

بررسی فعالیت بعضی از آنزیم‌های پاداکسندگی و پراکسیداسیون چربی‌های غشا در ژنوتیپ‌های لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata* L.) در شرایط عادی و تنش خشکی

خسرو مفاخری^۱، محمدرضا بی‌همتا^{۲*} و علیرضا عباسی^۳

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۲ و ۳. استاد و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۱)

چکیده

شناخت فرآیندهای فیزیولوژیکی مرتبط با تنش خشکی منجر به شناسایی راه‌کارهای اساسی در مقاومت، حفظ ظرفیت عملکرد و رقم‌های متحمل به تنش خشکی خواهد شد. با این هدف تأثیر تنش خشکی بر ژنوتیپ‌های لوبیا چشم‌بلبلی در سال ۱۳۹۳ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ارزیابی شد. پنج ژنوتیپ با قابلیت و پتانسیل عملکرد متفاوت در یک آزمایش کرت‌های خردشده (اسپلیت پلات) در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی در سه تکرار تحت سه سطح تنش خشکی (۳۵، ۶۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) قرار گرفتند. خشکی سبب کاهش RWC و افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) و محتوای مالون‌دی‌آلدهید شد. تنش خشکی سبب کاهش RWC و افزایش MDA و فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی شد که با افزایش سطوح تنش بر مقادیر آن‌ها افزوده شد اما برای آنزیم کاتالاز بیشترین میزان آنزیم در سطح تنش ۶۵ درصد بود و با افزایش شدت تنش در سطح تنش ۳۵ درصد ظرفیت زراعی میزان آن کاهش نشان داد. به صورتی که در سطح تنش ۳۵ درصد ظرفیت زراعی بیشترین و کمترین میزان محتوای آب نسبی به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های ۲۱۰ و ۳۱۳ بود، میزان MDA در این دو ژنوتیپ در این سطح تنش کمترین میزان را داشت برای آنزیم‌های CAT، GPX و APX ژنوتیپ‌های ۲۱۰ و ۲۹۱ بالاترین میزان را داشتند. بالا بودن فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی در ژنوتیپ‌های ۲۱۰ و ۲۹۱ همراه با پایین بودن میزان محتوای مالون‌دی‌آلدهید در این ژنوتیپ‌ها، به احتمال زیاد نشان‌دهنده ظرفیت بالای این ژنوتیپ‌ها برای حذف گونه‌های فعال اکسیژن تولیدی و ثبات عملکرد و اجزای عملکرد در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های پاداکسندگی، پراکسیداسیون چربی‌های غشاء، تنش خشکی، لوبیا چشم‌بلبلی.

مقدمه

در مناطقی که شرایط اقلیمی خشک و نیمه‌خشک را دارند که حدود دوسوم مساحت ایران را اقلیم خشک و نیمه‌خشک در بر گرفته است اهمیت بسزایی دارد، در این شرایط استفاده اقتصادی و مدیریت بهینه منابع آب

در بیشتر مناطق جهان خشکی یکی از مهم‌ترین عامل‌های محدودکننده تولید محصولات کشاورزی است. در این زمینه استفاده مؤثر و اقتصادی از منابع آب، به‌ویژه

آنزیمی و غیرآنزیمی از تجمع اکسیژن‌های فعال (ROS) جلوگیری کرده و گونه‌های مختلف گیاهی برای رویارویی با تنش خشکی از سازوکارهای مختلفی کمک می‌گیرند، که اغلب برای رویارویی با گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده سامانه آنتی‌اکسیدانی دارند، شواهد فیزیولوژیکی نشان داده که سامانه پاداکسندگی گیاه یک جزء مهم از سازوکارهای محافظتی گیاه در برابر تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش خشکی است (Sairame & Sirvastava, 2002). تنش‌های غیرزیستی تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن را القا می‌کنند که در غلظت‌های بالا برای یاخته زیان‌آور هستند. تولید این ترکیب‌ها مانند رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل باعث پراکسیداسیون چربی‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، آسیب به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاهای یاخته‌ای می‌شود (McDonald, 1999; Baily, 2004). پراکسیداسیون چربی (لیپید)های غشا توسط گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) باعث آسیب به غشاهای یاخته‌ای، افزایش نفوذپذیری غشاء و کاهش پایداری آن می‌شود (Dhindsa, 1991).

شاخص محتوای آب نسبی یاخته (RWC) جذب آب به‌وسیلهٔ بافت‌ها و یاخته‌ها را نشان می‌دهد (Silva *et al.*, 2007). محتوای آب نسبی به‌عنوان یک شاخص سودمند در گزینش برای تحمل به خشکی ارزیابی شده است (Dedio, 1975). در شرایط تنش خشکی کاهش نورساخت (فتوسنتز) باعث انتقال انرژی جذب‌شدهٔ نور خورشید به اکسیژن شده و در نتیجه باعث افزایش میزان تولید ROS و در نهایت افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید را به دنبال دارد. همچنین میزان کم اکسایش (اکسیداسیون) چربی‌های غشایی عاملی مهم در تحمل گیاهان به تنش به شمار می‌آید (Capmos *et al.*, 2003). گیاهانی که سطوح بالاتری از پاداکسندها دارند، مقاومت بیشتری به تنش اکسایشی نشان می‌دهند. دو آنزیم کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) از مهم‌ترین پاداکسندهایی هستند که باعث شکستن هیدروژن پراکسید به آب و مولکول‌های اکسیژن می‌شود (Vanai *et al.*, 2011).

مالون‌دی‌آلدئید در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع توسط گونه‌های فعال اکسیژن تولید

ضروری است، تا با توجه به واکنش گیاهان به کمبود آب و بررسی میزان حساسیت مراحل مختلف رشد به کم‌آبی بیشترین بهره‌برداری از منابع آبی صورت گیرد (Shahram & Daneshi, 2005).

لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata* L.) گیاهی است از خانوادهٔ لگومینوز و زیر خانوادهٔ پروانه‌آساها که منشأ آن را آفریقا بیان کرده‌اند (Majnoon Husseini, 2008). لوبیا چشم‌بلبلی به‌عنوان یکی از ارزان‌ترین منابع غذایی و پروتئینی در بیشتر نقاط جهان شناخته شده است. دانه‌های لوبیا چشم‌بلبلی محتوای ۲۰-۲۵ (تا حدود ۳۵) درصد پروتئین، ۱/۸ درصد چربی، ۶۰/۳ درصد کربوهیدرات و همچنین یک منبع سرشار از کلسیم و آهن هستند (Majnoon Hosseini, 2008). که نقشی مهم در تغذیهٔ انسان و دام دارد. لوبیا چشم‌بلبلی یک گیاه مقاوم به خشکی است و توانایی بالایی در تثبیت نیتروژن در خاک‌های فقیر و تحمل سایه دارد، بنابراین قابلیت رشد و کشت همراه با دیگر غلات و گیاهان ریشه‌ای را دارد (Singh *et al.*, 1999).

تنش خشکی یکی از محدودیت‌های تولید لوبیا در سطح جهان است، به‌نژادگران به دنبال اصلاح برای مقاومت به خشکی و تعیین رقم‌ها و منابع ژنتیکی مقاوم به خشکی سپس معرفی به لوبیاکاران هستند (Szilagy, 2003). اما با توجه به نیمه مقاوم بودن لوبیا چشم‌بلبلی به تنش خشکی و قابلیت رشد در خاک‌های فقیر (Coetzee, 1995; Mortimor *et al.*, 1997)، و با توجه به کوتاه بودن دورهٔ رشد لوبیا چشم‌بلبلی، برای دستیابی به عملکرد مطلوب باید آب کافی در دسترس آن قرار گیرد (Ilampour, 1992). در شرایط تنش خشکی ریزش برگ نشان‌دهندهٔ حساسیت برگ‌های لوبیا چشم‌بلبلی به تنش کم‌آبی است، پتانسیل آب برگ در ظهر به‌طور پیش‌رونده با زمان کاهش می‌یابد (Hesiao, 1973). تنش خشکی منجر به تعادل نداشتن بین واکنش‌های پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) و میزان گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) تولیدی در اثر تنش در گیاه و در نتیجه تنش اکسایشی می‌شود که اکسیژن فعال لازم برای نشانهٔ (سیگنال) درون‌یاخته‌ای و بین‌یاخته‌ای در غلظت‌های بالا می‌تواند باعث آسیب به قسمت‌های مختلف یاخته‌های گیاهی شود (Smirnov, 1993). سامانه‌های آنتی‌اکسیدان‌های

استفاده از روش‌های جدید زیست‌فناوری و نشانگرهای مولکولی از جمله بررسی فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی امری ضروری به نظر می‌رسد. برای تحقق این امر آگاهی از وضعیت دفاعی گیاه در رویارویی با تنش‌های غیرزیستی و به‌ویژه تنش خشکی ضروری است تا بتوان در مراحل بعدی، ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی را شناسایی کرد. هدف از انجام این تحقیق بررسی فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی CAT، APX و GPX و نیز تغییرهای محتوای آب نسبی (RWC) و پراکسیداسیون چربی‌های غشا (MDA) در برگ شماری از ژنوتیپ لوییا چشم‌بلیلی در شرایط تنش خشکی بود. از آنجایی که این ژنوتیپ‌ها بر پایه داده‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیک)، عملکرد و اجزاء عملکرد و شاخص تحمل به تنش خشکی انتخاب شدند شماری از این ژنوتیپ‌ها که مقادیر بالا، متوسط و پایین را داشتند در شرایط آزمایشگاهی با شاخص‌های فیزیولوژیک بررسی شدند تا واکنش ژنوتیپ‌های که عملکرد مناسبی در شرایط تنش خشکی داشتند را از لحاظ شاخص‌های فیزیولوژیک نیز بررسی کنند.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۱۳۹۳ به‌صورت آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام شد. آزمایش به‌صورت کرت‌های خردشده (اسپلیت‌پلات) در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. پنج ژنوتیپ ۲۱۰، ۲۹۱، ۳۰، ۳۰۷ و ۳۱۳ بر پایه میزان عملکرد اقتصادی آن‌ها در شرایط مزرعه‌ای انتخاب و در قالب این آزمایش در شرایط گلخانه‌ای بررسی شدند (جدول ۱). ژنوتیپ‌های ۳۱۳، ۳۰ و ۳۰۷ به‌عنوان ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا در شرایط تنش خشکی، ژنوتیپ ۲۹۱ با عملکرد متوسط و ژنوتیپ ۲۱۰ با عملکرد کم در شرایط تنش خشکی بودند (Mafakheri *et al.*, 2015). تیمار خشکی شامل سه سطح (۳۵، ۶۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) اعمال شد که در آغاز خاک موجود در گلخانه از الک عبور داده شد و آنگاه به نسبت ۱:۳ خاک رس: ماسه مخلوط شد. سپس نمونه‌ای از خاک

می‌شود تغییر در پراکسیداسیون چربی‌ها به‌عنوان شاخص میزان آسیب اکسایشی در موجودات زنده به شمار می‌آید. احتمال دارد دلیل اصلی آسیب شدید به غشای یاخته‌ای تولید رادیکال‌های سوپراکسید (O_2)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) باشد که در نهایت منجر به پراکسیداسیون چربی‌های غیراشباع غشای یاخته‌ای می‌شود. افزایش نفوذپذیری غشا و کاهش پایداری غشا می‌تواند منجر به افزایش نشت الکترولیت‌ها به فضای بین یاخته‌ای شود (Brosani *et al.*, 2001). در مقایسه با گیاهان حساس، بالا بودن فعالیت آنزیم‌های پاداکسند در گیاهان مقاوم به تنش خشکی نقش مهمی در مقاوم شدن آن‌ها به تنش خشکی دارد (Heso & Kaoo, 2003). اغلب در اثر تنش‌های غیرزیستی فعالیت آنزیم CAT در بیشتر گیاهان افزایش می‌یابد (Luna *et al.*, 2004) و در مواردی هم یا ثابت می‌ماند یا حتی کاهش پیدا می‌کند (Turkan *et al.*, 2005). آسکورات پراکسیداز (APX) با پاکسازی رادیکال‌های اکسیژن سمی از آسیب به غشا جلوگیری می‌کند (Abdul Jaleel *et al.*, 2009). پاداکسند آسکورات توانایی واکنش مستقیم با رادیکال سوپراکسید و دیگر گونه‌های فعال اکسیژن را دارد که می‌تواند شدت آسیب را در گیاهان در شرایط تنش خشکی کاهش دهد (Israr & Sahi, 2006). گایاکول پراکسیداز دسته‌ای از گلیکوپروتئین‌هایی هستند که در سیتوسول، دیواره یاخته‌ای و واکوئل قرار دارند و از اکسایش ترکیب‌های فنلی مانند گایاکول برای سم‌زدایی و تجزیه H_2O_2 استفاده می‌کنند، ترکیب‌های فنلی مانند گایاکول به‌عنوان دهنده الکترون به پراکسید هیدروژن عمل می‌کنند (Asada, 1992). آنزیم‌های پاداکسندگی مانند کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، آسکورات پراکسیداز (APX)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و گلوکاتایون ریداکتاز (GR) باعث حذف و غیرفعال شدن گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (McDonald, 1999; Bailly, 2004).

با توجه به اینکه دوسوم مساحت کشور ایران در منطقه خشک و نیمه‌خشک قرار گرفته است (Shahram & Daneshi, 2005)، شناسایی و تولید گیاهان مقاوم به تنش خشکی با عملکرد مناسب با

۵ کیلوگرمی برای کشت استفاده شد. وزن هر گلدان به‌طور دقیق یادداشت و درون هر کدام از آن‌ها میزان ۴ کیلوگرم خاک آماده‌شده، ریخته شد. سپس شمار چهار بذر از هر ژنوتیپ در گلدان‌ها کاشته شد. ژنوتیپ‌ها در سه سطح تنش ۳۵، ۶۵ و ۱۰۰ درصد FC بررسی شدند. پس از کاشت بذر آبیاری همه گلدان‌ها تا پیش از اعمال تنش به‌طور کامل انجام گرفت و بیست روز پس از سبز شدن گیاه، تنش به‌صورت وزنی و پیوسته در گلدان‌های موردنظر اعمال شد که به مدت چهارده روز اعمال تنش ادامه داشت. برای اعمال تنش در آغاز وزن گلدان‌هایی که در آن‌ها خاک ریخته شده بود مشخص شد. پس از آن هر روز گلدان‌ها را وزن کرده و بر پایه سطح تنش مربوط به آن‌ها و با توجه به میزان آبی که خاک از دست داده بود آبیاری انجام می‌شد تا وزن نمونه‌ها به سطح تنش موردنظر برسد. در نهایت در دوره‌های هفت و چهارده روز پس از آغاز تنش از گیاهان برای انجام آزمایش‌ها نمونه برگ تهیه شد و برای اندازه‌گیری شاخص‌های موردنظر به آزمایشگاه منتقل شدند.

برای تعیین مشخصات فیزیکی و شیمیایی آن به آزمایشگاه گروه خاک‌شناسی دانشکده کشاورزی فرستاده شد. مشخصات خاک در (جدول ۲) آمده است. میزان ظرفیت زراعی (FC) خاک نیز به‌صورت دستی و با استفاده از استوانه‌های نمونه‌برداری انجام شد. برای این منظور سه نمونه خاک آماده، در سه گلدان با آب به‌طور کامل اشباع و روی گلدان‌ها با پلاستیک محصور شد تا خاک به‌طور کامل اشباع شود و پس از ۲۴ ساعت که آب خلل و فرج خاک در اثر نیروی ثقل خارج شد پلاستیک را برداشته و با استفاده از استوانه‌های مخصوص از هر گلدان سه نمونه برداشته و وزن شدند و سپس نمونه‌ها به آون ۱۰۵ درجه سلسیوس منتقل شد، پس از ۲۴ ساعت دوباره نمونه‌ها وزن شدند تا وزن خشک محاسبه شود و با استفاده از این وزن‌ها و حجم استوانه ظرفیت زراعی محاسبه شد (Khani *et al.*, 2011). در نهایت میانگین FC این سه نمونه خاک به‌عنوان FC خاک لحاظ شد، در نهایت به‌صورت وزنی میزان آب به هر گلدان اضافه می‌شد و بنابراین و بر پایه سطح تنش‌های موردنظر تنش خشکی اعمال شد. از گلدان‌های

جدول ۱. مشخصات ژنوتیپ‌های مورد استفاده در تحقیق

Table 1. Specifications of genotypes used in the study

No.	Genotype No.	Genotype cod	Origin	Seed yield
1	210	62-157-00310	America	High
2	291	62-157-00421	America	High
3	313	62-157-00451	America	High
4	30	62-069-00030	India	Medium
5	307	62-157-00444	America	Low

جدول ۲. مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک استفاده‌شده برای کاشت

Table 2. Physical and chemical properties of the soil used for sowing

Texture calss	Silt (%)	Clay (%)	Sandy (%)	Organic matter (%)	EC (dSm ⁻¹)	PH
Clay	25	52	23	0.82	2.62	7.9

در آب مقطر قرار داده شدند و سپس وزن آن‌ها تعیین شد. آنگاه قطعه‌های برگ به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سلسیوس در آون قرار گرفتند تا وزن خشک آن‌ها نیز به دست آید. در نهایت از فرمول زیر برای به دست آوردن محتوای آب نسبی استفاده شد:

= محتوای آب نسبی (%)

$$\frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تر})}{(\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس})} \times 100$$

محتوای آب نسبی (RWC)

محتوای آب نسبی یک هفته پس از اعمال تنش اندازه‌گیری شد. برای این منظور از آخرین برگ توسعه‌یافته گیاه نمونه‌برداری انجام شد و بی‌درنگ نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و برگ‌ها به قطعه‌های ۱ سانتی‌متری تقسیم شدند. وزن تازه آن‌ها تعیین شد و برای تعیین وزن آماس، قطعه‌های برگ ۱۸-۱۶ ساعت در دمای اتاق (نزدیک به ۲۰ درجه سلسیوس)

پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز استفاده شد. از دستگاه Plate Reader برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین استفاده شد. برای این منظور ۱ سی‌سی محلول برادفورد داخل لوله‌های ۱/۵ سی‌سی ریخته شد و آنگاه ۵۰ میکرولیتر به آن عصاره برگ اضافه شد و پس از بیست دقیقه جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد، برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) استفاده شد.

آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با استفاده از اسپکتروفتومتر و به روش Aebi (1984) اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم از دستگاه طیف‌سنج نوری ساخت کشور ژاپن در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده شد. محلول‌ها و مواد استفاده‌شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=7) ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H₂O₂) ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم به مدت سه دقیقه در فاصله‌های زمانی بیست ثانیه‌ای ثبت شد. آنزیم کاتالاز بدون نیاز به عامل احیاکننده H₂O₂ را به O₂ و H₂O تبدیل می‌کند.

آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) نیز همانند آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به روش Chance و Maehly (1955) اندازه‌گیری شد. نوع و میزان مواد لازم مورد برای سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات منوسدیک ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد، ۳ میکرولیتر محلول گایاکول ۲۰۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. دستگاه طیف‌سنج نوری روی ۴۷۰ نانومتر تنظیم و با محلول شاهد که شامل همه مواد یادشده به استثنای عصاره آنزیم بود، واسنجی (کالیبره) شد. فعالیت آنزیم به مدت سه دقیقه و در فاصله‌های زمانی بیست ثانیه‌ای ثبت شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. میزان جذب با افزایش زمان روند افزایشی داشت. میزان فعالیت

مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

میزان اکسایش گیاهچه‌ها بر پایه تجمع مالون‌دی‌آلدئید برگ با استفاده از تیوباربیتوریک اسید تعیین شد. ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه برگ که از برگ‌های بخش میانی ساقه گرفته شده بودند در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (TCA ۱ درصد) هموژن شده و به مدت پانزده دقیقه در سانتی‌فیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. ۱ میلی‌لیتر از سوپرناتانت به دست آمده با ۲ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA ۵ درصد) حاوی اسیدتری‌کلرواستیک (TCA ۲۰ درصد) مخلوط و در حمام آب جوش (۹۵ درجه سلسیوس) به مدت سی دقیقه قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ده دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰ دور سانتی‌فیوژ شدند، جذب و چگالی نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر Shimadzu UV-160) تعیین شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید بر پایه فرمول زیر محاسبه شد که D اشاره به چگالی و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر ۱۰^۵ × ۱/۵۶) دارد (Carmak & Horst, 1999).

$$C = \frac{D}{E}$$

استخراج پروتئین کل

استخراج پروتئین کل بنا بر روش Bradford (1979) صورت گرفت. همه مراحل استخراج در دمای ۵±۱ درجه سلسیوس روی یخ انجام شد. آنگاه پودر نمونه‌های برگ در هاون چینی و تحت نیتروژن مایع، ۰/۲۵ گرم از بافت برگ پودر شده در فالكون ۱۵ میلی‌لیتری قرار داده شد و آنگاه به آن ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (تریس اسیدکلریدریک (pH=7/5) افزوده شد. پس از دو دقیقه ورتکس پودر نمونه‌ها و بافر استخراج، نمونه‌ها به مدت پانزده دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور ۱۳۰۰۰ سانتی‌فیوژ شدند. در نهایت سوپرناتانت به دست آمده درون لوله‌های جداگانه ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و داخل نیتروژن مایع فریز شدند. از عصاره به دست آمده برای خواندن میزان پروتئین کل و سنجش کمی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول

میانگین انجام شده در سطح تنش ۳۵ درصد ظرفیت زراعی بیشترین و کمترین میزان محتوای آب نسبی به ترتیب مربوط به ژنوتیپ ۲۱۰ با (۶۱/۸ درصد) و ۳۱۳ با (۴۱ درصد) بود و ژنوتیپ‌های ۳۰، ۲۹۱ و ۳۰۷ از نظر شاخص محتوای آب نسبی تفاوت معنی‌داری با ژنوتیپ ۲۱۰ نشان ندادند. از آنجایی که تنش اعمال شده و اندازه‌گیری‌ها در مرحله رشد رویشی بود این عدد به دست آمد، ولی ممکن است با ادامه تنش اعمال شده در این سطح تنش پیش از گلدهی گیاه، گیاهان تحت تنش از بین بروند (شکل ۱). همچنین در این آزمایش در سطح تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی ژنوتیپ ۳۰ در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها به میزان کمتری آب از دست داد و میزان محتوای آب نسبی آن ۶۲/۶۳ درصد بود در این سطح تنش ژنوتیپ ۲۹۱ نیز با میزان ۵۰/۳۴ درصد کمترین میزان محتوای آب نسبی را به خود اختصاص داد و بنابراین با توجه به میزان RWC و بالا بودن سطح عملکرد ژنوتیپ ۳۰ در شرایط تنش خشکی (Mafakheri et al., 2015) به احتمال زیاد این رقم در شرایط تنش شدید نسبت به دیگر رقم‌های عملکرد بالا و توان تحمل تنش خشکی بالاتری دارد. محتوای آب نسبی به‌عنوان یک شاخص سودمند در گزینش برای تحمل به خشکی ارزیابی شده است (Dedio, 1975). همچنین اهمیت محتوای آب نسبی به‌عنوان یک نشانگر مقاومت به خشکی به‌وسیله Canfield et al. (1988) نیز پیشنهاد شده است. چراکه کنترل فعالیت‌های فیزیولوژیک گیاه به میزان محتوای آب نسبی گیاه وابسته است (Graca et al., 2010). همچنین گزارش شده است که گیاهان متحمل به خشکی با جذب آب از پروتوپلاست آب بیشتری را در خود نگهداری می‌کنند، بنابراین میزان بالاتری RWC دارند (Silva et al., 2007). میزان و زمان تنش خشکی نیز روی محتوای آب نسبی گیاه تأثیر دارد به‌طوری‌که توسعه اندام‌های هوایی گیاه را مختل کرده و موجب می‌شوند که گیاهان کوچک باقی بمانند (Cameron, 1999).

پراکسیداسیون چربی‌های غشا (MDA)

پراکسیداسیون چربی در برگ‌های گیاهان با اندازه‌گیری

آنزیم گایاکول پراکسیداز بر پایه میزان جذب ترکیب نارنجی‌رنگ تتراگایاکول در میلی‌گرم غلظت پروتئین محاسبه شد.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

میزان فعالیت آنزیم با روش (Ranieri et al., 2003)، سنجدیده شد. محیط واکنش حاوی ۶۰۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۴۰۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار، ۴۰۰ میکرولیتر H₂O₂ ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش فعالیت آنزیم در طول دو دقیقه با فاصله‌های زمانی بیست ثانیه‌ای ثبت شد. در نتیجه واکنش بین آسکوربیک اسید و H₂O₂ در حضور آنزیم آسکوربات پراکسیداز، دهیدروآسکوربات تولید می‌شود که در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده و داده‌ها به‌صورت میکرومول آسکوربات اکسیده‌شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

نتایج و بحث

محتوای آب نسبی (RWC)

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس برای ژنوتیپ‌های موردبررسی و برای صفت محتوای آب نسبی نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بین ژنوتیپ‌ها و سطوح مختلف تنش وجود دارد (جدول ۳). مقایسه میزان محتوای آب نسبی یاخته‌ها در سطوح مختلف تنش نشان داد که با افزایش شدت تنش از میزان محتوای آب نسبی کاسته می‌شود. به‌طوری‌که در این آزمایش بیشترین میزان محتوای آب نسبی مربوط به شرایط شاهد یا ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان ۷۷/۶۲ درصد و کمترین میزان آن مربوط به سطح تنش ۳۵ درصد ظرفیت زراعی به میزان ۵۱/۹۹ درصد بود. همچنین بر پایه میزان محتوای آب نسبی می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ ۲۱۰ که عملکرد به نسبت کمتری در شرایط تنش نسبت به دیگر ژنوتیپ‌های موردبررسی در این تحقیق را دارد در شرایط تنش شدید برتری شایان توجهی نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها نشان داد. نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه‌های

شرایط تنش کمتر آسیب می‌بیند نام برد. گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) موجب اکسایش اسیدهای چرب غیراشباع غشاهای یاخته‌ای شده که در نهایت در اثر این عمل مالون‌دی‌آلدهید تولید می‌شود. در گیاهان مقاوم به شرایط تنش خشکی با فعال شدن سامانه پاداکسندگی آنزیمی و غیرآنزیمی موجب کاهش میزان ROSهای تولیدی درون گیاه می‌شوند و در نتیجه آسیب وارده به غشای یاخته‌ای و پراکسیداسیون چربی‌ها کاهش می‌یابد. کاهش پایداری غشاء یاخته‌ای میزان پراکسیداسیون چربی ناشی از ROSهای تولیدی را نشان می‌دهد (Patel & Hemantaranjan, 2012). در شرایط تنش خشکی کاهش نورساخت باعث انتقال انرژی جذب‌شده نور خورشید به اکسیژن شده و در نتیجه میزان تولید ROS و در نهایت تولید MDA افزایش یابد. همچنین میزان کم اکسایش چربی‌های غشایی عاملی مهم در تحمل گیاهان به تنش به‌شمار می‌آید (Capmos *et al.*, 2003). در ژنوتیپ‌های که مقاومت بالایی به تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی و سرما دارند از آنجایی که میزان مالون‌دی‌آلدهید اندازه‌گیری شده در آن‌ها کمتر است، به‌احتمال در این ژنوتیپ‌ها در ساختار دیواره یاخته‌ای میزان بیشتری از اسیدهای چرب غیراشباع وجود دارد که این چربی‌های غیراشباع پیوند دوگانه بیشتری در ساختار خود دارند و در نتیجه میزان تخریب غشا در این ژنوتیپ‌ها کمتر خواهد بود و کاهش در میزان مالون‌دی‌آلدهید در این ژنوتیپ‌ها را باعث می‌شود که در این تحقیق در سطح تنش شدید بیشترین میزان MDA مربوط به ژنوتیپ ۳۰۷ بود که تفاوت معنی‌دار با دیگر ژنوتیپ‌ها داشت و ژنوتیپ‌های ۳۱۳ و ۳۰ با وجود عملکرد بالا در شرایط تنش خشکی آسیب‌پذیری آن‌ها از تنش خشکی بر پایه شاخص مالون‌دی‌آلدهید کمتر بود به عبارتی مقاومت آن‌ها به تنش خشکی بالاتر است. افزایش در میزان محتوای MDA در گیاهان تحت تنش خشکی نشان داد که تنش خشکی باعث آسیب به ساختار غشا یاخته‌ای شد. در رابطه با شاخص محتوای آب نسبی (RWC) در شدیدترین سطح تنش خشکی، ژنوتیپ ۲۱۰ بالاترین میزان RWC و به عبارتی

محتوای مالون‌دی‌آلدهید اندازه‌گیری شده نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مختلف و سطوح تنش در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). بالا بودن میزان MDA در گیاه نشان‌دهنده حساسیت آن گیاه به تنش و آسیب بیشتر به چربی‌های غشا است. نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین سطوح مختلف تنش نشان داد که با افزایش شدت تنش میزان پراکسیداسیون چربی و میزان MDA نیز افزایش می‌یابد. افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدهید در شرایط تنش خشکی و بالا رفتن آن در رقم‌های حساس نشان‌دهنده تولید مقادیر زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن در این رقم‌های است. محققان در بررسی‌های فراوانی که انجام داده‌اند افزایش MDA در شرایط تنش را گزارش کرده‌اند (Svetleva *et al.*, 2012; Yasar *et al.*, 2010; Zlatev *et al.*, 2006; Turkan *et al.*, 2005). پراکسیداسیون چربی‌های غشا بیان‌کننده میزان آسیب اکسایشی به بافت‌های گیاهی است (Zhang & Kirkham, 1996)، و در نهایت منجر به کاهش یکپارچگی غشا می‌شود (Smirnof, 1993). لذا اغلب از مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان یک معیار برای بیان میزان افزایش آسیب اکسایشی استفاده می‌کنند (Demiral and Turkan, 2005). بین ژنوتیپ‌های موردبررسی نیز در سطوح مختلف تنش اختلاف معنی‌دار وجود داشت، به‌طوری‌که بیشترین میزان MDA مربوط به ژنوتیپ ۳۰۷ ($33/09 \mu\text{mol/gr}$) و کمترین میزان مربوط به ژنوتیپ ۲۹۱ ($9/6 \mu\text{mol/gr}$) بود (شکل ۲). نتایج به‌دست‌آمده از اثر متقابل گیاه با سطوح تنش نیز نشان داد که در سطح تنش ۳۵ درصد ژنوتیپ ۳۱۳ ($17/9 \mu\text{mol/gr}$) و ژنوتیپ ۲۱۰ ($14/31 \mu\text{mol/gr}$) به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر MDA داشتند. با کاهش شدت تنش یعنی از سطح ۳۵ به ۶۵ درصد میزان MDA در ژنوتیپ‌ها به‌طور چشمگیری کاهش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA) مربوط به ژنوتیپ ۳۰۷ ($23/09 \mu\text{mol/gr}$) در سطح تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی بود و کمترین میزان نیز در این سطح تنش مربوط به ژنوتیپ ۲۱۰ ($16/89 \mu\text{mol/gr}$) بود که می‌توان از این ژنوتیپ به‌عنوان ژنوتیپی که در

مقاوم‌ترین ژنوتیپ به تنش خشکی بر پایه این شاخص بود، در مرتبه دوم ژنوتیپ‌های ۳۰، ۲۹۱ و ۳۰۷ بالاترین میزان RWC را نشان دادند و تفاوت معنی‌داری بین این ژنوتیپ‌ها از نظر شاخص RWC دیده نشد، با وجود عملکرد بالا در این ژنوتیپ‌ها مقاومت به تنش خشکی آن‌ها نیز بالا بود.

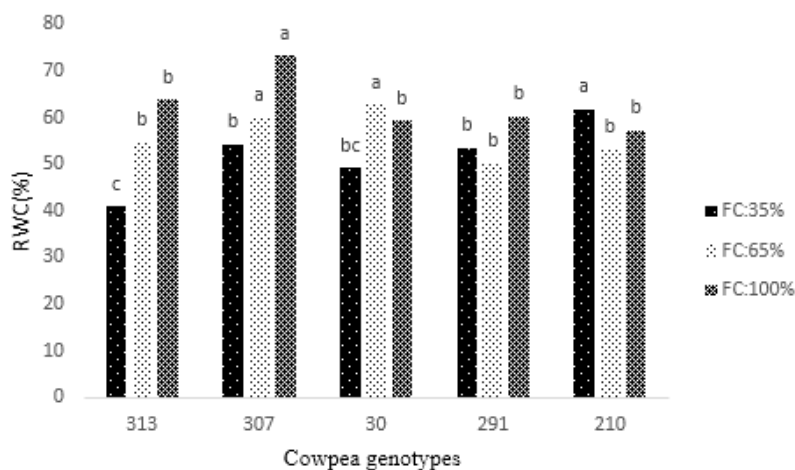
جدول ۳. تجزیه واریانس RWC و MDA (اعداد درون جدول میانگین مربعات هستند)

Table 3. Analysis of variance for RWC and MDA (The numbers in the table are mean square)

S.O.V	df	RWC	MDA
Repeat	2	19.24 ^{ns}	3.95 ^{ns}
Stress	2	449.27 ^{**}	272.38 ^{**}
Repeat × Stress	4	28.19 ^{ns}	0.41 ^{ns}
Genotype	4	112.03 ^{**}	127.16 ^{**}
Genotype × Stress	8	127.74 ^{**}	25.69 ^{**}
Error	24	20.11	2.83
C.V%		7.88%	9.57%

*, ** و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح ۱درصد، ۵درصد و غیرمعنی‌داری.

*, ** and ns: Significant at 5%, 1% probability levels and not significant, respectively.

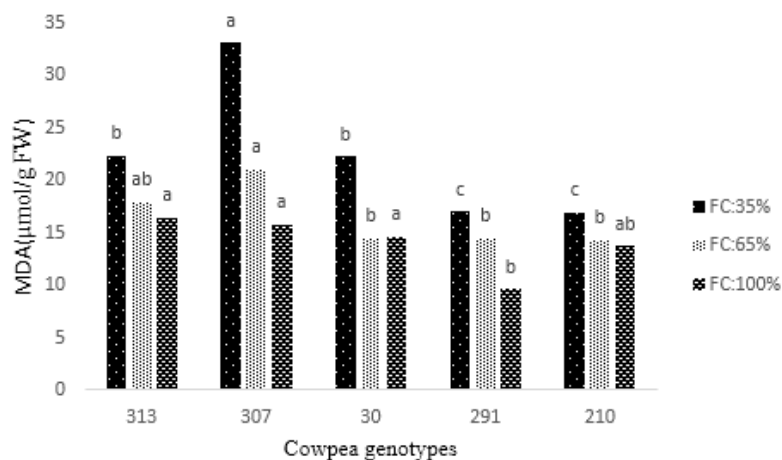


شکل ۱. میزان محتوای آب نسبی در ژنوتیپ‌های مختلف و در سطوح مختلف تنش خشکی

*برای هر صفت میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 1. Amount relative water content in different genotypes and different levels of drought stress

*Means followed by the same letters for each column are not significantly different by the Duncan test at 1% probability level.



شکل ۲. میزان MDA در رقم‌های مختلف و در سطوح مختلف تنش خشکی

*برای هر صفت میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 2. Amount MDA in different genotypes and different levels of drought stress

*Means followed by the same letters for each column are not significantly different by the Duncan test at 1% probability level.

جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین کاهش نشان داد (شکل ۳، جدول ۶). در تنش‌های درازمدت ولی خفیف (۶۵ درصد ظرفیت زراعی) ژنوتیپ‌های ۲۱۰ و ۲۹۱ واکنش مناسب‌تری با افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز از خود نشان دهند و مقادیر ROSهای تولید شد (H_2O_2) در اثر تنش را کاهش دادند که این عامل یکی از نشانه‌های مقاومت ژنوتیپ‌ها به تنش خشکی است. در سطوح تنش ۳۵ درصد و شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) کاهش فعالیت آنزیم CAT در تنش هفت و چهارده روز مشاهده شد. بنابراین با طولانی شدن مدت تنش فعالیت آنزیم در ژنوتیپ ۲۱۰ و ۲۹۱ بالاترین میزان را نشان داد و بین زمان‌های تنش برای این ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و در مرتبه دوم ژنوتیپ‌های ۳۱۳ و ۳۰ بالاترین میزان را فعالیت آنزیم کاتالاز را نشان دادند به صورتی در تنش چهارده روز بین ژنوتیپ‌های ۲۹۱ و ۳۱۳ از نظر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تفاوت معنی‌داری دیده نشد. بنابراین می‌توان گفت که افزایش فعالیت آنزیم CAT در این ژنوتیپ نشان‌دهنده تحمل آن‌ها به تنش خشکی است. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز به علت جلوگیری از تولید آنزیم یا تجزیه آنزیم به وسیله پروتئازهای القاشده پراکسی‌زوم و یا غیرفعال شدن نوری آنزیم رخ می‌دهد (Abedi & Pakniat, 2010). ظرفیت دفاع پاداکسندگی و افزایش تولید فعالیت آنزیمی گیاه در اثر تنش خشکی به ژنوتیپ گیاه نیز بستگی دارد. به طوری که ژنوتیپ‌های مختلف پاسخ‌های متفاوتی به تنش خشکی نشان می‌دهند. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان مختلف در شرایط تنش خشکی ممکن است به دلیل آسیب‌هایی مانند پراکسیداسیون چربی در غشا باشد که ROS به گیاه وارد کرده است (Xu et al., 2011). احتمال دارد متصل شدن کاتالاز به سالیسیلیک اسید و یا دیگر اجزا یاخته‌ای باعث غیرفعال شدن CAT شود در کنار این طولانی شدن مدت تنش ممکن است باعث کاهش فعالیت آنزیم شود (Jiang & Huang, 2001). فعالیت متفاوت آنزیم‌های پاداکسندگی در اثر تنش‌های محیطی در ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان می‌تواند به رفتار ژنتیکی متفاوت گیاهان برای تحمل به تنش خشکی

آنزیم کاتالاز (CAT)

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس فعالیت آنزیم کاتالاز در تنش هفت و چهارده روز نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش اختلاف معنی‌دار وجود داشت ولی اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۴). با افزایش زمان اعمال تنش از هفت روز به چهارده روز به‌طور میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش پیدا کرد. در این مرحله در تنش چهارده روز بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی بود و با افزایش شدت تنش از میزان فعالیت آنزیم کاسته شد (شکل ۳). Abedi & Pakniat (2010) و Terzi et al. (2011) Saglam et al. (2010) به ترتیب کاهش و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز را در شرایط تنش در گیاهان مختلف در بررسی‌های مختلفی گزارش کرده‌اند. آنزیم کاتالاز به‌طور مستقیم باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود (Jiang & Huang, 2001). گرچه با افزایش شدت تنش خشکی کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش خشکی در این بررسی دیده شد. اما Lee et al. (2001)، کاهش فعالیت این آنزیم توسط تنش‌های غیرزیستی دیگر مانند تنش سرما (Kubo et al., 1999)، تکانه (شوک) گرمایی (Moran et al., 1998) و تنش خشکی (Dat et al., 1994) نیز بیان شده است. نتایج آزمون‌های آماری نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در تنش هفت و چهارده روز مربوط به ژنوتیپ‌های ۲۱۰ و ۲۱۰ با مقادیر 0.0362 و 0.0374 (برای تنش هفت روز) و 0.0393 و 0.0374 (برای تنش چهارده روز) جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بود (جدول ۵). که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هفت و چهارده روز تفاوت معنی‌دار نداشتند. کمترین میزان متوسط فعالیت آنزیم در تنش هفت و چهارده روز به ژنوتیپ ۳۰۷ (0.01889) و (0.02355) اختصاص داشت.

نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح تنش نشان داد که بین سطوح تنش اختلاف معنی‌دار وجود دارد که در سطح تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (0.02933) جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین دیده شد که با افزایش سطح تنش به ۳۵ درصد ظرفیت زراعی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (0.02525)

نقش مهم و کلیدی در تجزیه H_2O_2 نداشته است و تجزیه H_2O_2 بیشتر توسط آنزیم‌های دیگر مانند APX و GPX صورت می‌گیرد.

مربوط باشد (Sayfzadeh *et al.*, 2011). در نهایت می‌توان گفت با توجه به کاهش فعالیت این آنزیم در شرایط تنش خشکی، به احتمال CAT در این آزمایش

جدول ۴. جدول تجزیه واریانس آنزیم‌های پاداکسندگی (اعداد داخل جدول میانگین مربعات هستند)

S.O.V	df	CAT	GPX	APX
Genotype	4	29.21**	24.13**	21.37**
Stress levels	2	6.4**	2.03 ^{ns}	9.42**
Genotype × Stress levels	8	1.74 ^{ns}	3.51**	0.53
Main error	30	0.0000007	0.0000005	0.0000015
Time	1	4.68**	70.66**	8.31**
Genotype × Time	4	2.71 ^{ns}	2.78**	2.69**
Stress levels × Time	2	5.06**	3.41**	0.94 ^{ns}
Genotype × Stress levels × Time	8	11.66**	4.41**	2.11 ^{ns}
Sub error	30	0.0000004	0.0000004	0.0000004

*, ** and ns: Significant at 5%, 1% probability levels and not significant, respectively.

*, ** and ns: Significant at 5%, 1% probability levels and not significant, respectively.

پروتئین‌های گیاهی در شرایط تنش خشکی شده است. نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها برای زمان‌های تنش نشان داد که در تنش هفت روز به طور میانگین بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به ژنوتیپ ۲۱۰ (۰/۰۱۱۷۶) و ۲۹۱ (۰/۰۰۸۲۰۱) و ژنوتیپ ۳۱۳ (۰/۰۰۸۰۷۵) و کمترین میزان فعالیت هم به ژنوتیپ ۳۰۷ (۰/۰۰۳۲۱۰) اختصاص داشت. در تنش چهارده روز که میزان فعالیت آنزیم در همه ژنوتیپ‌ها افزایش یافته بود، ژنوتیپ ۲۱۰ (۰/۰۲۲۱۵) بیشترین فعالیت آنزیمی و کمترین فعالیت آنزیم نیز در ژنوتیپ ۳۰۷ (۰/۰۰۷۳۵۶) مشاهده شد (جدول ۵). با افزایش مدت زمان تنش بر میزان آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز افزوده شده است. در زمان تنش هفت و چهارده روز پس از ژنوتیپ ۲۱۰ به ترتیب ژنوتیپ‌های ۲۹۱ و ۳۱۳ میزان بالای از GPX را تولید کردند. فعالیت بالای آنزیم‌های پراکسیداز باعث کاهش آسیب‌های یاخته‌ای در شرایط تنش خشکی شده و می‌توانند به عنوان یک سازوکار حفاظتی مؤثر در برابر تنش خشکی در نظر گرفته شود (Rostami & Rahemi, 2013). از آنجا که GPX ایندول ۳- استیک اسید (IAA) را تجزیه می‌کند و با تجزیه H_2O_2 در دفاع گیاه در برابر تنش‌های زنده و همچنین در زیست‌ساخت (بیوسنتز) لیگنین نقش دارد (Gill & Tuteja, 2010). در نهایت بین زمان‌های تنش چهارده روز (۰/۰۱۳۵۶) و هفت روز (۰/۰۰۷۰۶۴) اختلاف معنی‌داری دیده شد یعنی با افزایش مدت زمان تنش

آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز (GPX)

نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) در تنش هفت و چهارده روز نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و زمان تنش اختلاف معنی‌داری دارند و اثر متقابل ژنوتیپ × سطوح تنش و ژنوتیپ × زمان تنش آن‌ها معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین بین سطوح تنش نشان داد که در تنش هفت روز با بیشتر شدن شدت تنش میزان فعالیت GPX نیز افزایش یافت. در تنش هفت روز و چهارده روز بین سطوح تنش ۱۰۰ و ۳۵ و ۶۵ درصد اختلاف معنی‌دار بود به صورتی که با افزایش زمان تنش از هفت روز به چهارده روز میزان محتوای آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در کل افزایش نشان داد و بالاترین سطح آنزیم در سطح تنش ۶۵ درصد ظرفیت زراعی در چهارده روز دیده شد اما بین سطوح ۳۵ درصد و ۶۵ درصد ظرفیت زراعی در هفت و چهارده روز تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (شکل ۴). افزایش فعالیت GPX در شرایط تنش خشکی در بررسی‌های چندی گزارش شده است (Rostami & Rahemi, 2013; Gill & Tuteja, 2010; Guo *et al.*, 2002; Dichio *et al.*, 2006; Rajender *et al.*, 1991). در گیاه ارزن و در مورد غلات (Gonadi *et al.*, 2002) گزارش کرده بودند که در شرایط تنش خشکی، غلظت پروتئین در این گیاهان افزایش پیدا کرد. بنابراین می‌توان گفت که افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی در شرایط تنش خشکی به احتمال با دارنده تجزیه

تنش شدید رادیکال‌های سوپراکسید توسط آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) به H_2O_2 تبدیل می‌شود. (Guo *et al.*, 2006). گیاهان برای تجزیه H_2O_2 اضافی از آنزیم‌های پاداکسندگی کمک می‌گیرند. بر این پایه یکی از دلایل افزایش فعالیت GPX در برخی از ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش افزایش فعالیت SOD است. از سوی دیگر GPX با کاتالیز اکسایش الکل‌های سینامیل که مرحله نهایی تولید لیگنین است، در چوب شدگی نقش دارند (Quiroga *et al.*, 2000).

فعالیت GPX نیز افزایش یافت اما بین سطح تنش ۳۵، ۶۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی در زمان‌های تنش هفت و چهارده روز تفاوت معنی‌داری دیده نشد (جدول ۶). پراکسیدازها از جمله GPX در سیتوپلاسم یاخته‌ای و آپوپلاست یافت می‌شوند و در دامنه گسترده‌ای از فرآیندهای مرتبط با رشد و توسعه گیاه نقش دارند (Tayefi-Nasrabadi *et al.*, 2011). افزایش فعالیت آنزیم‌های APX، GPX و PPO در شرایط تنش‌های غیرزیستی باعث پاکسازی ROSها می‌شوند. در شرایط

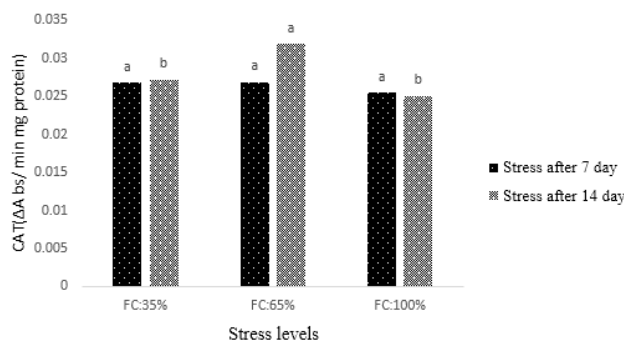
جدول ۵. مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های لوبیا چشم‌بلبلی برای زمان‌های مختلف تنش خشکی (۷ و ۱۴ روز)

Table 5. Means for different time's drought stress of cowpea genotypes (7 and 14 days)

Genotypes	Caatalaz (CAT)		Glutation peroxidase (GPX)		Ascorbat peroxidase (APX)	
	7 day	14day	7day	14day	7day	14day
210	0.03625 ^a	0.03374 ^a	0.01176 ^a	0.02215 ^a	0.03748 ^a	0.03538 ^a
291	0.03062 ^a	0.03093 ^{ab}	0.00820 ^{ab}	0.01556 ^b	0.03290 ^a	0.03438 ^{ab}
313	0.02459 ^b	0.02699 ^{bc}	0.00807 ^{ab}	0.01144 ^{bc}	0.02292 ^b	0.02823 ^{abc}
30	0.02149 ^b	0.02494 ^c	0.00407 ^{bc}	0.01129 ^{bc}	0.01819 ^b	0.02539 ^{bc}
307	0.01889 ^b	0.02355 ^c	0.02355 ^c	0.00321 ^c	0.01623 ^b	0.02304 ^c

* برای هر صفت میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

* Means followed by the same letters for each column are not significantly different by the Duncan test at 1% probability level.

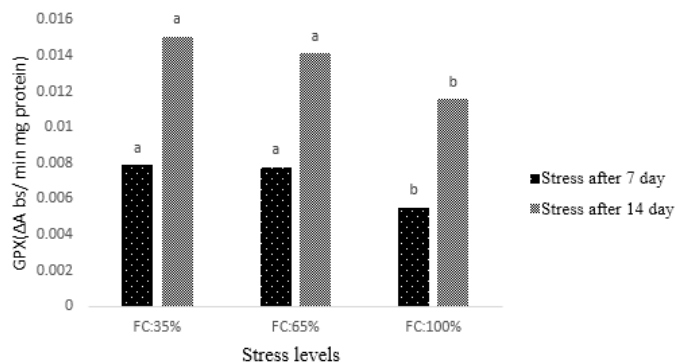


شکل ۳. روند تغییرپذیری کاتالاز (CAT) در تنش هفت و چهارده روز

* برای هر صفت میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 3. Trend of catalase (CAT) in seven and fourteen days drought stress

* Means followed by the same letters for each column are not significantly different by the Duncan test at 1% probability level.

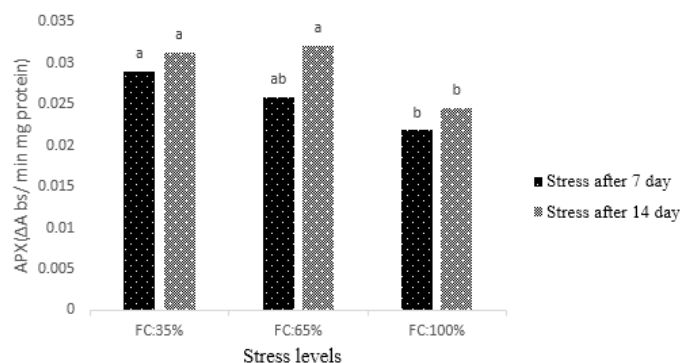


شکل ۴. روند تغییرپذیری گلوکوتیون پراکسیداز (GPX) در تنش هفت و چهارده روز

* برای هر صفت میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 4. Trend of Glutathione peroxidase (GPX) in seven and fourteen days drought stress

* Means followed by the same letters for each column are not significantly different by the Duncan test at 1% probability level.



شکل ۵. روند تغییرپذیری آسکوربات پراکسیداز (APX) در تنش هفت و چهارده روز

* برای هر صفت میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 5. Trend of Ascorbate peroxidase (APX) in seven and fourteen days drought stress

* Means followed by the same letters for each column are not significantly different by the Duncan test at 1% probability level.

معنی‌دار نشان داد. بیشترین فعالیت آنزیم APX در تنش هفت روز مربوط به ژنوتیپ‌های ۲۱۰ (۰/۰۳۷۴۸) و ۲۹۱ (۰/۰۳۲۹۰) بود که تفاوت معنی‌داری با ژنوتیپ ۳۱۳ (۰/۰۲۲۹۲) و ۳۰ (۰/۰۱۸۱۹) و ۳۰۷ (۰/۰۱۶۲۳) دارند. افزایش فعالیت آنزیم APX در ژنوتیپ‌ها نشان‌دهنده تحمل بیشتر آن‌ها در برابر تنش اکسایشی است. کمترین میزان متوسط فعالیت APX نیز به ژنوتیپ ۳۰۷ اختصاص داشت. در تنش چهارده روز بیشترین میزان متوسط فعالیت APX مربوط به ژنوتیپ‌های ۲۱۰ (۰/۰۳۵۳۸)، ۲۹۱ (۰/۰۳۴۳۸) و ۳۱۳ (۰/۰۲۸۲۳) بود. کمترین فعالیت APX نیز به ژنوتیپ ۳۰۷ (۰/۰۲۳۰۴) اختصاص داشت (جدول ۵). نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح و زمان تنش برای APX نشان داد که در تنش هفت روز با افزایش سطح تنش فعالیت آنزیم نسبت به حالت شاهد افزایش یافت. بیشترین فعالیت در این زمان در سطح تنش ۳۵ درصد دیده شد. اما در مدت‌زمان تنش چهارده روز بیشترین فعالیت آنزیم APX مربوط به سطح تنش ۶۵ درصد (۰/۰۳۲۰۸) بود (جدول ۶). فعالیت بالای آنزیم APX نشانه حفاظت بیشتر گیاه در برابر آسیب‌های اکسایشی القاشده به‌وسیله تنش خشکی است (Chai *et al.*, 2005). از سوی دیگر محصول واکنش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) یعنی H_2O_2 بستره (سوسترای) فعالیت APX است بنابراین H_2O_2 می‌تواند نقش سیگنال را برای القای APX ایفا کند (Faize *et al.*,

آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس فعالیت آنزیم APX در تنش هفت و چهارده روز نشان داد که بین ژنوتیپ و سطوح تنش و زمان‌های تنش اختلاف معنی‌داری وجود دارد ولی اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۴). در تنش هفت روز با اعمال تنش ۶۵ درصد از میزان فعالیت APX کاسته شد ولی با بیشتر شدن شدت تنش (۳۵ درصد) بر میزان فعالیت APX نیز افزوده شد. افزایش فعالیت APX در شرایط تنش خشکی در تحقیق‌های چندی گزارش شده است (Terzi *et al.*, 2010; Turkan *et al.*, 2005; Saglam *et al.*, 2011). در تنش چهارده روز با اعمال تنش ۶۵ درصد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) نیز افزایش یافت (Simirinof & Klamb, 2000). در شرایط تنش خشکی در گیاه جو تغییری در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز دیده نشد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه گلوکاتایون آسکوربات با استفاده از آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود (Moore & Roberts, 1998). در سطح تنش ۳۵ درصد کاهش معنی‌داری در فعالیت APX در زمان‌های تنش هفت و چهارده روز مشاهده نشد اما در زمان هفت روز با شدیدتر شدن تنش یعنی در سطح ۳۵ درصد فعالیت APX افزایش یافت (۰/۰۲۸۹۸)، اما این افزایش فعالیت تفاوت معنی‌دار با سطح تنش ۶۵ درصد نداشت اما با سطح تنش ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) تفاوت

آنزیمی و غیرآنزیمی را در برابر گونه‌های ROS تولیدی درون گیاه نشان می‌دهند. آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نقش موازی و یکسانی را در سامانه دفاعی گیاه بازی می‌کنند، به صورتی که وظیفه هر سۀ این آنزیم‌ها، سم‌زدایی و تجزیه گونه‌های اکسیژن فعال تولیدی (مثل پراکسید هیدروژن) درون یاخته‌های گیاهی است (Ariano *et al.*, 2005).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این تحقیق چنین استنباط می‌شود که ژنوتیپ‌های با میزان عملکرد متفاوت در شرایط محیطی مختلف واکنش‌های متفاوت آنزیمی و غیرآنزیمی را در برابر گونه‌های اکسیژن فعال تولیدی درون گیاه نشان می‌دهند. در این تحقیق نتایج مقایسه میانگین‌ها بین ژنوتیپ‌های مختلف در سطوح و زمان‌های مختلف تنش تفاوت و شباهت موجود بین ژنوتیپ‌ها را نشان داد در حالت کلی در مرتبه اول ژنوتیپ‌های ۲۱۰ و ۲۹۱ و در مرتبه دوم ژنوتیپ‌های ۳۱۳ و ۳۰ وضعیت مطلوبی را با توجه به میزان کمتر پراکسیداسیون چربی‌ها (محتوای پابین تر MDA) همراه با فعالیت بالاتر آنزیم‌های پاداکسندگی در شرایط تنش خشکی، پتانسیل بالاتری برای حذف گونه‌های فعال اکسیژن تولیدی و ثبات عملکرد بهتری در شرایط تنش خشکی نشان دادند. با توجه به اینکه افزایش فعالیت پاداکسندگی نشان‌دهنده افزایش حذف گونه‌های فعال اکسیژن است، لذا از این ویژگی می‌توان به‌عنوان یک صفت کارآمد برای شناسایی رقم‌ها و ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی نام برد. لذا می‌توان برای بررسی‌های تکمیلی اندازه‌گیری دیگر آنزیم‌های پاداکسندگی مانند گلوتاتیون‌ردکتاز، آسکوربیک اسید و ... نیز ارزیابی تحمل به تنش‌های غیرزیستی گیاهان برنامه‌های پژوهشی جامع‌تری را تدوین و اجرا کرد.

فعالیت بالای آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز (APX) باعث تجزیه بیشتر H_2O_2 و مقاومت بیشتر گیاه به تنش اکسایشی شده و کاهش فعالیت آنزیم نیز بر اثر کاهش ROS باعث کاهش ساخت (سنتز) آنزیم می‌شود (Polle, 2001). افزایش فعالیت APX در شرایط تنش‌های غیرزیستی مانند SOD و GPX بر اثر افزایش ROSها است که با فعال کردن مسیرهای انتقال پیام باعث افزایش بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های پاداکسندگی و افزایش فعالیت آنزیم‌ها می‌شود (Mittler, 2002).

جدول ۶. مقایسه میانگین سطوح تنش خشکی برای آنزیم‌های پاداکسندهی

Table 6. Means for drought stress levels of antioxidant enzymes

Drought stress levels (%)	Enzyme activity		
	Caatalaz (CAT)	Glotation peroxidase (GPX)	Ascorbat peroxidase (APX)
35%	0.02933 ^a	0.01146 ^a	0.03011 ^a
65%	0.02702 ^{ab}	0.00981 ^a	0.02896 ^a
100%	0.02525 ^b	0.00967 ^a	0.02318 ^b

برای هر صفت میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Means followed by the same letters for each column are not significantly different by the Duncan test at 1% probability level.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی، مالون‌دی‌آلدهید و محتوای آب نسبی می‌توان گفت تنش خشکی از راه بستن روزنه‌ها سبب کاهش جذب دی‌اکسیدکربن می‌شود و این حالت منجر به تحریک تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروژن و پراکسید می‌شود و در نتیجه سبب ایجاد تنش‌های اکسایشی درون یاخته‌های گیاهی، افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و آسیب به غشا می‌شود. در حالت کلی کاهش، حذف و یا سمیت‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن یک بخش مهم تحمل به تنش خشکی است، بررسی فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی نشان داد که ژنوتیپ‌های با عملکرد متفاوت واکنش‌های مختلف

REFERENCES

1. Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, X., Hong-Bo, S. & Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 427-436.
2. Abedi, T. & Pakniat, H. (2010). Antioxidant Enzyme Changes in Response to Drought Stress in Ten Cultivars of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genet Plant Breed*, 46(1), 27-34.
3. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. ELSEVIER. 105, 121-126.

4. Ariano, S., Bartolomeo, D., Cristos, X. & Andras, M. (2005). Antioxidant defenses in Olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32, 45-53.
5. Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging in plant. *Physiologia plantarum*, 85, 235-241.
6. Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14, 93-107.
7. Borsani, O., Valpuesta, V. & Butella, M.A. (2001) Evidence for the role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiology*, 126, 1024-1030.
8. Bradford, M.M. (1979). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
9. Carmak, I. & Horst, J.H. (1991). Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plant*, 83, 463-8.
10. Cameron, D. (1999). The effect of different irrigations on water relation and growth in *Rhododendron*. *New Phytologist*, 137, 90-95.
11. Campos, P.S., Quartin, V., Ramalho, J.C. & Nunes, M.A. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. *Journal of Plant Physiology*, 160, 283-292.
12. Canfield, T.J., Brunson, E.L., Dwyer, F.J., Ingersoll, C.G. & Kemble, N.E. (1998). Assessing sediments from the upper Mississippi River navigational pools using a benthic community evaluation and the sediment quality triad approach. *Arch Environ Contam Toxic*, 0135, 202-212
13. Chance, A. & Maehly, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidase. *Methods Biochem Anal*, 2, 764-775.
14. Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H. & Scott, I.M. (1998). Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermo tolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 116, 1351-1357.
15. Dedio, W. (1975). Water relations in wheat leaves as screening tests for drought resistance. *Canadian Journal of Plant Scienc*, 55, 369-378.
16. Demiral, T. & Turkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, Elsevier, 53, 247-257.
17. Dhindsa, R.S. (1991). Drought stress, Enzymes of Glutathione Metabolism, Oxidation Injury, and Protein Synthesis in *Turtula ruralis*. *Plant Physiology*, 95, 648-651.
18. Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M. J., Alcobendas, R., Artlip, T. & Hernandez, J.A. (2011) Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2599-2613.
19. Graça, J.P., Rodrigues, F.A., Farias, J.R.B., Oliveira, M.C.N., Hoffmann-Campo, C.B. & Zingaretti, S.M. (2010). Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(3), 189-197, ISSN 1677-0420.
20. Genadii, B., Irina, V., Anna, I. & Victor, K. (2002). Accumulation of dehydrin-like protein in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *Plant Biology*, 2, 157-170.
21. Gill, S.S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
22. Guo, Z., Ou, W., Lu, S. & Zhong, Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 828-836.
23. Hsu, S.Y. & Kao, C.H. (2003). Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol and antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regulation, Springer*, 39, 83-90.
24. Hsiao, T.C. (1973). Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiology*, 24, 519-570.
25. Ilampour, S. (1992). Irrigation scheduling and estimating evaporation sweating cowpea of farm (*Vigna sinensis* L.) by using the temperature of the green plant cover. MS Thesis, Department of Agriculture. ShirazUniversity. Iran. p166.
26. Israr, M. & Sahi, S.V. (2006). Antioxidative responses to mercury in the cell cultures of *Sesbania drummondii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 590-595.
27. Jiang, Y. & Huang, B. (2001). Drought and Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turf grasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. *Crop Science*, 41, 436-442.
28. Kazemi Shahandashti, S.S., Mali Amiri, R. & Zinali Khanghah, H. (2011). Assessment some indicators of cell damage under cold stress in pea Jam. *Genetic Novin Journal*, 6(4), 70-77. (in Farsi)

29. Khani, M.R., Heidari Sharif Abad, H., Madani, H. & Amini, Z. (2011). The comparison between different levels of drought stress on yield and components yield of 5 cultivars of sesame in tropical region. The first national conference on new issues in agriculture, Islamic Azad University Saveh branch, Saveh, Iran. http://www.civilica.com/Paper-NCNCA01-NCNCA01_217.html.
30. Kubo, A., Aono, M., Nakajima, N., Saji, H., Tanaka, K. & Kondo, N. (1999). Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 112, 279-290.
31. Lee, D. H., Kim, Y. S. & Lee, C. B. (2001). The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.), *Journal of Plant Physiology*, 158, 737-745.
32. Luna, C.M., Pastori, G.M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S. & Foyer, C.H. (2004). Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 56, 417-423.
33. Majnoon Hoseini, N. (2008). Culture and Production Leguminous, Tehran University Publication Jahad. (in Farsi)
34. Mafakheri, Kh. Bihamta, M. R., Abbasi, A. R. & Rasolnia, A.R. (2015). Genetic diversity of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Germplasm Based on Agronomic and Morphological Traits. *Seed and Plant, Improvement Journal*, 1(31), 135-162. (in Farsi)
35. McDonald, M. B. (1999). Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. *Seed Science and Technology*, 27(11), 177-237.
36. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Science.*, 7, 405-415.
37. Moran, J.F., Becana, M.I., Iturbe-Ormaetxe, S., Frechilla, R., Klucas, V. & Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Plant Science*, 194, 346-352.
38. Moore, K. & Roberts, L.J. (1998). Measurement of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 28, 659-71.
39. Patel, P.K. & Hemantaranjan, A. (2012). Antioxidant Defence System in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Influence by Drought Stress Implement at Pre- and Post-anthesis Stage. *American Journal of Plant Physiology*, 7(4), 164-173.
40. Polle, A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling: Computer simulation as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, 126, 445-462.
41. Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A. & Soldatini, G.F. (2003). Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Jornal of Experimental Botany*, 54, 2529-2540.
42. Rajendra, P., Kandpal, C.S., Vaidyanathan, M., Udayakumar, K.S. & Appaji, R. (1991). Alterations in the activities of the enzymes of proline metabolism in Ragi (*Eleusine coracana*) leaves during water stress. *Journal of Biosciences*, 3, 361-370.
43. Rostami, A.A. & Rahemi, M. (2013). Screening Drought Tolerance in Caprifig Varieties in Accordance to Responses of Antioxidant Enzymes. *World Applied Sciences Journal*, 21(8), 1213-1219.
44. Sairam, R.K., Deshmukh, P.S. & Saxena, D.C. (1998). Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Plan Biology*, 41(3), 387-394.
45. Sairam, R.K. & Srivastava, G.C. (2002). Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science, Elsevier*, 162, 897-904.
46. Saglam, A., Saruhan, N., Terzi, R. & Kadioglu, A. (2011). The Relations between Antioxidant Enzymes and Chlorophyll Fluorescence Parameters in Common Bean Cultivars Differing in Sensitivity to Drought Stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1), 60-68.
47. Sayfzadeh, S., Habibi, D., Taleghani, D.F., Kashani, A., Vazan, S., Sadre Qaeni, S.H., Khodaei, A.H., Boojar, M.M.A. & Rashidi, M. (2011). Response of Antioxidant Enzyme Activities and Root Yield in Sugar Beet to Drought Stress. *International Journal of Agriculture & Biology*, 1560-8530, ISSN Online, 1814-9596.
48. Silva, M.A., Jifon, J.L., Silva, J.A.G. & Sharma, V. (2007). Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Vol.19, No.3, (July/September 2007), pp. 193-201, ISSN 1677-0420.
49. Svetleva, D., Krastev, V., Dimova, D., Mitrovska, Z., Miteva, D., Parvanova, P. & Chankova, S. (2012). Drought tolerance of Bulgarian common bean genotypes, charactrized by some biochemical markers for oxidative stress. *Journal of Central European Agriculture*, 13(2), 349-361.
50. Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125(1), 27-58.

51. Sharma, P. & Dubey, R.S. (2005). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation, Springer*, 46, 209-221
52. Shahram, A. & Daneshi, N. (2005). The most appropriate amount of water needed in irrigation and agriculture agricultural white beans. Ninth Congress of Soil Science. Tehran, Iran. http://www.civilica.com/Paper-SSCI09-SSCI09_457.html.
53. Szilagyi, L. (2003). Influence of drought on seed yield components in common bean, Blug. J. Plant Physiology. Special Issue, 320-330.
54. Tayefi-Nasrabadi, H., Dehghan, G., Daeihassani, B., Movafegi, A. & Samadi, A. (2011). Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 751-763.
55. Terzi, R., Saglam, A., Kutlu, N., Nar, H. & Kadioglu, A. (2010). Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of Phaseolus vulgaris cultivars. *Turkish Journal of Botany*, 34, 1-10.
56. Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. & Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168, 223-231.
57. Vanai, S., Siosemardeh, A. & Haidari, GH.R. (2011). The effects of cold stress during seed germination and seedling antioxidant enzyme activities and some physiological traits in pea (*Cicer arietinum*). *Iranian Journal of Field Crops Research*, 9(3), 514-524.
58. Yasar, F., Uzal, O. & Ozpay, T. (2010). Changes of the lipid peroxidation and chlorophyll amount of green bean genotypes under drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 5(19), 2705-2709.
59. Zhang, J. & Kirkham, M.B. (1996). Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, 132, 361-373.
60. Zlatev, Z.S., Lidon, F.C., Ramalho, J.C. & Yordanov, I.T. (2006). Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biology Plantrum*, 50(3), 389-394.

Assessment of antioxidant enzymes activity and peroxidation of membrane lipid in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) genotypes under normal and drought stress condition

Khosro Mafakheri¹, Mohamad Reza Bihamta^{2*} and Ali Reza Abbasi³

1. Ph.D. Student of Plant Breeding, Plant breeding and Biotechnology Department, University of Tabriz, Iran

2, 3. Professor and Associated Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: May 26, 2015 - Accepted: Nov. 22, 2015)

ABSTRACT

Understanding the physiological processes associated with drought stress lead to an understanding of the basic mechanisms of resistance, maintaining yield potential and contribute to the identification of drought tolerant cultivars. For this purpose, the effects of drought stress in cowpea genotypes was evaluated using five different genotypes with different yield potential in a pot experiment in split plot in a randomized complete block design with three replications under drought stress levels (35, 65 and 100% of field capacity) in the College of Agriculture, University of Tehran in 2014. Drought stress decreased RWC of cells and increase antioxidant enzyme and MDA content. Drought stress decreased RWC and increase MDA content and antioxidant enzyme activities by increasing levels of stress, but for catalase enzyme in stress levels the highest activity was 65%. With increasing stress and the stress level of 35% of field capacity, catalase activity exhibited higher reduction. Genotypes 210 and 313 had the lowest MDA level at 35% of field capacity and in these two genotypes enzymes CAT, GPX and APX 210 had the highest value. High levels of antioxidant enzyme activity in genotypes 210 and 291 associated with lower levels of MDA content in these genotypes, probably indicates the high potential of these genotypes to eliminate oxygen species production and yield stability compared with other genotypes.

Keywords: Antioxidant enzyme, cowpea, drought stress, lipid peroxidation.