



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "تحقیقات کاربردی اکوفیزیولوژی گیاهی"
دوره چهارم، شماره اول، فروردین و اردیبهشت ۹۶
<http://arpe.gonbad.ac.ir>

تأثیر محلول‌پاشی پرولین بر ویژگی‌های بیوشیمیایی بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) در شرایط تنش آبی

حکیمه درویش*^۱، محسن زواره^۲، محمود قاسم‌نژاد^۳

^۱دانشجوی دکتری گروه زراعت، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

^۲استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

^۳دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲۸

چکیده

مقدمه: تنش کم‌آبی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده است که به‌طور جدی تولید گیاهان را کاهش می‌دهد. به‌همین دلیل، راهکارهای مختلفی برای کاهش آسیب‌های سلولی ایجاد شده در طی تنش و بهبود تحمل به کم‌آبی پیشنهاد می‌شود. بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی اثر محلول‌پاشی پرولین بر عملکرد کمی و کیفی بابونه آلمانی در شرایط تنش کم‌آبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور تنش کم‌آبی (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ تخلیه از حد ظرفیت زراعی) و محلول‌پاشی پرولین (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و با سه تکرار در دانشگاه گیلان در سال ۱۳۹۱ انجام شد. مقدار پرولین درون‌زاد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کلروفیل a/b و کاروتنوئیدها اندازه‌گیری شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که، کم‌آبی به تنهایی روی مقدار کلروفیل a، فعالیت کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و پرولین درون‌زاد تأثیر معنی‌دار داشت. هم‌چنین کاربرد پرولین برون‌زاد بر همه ویژگی‌های اندازه‌گیری شده تأثیر معنی‌دار داشت. در این آزمایش کلروفیل a، کلروفیل کل، کلروفیل a/b، فعالیت کاتالاز و

*نویسنده مسئول: hdarvizhe@yahoo.com

پراکسیداز تحت تاثیر معنی‌دار برهمکنش کم‌آبی و کاربرد پرولین قرار گرفت. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش کم‌آبی و پرولین نشان داد که، بیشترین مقدار کلروفیل a ، کلروفیل کل و کلروفیل a/b مربوط به تیمار ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پرولین در شرایط عدم تنش (شاهد) بود. هم‌چنین بیشترین میزان آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در تنش خشکی ۷۵ درصد ظرفیت زراعی با کاربرد ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر پرولین بدست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که، با افزایش شدت کم‌آبی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و میزان پرولین زیاد شده؛ در حالی که مقدار کلروفیل برگ‌ها کاهش می‌یابد. هم‌چنین مشاهده شد که افزایش شدت کمبود آب مقدار پرولین درون‌زاد را هم بیشتر می‌کند که یک پاسخ دفاعی در برابر کمبود آب می‌باشد. در کل، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کنار افزایش مقدار پرولین درون‌زاد در شرایط کم‌آبی و با کاربرد پرولین برون‌زاد بیانگر آن است که کاربرد پرولین برون‌زاد می‌تواند اثرات نامطلوب کم‌آبی را تا حدودی جبران کند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش کم‌آبی، عملکرد کمی و کیفی، پرولین، بابونه

مقدمه

گیاهان در طول دوره رشد خود با تنش‌های مختلفی روبه‌رو می‌شوند که اثر آن‌ها بر رشد و عملکرد گیاه بسته به شدت تنش، حساسیت و مرحله رشد گونه گیاهی متفاوت خواهد بود. تنش خشکی به‌عنوان یکی از عوامل مهم محدودکننده زراعت و رشد گیاهان مناطق خشک و نیمه‌خشک از جمله ایران محسوب می‌شود که بر مقدار تولیدات کشاورزی تأثیر منفی می‌گذارد، در چنین شرایطی کشت گیاهان دارویی ممکن است با تولید ماده مؤثره بیشتر، بازده اقتصادی بالاتری داشته باشد (Askari and Ehsanzadeh, 2015).

رادیکال‌های آزاد، واکنش‌گرهای بسیار قوی هستند که در طی تنش افزایش یافته و موجب آسیب به مولکول‌های دیگر شده و یا عملکرد آن‌ها را تغییر می‌دهند. گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از تنش‌های غیرزنده، دارای سیستم دفاعی با کارایی بالایی هستند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند (Smirnoff, 2005). این سیستم دفاعی شامل آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند آسکوربات، گلووتاتیون، توکوفرول و کاروتنوئیدها و آنزیم‌های سمیت‌زدایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز می‌باشد (Smirnoff, 2005). علت تنوع سیستم‌های دفاعی به این خاطر است که، انواع اکسیژن‌های واکنش‌زا در سلول‌ها و بخش‌های مختلف تولید شده از نظر ویژگی‌هایی، چون توانایی انتشار، حلالیت و تمایل به شرکت در واکنش با مولکول‌های بیولوژیک باهم متفاوت هستند.

تحقیقات نشان داده است که، ارتباط بسیار قوی بین میزان تحمل به تنش‌های اکسیداتیو ایجاد شده توسط تنش‌های محیطی و افزایش میزان غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان فتوسنتز کننده وجود دارد (Sairam and Srivastava, 2002). کاتالاز و پراکسیداز دو آنزیم مهم در مقابله با پراکسید هیدروژن می‌باشند. گزارش شده که پراکسیداز پس از کاتالاز در درجه دوم اهمیت در حذف پراکسید هیدروژن قرار دارد (Cook *et al.*, 2004). تولید کاتالاز در گیاهانی که تحت شرایط تنش قرار گرفته‌اند افزایش مقاومت گیاهان به شرایط تنش را به دنبال خواهد داشت (Guan *et al.*, 2009). در شرایط تنش خشکی میزان کاتالاز در گوجه‌فرنگی (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2010)، یونجه (Wang *et al.*, 2009) و بادام‌زمینی (Akcy *et al.*, 2010) افزایش پیدا کرده است.

آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز از مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در تبدیل پراکسید هیدروژن به آب می‌باشند. آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه گلوتاتیون-آسکوربات حضور دارد که این چرخه معمولاً در کلروپلاست، سیتوسل (Mittler, 2002)، پراکسی زوم (Del Rio *et al.*, 2006) و میتوکندری فعال می‌باشد. گیاهان برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو مقدار آنزیم آسکوربات پراکسیداز را افزایش می‌دهند. افزایش مقدار این آنزیم در شرایط تنش خشکی در گندم (Abdullah and Ghamdi, 2009)، زیتون (Sofa *et al.*, 2008) گزارش شده است. هم‌چنین در شرایط تنش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز افزایش پیدا کرده و از گیاه در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن محافظت می‌کند (Moussa and Abdel-Aziz, 2008). افزایش میزان آنزیم پراکسیداز در مواجهه با تنش در علف تال (گیاه آرابیدوپسیس) (Jung, 2004) و گندم (Shao *et al.*, 2007) گزارش شده است.

کلروفیل‌ها و رنگیزه‌های کمکی جمع‌آوری‌کننده نور، در غشای تیلاکوئیدی قرار دارند که انتقال انرژی به مجموعه‌های جمع‌آوری‌کننده و انتقال در مرکز واکنشی را تسریع می‌کند. هم‌چنین فتوسنتز تنها فرآیند زیستی مهمی است که قادر است از این انرژی بهره‌برداری کند (kafi *et al.*, 2009). مقدار کلروفیل برگ به‌عنوان یکی از مهم‌ترین معیارهای تعیین‌کننده فشار محیطی وارد بر گیاهان است که در شرایط تنش مقدار آن کاهش یافته و به دنبال آن میزان جذب نور توسط گیاه روند کاهشی پیدا خواهد کرد (Zarco-Tejada *et al.*, 2000). کاروتنوئیدها نیز به‌عنوان رنگدانه‌های فرعی، نقش جمع‌کننده نور فتوسنتز را بر عهده دارند و تا حدود زیادی از سلول‌ها در مقابل آثار زیان‌بار تنش نوری محافظت می‌کنند (Carter and Knapp., 2001). این رنگدانه‌ها نقش مهمی در جذب نور و هم‌چنین بازتاب نور از سطح برگ را برعهده دارند (Arnon and Sairam, 2002).

بابونه آلمانی گیاهی از تیره کاسنی و از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی شناخته شده است که بومی منطقه مدیترانه، اروپا و آسیای صغیر می‌باشد. اسانس آن آرام‌بخش و تحریک‌کننده گلبول‌های سفید

خون، تقویت‌کننده سیستم دفاعی بدن ضد باکتری گرم مثبت (استرپتوکوکوک و لاکتوباسیل)، ضد حساسیت، ضد اسپاسم از بین برنده نفخ و کولیک می‌باشد (Alexandra, 2005).

میزان کلروفیل در گیاه بابونه آلمانی در شرایط تنش خشکی به مقدار قابل توجهی نسبت به شرایط بدون تنش کاهش یافت (Pirzad *et al.*, 2009). نتایج نشان می‌دهد که، تنش خشکی، توانایی کاهش غلظت کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدهای بافت را دارد و این کاهش به‌طور عمده با تولید رادیکال‌ها در تیلاکوئید در ارتباط می‌باشد (Jaleel *et al.*, 2009). صفی‌خانی و همکاران (Safikhani *et al.*, 2007) در تحقیقات خود با اعمال تیمارهای ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی در گیاه بادرشبو نتیجه گرفت که بیش‌ترین عملکرد اسانس، قند محلول، کلروفیل a و کلروفیل کل به ترتیب مربوط به تیمارهای ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی بود. مطالعه فاتیان (Fathian, 2008) بر روی گیاه گلرنگ، نشان داد که تنش خشکی منجر به افزایش ۸۳ درصدی پرولین نسبت به حالت شاهد شده است، که این افزایش به تداوم رشد گیاه تا پایان دوره رشد کمک می‌کند.

راهکارهای متعددی برای کاهش میزان آسیب سلولی ناشی از تنش‌های غیرزنده و افزایش تحمل به آن وجود دارد که یکی از این راهکارها استفاده از مواد اسمولیت مانند پرولین، گلیسین بتائین، ترهالوز و غیره به‌صورت محلول پاشی می‌باشد؛ که به‌طور چشم‌گیری باعث کاهش اثرات مخرب تنش در گیاهان می‌شوند. از این میان کاربرد پرولین (برون‌زاد)، روش کارآمدی برای کاهش اثرات نامطلوب تنش‌ها بوده و میزان تأثیر محلول پاشی پرولین بر گیاهان، به گونه گیاهی، مرحله رشد گیاه، زمان استفاده و میزان غلظت پرولین بستگی دارد (Ashraf and Foolad, 2007). استفاده از اسید آمینه پرولین به‌صورت محلول پاشی در غلظت‌های کم تا حدود بسیار زیادی تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی را بهبود می‌بخشد (Deivanai *et al.*, 2011). درعین حال غلظت بالای پرولین در بسیاری از موارد برای گیاهان بوده و در مواردی نیز بر روی متابولیسم‌های حیاتی گیاهان اثرات منفی و جبران‌ناپذیر را بر جای می‌گذارد و باعث مهار رشد می‌شود (Nanjo *et al.*, 2003).

کارایما و همکاران (Karima *et al.*, 2005) در آزمایشی دریافتند که محلول پاشی اسیدهای آمینه باعث افزایش قابل توجه ارتفاع بوته، تعداد ساقه‌های فرعی، وزن تر و خشک گیاه بابونه می‌شود که این یافته مشابه یافته‌های (Attoa *et al.*, 2002) در گیاه بابونه است. محلول پاشی پرولین در شرایط تنش خشکی به‌طور قابل توجهی درصد و عملکرد اسانس را در گیاهان ریحان و بابونه افزایش داد (Gamal EL-Din 2005). محلول پاشی پرولین به‌طور قابل توجهی اثرات منفی تنش شوری بر درصد جوانه‌زنی، رشد و محتوای کلروفیل دو رقم گندم را کاهش داد (Talat *et al.*, 2013). خلیل و ال‌نومنی (Khalil and El-Noemani., 2012) در مطالعه دیگری که بر روی رشد، عملکرد و برخی از فعالیت‌های متابولیک در گیاه (*Lepidium sativum* L.) تحت فواصل مختلف آبیاری (۵، ۱۰ و ۱۵

روز) و محلول پاشی پرولین (۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار) در افزایش تحمل به خشکی انجام دادند، دریافتند که محلول پاشی پرولین باعث بهبود مقاومت گیاهان تحت سطوح مختلف کم آبی می شود. آزمایشی که کایا و همکاران (Kaya et al., 2007) بر روی گیاه خربزه در شرایط تنش شوری انجام دادند نشان داد که کاربرد پرولین خارجی تا حدود بسیار زیادی اثر تنش شوری را کاهش می دهد؛ و باعث افزایش عملکرد میوه، وزن خشک بوته، مقدار کلروفیل، تعداد روزنه و محتوای آب نسبی نسبت به شرایط تنش و عدم مصرف پرولین شده است. هوکو و همکاران (Hoque et al., 2007) در آزمایشی که بر روی تنباکو انجام دادند، دریافتند که استفاده از پرولین برون زاد به علت افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی، نقش مهمی در کاهش اثرات تنش ایفا می کند. علی و همکاران (Ali et al., 2007) در پژوهشی که بر روی ذرت انجام شد، بیان داشتند که تنش خشکی باعث کاهش رشد، میزان کلروفیل a و b شد. اما محلول پاشی پرولین در شرایط تنش خشکی، بهبود رشد و افزایش رنگدانه های فتوسنتزی را به دنبال داشت.

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف تنش کم آبی و کاربرد پرولین برون زاد بر ویژگی های بیوشیمیایی با بونه آلمانی و تعیین میزان مقاومت این گیاه در برابر سطوح مختلف کم آبی و این که آیا کاربرد پرولین برون زاد می تواند به عنوان روشی کارآمد برای کاهش اثرات نامطلوب تنش ها در گیاهان، مورد استفاده قرار گیرد. صورت پذیرفت.

مواد و روش ها

این آزمایش در بهار و تابستان سال ۱۳۹۱ در دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان با عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۳ دقیقه شرقی از نصف النهار گرینویچ با ارتفاع ۷ متر از سطح دریای آزاد با هدف بررسی اثر چهار سطح رژیم آبیاری (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد تخلیه رطوبت ظرفیت زراعی) و محلول پاشی با پرولین در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به صورت گلدانی اجرا شد. بذور تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان با قوه نامیه حدود ۹۵ درصد، سال ۱۳۹۰ در گلدان های کوچک (خاک گلدان مخلوطی به نسبت ۱:۱:۲ از خاک رس، کمپوست و ماسه و بافت لومی رسی با چگالی ظاهری ۱/۴۹ گرم بر سانتی متر مکعب و رسانایی الکتریکی ۱/۲۲ دسی زیمنس بر متر و هم چنین ظرفیت زراعی و نقطه پژمردگی خاک به ترتیب ۲۳ و ۱۰ درصد وزنی) با قطر متوسط شش و ارتفاع هشت سانتی متر کشت و سپس نشاءها در اردیبهشت ۱۳۹۱ به گلدان های با ارتفاع و قطر متوسط ۳۰ سانتی متر منتقل شدند. بوته های اضافه از استقرار کامل نشاءها تنک شدند؛ به گونه ای که

در هر گلدان دو بوته باقی گذاشته شد. میزان رطوبت و دمای محیط به کمک دستگاه رطوبت‌سنج و دماسنج استفاده شد.

تیمار محلول پاشی پرولین از شرکت مرک با درصد خلوص ۹۵ درصد به شکل پودر (محلول در آب)، در دو مرحله، ۳۰ روز پس از کشت بذر (مرحله دو تا سه برگی) قبل از انتقال به گلدان اصلی و پس از اعمال تنش کم‌آبی در مرحله ساقه‌رویی، در عصر و در هوای ملایم و صاف با استفاده از سم‌پاش دستی اعمال گردید؛ به طوری که برگ‌های گیاه کاملاً خیس شده و به‌منظور بهبود جذب برگی پرولین، از تریتون X100 با غلظت ۰/۰۱ درصد (Arab et al., 2017) استفاده شد. هم‌چنین تیمار کم‌آبی تا مرحله‌ی پایان گل‌دهی ادامه داشت. برای تعیین وضعیت رطوبتی خاک از TDR استفاده استفاده گردید. نمونه‌برداری نیز در مراحل گلدهی کامل انجام شد.

میزان پرولین به روش بتیس و همکاران (Bates et al., 1973) با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین میزان مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل کل و کاروتنوئید برگ از روش لیچتن‌تالر و ولبورن (Lichtenthaler and Wellburn, 1983) استفاده گردید. بدین منظور ۰/۱ گرم بافت تازه با کمک نیتروژن مایع در داخل هاون چینی آسیاب شده و به آن یک میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد اضافه گردید. محلول حاصل صاف شده و حجم آن به یک میلی‌لیتر رسانده شد و سپس جذب محلول صاف شده در طول موج‌های ۶۴۶/۲، ۶۴۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید، و با استفاده از روابط زیر مقدار کلروفیل و کاروتنوئید محاسبه شد.

$$\text{Chlorophyll a (mg/ml)} = 12.25(A_{663.2}) - 2.79(A_{646.8}) \quad (\text{رابطه ۱})$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/ml)} = 21.50(A_{646.2}) - 5.10(A_{663.2}) \quad (\text{رابطه ۲})$$

$$\text{Chlorophyll a+b (mg/ml)} = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b \quad (\text{رابطه ۳})$$

$$\text{Carotenoid (}\mu\text{g/ml)} = (1000(A_{470}) - 1.8(\text{Chl}_a) - 85.02(\text{Chl}_b)) / 198 \quad (\text{رابطه ۴})$$

در این روابط؛ رابطه ۱، رابطه ۲، رابطه ۳ و رابطه ۴ به ترتیب کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید را نشان می‌دهد. $A_{663.2}$ ، $A_{646.8}$ و A_{470} به ترتیب جذب در طول موج‌های ۶۴۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر هستند.

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش چینس و ماهلی (Chance and Maehly, 1955) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی (برای اندازه‌گیری فعالیت ویژه‌ی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاه در یک هاون سرد شده، با یک میلی‌لیتر بافر استخراج مخلوط و به‌طور کامل یکنواخت شد. بافر استخراج از پلی‌وینیل‌پیرولیدون یک درصد، تریتون X100 نیم درصد و بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH = ۷) تشکیل شده بود. عصاره‌ی حاصل با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در

دقیقه و در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتی‌فیوژ شد. بخش شفاف واقع در بالای عصاره برای سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به کار گرفته شد، با ۹۸۰ میکرولیتر از بافر فسفات حاوی پراکسید هیدروژن دو میلی مولار مخلوط و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر از راه اندازه‌گیری تجزیه پراکسید هیدروژن توسط اسپکتروفتومتر به صورت تغییرات جذب بر زمان ثبت شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی کاتالاز $39/4 \text{ Mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه و در نهایت بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه بیان شد.

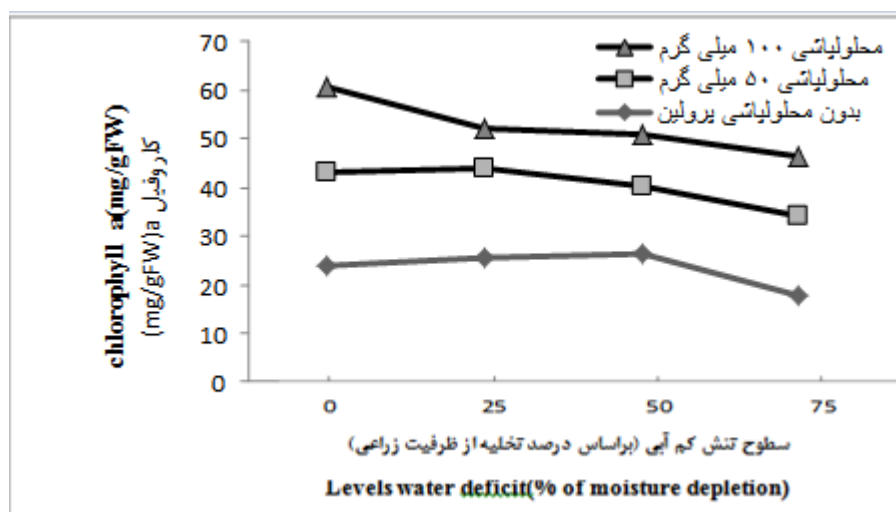
برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش ناکانو و آسادا (Nakano and Asada, 1981) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل: ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۷۷۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی مولار، ۱۰۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید پنج میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۰/۱ میلی مولار بود. سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرات جذب بر زمان (OD/min) در طول موج ۲۹۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی آسکوربات پراکسیداز $2/8 \text{ Mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه و در نهایت بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش سزار و همکاران (Cesar et al., 2010) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. ۴۹۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۵ مولار و ۴۹۰ میکرولیتر پیروکاتکول ۰/۲۰ مولار به ۲۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی اضافه شد. پس از بهم زدن مخلوط واکنش، تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر در مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت این آنزیم با استفاده از قانون بیرلامبرت و ضریب خاموشی ۲۶/۶ آنزیم پراکسیداز با پیش ماده پیروکاتکول بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از رویه‌های برنامه SAS نسخه ۹/۲ تجزیه شدند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی، ضریب همبستگی با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 انجام شد.

نتایج و بحث

کلروفیل a: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که سطوح تنش کم‌آبی، پرولین و برهم‌کنش آن‌ها بر میزان کلروفیل a تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۱). با افزایش سطح تنش کم‌آبی از مقدار کلروفیل a کاسته شد؛ درحالی‌که در همه سطوح تنش کم‌آبی بیشترین میزان کلروفیل a در محلول‌پاشی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پرولین به‌دست آمد (شکل ۱). برش‌دهی فیزیکی برهم‌کنش پرولین و تنش کم‌آبی بر صفت کلروفیل a نشان داد که همه سطوح کم‌آبی اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشتند

(جدول‌های ۲ و ۳). همچنین محلول پاشی پرولین نیز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود؛ که این امر نشان می‌دهد که محلول پاشی پرولین تا حدود زیادی می‌تواند اثر تنش خشکی را کاهش دهد (جدول ۱). نتایج همبستگی داده‌ها (جدول ۴) نشان داد که، بین کلروفیل a با کلروفیل کل ($r=0.990^{**}$)، نسبت کلروفیل a/b ($r=0.989^{**}$) و کاروتنوئید ($r=0.873^{**}$) همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳).



شکل ۱- برهم‌کنش تنش کم‌آبی و پرولین بر میزان کلروفیل a

Figure 1- Interaction effects of water deficit \times prolin application on chlorophyll a content

این نتایج با یافته‌های جونز و تاردیو (Jones and Tardieu., 1998) و سارکر و همکاران (Sarker *et al.*, 2005) مطابقت دارد. عباس‌زاده و همکاران (Abbaszadeh *et al.*, 2008) در پژوهشی به این نتایج دست یافتند که تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل داشته است، به طوری که بیشترین مقدار کلروفیل a در شرایط بدون تنش (شاهد) بوده است. به نظر می‌رسد که کاهش میزان کلروفیل a در اثر تنش خشکی، به علت افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن باشد، که این رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون (Wise and Naylor, 1989) و در نتیجه تجزیه این رنگیزه می‌شوند. سانتوز (Santos, 2004) گزارش کرد که، در روزهای اول بعد از تنش، فعالیت آنزیم کلروفیل‌از که باعث تخریب کلروفیل می‌شود، افزایش می‌یابد؛ ولی با گذشت زمان کاهش ساخت کلروفیل عامل اصلی کاهش کلروفیل می‌باشد.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر تنش کم آبی و محلول پاشی پرولین بر صفات پایونه المانی

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Chlorophyll a+b	کلروفیل a/b Chlorophyll a/b	کاروتنوئید Carotenoid	کاتالاز Catalase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	پراکسیداز Peroxidase	پرولین Proline
تنش Stress	3	37.20**	0.05 ^{ns}	36.35 ^{ns}	0.01*	0.60 ^{ns}	18.60**	775**	1.86**	0.251**
پرولین Prolin	2	375**	0.37**	591**	0.15**	2.65**	201**	9605**	0.22**	4.18**
تنش × پرولین Stress × Prolin	6	37.4**	0.13 ^{ns}	90.9**	0.02**	0.66 ^{ns}	4.10**	42.4 ^{ns}	0.03**	0.01 ^{ns}
خطا Error	24	1.01	0.09	21.3	0.004	10.7	0.44	19.1	0.0005	0.015
ضریب تغییرات CV(%)	-	5.77	12.2	15.3	4.3	19.3	16.8	9.25	4.30	10.7

ns, * and **: non-significant difference, significant difference at the level of five and percent probability, respectively. ns, * and **: پدترتیب عدم وجود اختلاف معنی دار و اختلاف معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۲- برش دهی برهم‌کنش تنش کم‌آبی در پرولین بر ویژگی‌های بیوشیمیایی بابونه آلمانی
Table 2- Slicing interaction effects of water deficit at prolin on biochemistry characteristics of German chamomil

منبع تغییرات S.O.V	شاهد	درجه آزادی Df	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل کل Chlorophyll a+ b	کلروفیل a/b Chlorophyll a/b	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase
Control		2	30.07**	42.2 ^{ns}	0.03 ^{ns}	20.8**	0.34**
Irrigation (25% of moisture depletion)	رژیم آبیاری (۵۰ درصد تخلیه رطوبت)	2	227**	477**	0.73*	49.2**	0.37**
Irrigation (50% of moisture depletion)	رژیم آبیاری (۵۰ درصد تخلیه رطوبت)	2	206**	320**	0.66*	55.6**	0.90**
Irrigation (75% of moisture depletion)	رژیم آبیاری (۷۵ درصد تخلیه رطوبت)	2	23.9**	23.6 ^{ns}	0.21 ^{ns}	87.5**	1.06**

ns, * and **: non-significant difference, significant difference at the level of five and percent probability, respectively.

جدول ۳- برش دهی برهم‌کنش پرولین در تنش کم‌آبی بر ویژگی‌های بیوشیمیایی بابونه آلمانی
Table 3- Slicing interaction effects of prolin at water deficit on biochemistry characteristics of German chamomil

منبع تغییرات S.O.V	شاهد	درجه آزادی Df	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل کل Chlorophyll a+ b	کلروفیل a/b Chlorophyll a/b	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase
عدم محلول پاشی Non- Spray		3	44.6**	38.7 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.48 ^{ns}	0.019**
محلول پاشی پرولین (۵۰ میلی گرم در لیتر) Prolin application (50 mg/L)		3	17.8**	41.1 ^{ns}	0.20 ^{ns}	5.71**	0.063**
محلول پاشی پرولین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) Prolin application (100 mg/L)		3	49.6**	138*	0.30 ^{ns}	20.6**	0.314**

ns, * and **: non-significant difference, significant difference at the level of five and percent probability, respectively.

جدول ۴- ضرایب همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده
Table 4- Correlation coefficients among measured traits

صفات Traits	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Chlorophyll a+b	کلروفیل a/b Chlorophyll a/b	کاروتنوئید Carotenoid	کاتالاز Catalase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	پرولین Proline
کلروفیل a Chlorophyll a	1							
کلروفیل b Chlorophyll b	0.245	1						
کلروفیل کل Chlorophyll a+ b	0.990**	0.379	1					
کلروفیل a/b Chlorophyll a/b	0.989**	0.103	0.959**	1				
کاروتنوئید Carotenoid	0.873**	0.591	0.919**	0.811**	1			
کاتالاز Catalase	-0.968**	-0.415	-0.984**	-0.933**	-0.918**	1		
آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	-0.972**	-0.343	-0.977**	-0.950**	-0.902**	0.984**	1	
پراکسیداز Peroxidase	-0.954**	-0.418	-0.971**	-0.922**	-0.927**	0.988**	0.994**	1
پرولین Proline	-0.963**	0.409	0.979**	-0.931**	-0.923**	0.990**	0.997**	1

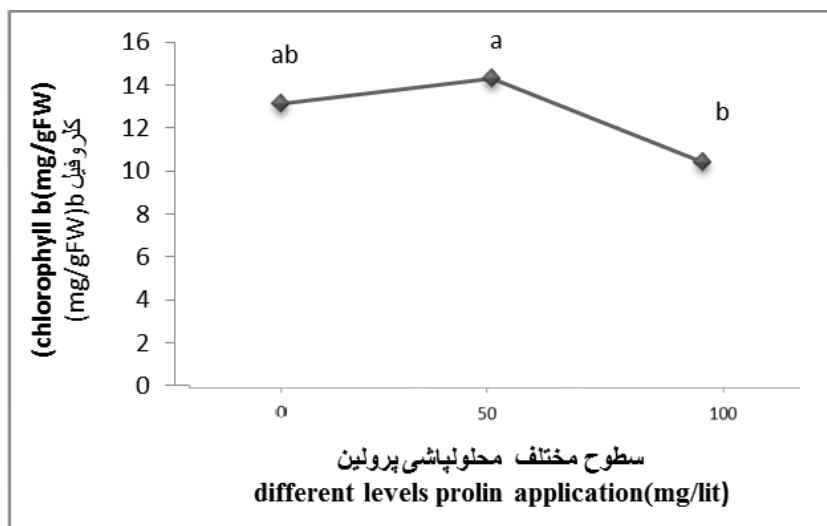
* and **: significant at 0.05 and 0.01 probability level, respectively.

* و **: پدیده‌های وجود اختلاف معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

در شرایط کمبود آب، غلظت اسیدآمینه پرولین افزایش می‌یابد از آنجایی که کلروفیل و پرولین هر دو از پیش ماده مشترکی به نام گلوتامات سنتز می‌شوند. بنابراین می‌توان گفت افزایش سنتز پرولین در شرایط تنش خشکی به کاهش سنتز کلروفیل منجر می‌شود. اسپینال و پیلگ (Aspinall and Paleg., 1981) و هم‌چنین اگرت و توینی (Egert and Tevini., 2002) اظهار داشتند که کاهش کلروفیل که در گیاهان تحت تنش خشکی مشاهده می‌شود، یک علامت مشخصه‌ی تنش اکسیداتیو است.

کلروفیل b: نتایج تجزیه وایانس داده‌ها حاکی از معنی‌داری اثر ساده سطوح مختلف محلول پاشی پرولین بر میزان کلروفیل b بود (جدول ۱). مقایسه میانگین میزان کلروفیل b در سطوح مختلف محلول پاشی پرولین نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل b در سطح محلول پاشی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به دست آمده است (شکل ۲). نتایج همبستگی داده‌ها نشان داد که، بین کلروفیل b با کاروتنوئید ($r=0.591^*$) همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴).

تنش خشکی باعث کاهش میزان کلروفیل a و b می‌شود. تنش کم‌آبی، با افزایش پراکسیداسیون در غشاء کلروپلاست‌ها و تیلاکوئیدها، هم‌چنین خسارت به پروتئین‌های متصل به فتوسیستم‌ها (Lawlor, 2002) تا حدود زیادی باعث کاهش میزان کلروفیل a، b و کاهش ظرفیت فتوسنتزی می‌شود. در واقع کاهش میزان کلروفیل می‌تواند به واسطه کاهش سنتز کلروفیل و تخریب آن در گیاه باشد. تخریب مولکولی کلروفیل‌ها در گیاهان تحت شرایط تنش می‌تواند به علت جدا شدن زنجیره فیتولی از حلقه پورفیرین در اثر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا فعالیت آنزیم کلروفیلاز (Parvaiz and Satyawati., 2008) و هم‌چنین افزایش مقدار اتیلن در شرایط تنش باشد. در این پژوهش محلول پاشی پرولین، باعث افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاه شد، که با نتایج علی و همکاران (Ali et al., 2007) مطابقت دارد. در واقع محلول پاشی پرولین باعث افزایش بیوسنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی و حفاظت از رنگدانه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش می‌شود. هم‌چنین محلول پاشی پرولین در گیاهان باعث افزایش هدایت روزنه‌ای شده و میزان دی‌اکسیدکربن را در فضای روزنه افزایش می‌دهد که به دنبال آن میزان فتوسنتز گیاه افزایش یافته و افزایش عملکرد را به دنبال خواهد داشت (Ali et al., 2007).

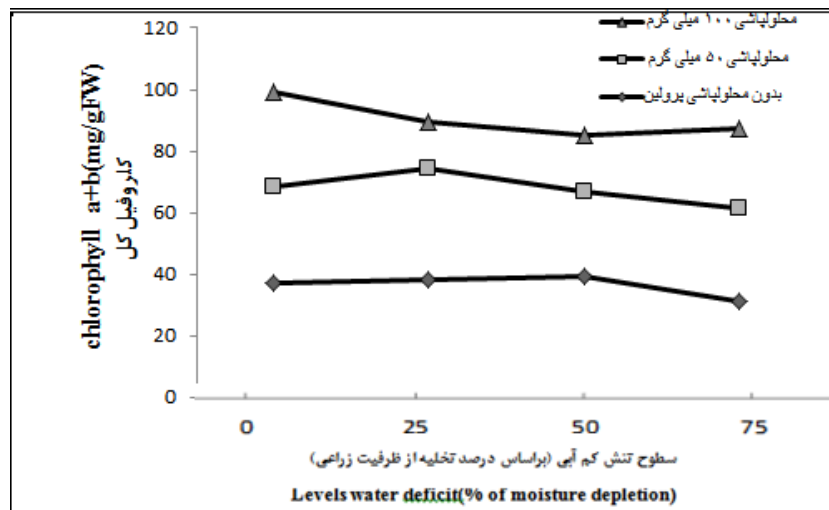


شکل ۲- تأثیر سطوح محلولپاشی پرولین بر مقدار کلروفیل b

Figure 2- Effects of different levels prolin application on chlorophyll b content

کلروفیل کل: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد (جدول ۱) که اثر پرولین و برهم‌کنش آن با تنش کم‌آبی بر کلروفیل کل معنی‌دار بوده است. با افزایش سطوح تنش کم‌آبی میزان کلروفیل کل کاهش یافت و بیشترین مقدار کلروفیل کل در تیمار محلولپاشی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد (شکل ۳). برش‌دهی فیزیکی برهم‌کنش پرولین و تنش کم‌آبی بر صفت کلروفیل کل نشان داد که سطوح کم‌آبی ۲۵ و ۵۰ درصد تخلیه از ظرفیت زراعی اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشته است (جدول‌های ۲ و ۳). همچنین محلولپاشی ۱۰۰ میلی‌گرم پرولین در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود که بیانگر این است که تا حدودی می‌تواند اثر تنش خشکی را کاهش دهد. نتایج همبستگی داده‌ها نشان داد که بین کلروفیل کل با نسبت کلروفیل a/b ($r=0.959^{**}$) و کاروتنوئید ($r=0.919^{**}$) همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴).

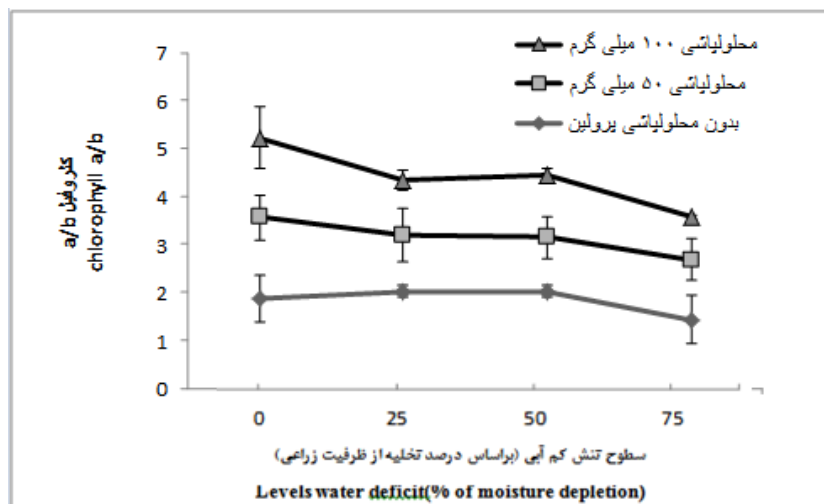
در شرایط کمبود آب به‌طور قابل توجهی میزان کلروفیل و ظرفیت فتوسنتزی کاهش پیدا می‌کند. که علت این کاهش در ظرفیت فتوسنتزی، می‌تواند به‌علت بسته شدن روزنه‌ها و یا از طریق اختلال و آسیب به پروتئین‌های ساختاری که در فتوسیستم‌ها به‌کار رفته‌اند؛ باشد (Lawlor, 2002)، در حالی که محلولپاشی پرولین، می‌تواند باعث افزایش هدایت روزنه‌ای شده و میزان دی‌اکسیدکربن را افزایش دهد و در نتیجه فتوسنتز افزایش یابد (Ali et al., 2007).



شکل ۳- برهم‌کنش تنش کم‌آبی و پرولین بر میزان کلروفیل کل

Figure 3- Interaction effects of water deficit × prolin application on chlorophyll a+b content

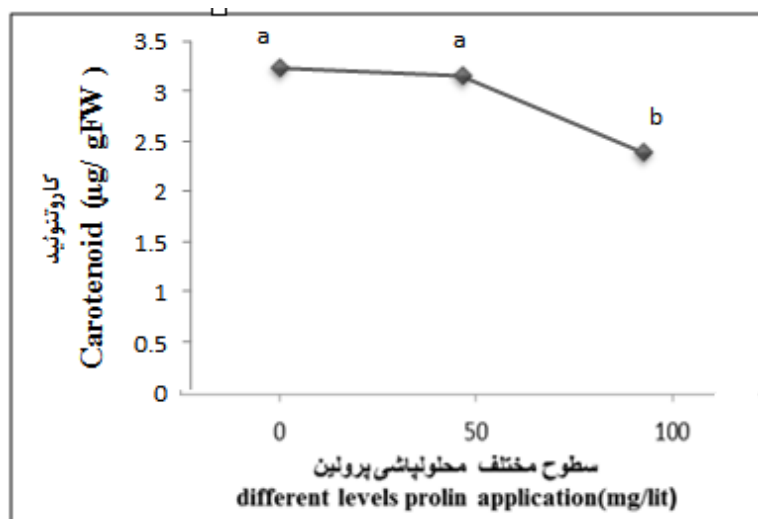
نسبت کلروفیل a/b: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تنش کم‌آبی، پرولین و برهم‌کنش سطوح کم‌آبی در پرولین بر نسبت کلروفیل a/b معنی‌دار بود (جدول ۱). کمترین میزان نسبت کلروفیل a/b در سطح ۷۵ درصد تخلیه براساس ظرفیت زراعی به‌دست آمد و محلول‌پاشی پرولین تا حدود زیادی اثر تنش کم‌آبی را کاهش داد (شکل ۴). برش‌دهی فیزیکی برهم‌کنش پرولین و تنش کم‌آبی بر صفت کلروفیل a/b نشان داد که سطوح کم‌آبی ۲۵ و ۵۰ درصد تخلیه از ظرفیت زراعی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد (جدول‌های ۲ و ۳). نتایج همبستگی داده‌ها نشان داد که بین نسبت کلروفیل a/b ($r=0.959^{**}$) با کاروتنوئید ($r=0.811^{**}$) همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت (جدول ۴). در شرایط تنش خشکی نسبت کلروفیل a/b افزایش یافت، به‌عبارت دیگر تنش خشکی، غلظت کلروفیل b را بیشتر از کلروفیل a کاهش داد. نتایج این مطالعه با نتایج اشرف و همکاران (Ashraf *et al.*, 1994) و استایل و همکاران (Estil *et al.*, 1991) مغایرت داشت.



شکل ۴- برهم کنش تنش کم آبی و پرولین بر نسبت کلروفیل a/b

Figure 4- Interaction effects of water deficit \times prolin application on chlorophyll a/b content

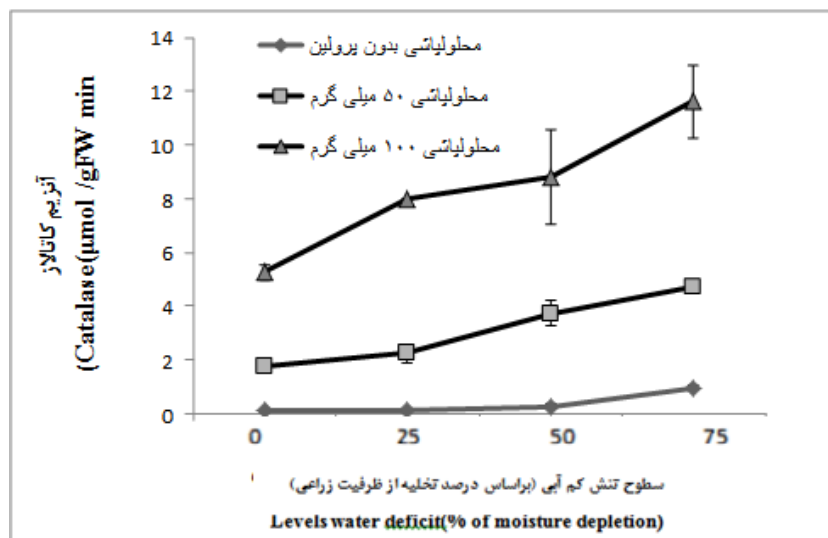
کاروتنوئید: نتایج تجزیه وایانس داده‌ها حاکی از معنی‌داری اثر پرولین بر کاروتنوئید بود (جدول ۱). مقایسه میانگین کاروتنوئید در سطوح مختلف محلول‌پاشی پرولین نشان داد که بیشترین مقدار در سطح صفر (عدم) محلول‌پاشی و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد (شکل ۵). در تنش‌های شدید، مقدار کاروتنوئید که به‌عنوان حمایت‌کننده‌ای برای کلروفیل‌ها در برابر اکسیداسیون نوری به‌شمار می‌رود؛ افزوده می‌شود تا مانع تخریب بیشتر کلروفیل‌ها شود. از آنجائی‌که محلول‌پاشی پرولین باعث افزایش بیوسنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی و حفاظت از رنگدانه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش می‌شود (Ali *et al.*, 2007). استنباط می‌شود؛ شاید محلول‌پاشی پرولین تا حدود زیادی اثر تنش کم‌آبی را کاهش داده و در نتیجه میزان کاروتنوئید در سطوح مختلف کم‌آبی اختلاف معنی‌داری را نشان نداده است.



شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف محلول پاشی پرولین بر کاروتنوئید
Figure 5- Effects of different levels prolin application on carotenoid content

آنزیم کاتالاز: مقایسه میانگین داده‌های برهم‌کنش تنش کم‌آبی در پرولین نشان داد که میزان آنزیم کاتالاز تحت شرایط کم‌آبی افزایش پیدا کرد (شکل ۶). برش‌دهی فیزیکی برهم‌کنش پرولین و تنش کم‌آبی بر صفت آنزیم کاتالاز نشان داد که همه سطوح کم‌آبی اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر میزان آنزیم کاتالاز داشته است و در این شرایط محلول پاشی پرولین تأثیر زیادی نداشت (جدول‌های ۲ و ۳). محلول پاشی در هر دو سطح (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). نتایج همبستگی داده‌ها نشان داد که بین کاتالاز با آسکوربات پراکسیداز ($r=0.984^{**}$)، پراکسیداز ($r=0.988^{**}$) و پرولین ($r=0.990^{**}$) همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴).

میتلر (Mittler, 2002) گزارش کرد که سنتز آنزیم کاتالاز، پاسخ سازگار یافته در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشد. برش‌دهی فیزیکی برهم‌کنش پرولین و تنش کم‌آبی بر صفت آنزیم کاتالاز نشان داد که همه سطوح کم‌آبی اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد، داشته است (جدول ۳). افزایش پرولین درون‌زاد در شرایط تنش کم‌آبی، علاوه بر حفاظت از آنزیم‌ها، ساختمان سه بعدی پروتئین‌ها و غشاء، انرژی لازم برای رشد را در شرایط کم‌آبی تأمین کرده و به تحمل گیاهان در چنین شرایطی کمک می‌کند (Hoque *et al.*, 2007).

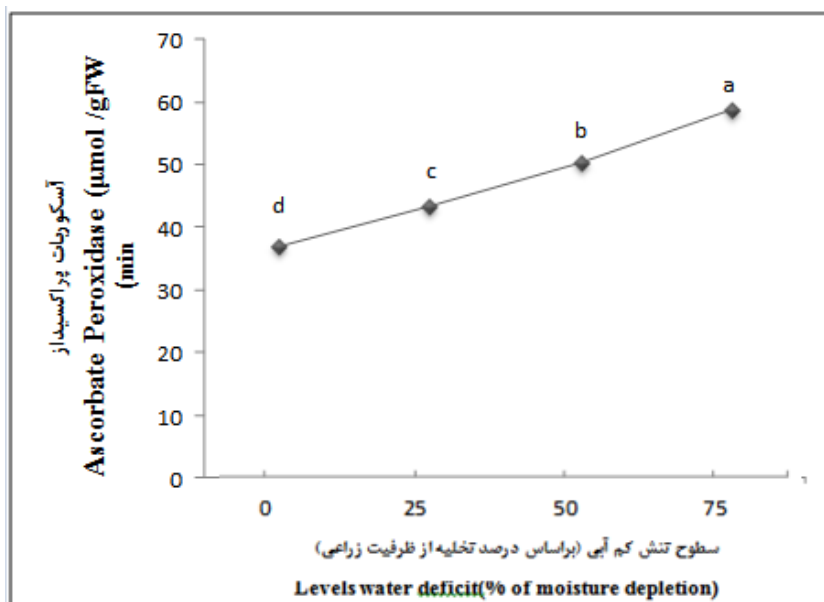


شکل ۶- برهم کنش تنش کم آبی و پرولین بر مقدار کاتالاز

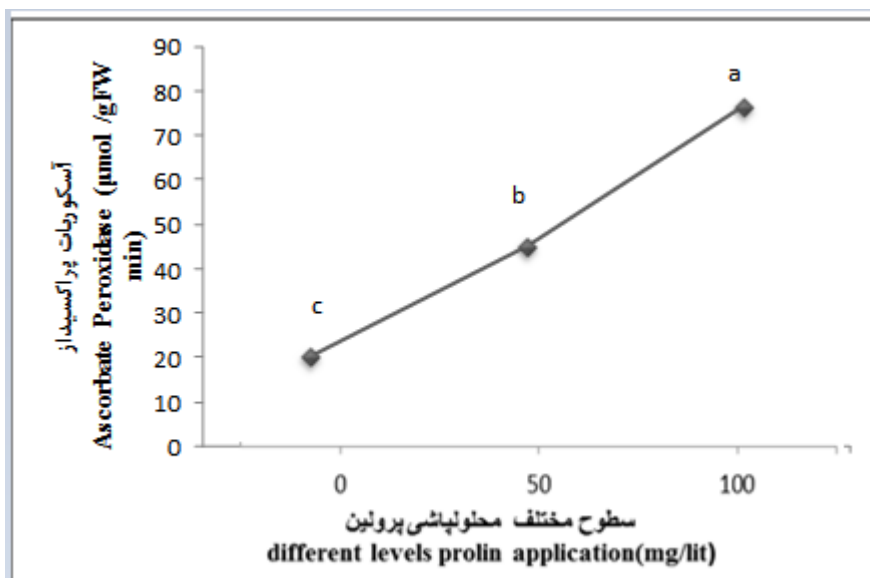
Figure 6- Interaction effects of water deficit × prolin application on catalase content

آنزیم آسکوربات پراکسیداز: نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده تنش کم آبی نشان داد که با افزایش سطوح تنش، میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش یافته است (شکل ۷). هم چنین با افزایش سطوح محلول پاشی پرولین مقدار آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش چشم گیری پیدا کرد (شکل ۸). نتایج همبستگی داده ها نشان داد که بین آسکوربات پراکسیداز با پراکسیداز ($r=0.994^{**}$) و پرولین ($r=0.997^{**}$) همبستگی مثبت و معنی داری وجود دارد (جدول ۴).

آنزیم های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز نقش موازی و مشابهی را در سیستم دفاعی گیاه ایفا می کنند و وظیفه هر سه آنزیم فوق سم زدایی و تجزیه پراکسید هیدروژن تولید شده در سلول می باشد (Ariano *et al.*, 2005). در مطالعه حاضر میزان آنزیم آسکوربات اکسیداز تحت شرایط تنش افزایش یافت که با نتایج شارما و دویی (Sharma and Dubey., 2005) و سیرام و همکاران (Sairam *et al.*, 2001) مطابقت دارد. به طور کلی در شرایط تنش خشکی رونویسی از برخی ژن های مربوط به آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند گلوکاتایون ردوکتاز یا آسکوربات پراکسیداز برای بهبود وضعیت گیاه در چنین شرایطی، افزایش پیدا می کند که نقش مهمی در کاهش گونه های اکسیژن فعال و آسیب های ناشی از آن، ایفا می کند (Ratnayaka *et al.*, 2003).



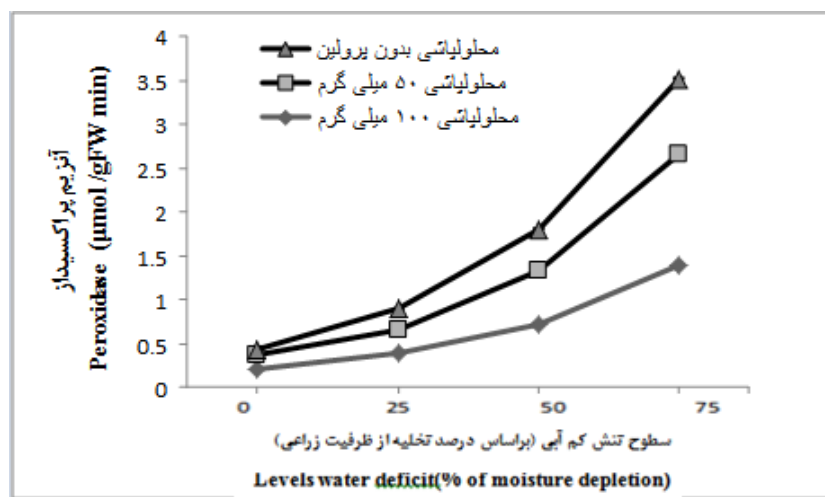
شکل ۷- تأثیر سطوح مختلف تنش کم آبی بر مقدار آسکوربات پراکسیداز
 Figure 7- Effects of different levels water deficit on ascorbate peroxidase content



شکل ۸- تأثیر سطوح مختلف محلول پاشی پرولین بر مقدار آسکوربات پراکسیداز
 Figure 8- Effects of different levels prolin application on ascorbate peroxidase content

آنزیم پراکسیداز: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تنش کم‌آبی و پرولین و برهم‌کنش آن‌ها بر میزان آنزیم پراکسیداز معنی‌دار بوده است (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌های برهم‌کنش تنش کم‌آبی در پرولین نشان داد که میزان آنزیم پراکسیداز تحت شرایط کم‌آبی افزایش پیدا کرد (شکل ۹). برش‌دهی فیزیکی برهم‌کنش پرولین و تنش کم‌آبی بر آنزیم پراکسیداز نشان داد که همه سطوح کم‌آبی اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشته‌اند و در این شرایط محلول‌پاشی پرولین تأثیر زیادی نداشته است (جدول‌های ۲ و ۳).

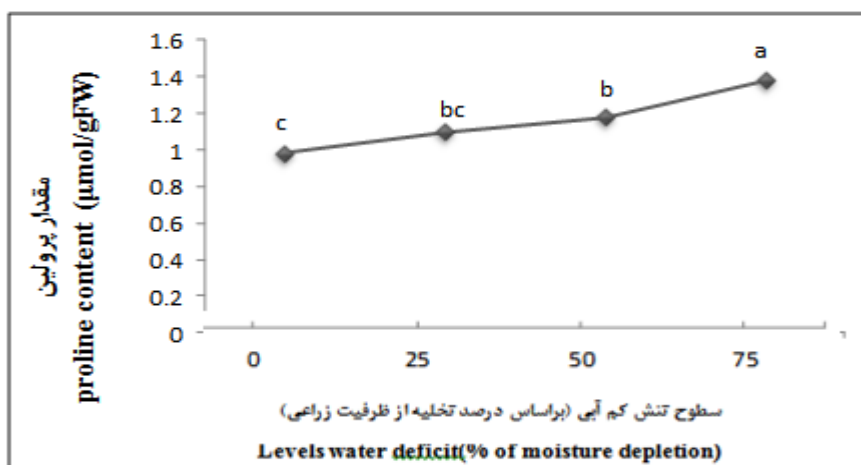
بین سطوح مختلف محلول‌پاش پرولین در هر سه سطح اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۵)؛ که نتایج به‌دست آمده با نتایج حیات و احمد (Hayat and Ahmad., 2007)، ژانگ (Jung, 2004) و بای و سوی (Bai and Sui., 2006) مطابقت دارد. تنش خشکی موجب القاء تنش اکسیداتیو در گیاهان شده که نتیجه آن افزایش ترکیبات گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد. که در این شرایط فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند پراکسیداز و کاتالاز افزایش می‌یابد. گیاهان می‌توانند از طریق القاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، به طیف وسیعی از تنش‌ها پاسخ دهند. هم‌چنین افزایش پراکسیداز در شرایط تنش، از طریق لیگینی شدن دیواره سلولی تا حدود زیادی می‌تواند خسارت ناشی از تنش و آسیب‌های اکسیداتیو را کاهش دهد (Moussa and Abdel-Aziz., 2008).



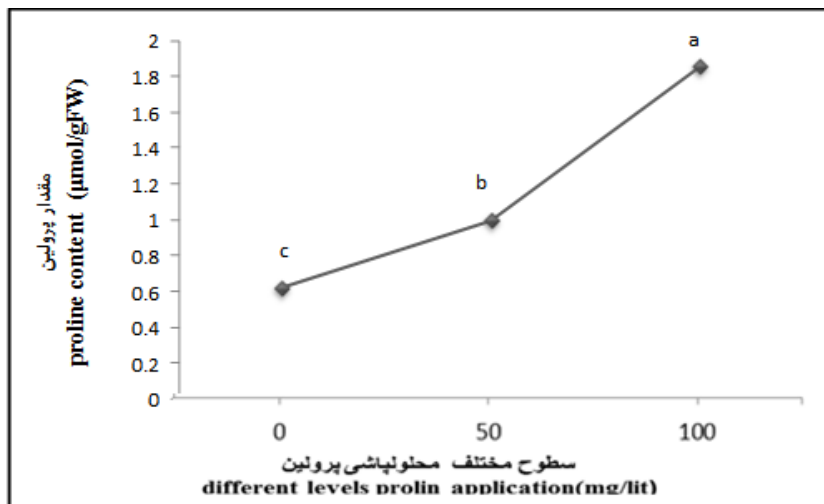
شکل ۹- برهم‌کنش تنش کم‌آبی و پرولین بر مقدار پراکسیداز

Figure 9- Interaction effects of water deficit × prolin application on peroxidase

میزان پرولین: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تنش کم‌آبی و پرولین بر میزان پرولین معنی‌دار بوده است (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده تنش کم‌آبی نشان داد که با افزایش شدت تنش، میزان پرولین افزایش پیدا می‌کند (شکل ۱۰). مقایسه اثرات ساده محلول پاشی پرولین نشان داد که بیشترین میزان پرولین در سطح محلول پاشی ۱۰۰ میلی‌گرم پرولین به‌دست آمده است (شکل ۱۱). عمده‌ترین راهکار تحمل به تنش در گیاهان تولید یکسری املاح آلی سازگار می‌باشد. این املاح با وزن مولکولی کم، ترکیبات بسیار مهمی هستند که حتی در غلظت‌های بالای سیتوزولی هم برای گیاهان غیرسمی هستند. در شرایط تنش میزان پرولین افزایش نشان داد که، با نتایج عبدالعزیز و همکاران (Abd EL-Aziz *et al.*, 2006) مطابقت دارد. نتایج نشان می‌دهد که افزایش پرولین در شرایط تنش خشکی، نیازمند مصرف انرژی می‌باشد که در صورت ادامه روند تولید پرولین، میزان عملکرد گیاه کاهش پیدا می‌کند. حبیبی و همکاران (Habibi *et al.*, 2010) اظهار داشتند که افزایش پرولین در طی تنش خشکی ممکن است به‌خاطر تجزیه‌ی پروتئین‌ها باشد. فاروق و همکاران (Farooq *et al.*, 2009) بیان نمودند که در شرایط تنش کم‌آبی و در نتیجه تجمع مواد محلول، پتانسیل اسمزی سلول‌ها کاهش می‌یابد که این حالت آب را به داخل سلول جذب و به حفظ حالت تورگر کمک می‌کند. با تدبیر تعدیل اسمزی، فعالیت‌های سیتوپلاسمی و اندامک‌ها، به گیاه کمک می‌کند تا به‌صورت کارآمدتری بتواند دوره رشد، فتوسنتز و تسهیم آسمیلات را تا پر شدن دانه به انجام برساند. افزایش غلظت و محتوای پرولین تحت شرایط تنش کم‌آبی ممکن است نشان دهنده نقش احتمالی این اسید آمینه در تنظیم اسمزی باشد.



شکل ۱۰ - تأثیر سطوح مختلف تنش کم‌آبی بر محتوای پرولین
Figure 10- Effects of different levels water deficit on proline content



شکل ۱۱- تأثیر سطوح مختلف محلولپاشی پرولین بر محتوای پرولین
Figure 11- Effects of different levels prolin application on proline content

نتیجه گیری

استفاده از پرولین برونزاد به علت افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی شامل (آنزیمهای کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز) و افزایش میزان پرولین گیاه، نقش مهمی در کاهش مقدار رادیکالهای آزاد اکسیژن (هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و سوپراکسید) تولید شده تحت شرایط تنش خشکی، ایفا می کند. محلولپاشی پرولین با افزایش بیوسنتز و حفاظت از رنگدانههای فتوسنتزی در شرایط تنش، میزان کلروفیل را افزایش می دهد. از این رو می توان پیشنهاد کرد که کاربرد پرولین برونزاد به عنوان یک عامل دفاعی در گیاهان به صورت محلولپاشی در شرایط تنش، می تواند قدم موثری در جهت صرفه جویی در مصرف آب با توجه به بحران کم آبی در کشاورزی بردارد. و با کاهش میزان خسارت ناشی از تنش کم آبی، افزایش عملکرد را به دنبال داشته باشد.

منابع

- Abbaszadeh B., Sharifi ashourabadi E., Lebaschi M.H., Naderi hajibagher M., Moghadami F. 2008. The effect of drought stress on proline contents, soluble sugars, chlorophyll and relative water contents of balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 23: 504-513.
- Abd EL-Aziz N.G., Mazher Azz A.M., EL-Habba E. 2006. Effect of foliar spraying ascorbic acid on growth and chemical constituents of Khaya

- senegalensis growth under salt condition. American Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences, 3: 207-214.
- Abdullah A., Ghamdi A.L.A. 2009. Evaluation of oxidative stress in two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in response to drought. International Journal Agricultural and Biological, 11: 7-12.
- Akcaay U.C., Ercan O., Kavas M., Yildiz L., Oktem H.A., Yucel M. 2010. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. Plant Growth Regulation, 61 (1): 21-28.
- Alexandra S. 2005. German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) population morphological and chemical diversity. Budapest Doktorin Thesis, Budapest University, Department of Horticulture, 135 p.
- Ali Q., Ashraf M., Athar H.R. 2007. Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions. Pakistan Journal of Botany, 39: 1133-1144.
- Arab S., Firoozabadi M., Gholami A., Aghari H.R., Rahimi M. 2017. Effect of ascorbic acid and sodium nitroprusside associating on protein content, grain yield and some traits of safflower under irrigation stress. Journal of Crop Production, 9 (1): 69-87.
- Ariano S., Bartolomeo D., Cristos X., Andras M. 2005. Antioxidant defenses in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. Functional Plant Biology, 32: 45-53.
- Arnon A., Sairam R.K. 2002. Oxidative stress and anti oxidative systems in plants. Current Science, 82: 1227-1238.
- Ashraf M., Foolad M.R. 2007. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. Environmental and Experimental Botany, 59: 206-216.
- Ashraf M.Y., Azmi A.R., Khan A.H., Ala S.A. 1994. Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat. Acta Physiologiae Plantarum, 16: 185-191.
- Askari E., Ehsanzadeh P. 2015. Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid and their interactive effects on physiological characteristics of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) genotypes. Acta Physiologiae Plantarum, 37: 2-14.
- Aspinall D., Paleg I.G. 1981. Proline accumulation: physiological aspects. Physiology and biochemistry of drought resistance. Academic Press. Sydney, Pp: 205-241.
- Attoa G.E., Wahba H.E., Frahat A.A. 2002. Effect of some amino acids and sulphur fertilizers on growth and chemical composition of *Iberis amara* L. plant. Egyptian Journal of Horticultural, 29: 17-37.

- Bai L.P., Sui F.G. 2006. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. *Pedosphere Journal*, 16: 326-332.
- Bates L.S., Waldran R.P., Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water studies. *Plant Siol*, 39: 205-207.
- Carruba A., LaTorre R., Matranga A. 2002. Cultivation trials of aromatic and medicinal plants in semiarid Mediterranean environment. *Acta Horticultural*, 576: 207-216.
- Carter A.C., Knapp A.K. 2001. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *American Journal of Botany*, 88: 677-684.
- Cesar Ferreira L., Catarina Cataeo A., Ramazzini Remaeh M., Corniani N., Defumis T., Andreode Souza Y., Scavroni J., Jose B. 2010. Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in Soybean Plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 47-54.
- Chance B., Maehly A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymologist*, 11: 764-755.
- Cook D., Fowler S., Fiehnand O., Etsval A. 2004. prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low temperature metabolome of arabidopsis. *Plant Biology*, 101: 15243-8.
- Deivanai S., Xavier R., Vinod V., Timalata K., Lim O.F. 2011. Role of exogenous proline in ameliorating salt stress at early stage in two rice cultivars. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 7 (4): 157-174.
- Del Rio L., Sandalio L., Corpas F., Palma J., Barroso J. 2006. Reactive oxygen specie and reactive nitrogen species in paroxysms. Production scavenging and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141: 330-335.
- Egert M., Tevini M. 2002. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany*, 48: 43-49.
- Estill K., Delany R.H., Smith W.K., Ditterline R.L. 1991. Water relations and productivity of alfalfa leaf chlorophyll variants. *Crop Science*, 31: 1229-1233.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. 2009. Plant drought stress effevts, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29: 185-212.
- Fathian S. 2008. Physiological limitations to safflower photosynthesis under two different moisture regimes. M.Sc. Dissertation, Isfahan University of Technology, Iran. (In Persian).
- Gamal EL-Din K.M., Abd EL-Wahed M.S.A. 2005. Effect of some amino acids on growth and essential oil content of chamomile plant. *International Journal of Agriculture and Bioogy*, 7 (3): 376-380.

- Guan Z. Q., Chai T., Zhang Y.X., Xu J., Wei W. 2009. Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. *Chemosphere*, 76: 623-630.
- Habibi D., Ardakani M.R., Mahmoudi A., Asgharzadeh A. 2010. Effects of super absorbent polymer and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and oxidative damage of maize under drought stress. *International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Pp: 253-257.
- Hayat S., Ahmad A., 2007. *Salicylic Acid: A Plant Hormone*, Springer. Pp: 97-99.
- Hoque M.A., Okuma E., Banu M.N.A., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata N. 2007. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *Journal of Plant Physiology*, 164: 553-561.
- Jaleel C.A., Manivannan P., Wahid A., Farooq M., Al-Juburi H.J., Somasundarm R., Panneersel Vam R. 2009. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11 (1): 100-105.
- Jones H.G., Tardieu F. 1998. Modeling water relations of horticultural crops: a review. *Scientia Horticulture*, 74: 21-46.
- Jung S. 2004. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science*, 166: 459-466.
- Kafi M., Zand E., Kamkar B., Mahdavi Damghani A., Abbasi F., Sharifi H.R. 2009. *Plant Physiology*, 265 p. (In Persian).
- Karima M., EL-DIN Gamal., Abdel-wahed M.S.A. 2005. Effect of some amino acids on growth and essential oil content of chamomile plant. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15 (3): 376-380.
- Kashfi Bonab A. 2010. Relative economic advantage cultivation and trade of medicinal plants in Iran and its value on world markets. *Journal of Evaluation of Commerce*, 8 (44): 67-78.
- Kaya C., Levent Tuna A., Ashraf M., Altunlu H. 2007. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 397-403.
- Khalil S.E., El-Noemani A.A. 2012. Effect of irrigation intervals and exogenous proline application in improving tolerance of garden cress plant (*Lepidium sativum* L.) to water stress. *Journal of Applied Sciences Research*, 8 (1): 157-167.
- Lawlor D.W. 2002. Limitation to photosynthesis in water stressed leaves: stomata versus metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, 89. 1-15.
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11: 591-592.

- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Annual Review of Plant Science*, 7: 405-415.
- Moussa H., Abdel-Aziz S.M. 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*, 1: 31-36.
- Nakano Y., Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22: 867-880.
- Nakhai A., 2011. Investment capabilities in the production of medicinal herbs to create jobs and economic prosperity in Kerman province. *National Conference on Employment of Graduates of Agriculture and Natural Resources*, 11 p.
- Nanjo T., Fujita M., Seki M., Kato M., Tabata S., Shinozaki K. 2003. Toxicity of free proline revealed in an arabidopsis TDNA- agged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiology*, 44: 541-548.
- Parvaiz A., Satyawati S. 2008. Salt stress and Phyto-biochemical responses of plants. *Plant Soil Environment*, 54: 89-99.
- Pirzad A., Alyari H., Shakiba M. R., Zehtab-Salmasi S., Mohammadi A. 2009. Effect of water stress on chlorophyll amounts in German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Pp. 315-317.
- Ramawat K.G., Dass S., Mathur M. 2009. The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potential of Medicinal Plants. In: Ramawat K.G. (Ed.), *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Pp: 7-32.
- Ratnayaka H.H., Molin W.T., Sterling T.M. 2003. Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2293-2305.
- Safikhani F., Heydari Sharifabad H., Syadat A., Sharifi Ashorabadi A., Syednedjad M. 2007. The effect of drought stress on percentage and yield of essential oil and physiological characteristics of *Deracocephalum moldavica* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 23 (1): 86-99.
- Sairam R.K., Chandrasekhar V., Srivastava G.C. 2001. Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their response to water stress. *Biologia Plantarum*, 44: 89-94.
- Sairam R.K., Srivastava G.C. 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*, 162: 897-904.
- Sanchez-Rodriguez E., Rubio-Wilhelmi M., Cervilla L.M., Blasco B., Rios J.J., Rosale M.A.S., Romero L., Ruiz J.M. 2010. Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science*, 178: 30-40.
- Santos C.V. 2004. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Science Horticulture*, 103: 93-99.

- Sarker B.C., Hara M., Uemura M. 2005. Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress. *Science Horticulture*, 103: 387-402.
- Shao H.B., Chu L. Y., Wu G., Zhang J.H., Lu Z.H., Hu Y.C. 2007. Changes of Some anti-oxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. *Colloids Surf*, 54. 143-149.
- Sharma P., Dubey R.S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 46: 209-221.
- Smirnoff N. 2005. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing Ltd, OxfordUK, Pp: 53-86.
- Sofo A., Manfreda S., Dichio B., Xiloyannis, C. 2008. The Olive Tree: A paradigm for drought tolerance mediterranean climates. *Hydrology and Earth System Sciences*, 12: 293-301.
- Talat A., Nawaz K., Hussian K., Hayat Bhatti K. 2013. Foliar application of proline for salt tolerance of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World Applied Sciences Journal*, 22 (4): 547-554.
- Wang W.B., Kim Y.H.S., Lee H., Kim K.Y., Deng X.P., Kwak S.S. 2009. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 570-577.
- Wise R.R., Naylor A.W. 1989. Chilling enhanced photo-oxidation, the peoxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrasructure. *Plant physiology*, 83. 278-282.
- Zarco-Tejada P.J., Miller J.R., Mohammad G.H., Noland T.L., Sampson P.H. 2000. Chlorophyll fluorescence effects on vegetation apparent reflectance. *Remote Sensing Environment*, 74: 596-60.