشکی به‌صورت هفته‌ای یک‌بار با کود کامل (نیترژن ۵درصد، فسفر ۲درصد، پتاسیم ۴درصد، آهن ۰/۱ درصد، روی، ۰/۰۵ درصد، مس ۰/۰۵ درصد و بُر ۰/۰۲ درصد) انجام شد. از اوایل اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۲ تا پیش از اعمال تنش خشکی هر پانزده روز یک‌بار از توپاس با غلظت (۰/۲۵ در ۱۰۰۰) برای مبارزه با قارچ سفیدک پودری و از اورتوس با غلظت (۱در ۱۰۰۰) برای مبارزه با کنه‌ها استفاده شد. گیاهان در هنگام اعمال تنش در مردادماه دوساله بودند و یک شاخه اصلی با ارتفاع تقریبی ۱۱۰ سانتی‌متر، سه شاخه فرعی با طول تقریبی ۶۰ سانتی‌متر و قطر تنه اصلی حدود ۲/۵ سانتی‌متر داشتند.

تعیین بافت و منحنی رطوبت حجمی خاک

برای تعیین بافت خاک و رسم منحنی رطوبتی خاک برای اعمال سطوح مورد نظر تنش خشکی در اواخر تیرماه ۱۳۹۲ از خاک گلدان‌ها نمونه‌گیری و نمونه به آزمایشگاه خاک‌شناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انتقال یافت. تعیین بافت نمونه خاک گلدان‌ها بر پایه مثلث بافت خاک، شامل ۱۹ درصد رس، ۱۹ درصد سیلت و ۶۲ درصد شن صورت گرفت، آنگاه نمونه خاک به‌دستگاه صفحه فشار منتقل شد و با توجه به داده‌های دستگاه صفحه فشار و با استفاده از نرم‌افزار RETC نمودار منحنی رطوبت خاک (مگاپاسکال مکش نسبت به رطوبت حجمی) بر پایه بافت خاک، رسم شد (شکل ۱).



شکل ۱. منحنی رطوبتی خاک
Figure 1. Soil moisture curve

(GR) و ... هستند (Xu et al., 2008). تحمل به تنش خشکی در گیاهان با توانایی به دام انداختن ROS کاهش دادن اثرگذاری مخربشان مرتبط است (Mittler et al., 2004). افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده APX و CAT در رقم‌های متحمل به تنش خشکی در برگ‌های انگور رقم ساهانی گزارش شده است (Talaie et al., 2009). با توجه به اینکه رقم‌های یاقوتی و چفته بیشتر در نواحی دیم استان‌های کشور مانند فارس و قزوین کشت می‌شوند و رقم بی‌دانه سفید بیشتر در شرایط آبی کشت می‌شود، هدف از این پژوهش بررسی واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی آن‌ها به مقادیر مختلف آب خاک می‌تواند برای انتخاب مناطق گسترش آن‌ها در کشور کمک کند.

مواد و روش‌ها

این آزمایش با ۱۲ تیمار شامل سه رقم انگور غیر پیوندی بی‌دانه سفید، یاقوتی و چفته و چهار تیمار خشکی در حد ۰/۳- (شاهد)، ۰/۶- (ملایم)، ۱- (شدید) و ۱/۵- (خیلی شدید) مگاپاسکال پتانسیل آب خاک و سه تکرار به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی اجرا شد. هر واحد آزمایشی شامل یک گلدان و هر گلدان حاوی یک بوته بود. بدین منظور در آغاز قلمه‌های سه رقم انگور انتخاب‌شده، در مرحله بعد ریشه‌دار شدند و سپس قلمه‌های ریشه‌دارشده در اسفندماه سال ۱۳۹۱ در گلدان‌های ۲۰ لیتری محتوای خاک لومی- شنی (قطر کف گلدان ۲۸ سانتی‌متر) حاوی ۱۶۶۵۷ سانتی‌مترمکعب خاک و حاوی سوراخ کف و یک لایه سنگ در کف گلدان در فضای آزاد در پردیس کشاورزی دانشگاه تهران واقع در کرج کاشته شدند. با قرار دادن قطعه‌های آجر در زیر گلدان‌ها از انسداد مجاری زه‌کشی کف گلدان جلوگیری به عمل آمد. خاک گلدان‌ها شامل یک قسمت ماسه شسته شده و یک قسمت خاک بود. از ماسه برای جبران برهم‌خوردگی ساختمان خاک مزرعه و ایجاد خلل و فرج مورد نیاز ریشه استفاده شد. جوانه‌ها اواخر فروردین‌ماه ۱۳۹۲ شروع به باز شدن کردند و در اواسط اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۲ به‌کلی شکوفا شده بودند.

چگونگی اعمال تنش خشکی

۰/۳ - ۰/۶ - ۱ - و ۱/۵ - مگاپاسکال به‌طور میانگین به ترتیب (۱، ۳، ۷ و ۱۰ روز)، زمان لازم بود. سپس با اطلاع از روز و ساعت رسیدن مکش خاک گلدان‌های کمکی به سطوح موردنظر خشکی پس از آخرین آبیاری، اعمال تنش خشکی برای گلدان‌های مورد آزمایش نیز انجام شد و اندازه‌گیری‌های مربوط به آزمایش تنش برای گلدان‌های مورد آزمایش در اواخر مردادماه و مصادف با گرم‌ترین و کم‌آب‌ترین ماه سال و به‌صورت پرهیز از آبیاری اعمال شد. همه نمونه‌گیری‌ها برای انجام آزمایش‌های فیزیولوژیکی در هنگام رسیدن آب خاک به سطوح ۰/۳ - ۰/۶ - ۱ - و ۱/۵ - مگاپاسکال انجام شد.

اندازه‌گیری صفات

محتوای نسبی آب برگ (RWC)

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب بر پایه روش *Turner et al.* (1981) انجام گرفت و با استفاده از رابطه ۴ زیر میزان محتوای نسبی آب برگ (RWC) محاسبه شد.

$$RWC = \frac{(WF-WD)}{(WT-WD)} \times 100 \quad (4)$$

WF = وزن تر برگ

WT = وزن آماس برگ

WD = وزن خشک برگ

کلروفیل

کلروفیل بر پایه روش *Lichtenthaler & Bushmann* (2001) اندازه‌گیری شد و غلظت کلروفیل از رابطه‌های ۵ و ۶ به‌دست آمد.

$$Chl a (mg F.W) = \frac{(11.23 \times A_{663} - 2.04 \times A_{645}) V}{100 W} \quad (5)$$

$$Chl b (mg F.W) = \frac{(20.13 \times A_{645} - 4.19 \times A_{663}) V}{100 W} \quad (6)$$

V = حجم محلول صاف‌شده

A = جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر

W = وزن تر نمونه بر حسب گرم

نشت یونی (EL)

نشت یونی بر پایه روش *Sairam et al.* (2001) اندازه‌گیری شد سپس درصد نشت یونی از رابطه ۷ به‌دست آمد.

برای مشخص کردن زمان دقیق رسیدن خاک گلدان‌ها به سطوح ۰/۳ - ۰/۶ - ۱ - و ۱/۵ - مگاپاسکال پتانسیل آب خاک، در آغاز با استفاده از سه گلدان کمکی که محتوای خاک آن همسان با گلدان‌های مورد آزمایش بود اعمال تنش خشکی یک‌بار انجام و اندازه‌گیری‌های مربوط به خاک برای به‌دست آوردن روز و ساعت دقیق رسیدن مکش خاک گلدان‌ها به سطوح مورد نظر تنش خشکی برای نمونه‌گیری از بوته‌های انگور برای آزمایش‌های فیزیولوژیکی انجام شد. بدین ترتیب پس از آخرین آبیاری در اوایل مردادماه به مدت دو هفته به‌صورت روزانه و هر دو ساعت یک‌بار در زمان‌های (۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶) از خاک گلدان‌های کمکی نمونه‌گیری انجام شد. بدین منظور ظرف‌های استوانه‌ای با حجم مشخص تهیه و پس از توزین ظرف‌های خالی ضمن حفظ ساختار و بافت با خاک محیط ریشه پر شده و بی‌درنگ به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از اندازه‌گیری وزن تر، نمونه خاک در آون در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس قرار داده شد تا وزن خشک آن نیز به‌دست آید. سپس با استفاده از روابط ۱ و ۲ در آغاز درصد رطوبت وزنی نمونه خاک محاسبه و سپس این میزان از رابطه ۳ به رطوبت حجمی تبدیل شد. سپس با در دست داشتن مقادیر رطوبت حجمی محاسبه شده از رابطه‌های زیر و منحنی رطوبت حجمی (شکل ۱) می‌توان روز و ساعت دقیق رسیدن مکش خاک گلدان‌های کمکی را به سطوح ۰/۳ - ۰/۶ - ۱ - و ۱/۵ - مگاپاسکال به‌دست آورد.

$$(1) \text{ رطوبت خاک (گرم بر سانتی‌متر)} =$$

$$\frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن ظرف}}{100}$$

$$(2) \text{ درصد رطوبت وزنی} =$$

$$\frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن ظرف}}{\text{وزن تر} - \text{وزن خشک}} \times 100$$

$$(3) \text{ درصد رطوبت حجمی} =$$

$$\text{درصد رطوبت وزنی} \times \text{گرم بر سانتی‌متر رطوبت خاک}$$

به‌منظور رسیدن مکش خاک گلدان‌ها به سطوح

هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی معادل $39/4 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر پایه روش *Ranieri et al.* (2003) اندازه‌گیری و میزان آسکوربات پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی معادل $2/8 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر پایه روش *Plewa et al.* (1991) با استفاده از گایاکول اندازه‌گیری و میزان فعالیت آن با استفاده از ضریب خاموشی $26/6 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل

ظرفیت پاداکسنده کل عصاره‌ها از راه خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد (DPPH) با استفاده از روش *Eberhar et al.* (2000) و با استفاده از رابطه ۹ محاسبه شد.

$$\% \text{ DPPH} = \frac{(A \text{ cont} - A \text{ samp})}{(A \text{ cont})} \times 100 \quad (9)$$

$\% \text{ DPPH}$ = درصد بازدارندگی رادیکال آزاد
 $A \text{ cont}$ = میزان جذب DPPH خالص
 $A \text{ samp}$ = جذب عصاره

تجزیه آماری

تجزیه واریانس داده‌ها، آزمون نرمال بودن داده‌ها و همچنین مقایسه میانگین داده‌ها بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ انجام گرفت. رسم منحنی با استفاده از نرم‌افزار EXCEL انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد، تیمار تنش خشکی و عامل رقم هر کدام به‌طور مستقیم از نظر آماری بر همه صفات اثر معنی‌دار داشت. در مقابل اثر متقابل تنش \times رقم تنها بر میزان کلروفیل a معنی‌دار بود و بر صفات دیگر از نظر آماری اثر معنی‌داری نداشت.

بنابر نتایج مقایسه میانگین (شکل A-۲)، محتوای نسبی آب برگ در تیمار ۱/۵- مگاپاسکال در مقایسه

$$EL = \frac{EC1}{EC2} \times 100 \quad (7)$$

EL = میزان نشت یونی
 $EC1$ = هدایت الکتریکی اولیه
 $EC2$ = هدایت الکتریکی ثانویه

مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

میزان MDA به روش *Stewart & Beweley* (1980) به دست آمد. سپس نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر از رابطه ۸ به دست آمد.

$$\text{MDA} = \frac{(532 \text{ nm} - 600 \text{ nm})}{\text{QD} \times \text{QF}} \times \text{QF} \quad (8)$$

MDA = میزان مالون دی‌آلدئید بر حسب (نانومول بر گرم وزن)
 QD = قطر کووت (۱ سانتی‌متر)
 QF = ضریب خاموشی (۱۵۵ میلی‌مولار بر سانتی‌متر)
 DF = فاکتور رقت (در این روش ۲۰ است)

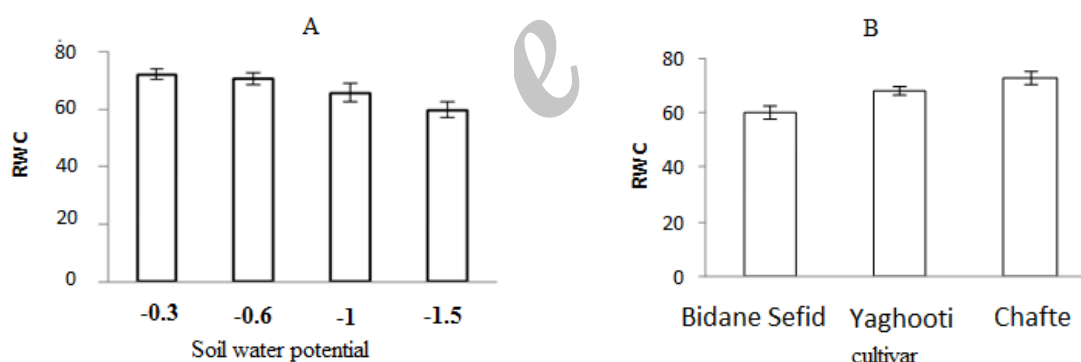
پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

استخراج H_2O_2 بر پایه واکنش پراکسید هیدروژن با یدور پتاسیم (KI) بنابر روش *Alexieva et al.* (2001) انجام شد. غلظت پراکسید هیدروژن بر پایه رسم منحنی استاندارد پراکسید هیدروژن و معادله خط آن به صورت میکرومول بر گرم وزن تر برگ به دست آمد.

استخراج عصاره آنزیمی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها ۰/۵ گرم از برگ منجمد شده در بافر Tris-HCL ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی ۲۰ درصد گلیسرول همگن شدند. همگن‌های به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. بخش رویی برای سنجش‌های آنزیمی استفاده شد. استخراج و سنجش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز بر پایه روش *Axelroad et al.* (1981) اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین با استفاده از ضریب خاموشی معادل $25 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ به دست آمد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر پایه روش *Aebi* (1984) با روش طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر) و بر پایه کاهش جذب پراکسید

در یاخته‌های محافظ روزنه خود گیرنده‌هایی دارند که در هنگام دریافت پیام تنش با وجود کاهش پتانسیل آب خاک و ریشه باعث بسته ماندن روزنه‌ها و حفظ پتانسیل آب برگ می‌شوند) دارد که تغییرپذیری شدید در محتوای نسبی آب برگ و پتانسیل آب برگ آن را محدود کند (Sousa *et al.*, 2006). Lawlor & Cornic (2002) دو الگوی مختلف پاسخ نورساختی به تنش آبی که در گیاهان ممکن است رخ دهد، پیشنهاد کرده‌اند. بر پایه این الگوها از محتوای نسبی آب برگ به‌عنوان یک شاخص برای نشان دادن شدت تنش خشکی در سطح برگ استفاده می‌شود. ولی بنابر تحلیل Flexas *et al.* (2004) هیچ‌کدام از این الگوها برای گیاه انگور سازگار نیست. در واقع تا هنگامی که گیاه انگور در معرض تنش شدید خشکی قرار نگیرد میزان محتوای نسبی آب برگ به‌طور چشمگیری کاهش نمی‌یابد که نتایج این پژوهش با آن همخوانی دارد.

با تیمارهای شاهد و ۰/۶- و ۱- مگاپاسکال به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین نتایج مقایسه میانگین مربوط به رقم‌های بررسی‌شده در این آزمایش نشان داد (شکل B-۲). بالاترین میزان محتوای نسبی آب برگ مربوط به رقم چفته و پس‌از آن رقم یاقوتی و در برابر پایین‌ترین میزان محتوای نسبی آب برگ مربوط به رقم بی‌دانه سفید بود. با افزایش تنش خشکی در برخی از گونه‌های گیاهی مانند انگور میزان نورساخت به‌طور پیوسته کاهش می‌یابد این در حالی است که این کاهش با کاهش کمی در محتوای نسبی آب برگ همراه است (Flexas *et al.*, 2004). Patacac *et al.* (1977)، میزان آب، پتانسیل اسمزی و تورژسانس برگ‌های رقم انگور ردیتیس (Roditis) را اندازه‌گیری و مشاهده کردند که در دوره تنش خشکی میزان محتوای نسبی آب برگ در برگ‌های جوان به ۷۸ درصد و در برگ‌های پیر به ۶۲ درصد کاهش یافت. انگور خاصیت ایزوهیدریک (گیاهان ایزوهیدریک



شکل ۲. (A) مقایسه میانگین اثر تنش بر میزان محتوای نسبی آب برگ تحت مقادیر ۰/۶-، ۱-، ۱/۵- و مگاپاسکال پتانسیل آب خاک، (B) مقایسه میانگین اثر رقم‌های بر میزان محتوای نسبی آب برگ در سه رقم انگور شامل بی‌دانه سفید، یاقوتی، چفته تحت تنش خشکی نشانه‌های روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. میانگین‌های دارای دست‌کم یک حرف همسان از نظر آماری اختلافی در سطح ۱ درصد ندارند.

Figure 2. (A) Comparison of the average stress effect on the relative water content of leaves under the values of -0.3, -0.6, -1.5 and -1 Mpa, the water potential of the soil, (B). The average of the effect of digits on the relative amount of leaf water content in three grapevine cultivars including Bidane sefid, Yaghooti, Caffe, and Dipper under drought stress indicate the standard error (SE). Averages with at least one identical letter do not have a statistical difference of 1%.

کاهش میزان کلروفیل a مربوط به تیمار خشکی شدید بود. در رقم چفته نیز میزان کلروفیل a با افزایش شدت تنش خشکی کاهش پیدا کرد و بیشترین کاهش مربوط به تیمار متوسط و شدید خشکی بود.

نتایج مقایسه میانگین جدول ۱ نشان داد، با افزایش سطوح تنش خشکی میزان کلروفیل a در هر سه رقم چفته، یاقوتی و بی‌دانه سفید به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در رقم بی‌دانه سفید بیشترین

۱/۵- مگاپاسکال اختلاف معنی‌داری از نظر میزان کلروفیل b با یکدیگر نداشتند (شکل A-۳). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده رقم چفته و پس‌از آن رقم یاقوتی بالاترین میزان کلروفیل b و در مقابل رقم بی‌دانه سفید پایین‌ترین میزان کلروفیل b را داشتند (شکل B-۳).

در رقم یاقوتی نیز با افزایش سطوح تنش خشکی میزان کلروفیل a کاهش پیدا کرد. بنابر نتایج، بیشترین کاهش میزان سبزینه b مربوط به تیمارهای ۱- و ۱/۵- مگاپاسکال بود. همچنین نتایج نشان داد، تیمارهای ۰/۳-، ۰/۶- مگاپاسکال و تیمارهای ۱- و

جدول ۱. مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تنش \times رقم بر میزان کلروفیل a (mg g^{-1} F.W)

Table 2. Comparison of the effects of stress \times interaction on the amount of vegetable a (mg g^{-1} F.W)

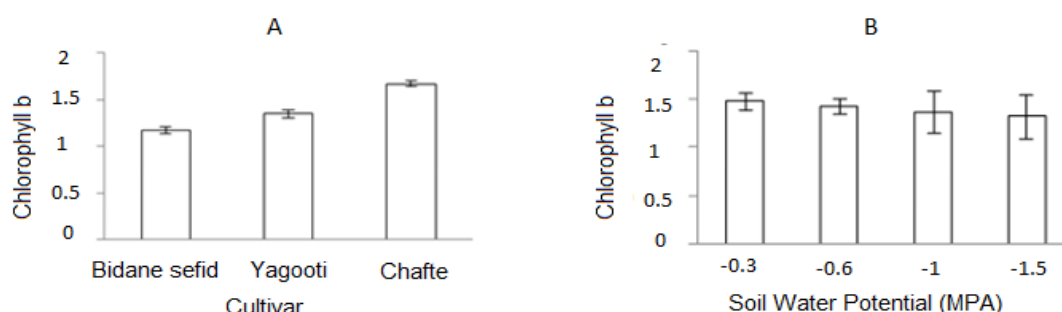
Treatment	(Control) -0.3 MPa	(Mild) -0.6 MPa	(Moderate) -1 MPa	(Severe) -1.5 MPa
Bidane sefid	1.77 \pm 0.099 f	1.74 \pm 0.075 f	1.56 \pm 0.030 g	1.40 \pm 0.032 h
Chafte	2.66 \pm 1.056 a	2.63 \pm 0.013 a	2.29 \pm 0.045 b	2.12 \pm 0.043 cd
Yaghooti	2.04 \pm 0.024 cd	2.06 \pm 0.045 cd	1.94 \pm 0.048 de	1.82 \pm 0.033 ef

میانگین‌هایی که حرف مشترک ندارند در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار هستند. تیمار شاهد، ملایم، متوسط و شدید به ترتیب نشان‌دهنده پتانسیل آب خاک به میزان ۰/۳-، ۰/۶- و ۱/۵- مگاپاسکال هستند.

Averages that do not have a common language are significant at 1% probability level. The control, mild, moderate, and severe, indicate that the soil water potential is -0.3, -0.6, -1.5 and -1.5 MPa, respectively.

همچنین باعث شکسته شدن کلروپلاست‌ها، کاهش میزان کلروفیل، کاهش تشکیل پلاستیدهای جدید، کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتن و همچنین افزایش نسبت کلروفیل a به b می‌شود (Weng *et al.*, 2001). افزون بر این کاهش میزان کلروفیل در گیاهان در شرایط تنش می‌تواند در اثر تجزیه کلروفیل توسط آنزیم کلروفیلاز صورت گیرد (Sevengo *et al.*, 2011). از سوی دیگر گلوتامیک اسید به‌عنوان پیش ساز مشترک برای زیست‌ساخت (بیوسنتز) کلروفیل و پرولین استفاده می‌شود (Dily *et al.*, 1993). در شرایط تنش خشکی فعالیت آنزیم گلوتامات‌لیگاز برای تبدیل گلوتامین به پرولین فعال می‌شود و گیاه مخزن گلوتامیک اسید را به سوی زیست‌ساخت پرولین که نقش مهمی در مقاومت به تنش خشکی به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی دارد، سوق می‌دهد و گلوتامیک اسید موجود برای زیست‌ساخت کلروفیل کاهش می‌یابد که منجر به کاهش میزان کلروفیل در گیاهان تحت تنش می‌شود (Dily *et al.*, 1993). در همین رابطه در آزمایشی که تأثیر تنش خشکی بر مقادیر کلروفیل، پرولین و قندهای محلول در انگور را بررسی کردند گزارش شد که تنش خشکی باعث افزایش میزان پرولین و قندهای محلول و کاهش شاخص سطح کلروفیل شده بود (Azizi *et al.*, 2004).

کاهش غلظت کلروفیل در شرایط تنش آبی به‌عنوان یک عامل غیر روزنه‌ای به شمار می‌آید. سرعت نورساخت ممکن است به میزان کلروفیل وابسته باشد. بنابراین کاهش نورساخت می‌تواند در اثر کاهش میزان کلروفیل باشد (Deborh & Bruce, 1998). میزان کلروفیل یکی از فراسنجه‌های بیوشیمیایی است که ممکن است تحت تنش خشکی کاهش یابد و به‌عنوان یک نشانگر برای تنش خشکی معرفی شده است (Yanbao *et al.*, 2006). برخی دیگر از محققان گزارش کردند که تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش خشکی تأثیر منفی بر نورساخت دارند. نورساخت و رشد یاخته‌ای از نخستین فرایندهایی هستند که از تنش آبی تأثیر می‌پذیرند. آن‌ها همچنین گزارش کردند که در تنش خشکی میزان کلروفیل به‌شدت کاهش می‌یابد و از سوی دیگر میزان گونه‌های فعال اکسیژن نیز به‌نوبه خود باعث کاهش نورساخت می‌شوند (Pirkeret *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004). کاهش میزان کلروفیل a و b تحت تنش در گیاه انگور (Ghadery *et al.*, 2005) و سیب (Sircelj *et al.*, 2007) گزارش شده است. برخی دیگر از محققان نیز اعلام کردند که تنش خشکی باعث آسیب دیدن کمپلکس دریافت‌کننده اکسیژن در فتوسیستم ۲ که حساس‌ترین بخش به تنش است و



شکل ۳. (A) مقایسه میانگین اثر تنش بر میزان کلروفیل b تحت مقادیر ۰/۳-، ۰/۶-، ۱- و ۱/۵- مگاپاسکال پتانسیل آب خاک، (B) مقایسه میانگین اثر رقم‌های بر میزان سبزینه b در سه رقم انگور شامل بی‌دانه سفید، یاقوتی، چفته تحت تنش خشکی. نشانه‌های روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. (میانگین‌های دارای دست‌کم یک حرف همسان از نظر آماری اختلافی در سطح ۱ درصد ندارند).

Figure 3. (A) Comparison of the average stress effect on the amount of chlorophyll b under the values of -0.3, -0.6, -1.5 and -1.5 Mpa. Soil water potential (B) The average of the effect of cultivars on the amount of vegetable b in three grapevine cultivars including white wheat, Yagutty, Stained under Drought Stress. Symbols on the columns show the criterion error (SE). Averages with at least one identical letter do not have a statistical difference of 1%.

افزایش میزان نشت یونی متناسب با افزایش شدت تنش خشکی در رقم‌های انگور گزارش شده است (Gaderi *et al.*, 2009; Jalili *et al.*, 2011). Barabal (1990) میزان نشت یونی را در رقم‌های متحمل و حساس انگور را پیش و پس از تنش خشکی اندازه‌گیری و گزارش کرد که در آن میزان نشت یونی برگ رابطه مستقیم با میزان رطوبت و در نتیجه تحمل به تنش خشکی دارد. یکی از آسیب‌های جدی تنش خشکی آسیب به غشا و رهاسازی یون‌ها از یاخته به فضای بین یاخته‌ای است که با اندازه‌گیری نشت یونی میزان آسیب به غشا ارزیابی می‌شود (Halliwell & Gutteridge, 1984).

نتایج همچنین نشان داد، رقم بی‌دانه سفید در مقایسه با رقم‌های چفته و یاقوتی در تیمار شدید خشکی میزان بالاتری از H_2O_2 دارد. میزان H_2O_2 در رقم‌های چفته و یاقوتی تحت تیمار شدید خشکی در مقایسه با تیمار ملایم خشکی افزایش معنی‌داری داشت. بین رقم‌های چفته و یاقوتی در میزان H_2O_2 اختلاف معنی‌داری دیده نشد. در اثر تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ایجاد می‌شوند. گونه‌های فعال اکسیژن فرم‌هایی از اکسیژن اتمسفری (O_2) هستند که تا حدودی احیا شده‌اند. از برانگیخته شدن اکسیژن، اکسیژن یکتایی (O_2) به وجود می‌آید. با انتقال یک، دو یا سه الکترون به

نتایج میزان نشت یونی، تجمع مالون‌دی‌آلدئید، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز، پراکسید هیدروژن نتایج تجزیه واریانس نشان داد، بین همه رقم‌ها و همچنین بین همه سطوح تنش خشکی برای همه صفات اختلاف معنی‌دار وجود دارد. همچنین اثر متقابل تنش × رقم برای همه صفات به جز میزان مالون‌دی‌آلدئید اختلاف معنی‌دار داشتند.

بر پایه نتایج ارائه‌شده در جدول ۲، در رقم بی‌دانه سفید، افزایش سطوح تنش خشکی باعث افزایش میزان نشت یونی شده است به طوری که در تیمار شدید خشکی، رقم بی‌دانه سفید بالاترین میزان نشت یونی را در مقایسه با رقم‌های چفته و یاقوتی داشت. رقم چفته در همه سطوح تنش خشکی، تغییر معنی‌داری در میزان نشت یونی نداشت. در رقم یاقوتی افزایش معنی‌داری در میزان نشت یونی در تیمار شدید خشکی نسبت به تیمار ملایم خشکی مشاهده شد. با افزایش سطوح تنش خشکی افزایش نشت یونی همراه با کاهش محتوای نسبی آب برگ رخ می‌دهد. بر پایه گزارش‌های علمی همان‌طور که محتوای نسبی آب برگ در تنش خشکی کاهش می‌یابد، یاخته‌ها چروکیده شده و غشای یاخته‌ای پایداری خود را از دست می‌دهد (Tiaz & Zeiger, 1998) در نتیجه نفوذپذیری غشای یاخته‌ای افزایش یافته و محتویات درون یاخته به بیرون آن نشت می‌کند (Hura *et al.*,

یاخته‌ای مانند لیپیدها، پروتئین‌ها، DNA و RNA دارند که می‌تواند منجر به آسیب اکسیداتیو یاخته شود (Asada & Takahashi, 1987; Dat *et al.*, 2000;) (Hammond & Jones, 1996).

اکسیژن به ترتیب رادیکال‌های سوپر اکسید (O_2^-), پراکسید هیدروژن (H_2O_2) یا رادیکال هیدروکسیل (OH) تشکیل می‌شود. برخلاف اکسیژن اتمسفری، ROSها توانایی نامحدود در اکسیداسیون مولکول‌های زیستی

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش \times رقم بر میزان نشت یون، آنزیم لیپواکسیژناز (LOX)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)
Table 4. Comparison of mean stress \times effect on ion leakage, lipoxygenase enzyme (LOX), hydrogen peroxide (H_2O_2)

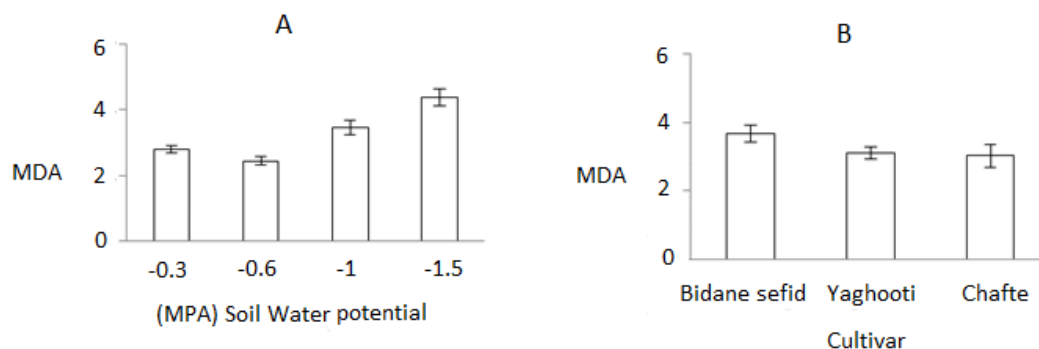
Cultivar	Treatment	Ion Leakage (%)	H_2O_2	LOX
Bidane sefi	Control	21.65 \pm 1.731 c	59.27 \pm 6.335 cd	0.708 \pm 0.0124 de
	Mild	22.75 \pm 0.382 c	75.16 \pm 3.910 bc	0.876 \pm 0.064 de
	Moderate	25.58 \pm 0.452 b	80.70 \pm 7.925 b	1.850 \pm 0.476 b
	Severe	31.63 \pm 1.252 a	125.8 \pm 5.723 a	2.583 \pm 0.355 a
Chefte	Control	21.42 \pm 1.086 c	54.06 \pm 3.360 cd	0.686 \pm 0.087 e
	Mild	21.94 \pm 0.935 c	47.47 \pm 5.538 d	0.758 \pm 0.094 de
	Moderate	23.447 \pm 0.317 bc	74.90 \pm 9.927 bc	1.131 \pm 0.072 cde
	Severe	24.10 \pm 1.286 bc	80.73 \pm 15.280 b	1.464 \pm 0.274 bc
Yaghooti	Control	22.63 \pm 0.559 c	58.28 \pm 5.506 bcd	0.701 \pm 0.056 de
	Mild	22.40 \pm 0.707 c	59.90 \pm 3.991 cd	0.671 \pm 0.091 e
	Moderate	24.40 \pm 1.182 bc	74.90 \pm 9.927 bc	1.257 \pm 0.150 cd
	Severe	25.88 \pm 0.572 b	1.622 \pm 0.310 bc	80.73 \pm 15.280 b

هر عدد میانگین ۳ اندازه‌گیری است. تیمار شاهد، ملایم، متوسط و شدید به ترتیب نشان‌دهنده ۰/۳، -۰/۶، -۱/۵ و -۱/۵ مگاپاسکال پتانسیل آب خاک هستند. همه اندازه‌گیری‌ها در هنگام رسیدن مکش خاک گلدان‌ها به سطوح تنش خشکی مورد نظر انجام گرفته است. میانگین‌های هر ستون برای صفت مورد نظر که حروف یکسان دارند در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Each number is an average of measurements. The control, mild, moderate and severe, indicate a potential of soil water of -0.3, -0.6, -1.5 and -1.5 MPa, respectively. All measurements were made when the soil soaked to the drought stress levels was reached. The mean of each column for the adjective with the same letters is not significantly different at 1% probability level.

پاداکنده (آنزیمی و غیر آنزیمی) تعادل وجود دارد. اما در شرایط تنش میزان تولید ROSها از ظرفیت جاروب کردن آن‌ها توسط سامانه دفاع پاداکنده بیشتر شده و در نتیجه تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد. با توجه به (شکل A-۴)، بالاترین میزان مالون‌دی‌آلدی‌هید مربوط به سطح تنش ۱/۵- مگاپاسکال بود و تیمارهای ۰/۳- و ۰/۶- مگاپاسکال تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشتند همچنین دو رقم چفته و یاقوتی تجمع پایین‌تری از مالون‌دی‌آلدئید در مقایسه با رقم بی‌دانه سفید داشتند (شکل B-۴). تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن تحت تنش خشکی منجر به پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشای یاخته‌ای می‌شود. پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشای یاخته‌ای منجر به تجمع مالون دی‌آلدئید (MDA) می‌شود (Scandadalius, 1993). میزان تجمع مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان یک نشانگر (بیو مارکر) برای مشخص کردن میزان آسیب تنش اکسیداتیو به اسیدهای چرب غشای یاخته‌ای به کار می‌رود و میزان آن بسته به نوع تنش زیستی و غیرزیستی متفاوت است (Ohkawa *et al.*, 1979; Shulaev & Oliver, 2006).

رادیکال سوپراکسید به‌عنوان نخستین گونه فعال اکسیژن از راه نشت الکترون در زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری و کلروپلاست تشکیل می‌شود و به‌سرعت توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به H_2O_2 تبدیل می‌شود. همچنین در یاخته‌ها، H_2O_2 توسط آنزیم گلیکولات اکسیداز در تنفس نوری در پراکسی‌زوم ایجاد می‌شود. گلیکولات اکسیداز، اگسالات و اکسیژن را به H_2O_2 و CO_2 تبدیل می‌کند. افزون بر میتوکندری و کلروپلاست، NADPH اکسیداز واقع در غشای یاخته‌ای که الکترون را از NADPH به مولکول اکسیژن انتقال می‌دهد، O_2^- تولید می‌کند که پس از تولید، توسط آنزیم SOD به H_2O_2 تبدیل می‌شود. ROSها محصول طبیعی در متابولیسم گیاهی هستند که در حالت طبیعی در یاخته ایجاد می‌شوند و در غلظت‌های پایین در سیگنال‌دهی یاخته‌ای نقش دارند اما هنگامی که تحت تنش میزان آن‌ها زیاد می‌شود موجب ایجاد آسیب اکسیداتیو به یاخته می‌شوند. در شرایط غیر تنش بین میزان تولید ROSها و ظرفیت جاروب کردن این ترکیب‌ها توسط سامانه دفاع



شکل ۴. (A) مقایسه میانگین اثر تنش بر میزان مالون‌دی‌آلدی‌هید در سه رقم انگور شامل بی‌دانه سفید، یاقوتی، چفته تحت تنش خشکی، (B) تغییر میزان مالون‌دی‌آلدی‌هید در انگور تحت مقادیر ۰/۳- (شاهد)، ۰/۶- (ملایم)، ۱- (متوسط) و ۱/۵- (شدید) مگاپاسکال پتانسیل آب خاک. نشانه‌های روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. میانگین‌های دارای دست‌کم یک حرف همسان از نظر آماری اختلافی در سطح ۱ درصد ندارند.

Figure 4. (A) Comparison of the average stress effect on the level of malondialdehyde in three grapevine cultivars including white, yogurt, chamomile under drought stress, (B) Changes in malondialdehyde content in grapes under the values of -0.3 (control), 0.6-0 (mild), 1- (moderate) and 1.5 (severe) megapascal potential of soil water. Symbols on the columns show the criterion error (SE). Averages with at least one identical letter do not have a statistical difference of 1%.

عامل رقم هر کدام به‌طور مستقیم از نظر آماری بر همه صفات اثر معنی‌دار داشتند. همچنین اثر متقابل تنش × رقم برای همه صفات اختلاف معنی‌دار داشت.

نتایج اثر متقابل جدول ۳ نشان می‌دهد، میزان فعالیت آنزیم CAT در رقم‌های چفته و یاقوتی در تیمار شدید خشکی به‌طور معنی‌داری نسبت به رقم بی‌دانه سفید افزایش یافت. در مقابل در تیمارهای شاهد، ملایم و متوسط خشکی تغییرپذیری معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم CAT در مقایسه با رقم بی‌دانه سفید مشاهده نشد. فعالیت آنزیم CAT در رقم‌های چفته و یاقوتی تا حدودی یکسان بود و اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. با این‌وجود در رقم بی‌دانه سفید تغییرپذیری معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم CAT با افزایش شدت تنش خشکی از تیمار شاهد تا تیمار شدید خشکی مشاهده نشد. همچنین در رقم‌های چفته و یاقوتی افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم APX در تیمارهای متوسط و شدید خشکی مشاهده شد. نتایج نشان داد، در رقم بی‌دانه سفید با افزایش سطوح تنش خشکی افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم APX مشاهده نشد. فعالیت آنزیم GPX در رقم‌های چفته و یاقوتی به‌صورت معنی‌داری در اثر تیمارهای متوسط و شدید تنش

بنابر نتایج جدول ۲، میزان فعالیت آنزیم LOX با افزایش سطوح تنش خشکی در رقم بی‌دانه سفید افزایش یافت به‌طوری‌که در تیمار متوسط خشکی به‌طور معنی‌داری میزان فعالیت آنزیم LOX آغاز به افزایش کرد و در تیمار شدید خشکی بالاترین میزان فعالیت آنزیم LOX را داشت. همچنین در رقم‌های چفته و یاقوتی با افزایش سطوح تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم LOX افزایش یافت اما میزان افزایش آنزیم LOX در رقم‌های چفته و یاقوتی در مقایسه با رقم بی‌دانه سفید به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. افزون بر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشای یاخته‌ای که به‌صورت غیر آنزیمی و در اثر تجمع ROSها منجر به تجمع MDA می‌شود پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشای یاخته‌ای به‌صورت آنزیمی نیز در اثر فعالیت بالای آنزیم LOX، انجام می‌شود. تحت تنش خشکی ROSها و میزان فعالیت آنزیم LOX افزایش می‌یابد که باعث افزایش نفوذپذیری غشای یاخته‌ای و در نتیجه افزایش نشت یونی از یاخته به خارج می‌شود.

نتایج میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل نتایج تجزیه واریانس نشان داد، تیمار تنش خشکی و

کل (DPPH) در رقم‌های چفته و یاقوتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت اما میزان ظرفیت پاداکسنده کل در رقم بی‌دانه سفید تحت تأثیر سطوح تنش خشکی قرار نگرفت.

خشکی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ولی در رقم بی‌دانه سفید با افزایش سطوح تنش خشکی میزان فعالیت این آنزیم تغییری پیدا نکرد. همچنین با افزایش سطوح تنش خشکی میزان ظرفیت پاداکسنده

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش × رقم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و ظرفیت آنتی اکسیدان کل (DPPH)

Table 3. Comparison of mean stress × effect on the activity of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiac peroxidase (GPX) and total antioxidant capacity (DPPH)

Cultivar	Treatment	CAT	APX	GPX	DPPH (%)
		U/mg protein	U/mg protein	U/mg protein	
Bidane sefi	Control	0.71 ± 0.163 cd	1.88 ± 0.356 c	0.71 ± 0.163 cd	1.88 ± 0.356 c
	Mild	0.852 ± 0.122 cd	2.26 ± 0.526 c	0.852 ± 0.122 cd	2.26 ± 0.526 c
	Moderate	1.100 ± 0.152 cd	2.87 ± 0.245 bc	1.100 ± 0.152 cd	2.87 ± 0.245 bc
	Severe	0.936 ± 0.051 cd	1.69 ± 0.214 c	0.936 ± 0.051 cd	1.69 ± 0.214 c
Chefte	Control	0.866 ± 0.0611 cd	2.24 ± 0.269 c	0.866 ± 0.061 cd	2.24 ± 0.269 c
	Mild	0.906 ± 0.143 cd	2.10 ± 0.285 c	0.906 ± 0.143 cd	2.10 ± 0.285 c
	Moderate	1.257 ± 0.083 cd	3.76 ± 0.277 ab	1.257 ± 0.083 cd	3.76 ± 0.277 ab
	Severe	1.722 ± 0.080 a	4.77 ± 0.093 a	1.722 ± 0.080 a	4.77 v 0.093 a
Yaghooti	Control	0.906 ± 0.143 cd	1.93 ± 0.118 c	0.906 ± 0.143 cd	1.93 ± 0.118 c
	Mild	0.318 ± 0.042 d	1.89 ± 0.428 c	0.318 ± 0.042 d	1.89 v 0.428 c
	Moderate	0.192 ± 0.133 de	3.78 ± 0.608 ab	0.192 ± 0.133 de	3.78 ± 0.608 ab
	Severe	1.583 ± 0.230 ab	3.65 ± 0.608 ab	1.583 ± 0.230 ab	3.65 ± 0.608 ab

هر عدد میانگین ۳ اندازه‌گیری است. تیمار شاهد، ملایم، متوسط و شدید به ترتیب نشان‌دهنده ۰/۳، -۰/۶، -۱/۰ و -۱/۵ مگاپاسکال پتانسیل آب خاک هستند. همه اندازه‌گیری‌ها در زمان رسیدن مکش خاک گلدان‌ها به سطوح تنش خشکی مورد نظر انجام گرفته است. میانگین‌های هر ستون برای صفت مورد نظر که حروف یکسان دارند در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Each number is an average of 3 measurements. The control, mild, moderate and severe, indicate a potential of soil water of -0.3, -0.6, -1.5 and -1.5 MPa, respectively. All measurements have been made at the drought stress levels when the soil soaking is reached. The mean of each column for the adjective with the same letters is not significantly different at 1% probability level.

بیش‌ازحد یوبی کوئینون و تولید ROSها می‌شود. AOX از راه حفظ تعادل بین تولید ROS و فعالیت سامانه پاداکسنده که مسئول کاهش سطوح ROS می‌شود موجب افزایش مقاومت به تنش‌ها می‌شود. روش دوم دفاع در برابر تنش اکسیداتیو عبارت است از فعال کردن ژن‌های جاروکننده ROS که شامل آنزیم‌های پاداکسنده مانند SOD و CAT و چرخه آسکوربات-گلوتاتیون است. فعالیت بالای سامانه پاداکسنده موجب کاهش اثر زیان‌بار ROS بر غشای یاخته‌ای و افزایش مقاومت به تنش می‌شود (Moller, 2001). آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز از آنزیم‌های مهم سامانه دفاع پاداکسنده در گیاهان هستند اگرچه سوپراکسید دیسموتاز در خط مقدم دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کند اما محصول عمل آن یعنی پراکسید هیدروژن همچنان

در شرایط غیر تنش بین میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ظرفیت جاروب کردن این ترکیب‌ها توسط سامانه دفاع پاداکسنده (آنزیمی و غیر آنزیمی) تعادل وجود دارد. اما در شرایط تنش میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن از ظرفیت جاروب کردن آن‌ها توسط سامانه دفاع پاداکسنده بیشتر شده و در نتیجه تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد. بنابراین برای رویارویی با تنش اکسیداتیو ظرفیت بالای سامانه دفاع پاداکسنده ضروری است (Wang *et al.*, 2006). دفاع در برابر تنش‌های اکسیداتیو به دو روش صورت می‌گیرد روش اول عبارت است از فعال کردن ژن‌های بازدارنده تولید ROS که شامل آنزیم آلترناتیو اکسیداز (AOX) است. مسیر AOX گیاهی انشعابی از مسیر سیتوکرومی زنجیره انتقال الکترون است که در شرایطی که مسیر سیتوکرومی با الکترون اشباع شده است از راه اکسید کردن یوبی کوئینول عمل می‌کند و مانع احیای

پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به همراه تجمع پراکسید هیدروژن و ظرفیت پاداکسنده کل (DPPH) دارند، اما فعالیت سامانه پاداکسنده تفاوت معنی‌داری بین این دو رقم نشان نمی‌دهد که می‌توان آن را به سطوح یکسان تحمل به تنش خشکی در این دو رقم نسبت داد.

نتیجه‌گیری کلی

در رقم بی‌دانه سفید، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و میزان بالای H_2O_2 تحت سطوح بالای تنش خشکی می‌تواند ناشی از افزایش تولید ROSها باشد که حذف، جارو کردن و خاموش کردن آن‌ها خارج از توان این رقم بوده و همچنین فعالیت پایین آنزیم‌های پاداکسنده شامل CAT و APX در رقم بی‌دانه سفید نشان می‌دهد، سازوکارهای دفاعی ایجادشده در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی کافی نبوده و در نتیجه می‌توان احتمال داد یکی از علت‌های تحمل پایین رقم بی‌دانه سفید به سطوح بالای تنش خشکی باشد. در مقابل در رقم‌های چفته و یاقوتی پایین بودن میزان پراکسیداسیون لیپیدها و پایین بودن میزان H_2O_2 و همچنین فعالیت بالای آنزیم‌های سامانه پاداکسنده تحت تنش شدید خشکی می‌تواند ناشی از حذف و جارو کردن ROSها در رقم‌های چفته و یاقوتی باشد که می‌توان احتمال داد یکی از دلایل تحمل بیشتر این رقم‌ها به تنش خشکی باشد.

برای یاخته سمی است و باید از یاخته حذف شود که توسط کاتالاز یا آسکوربات پراکسیداز چرخه آسکوربات-گلوتاتیون انجام می‌گیرد (Laspina *et al.*, 2005). بین SOD، APX و CAT برای تعیین سطح رادیکال‌های سوپر اکسید و پر اکسید هیدروژن تعادل برقرار است. آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در حذف پراکسید هیدروژن در یاخته نقش دارند (Sundhacar *et al.*, 2001). در مجموع، می‌توان بیان کرد که رقم بی‌دانه سفید تحت تنش خشکی نسبت به رقم‌های چفته و یاقوتی فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز پایین‌تری دارد که منجر به تجمع سطوح بالای پراکسید هیدروژن می‌شود و تجمع بالای پراکسید هیدروژن در رقم بی‌دانه سفید نیز این مسئله را تأیید می‌کند. همچنین ظرفیت پاداکسنده کل (DPPH) نیز در رقم بی‌دانه سفید نسبت به رقم‌های چفته و یاقوتی به‌طور معنی‌داری تحت تنش خشکی پایین است. سطوح بالای نشت یونی و میزان مالون دی‌آلدئید در رقم بی‌دانه سفید نشان‌دهنده سطوح بالای تنش اکسیداتیو در این رقم است که باعث می‌شود این رقم به‌عنوان رقم حساس به تنش خشکی معرفی شود. بااینکه رقم‌های چفته و یاقوتی نسبت به بی‌دانه سفید سطوح بالای فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده کاتالاز، آسکوربات

REFERENCES

1. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 105, 121-126.
2. Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment*, 24, 1337-1344.
3. Alsher, R.G., Erturk, N. & Heath, L. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1331-1341.
4. Plewa, M. J., Smith, S. R. & Wanger, E. D. (1991). Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research*, 247, 57-64.
5. Asada, K. & Takahashi, M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, Eds, *and Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, PP, 227-287.
6. Bakhshi, D. & Arakawa, O. (2006). Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the Tesh of red and yellow apples. *Journal of Applied Horticulture*, 8(2), 101-104.
7. Bandoğlu, E., Eyidoğan, F., Yücel, M. & Öktem, H. A. (2004). Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. *Plant Growth Regulation*, 42(1), 69-77.
8. 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(1), 248-254.
9. Dat, J., Vandenberghe, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Breusege, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, 779-795.

10. Deborth, L. B. & Bruce, G. B. (1998). Photosynthetic capacity and mass partitioning dwarf and semi-dwarf wheat. *Journal of Plant Physiology*, 153, 558-565.
11. Eberhardt, M. V., Lee, C. Y. & Liu, R. H. (2000). Nutrition: Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405(6789), 903-904.
12. Egert, M. & Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany*, 48(1), 43-49.
13. Esteban, M. A., Villanueva, M. J. & Lissarrague, J. R. (1999). Effect of irrigation on changes in berry composition of Tempranillo during maturation. Sugars, organic acids, and mineral elements. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 418-434.
14. Esteban, M. A., Villanueva, M. J. & Lissarrague, J. R. (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 402-420.
15. Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. & Sharkey, T. D. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C_3 plant. *Plant Biology*, 6, 1-11.
16. Ghaderi, N., Siosemardeh, A. & Shahoei, S. (2005). The effect of water stress on some physiological characteristics in rasheh and khoshnave grape cultivars. *Acta Horticulturae*, 754, 317-332.
17. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 219, 1-14.
18. Halliwell, B. & Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, 219(1), 1.
19. Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8, 1773-1791.
20. Hura, T., Hura, K., Grzesiak, M. & Rezepka, A. (2007). Effect of long-term drought stress on leaf gas exchange and fluorescence parameters in C_3 and C_4 Plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29, 103-113.
21. Iturbe-ormaeche, I., Escuredo, P.R., Arrese-Igor, C. & Becana, M. (1998). Oxidative damage in pea plant exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology*, 116, 173-181.
22. Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L. & Benavides, M. P. (2005). Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science*, 169, 323-330.
23. Lawlor, D. W. & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plant. *Plant Cell and Environment*, 25, 275-294.
24. Le Dily, F., Billard, J. P., Le Saos, J. & Huault, C. (1993). Effects of NaCl and gabaculine on chlorophyll and proline levels during growth of radish cotyledons. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31, 303-310.
25. Lichtenthaler, H. K. & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*.
26. Liu, F., Jensen, C. R. & Andersen, M. N. (2004). Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. *Field Crops Research*, 86(1), 1-13.
27. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*, 7(9), 405-410.
28. Moller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annual Review. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 52, 561-591.
29. Noctor, G. & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
30. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry*, 95, 351-358.
31. Pereria, J. S. & Chaves, M. M. (1995). Plant responses to drought under climate change in Mediterranean-type ecosystems. In: Moreno, J.M., Oechel, W.C. (Eds), *Global change and Mediterranean-type Ecosystems, Ecology Studies*, vol, 117. Springer-Verlag, Berlin, PP, 140-160.
32. Plewa, M. J., Smith, S. R., & Wagner, E. D. (1991). Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 247(1), 57-64.
33. Rabiei, V. (2003). *Evaluation of physiological and morphological responses of some grape varieties under drought stress*. Ph. D. thesis. Faculty of Horticulturae University, Tehran.
34. Ranieri, A., Castagna, J., Pacini, B., Baldan, A. & Mensuali Sodi, G. F. (2003). Soldatini Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflowers plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany*, 54, 2529-2540.

35. Rubio, M. C., González, E. M., Minchin, F. R., Webb, K. J., Arrese-Igor, C., Ramos, J. & Becana, M. (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum*, 115(4), 531-540.
36. Sairam, R. K., Chandrasekhar, V. & Srivastava, G. C. (2001). Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their responses to water stress. *Biologia Plantarum*, 44(1), 89-94.
37. Scandalalius, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 101, 7-12.
38. Shulaev, V. & Oliver, D. J. (2006). Metabolic and proteomic markers for oxidative stress, new tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiology*, 141, 367-372.
39. Sircelj, H., Tausz, M., Grill, D. & Batic, F. (2007). Detecting different levels of drought stress in apple (*Malus domestica* brkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Scientia Horticulturae*, 113, 362-369.
40. Souse, T. A., Oliveira, M. T. & Pereira, J. M. (2006). Physiological indicators of plant water status of irrigated and non- irrigated grapevines grown in a low rainfall area of Portugal. *Plant and Soil*, 282, 127-134.
41. Stewart, R. C. & Beweley, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, 65, 245-248.
42. Sundhacar, C., Lakshmi, A. & Giridarakumar, S. (2001). Changes in the Antioxidant Enzyme Efficacy in two High Yielding Genotypes of Mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl Salinity. *Plant Science*, 161, 613-619.
43. Talaie, A. R., Ghaderi, N., Ebadi, A. & Lesani, H. (2009). Biochemical responses of two varieties of seedless white grapes Sahany and changes in soil water potential. *Acta Horticulturae*, 42(3), 301-308.
44. Tiaz, L. & Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology*. 2nd ed. Sinauer Associates Inc., Massachusetts.
45. Turner, N. C. (1981). Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil*, 58(1-3), 339-366.
46. Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. & Tan, R. X. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Biology and Chemistry*, 15, 351-358.
47. Xi, Z. M., Fang, Y. L., Guo, Y. Z. & Zhang, Z. W. (2007). The effect of water stress on main physiological indexes of wine grape leaf [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 3, 030.
48. Yanbao, L., Chunying, Y. & Chunyang, L. (2006). Differences in some morphological, physiological and biochemical responses to drought stress in two contrasting population of populus przewalskii. *Physiologia Plantarum*, 127, 182-191.