

## اثر تنش آب بر برخی محلول‌های سازگارکننده و پایداری غشاء در دو گونه اسپرس (*Onobrychis viciifolia* و *Onobrychis radiata*)

پروین رامک<sup>۱\*</sup>، محمد مهرنیا<sup>۱</sup> و صدیقه اسمعیل زاده بهابادی<sup>۲</sup>

۱- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران

### چکیده

در این تحقیق اثر تنش آب بر برخی محلول‌های سازگار کننده شامل: پرولین، قندهای محلول و گلیسین بتائین و میزان پراکسیداسیون چربی‌ها و پایداری غشاء در دو گونه اسپرس (*Onobrychis radiata* (Desf.) M.Bieb و *Onobrychis viciifolia* Scop.) بررسی شد. طرح آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار بود و تنش آب بر اساس آبیاری در سطوح ۵۰، ۶۰، ۷۵ و ۱۰۰ ظرفیت مزرعه‌ای اعمال شد. نتایج نشان داد دو گونه *O.viciifolia* و *O.radiata* پاسخ‌های فیزیولوژیکی متفاوتی در مواجهه با تنش‌های اعمال شده، دارند. گونه *O.radiata* قابلیت بیشتری در تجمع قندهای محلول و گلیسین بتائین داشت. محتوی آب نسبی در گونه *O.viciifolia* روند کاهشی شدیدتری در مقایسه با گونه *O.radiata* داشت و میزان محتوی آب نسبی از دست‌رفته در گونه *O.viciifolia* در همه سطوح تنش‌های اعمال شده، کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد داشت به طوری که این گونه قادر به تحمل تنش FC ۵۰٪ نبود و خشک شد. میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در گونه *O.radiata* کمتر از گونه *O.viciifolia* بود و غشاء سلول‌های برگ در گونه *O.radiata* از پایداری بالاتری نسبت به گونه *O.viciifolia* برخوردار بود.

**واژگان کلیدی:** اسپرس، پایداری غشاء، پراکسیداسیون چربی، تنش آب، محلول‌های سازگار کننده

\* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: ramak30@yahoo.com

## مقدمه

در طبیعت تنش های محیطی مختلفی بقاء، عملکرد و رشد گیاهان را تهدید می کنند. در بین تنش های محیطی، تنش خشکی بیشترین صدمات را بر تولیدات گیاهی وارد می کند. گیاهان به عنوان موجودات بی تحرک، قادر به فرار در برابر تنش های محیطی نیستند، لذا سعی می کنند با استفاده از مکانیسم های متابولیسمی به تنش های محیطی پاسخ داده و قابلیت تحمل تنش را افزایش دهند (Pérez-Clemente et al., 2013). تجمع محلول های سازگار کننده (Compatible Solutes) یکی از مکانیسم های مؤثر در تعدیل تنش های اسمزی ناشی از کم آبی یا شوری است. محلول های سازگار کننده، قادر به حفظ تورژسانس سلول ها و فرآیندهای وابسته به آن در پتانسیل های پایین آب هستند (Vinocur and Altman, 2005). از طرفی محلول های سازگار کننده با کاهش اثرات مخرب گونه های فعال اکسیژن و جلوگیری از پراکسیداسیون چربی های غشاء و نیز با حفاظت از پروتئین های غشاء، به سلامت و یکپارچگی غشاء کمک نموده و سبب افزایش آستانه تحمل به تنش اسمزی می شوند (Zhang et al., 2008). پرولین، گلیسین بتائین و قندهای محلول از جمله مهم ترین محلول های سازگار کننده ای هستند که اثرات مثبت آن ها در تعدیل تنش های اسمزی و حفظ غشاهای پلاسمایی گزارش شده است (Pérez-Clemente et al., 2013).

گونه های سرده اسپرس (*Onobrychis*) عمدتاً در نواحی شمال غربی آسیا و در دو کشور ایران و ترکیه گسترش دارند و این نواحی به عنوان مرکز اصلی تنوع ژنتیکی سرده اسپرس شناخته می شوند (Irfan et al., 2007). جنس اسپرس در ایران دارای ۶۳ گونه یک ساله و چند ساله است که در مناطق مختلف آب و هوایی پراکنش یافته اند (Mozaffarian, 1996). تعدادی از گونه های این سرده به دلیل داشتن پروتئین بالا، ارزش علوفه ای فوق العاده ای در تغلیف دام دارند. اسپرس ها با جلب زنبور عسل علاوه بر

تداوم نسل خود، به حفظ و بقاء گیاهان اکوسیستم خود نیز کمک می نمایند. گونه های اسپرس به دلیل داشتن ریشه های عمیق از فرسایش خاک جلوگیری نموده و سبب بهبود ساختمان و کیفیت خاک می شوند (Buyukburc et al., 1991). اسپرس زراعی با نام علمی *Onobrychis viciifolia* Scop و اسپرس کوهستان با نام علمی *Onobrychis radiata* (Desf.) Bieb از جمله گیاهان علوفه ای مهم در ایران هستند که با خاک های آهکی مناطق کوهستانی و سنگلاخی سازگاری دارند و در برابر چرای مفرط از خود مقاومت نشان می دهند (Heydari Sharif Abadi and Dori, 2001). اسپرس زراعی نه تنها به دلیل تولید مناسب و کیفیت عالی علوفه، در کشت زراعی حائز اهمیت است بلکه به دلیل تحمل بالایی که نسبت به تنش های زیستی به خصوص خشکی دارد، برای احیاء مراتع و تبدیل دیمزارهای کم بازده و رها شده به علوفه کاری دیم نیز استفاده می شود (Dadkhah et al., 2011). بررسی اثر تنش خشکی در ۱۰ رقم اسپرس زراعی نشان داده که محتوی نسبی آب برگ شاخص خوبی برای سنجش کارایی و عملکرد ژنوتیپ های مقاوم به تنش آب می باشد و رقمی که بتواند بیشترین محتوی نسبی آب برگ را در شرایط تنش حفظ نماید، بیشترین عملکرد را دارد (Veisipoor et al., 2013). تنش آب سبب کاهش رنگیزه های فتوسنتزی و آسیمیلاسیون کربن در دو گونه *O. radiata* و *O. viciifolia* می شود (Ramak et al., 2006). همچنین تجمع نیترات و نقش آن در تعدیل اثرات تنش آب در دو گونه *O. viciifolia* و *O. radiata* گزارش شده است (Ramak et al., 2005).

ایران با متوسط بارندگی ۲۲۰ میلی متر در سال از جمله سرزمین های خشک محسوب می شود لذا با عنایت به لزوم حفظ خاک و جلوگیری از فرسایش آن در مراتع، تأمین نیاز غذایی دام و افزایش محصولات دامی در پاسخ به تقاضای روزافزون، توسعه کشت نباتات علوفه ای مقاوم به تنش کم آبی در مزارع دیم و مراتع آسیب دیده، در آینده الزام آور

FC = ظرفیت مزرعه، FW = وزن تر، DW = وزن خشک  
 به مدت ۲۵ روز گلدان‌ها در سطح رطوبت ظرفیت مزرعه  
 آبیاری (FC ۱۰۰٪) شدند. پس از سپری شدن این مدت  
 تیمارهای تنش آب (۵۰، ۶۰ و ۷۵ درصد FC) در چهار  
 تکرار اعمال شدند. گیاهان آبیاری شده در FC ۱۰۰٪  
 به‌عنوان نمونه‌های شاهد در نظر گرفته شدند. وزن گلدان‌ها  
 (با تخمین وزن گیاهان کاشته شده) هر روز کنترل و آبیاری  
 تا حدی انجام می‌شد که در هر تیمار رطوبت به حد مورد  
 نظر برسد و جهت کنترل تنش‌های اعمال شده محتوی آب  
 نسبی (Relative Water Content; RWC) و محتوای نسبی  
 آب از دست‌رفته (Relative Water Loss; RWL) برگ‌ها  
 نیز اندازه‌گیری شد. ۲۰ روز پس از اعمال تنش‌ها از گلدان‌ها  
 نمونه‌برداری شد. وزن تر نمونه‌ها یادداشت و برای  
 سنجش‌های بیوشیمیایی بعضی از نمونه‌ها در آون خشک  
 شدند و برخی هم در دمای ۲۰ °C - تا زمان سنجش‌ها در  
 فریزر نگهداری شدند.

**محتوای نسبی آب برگ ( Relative Water Content; )  
 (RWC):**

۰/۵ گرم از جوان‌ترین برگ‌های توسعه یافته هر گیاه جدا  
 شده و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی آب مقطر  
 شناور شدند. چهار ساعت پس از آب‌گیری، قطعات برگ  
 بلافاصله وزن شدند تا وزن برگ‌ها در حالت تورژسانس  
 به‌دست آید. پس از آنکه قطعات برگ در آون ۷۰ °C به  
 مدت ۴۸ ساعت خشک شدند تا وزن خشک نمونه برگی  
 به‌دست آید و برای محاسبه محتوی نسبی آب برگ‌ها از  
 رابطه زیر استفاده شد (Gunes et al., 2008):

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

FW = وزن تر نمونه برگی، TW = وزن برگ‌ها در حالت  
 تورژسانس و DW = وزن خشک نمونه برگی

**محتوای نسبی آب از دست‌رفته برگ ( Relative  
 (Water Loss; RWL):**

خواهد بود. شناخت قابلیت‌ها و رفتارهای فیزیولوژیک گیاه  
 علوفه‌ای اسپرس در شرایط کم آبی، می‌تواند به طراحی و  
 عملیاتی کردن پروژه‌های اصلاح و به‌نژادی این گیاه از  
 طریق مهندسی ژنتیک یا متابولیک کمک نماید.

#### مواد و روش‌ها

در این آزمایش تأثیر تنش آب بر برخی محلول‌های  
 سازگاری (Compatible Solutes) از جمله قندهای غیر  
 ساختمانی، پرولین و نیترات و نقش این محلول‌های  
 سازگاری در ایجاد مقاومت و پایداری غشاء در دو گونه  
 اسپرس با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب  
 آزمایش‌های فاکتوریل مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### مواد گیاهی و اعمال تنش‌ها

بذر دو گونه *Onobrychis vicifolia* و *Onobrychis  
 radiata* از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر  
 وزارت جهاد کشاورزی تهیه شدند. بذرها پس از ضدعفونی  
 با هیپوکلریت سدیم (۸٪) در گلدان‌هایی به قطر ۱۵  
 سانتی‌متر کاشته شدند. کف گلدان‌ها سوراخ و به‌منظور زه  
 کش حدود ۲ سانتی‌متر شش در کف آن‌ها ریخته شد. خاک  
 گلدان‌ها یکسان و با آزمایش‌های خاک‌شناسی ویژگی‌های  
 آن مشخص گردید (جدول ۱). گلدان‌ها در اتاق کشت با  
 دمای شب و روز به‌میزان حداقل ۱۲ °C و حداکثر ۳۵ °C و  
 شرایط روشنایی ۱۶ h و تاریکی ۸ h نگهداری می‌شدند.

تنش‌ها بر اساس ۵۰، ۶۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت  
 مزرعه‌ای (Field Capacity; FC) اعمال شدند. برای  
 اندازه‌گیری میزان آب در ظرفیت مزرعه (FC)، خاک تا حد  
 اشباع خیس و سطح آن پوشانده شد تا از تبخیر سطحی  
 جلوگیری شود. پس از گذشت سه روز نمونه‌برداری از  
 خاک به‌عمل آمد و وزن تر آن یادداشت شد. نمونه ۲۴  
 ساعت در آون ۱۰۵ °C خشک شد و با استفاده از فرمول  
 Heydari Sharif ( Heydari Sharif )  
 (Abadi, 2000).

$$FC = (FW / DW) \times 100$$

جدول ۱- مشخصات خاک شناسی، خاک مورد استفاده

بافت	PH	E.C. (dS/m)	پتاسیم قابل جذب (p.p.m)	فسفر قابل جذب (p.p.m)	کربن آلی (O.C%)	نیتروژن (%)	CaCO3 (%)
لومی	۷/۶	۲/۸	۵۵۰	۲۶/۷	۹/۲	۰/۱	۳/۵

محتوی نسبی آب از دست رفته برگ‌ها به روش Egert و Tevini (2002) و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

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

$FW$  = وزن تر نمونه برگگی؛  $WW$  = وزن پژمردگی برگ‌ها ۵ ساعت پس از قرار گرفتن در دمای  $35^\circ C$ ؛  $TW$  = وزن برگ‌ها در حالت تورژسانس و  $DW$  = وزن خشک نمونه برگگی

#### سنجش قندهای محلول و نشاسته:

قندهای محلول و نشاسته به روش Kochert (۱۹۷۸) از ماده خشک اندام هوایی و ریشه استخراج شد. جذب محلول‌های حاصل در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز، میزان قند نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک محاسبه شد.

#### سنجش پرولین:

با استفاده از معرف نین هیدرین و به روش Bates و همکاران (۱۹۷۳)، محتوی پرولین بافت تر اندام‌های هوایی و ریشه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج بر حسب میکروگرم در گرم وزن تر گزارش گردید.

#### سنجش گلیسین بتائین:

میزان گلیسین بتائین به روش Grattan و Grieve (۱۹۹۲) با استفاده از ۰/۳ گرم از ماده خشک گیاهی و معرف یدید پتاسیم و اسیدسولفوریک دو نرمال و ۱ و ۲ دی کلرو اتان، به کمک منحنی استاندارد و جذب نمونه‌ها در ۳۶۵ نانومتر بر حسب میکروگرم در میلی‌گرم وزن خشک محاسبه گردید.

#### سنجش میزان نشت غشاء سلولی:

برای سنجش پایداری غشاءهای سلولی در برگ، میزان نشت الکترولیت‌ها به روش Sairam و همکاران (2002) اندازه‌گیری شد. به این منظور جوان‌ترین برگ‌های بالغ انتهایی تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در ظروف شیشه‌ای درب دار در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس میزان هدایت الکتریکی محلول همراه نمونه، به‌عنوان نشت اولیه اندازه‌گیری شد. نشت ثانویه نیز از طریق اندازه‌گیری میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها پس از حرارت دادن آن‌ها به مدت یک ساعت و در  $100^\circ C$  درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. میزان نشت الکترولیت از غشاءها از رابطه زیر محاسبه شد.

#### سنجش پراکسیداسیون لیپیدها:

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی بر اساس تشکیل کمپلکس مالون دی‌آلدئید (MDA; Malondialdehyde) با تیوباربتوریک اسید (TBA) سنجش شد و غلظت MDA به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) با استفاده از ضریب تصحیح  $1.55 \times 10^5 M^{-1} Cm^{-1}$  در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب میکرومول در میلی‌گرم وزن خشک محاسبه و ارائه گردید.

#### تحلیل‌های آماری:

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.18 تحلیل شدند. میانگین‌ها در  $P=0/05$  با استفاده از آزمون دانکن با یکدیگر مقایسه و نمودارها با Excel 2007 رسم شدند.

#### نتایج

#### اثر تنش آب بر میزان قندهای محلول و نشاسته:

*O.viciifolia* مقدار گلیسین بتائین ریشه‌ها در گیاهان شاهد و گیاهان تحت تنش بیشتر از اندام هوایی بود. تحت تأثیر تنش‌های اعمال شده میزان گلیسین بتائین در اندام هوایی و ریشه‌های گونه *O.viciifolia* نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش داشت و بیشترین افزایش در تنش FC ۷۵٪ قابل مشاهده بود. تنش FC ۷۵٪ اثر معنی‌داری بر محتوی گلیسین بتائین اندام‌های هوایی گونه *O.radiata* نداشت، اما میزان گلیسین بتائین در تنش‌های FC ۶۰٪ و FC ۵۰٪ در مقایسه با نمونه‌های شاهد، افزایش معنی‌داری داشت. میزان گلیسین بتائین ریشه‌ها در کلیه سطوح تنش‌های اعمال شده، افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد داشت، اما این افزایش بین سطوح تنش معنی‌دار نبود. با اینکه مقدار گلیسین بتائین در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی گونه *O.radiata* در مقایسه با نمونه‌های شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند، اما تحت تأثیر تنش‌های اعمال شده مقدار گلیسین بتائین ریشه‌ها بیشتر از اندام هوایی بود (شکل ۲b).

#### اثر تنش آب بر پراکسیداسیون چربی‌ها و پایداری غشاءهای برگ

در اثر تنش‌های اعمال شده، میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان شاخصی از پراکسیداسیون چربی‌ها، در دو گونه *O.viciifolia* و *O.radiata* افزایش نشان داد. بیشترین میزان MDA در تنش FC ۶۰٪ و در گونه *O.viciifolia* مشاهده شد. تنش‌های FC ۷۵٪، FC ۶۰٪ و FC ۵۰٪ اثر معنی‌داری بر میزان MD در گونه *O.radiata* در مقایسه با نمونه‌های شاهد نداشتند، اما تفاوت بین سطوح تنش‌های ذکر شده معنی‌دار نبود (شکل ۳a).

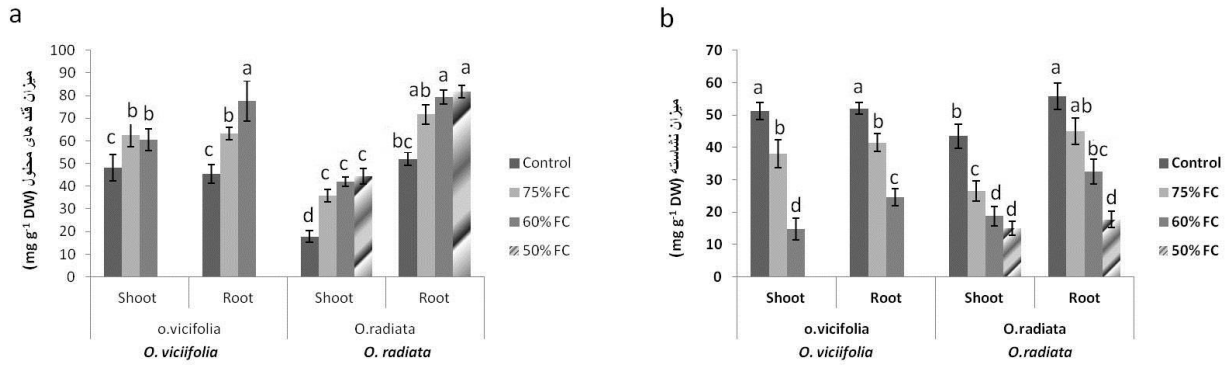
در همه سطوح تنش‌های اعمال شده میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگ گونه *O.viciifolia* تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نداشتند و با افزایش شدت تنش‌ها بر میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگ افزوده شد (شکل ۳b). در گونه *O.radiata* تنش‌های FC ۷۵٪ و FC ۶۰٪ اثر معنی‌داری بر میزان نشت الکترولیت از غشاءهای

سطوح مختلف تنش‌های اعمال شده سبب افزایش محتوی قند محلول اندام‌های هوایی و ریشه‌ها در هر دو گونه *O.viciifolia* و *O.radiata* شد (شکل ۱a) به طوری که با افزایش شدت تنش بر محتوی قندهای محلول در اندام‌های هوایی و ریشه افزوده می‌شد. تجمع قندهای محلول در ریشه‌ها در هر دو گونه بیشتر از اندام‌های هوایی بود. در تنش FC ۶۰٪ میزان قندهای محلول در گونه *O.radiata* نسبت به نمونه شاهد بیش از ۶۰ درصد افزایش نشان داد، در حالی که میزان قندهای محلول در گونه *O.viciifolia* در همین سطح از تنش، نسبت به نمونه شاهد حدود ۲۷ درصد افزایش داشت. کاهش رطوبت خاک سبب کاهش معنی‌دار میزان نشاسته در ریشه و اندام هوایی هر دو گونه *O.viciifolia* و *O.radiata* شد. محتوی نشاسته اندام‌های هوایی و ریشه در گونه *O.viciifolia* تفاوت معنی‌داری در نمونه شاهد و یا سطوح مختلف تنش با هم نداشتند. در گونه *O.radiata* محتوی نشاسته اندام‌های هوایی و ریشه‌ها در تنش FC ۵۰٪ تفاوت معنی‌داری نداشتند اما در سایر سطوح تنش، ریشه‌ها در مقایسه با اندام هوایی از محتوی نشاسته بالاتری برخوردار بودند (شکل ۱b).

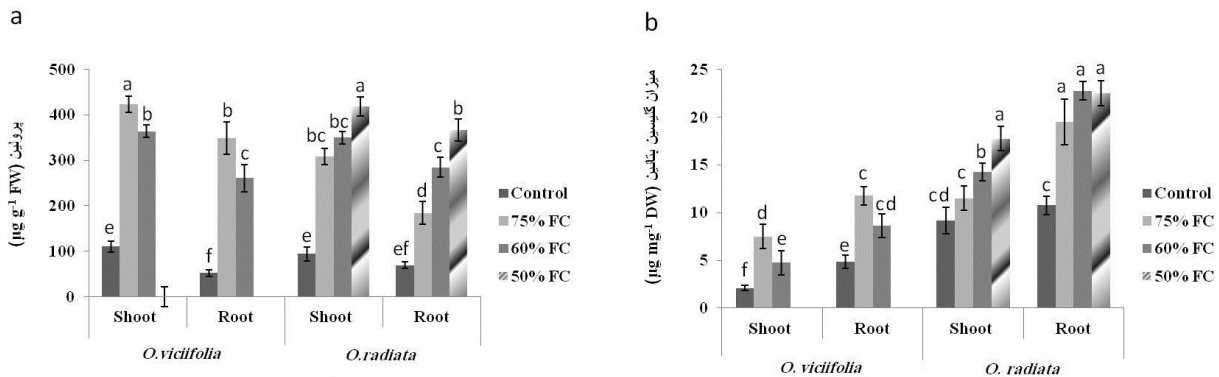
#### اثر تنش آب بر میزان پرولین و گلیسین بتائین:

نتایج نشان داد که تنش‌های اعمال شده، تغییر معنی‌داری در میزان پرولین ریشه و اندام هوایی هر دو گونه *O.viciifolia* و *O.radiata* ایجاد کرده است. در تنش FC ۷۵٪ تجمع پرولین در اندام هوایی و ریشه گونه *O.viciifolia* بسیار افزایش نشان داد، به طوری که ۴ برابر گیاهان شاهد بود، اما با افزایش شدت تنش (FC ۶۰٪) مقدار پرولین اندکی کاهش داشت. میزان پرولین در اندام‌های هوایی و ریشه گونه *O.radiata* با شدت یافتن تنش، افزایش نشان داد و بیشترین مقدار پرولین در تنش FC ۵۰٪ مشاهده شد (نمودار ۲a).

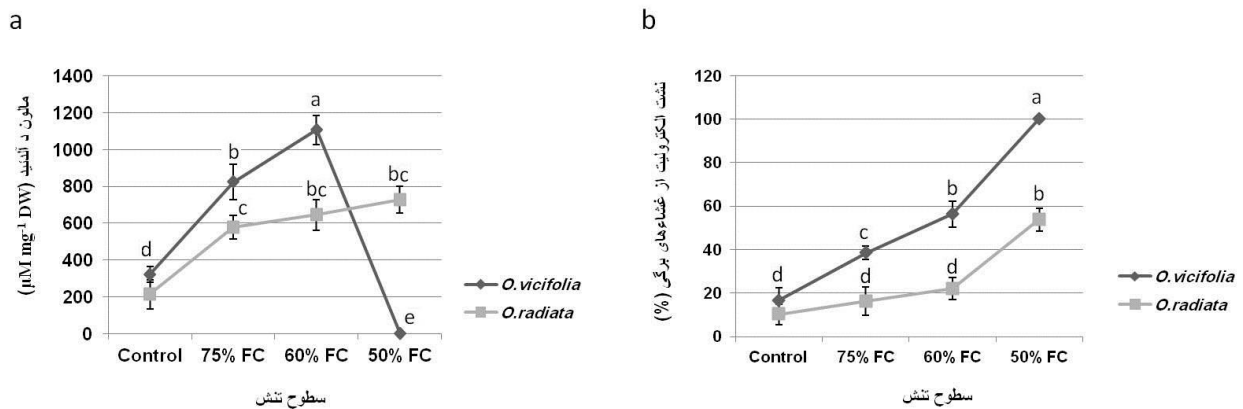
روند تغییرات و میزان گلیسین بتائین در دو گونه *O.viciifolia* و *O.radiata* با یکدیگر متفاوت بود. در گونه



شکل ۱- تأثیر تنش آبی بر میزان قندهای محلول (a) و نشاسته (b) در گونه های *O. radiata* و *O. vicifolia* مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) می باشد. حروف غیرمشابه بیانگر معنی دار بودن ( $p > 0.05$ ) بر اساس آزمون دانکن می باشد.



شکل ۲- تأثیر تنش آبی بر میزان پرولین (a) و گلیسین بتاین (b) در گونه های *O. radiata* و *O. vicifolia* مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) می باشد.



شکل ۳- تأثیر تنش آبی بر میزان مالون دی آلدئید (a) و نشت الکتروولیت از غشاءهای برگ (b) در گونه های *O. radiata* و *O. vicifolia* مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) می باشد.

از گونه *O. radiata* بود به طوری که تنش FC ۶۰٪ سبب کاهش ۴۵ درصدی محتوی آب نسبی برگ‌ها در گونه *O. viciifolia* شد (شکل ۴a).

میزان محتوی آب نسبی از دست‌رفته برگ‌ها در گونه *O. viciifolia* در کلیه سطوح تنش‌های اعمال شده، همگام با شدت تنش‌ها، کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد داشت. در تنش FC ۵۰٪ برگ‌های گونه *O. viciifolia* کاملاً خشک شده و از بین رفتند. تنش‌های FC ۷۵٪ و FC ۶۰٪ تأثیر معنی‌داری بر میزان محتوی آب نسبی از دست‌رفته برگ‌ها در گونه *O. radiata* نداشتند، اما در تنش FC ۵۰٪ میزان محتوی آب نسبی از دست‌رفته برگ‌ها در این گونه ۳۵ درصد کاهش نشان داد (شکل ۴b) اثر تنش آب بر میزان ماده خشک و درصد زنده‌مانی:

تنش‌های اعمال شده بر زنده‌مانی (Viability) گیاهان گونه *O. viciifolia* در مقایسه با گونه *O. radiata* اثرات شدیدتری داشت. در تنش‌های FC ۷۵٪ و FC ۶۰٪ به ترتیب حدود ۳۰ و ۸۰ درصد از گیاهان گونه *O. viciifolia* از بین رفتند در حالی که این سطح از تنش‌ها، تأثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی گیاهان گونه *O. radiata* نداشتند. گونه *O. viciifolia* قادر به تحمل تنش FC ۵۰٪ نبود و همه گیاهان در این سطح از تنش خشک شدند. درصد زنده‌مانی گیاهان گونه *O. radiata* در تنش FC ۵۰٪، یک کاهش ۲۰ درصدی را نشان داد، اما حدود ۸۰٪ از گیاهان زنده ماندند (شکل ۵a).

وزن خشک کل (Biomass) در گونه *O. viciifolia* در اثر تنش‌های اعمال شده به شدت کاهش یافت و در تنش FC ۷۵٪ یک کاهش ۵۰ درصدی در وزن خشک کل، قابل مشاهده بود. با اینکه متوسط وزن خشک کل در تنش FC ۶۰٪ کاهش داشت، اما این کاهش تفاوت معنی‌داری با تنش FC ۷۵٪ نداشت. تنش‌های FC ۷۵٪ و FC ۶۰٪ بر وزن خشک کل گونه *O. radiata* تأثیر معنی‌داری در مقایسه با نمونه‌های شاهد نداشت، اما در تنش FC ۵۰٪ کاهش وزن خشک کل معنی‌دار بود (شکل ۵b).

برگی نداشتند، اما در تنش FC ۵۰٪، میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگ، افزایش ۴۰ درصدی نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد (شکل ۳b).

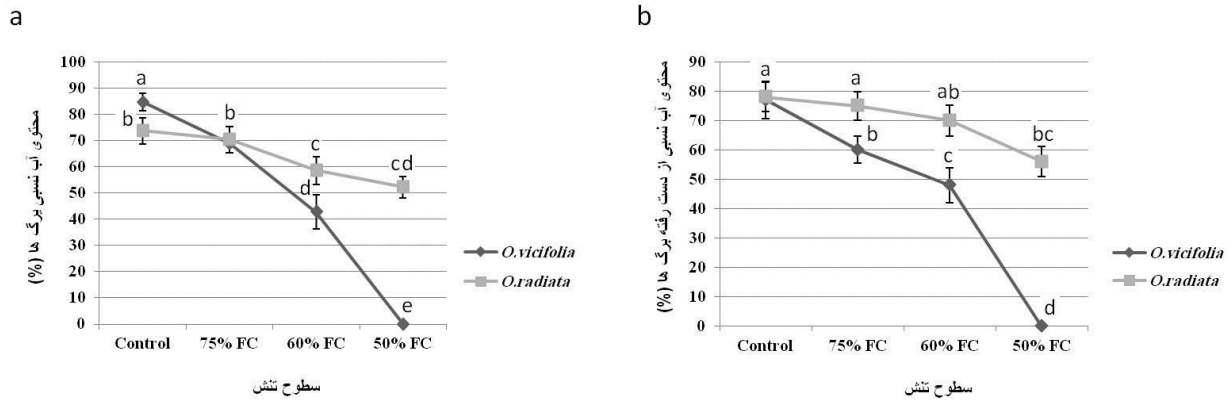
**اثر تنش آب بر پراکسیداسیون چربی‌ها و پایداری غشاءهای برگ**

در اثر تنش‌های اعمال شده، میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان شاخصی از پراکسیداسیون چربی‌ها، در دو گونه *O. radiata* و *O. viciifolia* افزایش نشان داد. بیشترین میزان MDA در تنش FC ۶۰٪ و در گونه *O. viciifolia* مشاهده شد. تنش‌های FC ۷۵٪، FC ۶۰٪ و FC ۵۰٪ اثر معنی‌داری بر میزان MD در گونه *O. radiata* در مقایسه با نمونه‌های شاهد نداشتند، اما تفاوت بین سطوح تنش‌های ذکر شده معنی‌دار نبود (شکل ۳a).

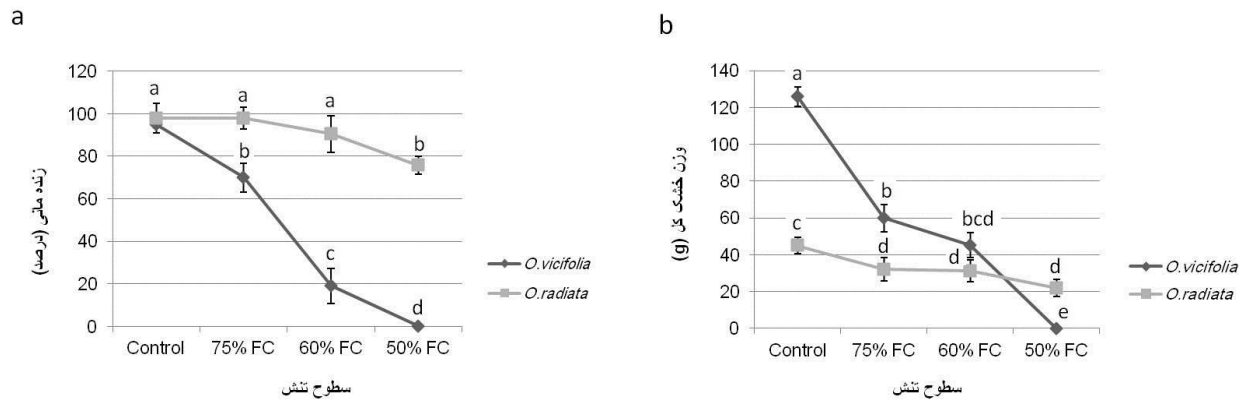
در همه سطوح تنش‌های اعمال شده میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگ گونه *O. viciifolia* تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد داشتند و با افزایش یافتن شدت تنش‌ها بر میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگ افزوده شد. در گونه *O. radiata* تنش‌های FC ۷۵٪ و FC ۶۰٪ اثر معنی‌داری بر میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگ نداشتند، اما در تنش FC ۵۰٪، میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگ، افزایش ۴۰ درصدی نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد (شکل ۳b).

**اثر تنش آب بر محتوی آب نسبی (RWC) و محتوی آب نسبی از دست‌رفته (RWL) برگ‌ها:**

در رطوبت FC ۷۵٪ محتوی آب نسبی در برگ‌های گونه *O. viciifolia* کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد داشت، در صورتی که این سطح از تنش اثر معنی‌داری بر محتوی آب نسبی برگ‌ها در گونه *O. radiata* در مقایسه با نمونه‌های شاهد نداشت. سطوح تنش FC ۶۰٪ و FC ۵۰٪ سبب کاهش معنی‌دار محتوی آب نسبی برگ‌ها در گونه *O. radiata* شدند. روند کاهش محتوی آب نسبی برگ‌ها در گونه *O. viciifolia* شدیدتر



شکل ۴- تأثیر تنش آبی بر درصد محتوی آب نسبی (a) و محتوی آب نسبی از دست رفته برگ ها (b) در گونه های *O. viciifolia* و *O. radiata* مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) می باشد.



شکل ۵- تأثیر تنش آبی بر میزان زنده مانگی (a) و وزن خشک کل (b) در گونه های *O. viciifolia* و *O. radiata* مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) می باشد.

بیشتر آب را فراهم می کنند و دوم با ایجاد لایه های محافظتی اسمزی (Osmoprotectors) که به احتمال زیاد به عنوان جانشینی برای آب عمل کرده و با دنباله های قطبی پلی پپتیدها و گروه های فسفات فسفولیپیدها از ساختار ساختمانی پروتئین ها و غشاء های سلولی محافظت می کنند (Mundree et al., 2002). به نظر می رسد افزایش بیشتر محتوی قندهای محلول در گونه *O. radiata* (۶۰ درصد بیشتر از نمونه های شاهد) نسبت به گونه *O. viciifolia* در افزایش سطح تحمل این گونه در تنش های ۶۰ و ۵۰ درصد رطوبت ظرفیت مزرعه مؤثر بوده است. نتایج این تحقیق نشان داد که در شرایط تنش تجمع قندهای محلول در

## بحث

همان گونه که در شکل ۱a نشان داده شده است، سطوح مختلف تنش های اعمال شده سبب افزایش محتوی قند محلول اندام های هوایی و ریشه ها در هر دو گونه جمله مهم ترین محلول های سازگاری هستند که تحت تنش خشکی در گیاهان تجمع می یابند (Hessini, et al., 2009). قندهای محلول عمدتاً به دو روش به ایجاد تحمل در گیاهان تحت تنش کمک می کنند: اول به عنوان یک عامل اسمزی (Osmotic agents) با کاهش پتانسیل آب سلول ضمن حفظ تورژسانس سلولی، امکان جذب و نگهداری

باعث افزایش اسمولاریته سلول شده و می‌تواند میزان خروج آب از گیاه را کاهش دهد. این پدیده ایجاد تورژسانس می‌نماید که وجود آن در گسترش و توسعه سلولی ضروری است. برهم‌کنش پرولین با آنزیم‌ها سبب حفظ ساختار پروتئین‌ها و فعالیت‌های مربوط به آن‌ها می‌شود. پرولین باعث حفظ یکپارچگی و عملکرد آنزیم M4-لاکتات دهیدروژناز (M4 lactate dehydrogenase) می‌شود و غلظت‌های بالایی از این اسیدآمین، سبب افزایش ایمنی سلول‌های گیاهی در برابر اختلالات ترمودینامیکی ناشی از کمبود آب می‌شود (Szabados and Savoure, 2010). پرولین می‌تواند در آب‌پوشی لایه احاطه‌کننده فسفولیپیدها نقش داشته و با گروه‌های سر فسفولیپیدها برهم‌کنش انجام دهد. پرولین در محافظت از غشاهای تیلاکوئیدی کلروپلاست در برابر رادیکال‌های آزاد ناشی از آسیب‌های نوری نیز نقش دارد (Alia and Mohanty, 1997). تغییرات غلظت کربوهیدرات‌ها در القای ساز و کارهای تحمل در برابر تنش‌های آبی بسیار مهم است، زیرا این ترکیبات به‌طور مستقیم با واکنش‌های فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، انتقال مواد فتوسنتزی و تنفس در ارتباط هستند (Ashraf and Foolad, 2007). بیش بیان ژن P5CS (ژن مسئول بیوسنتز پرولین) در گیاه تراریخت تنباکو، سبب افزایش مقاومت و بهبود رشد این گیاه در تنش خشکی شد (Kavi Kishor et al., 1995). گزارش‌های متعددی از افزایش پرولین در تنش خشکی موجود می‌باشد (Choudhary et al., 2005; Mohammadkhani and Heidari, 2008; Antolín et al., 2010) و نتایج این تحقیق را تأیید می‌کنند.

همان‌گونه که در شکل ۲b مشاهده می‌شود، میزان گلیسین بتائین در اندام هوایی و ریشه‌های گونه *O. viciifolia* در کلیه سطوح تنش‌های اعمال شده، نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. در گونه *O. radiata* نیز کلیه سطوح تنش‌های اعمال شده سبب افزایش معنی‌دار گلیسین

ریشه‌ها بیشتر از اندام هوایی بود. تجمع قندها در ریشه سبب منفی‌تر شدن توان بالقوه آبی در ریشه شده و این امر به جذب بیشتر آب توسط ریشه‌ها منتهی می‌شود، از طرفی حضور قندها در ریشه به‌عنوان تأمین‌کننده منبع کربن سبب رشد و توسعه ریشه‌ها می‌شود (Sharp et al., 1990). میزان نشاسته در ریشه و اندام هوایی هر دو گونه *O. viciifolia* و *O. radiata* در شرایط تنش بسیار کمتر از گیاهان شاهد بود (شکل ۱b). افزایش فعالیت آنزیم  $\alpha$ -آمیلاز به هنگام تنش آب موجب تجزیه نشاسته و تبدیل این درشت مولکول به واحدهای کوچک‌تر مانند گلوکز شده و با افزایش قندهای محلول، به تنظیم اسمزی و حفظ آب سلول کمک می‌کند. همچنین از آنجائی که نشاسته به‌عنوان یک منبع کربنی در تنش کم‌آبی برای تنفس و رشد گیاه به مصرف می‌رسد، لذا کاهش مشاهده شده در میزان نشاسته اندام‌های هوایی و ریشه، می‌تواند به این علت باشد. کاهش سطوح نشاسته تحت تأثیر تنش خشکی در گیاهان مختلفی گزارش شده است (Castrillo, 1992).

نتایج نشان داد که تنش‌های اعمال شده، تغییر معنی‌داری در میزان پرولین ریشه و اندام هوایی هر دو گونه *O. viciifolia* و *O. radiata* ایجاد کرده است (شکل ۲a). اسیدآمین پرولین در بسیاری از گیاهان عالی شناسایی شده و معمولاً در مقادیر زیاد در پاسخ به تنش‌های محیطی، تجمع می‌یابد. نقش ویژه پرولین در گیاهانی که در معرض خشکی قرار گرفته‌اند، به اثبات رسیده است؛ و میزان تجمع آن در گیاهان متحمل به تنش بیش از ارقام حساس است. مقدار چندین اسیدآمین دیگر نیز تحت تأثیر تنش‌های مختلف مانند خشکی و شوری افزایش می‌یابد؛ اما میزان این تغییرات با تغییراتی که در پرولین رخ داده و طی مدت کوتاهی بعد از ایجاد تنش به سطح بالایی می‌رسد، قابل مقایسه نیست (Mahajan and Tuteja, 2005). پرولین از دو مسیر گلوتامات و اورنیتین سنتز می‌شود که تحت تنش خشکی به مقدار زیادی سنتز آن از هر دو مسیر افزایش می‌یابد. تجمع مواد محلول سازگار،

عملکرد گیاه آفتاب‌گردان (*Helianthus annuus*) تحت تنش کمبود آب می‌شود (Iqbal et al., 2008).

همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، کلیه سطوح تنش‌های اعمال شده سبب افزایش توأم گلاسیسین بتائین و پرولین در مقایسه با نمونه‌های شاهد، شده‌اند. تنظیم اسمزی از اولین و مهم‌ترین پاسخ‌های فیزیولوژیک در گیاهان تحت تنش آبی می‌باشد (Bohnert et al., 1995). گزارش‌های متعددی نقش و اهمیت گلاسیسین بتائین و پرولین را به‌عنوان محلول‌های سازگاری کلیدی در حفظ فشار تورژسانس و تنظیم اسمزی سلول‌های گیاهی به هنگام تنش آبی تأیید کرده‌اند (Szabados and Savoure, 2010). تجمع گلاسیسین بتائین و پرولین در سیتوسل سلول‌های گیاهی تداخلات درون‌سلولی ایجاد نمی‌کند و تعادل بیوشیمیایی سلول را بر هم نمی‌زند و به هنگام تنش‌های آبی سلول‌های گیاهی با انباشت گلاسیسین بتائین و پرولین سعی در حفظ آب درون‌سلولی و ایجاد مقاومت در برابر تنش وارده دارند به‌طوری که تجمع گلاسیسین بتائین و پرولین به‌عنوان شاخص‌های مهم تنش آبی در گیاهان شناخته می‌شوند (Ashraf and Foolad, 2007). همچنین افزایش توأم گلاسیسین بتائین و پرولین در فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسدانی و چرخه گلی‌اگزالات سلول‌های گیاهی مؤثر بوده و در پایداری غشاهای سلولی و تخفیف اثرات تنش اکسیداتیو نقش دارد (Patade et al., 2014).

در اثر تنش‌های اعمال شده، میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) در دو گونه *O. radiata* و *O. viciifolia* افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد (شکل ۳a). کمبود آب، تنش اکسیداتیو را در سلول‌های گیاهی القاء می‌نماید و با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS)، سلول گیاه را با تنش ثانویه ناشی از حضور رادیکال‌های آزاد اکسیژنی مواجه می‌کند. تجمع گونه‌های فعال اکسیژن به بسیاری از ترکیبات نظیر چربی‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه

بتائین در ریشه‌ها شده و در اندام هوایی به‌جز تنش ۷۵٪ FC سایر تنش‌های اعمال شده (۶۰٪ FC و ۵۰٪ FC)، اثر معنی‌داری بر محتوی گلیسین بتائین اندام‌های هوایی داشتند. گلاسیسین بتائین معمول‌ترین محلول آلی سازگارکننده، می‌باشد که در میکروارگانیزم‌های مختلف، گیاهان عالی و حیوانات وجود داشته و بیشترین و فراوان‌ترین ترکیب در پاسخ به تنش‌های اسمزی در گیاهان می‌باشد (Mohanty et al., 2002; Yang et al., 2005). گلاسیسین بتائین مهم‌ترین نقش را در محافظت غشاهای تیلاکوئیدی و در نتیجه کارایی فتوسیستم‌های فتوسنتزی دارد (Wang et al., 2010; Tian et al., 2013). گزارش‌های متعددی در خصوص اثر مثبت گلیسین بتائین بر جذب بهینه CO<sub>2</sub>، فلورسانس کلروفیل و تعدیل رشد و عملکرد در گیاهان تحت تنش خشکی موجود است. گلاسیسین بتائین به‌عنوان بک اسمولیت، در حفظ عملکرد آنزیم‌ها و ساختار غشاهای پلاسمایی به هنگام تنش‌های خشکی نقش حفاظتی دارد (Ashraf and Foolad, 2007). نقش علامت‌رسانی گلاسیسین بتائین که در ارتباط با مسیر MAP کینازها (Mitogen-activated protein kinases; MAP kinases) می‌باشد، نیز در ایجاد مقاومت به تنش خشکی در گیاهان مؤثر است (Shinha et al., 2011). Harinasut و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که پاشیدن برگی گلاسیسین بتائین در گیاهان نورسته برنج (*Oryza sativa*) از صدمه به فتوسیستم II در شرایط شوری جلوگیری می‌کند. نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد که افزایش بیوستنز گلاسیسین بتائین سبب افزایش کارایی فتوسیستم II و افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و آسیمیلاسیون کربن در گیاه تراریخت تنباکو (*Nicotiana tabacum*) (Yang et al., 2005; Yang et al., 2007) و محافظت از غشای سلول‌های ریشه گیاه نیشکر (*Saccharum sp. cv. HSF-240*) در مقابل تخریب ناشی از تنش گرما می‌شود (Rasheed et al., 2011). همچنین کاربرد خارجی گلاسیسین بتائین، سبب افزایش

است (Kocheva and Georgive, 2003). نتایج این تحقیق نشان داد که غشاهای پلاسمایی گونه *O. radiata* در مقایسه با گونه *O. viciifolia* از مقاومت بیشتری در برابر خشکی برخوردارند و قادرند تنش‌های بسیار سخت (FC ۵۰٪) را تحمل نمایند. گزارش‌هایی در خصوص تأیید نتایج این تحقیق، مبنی بر پایداری غشاهای پلاسمایی و نشت کمتر الکترولیت‌ها در ارقام مقاوم به تنش خشکی موجود می‌باشد (فرشادفر و جوادی‌نیا، ۱۳۹۰؛ Kocheva and Georgive, 2003; Valentovič et al., 2006; Molaei et al., 2012).

محتوی آب نسبی در برگ‌های گیاهان شاهد حدود ۸۵٪ در گونه *O. viciifolia* و ۷۴٪ در گونه *O. radiata* بود. روند کاهش محتوی آب نسبی برگ‌ها در گونه *O. viciifolia* شدیدتر از گونه *O. radiata* بود، به طوری که میزان محتوی آب نسبی از دست‌رفته برگ‌ها در گونه *O. viciifolia* در کلیه سطوح تنش‌های اعمال شده، همگام با شدت تنش‌ها، کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد داشت و در تنش FC ۵۰٪ برگ‌های گونه *O. viciifolia* کاملاً خشک شده و از بین رفتند (شکل‌های a و b). محتوی آب نسبی و محتوی آب نسبی از دست‌رفته برگ‌ها، نشان دهنده وضعیت آب در سلول‌های گیاهی است (Lawlor and Cornic, 2002). گیاهان مقاوم به خشکی عموماً در شرایط کمبود آب قادر به حفظ بیشتر محتوی آب نسبی هستند (Yousfi et al., 2010). در این تحقیق گونه *O. radiata* در مقایسه با گونه *O. viciifolia* مقاومت بهتری را در تحمل تنش‌های اعمال شده از خود نشان داد، لذا حفظ بقای این گونه در تنش شدید FC ۵۰٪ می‌تواند نتیجه عملکرد بهتر مکانیسم‌های حفظ محتوی نسبی آب در این گونه باشد. مطالعات متعددی نتایج این تحقیق را تأیید می‌کنند (Lawlor and Cornic, 2002; Valentovič et al., 2006; Yousfi et al., 2010).

می‌زند. اندازه‌گیری محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها، یکی از معمول‌ترین و قابل‌قبول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری صدمات اکسیداتیو به غشاهای سلولی است. مالون دآلدئید به‌عنوان شاخص مناسبی برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، محسوب می‌شود و بسیاری از گیاهان وقتی در محیط خشک قرار می‌گیرند در اثر پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و آسیب‌های جدی وارد شده بر غشاهای پلاسمایی، بر مقدار مالون دآلدئید آن‌ها افزوده می‌شود (Apel and Hirt, 2004). افزایش MDA در تنش‌های کم آبی در گیاهانی چون زیتون (Sofa et al., 2004)، ذرت (Valentovič et al., 2006)، یونجه (Antolín et al., 2010) و گندم (Niedzwiedz-Siegien et al., 2004; Moaveni, 2011) گزارش شده است و نتایج این تحقیق را تأیید می‌کنند.

میزان نشت الکترولیت‌ها از غشاهای برگ‌گی گونه *O. viciifolia*، در همه سطوح تنش‌های اعمال شده، تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد داشت، اما میزان نشت الکترولیت از غشاهای برگ‌گی در گونه *O. radiata* در تنش‌های FC ۷۵٪ و FC ۶۰٪ تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نداشت و تنها گیاهانی که در معرض تنش FC ۵۰٪ قرار داشتند، میزان نشت الکترولیت از غشاهای برگ‌گی آن‌ها نسبت به نمونه‌های تفاوت معنی‌داری را نشان داد (شکل ۳b). تغییر ساختمان غشاء در اثر آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو به هنگام کمبود آب، تراوایی غشای سلولی را افزایش می‌دهد و منجر به نشت الکترولیت‌های موجود در داخل سلول به سمت بیرون می‌شوند، لذا اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از غشاهای پلاسمایی به‌عنوان شاخصی از آسیب وارده به غشاهای سلولی، تلقی می‌شود. ثبات بیشتر غشاهای سلولی و نشت کمتر الکترولیت‌ها در شرایط تنش‌های آبی، مشخصه اصلی ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش خشکی محسوب می‌شود و نشانه‌ای از وجود مکانیزم‌های کنترلی در تحمل خشکی

درصد کاهش نشان داد (شکل ۵b). گزارش های متعددی در خصوص کاهش وزن خشک و میزان زندهمانی در شرایط تنش خشکی موجود است (Kocheva and Georgive, 2003; Khan *et al.*, 2010; Farshadfar. and Javadinia, 2011) و نتایج این تحقیق را تأیید می کنند.

### نتیجه گیری

گیاهان مختلف بر اساس ویژگی های ژنتیکی خود، پاسخ های فیزیولوژیکی متفاوتی به تنش خشکی می دهند (Centritto *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2012). فیزیولوژی تحمل تنش خشکی در سلول های گیاهی بسیار پیچیده است و تغییرات مولکولی، بیوشیمیایی و ریخت شناسی زیادی را در بر می گیرد (Sapeta *et al.*, 2013). مطالعه پاسخ های فیزیولوژیک گونه های گیاهی به تنش خشکی، ضمن اینکه به فهم بهتر مکانیسم های سازگاری گیاهان با شرایط خشک کمک می کند، از یافته ها و نتایج آن می توان در تولید ارقام مقاوم به تنش خشکی با استفاده از ابزارهای بیوتکنولوژی بهره گرفت.

نتایج کلی به دست آمده در این تحقیق نشان می دهد که گونه *O. radiata* در مقایسه با گونه *O. viciifolia*، توانایی بیشتری در تجمع محلول های سازگاری و حفظ یکپارچگی غشاء های پلاسمایی در شرایط تنش کم آبی دارد و برآیند مجموعه تغییرات فیزیولوژی به وجود آمده در گونه *O. radiata* به بقا و عملکرد بهتر این گونه در شرایط سخت کم آبی کمک کرده است. با توجه به میزان کم و پراکنش نامناسب بارش ها در کشورمان و نیاز روزافزون تولید علوفه، گونه *O. radiata* می تواند گزینه مناسبی برای کاشت علوفه در مناطق کم باران کشور باشد. همچنین انتقال توانایی های این گونه به روش های مهندسی ژنتیک و یا متابولیک می تواند در پروژه های بیوتکنولوژی مد نظر قرار گیرد.

همان گونه که در شکل ۵a نشان داده شده است، همه سطوح تنش های اعمال شده سبب کاهش معنی دار وزن خشک کل (Biomass) در هر دو گونه *O. radiata* و *O. viciifolia* در مقایسه با نمونه های شاهد، شده اند. یکی از مهم ترین تغییرات فیزیولوژیک ناشی از کم آبی، کاهش رشد رویشی، بخصوص کاهش رشد ساقه ها است. به هنگام تنش کم آبی، فعالیت کینازهای وابسته به سیکلین (cyclin-dependent kinase) کاهش یافته و در نتیجه تقسیم سلولی و رشد گیاه کاهش می یابد (Schuppler *et al.*, 1998). در تنش های کم آبی کاهش رشد برگ ها بیشتر از ریشه ها است، چون کاهش اندام هوایی، سبب کاهش سطح تبخیر و تعرق آب در گیاه می شود و این تغییر بیوفیزیکی سبب حفظ و نگهداری بیشتر آب در گیاه شده و به نفع گیاه تحت تنش کم آبی است (Mahajan and Tuteja, 2005). همچنین افزایش هورمون آبسزیک اسید که به هنگام تنش آب رخ می دهد، عامل دیگری است که سبب ریزش برگ ها و کاهش تقسیم و رشد سلول ها و نهایتاً کاهش وزن خشک کل در گیاهان تحت تنش آبی می شود. شواهدی وجود دارد که بیانگر نوعی هم افزایی و تداخل عمل (cross talk) بین قندهای محلول و هورمون ABA است. قندهای محلول و هورمون ABA به هنگام تنش های آبی، نوعی عمل علامت رسانی در تنظیم رشد و نمو گیاهان تحت تنش دارند، به طوری که در تنش های خشکی سخت افزایش توأم محتوی قندها و ABA سبب کاهش یا توقف رشد گیاهان تحت تنش می شود (Leon and Sheen, 2003). تنش های بالاتر از ۷۵٪ FC به شدت زندهمانی گونه *O. viciifolia* را تهدید کرد، به طوری که این گونه قادر به تحمل تنش ۵۰٪ FC نبود و از بین رفت. گونه *O. radiata* در برابر تنش های اعمال شده مقاومت خوبی از خود نشان داد و در شدیدترین سطح از تنش های اعمال شده (۵۰٪ FC)، زندهمانی این گونه تنها ۲۰

### References

Alia, P.S. and Mohanty, P. (1997). Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 38: 253–257

- Antolín, M.C., Muro, I. and Sánchez-Díaz, M. (2010). Application of sewage sludge improves growth, photosynthesis and antioxidant activities of nodulated alfalfa plants under drought conditions. *Environmental and Experimental Botany* 68: 75–82.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007). Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206–216.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7: 1099–1111.
- Buyukburc, U., Acikgoz, E., Ekiz, H. and Karagullu, N. (1991). Some agriculture traits of cultivated and wild sainfoin species from different origins. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 15: 35-45.
- Castrillo, M. (1992). Sucrose metabolism in bean plants under water deficit. *Journal of Experimental Botany* 43: 1557–1561.
- Centritto, M., Lauteri, M., Monteverdi, M.C. and Serraj, R. (2009). Leaf gas exchange, carbon isotope discrimination, and grain yield in contrasting rice genotypes subjected to water deficits during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* 60: 2325–2339.
- Choudhary, N.L., Sairam, R.K. and Tyagi, A. (2005). Expression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 42: 366-370.
- Costa, J.M., Ortuño, M.F., Lopes, C.M. and Chaves, M.M. (2012). Grapevine varieties exhibiting differences in stomatal response to water deficits. *Functional Plant Biology* 39: 179–189.
- Dadkhah, M., Majidi, M.M. and Mirlohi, A. (2011). Multivariate analysis of relationships among different characters in Iranian Sainfoin populations (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *Iranian Journal of Field Crop Science* 42: 349-357.
- Egert, M. and Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany* 48: 43-49.
- Farshadfar, E. A. and Javadinia, J. (2011). Evaluation of chickpea genotypes for drought tolerance. *Seed and Plant Improvement Journal* 21 (1): 78-102 (In Persian).
- Grattan, S. R. and Grieve, C. M. (1992). Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agriculture Ecological Environment* 38: 275-300.
- Gunes, A., Inal, A., Adak, M.S., Bagci, E.G., Cicek, N. and Eraslan, F. (2008). Effect of drought stress implemented at pre- or post-anthesis stage some physiological as screening criteria in chickpea cultivars. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 59–67.
- Harinasut, P., Tsutsui, K., Takabe, T., Nomura, M., Takabe, T., and Kishitani, S. (1996). Exogenous glycinebetaine accumulation and increased salt-tolerance in rice seedlings. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60: 366–368.
- Heath, R. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 196: 385–395.
- Heydari Sharif Abadi, H. (2000). *Plant, Aridity and Drought*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran (In Persian).
- Heydari Sharif Abadi, H. and Dori, M. A. (2001). *Forage Crops (Leguminosae)*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran (In Persian).
- Hessini, K., Martinez, J.P., Gandour, M., Albouchi, A., Soltani, A. and Abdelly, C. (2009). Effect of water stress on growth, osmotic adjustment, cell wall elasticity and water-use efficiency in *Spartina alterniflora*. *Environmental and Experimental Botany* 67: 312–319.
- Iqbal, N., Ashraf, M and Ashraf, M.Y. (2008). Glycinebetaine, an osmolyte of interest to improve water stress tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.): water relations and yield. *South African Journal of Botany* 74: 274–281.
- Irfan, E., Turgut-balik, D., Sahin, A. and Kursat, M. (2007). Total electrophoretic band patterns of some *Onobrychis* species growing in turkey. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 2: 123-126.
- Kavi Kishor, P.B., Hong, Z., Miao, G., Hu, C. and Verma, D.P.S. (1995). Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108: 1387–1394.
- Khan, A.J., Azam, F., and Ali, A. (2010). Relationship of morphological traits and grain yield in recombinant inbred wheat lines grown under drought conditions. *Pakistan Journal of Botany* 42: 259-267.

- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method, In Helebust, J. A., Craig, J. S. (ed) Handbook physiological methods. Cambridge University. Press Cambridge.
- Kocheva, K. and Georgieva, G. (2003). Evaluation of the reaction of two contrasting Barley (*Hordeum vulgare L.*) Cultivars in response to osmotic stress with PEG6000. Bulgarian Journal of Plant Physiology 49: 290-294.
- Lawlor, D.W. and Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. plant cell & environment 25:275-294.
- Leon, P. and Sheen, J. (2003). Sugar and hormone connections. Trends in Plant Science 8: 110-116.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of Biochemistry and Biophysics 444:139-158.
- Moaveni, P. (2011). Effect of water deficit stress on some physiological traits of wheat (*triticum aestivum*) Agricultural Science Research Journal 1(1): 64 – 68.
- Mohammadhani, N. and Heidari, R. (2008). Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. Turkish Journal of Biology 32: 23-30.
- Mohanty, A., Kathuria, H., Ferjani, A., Sakamoto, A., Mohanty, P., Murata, N. and Tyagi, A.K. (2002). Transgenics of an elite indica rice variety Pusa Basmati-1 harbouring the *codA* gene are highly tolerant to salt stress. Theoretical and Applied Genetics 106: 51-57.
- Molaei, P., Ebadi, A., Namvar, A. and Khandan Bejandi, T. (2012). Water relation, solute accumulation and cell membrane injury in sesame (*Sesamum indicum L.*) cultivars subjected to water stress. Annals of Biological Research 3 (4):1833-1838.
- Mozaffarian V. A. (1996). Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser, Tehran (In Persian).
- Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Wilingen, C.V., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S., Farrant, J.M. and Thomson, J.A. (2002). Physiological and molecular insights into drought tolerance. African Journal of Biotechnology 1(2): 28-38.
- Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Wilingen, C.V., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S., Farrant, J.M. and Thomson, J.A. (2002). Physiological and molecular insights into drought tolerance. African Journal of Biotechnology 1: 28-38.
- Niedzwiedz-Siegien, I., Bogatek-Leszczynska, R., Côme, D. and Corbineau, F. (2004). Effects of drying rate on dehydration sensitivity of excised wheat seedlings shoots as related to sucrose metabolism and antioxidant enzyme activities. Plant Science 167: 879-888.
- Patade, V. Y., Lokhande, V. H. and Suprasanna, P. (2014). Exogenous application of proline alleviates salt induced oxidative stress more efficiently than glycine betaine in sugarcane cultured cells. Sugar Technology 16 (1): 22-29.
- Pérez-Clemente, R.M., Vives, V., Zandalinas, S.I., López-Climent, M.F., Muñoz, Valeria. and Gómez-Cadenas, A. (2013). Biotechnological Approaches to Study Plant Responses to Stress. BioMed Research International, Article ID 654120, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/6541210>.
- Rajendrakumar, C. S., Reddy, B. V., and Reddy, A. R. (1994). Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. Biochemical and Biophysical Research Communications 201: 957-963.
- Ramak, P., Hidari Sharifabadi, H., Rafiee, M. and Khademi, K. (2005). The physiological role of nitrate on drought tolerance in two sainfoin. First National Congress of forage crops. 9-11 July, University of Tehran, Karaj, Iran (In Persian).
- Ramak, P., khavari-Nejad, R. A., Hidari Sharifabadi, H., Rafiee, M. and Khademi, K. (2006). The effect of water stress on dry weight and photosynthetic pigments in two sainfoin. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research 14 (2): 80-91(In Persian).
- Rasheed, R., Farooq, W.M., Hussain, I., and Basra, S. A. (2011). Role of proline and glycinebetaine pretreatments in improving heat tolerance of sprouting sugarcane (*Saccharum sp.*) buds. Plant Growth Regul, <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-011-9572-3>.
- Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.C. (2002). Differential response of wheat genotypes to longterm salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science. 163: 1037-1046.
- Sapeta, H., Costa, J.M., Lourenço, T., Maroco, J., van der Linde, P. and Oliveira, M.M. (2013). Drought stress response in *Jatropha curcas*: growth and physiology. Environmental and Experimental Botany 85:76-84.
- Schuppler, U., He, P., John, P. C. L. and Munns, R. (1998). Effect of water stress on cell division and cdc2-like cell cycle kinase activity in Wheat leaves. Plant Physiology. 117: 667-678.
- Sharp, R.E., Hsiao, T.C., and Silk, W.K. (1990). Growth of the maize primary root at low water potentials. II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. Plant Physiology. 93: 1337-1346.

- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. (2004). Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science* 166: 293–302.
- Szabados, L.S. and Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.
- Tian, F., Gong, J., Zhang, J., Zhang, M., Wang, G., Li, A. and Wang, W. (2013). Enhanced stability of thylakoid membrane proteins and antioxidant competence contribute to drought stress resistance in the *tasg1* wheat stay-green mutant. *Journal of Experimental Botany* 64(6): 1509–1520.
- Valentovič, P., Luxová, M., Kolarovič, L. and Gašpariková, O. (2006). Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil and Environment* 52 (4): 186–191.
- Veisipoor, A., Majidi, M. M. and Mirlohi, A. (2013). Response of physiological traits to drought stress in some populations of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research* 21 (1): 87-102 (In Persian).
- Vinocur, B. and Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123-132.
- Wang, G.P., Zhang, X.Y., Li, F., Luo, Y. and Wang, W. (2010). Overaccumulation of glycine betaine enhances tolerance to drought and heat stress in wheat leaves in the protection of photosynthesis. *Photosynthetica* 48: 117–126.
- Yang, X. and Lu, C. (2005). Photosynthesis is improved by exogenous glycinebetaine in salt-stressed maize plants. *Physiologia Plantarum* 124: 343-352.
- Yang, X., Wen, X., Gong, H., Lu, Q., Yang, Z., Tang, Y., Liang, Z. and Lu, C. (2007). Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances thermotolerance of photosystem II in tobacco plants. *Planta* 225: 719–733.
- Yang, X., Wen, X., Gong, H., Lu, Q., Yang, Z., Tang, Y., Liang, Z. and Lu, C. (2005). Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* 138: 2299–2309.
- Yousfi, N., Slama, I., Ghnaya, T., Savouré, A. and Abdelly, C. (2010). Effects of water deficit stress on growth, water relations and osmolyte accumulation in *Medicago truncatula* and *M. laciniata* populations. *Comptes Rendus Biologies* 333 (3): 205-13.
- Zhang, Y.Y., Li, Y., Gao, T. and Zhu, H. (2008). *Arabidopsis* SDIR1 enhances drought tolerance in crop plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72(8) 2251–2254.

## Effects of Water Stress on Some Compatible Solutes and Membrane Stability in Two Species of Sainfoin (*Onobrychis radiata* and *Onobrychis viciifolia*)

Parvin Ramak <sup>1,\*</sup>, Mohammad Mehrnia <sup>1</sup> and Sedigheh Esmailzadeh Bahabadi <sup>2</sup>

1- Lorestan Agricultural Research and Natural Resources Center, Khorramabad, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

### Abstract

The effects of water stress on some compatible solutes including proline, soluble sugars and glycine betaine, the level of lipid peroxidation and membrane stability in two species of Sainfoin (*Onobrychis radiata* (Desf.) M.Bieb. and *Onobrychis viciifolia* Scop.) were investigated. The experimental plan was a basic factorial design, completely random with four replications and water stress was applied based on irrigation at 50, 60, 70 and 100% of Field Capacity (FC). Different physiological responses were observed between the species in their response to water stress. Our results showed that *O. radiata* possessed greater increments in soluble sugars content and glycine betaine than *O. viciifolia*. The Relative Water Content (RWC) in *O. viciifolia* was significantly lower comparing with *O. radiata*. The Relative Water Loss (RWL) of *O. viciifolia* had significantly decreased compared to control plants in all treatments and *O. viciifolia* was not able to withstand the 50% soil field capacity and dried out. Lipid peroxidation in *O. radiata* was lower than *O. viciifolia* and membrane of leaf cells in *O. radiata* was more oxidatively stable compared to *O. viciifolia*.

**Key words:** Compatible solutes, Lipid peroxidation, Membrane stability, *Onobrychis*, Water stress

---

\* Corresponding Author, E-mail: ramak30@yahoo.com