

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

پروین رامک^{۱*}، محمد مهرنیا^۱ و صدیقه اسمعیل زاده بهابادی^۲

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲۰

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 برگ‌ها 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 تنش‌های محیطی مختلفی بقاء، عملکرد و رشد گیاهان را تهدید می‌کنند. در بین تنش‌های محیطی، تنش خشکی بیشترین صدمات را بر تولیدات گیاهی وارد می‌کند. گیاهان به‌عنوان موجودات بی‌تحرک، قادر به فرار در برابر تنش‌های محیطی نیستند، لذا سعی می‌کنند با استفاده از مکانیسم‌های متابولیسمی به تنش‌های محیطی پاسخ داده و قابلیت تحمل تنش را افزایش دهند (Pérez-Clemente et al., 2013). تجمع محلول‌های سازگارکننده (Compatible Solutes) یکی از مکانیسم‌های مؤثر در تعدیل تنش‌های اسمزی ناشی از کم آبی یا شوری است. محلول‌های سازگارکننده، قادر به حفظ تورژسانس سلول‌ها و فرآیندهای وابسته به آن در پتانسیل‌های پایین آب هستند (Vinocur and Altman, 2005). از طرفی محلول‌های سازگارکننده با کاهش اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از پراکسیداسیون چربی‌های غشاء و نیز با حفاظت از پروتئین‌های غشاء، به سلامت و یکپارچگی غشاء کمک نموده و سبب افزایش آستانه تحمل به تنش اسمزی می‌شوند (Zhang et al., 2008). پرولین، گلیسین بتائین و قندهای محلول از جمله مهم‌ترین محلول‌های سازگارکننده‌ای هستند که اثرات مثبت آن‌ها در تعدیل تنش‌های اسمزی و حفظ غشاهای پلاسمایی گزارش شده است (Pérez-Clemente et al., 2013).

گونه‌های سرده اسپرس (*Onobrychis*) عمدتاً در نواحی شمال غربی آسیا و در دو کشور ایران و ترکیه گسترش دارند و این نواحی به‌عنوان مرکز اصلی تنوع ژنتیکی سرده اسپرس شناخته می‌شوند (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 یافته‌اند (Mozaffarian, 1996). تعدادی از گونه‌های این سرده به‌دلیل داشتن پروتئین بالا، ارزش علوفه‌ای فوق‌العاده‌ای در تغلیف دام دارند. اسپرس‌ها با جلب زنبورعسل علاوه بر

تداوم نسل خود، به حفظ و بقاء گیاهان اکوسیستم خود نیز کمک می‌نمایند. گونه‌های اسپرس به‌دلیل داشتن ریشه‌های عمیق از فرسایش خاک جلوگیری نموده و سبب بهبود ساختمان و کیفیت خاک می‌شوند (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 علوفه‌ای مهم در ایران هستند که با خاک‌های آهکی مناطق کوهستانی و سنگلاخی سازگاری دارند و در برابر چرای مفرط از خود مقاومت نشان می‌دهند (Heydari Sharif Abadi and Dori, 2001). اسپرس زراعی نه تنها به‌دلیل تولید مناسب و کیفیت عالی علوفه، در کشت زراعی حائز اهمیت است بلکه به‌دلیل تحمل بالایی که نسبت به تنش‌های زیستی به‌خصوص خشکی دارد، برای احیاء مراتع و تبدیل دیم‌زارهای کم بازده و رها شده به علوفه‌کاری دیم نیز استفاده می‌شود (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 ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش آب می‌باشد 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 رنگیزه‌های فتوسنتزی و آسمیلاسیون کربن در دو گونه *O. radiata* و *O. viciifolia* می‌شود (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 میلی‌متر در سال از جمله سرزمین‌های خشک محسوب می‌شود 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 علوفه‌ای مقاوم به تنش کم آبی در مزارع دیم و مراتع آسیب‌دیده، در آینده الزام‌آور

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 (۱/۸٪) 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
 زیر رطوبت ظرفیت مزرعه مشخص شد (Heydari Sharif, 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	7.6	2.8	550	26.7	9.2	0.1	3.5

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

$$RWL\% = 100 \times [(FW - WW \ 5h) / (TW - DW)]$$

FW = وزن تر نمونه برگی؛ $WW \ 5h$ = 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 برگی

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 اندازه گیری و با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز، میزان قند نمونهها بر حسب میلی گرم 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 اندازه گیری 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 کلرواتان، به کمک منحنی استاندارد و جذب نمونهها در ۳۶۵ نانومتر بر حسب میکروگرم در میلی گرم وزن خشک محاسبه گردید.

سنجش میزان نشت غشاء سلولی:

برای سنجش پایداری غشاءهای سلولی در برگ، میزان نشت الکترولیت ها به روش Sairam و همکاران (2002) اندازه گیری شد. به این منظور جوان ترین برگهای بالغ انتهایی تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در ظروف شیشه ای درب دار در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس میزان هدایت الکتریکی محلول همراه نمونه، به عنوان نشت اولیه اندازه گیری شد. نشت ثانویه نیز از طریق اندازه گیری میزان هدایت الکتریکی نمونهها پس از حرارت دادن آنها به مدت یک ساعت و در ۱۰۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. میزان نشت الکترولیت از غشاءها از رابطه زیر محاسبه شد.

$100 \times (\text{نشت ثانویه} / \text{نشت اولیه}) = \text{نشت الکترولیت از غشاء سلولی (درصد)}$

سنجش پراکسیداسیون لیپیدها:

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی بر اساس تشکیل کمپلکس مالون دی آلدئید (MDA) با تیوباربتوریک اسید (TBA) سنجش شد و غلظت MDA به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) با استفاده از ضریب تصحیح $1.55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$ در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج حاصل از اندازه گیری بر حسب میکرو مول در میلی گرم وزن خشک محاسبه و ارائه گردید.

تحلیل های آماری:

داده ها با استفاده از نرم افزار 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 برگی

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).

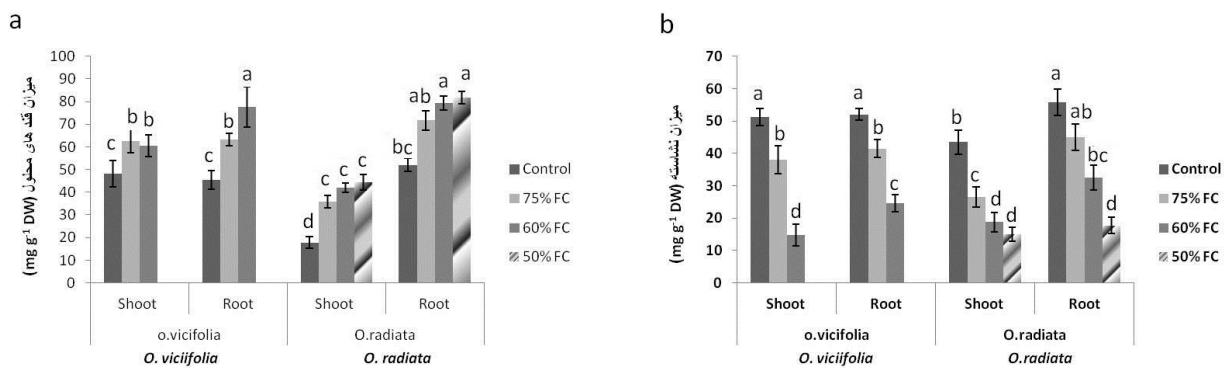
در همه سطوح تنش‌های اعمال شده میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگی گونه *O.viciifolia* تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نداشتند و با افزایش شدت تنش‌ها بر میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگی افزوده شد (شکل ۳b). در گونه *O.radiata* تنش‌های FC ۷۵٪ و FC ۶۰٪ اثر معنی‌داری بر میزان نشت الکترولیت از غشاءهای

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).

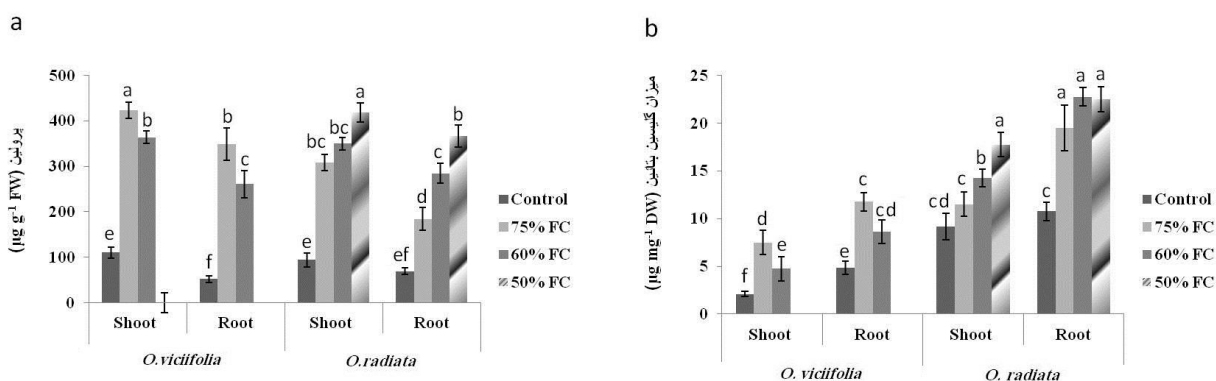
اثر تنش آب بر میزان پرولین و گلیسین بتائین:

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).

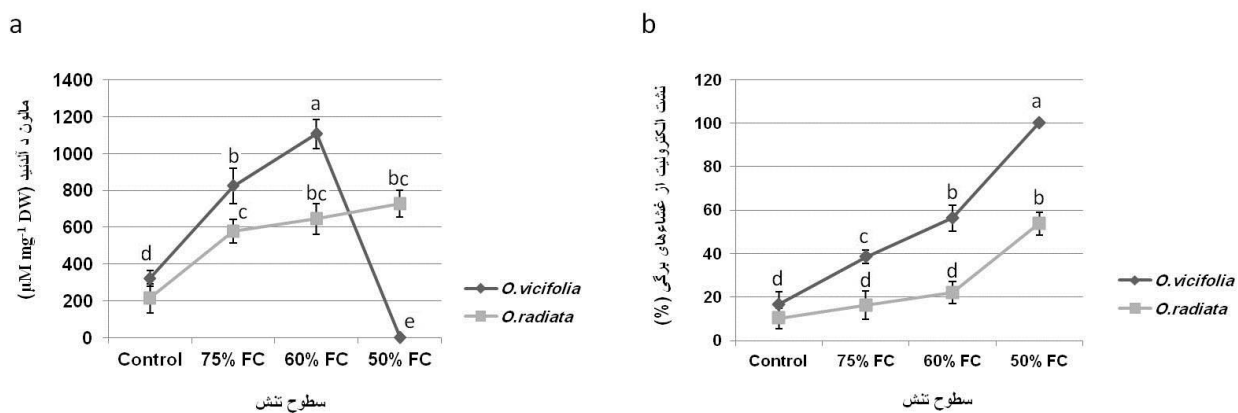
روند تغییرات و میزان گلیسین بتائین در دو گونه *O.viciifolia* و *O.radiata* با یکدیگر متفاوت بود. در گونه



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 بتائین (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 برگی (b) در گونه های *O. vicifolia* و *O. radiata* 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).

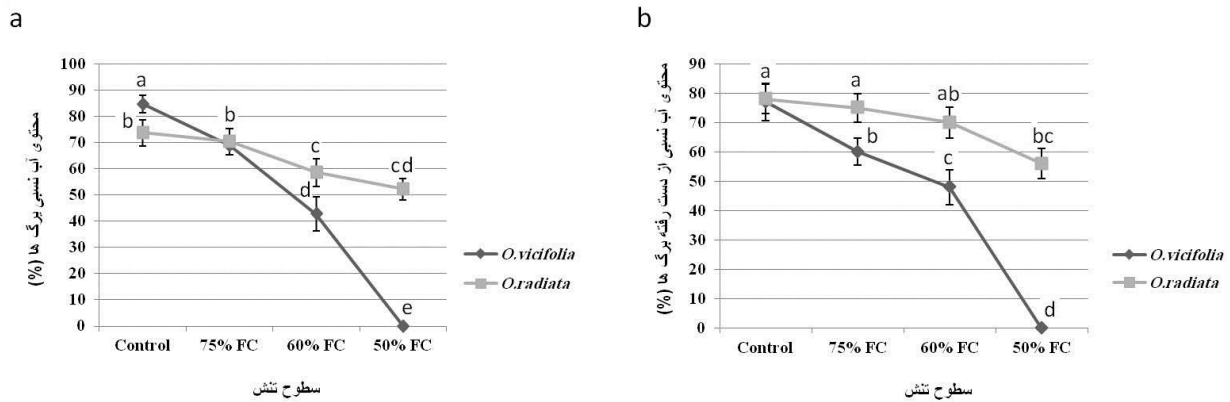
اثر تنش آب بر پراکسیداسیون چربی‌ها و پایداری غشاءهای برگ

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).

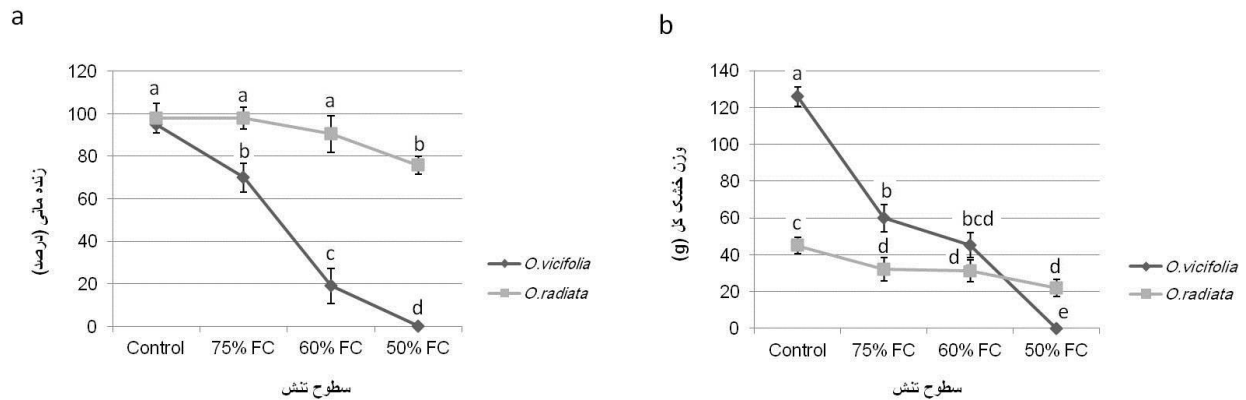
در همه سطوح تنش‌های اعمال شده میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگ گونه *O. viciifolia* تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های شاهد داشتند و با افزایش یافتن شدت تنش‌ها بر میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگ افزوده شد. در گونه *O. radiata* تنش‌های FC ۷۵٪ و FC ۶۰٪ اثر معنی‌داری بر میزان نشت الکترولیت از غشاءهای برگ 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 غیرمشابه 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. radiata* و *O. viciifolia* مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیرمشابه 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 α -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 می شود (Iqbal et al., 2008).

همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می شود، کلیه سطوح تنش های اعمال شده سبب افزایش توأم گلیسین بتائین و پرولین در مقایسه با نمونه های شاهد، شده اند. تنظیم اسمزی از اولین و مهم ترین پاسخ های فیزیولوژیک در گیاهان تحت تنش آبی می باشد (Bohnert et al., 1995). گزارش های متعددی نقش و اهمیت گلیسین بتائین و پرولین را به عنوان محلول های سازگاری کلیدی در حفظ فشار تورژسانس و تنظیم اسمزی سلول های گیاهی به هنگام تنش آبی تأیید کرده اند (Szabados and Savoure, 2010). تجمع گلیسین بتائین و پرولین در سیتوسل سلول های گیاهی تداخلات درون سلولی ایجاد نمی کند و تعادل بیوشیمیایی سلول را بر هم نمی زند و به هنگام تنش های آبی سلول های گیاهی با انباشت گلیسین بتائین و پرولین سعی در حفظ آب درون سلولی و ایجاد مقاومت در برابر تنش وارده دارند به طوری که تجمع گلیسین بتائین و پرولین به عنوان شاخص های مهم تنش آبی در گیاهان شناخته می شوند (Ashraf and Foolad, 2007). همچنین افزایش توأم گلیسین بتائین و پرولین در فعال سازی سیستم آنتی اکسدانی و چرخه گلی اگزالات سلول های گیاهی مؤثر بوده و در پایداری غشاهای سلولی و تخفیف اثرات تنش اکسیداتیو نقش دارد (Patade et al., 2014).

در اثر تنش های اعمال شده، میزان مالون دی آلدئید (MDA) در دو گونه *O. radiata* و *O. viciifolia* افزایش معنی داری را نسبت به نمونه های شاهد نشان داد (شکل ۳a). کمبود آب، تنش اکسیداتیو را در سلول های گیاهی القاء می نماید و با تولید گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS)، سلول گیاه را با تنش ثانویه ناشی از حضور رادیکال های آزاد اکسیژنی مواجه می کند. تجمع گونه های فعال اکسیژن به بسیاری از ترکیبات نظیر چربی ها، پروتئین ها، کربوهیدرات ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه

بتائین در ریشه ها شده و در اندام هوایی به جز تنش ۷۵٪ FC سایر تنش های اعمال شده (۶۰٪ FC و ۵۰٪ FC)، اثر معنی داری بر محتوی گلیسین بتائین اندام های هوایی داشتند. گلیسین بتائین معمول ترین محلول آلی سازگارکننده، می باشد که در میکروارگانیزم های مختلف، گیاهان عالی و حیوانات وجود داشته و بیشترین و فراوان ترین ترکیب در پاسخ به تنش های اسمزی در گیاهان می باشد (Mohanty et al., 2002; Yang et al., 2005). گلیسین بتائین مهم ترین نقش را در محافظت غشاهای تیلاکوئیدی و در نتیجه کارایی فتوسیستم های فتوستتزی دارد (Wang et al., 2010; Tian et al., 2013). گزارش های متعددی در خصوص اثر مثبت گلیسین بتائین بر جذب بهینه CO₂، فلورسانس کلروفیل و تعدیل رشد و عملکرد در گیاهان تحت تنش خشکی موجود است. گلیسین بتائین به عنوان یک اسمولیت، در حفظ عملکرد آنزیم ها و ساختار غشاهای پلاسمایی به هنگام تنش های خشکی نقش حفاظتی دارد (Ashraf and Foolad, 2007). نقش علامت رسانی گلیسین بتائین که در ارتباط با مسیر MAP کینازها (Mitogen-activated protein kinases; MAP kinases) می باشد، نیز در ایجاد مقاومت به تنش خشکی در گیاهان مؤثر است (Shinha et al., 2011). Harinasut و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که پاشیدن برگی گلیسین بتائین در گیاهان نورسته برنج (*Oryza sativa*) از صدمه به فتوسیستم II در شرایط شوری جلوگیری می کند. نتایج بررسی های آزمایشگاهی نشان می دهد که افزایش بیوستتز گلیسین بتائین سبب افزایش کارایی فتوسیستم II و افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و آسیمیلایون کربن در گیاه تراریخت تنباکو (*Nicotiana tabacum*) (Yang et al., 2005; Yang et al., 2007) و محافظت از غشای سلول های ریشه گیاه نیشکر (*Saccharum sp. cv. HSF-240*) در مقابل تخریب ناشی از تنش گرما می شود (Rasheed et al., 2011). همچنین کاربرد خارجی گلیسین 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 می‌کند.

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). گزارش‌های 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 می‌کنند.

نتیجه‌گیری

گیاهان مختلف بر اساس ویژگی‌های ژنتیکی خود، پاسخ‌های فیزیولوژیکی متفاوتی به تنش خشکی می‌دهند (Centritto *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2012). فیزیولوژی تحمل تنش خشکی در سلول‌های گیاهی بسیار پیچیده است و تغییرات مولکولی، بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی زیادی را در بر می‌گیرد (Sapeta *et al.*, 2013). مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیک گونه‌های گیاهی به تنش خشکی، ضمن اینکه به فهم بهتر مکانیسم‌های سازگاری گیاهان با شرایط خشک کمک می‌کند، از یافته‌ها و نتایج آن می‌توان در تولید ارقام مقاوم به تنش خشکی با استفاده از ابزارهای بیوتکنولوژی بهره گرفت.

نتایج کلی به‌دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که گونه *O. radiata* در مقایسه با گونه *O. viciifolia*، توانایی بیشتری در تجمع محلول‌های سازگاری و حفظ یکپارچگی غشاءهای پلاسمایی در شرایط تنش کم‌آبی دارد و برآیند مجموعه تغییرات فیزیولوژی به‌وجود آمده در گونه *O. radiata* به بقا و عملکرد بهتر این گونه در شرایط سخت کم‌آبی کمک کرده است. با توجه به‌میزان کم و پراکنش نامناسب بارش‌ها در کشورمان و نیاز روزافزون تولید علوفه، گونه *O. radiata* می‌تواند گزینه مناسبی برای کاشت علوفه در مناطق کم‌باران کشور باشد. همچنین انتقال توانایی‌های این گونه به روش‌های مهندسی ژنتیک و یا متابولیک می‌تواند در پروژه‌های بیوتکنولوژی مد نظر قرار گیرد.

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

همان‌گونه که در شکل ۵a نشان داده‌شده است، همه سطوح تنش‌های اعمال شده سبب کاهش معنی‌دار وزن خشک کل (Biomass) در هر دو گونه *O. radiata* و *O. viciifolia* در مقایسه با نمونه‌های شاهد، شده‌اند. یکی از مهم‌ترین تغییرات فیزیولوژیک ناشی از کم‌آبی، کاهش رشد رویشی، بخصوص کاهش رشد ساقه‌ها است. به هنگام تنش کم‌آبی، فعالیت کینازهای وابسته به سیکلین (cyclin-dependent kinase) کاهش یافته و در نتیجه تقسیم سلولی و رشد گیاه کاهش می‌یابد (Schuppler *et al.*, 1998). در تنش‌های کم‌آبی کاهش رشد برگ‌ها بیشتر از ریشه‌ها است، چون کاهش اندام هوایی، سبب کاهش سطح تبخیر و تعرق آب در گیاه می‌شود و این تغییر بیوفیزیکی سبب حفظ و نگهداری بیشتر آب در گیاه شده و به نفع گیاه تحت تنش کم‌آبی است (Mahajan and Tuteja, 2005). همچنین افزایش هورمون آبسزیزیک اسید که به هنگام تنش آب رخ می‌دهد، عامل دیگری است که سبب ریزش برگ‌ها و کاهش تقسیم و رشد سلول‌ها و نهایتاً کاهش وزن خشک کل در گیاهان تحت تنش آبی می‌شود. شواهدی وجود دارد که بیانگر نوعی هم‌افزایی و تداخل عمل (cross talk) بین قندهای محلول و هورمون ABA است. قندهای محلول و هورمون ABA به هنگام تنش‌های آبی، نوعی عمل علامت‌رسانی در تنظیم رشد و نمو گیاهان تحت تنش دارند، به‌طوری که در تنش‌های خشکی سخت افزایش توأم محتوی قندها و ABA سبب کاهش یا توقف رشد گیاهان تحت تنش می‌شود (Leon and Sheen, 2003). تنش‌های بالاتر از ۷۵٪ FC به شدت زنده‌مانی گونه *O. viciifolia* را تهدید کرد، به‌طوری که این گونه قادر به تحمل تنش ۵۰٪ FC نبود و از بین رفت. گونه *O. radiata* در برابر تنش‌های اعمال شده مقاومت خوبی از خود نشان داد و در شدیدترین سطح از تنش‌های اعمال شده (۵۰٪ FC)، زنده‌مانی این گونه تنها ۲۰

- 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 Δ^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^{1,*}, Mohammad Mehrnia¹ and Sedigheh Esmailzadeh Bahabadi²

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