

مقایسه نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پرولین در تحمل به تنش خشکی در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)

حمید جباری^۱، غلامعباس اکبری^{۲*}، نیر اعظم خوش خلق سیما^۳، ایرج اله‌دادی^۴، امیر حسین شیرانی‌راد^۴، سیدعلی طباطبایی^۵ و علی حامد^۶

^۱ استادیار پژوهش بخش تحقیقات دانه‌های روغنی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

^۲ دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

^۳ استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

^۴ استاد پژوهش بخش تحقیقات دانه‌های روغنی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

^۵ استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی یزد

^۶ کارشناس ارشد زراعت، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

پست الکترونیک نویسنده مسئول ghakbari@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۸/۰۳)

چکیده

به منظور مقایسه نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پرولین در تحمل به تنش خشکی در گیاه کلزا، آزمایشی در سال زراعی ۱۳۹۱-۱۳۹۰ در مزرعه مرکز تحقیقات و منابع طبیعی یزد انجام شد. در این بررسی سه رقم کلزای تجاری پاییزه **GKH2005**، **Opera** و **Okapi** از نظر واکنش به تیمارهای آبیاری شامل بدون تنش (شاهد) و قطع آبیاری از مراحل ساقه‌دهی، گل‌دهی و خورجین‌دهی به بعد در چهار آزمایش جداگانه، هر یک در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی ارزیابی شدند. نتایج آزمایش نشان داد که تجمع پرولین، میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و شاخص پراکسیداسیون چربی (غلظت مالون‌دی‌آلدئید) در تیمارهای تنش خشکی بالاتر از شرایط بدون تنش بود، اما این مقدار در هر رقم متفاوت بود. با اعمال تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در رقم **GKH2005** بیشتر از دو رقم دیگر بود و بدین واسطه کمترین میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید نیز در همین رقم مشاهده شد. در بین ارقام، رقم **GKH2005** بیشترین عملکرد دانه را در تیمارهای بدون تنش، قطع آبیاری از ساقه‌دهی، گل‌دهی و خورجین‌دهی به ترتیب به میزان ۳۱۱۰، ۱۴۵۰، ۱۷۷۳ و ۲۵۱۰ کیلوگرم در هکتار تولید نمود. نتایج نشان داد که نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش تحمل به خشکی بسیار پررنگ‌تر از نقش پرولین بود. هم‌چنین یک سیستم آنتی‌اکسیداتیو کارآمد به همراه تولید مالون‌دی‌آلدئید کمتر و تولید تعداد خورجین زیاد در شاخه فرعی بیشترین نقش را در افزایش عملکرد دانه گیاه کلزا در شرایط تنش خشکی داشت.

کلید واژه‌ها: پراکسیداز، تعداد خورجین در شاخه فرعی، عملکرد دانه، کاتالاز، مالون‌دی‌آلدئید

مقدمه

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی است که به طور میانگین سبب کاهش ۵۰ درصدی عملکرد دانه گیاهان زراعی در جهان می‌شود (حیدری و کرمی^۱، ۲۰۱۴).

کلزا با دارا بودن ۴۴-۴۰ درصد روغن یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی محسوب شده و پس از سویا و نخل روغنی سومین گیاه روغنی یکساله جهان است که به خاطر روغن خوراکی آن کشت می‌شود (فائو^۲، ۲۰۱۳). در چند سال گذشته به دلیل اهمیت بسیار بالای روغن خوراکی و کنجاله برای خوراک دام، سطح زیر کشت این گیاه روغنی به طور چشمگیری افزایش پیدا کرده است، درحالی‌که در سال‌های اخیر به دلیل کمبود نزولات جوی و تنش خشکی سطح زیر کشت کلزا با کاهش مواجه گردیده است (مقدم و پورداد^۳، ۲۰۱۱). بنابراین یکی از عوامل مهم که توسعه و کشت موفقیت آمیز کلزا را در کشور به مخاطره می‌اندازد تنش خشکی است (رشیدی^۴ و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین با توجه به اینکه بخش وسیعی از زمین‌های زیر کشت ایران در شرایط آب و هوایی نیمه خشک واقع هستند، لزوم شناسایی ارقام مقاوم به خشکی و همچنین سازوکارهای مناسب برای انتخاب این ارقام ضروری است (جونگرونگ کلانگ^۵ و همکاران، ۲۰۱۳).

اسید آمینه پرولین یکی از مهم‌ترین اسمولیت‌های عالی است که در گیاهان در واکنش به عوامل نامساعد محیطی تجمع می‌یابد (مهajan^۶ و توتجا، ۲۰۰۵). پرولین به عنوان یک محافظت کننده اسمزی می‌تواند از ساختار پروتئین‌ها محافظت کند و بر طبق نتایج گزارش شده تنش خشکی به طور معنی‌داری سبب افزایش تجمع پرولین می‌شود (بی‌تس^۷ و همکاران، ۱۹۷۳؛ رن^۸ و همکاران، ۲۰۰۶). تجمع پرولین در شرایط پر تنش

سبب حفظ وضعیت آبی گیاه شده و به عنوان یک محافظت کننده اسمزی باعث پایداری غشاء سلولی نیز می‌گردد (بهاردواج و یاداو^۹، ۲۰۱۲). افزایش در غلظت محتوی پرولین یکی از مهم‌ترین سازوکارهای تحمل به کم‌آبی در کلزا بشمار می‌رود و اعمال تنش اسمزی در سطح ۱/۵- مگاپاسکال سبب افزایش معنی‌دار محتوی پرولین در ریشه و ساقه ارقام کلزا شده است (امیدی^{۱۰}، ۲۰۱۰). علاوه بر این گیاهان به منظور مقابله با خسارات گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش خشکی، نیاز به یک سیستم آنتی‌اکسیدان فعال دارند (استپین و کلوبوس^{۱۱}، ۲۰۰۵). بسیاری از مطالعات نشان داده است که یک سیستم آنتی‌اکسیداتیو کارآمد به همراه افزایش تجمع پرولین در گیاه می‌تواند نقش مهمی در تحمل به خشکی ایفا کند (ژی‌آئو^{۱۲} و همکاران، ۲۰۰۸؛ ژو^{۱۳} و همکاران، ۲۰۰۸). فعالیت بسیاری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در واکنش به تنش خشکی افزایش می‌یابد (گو^{۱۴} و همکاران، ۲۰۰۶). هرچند واکنش آنزیم کاتالاز در شرایط تنش خشکی متغیر بوده و می‌تواند افزایشی، کاهش یا بدون تغییر باشد (زانگ و کیرخام^{۱۵}، ۱۹۹۶). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ذکر شده به همراه گلوکاتاتیون پراکسیداز در برگ‌های گیاه کلزا در شرایط تنش خشکی به ثبت رسیده است (توحیدی مقدم و همکاران^{۱۶}، ۲۰۰۹). افزایش در غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از مهم‌ترین سازوکارهای تحمل به خشکی در کلزا بشمار می‌رود (امیدی^{۱۷}، ۲۰۱۰). البته میزان افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ارقام متحمل عموماً بیشتر بوده و ارتباط بسیار زیادی بین تحمل به خشکی با فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه کلزا و سایر گیاهان وجود دارد (فاروغ و همکاران^{۱۸}، ۲۰۰۹؛ توحیدی - مقدم و همکاران، ۲۰۰۹).

9- Bhardwaj and Yadav

10- Omidi

11- Stepien and Klobus

12- Xiao

13- Xu

14- Guo

15- Zhang and Kirkham

16- Tohidi-Moghaddam

17- Omidi

18- Farooq

1- Heidari and Karami

2- FAO

3- Moghaddam and Pourdard

4- Rashidi

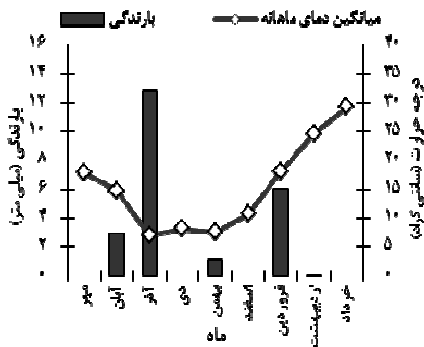
5- Jongrungrklang

6- Mahajan and Tuteja

7- Bates

8- Ren

با موقعیت طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۱۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۵۵ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۲۳۶ متر از سطح دریا انجام شد. یزد با متوسط بارندگی سالانه ۶۵ میلی‌متر، میانگین دمای سالانه ۱۸/۹ سانتی‌گراد، با اقلیمی خشک در فلات مرکزی ایران واقع شده است (بی‌نام، ۱۳۹۰). میزان بارندگی و تغییرات میانگین دمای ماهانه در طول دوره رشد در شکل ۱ نشان داده شده است. همچنین نتایج آزمون خاک محل آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است.



شکل ۱- میزان بارندگی و تغییرات میانگین دمای ماهانه در طول دوره رشد در منطقه یزد (۹۱-۱۳۹۰)

این پژوهش به صورت چهار آزمایش جداگانه هر کدام در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد و در پایان، تجزیه داده‌ها به صورت چند مکان در یک سال از طریق تجزیه واریانس مرکب انجام گرفت. آزمایش اول، شاهد (آبیاری به صورت نرمال براساس ۸۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A در کلیه مراحل رشدی گیاه)، آزمایش دوم، تنش خشکی به صورت قطع آبیاری از مرحله ساقه‌دهی تا رسیدگی فیزیولوژی، آزمایش سوم، تنش خشکی به صورت قطع آبیاری از مرحله گل‌دهی تا رسیدگی فیزیولوژی و آزمایش چهارم، تنش خشکی به صورت قطع آبیاری از مرحله خورجین‌دهی تا پایان رسیدگی فیزیولوژی انجام شد. ویژگی‌های ارقام مورد بررسی در جدول ۲ ارائه شده است.

مالون‌دی‌آلدئید محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدهاست و سطوح پراکسیداسیون لیپیدها در شرایط تنش به عنوان یک شاخص مهم به منظور ارزیابی میزان خسارت رادیکال‌های آزاد به غشای سلولی شناخته شده است (بهاردواج و یاداو^۱، ۲۰۱۲). میزان مالون‌دی‌آلدئید در شرایط تنش خشکی افزایش می‌یابد؛ اما میزان افزایش در ارقام متحمل بسیار کمتر از ارقام حساس است (بهاردواج و یاداو، ۲۰۱۲). حمزه‌ای و سلطانی^۲ (۲۰۱۲) کاهش محسوس عملکرد دانه کلزا را در رقم لیکورد از ۱۶۳۸ گرم در متر مربع در تیمار آبیاری با ۴۵۰۰ متر مکعب در هکتار به ۸۸۴ گرم در متر مربع در میزان آبیاری ۳۰۰۰ متر مکعب در هکتار گزارش کرده‌اند. کاهش عملکرد دانه کلزا در شرایط تنش خشکی توسط بسیاری از محققین گزارش شده است (فرجی و همکاران^۳، ۲۰۰۹؛ توحیدی مقدم و همکاران^۴، ۲۰۱۱). با این حال، انجالبرت^۵ و همکاران (۲۰۱۳) تنوع فنوتیپی و ژنتیکی زیادی برای عملکرد دانه گونه‌های جنس براسیکا در شرایط تنش خشکی گزارش کرده‌اند.

با توجه به اینکه خشکی مهم‌ترین و رایج‌ترین تنش محیطی در ایران است و دوره رشد زایشی کلزا در اکثر مناطق ایران با تنش خشکی مواجه می‌گردد، لزوم انجام آزمایش‌هایی به منظور بررسی واکنش ارقام مختلف کلزا از نظر سازگاری و تحمل به خشکی می‌تواند مفید واقع شود. در این تحقیق سعی شده است تا ارتباط بین تجمع پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز و کاتالاز با تولید مالون‌دی‌آلدئید و میزان تحمل به تنش خشکی در سه رقم کلزای پائیزه با تأکید بر عملکرد دانه و اجزای عملکرد تعیین گردد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰ در مزرعه پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی یزد

- 1- Bhardwaj and Yadav
- 2- Hamzei and Soltani
- 3- Faraji
- 4- Tohidi-Moghaddam
- 5- Enjalbert

جباری و همکاران: مقایسه نقش آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پرولین در تحمل به تنش خشکی

جدول ۱- نتایج آزمون فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

عمق نمونه برداری (cm)	EC (dS/m)	pH	ازت کل (%)	فسفر قابل جذب (ppm)	پتاسیم قابل جذب (ppm)	شن (%)	سیلت (%)	رس (%)	بافت خاک	جرم مخصوص ظاهری (g/cm ³)	FC (%)	PWP (%)
۳۰-۰	۳/۸۸	۷/۸	۰/۰۱۴	۵۰۰۲	۱۰۷/۹	۶۴/۲	۱۰/۸	۲۵	لوم رسی-شنی	۱/۳۹	۱۷/۱	۷/۹

جدول ۲- نام و مشخصات ژنوتیپ‌های کلزا مورد استفاده در آزمایش

ردیف	ژنوتیپ*	مبدأ	تیپ رشدی	تعداد رور تا گل‌دهی	تعداد رور تا خورجین‌دهی	طول دوره رشد
۱	GKH2005	مجارستان	زمستانه	۱۵۱	۱۶۱	۲۰۰
۲	Opera	سوئد	زمستانه	۱۵۳	۱۶۲	۲۰۱
۳	Okapi	فرانسه	زمستانه	۱۵۵	۱۶۵	۲۰۴

* در بین سه ژنوتیپ مورد بررسی، Opera و Okapi ارقام شاهد (ارقام مورد کشت در منطقه یزد) هستند.

بذرکاری ۱۰۰ بوته در متر مربع و پس از زمستان‌گذرانی (مرحله رزت) تا هنگام برداشت به ۸۵ بوته در متر مربع تقلیل یافت. به دلیل شوری خاک و تجمع املاح در محل داغاب، کشت در کف جوی انجام شد. بعد از کاشت، اولین آبیاری و چهار روز پس از کاشت نیز دومین آبیاری به منظور سبزشدن مناسب بذور انجام شد. به دلیل خشکی و شوری خاک منطقه تراکم علف-های هرز قابل توجه نبود و تنها علف هرز غالب منطقه خارشتر (*Alhagi maurorum*) بود که به صورت مکانیکی کنترل شد. همچنین برای مبارزه با آفت شته مومی (*Brevicoryne brassicae*) از سم متاسیستوکس در دو مرتبه (اوایل گل‌دهی و خورجین‌دهی) به میزان ۱/۵ لیتر در هکتار استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی، نمونه‌برداری‌ها در تیمارهای شاهد، قطع آبیاری از ساقه‌دهی، گلدهی و خورجین‌دهی به ترتیب طی شش، سه، سه و دو مرحله (با فواصل هشت روزه بین هر مرحله نمونه‌گیری) انجام شد که براساس روزهای پس از سبزشدن به همراه مقادیر درصد رطوبت وزنی خاک در هر مرحله در شکل ۲ بیان شده است. لازم به ذکر است که اولین نمونه‌برداری در هر تیمار یک هفته پس از اعمال قطع آبیاری (تنش خشکی) انجام گرفت. به منظور محاسبه

کودهای لازم با توجه به نتایج تجزیه خاک به زمین آزمایش اضافه گردید. به منظور آماده سازی زمین، قبل از اجرای آزمایش، زمین مورد نظر آبیاری گردید و پس از گاورو شدن، به وسیله گاو آهن برگردان دار شخم زده شد. سپس جهت خرد شدن کلوخه‌ها و همچنین یکنواخت شدن وضعیت خاک مزرعه، زمین مذکور دیسک و ماله زده شد. سپس اقدام به نمونه‌گیری از خاک مزرعه در عمق ۰-۳۰ سانتی‌متر گردید. براساس نتایج تجزیه خاک و توصیه کودی، اقدام به کودپاشی (کود اوره ۲۵۰ کیلوگرم در هکتار در سه نوبت: ۱۰۰ کیلوگرم به صورت پایه، ۱۰۰ کیلوگرم در مرحله ساقه‌دهی و ۵۰ کیلوگرم در مرحله شروع گل‌دهی، کود فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم هر کدام ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار به صورت پایه) شد و به وسیله دیسک سبک، کود با خاک مخلوط گردید. کاشت به صورت هیرم‌کاری و در تاریخ سوم آبان ماه انجام شد. هر کرت آزمایشی شامل شش خط به طول پنج متر، فاصله خطوط ۳۰ سانتی‌متر از هم بود که دو خط کناری به عنوان حاشیه در نظر گرفته شدند. همچنین علف‌کش ترفلان به میزان ۲/۵ لیتر در هکتار به طور یکنواخت در سطح مزرعه پخش شد و به وسیله دیسک سبک، کود و علف‌کش با خاک مخلوط گردیدند. تراکم بوته‌ها در زمان

پایان برای به دست آوردن درصد رطوبت وزنی خاک از رابطه ۱ استفاده شد:

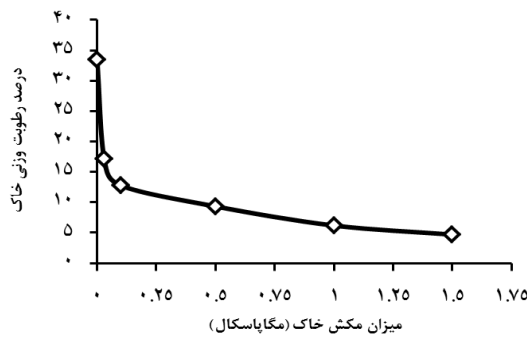
$$(1) \quad \frac{\text{وزن خاک خشک} - \text{وزن خاک مرطوب}}{\text{وزن خاک مرطوب}} \times 100 = \text{درصد رطوبت وزنی خاک}$$

همچنین پس از تعیین درصد رطوبت وزنی، با استفاده از دستگاه صفحه فشاری منحنی رطوبت خاک تهیه و رسم شد (شکل ۳).

رطوبت وزنی خاک، نمونه‌برداری از هر تیمار آبیاری به طور جداگانه در سه تکرار با استفاده از دستگاه اوگر از عمق ۴۰ سانتی‌متری خاک انجام شد و با توزین نمونه‌ها وزن خاک مرطوب بدست آمد. سپس نمونه‌ها در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا خاک کاملاً خشک شود. پس از توزین مجدد نمونه‌ها وزن خاک خشک نیز بدست آمد. در



شکل ۲- درصد رطوبت وزنی در عمق ۴۰ سانتی‌متری خاک در مراحل نمونه‌برداری صفات فیزیولوژی در تیمارهای آبیاری.



شکل ۳- منحنی رطوبت خاک مزرعه محل آزمایش

کرج صورت گرفت. بر این اساس اندازه‌گیری میزان پرولین براساس روش بیتس^۱ و همکاران (۱۹۷۳) با کمی اصلاحات انجام شد. در این روش ابتدا ۰/۱ گرم ماده تر گیاهی وزن و ضمن سائیدن داخل هاون چینی به تدریج ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد به آن اضافه شد. محلول حاصل به لوله آزمایش دربردار منتقل شد و پس از قرار گرفتن درون حمام آب یخ به مدت ۱۰ دقیقه، با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه

به منظور ارزیابی صفات پرولین، آنزیم‌های آنتی اکسیدان و شاخص پراکسیداسیون لیپید (مالون‌دی‌آلدئید) در هر مرحله نمونه‌برداری براساس تعداد روز پس از سبز شدن (شکل ۲)، حدود ۵ برگ جوان و توسعه یافته از بالای پوشش گیاهی در هر تکرار جدا گردید و سریعاً توسط ازت مایع فریز و به فریزر ۸۰- سانتی‌گراد منتقل شد. پس از آن اندازه‌گیری صفات ذکر شده در طی تابستان و پائیز ۱۳۹۱ در آزمایشگاه فیزیولوژی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

1- Bates

گایاکول ۱۰ میلی‌مولار، ۳۴ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار (محلول در بافر فسفات پتاسیم) و ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت سه دقیقه اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی معادل $26/6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه و برحسب واحد میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز به روش ابی^۳ (۱۹۸۴) با بررسی کاهش مقدار پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر در مدت زمان سه دقیقه انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۵۰۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل، ۲۵۰ میکرولیتر بافر قرائت فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، ۲۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار (محلول در بافر فسفات پتاسیم) و ۲۵ تا ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در یک حجم مخلوط ۱۰۲۵ تا ۱۰۳۰ میکرولیتر بود. در نهایت میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از ضریب خاموشی معادل $39/4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه و بر حسب واحد میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

به منظور ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی به وسیله تست تیوباربیتوریک اسید^۴، از سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از روش هیث و پاکر^۵ (۱۹۶۸) استفاده شد. بدین منظور ۰/۲ گرم از بافت برگ در دو میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید^۶ ۰/۱ درصد سائیده شد و محلول همگن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن به یک میلی‌لیتر از مایع رویی دو میلی‌لیتر از محلول تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید بود، اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (بن ماری) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از آن بلافاصله در یخ به مدت ۳۰ دقیقه سرد گردید. مجدداً ۱/۵ میلی‌لیتر

به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. دو میلی‌لیتر از روشناور عصاره حاصل برداشته در لوله آزمایش ریخته و سپس دو میلی‌لیتر معرف اسید ناین هایدین و دو میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن افزوده و سپس خوب مخلوط گردید (به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد). در مرحله بعد نمونه‌ها در حمام آب گرم (بن ماری) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند تا رنگ آجری تولید شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله درون حمام آب یخ قرار داده شدند تا کاملاً سرد شده و واکنش متوقف گردد. بعد از سرد شدن، در هر لوله آزمایش چهار میلی‌لیتر تولون اضافه شد و نمونه‌ها بلافاصله به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شده تا دو فاز گردند. سپس نمونه‌ها در دمای محیط قرار گرفتند تا با دمای محیط هم دما شوند. از فاز بالایی که حاوی کمپلکس رنگی بود، برای اندازه‌گیری میزان پرولین استفاده شد و میزان جذب نور آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Cary 300 قرائت شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز برگ با استفاده از عصاره آنزیمی صورت گرفت. به منظور استخراج عصاره آنزیمی، به ۰/۳ گرم از بافت تر گیاهی، سه میلی‌لیتر بافر استخراج فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ و سدیم متابای سولفیت یک میلی‌مولار حاوی ۳۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل پیرولیدین^۱ اضافه شد و به مدت چهار دقیقه ورتکس شد. تمام مراحل استخراج در یخ و در تاریکی انجام گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سنجش‌های آنزیمی در مایع رویی با استفاده از اسپکتروفوتومتر مدل Cary 300 انجام پذیرفت.

فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش چانس و مهلی^۲ (۱۹۹۵) اندازه‌گیری شد. در این روش ۱۰۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۴۶۶ میکرولیتر از آب مقطر استریل به همراه ۲۵۰ میکرولیتر بافر قرائت فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، ۲۵۰ میکرولیتر

3- Aebi

4- Thiobarbituric acid (TBA)

5- Heath and Packer

6- Trichloro acetic acid (TCA)

1- Polyvinylpyrrolidone (PVP)

2- Chance and Maehly

معنی دار^۳ در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. ضرایب همبستگی ساده بین عملکرد و اجزاء عملکرد نیز با نرم افزار آماری SAS (ver 9.1) محاسبه شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

روند تغییرات غلظت پرولین برگ در شکل ۴ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که به طور کلی به موازات قطع آبیاری از مراحل مختلف نموی، تجمع پرولین افزایش چشمگیری یافت و در شرایط شاهد و تیمار قطع آبیاری از گل‌دهی به ترتیب پایین‌ترین و بالاترین غلظت پرولین مشاهده شد (شکل ۴). با این وجود، واکنش سه رقم کلزا از نظر تجمع پرولین در شرایط تنش کم‌آبی کاملاً متفاوت بود (شکل ۴). بر این اساس در شرایط قطع آبیاری از ساقه‌دهی، میزان پرولین در هر سه رقم با اعمال قطع آبیاری در ۱۵۲ روز پس از سبز شدن به مقادیر مختلفی افزایش یافت و پس از رسیدن به حداکثر میزان تجمع در ۱۶۰ روز پس از سبز شدن در دو رقم Opera و GKH2005 روند نزولی پیدا کرد، درحالی‌که در رقم Okapi ثابت باقی ماند (شکل ۴). در تیمار قطع آبیاری از ساقه‌دهی بیشترین تجمع پرولین در ارقام Okapi و GKH2005 و به میزان ۱۸/۷ میکروگرم در گرم وزن تر در ۱۶۰ روز پس از سبز شدن مشاهده شد. به موازات قطع آبیاری از مراحل گل‌دهی و خورجین‌دهی، تجمع میزان پرولین در هر سه رقم با یک روند افزایشی مشاهده شد، اما میزان شیب افزایش در رقم GKH2005 بیشتر و سریع‌تر بود (شکل ۴). به عنوان مثال در تیمار قطع آبیاری از خورجین‌دهی، رقم GKH2005 در هر دو مرحله نمونه‌برداری (۱۸۴ و ۱۹۲ روز پس از سبز شدن) به صورت مشهودی مقادیر بالاتری از اسید آمینه پرولین را در مقایسه با دو رقم دیگر تجمع داد، به طوری‌که در ۱۹۲ روز پس از سبز شدن، یعنی ۱۶ روز پس از اعمال قطع آبیاری، غلظت اسید آمینه پرولین در ارقام GKH2005، Opera و Okapi به ترتیب ۱۸/۱، ۶/۲ و ۵/۹ میکروگرم بر گرم وزن تر بود (شکل ۴). به طور

از مایع رویی درون لوله آزمایش جدید ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت میزان جذب مایع رویی در سه طول موج ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Cary 300 قرائت شد و غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب تصحیح $10^6 \times 15700$ محاسبه و بر اساس واحد نانومول بر سانتی‌متر بیان گردید.

با ورود بوته‌ها به مرحله رسیدگی فیزیولوژیک، تعداد کل خورجین‌های پر در ساقه اصلی و شاخه فرعی به طور مجزا در ۷ بوته انتخاب شده به صورت تصادفی به دست آمد. با احتساب مجموع خورجین‌های دارای دانه و باز نشده، تعداد دانه در ۳۰ خورجین ساقه اصلی در بوته‌های منتخب برای تعیین تعداد دانه در خورجین ساقه اصلی و جهت تعیین تعداد دانه در خورجین شاخه فرعی نیز، تعداد ۳۰ عدد خورجین از شاخه‌های فرعی به‌طور تصادفی شمارش شدند. برای اندازه‌گیری وزن ۱۰۰۰ دانه، پنج تکرار صدتایی از هر تیمار جدا و پس از توزین با ترازوی دقیق میانگین آن‌ها به عنوان وزن هزار دانه هر کرت بر حسب گرم تعیین گردید. به منظور تعیین عملکرد دانه از روش فرجی و همکاران^۱ (۲۰۰۹)، استفاده شد و دو روز پس از رسیدگی فیزیولوژی در هر کرت، خطوط دوم، سوم، چهارم و پنجم با رعایت حاشیه برداشت شدند و پس از خشک شدن در مزرعه با کمباین مخصوص آزمایش‌های کلزا کوبیده شدند. میزان روغن دانه‌ها با استفاده از دستگاه سوکسله استخراج گردید و از حاصل ضرب میزان روغن دانه در عملکرد دانه، عملکرد روغن در هکتار محاسبه شد. با توجه به انجام دادن چهار آزمایش (شرایط) جداگانه، پس از اطمینان از مفروضات و یکنواختی اشتباهات آزمایشی توسط آزمون بارتلت، هر آزمایش به عنوان یک مکان (تیمار آبیاری) در نظر گرفته شد و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (ver 9.1) تجزیه واریانس مرکب شدند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از رویه برش‌دهی^۲ و به روش آزمون حداقل اختلاف

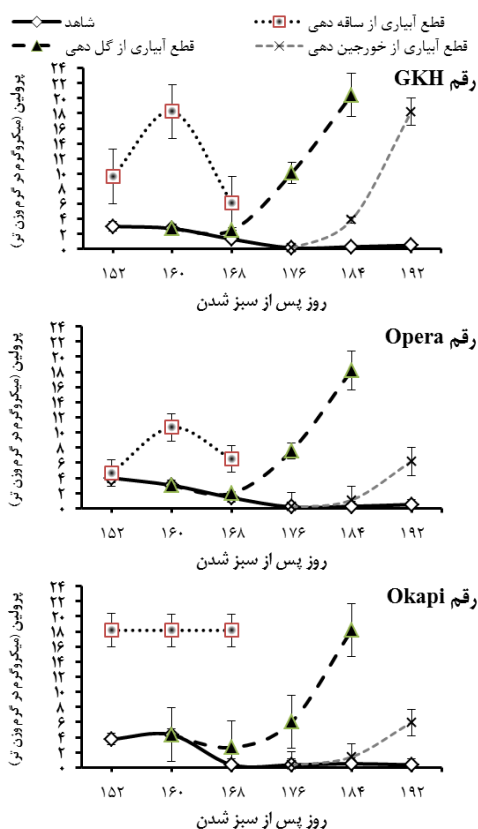
1- Faraji
2- Slicing

3- LSD

حساس به خشکی است و این امر با افزایش تحمل به خشکی و سازگاری گیاه با شرایط خشک ارتباط نزدیکی دارد. روند تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان داد که به موازات قطع آبیاری از مراحل نموی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش چشمگیری یافت و در شرایط شاهد و قطع آبیاری از ساقه‌دهی به ترتیب پایین‌ترین و بالاترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مشاهده شد (شکل ۵). با این وجود، واکنش سه رقم کلزا از نظر فعالیت این آنزیم در شرایط تنش خشکی کاملاً متفاوت بود (شکل ۵). مقایسه میزان افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در سه رقم کلزا در تیمارهای قطع آبیاری نشان داد که بیشترین میزان فعالیت در رقم GKH2005 و پس از آن در رقم Opera مشاهده شد، درحالی‌که در رقم Okapi افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش خشکی بخصوص در قطع آبیاری از خورجین‌دهی چشمگیر نبود (شکل ۵). به موازات قطع آبیاری از مراحل گل‌دهی و خورجین‌دهی، فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر سه رقم افزایش یافت، اما این میزان در رقم GKH2005 بسیار بیشتر بود (شکل ۵). افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از مهم‌ترین مکانیسم‌های تحمل به خشکی در کلزا بشمار می‌رود (امیدی^۴، ۲۰۱۰). میزان افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ارقام متحمل به تنش عموماً بیشتر بوده و ارتباط بسیار زیادی بین تحمل به خشکی با فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه کلزا و سایر گیاهان وجود دارد (فاروغ^۵ و همکاران، ۲۰۰۹؛ توحیدی-مقدم^۶ و همکاران، ۲۰۰۹).

روند تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در شکل ۶ نمایش داده شده است. نتایج حاصل نشان داد که واکنش ارقام به تیمارهای قطع آبیاری از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز کاملاً متفاوت بود (شکل ۶).

گسترده‌ای ثابت شده است که گیاهان انواع مختلفی از مواد محلول سازگار نظیر پرولین را به عنوان یک مکانیسم سازگاری در تحمل به خشکی تجمع می‌دهند (اشرف و فولاد^۱، ۲۰۰۷). پرولین سبب استواری ساختار سه بعدی پروتئین‌ها و محافظت از سیستم فتوسنتزی و غشاء سلولی (وربراگن و هرمانس^۲، ۲۰۰۸)، تنظیم اسمزی سلولی (بهاردواج و یاداو^۳، ۲۰۱۲) و جاروبگری



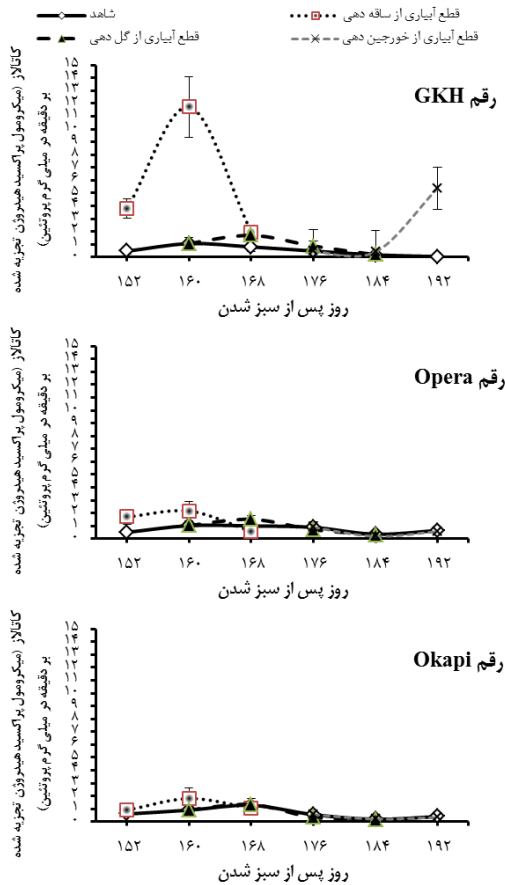
شکل ۴- روند تغییرات پرولین برگ در طی مراحل نمونه‌گیری براساس روز پس از سبز شدن در سه رقم کلزا و سطوح مختلف آبیاری (خطوط رسم شده در بالای نقاط، خطای استاندارد محاسبه شده برای داده‌ها را نشان می‌دهد).

گونه‌های فعال اکسیژن (اشرف و فولاد، ۲۰۰۷) در واکنش به تنش‌های غیر زیستی می‌گردد. بهاردواج و یاداو (۲۰۱۲) نیز بیان داشتند که افزایش تجمع پرولین در ارقام متحمل به خشکی بسیار چشمگیرتر از ارقام

4- Omidi
5- Farooq
6- Tohidi-Moghaddam

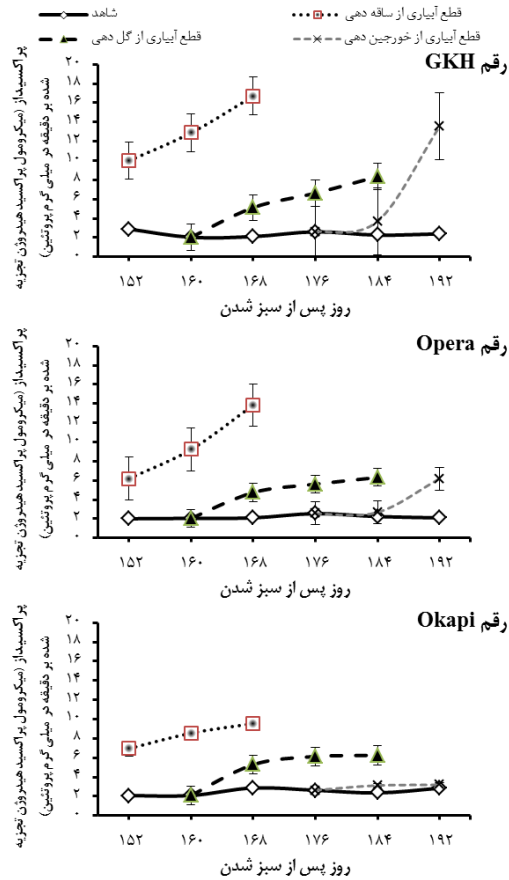
1- Ashraf and Foolad
2- Verbruggen and Hermans
3- Bhardwaj and Yadav

آنزیم کاتالاز به ترتیب در تیمار شاهد و قطع آبیاری از ساقه‌دهی مشاهده شد (شکل ۶). نتایج این بخش از آزمایش نشان‌دهنده تغییرات کمتر آنزیم کاتالاز در شرایط تنش خشکی در مقایسه با آنزیم پراکسیداز بود (شکل‌های ۵ و ۶).



شکل ۶- روند تغییرات آنزیم کاتالاز در طی مراحل نمونه‌گیری براساس روز پس از سبز شدن در سه رقم کلزا و سطوح مختلف آبیاری (خطوط رسم شده در بالای نقاط، خطای استاندارد محاسبه شده برای داده‌ها را نشان می‌دهد).

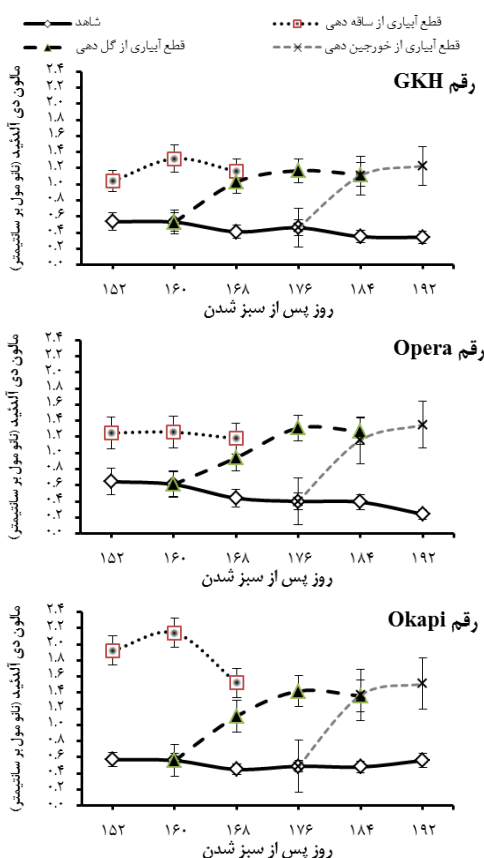
در شرایط قطع آبیاری از گل‌دهی، فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام GKH2005 و Opera در مقایسه با شاهد، ۱۱۳ و ۵۰ درصد افزایش یافت اما در رقم Okapi فعالیت آنزیم کاتالاز بدون تغییر باقی ماند (شکل ۶). همچنین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم GKH2005 بواسطه قطع آبیاری از خورجین‌دهی



شکل ۵- روند تغییرات آنزیم پراکسیداز در طی مراحل نمونه‌گیری براساس روز پس از سبز شدن در سه رقم کلزا و سطوح مختلف آبیاری (خطوط رسم شده در بالای نقاط، خطای استاندارد محاسبه شده برای داده‌ها را نشان می‌دهد).

امیدی (۲۰۱۰) در بررسی تغییرات محتوی پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در دو رقم کلزا در شرایط تنش کم‌آبی گزارش کرد که اعمال تنش اسمزی در سطح ۱/۵- مگاپاسکال سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در ریشه و ساقه شد. در بین ارقام مورد بررسی، تنها در رقم GKH2005 با اعمال قطع آبیاری از مراحل ساقه‌دهی و خورجین‌دهی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش چشمگیری یافت (شکل ۶). در مقابل فعالیت آنزیم کاتالاز در دو رقم Opera و Okapi با اعمال قطع آبیاری از مراحل نمودی تفاوت چندانی پیدا نکرد و تنها به موازات قطع آبیاری از ساقه‌دهی مقداری افزایش یافت (شکل ۶). براین اساس پایین‌ترین و بالاترین فعالیت

باشد (شکل‌های ۴، ۵ و ۶). این در حالی است که بالا بودن غلظت مالون‌دی‌آلدئید در رقم Okapi احتمالاً به واسطه فعالیت اندک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر پراکسیداز و کاتالاز و تجمع کمتر پرولین در شرایط قطع آبیاری و احتمالاً افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن بر اثر القای تنش اکسیداتیو بوده است (شکل‌های ۴، ۵ و ۶). بهار دواج و یاداو (۲۰۱۲) گزارش کردند که میزان افزایش مالون‌دی‌آلدئید در شرایط تنش خشکی در ارقام متحمل کمتر از ارقام حساس بود. در این آزمایش، نتایج



شکل ۷- روند تغییرات مالون‌دی‌آلدئید در طی مراحل نمونه‌گیری براساس روز پس از سبزش شدن در سه رقم کلزا و سطوح مختلف آبیاری (خطوط رسم شده در بالای نقاط، خطای استاندارد محاسبه شده برای داده‌ها را نشان می‌دهد).

روند تغییرات مالون‌دی‌آلدئید در شرایط تنش خشکی نشان داد که نحوه تغییرات این نشانگر زیستی به سه مرحله آغازین تولید، پخش (افزایش تجمع) و خاتمه

افزایش چشمگیری یافت، اما در مقابل کاهش اندکی در فعالیت آنزیمی کاتالاز در دو رقم Opera و Okapi مشاهده شد (شکل ۶). زانگ و کیرخام^۱ (۱۹۹۶) گزارش کردند که واکنش آنزیم کاتالاز در شرایط تنش خشکی متغیر بود و با نتایج این آزمایش همخوانی داشت.

روند تغییرات مالون‌دی‌آلدئید در شکل ۷ نشان داد که کمترین غلظت میزان مالون‌دی‌آلدئید در هر سه رقم کلزا در تیمار شاهد مشاهده شد و به موازات قطع آبیاری میزان پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در غشای سلولی و به عبارتی دیگر تولید مالون‌دی‌آلدئید افزایش چشمگیری یافت (شکل ۷). مالون‌دی‌آلدئید محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدهاست و در شرایط تنش به عنوان یک شاخص مهم به منظور ارزیابی میزان خسارت رادیکال‌های آزاد به غشای سلولی شناخته شده است (بهار دواج و یاداو^۲، ۲۰۱۲). بنابراین میزان مالون‌دی‌آلدئید به همراه برخی صفات دیگر نظیر پرولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یکی از مهم‌ترین نشانگرها برای شناسایی تحمل به کم‌آبی هستند (بهار دواج و یاداو، ۲۰۱۲). در این بررسی و در شرایط شاهد، میزان مالون‌دی‌آلدئید در ارقام GKH2005، Opera و Okapi بین ۰/۲۴ تا ۰/۶۵ نانو مول بر سانتی‌متر متغیر بود، در حالی که در تیمار قطع آبیاری از ساقه‌دهی میزان مالون‌دی‌آلدئید در همه ارقام افزایش یافت، هر چند ارقام Opera و GKH2005 از پراکسیداسیون کمتری در مقایسه با رقم Okapi برخوردار بودند (شکل ۷). به عنوان مثال میزان مالون‌دی‌آلدئید در تیمار قطع آبیاری از ساقه‌دهی در ۱۵۲، ۱۶۰ و ۱۶۸ روز پس از سبزش شدن برای رقم GKH2005 به ترتیب برابر با ۱/۳۲، ۱/۰۴ و ۱/۱۶ نانو مول بر سانتی‌متر بود (شکل ۷). در تیمار قطع آبیاری از گل‌دهی و خورجین‌دهی، کمترین و بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید به ترتیب در ارقام GKH2005 و Okapi مشاهده شد (شکل ۷). این موضوع می‌تواند به دلیل تجمع پرولین و فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر پراکسیداز و کاتالاز در رقم GKH2005

1- Zhang and Kirkham

2- Bhardwaj and Yadav

آزیم‌های آنتی اکسیدان و تجمع پرولین در رقم GKH2005 در مقایسه با دو رقم دیگر می‌تواند از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تولید تعداد خورجین زیاد تحت شرایط تنش خشکی باشد. ارقام از نظر تعداد دانه در خورجین ساقه اصلی در هر سطح آبیاری متفاوت بودند، به طوری که در تیمارهای شاهد و قطع آبیاری از خورجین‌دهی رقم GKH2005 برتر از دو رقم دیگر بود، اما در قطع آبیاری از مراحل ساقه‌دهی اختلاف معنی‌داری در بین سه رقم کلزای مورد بررسی مشاهده نشد (جدول ۴). همچنین در تیمار قطع آبیاری از خورجین‌دهی، تعداد دانه در خورجین ساقه اصلی ارقام Okapi و GKH2005 به طور معنی‌داری بیشتر از رقم Opera بود (جدول ۴). از نظر تعداد دانه در خورجین شاخه فرعی، ارقام اختلاف معنی‌داری در تیمارهای شاهد و قطع آبیاری از ساقه‌دهی نداشتند، درحالی که در تیمارهای قطع آبیاری از مراحل گل‌دهی و خورجین‌دهی رقم GKH2005 برتر از دو رقم دیگر بود (جدول ۴). به نظر می‌رسد که در سطوح مختلف آبیاری رقم GKH2005 در مقایسه با دو رقم دیگر با برخورداری از خورجین بلندتر، برتری قابل توجهی نیز از نظر تولید دانه داشته است. حسین‌زاده^۲ و همکاران (۲۰۱۰) اظهار داشتند که در ارقام کلزا ارتباط نزدیکی بین طول خورجین و تعداد دانه در آن وجود دارد. گوناسکرا^۳ و همکاران (۲۰۰۶) نیز بر نقش اساسی تعداد دانه در خورجین در افزایش عملکرد دانه ارقام متحمل به شرایط سخت آب و هوایی تأکید داشته‌اند. نتایج مقایسه میانگین عملکرد دانه در سطوح مختلف آبیاری نشان داد که رقم GKH2005 بیشترین عملکرد دانه را در تیمارهای آبیاری شاهد، قطع آبیاری از ساقه‌دهی، گل‌دهی و خورجین‌دهی به ترتیب به میزان ۳۱۱۰، ۱۴۵۰، ۱۷۷۳ و ۲۵۱۰ کیلوگرم در هکتار تولید نمود (جدول ۴). این در حالی است که کمترین عملکرد دانه در تیمارهای تنش خشکی در دو رقم Opera و Okapi مشاهده شد (جدول ۴). عملکرد گیاه کلزا تابع تعداد خورجین در گیاه، تعداد دانه و وزن دانه‌ها می‌باشد

تولید تقسیم شد که با نتایج شوفلت و پورویس^۱ (۱۹۹۵) هم راستا است (شکل ۷).

نتایج تجزیه واریانس عملکرد دانه و اجزای عملکرد در جدول ۳ نشان داده شده است. براین اساس اثر آبیاری و اثر رقم بر کلیه صفات مورد مطالعه در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود، درحالی که ارقام تنها از نظر تعداد خورجین در ساقه اصلی و شاخه فرعی، تعداد دانه در خورجین در ساقه اصلی و شاخه فرعی و عملکرد دانه واکنش متفاوتی به سطوح آبیاری نشان دادند و اثر متقابل آبیاری × رقم بر وزن دانه و عملکرد روغن در سطح آماری معنی‌دار نبود (جدول ۳). بررسی سطوح اثرات متقابل در جدول ۴ نشان داد که بیشترین تعداد خورجین در ساقه اصلی و شاخه فرعی در هر سه رقم مورد مطالعه در تیمار شاهد مشاهده شد و اعمال قطع آبیاری سبب کاهش محسوس این صفات در مقایسه با شاهد شد، به طوری که تیمار قطع آبیاری از ساقه‌دهی و پس از آن قطع آبیاری از گل‌دهی دارای کمترین تعداد خورجین پر در ساقه اصلی و شاخه‌های فرعی بودند (جدول ۴). بین ارقام اختلاف معنی‌داری در تیمار شاهد و قطع آبیاری از خورجین‌دهی مشاهده نشد، ولی در قطع آبیاری از مرحله ساقه‌دهی، ارقام GKH2005 و Opera و در قطع آبیاری از مرحله گل‌دهی، رقم GKH2005 بیشترین تعداد خورجین پر در ساقه اصلی را داشتند (جدول ۴). واکنش ارقام از نظر تعداد خورجین پر در شاخه فرعی به هر سطح آبیاری نسبتاً مشابه بود و در کلیه تیمارهای آبیاری رقم GKH2005 با اختلاف قابل توجهی نسبت به دو رقم دیگر، برتر بود (جدول ۴). تفاوت سه رقم کلزای مورد بررسی در سطوح مختلف آبیاری از نظر تعداد خورجین پر در ساقه اصلی بسیار کمتر از شاخه فرعی بود. همچنین رقم GKH2005 در مقایسه با دو رقم دیگر، در واکنش به تیمارهای قطع آبیاری از کمترین میزان کاهش در تعداد خورجین پر در شاخه فرعی برخوردار بود و تعداد خورجین پر خود را در شرایط خشکی به خوبی حفظ کرد (جدول ۴). در این آزمایش کمتر بودن شاخص پراکسیداسیون لیپید به واسطه فعالیت بالاتر

2- Hoseinzadeh
3- Gunasekera

1- Shewfelt and Purvis

(انگدی^۱ و همکاران، ۲۰۰۳) و نتایج این آزمایش نشان داد که بیشترین عملکرد دانه در رقم زودرس GK2005 با داشتن بیشترین اجزاء عملکرد، بویژه تعداد خورجین پر در شاخه‌های فرعی مشاهده شد (جدول ۴). همچنین بالاتر بودن فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز، تجمع بیشتر پرولین به همراه پائین بودن میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید از مهم‌ترین دلایل بالاتر بودن عملکرد دانه در رقم GK2005 در مقایسه با دو رقم دیگر بود.

در این زمینه هسو و کائو^۲ (۲۰۰۳) بیان کردند که در مقایسه با گیاهان حساس به خشکی، بالا بودن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان متحمل به خشکی، نقش مهمی در مقاوم کردن آن‌ها در مقابل تنش دارد. بهاردواج و یاداو^۳ (۲۰۱۲) نیز در این رابطه بیان داشتند که افزایش تجمع پرولین در ارقام متحمل به خشکی با افزایش تحمل به خشکی و سازگاری گیاه با شرایط خشک ارتباط نزدیکی داشت.

نتایج مندرج در جدول ضرایب همبستگی ساده بین صفات مورد مطالعه نشان داد که همبستگی منفی و معنی‌داری بین مالون‌دی‌آلدئید با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پرولین وجود داشت، به طوری که به ترتیب آنزیم پراکسیداز ($r = -0/81$)، کاتالاز ($r = -0/79$) در سطح احتمال یک درصد و پرولین ($r = -0/69$) در سطح احتمال پنج درصد رابطه منفی و قوی با مالون‌دی‌آلدئید داشتند. براین اساس تأثیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز و کاتالاز در مقایسه با پرولین بر کاهش اثرات تنش ثانویه اکسیداتیو و غلظت مالون‌دی‌آلدئید بیشتر بوده است. هرچند نقش اسید آمینه پرولین نیز در پایداری غشاء سلولی به واسطه خاصیت جاروبگری گونه‌های فعال اکسیژن اثبات شده است (اشرف و فولاد^۴، ۲۰۰۷؛ وبراگن و هرمانس^۵، ۲۰۰۸). مالون‌دی‌آلدئید همبستگی منفی و معنی‌داری با تعداد خورجین در ساقه اصلی و شاخه فرعی، تعداد دانه در

خورجین در ساقه اصلی و شاخه فرعی، وزن هزار دانه و عملکرد دانه داشت (جدول ۵). در مقابل، بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با اجزای عملکرد و عملکرد دانه همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد و در بین اجزای عملکرد، تعداد خورجین در شاخه فرعی و تعداد دانه در خورجین شاخه فرعی از بیشترین همبستگی مثبت با آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز برخوردار بودند. این درحالی است که ارتباط معنی‌داری بین پرولین و اجزای عملکرد و عملکرد دانه مشاهده نشد (جدول ۵). هسو و کائو^۲ (۲۰۰۳) بر نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در افزایش تحمل به خشکی در گیاهان تأکید کرده‌اند. همچنین به طور کلی، آنزیم پراکسیداز در مقایسه با کاتالاز رابطه قوی‌تری و معنی‌داری با عملکرد و اجزای عملکرد داشت (جدول ۵). در بین اجزای عملکرد، تعداد خورجین در شاخه فرعی بالاترین و وزن هزار دانه پائین‌ترین ضریب همبستگی را با عملکرد دانه دارا بود (جدول ۵). نتایج تجزیه همبستگی در این مطالعه نشان داد که نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر پراکسیداز و کاتالاز در کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش تحمل به خشکی بسیار پررنگ‌تر از نقش پرولین بوده و در بین اجزای عملکرد، بالاتر بودن تعداد خورجین در شاخه فرعی بیشترین نقش را در افزایش عملکرد دانه گیاه کلزا دارد.

نتایج کلی این بررسی نشان داد که با اعمال تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر پراکسیداز و کاتالاز و تولید مالون‌دی‌آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید افزایش یافت، اما در ارقام متحمل میزان افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بسیار بیشتر و میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید کمتر از ارقام حساس است. همچنین مقایسه نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پرولین در تحمل به تنش خشکی نشان داد که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و بخصوص پراکسیداز نقش مهم‌تری در حفظ و پایداری اجزای عملکرد و عملکرد دانه کلزا در مقایسه با پرولین داشتند. همچنین در بین اجزای عملکرد، تعداد خورجین در شاخه فرعی بالاترین

1- Angadi

2 Hsu and Kao

3 Bhardwaj and Yadav

4- Ashraf and Foolad

5- Verbruggen and Hermans

6- Hsu and Kao

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در سه رقم کلزا در تیمارهای مختلف آبیاری

میانگین مربعات								
منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد خورجین پر در ساقه اصلی	تعداد خورجین در شاخه‌های فرعی	تعداد دانه در خورجین ساقه اصلی	تعداد دانه در خورجین شاخه‌های فرعی	وزن هزار دانه	عملکرد دانه	عملکرد روغن
آبیاری (I)	۳	۲۱۶۵ **	۲۳۰۳۸ **	۴۹۱ **	۵۵۳ **	۱/۸۳	۵۵۵۵۵۹۱	۱۱۶۷۲۵۳
خطای الف	۸	۳۶	۱۹۶	۸	۵	۰/۱۲	۵۱۵۷۱	۱۰۷۰۸
رقم (V)	۲	۴۶۳ **	۲۶۶۲۰ **	۱۰۲ **	۴۸ **	۰/۶۵	۱۱۶۹۲۹۸	۱۹۶۹۳۷
اثر متقابل	۶	۱۳۵ *	۲۵۹۱ **	۴۰ **	۱۲ *	۰/۱۶	۵۶۶۵۶ *	۶۳۰۷ ns
خطای ب	۱۶	۳۴	۱۵۵	۱	۴	۰/۱۱	۱۵۵۸۴	۳۲۹۶
ضریب		۱۰/۰	۸/۸	۶/۵	۱۲/۹	۱۱/۹	۶/۷	۷/۱

ns: غیر معنی دار، * و ** به ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی دار می‌باشند.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تنش × رقم بر برخی صفات مورد مطالعه به روش برش‌دهی

ارقام	تعداد خورجین پر در ساقه اصلی			تعداد خورجین پر در شاخه فرعی		
	شاهد	قطع آبیاری از ساقه‌دهی	قطع آبیاری از گل‌دهی	شاهد	قطع آبیاری از ساقه‌دهی	قطع آبیاری از گل‌دهی
GKH2005	۷۷ a	۴۸/۶a	۶۵/۰ a	۲۲۰/۶a	۱۴۸/۳ a	۱۹۸/۳a
Opera	۸۰ a	۴۵/۵ a	۴۵/۱ b	۱۷۰/۴ c	۷۸/۳ b	۱۰۲/۳ b
Okapi	۷۱ a	۳۳/۳ b	۴۱/۲ b	۲۰۴/۳ b	۸/۶ c	۸۹/۰ b
LSD (%۵)	۱۱/۶	۸/۱	۱۲/۱	۱۲/۹	۱۰/۱	۳۹/۳

ارقام	تعداد دانه در خورجین ساقه اصلی			تعداد دانه در خورجین شاخه‌های فرعی		
	شاهد	قطع آبیاری از ساقه‌دهی	قطع آبیاری از گل‌دهی	شاهد	قطع آبیاری از ساقه‌دهی	قطع آبیاری از گل‌دهی
GKH2005	۲۷/۰ a	۱۱/۰ a	۲۵/۴ a	۲۵/۹ a	۷/۰ a	۱۶/۱ a
Opera	۲۳/۵ b	۱۰/۱ a	۱۲/۶ b	۲۰/۸ b	۷/۷ a	۱۰/۸ b
Okapi	۲۶/۱ ab	۸/۰ a	۱۱/۵ b	۲۶/۳ a	۴/۳ a	۱۱/۵ b
LSD (%۵)	۲/۷	۵/۴	۴/۳	۱/۲	۳/۵	۳/۱

عملکرد دانه (کیلوگرم در هکتار)

ارقام	شاهد	قطع آبیاری از ساقه‌دهی	قطع آبیاری از گل‌دهی
GKH2005	۳۱۱۰ a	۱۴۵۰ a	۱۷۷۳ a
Opera	۲۶۷۹ b	۹۷۸ b	۱۲۴۶ b
Okapi	۲۷۷۸ ab	۸۳۲ b	۱۱۶۸ b
LSD (%۵)	۴۱۰	۲۴۷	۳۳۱

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال پنج درصد هستند.

بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، برخورداری از بالاترین تعداد خورجین در شاخه فرعی به همراه پائین بودن میزان نشت الکترولیت‌ها از غشای سلول (غلظت مالون‌دی‌آلدئید) در مقایسه با دو رقم دیگر بیشترین عملکرد دانه را تولید نمود.

همبستگی مثبت و معنی‌دار را با عملکرد دانه و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داشت. براین اساس یک سیستم آنتی‌اکسیداتیو کارآمد به همراه بالاتر بودن تعداد خورجین در شاخه فرعی می‌تواند نقش مهمی در تحمل به خشکی ایفا کند و رقم GK2005 با داشتن

جدول ۵- جدول ضرایب همبستگی ساده بین صفات مورد مطالعه

صفات	پرولین	کاتالاز	پراکسیداز	مالون-دی‌آلدئید	تعداد خورجین پر در ساقه اصلی	تعداد خورجین پر در شاخه فرعی	تعداد دانه در خورجین ساقه اصلی	تعداد دانه در خورجین شاخه فرعی	وزن هزار دانه	عملکرد دانه
پرولین	۱									
کاتالاز	۰/۶۷*	۱								
پراکسیداز	۰/۴۷ ^{ns}	۰/۷۷**	۱							
مالون‌دی‌آلدئید	-۰/۶۹*	-۰/۷۹**	-۰/۸۱**	۱						
تعداد خورجین پر	۰/۴۱ ^{ns}	۰/۶۱*	۰/۷۳**	-۰/۷۵**	۱					
تعداد خورجین پر	۰/۳۴ ^{ns}	۰/۶۵*	۰/۸۰**	-۰/۷۹**	۰/۸۷**	۱				
تعداد دانه در خورجین	۰/۵۰ ^{ns}	۰/۶۳*	۰/۷۹**	-۰/۶۴*	۰/۹۵**	۰/۸۵**	۱			
تعداد دانه در خورجین شاخه فرعی	۰/۵۹*	۰/۷۴**	۰/۸۰**	-۰/۷۳**	۰/۹۲**	۰/۸۳**	۰/۹۴**	۱		
وزن هزار دانه	۰/۴۴ ^{ns}	۰/۶۱*	۰/۵۷*	-۰/۷۸**	۰/۵۶*	۰/۴۵ ^{ns}	۰/۳۳ ^{ns}	۰/۳۸ ^{ns}	۱	
عملکرد دانه	۰/۵۳ ^{ns}	۰/۷۷**	۰/۸۶**	-۰/۸۳**	۰/۹۲**	۰/۹۷**	۰/۸۷**	۰/۹۲**	۰/۶۰*	۱

ns: غیر معنی‌دار، * و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

منابع

بی‌نام. ۱۳۹۰. آمارنامه هواشناسی. اداره کل هواشناسی استان یزد.

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121-126.
- Angadi, S.V., Cutforth, H.W., McConkey, B.G. and Gen, Y. 2003. Yield adjustment by canola grown at different by plant population under semiarid conditions. *Crop Science*, 43: 1358-1366.
- Ashraf, M., and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 206-216.
- Bates, C.J., Waldren, R.P., and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Bhardwaj, J., and Yadav, S.K. 2012. Comparative study on biochemical parameters and antioxidant enzymes in drought tolerant and a sensitive variety of Horsegram (*Macrotyloma uniflorum*) under drought stress. *American Journal of Plant Physiology*, 7 (1): 17-29.

- Chance, B., and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2: 764-817.
- Enjalbert, J.N., Zheng, S., Johnson, J.J., Mullen, J.L., Byrne, P.F., and McKay, J.K. 2013. Brassicaceae germplasm diversity for agronomic and seed quality traits under drought stress. *Industrial Crops and Products*, 47: 176-185.
- FAO. 2013. Food outlook. Global Market Analysis. Available in: <http://www.fao.org/foodoutlook>. (accessed march 2014).
- Faraji, A., Lattifi, N., Solatni, A., and Shirani Rad, A.H. 2009. Seed yield and water use efficiency of canola as affected by high temperature stress and supplemental irrigation. *Agricultural Water Management*, 96: 132-140.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., and Basra, S.M.A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29: 185-212.
- Gunasekera, C.P., Martin, L.D., Siddique, K.H.M., and Walton, G.H. 2006. Genotype by environment interactions of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) and canola (*B. napus* L.) in Mediterranean-type environments. 1. Crop growth and seed yield. *European Journal of Agronomy*, 25: 1-12.
- Guo, Z., Ou, W., Lu, S., and Zhong, Q. 2006. Differential responses of Antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 828-836.
- Hamzei, J., and Soltani, J. 2012. Deficit irrigation of rapeseed for water-saving: Effects on biomass accumulation, light interception and radiation use efficiency under different N rates. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 155: 153-160.
- Heath, R.L., and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acids peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198.
- Heidari, M., and Karami, V. 2014. Effects of different mycorrhiza species on grain yield, nutrient uptake and oil content of sunflower under water stress. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 13: 9-13.
- Hoseinzadeh, B., Eshaghbeygi, A., and Raghmi, N. 2010. Silique Picking Force for Canola. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12 (4): 632-634.
- Hsu, S.Y., and Kao, C.H. 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol and antioxidant enzymes in rice leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39: 83-90.
- Jongrunklang, N., Toomsan, B., Vorasoot, N., Jogloy, S., Boote, K.J., Hoogenboom, G., and Patanothai, A. 2013. Drought tolerance mechanisms for yield responses to pre-flowering drought stress of peanut genotypes with different drought tolerant levels. *Field Crops Research*, 144: 34-42.
- Mahajan, S., and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158.
- Moghaddam, M.J., and Pourdard, S.S. 2011. Genotype × environment interactions and simultaneous selection for high oil yield and stability in rainfed warm areas rapeseed (*Brassica napus* L.) from Iran. *Euphytica*, 180: 321-335.
- Omidi, H. 2010. Changes of proline content and activity of antioxidative enzymes in two canola genotype under drought stress. *American Journal of Plant Physiology*, 5 (6):338-349.
- Rashidi, S., Shirani Rad, A.H., Ayene Band, A., Javidfar, F., and Lak, S. 2012. Study of relationship between drought stress tolerances with some physiological parameters in canola genotypes (*B. napus* L.). *Annals of Biological Research*, 3 (1): 564-569.

- Ren, J., Yao, Y., Yang, Y., Korpelainen, H., Junttila, O., and Li, C. 2006. Growth and physiological responses of two contrasting *poplar* species to supplemental UV-B radiation. *Tree Physiology*, 26: 665-672.
- Shewfelt, R.L., and Purvis, A.C. 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. *Horticulture Science*, 30(2): 213-218.
- Stepien, P., and Klobus, G. 2005. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Plant Physiology*, 125: 31-40.
- Tohidi-Moghaddam, H.R., Shirani-Rad, A.R., Noormohammadi, G., Habibi, D., and Boojar, M.M.A. 2009. Effect of super absorbent application on antioxidant enzyme activities in canola (*Brassica napus* L.) cultivars under water stress conditions. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 4: 215-223.
- Tohidi-Moghaddam, H.R., Zahedi, H., and Ghooshchi, F. 2011. Oil quality of canola cultivars in response to water stress and super absorbent polymer application. *Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)*, 41(4): 579-586.
- Verbruggen, N., and Hermans, C. 2008. Proline accumulation implants: A review. *Amino Acids*, 35: 753-759.
- Xiao, X., Xu, X., and Yang, F. 2008. Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. *Silva Fennica*, 42: 705-719.
- Xu, X., Yang, F., Xiao, X., Zhang, S., Korpelainen, H., and Li, C. 2008. Sex-specific responses of *Populus cathayana* to drought and elevated temperatures. *Plant, Cell and Environment*, 31: 850-860.
- Zhang, J., and Kirkham, M.B. 1996. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, 132: 361-373.

Comparison of antioxidant enzymes and proline roles in drought tolerance of rapeseed (*Brassica napus* L.)

Hamid Jabbari¹, GHolam Abbas Akbari^{2*}, Nir azam Khosh kholgh Sima³, Iraj Alahdadi², Amir hossein Shirani rad⁴, Sayyed ali Tabatabaee⁵ and Ali Hamed⁶

¹ Research Assistant Prof., Oil Seed Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj

² Associate Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Abureyhan, University of Tehran, Tehran.

Corresponding author Email: ghakbari@ut.ac.ir

³ Assistant Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj

⁴ Professor, Oil Seed Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj

⁵ Research Assistant Prof., Yazd Agricultural and Natural Resources Research center, Yazd

⁶ MS.c. of Agronomy, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Abureyhan, University of Tehran, Tehran

(Received: 2014/04/14 - Accepted: 2014/10/25)

Abstract

In order to comparison of antioxidant enzymes and proline roles in drought tolerance of rapeseed, an experiment was conducted at the research field of Yazd Agricultural and Natural Resources Research Center in 2011-2012. In this study, three commercial rapeseed genotypes (GKH2005, Opera and Okapi) were examined for response to irrigation treatments such as non-stress conditions (control) and withholding irrigation from stem elongation, flowering and silique formation stages in four separate experiments based on randomized complete block (RCB) design. The results indicated that proline accumulation, activity of catalase and peroxidase enzyme and lipid peroxidation index (content of malondealdehyde) were higher in drought stress treatments, but these amounts were different in three rapeseed genotypes. Maximum activity of antioxidant enzymes and low content of malondealdehyde was observed in GKH2005 compared with others, in drought stress conditions. Between these genotypes, GKH2005 produced the highest seed yield under non-stress conditions and withholding irrigation from stem elongation, flowering and silique formation stages as 3110, 1450, 1773 and 2510 kg.ha⁻¹, respectively. These results showed that role of antioxidant enzymes on reduction of lipid peroxidation and increasing the drought tolerance is more than proline. Also, an effective antioxidant system along with lower malondealdehyde and high silique number per secondary branch had the greatest role to productivity maintenance of Rapeseed under drought stress conditions

Key words: *Catalase, Malondealdehyde, Peroxidase, Seed yield, Silique number per secondary branch*