نشریه پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران، شماره ویژه: پژوهش‌های فیزیولوژی گیاهی، سال نهم، شماره ویژه بهار ۱۳۹۳ / صفحات: ۱۱-۱

بررسی اثر هورمون آبسیزیک اسید بر افزایش تحمل خشکی گیاه علفی رستاخیزی *Sporobolus stapfianus* در مقایسه با گیاه علفی و غیررستاخیزی *Sporobolus pyramidalis*

هوشنگ امیریان*[۱]، حمیدرضا قاسمپور[۲]، مه‌لقا قربانلی[۳]، سکینه ونایی[٤]، حمیدرضا قاسمی[٥]

[۱] کارشناس‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه

[۲] استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه

[۳] استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان

[٤] دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان

[٥] دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲٤

چکیده

در این تحقیق به بررسی اثر دهیدراسیون بر محتوای نسبی آب، میزان کلروفیلی و آزمون زنده مانی سلول‌ها در دو گیاه *Sporobolus stapfianu* و *Sporobolus pyramidalis* طی خشک شدن پرداخته شد. همچنین با اعمال جداگانهٔ تنش خشکی بر روی بافت‌های برگ هر دو گیاه، میزان نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های برگ به عنوان فاکتوری برای اندازه گیری میزان آسیب وارده آمده به غشاهای سلول، مورد ارزیابی قرار گرفت. اعمال تنش بر روی نمونه‌ها به‌مدت ۵۰ روز با قطع کامل آبیاری انجام گردید و در طول این مدت (با فواصل ۱۰ روز یک بار) از بافت‌های هوایی دو گیاه نمونه برداری با سه تکرار صورت گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که کاهش محتوای نسبی آب از ۹٦ درصد در برگ‌های کاملاً آبدار به ۸ درصد در برگ‌های خشک، منجر به کاهش در محتوای کلروفیلی هر دو گیاه گشت. همچنین نتایج بدست آمده از بررسی میزان نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های برگی هر دو گیاه، با داده‌های حاصل از آزمون زنده مانی سلول‌ها، همخوانی و رابطهٔ قابل قبولی را نشان داد. در مجموع، نتایج داده‌ها با فاکتورهای مطالعه شده در گیاهان رستاخیزی و نقش آنها در القاء مقاومت به خشکی هماهنگی داشت.

واژگان کلیدی: آزمون زنده مانی سلول، گیاهان رستاخیزی، محتوای کلروفیلی، محتوای نسبی آب، مقاومت به خشکی، نشت الکترولیت‌ها.

مقدمه

گیاهان رستاخیزی یا احیا شونده، بیشترین میزان تحمل به خشکی را نشان می‌دهند به‌طوری‌که فعالیت‌های فیزیولوژیکی این گیاهان حتی در شرایط پسابیدگی پروتوپلاسم تا حد متعادل شدن آنها پتانسیل آب سلول با رطوبت نسبی هوای خشک اطراف، ادامه پیدا می‌کند. اغلب گیاهان رستاخیزی پتانسیل آبی پایین‌تر از 400 Mpa – را می‌توانند تحمل کنند. در صورتی که گیاهان معمولی در پتانسیل آبی برگ نزدیک به 1.5 Mpa– پژمرده شده و در پتانسیل آبی 15 Mpa– می‌میرند (Gaff and Churchill, 1976).

*نویسنده مسئول: h.amirian1975@gmail.com

گیاهان رستاخیزی در بین همهٔ گروه‌های گیاهی به جز بازدانگان یافت می‌شود (Oliver, 1996). تخمین زده می‌شود که حدود ۳۰۰ گونه از آنژیوسپرم‌ها و ۹۰ گونه از پتریدوفیت‌ها رستاخیزی باشند (Porembski and Barthlott, 2000; Gaff, 1989) و تا کنون تنها نزدیک به ٤٠ گونهٔ علفی رستاخیزی توسط گروه‌های تحقیقاتی به سرپرستی پروفسور Gaff شناخته شده است (Gaff et al., 2009). به‌طورکلی فراوانی این گیاهان در بین تک لپه‌ای‌ها بیشتر از دو لپه‌ای‌ها است و تعداد زیادی از گونه‌های علفی رستاخیزی در خانوادهٔ Poaceae یافت شده است. در مجموع، رستاخیزی بودن ٧٤ گونهٔ از پتریدوفیت‌ها، و ١٤٥ گونه از نهاندانگان مورد بررسی قرار گرفته است (Gaff, 1989; Gaff et al., 2009). گیاهان رستاخیزی به طور معمول در زیستگاه‌های دارای بارش‌های پراکنده و در زمین‌های سنگلاخی و مناطق خشک نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می شوند (Rascio and La rocca, 2005). و عمدتاً بومی مناطق خشک مانند، آفریقای جنوبی، آمریکا و غرب استرالیا هستند (Gaff, 1987).

گیاهان رستاخیزی را می توان به لحاظ از دست دادن یا حفظ کلروفیل در طی دورهٔ خشکی، در دو گروه جای داد. نخست گروهی موسوم به پویکیلوکلروفیلوس که در مواجه با تنش خشکی همهٔ کلروفیل خود را از دست داده و کلروپلاست آنها تخریب می‌شود. مانند *Xerophyta viscose* (Tuba et al., 1994; Shervin and Farrant, 1998) گیاهانی که در این گروه قرار می‌گیرند، به استثنای برخی از علف‌های چمنی، همگی تک لپه هستند. گروه دوم آنهایی هستند که کلروفیل و اساس ساختاری کلروپلاست خود را حفظ می کنند و همیوکلروفیلوس نام دارند. مانند *Craterostigma wilmsii* و *Craterostigma plantagineum* (Sherwin and Farrant, 1996)

دو گیاه مورد مطالعه در این تحقیق از گیاهان علفی C4 خانوادهٔ Poaceae می باشند که یکی رستاخیزی با نام علمی *Sporobolus stapfianus* و دیگری حساس و غیررستاخیزی از همین جنس با نام *Sporobolus pyramidalis* که به عنوان نمونهٔ کنترل از نظر گرفته شده است. این گیاهان مانند سایر گونه‌های C_4، خصوصیات آناتومی کرانز ، با دستجات آوندی احاطه شده با لایه‌ای از سلول‌های غلاف آوندی را نشان می‌دهند. (Dalla Vecchia et al., 1998; Blomstedt et al., 2010).

گیاه *Sporobolus stapfianus* یکی ار چهل گونهٔ علفی رستاخیزی و چند ساله است که الگوی مناسبی برای پژوهش در مورد تحمل به خشکی در بافت‌های رویشی گیاهان آنژیوسپرم می‌باشد. *S. stapfianus* در مورد وضعیت کلروفیل به هنگام خشکی، حالتی حدواسط بین همیوکلروفیلوس و پویکیلوکلروفیلوس دارد. زمانی که گیاه خشک می‌شود کلروفیل در برگ‌ها به ٤٠ درصد مقدار اولیه کاهش یافته و در زمان آب دهی مجدد به ۹۰ درصد می‌رسد (Gaff and McGregor, 1979; Dalla Vecchia et al., 1998). گونهٔ *Sporobolus stapfianus* نیز مانند بسیاری از گونه‌های علفی رستاخیزی در علفزارهای وسیع و اغلب در دامنهٔ تپه‌ها در خاک‌های کم عمق و سنگلاخی و در معرض کامل نور خورشید رویش دارد (Chippindall, 1955). این گونه به‌طور عمده در کشورهای گرمسیری آفریقا یافت می‌شوند اما در مناطق نیمه گرمسیری در جنوب و شرق آفریقا در کشورهای نیجریه، اوگاندا، اتیوپی، ماداگاسکار، کنیا، تانزانیا و به طرف جنوب در بوتسوانا و آفریقای جنوبی هم مشاهده شده است (Clayton, 1955; Chippindall, 1974).

در این تحقیق رستاخیزی بودن گونه گیاهی مورد مطالعه (*Sporobolus stapfianus*) نسبت به گونهٔ حساس و غیر رستاخیزی (*Sporobolus*

pyramidalis) به خوبی قابل اثبات بوده و هدف از این تحقیق نیز بررسی علت‌ها و مکانیسم‌های مؤثر در ایجاد تحمل خشکی زیاد در گونهٔ رستاخیزی و تفاوت میزان اثر و بروز این مکانیسم‌ها با گونه غیررستاخیزی، در ارتباط با اثر هورمون آبسیزیک اسید (ABA) و میزان نقش این هورمون در ایجاد و القاء تحمل خشکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کاشت و پرورش گیاه: بذرهای دو گیاه *S. stapfianus* و *S. pyramidalis* به‌طور جداگانه در گلدان‌های پلاستیکی متوسط با ترکیبی از ماسه – کود برگ– خاک با نسبت ۱/۵: ۱/۵: ۱ در محیط آزمایشگاه، در معرض نور طبیعی و دمای ۲۵–۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد کشت شدند. پس از آن گلدان‌ها هر ٤٨ ساعت یک بار آبیاری گشتند و پس از جوانه زدن دانه‌ها، افزون بر آبیاری، هر ۳ هفته یکبار به گلدان‌ها به میزان ۵۰ میلی‌لیتر محلول غذایی نیم هوگلند نیز اضافه شد. پس از ٤ ماه، همهٔ نمونه‌ها به‌منظور کنترل شرایط محیطی گیاه، به اتاق رشد منتقل گردیدند. شرایط کنترل شده اتاق رشد برای این گیاهان به‌صورت: دورهٔ نوری ١٦ ساعت و تاریکی ٨ ساعت در شبانه روز، رطوبت نسبی ۵۰–٤۰ درصد، دمای ۲۹ درجهٔ سانتی‌گراد در روز و ۲۷ درجه در شب و شدت نور فتوسنتزی ۲٦۰ µ mol m-2 s -1، بود.

تنش خشکی با قطع کامل آبیاری به مدت ۵۰ روز اعمال گردید. در نخستین روز اعمال تنش، به هر کدام از گیاهان مقاوم و حساس با سه تکرار، تنها یک بار به میزان ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۲/۵ میلی مولار هورمون آبسیزیک اسید (ABA) همراه با Triton X - 100 (۰/۰۲ درصد) به‌عنوان سورفاکتانت، Triton X- 100 نفوذپذیری لایهٔ کوتینی برگ نسبت به آبسیزیک اسید را افزایش می‌دهد(Neal et al., 2000). به‌صورت اسپری پاشیده شد. و نیم دیگر (سه تکرار از هر کدام) به‌عنوان شاهد، هورمون دریافت نکرده و تنها با ترکیب آب مقطر و Triton X -100 مورد تیمار قرار گرفتند.

اندازه‌گیری محتوی آب نسبی گیاه (RWC): برای این کار در مراحل مختلف تنش، در تمام نمونه‌ها، تعداد ۱۰ قطعهٔ ۱ سانتی‌متری از برگ‌های هر دو گیاه را جدا و بلافاصله وزن تر برگ (Fw) با استفاده از ترازوی Sartorius با دقت ده هزارم گرم بدست آورده شد. سپس بعد از غوطه‌ور ساختن برگ‌ها در آب مقطر دو بار تقطیر به‌مدت ٢٤ ساعت برگ‌ها دوباره وزن شد و به این ترتیب Tw بدست آمد. در نهایت وزن خشک برگ‌ها (Dw) پس از قرارگیری در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد داخل آون به‌مدت ٤٨ ساعت اندازه‌گیری و بر اساس فرمول زیر RWC برگ محاسبه گردید (Kuang et al., 1995).

$$RWC = Fw – Dw / Tw – Dw \cdot 100$$

بررسی رستاخیزی بودن به روش میکروسکوپی: به‌منظور اثبات تحمل بالای خشکی و رستاخیزی بودن گونهٔ *S. stapfianus* و غیر رستاخیزی بودن گونهٔ *S. pyramidalis* آزمون توانایی زنده ماندن ۱ سلول‌های برگ به عمل آمد. برای این منظور ابتدا از برگ‌های هر دو گیاه، برش‌های نازک دستی تهیه گردید. سپس پر شده‌ها در یک ظرف پتری حاوی محلول تازهٔ قرمز خنثی غوطه‌ور گشت و پس از یک ساعت، شستشو شدند. سپس با استقرار آن بر روی لام، سلول‌های زندهٔ برگ که رنگ NR را جذب کرده بودند، با کمک میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی x ۲۰۰، مورد شمارش و عکسبرداری قرار گرفتند. در این سنجش سلول‌هایی که قادر به جذب رنگ قرمز خنثی در واکوئل خود

1- Viability test

بودند، نشان‌دهنده سلول‌های زنده و سلول‌های بدون رنگ نشان‌دهندهٔ سلول‌های مرده بودند. به این ترتیب با محاسبهٔ تعداد سلول‌های زنده به تعداد کل سلول‌ها در سه ناحیه انتخابی از برگ (یک ناحیه در قسمت محوری و دو ناحیه در قسمت‌های جانبی) بر طبق فرمول زیر آزمون سلولی زنده ماندن (V.T) انجام گرفت (Sullivan and Levitt, 1959).

V.T = X alive / X Total. 100

تعیین میزان نشت الکترولیت و آسیب دیدگی غشاها: برای اندازه گیری مقدار نشت الکترولیت‌ها[1] از روش Nanjo و همکاران (۱۹۹۹) استفاده گردید. در این روش پس از شستشوی برگ‌های دو گیاه مورد آزمایش با آب مقطر و سپس خشک کردن آن، مقدار ۰/۱ گرم از برگ هر گیاه به قطعات مساوی (۱۰ قطعه) تقسیم و درون دو سری لوله آزمایش با عنوان نمونهٔ تحت تنش و بدون تنش قرار داده شدند. سپس به نمونه‌های هر لولهٔ آزمایش، مقدار ۱۰میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و به‌مدت ٢٤ ساعت در یخچال مورد نگهداری قرار گرفتند. پس از این مدت، نمونه‌های بدون تنش در ۱۰ میلی‌لیترآب مقطر و نمونه‌های مورد تنش در ۱۰ میلی‌لیتر محلول پلی اتیلن گلیکول (PEG) ٤٠ درصد قرار داده شد. دوباره به‌مدت ٢٤ ساعت در یخچال نگهداری شدند. پس از این مدت، نمونه‌ها به آرامی از پلی‌اتیلن گلیکول زدوده و بار دیگر به همراه نمونه‌های بدون تنش در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر جدید قرار گرفته و به‌مدت ٢٤ ساعت در یخچال نگهداری شدند. در ادامه نمونه‌ها از یخچال خارج شده و پس از رسیدن دمای آن به حد دمای طبیعی، هدایت‌الکتریکی[2] هر کدام از نمونه‌ها به وسیلهٔ دستگاه هدایت‌سنج[3]، تحت عنوان C1 اندازه‌گیری گردید. سپس در مرحلهٔ بعد لوله‌های محتوی نمونه را به منظور تخریب کامل غشاهای بافت‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجهٔ سانتی گراد بن ماری جوشان قرار داده و سپس هدایت‌الکتریکی آنها نیز با عنوان C2 که نشان دهندهٔ غلظت کلی یون‌های نشت یافته از خلال غشاهای آسیب دیده بافت‌ها می باشد، اندازه گیری گردید. در نهایت با استفاده از فرمول 100×(C1/C2) درصد نشت یون‌ها و الکترولیت‌های بافت‌های گیاه تعیین گردیده و از این طریق میزان آسیب نسبی غشاها مشخص می گردد (Nanjo et al., 1999).

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل گیاه: برای تعیین محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل در نمونه‌ها، از روش Hipkins and Baker (1986) استفاده گردید. به این ترتیب که مقدار ۵۰ میلی گرم از بافت برگی پودر شدهٔ هر کدام از تیمارها را وزن کرده و با ۳ میلی‌لیتر متانول ۱۰۰ درصد مخلوط شده و سپس به‌مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه و در تاریکی، انکوباسیون گردید. سپس نمونه‌ها هموژنیزه شده در دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. پس از آن جذب محلول رویی به وسیلهٔ دستگاه UV اسپکتروفتومتر، در طول موج ٦٥٠ و ٦٦٥ نانومتر ثبت گردید. از متانول ۱۰۰ درصد نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. در نهایت برای محاسبهٔ کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل از فرمول زیر استفاده شد:

Chlorophyll a (µg / ml) = 16.5 × A665 – 8.3 × A650
Chlorophyll b (µg / ml) = 33.8 × A650 – 12.5 × A665
Total Chlorophyll (µg / ml) = 25.8 × A650 + 4.0 × A665

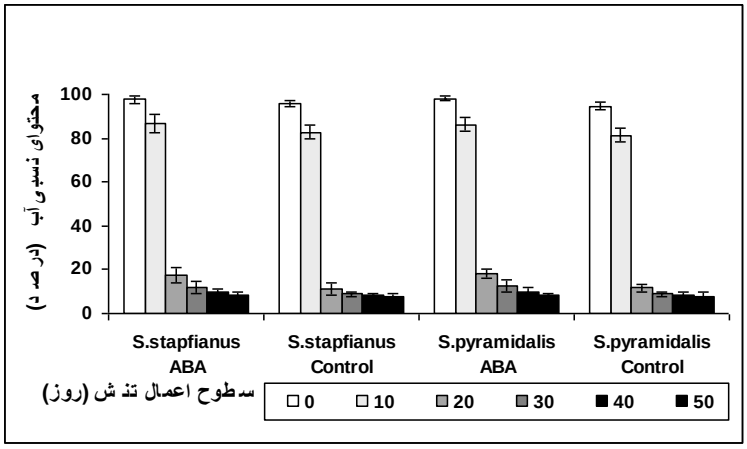
تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. ترسیم شکل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 انجام گرفت.

1- Electrolyte leakage
2- Electrical conductances
3- Conduct meter

نتایج

نتایج و بررسی داده‌ها یکسان بودن مقدار محتوای آب نسبی برگ در هر دو گیاه را نشان داد (نمودار ۱). در همهٔ تیمارها یک افت شدید RWC در بین روزهای ۳۰-۲۰ تنش مشاهده گردید تا این که در مراحل پایانی تنش به حدود ۸ درصد رسید.

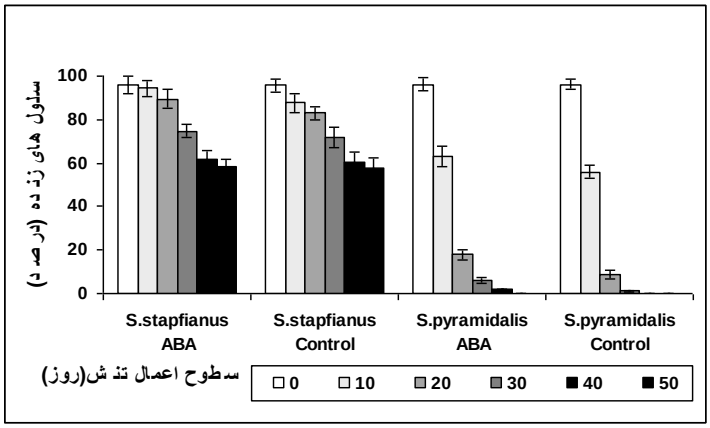
تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) داده‌های مربوط به تغییرات RWC در گیاه رستاخیزی شاهد و گیاه تحت تیمار با ABA اختلافات معناداری در سطح ۰/۰۵ را بین این دو نوع تیمار نشان نداد. مشابه همین نتایج نیز برای گیاه حساس کنترل و تحت تیمار با ABA بدست آمد. همچنین با مقایسهٔ میانگین تیمارهای هر دو گیاه به کمک تست توکی می‌توان عدم اختلاف بین تیمارها را مشاهده کرد.



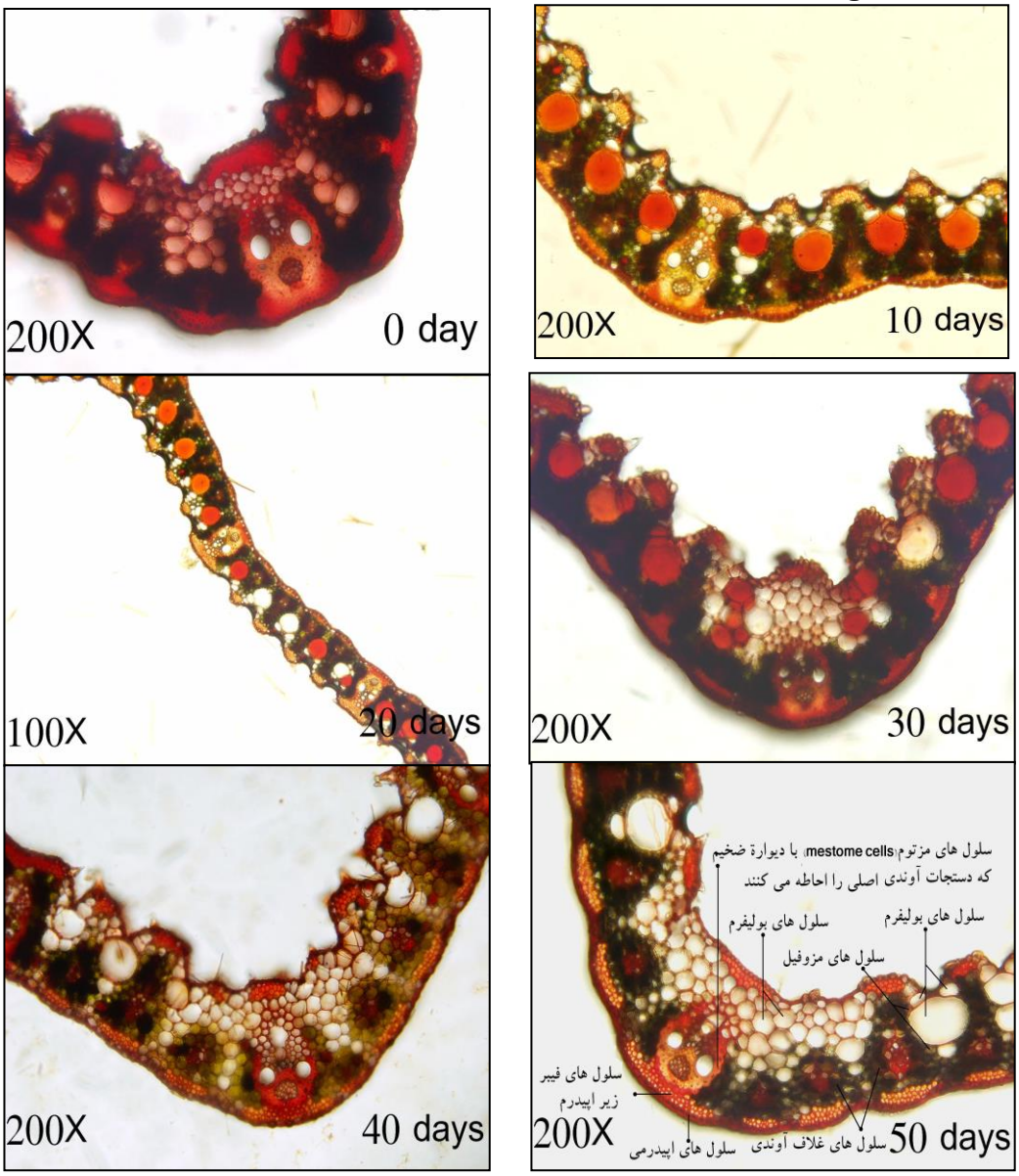
نمودار ۱: تغییرات محتوای نسبی آب در طی تنش خشکی در گیاه حساس و رستاخیزی شاهد و تیمار شده با آبسیزیک اسید

نتایج بررسی آزمون زنده مانی سلول‌ها نشان می‌دهد که در گیاه رستاخیزی تعداد اندکی از سلول‌ها دچار مرگ می‌شوند به‌طوری‌که تا آخرین مرحلهٔ تنش که محتوای آب نسبی برگ‌ها به حدود ۸ درصد می‌رسد بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها زنده می‌مانند در حالی که در گونهٔ حساس طی ۱۰ روز اول تنش بیش از ۳۰ درصد و پس از ۲۰ روز تنش بیش از ۸۰ درصد سلول‌ها از بین می‌روند (نمودار ۲؛ جدول ۱ و ۲؛ شکل ۱و۲). به عبارت دیگر بیشتر سلول‌های برگ گیاه حساس در محتوای نسبی کمتر از ۷۰ درصد دچار مرگ می‌شوند و برخلاف گیاه رستاخیزی در برابر خشکی مقاومتی نشان نمی‌دهد.

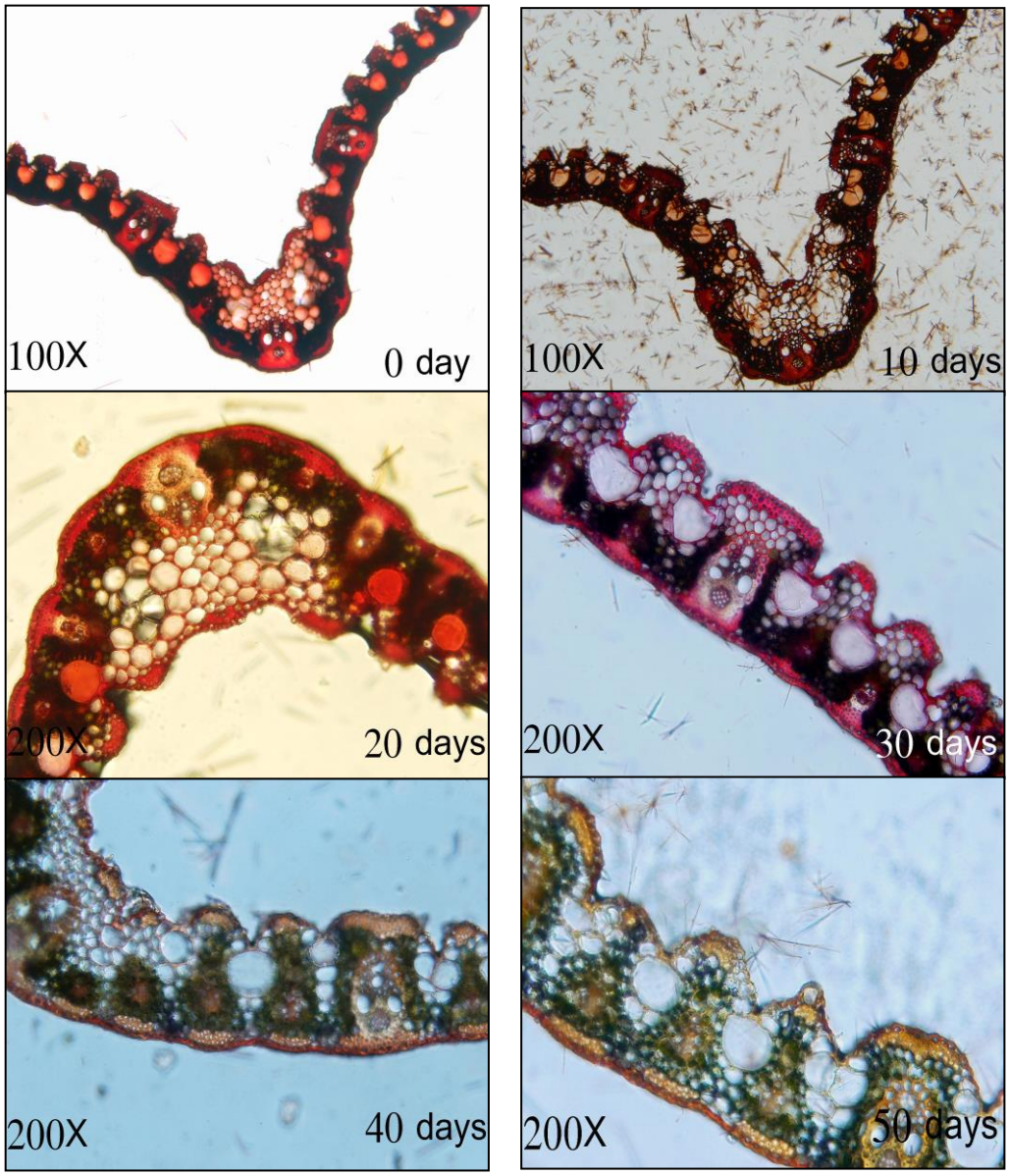
تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمون زنده‌مانی سلول‌ها در دو گیاه رستاخیزی و غیر رستاخیزی تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ بین این دو را نشان می‌دهد اما تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مقادیر آزمون زنده مانی سلول‌ها در گیاه رستاخیزی کنترل و گیاه رستاخیزی تحت تیمار با ABA و همچنین هر دو تیمار گیاه حساس، اختلافات معناداری را بین این دو نوع از تیمارها نشان نمی‌دهد. این نتایج حاکی از آن است که هورمون ABA اثر معنی‌داری بر روند زنده ماندن سلول‌های تحت تنش بر جای نمی‌گذارد.



نمودار ۲: نتایج آزمون زنده مانی سلول‌ها در گیاه حساس و رستاخیزی شاهد و تیمار شده با آبسیزیک اسید.

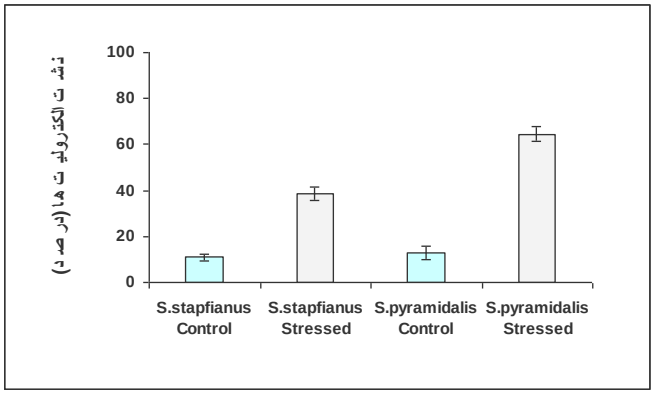


شکل ۱: نمونه‌ای از برش‌های عرضی برگ گیاه *S. stapfianus* و انجام آزمون زنده مانی سلول‌ها بر روی نمونه‌های تحت استرس به‌ترتیب در ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ روز بی آبی.



شکل ۲: نمونه‌ای از برش‌های عرضی برگ گیاه *S. pyramidalis* و انجام آزمون زنده مانی سلول‌ها بر روی نمونه‌های تحت استرس به‌ترتیب در ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ روز بی آبی.

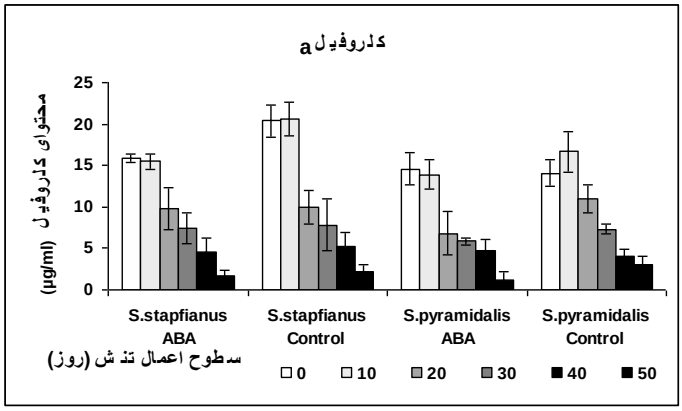
نتایج مقادیر نشت الکترولیت‌ها حاکی از آن است که نشت الکترولیت‌ها در گیاه رستاخیزی نزدیک به ۴۵ درصد کمتر از گیاه غیر رستاخیزی است و در نتیجه، پایداری غشاها در گیاه *S. stapfianus* ۴۵ درصد بیشتر از گیاه حساس *S. pyramidalis* می باشد این در حالی است که هر دو گیاه در شرایط طبیعی از پایداری غشاء نسبتاً برابری برخوردارند. تجزیه واریانس یکطرفه داده‌های مربوط به این سنجش نیز، معنا دار بودن تفاوت مقادیر نشت الکترولیت بین دو گیاه تحت تنش حساس و رستاخیزی در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهد.



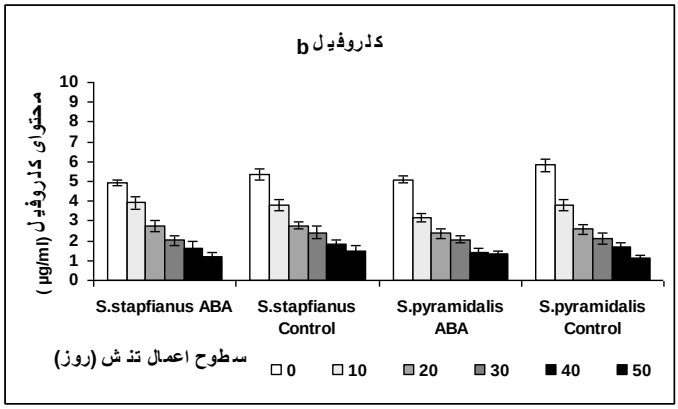
نمودار ۳ : مقایسهٔ مقادیر نشت الکترولیت دو گیاه حساس و رستاخیزی با دو تیمار کنترل و متأثر از تنش.

نمودار٤ تغییرات مقادیر کلروفیل a در تیمارهای دو گیاه رستاخیزی و غیر رستاخیزی را نشان می‌دهد. در این نمودار به روشنی دیده می‌شود که در همهٔ تیمارها در طول تنش، کلروفیل a با روند تقریباً مشابهی به مقدار ۲۰-۱۰ درصد مقدار اولیهٔ خود کاهش می‌یابد. مقایسهٔ مقادیر کلروفیل a در دو تیمار ABA و کنترل گیاه رستاخیزی بیانگر کاهش ۲۰ درصدی کلروفیل توسط ABA است. این مقدار کاهش در کلروفیل a در گیاه غیر رستاخیزی نیز به ۱۸ درصد می‌رسد.

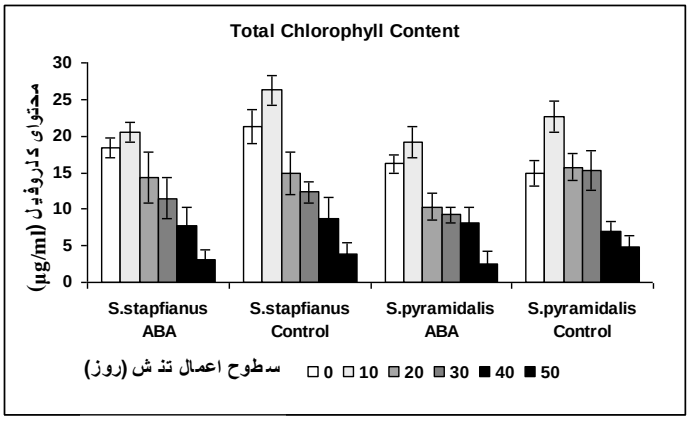
آنالیز واریانس داده‌های مربوط به این صفت در دو گیاه، عدم وجود اختلاف معنا دار در بین همهٔ تیمارها، در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهد. همچنین مقایسهٔ میانگین تیمارها به کمک آزمون توکی نیز هیچگونه اختلاف معنا داری بین تیمارها را نشان نمی‌دهد. مشابه همین وضعیت به خوبی در مورد کلروفیل b نیز دیده می‌شود (نمودار ۵). و مقایسهٔ میانگین‌ها توسط آزمون توکی نیز نشان می‌دهد که مقادیر کلروفیل در همهٔ تیمارها اختلاف معناداری ندارد. در مورد کلروفیل کل نیز همان‌طورکه در نمودار ٦ دیده می‌شود، در همهٔ تیمارها مقدار کلروفیل کل گیاه با آهنگ تقریباً یکسانی رو به کاهش می‌گذارد. این کاهش تا پایان روز ۵۰ تنش به ۳۰-۱۵ درصد مقدار اولیه برگ می‌رسد. مقایسهٔ مقادیر کلروفیل کل در دو تیمار ABA و کنترل گیاه رستاخیزی، کاهش ١٦ درصدی در تیمار ABA را نشان می‌دهد. این مقایسه در گیاه غیر رستاخیزی نیز حاکی از کاهش ۲۳ درصد از محتوای کلروفیل تحت اثر آبسیزیک اسید است. اما تجزیهٔ واریانس داده‌های مربوط به تغییرات کلروفیل کل تفاوت معنا داری بین تیمارها را نشان نمی‌دهد. مقایسهٔ میانگین تیمارها توسط آزمون توکی نیز مشابهت همهٔ گروه‌ها را به لحاظ مقادیر و نوسانات کلروفیل تأیید می‌کند.



نمودار ٤: نتایج تغییرات محتوای کلروفیل a در تیمارهای دو گیاه حساس و رستاخیزی



نمودار ۵: نتایج تغییرات محتوای کلروفیل b در تیمارهای دو گیاه حساس و رستاخیزی



نمودار ٦: نتایج تغییرات محتوای کلروفیل کل در تیمارهای دو گیاه حساس و رستاخیزی

بحث

نتایج بدست آمده از آزمون زنده مانی سلول‌ها در دو گیاه مورد آزمایش، به خوبی گویای توانایی بارز گیاه رستاخیزی *S. stapfianus* در زنده نگه داشتن سلول و بافت‌های برگی خود می‌باشد. از آنجا که تست سلولی انجام گرفته در این مطالعه نیز مانند بیشتر تست‌های سلولی بر اساس رنگ آمیزی حیاتی و جذب فعال محلول رنگ قرمز خنثی از سوی غشاء سیتوپلاسمی و تونوپلاست سلول قرار دارد، لذا تنها از سوی سلول‌های زنده‌ای که دارای غشای سیتوپلاسمی و واکوئلی سالم و محتوای ATP کافی باشند جذب می‌گردد. در سلول‌های مرده به علت آسیب دیدگی ساختار غشاء و احتمالاً به‌دلیل فقدان ذخیرهٔ ATP، توانایی جذب رنگ وجود ندارد.

از روی نتایج می‌توان دریافت که کاربرد آبسیزیک اسید خارجی اثر چشمگیری بر توانایی زنده ماندن سلول‌ها ندارد. در واقع در گیاه نامبرده هنگامی که محتوای آب نسبی برگ به کمتر از ٦٠ درصد می‌رسد تحمل خشکی در آن القاء می‌گردد. در این امر، محتوای هورمون ABA داخلی گیاه که به‌طور چشمگیری در پاسخ به خشکی افزایش می‌یابد، نقش بارزی ایفا می کند اما اعمال ABA خارجی اثر اندکی و یا هیچ افزایشی در تحمل خشکی پروتوپلاسمی گیاه از خود نشان نمی‌دهد (Gaff and Loveys., 1993). همچنین طی مطالعات Ghasempour و همکاران (۲۰۰۱) در مورد اثر هورمون‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در ایجاد مقاومت خشکی پروتوپلاسمی گیاه *S. satpfianus*، اثر ناچیز ABA

خارجی بر پایداری سوسپانسیون پروتوپلاسم‌ها در برابر استرس خشکی مورد تأکید قرار گرفته است. در پژوهش فوق نشان داده شده است که از میان ۱۱ ماده رشد مورد مطالعه، استفادهٔ همزمان براسینولوئید (BR) و متیل جاسمونیک اسید (MJA)، تاثیر گذارترین مورد در بهبود زنده ماندن پروتوپلاسم‌ها و تحمل خشکی پروتوپلاسمی سلولهای مزوفیل گیاه *S. stapfianus* بوده است در حالی که اعمال ABA خارجی تنها اثر ناچیزی بر بهبودی تحمل خشکی پروتوپلاسمی دارد (Ghasempour et al., 2001).

تنش آب در پروتوپلاست‌های حساس به پسابیدگی موجب تخریب سیستم‌های غشایی می‌شود. به این ترتیب پیوستگی غشاهای پلاستیدها، میتوکندری‌ها، هسته، دیکتیوزوم‌ها و غشای سلولی از دست می‌رود. نشت و تراوش پذیری غشاها نسبت به املاح محلول در پتانسیل پایین آب، نظریهٔ تخریب غشاها طی تنش آب را تأیید می‌کند (Oliver, 1991). در این تحقیق نتایج حاصل از بررسی میزان نشت الکترولیت‌ها به خوبی نشان می‌دهد که گیاه رستاخیزی در مقایسه با گیاه حساس، از نشت الکترولیت بسیار کمتر و بنابراین از پایداری و پیوستگی غشای بیشتری برخوردار است. در این رابطه گزارش شده است که در برگ‌های زنده خشک شدهٔ گیاهان رستاخیزی طی آبگیری دوباره مقداری از یون‌ها به‌ویژه یون‌های پتاسیم نشت می‌کند و به نظر می‌رسد این نشت جزیی و موقتی بوده و پس از آن بهبود می یابد اما در برگهای مردهٔ گیاهان حساس میزان نشت پتاسیم بیش از دو برابر گیاه مقاوم است و حاکی از آسیب اساسی به سیستم غشایی می باشد (Gaff, 1980). گیاهان رستاخیزی تک لپه در شرایط از دست رفتن تعدادی از کریستاها، بیشتر تیلاکوئیدها و پارگی غشاهای خارجی میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها، زنده می مانند (Hallam and Luff, 1980).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش حاکی از آن است که گیاه رستاخیزی نسبت به گیاه حساس از مکانیسم‌های چندگانهٔ ویژه‌ای برای زنده نگه داشتن سلول‌ها و بافت‌های برگی خود بهره می‌گیرد که دست کم حفظ ساختار غشاها، یکی از مهمترین عوامل در این فرایند به شمار می‌رود. این امر به خوبی در بررسی میزان نشت الکترولیت‌ها و سنجش میزان خسارت غشاها در دو گیاه نمایان می‌باشد. این وضعیت همچنین با مقادیر اندازه‌گیری شدهٔ درصد زنده ماندن سلول‌ها در دو گیاه به خوبی همخوانی و ارتباط دارد. در مورد وضعیت محتوای کلروفیلی گیاه رستاخیزی مورد مطالعه در طی دورهٔ خشکی کاهش کلروفیل به صورت نسبی بوده و حکایت از آن دارد که این گیاه وضعیت حد واسط بین گیاهان همیوکلروفیلوس و پویکیلوکلروفیلوس را دارا می‌باشد. به‌طورکلی در این مطالعه بررسی و سنجش فاکتورهای مختلف مؤثر در تحمل گیاه به خشکی، بر نقش ناچیز اعمال ABA خارجی بر روی بسیاری از مکانیسم‌های القای تحمل خشکی در دو گیاه مورد بررسی، تأکید دارد.

منابع

Blomstedt, C.K, Griffiths, C.A., Fredericks, D.P., Hamill, J.D., Gaff, D.F. and Neale, A.D. (2010). The resurrection plant *Sporobolus stapfianus:* An unlikely model for engineering enhanced plant biomass? Plant Growth Regulation. 62:217–232.

Boyer, J.S. (1983). Subcellular mechanisms of plant response to low water potential. Agricultural Water Management. 7: 239-248.

Dalla Vecchia, F., ElAsmar, T., Calamassi, R., Rascio, N. and Vazzana, C. (1998). Morphological and ultrastructural aspects of dehydration and rehydration in leaves of

stapfianus and the desiccation - sensitive grass *Sporobolus pyramidalis*. Australian Journal of Plant Physiology. 22: 1027-34.

Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubar, Y., Yamaguchi, Shinozaki, K.,Shinozaki, K.(1999). Antisense suppression of the proline degradation improvestolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. Federation of European Biochemical Societies.461: 205-210.

Neale, A.D., Blomstedt, C.K., Bronson, P., Le, T.N., Guthridge, K., Evans, J., Gaff, D.F. and Hamill, D.J. (2000). The isolation of genes from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* which are induced during several drought stress. Plant, Cell and Environment . 23:265 – 277.

Oliver, M.J. (1996). Desiccation tolerance in vegetative plant cells. Physiologia Plantarum. 97:779–787.

Porembski, S. and Barthlott, W. (2000). Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. Plant Ecology.151:19–28.

Quartacci, M.F., Forli, M., Dalla Vecchia, F., Bochicchio, A., Navari-Izzo, F. (1997). Desiccation tolerant *Sporobolus stapfianus*: lipid composition and cellular ultrastructure during dehydration and rehydration. Journal of Experimental Botany. 48:1269-1279.

Rascio, N. and La Rocca, N. (2005). Resurrection plants: the puzzle of surviving extreme vegetative desiccation. Critical Reviews in Plant Sciences. 24:209–225.

Sherwin, H.W. and Farrant, J.M. (1996). Differences in rehydration of three desiccation – tolerant angiosperm species. Annals of Botany. 78: 703-710.

Sherwin, H.W. and Farrant, J.M. (1998). Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants Craterostigma wilmsii and *Xerophyta viscosa*. Plant Growth Regulation. 24:203–210.

Sullivan, C.Y. and Levitt, J. (1959). Drought tolerance and avoidance in two species of oak. Physiology Plant Journal. 12: 299-305.

Tuba, Z., Lichtenhaler, H.K., Csintalan, Z., Nagy, Z. and Szente, K. (1994). Reconstitution of chlorophylls and photosynthetic CO_2 assimilation upon rehydration of the desiccated poikilochlorophyllatous plant *Xerophyta scabrida* (Pax.). Planta. 192: 414-420.

Sporobolus stapfianus. Plant Growth Regulation 24**:** 219–228.

Gaff, D.F., Blomstedt, C.K., Neale, A.D., Le, T.N., Hamill, J.D. and Ghasempour, H.R. (2009). *Sporobolus stapfianus*, a model desiccation-tolerant grass. Functional Plant Biology. 36:589–599.

Gaff, D.F. (1980). Protoplasmic tolerance of extreme water stress. In 'Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress'. (Eds. N. c Turner. and P. J. Kramer) PP.207-231. (Wiley- Interscience: New York).

Gaff, D.F. and Churchill, D.M. (1976). *Borya nitida* Labill.An Australian species in the liliaceae with desiccation tolerant leaves. Australian Journal of Botany. 24: 209-24.

Gaff, D.F. (1989). Responses of desiccation tolerant "resurrection" plants to water stress. Pp. 264–311. In: Kreeb, K.H., Richter, H. & Hinckley, T.M. (eds), Structural and functional responses to enironmental stresses: water shortages. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands.

Gaff, D.F. and Loveys, B.R.(1984). Abscisic acid content and effects during dehydration of detached leaves of desiccation tolerant plants. Journal of Experimental Botany. 35(158): 1350-1358.

Gaff, D.F. and Loveys, B.R.(1993). Abscisic acid levels in drying plants of a resurrection grass. Transactions of Malaysian Society Plant Physiology. 3: 286-287.

Gaff, D.F. (1987). Desiccation tolerant plants in South America. Oecologia. 74:133-136.

Ghasempour, H., Anderson, E. and Gaff, D. (2001). Effects of growth substances on the protoplasmic drought tolerance of leaf cells of the resurrection grass Sporobolus stapfianus. Australian Journal of Plant Physiology. 28:1115-1120.

Hallam, N.D. and Luff, S.E.(1980). Fine structure changes in mesophyll tissue of the leaves of *Xerophyta villosa* during desiccation. Botanical Gazette Journal. 141: 173-9.

Hipkins, M.F. and Baker, N.R.(1986). Photosynthesis Energy Transduction. Spectroscopy. IRL Press, Oxford, Washington, pp. 51–101.

Kuang. J., Gaff. D.F., Gianelo, R.D., Blomstedt, C.K., Neale, A.D. and Hamill, J.D. (1995). Changes in invivo protein complements in drying leaves of the desiccation - tolerant grass *Sporobolus*