تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد پانزدهم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۱

http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.3792.1916

مقاله پژوهشی

ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیکی اکوتیپ‌های شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) در سطوح مختلف آبیاری

صادق اسدی[1*]، حسین مقدم[2]، حسنعلی نقدی‌بادی[3]، محمدرضا نقوی[4]، سیدعلیرضا سلامی[5]

۱. دانشجوی دکتری اکولوژی گیاهان زراعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. دانشیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج
۴. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات (بیوتکنولوژی)، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۵. دانشیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز (بیوتکنولوژی)، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
پرولین
تنش خشکی
کاتالاز
کلروفیل
گایاکول پراکسیداز

تاریخ دریافت:
۱۳۹۹/۰۷/۱۷

تاریخ پذیرش:
۱۳۹۹/۱۰/۰۷

تاریخ انتشار:
تابستان ۱۴۰۱

۱۵(۲): ۳۶۱-۳۷۳

چکیده

به‌منظور ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیکی اکوتیپ‌های شاهدانه تحت تأثیر سطوح مختلف آبیاری، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۵ انجام شد. عامل آبیاری در سه سطح (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و عامل اکوتیپ با ۱۲ سطح (ارومیه، سنندج، تبریز، دشت مغان، رشت، خمین، داران، قم، شاهرود، کرمان، طبس و سراوان) بود. نتایج نشان داد که با افزایش تنش خشکی، محتوای رطوبت نسبی، میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل و کاروتنوئید کاهش یافت ولی میزان نشت الکترولیت‌ها، پرولین، آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز افزایش یافت. در بین اکوتیپ‌ها، اکوتیپ طبس ضمن دارا بودن بیشترین میزان محتوای رطوبت نسبی، کاروتنوئید، پرولین، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، دارای کمترین مقدار نشت الکترولیتی یا به عبارتی دارای بیشترین میزان پایداری غشا نیز بود و برتری قابل‌توجهی در حفظ محتوای رطوبت نسبی، حفظ محتوای کلروفیل و حفظ پایداری غشا در سطوح مختلف تنش داشت. همچنین اکوتیپ تبریز با دارا بودن محتوای رطوبت نسبی، کاروتنوئید و پرولین کمتر، دارای بیشترین نشت الکترولیتی غشا بود و ازلحاظ از دست دادن محتوای رطوبت نسبی، محتوای کلروفیل و پایداری غشا در سطوح مختلف تنش، نسبت به سایر اکوتیپ‌ها حساس‌ترین اکوتیپ شناسایی شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پارامترهای فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده تحت تنش خشکی می‌توانند به‌عنوان معیاری در جهت شناسایی اکوتیپ‌های متحمل و حساس به کار روند.

مقدمه

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی محدودکننده تولید محصولات گیاهی در سراسر جهان محسوب شده و اثرات نامطلوبی بر رشد و نمو گیاه دارد (Lum et al., 2014). علیرغم مطالعات فراوانی که در زمینه اثرات تنش خشکی روی بسیاری از گیاهان وجود دارد، اما مطالعات کمتری در این زمینه برای برخی از گیاهان دارویی به‌ویژه شاهدانه انجام شده است. شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)، گیاهی علفی، یک‌ساله، متعلق به خانواده Cannabacea است (Ahmed et al., 2008) که در تولید فرآورده‌هایی مانند فیبر، کاغذ، استخراج روغن و تولید ترکیب‌های دارویی و مخدر قابل استفاده است (Aladić et al., 2015). توانایی مقاومت به خشکی، توانایی رشد در اقلیم‌های گوناگون، تنوع ژنتیکی بالا (Amaducci et al., 2008) و سازگاری رشد به مناطق مختلف اکولوژیکی ایران از ویژگی‌های ارزشمند شاهدانه است.

* نگارنده پاسخگو: صادق اسدی. پست الکترونیک: sadegh.asadi@ut.ac.ir

گیاهان عموماً از طریق القای انواعی از پاسخ‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی به تنش خشکی سازگار می‌شوند و هرکدام از این عوامل می‌توانند در معرفی ارقام متحمل به خشکی مؤثر باشند. در میان ویژگی‌های فیزیولوژیک، وضعیت آب برگ، پایداری غشاء، تغییرات فتوسنتز و عوامل مرتبط با آن از اهمیت بالایی برخوردار هستند. غشای سلولی از اولین اندام‌هایی است که تحت شرایط تنش، آسیب می‌بیند و تراوایی آن افزایش‌یافته و نشت الکترولیتی (ELI)[1]، از سلول باعث مرگ آن می‌گردد (Farooq et al., 2009). بهادر و تدین (Bahador and Tadayon, 2018) با بررسی سطوح تنش کم‌آبی در شاهدانه مشاهده کردند که با افزایش شدت خشکی میزان ELI افزایش یافت. در پژوهش دیگری نیز با افزایش شدت تنش، شاخص ELI، در ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) افزایش یافت (Daliri et al., 2010). شاخص محتوای رطوبت نسبی برگ (RWCL)[2]، می‌تواند توانمندی گیاه در تحمل به تنش را به‌خوبی نشان دهد. کاهش مقدار این صفت یکی از مهم‌ترین تغییرات تنش خشکی است (Wang and Bughrara, 2007). گزارش آراد (Arad, 2016) در سطوح مختلف خشکی روی شاهدانه نشان داد که میزان RWCL با افزایش سطوح تنش کاهش یافت. همچنین تنش کم‌آبی موجب کاهش مقدار RWCL در گلرنگ (Amiri et al., 2017) و بادرشبویه (Jalalvand et al., 2019) شد.

دوام فتوسنتز و حفظ کلروفیل برگ تحت تنش خشکی ازجمله شاخص‌های فیزیولوژیک مناسب برای مقاومت به خشکی هستند (Sadat Rasti Sani et al., 2014). گزارش شده است که کمبود آب، محتوای کلروفیل a و b را در گیاه زوفا (Hyssopus officinalis L.) کاهش داد اما غلظت کلروفیل b بیشتر از کلروفیل a کاهش یافت (Raasam et al., 2015). نتایج آراد (Arad, 2016) روی شاهدانه نشان داد که با افزایش سطوح خشکی میزان کاروتنوئید کاهش یافت. گزارش‌ها حاکی از همبستگی بالایی بین افزایش میزان پرولین و تحمل به تنش‌ها است. افزایش غلظت پرولین توسط محمدزاده (Mohammadzadeh, 2011) روی لوبیا (Phaseolus vulgaris L.) و بابایی و همکاران (Babaei et al., 2010) روی آویشن (*Thymus vulgaris* L.) نشان‌دهنده این موضوع است. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)[3] و گایاکول پراکسیداز (GPX)[4]، در بروز مقاومت گیاهان تحت تنش خشکی نقش مهمی دارد. افزایش فعالیت CAT در اثر خشکی در اکثر گیاهان گزارش شده است (Terzi et al., 2010). همچنین افزایش فعالیت GPX تحت تنش خشکی روی نخود (*Cicer arietinum* L.) توسط عطایی (Ataei, 2005) و سورگوم (*Sorghum bicolor* L.) توسط ساعی (Saeei, 2004) گزارش شده است.

با توجه به اهمیت دارویی و صنعتی شاهدانه و وجود تنوع زیاد آن در ایران و شدت خشکی حاکم بر کشور، لازم است سازوکارهای این گیاه در پاسخ به خشکی شناسایی شود. لذا انتخاب و توجه به اکوتیپی که بتواند در شرایط تنش تولید مطلوبی نماید از اهمیت خاصی در برنامه‌های به‌نژادی خواهد داشت. بنابراین هدف از این تحقیق، شناسایی اکوتیپ‌های حساس و متحمل به خشکی شاهدانه بر اساس پاسخ‌های فیزیولوژیک است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیکی برخی اکوتیپ‌های شاهدانه تحت تأثیر سطوح مختلف آبیاری، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۶ - ۱۳۹۵ اجرا شد. عامل آبیاری (A) با سه سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید)، ۷۵ درصد ظرفیت زراعی (تنش خفیف) و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (آبیاری نرمال) و عامل اکوتیپ (B) با ۱۲ سطح (ارومیه، سنندج، تبریز، دشت مغان، رشت، خمین، داران، قم، شاهرود، کرمان، طبس و سراوان) بود. مشخصات اقلیمی و جغرافیایی مناطق مختلف اکوتیپ‌های شاهدانه جمع‌آوری‌شده در جدول ۱ و مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده برای کاشت در جدول ۲ ارائه شده است.

اندازه قطر و ارتفاع گلدان‌ها به ترتیب ۳۰ و ۳۵ سانتی‌متر و میزان خاک گلدان‌ها ۲۰ کیلوگرم بود. در هر گلدان تعداد ۱۰ عدد بذر در عمق ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متری کشت شد. در دوره گلدهی پس از مشخص شدن جنسیت بوته‌ها ازلحاظ نر و ماده بودن، بوته‌های نر و ماده برای مطالعات دیگری برداشت شدند و تنها یک بوته ماده تا پایان رشد نگهداری شد.

[1]. Electrolyte leakage Index
[2].Relative Water Content of Leaf
[3]. Catalase
[4]. Guaiacol Peroxidase

جدول ۱. کد، اقلیم و محل مشخصات جغرافیایی مناطق اکوتیپ‌های جمع‌آوری‌شده شاهدانه در ایران

Table 1. Coding, climatic and geographical characteristics of hemp ecotypes collection regions in Iran.

اکوتیپ Ecotype	کد اکوتیپ* Ecotype Code*	میزان بارندگی Rainfall (mm)	اقلیم Climate	عرض جغرافیایی Latitude, N	طول جغرافیایی Longitude, E	ارتفاع از سطح دریا Altitude (m)
ارومیه (آذربایجان غربی) Urmia (West Azerbaijan)	247 CS	341	معتدل خشک	37° 52′	45° 4′	1345
سنندج (کردستان) Sanandaj (Kurdistan)	248 CS	458.4	معتدل خشک	35° 30′	47° 03′	1538
تبریز (آذربایجان شرقی) Tabriz (East Azerbaijan)	249 CS	310	معتدل خشک	38° 5′	46° 28′	1365
دشت مغان (اردبیل) Dasht-e-Moghan (Ardabil)	250 CS	303.9	معتدل خشک	39° 64′	47° 92′	388
رشت (گیلان) Rasht (Gilan)	251 CS	1359	معتدل مرطوب	37° 22′	49° 63′	3
خمین (اراک) Khomein (Arak)	252 CS	341.7	نیمه‌خشک	33° 63′	50° 07′	1811
داران (اصفهان) Daran (Isfahan)	253 CS	122.8	نیمه‌خشک	32° 98′	50° 41′	2325
قم (قم) Qom (Qom)	254 CS	151.1	نیمه‌خشک	34° 64′	50° 89′	934
شاهرود (سمنان) Shahroud (Semnan)	255 CS	140.8	نیمه‌خشک	36° 39′	54° 94′	1308
کرمان (کرمان) Kerman (Kerman)	256CS	135	خشک	30° 29′	57° 06′	1755
طبس (خراسان جنوبی) Tabas (South Khorasan)	257 CS	84.85	خشک	33° 86′	56° 93′	682
سراوان (زاهدان) Saravan (Zahedan)	258 CS	90.6	خشک	27° 38′	62° 32′	1164

*: مرکز تحقیقات گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، بانک ژن گیاهان دارویی، کرج، ایران.

***:** Ecotype codes were obtained from: Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran.

جدول ۲. مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورداستفاده جهت کاشت.

Table 2. Physical and chemical characteristics of the soil used for planting.

بافت خاک Soil Texture	سیلت Silt	رس Clay	شن Sand	ماده آلی OC	هدایت الکتریکی EC	اسیدیته pH	ظرفیت زراعی FC
Clay loam	----------%----------				dSm^{-1}		%
لوم رسی	38	32	30	0.82	1.62	7.9	22

جهت جوانه‌زنی و سبز شدن یکنواخت، آبیاری برای همه گلدان‌ها به‌صورت یکسان انجام شد و اعمال تیمارهای کم‌آبیاری پس از استقرار کامل گیاه در مرحله ۵ جفت برگی (با توجه به فنولوژی هر اکوتیپ) صورت گرفت و تا زمان برداشت گیاه ادامه داشت. برای اعمال تیمارهای کم‌آبیاری، رطوبت خاک گلدان‌ها به‌روش وزنی اندازه‌گیری شد. صفات فیزیولوژیکی در مرحله گلدهی کامل و اوایل میوه‌دهی بررسی شد. برای اندازه‌گیری صفات RWCL و ELI از جوان‌ترین برگ توسعه‌یافته، قطعه‌های یک سانتی‌متر مربعی تهیه شد و به‌ترتیب با استفاده از روابط ۱ و ۲ محاسبه شد.

$$RWCL=FW-DW/TW-DW\times100 \quad [۱]$$

$$ECI = Ec1/Ec2\times100 \quad [۲]$$

که در رابطه ۱، FW، وزن برگ در حالت تر؛ TW وزن برگ در حالت اشباع و DW، وزن برگ در حالت خشک؛ و در رابطه

۲، EC1، میزان هدایت الکترولیتی در حالت اشباع اولیه؛ و EC2، میزان هدایت الکترولیتی در حالت اشباع نهایی است. اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی بر مبنای روش آرنون (Arnon, 1967) و برای قرائت جذب نمونه‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160) استفاده شد. درنهایت از روابط زیر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید محاسبه شد.

کلروفیل a (میلی‌گرم در گرم برگ تر) =

$$[(12.7\times A663) - (2.69\times A645)]\times V / 1000\times W \quad [۳]$$

کلروفیل b (میلی‌گرم در گرم برگ تر) =

$$[(22.9\times A645) - (4.69\times A663)]\times V / 1000\times W \quad [۴]$$

کلروفیل کل (میلی‌گرم در گرم برگ تر) =

$$[(20.2\times A645) + (8.02\times A663)]\times V / 1000\times W \quad [۵]$$

کاروتنوئید (میلی‌گرم در گرم برگ تر) =

$$[7.6 \times (A480) - 14.9 \times (A510)]\times V/1000\times W \quad [۶]$$

میزان پرولین، بر اساس روش بیت (Bates et al., 1973) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۵۰۰ نانومتر برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر ارزیابی شد. محلول‌ها و مواد استفاده‌شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بود و فعالیت آنزیم به مدت ۵ دقیقه در فواصل ۲۰ ثانیه‌ای ثبت گردید میزان فعالیت کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی ($\varepsilon = 39.4\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) و برحسب واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (Chance and Mahely, 1995). فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) نیز همانند آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. نوع و میزان مواد لازم شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) ۵۰ میلی مولار، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد، ۳ میکرولیتر محلول گایاکول ۲۰۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. دستگاه اسپکتروفتومتر روی ۴۷۰ نانومتر تنظیم شد و با محلول شاهد که شامل همه مواد ذکرشده به‌استثنای عصاره آنزیم بود، کالیبره شد. فعالیت آنزیم به مدت ۵ دقیقه و در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای ثبت گردید. میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی ($\varepsilon = 26.6\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) و بر اساس مقدار جذب ترکیب نارنجی‌رنگ تتراگایاکول در میلی‌گرم غلظت پروتئین محاسبه شد (Chance and Mahely, 1995).

درنهایت، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۲) انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

محتوای رطوبت نسبی برگ (RWCL)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی اکوتیپ، سطوح مختلف آبیاری و همچنین اثر متقابل اکوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان RWCL در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین سطوح آبیاری نشان داد که بیشترین مقدار RWCL مربوط به آبیاری نرمال (۷۷/۲۱ درصد) و کمترین مقدار آن مربوط به تنش شدید (۵۳/۱۸ درصد) بود (جدول ۴). نتایج نشان داد که با افزایش شدت تنش از میزان RWCL کاسته شد، به‌طوری‌که مقدار RWCL به ترتیب به میزان ۱۶/۷۰ و ۳۱/۱۳ در تنش خفیف و تنش شدید نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول ۴). در بین اکوتیپ‌ها، بیشترین مقدار RWCL مربوط به اکوتیپ طبس (۷۳/۴۲ درصد) و کمترین مقدار این صفت مربوط به اکوتیپ دشت مغان (۵۶/۰۵ درصد) بود (جدول ۴). نتایج برهمکنش سطوح آبیاری و اکوتیپ نشان داد که بیشترین مقدار RWCL در آبیاری نرمال در اکوتیپ ارومیه (۸۴/۶۱ درصد) و کمترین مقدار این صفت نیز در تنش شدید در اکوتیپ تبریز (۴۲/۱۱ درصد) ملاحظه شد (جدول ۵). در بین اکوتیپ‌های موردمطالعه، اکوتیپ‌های ارومیه، طبس، سراوان و کرمان در هر دو شرایط آبیاری نرمال و تنش شدید از مقدار RWCL بالاتری برخوردار بودند و اکوتیپ‌های تبریز، شاهرود، رشت، سنندج و دشت مغان نیز از مقدار RWCL کمتری در هر دو شرایط برخوردار بودند. به‌طورکلی اکوتیپ‌های متحمل نسبت به اکوتیپ‌های حساس حتی در شرایط بدون تنش دارای RWCL بیشتری بوده و قادر هستند در سطوح بالای تنش، RWCL خود را در سطح بالایی نگه‌دارند و از صدمات کمتر ناشی از پسابیدگی و کاهش محتوای آب برخوردار گردند. میزان RWCL بین اکوتیپ‌های

مختلف در سطوح آبیاری نرمال و تنش شدید دارای اختلاف زیادی است و اکوتیپی موفق است که بتواند RWCL خود را بیشتر حفظ کند. با توجه به این موضوع اکوتیپ طبس در هر دو شرایط تنش خفیف و شدید برتری قابل‌توجهی در حفظ آب برگ، نسبت به سایر اکوتیپ‌ها داشته است زیرا در سطوح مختلف تنش، میزان آب کمتری (به ترتیب ۸/۱۴ و ۱۸/۰۵ درصد در تنش خفیف و شدید) را نسبت به سایر اکوتیپ از دست داده است پس شاید بتوان چنین اظهار داشت که اکوتیپ طبس دارای پتانسیل تحمل به خشکی بیشتری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها است؛ زیرا در این راستا سیلوا و همکاران (Silva et al., 2007) گزارش کردند که RWCL به‌عنوان یک شاخص مفید در گزینش برای تحمل به خشکی ارزیابی شده است. همچنین اعلام کردند که گیاهان متحمل به خشکی با جذب آب از پرتوپلاست، آب بیشتری را در خود نگهداری می‌کنند درنتیجه دارای مقدار RWCL بالاتری هستند. علاوه بر این، گزارش شده است که RWCL می‌تواند توانمندی گیاه در تحمل به تنش را به‌خوبی نشان دهد به‌طوری‌که کاهش این صفت یکی از مهم‌ترین تغییرات تنش خشکی است (Wang and Bughrara, 2007). مطالعه دیگری روی دو رقم گندم نشان داد که کاهش مقدار RWCL در رقم مقاوم در شرایط تنش کمتر بوده است (Sairam and Srivastava, 2001). RWCL ارقام حساس به خشکی در مقایسه با ارقام متحمل، در شرایط تنش، کاهش بیشتری پیدا می‌کند.

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی در اکوتیپ‌های مختلف شاهدانه تحت شرایط مختلف کم‌آبیاری

Table 3. Analysis of variance on Physiological traits in different ecotypes of cannabis under deficit irrigation conditions.

S.O.V	منبع تغییرات	درجه آزادی df	محتوای رطوبت نسبی Relative water content	نشت یونی Electrolyte leakage	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total Chlorophyll
Irrigation levels (A)	سطوح آبیاری	2	5206.08 **	2536.95 **	0.4064 **	0.55 **	1.911 **
Ecotyps (B)	اکوتیپ	11	310.46 **	598.14 **	0.7253 **	0.050 **	1.033 **
A*B	سطوح آبیاری × اکوتیپ	22	26.77 **	14.26 *	0.0054 ns	0.0028 **	0.0135 **
Error	خطا	72	4.71	8.26	0.0034	0.0011	0.0073
C.V (%)	ضریب تغییرات (٪)	-	3.34	4.68	5.33	9.31	5.83

Table 3. Continued **جدول ۳. ادامه**

S.O.V	منبع تغییرات	درجه آزادی df	کاروتنوئید Carotenoid	پرولین Proline	کاتالاز (CAT) Catalase	گایاکول پراکسیداز Gayacol Peroxidase (GPX)
Irrigation levels (A)	سطوح آبیاری	2	0.3049 **	2.87 **	0.0046 **	0.1195 **
Ecotyps (B)	اکوتیپ	11	0.1941 **	0.7266 **	0.0019 **	0.0832 **
A*B	سطوح آبیاری × اکوتیپ	22	0.0016 ns	0.0139 ns	0.0002 ns	0.0175 ns
Error	خطا	72	0.0090	0.0092	0.0001	0.0107
C.V (%)	ضریب تغییرات (٪)	-	17.06	10.81	18.36	23.05

**، * و ns: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد،۵ درصد و غیر معنی‌داری است.

*,** and ns: represent significant at of 5% and 1% probability level and not significant, respectively.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر اصلی سطوح آبیاری و اکوتیپ روی صفات فیزیولوژیکی

Table 4. Mean comparison of simple effects of irrigation levels and ecotype on physiological traits.

Treatment	تیمارها	محتوای رطوبت نسبی Relative water content	نشت یونی Electrolyte leakage	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total Chlorophyll
		----------%----------		----------mg.g^{-1}Fw----------		
Irrigation	**آبیاری**					
Severe	**شدید**	53.18 ^{c}	69.49 ^{a}	0.99 ^{c}	0.23 ^{c}	1.22 ^{c}
Mild	**خفیف**	64.32 ^{b}	62.16 ^{b}	1.11 ^{b}	0.37 ^{b}	1.49 ^{b}
Normal	**نرمال**	77.21 ^{a}	52.74 ^{c}	1.21 ^{a}	0.48 ^{a}	1.69 ^{a}
Ecotype	**اکوتیپ**					
Urmia	**ارومیه**	71.52 ^{ab}	59.85 ^{de}	1.52 ^{a}	0.42 ^{c}	1.94 ^{a}
Sanandaj	**سنندج**	59.30 ^{f}	71.53 ^{b}	0.82 ^{f}	0.30 ^{de}	1.12 ^{f}
Tabriz	**تبریز**	60.17 ^{f}	74.41 ^{a}	1.09 ^{d}	0.32 ^{de}	1.41 ^{d}
Dasht-e-Moghan	**دشت مغان**	56.05 ^{g}	68.72 ^{c}	0.55 ^{g}	0.29 ^{e}	0.84 ^{g}
Rasht	**رشت**	60.62 ^{f}	66.96 ^{c}	1.29 ^{c}	0.32 ^{de}	1.61 ^{c}
Khomein	**خمین**	63.01 ^{de}	61.34 ^{d}	0.94 ^{e}	0.33 ^{d}	1.27 ^{e}
Daran	**داران**	63.46 ^{d}	57.91 ^{e}	1.05 ^{d}	0.33 ^{d}	1.38 ^{d}
Qom	**قم**	67.39 ^{c}	54.39 ^{f}	1.28 ^{c}	0.33 ^{d}	1.61 ^{c}
Shahroud	**شاهرود**	61.07 ^{ef}	66.95 ^{c}	0.84 ^{f}	0.31 ^{de}	1.16 ^{f}
Kerman	**کرمان**	70.51 ^{b}	53.73 ^{f}	1.06 ^{d}	0.40 ^{c}	1.46 ^{d}
Tabas	**طبس**	73.42 ^{a}	50.91 ^{g}	1.31 ^{c}	0.53 ^{a}	1.84 ^{b}
Saravan	**سراوان**	72.29 ^{ab}	50.84 ^{g}	1.45 ^{b}	0.47 ^{b}	1.92 ^{a}

Table 4. Continued **جدول ۴. ادامه**

Treatment	تیمارها	کاروتنوئید Carotenoid	پرولین Proline	کاتالاز Catalase (CAT)	گایاکول پراکسیداز Gayacol Peroxidase (GPX)
		---------mg.g^{-1}Fw---------		---------Mc.min^{-1} mg^{-1} pro--------	
Irrigation	**آبیاری**				
Severe	**شدید**	0.46 ^{c}	1.19 ^{a}	0.0778 ^{a}	0.5036 ^{a}
Mild	**خفیف**	0.57 ^{b}	0.83 ^{b}	0.0669 ^{b}	0.4556 ^{a}
Normal	**نرمال**	0.64 ^{a}	0.63 ^{c}	0.0551 ^{c}	0.3889 ^{b}
Ecotype	**اکوتیپ**				
Urmia	**ارومیه**	0.57 ^{bc}	1.27 ^{a}	0.0814 ^{ab}	0.5800 ^{a}
Sanandaj	**سنندج**	0.47 ^{cd}	0.58 ^{e}	0.0556 ^{de}	0.4144 ^{cde}
Tabriz	**تبریز**	0.34 ^{e}	0.55 ^{ef}	0.0696 ^{bc}	0.4278 ^{cde}
Dasht-e-Moghan	**دشت مغان**	0.49 ^{cd}	0.48 ^{f}	0.0567 ^{de}	0.3878 ^{de}
Rasht	**رشت**	0.44^{de}	0.84 ^{c}	0.0494 ^{ef}	0.2744 ^{f}
Khomein	**خمین**	0.36 ^{e}	0.74 ^{d}	0.0396 ^{f}	0.3322 ^{ef}
Daran	**داران**	0.62 ^{b}	0.97 ^{b}	0.0792 ^{ab}	0.5478 ^{ab}
Qom	**قم**	0.64 ^{b}	1.04 ^{b}	0.0854 ^{a}	0.4800^{abcd}
Shahroud	**شاهرود**	0.52 ^{cd}	0.67 ^{d}	0.0591 ^{cde}	0.3900 ^{de}
Kerman	**کرمان**	0.78 ^{a}	0.98 ^{b}	0.0643 ^{cd}	0.4467 ^{bcd}
Tabas	**طبس**	0.79 ^{a}	1.23 ^{a}	0.0820 ^{ab}	0.5611 ^{a}
Saravan	**سراوان**	0.66 ^{b}	1.19 ^{a}	0.0769 ^{ab}	0.5300 ^{abc}

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

In each column, averages with the same letters are not significantly different at 5% level of probability.

این موضوع در مورد اکوتیپ تبریز بیشتر صادق بود؛ زیرا آب ازدست‌رفته این اکوتیپ نسبت به سایر اکوتیپ‌ها بیشتر بود به‌طوری‌که مقدار RWCL در تنش خفیف و شدید به ترتیب به میزان ۲۱/۴۳ و ۴۵/۶۶ درصد نسبت به آبیاری نرمال کاهش یافت بنابراین می‌توان اکوتیپ تبریز را حساس‌ترین اکوتیپ ازنظر از دست دادن رطوبت نسبت به سایر اکوتیپ‌ها دانست. گزارش آراد (Arad, 2016) در سطوح مختلف خشکی روی شاهدانه نشان داد که میزان RWCL در سطوح آبیاری نرمال و تنش شدید به ترتیب به میزان ۸۸/۴۴ و ۶۷/۷۵ درصد بود. گزارش‌های دیگر هم نشان داد که تنش کم‌آبی موجب کاهش RWCL در گیاه گلرنگ (Amiri et al., 2017) و گیاه بادرشبویه (Jalalvand et al., 2019) شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

نشت یونی یا شاخص نشت الکترولیتی (ELI)

نتایج نشان داد که ازنظر میزان خسارت به غشای سلولی بر اساس ELI، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بین سطوح آبیاری، اکوتیپ‌ها و اثر متقابل آن‌ها وجود داشت (جدول ۳). با افزایش شدت تنش، میزان ELI افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب مربوط به سطوح تنش شدید (۶۹/۴۹ درصد) و آبیاری نرمال (۵۲/۷۴ درصد) بود. به عبارتی میزان ELI در تنش خفیف و تنش شدید به ترتیب ۱۰/۵۴ و ۲۴/۱۱ درصد نسبت به آبیاری نرمال افزایش یافت (جدول ۴). مقایسات میانگین اکوتیپ‌ها نشان داد که بیشترین مقدار ELI مربوط به اکوتیپ تبریز (۷۴/۴۱ درصد) و کمترین مقدار این صفت مربوط به اکوتیپ‌های سراوان (۵۰/۸۴ درصد) و طبس (۵۰/۹۱ درصد) بود. با اعمال تنش کم‌آبی، افزایش ELI همراه با کاهش RWCL دیده شد به‌طوری‌که اکوتیپ‌های سراوان و طبس که از RWCL بالاتری برخوردار بودند دارای کمترین مقدار ELI بودند و اکوتیپ‌های تبریز، سنندج، رشت و شاهرود که از RWCL کمتری برخوردار بودند دارای بیشترین مقدار ELI بودند (جدول ۴). بنابراین یک رابطه معکوسی بین RWCL و ELI وجود دارد و ملاحظه شد که اکوتیپ‌هایی که در شرایط خشکی، توانایی حفظ آب بیشتری دارند از پایداری غشایی بیشتری نیز برخوردار هستند. نتایج برهمکنش سطوح آبیاری و اکوتیپ نشان داد که بیشترین مقدار ELI در سطوح تنش شدید در اکوتیپ تبریز (۸۴/۴۳ درصد) و کمترین مقدار این صفت نیز در آبیاری نرمال در اکوتیپ‌های طبس (۴۵/۲۶ درصد) و سراوان (۴۳/۱۳ درصد) دیده شد (جدول ۵).

نتایج نشان داد که افزایش تنش کم‌آبی منجر به کاهش پایداری غشا در هر دو سطوح تنش شد و بیشترین خسارت نیز در اکوتیپ تبریز مشاهده شد به‌طوری‌که در تیمار تنش شدید، اکوتیپ تبریز ضمن دارا بودن پایداری کمتر، بیشترین حساسیت به تنش شدید را نشان داد و به میزان ۲۴/۹۱ درصد کاهش پایداری نسبت به شرایط آبیاری نرمال داشت. در بین اکوتیپ‌ها، اکوتیپ طبس در تیمار تنش شدید، ضمن دارا بودن پایداری بیشتر، کمترین حساسیت به تنش شدید را داشت و نسبت به شرایط آبیاری نرمال ۱۸/۶۸ درصد کاهش پایداری نشان داد. افزایش نفوذپذیری نسبی غشا به معنای کاهش قابلیت انتخابی غشای سلولی در ورود و خروج یون‌ها و الکترولیت‌ها بوده که منجر به کاهش فعالیت‌های فتوسنتزی و عدم تولید انرژی کافی جهت رشد اندام‌های گیاه می‌شود و ازآنجایی‌که غشای سلولی از اولین بخش‌های گیاه است که تحت تنش خشکی آسیب می‌بیند، لذا حفظ انسجام غشا یکی از راهکارهای مهم اصلاحی برای افزایش تحمل به خشکی است. ازاین‌رو، ELI به‌عنوان یکی از معیارهای مقاومت به خشکی، به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Beltrano and Ronco. 2008).

کلروفیل a

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی سطوح مختلف آبیاری و اکوتیپ در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود اما ارتباط معنی‌داری بین اثر متقابل آن‌ها وجود نداشت (جدول ۳). بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین و کمترین میزان کلروفیل a به ترتیب در آبیاری نرمال و تنش شدید به میزان ۱/۲۱ و ۰/۹۹ میلی‌گرم بر گرم حاصل شد. به عبارتی میزان کلروفیل a در تنش خفیف و تنش شدید به ترتیب ۸/۲۶ و ۱۸/۱۸ درصد نسبت به آبیاری نرمال کاهش یافت (جدول ۴). کاهش میزان کلروفیل a در طی تنش کم‌آبی در اثر تخریب کلروفیل a توسط رادیکال‌های آزاد است. در شرایط کم‌آبی رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال به دلیل فتواکسیداسیون افزایش پیدا می‌کند که باعث تخریب غشاها و پروتئین‌ها می‌شود (Aghcheli et al., 2019). کاهش کلروفیل a طی تنش خشکی در لوبیا نیز گزارش شده است (Sadat Rasti Sani et al., 2014). با توجه به اثر اصلی

جدول ۵. اثر برهمکنش سطوح آبیاری در اکوتیپ روی برخی صفات فیزیولوژیکی

Table 5. The effect of interaction of irrigation levels in the ecotype on some physiological traits.

سطوح آبیاری Irrigation	Ecotype	اکوتیپ	محتوای رطوبت نسبی Relative water content	نشت یونی Electrolyte leakage	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total Chlorophyll
			----------%		----------mg.g^{-1}fw----------	
	Urmia	ارومیه	57.97 nop	67.30ef	0.23 ij	1.60 efg
	Sanandaj	سنندج	45.77 rs	79.77 ab	0.19 jk	0.93 rs
	Tabriz	تبریز	42.11 t	84.43 a	0.17 jk	1.11 nop
	Dasht-e-Moghan	دشت مغان	42.83 st	77.49 bc	0.20 jk	0.69 t
	Rasht	رشت	47.83 r	75.55 bc	0.20 jk	1.35 jkl
شدید	Khomein	خمین	55.24 pq	70.57 de	0.21 jk	1.07 opq
Severe	Daran	داران	52.42 q	68.09 e	0.22 jk	1.16 no
	Qom	قم	57.06 op	62.05 gh	0.21 jk	1.36 jkl
	Shahroud	شاهرود	48.21 r	75.16 bcd	0.20 jk	0.95 qrs
	Kerman	کرمان	60.28 lmn	60.95 gh	0.27 hi	1.23 lmn
	Tabas	طبس	65.93 jk	56.81 ijk	0.38 ef	1.57 fgh
	Saravan	سراوان	62.48 klm	56.81 ijk	0.32 gh	1.63 efg
	Urmia	ارومیه	71.99 ghi	61.32 gh	0.46 bcd	1.97 bc
	Sanandaj	سنندج	59.20 mn	74.53 cd	0.28 hi	1.10 npp
	Tabriz	تبریز	60.89 klm	75.40 bc	0.31 gh	1.38 ijk
	Dasht-e-Moghan	دشت مغان	55.17 pq	70.50 de	0.29 h	0.84 s
	Rasht	رشت	59.18 mn	68.78 e	0.33 fgh	1.60 efg
خفیف	Khomein	خمین	60.20 lmn	60.20 ghi	0.35 fg	1.30 klm
Mild	Daran	داران	63.07 jkl	54.40 jkl	0.32 gh	1.38 ijk
	Qom	قم	66.11 j	53.78 jkl	0.31 gh	1.61 efg
	Shahroud	شاهرود	58.78 no	69.18 e	0.32 gh	1.17 mno
	Kerman	کرمان	71.10 hi	53.43 kl	0.43 cde	1.51 ghi
	Tabas	طبس	73.90 fgh	51.81 klm	0.59 a	2.00 b
	Saravan	سراوان	72.26 ghi	52.59 kl	0.50 b	1.99 b
	Urmia	ارومیه	84.61 a	50.94 lmn	0.56 a	2.25 a
	Sanandaj	سنندج	72.93 fgh	60.30 ghi	0.42 de	1.33 c
	Tabriz	تبریز	77.50 cde	63.40 fg	0.48 bc	1.73 dc
	Dasht-e-Moghan	دشت مغان	70.16 i	58.16 hij	0.38 ef	0.99 pqr
	Rasht	رشت	74.84 efg	56.55 ijk	0.43 cde	1.87 bc
نرمال	Khomein	خمین	73.59 fgh	53.25 kl	0.43 cde	1.44 hij
Normal	Daran	داران	74.90 efg	51.23 klm	0.45 bcd	1.61 efg
	Qom	قم	79.00 bcd	47.34 mn	0.47 bcd	1.85 cd
	Shahroud	شاهرود	76.21 def	56.51 ijk	0.43 cde	1.36 jkl
	Kerman	کرمان	80.18 bc	46.81 no	0.49 bc	1.65 ef
	Tabas	طبس	80.45 bc	45.26 o	0.61 a	1.95 bc
	Saravan	سراوان	82.13 ab	43.13 o	0.59 a	2.14 a

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

In each column, averages with the same letters are not significantly different at 5% level of probability.

اکوتیپ بیشترین و کمترین مقدار کلروفیل a به ترتیب در اکوتیپ‌های ارومیه و دشت مغان به میزان ۱/۵۲ و ۰/۵۵ میلی‌گرم بر گرم بود و در درجات بعدی بیشترین مقدار کلروفیل a در اکوتیپ‌های سراوان، طبس، قم و رشت حاصل شد و کمترین مقدار هم در اکوتیپ‌های سنندج، شاهرود و خمین مشاهده شد (جدول ۴).

کلروفیل b

نتایج نشان داد که اثر اصلی اکوتیپ، سطوح آبیاری و اثر متقابل اکوتیپ و سطوح آبیاری روی کلروفیل b در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۳). با کاهش حجم آبیاری، میزان کلروفیل b از ۰/۴۸ میلی‌گرم بر گرم در آبیاری نرمال به ۰/۲۳ میلی‌گرم بر گرم در تنش شدید رسید. به عبارتی میزان کلروفیل b در تنش خفیف و تنش شدید به ترتیب ۲۲/۹۲ و ۵۲/۰۸ درصد نسبت به آبیاری نرمال کاهش نشان داد (جدول ۴). اثرات اصلی اکوتیپ نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار کلروفیل b به ترتیب در اکوتیپ‌های طبس و دشت مغان به میزان ۰/۵۳ و ۰/۲۹ میلی‌گرم بر گرم حاصل شد. اکوتیپ‌های سنندج، شاهرود، رشت و تبریز نیز دارای مقادیر پایین‌تر این صفت بودند و با اکوتیپ دشت مغان اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۴). نتایج برهمکنش سطوح آبیاری و اکوتیپ نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل b در آبیاری نرمال در اکوتیپ طبس (۰/۶۱ میلی‌گرم بر گرم) و کمترین مقدار این صفت نیز در سطوح تنش شدید در اکوتیپ تبریز (۰/۱۷ میلی‌گرم بر گرم) دیده شد (جدول ۵).

کلروفیل کل

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان کلروفیل کل به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح آبیاری، اکوتیپ و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱٪ قرار گرفت (جدول ۳). بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین مقدار کلروفیل کل در آبیاری نرمال (۱/۶۹ میلی‌گرم بر گرم) و کمترین مقدار هم در تنش شدید (۱/۲۲ میلی‌گرم بر گرم) مشاهده شد. به‌طورکلی میزان کاهش کلروفیل کل در تنش خفیف و تنش شدید به ترتیب به میزان ۱۱/۸۳ و ۲۷/۸۲ درصد نسبت به شرایط آبیاری نرمال کاهش نشان داد (جدول ۴). کاهش غلظت کلروفیل در شرایط کم‌آبی می‌تواند به‌عنوان یک عامل محدودکننده غیر روزنه‌ای به‌حساب آید. یکی از دلایل این کاهش، افزایش میزان فعالیت آنزیم کلروفیلاز است که البته تحت شرایط تنش بیان این آنزیم القاء می‌شود. از عوامل دیگر می‌توان به رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش اکسیداتیو اشاره کرد (Ranjan et al., 2001). اثرات اصلی اکوتیپ نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل کل به ترتیب در اکوتیپ‌های ارومیه و سراوان به میزان ۱/۹۴ و ۱/۹۲ میلی‌گرم بر گرم حاصل شد. این اکوتیپ‌ها ازنظر مقدار کلروفیل a هم در سطح بالاتری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها بودند. همچنین ملاحظه شد که کمترین مقدار کلروفیل کل مربوط به اکوتیپ دشت مغان (۰/۸۴ میلی‌گرم بر گرم) بود. همچنین این اکوتیپ ازنظر مقدار کلروفیل a و b نیز دارای پایین‌ترین مقدار، نسبت به سایر اکوتیپ‌ها بود (جدول ۴). نتایج برهمکنش سطوح آبیاری و اکوتیپ نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل کل در آبیاری نرمال در اکوتیپ‌های ارومیه و سراوان به ترتیب به میزان ۲/۲۵ و ۲/۱۴ و کمترین مقدار این صفت نیز در سطوح تنش خفیف و تنش شدید به ترتیب به میزان ۰/۶۹ و ۰/۸۴ میلی‌گرم بر گرم در اکوتیپ دشت مغان حاصل شد (جدول ۵). میزان کلروفیل ارقام حساس و متحمل تحت تنش خشکی کاهش می‌یابد، ولی میزان کاهش این صفت برای ارقام حساس بیشتر است (Sairam and Srivastava, 2001). در تنش کم‌آبی اکوتیپ طبس ازلحاظ حفظ کلروفیل برتری نشان داد زیرا سیر نزولی کلروفیل در این اکوتیپ کمتر بود. به‌طوری‌که میزان کاهش کلروفیل در تنش شدید نسبت به آبیاری نرمال به میزان ۱۹/۴۹ درصد مشاهده شد. از طرفی در سطوح تنش خفیف میزان کلروفیل کل این اکوتیپ کاهش نیافت بلکه نسبت به آبیاری نرمال به میزان ۲/۵ درصد نیز افزایش نشان داد. بنابراین این حالت از پاسخ به تنش خشکی، یک نکته حائز اهمیت ازنظر حفظ غلظت کلروفیل است. در این میان اکوتیپ تبریز سیر نزولی بیشتری در سطوح تنش نشان داد به‌طوری‌که در تنش شدید نسبت به آبیاری نرمال به میزان ۳۵/۸۴ درصد کاهش در میزان کلروفیل نشان داد. ارقام دارای محتوای کلروفیل بالاتر، مقاومت بیشتری در شرایط تنش از خود نشان می‌دهند. دوام فتوسنتز و حفظ کلروفیل برگ در شرایط خشکی ازجمله شاخص‌های فیزیولوژیک مناسب برای مقاومت به خشکی هستند (Rasti Sani et al., 2014).

کاروتنوئید

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی سطوح مختلف آبیاری و اکوتیپ در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود اما تفاوت

معنی‌داری بین اثر متقابل آن‌ها وجود نداشت (جدول ۳). بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین و کمترین میزان کاروتنوئید به ترتیب در آبیاری نرمال (۰/۶۴ میلی‌گرم بر گرم) و تنش شدید (۰/۴۶ میلی‌گرم بر گرم) حاصل شد. به عبارتی میزان کاروتنوئید در تنش خفیف و تنش شدید به ترتیب ۱۰/۹۴ و ۲۸/۱۲ درصد نسبت به آبیاری نرمال کاهش یافت (جدول ۴). در کلروپلاست‌ها کاروتنوئیدها به‌عنوان رنگیزه کمکی فعالیت دارند اما نقش آنتی‌اکسیدانی آن‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار است. کاروتنوئیدها انرژی زیاد طول‌موج‌های کوتاه را گرفته و اکسیژن یکتایی را به سه‌تایی تبدیل می‌کنند و با گرفتن رادیکال‌های اکسیژن تولیدشده، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را بروز می‌دهند (Inzé and Van Montagu, 2000). نتایج آراد (Arad, 2016)، نشان داد که با افزایش سطوح خشکی میزان کاروتنوئید در شاهدانه کاهش یافت؛ اما نتایجی هم حاکی از افزایش کاروتنوئید در شرایط تنش خشکی گزارش شده است (Emadi et al., 2013). اثر اصلی اکوتیپ نشان داد که بیشترین مقدار کاروتنوئید مربوط به اکوتیپ‌های طبس و کرمان به ترتیب به میزان ۰/۷۹ و ۰/۷۸ میلی‌گرم بر گرم بود و کمترین مقدار این صفت نیز در اکوتیپ‌های تبریز و خمین به ترتیب به میزان ۰/۳۴ و ۰/۳۶ میلی‌گرم بر گرم حاصل شد. در درجات بعدی بیشترین مقدار کاروتنوئید در اکوتیپ‌های سراوان، قم و داران حاصل شد و کمترین مقدار هم در اکوتیپ‌های رشت، سنندج، دشت مغان و شاهرود مشاهده شد (جدول ۴). با توجه به نقش حفاظتی و اهمیت کاروتنوئیدها در تنش، اکوتیپ‌هایی که دارای مقدار بالاتری از این رنگیزه هستند شاید بتوانند در پاسخ به خشکی موفق باشند.

پرولین

میزان پرولین به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح آبیاری و اکوتیپ در سطح احتمال ۱٪ قرار گرفت؛ اما اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نشد (جدول ۳). با افزایش شدت تنش میزان پرولین از ۰/۶۳ میلی‌گرم بر گرم در آبیاری نرمال به ۰/۸۳ میلی‌گرم بر گرم در تنش خفیف و به میزان ۱/۱۹ میلی‌گرم بر گرم در تنش شدید رسید. به عبارتی پرولین به میزان ۳۰/۲۵ و ۴۷/۰۶ درصد به ترتیب در تنش خفیف و شدید نسبت به آبیاری نرمال افزایش نشان داد. گزارش شده است که تجمع پرولین در تنش‌های مختلفی ازجمله خشکی، شوری، دما و شدت نور بالا افزایش می‌یابد (Claussen, 2005; Thapa et al., 2011). در شرایط خشکی، پرولین در حفظ پتانسیل اسمزی، حذف رادیکال‌های آزاد، حفاظت ماکرومولکول‌ها از دناتوره شدن و تنظیم PH سلولی نقش دارد و به‌عنوان منبع نیتروژن و کربن تحت تنش شدید عمل کرده و تحمل گیاه را در تنش‌ها افزایش می‌دهد (Lehmann et al, 2010). اثرات اصلی اکوتیپ نشان داد که بیشترین مقدار پرولین در اکوتیپ ارومیه (۱/۲۷ میلی‌گرم بر گرم) مشاهده شد؛ و کمترین مقدار این صفت هم در اکوتیپ دشت مغان (۰/۴۸ میلی‌گرم بر گرم) حاصل شد (جدول ۴). افزایش میزان پرولین تحت تنش خشکی در آویشن (Babaei et al., 2010) و لوبیا (Mohammadzadeh, 2011) نیز گزارش شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که بین سطوح آبیاری و اکوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت، ولی اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نشد (جدول ۳). با افزایش شدت تنش، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت. بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم CAT به ترتیب در تنش شدید و آبیاری نرمال به میزان ۰/۰۷۷۸ و ۰/۰۵۵۱ میکرومول بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین مشاهده شد. به عبارتی با افزایش سطوح تنش میزان فعالیت آنزیم CAT در تنش خفیف و شدید به ترتیب به میزان ۱۴/۰۱ و ۲۹/۱۸ درصد نسبت به آبیاری نرمال افزایش یافت (جدول ۴). افزایش فعالیت کاتالاز در گیاهان یک ویژگی سازشی بوده و با کاهش میزان هیدروژن پراکسید حاصل از متابولیسم سلولی از آسیب رسیدن به بافت‌ها جلوگیری می‌کند و نقش مهمی در بروز مقاومت در گیاهان تحت تنش دارد (Gill and Tuteja., 2010). بررسی‌ها نشان داده‌اند که در اثر تنش خشکی فعالیت CAT در اکثر گیاهان افزایش می‌یابد (Shehab et al., 2010) و در مواردی هم یا ثابت می‌ماند یا حتی کاهش پیدا می‌کند (Saglam et al., 2011). ولی مجموعه مطالعات حاکی از افزایش CAT در شرایط تنش است که با نتایج حاصل از این آزمایش مطابقت دارد. اثرات اصلی اکوتیپ روی فعالیت CAT نشان داد که اکوتیپ قم با میانگین فعالیت ۰/۰۸۵۴ میکرومول بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین در رتبه اول و اکوتیپ‌های طبس، داران و سراوان به ترتیب با اختلاف کمتری در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. همچنین اکوتیپ خمین با میانگین فعالیت ۰/۰۳۹۶

میکرومول بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین کمترین میزان فعالیت CAT را دارا بود (جدول ۴). ازآنجایی‌که افزایش فعالیت CAT باعث مقاومت گیاه در شرایط تنش می‌شود بنابراین اکوتیپ‌های قم، طبس، داران و سراوان ازنظر دارا بودن بیشترین میزان فعالیت CAT در مقاومت به خشکی می‌توانند موفق عمل کنند. همچنین این اکوتیپ‌ها ازنظر دارا بودن غلظت پرولین نیز در رتبه‌های بالاتری بودند (جدول ۴). گزارش‌ها نشان می‌دهد که رقم‌های مقاوم از طریق القا کردن سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی با تنش‌های محیطی مقابله می‌کنند (Demiral and Turcan, 2004).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم GPX نشان داد که اثر اصلی سطوح آبیاری و اکوتیپ در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود، ولی اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نشد (جدول ۳). مقایسه میانگین سطوح آبیاری نشان داد که بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم به ترتیب در تنش شدید و آبیاری نرمال به میزان ۰/۵۰۳۶ و ۰/۳۸۸۹ میکرومول بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بود. با بیشتر شدن شدت تنش، فعالیت GPX نیز افزایش یافت و این افزایش تا تیمار تنش خفیف به میزان ۱۴/۶۸ درصد بود ولی بین تنش خفیف و شدید اختلاف معنی‌داری ملاحظه نشد (جدول ۴). به نظر می‌رسد که پاسخ اکوتیپ‌ها به سطوح تنش تا سطح مشخصی، بیشتر تحت تأثیر قرار گرفته است (تنش خفیف) و پس از آن با افزایش سطح تنش (تنش شدید)، فعالیت آنزیم کمتر تحت تأثیر قرار گرفته است؛ بنابراین می‌توان گفت که فعالیت GPX در تنش‌های شدید کم‌آبی نسبت به تنش‌های خفیف کاهش می‌یابد و ممکن است این آنزیم نتواند آنزیم موفقی در جهت مقابله با تنش‌های شدید خشکی در شاهدانه باشد. افزایش فعالیت GPX در تنش خشکی در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (Gill and Tuteja, 2010; Rostami and Rahemi, 2013). مقایسه میانگین اکوتیپ‌ها نشان داد که بالاترین میزان فعالیت GPX در اکوتیپ‌های ارومیه و طبس به ترتیب به میزان ۰/۵۸۰۰ و ۰/۵۶۱۱ میکرومول بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین مشاهده شد. هرچند که اختلاف معنی‌داری با اکوتیپ‌های داران، سراوان و قم نداشتند. همچنین کمترین میزان فعالیت GPX نیز در اکوتیپ‌های رشت و خمین به ترتیب به میزان ۰/۲۷۴۴ و ۰/۳۳۲۲ میکرومول بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین مشاهده شد. اکوتیپ‌های دشت مغان و شاهرود نیز از میزان فعالیت GPX کمتری برخوردار بودند که اختلاف معنی‌داری با اکوتیپ‌های سنندج و تبریز نداشتند (جدول ۴).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که در همه اکوتیپ‌ها با افزایش تنش خشکی،RWCL، میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل و کاروتنوئید کاهش یافت. ولی میزان ECL، پرولین، آنزیم‌های CAT و GPX، افزایش نشان داد. اکوتیپ طبس در مقایسه با سایر اکوتیپ‌ها ازنظر خصوصیات فیزیولوژیکی دارای تحمل بیشتری در برابر تنش خشکی بود به‌طوری‌که ضمن دارا بودن RWCL، کاروتنوئید، پرولین، CAT و GPX بیشتر، دارای کمترین مقدار ECL یا به عبارتی دارای بیشترین میزان پایداری غشا نیز بود. از طرفی این اکوتیپ برتری قابل‌توجهی در حفظ RWCL، حفظ محتوای کلروفیل و حفظ پایداری غشا، داشته است که درنهایت نشان‌دهنده تحمل اکوتیپ طبس در سطوح تنش کم‌آبی است. در مقابل اکوتیپ تبریز ضمن دارا بودن محتوای RWCL و کاروتنوئید کمتر، دارای بیشترین مقدار ECL بود؛ و در تنش کم‌آبی حساس‌ترین اکوتیپ ازنظر از دست دادن RWCL، محتوای کلروفیل و پایداری غشا، نسبت به سایر اکوتیپ‌ها شناسایی شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این صفات فیزیولوژیک می‌توانند به‌عنوان معیاری در جهت شناسایی اکوتیپ‌های حساس و متحمل به خشکی باشند. در درجات بعدی، اکوتیپ‌های سراوان، قم، ارومیه و کرمان با دارا بودن مقادیر بالاتری از شاخص‌های فیزیولوژیک، متحمل به خشکی بودند و اکوتیپ‌های شاهرود، رشت، سنندج و دشت مغان نیز از مقادیر کمتر این شاخص‌ها برخوردار بودند لذا می‌توان اظهار داشت که این اکوتیپ‌ها حساس به تنش خشکی هستند. بر اساس پاسخ‌های فیزیولوژیکی متفاوت به تنش خشکی در این آزمایش، نتایج این پژوهش می‌تواند به‌منظور بهره‌برداری در جهت اجرای برنامه‌های اصلاحی مفید واقع شود. از طرفی به لحاظ اهمیت دارویی و صنعتی شاهدانه پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری صورت گیرد.

منابع

Aghcheli, S., Rahmikarizaki, A., Gholamalipour-Alamdari, A., Gholizadeh, A., Davodi, S.H., 2019. Evaluation of some physiological characteristics of cold cereals under low irrigation conditions. Environmental stresses in Crop ScienceS. 12, 673-683. [In Persian with English summary].

Ahmed, S. A., Ross, S. A., Slade, D., Radwan, M. M., Zulfiqar, F., ElSohly, M.A., 2008. Cannabinoid ester constituents from high-potency Cannabis sativa. Journal of Natural Products. 71, 536- 542.

Aladić, K., Jarni, K., Barbir, T., Vidović, S., Vladić, J., Bilić, M., Jokić, S. 2015. Supercritical CO2 extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. Industrial Crops and Products. 76, 472- 478.

Amaducci, S., Zatta, A., Pelatti, F., Venturi, G., 2008. Influence of agronomic factors on yield and quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) fibre and implication for an innovative production system. Field Crops Research. 107, 161- 169.

Amiri, A., Ismail Zadeh Bahabadi, P., Yidulahi ten Cheshmeh, P., Sirus Mehr, A.S.R., 2017. The role of soluble salicylic acid and chitosan in water stress conditions on some physiological traits and yield of safflower oil (*Carthamus tinctorius* L.). Ecophysiology of Crops. 1, 84-69. [In Persian with English summary].

Arad, N., 2016. Effect of drought stress on relative expression of some key genes involved in cannabisis in medicinal cannabis. Master Thesis. University of Tehran. [In Persian].

Arnon, A.N., 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal. 23, 112-121.

Ataei, A., 2005. The effect of drought stress on some physiological characteristics and the activity of antioxidant enzymes in pea cultivars. Master Thesis. Islamic Azad University, Karaj. [In Persian].

Babaei, K., Amini Dehghani. M., Modares Sanavi., S.A.M., Jabbari, R., 2010. Water deficit effect on morphology, prolin content and thymol percentage of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 26, 239-251.

Bahador, M., Tadayon, M., 2018. Effect of deficit irrigation and zeolite levels on phenology, oil yield and water use efficiency of hemp .Iranian Journal of Field Crop Science. 49, 25-38. [In Persian with English summary].

Beltrano, J., Ronco, M.G., 2008. Improved tolerance of wheat plants to drought stress and rewatering by the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus claroideum: Effect on growth and cell membrane stability. Brazilian Journal of Plant Physiology. 20, 29-37.

Chance, B., Maely, A. C., 1955. Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology. 2, 765-775.

Claussen, W., 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. Plant Science. 168, 241-248.

Daliri, R., Shokrpour, M., Asghari, A., Esfandyari, E., Seyed-Sharifi, R., 2010. Evaluation of different ecotypes Silybum marianum in terms of drought resistance in hydroponic culture medium. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture. 1, 9-17.

Demiral, T., Türkan, I., 2004. Does exogenous glycine betaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment? Journal of Plant Physiology. 161, 1089-1100.

Emadi, N., Jahanbin, Sh., Blouchi, H.R., 2013. The effect of drought stress and plant density on yield and some physiological characteristics of pinto beans in Yasuj region. Journal of Crop Production and Processing. 3, 25-35. [In Persian with English summary].

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. Basra, S.M.A., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development. 29, 185-212.

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.

Inzé, D., Van Montagu, M., 1995. Oxidative stress in plants. Current Opinion in Biotechnology. 6(2), 153-158.

Jalalvand, A., Andalibi, B., Tavakoli, A., Moradi, P., 2019. The effect of salicylic acid and cycocel on the percentage and yield of essential oil and physiological properties of the Moldavian balm plant (*Dracocephalum moldavica* L.) under drought stress conditions.

Environmental Stresses in Crop Science. 12(3), 865-876. [In Persian with English summary].

Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D., 2010. Proline metabolism and transport in plant development. Amino Acids. 39, 949-962.

Lum, M.S., Hanafi, M.M., Rafii, Y.M. Akmar, A.S.N., 2014. Effect of Drought Stress on Growth, Proline and Antioxidant Enzyme Activities of Upland Rice. Journal of Animal & Plant Sciences. 24, 1487-1493.

Mohammadzadeh, A., 2011. Study the response of two red kidney bean varieties to limited irrigation and nitrogen. Master Thesis. University of Tehran. [In Persian].

Raasam, Gh., Dadkhah, A., Khoshnood Yazdi, A., 2015. Evaluation of water deficit on morphological and physiological traits of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). Journal of Agronomy Sciences. 10, 1-12. [In Persian with English Summary.[

Ranjan, R., Bohra, S.P., Jeet, A.M., 2001. Plant senescence. Agro bios New York. 18-42

Rostami, A. A., Rahemi, M., 2013. Screening Drought Tolerance in Caprifig Varieties in Accordance to Responses of Antioxidant Enzymes. World Applied Sciences Journal. 21, 1213-1219.

Sadat Rasti-Sani, M., Lahouti, M., Ganjeali, A., 2014. Effect of drought stress on some morphophysiological traits and chlorophyll fluorescence of red bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). Iranian Journal of Pulses Research. 5, 103-116. [In Persian with English summary].

Saei, M., Habibi, D., Mashhadi Akbar Bujar, M., Ardakani, M.R., 2005. Determining activity level of antioxidant enzymes as a parameter to determine resistant species of sorghum against drought stress. Proceeding of 1st Iranian Biological Sciences Conference. Karaj, Iran [In Persian].

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, 60-68.

Sairam, R.K., Srivastava. G.C., 2001. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) Variation in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotype. Journal of Agronomy and Crop Science 186: 63-70.

Silva, M.A., Jifon, J.L., Da 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 19, 193-201.

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.

Thapa, G., Dey, M., Sahoo, L., Panda, S.K., 2011. An insight into the drought stress induced alterations in plants. Biologia Plantarum. 55, 603–613.

Wang, J.P., Bughrara S.S., 2007. Monitoring of gene expression profiles and identification of candidate genes involved in drought responses in Festuca mairei. Molecular Genetics and Genomics.277, 571-587.