به‌زراعی کشاورزی

دوره ۱۶ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۳

صفحه‌های ۷۱۶-۷۰۷

سازوکار تحمل تنش خشکی پایهٔ GF677 (هیبرید هلو و بادام) در شرایط درون‌شیشه‌ای

مهری مشایخی[۱] *، فریبرز حبیبی[۲]، محمد اسماعیل امیری[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲. کارشناس‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۵/۰۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۱/۳۰

چکیده

سازوکار تحمل تنش خشکی پایهٔ GF677، هیبرید هلو و بادام (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*) در شرایط درون‌شیشه‌ای بررسی شد. گیاهچه‌های پایهٔ GF677 به محیط کشت پرآوری جامد موراشیگ و اسکوگ[۱] (MS) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) در چهار سطح خشکی صفر (شاهد)، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم بر لیتر پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (به ترتیب، معادل پتانسیل اسمزی صفر، ۰/۲-، ۰/۴- و ۰/۶- مگاپاسکال) واکشت شد. بعد از گذشت شش هفته نتایج نشان داد تنش خشکی القاشده اثر معناداری بر پارامترهای اندازه‌گیری شده داشت. با افزایش سطوح خشکی در محیط کشت، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (کاتالاز و پراکسیداز)، مقدار پروتئین کل و مقدار پرولین به طور معناداری افزایش یافت، در حالی که قندهای محلول افزایش غیرمعناداری در سطوح مختلف خشکی داشتند. از نتایج حاصل می‌توان چنین استنباط کرد که مهم‌ترین سازوکار تحمل به تنش خشکی پایهٔ GF677 در شرایط درون‌شیشه‌ای، به‌کارگیری سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی، افزایش سنتز پروتئین (افزایش بیان ژن‌ها) و تجمع پرولین است. تنظیم اسمزی با قندهای محلول اهمیت کمتری دارد.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، پروتئین کل، پرولین، تنظیم اسمزی، قندهای محلول.

1. Murashige and Skoog

* نویسنده مسئول Email: mehri_m662004@yahoo.com

۱. مقدمه

پایهٔ GF677 هیبرید طبیعی هلو و بادام (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*) است که به طور گسترده در دنیا استفاده می‌شود. از مزایای این پایه مقاومت به خشکی، مقاومت به خاک‌های آهکی و متحمل کمبود آهن است [۱۶].

شناخت سازوکار تحمل تنش خشکی در پایه‌های درختان میوه یکی از مهم‌ترین راهکارهای مؤثر در حل مشکلات تنش خشکی در باغبانی است [۲۹]. تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که آثار نامطلوبی بر رشدونمو گیاهان دارد و بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تأثیر می‌گذارد [۲۰]. اولین اثر تنش خشکی کاهش فشار تورژسانس است که باعث کاهش رشد رویشی گیاهان می‌شود [۲۶]. علاوه بر تغییرات فیزیولوژیکی که در اثر کمبود آب در گیاه ایجاد می‌شود، صدمات اکسایشی نیز از عوامل مهم محدودکنندهٔ رشد گیاهان است [۳۰، ۳۵]. گونه‌های واکنشگر اکسیژن[1] (ROS) (پراکسید هیدروژن، سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل) تحت تنش خشکی در گیاه تجمع می‌یابند [۱۵] که منجر به خسارات جدی به ساختارهای سلولی می‌شود [۲۴]. ارتباط مستقیمی بین تحمل به تنش‌های اکسایشی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاهان وجود دارد [۱۲].

تنظیم اسمزی نیز یکی از مهم‌ترین سازوکارهای تحمل به خشکی در گیاهان است [۲۵]. پرولین یکی از اسید آمینه‌های فعال در پدیدهٔ تنظیم اسمزی است که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش بسزایی دارد [۵]. یکی دیگر از محلول‌های سازگار، قندهای محلول است. قندها در شرایط تنش از سلول‌ها از طریق تنظیم فشار اسمزی و نگهداری تورژسانس، همچنین پایداری غشاها و پروتئین‌ها محافظت می‌کند [۱، ۲۷، ۳۷].

اگرچه می‌توان میزان تحمل پایه‌های درختان میوه را در خاک‌های شور یا خشک ارزیابی کرد، تغییر میزان خشکی در خاک و بررسی اثر متقابل آن با عوامل دیگر نظیر دمای محیط، شدت نور، تعرق و میزان عناصر مختلف خاک مشکل است [۱۳]. بنابراین، استفاده از تکنیک کشت بافت کنترل بیشتری از شرایط بیرون دارد و می‌توان تعداد زیادی از گیاهان را در فضایی محدود ارزیابی کرد و امکان انجام آزمایش‌ها در شرایط یکسان در تمام طول سال امکان‌پذیر است. بسیاری از عکس‌العمل‌های فیزیولوژی و مورفولوژی و بیوشیمیایی گیاه در شرایط کشت بافت قابل اندازه‌گیری است [۲۸]. گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای و محیط بیرون به روش مشابهی تنش را تحمل می‌کند [۲۳] و بافتی که بتواند در شرایط تنش درون‌شیشه‌ای زنده بماند، دارای پتانسیل مقاومت در شرایط بیرون نیز هست [۳۲]. بنابراین، سیستم کشت بافت تکنیکی مناسب برای ارزیابی گیاهان به شرایط تنش است.

در بررسی آثار تنش کم‌آبی نیاز به موادی است که با مولکول‌های آب در محیط کشت درگیر شود و آن‌ها را از دسترس گیاه خارج کند [۲۲]. پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) پلیمری منعطف و غیرسمی است که تمایلی به واکنش با مواد شیمیایی و بیولوژیکی ندارد [۳۸]. همچنین، توسط گیاه جذب نمی‌شود و غلظت آن در تمام مدت تنش ثابت می‌ماند. به همین دلیل بهترین تیمار برای تنش‌های اسمزی در مقایسه با دیگر محلول‌های سازگار نظیر مانیتول و نمک شناخته شده است [۱۴]. این تکنیک در تنش خشکی خرما [۱]، موز [۸] و پایهٔ گیزیلا-۵ [2] گیلاس [۳۰] استفاده شده است.

پایهٔ GF677 پایه‌ای مقاوم به خشکی برای هسته‌داران است که به طور گسترده در دنیا استفاده می‌شود. تاکنون گزارش مشخص و معینی دربارهٔ سازوکار تحمل خشکی

1. Reactive Oxygen Species

2. Gisela5

در این پایه یافت نشده است. بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ما را در شناخت دقیق‌تر سازوکارهای تحمل پایه‌ها به تنش خشکی یاری می‌کند. هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی دقیق سازوکار تحمل خشکی پایهٔ GF677 در شرایط درون‌شیشه‌ای است.

۲. مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب طرحی کاملاً تصادفی (CRD) در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه زنجان، در سال ۹۲-۱۳۹۱ انجام شد. برای تهیهٔ ریزنمونه، جوانه‌های یک‌سالهٔ پایهٔ GF677، (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*) از ایستگاه تحقیقات باغبانی سهند استفاده شد. نمونه‌های گیاهی پس از انتقال به آزمایشگاه با مایع ظرفشویی و آب مقطر شست‌وشو داده شدند. سپس، به قطعاتی در اندازه‌های کوچک تقسیم شدند، به‌طوری که در هر قطعه یک جوانه وجود داشته باشد. سپس، با آب مقطر استریل شسته و به مدت سی ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور و بعد در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت بیست دقیقه ضدعفونی شدند. ریزنمونه‌ها پس از تیمار سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو شد. سپس ریزنمونه‌های ضدعفونی‌شده به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP انتقال داده شد. جوانه‌ها پس از رشد، در محیط پایهٔ MS واکشت شد. ترکیبات محیط عبارت بود از عناصر ماکرو، عناصر میکرو، ویتامین‌ها و آهن با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) [۳۱]. اسیدیتهٔ محیط ۵/۷ تا ۵/۸ با استفاده از سود (NaOH) یک نرمال تنظیم شد. آگار با تکان دادن و گرمادهی پیوسته روی هیتر به طور کامل حل شد. سپس، محیط در ظروف کشت پخش و در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ‌مربع به مدت پانزده دقیقه اتوکلاو شد.

در این تحقیق، به منظور شناسایی سازوکارهای تحمل به تنش خشکی، ریزنمونه‌هایGF677 در محیط کشت جامد موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۱ میلی‌گرم نفتالین استیک اسید (NAA) در چهار سطح خشکی صفر (شاهد)، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (به ترتیب معادل پتانسیل اسمزی صفر، ۰/۲-، ۰/۴- و ۰/۶- مگاپاسکال) در سه تکرار (ظرف کشت) به مدت شش هفته واکشت شد. هر ظرف کشت شامل سه ریزنمونهٔ یکنواخت (به اندازهٔ ۲ سانتی‌متر) بود.

برای اندازه‌گیری پتانسیل آب، ابتدا از هر سطوح PEG-6000 مطابق روش میچل و کافمن [۲۸] یک نمونه تهیه و با استفاده از دستگاه اسمومتر (5520XR, Wescor, USA) مولاریتهٔ محیط کشت اندازه‌گیری شد.

شرایط نگهداری تمامی کشت‌های انجام شده (مرحلهٔ استقرار، مرحلهٔ پرآوری و تیمار خشکی) در اتاقک رشد، در دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد با شانزده ساعت روشنایی و شدت نور ۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس بود.

در پایان دورهٔ تنش (هفتهٔ ششم)، مقدار پروتئین کل به روش برادفورد[1] [۱۱] اندازه‌گیری شد. به منظور تهیهٔ محلول استاندارد از آلبومین سرم گاوی[2](BSA) استفاده شد. میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil.Series 2, England) قرائت شد. فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز به روش چانس و مهلی[3] [۱۴] اندازه‌گیری شد. مقدار پرولین به روش بیتس و همکاران[4] [۸] و قندهای محلول به روش دوبیوس و همکاران[5] [۱۹] اندازه‌گیری شد.

1. Bradford
2. Bovine serum albumin
3. Chance and Maehly
4. Bates *et al.*
5. Dubious *et al.*

داده‌ها پس از جمع‌آوری، با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTAT-C تجزیه و تحلیل شد و مقایسهٔ میانگین به کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شد.

۳. نتایج و بحث

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف خشکی (PEG-6000) اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز، پروتئین کل، پرولین و قندهای محلول وجود دارد (جدول ۱).

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز با افزایش سطوح پلی‌اتیلن گلیکول به طور معناداری در پایهٔ GF677 افزایش پیدا کرد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۹۶ جذب در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در سطح ۳۰ گرم در لیتر پلی‌اتیلن گلیکول مشاهده شد. همچنین، با افزایش سطوح خشکی فعالیت آنزیم پراکسیداز در پایهٔ GF677 افزایش پیدا کرد، به‌طوری که بیشترین مقدار (۰/۵ جذب در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در تیمار ۳۰ گرم در لیتر پلی‌اتیلن گلیکول مشاهده شد. کمترین میزان فعالیت هر دو آنزیم در تیمار شاهد به‌دست آمد (جدول ۲).

افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت واکنشی دفاعی برای جلوگیری از آسیب سلولی است که گیاهان در واکنش به تنش اکسایشی از خود نشان می‌دهند [۲۴]. پراکسید هیدروژن در شرایط نامساعد محیط نظیر تنش‌ها تولید می‌شود و در حضور رادیکال سوپراکسید (O^{2-})، رادیکال هیدروکسیل (OH) را تولید می‌کند که بسیار فعال است و از میان غشای سلولی عبور می‌کند و وارد اجزای سلول می‌شود. بنابراین، خنثی کردن پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) برای بقای سلول اهمیت ویژه‌ای دارد [۳]. علاوه‌بر این، اثر انواع واکنشگر اکسیژن (ROS) که منجر به اکسایش لیپیدها، تغییر ساختار غشا و از هم‌پاشیدگی آن می‌شود، با افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز کاهش می‌یابد [۳۳]. H_2O_2 ترکیبی سمی برای سلول است و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی باید به سرعت آن را به آب و اکسیژن تبدیل کند [۱۷]. در غیر این صورت از طریق پراکسایش لیپیدها به غشای سلولی، ساختمان پروتئین‌ها و DNA آسیب وارد می‌کند و از فرایند فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌های دیگر جلوگیری می‌کند [۱۸]. چندین آنزیم سطوح H_2O_2 را درون سلول تنظیم می‌کنند که مهم‌ترین آن‌ها کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز (گایاکول پراکسیداز) است. بنابراین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کاهش آثار تنش اکسایشی نقش دارد [۶].

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس اثر سطوح مختلف تنش خشکی (PEG-6000) بر صفات اندازه‌گیری شده گیاهچه‌های GF677، (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*) در محیط پایهٔ جامد MS بعد از شش هفته کشت

منابع تغییرات	میانگین مربعات					
	درجهٔ آزادی	آنزیم کاتالاز	آنزیم پراکسیداز	پروتئین کل	پرولین	قندهای محلول
خشکی	۳	۰/۱۵۴**	۰/۱۱۲**	۰/۵۹**	۸۶/۱۸۷**	۰/۳۳۵**
خطا	۸	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۷۱	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات (٪)	–	۶/۱۱	۳/۴۵	۵/۶۲	۴/۱۴	۲/۱۶

** معنادار در سطح ۱ درصد، * معنادار در سطح ۵ درصد، ns غیرمعنادار

پاسخ آنتی‌اکسیدانی فرایندی مهم برای محافظت گیاهان در مقابل آسیب‌های اکسایشی است که در اثر طیف وسیعی از تنش‌های محیطی شامل شوری، خشکی، فلزات سنگین و سرما ایجاد می‌شود [۲۴]. رقم‌های مقاوم به تنش‌های محیطی از طریق القا کردن سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی با تنش‌های محیطی مقابله می‌کنند. بنابراین، بین سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و تحمل شرایط تنش ارتباط وجود دارد [۱۰].

به نظر می‌رسد که بالاتر بودن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در پایه‌های مقاوم موجب کاهش صدمات رادیکال‌های آزاد اکسیژن، کاهش پراکسایش لیپیدها و در نتیجه افزایش شاخص پایداری غشا در آن‌ها می‌شود. فعالیت بیشتر این آنزیم‌ها از میزان تنش اکسایشی می‌کاهد و از فرایندهای متابولیکی ضامن بقای سلول و گیاه محافظت می‌کند [۲۱].

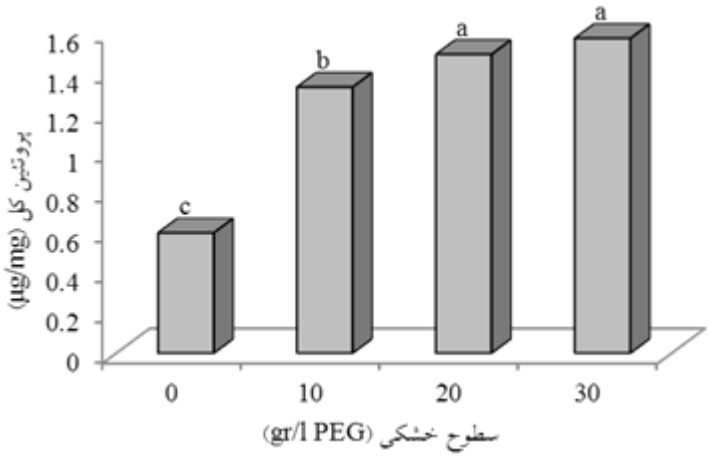
فعالیت آنزیم‌های کاتالاز در شرایط تنش دو برابر و باعث افزایش مقاومت به تنش‌های اکسایشی می‌شود (جدول ۲). برای مثال، این نتیجه در تنش خشکی درون‌شیشه‌ای پایهٔ گیلاس گیزیلا-۵ نیز حاصل شده است که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به‌طور معناداری با افزایش سطوح خشکی افزایش پیدا می‌کند [۳۰]. همچنین، افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تنش خشکی درون‌شیشه‌ای موز نیز گزارش شده است [۸]. تحقیقات نشان داد گیاهان مقاوم به خشکی سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمدتری دارند، به‌طوری که همبستگی مثبتی بین تحمل به تنش‌های اکسایشی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاهان وجود دارد [۳۱]. در پایهٔ GF677، با افزایش سطوح تنش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نیز افزایش یافت. بنابراین، یکی از عوامل در بالا بردن میزان مقاومت پایهٔ GF677 به تنش خشکی افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت است.

با افزایش سطح خشکی مقدار پروتئین کل در پایهٔ GF677 به‌طور معناداری افزایش پیدا کرد. بیشترین مقدار در تیمار ۲۰ و ۳۰ گرم بر لیتر پلی‌اتیلن گلیکول به‌دست آمد، به‌طوری که اختلاف معناداری بین دو سطح مشاهده نشد. کمترین مقدار پروتئین کل با غلظت ۰/۶ میکروگرم بر لیتر در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۱).

جدول ۲. اثر سطوح مختلف تنش خشکی (PEG-6000) بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز گیاهچه‌های GF677، (*Prunus persica* × *Prunus amygdalus*) در محیط پایهٔ جامد MS بعد از شش هفته کشت

سطوح PEG (gr/l)	پتانسیل اسمزی (MPa)	فعالیت آنزیم کاتالاز [abs/min /mg protein (f.m)]	فعالیت آنزیم پراکسیداز [abs/min /mg protein (f.m)]
۰	۰	۰/۴۴[d]	۰/۰۵[d]
۱۰	-۰/۲	۰/۶۷[c]	۰/۲[c]
۲۰	-۰/۴	۰/۸۴[b]	۰/۳۵[b]
۳۰	-۰/۶	۰/۹۶[a]	۰/۵[a]

[†]میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشابه و اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ درصد نشان داده شده است.



شکل ۱. اثر سطوح مختلف خشکی (PEG-6000) بر مقدار پروتئین کل گیاهچه‌های GF677
(حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ درصد)

مقدار پروتئین کل علامت مهمی از وضعیت بیوشیمیایی گیاهان است [۱۱]. تنش‌های محیطی سبب تغییر در بیان ژن و بیان ژن‌ها به شکل تولید پروتئین‌هایی مشخص می‌شود که قبل از تحریک با تنش وجود نداشتند. این پروتئین‌ها به رشد گیاه در شرایط تنش کمک می‌کنند و سبب پایداری غشا می‌شوند [۵]. در واقع، سنتزپروتئینی فرایند سوخت‌وساز اساسی است که موجب بهبود تحمل به خشکی گیاه می‌شود. تنش خشکی از طریق افزایش تجمع پروتئین‌ها، موجب سازگاری فیزیولوژیکی در شرایط تنش خشکی می‌شود [۱۹].

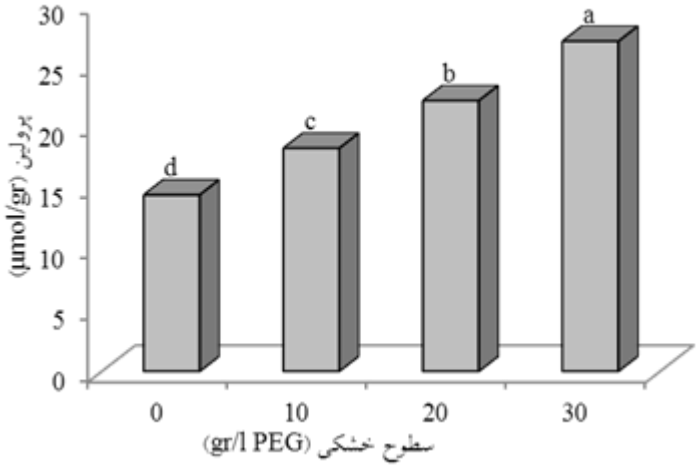
در پایهٔ GF677، با افزایش سطوح تنش مقدار پروتئین کل حفظ می‌شود و افزایش می‌یابد که احتمال می‌رود این افزایش یکی دیگر از سازوکارهای مهم پایهٔ GF677 در تحمل به تنش خشکی باشد که به سازگاری آن در این شرایط کمک می‌کند، زیرا بسیاری از پروتئین‌ها از سلول در مقابل آثار زیانبار خشکی محافظت می‌کنند [۲۹].

با افزایش سطح خشکی میزان تجمع پرولین در پایهٔ GF677 نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. بیشترین مقدار تجمع پرولین در تیمار ۳۰ گرم بر لیتر پلی‌اتیلن گلیکول مشاهده شد. کمترین مقدار تجمع پرولین در تیمار شاهد به‌دست آمد (شکل ۲).

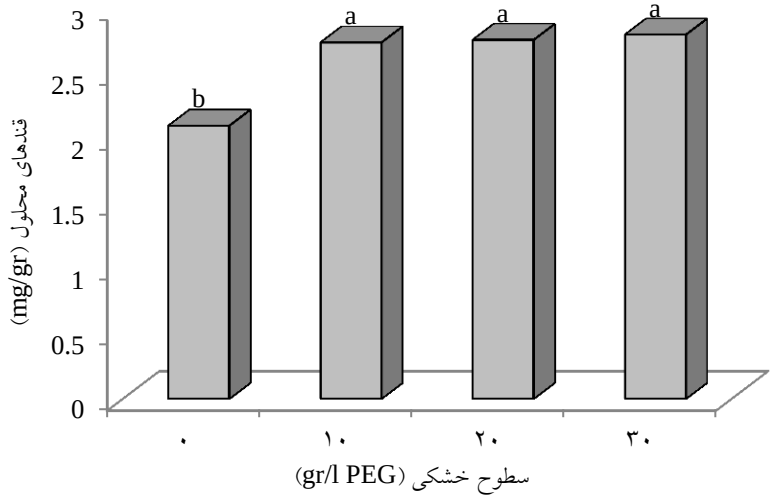
گیاهان در برابر کمبود آب پاسخ‌های شیمیایی متفاوتی نشان می‌دهند. این مواد وزن ملکولی پایین و حلالیت بالا دارند [۲۹]. پرولین یکی از اسید آمینه‌های فعال در پدیدهٔ تنظیم اسمزی است که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش بسزایی دارد [۷]. تجمع پرولین به منزلهٔ محلولی سازگار عمل می‌کند که به‌طور طبیعی در سیتوزول واقع می‌شود و علاوه بر تنظیم فشار اسمزی سلول، از ماکرومولکول‌ها حمایت می‌کند و سبب حفظ ساختارهای سلولی، طی تنش اسمزی می‌شود [۴]. همچنین، پرولین در پایداری ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها، بازدارندهٔ پراکسایشی لیپیدهای غشا و تنظیم اسیدیتهٔ سیتوزول نقش دارد [۱۵]. افزایش پرولین در تنش خشکی درون‌شیشه‌ای ژنوتیپ‌های خرما با افزایش سطح خشکی نیز مشاهده شد [۱].

تجمع پرولین در گیاهان با دو مسیر بیولوژیکی شامل مسیر وابسته به گلوتامات۲ و مسیر وابسته به اورنیتین۳ انجام

می‌شود. ظاهراً، مسیر وابسته به گلوتامات در شرایط تنش خشکی مسیر غالب است [۵]. تنش خشکی سبب افزایش نسخه‌برداری ژن کدکنندهٔ آنزیم‌های مسیر mRNA [پیرولین-۵- کربوکسیلاتسنتاز (P_5C_5) و دلتا پرولین کربوکسیلات ردوکتاز (P_5CR)] و در نهایت افزایش بیوسنتز پرولین می‌شود [۳۴]. باتوجه به اینکه در پایهٔ GF677 با افزایش سطح خشکی مقدار پرولین افزایش یافت، این پاسخ گیاه سازوکاری در تحمل به تنش خشکی است، زیرا تجمع پرولین از آثار زیانبار خشکی بر فعالیت‌های سوخت‌وسازی جلوگیری می‌کند و سازوکاری دفاعی برای مقابله و تحمل تنش است [۳۳، ۳۹].



شکل ۲. اثر سطوح مختلف خشکی (PEG-6000) بر مقدار پرولین گیاهچه‌های GF677
(حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ درصد)



شکل ۳. اثر سطوح مختلف خشکی (PEG-6000) بر مقدار قندهای محلول گیاهچه‌های GF677
(حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ درصد)

مقدار قند در پایهٔ GF677 در سطوح مختلف تنش نسبت به شاهد اختلاف معناداری داشت. پس گیاه طی تنش مقدار قند خود را افزایش می‌دهد، ولی بین سطوح مختلف خشکی اختلاف معناداری مشاهده نشد و تقریباً در همهٔ تیمارها به یک نسبت افزایش پیدا کرد (شکل ۳). در نتیجه، قندهای محلول در تحمل به تنش خشکی نقش کمتری داشتند و بیشترین نقش در تنظیم اسمزی را پرولین داشت.

در پاسخ‌های اسمزی گیاهان، تجمع کربوهیدرات از عواملی است که قادر است از اختلالات در غشای سلولی جلوگیری کند. در بیشتر موارد خشکی بر سوخت‌وساز قندهای محلول اثر می‌گذارد و مقدار آن را افزایش می‌دهد [۲]. براساس بسیاری از تحقیقات، تنش خشکی سبب تجمع کربوهیدرات‌ها (قندهای محلول) در گیاهان مختلف می‌شود، زیرا در شرایط بیرونی، تنش آبی رشد را بیشتر از فتوسنتز محدود می‌کند و تحت چنین شرایطی کربوهیدارات‌های غیرساختاری تمایل به تجمع دارند. این قندهای محلول معمولاً آبدوست‌اند و در سطح پروتئین‌ها یا غشا جانشین آب می‌شوند و مثل ترکیبات با وزن مولکولی پایین عمل می‌کنند [۳۶]. تجمع این مواد سبب کاهش پتانسیل آب اندام‌های گیاهی و متعاقب آن ایجاد شیب پتانسیل آب نسبت به محیط خارج می‌شود. در چنین حالتی جذب آب در گیاه امکان‌پذیر می‌شود [۲۵]. همچنین، تجمع قندهای محلول طی تنش خشکی علاوه بر نقش کارکردی به عنوان حفاظت‌کنندهٔ اسمزی و مواد رشدی به عنوان تنظیم‌کننده‌های بیان ژن نیز نقش‌های مهمی دارد [۹].

طبق نتایج موجود، پس از گذشت شش هفته از اعمال تیمار خشکی، گیاه GF677 توانست در سطوح مختلف خشکی رشد رویشی مناسبی داشته باشد. در بالاترین سطح خشکی (۳۰ گرم بر لیتر) کلروز برگی بیشتری مشاهده شد. اما، این تداوم رشد نشان‌دهندهٔ مقاومت و سازوکار دفاعی درونی مناسب این پایه در مقاومت به تنش خشکی است (شکل ۴).

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر، سازوکار تحمل پایهٔ GF677 به تنش خشکی، دارا بودن سازوکارهای دفاعی همچون افزایش پروتئین‌سازی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز و تنظیم اسمزی توسط پرولین است و نقش قندهای محلول در تنظیم اسمز کمتر است.

شکل ۴. اثر تنش خشکی [سطوح مختلف پلی‌اتیلن گلیکول (PEG-6000)] بر گیاهچه‌های GF677 طی شش هفته کشت در محیط پایه MS [A (0); B (10gr/l); C (20gr/l); D (30gr/l)]

منابع

1. Al-Khayri JM and Al-Bahrany AM (2004) Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. Biologia Plantarum. 48(1): 105-108.
2. Anjum SA, Xie XY, Wang LC, Saleem MF, Man C and Lei W (2011) Morphological, physiological and biochemical of plants to drought stress. African Journal of Agriculture Research. 6: 2026-2032.
3. Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. PlantPhysiology. 141: 391-396.
4. Ashraf M and Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 59: 206-216.
5. Bartels D and Salamini F (2001) Desiccation tolerance in resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level.Plant Physiology. 127: 1346-1353.
6. Blokhin O, Virolainen E and Fagerstedt K (2003) Antioxidant oxidative damage and oxygen deprivation stress. Annual Review Botany. 91: 179-194.
7. Bosabalidis AM and Kofidis G (2002) Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. Plant Science. 163: 375-379.
8. Chai TT, Fadzillah NM, Kusnan M and Mahmood M (2005) Water stress-induced oxidative damage and antioxidant responses in micropropagated banana plantlets. Biologia Plantarum. 49(1): 153-156.
9. Chaves MM, Maroco JP and Pereira JS (2003) Underestanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. Functional Plant Biology. 30: 239-246.
10. Demiral T and Turkan I (2004) Does exogenous glycine betaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment. Plant Physiology. 161: 1089-1100.
11. Doganlar ZB, Demir K, Basak H and Gul I (2010) Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. African Journal Agriculture Research. 5(15): 2056-2065.
12. Erturk U, Sivritepe N, Yerlikaya C, Bor M, Ozdemir F and Turkan I (2007) Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*. Biologia Plantarum. 51: 597-600.
13. Flowers TJ (2004) Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany. 55(396): 307-319.
14. Georgieva MD, Djilianov D, Konstantinova T and Parvanova D (2004) Screening of Bulgarian raspberry cultivars and elites for osmotic tolerance *in vitro*. Biotechnology Equipment. 18: 95-98.
15. Gill SS and Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinary in abiotic stress tolerant in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry. 48: 909-930.
16. Grassely C (1956) New method of vegetative propagation of hybrid Peach×Almand used like rootstock. Review Horticultural Suisse. 29: 116-118.
17. Guo Z, Ouw 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.
18. Gupta S and Gupta NK (2005) High temperature induced antioxidative defense mechanism in contrasting wheat seedlings. Indian Journal of Plant Physiology. 10: 73-75.
19. Hayat S and Ahmad A (2007) Salicylic Acid: A Plant Hormone. Springer. Pp: 97-99.
20. Hoekstra F, Golovina E and Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trendsin Plant Science. 8(9): 431-438.

21. Jiang Y and Hung B (2001) Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism lipid peroxidaion. Crop Science. 41: 436-442.

22. Lagerwerff J, Ogata VG and Eagle HE (1961) Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. Science. 133:1486-1787.

23. Maruyama H, Koyama R, Oi T,Yagi M, Takeda M and Kanechi M (2008) *In vitro* evaluation of osmotic stress tolerance using a novel root recovery assay. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1: 101-106.

24. Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. Annual Review of Plant Science. 7: 405-415.

25. Pagter M, Bragato C and Brix H (2005) Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. Aquatic Botany. 81: 285-299.

26. Parry MAJ, Androjc J, Khan S, Lea PJ and Keys AJ (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. Annals of Botany. 89: 833-839.

27. Ranjbarfardooei A, Samson R, Van Damme P and Lemeur R (2000) Effects of osmotic drought stress induced bypolyethylene glycol on pigment content and photosynthetic gas exchange of *Pistacia khinjuk* and *P. mutica*. Photocynthetica. 38: 443-447.

28. Shibli RA and Al-Juboory K (2002) Comparative responses of Nabali olive microshoot, callus, andsuspension cell cultures to salinity and water deficit. Plant Nutrition. 25(1): 61-74.

29. Sircelj H, Tausz M, Grill D and Batic F (2005) Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. Plant Physiology. 162: 1308-1318.

30. Sivritepe N, Erturk U, Yerlikaya C, Turkan I, Bor M and Ozdemir F (2008) Response of the cherry rootstock to water stress induced *in vitro*. Biologia Plantarum. 52(3): 573-576.

31. Sofo A, Dichio B, Xiloyannis C and Masia A (2005) Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. Functional Plant Biology. 32: 45-53.

32. Swati Z, Muhammad AI and Hayataj F (2003) *In situ* and *In vitro* studies in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes for drought tolerance. Treatment of plant breeding and genetic faculty of crop production Science. 197 p.

33. Turkan I, Bor M, Ozdemir F and Koca H (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science. 168: 223-231.

34. Verslues PE, Ober ES and Sharp RE (1998) Root growth and oxygen relations at low water potentials, Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. Plant Physiology. 116: 1403-1412.

35. Vranova E, Inze D and Breusegem VF (2002) Signal transduction during oxidative stress. Experimental Botany. 53: 1227-1236.

36. Xu YC, Li SH, Cai CL, Liu GJ and Chen SW (2001) Carbohydrate metabolism in source leaves of Jonagold apple tree under water stress and afterwater stress relief. Fruit Science. 18(1): 1-6.

37. Yordanov V and Tsoev T (2000) Plant responses to drought, acclimation and stress tolerance. Photosynthica. 38: 171-186.

38. Zeid IM and El-Semary NA (2001) Response of two differentially drought tolerant varieties of maize to drought stress. Pakistan Journal Biologic Science. 4: 779-784.

Zlatev ZS, Lidon FC, Ramalho JC and Yordanov IT (2006) Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. Biologia Plantarum. 50: 389-394.