مطالعه اثر تنش خشکی بر سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی وغیرآنزیمی برخی ارقام انگور

Studying the effect of drought stress on enzymatic and non-enzymatic antioxidant system of some grape cultivars

چکیده

به‌منظور بررسی مطالعه اثر تنش خشکی بر سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی شش رقم انگور آزمایشی فاکتوریل بر پایهٔ طرح کاملا تصادفی با سه تکرار تحت شرایط گلخانه‌ای اجرا شد. در این آزمایش، تیمارها شامل شش رقم انگور (عسگری، خلیلی، یاقوتی، پیکامی، ترکمن ٤ و سوزک) و چهار سطح تنش خشکی ((شرایط نرمال (۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه)، تنش کم (۷۵ درصد ظرفیت مزرعه)، تنش متوسط (۵۰ درصد ظرفیت مزرعه) و تیمار تنش شدید (۲۵ درصد ظرفیت مزرعه)) بودند. نتایج نشان داد که صفات پرولین، مالون‌دی‌آلدئید، آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز با افزایش شدت تنش، به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند. درمقابل، محتوای فنول کل با افزایش شدت تنش، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در میان ارقام مورد مطالعه، رقم یاقوتی از حیث شاخص‌های موردمطالعه نسبت به سایر ارقام انگور، مقاومت بیشتری نسبت به خشکی نشان داد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم یاقوتی ثبت شد؛ به‌گونه‌ای که فعالیت آنزیم کاتالاز آن در سطوح ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به‌ترتیب ۱۳، ۱۲ و ٤٦ درصد نسبت به ظرفیت زراعی ۱۰۰ درصد افزایش یافت. با توجه به نتایج این پژوهش به‌نظر می‌رسد که رقم یاقوتی نسبت به ارقام دیگر به خشکی متحمل‌تر است. ولی از آنجا که این تحمل ناشی از مکانیزم های فعال در برگ می باشد لازم است در زمان استفاده از این رقم به عنوان پایه آزمایش های تکمیلی انجام شود.

کلمات کلیدی: آسکوربات‌پراکسیداز، پرولین، فنول، کاتالاز،

مقدمه وکلیات

خشکسالی یکی از مهم‌ترین مشکلاتی است که کشاورزی را در سراسر جهان تهدید می‌کند. تنش خشکی بر جذب مواد مغذی، فتوسنتز، تنفس و متابولیسم انرژی در گیاهان تأثیر منفی می‌گذارد و در نتیجه رشد، نمو، عملکرد محصول وبهره‌وری گیاهان را کاهش می‌دهد (Mishra *et al*., 2023). بسته شدن روزنه‌ها طی تنش خشکی معمولاً تثبیت دی‌اکسید کربن را کاهش داده، زنجیره انتقال الکترون را مختل می‌سازد و باعث تولید مقادیر زیادی از گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در کلروپلاست و میتوکندری می‌شود (Sofo *et al*., 2004)، اما تولید بیش از حد آن‌ها طی تنش خشکی به بروز تنش اکسایشی در گیاه منجر می‌گردد (Arora *et al*., 2002). تولید نامتعادل و تخریب گونه‌های اکسیداتیو فعال (ROS)، مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال‌های سوپراکسید (O^{2-}) و رادیکال‌های هیدروکسیل (HO)، باعث تجمع بیش از حد ROS تحت تنش خشکی می‌شود (Choudhury *et al*., 2017). ROS اضافی به‌طور جدی به رنگدانه‌های فتوسنتزی، لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها، مولکول‌های

RNA و DNA آسیب می‌زند و منجر به مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی می‌شود (Mukarram *et al.*, 2021). با گذشت زمان، گیاهان استراتژی‌های مختلفی را برای مقابله با کمبود آب و در نتیجه حفظ رشد و نمو ایجاد کرده‌اند. تنظیم اسمزی رایج‌ترین واکنش برای غلبه بر اثرات نامطلوب خشکسالی در نظر گرفته می‌شود. در شرایط خشکی، گیاهان با جذب مقادیر زیادی از املاح فعال اسمزی پتانسیل اسمزی را در سلول‌ها کاهش می‌دهند و در نهایت باعث حفظ تورژسانس سلولی می‌شوند (Choudhury *et al.*, 2017). علاوه بر این، ROS سمی تولید شده در طول تنش خشکی می‌تواند از طریق مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی حذف شود. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX)، می‌توانند تحت تنش خشکی فعال شوند. اسید اسکوربیک (AsA)، گلوتاتیون (GSH)، توکوفرول و فنولیک‌ها چندین آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی هسته‌ای هستند (Hasanuzzaman *et al.*, 2020؛ Mukarram *et al.*, 2021). سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی تقریباً در تمام سایت‌های اصلی تولیدکننده ROS، مانند کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها و هسته‌ها وجود دارد و نقشی حیاتی در پاسخ به تنش خشکی ایفا می‌کند (Mukarram *et al.*, 2021). آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی هر دو به عنوان سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی متعارف شناخته می‌شوند زیرا به‌طور خاص بر روی یک نوع ROS و مولکول‌های منفرد عمل می‌کنند. توانایی گیاهان در از بین بردن گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن و کاهش اثرات مضر آن‌ها ممکن است با تحمل آن‌ها در برابر تنش خشکی ارتباط داشته باشد (Tsugane *et al.*, 1999). علاوه بر این، گیاهان بسته به شدت و طول دوره تنش، گونه گیاهی و مرحله نموی آن، واکنش‌های متفاوتی در برابر تنش خشکی بروز می‌دهند (Dacosta and Huang, 2007).

انگور (*Vitis vinifera* L.) یکی از مهم‌ترین درختان میوه پس از پسته در جایگاه دومین محصول با سطح کشت بالا قرار گرفته است که سهم زیادی در صادرات غیرنفتی کشور ایفا می‌کند. با این حال، قابلیت دسترسی به آب مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید این محصول در کشور است (اسدی وهمکاران، ۱۳۹۶). مطالعات زیادی در مورد تأثیر خشکی در ارقام مختلف انگور گزارش شده است. Sorori و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که سازگاری گیاه انگور به تنش خشکی نتیجه تغییرات در بسیاری از مکانیسم های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است که باعث تغییر در محتوای پرولین، مواد جامد محلول، سرعت فتوسنتز، فعالیت های آنزیمی و غیره می‌شود. به‌طوری که رقم گرمه با بیشترین میزان پراکسیداز و کاتالاز از مقاوم‌ترین ارقام معرفی گردید. Altinci و Cangi (۲۰۱۹) طی مطالعاتی کاهش صفات رشدی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را طی تنش

خشکی در ارقام مختلف انگور گزارش کردند. Singh و همکاران (۲۰۰۰) در بررسی ارقام انگور تحت تنش، کاهش میزان کلروفیل و افزایش میزان پرولین و کل قند محلول را با افزایش تنش گزارش کردند. فهمیم و همکاران (۱٤۰۱) گزارش کردند که با افزایش سطح تنش خشکی میزان نشت یونی، مالون دی‌آلدئید، کل قند محلول، پرولین و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بیشتر ارقام انگور افزایش معنی‌داری پیدا کرد. در بررسی تأثیر تنش خشکی بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دو رقم انگور توسط محسنی‌فرد و همکاران (۱۳۹۸) مشخص شد که تنش خشکی به‌طور معنیداری فعالیت آنزیمهای کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز افزایش داد. طی تحقیقی توسط مهری و همکاران (۱۳۹۳) مشخص شد که افزایش تنش خشکی باعث کاهش صفات رشدی و میزان رطوبت نسبی آب برگ و افزایش معنی‌دار در میزان پرولین، مالون دی‌آلدئید و همچنین فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز می‌شود.

هدف از این پژوهش، بررسی سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی وغیرآنزیمی ژنوتیپ‌های کاندید انگور در تنش ملایم، متوسط و شدید به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل‌تر به خشکی است به‌طوری که بتوان در برنامه‌های آینده بهنژادی از آن‌ها بهره جست.

فرآیند پژوهش

این پژوهش در خراسان شمالی، شهرستان اسفراین (طول جغرافیایی٥٦، عرض جغرافیایی٣٦، ارتفاع از سطح دریا ۱۲٦۰ متر) در محیط گلخانه با میانگین دمای ۲۷-۳۰ درجه سانتی‌گراد، انجام گرفت. مواد گیاهی شامل (عسگری، خلیلی، یاقوتی، پیکامی، ترکمن ٤ و سوزک) از شرکت کشت و صنعت جوین تهیه و سپس به صورت نهال‌های ریشه‌دار یکساله، در گلدان‌هایی به قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر قرار گرفتند. برای کشت ارقام، مخلوطی از خاک‌های رس، ماسه و ماده آلی به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲ تهیه شدند.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در فصل تابستان سال ۹۸-۹۹ انجام شد. این مطالعه شامل چهار تیمار آبیاری کامل (رطوبت خاک در حد ظرفیت مزرعه)، تنش کم (رطوبت خاک در حد ۷۵ درصد ظرفیت مزرعه)، تنش متوسط (رطوبت خاک در حد ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه) و تنش شدید (رطوبت خاک در حد ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه) با سه تکرار و در هر تکرار سه واحد آزمایشی (گلدان۳۰ در ۵۰) اجرا شد.

تنش رطوبتی به‌وسیله وزن کردن روزانه گلدان‌ها اعمال شد. به‌طوری که رطوبت گلدان‌های حاوی تیمار تنش کم در حد ۷۵ درصد ظرفیت مزرعه، تنش متوسط در حدود ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه و تیمار تنش شدید، ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه حفظ شد. همچنین، درصد رطوبت در گلدان‌های بدون تنش در حد ظرفیت مزرعه حفظ شد. قابل ذکر است که برای بدست آوردن میزان آب لازم برای رسیدن به حد ظرفیت مزرعه از رابطه زیر استفاده می‌گردد (Jalili Marandi *et al.*, 2011):

۱۰۰* وزن خاک خشک شده در آون / (وزن خاک خشک شده در آون- وزن خاک در ظرفیت مزرعه)

در این آزمایش به‌منظور خارج کردن اثر افزایشی وزن گیاه و کاهش خطا در تنظیم مقدار آب خاک به‌روش وزنی، از گلدان‌های فاقد گیاه که فقط حاوی خاک آزمایش و هم وزن با گلدان‌های اصلی هستند، استفاده شد تا اختلاف وزنی گلدان‌های فاقد گیاه و حاوی گیاه، مقدار اثر وزن گیاه را از آزمایش خارج کند و مقدار تنظیم رطوبت خاک گلدان‌ها بر اساس روش وزنی باشد.

غلظت ترکیبات فنلی طبق روش Isfendiyaroglu و Zeker (۲۰۰۲) تعیین شد بدین صورت که ۰/۱ گرم نمونه برگی با ازت مایع هموژن شده و ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص به هر نمونه افزوده شد. بعد از سانتریوفیوژ با ۳۰۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه، ۲۵ میکرولیتر عصاره، ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر معرف فولین شیکالتو مخلوط و بعد از ۵ دقیقه استراحت، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات‌سدیم ۲۰ درصد به آن افزوده شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷٦۵ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد.

در راستای برآورد میزان پرولین، ۰/۵ گرم برگ تازه با ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالیسیلیک ۳/۳ درصد سائیده و به‌مدت ۱۵دقیقه در ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد . ۲ میلی لیتر از عصاره حاصل با ۲ میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک خالص مخلوط گردیده و به‌مدت یک ساعت در حمام آب جوش قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به داخل مخلوط آب و یخ منتقل شدند. در این مرحله با افزودن تولوئن به هر یک از لوله‌های آزمایش، میزان جذب نور فاز فوقانی در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Paquin and Lechasseur,1979).

در این مطالعه، میزان مالون دی‌آلدئید به روش Wang و همکاران (۲۰۰۹) تعیین شد (Wang *et al.*, 2009). در این روش ۰/۲ گرم برگ تازه در ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) یک درصد ساییده شده، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریوفیوژ مجدد به

مدت ۵ دقیقه با ۸۰۰۰ دور، جذب در دو طول موج ۵۳۲ و ٦۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد.

به منظور سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز، ابتدا عصاره‌گیری از نمونه‌ها در یک میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH= ۷.۵)، حاوی ۵۰ میلی‌مولار EDTA و پلی ونیل پیرولیدین یک درصد صورت گرفت (Aebi, 1984) .

فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Aebi (۱۹۸٤) تعیین شد. به طور خلاصه، محلول واکنش حاوی بافر ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷/٤، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه بود. تجزیه آب اکسیژنه یا کاهش جذب طی مدت ٦۰ ثانیه در طول موج ۲٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و میزان فعالیت آنزیم از روی میزان تغییرات H_2O_2 تخمین زده شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز با روش Ranieri و همکاران (۲۰۰۳) تعیین شد. به‌طور خلاصه، مخلوط واکنش سنجش فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز حاوی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷/۵)، ۱۰۰ میکرولیتر آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آسکوربیک‌پراکسیداز براساس اکسیداسیون آسکوربیک اسید و کاهش در جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد.

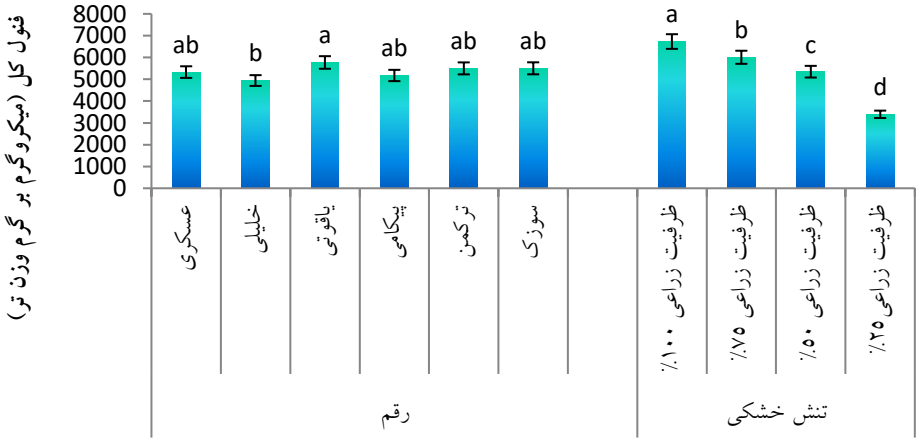
برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SAS استفاده شد. همچنین، مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها آشکار ساخت که تغییرات معنی‌دار در محتوای فنول کل در اثر سطوح تنش در سطح پنج درصد وجود دارد. بر اساس مشاهدات حاصل از این مطالعه، با افزایش شدت تنش خشکی از ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ به ظرفیت زراعی ۲۵٪، محتوای فنول کل به‌طور معنی‌داری در ارقام انگور کاهش یافت به‌گونه‌ای که فنول کل تا ۵۰ درصد کاهش یافت (شکل ۱).

در توافق با مشاهدات ما، Esmaeilizadeh و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که کاهش آب آبیاری باعث کاهش سطح ترکیبات فنلی و افزایش آب آبیاری باعث افزایش ترکیبات فنلی در ژنوتیپ‌های انگور می‌شود. علت کاهش ترکیبات فنلی تحت شرایط خشکی در این پژوهش احتمالاً ناشی از کاهش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز می‌باشد. آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در واقع آنزیم اصلی درگیر در تولید ترکیبات فنلی می‌باشد که فعالیت آن در پاسخ به تنش های غیرزیستی و به خصوص

خشکی تغییر می‌کند و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل نموده و رادیکال‌های آزاد اکسیژن را به دام می‌اندازد. کاهش فعالیت این آنزیم احتمالاً به بیان فاکتورهای رونویسی درگیر در بیان ژن کدکننده آن برمی‌گردد. در توافق با نتایج ما، Haider و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده کردند که خشکی باعث کاهش بیان فاکتورهای رونویسی می‌شود که در بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز درگیر هستند و کاهش بیان آنها متعاقباً منجر به کاهش بیان فنیل آلانین آمونیالیاز و کاهش تولید ترکیبات فنلی می‌شود.



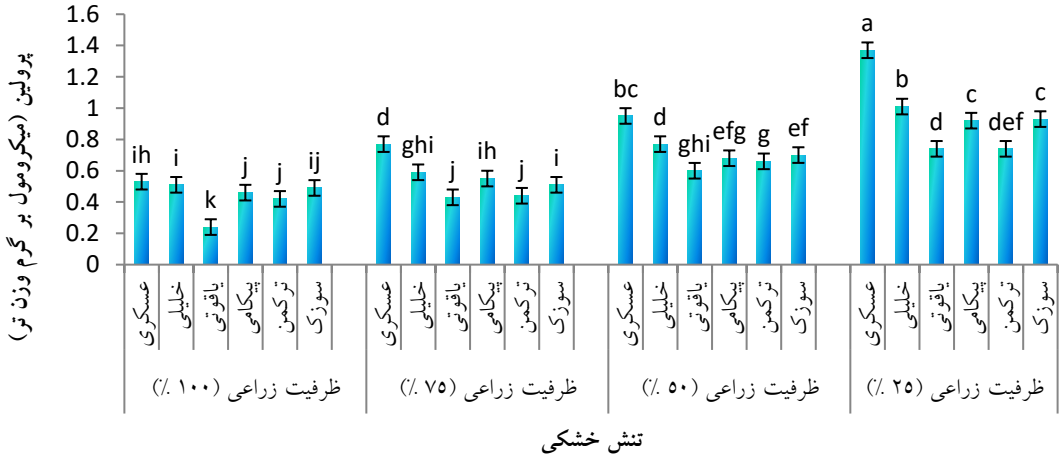
شکل ۱- محتوای فنول کل در ارقام مختلف انگور تحت شرایط آبی متفاوت

Figure 1. The total phenol in the grapes varieties under different water conditions

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در این آزمایش گویای تغییرات معنی‌دار در محتوای پرولین در اثر ارقام و سطوح تنش در سطح یک درصد و اثر متقابل تنش خشکی و رقم انگور در سطح پنج درصد بود. با افزایش سطح تنش از ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ تا ظرفیت زراعی ۲۵٪، محتوای پرولین به‌طور معنی‌داری در ارقام انگور افزایش پیدا کرد. کمترین میزان محتوای پرولین در سطح ظرفیت زراعی ۷۵٪، ظرفیت زراعی ۲۵٪ و ظرفیت زراعی ۲۵٪ به ترتیب متعلق به رقم یاقوتی بود. با این حال، بیشترین میزان محتوای پرولین در سطح ظرفیت زراعی ۷۵٪، ظرفیت زراعی ۲۵٪ و ظرفیت زراعی ۲۵٪ به ترتیب متعلق به رقم عسگری بود. به‌گونه‌ای که محتوای پرولین رقم عسگری در سطوح ظرفیت زراعی ۷۵٪، ظرفیت زراعی ۲۵٪ و ظرفیت زراعی ۲۵٪ به ترتیب ٤٥، ۸۰ و ۱۵۰ درصد نسبت به ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ (رژیم آبیاری بدون تنش خشکی) افزایش یافت (شکل ۲).

طی تنش‌های محیطی مثل خشکی، پرولین به‌عنوان یک ترکیب اسمولیتی، تعدیل اسمزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این اسمولیت به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، کاهش پتانسیل ردوکس

(اکسیداسیون و احیای سلولی) و ثبات ساختاری ریزسلولی در شرایط تنش کمک می‌کند (Beis and Patakas, 2015). طی کمبود آب و مواجه گیاه با آن، آنزیم گلوتامین کیناز جهت تبدیل گلوتامین به پرولین القا شده تا با این رویه علاوه بر حافظت از غشا و لیپید، با تشکیل پیوندهای نوع هیدروژنی با دنباله خطی پروتئین‌ها منجربه پایداری پروتئین‌ها در سلول شوند. هم‌راستا با نتایج ما، فهیم و همکاران (۱۴۰۱) و Esmaeilizadeh و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که میزان پرولین با وضعیت آبی خاک مزرعه در ژنوتیپ‌های انگور در ارتباط می‌باشد. به‌طور مشابهی، اسدی و همکاران (۱۳۹۶) نشان دادند که با افزایش شدت تنش خشکی، بر میزان پرولین افزوده می‌شود و این امر احتمالاً به دلیل افزایش بیان ژن درگیر در سنتز پرولین یعنی گلوتامین کیناز است. علیرغم اینکه رقم یاقوتی از حیث شاخص‌های تحمل به خشکی، نسبت به سایر ارقام مورد بررسی در این مطالعه برتر بود، با این حال از میزان پرولین کمتری برخوردار بود که شاید دلیل این امر را بتوان به بیان کمتر گلوتامین کیناز به واسطه مشارکت کمتر فاکتورهای رونویسی درگیر در بیان گلوتامین کیناز دانست (Bertamini *et al.*, 2006).



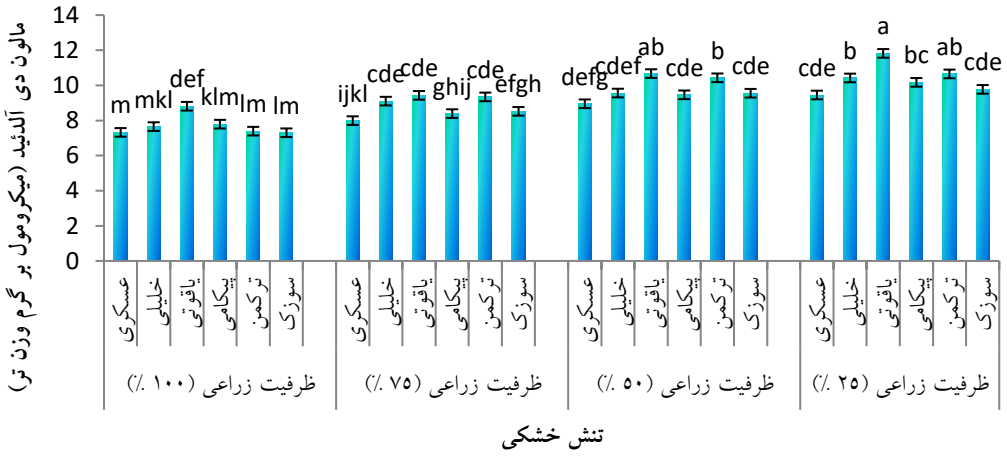
شکل ۲- محتوای پرولین در ارقام مختلف انگور تحت شرایط آبی متفاوت

Figure 2. The proline content in the grapes varieties under different water conditions

یافته‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تغییرات معنی‌دار در محتوای مالون‌دی‌آلدئید در اثر ارقام، سطوح تنش و اثر متقابل تنش خشکی و رقم انگور در سطح یک درصد وجود دارد. با افزایش سطح تنش از ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ تا ۲۵٪، محتوای مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری در ارقام انگور افزایش پیدا کرد. مقایسه بین ارقام انگور تحت تنش خشکی نشان داد که کمترین میزان مالون‌دی‌آلدئید در سطح ظرفیت زراعی ۷۵٪، ظرفیت زراعی ۲۵٪ و ظرفیت زراعی ۲۵٪ متعلق به رقم

عسگری بود. با این حال، بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید در سطح ظرفیت زراعی ۷۵٪، ظرفیت زراعی ۲۵٪ و ظرفیت زراعی ۲۵٪ متعلق به رقم یاقوتی بود. به‌طوری‌که که محتوای مالون‌دی‌آلدئید رقم یاقوتی در سطوح ظرفیت زراعی ۷۵٪، ظرفیت زراعی ۲۵٪ و ظرفیت زراعی ۲۵٪ به ترتیب ۸، ۲۰ و ۳٤ درصد نسبت به ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ افزایش یافت (شکل ۳).

مالون‌دی‌آلدئید، محصول فرعی حاصل از پراکسیداس یونی لیپیدها در غشای سلولی می‌باشد. غشاء سلولی اولین خسارات را طی خشکی دریافت می‌نماید بدین شکل که اسیدهای چرب اشباع نشده واقع در غشای سلولی به‌راحتی با گونه‌های فعال اکسیژن آزاد واکنش می‌دهند. محصول نهایی پراکسیداسیون این اسیدهای چرب توسط گونه‌های فعال اکسیژن آزاد، مالون‌دی‌آلدئید خواهد بود. بنابراین، جهت پی بردن به تحمل یا حساسیت ژنوتیپ‌های گیاهی به تنش کم آبی، اندازه گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید می‌تواند به مقدار زیادی تعیین کننده سطح مقاومت باشد (Khochert, 1987). بر مبنای تحقیقات گذشته، تجمع مالون‌دی‌آلدئید در یک رقم گویای حساسیت بالاتر آن به تنش‌های کم آبی است. بالا بودن مالون‌دی‌آلدئید در رقم یاقوتی می‌تواند به دلیل ظرفیت کمتر آن در سنتز پرولین طی شرایط خشکی باشد که این مشاهدات در پژوهش‌های اسدی و همکاران (۱۳۹٦)، سوخت‌سرایی و همکاران (۱۳۹٦) و Esmaeilizadeh و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است. با این حال، پژوهشگران دیگر نشان داده‌اند که میزان تولید بتائین‌گلایسین در رقم یاقوتی بالاست و لذا این متابولیت می‌تواند به‌عنوان جایگزین پرولین در حفاظت از سلول‌ها عمل کند (سوخت‌سرایی و همکاران، ۱۳۹٦).



شکل ۳- محتوای مالون‌دی آلدئید در ارقام مختلف انگور تحت شرایط آبی متفاوت

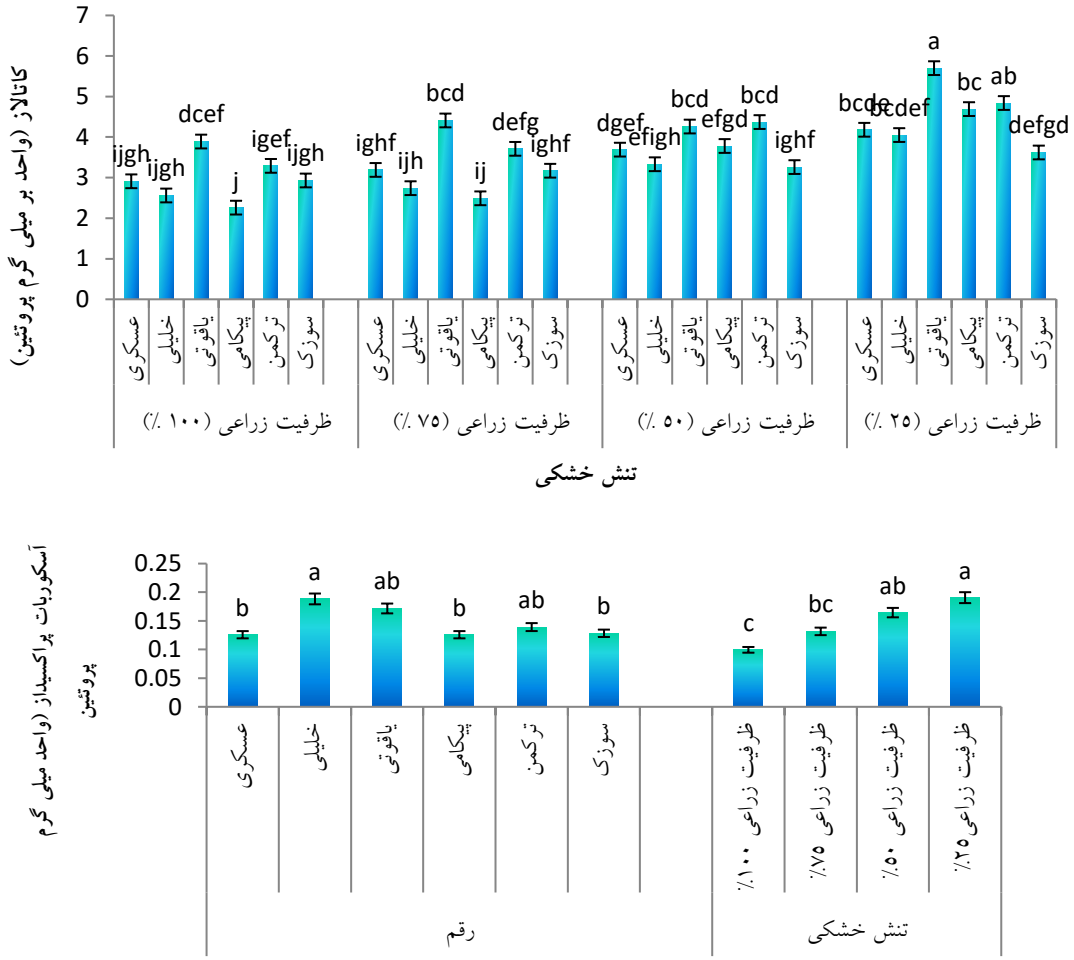
Figure 3. The MDA content in the grapes varieties under different water conditions

یافته‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تغییرات معنی‌دار در فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر ارقام و سطوح تنش در سطح یک و اثر متقابل تنش خشکی و رقم در سطح پنج درصد وجود دارد. با افزایش سطح تنش خشکی از ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ (بدون تنش) تا ظرفیت زراعی ۲۵٪ (تنش شدید)، فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور معنی‌داری در ارقام انگور افزایش یافت. کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطوح تنش ظرفیت زراعی ۷۵٪، ظرفیت زراعی ۲۵٪ و ظرفیت زراعی ۲۵٪ به‌ترتیب متعلق به ارقام پیکامی، سوزک، و سوزک بود. در مقابل، بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم یاقوتی ثبت شد به‌گونه‌ای که فعالیت آنزیم کاتالاز آن در سطوح ظرفیت زراعی ۷۵٪، ظرفیت زراعی ٪۲۵ و ظرفیت زراعی ۲۵٪ به ترتیب ۱۳، ۱۲ و ٤٦ درصد نسبت به ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ افزایش یافت (شکل ۵). همان گونه که مشاهده می‌شود فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدانت در تنش شدید خشکی، به‌طور چشم‌گیری در رقم یاقوتی افزایش یافت که نشان از پتانسیل این رقم انگور در مقابله با تولید بالای گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط شدید تنش کم آبی دارد.

تجزیه واریانس داده های این آزمایش آشکار ساخت که تغییرات معنی‌دار بر اثر ارقام و سطوح تنش در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح پنج درصد وجود دارد. یافته‌های ما نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی از ظرفیت زراعی ۱۰۰٪ به ظرفیت زراعی ۲۵٪، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به‌گونه‌ای که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تا ۵۳ درصد افزایش یافتند (شکل ٦).

تنش خشکی موجب بروز تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود و تحت چنین شرایطی، انواع اکسیژن فعال تولید می‌شوند (Mhamdi *et al*., 2010). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS ها) به دلیل تاثیر منفی بر DNA ، پروتئین‌ها، چربی‌ها و رنگدانه‌ها، صدمات سلولی زیادی را موجب می‌شوند. در مقابله با این خسارات، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و ترکیبات با وزن مولکولی پایین، این توانایی را دارند که بدون آن که خود مورد تغییر قرار گرفته و به مواد مخرب رادیکال تبدیل شوند، ROSها را مهار کنند (Mhamdi *et al*., 2010). آنزیم‌های تجزیه کننده گونه‌های فعال اکسیژن از جمله کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز از رایج‌ترین مکانیسم‌ها برای سمیت زدایی ROSهای تولید شده در طول تنش هستند (Bertamini *et al*., 2006). در توافق با یافته‌های ما، افزایش فعالیت کاتالاز و آسکوربات-پراکسیداز طی شرایط کمبود آب در انگور توسط فهیم و همکاران (١٤٠١)، اسدی و همکاران (١٣٩٦)، سوخت‌سرایی و همکاران (١٣٩٦) و Esmaeilizadeh و همکاران (٢٠١٨) گزارش شده است. تمام این محققان علت افزایش فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را به افزایش بیان ژن-

های کدکننده آن در سلول نسبت داده‌اند. با توجه به مشاهدات آنها، هر چه فعالیت این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در یک رقم بیشتر باشد، متعاقباً تنش اکسیداتیو به مقدار بیشتری کاهش می‌یابد که ضامن محافظت از سلول و فعالیت متابولیکی یا سوخت‌وسازی آن می‌باشد. افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانت کاتالاز در رقم یاقوتی گویای این موضوع است که به احتمال زیاد این رقم تحمل بیشتری به سطح بالای خشکی نسبت به سایر ارقام مورد مطالعه در این پژوهش دارد. همان گونه که قبلا ذکر شده، رقم یاقوتی از پایداری غشاء بیشتری نسبت به دیگر ارقام انگور برخودار است که علت آن می‌تواند به فعالیت بیشتر آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز مرتبط باشد.



شکل ۵- فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ارقام مختلف انگور تحت شرایط آبی متفاوت

Figure 5. The antioxidant enzyme activates in the grapes varieties under different water conditions

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های مطالعه اخیر، ژنوتیپ‌هایی که تحت تنش خشکی، دارای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و محتوای فنول کل بالاتر می‌باشند، ظرفیت بیشتری در تحمل خشکی دارند. درنتیجه، به نظر می‌رسد که رقم یاقوتی نسبت به سایر ارقام انگور، تنش خشکی را به مراتب بهتر تحمل کند و لذا برای کشت در مناطق با احتمال تنش خشکی توصیه می‌شود.

منابع

۱) اسدی و. رسولی م. غلامی م. و م، ملکی. ۱۳۹۶. بررسی برخی ویژگی‌های ریخت شناختی و فیزیولوژیک چهار رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) در شرایط تنش خشکی. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۸(۴): ۹۹۰-۹۹۷.

۲) سوخت‌سرایی، ر.، عبادی، ع.، سلامی، س.ع. و ح، لسانی. ۱۳۹۶. بررسی شاخص‌های اکسیداتیو در سه رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) در شرایط تنش خشکی. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۸: ۹۸-۸۵.

۳) فهیم، س.، قنبری، ع.ر.، ناجی، ع.م.، شکوهیان، ع.ا. و ح، ملکی لجایر. ۱۴۰۱. تاثیر تنش خشکی روی صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در برخی ارقام انگور ایرانی. فرآیند و کارکرد گیاهی، ۱۱(۴۷)، ۲۴۹-۲۶۶.

۴) محسنی‌فرد، ا.، نجاتیان، م.ع.، حسینی‌سالکده، ق.، محمدپرست، ب. و ا، مویدی‌نژاد. ۱۳۹۸. تأثیر تنش خشکی بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دو رقم انگور. فرآیند و کارکردهای گیاهی، ۳۲: ۳۷۷-۳۹۰.

۵) مهری، ح.ر.، قبادی، س.، بانی‌نسب، ب.، احسان زاده، پ و م، غلامی. ۱۳۹۳. بررسی برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک چهار رقم انگور ایرانی (*Vitis vinifera* L.) به تنش خشکی در شرایط درون شیشه‌ای. فرآیند و کارکرد گیاهی، ۱۰(۳)، ۱۱۵-۱۲۶.

6) Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 105: 121-126.
7) Altinci, N.T. and R, Cangi, R. 2019. Drought tolerance of some wine grape cultivars under *in vitro* conditions. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University*, 36: 145-151.
8) Arora, A., Sairam, R.K. and G.C, Srivastava. 2002. Oxidative stress and antioxidant system in plants. *Plant Physiology*, 82: 1227-1237.
9) Beis A. and A, Patakas. 2015. Differential physiological and biochemical responses to drought in grapevines subjected to partial root drying and deficit irrigation. *European Journal of Agronomy*, 62: 90-97.

10) Bertamini, M., Zulini, L., Muthuchelian, K. and N, Nedunchezhian. 2006. Effect of water deficit on phostosynthetic and other physiological responses in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) plants. *Photosynthetica*, 44: 151-154.
11) Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E. and R, Mittler. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Physiology Plants*, 90(5): 856-867.
12) Dacosta, M. and B, Huang. 2007. Changes in antioxidant enzyme activities and lipid pero×idation for bentgrass species in responses to drought stress. *Journal of the American Society for Horticultureal Science,* 132*: 319-326***.**
13) Esmaeilizadeh, M., Lotfi, A., Mirdehghan, S.H. and M, Shamshiri. 2018. Effects of irrigation intervals on some physiological and biochemical characteristics in four Iranian grapevine cultivars. *Crops Improvement*, 20: 3-14.
14) Esmaeilizadeh, M., Lotfi, A., Mirdehghan, S.H. and M, Shamshiri. 2018. Effects of irrigation intervals on some physiological and biochemical characteristics in four Iranian grapevine cultivars. *Crops Improvement*, 20: 3-14.
15) Haider, M.S., Zhang, C. and M.M, Kurjogi. 2017. Insights into grapevine defense response against drought as revealed by biochemical, physiological and RNA-Seq analysis. *Scientific reports*, 7: 13134.
16) Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Mahmud, J.A., Fujita, M. and V, Fotopoulos. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants* (Basel), 9(8): 681.
17) Isfendiyaroglu, M. and E, Zeker. 2002. The relation between phenolic compound and seed dormancy in Pistacia spp. In: AKB E (ed.). 11 Grema Serr Pistachios and Almond. *Chieres Optins Mediterraneenes*, 232-277.
18) Jalili marandi, R., Hassani, A., Dolati baneh, H., Azizi, H. and R, Haji taghiloo. 2011. Effect of different levels of soil moisture on the morphological and physiological characteristics of three grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Horticultural Science,* 42: 31-40.
19) Khochert, G. 1987. Carbohydrate determination by phenol- solphoric acid methods. In: Hellebust J. A. and Garigie J. S. (Eds.) pp. 95-97. Handbook of Physiological Methods, Cambridge University Press. UK.
20) Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Breusegem, F. and G, Noctor. 2010. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61(15): 4179-4220.
21) Mishra, N., Jiang, Ch., Chen, L., Paul, A., Chatterjee, A. and G, Shen. 2023. Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. *Frontiersin Plant Science,* 14: 1110622. doi: 10.3389/fpls.2023.1110622.
22) Mukarram, M., Choudhary, S., Kurjak, D., Petek, A. and M.M.A, Khan. 2021. Drought: Sensing, signalling, effects and tolerance in higher plants. *Physiology Plant*, 172: 1291–1300.
23) Paquin, R. and P, Lechasseur. 1979. Observations sure one method de dosage de la proline libber dens les extra its de plants. *Canadian Journal of Botany*, 57: 1851-1854.
24) Ranieri, A., Castagna, J., Pacini, B., Baldan, A. and G.F, Mensuali Sodi. 2003. Soldatini Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast

of sunflowers plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2529-2540.
25) Singh, S.K., Sharma, H.S., Datta, S.B. and S.P, Singh. 2000. In vitro growth and leaf compsition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. *Biologia Plantarum*, 43: 283-286.
26) Sofo A., Dichio B., xiloyannis, C. and A, Masia. 2004. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science*, 166(2): 293-302.
27) Sorori, Sh., Asgharzadeh, A., Marjani, A. and M, Samadi-Kazemi. 2022. Evaluation of Drought Stress Tolerance among some of Grape Cultivars Using Physiological and Biochemical Studies. *Journal of Horticultural Science*, 36(2): 373-388. http://doi.org/10.22067/JHS.2021.67767.1004
28) Tsugane, K., Kobayarabidopsis shi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K. and H, Kobayashi. 1999. A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell*, 11: 1195-1206.
29) Wang, F., Zeng, B., Sun, Z. and C, Zhu. 2009. Relationship between prolion and Hg^{2+} induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(4): 723-731.

Studying the effect of drought stress on enzymatic and non-enzymatic antioxidant system of some grape cultivars

Abstract

In order to investigate the effect of drought stress on the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system of six grape varieties, a factorial experiment was conducted based on a completely randomized design with three replications under greenhouse conditions. In this experiment, the treatments included six grape varieties (Asgari, Khalili, Yaquti, Pikami, Turkmen 4 and Suzak) and four levels of drought stress (normal conditions (100% of the farm capacity), low stress (75% of the farm capacity), medium stress (50% of the farm capacity) and severe stress treatment (25% of the farm capacity). The results showed that the traits of proline, malondialdehyde, catalase enzymes and ascorbate peroxidase enzymes improved with increasing stress intensity. increased significantly. On the other hand, the content of total phenol decreased significantly with the increase of the intensity of stress. Among the cultivars studied, Yaqouti cultivar is more resistant to drought than other grape cultivars in terms of the studied indices. The highest amount of catalase enzyme activity was recorded in Yaqouti cultivar, so that its catalase enzyme activity at the levels of 75, 50 and 25% of the agricultural capacity increased by 13, 12 and 46% respectively compared to the 100% agricultural capacity. According to the results of this research, it seems that Yaghuti cultivar is more drought tolerant than other cultivars. Since this toleration mechanisms located in leaf of Yaghuti, it is necessary to carry out additional tests when using as rootstock.

Keywords: proline, phenol, catalase, ascorbate-peroxidase