نشریهٔ پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۳ شمارهٔ۲، صفحهٔ ۳۰-۱۷، نیمهٔ دوم ۱۳۹۱

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 3, No. 2, 2012, p. 17-30

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

پروانه ابریشم‌چی[1]، علی گنجعلی[1*] و همان ساکنی[2]
۱- اعضای هیئت علمی دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- کارشناس‌ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۷/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۱۵

چکیده

مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی واکنش ژنوتیپ‌های نخود به تنش خشکی از نظر صفات مورفولوژیک و تغییرات بیوشیمیایی ایجادشده، برای درک بهترِ ساز و کارهای مقاومت به خشکی و دستیابی به منابع ژنتیکی مطلوب انجام گرفت. ژنوتیپ‌های نخود شامل MCC877 و MCC696 (متحمل به خشکی) و MCC776 و MCC588 (حساس به خشکی) در چهار رژیم رطوبتی خاک شامل ظرفیت زراعی (شاهد)، ۷۵درصد، ۵۰درصد و ۲۵درصد ظرفیت زراعی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در محیط کنترل‌شده، در سال۱۳۸۸ با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که اغلب صفات مورفولوژیک، مانند ارتفاع بوته، زیست تودهٔ اندام هوایی و ریشه، مجموع طول ریشه‌ها و سطح برگ، عمدتاً تحت تأثیر تنش‌های شدید خشکی قرار گرفتند. تنش‌های متعادل خشکی (رطوبت ۵۰درصد ظرفیت زراعی و بالاتر)، تأثیر معنی‌داری بر صفات فوق نداشت. در این بررسی، با کاهش رطوبت خاک، میزان پرولین در تمام ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. ژنوتیپ بومی کاندیدا برای تحمل به خشکی (MCC696) از بیشترین مقدار پرولین درشرایط تنش شدید خشکی برخوردار بود. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز، تحت تأثیر تنش خشکی، افزایش یافت و این افزایش در ژنوتیپ حساس به خشکی MCC588، بیش از سایر ژنوتیپ‌های نخود بود. احتمالاً عدم وجود مقاومت و اجتناب از تنش خشکی در ژنوتیپ MCC588، باعث واکنش گیاه به تولید بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این ژنوتیپ شد.

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

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.)، یک منبع مهم پروتئینی در رژیم غذایی بسیاری از مردم کشورهای درحال‌توسعه می‌باشد که اغلب به‌عنوان مکمل پروتئین غلات در رژیم غذایی جای می‌گیرد (Singh & Saxena, 1993). این گیاه در دامنهٔ وسیعی از شرایط آب‌وهوایی از نواحی نیمه‌گرمسیری تا مناطق مدیترانه‌ای غرب آسیا، شمال افریقا، جنوب و جنوب‌غربی اروپا کشت می‌شود (FAO, 2005). بررسی‌ها نشان داده است که تنش خشکی به‌تنهایی علت کاهش ۵۰درصد عملکرد نخود است (Gupta, 1997). این مشکل در ایران، جدی‌تر است چرا که نخود اغلب به‌صورت سنتی در انتهای فصل باران (اسفند یا فروردین) براساس رطوبت ذخیره‌شده در خاک کشت می‌شود و رشد سریع گیاه نیز همزمان با مرحله‌ای است که رطوبت خاک به‌طور فزاینده با گذشت زمان کاهش می‌یابد (Ganjeali & Nezami, 2008). بنابراین در راستای افزایش بازدهی تولید نخود در مناطق دارای تنش خشکی، بهبود سازگاری و تحمل به تنش، مورد نیاز است. در این ارتباط، صفات مورفوفیزیولوژیک متعددی وجود دارد که می‌توان از آنها برای بهبود مقاومت و تحمل به خشکی استفاده نمود (Singh & Saxena, 1993).

در شرایط تنش خشکی، ارتفاع بوته و گسترش سطح برگ، کاهش یافته و برگ‌های جدید سطح کمتری داشته (ضخیم‌تر) و ریزش می‌کنند (Ludlow & Munchow, 1990). از آنجایی که عامل اصلی محدودکنندهٔ رشد در محیط‌های خشک، آب قابل‌دسترس می‌باشد، لذا بیشترین بازده از نظر رشد و تولید محصول، زمانی به‌دست می‌آید که از آب محدود موجود در خاک، حداکثر جذب صورت پذیرد. این خصوصیت تنها از طریق مکانیسم‌های سازگاری مرتبط با

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

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

تنظیم اسمزی، تجمع فعّال مواد محلول توسط گیاه در واکنش به افزایش کمبود آب خاک می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که همبستگی معنی‌داری بین توانایی تنظیم اسمزی یک گیاه و رشد آن در شرایط تنش خشکی وجود دارد (Valentovic *et al.*, 2006). در عین حال، بسیاری از گیاهان به‌منظور تنظیم اسمزی و تحمل بیشتر تنش، از اسمولیت‌های آلی مثل پرولین استفاده می‌کنند. پرولین، یک منبع ذخیره برای کربن، نیتروژن و نیز جاروکنندهٔ[1] رادیکال‌های آزاد می‌باشد. همچنین، پرولین ساختمان‌های فراسلولی (از جمله غشاءها و پروتئین‌ها) را تثبیت و پتانسیل ردوکس سلولی ایجادشده در اثر تنش را از بین می‌برد (Chen & Murata, 2000). سنتز پرولین در بسیاری از گونه‌های گیاهی در مواجهه با تنش‌های خشکی، شوری، دماهای بالا و شدت‌های بالای نور، افزایش می‌یابد (Mansour, 2000). این ماده، فسفولیپیدهای غشای سلول را در مقابل تخریب، حفظ و به‌عنوان خنثی‌کنندهٔ رادیکال هیدروکسیل عمل می‌نماید (Samaras *et al.*, 1995). گیاهان مقاوم به تنش، از توانایی بیشتر سنتز پرولین و متعاقب آن از پایداری بیشتر غشاء برخوردار هستند که نتیجهٔ آن، هدررفت کمتر آب از طریق غشاهای سلولی می‌باشد (Valentovic *et al.*, 2006).

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

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

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی صفات مورفوفیزیولوژیک ژنوتیپ‌های نخود در واکنش به تنش خشکی و نیز بررسی تغییرات بیوشیمیایی و آنزیمی ناشی از آن، آزمایشی با چهار ژنوتیپ نخود شامل MCC877 و MCC696 (متحمل به خشکی) و MCC588 و MCC776 (حساس به خشکی) در محیط کنترل‌شده با دمای روز و شب، به‌ترتیب ۲۷ و۱۲درجهٔ سانتی‌گراد و دورهٔ روشنایی و تاریکی به‌ترتیب۱۳ و ۱۱ساعت، در چهار رژیم رطوبتی خاک شامل ظرفیت زراعی[2] (شاهد)، ۷۵درصد، ۵۰درصد و ۲۵درصد ظرفیت زراعی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه‌تکرار در آزمایشگاه تحقیقاتی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در سال۱۳۸۸ اجرا شد. به‌منظور سهولت مطالعهٔ ریشه و بازیافت آن، از ماسهٔ شسته‌شده به‌عنوان بستر کاشت و از محلول غذایی هوگلند برای تغذیهٔ گیاهان استفاده شد. ظرفیت زراعی و سطوح تنش خشکی، بر اساس درصد رطوبت وزنی ایجاد شدند و از طریق توزین روزانهٔ گلدان‌ها (دو کیلوگرم) و تأمین کسری آب موجود در محیط، میزان رطوبت گلدان‌ها در طول دورهٔ رشد، به‌طور ثابت حفظ گردید. دَه روز پس از کاشت، سطوح مختلف تنش خشکی بر روی ژنوتیپ‌ها اعمال شد و تا پایان دورهٔ رشد، ادامه یافت. حدود هفت هفته پس از کاشت که تقریباً مصادف با پایان دورهٔ رشد رویشی و آغاز مرحلهٔ گلدهی بود، نمونه‌های گیاهی، تخریب و به دو بخش ریشه و اندام هوایی تفکیک شدند. ریشه‌های هر گیاه به‌طور کامل و با حداقل آسیب‌دیدگی شسته و به‌منظور جلوگیری از پلاسیدگی، بلافاصله به یخچال انتقال داده شدند. صفاتی مانند مجموع طول ریشه‌ها (TRL)[3]، سطح ریشه‌ها (RA)[4] و وزن‌خشک ریشه (RDW)[5]،

1- Scavenger

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

اندازه‌گیری و محاسبه شدند. اندام‌های هوایی نیز به دو بخش برگ و ساقه تفکیک شده و پس از اندازه‌گیری سطح برگ(LA)[1]، به مدت ۴۸ساعت در آون ۷۲درجه سانتی‌گراد خشک شدند و سپس وزن‌خشک برگ(LDW)[2] و وزن‌خشک ساقه(SDW)[3] با ترازوی AND مدل GT-300 با دقّت ۰/۰۰۱گرم تعیین شد. ارتفاع بوته توسط خط‌کش، سطح برگ توسط دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ، طول و سطح ریشه‌ها پس از رنگ‌آمیزی، با یک اسکنر متصل به کامپیوتر بررسی و سپس با استفاده از نرم‌افزار ROOT EDGE (Root Edge, 1999)، طول و سطح ریشه برای هر گیاه محاسبه شد (Ganjeali *et al.*, 2007).

بررسی‌های بیوشیمیایی

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

استخراج و سنجش پرولین

برای استخراج و سنجش پرولین از روش Bates (1973) *et al* استفاده شد. برای این منظور، ۵۰۰میلی‌گرم از بافت برگ در ۱۰ml اسید سولفوسالیسیلیک آبدار (w/v) ۳درصد کاملاً ساییده شد تا محلول همگن ایجاد شود. دو میلی‌لیتر از محلول حاصل با دو میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و ۲میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال در یک لولهٔ آزمایش مخلوط شدند و به‌مدت یک‌ساعت در حمام آب۱۰۰درجه، قرار گرفتند. به محتویات لوله، ۴میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به‌مدت ۳۰ثانیه به‌شدت به‌هم‌زده شدند. این عمل موجب دوفازه‌شدن محتویات لوله (فاز تولوئن رنگی حاوی پرولین در بالا و فاز آبی شفاف در پایین لوله) می‌شود. پس از مدت ۲۰دقیقه، جذب نوری محلول در ۵۲۰نانومتر با استفاده از تولوئن به‌عنوان شاهد خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین در محلول محاسبه گردید.

استخراج و سنجش آب اکسیژنه (H_2O_2)

برای اندازه‌گیری میزان آب‌اکسیژنه، از روش Velikova (2000) استفاده شد. برای این منظور، ۵۰۰میلی‌گرم از بافت برگی را با ۵میلی‌لیتر TCA۰/۱درصد (w/v) در حمام یخ، ساییده تا هموژن شوند. آن‌گاه، همگنای حاصل به‌مدت ۱۵دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. ۰/۵میلی‌لیتر از روشناور را برداشته و ۰/۵میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰mM با pH= 7 و ۱میلی‌لیتر یدورپتاسیم (KI) ۱مولار به آن اضافه گردید. در نهایت، جذب نمونه در طول موج ۳۹۰نانومتر خوانده شد و سپس با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار آب‌اکسیژنه در نمونه محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌ها

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۲میلی‌لیتر تامپون استات ۰/۲مولار (pH=5) با ۰/۲میلی‌لیتر آب‌اکسیژنه ۰/۳درصد و ۰/۱میلی‌لیتر بنزیدین۰/۰۲مولار محلول در متانول ۵۰درصد در حمام یخ مخلوط شدند و سپس ۰/۱میلی‌لیتر عصارهٔ آنزیمی به آن اضافه شد و سپس جذب نمونه‌ها به‌مدت ۳دقیقه یا بیشتر در طول موج ۵۳۰نانومتر خوانده شد و منحنی تغییرات جذب آن رسم گردید. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین، محاسبه شد (Holy, 1972).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز(SOD)

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش Giannopolitis & Ries (1997) و به‌کمک سنجش مهار احیای نوری[4] نیتروبلوتترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰نانومتر، انجام گرفت. برای این منظور، ابتدا محلول بافر فسفات پتاسیم ۵۰میلی‌مولار با pH= 7.5 تهیه و سپس برای تهیهٔ محلول واکنش، ترکیبات EDTA ۰/۱میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۷۵میکرومولار، متیونین ۱۳میلی‌مولار و ریبوفلاوین ۴میکرومولار به‌ترتیب اضافه و محلول حاصل در تاریکی نگه‌داشته شد. از هر نمونهٔ عصاره، ۱۰۰میکرولیتر در هر لولهٔ آزمایش ریخته و ۳میلی‌لیتر از محلول فوق به آن اضافه گردید و با قراردادن آنها تحت روشنایی لامپ فلورسنت (۴۰W) بلافاصله واکنش آغاز گردید. پس از ۸دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰نانومتر خوانده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم، نیاز به شاهد روشنایی است. این نمونه، شامل ۳میلی‌لیتر از محلول واکنش (فاقد عصاره) است که در روشنایی قرار می‌گیرد. به این ترتیب، میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه‌ها در مقایسه با شاهد روشنایی

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

سنجیده می‌شود. به‌دلیل عدم وجود آنزیم در شاهد روشنایی، احیای NBT در حضور نور به‌طور ۱۰۰درصد انجام گرفته و تمام نیتروبلوتترازولیوم موجود در محلول واکنش، به فورمازون[1] تبدیل می‌شود. میزان جذب این شاهد در ۵۶۰نانومتر نشان‌دهندهٔ ۱۰۰درصد احیای نوری NBT است و نیمی از آن، معادل یک واحد آنزیمی می‌باشد. بنابراین، یک واحد آنزیمی[2] سوپراکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰درصد ممانعت از احیای نوری NBT می‌گردد. اختلاف جذب نمونه‌ها و شاهد روشنایی در ۵۶۰نانومتر، نشان‌دهندهٔ مهار احیای نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه می‌باشد. با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه‌ها، محاسبه شده و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) در ۱۰۰میکرولیتر عصارهٔ به‌دست‌آمده مطابق روش (Lowry *et al.*, 1951) بیان گردید.

تجزیهٔ آماری

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

نتایج و بحث

صفات اندام هوایی

ارتفاع بوته

نتایج مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که با افزایش تنش خشکی، ارتفاع بوته در تمامی ژنوتیپ‌ها کاهش یافت اما کاهش ارتفاع بوته نسبت به شاهد، تنها در سطح تنش ۲۵FCدرصد معنی‌دار بود (جدول۱). بیشترین و کمترین ارتفاع بوته، به‌ترتیب به ژنوتیپ‌های MCC588 و MCC776 تعلق داشت (داده‌ها نشان داده نشده است). مقایسهٔ میانگین مشاهدات مربوط به برهم‌کُنش ژنوتیپ و تنش خشکی، نشان داد که در تمامی ژنوتیپ‌ها، ارتفاع بوته با کاهش رطوبت خاک کاهش یافت (جدول۲). ارتفاع بوته در بالاترین سطح تنش خشکی (۲۵FCدرصد)، نسبت به شاهد (۱۰۰FCدرصد) به‌طور متوسط، حدود ۲۱درصد کاهش یافت. گرچه ارتفاع بوته در ژنوتیپ‌های حساس به خشکی MCC776 و MCC588 با کاهش درصد رطوبت خاک کاهش یافت، اما درصد کاهش ارتفاع بوته در ژنوتیپ‌های فوق نسبت به همین ژنوتیپ‌ها در شرایط بدون تنش (FC)، معنی‌دار نبود (جدول۲). بیشترین ارتفاع بوته، به ژنوتیپ MCC588 در تیمار شاهد و کمترین آن به ژنوتیپMCC776 و در بالاترین سطح تنش خشکی (۲۵ FCدرصد)، تعلق داشت. در یک آزمایش، با کاهش رطوبت خاک از ظرفیت زراعی (۱۰۰FCدرصد) به ۲۵FCدرصد، ارتفاع گیاهچه‌های نخود از ۲۰/۲ به ۳/۷ سانتی‌متر کاهش یافت Majnoon Hossieini *et al.*, (2009b). کاهش فاصلهٔ میانگره‌ها و متعاقب آن ارتفاع کمتر بخش هوایی، یک سازوکار مهم سازگاری گیاهان در شرایط تنش خشکی است (Gupta, 1997).

وزن‌خشک اندام هوایی

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

شدت کاهش وزن‌خشک اندام هوایی در بالاترین سطح تنش در ژنوتیپ حساس MCC588، بیش از سایرین بود (جدول۲). Majnoun Hossieni *et al.*, 2009a، کاهش وزن‌خشک اندام هوایی را در شرایط رطوبت محدود (۲۵FCدرصد) نسبت به شاهد (۱۰۰FCدرصد) برای نخودهای تیپ کابلی ۸۵-۷۹درصد و برای تیپ دسی، ۷۹-۷۷درصد گزارش کردند. عدم وجود تفاوت‌های معنی‌دار میان ژنوتیپ‌ها در اغلب سطوح تنش خشکی و تیمار شاهد از نظر وزن‌خشک اندام هوایی (جدول۲)، ممکن است تا حدی به این موضوع مرتبط باشد.

سطح برگ

تفاوت‌های معنی‌داری میان ژنوتیپ‌ها از نظر سطح برگ وجود نداشت ($p< 0.05$). بیشترین و کمترین سطح برگ در گیاه به‌ترتیب به ژنوتیپ‌های MCC776 وMCC558 تعلق داشت، ولی تفاوت موجود، معنی‌دار نبود (داده‌ها ارائه نشده

1- Furmazone
2- Enzyme unit

است). این نتایج با روند وزن‌خشک اندام هوایی (برگ+ساقه) مطابقت دارد. اختصاص بیشتر مواد فتوسنتزی به ریشه‌ها در مراحل اولیهٔ رشد گیاه تا شروع گل‌دهی، احتمالاً دلیل اصلی عدم وجود تفاوت‌های معنی‌دار میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. برهمکُنش ژنوتیپ و تنش خشکی، تأثیر معنی‌داری بر سطح برگ گیاه داشت (جدول ۱). با کاهش آب قابل‌دسترس، سطح برگ، تقریباً در تمامی ژنوتیپ‌ها کاهش یافت (جدول۲).

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

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

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

ns، *، **: به‌ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد.

ns, * and **: no significant and significant at 5 and 1% levels of probability, respectively.

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

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

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

میانگین‌هایی که در هر ستون، حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Similar letters in each column indicate no significant difference according to Duncan Multiple Range Test ($p< 0.05$) between treatments.

این نتایج با مطالعات (Neumann, 1995) در شرایط تنش خشکی که بیان داشت سطح برگ‌ها به‌دلیل بسته‌شدن روزنه‌ها کاهش می‌یابد، مطابقت دارد. Majnoun Hossieni *et al*. (2009b) کاهش سطح برگ، سطح ویژهٔ برگ و تعداد شاخه در گیاهچه‌های نخود را با کاهش رطوبت خاک گزارش کردند. Lecoeur & Sinclair (1996) بیان داشتند فرایندهایی در گیاه که وابسته به حجم سلول می‌باشند، مخصوصاً به کمبود آب حساس هستند. آنها اظهار داشتند رشد برگ و سرعت تبادل Co_2 دو فرایند حساس در گیاه هستند که وابسته به حجم سلول‌های محافظ و بطور کلّی آماس سلولی می‌باشند، بنابراین در شرایط تنش خشکی بایستی کاهش شاخص سطح برگ و تولید اسیمیلات در گیاه را انتظار داشت. بیشترین و کمترین کاهش سطح برگ با کاهش آب قابل‌دسترس به‌ترتیب به ژنوتیپ‌های MCC588 و MCC877 تعلق داشت (جدول۲). ژنوتیپ مقاوم به خشکی MCC877 از نظر سطح برگ در تمام سطوح تنش، یکسان بود. به عبارت دیگر، تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر کاهش سطح برگ این ژنوتیپ نداشت (جدول۲). حفظ آماس سلولی و پتانسیل فشاری آب برگ باوجود کاهش آب خاک، یک ویژگی مهم گیاهان متحمل به خشکی است (Turner *et al*., 2003).

صفات ریشه

وزن‌خشک ریشه

ژنوتیپ‌های نخود از نظر وزن‌خشک ریشه، تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p\leq 0.05$). سطوح مختلف تنش خشکی، تأثیر معنی‌داری بر وزن‌خشک ریشه داشت و با کاهش مقدار رطوبت، وزن‌خشک ریشه در تمام ژنوتیپ‌ها کاهش یافت (جدول۲). وزن‌خشک ریشه در سطوح رطوبتی ۷۵ و۵۰درصد ظرفیت زراعی، با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند، اما ژنوتیپ‌های MCC696 و MCC588 در شرایط ۲۵FCدرصد، از نظر بیوماس ریشه تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند. به‌نظر می‌رسد کاهش رطوبت تا ۵۰FCدرصد ، تأثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های ریشه نخود نداشته و سطوح رطوبتی کمتر از این میزان برای رشد ریشهٔ اغلب ژنوتیپ‌های نخود، محدودکننده است. کاهش سطح برگ، اولین واکنش گیاه در مواجهه با تنش خشکی است، بنابراین با افزایش تداوم تنش، همزمان با کاهش فتوسنتز گیاه و افزایش نیاز گیاه به کربوهیدرات برای تنظیم اسمزی سلول، دسترسی به مواد فتوسنتزی کاهش یافته و درنتیجه، رشد ریشه کاهش و در نهایت، متوقف خواهد شد (Lu *et al*., 1998). بررسی‌ها در این ارتباط نشان می‌دهند که واکنش ریشه بسته به شدت تنش، گونهٔ گیاهی و مرحلهٔ فنولوژی گیاه، متفاوت است (Saxina, 2003; Fageria *et al*., 2006).

مجموع طول ریشه‌ها

مشابه وزن‌خشک ریشه، ژنوتیپ‌های نخود از نظر مجموع طول ریشه‌ها، تفاوت‌های معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول۱). در این ارتباط، همبستگی مثبت و بسیار معنی‌داری میان مجموع طول ریشه‌ها و وزن‌خشک ریشه در گیاه نخود گزارش شده است (Ganjeali & Kafi, 2007). با کاهش درصد رطوبت محیط کشت، مجموع طول ریشه‌ها کاهش یافت، اما مجموع طول ریشه‌ها، تنها در سطح رطوبتی ۲۵FCدرصد نسبت به تیمار شاهد (FC) معنی‌دار بود (داده‌ها نشان داده نشده است). به‌نظر می‌رسد سطوح خشکی معادل۵۰درصد و ۷۵FCدرصد به‌راحتی توسط گیاه، تحمل شده و گیاه هیچ واکنش مشهودی را از نظر تغییر در صفات مربوط به ریشه اتخاذ نکرده است. برهمکُنش تنش خشکی و ژنوتیپ، تأثیر معنی‌داری بر مجموع طول ریشه‌ها داشت (جدول۱). تمامی ژنوتیپ‌های نخود، به‌جُز ژنوتیپ‌های MCC696 و MCC588 که طول مجموع ریشه‌ها در این ژنوتیپ‌ها در پایین‌ترین سطح رطوبتی خاک (۲۵FCدرصد) با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند، از نظر مجموع طول ریشه‌ها در تمامی سطوح تنش، یکسان بودند و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول۲). بنابراین مجدداً تأیید می‌شود که نخود، یک گیاه کارآمد از نظر جذب آب و عناصر غذایی است و عکس‌العمل صفات مربوط به ریشهٔ این گیاه، حتی در مواجهه با تنش‌های شدید، ملایم است. ژنوتیپ‌های منتخب در این آزمایش، حاصل انتخاب از توده‌های بومی هستند که طی سالیان متمادی به‌خوبی به شرایط سخت محیطی سازگار شده‌اند.

سطح ریشه‌ها

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

تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر سطح ریشه‌های نخود داشت ($p\leq 0.05$). با کاهش درصد رطوبت خاک، سطح ریشه‌ها کاهش یافت، اما کاهش سطح ریشه‌ها در سطوح تنش خشکی معادل ۵۰ و ۷۵درصد ظرفیت زراعی نسبت به شاهد، معنی‌دار نبود، ولی تفاوت آن با پایین‌ترین سطح رطوبتی (۲۵FCدرصد)، معنی‌دار بود (داده‌ها نشان داده نشده است). برهمکُنش تنش خشکی و ژنوتیپ، تأثیر معنی‌داری بر سطح ریشه‌ها داشت (جدول۱). مشابه مجموع طول ریشه‌ها، تمامی ژنوتیپ‌های نخود، به‌جُز ژنوتیپ‌های MCC696 و MCC588 که طول مجموع ریشه‌ها در این ژنوتیپ‌ها در پایین‌ترین سطح رطوبتی خاک (۲۵FCدرصد) با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند، سایر ژنوتیپ‌ها از نظر سطح ریشه‌ها در تمامی سطوح تنش، یکسان بودند و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول۲).

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

تغییرات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

میزان پرولین برگ

نتایج تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که ژنوتیپ، تنش خشکی و برهمکُنش آنها، تأثیر معنی‌داری بر میزان پرولین برگ گیاه داشت (جدول۳). بیشترین و کمترین مقدار پرولین، با مقادیر ۶/۷۸ و ۳/۲۴ میکرومول در گرم وزن‌تر، به‌ترتیب به ژنوتیپ‌هایMCC696 و MCC776 تعلق داشت که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و با سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی داشتند (جدول۴). در این آزمایش، مقدار پرولین در ژنوتیپ مقاوم به خشکی (MCC877) بیشتر از ژنوتیپ حساس به خشکی (MCC776) و کمتر از ژنوتیپ بومی کاندیدا برای تحمل به خشکی (MCC696) بود. با کاهش میزان رطوبت خاک، مقدار پرولین در تمام ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. بالاترین مقدار پرولین، به ژنوتیپ MCC696 در شرایط ۲۵FCدرصد اختصاص داشت که تفاوت آن با سایر ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف رطوبتی، معنی‌دار بود. در پایین‌ترین سطح رطوبتی، ژنوتیپ MCC696 از نظر پرولین، تفاوت معنی‌داری با ژنوتیپ MCC588 نداشت. در این آزمایش، کمترین میزان پرولین به ژنوتیپ MCC877 در شرایط بدون تنش (FC) اختصاص داشت (جدول۴).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تأثیر ژنوتیپ و تنش خشکی بر خصوصیات بیوشیمیایی گیاه نخود

Table 3. Data Analysis of variance showing the effect of genotype and stress levels on biochemical characteristics of chickpea

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

ns، * و **، به‌ترتیب بیانگر عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

ns, * and ** indicating non significant and significant at 5 and 1% levels of probability, respectively.

تجمع پرولین و سایر اسمولیت‌ها برای حفظ تورژسانس سلول‌های گیاهی، قسمتی از مکانیسم‌های مقاومت در برابر تنش خشکی است (Huang *et al.*, 2000). به‌علاوه، شواهد دیگری مبنی بر تجمع زیاد این ترکیبات در گیاهان به جهت جلوگیری از برخی آسیب‌های ناشی از تنش خشکی که منجر به اختلال در استحکام غشاء می‌شوند، وجود دارد (Schwab & Gaff, 1990). در یک مطالعه روی دو گونه ذرت[1]، میزان پرولین در گونه حساس آنکورا[2] به صورت معنی‌داری کمتر از گونه مقاوم نووا[3] بود (Valentovic *et al.*, 2006). این نتایج در ارقام حساس به شوری برنج نیز گزارش شده است (Lutts *et al.*, 1996). انباشت پرولین در شرایط تنش، ممکن است به‌علت فعال‌سازی آنزیم‌های بیوسنتزی پرولین، کاهش تخریب آن در اثر اکسیداسیون و تبدیل آن به گلوتامات، کاهش استفاده از پرولین در سنتز پروتئین‌ها و افزایش واژگردی پروتئین‌ها باشد.

پراکسید هیدروژن

ژنوتیپ، تنش خشکی و برهمکُنش ژنوتیپ و تنش خشکی، تأثیر معنی‌داری بر تولید پراکسید هیدروژن در برگ گیاه نخود داشتند (جدول۳). بیشترین و کمترین مقدار پراکسید هیدروژن، به‌ترتیب به ژنوتیپ حساس MCC776 و ژنوتیپ کاندیدای متحمل به خشکی MCC696 تعلق داشت (جدول ۵). مقدار پراکسید هیدروژن در بالاترین سطح تنش خشکی (FC۲۵درصد)، بیشترین مقدار بود که تفاوت آن با سایر سطوح تنش خشکی (FC۵۰درصد و FC۷۵درصد) و تیمار شاهد، معنی دار بود، اما سایر سطوح تنش خشکی با یکدیگر و با شاهد، تفاوت معنی‌داری نداشتند (جدول۵). افزایش مقدار رادیکال‌های آزاد مثل سوپراکسید، نتیجه مواجههٔ گیاه با تنش‌های شدید خشکی است. در این راستا، واکنش بعدی گیاه، سنتز و فعالیت بیشتر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در جهت خنثی‌سازی هرچه بیشتر آنیون مخرّب سوپراکسید می‌باشد. بدیهی است محصول این واکنش، تولید پراکسید هیدروژن است. مطالعات نشان داده است که میزان پراکسید هیدروژن در گیاه، به شدت تنش خشکی که گیاه با آن مواجه است، وابسته است (Samaras *et al.*, 1995). Menconi *et al.* (1995) بیان داشتند گیاهانی که در معرض تنش خشکی ملایم قرار دارند، میزان پراکسید هیدروژن در سطح کنترل، حفظ می‌شود. شاید در تنش‌های ملایم خشکی، عملکرد خوب سیکل آسکوربات/گلوتاتیون به گیاه اجازه می‌دهد تا باوجود توانایی بالای غشاء تیلاکوئیدی برای هدایت الکترون‌ها به‌سمت اکسیژن، میزان پراکسید هیدروژن خود را در این سطح حفظ نمایند. در مطالعهٔ دیگر روی گیاه گندم، مشاهده شدگیاهانی که در معرض خشکی ملایم قرار گرفتند، هیچ‌گونه تنش اکسیداتیو مشخصی در آنها ایجاد نگردید و افزایشی نیز در مقدار H_2O_2 مشاهده نشد (Bartoli *et al.*, 1998). نتایج مقایسهٔ میانگین پراکسید هیدروژن در ژنوتیپ‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی (MCC696 و MCC877) از کمترین مقدار پراکسید هیدروژن برخوردار بودند (جدول۵) که مؤید این است که این ژنوتیپ‌ها از قابلیت اجتناب و یا تحمل به خشکی برخوردار هستند و لذا به‌نظر می‌رسد القای تنش اکسیداتیو ناشی از ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش خشکی (Perdomo *et al.*, 1996) در این ژنوتیپ‌ها، در حداقل مقدار بوده و یا ایجاد نشده است.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشاهدات نشان داد که ژنوتیپ، تنش خشکی و برهمکُنش ژنوتیپ و تنش خشکی، تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ داشتند (جدول۳). بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، به ژنوتیپ MCC588 تعلق داشت که تفاوت معنی‌داری با ژنوتیپ‌های MCC877 وMCC696 داشت. در این آزمایش، ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی (MCC877 و MCC696) از نظر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، ولی اختلاف آنها با سایر ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود (جدول۶).

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

1- *Zea mays*
2- Ankora
3- Nova

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

آنزیم پراکسیداز

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

بررسی‌ها، مؤید این است که گونه‌های سازگار به محیط‌های خشک در شرایط بروز تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان خود را مانند پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، در جهت خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تولیدشده، افزایش می‌دهند. در این ارتباط، بالاترین فعالیت آنزیم پراکسیداز، به ژنوتیپ حساس MCC855 در بالاترین سطح تنش خشکی تعلق داشت که تفاوت آن با ژنوتیپ مقاوم به خشکی MCC877 در همین سطح تنش خشکی، معنی‌دار بود (جدول۷). گرچه با افزایش تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش پیدا کرد، ولی افزایش فوق در سطوح مختلف تنش خشکی، معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری

نخود، معمولاً در اراضی حاشیه‌ای و مناطقی که رطوبت خاک محدود است، کشت می‌شود. در چنین مناطقی، سیستم ریشه‌ای مناسب برای جذب حداکثر آب موجود در خاک و کاهش سطح برگ به‌منظورتلفات کمتر آب، می‌تواند در بهبود تحمل به خشکی گیاه، مؤثر باشد. به علاوه، تنش‌های اکسیداتیو ناشی از وقوع متناوب دوره‌های خشکی در طول فصل رشد، احتمالاً علت بعدی کاهش رشد و عملکرد این گیاه در منطقه است. لذا شناخت صفات و درک مکانیسم‌هایی در گیاه که موجب بهبود تحمل گیاه به خشکی می‌شوند، امیدبخش به‌نظر می‌رسد. نتایج این مطالعه نشان داد که اغلب صفات مورفولوژیکی مانند ارتفاع بوته، بیوماس اندام هوایی و ریشه، مجموع طول ریشه‌ها و سطح برگ، عمدتاً تحت تأثیر تنش‌های شدید خشکی قرار می‌گیرند. تنش‌های ملایم خشکی (رطوبت FC۵۰درصد و بالاتر)، تأثیر معنی‌داری بر صفات فوق نداشت. این موضوع مجدداً تأیید می‌کند که گیاه نخود، یک گیاه سازش‌یافته به شرایط سخت محیطی است که طی سالیان متمادی، تکامل یافته است. ژنوتیپ حساس MCC588 از ارتفاع بوته، سطح برگ و به‌طور کلی، بیوماس اندام هوایی بیشتری نسبت به ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی برخوردار بود. شاید تلفات بیشتر آب به‌صورت تبخیر و تعرق در این ژنوتیپ و سیستم ریشه‌ای ضعیف آن برای جبران تلفات آب، علت حساسیت این ژنوتیپ به تنش خشکی است.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Table 5. Main and interaction effects of drought stress and genotypes on H_2o_2 amount (g per 100 g leaf fresh weight)

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

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

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

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

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

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

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف می‌باشند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p<0.05$) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.
حروف بزرگ در هر ستون و ردیف، به‌طور جداگانه به‌ترتیب برای مقایسهٔ ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش خشکی می‌باشند.
Similar letters in each column and row indicate no significant difference according to Duncan Multiple Range Test ($P<0.05$) between means.
Capital letters in row and column are for comparing genotypes and drought stress, respectively, and they should be comparing separately.

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

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

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

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف می‌باشند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p<0.05$) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.
حروف بزرگ در هر ستون و ردیف، به‌طور جداگانه به‌ترتیب برای مقایسهٔ ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش خشکی می‌باشند.
Similar letters in each column and row indicate no significant difference according to Duncan Multiple Range Test ($P<0.05$) between means.
Capital letters in row and column are for comparing genotypes and drought stress, respectively, and they should be comparing separately.

منابع

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

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

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

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 3, No. 2, 2012, p. 17-30

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

Abrishamchi[1], P., Ganjeali[1*], A. & Sakeni[2], H.

1- Contributions from College of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad
2- MSc. in Biology, Plant Physiology

Received: 25 September 2010
Accepted: 05 January 2011

Abstract

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

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

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