

بررسی برخی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سه رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) در پاسخ به تنش خشکی

محمدعلی اعظمی^{۱*}، اسحق شمسی نو^۲، محمدباقر حسن پور اقدام^۳

چکیده

بررسی اثرات تنش خشکی در چهار سطح در سه رقم انگور به مدت دو ماه انجام گردید. بیشترین میزان نشت الکتروولت و پراکسید هیدروژن در رقم خلیلی و سطح ۴۰ درصد تنش خشکی مشاهده گردید. رقم قیزیل اوزوم در تنش خشکی ۶۰ درصد بالاترین میزان کاتالاز و در تنش خشکی ۸۰ درصد کمترین محتوای مالون دی‌آلدهید و بیشترین مقدار پروتئین محلول کل را نشان داد. میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تمام سطوح تنش و گایاکول پراکسیداز در تنش خشکی ۶۰ درصد در رقم پرلت در بیشترین مقدار بود. پارامترهای فلورسانس کلروفیل تا سطح ۶۰ درصد تنش خشکی، در رقم قیزیل اوزوم افزایش معنی‌داری را نشان دادند. سطوح خشکی ۴۰ درصد اثر تخریبی بالایی بر سه رقم انگور مورد مطالعه داشت و در بین سه رقم خلیلی، پرلت و قیزیل اوزوم، رقم قیزیل اوزوم با داشتن مکانیزم‌های تحمل کارآمدتر از جمله فعالیت آنزیمی مناسب و کاهش اثرات زیان‌بار خشکی، به‌عنوان رقم متحمل‌تر نسبت به دو رقم پرلت و خلیلی معرفی گردید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، انگور، تنش خشکی، پرولین، فلورسانس کلروفیل

۱- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه

* (نویسنده مسئول: Aazami58@gmail.com)

۲- کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه

۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه

مقدمه

تنش‌های محیطی مانند سرما، شوری و خشکی از مهمترین عوامل موثر بر رشد و تولید محصول در گیاهان هستند. با توجه به رشد روز افزون جمعیت کره زمین و نیاز به غذای بیشتر، تولید گیاهان متحمل در برابر تنش‌های محیطی از اهمیت زیادی برخوردار است (Karimi *et al.*, 1994). کمبود آب یکی از عوامل تهدید کننده بهره‌وری محصولات باغی بوده و کیفیت محصولات را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Escalona *et al.*, 2013). اثرات اولیه خشکی در درختان معمولاً کاهش هدایت روزنه‌ای، پتانسیل آبی، پتانسیل اسمزی، رشد برگ و فتوسنتز است و در نهایت رشد گیاه مختل می‌گردد (Lovisolo *et al.*, 2010). در طی تنش خشکسالی همزمان با تغییرات مورفولوژیکی، تغییرات بیوشیمیایی در قالب تجمع اسیدآبسیزیک (ABA) در آوند چوبی دمبرگ و برگ اتفاق می‌افتد (Dodd, 2005). کمبود آب موجب افزایش سطح ABA گشته و سلول‌های روزنه حجم خود را از طریق خروج آنیون‌ها و یون‌های پتاسیم کاهش می‌دهند، در نتیجه روزنه‌ها بسته می‌شوند (Kim *et al.*, 2010). تنش خشکی باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌شود و محتوای کلروفیل را کاهش می‌دهد (Khan, 2011). برای جلوگیری از آسیب سلولی به علت تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در برابر تنش، گیاهان تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را جهت حفاظت ثانویه در برابر تنش اکسیداتیو تولید می‌کنند (Mittova *et al.*, 2003; Osmolovskaya *et al.*, 2018). متابولیسم آنتی‌اکسیدانی در حفاظت از گیاهان از انواع مختلف تنش‌های محیطی مانند خشکسالی، دماهای شدید، آلودگی‌ها، اشعه ماوراءبنفش و سطوح نوری بالا نقش مهمی دارند (Singam *et al.*, 2011). سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، می‌توانند اثرات زیان آور ROS را در محیط *in vivo* و *in vitro* بهبود بخشند (Mittova *et al.*, 2003).

آسکوربات یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی مهم در سلول‌های گیاهی است که در تمامی اندامک‌های درون سلول و فضای آپوپلاستی حضور دارد. آسکوربات نقش مهمی در فتوسنتز دارد و به همین دلیل غلظت آن در کلروپلاست بالاست. نقش این مولکول حذف پراکسید هیدروژن تولید شده در طی واکنش احیای نوری اکسیژن در فتوسیستم I است (Thirupathi *et al.*, 2011). گایاکول پراکسیداز (GPX) با مصرف H_2O_2 سلول‌ها را از آسیب ناشی از مقادیر بالای پراکسید هیدروژن تولید شده طی متابولیسم طبیعی گیاهان و یا در اثر شرایط تنش، نجات می‌دهد. در بین آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی مختلف گایاکول پراکسیداز از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا این آنزیم در درون و بیرون از سلول حضور داشته و در تجزیه H_2O_2 مشارکت می‌کند (Velikova *et al.*, 2000). کاتالاز آنزیمی است که با سرعت بسیار پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که کاتالاز در تنظیم هومئوستازی سلولی نقش دارد (Thirupathi *et al.*, 2011). پرولین در تنش‌ها دارای نقش چند منظوره مانند تنظیم اسمزی، تثبیت کننده ساختارهای سلولی، جاذب ROS ها، فعال کننده مسیرهای سم‌زدایی و سیگنال‌های مربوط به تنش است. مطالعات نشان داد پرولین در تنش‌های گیاهی، در تثبیت کردن پروتئین‌ها و ساختار غشاها، فراهم آوردن منبع کربن، نیتروژن و انرژی در طی از دست دهی آب سلولی نقش دارد (Szabados & Savoure, 2010).

انگور گیاه چندساله با نام علمی (*Vitis vinifera L.*) متعلق به خانواده Vitaceae است که در سراسر جهان به طور گسترده مورد کشت قرار می‌گیرد و از نظر اقتصادی یکی از مهمترین محصولات میوه ای است (Alston & Sambucci, 2019) رشد و نمو انگور به واسطه تنش‌های غیر زنده مانند خشکی، شوری، درجه حرارت شدید، سمیت شیمیایی و تنش اکسیداتیو تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Ma et al., 2012). ارقام انگور متحمل به خشکی، میزان پرولین بیشتری در مقایسه با رقم‌های حساس داشتند ولی میزان MDA در رقم‌های متحمل در مقایسه با رقم‌های حساس پایین‌تر بود (Gambetta et al., 2020). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در رقم متحمل به خشکی انگور شاهانی گزارش شده است (Talaie et al., 2009). با اعمال و آزمون تنش خشکی می‌توان ارقامی از انگور را انتخاب کرد که به احتمال زیاد با افزایش فعالیت آنزیمی و بیوشیمیایی نسبت به شرایط خشکی تحمل بیشتری دارند. بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی برخی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سه رقم انگور (*Vitis vinifera L.*) در پاسخ به تنش خشکی و انتخاب رقم متحمل به خشکی بوده و امکان سنجی گسترش آنها در کشور است.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در این آزمایش به منظور بررسی تاثیر تنش خشکی بر برخی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سه رقم انگور خلیلی، قیزیل‌اوزوم و پرلت (قلمه‌ها از مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان غربی تهیه گردید)، قلمه‌ها بعد از ریشه‌دار شدن به گلدان‌های پلاستیکی ۵ لیتری حاوی یک سوم خاک معمولی، یک سوم پرلایت و یک سوم ماسه بادی انتقال داده شدند. محلول غذایی مورد استفاده، محلول هوگلند (Hogland & Arnon, 1950) بود و pH محلول غذایی در ۶/۵ تنظیم شد و هر پنج روز یک مرتبه آبشویی کامل محیط ریشه گیاهان با آب معمولی انجام گرفت تا تغییرات EC و pH در اثر آبشویی به حداقل برسد. جهت جلوگیری از خروج آب و مواد غذایی از گلدان‌ها، زیر هر گلدان یک زیرگلدانی قرار داده شد و بعد از هر آبیاری، مقدار آب اضافی خارج شده به گلدان‌ها برگردانده شد. اعمال تنش همه گلدان‌ها پس از ریشه‌دار شدن قلمه‌ها، استقرار کامل و رشد گیاهان در چهار سطح تیمار خشکی در سطوح صفر (شاهد) ۸۰ درصد، ۶۰ درصد و ۴۰ درصد FC به مدت ۲ ماه در چهار تکرار انجام گرفت. نمونه‌برداری از گیاهان (برگ‌های توسعه یافته) پس از اتمام تیمارهای خشکی به منظور استخراج پرولین و اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول کل، مالون‌دی‌آلدهید، پراکسید هیدروژن و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و آسکوربات پراکسیداز (APX) انجام شد و نمونه‌ها از زمان برداشت در ازت مایع قرار گرفت و تا زمان اندازه‌گیری در فریزر (-۸۰ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. نمونه‌های برداشت شده جهت بررسی صفات به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

استخراج پرولین

جهت استخراج پرولین (نمونه‌های برگ) از روش Bates (1973) استفاده شد. غلظت پرولین نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد و با استفاده از فرمولی که در آن x مقدار جذب قرائت شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر و y غلظت پرولین در نمونه است، محاسبه گردید. $Y = 0.0012X + 0.269$

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید در بافت تر گیاهی (MDA)

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به وسیله تست تیوباربیتوریک‌اسید با سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید انجام شد. میزان جذب روشن‌ر در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب تصحیح ($\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) ۰/۱۵۵ محاسبه و براساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$) بیان شد (Health & Packer, 1968).

اندازه‌گیری غلظت پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

برای اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن، ۰/۲ گرم نمونه برگ در ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد اسید کلرواستیک (وزنی-حجمی) همگن شد و در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتی‌فیوژ گردید. سپس کمپلکس واکنش با ترکیب ۰/۵ میلی‌لیتر روشن‌ر، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷ و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار به دست آمد. میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۹۰ نانو متر اندازه‌گیری گردید. میزان پراکسید هیدروژن با استفاده از منحنی استاندارد بدست آمد (Velikova *et al.*, 2000).

استخراج آنزیمی

جهت اندازه‌گیری پروتئین محلول کل، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، ۰/۵ گرم از نمونه گیاهی (برگ) در نیتروژن مایع هموزن گردید و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH= ۷/۵) محتوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار اضافه شد. نمونه‌های هموزن شده در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتی‌فیوژ گردیدند. روشن‌ر بدست آمده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به دلیل نیمه عمر پایین آنزیم آسکوربات پراکسیداز و جهت افزایش پایداری آن به محلول استخراج آنزیم، پلی‌وینیل‌پیرولیدین (۵ درصد) و آسکوربات اضافه شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین محلول کل

برای اندازه‌گیری پروتئین محلول کل از سنجش Bradford (1976) استفاده شد. در این روش برای تعیین مقادیر پروتئین از منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های معین پروتئین استاندارد استفاده می‌گردد. برای اندازه‌گیری پروتئین به روش

برادفورد به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی هر نمونه، ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردید و سپس جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر یادداشت گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با بررسی کاهش مقدار پراکسیدهایدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷) و پراکسیدهایدروژن ۱۵ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر آغاز گردید. تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه ثبت شد. سپس فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (Dezar *et al.*, 2005).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵۰ میلی‌مولار (pH = ۷)، آب اکسیژنه ۱/۲ میلی‌مولار، اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار و EDTA ۰/۱ میلی‌مولار بود. با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی شروع شد. کاهش جذب نور به علت پراکسیداسیون اسید آسکوربیک در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از تغییرات جذب در یک دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین استفاده شد (Dezar *et al.*, 2005).

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)، به صورت زیر مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط واکنش شامل بافر پتاسیم فسفات ۲۵ میلی‌مولار (pH = ۶/۸) و پراکسیدهایدروژن ۴۰ میلی‌مولار و گایاکول ۲۰ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر آغاز گردید. افزایش جذب به وسیله‌ی تشکیل تتراگایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه ثبت شد. سپس فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان گردید (Dezar *et al.*, 2005).

اندازه‌گیری نشت الکترولیت

نشت یونی براساس روش نییر (Nayyar, 2003) اندازه‌گیری شد. هدایت الکتریکی نمونه‌ها با رسیدن به دمای محیط به عنوان EC اولیه توسط EC متر مدل CC-501 اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری EC ثانویه نمونه‌ها در دمای ۱۰۰ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از رسیدن به دمای محیط مجدداً EC نمونه‌ها توسط EC متر به عنوان EC₂ اندازه‌گیری شد و در نهایت درصد نشت یونی از حاصل تقسیم EC اولیه بر EC ثانویه محاسبه گردید.

$$\text{فرمول نشت یونی} = 100 - (E_1/E_2) \times 100$$

اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل

پس از اعمال تنش خشکی، اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل با استفاده از دستگاه فلورومتر مدل (PAM 2500-WALZ, Germany) از آخرین برگ‌های توسعه یافته در حالت روشنایی اندازه‌گیری شد. شاخص‌های فلورسانس روشنایی بدون در نظر گرفتن تاریکی بر روی برگ، مقادیر فلورسانس حداکثر (F_o)، فلورسانس حداکثر (F_m)، فلورسانس متغییر (F_v)، حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (F_v/F_m) II، فعالیت کمپلکس تجزیه کننده آب به عنوان دهنده الکترون فتوسیستم II (F_v/F_o)، پراکندگی گرما در گیرندهای فتوسیستم II (F_o/F_m) II مورد سنجش قرار گرفتند.

تجزیه‌های آماری

آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار SAS (v. 9.2) انجام گرفت. این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel (۲۰۱۶) ترسیم شدند.

نتایج و بحث

جدول ۱: تجزیه واریانس تاثیر تنش خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سه رقم انگور

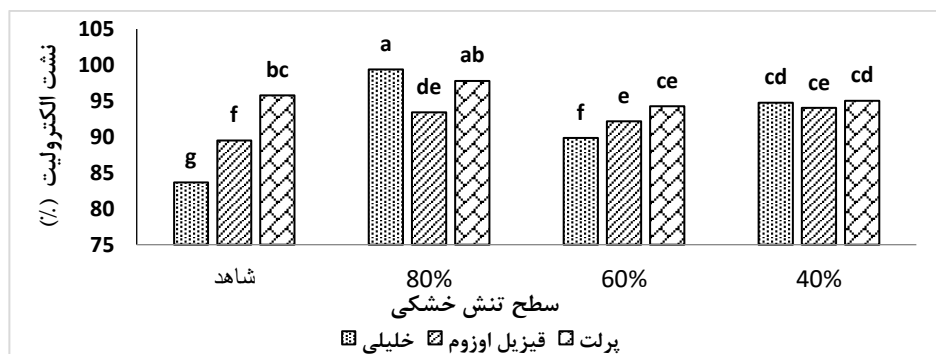
منابع تغییرات	درجه آزادی	پرولین	پراکسید هیدروژن	پروتئین	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	نشت الکترولیت	مالوندی آلدهید
تیمار	۲	۰/۱۹۶**	۰/۱۸۴**	۰/۰۶۴**	۷۵/۳۴**	۴۳/۹۹**	۲۰/۵۷*	۵۳/۱۴**	۱۸۶۴/۵*
رقم	۳	۰/۱۵۱**	۰/۱۱**	۰/۰۲۴**	۳۶/۳۹**	۱۱/۱۲*	۲/۴۰ ^{NS}	۸۷/۷۶**	۹۸۰/۳۵*
تیمار*رقم	۶	۱/۳۱**	۰/۱۲**	۰/۰۱۱**	۲۳/۴۶**	۷/۵۲*	۱۸/۹۲*	۳۳/۸۷**	۶۶۸/۶*
خطا		۰/۰۱۰۷	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۰۵۸	۲/۳۰۹	۲/۱۴	۳/۴۵	۱/۸۱	۱۴۳/۲
ضریب تغییرات		۱۳/۶۰۷	۶/۶۰۱	۳/۵۸	۶/۴۵	۸/۵۴	۲۵/۳۳	۱/۴۴	۱۹/۰۱

NS، * و **: به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

نشت الکترولیت

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اثرات متقابل خشکی و رقم انگور در مورد نشت الکترولیت در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد. به طوری که بیشترین میزان آن مربوط به رقم خلیلی و سطح ۸۰ درصد تنش خشکی و کمترین آن مربوط به رقم خلیلی در تیمار شاهد بود (شکل ۱).

در تنش خشکی، برخی ROSها از قبیل رادیکالهای سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکالهای هیدروکسیل افزایش یافته که به غشای سلولی آسیب می‌رساند و الکترولیت‌ها را به بیرون از سلول تراوش می‌کنند و این باعث می‌شود که لایه درون سلول بار منفی پیدا کند (Summart *et al.*, 2010). در رقم قیزیل اوزوم کاهش در میزان نشت مواد محلول از غشاء به عنوان شاخصی برای افزایش تحمل به شرایط تنش خشکی است. کاهش خسارت به غشای سلولی در رقم قیزیل اوزوم را می‌توان به عنوان راهکاری برای توصیف تحمل به خشکی دانست که ممکن است با تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی برای کاهش خسارت تنش اکسیداتیو مربوط باشد (Gou *et al.*, 2010). افزایش نشت الکترولیت حاکی از کمتر شدن پایداری ساختار غشای سلول‌ها و در نتیجه عدم حفاظت از بافت‌های گیاهی است که با افزایش تولید ROS تحت تنش خشکی مطابقت دارد (Gou *et al.*, 2010). کاهش مقدار نشت الکترولیت و پراکسید هیدروژن در شرایط کمبود آب نشان از آسیب کمتر به گیاه است (Abid *et al.*, 2020). نتایج به دست آمده در این پژوهش با نتایج حاصل از پژوهش‌های انجام گرفته روی ارقام مختلف انگور (Su *et al.*, 2015) مطابقت داشت که با اعمال تنش‌های محیطی نشت الکترولیت در ارقام مختلف انگور افزایش یافت.



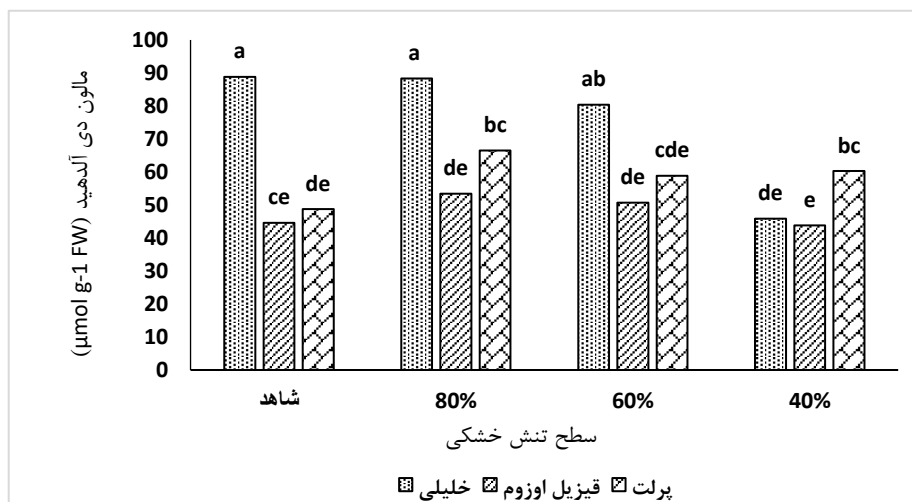
شکل ۱: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان نشت الکترولیت

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد است.

مالون دی‌آلدهید (MDA)

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، سطوح مختلف خشکی و رقم و اثر متقابل آنها در سطح احتمال پنج درصد بر محتوای MDA تأثیر معنی داری داشت (جدول ۱). به طوری که افزایش تنش خشکی تا ۸۰ درصد باعث افزایش MDA شد. در بررسی اثر متقابل رقم و تنش خشکی رقم قیزیل اوزوم در تنش ۸۰ درصد کمترین محتوای MDA را نشان داد (شکل ۲).

MDA یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در فسفولیپیدها است که باعث آسیب به غشای سلولی می‌شود در گیاهانی که تحت تنش‌های مختلف غیر محیطی قرار دارند افزایش پراکسیداسیون لیپیدی منجر به افزایش تولید ROS می‌گردد که با افزایش حساسیت گیاه به شرایط تنش همراه است (Tavallali *et al.*, 2010; Sarmadi *et al.*, 2019) در مقایسه با سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز که اولین روبشگر رادیکال‌های آزاد است، آنزیم آسکوربات پراکسیداز با توانایی بیشتری می‌تواند از طریق اکسیداسیون اسید آسکوربیک به دهیدروآسکوربات و MDA، سمیت پراکسید هیدروژن را کاهش دهد. که از این طریق نیز می‌توان افزایش میزان MDA را با افزایش تنش خشکی توجیه نمود تنش خشکی تغییرات اجزای لیپیدی و نفوذپذیری غشای پلاسمایی سلول‌های گیاهی را تحریک می‌کند. افزایش در محتوای MDA در گیاهان تیمار شده با خشکی نشان می‌دهد که عوامل تنش‌زا باعث کاهش پایداری سلولی توسط تولید ROS می‌گردد (Sarmadi *et al.*, 2019). در پژوهش حاضر تنش خشکی سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و در نتیجه سبب افزایش مقدار MDA در بافت سه رقم انگور شد. از آنجایی که سطح MDA بافت گیاهی شاخصی برای نشان دادن آسیب ناشی از تنش است، در پژوهش حاضر نیز با توجه به این که رقم فیزیل‌اوزوم کمترین افزایش محتوای MDA برگ را دارا بود، می‌توان گفت نسبت به دو رقم دیگر آسیب غشایی کمتری داشته و در مقابل تنش خشکی تحمل بیشتری از خود نشان داد. نتایج مشابهی در تاثیر تنش‌های محیطی بر محتوای MDA برگ در تحقیقات انجام شده روی ارقام مختلف انگور به دست آمده است (Ma *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2009).



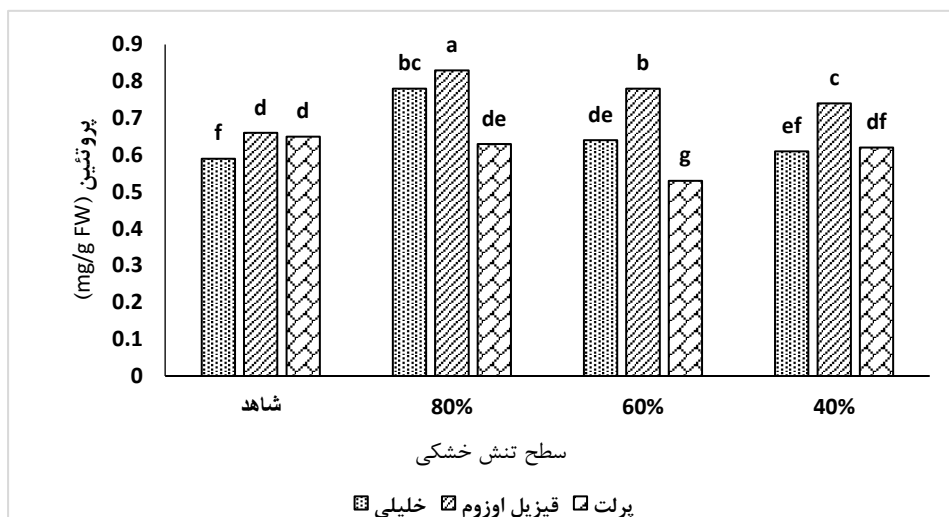
شکل ۲: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان مالون‌دی‌آلدئید.

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

پروتئین محلول کل

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، سطوح مختلف خشکی و رقم و اثر متقابل آنها در سطح احتمال یک درصد بر محتوای پروتئین تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۱). میزان پروتئین محلول کل با افزایش تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش یافت. رقم قیزیل اوزوم در هر چهار سطح تنش خشکی بیشترین محتوای پروتئینی را داشت. کمترین مقدار پروتئین مربوط به رقم پرلت در تنش ۶۰ درصد بود (شکل ۳).

مطالعات صورت گرفته روی متابولیسم گیاهان مختلف نشان داده است که بیوسنتز پروتئین‌ها بسته به رقم گیاهی و سطح تنش اعمال شده، اثر متفاوتی روی ساختار و متابولیسم سلولی می‌گذارند در برخی موارد این اختلالات باعث آسیب به پروتئین می‌شود و برخی آمینواسیدهای آزاد در جهت حفظ و تنظیم فشار اسمزی سلول انباشته شده و در چنین شرایطی تغییر در بیوسنتز پروتئین مشاهده می‌شود (Yamaguchi *et al.*, 2010). در شرایط تنش پروتئین‌های شوک حرارتی در گیاهان از تجمع پروتئین و حل مجدد پروتئین‌های دناتوره شده جلوگیری کرده و با حفظ هموستازی سلولی موجب افزایش تحمل شرایط تنشی در گیاه می‌شوند (Huang *et al.*, 2019). در صورت سمیت، فعالیت برخی از پروتئین‌های عملکردی مثل آنزیم‌ها که عملکرد خود را از دست داده‌اند، مختل می‌شود. در مطالعه حاضر، میزان پروتئین محلول کل در رقم قیزیل اوزوم با افزایش سطوح تنش خشکی افزایش یافت. نتایج این پژوهش با یافته‌های سایر محققین روی زیتون (Amini *et al.*, 2014) و انگور (Mehri *et al.*, 2015) تحت تنش خشکی مشابه بود.



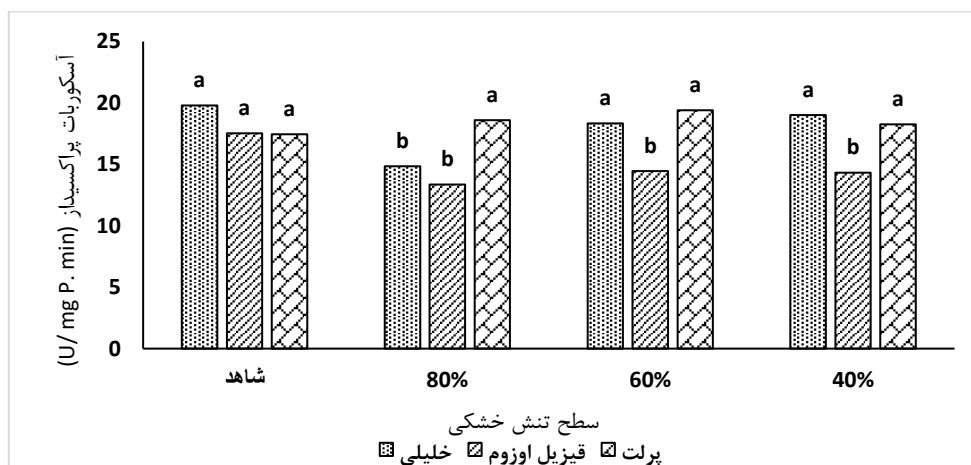
شکل ۳: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان پروتئین محلول کل.

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل تیمار خشکی و رقم بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز انگور در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با افزایش سطح تنش خشکی در رقم پرلت تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداد. کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم قیزیل‌اوزوم تحت تنش خشکی ۸۰ درصد مشاهده شد در حالی که بیشترین مقدار آنزیم در رقم پرلت در تمام تیمارها مشاهده گردید (شکل ۴).

در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آسکوربات پراکسیداز به عنوان جزئی از چرخه گلووتاتیون- آسکوربات است که باعث کاهش مولکول‌های ROS (رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن) و حفاظت از سلول‌ها در مقابل پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد (De Oliveira *et al.*, 2018). در مطالعه حاضر عدم کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش خشکی در رقم پرلت مشاهده شد که بیانگر توانایی این رقم در تنظیم فعالیت چرخه گلووتاتیون- آسکوربات بود. از طرفی نتایج حاکی از کاهش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط بدون تنش شوری بود. افزایش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات- پراکسیداز در غلظت زیاد، می‌تواند ناشی از تولید بیش از حد رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن باشد که منجر به مصرف بیشتر آسکوربات پراکسیداز، گلووتاتیون و اسید آسکوربیک می‌شود و سیستم دفاعی گیاه را کاهش می‌دهد (Mehri *et al.*, 2015). آسکوربات پراکسیداز به عنوان مهم‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدان در گیاه، احیاکننده بسیاری از رادیکال‌های آزاد به خصوص پراکسید هیدروژن است (Kafi *et al.*, 2011). در بسیاری از گیاهان دیگر نیز بر اهمیت و نقش این آنزیم تاکید شده است. از آن جمله می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر تنش سرما در نارنگی (Tadjvar *et al.*, 2011) و تحت تنش خشکی در انگور (Mehri *et al.*, 2015) اشاره کرد.

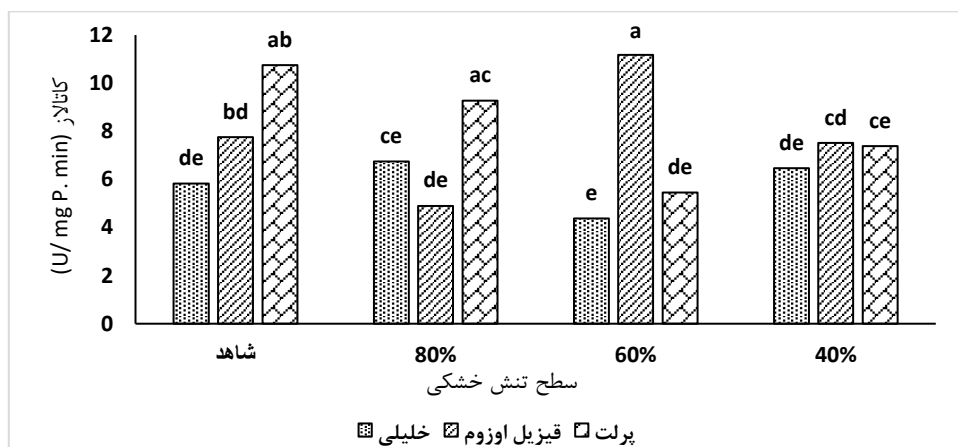


شکل ۴: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

آنزیم کاتالاز

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل تیمار خشکی و رقم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ گیاه انگور در سطح یک درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم قیزیل‌اوزوم با افزایش سطح تنش خشکی نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت. کمترین میزان فعالیت آنزیم در رقم خلیلی تحت تنش خشکی ۶۰ درصد یافت شد در حالی که بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۶۰ درصد خشکی در رقم قیزیل‌اوزوم مشاهده شد (شکل ۵).

تنش خشکی باعث برهم زدن تعادل سلولی شده و تنش‌های ثانویه مانند تنش اسمزی و اکسیداتیو ایجاد می‌کند که به نوبه خود باعث برهم زدن تعادل بین تولید و حذف ROS می‌گردد (Yang et al., 2010). سطوح بالای تنش خشکی باعث سوراخ شدن اپیدرم و اختلال در فعالیت‌های متابولیسی سلول می‌گردد. وقتی سطح تنش افزایش پیدا می‌کند، فعالیت آنزیم‌ها برای کاهش اثرات ROSها افزایش پیدا می‌کند. کاتالاز آنزیم مهمی است که در سیستم دفاعی برای تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن به کار می‌رود. به این صورت از تولید ROSها جلوگیری و تحمل گیاه را به شرایط تنش افزایش می‌دهد (De Oliveira et al., 2018). افزایش فعالیت CAT به وسیله تنش‌های محیطی و غیرمحیطی پدید می‌آید که در بسیاری از گونه‌های گیاهی رخ می‌دهد (Mutlu et al., 2009) و در حذف H_2O_2 از محیط آپوپلاست بهترین گزینه است (Alzahrani et al., 2019). در رقم قیزیل‌اوزوم فعالیت آنزیم CAT نسبت به سایر ارقام، بیشتر بود که حاکی از ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی رقم قیزیل‌اوزوم است. به دلیل میزان بالای H_2O_2 تولیدی در شرایط تنش خشکی در رقم خلیلی توان مهار آنزیم CAT به نظر کافی نمی‌رسد. تعدادی از محققین پیشنهاد کردند که ژنوتیپ‌های متحمل به تنش بهترین توانی مهار رادیکال‌های آزاد را دارند (Zhang et al., 2011; Hasanuzzaman et al., 2019).



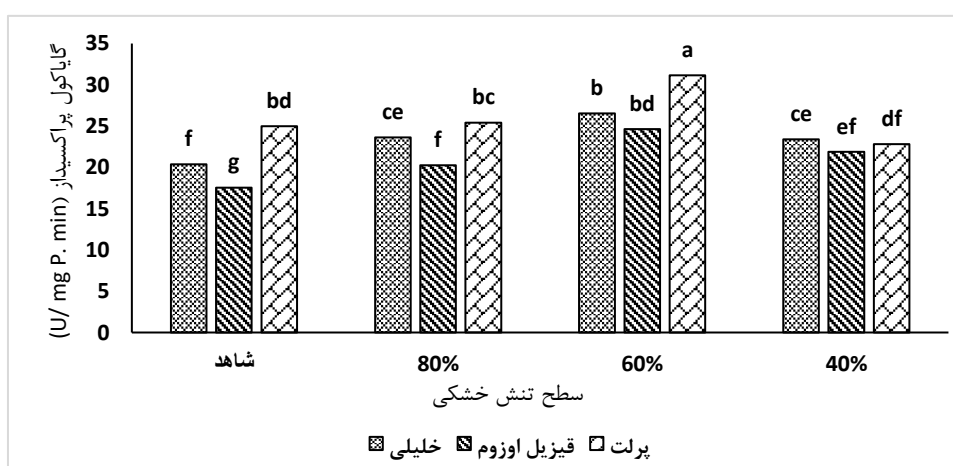
شکل ۵. اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

آنزیم گایاکول پراکسیداز

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با افزایش سطح تنش خشکی نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت. اثرات متقابل تنش خشکی و رقم در میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود به طوری که کمترین میزان فعالیت آنزیم در رقم قیزیل اوزوم در تیمار شاهد و بیشترین فعالیت آنزیم در تیمار ۶۰ درصد تنش خشکی در رقم پرلت مشاهده شد (شکل ۶).

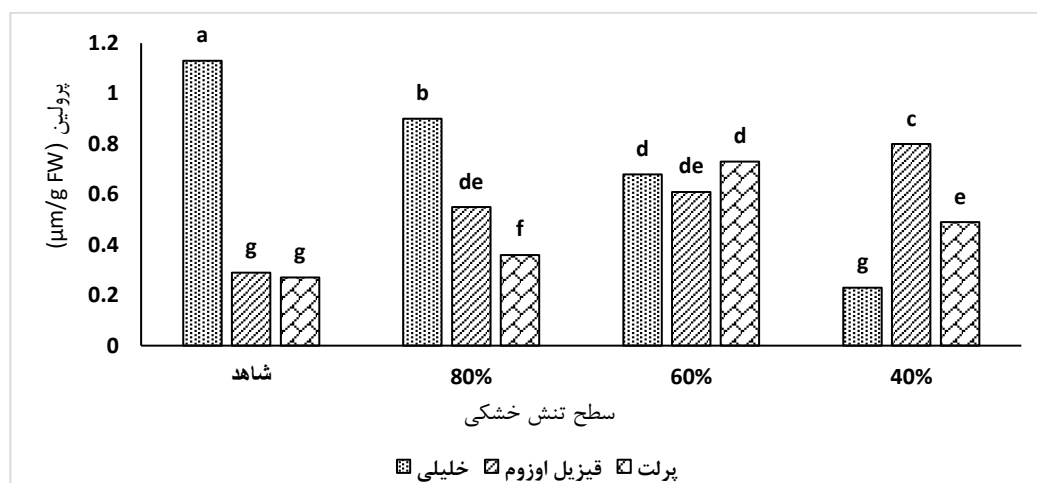
در شرایط تنش‌های محیطی مثل خشکی، فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و محتوای بالای ترکیبات غیر آنزیمی برای افزایش تحمل گیاه به تنش بسیار مهم است (Hasanuzzaman *et al.*, 2017). بررسی فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان گایاکول پراکسیداز نشان داد که تنش خشکی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز را افزایش داد. در رقم قیزیل اوزوم، فعالیت GPX نسبت به شاهد در تمام سطوح تنش خشکی افزایش یافت هر چند هیچ اختلاف معنی‌داری میان تیمارها ۴۰ درصد و ۸۰ درصد یافت نشد و تنها تغییرات قابل توجه در سطح ۶۰ درصد خشکی یافت شد. نقش رقم انگور روی فعالیت GPX تا به حال بسیار کم مورد بررسی قرار گرفته است اما مطابق نتایج محققان پیشین (Wang *et al.*, 2014) کاربرد رقم‌های حساس در سطوحی بالا از تنش‌های محیطی از جمله خشکی با تولید بیش از حد ROSها باعث آسیب به عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول‌های گیاهی می‌شود (Hosseini *et al.*, 2020). افزایش فعالیت GPX می‌تواند بسته به رقم متفاوت باشد که در ارقام متحمل به تنش‌های محیطی میزان این آنزیم آنتی‌اکسیدان (GPX) نسبت به ارقام حساس بالا است. این چنین افزایش در فعالیت آنزیم GPX در ارقام متحمل نشان از غلبه این آنزیم بر تولید مازاد پر اکسید هیدروژن است. مهار پراکسید هیدروژن توسط این آنزیم در افزایش شرایط تنش به نظر می‌رسد که کافی نباشد (Alzahrani *et al.*, 2019).



شکل ۶: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

پرولین

سطوح مختلف خشکی و رقم و همچنین اثر متقابل آن دو در سطح احتمال یک درصد بر محتوای پرولین تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۱). به طوری که افزایش تنش خشکی تا سطح ۸۰ درصد ظرفیت زراعی باعث افزایش محتوای پرولین شد. همچنین در میان ارقام خلیلی، پرت و قیزیل‌اوزوم، رقم قیزیل‌اوزوم دارای یک روند افزایشی یکنواخت بود که تفاوت معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد داشت. بیشترین محتوای پرولین در شاهد و سپس تنش خشکی ۸۰ درصد در رقم خلیلی به دست آمد (شکل ۷).



شکل ۷: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان پرولین

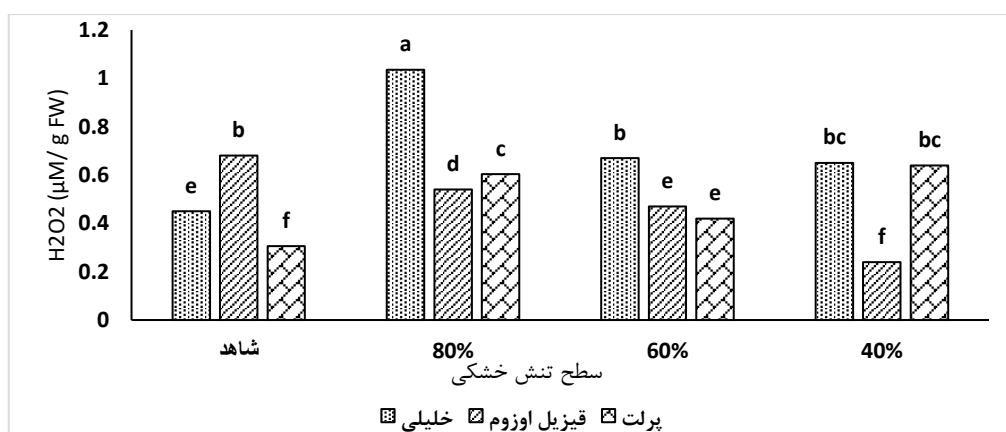
حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

گیاهان پاسخ‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را به تنش خشکی نشان می‌دهند. افزایش ترکیبات اسمزی مانند پرولین و تغییرات فیتوهورمون‌ها بعضی از رایج‌ترین واکنش گیاهان به تنش خشکی است (Hare *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2011). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که مقدار پرولین در ارقام مختلف و هنگام تنش خشکی می‌تواند افزایش یابد و این تجمع باعث تحمل گیاه به خشکی می‌شود (Seki *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009) که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد. نتایج مشابه این تحقیق در گیاه جو (Gao *et al.*, 2019) و توت فرنگی (Yaghubi *et al.*, 2016) تحت تنش شوری مشاهده گردید.

پراکسید هیدروژن

اثر متقابل خشکی و رقم در سطح احتمال یک درصد بر محتوای پراکسید هیدروژن موثر بود. کمترین محتوای پراکسید هیدروژن در سطح خشکی ۴۰ درصد در رقم قیزیل‌اوزوم به دست آمد و بیشترین محتوای آن در تیمار ۸۰ درصد در رقم خلیلی یافت شد (شکل ۸).

پراکسید هیدروژن در بسیاری از مکانیسم‌های مقاومت به تنش در گیاهان مشارکت دارد. اخیراً مشخص شده است که پراکسید هیدروژن می‌تواند به عنوان تنظیم کننده کلیدی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر پیری، تنفس نوری، فتوسنتز، حرکات روزنه‌ای، چرخه سلولی و رشد و نمو گیاهان ایفای نقش کند. انباشته شدن مقادیر زیاد پراکسید هیدروژن در سلول‌ها می‌تواند به تنش اکسیداتیو منجر شده و در نهایت موجب مرگ سلول شود. به طور کلی در مورد نقش‌های این مولکول در سلول‌ها عنوان می‌شود که پراکسید هیدروژن نقش دوگانه‌ای در گیاهان دارد. که در غلظت‌های کم به عنوان یک مولکول علامت عمل می‌کند، در صورتی که در غلظت‌های بالا، موجب مرگ سلول می‌شود (Amirjani, 2010; Singam *et al.*, 2011; Thirupathi *et al.*, 2011). در آزمایش حاضر افزایش میزان آن با کاهش مستقیم تحمل رقم به تنش خشکی و کاهش محتوای آن اثر مستقیمی در افزایش تحمل رقم قیزیل اوزوم به تنش خشکی داشت.



شکل ۸: اثر متقابل سطوح خشکی (درصد ظرفیت زراعی) و رقم انگور بر میزان فعالیت آنزیم هیدروژن پراکسید حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

اثر رقم و تنش خشکی روی پارامترهای فتوسنتزی

فلورسانس حداکثر (Fm)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان می‌دهد که روند تغییرات فلورسانس حداکثر (Fm) در برگ‌های سازگار به روشنایی تحت تیمار خشکی و رقم انگور در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. با افزایش سطح تیمار خشکی، فلورسانس حداکثر کاهش یافت و این کاهش معنی‌دار بود. فلورسانس حداکثر در اثر تابش فوتون‌های نوری و احیای همه ناقل‌های الکترون و بسته بودن همه مراکز واکنش ایجاد می‌شود (Mehta *et al.*, 2010). نتایج ارائه شده در آزمایش حاضر در خصوص فلورسانس حداکثر نشان داد که سطح تنش خشکی در ۸۰ درصد باعث افت میزان فلورسانس حداکثر (Fm) شد. به نظر می‌رسد کاهش فلورسانس حداکثر تحت تیمار خشکی می‌تواند به دلیل کاهش و آسیب کلروفیل و کاهش ظرفیت تبدیل انرژی فتوشیمیایی

در سلول‌های گیاهی باشد (Soheili movahhed *et al.*, 2017). در بررسی اثر متقابل رقم و تنش در رقم قیزیل‌اوزوم در سطح تنش ۶۰ درصد بیشترین میزان فلورسانس حداکثر را دارد که نشان دهنده تحمل بالای این رقم نسبت به دورقم خلیلی و پرلت است. مطالعات متعددی نشان داده است که وجود کوئینون در حالت اکسید شده در تیلاکوئیدهای ایزوله شده منجر به کاهش Fm در گیاه اسفناج گشته است (Mehta *et al.*, 2010) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین تحقیقات انجام گرفته روی گوجه‌فرنگی (Roosta & Sajjadinia, 2010) (*Solanum lycopersicum*) کاهش Fm در اثر سرما را نشان داد.

جدول ۲: تجزیه واریانس فلورسانس کلروفیل تحت تنش خشکی در ارقام مختلف انگور

منابع تغییرات	درجه آزادی	PAR	F	Y(II)	Y(NO)	ETR	FV/FM	Fo	Fm	FV	fv/fo
تیمار	۲	۱۰/۳**	۰/۰۳۶*	۰/۰۱۴ ^{ns}	۰/۰۰۵۸ ^{ns}	۳/۴**	۰/۰۱۲ ^{ns}	۰/۰۲۵ ^{ns}	۱/۵۰۵*	۰/۵۶**	۰/۹۵**
رقم	۳	۳/۸**	۰/۰۹۵*	۰/۰۲۷*	۰/۰۱۴ ^{ns}	۶/۵**	۰/۰۲۳*	۰/۰۵۴ ^{ns}	۰/۵۳*	۰/۱۶۶*	۰/۸۵**
تیمار*رقم	۶	۲/۳**	۰/۰۷۶*	۰/۰۰۷۹ ^{ns}	۰/۰۱۲*	۲/۰۰۲**	۰/۰۰۲۴ ^{ns}	۰/۰۰۷۸ ^{ns}	۰/۱۴۱ ^{ns}	۰/۱۹۶**	۰/۰۳۹ ^{ns}
خطا		۲/۴	۰/۰۱۰۲	۰/۰۰۵۰۵	۰/۰۰۴۹	۲۶/۷	۰/۰۰۵۸	۰/۰۲۴	۰/۱۱	۰/۲۰۴	۰/۰۲۹
ضریب تغییرات		۵/۹۰۶	۷/۹۷	۱۴/۳۵	۱۳/۱۵	۱۲/۴۱	۱۵/۶۳	۱۲/۴۷	۱۴/۷۴	۱۱/۸۳	۱۶/۵۷

ns, * و **: به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

فلورسانس متغیر (Fv)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر تنش خشکی و رقم بر روند تغییرات فلورسانس متغیر در برگ‌های سازگار به روشنایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با افزایش سطح تنش خشکی تا ۶۰ درصد، میزان فلورسانس متغیر (Fv) به صورت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد در رقم قیزیل‌اوزوم افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان فلورسانس متغیر مربوط به رقم قیزیل‌اوزوم در تنش خشکی ۶۰ درصد بود و کمترین میزان آن در تنش ۸۰ درصد در رقم خلیلی مشاهده شد (جدول ۳). فلورسانس متغیر (Fv) که از اختلاف فلورسانس حداکثر (Fm) با فلورسانس حداقل (Fo) بدست می‌آید، وضعیت جریان الکترون از بخش فتوسیستم II به QA را نشان می‌دهد (Hao *et al.*, 2012). از آنجایی که فلورسانس متغیر نشانگر احیای کامل پذیرنده الکترون (Q) است، بنابراین می‌توان استنباط نمود که تنش خشکی در انتقال الکترون به فتوسیستم I باعث ایجاد اختلال گردید (Hao *et al.*, 2012). کاهش فلورسانس متغیر تحت تیمار خشکی می‌تواند به دلیل کاهش محتوای کلروفیل و ظرفیت تبدیل انرژی فتوشیمیایی در سلول‌های گیاهی باشد (Wen *et al.*, 2016). به طور کلی کاهش در شاخص‌های فتوسنتز مانند فلورسانس متغیر در سطوح مختلف تنش خشکی از دو طریق باعث کاهش فتوسنتز می‌شود، یکی از طریق تغییر در فعالیت پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز، از جمله فروکتوز ۶-۱ بیس فسفاتاز که در چرخه کلوین مؤثر است و آنزیم‌های گلوکونئوزنز و تغییر در چرخه پنتوزفسفات اکسیداز که در متابولیسم کربوهیدرات نقش دارد، و دوم از طریق کاهش کلروفیل که

باعث عدم تحریک و کاهش در فتوسنتز می‌شود (Soheili movahhed *et al.*, 2017) که با نتایج آزمایش حاضر در ارتباط با کاهش و آسیب کلروفیل و تحریک کمتر فتوسنتز در سطوح بالای تنش های محیطی مطابقت دارد.

جدول ۳: اثرات متقابل رقم و تنش خشکی بر میزان فلورسانس متغیر (Fv) در ارقام مختلف انگور

رقم/ تنش خشکی	شاهد	۴۰ درصد	۶۰ درصد	۸۰ درصد
خلیلی	۱/۴۳ ^b	۱/۴۵ ^b	۱/۳۳ ^{bc}	۰/۷۹ ^d
قیزیل‌اوزوم	۱/۴۹ ^b	۱/۵۹ ^a	۱/۶۸ ^a	۱/۲۵ ^c
پرلت	۱/۱۶ ^c	۱/۳۵ ^{bc}	۱/۳۵ ^{bc}	۰/۸۵ ^d

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

فلورسانس حداقل (FO)

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) اثر تیمار خشکی و رقم روی فلورسانس حداقل (FO) در برگ میوه انگور نشان می‌دهد که اثر تیمارهای مذکور به تنهایی و اثر متقابل خشکی و رقم بر این صفت معنی‌دار نشد.

حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm)

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد اثر رقم روی حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. با افزایش تنش خشکی از صفر تا ۶۰ درصد ظرفیت زراعی حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II افزایش یافت به طوری که در تنش ۶۰ درصد بیشترین و در تنش ۸۰ درصد کمترین حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II را نشان داد. در ارزیابی اثر متقابل، تنش خشکی در سطح ۶۰ درصد و رقم قیزیل‌اوزوم بیشترین حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) را نسبت تیمار شاهد نشان داد.

حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) نشان دهنده ظرفیت انتقال الکترون فتوسیستم II است و به عنوان شاخصی معتبر برای نشان دادن اختلال ناشی از تنش در مراکز فتوشیمیایی و بازدارندگی نوری استفاده می‌شود کاهش میزان Fv/Fm در شرایط اثر متقابل خشکی و رقم در سطح ۸۰ درصد نشانه کاهش میزان حفاظت نوری بوده و همچنین دلیل معنی‌دار بودن تنش خشکی بر کارایی فتوسنتز است. به طور کلی در بسیاری از گونه‌های گیاهی زمانیکه Fv/Fm در حد ۰/۸۳ و یا بیشتر شود به این مفهوم است که تنش بر گیاه اعمال نشده است و لذا مقادیر کمتر از آن نشانه وجود تنش در گیاهان است (Hao *et al.*, 2012) به نظر می‌رسد گیاهی که در سطوح بالای خشکی نسبت Fv/Fm بیشتری داشته باشد، توانایی انجام حفاظت نوری در شرایط تنش را خواهد داشت. نتایج حاصل از این پژوهش نیز حاکی از افزایش Fv/Fm در اثر متقابل تنش ۶۰ درصد در رقم قیزیل‌اوزوم است. در یافته‌های حاضر، تغییرات روشنی در کاهش Fv/Fm در اثر تنش خشکی تحت تیمار خشکی ۸۰ درصد یافت شد که در واقع دارای کمترین توانایی برای تحمل گیاه تحت تیمار به شرایط خشکی است. ممکن است دو دلیل برای کاهش

Fv/Fm در تنش‌های خشکی شدید وجود داشته باشد که یکی مربوط به آسیب کلروفیل و دیگری عدم تعادل یون در سطح بالایی از خشکی است (Lata & Prasad, 2011). سایر محققین در آزمایشی نشان دادند که سرما سبب کاهش حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II در ارقام متحمل و حساس گندم به سرما می‌شود اما این کاهش در ارقام متحمل به‌طور معنی‌داری کمتر از ارقام حساس بود (Majdi *et al.*, 2007).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر نشان دهنده آسیب سیستم‌های فتوسنتزی و کاهش Fv/Fm، Fm، Fv، YII و افزایش Y(NO) در اثر تنش خشکی بود. بر اساس نتایج حاصله، خشکی ۴۰ درصد اثرات معنی‌داری بر اغلب شاخص‌های فلورسانس کلروفیل در سه رقم انگور نداشت این در حالی بود که بیشترین آسیب به سیستم فتوسنتزی در اثر تنش خشکی ۸۰ درصد ثبت شد و در بین ارقام مورد مطالعه رقم خلیلی بیشترین آسیب را متحمل شد. تنش خشکی سبب افزایش نشت الکترولیت، افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن در ارقام مورد مطالعه گردید. رقم قیزیل‌اوزوم با کمترین غلظت پراکسید هیدروژن از کمترین افزایش در تجمع مالون‌دی‌آلدهید و نشت یونی (که معیاری از پراکسیداسیون لیپدها و آسیب‌های غشایی هستند) نسبت به دو رقم دیگر برخوردار بود و در نتیجه کمتر دچار آسیب‌های غشایی شد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و گایاکول‌پراکسیداز در ارقام مختلف به‌طور متفاوتی تحت تاثیر تنش قرار گرفتند و سطوح مختلف خشکی اثرات متفاوتی بر فعالیت آنزیم‌های مذکور داشتند. سطوح خشکی بالاتر از ۶۰ درصد ظرفیت زراعی اثر تخریبی بالایی بر سه رقم انگور مورد مطالعه دارد و در بین سه رقم خلیلی، پرلت و قیزیل‌اوزوم، رقم قیزیل‌اوزوم با داشتن سازوکارهای تحمل کارآمدتر از جمله فعالیت آنزیمی مناسب و کاهش اثرات زیان‌بار خشکی، به‌عنوان رقم متحمل‌تر نسبت به دو رقم پرلت و خلیلی معرفی گردید.

منابع

Abid, G., Ouertani, R.N., Muhovski, Y., Jebara, S.H., Hidri, Y., Ghouili, E. and Jebara, M. (2020). Variation in antioxidant metabolism of faba bean (*Vicia faba*) under drought stress induced by PEG reveals biochemical markers associated with antioxidant defense. *Plant Biosystems*, 9:1-12.

Alston, J.M. and Sambucci, O. (2019). *Grapes in the world economy*. 1th edn. Springer, Cham, 365 Pp. Bern.

- Alzahrani, S.M., Alaraidh, I.A., Migdadi, H., Alghamdi, S., Khan, M.A. and Ahmad, P. (2019). Physiological, biochemical, and antioxidant properties of two genotypes of *Vicia faba* grown under salinity stress. *Pakistan Journal of Botany*, 51: 786–798.
- Amini, Z., Moalemi, N. and Saadati, S. (2014). Effects of water deficit on proline content and activity of antioxidant enzymes among three olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Journal of Plant Research*, 27(2): 156-167.
- Amirjani, M.R. (2010). Effects of salinity stress on growth, mineral composition, proline content, antioxidant enzymes of soybean. *American Journal of Physiology*, 5:350-360.
- Bates, L.S., Waldern, R. P. and Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205- 207.
- 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.
- De Oliveira, W. F., dos Santos, S., Marcelino, P., Breitenbach Barroso Coelho, L. C., dos Santos, C. and Tereza, M. (2018). Plant Antioxidants and Mechanisms of Action. *Letters in Drug Design & Discovery*, 15(10): 1103-1115.
- Dezar, C.A., Gago, G.M., González, D.H. and Chan, R.L. (2005). Hahb-4, a sunflower Homeobox-Leucine Zipper gene, confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Research*, 14: 429-440.
- Dodd, I. C. (2005). “Root-to-Shoot Signalling: Assessing the Roles of ‘Up’ in the Up and Down World of Long-Distance Signalling in Planta. *Plant and Soil*, 274 (1-2): 251-270
- Escalona, J.M., Fuentes, S., Tomás, M., Martorell, S. and Flexas J. (2013). Responses of leaf night Transpiration to drought stress in *Vitis vinifera* L. *Agricultural water management*, 118:50-58 .
- Gambetta, G.A., Herrera, J.C., Dayer, S., Feng, G., Hochberg, U. and Castellarin, S. (2020). The physiology of drought stress in grapevine: towards an integrative definition of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 71(16): 4658–4676.
- Gao, W., Feng, Z., Bai, Q., He, J. and Wang, Y. (2019). Melatonin-mediated regulation of growth and antioxidant capacity in salt-tolerant naked oat under salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5): 1176-1181.

- Gou, J., Strauss, S.H. and Tsai, C.J. (2010). Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell*, 22: 623-639.
- Hao, H., Xiao, W. and Fashui, H. (2012). Effects of nanoanatase TiO₂ on photosynthesis of spinach chloroplasts under different light illumination. *Biological trace Element Research*, 119(1): 68-76.
- Hare, P.D., W.A. Cress and J. van Staden. 1997. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. *Plant Growth Regulat*, 23:79–103.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Hossain, M., Anee, T.I., Parvin, K. and Fujita, M. (2017). Nitric oxide pretreatment enhances antioxidant defense and glyoxalase system to confer PEG-induced oxidative stress in rapeseed. *Journal of Plant Interactions*, 12(1): 323-331.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J.A. and Fujita, M. (2019). Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, 8: 384-396.
- Health, R.L. and Packer, L. (1968). Photo peroxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biophysics*, 125: 189-198.
- Hogland, D.R. and Arnon, D.I. (1950). The water-culture method for growing plants with soil. *California Agriculture Experiment Station Circular*, 374: 1-32.
- Hosseini, N.S., Hagh, Z.G., and Koshghalb, H. (2020). Morphological, antioxidant enzyme activity and secondary metabolites accumulation in response of polyethylene glycol-induced osmotic stress in embryo-derived plantlets and callus culture of *Salvia leriifolia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140(1): 143-155.
- Huang, L.J., cheng, G.X., Khan, A., Wei, A.M., Yu, Q.H., Yang, S.B. and Gong, Z.H. (2019). CaHSP16.4, a small heat shock protein gene in pepper, is involved in heat and drought tolerance. *Protoplasma*, 256(1): 39-51.
- Kafi, M., Nabati, J., Masoumi, A. and Zare Mehrgerdi, M. (2011). Effect of salinity and silicon application on oxidative damage of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) moench. *Pakistan Journal of Botny*, 43(5): 396-404.
- Karimi Alvije, M., Abadi, A., Musavi, S.A. and Salami, S.A. (1994). Investigation of changes in catalase, peroxidase and total protein enzymes in response to cold stress in some grape cultivars. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 1(29): 103-110. (In Farsi)

- Khan, M.S. (2011). The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25 (3):2433-2442.
- Kim, T.-H., Böhmer, M. and Huet, H. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 561-591.
- Kumar, R.R., Karajol, K., and Naik, G.R. (2011). Effect of PEG induced water stress on physiological and biochemical responses in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.). *Recent Research in Science and technology*, 15(6): 256-262.
- Lata, C. and Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal Experimental Botany*, 62: 4731-4748.
- Lovisol C., Perrone, I. A., Carra, A., Ferrandino, J., Flexas, H., Medrano, F. and Schubert, A. (2010). "Drought-Induced Changes in Development and Function of Grapevine (*Vitis* spp.) Organs and in Their Hydraulic and Non-Hydraulic Interactions at the Whole-Plant Level. *Functional Plant Biology*, 37(3): 98-116 .
- Ma, Y.Y., Zhang, Y.L., Shao, H. and Lu, J. (2010). Differential physio-biochemical responses to cold stress of cold-tolerant and non-tolerant grapes (*Vitis* L.) from China. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196(3): 212-219.
- Ma, Y., Qin, F. and Tran, L.S. (2012). Contribution of genomics to gene discovery in plant abiotic stress responses. *Molecular Plant*, 5 (6):1176-1178.
- Majdi, M., Karimzadeh, G. and Mahfuzi, S. (2007). Effect of Low Temperature and External Calcium on the Quantum Efficiency of Photosystem 2 (Fv / Fm) and Chlorophyll Levels in Sensitive Wheat Varieties Cold. *Research Construction*, 77(20): 175-181. (in Farsi).
- Mehri, H., Ghbadi, C., Baninasab, B., Ehsanzadeh, P. and Gholami, M. (2015) Evaluation of some physiological and morphological responses of four Iranian grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars to drought stress under *in vitro* conditions. *Journal of Plant Process and Function*, 3(10): 115-126.
- Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S. and Bharti, S. (2010). Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant physiology and biochemistry*, 48(1): 16-20.

- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. and Guy, M. (2003). Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Environment*, 26:845-856.
- Mutlu, S., Atici, O. and Nalbantoglu, B. (2009). Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, 53: 334-338.
- Nayyar, H. (2003). Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. *Environmental and Experimental Botany*, 50: 253-264.
- Osmolovskaya, N., Shumilina, J., Kim, A., Didio, A., Grishina, T., Bilova, T., Keltsieva, O.A., Zhukov, V., Tikhonovich, I., Tarakhovskaya, E. (2018). Methodology of drought stress research: Experimental setup and physiological characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 4089-4096.
- Roosta, H.R. and Sajjadinia, A. (2010). Studying the effect of cold stress on green basil, violet basil, tomato and lettuce using chlorophyll fluorescence technique. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 3(1): 1-8.
- Sarmadi, M., Karimi, N., Palazon, J., Ghassempour, A. and Mirgalili, M.H. (2019). Improved effects of polyethylene glycol on the growth, antioxidative enzymes activity and taxanes production in a *Taxus baccata* L. Callus culture. *Plant cell, Tissue and organ culture*, 137(2): 319-328.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. and Shinozaki, K. (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:296–302.
- Singam, K., Juntawong, N., Cha-Um, S. and Kirdmanee, C. (2011). Salt stress induced ion accumulation, ion homeostasis, membrane injury and sugar contents in salt-sensitive rice (*Oryza sativa* L. spp. indica) roots under iso-osmotic conditions. *African Journal of Biotechnology*, 10:1340-1346.
- Soheili movahhed, S., Esmaeili, M.A., Jabbari, F., Khorramdel, S. and Fouladi, A. (2017). Effects of water deficit on Relative Water Content, Chlorophyll Fluorescence indices and seed yield in four pinto bean genotypes. *Journal of Crop Production*, 10(1): 169-190. (In Farsi)
- Su, L., Dai, Z., Li, S. and Xin, H. (2015). A novel system for evaluating drought–cold tolerance of grapevines using chlorophyll fluorescence. *BMC plant biology*, 15(1): 82-88.

- Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P. and McManus, M.T. (2010). Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. *African Journal of Biotechnology*, 9(2): 74-75.
- Szabados, L. and Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15:89-97 .
- Tadjvar, Y., Fotouhi Ghazvini, R., Hamidoghli, H. and Hassan Sajedi, R. (2011). Physiological and biochemical responses of Page mandarin on citrange rootstock to low temperature stress. *Iranian Journal of Plant Biology*, 9:1-12. (In Farsi).
- Talaie, A. R., Ghaderi, N., Ebadi, A. & Lesani, H. (2009). Biochemical responses of two varieties of seedless white grapes Sahany and changes in soil water potential. *Acta Horticulturae*, 42(3), 301-308.
- Tavallali, V., Rahemi, M., Eshghi, S., Kholdebarin, B. and Ramezani, A. (2010). Zinc alleviates salt stress and increases antioxidant enzyme activity in the leaves of pistachio (*Pistacia Vera* L. 'Badami') seedlings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34(4): 349-359.
- Thirupathi K., Jun-Cheol, M., Changsoo, K., Kumariah, M. and Wook K. (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6): 709-725.
- Velikova, V., Yordanov, J. and Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants-protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151: 59-66.
- Wan, S.B., Tian, L., Tian, R.R., Pan, Q.H., Zhan, J.C., Wen, P.F. and Huang, W.D. (2009). Involvement of phospholipase D in the low temperature acclimation-induced thermo tolerance in grape berry. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6): 504-510.
- Wang, C., Shangguan, L., Yang, G. and Kayesh, E. (2014). Depiction of Grapevine Phenology by Gene Expression Information and a Test of its Workability in Guiding Fertilization. *Plant molecular biology reporter*, 32 (5):1070-1084.
- Wen, Z.H., Shen, J.B., Blackwell, M., Li, H.G., Zhao, B.Q. and Yuan, H.M. (2016). Combined applications of nitrogen and phosphorus fertilizers with manure increase maize yield and nutrient uptake via stimulating root growth in a long-term experiment. *Pedosphere*, 26: 62-73.

- Yaghubi, K., Ghaderi, N., Vafae, Y. and Javadi, T. (2016). Potassium silicate alleviates deleterious effects of salinity on two strawberry cultivars grown under soilless pot culture. *Scientia Horticulturae*, 213: 87-95.
- Yamaguchi, M., Valliyodan, B. and Zhang, J. (2010). Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. *Plant Cell Environment*, 33: 223-243.
- Yang, S., Vanderbeld, B., Wan, J. and Huang Y. (2010). Narrowing Down the Targets: Towards Successful Genetic Engineering of Drought-Tolerant Crops. *Molecular Plant*, 3:469-490.
- Zhang, X., Ervin, E.H., Evanylo, G.K. and Haering K.C. (2009). Impact of biosolids on hormone metabolism in drought-stressed tall fescue. *Crop Science*, 49:1893–1901.
- Zhang, Q., Zhang, J.Z., Chow, W.S., Sun, L.L., Chen, J.W., Chen, Y.J. and Peng, C.L. (2011). The influence of low temperature on photosynthesis and antioxidant enzymes in sensitive banana and tolerant plantain (*Musa* sp.) cultivars. *Photosynthetica*, 49: 201-208.

Evaluation of some of the physiological and biochemical changes in three grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) in response to drought stress

M. A. Aazami^{1*}, E. Shamsinow¹, M. B. Hassanpouraghdam¹

Received:2020.12.6

Accepted:2021.4.24

Abstract

In this study, effects of drought stress on three grape cultivars ('Ghizil Ouzum', 'Khalili', and 'Perlet'), an experiment was conducted in a CRD with four replications. Grape plants were treated at four levels including control, drought stress of 40, 60, and %80 of field capacity for two months. Physiological and biochemical traits including proline content, electrolyte leakage, hydrogen peroxide, total soluble protein, malondialdehyde, and the enzymatic activity of catalase, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase were studied, which showed different levels of significance. The highest amount of electrolyte leakage and hydrogen peroxide was observed in 'khalili' in %40 drought stress level. The 'Gizil ouzum' showed the highest level of catalase in %60 drought stress and the lowest content of malondialdehyde in %80 drought stress and the highest amount of total soluble protein. The activity of the ascorbate-peroxidase enzyme at all levels of stress and the guaiacol peroxidase at %60 drought stress was in 'perlet' in the highest amount. In the study of chlorophyll fluorescence parameters including minimal fluorescence (F_o), variable fluorescence (F_v), maximal fluorescence (F_m), the effective photochemical quantum yield of photosystem (YII), the maximum photochemical quantum yield of photosystem II (F_v / f_m), Quantum yield of non-regulated non-photochemical II Y(NO) changes were significant in drought stress treatment, and 'ghizil ouzum' in %60 FC compared to control. Drought stress levels above %60 FC have a high destructive effect on the three grape cultivars studied. Among three cultivars, the more efficient tolerance mechanisms including appropriate enzymatic activity and reduction of harmful effects of drought, 'ghizil ouzum' was introduced as a more tolerant cultivar than 'perlet and 'khalili'.

Keywords: *Antioxidant enzymes, Chlorophyll fluorescence, Drought stress, Grape, Proline*

1- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Maragheh, Iran
*(Corresponding author: maryapeyvandi@gmail.com)

2- MSc Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Maragheh, Iran

3- Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Maragheh, Iran