

مطالعه واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی چمن *Agrostis stolonifera* و *Festuca arundinacea* Schreb. نسبت به تنش خشکی

ایوب ملا احمد نالوسی^۱، عبدالله حاتم‌زاده^۱، محمود قاسم‌نژاد^{۱*} و محمدحسن علی بیگلویی^۲

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲ گروه مهندسی آب، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

تنش خشکی از مهم‌ترین عوامل محیطی محدود کننده رشد چمن‌ها در مناطق خشک و نیمه خشک است. در پژوهش حاضر، تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی دو گونه چمن، *Agrostis stolonifera* var. *palustris* و *Festuca arundinacea* Schreb. var. *ky 31* طی یک دوره ۴۰ روزه تنش خشکی (نیروی مکش ۷۰-۷۵ سانتی‌بار خاک) با فواصل زمانی ۱۰ روز یک بار و همچنین مرحله رشد مجدد در پایان دوره تنش ارزیابی گردید. گیاهان شاهد در مدت اعمال تنش خشکی به طور منظم در حد ظرفیت زراعی خاک (نیروی مکش ۲۰-۲۵ سانتی‌بار خاک) آبیاری شدند. نتایج نشان داد که با طولانی شدن مدت تنش، محتوای نسبی آب برگ و میزان کلروفیل برگ به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. میزان نش‌یونی و غلظت پرولین برگ طی تنش خشکی به طور معنی‌داری افزایش یافت و در زمان آبیاری مجدد در پایان دوره تنش خشکی به سطح شاهد رسید. میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز برگ تا ۳۰ روز پس از آغاز تنش خشکی در گونه‌های *F. arundinacea* Schreb. و *A. stolonifera* افزایش و پس از آن کاهش یافت. در گونه *F. arundinacea* Schreb. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تا ۲۰ روز پس از آغاز تنش افزایش و سپس کاهش نشان داد. همچنین در گونه *F. arundinacea* Schreb. فعالیت آنزیم کاتالاز در طول تنش افزایش و در زمان رشد مجدد کاهش یافت. در گونه *A. stolonifera* طی تنش خشکی و رشد مجدد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. در مجموع، نتایج نشان داد که گونه مقاوم *F. arundinacea* Schreb. تحت شرایط تنش خشکی دارای نش‌یونی کمتر، محتوای نسبی آب برگ بیشتر و تخریب کلروفیل کمتری در مقایسه با گونه حساس *A. stolonifera* بوده است.

واژه‌های کلیدی: *Agrostis stolonifera*، *Festuca arundinacea* Schreb.، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش خشکی،

پرولین

مقدمه

در مناطقی که تأمین آب برای فضای سبز روز به روز مشکل‌تر می‌شود، تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عامل محیطی محدود کننده رشد در علفی‌های چمنی است (Salahvarzy *et al.*, 2008). در حدود یک سوم اراضی جهان با کمبود بارندگی مواجه است و ایران با متوسط بارندگی ۲۵۰ میلی‌متر در سال جزو مناطق خشک جهان طبقه‌بندی شده است و از این قاعده مستثنی نیست. عدم بارندگی کافی و توزیع غیریکنواخت آن در طول دوره رشد در مناطق خشک و نیمه خشکی نظیر ایران باعث شده است که نیاز آبی چمن‌ها به قدر کافی تأمین نشود. با توجه به این که قرار گرفتن این گیاهان در معرض تنش خشکی به ویژه در برخی از ماه‌های سال امری اجتناب‌ناپذیر است، بنابراین برای رشد و کیفیت مناسب باید کمبود آب از طریق آبیاری جبران شود. همچنین با توجه به این که خشکی از ویژگی‌های بارز کشور است و راه فراری از این پدیده طبیعی و غیرقابل تغییر وجود ندارد و از سوی دیگر، مصرف منابع انرژی، آب و مواد غذایی به طور روز افزونی در جامعه در حال افزایش است، بنابراین اتخاذ روش‌هایی همچون بهره‌برداری صحیح از آب به همراه استفاده از شیوه‌های صحیح شامل کشت گیاهان مقاوم، شناخت ارتباط کمبود آب خاک و رشد گیاهان در هر مرحله و بررسی واکنش‌های فیزیولوژیک در مقابله با تنش، مفید خواهد بود (Kocheiki and Nasiri, 1994; Mahalati, 1994).

در ایران، تأثیر تنش خشکی بر اغلب محصولات زراعی به طور مفصل بررسی شده است، اما متأسفانه در مورد چمن‌ها کمتر پژوهش‌های همه‌جانبه انجام شده

است، در صورتی که تغییرهای فیزیولوژی و بیوشیمیایی زیادی در هنگام تنش خشکی در گونه‌های مختلف چمن‌ها دیده می‌شود. به طور معمول، ارزیابی عکس‌العمل چمن‌ها به کمی رطوبت خاک بدون توجه به عکس‌العمل‌های فیزیولوژیک آنها انجام می‌گیرد. در این زمینه، از محتوای نسبی آب برگ (RWC) به عنوان شاخصی مناسب از وضعیت آب برگ‌ها یاد می‌شود که در صورت پیشرفت تنش خشکی کاهش می‌یابد و سبب تغییرهایی در غشای یاخته‌ای می‌شود (Fu *et al.*, 2004). گیاهان با استفاده از سازوکارهای متفاوت، در شرایط خشکی فشار تورژسانس سلول‌های خود را بالا نگه می‌دارند تا رشد آنها متوقف نشود. از جمله سازوکارهای کارآمد برای حفظ فشار تورژسانس در شرایط تنش خشکی تنظیم اسمزی است (Morgan, 1984). سال‌هاست که فیزیولوژیست‌ها تجمع پرولین آزاد در گونه‌های متعدد گیاهی در پاسخ به تنش اسمزی را مطالعه می‌کنند (Hare *et al.*, 1999). پرولین آزاد و پیوندی به پروتئین‌ها از اجزای ضروری سلول‌های گیاهی هستند. میزان پرولین آزاد در بسیاری از گیاهان در پاسخ به پتانسیل پایین آب (نظیر خشکی و شوری) به مقدار زیاد تجمع می‌یابد (Ranney *et al.*, 1991; Kuznetsov and Shevyakova, 1999). پرولین علاوه بر اسمولیت بودن، به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی نیز قابل بررسی است، بنابراین می‌توان پرولین را یک آنتی‌اکسیدانت غیرآنزیمی برای دفع آثار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به شمار آورد (Gill and Tuteja, 2010).

در شرایط تنش، عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و توانایی گیاه برای سمیت‌زدایی این گونه‌ها

۳۷ درجه و ۲۵ دقیقه شمالی) انجام شد. برای این منظور دو گونه چمن آگروستیس (*Agrostis stolonifera* var. *palustris*) و فستوکا (*Festuca arundinacea*) Schreb. var *ky 31*) در مخلوط خاکی با نسبت حجمی ۱:۱:۲ از خاک با بافت لومی، ماسه، کود دامی و پیت ماس در گلدان‌هایی با قطر متوسط ۲۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر کشت شدند. پس از رشد و استقرار گیاهان طی ۱۳ هفته، گیاهان جهت اعمال تنش خشکی در سطوح مختلف رطوبتی خاک، شامل آبیاری کامل در حد ظرفیت زراعی (نیروی مکش ۲۰-۲۵ سانتی‌بار) و تنش خشکی (نیروی مکش ۷۰-۷۵ سانتی‌بار) قرار گرفتند (Alizadeh, 2004). نیروی مکش خاک در سطوح مختلف رطوبتی با استفاده از دستگاه تانسومتر (مدل ۲۷۲۵ ARL Series Model، شرکت Soilmoisture، آمریکا) که در هر گلدان کار گذاشته شده بود، اندازه‌گیری شد. در هر نوبت آبیاری خاک تا حد ظرفیت زراعی آبیاری شد. در مدت انجام این آزمایش میانگین دمای شب و روز گلخانه به ترتیب در حدود ۱۴ و ۲۳ درجه سانتیگراد تنظیم شد. صفات فیزیولوژیک شامل: محتوای نسبی آب برگ (RWC)، نشت یونی (EL)، محتوای کلروفیل، میزان پروکلین و فعالیت آنزیمی SOD، POD، APX و CAT در هر مرحله از نمونه‌برداری اندازه‌گیری شد. نخستین نمونه برداری برگی برای ارزیابی صفات، پیش از اعمال تیمار تنش خشکی و نمونه‌برداری‌های بعدی در دوره‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روزه پس از آغاز تنش خشکی صورت گرفت. پس از پایان تنش خشکی به منظور بررسی رشد مجدد، ۱۸ روز پس از آبیاری دوباره، آخرین نمونه‌برداری انجام گرفت.

باعث آسیب به گیاه شده و تنش اکسیداتیو را به دنبال دارد (Arghavani et al., 2010). برای سمیت‌زدایی، مجموعه‌ای از سیستم‌ها در گیاه وارد عمل می‌شوند که از جمله آنها می‌توان به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی نظیر: سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) اشاره کرد (Dabrowska et al., 2007). Xu و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در چمن‌های کنتاکی بلوگراس (*Poa pratensis*) و تال فسکیو (*Festuca arundinacea*) طی تنش به طور معنی‌داری برای کاهش تأثیرات تنش افزایش یافت. ارتباط بین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بالا رفتن مقاومت در چندین گونه گیاهی تأیید شده است. اگرچه، اثر تنش خشکی بر رشد و عملکرد گیاهان مختلف در سال‌های گذشته مطالعه شده است، اما تحقیقات اندکی در مورد آثار تنش خشکی روی چمن انجام شده است. مدیریت مناسب و درک پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی چمن در شرایط تنش خشکی نقش مهمی در به حداقل رساندن مشکلات چمن‌کاری در نواحی خشک و نیمه خشک دارد. بر این اساس، هدف از پژوهش حاضر شناسایی سازوکار مقاومت و میزان تحمل دو گونه چمن و همچنین پیدا کردن زمان بحرانی آبیاری طی تنش است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۰ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان (با طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی

سانتریفیوژ (مدل 5417R، شرکت Eppendorf، آلمان) شد و در نهایت، عصاره استونی شفاف جدا شد و پس از تاریکی، میزان کلروفیل با روش اسپکتروفتومتری در دو طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین مقدار کلروفیل‌های a و b و کلروفیل کل از رابطه‌های ۳، ۴ و ۵ استفاده شد (Arnon, 1949).

$$\text{Ch}_a = (19.3 \times A_{663} - 0.86 A_{645}) V / 100W \quad \text{رابطه ۳:}$$

$$\text{Ch}_b = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) V / 100W \quad \text{رابطه ۴:}$$

$$\text{Ch}_T = \text{Ch}_a + \text{Ch}_b \quad \text{رابطه ۵:}$$

غلظت پرولین: برای اندازه‌گیری غلظت پرولین، ۰/۵ گرم بافت برگ چمن با نیتروژن مایع درون هاون آسیاب شد و به آن ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۱۰ درصد اضافه گردید. این مخلوط از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ عبور داده شد. سپس به ۲ میلی‌لیتر از محلول صاف شده ۲ میلی‌لیتر از معرف نین‌هیدرین (حاوی ۱/۲۵ گرم نین‌هیدرین در ۳۰ میلی‌لیتر استیک اسید و ۳۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۶ مولار) و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید اضافه گردید و پس از آن به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. واکنش با فرو بردن در یخ متوقف شد. سپس، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه و به مدت ۱۵-۲۰ ثانیه ورتکس شد. جذب نوری محلول قرمز رنگ فاز رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (مدل Itd T80+UV/VIS; PG، شرکت Leicestershire Instruments Model، انگلستان) خوانده گردید. غلظت پرولین نمونه‌ها از روی منحنی جذب غلظت‌های پرولین محلول‌های استاندارد با رابطه ۶ محاسبه شد (Bates et al., 1973).

رابطه ۶:

نشت یونی (EL): برای تعیین EL، از هر گلدان ۹ عدد برگ تازه نمونه‌برداری شد و در لوله‌های آزمایشگاهی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر قرار داده شد. درب لوله‌ها با سرپوش پلاستیکی بسته و در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از ۱۲ ساعت، هدایت الکتریکی اولیه محیط (EC₁) با دستگاه EC سنج (مدل MI306، شرکت Milwaukee WI، آمریکا) اندازه‌گیری شد. پس از آن، نمونه‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شدند تا به طور کامل بافت‌ها کشته شوند و همه الکترولیت‌ها آزاد شود. سپس، نمونه‌ها تا دمای ۲۵ درجه سانتیگراد خنک شد و هدایت الکتریکی ثانویه (EC₂) اندازه‌گیری شد و EL از رابطه ۱ محاسبه شد (Shaoyun et al., 2009).

$$\text{EL} = (\text{EC}_1 / \text{EC}_2) \times 100 \quad \text{رابطه ۱:}$$

محتوای نسبی آب برگ (RWC): برای تعیین محتوای نسبی آب برگ در ابتدا ۰/۵ گرم برگ تازه (Wf) توزین و به مدت چهار ساعت در آب مقطر قرار داده شد، پس از این مدت مجدداً توزین شد (Ws) و در پایان، درون پاکت‌های کاغذی قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سانتیگراد نگه داشته شد تا کاملاً خشک شود (Wd). در نهایت، محتوای نسبی آب برگ از رابطه ۲ محاسبه شد (Shaoyun et al., 2009).

$$\text{RWC} = [(Wf - Wd) / (Ws - Wd)] \times 100 \quad \text{رابطه ۲:}$$

میزان کلروفیل: برای اندازه‌گیری کلروفیل، مقدار ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ آسیاب شده گیاه با یک میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شد. مخلوط به دست آمده، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه

بیان شد (Giannopolitis and Ries, 1977).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از طریق اندازه‌گیری اکسید شدن آسکوربات با اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر برای مدت زمان یک دقیقه انجام شد. سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرات جذب بر زمان در طول موج ۲۹۰ نانومتر برای یک دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیمی با ضریب خاموشی $2/\lambda \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ محاسبه و در نهایت، فعالیت آنزیم بر حسب یونیت بر گرم وزن تر در یک دقیقه بیان شد (Nakano and Asada, 1981).

فعالیت آنزیم کاتالاز از طریق اندازه‌گیری تجزیه آب اکسیژنه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای مدت زمان یک دقیقه انجام گرفت و فعالیت آنزیمی با ضریب خاموشی $40 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ محاسبه و در نهایت، فعالیت آنزیم بر حسب یونیت بر گرم وزن تر در یک دقیقه بیان شد (Chance and Maehly, 1955).

تحلیل داده‌ها: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه عامل شامل: دو گونه چمن، تنش خشکی و زمان در ۴ تکرار اجرا شد. تحلیل آماری داده‌های حاصل از صفات اندازه‌گیری توسط نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی نتایج نشان داد که در شرایط تنش خشکی، میزان نشت یونی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، با افزایش مدت تنش میزان نشت یونی به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت، همچنین بیشترین میزان

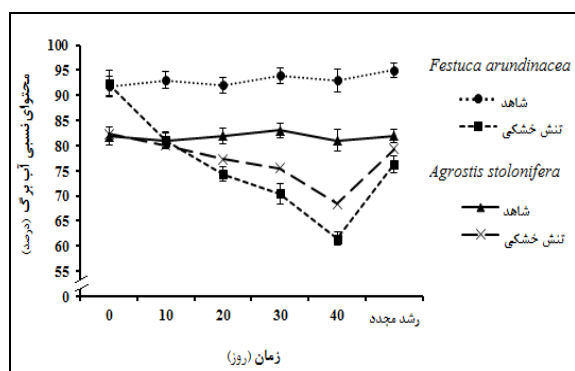
[۵/۵ (گرم نمونه)] / [میکرومول / میکروگرم ۱۱۵/۵ / (میلی لیتر تولوئن × میلی لیتر / میکروگرم پرولین)] = (μmol/gFw) پرولین

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی: برگ‌های تازه از چمن در هاون چینی ریخته و به آن نیتروژن مایع اضافه شد. ۰/۵ گرم از برگ آسیاب شده با افزودن ۱ میلی لیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (اسیدیته=۷) حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVPP) ۲ درصد و EDTA ۰/۱ میلی مولار به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد، سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام عمل سانتریفیوژ مایع رویی برداشته شد. از مایع رویی برای سنجش آنزیم‌های APX، SOD، POD و CAT استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیم POD با استفاده از آب اکسیژنه ۴۵ میلی مولار و گایاکول ۲۲۵ میلی مولار و بافر فسفات و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی محاسبه شد و میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از رابطه قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی گایاکول پراکسیداز $26/6 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ محاسبه و در پایان، فعالیت آنزیم بر حسب یونیت بر گرم وزن تر در یک دقیقه بیان شد (Chance and Maehly, 1955).

سنجش فعالیت آنزیم SOD در مخلوط واکنش به حجم ۱/۵ میلی لیتر و حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (اسیدیته=۷)، EDTA ۰/۱ میلی مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار، NBT، ریوفلاوین و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیم انجام گردید. جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و در نهایت، فعالیت آنزیم بر حسب یونیت بر گرم وزن تر

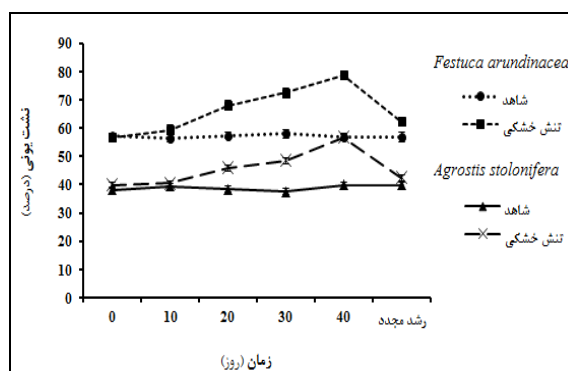
تنش بیشترین کاهش در محتوای نسبی آب برگ در دو گونه چمن مشاهده شد. همچنین، پس از آبیاری دوباره، چمن‌ها توانستند محتوای نسبی آب برگ خود را به سطح شاهد برسانند (شکل ۲). Naloussi و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که رشد مجدد پس از تیمار تنش خشکی با توانایی هر چه بیشتر در جذب آب در اثر آبیاری پس از یک دوره خشکی در دو گونه چمن *A. stolonifera* و *F. arundinacea* Schreb. همبستگی دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های برگ پس از اعمال تنش خشکی، همچنان ظرفیت خود را در جذب آب و ایجاد آماس حفظ می‌کنند. همبستگی منفی و معنی‌داری بین محتوای نسبی آب برگ و تنش یونی طی تنش خشکی به دست آمد و این موضوع نشانگر آن است که کاهش محتوای نسبی آب برگ به آسیب‌پذیری بیشتر غشا و در نتیجه آزاد شدن الکترولیت‌های بیشتر طی تنش خشکی منجر می‌شود (جدول ۱).



شکل ۲- مقایسه تغییرات محتوای نسبی آب برگ طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.

گیاهان تنش دیده نسبت به شاهد افزایش یافت، همچنین بیشترین میزان تخریب کلروفیل در ۴۰ روز پس از آغاز تنش مشاهده شد (شکل ۳). کاهش میزان

نشست یونی در ۴۰ روز پس از آغاز تنش مشاهده شد. میزان نشست یونی در گونه *A. stolonifera* بیشتر از گونه *F. arundinacea* Schreb. بود (شکل ۱). گزارش‌های پیشین نیز نشان داده است که بیشترین میزان نشست یونی غشا سلول برگی در تنش طولانی مدت و در پایین‌ترین سطح آبیاری خاک اتفاق می‌افتد (Inze and Van Montagu, 1995). آبیاری مجدد باعث شد که میزان نشست یونی در دو گونه چمن به سطح اولیه شاهد برسد. Wang و Huang (۲۰۰۴) نیز نشان دادند که پایداری غشای سلول‌ها در چمن کنتاکی بلوگراس پس از رفع تنش، دوباره به حالت اولیه باز می‌گردد. از آنجا که نشست یونی در اثر تخریب غشا و خروج یون‌ها اتفاق می‌افتد، بنابراین برای رشد دوباره چمن‌ها بازسازی غشا و کاهش نشست یونی ضروری است. نتایج نشان داد که محتوای نسبی آب برگ چمن‌ها در شرایط تنش خشکی کاهش پیدا کرد. با افزایش مدت تنش این کاهش بیشتر بود و ۴۰ روز پس از آغاز



شکل ۱- مقایسه تغییرات نشست یونی طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.

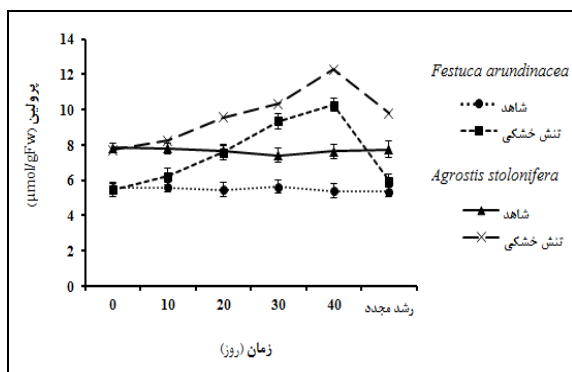
نتایج نشان داد که در شرایط تنش خشکی میزان کلروفیل برگ به طور معنی‌داری کاهش یافت، با طولانی شدن مدت تنش میزان تخریب کلروفیل در

یافت، با افزایش مدت تنش میزان پرولین در گیاهان تنش دیده نسبت به شاهد افزایش یافت، همچنین بیشترین میزان پرولین در ۴۰ روز پس از آغاز تنش مشاهده شد (شکل ۴). پرولین به عنوان یک محافظ در برابر تنش عمل می‌کند؛ بدین ترتیب که به طور مستقیم یا غیرمستقیم با درشت مولکول‌ها اثر متقابل دارد و از این طریق به حفظ شکل و ساختار طبیعی آنها تحت شرایط تنش کمک می‌کند. یکی از ویژگی‌های فیزیکی پرولین حلالیت بالای آن است (Kuznetsov and Shevyakova, 1999). همزمان با بهبود وضعیت آبی برگ‌ها و پس از رشد مجدد، گونه *A. stolonifera* توانست، با کاهش سریعتر محتوای پرولین خود تا سطح شاهد نسبت به *F. arundinacea* Schreb.، زمینه را برای رشد و نمو دوباره فراهم نماید. مطابق با همین نتایج، Salahvarzy و همکاران (۲۰۰۸) نیز نشان دادند که میزان پرولین پس از رشد مجدد پس از تنش خشکی کاهش می‌یابد. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین نشت یونی و پرولین طی تنش خشکی برای گونه *F. arundinacea* Schreb. ($R=0.95$) و گونه *A. stolonifera* ($R=0.98$) به دست آمد و این موضوع نشان دهنده آن است که با شدت تنش و افزایش آسیب غشا، میزان پرولین تولید شده توسط گیاه برای حفظ فشار اسمزی افزایش می‌یابد (جدول ۱). نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های POD و SOD برگ تا ۳۰ روز پس از آغاز تنش خشکی در هر دو گونه چمن افزایش و سپس کاهش یافت. در گونه *F. arundinacea* Schreb. فعالیت آنزیم APX تا ۲۰ روز پس از آغاز تنش افزایش و سپس کاهش نشان داد.

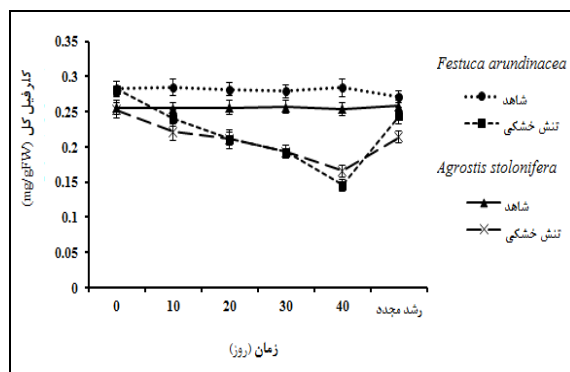
کلروفیل در اثر تنش خشکی می‌تواند به علت کاهش سنتز یا افزایش تجزیه آن باشد. Santos (۲۰۰۴) گزارش کرده است که در روزهای نخست پس از تنش، فعالیت آنزیم کلروفیلاز که سبب تجزیه کلروفیل می‌شود، افزایش می‌یابد، اما با گذشت زمان، کاهش سنتز کلروفیل علت اصلی کاهش میزان کلروفیل است. در واقع، خشک شدن بافت‌های برگ نه تنها موجب تخریب کلروفیل می‌شود، بلکه مانع ساخته شدن آن نیز می‌شود. در شرایط کمبود آب، غلظت آمینو اسید پرولین افزایش می‌یابد، از آنجا که کلروفیل و پرولین هر دو از پیش ماده مشترکی به نام گلوتامات (Glutamate) سنتز می‌شوند، می‌توان گفت افزایش سنتز پرولین در شرایط تنش خشکی به کاهش سنتز کلروفیل می‌انجامد (Aspinall and Paleg, 1981). همچنین Egert و Tevini (۲۰۰۲) اظهار داشتند که کاهش کلروفیل در گیاهان تحت تنش خشکی، از علامت‌های مشخص تنش اکسیداتیو است. میزان کلروفیل پس از آبیاری دوباره در مقایسه با زمان تنش افزایش یافت اما به سطح شاهد نرسید. همچنین Wang و Huang (۲۰۰۴) نیز نشان دادند که میزان کلروفیل پس از رشد مجدد نسبت به زمان تنش در کتاکای بلوگراس به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. همبستگی منفی و معنی‌داری بین نشت یونی و کلروفیل کل طی تنش خشکی به دست آمد که این روند نشان می‌دهد که با افزایش شدت تنش، میزان تخریب کلروفیل افزایش می‌یابد (جدول ۱). نتایج نشان داد که در شرایط تنش خشکی میزان پرولین در هر دو گونه چمن به طور معنی‌داری افزایش

رشد مجدد فعالیت آنزیم APX و CAT به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت (شکل‌های ۵، ۶، ۷، ۸).

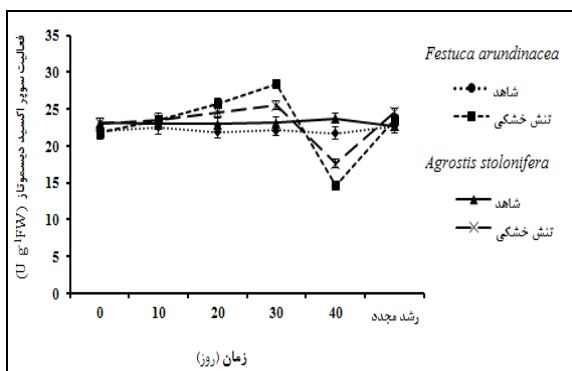
همچنین در گونه *F. arundinacea* Schreb. فعالیت CAT طی تنش افزایش و در زمان رشد مجدد کاهش یافت. در گونه *A. stolonifera* طی تنش خشکی و



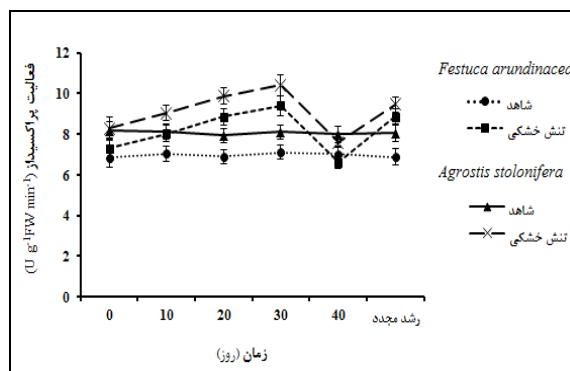
شکل ۴- مقایسه تغییرات پرولین طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.



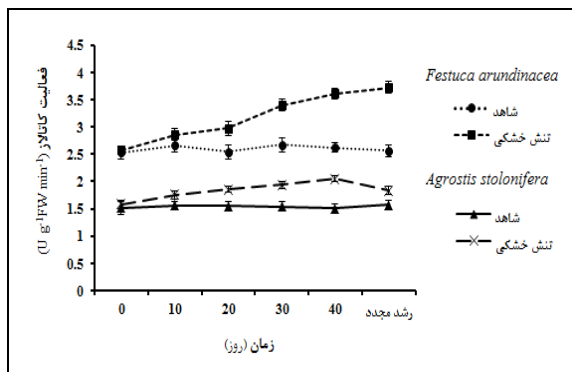
شکل ۳- مقایسه تغییرات کلروفیل کل طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.



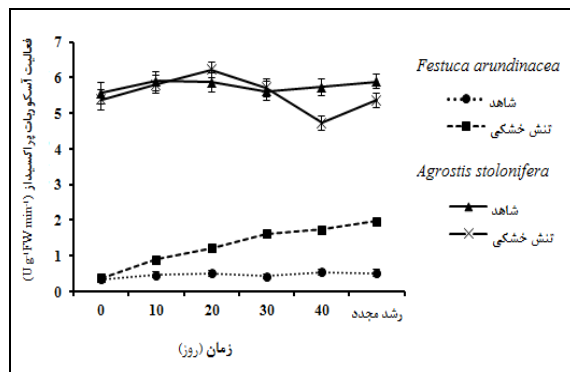
شکل ۶- مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم SOD طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.



شکل ۵- مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم POD طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.



شکل ۸- مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم CAT طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.



شکل ۷- مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم APX طی تنش خشکی و مرحله رشد مجدد. مقادیر، میانگین ۴ تکرار \pm StD است.

جدول ۱- ضریب همبستگی پیرسون بین شاخص‌های اندازه‌گیری شده در دو گونه چمن. *، ** به ترتیب همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

کاتالاز	آسکوربات	سوپراکسید	پراکسیداز	پرویلین	کلروفیل کل	محتوای نسبی آب برگ	نشت یونی	شاخص‌های اندازه‌گیری شده	
							۱	نشت یونی	
						۱	** -۰/۹۸۹	محتوای نسبی آب برگ	
					۱	** ۰/۹۵۸	** -۰/۹۳۱	کلروفیل کل	
				۱	** -۰/۹۶۰	** -۰/۹۵۷	** ۰/۹۵۴	پرویلین	<i>Festuca arundinacea</i>
			۱	۰/۱۶۵	۰/۰۷۶	۰/۲۹۳	-۰/۲۶۱	پراکسیداز	Schreb.
		۱	* ۰/۸۸۹	-۰/۵۷۱	۰/۵۱۴	۰/۶۹۴	-۰/۶۵۹	سوپراکسید دیسموتاز	
	۱	۰/۸۰۳	۰/۷۷۶	-۰/۵۲۳	۰/۳۹۶	۰/۵۲۲	-۰/۵۰۵	آسکوربات پراکسیداز	
۱	۰/۳۰۵	-۰/۴۰۷	۰/۰۴۴	** ۰/۹۵۶	** -۰/۹۸۹	** -۰/۹۲۴	** ۰/۹۰۵	کاتالاز	
							۱	نشت یونی	
						۱	** -۰/۹۵۸	محتوای نسبی آب برگ	
					۱	** ۰/۹۹۷۴	** -۰/۹۷۳	کلروفیل کل	
				۱	** -۰/۹۵۷	** -۰/۹۸۹	** ۰/۹۸۹	پرویلین	<i>Agrostis stolonifera</i>
			۱	-۰/۰۸۸	۰/۰۵۴	۰/۱۶۵	-۰/۱۰۶	پراکسیداز	
		۱	** ۰/۹۶۳	-۰/۲۷۱	۰/۲۸۴	۰/۳۵۸	-۰/۳۰۹	سوپراکسید دیسموتاز	
	۱	۰/۵۶۴	۰/۷۴۰	۰/۵۰۶	-۰/۵۶۵	-۰/۴۴۷	۰/۵۱۵	آسکوربات پراکسیداز	
۱	۰/۸۶۵	۰/۴۱۹	۰/۵۴۶	۰/۷۳۱	-۰/۶۵۴	-۰/۶۴۴	* ۰/۶۹۶	کاتالاز	

پاکسازی ROS های تولید شده در آپوپلاست است (Zhang, 2003). بنابراین، آنزیم‌های SOD، POD، CAT و APX می‌توانند یک سیستم دفاعی برای مقابله با تخریب اکسیداتیو باشند. کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD، POD ۳۰ روز پس از تنش خشکی در گونه‌های *A. stolonifera* و *F. arundinacea* Schreb. نشان‌دهنده آن است گیاه تا حدی قادر به افزایش فعالیت آنزیم‌های خاص است و زمانی که میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) بیش از فعالیت آنتی‌اکسیداتیوی گیاه باشد، دیگر گیاه توانایی تحمل تنش را نخواهد داشت. پس از آبیاری دوباره در چمن‌های *F. arundinacea* Schreb. و *A. stolonifera* فعالیت آنزیم‌های SOD و POD در گیاهان تحت تنش خشکی نسبت به شاهد دوباره افزایش یافت که نشان‌دهنده آن است که هنوز در گیاه عوامل سمیت زایی وجود دارد که گیاه برای از بین

آنزیم SOD نخستین سد دفاعی در مقابل ROS و پالاینده اصلی رادیکال سوپر اکسید است (Shehab et al., 2010). این آنزیم نقش کلیدی در تنظیم غلظت رادیکال سوپر اکسید و پراکسید دارد (Diego et al., 2003). Shehab و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (CAT، APX) و SOD) برای حفاظت از گیاه در مقابل تنش خشکی صورت می‌گیرد. آنزیم POD نقش کلیدی در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن و حذف مالون‌دی‌آلدئید که باعث پراکسیداسیون غشا می‌شود و در حفظ و ثبات و پایداری دیواره سلولی نقش دارد (Hojati et al., 2011). Xu و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، APX در چمن‌های کنتاکی بلوگراس و تال فسکیو طی تنش شوری به طور معنی‌داری در راستای کاهش آثار تنش افزایش یافت. همچنین بیان شده است که APX یکی از عوامل مهم

افزایش نشت یونی، میزان فعالیت این آنزیم برای کاهش سمیت ROSهای تولید شده افزایش می‌یابد. مشابه با پژوهش‌های دیگر (Anderson et al., 1995) بررسی فعالیت آنزیمی در پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم‌های مختلف بر اساس یک الگو در هنگام تنش خشکی و آبیاری مجدد تغییر نمی‌کند. پاسخ آنتی‌اکسیدان‌ها به کمبود آب، به شدت تنش و نوع گونه گیاهی بستگی دارد. گونه‌های گیاهی مقاوم معمولاً ظرفیت حفاظتی کارآمدتری در مقابل تنش اکسیداتیو القا شده توسط تنش کم آبی دارند که می‌تواند از طریق بالا بردن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش پیدا کند (Hosseini Boldaji et al., 2012).

جمع‌بندی

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که گونه مقاوم به خشکی *F. arundinacea* Schreb. تحت شرایط تنش خشکی دارای نشت یونی کمتر، محتوای نسبی آب برگ بیشتر و تخریب کلروفیل کمتری بود، با توجه به این که گونه حساس به خشکی *A. stolonifera* دارای نشت یونی و تخریب کلروفیل بیشتر و محتوای نسبی آب برگ کمتر در مقایسه با *F. arundinacea* Schreb. بود می‌توان بیان کرد که این گونه تا زمانی می‌تواند خشکی را تحمل کند که میزان محتوای نسبی آب برگ از ۷۰ درصد کمتر و میزان نشت یونی از ۷۴ درصد بیشتر نشود که باعث از بین رفتن سلول‌های گیاه شود. همچنین، مشخص شد که تا ۳۰ روز پس از تنش کارکردهای فیزیولوژیک این گونه به خوبی ادامه پیدا کرد، اما پس از ۳۰ روز با

بردن آنها مجبور به افزایش فعالیت برخی آنزیم‌ها است. Bian و Jiang (۲۰۰۹) در بررسی خود روی چمن کنتاکی بلوگراس گزارش کردند میزان بیان ژن POD پس از رشد مجدد در گیاهان تنش دیده بالا رفته و به همین دلیل میزان فعالیت آنزیم به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یافته است.

بنا بر گزارش Kavitha و همکاران (۲۰۰۸) تنش اکسیداتیو موجب افزایش در سطح بیان آنزیم APX در برگ‌های *Avicennia marina* می‌شود. آنها همچنین بیان نمودند که فعالیت APX در برگ‌های این گونه نقش مهمی در کاستن آثار زیان‌بار تنش اکسیداتیو دارد. نقش APX در حذف ROS از سلول‌های گیاه *Euphorbia esula* L. در مواجهه با تنش‌های محیطی نظیر: شوری، خشکی و سمیت عناصر نیز توسط Davis و Swanson (۲۰۰۱) گزارش شده است. در پژوهش حاضر، میزان فعالیت آنزیم APX طی تنش خشکی و همچنین طی رشد مجدد پس از تنش در گونه *A. stolonifera* در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۷). مطابق با نتایج پژوهش حاضر، Bian و Jiang (۲۰۰۹) گزارش کردند که فعالیت آنزیم APX در زمان رشد مجدد پس از تنش خشکی روی چمن کنتاکی بلوگراس افزایش یافت. عکس‌العمل‌های متفاوت این آنزیم در زمان رشد مجدد پس از تنش به گونه گیاهی، شدت تنش و میزان ROSهای تولید شده وابسته است.

در پژوهش حاضر، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین نشت یونی و آنزیم CAT در هر دو گونه چمن طی تنش خشکی و رشد مجدد به دست آمد (جدول ۱). این روند نشان می‌دهد که با افزایش شدت تنش و

اختیار باشد، چمن‌ها را در مقابل تنش خشکی حفاظت کرد و آنها را سبز نگه داشت.

سپاسگزاری

امکانات لازم برای انجام این پژوهش توسط دانشگاه گیلان فراهم گردیده است که بدین وسیله مراتب قدردانی اعلام می‌گردد.

توجه به این که میزان تولید ROSها از میزان فعالیت آنتی‌اکسیداتیو گیاه بیشتر شد و میزان نشت یونی و میزان تخریب کلروفیل نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت، کارکردهای فیزیولوژیک این گونه مختل گردید. بنابراین، با مشخص کردن آستانه تحمل هر گیاه می‌توان با آبیاری در زمان‌های بحرانی و با مصرف آب کمتر تا زمانی که آب کافی برای آبیاری مجدد در

منابع

- Alizadeh, A. (2004) Soil and plant water relations. Imam Reza University Press, Mashhad (in Persian).
- Anderson, M. D., Prasad, T. K. and Stewart, C. R. (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109: 1247-1257.
- Arghavani, M., Kafi, M., Babalar, M. and Nadari, R. (2010). A physiological and morphological study on *Lolium perenne* L. and *Poa pratensis* L. as affected by trinexapac-ethyl, mowing management and nitrogen source under salt stress conditions. PhD thesis, University of Tehran, Karaj, Iran (in Persian).
- Arnon D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
- Aspinall, D. and Paleg, I.G. (1981) Proline accumulation: physiological aspects, physiology and biochemistry of drought resistance. Australian Academic Press, Sydney.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, L. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bian, S. and Jiang, Y. (2009) Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae* 120: 264-270.
- Bradford, M. M. (1976) 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.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Dabrowska, G., Kata, A., Goc, A., Hebda, M. S. and Skrzypek, E. (2007) Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 49: 7-17.
- Davis, D. G. and Swanson, H. R. (2001) Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *Environmental and Experimental Botany* 46: 95-108.
- Diego, A. M., Oliva, M. A., Martinez, C. A. and Cambraia, J. (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49: 69-76.
- 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.

- Fu, J., Fry, J. and Huang, B. (2004) Minimum water requirements of four turfgrasses in the transition zone. *Horticulture Science* 39: 1740-1744.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Hare, P. D., Cress, W. A. and Staden, J. V. (1999) Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* 50: 413-434.
- Hojati, M., Modarres-Sanavy, A. M. M., Karimi, M. and Ghanati, F. (2011) Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. *Acta Physiologia Plantarum* 33: 105-112.
- Hosseini Boldaji, S. A., Khavari-Nejad, R. A., Hassan Sajedi, R., Fahimi, H. and Saadatmand, S. (2012) Water availability effects on antioxidant enzyme activities lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Acta Physiologia Plantarum* 34: 1177-1186.
- Inze, D. and Van Montagu, M. (1995) Oxidative stress in plants. *Current Opinion Biotechnology* 6: 153-158.
- Kavitha, K., Venkataraman, G. and Parida, A. (2008) An oxidative and salinity stress induced peroxisomal ascorbate peroxidase from *Avicennia marina*: molecular and functional characterization. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 794-804.
- Kocheki, A. and Nasiri Mahalati, M. (1994) Ecology of plants. 2nd edition. Jahad Daneshgahi Mashhad Press, Mashhad (in Persian).
- Kuznetsov, V. V. and Shevyakova, N. I. (1999) Proline under stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology* 46: 274-286.
- Morgan, J. M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 335-339.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Naloussi, A. M., Hatamzadeh, A., Ghasemnezhad, M. and Biglouei, M. H. (2014) Effect of exogenous sodium nitroprusside on drought resistance of creeping bentgrass and tall fescue. *Iranian Society For Horticultural Science* 14(4): 427-438.
- Ranney, T. G., Bassuk, N. L. and Whitlow, T. H. (1991) Osmotic adjustment and solute contributes in leaves and roots of water-stressed cherry (*Prunus*) trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 684-688.
- Santos, C. V. (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Environmental Science Horticulture* 103: 93-99.
- Shaoyun, L., Su, W., Li, H. and Guo, H. (2009) Abscisic acid improves drought tolerance of triploid bermudagrass and involves H₂O₂ and NO-induced antioxidant enzyme activities. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 132-138.
- Salahvarzy, Y., Tehrani, A. and Gazanchian, A. (2008) Physiomorphological changes under drought stress and rewatering in endemic and exotic turfgrasses. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology* 9(3): 193-204 (in Persian).
- Wang, Z. and Huang, B. (2004) Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. *Crop Science* 44: 1729-1736.
- Xu, R., Yamada, M. and Fujiyama, H. (2013) Lipid peroxidation and antioxidative enzymes of two turfgrass species under salinity stress. *Pedosphere* 23(2): 213-222.

The study of physiological and biochemical responses of *Agrostis stolonifera* and *Festuca arundinacea* Schreb. under drought stress

Ayoub Molaahmad Nalouisi ¹, Abdollah Hatamzadeh ¹, Mahmood Ghasemnezhad ^{1*} and Mohammad Hassan Alibiglouei ²

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran

² Department of Water Engineering, Faculty of Agriculture Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran

Abstract

Drought stress is a main limiting factor of turfgrass growth in arid and semi-arid regions. Therefore, in this study, the physiological and biochemical changes in two turfgrass species *Agrostis stolonifera* and *Festuca arundinacea* Schreb during drought stress (70-75 centibar) in a 40-day period and recovery were investigated. Control plants during drought stress were regularly irrigated at soil field capacity (20-25 centibar). The results showed that leaf relative water content and leaf chlorophyll content with long-term stress decreased. Electrolyte leakage and proline during drought stress significantly increased and in recovery stage, the level of electrolyte leakage and proline reached to the control. The activity of peroxidase and superoxide dismutase in two turfgrass significantly increased after 30 days and then significantly reduced. In *F. arundinacea* Schreb the activity of ascorbat peroxidase after 20 days significantly increased and then significantly reduced. Also, in *F. arundinacea* Schreb species the activity of catalase increased during drought stress and in recovery stage the activity of catalase reduced. In studied species during drought stress and recovery stage, the activity of ascorbat peroxidase and catalase significantly increased compared to the control. These results suggested that the resistant species *F. arundinacea* Schreb, under drought stress had a low level of electrolyte leakage, higher level of relative water content and chlorophyll destruction was less than *A. stolonifera*.

Key words: *Agrostis stolonifera*, *Festuca arundinacea* Schreb., Antioxidant enzymes, Drought stress, Proline

* Corresponding Author: ghasemnezhad@guilan.ac.ir