

بررسی پاسخ‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در سه ژنوتیپ *Lolium perenne* تحت تنش خشکی

فرزانه ترکش اصفهانی^۱، لیلا شبانی^{۲*}، محمد رضا سبزلعلیان^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۴

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تنش خشکی بر پاسخ‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان در ۳ ژنوتیپ از گیاه چچم بود که در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط مزرعه‌ای انجام شد. تنش خشکی RWC، وزن تر، وزن خشک، محتوای کلروفیل *a* کلروفیل *b* و کاروتنوئید را کاهش داد؛ در حالی که، غلظت H_2O_2 و محتوای پرولین افزایش یافت. همچنین در مقایسه با شاهد، فعالیت آنزیم‌های CAT، GPX، APX و SOD به علت تنش خشکی افزایش یافت. باتوجه به نتایج به دست آمده (شامل کاهش اندک محتوای نسبی آب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش میزان پرولین در ژنوتیپ اول)، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً این ژنوتیپ در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر نسبت به تنش خشکی دارای مقاومت بیشتری است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پراکسید هیدروژن، پرولین، چچم، خشکی

مقدمه

گیاهان به طور دائم در معرض تغییرات محیطی هستند و هنگامی که این تغییرات سریع و افراطی باشند، سبب تنش می‌شوند (Mahajan & Tuteja, 2005). در بین تنش‌های غیرزیستی، تنش کم‌آبی (خشکی) شدیدترین، مخرب‌ترین و با اهمیت‌ترین عامل محیطی محدودکننده تولید محصولات زراعی در مناطق نیمه خشک است (Jaleel et al., 2007). بیش از ۴۵ درصد از زمین‌های کشاورزی به طور دائم در معرض خشکی قرار دارند و ۳۸ درصد جمعیت دنیا در آن مکان‌ها ساکن هستند. لذا در آینده، بیشترین تلاش‌ها در جهت تولید بیشتر محصول در شرایط کم‌آبی خواهد بود. تنش خشکی دارای سطوح متفاوتی است و بر بخش‌های مختلف گیاهان اثر می‌گذارد. یکی از اثرات تنش خشکی، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و ایجاد تنش اکسیداتیو است (Lisar et al., 2012). القای تنش اکسیداتیو در گیاهان منجر به افزایش انباشته شدن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به خصوص H_2O_2 و O_2^- در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی زوم می‌شود (Abedi & Pakniyat, 2010). این رادیکال‌های آزاد اکسیژن مسئول ایجاد اکثر آسیب‌های اکسیداتیو در سیستم‌های بیولوژیکی می‌باشند که شامل شکسته شدن DNA، اکسیداسیون

۱- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۲- گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

* نویسنده مسئول: (Ishabani@gmail.com)

۳- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم دانشگاه شهرکرد است که با راهنمایی دکتر لیلا شبانی و دکتر محمد رضا سبزلعلیان انجام شده است.

آمینواسید و پروتئین و همچنین پراکسیداسیون لیپید هستند (Asada, 2006). در اثر این آسیب‌ها، پتانسیل کل آب و تورژسانس، کاهش و غلظت مواد حل‌شونده در سیتوزول سلول‌ها افزایش می‌یابد. همچنین توسعه سلول‌ها و به دنبال آن رشد و باروری گیاهان کاهش می‌یابد و در ادامه، سبب تجمع اسید آسبیزیک و افزایش اسمولیت‌هایی مانند پرولین می‌شود. پرولین به عنوان ترکیب اسمزی سازگار پیشنهاد شده است، به این علت که پتانسیل اسمزی را در سیتوپلاسم تعدیل می‌کند. از طرفی، تنش خشکی فقط بر میزان فشار تورژسانس اثر ندارد، بلکه منجر به بسته شدن روزنه‌ها برای کاهش تعرق نیز می‌شود؛ در نتیجه، باعث کاهش فتوسنتز و شاخص‌های رشد می‌گردد (Lisar et al., 2012). به منظور کاهش آسیب‌های اکسیداتیو وارده در اثر تولید و تجمع گونه‌های فعال، سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی در گیاهان تعبیه شده است که در کنترل سطح ROS، هم در شرایط طبیعی و هم در شرایط تنش‌زای محیطی نقش دارند (Anderson et al., 1995). سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیدازهایی مانند آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) هستند (Blokhina et al., 2003) در تحقیقی گیاهچه‌های مقاوم به خشکی *Phaseolus acutifolius* فعالیت بالاتر آنزیم کاتالاز و میزان MDA (شاخص پراکسیداسیون لیپید) کمتری را نسبت به گیاهچه‌های حساس به خشکی نشان دادند (Türkan et al., 2005). Sharma و Dubey (2005) و Zhu و همکاران (2009) نشان دادند که فعالیت آنزیم APX در برنج، تحت تنش خشکی ملایم، افزایش اما تحت تنش خشکی شدید، کاهش یافت. Abedi و Pakniyat نیز در سال (2010) نشان دادند که فعالیت آنزیم SOD به طور قابل توجهی در دانه‌رست‌های تحت تنش آبی افزایش یافت. Farfan-Vignolo و Asard (2012) گزارش دادند که تنش خشکی در گیاه مدل چمنزار یعنی *Lolium perenne* باعث ممانعت شدید در بیوماس و فتوسنتز گیاه شد و آسیب اکسیداتیوی قوی را ایجاد کرد. Hu و همکاران (2010) نشان دادند که تنش شوری (۲۵۰ میلی مولار نمک)، میزان پراکسیداسیون لیپید، نشت الکتریکی و محتوای پراکسید هیدروژن را در گیاهچه های *L. perenne* افزایش داد؛ به علاوه، برگ‌های گیاهان تحت تنش، فعالیت بالاتری از آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در مقایسه با گیاهان شاهد داشتند. در تحقیقی Luo و همکاران (2011)، پاسخ‌های فیزیولوژیکی چمن دائمی را تحت تنش کادمیوم مورد مطالعه قرار دادند. چمن دائمی به مدت ۷ روز در گلخانه در معرض سطوح متفاوتی از غلظت کادمیوم قرار گرفت. در چمن تیمار شده، مقدار مالون دی‌آلدئید، فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)، کاتالاز و سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) نسبت به شاهد افزایش یافت و تنش Cd منجر به القاء بیان رونوشت آنزیم‌های FeSOD، MnSOD و POD شد.

گیاه چچم چند ساله از خانواده پوآسه، یکی از اقتصادی‌ترین و مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که برای حیوانات شیری و گوشتی مورد کشت و کار است (Wilkins & Humphreys, 2003). همیشه سبز بودن این گیاه باعث شده است که بتوان از آن، علاوه بر مصارف علوفه‌ای، به طور وسیعی برای احداث چراگاه استفاده کرد. همچنین، کشت این گیاه به منظور تهیه سوخت سبز

از کاربردهای دیگر آن است. با توجه به کاربردهای گسترده این گیاه، کشورهای همچون آمریکا، نیوزیلند، دانمارک و استرالیا از این گیاه برای تولید علوفه و بذر استفاده می‌کنند.

تاکنون تحقیقات زیادی در زمینه تاثیر تنش خشکی بر گیاهان مختلف صورت گرفته است؛ ولی، با توجه به اهمیت تنش کم آبی در کشور ایران و کاربردهای متنوع گیاهان علفی، لزوم بررسی اثرات تنش خشکی بر این گیاهان آشکار است. به همین علت، در این پژوهش تغییرات ایجاد شده روی برخی شاخص‌های مهم فیزیولوژیک در سه ژنوتیپ *L. perenne* در پاسخ به تنش خشکی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

این پژوهش در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی واقع در دانشگاه صنعتی اصفهان (چاه اناری) با موقعیت جغرافیای ۳۲ درجه شمالی و ۵۱ درجه شرقی اجرا گردید. در این منطقه، متوسط بارندگی سالیانه ۱۲۲/۸ میلی‌متر مکعب و دامنه متوسط تغییرات دمای مطلق سالیانه از ۹/۱ تا ۲۳/۴ درجه متغیر است؛ بنابراین، اقلیم منطقه فراخشک و سرد است. تعداد ۳ ژنوتیپ چچم چند ساله (که از جنگل ابر مازندران جمع‌آوری شده بودند) در قالب طرح کامل تصادفی و با ۳ تکرار در مهرماه سال ۱۳۹۳ در مزرعه چاه اناری و در دو محیط مجزا کشت گردیدند. جهت اجرای آزمایش، ابتدا آماده‌سازی زمین شامل شخم، دیسک، تسطیح و کوددهی انجام شد. در این آزمایش، در هر کرت هر توده از هر ژنوتیپ به صورت کپه‌ای (سه کپه) کشت گردید. فواصل بین کپه‌ها ۵۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. آبیاری ۳ بار در هفته انجام شد و به مدت یک ماه هفته‌ای یک بار، به منظور رشد رویشی مناسب، ۲۰۰ گرم کود اوره در هر کرت به گیاهان اضافه گردید. پس از ظاهر شدن علائم رشد رویشی مناسب، از اواسط مردادماه آبیاری محیط تیمار تنش خشکی قطع شد و تنش روی گیاهان اعمال گردید. درصد رطوبت خاک دو محیط به کمک دستگاه TDR هفته‌ای یک بار اندازه‌گیری شد. پس از رسیدن رطوبت خاک به ۱۶ درصد در شرایط تنش و ۲۳ درصد در شرایط شاهد، آبیاری مجدد انجام گردید (Kumar *et al.*, 2008). این نحوه آبیاری تا قبل از برداشت نمونه، به مدت ۲ ماه اعمال شد. پس از یک ماه از اعمال تنش، گیاهان کنترل و تیمار جمع‌آوری گردیدند.

اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک گیاه

به‌منظور اندازه‌گیری وزن تر، ابتدا نمونه‌ها با آب مقطر شسته شده و رطوبت اضافی آن با کاغذ صافی گرفته شد. وزن تر اندام هوایی گیاهان بر حسب گرم اندازه‌گیری شد. برای محاسبه وزن خشک هر یک از نمونه‌ها، بعد از قرار گرفتن در پاکت‌های کاغذی، به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس بر حسب گرم توزین گردیدند.

سنجش محتوای نسبی آب (RWC)

برای اندازه‌گیری این شاخص، هر گیاه به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. از هر گیاه دو برگ تهیه و از هر برگ ۳ دیسک با قطر ۱ سانتی‌متر تهیه شد و با ترازو وزن گردید (FW). سپس دیسک‌ها در ظروف حاوی آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور گردیدند. دیسک‌ها پس از این مدت از ظروف خارج شده و با استفاده از کاغذ صافی خشک و دوباره وزن گردیدند تا وزن حالت تورژسانس کامل (TW) به دست آید. برای محاسبه وزن خشک (DW)، دیسک‌ها درون فویل آلومینیوم پیچیده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوباتور قرار داده شدند و سپس وزن گردیدند. محتوای نسبی آب برگ، از رابطه زیر محاسبه شد (Weatherley, 1950).

$$RWC (\%) = [(FW-DW)/(TW-DW)] \times 100$$

سنجش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید

کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای برگ با هموژنیزه کردن ۱۰۰ میلی‌گرم از وزن تر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ استخراج شدند. پس از سانتریفوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm، محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در روش‌ها مطابق روش Arnon (1949) و Lichtenthaler (1987) محاسبه گردید.

سنجش میزان H₂O₂

برای اندازه‌گیری H₂O₂ از روش Alexieva و همکاران (2001) استفاده شد. برای عصاره‌گیری، ۰/۰۵ گرم بافت تازه گیاه در هاون سرد شده با ۱/۵ میلی‌لیتر TCA (تری کلرو استیک اسید) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از استانداردها و عصاره‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۱ میلی‌لیتر محلول KI ۱ مولار ترکیب شد و در ۳۹۰ نانومتر خوانش گردید. از محلول پراکسید هیدروژن (سیگما) به عنوان استاندارد استفاده گردید.

عصاره‌گیری بافت برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

برای عصاره‌گیری، ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ گیاهچه‌های شاهد و تحت تیمار پس از توزین درون هاون چینی از پیش سرد شده قرار داده شدند و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول بافر عصاره‌گیری سالین فسفات با pH = ۷/۸ به تدریج به آن افزوده گردید. ضمن افزودن این حجم از محلول، بافت‌ها سائیده شدند. عصاره‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش توصیف شده توسط Aebi (1984) تعیین گردید. عصاره حاوی آنزیم به محلول واکنش حاوی ۱۰mM پراکسید هیدروژن در بافر سدیم فسفات اضافه شد. فعالیت آنزیم با بررسی کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با استفاده از ضریب جذب ۰/۰۳۹ میلی مول بر سانتی متر برای پراکسید هیدروژن اندازه گیری گردید. یک واحد فعالیت آنزیم کاتالاز سرعت مصرف یک میکرومول در دقیقه پراکسید هیدروژن در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد را بیان می کند.

سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

سنجش فعالیت این آنزیم به روش Beyer و Fridovich (1987) صورت گرفت. یک میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷/۸)، متیونین (۹/۹ میلی مولار)، تریتون X-100 (۰/۰۲۵ درصد)، نیتروبلوتترازولیوم (۷۵ میکرومولار) و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیم به همراه ۱۰ میکرولیتر ریبوفلاوین (۰/۰۰۴ درصد) در لوله آزمایش ریخته شد. مخلوط حاصل به مدت ۷ دقیقه در یک محفظه دارای دو لامپ فلورسنت ۲۰ وات قرار داده شد. افزایش در جذب به واسطه تشکیل فورمازان در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانش شد. طبق شرایط توصیف شده، افزایش در جذب در نمونه بدون عصاره آنزیمی معادل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و فعالیت آنزیم با تعیین درصد ممانعت در دقیقه محاسبه گردید. ۵۰ درصد ممانعت معادل با ۱ واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

مخلوط واکنش برای اندازه گیری آنزیم گایاکول پراکسیداز، مطابق با روش Lin و Kao (1999)، شامل ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۷، ۳/۳۵ میکرولیتر گایاکول ۹ میلی مولار و ۴/۵۱ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۹ میلی مولار بود که با ۵۰ میکرولیتر نمونه در لوله آزمایش مخلوط شد. سینتیک جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول ۱ دقیقه اندازه گیری شد. ضریب خاموشی، ۲۶/۶ میلی مول بر سانتی متر در نظر گرفته شد. یک واحد فعالیت آنزیم گایاکول-پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیمی که باعث تشکیل ۱ میکرومولار تتراگایاکول در دقیقه می شود تعریف شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano و Asada (1987) تعیین گردید. مخلوط واکنش حاوی ۵۰ میلی مولار بافر فسفات سدیم، ۰/۵ میلی مولار آسکوربیک اسید، ۲۵۰ میلی مولار H_2O_2 و ۵۰ میلی لیتر عصاره آنزیمی بود. اکسیداسیون آسکوربیک اسید به صورت کاهش در جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانش گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب جذب ۲/۸ میلی مول بر سانتی متر برای آسکوربیک اسید محاسبه گردید. یک واحد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، سرعت مصرف یک میکرومول در دقیقه آسکوربیک اسید در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد را بیان می کند.

سنجش میزان پرولین

اندازه‌گیری میزان پرولین به روش Troll و Lindsley (1955) انجام شد. در ابتدا ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاه در هاون سرد شده با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سائیده شد. پس از قرار گرفتن عصاره حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت، به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ g سانتریفوژ شد. ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۴۷۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر مخلوط واکنش (۱۵ میلی‌لیتر استیک‌اسید، ۵ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درصد، ۰/۲۵ گرم نین‌هیدرین و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر که دور از نور نگهداری شد بود) رقیق گردید و از این محلول برای سنجش میزان پرولین استفاده شد. برای تهیه منحنی استاندارد پرولین، غلظت‌های ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ میلی‌مولار از پرولین تهیه و همانند عصاره‌ها رقیق شدند. سپس عصاره‌ها و استانداردها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ، عصاره‌ها و استانداردها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. سپس جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید.

آنالیزهای آماری

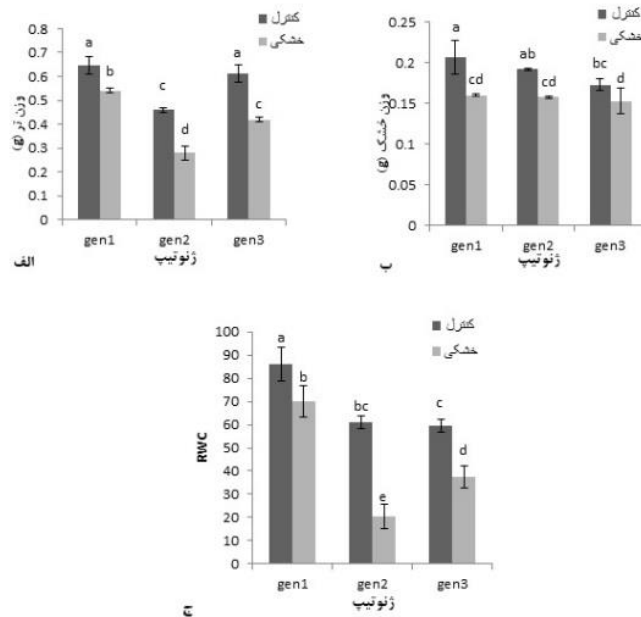
آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار در هر کدام از محیط‌های تنش خشکی و بدون تنش خشکی اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو سطح خشکی به عنوان فاکتور اصلی و سه سطح ژنوتیپ به عنوان فاکتور فرعی (در هر محیط) بود. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) ($p < 0/05$) مشخص شد. نمودارها با نرم‌افزار اکسل رسم گردید.

نتایج و بحث

تیمار خشکی بر میزان شاخص‌های وزن تر و وزن خشک اندام هوایی و شاخص RWC در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود. تیمار خشکی سبب کاهش میزان وزن تر، وزن خشک و محتوای نسبی آب به ترتیب به میزان ۲۷/۸۲ درصد، ۱۷/۵۷ درصد و ۳۵ درصد در مقایسه با شاهد شد. تاثیر ژنوتیپ نیز بر میزان وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی و شاخص RWC در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود. تاثیر ژنوتیپ‌های مختلف لولیم (بدون در نظر گرفتن تنش خشکی) بر شاخص‌های رشد و محتوای نسبی آب معنی‌دار بود. شاخص وزن تر اندام هوایی در ژنوتیپ ۱ به ترتیب ۶۰/۵۸ درصد و ۱۴/۹ درصد در مقایسه با ژنوتیپ ۲ و ۳ افزایش نشان داد. ژنوتیپ‌های متفاوت گیاه نیز سبب ایجاد تفاوتی معنی‌دار در وزن خشک اندام هوایی شد و این تفاوت به صورت ۱۲/۵ درصد افزایش وزن در ژنوتیپ ۱ نسبت به ژنوتیپ ۳ بود. محتوای نسبی آب برگ‌ها نیز در ژنوتیپ اول نسبت به دو ژنوتیپ ۲ و ۳ به ترتیب ۹۹ درصد و ۶۷/۵۳ درصد افزایش داشت. بنابراین بیشترین میزان وزن تر اندام هوایی،

وزن خشک اندام هوایی، نسبت وزن تر به وزن خشک و محتوای نسبی آب در ژنوتیپ اول مشاهده شد. نتایج نشان داد که زیست توده اندام هوایی و RWC در تمام ژنوتیپ‌ها به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) تحت تنش خشکی در مقایسه با شاهد کاهش یافت (شکل ۱). اگر چه کاهش میزان RWC در گیاهان تحت تنش خشکی در ژنوتیپ ۲ در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر مشهودتر بود. تنش خشکی یکی از عوامل محیطی اصلی است که رشد گیاه را محدود می‌کند و باعث کاهش شاخص‌های رشد می‌شود (Filippou et al., 2011). طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش، در تمام ژنوتیپ‌های چچم چندساله گیاهچه‌های تحت تیمار خشکی کاهش معنی‌داری را در شاخص وزن تر و محتوای نسبی آب در مقایسه با شاهد نشان دادند. کاهش شاخص‌های رشد ممکن است به دلیل القای تنش اکسیداتیو در گیاهان تحت تنش باشد که منجر به افزایش انباشته‌شدن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به خصوص H_2O_2 و O_2^- در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم می‌شود (Abedi & Pakniyat, 2010). این رادیکال‌های آزاد اکسیژن مسئول اکثر آسیب‌های اکسیداتیو در سیستم‌های بیولوژیکی هستند که شامل شکسته شدن DNA، اکسیداسیون آمینواسید و پروتئین و پراکسیداسیون لیپید است (Asada, 2006). به دنبال آسیب‌های اکسیداتیو اختلالاتی در متابولیسم سلول نیز رخ می‌دهد؛ به عنوان مثال، فقدان هماهنگی بین فرآیندهای تولید انرژی (منبع) و مصرف انرژی (مخزن) در طی فتوسنتز و همچنین اختلالاتی در فرآیندهای مهم تنفس، که منجر به کاهش رشد می‌شود (Reddy et al., 2004). همچنین کاهش شاخص‌های رشد ممکن است به دلیل مهار رشد سلول به علت فشار پایین تورژسانس و پیری بیشتر برگ تحت شرایط تنش خشکی باشد (Sayyari et al., 2013).

برخی مطالعات گذشته نیز کاهش شاخص‌های رشد تحت تنش را در گیاهان مختلف نظیر کاهو (Sayyari et al., 2013)، نخود (Khodadadi, 2013)، ۶ جمعیت *Achillea tinctoria* (Shanjani et al., 2014) و ارقام انجیر (Davarynejad, 2013) گزارش کرده‌اند. اعمال تیمار خشکی در هر سه ژنوتیپ چچم منجر به کاهش محتوای نسبی آب گردید. با این حال ژنوتیپ ۱ نسبت به دو ژنوتیپ دیگر میزان کمتری آب از دست داد و از محتوای نسبی آب بالاتری برخوردار بود؛ در مقابل، ژنوتیپ ۲ بیشترین کاهش در RWC را نشان داد. بنابراین می‌توان گفت ژنوتیپ ۱ مقاومت بیشتری در از دست دادن آب یا حفظ آب تحت تیمار خشکی از خود نشان داده‌است.

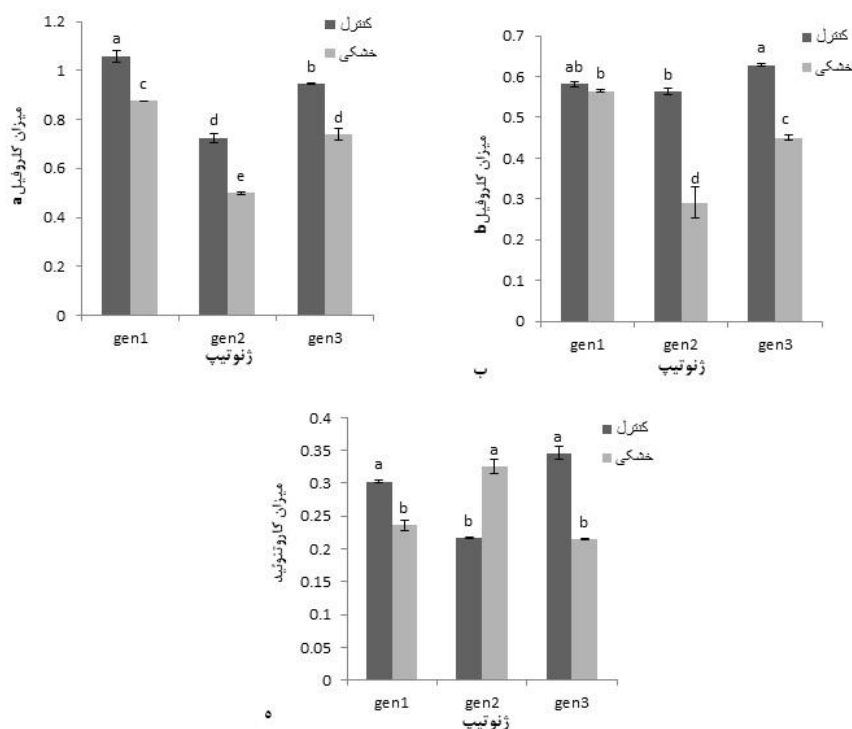


شکل ۱: تاثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان وزن تر (الف)، وزن خشک (ب) و محتوای نسبی آب (ج) در سه ژنوتیپ از چچم چندساله. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار میانگین در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است. تیمار خشکی بر میزان شاخص‌های کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود. تیمار خشکی سبب کاهش میزان کلروفیل a و b به ترتیب به میزان ۲۲/۵۵ درصد و ۲۶/۷۲ درصد در مقایسه با شاهد شد؛ در حالی که، خشکی به تنهایی بر میزان کاروتنوئیدها تاثیر معنی‌داری نداشته است. تاثیر ژنوتیپ‌های مختلف لولیم (بدون در نظر گرفتن تنش خشکی) بر میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها معنی دار بود. شاخص کلروفیل a در ژنوتیپ ۱ به ترتیب ۵۷/۷۵ درصد و ۱۴/۶۷ درصد در مقایسه با ژنوتیپ ۲ و ۳ افزایش نشان داده است. ژنوتیپ‌های متفاوت گیاه نیز سبب ایجاد تفاوتی معنی‌دار در میزان کلروفیل b شد و این تفاوت به صورت ۳۴/۱۰ درصد افزایش، در ژنوتیپ ۱ نسبت به ژنوتیپ ۲ بود (ژنوتیپ ۱ و ۳ تفاوت معنی داری نداشتند). ژنوتیپ گیاه به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر میزان کاروتنوئیدها نداشته است. بنابراین کمترین میزان کلروفیل a و کلروفیل b در ژنوتیپ دوم مشاهده شد. میزان کلروفیل a در ژنوتیپ ۲ بطور معنی‌داری ($P < 0.05$) تحت تنش خشکی در مقایسه با شاهد افزایش یافت (شکل ۲)؛ در حالی که، این شاخص تحت تنش خشکی در ژنوتیپ ۳ کاهش نشان داد و هیچ تاثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل a در ژنوتیپ ۱ نداشت. اگرچه تنش خشکی میزان کلروفیل b را در ژنوتیپ دوم افزایش داد ولی هیچ تاثیر معنی‌داری بر مقدار آن در دو ژنوتیپ دیگر نشان نداد. به طور مشابه، تحت تنش خشکی میزان کاروتنوئید در ژنوتیپ ۲ افزایش یافت؛ اگرچه، در ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ در مقایسه با شاهد میزان آن کاهش نشان داد (شکل ۲). با توجه به این که تغییرات در میزان کلروفیل و کاروتنوئید و نسبت رنگیزه‌ها شاخص‌های مهم تنش محیطی هستند، می‌توان تحمل گونه‌ها به تنش را با ارزیابی میزان رنگیزه‌ها توصیف کرد. یکی از نشانه‌های رایج تنش اکسیداتیو، کاهش محتوای رنگیزه‌ها است (Smirnoff, 1993).

طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش، در تمام ژنوتیپ‌های چچم گیاهچه‌های تحت تیمار خشکی کاهش معنی‌داری را در میزان کلروفیل a نشان دادند. میزان کلروفیل b در ژنوتیپ ۲ و ۳ در مقایسه با شاهد کاهش یافت؛ در حالی که، در ژنوتیپ ۱ از نظر آماری تغییر معنی‌داری نداشته است. کاهش محتوای کلروفیل در چچم چندساله تحت تیمار خشکی پاسخی به شرایط تنش است که ممکن است به علت ناپایداری کمپلکس‌های پروتئینی و تخریب کلروفیل توسط افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده کلروفیل و کلروفیلاز باشد (Sayyari et al., 2013). همچنین تنش خشکی باعث ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن شده است که با آسیب‌رسانی به فتوسیستم‌ها و تخریب غشای کلروپلاست، منجر به کاهش مقادیر کلروفیل می‌شوند (Herbinger et al., 2002). دلیل دیگری که می‌تواند سبب کاهش کلروفیل در تنش خشکی شود این است که کلروفیل و پرولین هر دو از پیش‌ماده آمینواسید گلوتامات ساخته می‌شوند؛ بنابراین می‌توان گفت که، افزایش سنتز پرولین در طی تنش‌ها می‌تواند منجر به کاهش سنتز کلروفیل شود (Rabiei, 2003). با توجه به نتایج، تنش خشکی بر روی کلروفیل a تاثیرگذارتر بوده است.

نتایج بدست آمده در این تحقیق، با پژوهش‌های انجام شده بر روی پنبه و *Catharanthus roseus* (Massacci et al., 2008)، برنج (Jnandabhiram & Prasad, 2012)، انجیر (Davarynejad, 2013)، گوجه فرنگی (Rezaei et al., 2012) و کاهو (Sayyari et al., 2013) تحت تیمار خشکی مطابقت داشته است. Farfan-Vignolo و Asard (2012) گزارش دادند که تنش خشکی در گیاه مدل چمنزار یعنی *L. perenne* باعث ممانعت شدید در بیوماس و فتوسنتز گیاه و آسیب اکسیداتیوی قوی می‌شود.

طبق نتایج بدست آمده، میزان کاروتنوئید در ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ چچم در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد که احتمالاً به دلیل فرونشانی غیرفتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته است که توسط کاروتنوئیدها انجام گرفته است و در نتیجه به برهم زدن ساختار آن‌ها منجر می‌گردد (Di Toppi & Gabbrielli, 1999). در مقابل، میزان کاروتنوئید در ژنوتیپ ۲ در مقایسه با شاهد افزایش داشته است که نیاز بیشتر حفاظت نوری را به وسیله کاروتنوئیدها نشان می‌دهد (Elsheery & Cao, 2008; Liu et al., 2011).

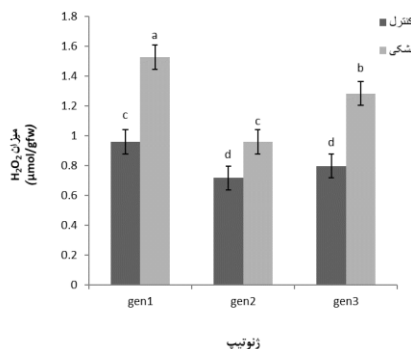


شکل ۲: تأثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر) (الف)، کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر) (ب) و کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر) (ج) در سه ژنوتیپ از چچم چندساله. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار میانگین در سطح 0.05 آزمون LSD است.

تأثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان H_2O_2 در سطح 0.05 معنی دار بود. تیمار خشکی سبب افزایش H_2O_2 به میزان $52/26$ درصد در مقایسه با شاهد شد. ژنوتیپ‌های متفاوت گیاه سبب ایجاد تفاوت معنی دار در میزان H_2O_2 شد؛ طوری که، این شاخص در ژنوتیپ ۱ به ترتیب $48/20$ درصد و $19/42$ درصد در مقایسه با ژنوتیپ ۲ و ۳ افزایش نشان داده است. همچنین نتایج نشان داد که تحت تیمار خشکی، میزان H_2O_2 در هر سه ژنوتیپ در مقایسه با شاهد افزایش معنی دار ($P < 0.05$) داشته است (شکل ۳). در این تحقیق میزان H_2O_2 در هر سه ژنوتیپ تحت تیمار خشکی در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد که ممکن است، به دلیل کاهش فعالیت فتوسیستم II (PSII)، منجر به عدم تعادل بین تولید و مصرف الکترون‌ها شود.

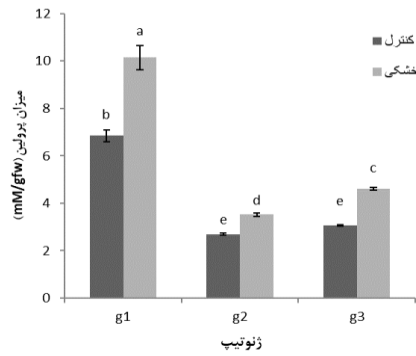
این تغییرات در فتوشیمی کلروپلاست‌های برگ‌های تحت تنش، منجر به اتلاف انرژی نوری زیادی در مرکز و آنتن‌های فتوسیستم II می‌گردد؛ بنابراین، گونه‌های فعال اکسیژن (OH , H_2O_2 , O_2^-) تولید می‌شوند (Peltzer et al., 2002). همچنین واکنش‌های فتوشیمیایی وابسته به فتوسیستم II نسبت به خشکی حساس‌ترند. از دست دادن یا کاهش پروتئین‌های D1 و D2 در فتوسیستم II باعث از بین رفتن فتوسیستم II می‌شود. بنابراین در طی خشکی، پتانسیل قابل توجهی برای افزایش انباشته شدن سوپراکسید و پراکسید هیدروژن، که از افزایش میزان احیای نوری O_2 در کلروپلاست‌ها حاصل می‌شوند، وجود دارد (Robinson & Bunce, 2000). از سوی دیگر، ممکن است فعالیت بالای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز باعث افزایش تولید H_2O_2 شود. نتایج این تحقیق با مطالعات دیگری که افزایش H_2O_2 را در پاسخ به تنش خشکی گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد.

این مطالعات روی برگ‌های گندم (Luna *et al.*, 2005) و بادام وحشی (Sorkheh *et al.*, 2011) انجام گرفته است. همچنین Hu و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که تنش شوری (۲۵۰ میلی مولار نمک) میزان پراکسیداسیون لیپید، نشت الکتریکی و محتوای پراکسید هیدروژن را در گیاهچه های *L. perenne* در مقایسه با شاهد افزایش داده است.



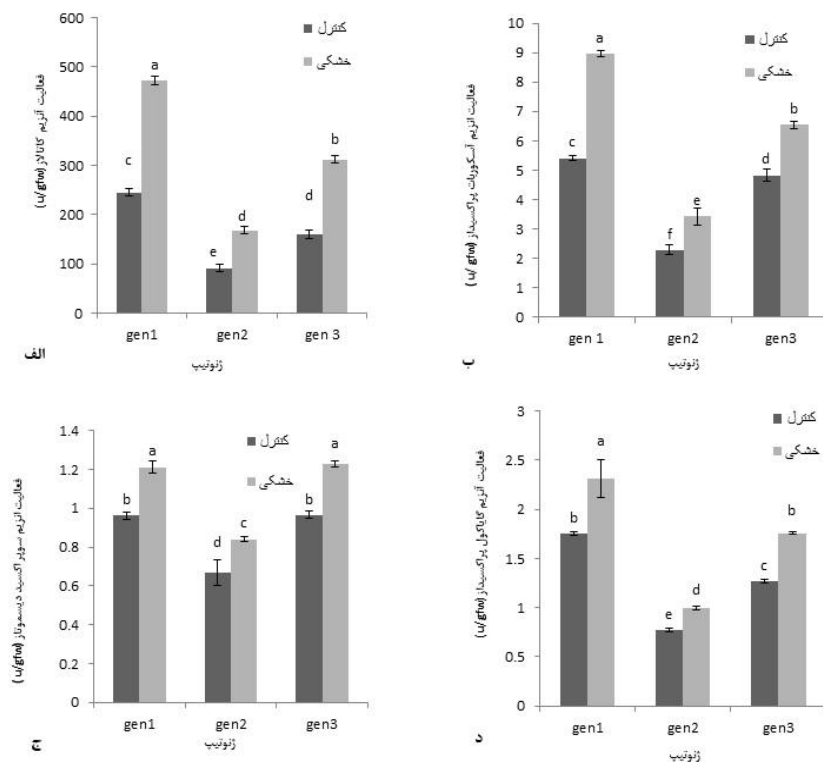
شکل ۳: تاثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان پراکسید هیدروژن (H₂O₂) در سه ژنوتیپ از چچم چندساله. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار میانگین در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است.

تاثیر تیمار خشکی، ژنوتیپ و اثر متقابل تیمار خشکی × ژنوتیپ بر میزان پرولین در سطح ۰/۰۵ معنی دار بوده است. تیمار خشکی سبب افزایش میزان پرولین به مقدار ۴۵/۰۳ درصد در مقایسه با شاهد شد. ژنوتیپ های متفاوت گیاه سبب ایجاد تفاوت معنی دار در میزان پرولین شده است. در این شاخص، ژنوتیپ ۱ به ترتیب ۱۷۳/۲۸ درصد و ۱۲۱/۸۶ درصد در مقایسه با ژنوتیپ ۲ و ۳ افزایش نشان داد. بنابراین بیشترین میزان پرولین در ژنوتیپ ۱ مشاهده شد. میزان پرولین در تمامی ژنوتیپ‌ها تحت تیمار خشکی افزایش معنی داری ($P < 0.05$) در مقایسه با شاهد نشان داد که البته این افزایش در ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ بسیار مشهود و در مقایسه با ژنوتیپ ۲ بارزتر بود (شکل ۴). طبق نتایج به دست آمده در این تحقیق، میزان پرولین در هر سه ژنوتیپ چچم تحت تیمار خشکی افزایش معنی داری در مقایسه با شاهد نشان داد. افزایش پرولین ممکن است نتیجه افزایش پروتئولیز در شرایط تنش باشد (Alizadeh *et al.*, 2011). پرولین به پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و بافری کردن پتانسیل ردوکس سلول تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Sayyari *et al.*, 2013). از طرف دیگر، تجزیه پرولین به محض برطرف شدن تنش ممکن است عواملی را فراهم کند تا فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی و تولید ATP، برای بازیابی از شرایط تنش و ترمیم آسیب‌های القا شده از تنش، را حمایت کند. بنابراین افزایش پرولین در گیاهان تحت تنش خشکی اثرات شدید تنش را کاهش می‌دهد (Hare & Cress, 1997). برخی از مطالعات گذشته نیز افزایش پرولین تحت تنش خشکی را در گیاهان مختلف مثل گندم (Nayyar & Walia, 2003)، کاهو (Sayyari *et al.*, 2013) و نخود (Mafakheri *et al.*, 2010) گزارش کرده اند. افزایش میزان پرولین در هر سه ژنوتیپ به جلوگیری از آسیب اکسیداتیو کمک کرده است. همچنین، با توجه به این که محتوای پرولین برگ عمدتاً مقیاسی برای مقاومت به خشکی است (Kanani *et al.*, 2013)، می‌توان گفت ژنوتیپ ۱ که دارای مقادیر بالاتری از پرولین است در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر به خشکی مقاوم‌تر است.



شکل ۴: تاثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان پرولین در سه ژنوتیپ از چچم چندساله. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار میانگین در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است.

تیمار خشکی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود. تیمار خشکی سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز به ترتیب به میزان ۹۱/۸۱ درصد، ۴۸/۸۴ درصد، ۳۳/۶۳ درصد و ۲۶/۴۱ درصد در مقایسه با شاهد شد. تاثیر ژنوتیپ نیز بر میزان فعالیت تمامی شاخص‌ها در سطح ۰/۰۵ معنی دار بوده است. تاثیر ژنوتیپ‌های مختلف لولیوم (بدون در نظر گرفتن تنش خشکی) بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان معنی دار بود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ اول به ترتیب ۱۷۶/۹۶ درصد و ۵۱/۸۸ درصد در مقایسه با ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ افزایش نشان داد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز در ژنوتیپ اول نسبت به دو ژنوتیپ ۲ و ۳ به ترتیب ۱۵۳ درصد و ۲۷/۴۸ درصد افزایش داشته است. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز در ژنوتیپ اول به ترتیب ۱۲۹ درصد و ۳۴/۱۶ درصد در مقایسه با ژنوتیپ ۱ و ۳ افزایش داشته است. ژنوتیپ‌های متفاوت گیاه نیز سبب ایجاد تفاوتی معنی دار در فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز شد و این تفاوت به صورت ۴۵/۴۲ درصد افزایش فعالیت در ژنوتیپ ۱ نسبت به ژنوتیپ ۲ بود (ژنوتیپ‌های ۱ و ۳ تفاوتی با هم نداشتند). در تمام ژنوتیپ‌ها، گیاهچه‌های تحت تیمار خشکی افزایش معنی داری ($P < 0.05$) در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان دادند، که این افزایش در ژنوتیپ اول بارزتر بود. همچنین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات-پراکسیداز و آنزیم گایاکول پراکسیداز در هر سه ژنوتیپ در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری ($P < 0.05$) داشت. فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نیز در هر سه ژنوتیپ تحت تیمار خشکی در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری ($P < 0.05$) نشان داد. به طور کلی، افزایش فعالیت همه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، در ژنوتیپ ۱ مشهودتر از ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ بوده است.



شکل ۵: تاثیر تیمار خشکی و ژنوتیپ بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (الف)، آسکوربات پراکسیداز (ب)، سوپراکسید دیسموتاز (ج) و گایاکول پراکسیداز (د) در سه ژنوتیپ از چچم چندساله. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار میانگین در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است.

القای فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان

آنتی‌اکسیدان راهکاری برای سازگاری کلی گیاهان برای غلبه بر تنش‌های اکسیداتیو است. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نشان داد که تمام ژنوتیپ‌های چچم چندساله تحت تیمار خشکی، افزایش معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان دادند. این آنزیم در پراکسی‌زوم سلول‌های گیاهی حضور دارد و مهم‌ترین آنزیم برای حذف پراکسید هیدروژن است. این آنزیم سلول‌ها را از اثرات سمی پراکسید هیدروژن از طریق تجزیه آن‌ها به اکسیژن مولکولی و آب، بدون تولید رادیکال‌های آزاد حفاظت می‌کند (Arora et al., 2002). میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تیمار خشکی در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری یافته است. فعالیت بالای این آنزیم نقش آن را در سم‌زدایی H₂O₂ نشان می‌دهد (Zhou et al., 2008). همچنین این آنزیم، آسکوربیک اسید را اکسید و با تنظیم بیان ژن‌های چرخه اکسیداسیون و احیا، عوامل آنزیمی را فعال می‌کند (Ghorbanli et al., 2012).

میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در هر سه ژنوتیپ تحت تیمار خشکی در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان داده است. آنزیم گایاکول پراکسیداز در حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، درون سیستم پراکسید/فنول‌ها/آسکوربات در تنش خشکی دخالت داشته است (Sgherri et al., 2004). همچنین این آنزیم از غشای سلول در مقابل اکسیدان‌های فعال حفاظت

می‌کند و گیاهان را در کاهش اثرات تنش یاری می‌کند. فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) در هر سه ژنوتیپ چچم تحت تیمار خشکی، در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد. افزایش بیان SOD، در صورتی که با افزایش مکانیسم‌های پاک‌سازی H₂O₂ مثل فعالیت آنزیم‌های CAT و GPX همراه شود، به عنوان یک مکانیسم مهم ضد خشکی برای مقابله با تنش اکسیداتیو در طی شرایط تنش آبی به شمار می‌رود (McKersie et al., 1999). نتایج این تحقیق با مطالعات دیگری که افزایش فعالیت SOD را در پاسخ به تنش خشکی گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد. این مطالعات بر روی آفتاب‌گردان (Gunes et al., 2008)، نخود (Manivannan et al., 2007) و شیرین بیان (Pan et al., 2006) انجام گرفته است. Hu و همکاران (2012) نشان دادند که تنش شوری (۲۵۰ میلی مولار نمک) در برگ‌های گیاهچه‌های *L. perenne* موجب فعالیت بالاتری از آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در مقایسه با گیاهان شاهد می‌شود. در تحقیقی Luo و همکاران (2011) پاسخ‌های فیزیولوژیکی چمن دائمی را تحت تنش Cd مورد مطالعه قرار دادند. چمن دائمی به مدت ۷ روز در گلخانه در معرض سطوح متفاوتی از غلظت Cd قرار گرفت. در چمن تیمار شده مقدار مالون دی‌آلدئید، فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)، کاتالاز و سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) نسبت به شاهد افزایش یافت؛ به علاوه، تنش Cd منجر به القاء بیان رونوشت آنزیم‌های FeSOD، MnSOD و POD شد. بنابراین در این تحقیق افزایش همه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در هر سه ژنوتیپ چچم چندساله در مقایسه با شاهد معنی‌دار بوده است.

آنزیم کاتالاز با بالاترین فعالیت می‌تواند به عنوان شاخص مهم مقاومت به تنش باشد. این افزایش فعالیت آنزیمی نشانگر وجود یک سیستم آنتی‌اکسیدانی هماهنگ در گیاه است و مقاومت بالایی را در گیاه تحت تیمار خشکی حاصل می‌کند. به طوری که گزارش شده‌است، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحمل به خشکی ارقام توت (Reddy et al., 2004)، چای (Upadhyaya et al., 2008) و زیتون (Ahmed et al., 2009) را تقویت می‌کند. در این پژوهش، ژنوتیپ ۱ چچم چندساله بالاترین سطح عملکردی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر نشان داد. این فرآیند، با افزایش میزان پرولین و کاهش کمتر محتوای نسبی آب، وزن تر، وزن خشک و رنگیزه‌های فتوسنتزی همراه بود؛ در نتیجه، می‌توان بیان داشت که سیستم آنتی‌اکسیدانی قوی در این گیاه، مقاومت بالاتری را در برابر تیمار خشکی در مقایسه با دو ژنوتیپ دیگر به وجود آورده است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان نامه دانشجویی و با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام پذیرفته است،

که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

منابع

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121–126
- Abedi, T. and Pakniyat, H. (2010) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46(1): 27-34.
- Ahmed, C.B., Rouina, B.B., Sensoy, S., Boukhris, M. and Abdallah, F.B. (2009) Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 67(2): 345-352.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12): 1337-1344.
- Alizadeh, A., Alizade, V., Nassery, L. and Eivazi, A. (2011) Effect of drought stress on apple dwarf rootstocks. *Technical Journal of Engineering and Applied Science*, 1(3): 86-94.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K. and Stewart, C.R. (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109(4): 1247-1257.
- Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1): 1-15.
- Arora, A., Sairam, R. and Srivastava, G. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science-Bangalore*, 82(10): 1227-1238.
- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141(2): 391-396.
- Beyer, W.F. and Fridovich, I. (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2): 559-566.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2): 179-194.
- Davarynejad, G.H. (2013). Physiological and biochemical responses of four edible fig cultivars to water stress condition. *Scholarly Journal of Agricultural Science*, 3: 473-479
- Di Toppi, L.S. and Gabbrielli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41(2): 105-130.
- Elsheery, N.I. and Cao, K.F. (2008) Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(6): 769-777.
- Farfan-Vignolo E.R. and Asard, H. (2012) Effect of elevated CO₂ and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59: 55-62.
- Filippou, P., Antoniou, C. and Fotopoulos, V. (2011) Effect of drought and rewatering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(2): 270-277.
- Ghorbanli, M., Bakhshi, K.G. and Zakeri, A. (2012) Investigation on the effects of water stress on antioxidant compounds of *Linum usitatissimum* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27(4):647-658.

- Gunes, A., Pilbeam, D.J., Inal, A. and Coban, S. (2008) Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: Growth, antioxidant mechanisms, and lipid peroxidation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39(13-14): 1885-1903.
- Hare, P. and Cress, W. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21(2): 79-102.
- Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A. and Grill, D. (2002) Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6): 691-696.
- Hu, L., Li, H., Pang, H. and Fu, J. (2012) Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 169 (2): 146-156.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2007) Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60(1): 110-116.
- Jnandabhiram, C. and Sailen-Prasad, B. (2012) Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* L.) genotypes of Assam, India II. Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress. *American Journal of Plant Sciences*, 3: 971-980.
- Kanani, S.M., Kasraie, P. and Abdi, H. (2013) Effects of late season drought stress on grain yield, protein, proline and ABA of bread wheat varieties. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(11): 2943-2952.
- Khodadadi, M. (2013) Effect of drought stress on yield and water relative content in chickpea. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(6): 1168-1172.
- Kumar, A., Bernier, J., Verulkar, S., Lafitte, H.R., Atlin, G.N. (2008) Breeding for drought tolerance: Direct selection for yield, response to selection and use of drought-tolerant donors in upland and lowland-adapted populations. *Field Crops Research*, 107: 221-231.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148C: 350-382.
- Lin, C.C. and Kao, C.H. (1999) NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant and Soil*, 216(1-2): 147-153.
- Lisar, S.Y.S., Motafakkerzad, R., Hossain, M.M., Rahman, I.M.M. (2012) Water stress in plants: causes, effects and responses. Pages: 1-14 in Rahman, M. and Hasegawa, H., eds. *Water Stress InTech: Rijeka, Croatia*.
- Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, G., Zheng, Y., Yu, L. and Yang, R. (2011) Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany*, 71(2): 174-183.
- Luna, C.M., Pastori, G.M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S. and Foyer, C.H. (2005) Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 56(411): 417-423.
- Luo, H., Li, H., Zhang, X. and Fu, J. (2011) Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology*, 20:770-778.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. and Sohrabi, Y. (2010) Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 4(8):580-585

- Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444(2): 139-158.
- Manivannan, P., Jaleel, C.A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G.A. and Panneerselvam, R. (2007) Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 59(2): 141-149.
- Massacci, A., Nabiev, S., Pietrosanti, L., Nematov, S., Chernikova, T., Thor, K. and Leipner, J. (2008) Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. Plant Physiology and Biochemistry, 46(2): 189-195.
- Mckersie, B.D., Bowley, S.R. and Jones, K.S. (1999) Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. Plant Physiology, 119(3): 839-848.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant and Cell Physiology, 28(1): 131-140.
- Nayyar, H. and Walia, D. (2003) Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. Biologia Plantarum, 46(2): 275-279.
- Pan, Y., Wu, L.J. and Yu, Z.L. (2006) Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). Plant Growth Regulation, 49(2-3): 157-165.
- Peltzer, D., Dreyer, E. and Polle, A. (2002) Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. Plant Physiology and Biochemistry, 40(2): 141-150.
- Rabiei, R. (2003) Physiological and morphological reaction of some grapes varieties to drought stress. Iranian Ph.D. Thesis of Tehran University.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology, 161(11): 1189-1202.
- Rezaei, M.A., Jokar, I., Ghorbanli, M., Kaviani, B. and Kharabian-Masouleh, A. (2012) Morpho-physiological improving effects of exogenous glycine betaine on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. PS under drought stress conditions. Plant Omics, 5(2):70-86.
- Robinson, J.M. and Bunce, J.A. (2000) Influence of drought-induced water stress on soybean and spinach leaf ascorbate-dehydroascorbate level and redox status1, 2. International Journal of Plant Science, 161(2): 271-279.
- Sayyari, M., Ghavami, M., Ghanbari, F. and Kordi, S. (2013) Assessment of salicylic acid impacts on growth rate and some physiological parameters of lettuce plants under drought stress conditions. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 5(17): 1951-1957.
- Sgherri, C., Stevanovic, B. and Navari-Izzo, F. (2004) Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. Physiologia Plantarum, 122(4): 478-485.
- Shanjani, P.S., Izadpanah, M. and Mohamadpour, M.R. (2014) Effects of water stress on germination of yarrow populations (*Achillea* Spp.) from different bioclimatic zones in Iran. Plant Breeding and Seed Science, 68(1): 39-54.
- Sharma, P. and Dubey, R.S. (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Regulation, 46(3): 209-221.

- Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 52: 27-58.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Rouhi, V., Khodambashi, M. and Sofo, A. (2011) Regulation of the ascorbate-glutathione cycle in wild almond during drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1): 76-84.
- Troll, W. and Lindsley, J. (1955) A photometric method for the determination of proline. *Journal of Biological Chemistry*, 215(2): 655-660.
- Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F. and Koca, H; (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1): 223-231.
- Upadhyaya, H., Panda, S.K. and Dutta, B. K. (2008) Variation of physiological and antioxidative responses in tea cultivars subjected to elevated water stress followed by rehydration recovery. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(4): 457-468.
- Zhou, Z.S., Wang, S.J. and Yang, Z.M. (2008) Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere*, 70(8): 1500-1509.
- Zhu, Z., Liang, Z., Han, R. and Wang, X. (2009) Impact of fertilization on drought response in the medicinal herb *Bupleurum chinense* DC. growth and saikosaponin production. *Industrial Crops and Products*, 29(2): 629-633.

Survey of antioxidant defensive responses in three genotypes of *Lolium perenne* under drought stress

F.Tarkesh-Esfahani¹, L.Shabani^{2*}, M.R. Sabzalian³

Received: 2017.5.24

Accepted: 2017.10.16

Abstract

The aim of the present study was aimed to investigate the effect of drought stress on antioxidant defensive responses of three genotypes of *Lolium perenne*. This investigation was performed as factorial and a completely randomized complete design with three replications under field conditions. The results indicated that drought stress significantly decreased the relative water content (RWC), fresh and dry weight, chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid contents, while the concentration of H₂O₂ and proline increased. Also, compared to the control, the activities of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) increased due to drought stress. Regarding results of the relative water content, the activity of antioxidant enzymes and proline content, it can be concluded that genotype 1 had more tolerance to drought compared to the two other genotypes.

Keyword: Antioxidant, Drought, H₂O₂, *Lolium*, Proline.

1- Department of Plant Science, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2- Department of Plant Science, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

*(Corresponding Author: lshabani@gmail.com)

3- Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111