نشریهٔ پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۶ شمارهٔ۲، صفحهٔ ۷۲-۵۹، نیمهٔ دوم ۱۳۹۴

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 6, No. 2, 2015, p. 59-72

اثر تغذیهٔ روی بر برخی صفات فیزیولوژیک نخود (*Cicer arietinum* L.) در تنش کم‌آبی

نادر دادخواه[۱]، علی عبادی[۲]، قاسم پرمون*[۱]، عبدالقیوم قلی‌پوری[۲] و سدابه جهانبخش[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زراعت، علوم و تکنولوژی بذر دانشگاه محقق اردبیلی

۲ و۳- به‌ترتیب دانشیار و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه محقق اردبیلی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۴

چکیده

به‌منظور مطالعه تأثیر کم‌آبی و محلول‌پاشی سولفات روی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک نخود آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۲ اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح آبیاری (آبیاری در زمان کاشت؛ آبیاری در زمان کاشت و قبل از گلدهی؛ و آبیاری در زمان کاشت، قبل از گلدهی و غلاف‌دهی) و سه سطح محلول‌پاشی روی (صفر، ۳ و ۶ کیلوگرم روی در هکتار به‌صورت سولفات روی) در دو مرحله ۱۵ و ۲۵ روز پس از کاشت بود. نتایج نشان داد کم‌آبی موجب افزایش میزان پرولین، لیزین، قندهای محلول و کاهش متیونین، پروتئین و پتانسیل اسمزی شد. محلول‌پاشی با ۶ کیلوگرم در هکتار سولفات روی سبب افزایش میزان پرولین، پروتئین، قندهای محلول و پتانسیل اسمزی شد، ولی بر میزان لیزین و متیونین تأثیر معنی‌داری نداشت. نتایج نشان داد همبستگی صفات با افزایش مدت زمان بعد از اعمال تنش بیشتر می‌شود، به‌طوری‌که در ۳۳ روز بعد از تنش، تنها پرولین و در ۷۵ روز همه صفات با پتانسیل اسمزی همبستگی معنی‌دار داشتند. نتایج معادلات رگرسیونی نیز نشان داد در مراحل اولیه نمونه‌برداری میزان پرولین بیشترین سهم را در پیش‌بینی میزان پتانسیل اسمزی داشت، ولی با گذشت زمان سهم لیزین و متیونین و پروتئین‌ها در پیش‌بینی پتانسیل اسمزی افزایش پیدا کرد. به‌طور کلی می‌توان گفت تنش میزان پتانسیل اسمزی را کاهش داده و در این شرایط تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش یافت. در بین متابولیت‌های ثانویه، پرولین بیشترین حساسیت را به تنش داشت و در سطوح پایین تنش تولید آن جهت تنظیم اسمزی مناسب می‌باشد، ولی با شدت‌یافتن تنش گیاه از متابولیت‌هایی مانند لیزین و متیونین نیز جهت تنظیم اسمزی استفاده می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پرولین، قندهای محلول، لیزین، همبستگی

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) در بین حبوبات، سومین گیاه مهم است که در جنوب آسیا، خاورمیانه و شرق آفریقا به‌طور گسترده‌ای کشت می‌شود. عمده مناطق تولید نخود در نقاط خشک و نیمه خشک قرار دارند و حدود ۹۰ درصد از نخود جهان در شرایط دیم تولید می‌شود. تنش خشکی از مهم‌ترین عوامل کاهش‌دهنده عملکرد نخود به حساب می‌آید (Sabaghpour, 2004). کم‌آبی یکی از عوامل محدودکننده تولیدات گیاهان زراعی است، علت اصلی تنش آب در گیاه افزایش میزان تلفات آب یا کافی نبودن میزان جذب آب و یا ترکیبی از هر دو است که موجب افزایش تلفات آب ناشی از تعرق در مقایسه با آب جذب شده توسط ریشه‌ها می‌شود (Hajebi & Hidary Sharifabady, 2005). در چنین شرایطی گیاه به‌منظور ادامه جذب آب، از طریق تجمع ترکیبات اسمزی از جمله پرولین و کربوهیدرات‌های محلول، پتانسیل اسمزی خود را کاهش می‌دهد (Zhang *et al.,* 1999). تنظیم اسمزی یکی از مهم‌ترین مکانیزم‌های تحمل خشکی در گیاهان است و به‌واسطه کاهش پتانسیل اسمزی از طریق تجمع املاح در سلول‌های گیاه با حفظ پتانسیل آماس سلول‌ها به توسعه سلولی و رشد گیاه در شرایط تنش کمک می‌کند (Mansour *et al.,* 2005). پرولین یک مولکول آلی است که در گیاهان تحت تنش به‌عنوان محافظ ماکرومولکول‌ها (پروتئین‌ها و غشاها)، منبع انرژی و حتی ترارسان علامت در تنش عمل می‌کند (Rahnama & Ebrahimzadeh, 2004). پرولین قادر به محافظت از پروتئین‌ها و افزایش فعالیت‌های مختلف آنزیمی است و همچنین در پایداری ساختارهای غشاها و پروتئین‌ها، خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و تنظیم پتانسیل اکسید و احیایی در شرایط تنش نقش دارد (Szabados & Savoure, 2009). قندهای محلول، دسته دیگری از محافظت‌کننده‌های اسمزی هستند که در پاسخ به تنش

*نویسنده مسئول: ghasem.parmoon@gmail.com

خشکی وضعیت آنها در برگ‌ها شروع به تغییر می‌کند و این امر ممکن است به‌عنوان یک سیگنال متابولیک عمل کند (Pagter *et al.,* 2005). قندهای محلول باعث ممانعت از چسبندگی غشاهای مجاور در طول دوره تنش، نگهداری لیپیدها، پایداری پروتئین‌ها و تنظیم بیان ژن می‌شوند (Ho *et al.,* 2001). سنتز پروتئین‌ها یکی از اصلی‌ترین عوامل در رشد سلول‌ها محسوب می‌گردد. بنابراین تنش خشکی که موجب توقف سنتز پروتئین‌ها می‌گردد، باعث کاهش رشد نیز خواهد شد. تخریب پروتئین‌ها و انباشت برخی اسیدآمینه‌های آزاد در جهت حفظ و تنظیم پتانسیل اسمزی سلول و کاهش سنتز پروتئین در شرایط تنش خشکی نیز مشاهده شده است. مقدار پروتئین بافت‌های گیاه تحت شرایط خشکی یا شوری به دلیل افزایش پروتئولیز و کاهش سنتز پروتئین کاهش می‌یابد (Moran *et al.,* 1994).

متیونین نیز یکی دیگر از اسیدهای آمینه است که به‌عنوان اسید آمینه‌های ضروری غیرقطبی طبقه‌بندی و به همراه سیستئین یکی از دو اسید آمینه حاوی سولفور می‌باشد. متیونین به‌عنوان یک واسطه در بیوسنتز سیستئین، کارنتئین، تورین، لستین، فسفولیپیدها دارای نقش بوده و همچنین به‌عنوان پیش‌ساز هورمون اتیلن در تنظیم حرکات روزنه‌ای برگ مؤثر است. متیونین به‌عنوان باقی‌مانده پروتئین‌های اکسیدشده، می‌تواند توسط رایکال‌های فعال اکسیژن تولیدشده در سیستم‌های بیولوژیک تولید شود (Refsum *et al.,* 1998; Vogt, 1995). همچنین لیزین در تنظیم بازشدن روزنه‌های برگ، در تندش دانه‌های گرده و در سنتز کلروفیل کاربرد دارد که می‌تواند نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه به تنش ایفا کند (Najafy *et al.,* 2013).

عنصر روی در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی گیاه نقش کاتالیزور فعال‌کننده و یا ساختمانی دارد و در گیاه در ساخته‌شدن و تخریب پروتئین‌ها دخالت دارد. روی از عناصر کم‌مصرف ضروری است که برای رشد طبیعی و باروری گیاهان زراعی ضروری است (Brown *et al.,* 1993). Marschner (1995) بیان کرد که عنصر روی نقش بسیار مهمی در سنتز پروتئین و کربوهیدرات‌ها، اعمال متابولیکی سلول، محافظت از غشاء در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایر فرآیندهای مرتبط با سازگاری گیاهان به تنش‌ها دارد.

نتایج پژوهش‌ها نشان داد تنش خشکی و کاربرد سولفات روی سبب افزایش میزان پروتئین و عناصر غذایی در ذرت شد (Sajedi & Rjay, 2011). Thalooth *et al,* (2005) نشان دادند که محلول‌پاشی عنصر روی، اثر مثبتی بر عملکرد و اجزای عملکرد آفتابگردان داشت. Aziz zade Firozy *et al.* (2004) گزارش نمودند کاربرد روی موجب افزایش روی، آهن و پروتئین در دانه گندم گردید. Marschner (1995) گزارش کرد در اثر مصرف آهن و روی در ذرت، مقدار نشاسته و پروتئین دانه افزایش و با افزایش کربوهیدرات وزن هزاردانه، تعداد دانه و در نتیجه عملکرد دانه افزایش یافت. نتایج نشان داد تنش کمبود آب سبب افزایش غلظت پرولین و کل کربوهیدرات‌های محلول در نخود گردید، به‌گونه‌ای‌که محتوای پرولین و کل کربوهیدرات‌های محلول در سطح ۲۵درصد ظرفیت زراعی به‌ترتیب ۳۲ و ۲ برابر افزایش یافت (Samen *et al.,* 2011). با توجه به مطالب بیان شده هدف از این مطالعه بررسی نقش برخی از متابولیت‌های سازگاری در تنظیمات سلول‌های برگ نخود در شرایط تنش و نقش محلول‌پاشی روی در این تغییرات می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش مزرعه‌ای به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار و آزمایش آزمایشگاهی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سال ۱۳۹۲ در دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا گردید. فاکتور اول، به‌صورت سه سطح آبیاری (۱- آبیاری در زمان کاشت، ۲- آبیاری در زمان کاشت و قبل از گلدهی، ۳- آبیاری در زمان کاشت، قبل از گلدهی و غلاف‌دهی) و فاکتور دوم، سه سطح محلول‌پاشی روی (صفر، ۳ و ۶ کیلوگرم روی در هکتار به‌صورت سولفات روی) در دو مرحله ۱۵ و ۲۵ روز پس از کاشت، درنظر گرفته شدند.

آزمایش در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه محقق اردبیلی واقع در ۱۰کیلومتری شرق اردبیل با مختصات جغرافیایی ۳۸ درجه و ۱۵ دقیقه عرض شمالی و ۴۸ درجه و ۱۵ دقیقه طول شرقی و دارای میانگین بارندگی سالانه ۴۰۰ میلی‌متر اجرا شد. خصوصیات خاک‌شناسی منطقه طبق آزمون خاک در عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری خاک، شوری ۰/۴۱ دسی زمینس بر متر، pH خاک ۷/۶۲، درصد اشباع خاک ۵۴/۹، کربنات کلسیم معادل ۱/۲۵ درصد، کربن آلی ۲۹ درصد، نیتروژن کل ۰/۱۵۴ درصد، فسفر قابل جذب ۸/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، روی ۰/۵۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، رس ۳۷/۵ درصد، سیلت ۲۲/۵ درصد، شن ۴۰ درصد و بافت خاک لوم رسی بود. مزرعه در پاییز شخم عمیق زده شد و در بهار عملیات تکمیلی تهیه زمین شامل شخم سطحی، دیسک‌زنی و همچنین کرت‌بندی انجام شد. بذور از نوع توده محلی بیونیج، از ایستگاه تحقیقات کرمانشاه تهیه شد و با تراکم ۴۰ بوته در متر مربع کشت شد. هر کرت آزمایشی به مساحت ۸ مترمربع بود، در هرکرت ۵ ردیف نخود

با فاصله بین ردیف ۴۰ سانتی‌متر و به طول ۴ متر کشت گردید. در طول دوره رشد، کنترل علف‌های هرز چندین‌بار به‌طریق دستی انجام شد. به‌منظور مبارزه با آفت هلیوتیس، گیاهان با سم مالاتیون به نسبت دو در هزار سمپاشی شدند.

پتانسیل اسمزی براساس هدایت الکتریکی در ۷۵ روز بعد از اعمال تنش اندازه‌گیری شد. در این روش یک گرم بافت برگ را پس از له‌کردن، با آب مقطر، به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده و EC آن در دمای ۲۵°C درجه سلسیوس قرائت شد. محتوای آب یک گرم دیگر از برگ‌های نمونه هم با قراردادن نمونه‌ها در آون در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت به‌دست آمد. با استفاده از معادلات زیر پتانسیل اسمزی محاسبه گردید (Janardhan & Krishnamorthy, 1975).

$$Df^{1}=\frac{\text{وزن ماده}\times 25}{\text{مقدار آب موجود در یک گرم بافت برگی}}$$

$$OP^{2}=\frac{\text{EC (در دمای ۲۵)}\times 0.0836\times Df}{0.672}$$

میزان پرولین، لیزین، متیونین، قندهای محلول و پروتئین در سه مرحله ۳۳، ۵۵ و ۷۵ روز بعد از اعمال تنش اندازه‌گیری شد. استخراج پرولین از جوان‌ترین برگ‌ها صورت گرفت. در این روش مقدار یک گرم بافت برگی در ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳٪ ساییده و سپس با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و به ۲میلی‌لیتر از عصاره حاصل، ۲ میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید اسیتیک گلاسیال خالص اضافه گردید. لوله‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری قرار گرفته و پس از اضافه‌کردن ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هرکدام از لوله‌ها، به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس گردیدند. پس از تشکیل دو فاز جداگانه، فاز بالایی رنگی، در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد (Bates *et al.*, 1973). استخراج قندهای محلول با استفاده از روش فنل سولفوریک (Irigoyen *et al.*, 1992) صورت گرفت. در این روش ۰/۲گرم از برگ‌ها پودر شده با ۲ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات (pH=۷) ساییده و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. از محلول روشناور ۱۰ میکرولیتر برداشته و به آن ۹۹۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد. به ۰/۵میلی‌لیتر از محلول حاصل، ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵٪ (محلول آبی) و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک (۹۸٪) اضافه گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر صورت گرفت.

استخراج پروتئین کل از برگ به روش برادفورد انجام گرفت. در این روش ۰/۱ گرم برگ را با ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج، له نموده سپس نمونه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ (۱۱۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ سانتی‌گراد) به مدت ۲۱دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه در هر لوله آزمایش ۵میلی‌لیتر محلول برادفورد و ۹۹۰ میکرولیتر بافر استخراج افزوده و سپس به هرکدام۱۰میکرولیتر عصاره افزوده و بعد از به‌هم زدن میزان جذب در طول ۵۹۵ نانومتر قرائت شد (Bradford, 1976). اندازه‌گیری لیزین و متیونین با استفاده از روش Ferrel *et al,* (1969) صورت گرفت. در این روش ۰/۵گرم نمونه را در۵۰میلی‌لیتر از هیدروکلریک اسید (۰/۱نرمال) حل کرده آن را با آب به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و صاف‌کرده و سپس نیم میلی‌لیتر از آن را با گلیسرول (۵۰٪)، ۲ میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH=6) و ۱ میلی‌لیتر نین‌هیدرین حل و به مدت ۳۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و جذب لیزین درطول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری متیونین ۱۰ میلی‌لیتر از محلول فیلترشده در مرحله بالا را با ۴ میلی‌لیتر از سدیم هیدروکسید (۵ نرمال)، ۲ میلی‌لیتر از محلول گلیسین آبدار و ۲ میلی‌لیتر از محلول سدیم نیتروفری سیانید آبدار (۰/۱) مخلوط نموده و محلول حاصل به مدت۱۰دقیقه در دمای۴۰درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۵ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید (۱:۱) را به آن افزوده و بعد از صاف‌نمودن در میزان جذب در ۵۱۰ نانومتر قرائت شد.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. تجزیه رگرسیونی با استفاده از نرم افزار Minitab، همبستگی با استفاده از SPSS و رسم نمودارها با Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

براساس نتایج تجزیه واریانس، اثرات اصلی کم‌آبی بر میزان پرولین برگ‌ها در ۳۳ روز بعد از تنش دارای اثر معنی‌دار نبود، ولی بر میزان پرولین در ۵۵ و ۷۵ روز در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول۱). مقایسه میانگین‌های اثرات اصلی در مورد تنش کم‌آبی نشان داد در مرحله دوم و سوم نمونه‌برداری بیشترین میزان انباشت پرولین (به‌ترتیب ۰/۹۰۴ و ۱/۱۸۸ میکروگرم بر گرم وزن تر بافت) از یک بار آبیاری و کمترین میزان آن (به‌ترتیب با ۰/۵۹۵ و ۰/۸۳۸ میکروگرم بر گرم وزن‌تر) از سه بار آبیاری مشاهده شد (جدول ۲). همچنین کاربرد سولفات روی در ۳۳روز بعد از تنش تأثیر بر میزان

[1] Dillution factor
[2] Osmotic potential

پرولین نداشت، درحالی‌که در ۵۵ و ۷۵ روز به‌ترتیب در سطح ۱ و ۵ درصد تأثیر معنی‌دار نشان داد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد در ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش، کاربرد ۶کیلوگرم روی در هکتار باعث افزایش معنی‌دار میزان پرولین تولیدشده نسبت به سایر سطوح روی شد، به‌طوری‌که در ۵۵روز بعد از تنش میزان پرولین از ۰/۶۳۰به ۰/۸۵۱و در ۷۵روز از ۰/۸۸۲ به ۱/۰۸۱ میکروگرم بر گرم وزن‌تر رسید (جدول ۲).

نتایج دیگر پژوهش‌ها نیز تأییدکننده این مطالب می‌باشد، به‌طوری‌که در نخود و بادرنجبویه نیز به افزایش محتوای پرولین برگ برای اجتناب از تنش کم‌آبی اشاره شده است (Abbas-Zade *et al.,* 2007; Dehqanzadeh *et al.,* 2008; Verbruggen & Hermans, 2008). به نظر می‌رسد با افزایش فواصل آبیاری و کاهش رطوبت خاک، پتانسیل آب سلول به پایین‌تر از حد آستانه رسیده و با افزایش آنزیم پروتئولاز، سنتز پرولین به‌منظور بالابردن توان جذب آب افزایش یافته است. کاهش تورژسانس، عامل اولیه تجمع پرولین در تنش خشکی است. کاهش تورژسانس باعث فعال شدن یک توالی پیچیده فرآیندهای تطابقی مرتبط با سطح تحمل گیاه به تنش می‌شود (Syosemarde *et al.,* 2009). تجمع پرولین در زمان تنش کم‌آبی در سیتوپلاسم بوده و به‌عنوان یک مادهٔ محلول، سبب محافظت از ساختمان ماکرومولکول‌های درون سلول، تنظیم اسمزی، نگهداری تورژسانس سلول و در مجموع موجب انطباق گیاه با شرایط تنش شده است (Bokhari & Trent, 1985).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) میزان اسیدآمینه‌های پرولین، متیونین و لیزین طی ۳۳، ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش کم‌آبی و کاربرد روی

Table 1. Analysis of variance (mean squares) for proline, methionine and lysine content in 33, 55 and 75 day after stress and usage zinc

منابع تغییرات S.O.V		درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)								
			پرولین Proline			متیونین Methionine			لیزین Lysine		
			33day	55day	75day	33day	55day	75day	33day	55day	75day
تنش	Stress	2	0.230**	0.147**	0.275**	0.000033^{ns}	0.000050**	0.00019**	0.000056^{ns}	0.0439**	0.094**
روی	Zinc	2	0.116*	0.117*	0.116**	0.000002^{ns}	0.000003^{ns}	0.00016^{ns}	0.00020^{ns}	0.000090^{ns}	0.0075^{ns}
اثرات متقابل	Stress×Zinc	4	0.028^{ns}	0.002^{ns}	0.002^{ns}	0.000022	0.000006^{ns}	0.000022^{ns}	0.000065^{ns}	0.00045^{ns}	0.0010^{ns}
خطا	Error	18	0.020	0.021	0.006	0.000021	0.000007	0.000054	0.00017	0.00073	0.0023
ضریب تغییرات	CV%	-	19.54	19.34	8.03	12.56	8.85	9.10	11.02	9.48	10.55

ns: غیرمعنی‌دار، *: معنی‌دار در سطح ۵ درصد و **: معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

ns: Non-significant; * and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) میزان پروتئین و قندهای محلول طی ۳۳، ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش کم‌آبی و کاربرد سولفات روی و پتانسیل اسمزی

Table 2. Analysis of variance (mean squares) for protein, soluble sugar and potansil osmotic content in 33, 55 and 75 day after streass and usage zinc

منابع تغییرات S.O.V		درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)						
			پروتئین Protein			قندهای محلول Soluble sugar			پتانسیل اسمزی Osmotic potential
			33day	55day	75day	33day	55day	75day	
تنش	Stress	2	31.70^{ns}	525.13**	489.35**	10.74^{ns}	500.37**	2090.10**	50.57**
روی	Zinc	2	42.39^{ns}	166.65*	125.89*	26.20^{ns}	300.73*	291.08*	1.66*
اثرات متقابل	Stress×Zinc	4	43.48^{ns}	20.59^{ns}	12.66^{ns}	20.11^{ns}	522.45^{ns}	13.049^{ns}	0.367^{ns}
خطا	Error	18	53.99	37.83	26.56	58.22	52.004	103.38	0.405
ضریب تغییرات	CV%	-	9.61	10.44	15.08	8.29	14.42	12.40	4.72

ns: غیر معنی‌دار، *: معنی‌دار در سطح ۵ درصد و **: معنی‌دار در سطح ۱ درصد. ns: Non-significant; * and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان پرولین، لیزین و متیونین تحت شرایط تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی روی

Table 3. Mean comparisons for proline, methionine and lysine content under drought stress and zinc applied

تیمارها	Traits	پرولین (میکروگرم بر گرم وزن‌تر) Proline (µg. g fw)			متیونین (میکروگرم بر گرم وزن‌تر) Methionine (µg. g fw)			لیزین (میکروگرم بر گرم وزن‌تر) Lysine (µg. g fw)		
		33day	55day	75day	33day	55day	75day	33day	55day	75day
تنش	Stress									
۱ بار آبیاری	1 stage irrigation	0.904^{a}	0.904^{a}	1.188^{a}	0.038^{a}	0.028^{b}	0.021^{c}	0.117^{a}	0.365^{a}	0.57^{a}
۲ بار آبیاری	2 stage irrigation	0.676^{b}	0.676^{b}	1.016^{b}	0.038^{a}	0.032^{a}	0.024^{b}	0.120^{a}	0.251^{b}	0.442^{b}
۳ بار آبیاری	3 stage irrigation	0.595^{b}	0.689^{b}	0.839^{c}	0.035^{a}	0.033^{a}	0.030^{a}	50.122^{a}	0.238^{b}	0.374^{c}
روی	Zinc									
۰ کیلوگرم	0 kg	0.630^{b}	0.630^{b}	0.881^{b}	0.037^{a}	0.031^{a}	0.024^{b}	0.119^{a}	0.281^{a}	0.435^{b}
۳ کیلوگرم	3kg	0.694^{b}	0.788^{a}	1.075^{a}	0.036^{a}	0.030^{a}	0.025^{ab}	0.116^{a}	0.287^{a}	0.463^{ab}
۶ کیلوگرم	6kg	0.851^{a}	0.851^{a}	1.082^{a}	0.037^{a}	0.031^{a}	0.027^{a}	0.125^{a}	0.286^{a}	0.493^{a}

حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در احتمال خطای درصد ($P<0.05$) آزمون LSD می‌باشد

Dissimilar letters indicate significant differences at 5% level ($P<0.05$) of LSD test.

عناصر روی و منگنز به‌خصوص در ارقام متحمل به خشکی در شرایط تنش، نقش افزایش‌دهنده در فرآیند تنظیم اسمزی به‌واسطه افزایش میزان پرولین و یا قندهای محلول دارند. بررسی‌ها نشان داد که انباشتگی میزان پرولین با میزان تحمل به خشکی گیاه ارتباط مستقیم دارد. همچنین نتایج نشان داد با گذشت مدت زمان بیشتر بعد از تنش میزان پرولین افزایش پیدا کرد که این باعث می‌شود گیاه فرصت کافی برای تولید پرولین را به‌دست آورده و در این مدت گیاه به تنش مقاوم‌تر شده است.

همچنین نتایج نشان داد در ۳۳ روز بعد از تنش تنها میزان پرولین با تغییرات پتانسیل اسمزی دارای همبستگی معنی‌داری بود ولی با افزایش مدت زمان به ۵۵ و ۷۵ روز میزان اسید آمینه‌های لیزین و متیونین نیز با تغییرات پرولین دارای همبستگی معنی‌دار بودند که این نشان‌دهنده واکنش سریع پرولین به شرایط تنش می‌باشد. افزایش پرولین در طی تنش مربوط به کاهش فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز می‌باشد. حساسیت آنزیم نیترات رداکتاز به تغییرات وضعیت رطوبت و پتانسیل آب برگ، می‌تواند توجیه‌گر حساسیت پرولین به تنش کم‌آبی باشد (Tejo & Santos Diaz, 1987).

همچنین نتایج تجزیه واریانس‌ها نشان داد اگرچه اثرات اصلی کم‌آبی بر میزان لیزین در۳۳روز بعد از تنش معنی‌دار نشد، ولی بر میزان آن در ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش در سطح ۱درصد معنی‌دار بود. محلول‌پاشی با سولفات روی بر میزان لیزین در هیچ‌یک از مراحل نمونه‌برداری اثر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱)؛ ولی مقایسه میانگین اثرات اصلی تنش در ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش نشان داد میزان لیزین طی افزایش فواصل آبیاری افزایش یافت. بیشترین میزان لیزین در طی ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش به‌ترتیب ۰/۳۶۵ و ۰/۵۷۵ میکروگرم در گرم از یک بار آبیاری و کمترین میزان آن نیز به‌ترتیب ۰/۲۳۸ و ۰/۳۷۴ میکروگرم بر گرم وزن‌تر از تیمار سه بار آبیاری به‌دست آمد (جدول ۲). همچنین نتایج نشان داد میزان اسیدآمینه متیونین تنها تحت تأثیر اثرات اصلی کم‌آبی در ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش قرار گرفت ($P<0.01$) و محلول‌پاشی و اثرات متقابل کم‌آبی در محلول‌پاشی در هیچ‌کدام از مراحل نمونه‌برداری معنی‌دار نشد (جدول ۱). نتایج نشان داد بر خلاف لیزین میزان متیونین در طی تنش کاهش پیدا کرد، به‌طوری‌که بیشترین مقدار آن در طی ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش به‌ترتیب ۰/۳۳۵ و ۰/۳۰۶ میکروگرم بر گرم وزن‌تر از ۳ بار آبیاری و کمترین مقدار آنها (۰/۲۸۹ میکروگرم بر گرم وزن‌تر در ۵۵ روز بعد از تنش و ۰/۲۱۶ میکروگرم بر گرم وزن‌تر در ۷ روز بعد از تنش) نیز از یک بار آبیاری مشاهده شد (جدول ۲). علی‌رغم معنی‌دارنشدن اثرات اصلی مصرف روی بر میزان لیزین و متیونین، بین مصرف ۶ کیلوگرم در هکتار سولفات روی و عدم استفاده روی در مرحله سوم نمونه‌برداری اختلاف معنی‌دار وجود دارد. با این حال، تأثیر روی در شرایط تنش، کم رنگ‌تر از اثر خشکی بر میزان این اسیدآمینه بود. نتایج همبستگی صفات نشان داد که هرچه مدت زمان بعد از تنش افزایش یابد همبستگی بین لیزین و متیونین با پتانسیل اسمزی افزایش پیدا می‌کند که علت آن می‌تواند افزایش شدت تنش باشد (جدول ۴).

پژوهش‌های دیگر نیز گزارش نمودند میزان لیزین برای کاهش تأثیر تنش افزایش پیدا می‌کند (Liu *et al.*, 2007). پلی‌آمین ها نقش مثبتی را در واکنش دفاعی گیاهان در برابر تنش‌ها بر عهده دارند. نقش تنظیم‌کنندگی پلی‌آمین‌ها در

واکنش گیاهان در برابر تنش‌ها، از طریق استحکام غشاهای سلولی و بازداری از فعالیت آنزیم‌های هیدرولتیک می‌باشد. چنین تأثیری در پلی‌آمین‌ها با برخی بارهای مثبت (گروه‌های آمینی) در ساختار مولکول مرتبط می‌باشد (Abu-kpawoh *et al.,* 2002). به نظر می‌رسد مصرف روی موجب افزایش اسیدآمینه لیزین در مقابله با تنش شده و از این طریق موجب تقویت سیستم دفاع سلولی شده است (Liu *et al.,* 2007)؛ به نحوی‌که در شرایط کمبود عنصر روی بروز خسارت‌های اکسیداتیو ناشی از تهاجم رادیکال‌های آزاد با ایجاد اختلال در عملکرد غشاهای سلولی و تولید رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید به سلول خسارت وارد می‌نمایند (Murray, 1989). روند کاهشی میزان متیونین با افزایش تنش، قابل‌توجه است. بیوسنتز متیونین و اتیلن از یک پیش ماده مشترک به‌نام s-آدنوزیل متیونین می‌باشد. به نظر می‌رسد تنش باعث برتری بیوسنتز اتیلن در باندشدن با پیش‌ماده مشترک شده و میزان متیونین کاهش یافته است. این نتایج با یافته‌های پژوهشگران دیگر (Khan, 2008; Sood & Nagar, 2008) مطابقت دارد.

جدول ۴- مقایسه میانگین میزان پروتئین، قندهای محلول و پتانسیل اسمزی تحت شرایط تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی روی

Table 4. Mean comparisons for protein, soluble sugar content and osmotic potential under drought stress and zinc applied

تیمارها	Traits	پروتئین (میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) Protein (mg. g fw)			قندهای محلول (میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) Soluble sugar (mg. g fw)			پتانسیل اسمزی (بار) Osmotic potential (par)
		33day	55day	75day	33day	55day	75day	
تنش	Stress							
۱ بار آبیاری	1 stag irrigation	76.84^{a}	50.21^{b}	26.91^{c}	34.48^{a}	58.57^{a}	98.14^{a}	-15.76^{a}
۲ بار آبیاری	2 stag irrigation	78.02^{a}	61.81^{a}	33.93^{b}	32.49^{a}	46.40^{b}	79.81^{b}	-13.63^{b}
۳ بار آبیاری	3stag irrigation	74.34^{a}	64.62^{a}	41.65^{a}	32.70^{a}	45.02^{b}	67.89^{c}	-11.03^{c}
روی	Zinc							
۰ کیلوگرم	0 kg	73.90^{a}	53.91^{b}	31.88^{b}	33.21^{a}	44.21^{b}	77.11^{b}	-13.72^{a}
۳ کیلوگرم	3kg	77.78^{a}	61.34^{a}	32.14^{b}	31.53^{a}	50.01^{ab}	80.52^{ab}	-13.72^{a}
۶ کیلوگرم	6kg	77.52^{a}	61.39^{a}	38.78^{a}	34.94^{a}	55.77^{a}	88.21^{a}	-12.98^{b}

حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در احتمال خطای درصد (P<0.05) آزمون LSD می‌باشد

Dissimilar letters indicate significant differences at 5% level (P<0.05) of LSD test.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد میزان پروتئین در ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش در سطح ۱درصد تحت تأثیر اثرات اصلی کم‌آبی و در سطح ۵درصد تحت تأثیر محلول‌پاشی با سولفات روی قرار گرفت (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد کم‌آبی موجب کاهش میزان پروتئین‌ها شد، به‌طوری‌که بیشترین میزان تولید پروتئین (به‌ترتیب ۶۴/۶۲ و ۴۱/۶۵ میلی‌گرم در گرم در ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش) با سه بار آبیاری و کمترین میزان این شاخص در مرحله ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش (به‌ترتیب ۵۰/۲۰ و ۲۶/۹۰ میلی‌گرم در گرم) با یک بار آبیاری به‌دست آمد. سه بار آبیاری گیاه در مراحل مختلف رشد نسبت به دو بار ۱۸/۵۳ درصد و نسبت به یک بار ۳۵/۳۹ درصد از پروتئین محلول بیشتری برخوردار بود (جدول ۳). همچنین کاربرد سولفات روی باعث کاهش تأثیر تنش در تجزیه پروتئین شد. محلول‌پاشی موجب افزایش پروتئین برگ‌ها در ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش شد. مصرف ۶ کیلوگرم در هکتار سولفات روی موجب افزایش ۶۱٪ و ۲۲٪ میزان پروتئین در ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش شد (جدول ۳). به نظر می‌رسد که تنش خشکی موجب تجزیه و کاهش غلظت پروتئین‌ها در برگ‌ها شده است. احتمالاً تجزیه و تخریب پروتئین‌ها و انباشت برخی آمینواسیدهای آزاد (از جمله پرولین) در شرایط تنش خشکی، در جهت تنظیم اسمزی سلول و کاهش تأثیر سوء تنش باشد. در پژوهش‌های نخود و ذرت نیز چنین نتایجی حاصل شده بود (Moran *et al.,* 1994; Sheykhbagloo1 *et al.,* 2009). Ghorbanli & Niakan (2005) بیان کردند که با تشدید میزان تنش در سویا، مقدار کل پروتئین‌های محلول، هم در بخش هوایی ساقه و برگ و هم در ریشه، کاهش یافت. روی، سنتز پروتئین را افزایش داده و باعث کاهش همه اسیدهای آمینه از طریق انتقال اسیدهای آمینه و کاهش تجزیه و تخریب RNA شد (Brown *et al.,* 1993). نتایج نشان می‌دهد، تنش خشکی از طریق توقف سنتز و افزایش تخریب پروتئین‌ها باعث کاهش عملکرد شد. کاهش میزان پروتئین‌ها از لحاظ تغذیه‌ای نیز از آثار نامطلوب تنش خواهد بود. نتایج به‌دست آمده توسط سایر محققان نشان داده است که محلول‌پاشی روی موجب افزایش درصد پروتئین می‌گردد (Jamson *et al.,* 2009;

Banks .(Mazhar *et al.,* 2005; Thalooth *et al.,* 2005 (2004) بیان داشت محلول‌پاشی روی در سویا میزان پروتئین و میزان روغن دانه را افزایش داد.

میزان قندهای محلول در سطح ۱ درصد و ۵ درصد تحت تأثیر اثرات اصلی کم‌آبی و محلول‌پاشی در ۵۵ و ۷۵ روز بعد از تنش قرار گرفت، ولی در ۳۳ روز معنی‌دار نشد (جدول ۲). کم‌آبی موجب افزایش میزان قندهای محلول گردید؛ به‌طوری‌که بیشترین (۵۸/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) و کمترین (۴۵/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) میزان قندهای محلول در ۵۵ روز بعد از تنش به‌ترتیب از یک بار آبیاری و سه بار آبیاری مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد یک بار آبیاری در مرحله سوم نمونه‌برداری موجب افزایش میزان قندهای محلول از ۶۷/۸۹ به ۹۸/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر شد (جدول ۴). محلول‌پاشی با سولفات روی بر میزان قندهای محلول در نمونه‌برداری بعد از ۵۵ و ۷۵ روز اعمال تنش در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار نشان داد (جدول ۲). محلول‌پاشی موجب افزایش میزان قندهای محلول شد. محلول‌پاشی برگ‌ها با ۶کیلوگرم در هکتار سولفات روی موجب افزایش ۲۷٪ قندهای محلول در نمونه‌برداری در ۵۵ روز و ۱۴٪ در نمونه‌برداری در ۷۵ روز بعد از تنش شد (جدول ۴). این نتایج با گزارش‌های دیگر پژوهش‌ها مطابقت دارد (;Abbas-Zade *et al.,* 2007 Dehqanzadeh *et al.,* 2008). در طی دیگر پژوهش‌ها نیز میزان کربوهیدرات‌ها در اثر محلول‌پاشی روی افزایش یافت (Babania *et al.,* 2010). به نظر می‌رسد با افزایش فاصله زمانی از آبیاری، پتانسیل آب سلول سریع‌تر به پایین‌تر از حد آستانه رسیده و منجر به افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز و تجزیه نشاسته به ساکارز و سپس مولکول‌های کوچک‌تری مانند گلوکز و فروکتوز و سایر قندهای آزاد محلول شده است. نتایج همبستگی نیز نشان داد بین تغییرات میزان قند محلول و پتانسیل اسمزی همبستگی مثبت وجود دارد. همچنین نتایج نشان داد میزان قندهای محلول تنها در نمونه‌برداری سوم دارای همبستگی معنی‌داری با میزان پتانسیل اسمزی می‌باشد. در واقع می‌توان گفت تغییرات میزان قندهای محلول آهسته بوده و برای تجزیه نشاسته نیاز به زمان بیشتری در مقایسه با میزان اسید آمینه‌ها و پروتئین می‌باشد (جدول ۷). قندهای محلول تجمع‌یافته در شرایط تنش خشکی ممکن است به‌عنوان عامل اسمزی و یا محافظ اسمزی عمل نمایند. در حالت اول، افزایش قندها در اثر تنش با تنظیم اسمزی و نگهداری تورژسانس و در حالت دوم، با پایدار کردن غشاها و پروتئین‌ها در ارتباط می‌باشد. قندها به‌احتمال قوی جایگزین آب در پیوندهای هیدروژنی یا دنباله‌های پلی‌پپتیدی و گروه‌های فسفات فسفولیپیدها می‌شوند و از گسیختگی غشایی ممانعت می‌کنند (Irigoyen *et al.,* 1992). انباشت قندهای محلول در شرایط تنش علاوه بر نقش‌های فیزیولوژیک مهمی که از نظر تأمین انرژی و جلوگیری از مرگ حتمی ایفا می‌کند،می‌تواند از طریق تنظیم اسمزی و بالاترنگه‌داشتن محتوای آب نسبی، در سازوکار تحمل به خشکی هم نقش مهمی داشته باشد. افزایش قندهای محلول تحت تنش، نشان‌دهنده این است که میزان تنظیم اسمزی در اندام‌های در حال رشد، به تأمین متابولیت‌ها بستگی کامل دارد، زیرا این عمل با صرف انرژی همراه است و ترکیبات کربن‌دار برای تولید متابولیت‌ها به تداوم فتوسنتز وابسته‌اند. با کاهش فتوسنتز و در نتیجه کاهش کربوهیدرات‌های ساختاری، رشد و عملکرد محدود می‌شود.

جدول ۵- نتایج همبستگی صفات در ۳۳ روز بعد از اعمال تنش

Table 5. Correlation results at 33 days after stress

	Proline	Methionine	Lysine	Protein	Souble sugar	Osmotic potential
پرولین Proline	1					
متیونین Methionine	-0.135	1				
لیزین Lysine	0.041	-0.089	1			
پروتئین Protein	0.135	-0.104	-0.182	1		
قندهای محلول Souble sugar	-0.059	0.455*	-0.154	-0.305	1	
پتانسیل اسمزی Osmotic potential	-0.428*	-0.357	0.151	-0.116	-0.102	1

*: Significant at 5% probability levels

* : معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

جدول ۶- نتایج همبستگی صفات در ۵۵ روز بعد از اعمال تنش

Table 6. Correlation results at 55 days after stress

	Proline	Methionine	Lysine	Perotine	Souble sugar	Osmotic potential
پرولین Proline	1					
متیونین Methionine	-0.104	1				
لیزین Lysine	0.567**	-0.407*	1			
پروتئین Protein	-0.666**	0.334	-.673**	1		
قندهای محلول Souble sugar	0.029	-0.216	0.411*	-0.334	1	
پتانسیل اسمزی Osmotic potential	-0.489**	0.601**	-0.777**	0.653**	-0.378	1

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

جدول ۷- نتایج همبستگی صفات در ۷۵ روز بعد از اعمال تنش

Table 7. Correlation results at 75 days after stress

	Proline	Methionine	Lysine	Protein	Souble sugar	Osmotic potential
پرولین Proline	1					
متیونین Methionine	-0.542**	1				
لیزین Lysine	0.768**	-0.677**	1			
پروتئین Protein	-0.505**	0.706**	-.530**	1		
قندهای محلول Souble sugar	0.784**	-0.543**	0.836**	-0.440*	1	
پتانسیل اسمزی Osmotic potential	-0.726**	0.854**	-0.762**	0.788**	-0.691**	1

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

تأثیر کم‌آبی بر پتانسیل اسمزی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش تعداد دفعات آبیاری محتوای آب بیشتر و پتانسیل اسمزی افزایش می‌یابد. کمترین پتانسیل اسمزی (۱۵/۷- بار) از یک بار آبیاری و بالاترین میزان این شاخص (۱۱/۱- بار) از سه بار آبیاری به‌دست آمد (جدول ۴). مصرف سولفات روی نیز در سطح ۵ درصد بر روی پتانسیل اسمزی اثر معنی‌داری داشت (جدول ۲). محلول‌پاشی با سولفات روی موجب افزایش پتانسیل اسمزی شد به‌طوری‌که مصرف ۶ کیلوگرم روی در هکتار نسبت به دو سطح دیگر تأثیر مثبت‌تری بر کاهش پتانسیل اسمزی داشت (جدول ۵).

با مصرف روی، نشتی کمتر، پایداری بیشتر، خروج املاح کمتر، املاح باقی‌مانده بیشتر و پتانسیل اسمزی پایین‌تر بود. تنظیم اسمزی یکی از سازوکارهای مهم تحمل خشکی در گیاهان می‌باشد. کاهش معنی‌دار پتانسیل اسمزی می‌تواند به دلیل از دست دادن آب آزاد سلول‌ها و یا به دلیل وجود سازوکار فعال در جذب و یا تولید املاح کاهش‌دهنده پتانسیل اسمزی در محیط سلول و یا هر دو آن‌ها باشد. در شرایط کمبود آب فعالیت برخی از آنزیم‌های هیدرولیزکننده افزایش می‌یابد که این آنزیم از طریق تجزیه مولکول‌های پلیمر ذخیره‌ای، میزان مواد محلول در سلول را افزایش داده و پتانسیل اسمزی را کاهش می‌دهند. این امر موجب می‌شود که سلول با حفظ توانایی جذب آب، فشار آماس خود را در سطح بالایی حفظ کند؛ همان‌طوری‌که در پژوهش انجام گرفته نیز همبستگی مثبت معنی‌داری بین افزایش اسید آمینه پرولین، لیزین و میزان قندهای محلول مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد در طی نمونه‌برداری میزان پرولین در نمونه‌برداری اول، دارای همبستگی معنی‌داری با میزان پتانسیل اسمزی داشته و بقیه صفات معنی‌دار نشده‌اند. با گذشت زمان و نمونه‌برداری‌های بعدی میزان لیزین و قندهای محلول نیز دارای همبستگی معنی‌دار شده‌اند. با توجه به این نتیجه می‌توان استنباط نمود که تغییرات پرولین حساس‌تر بوده و به‌سرعت در اثر تنش تغییر پیدا می‌کند و با پتانسیل اسمزی همبستگی بالاتری دارد (جدول ۶). توانایی گیاه از نظر تنظیم

اسمزی عمدتاً تحت تأثیر محیط رشد قرار می‌گیرد (Loos & Siddique, 1994). همچنین نتایج پیش‌بینی میزان پتانسیل اسمزی نشان داد در نمونه‌برداری اول (۳۳ روز بعد از اعمال تنش) میزان پرولین (R^2=۰/۱۸۳) بالاترین سهم را در پیش‌بینی نشان داد، به‌طوری‌که تغییرات میزان پرولین و پتانسیل اسمزی از نوع خطی بود. با گذشت مدت زمان از اعمال تنش سهم بقیه اسیدآمینه‌ها در پیش‌بینی پتانسیل اسمزی افزایش پیدا کرد، به‌طوری‌که در مرحله دوم نمونه‌برداری میزان اسید آمینه لیزین (R^2=-۰/۶۰۴) و متیونین (R^2=-۰/۵۹۲) و در ۷۵ روز بعد از تنش میزان متیونین (R^2=-۰/۷۲۹) و پروتئین (R^2=-۰/۶۲۰) بالاترین سهم را در پیش‌بینی میزان پتانسیل اسمزی نشان دادند (جدول ۸). در واقع نتایج نشان داد میزان پرولین در مقایسه با بقیه صفات اندازه‌گیری شده در نمونه‌برداری اول واکنش سریع‌تری انجام داده است، ولی با گذشت زمان و تغییر در دیگر صفات مانند اسیدآمینه لیزین و متیونین از تأثیر پرولین بر میزان پتانسیل اسمزی کاسته شد. همچنین نتایج نشان داد میزان پرولین در نمونه‌برداری اول به‌جز با پتانسیل اسمزی با هیچ‌یک از صفات دیگر دارای همبستگی معنی‌دار نبود، ولی در نمونه‌برداری دوم و سوم بر میزان همبستگی لیزین و پروتئین افزوده شده که این می‌تواند از همبستگی پرولین با پتانسیل اسمزی کاسته ولی بر میزان همبستگی آن با لیزین و متیونین افزوده و از این طریق در تنظیم پتانسیل اسمزی نقش ایفا نماید (جدول ۵، ۶ و ۷).

جدول ۸- معادلات رگرسیونی پیش‌بینی پتانسیل اسمزی در شاخص‌های سازگاری سلول در روزهای مختلف بعد تنش

Table 8. Regression equations for predicting the osmotic potential of the cells at various days post- stress adaptation

صفات وابسته X	نمونه‌برداری	همبستگی R square	ضرایب رگرسیونی معادله b_0	b_1	b_2	b_3	مدل Model
پرولین Proline	33day	0.183	10.42**	-4.205*	….ns	….ns	$Y=b_0+b_1X$
	55day	0.239	9.38**	-5.40**	….ns	….ns	$Y=b_0+b_1X$
	75day	0.528	5.29**	-8.07**	….ns	….ns	$Y=b_0+b_1X$
متیونین Methionine	33day	0.127	7.48**	-160.70	….ns	….ns	$Y=b_0$
	55day	0.592	84.66**	3780.7**	47801.1**	0.00*	$Y=b_0+b_1X+b_2X^2+b_3X^2$
	75day	0.729	23.68**	397.9**	….ns	….ns	$Y=b_0+b_1X$
لیزین Lysine	33day	0.023	16.50	25.17	….ns	….ns	$Y=0$
	55day	0.604	6.12**	-25.74**	….ns	….ns	$Y=b_0+b_1X$
	75day	0.580	5.93**	-16.19**	….ns	….ns	$Y=b_0+b_1X$
پروتئین Protein	33day	0.013	10.86	-0.034	….ns	….ns	$Y=0$
	55day	0.427	22.31**	0.150**	….ns	….ns	$Y=b_0+b_1X$
	75day	0.620	20.30**	0.200**	….ns	….ns	$Y=b_0+b_1X+b_2X^2$
قندهای محلول Solube sugar	33day	0.010	12.43	-0.031	….ns	….ns	$Y=0$
	55day	0.142	10.52**	-0.059**	….ns	….ns	$Y=b_0+b_1X$
	75day	0.478	6.10**	-0.090**	….ns	….ns	$Y=b_0+b_1X$

ns: غیر معنی‌دار، *: معنی‌دار در سطح ۵ درصد و **: معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

ns: Non-significant; * and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این پژوهش مشاهده شد در طی تنش کم‌آبی میزان اسیدآمینه پرولین، لیزین و میزان قندهای محلول افزوده و از میزان متیونین و پروتئین و پتانسیل اسمزی برگ‌ها کاسته شد. همچنین محلول‌پاشی برگ‌ها با سولفات روی سبب افزایش و ارتباط پرولین، قند محلول و میزان پروتئین و پتانسیل اسمزی شد، ولی بر میزان لیزین و متیونین تأثیر معنی‌داری نداشت. همچنین با گذشت زمان بعد از اعمال تنش (تشدید تنش) همبستگی صفات با یکدیگر افزایش پیدا می‌کند. پرولین در مراحل اولیه بعد از تنش بیشترین همبستگی و سهم را در پیش‌بینی پتانسیل اسمزی نشان داد که می‌تواند به ایفای نقش آن در تنظیم اسمزی در ابتدای تنش مرتبط باشد؛ ولی با گذشت زمان میزان همبستگی لیزین و متیونین با پتانسیل اسمزی افزایش یافت که نشان‌دهنده این است که در کاهش شدید پتانسیل اسمزی گیاه از این اسیدآمینه‌ها نیز برای تحمل تنش استفاده می‌کند.

منابع

1. Abbas-Zade, B., Sharifi. A., Abadi, A., Lebaschi, M.H., Naderi, M., and Maghdami, F. 2007. Effect of drought stress on proline, soluble sugars, chlorophyll and relative water content of *Melissa officinalis* L. Journal Reserche Aroma Plants Iran 23(4): 504-513.

2. Abu-Kpawoh, J.C., Xi, Y.F., Zhang, Y.Z., and Jin, Y.F. 2002. Polyamine accumulation following Hot-water dips influence chilling injury and decay in friar plum fruit. Food Chemistry and Toxicology 67(7): 2649-2653.
3. Aziz zade Firozy, F., Bahman Yar, A., Momeny, V., and Ghasem por A. 2004. Effect of potassium fertilizers on the agronomic characteristics and quantities of zinc, iron and phosphorus in two wheat cultivars on calcareous soil with low. Proceedings of the 10th Congress of Iran, Karaj. (In Persian).
4. Babania, M., Haidary, M., and Ghanbari, A., 2010. Effects of water stress and foliar application of micronutrients on physiological characteristics and nutrient uptake of sunflower. (*Helianthus annus* L.). Iranian Journal of Crop Sciences 12(4): 377-391. (In Persian).
5. Banks, L.W. 2004. Effect of timing of foliar zinc fertilizer on yield component of soybeans. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 22(116): 226-231.
6. Bates, I.S., Waldern. R.P., and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free prolin for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
7. Bokhari, U.G., and Trent, J.D. 1985. Proline concentrations in water stressed grasses. Journal of Range Management 38: 37-38.
8. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantitie of protein utilysineg the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
9. Brown, P.H., Cakmak, I., and Zhang, Q. 1993. Form and function of zinc in plants, In: Robson, A.D. (Ed.). Pp: 93-106.
10. Dehqanzadeh, H., Khajehpour, M.R., Heidari Sharif Abad, H., and Soleimani, A.S. 2008. Effect of limited irrigation on the accumulation of proline, free soluble sugars and potassium in bread wheat cultivars. 10th Iran. Cong. Agron. and Plant Breed Science. 430p.
11. Ferrel, R.E., Fellers, D.A., and Shepherd, A.D. 1969. Determination of free Lysine and Methionine in Amino acid-Forttified wheat. 46: 614- 620.
12. Ghorbanli, M., and Niakan, M. 2005. Study the effect of drought stress on soluble sugars, protein, proline, phenol compounds and reductase enzyme activity in soybean plants cv. Gorgan 3. Tarbiat Moallem University Science Magazin. 5(1, 2): 537-550.
13. Hajebi, A., and Hidary sharifabady, H. 2005. Effect of drought on growth and nodulation of three species of clover. Journal of Agronomy and Horticulture Research and Development 66: 13-21. (In Persian).
14. Ho, S., Chao, Y., Tong, W., and Yu, S. 2001. Sugar coordinately and differentially regulates growth and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. Plant Physiology 46: 281-285.
15. Irigoyen, J. J., Emerich D.W., and Sanchez-Diaz, M. 1992. Alfalfa leaf senescense induced by drought stress: photosnthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and athylene evoluation. Physiologia Plantarum 84: 67-72.
16. Jamson, M., Galshy, S., Pahlevani, M., and Zinaly, A., 2009. Effect of foliar zinc (Zn) on the yield and grain quality characteristics of soybean cultivars in summer cultivation. Journal of Plant Production 16(1): 17-28. (In Persian).
17. Janardhan, K.V., and Krishnamorthy, V. 1975. Arapid metod for determination of osmotic potencial of plant cell. Curren Science 44(11): 390-391.
18. Khan, A.S., Singh, Z., Abbasi, N.A., and Swinny, E.E. 2008. Pre or post-harvest application of putrescine and low temperature storage affect fruit ripening and quality of Agelino plum. Journal of the Science of food and Agriculture 88(11): 1687-1695.
19. Liu, J. H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y., and Moriguchi, T. 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. Plant Biotechnology 24: 117-126.
20. Loos, S.P., and Siddique, K.H.M. 1994. Morphological and physiological traits Associated with wheat increases in Mediterranean environment. Adv. in Agronomy 52: 229-276.

21. Mansour, M.M.F., Salama, K.H., Ali, F.Z.M., and Abou Hadid, A.F. 2005. Cell and plant responses to NaCl in *Zea Mays* L. cultivars differing in salt tolerance. Gentice Applec Plant Physiology 31(1-2): 29-41.
22. Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants, 2. Academic Press, London, U.K., Pp. 889.
23. Mazhar, U., Haq, M.U., and Mallarino, A.P. 2005. Response of soybean grain oil and protein concentrations to foliar and soil fertilization. Agronomy Journal 97: 910-918
24. Mohsenzade, S., Malboobi, M.A., Razavi, K., and Farrahi Aschtiani, S. 2006. Physiological and molecular responses of *Aeluropus lagopoides* (poaceas) to water deficit. Environmental and Experimental Botany 56: 374-322.
25. Moran, J.F., Becana, M., Ormaetxe, I.I., Frechilla, S.L., Klucasc, R.V., and Tejo, D.A. 1994. Drought induces oxidative stress in pea plants. Plant 194: 346-352.
26. Murray, D. R. 1989. Biology of fool irradiation. Research Studies Press, UK. Esmith, D. S. 1991. Growth responses of corn (*Zea mays* L.) to interminating of soil water dificits. Fild Crops Abstracts. Pp: 237.
27. Najafy, M. 2013. The role of amino acids in organic farming. http://www.talfighdaneh.ir/News/post-23550.
28. Pagter, M., Bragato, C., and Brix, H. 2005. Tolerance and physiological responses of phragmites australis to water deficit. Aquatic Botany 81: 285-299.
29. Rahnama, H., and Ebrahimzadeh, H. 2004. The effect of NaCl on proline accumulation in potato seedlings and calli. Physiologiae Plantarum 26 (3): 263-270.
30. Refsum H., Ueland, P.M, Nygård, O., and Vollset, S.E. 1998. Homocysteine and Cardiovascular Disease. Annual Review of Medicine 49: 31-62.
31. Sabaghpour, S.H. 2004. Present status and future prospects of food legume in Iran. In Gowda, C.L.L and Pande, F. (Eds.). Role of legumes in crop diversification and poverty reduction in Asia. The International Crops Research Institute for the Semi-Arid-Tropics. Pp 75-83.
32. Sajedi, N.A., and Rjay, F. 2011. Application of mycorrhizal inoculation on the uptake of zinc and micronutrients in maize. Journal of Soil Research 25: 83-92. (In Persian).
33. Samen, M., Sepehry A., and Ahmadvand, G., 2011. Dry matter accumulation of metabolites produced in six chickpea genotypes under different levels of soil moisture adjustment. Iranian Journal of Biology 24(3): 373-389. (In Persian).
34. Sheykhbagloo1, N., Hassanzadeh, A., Gorttapeh, M., Baghestani, M., and Zand, B. 2009. Study the effect of zinc foliar application on the quantitative and qualitative yield of grain corn under water stress. Electronic Journal of Crop Production 2(2): 59-74. (In Persian).
35. Sood, S., and Nagar, P.K. 2008. Post-harvest alteration in polyamins and ethylene in two diverse rose species. Acta Physiology Plant 30(21): 243-248.
36. Syosemarde, A., Ahmady, A., and Postiny, K. 2009. Stomatal and non-stomatal factors controlling photosynthesis and its relation with drought resistance in wheat. Journal of Agricultural Sciences 35: 93-106. (In Persian).
37. Szabados, L., and Savoure, A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science 15(2): 89-97.
38. Tejo, P.A., and Santos Diaz, M. 1987. Nodule and leaf nitrate reductase and nitrogen fixation in *Medicago sativa* L. under water stress. Plant Physiology 69: 479-482.
39. Thalooth, A.T., Badr, N.M., and Mohamed, M.H. 2005. Effect of foliar spraying with Zn and different levels of phosphatic fertilizer on growth and yield of sunflower plants grown under saline conditions. Egyptian Journal of Agronomy 27: 11-22.
40. Verbruggen, N., and Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. Amino Acids 35: 753 -759.
41. Vogt, W. 1995. Oxidation of methionine residues in proteins: Tools, targets, and reversal. Free Radical Biology and Medicine 18: 93-105.

42. Zhang, J., Nguyen, H.T., and Blum, A. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. Journal of Experimental Botany 50: 291-302.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 6, No. 2, 2015, p. 59-72

The effects of zice fertilizer on some physiological characteristics of chickpea (C*icer arietinum* L.) under water stress

Dadkhah[1], N., Ebadi[2], A., Parmoon[1*], Gh., Ghlipoori[2], E. & Jahanbakhsh[2], S.

1- MSc. Graduated of Agronomy and seed science and technology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2- Associate & Assistant Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili

Received: 8 June 2014
Accepted: 3 February 2015

Introduction

Dehydration is one of the limiting factors of crop production. It results from increasing the amount of water losses from leaf or inadequate water absorption rate or combination of both. Zinc used in many enzymes of the plant tissues and have catalytic role in activation of some enzymes. Zinc is involved in the synthesis and degradation of proteins and is an essential micronutrient for normal growth and reproduction of crops. It plays an important role in the synthesis of protein and carbohydrates, metabolic functions of the cell membrane to protect cells against free radicals of oxygen and other processes related to the plants adaptation to stress. Osmotic adjustment is one of the most important mechanisms of drought tolerance in plants. By this mechanism the osmotic potential of plant cells reduces by solute accumulation. Torgur potential maintains high which is essential in cell development and growth.

Materials and Methods

Effect of water deficit stress and foliar application of zinc on physiological characteristics of chickpea was studied at a factorial experiment using randomized complete block design in field crop research station of University of Mohaghegh Ardabili in 2012. Irrigation schedules consisted of three levels (1: irrigation at planting, 2 : planting + before flowering and 3 : planting + before flowering + pod set) and zinc was applied on three concentration (0, 3 and 6 kg ha^{-1} as zinc sulfate) in two stages of 15 and 25 days after planting. In this study Proline, Lysine, Methionine, soluble sugars, and protein content were measured in three stages 33, 55 and 75 day after stress induction and osmotic potential in 75 days after stress. Osmotic potential was measured based on the electrical conductivity, the extraction of soluble sugars by using phenol sulfuric method, total protein from the leaves by the Bradford method and Lysine and methionine assayed using Ferrel method. Data were analyzed using the SAS and means compared by the LSD at the 5% level.

Results and Discussions

The results showed that dehydration increased proline, lysine, methionine, protein and soluble sugar content but reduced the osmotic potential. The maximum amount of proline accumulation resulted in two and three stage samplings once irrigation and its minimum rate obtained in the three irrigation schedule. It seems that by reducing soil moisture availability or increasing irrigation intervals, the water potential of the cells has been reached to the lower threshold which enhanced the protease enzyme activity resulted in proline accumulation in order to enhance water absorption. The maximum amount of lysine during 55 and 75 days after the stress obtained from one irrigation. Unlike the lysine, methionine content reduced during stress period, so that it's maximum value was obtained over 55 and 75 days after the tension of 3 times irrigation. Dehydration reduced the amount of proteins so that the maximum amount of protein production observed with three irrigations. Spraying six kg ha^{-1} zinc sulphate also enhanced the amount of proline, soluble sugar and osmotic potential but had no effect on the amount of lysine and methionine. Correlation showed that by increasing the time from withholding irrigation by 33 days proline increased, but osmotic potential affected only after 75 days. The regression results also showed that in the early stages of sampling, proline content had the significant effect on the biomass prediction but the elapsed time increased the effect of lysine, methionine and protein on predicting the osmotic potential.

*** Corresponding Author**: ghasem.parmoon@gmail.com

Conclusions

In general it can be said increasing the secondary metabolites production can reduce the stress and proline is the most sensitive to the low level of stress, but under higher levels of stress many metabolites such as lysine and methionine were also used for osmoregulation. The regression results also showed that in the early stages of sampling, proline levels had the largest effect on the biomass prediction, but with increasing time the lysine, methionine and protein levels also predicted the osmotic potential.

Key words: Correlation, Lysine, Proline, Soluble sugar