



Effects of Drought Stress and Re-Irrigation at the Flowering Stage on the Physiological and Biochemical Responses and Yield in Promising Lentil Lines

Solmaz Azizi ¹ | Nasser Zare^{2✉} | Parisa Sheikhzadeh ³ | Javanshir Azizi Mobser ⁴ | Rahmatollah Karimizadeh⁵

1. Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2. Corresponding Author, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: nzare@uma.ac.ir
3. Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
4. Department of Water Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
5. Dryland Agricultural Research Institute, AREEO, Gachsaran, Iran.

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: July 15, 2023

Received in revised form:

September 7, 2023

Accepted: September 10, 2023

Published online: March 20, 2024

Keywords:

Antioxidant enzymes, chlorophyll, drought stress, peroxidase, recovery.

ABSTRACT

Rapid and efficient recovery from water deficit stress may be one of the key determinants of drought adaptation in plants. The present study was designed to investigate drought stress tolerance and recovery in promising lentil lines at the flowering stage. For this, a factorial experiment based on the completely randomized design was conducted with three replications. The factors included 6 lentil lines, drought stress (control (irrigation at 80% FC or 20% moisture depletion), medium stress (irrigation at 55% FC or 45% moisture depletion), and severe stress (irrigation at 30% FC or 70% moisture depletion)), and three sampling times (three and six days after drought, and recovery (two days after re-irrigation)). Drought stress caused a decrease in chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoid, protein, yield, and yield components. The reduction of these traits was more remarkable at six days after stress. However, during the recovery time remarkable increase was observed in these traits. The results showed that the correlation between H₂O₂ and MDA was significant and positive. Furthermore, drought stress increased the amount of proline, H₂O₂, and MDA, which resulted in an increase in the activity of antioxidant enzymes (catalase, polyphenol oxidase, and peroxidase). An increase in the intensity and duration of the drought stress also caused an increase in H₂O₂ and MDA content and the activity of antioxidant enzymes. In addition, in the recovery conditions, a significant reduction in the destructive effects of stress (H₂O₂, MDA content) and the activity of antioxidant enzymes was visible. The results of the present study indicated that the effects of drought stress on lentil lines yield and yield components (seed number, number of pods, 100-seed weight, and seed yield) were varied. Drought stress at the flowering stage decreased the number of seeds and pods per plant, and 100-seed weight, which led to yield losses. Although line 2 had the highest yield under normal and drought stress conditions, line 1 exhibited the lowest yield under stress conditions. Based on the results of this experiment, line 2 seems to be a suitable line for culture in the regions challenged with water deficit stress.

Cite this article: Azizi, S., Zare, N., Sheikhzadeh, P., Azizi Mobser, J., & Karimizadeh, R. (2024). Effects of drought stress and re-irrigation at the flowering stage on the physiological and biochemical response and yield in promising lentil lines. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 55(1), 123-137. DOI: 10.22059/ijfcs.2023.362098.655018.





اثر تنش خشکی و آبیاری مجدد در مرحله گلدهی بر پاسخ فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و عملکرد لاین‌های امیدبخش عدس

سولماز عزیززی^۱ | ناصر زارع^{۲*} | پریسا شیخ‌زاده^۳ | جوانشیر عزیززی مبصر^۴ | رحمت‌الله کریمی‌زاده^۵

۱. گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۲. نویسنده مسئول، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: nzare@uma.ac.ir
۳. گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۴. گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۵. موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، گچساران، ایران.

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۱/۰۱

کلیدواژه‌ها:

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی،
بازیابی،
پراکسیداز،
تنش خشکی،
کلروفیل.

بازیابی سریع و کارآمد گیاه زراعی از تنش خشکی ممکن است یکی از عوامل کلیدی تعیین‌کننده سازگاری با خشکی در گیاهان باشد. آزمایش حاضر به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و به منظور بررسی نقش تحمل خشکی و آبیاری مجدد پس از تنش در لاین‌های امیدبخش عدس در مرحله گلدهی اجرا شد. تیمارهای این پژوهش شامل شش لاین امیدبخش عدس، تنش خشکی (شاهد (آبیاری در ۸۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای یا تخلیه رطوبتی ۲۰٪)، تنش متوسط (آبیاری در ۵۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای یا تخلیه رطوبتی ۴۵٪) و تنش شدید (آبیاری در ۳۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای یا تخلیه رطوبتی ۷۰٪)، و سه زمان نمونه‌برداری (سه و شش روز پس از تنش و دو روز پس از آبیاری مجدد (ریکاوری)) بود. تنش خشکی باعث کاهش کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارنوتینید، پروتئین، عملکرد و اجزای عملکرد شد و کاهش این صفات در زمان شش روز پس از تنش بیشتر بود. اما در شرایط آبیاری مجدد افزایش این صفات قابل مشاهده بود. نتایج نشان داد که همبستگی H_2O_2 و MDA مثبت و معنی‌دار بود. علاوه بر این، تنش خشکی موجب افزایش میزان پروپیلن، H_2O_2 ، MDA و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز) شد. افزایش شدت و مدت زمان تنش موجب افزایش بیشتر این صفات شد. علاوه بر این، در شرایط بازیابی کاهش معنی‌دار اثرات مخرب تنش (H_2O_2 ، MDA) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان قابل مشاهده بود. اثر تنش خشکی بر عملکرد و اجزای عملکرد (تعداد دانه، تعداد غلاف، وزن ۱۰۰ دانه و عملکرد دانه) لاین‌های عدس متفاوت بود. تنش خشکی در مرحله گلدهی باعث کاهش تعداد دانه، غلاف در بوته و وزن صددانه شد که منجر به کاهش عملکرد شد. اگرچه لاین ۲ در شرایط نرمال و تنش خشکی بیشترین عملکرد را داشت، کمترین میزان عملکرد در لاین ۱ در شرایط تنش مشاهده شد. براساس نتایج این آزمایش لاین ۲ لاین مناسبی برای کشت در مناطقی که با تنش کم‌آبی مواجه هستند به نظر می‌رسد.

استناد: عزیززی، س.، زارع، ن.، شیخ‌زاده، پ.، عزیززی مبصر، ج.، و کریمی‌زاده، ر. (۱۴۰۳). اثر تنش خشکی و آبیاری مجدد در مرحله گلدهی بر پاسخ فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و عملکرد لاین‌های امیدبخش عدس. *علوم گیاهان زراعی ایران*، ۵۵(۱)، ۱۳۷-۱۲۳. DOI:10.22059/ijfcs.2023.362098.655018



۱. مقدمه

عدس (*Lens culinaris* Medik) یکی از حبوباتی است که با داشتن بیش از ۲۰ درصد پروتئین و خصوصیتی همچون توانایی رشد در شرایط نامناسب و خاک‌های فقیر توانسته است به‌عنوان یک گونه گیاهی باارزش نقش مهمی را در رژیم غذایی اقشار کم‌درآمد مردم کشورهای درحال توسعه ایفا کند (Srivastava & Vasishtha, 2012; Kumar *et al.*, 2013). کمبود بارندگی سالانه، نوسانات بارندگی و قطع زودهنگام بارندگی‌ها در بهار موجب بروز تنش خشکی در مراحل مختلف رشدی گیاه عدس می‌شوند که در کاهش عملکرد تأثیر قابل ملاحظه‌ای دارند. از سوی دیگر، بین ژنوتیپ‌های عدس از نظر مقاومت به تنش خشکی تنوع قابل توجهی وجود دارد (Reda, 2015).

در طول دهه‌های گذشته، کمبود آب و استفاده نادرست از منابع آبی در ایران به‌شدت افزایش یافته است (Emadodin *et al.*, 2019). از مشکلات اساسی آب در ایران مصرف بی‌رویه در کشاورزی و مدیریت نامناسب آب می‌باشد (Ashraf *et al.*, 2021)؛ از این‌رو، عملکرد محصولات در ایران همواره توسط تنش خشکی تهدید می‌شود. مراحل زایشی نسبت به مراحل رویشی بیشتر مستعد خشکسالی هستند (Barnabás *et al.*, 2008). تنش که در زمان گلدهی و گرده‌افشانی ظاهر می‌شوند به دلیل کاهش عملکرد گرده و تخمک‌ها و مه‌ار رشد و عقیمی گرده منجر به شکست لقاح می‌شوند (Sehgal *et al.*, 2019). حساسیت به تنش خشکی با توجه به ژنوتیپ، مرحله فیزیولوژیکی و مدت زمان تنش متفاوت است (Ahmed *et al.*, 2013).

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) پتانسیل واکنش با بسیاری از ترکیبات سلولی را داشته و سبب خسارت به غشا و سایر ماکرومولکول‌های ضروری از قبیل رنگدانه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها می‌شوند (Blokina *et al.*, 2003). آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که مانع از عملکرد رادیکال‌های آزاد شده و از تخریب سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. این مواد می‌توانند با دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد، آن‌ها را به شکل پایدار خود تبدیل و مانع از اثرات مخرب آن‌ها شوند. درجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاهان به گونه گیاهی، مرحله نمو، شرایط متابولیک، طول مدت و شدت تنش بستگی دارد. سازوکارهای سمیت‌زدایی انواع اکسیژن فعال در گیاهان به دو دسته آنزیمی (آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز، گایاکول‌پراکسیداز، گلوکاتایون‌ردوکتاز، گلوکاتایون‌پراکسیداز و ...) و غیر آنزیمی (ویتامین E، آسکوربات، گلوکاتایون، ملاتونین، ترکیبات فلاونوئیدی، کاروتنوئیدها و ...) طبقه‌بندی می‌شوند. گزارش‌ها نشان می‌دهند که ژنوتیپ‌های متحمل به تنش‌های محیطی می‌توانند از طریق فعال کردن سامانه‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی با تنش‌های محیطی مقابله کنند. بنابراین، بین سامانه دفاع آنتی‌اکسیدانی و تحمل شرایط تنش ارتباط وجود دارد. برخی از محققان معتقدند که افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها تحمل گیاه به تنش‌های محیطی را افزایش می‌دهد (Demiral & Türkan, 2004; Guo *et al.*, 2006). در این زمینه مطالعات نشان داد که در تنش‌های کمبود آب شدید، غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نخود تا دو برابر افزایش یافته که نتیجه آن مقاومت بیشتر گیاه به تنش اکسیداتیو است (Abrishamchi *et al.*, 2012; Bahadoran *et al.*, 2015). در مطالعه روی ژنوتیپ‌های عدس مشاهده شد که تنش آبی منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با تیمار بدون تنش شد (Ahmadi *et al.*, 2020). همچنین در بررسی روی ارقام متحمل و حساس نخود و لوبیا به تنش خشکی دلیل افزایش شاخص کلروفیل با دستگاه Spad در ارقام متحمل فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گزارش شده است (Rahbarian *et al.*, 2012; Abrishamchi *et al.*, 2012).

هدف این آزمایش بررسی اثرات خشکی در زمان تنش و آبیاری مجدد روی لاین‌های عدس بود. اکثر مطالعات به رابطه منفی بین پتانسیل عملکرد (عملکرد در شرایط بدون تنش) و عملکرد تحت تنش شدید اشاره می‌کنند، اما کمتر گزارشی در مورد اثرات تنش بعد از آبیاری مجدد مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج Chen *et al.* (2016) نشان داد که مرحله بازیابی از اهمیت زیادی بر تحمل به تنش خشکی و بازگشت به شرایط نرمال دارد. آن‌ها مشاهده کردند که صفات فیزیولوژیک مانند کلروفیل نقش زیادی در بهبود شرایط بعد از تنش ایفا می‌کنند. کلروفیل به‌عنوان رنگدانه فتوسنتزی نقش مهمی در جذب نور و فتوسنتز گیاهان دارد. محتوای کلروفیل یکی از رایج‌ترین معیارهای مورد استفاده برای ارزیابی شدت تنش خشکی است زیرا تنش می‌تواند تجزیه کلروفیل را تسریع کند (Ying *et al.*, 2015) و با توجه به اینکه تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده عملکرد گیاهان زراعی به

شمار می‌آید، بنابراین شناخت ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ایجادشده در محیط دارای تنش خشکی و بررسی تغییرات بعد از مرحله آبیاری مجدد (قابلیت ریکاوری) عدس دیدگاه‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مناسبی را در توجیه رفتار این گیاه در مواجهه با تنش خشکی و آبیاری مجدد فراهم می‌سازد. بنابراین این تحقیق باهدف بررسی اثر تنش خشکی بر فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات فیزیولوژیک و عملکرد لاین‌های عدس انجام شده است.

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲-۱. طرح آزمایشی و شرایط رشد گیاه

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول لاین‌های عدس در شش سطح (جدول ۱)، فاکتور دوم تنش خشکی در سه سطح شاهد (آبیاری در ۸۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای)، تنش متوسط (آبیاری در ۵۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای) و تنش شدید (آبیاری در ۳۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای) و فاکتور سوم زمان نمونه‌برداری در سه سطح سه و شش روز پس از تنش و دو روز پس از آبیاری مجدد انجام شد. اعمال تنش خشکی با ظهور اولین گل صورت گرفت. این آزمایش در شرایط گلخانه‌ای با متوسط دمای 22 ± 3 و رطوبت نسبی ۶۰-۵۰ درصد اجرا شد. گیاهان در گلدان‌های ۱۰ کیلوگرمی با سطح دهانه بیضی با ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و قطر کوچک ۲۵ و قطر بزرگ ۴۵ کشت شدند. در هر گلدان ۲۰ بذر کشت شد و پس از یک هفته ۱۰ گیاهچه کاملاً نرمال و یکنواخت نگهداری و سایر گیاهچه‌ها حذف شدند (شکل ۱). برخی خصوصیات خاک استفاده‌شده در این آزمایش در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۱. معرفی اجمالی لاین‌های امیدبخش عدس.

Lines name	Pedegre	origin
Line-1	FLIP2011-6L ILL 6434 X ILL 6972-11 ARLYT2 (2012-13)	ICARDA
Line-2	ILL 7547 x ILL 6211 2006-02-0G-0GA-0GA-11 -9 ARLYT3 (2012-13)	IRAN
Line-3	FLIP 2005-53L-7 URLYT (2010-13)	ICARDA
Line-4	ILL 4605 x ADDA 2006-03-0GA-0GA-0GA-11 -1 ARLYT3 (2012-13)	IRAN
Line-5	FLIP2010-8L ILL 2126 X ILL 6199-5 ARLYT2 (2012-13)	ICARDA
Line-6	FLIP2011-1L ILL 6443 X ILL 1005-7 ARLYT2 (2012-13)	ICARDA

جدول ۲. برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش.

Texture	FC	pwp	pb**	Silt	Clay	Sand	O.C	Equivalent to calcium carbonate	EC	pH
	%	%	g.cm ⁻³		%			%	dS.m ⁻¹	
Lumi	34	14	0.79	36	22	42	0.9	5.7	2.3	7.4

pwp: رطوبت در نقطه پژمردگی دائم، pb: جرم مخصوص ظاهری خاک.



شکل ۱. مراحل اجرای آزمایش.

۲-۲. برنامه‌های آبیاری

تیمار تنش شامل سه سطح تنش خشکی بود. اولین تیمار که تحت عنوان تیمار شاهد بود، در این تیمار چنانچه رطوبت سهل‌الوصول خاک به ۸۰ درصد می‌رسید (خاک ۲۰ درصد رطوبت از صددرصد ظرفیت مزرعه را از دست می‌دهد) آبیاری انجام می‌شد. در تیمار دوم یا تنش متوسط تخیله رطوبتی ۴۵ درصد و در تیمار سوم یا تنش شدید، زمان آبیاری بعد از تخلیه ۷۰ درصدی رطوبت سهل‌الوصول در نظر گرفته شد. در این پژوهش، اعمال تنش خشکی براساس ظرفیت زراعی صورت گرفت. برای اندازه‌گیری رطوبت در ظرفیت زراعی از روش اندازه‌گیری وزنی رطوبت استفاده شد. برای این منظور ابتدا گلدان‌ها با زهکشی آزاد اشباع شده و در گلدان‌ها با پلاستیک بسته شد تا از تبخیر جلوگیری شود. سپس از گلدان‌ها نمونه خاک برداشت شده و رطوبت وزنی تا زمانی که در دو روز متوالی برابر شود ادامه یافت که نشان‌دهنده رطوبت وزنی در وضعیت ظرفیت زراعی بود. در گام آخر با ضرب رطوبت وزنی ظرفیت زراعی در جرم مخصوص ظاهری اندازه‌گیری شده خاک رطوبت حجمی به دست آمد و با استفاده از آن مدیریت آبیاری و تیمارهای تنش اعمال شد (Nasimi et al., 2019). گلدان‌های مشابه و هم‌وزن انتخاب و خاک همگن شده به میزان ۱۰ کیلوگرم در هر گلدان اضافه شد. آبیاری براساس رطوبت خاک در ۸۰٪ ظرفیت زراعی (یا ۲۰٪ تخلیه رطوبتی) در طول دوره رشد انجام شد. آغاز تنش از مرحله گلدهی شروع شد، زیرا مرحله گلدهی بیشترین حساسیت را نسبت به تنش خشکی دارد و گیاه بیشترین آسیب را در این مرحله متحمل می‌شود. علاوه بر این، سه و شش روز پس از اعمال تنش، آبیاری با ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به مدت دو روز (۴۸ ساعت) انجام شد تا ریکاوری انجام شود. نمونه‌برداری در روز سوم و ششم تنش انجام شد. نمونه‌برداری سوم در مرحله بازبایی انجام و صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شد تا مرحله برداشت آبیاری براساس رطوبت خاک در ۸۰٪ ظرفیت زراعی انجام شود.

۲-۳. اندازه‌گیری عملکرد و اجزای عملکرد

برای اندازه‌گیری عملکرد دانه، وزن ۱۰۰ دانه، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در بوته، چهار بوته در هر گلدان در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک برداشت شدند. سپس با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن آن‌ها توزین شد.

۲-۴. اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کارتنوئید

حدود ۰/۱ گرم از بافت برگ تازه با استون ۸۰ درصد سائیده شد و به حجم دو میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ دور سانتریفیوژ شد. جذب نوری در طول موج‌های ۶۴۵، ۴۷۰ و ۶۶۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. مقدار کلروفیل و کارتنوئیدها طبق معادله‌های زیر محاسبه شد (Arnon, 1967).

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 \times A_{663} - 0.86 \times A_{645}) / 100W$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) / 100W$$

$$\text{Chlorophyll t} = \text{chlorophyll a} + \text{chlorophyll b}$$

$$\text{Carotenoids} = (1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b) / 198$$

۲-۵. محتوای پروتئین برگ

مقدار ۰/۱ گرم بافت برگ تازه در ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک‌اسید سه درصد سائیده و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به دو میلی‌لیتر از عصاره حاصل، دو میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال خالص اضافه شده و لوله‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس چهار میلی‌لیتر تولوئن به آن‌ها اضافه و پس از تشکیل دو فاز جداگانه، جذب نوری فاز بالایی رنگی در دستگاه اسپکتروفوتومتری با طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد (Bates et al., 1973).

۲-۶. استخراج عصاره پروتئینی

برای استخراج پروتئین، ۰/۱ گرم نمونه‌های برگ تازه در نیتروژن مایع پودر شد. سپس با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷/۸) مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شد (Hazrati et al., 2022).

۲-۷. اندازه‌گیری پروتئین محلول کل

غلظت پروتئین به روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از روش برادفورد (Bradford, 1976) تعیین شد. برای این منظور، ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی به ۹۵۰ میکرولیتر محلول برادفورد اضافه شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۲-۸. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۵۰۰ میکرولیتر H_2O_2 (۱۰ میلی‌مولار) و ۲/۴۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (pH 7)؛ ۱۰۰ میلی‌مولار) مخلوط شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری (SmartSpec^{Plus} Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) اندازه‌گیری شد (Aebi, 1984).

۲-۹. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)

۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۲/۵ میلی‌لیتر محلول واکنش (حاوی تریس ۱۰۰ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن پنج میلی‌مولار و پیروگال ۱۰ میلی‌مولار) اضافه شد. سپس میزان جذب نوری در طول موج ۴۲۵ نانومتر قرائت شد (Kar & Mishra, 1976).

۲-۱۰. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO)

برای اندازه‌گیری پلی‌فنل‌اکسیداز ابتدا به ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر تریس (۲۰ مولار)، ۰/۳ میلی‌لیتر از پیروگال (۲/ مولار) اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به آن اضافه شد. مخلوط واکنش پس از ورتکس به مدت پنج دقیقه در حمام آبی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس میزان جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری (SmartSpec^{Plus} Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) در طول موج ۴۲۰ نانومتر ثبت شد (Kar & Mishra, 1976).

۲-۱۱. اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

۰/۱ گرم از بافت برگ در ازت مایع سائیده شد و در حمام یخ با ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد کاملاً مخلوط و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس نیم میلی‌لیتر از مایع رویی به نیم میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH 7.0) و یک میلی‌لیتر از یدید پتاسیم یک مولار اضافه شد. جذب نوری مخلوط در طول موج ۳۹۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (Zaragoza-Martínez et al., 2016).

۲-۱۲. اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

۰/۲ گرم از نمونه برگ تازه با پنج میلی‌لیتر اسیدتری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد سانتریفیوژ شد. پس از مخلوط کردن با محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباریتوریک‌اسید نیم درصد، ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت شد (Zaho et al., 1994).

۲-۱۳. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. رسم نمودار همبستگی با استفاده از نرم‌افزار R انجام شد.

۳. نتایج پژوهش و بحث

۳-۱. محتوای کلروفیل و کارتنوئید

نتایج نشان داد که اثر ژنوتیپ، تنش خشکی و زمان و همچنین برهمکنش بین آن‌ها بر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). کلروفیل a در اثر تنش متوسط (۵۵٪ ظرفیت زراعی) و شدید (۳۰٪ ظرفیت زراعی) در تمامی لاین‌ها کاهش یافت و در زمان آبیاری مجدد افزایش یافت؛ به طوری که لاین ۶ بیشترین میزان کلروفیل a (۵/۳۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را در شرایط بدون تنش (۸۰٪ ظرفیت زراعی) و اولین مرحله نمونه‌برداری نشان دادند. در حالی که کمترین میزان کلروفیل a در لاین ۲ (۱/۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در شرایط تنش شدید و نمونه‌برداری دوم مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی لاین‌های عدس تحت تنش خشکی.

S.O.V	DF	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total Chlorophyll	Carotenoid	Protein	Proline
Genotype	5	10.56**	0.420**	14.24**	20.38**	3.39**	1.16**
Stress	2	7.58**	0.246**	**10.62	10.40**	6.24**	0.093**
Sampling time	2	4.72**	0.068**	**5.91	6.91**	0.49**	0.014**
Stress* Genotype	10	0.480**	0.011**	**0.54	0.322**	1.05**	0.081**
Genotype *Sampling time	10	0.700**	0.005 ^{ns}	**0.72	0.472**	0.07**	0.008**
Stress *Sampling time	4	2.50**	0.033**	**2.98	4.002**	0.29**	0.005**
Stress *Sampling time * Genotype	20	0.356**	0.006**	**0.37	0.498**	0.04**	0.005**
Error	108	0.014	0.003	0.017	0.078	0.017	0.0005
CV (%)		3.75	18.48	3.79	6.65	8.11	7.1

تنش خشکی موجب کاهش کلروفیل b و کلروفیل کل در همه لاین‌ها شد. بیشترین میزان کلروفیل b در لاین ۴ در شرایط نرمال و دومین مرحله نمونه‌برداری (۰/۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در حالی که کمترین میزان کلروفیل b و کل در لاین ۲ و در شرایط تنش شدید در دومین مرحله نمونه‌برداری (به ترتیب ۰/۰۹۳ و ۱/۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. بیشترین میزان کلروفیل کل در لاین ۶ (۵/۷۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در شرایط نرمال (۸۰٪ ظرفیت زراعی) و اولین مرحله نمونه‌برداری (سه روز) مشاهده شد. با این وجود میزان کلروفیل کل در مرحله بازیابی افزایش معنی‌داری نشان داد.

نتایج نشان داد که تنش موجب کاهش کارتنوئید شد و این کاهش تا مرحله دوم نمونه‌برداری نیز اتفاق افتاد؛ به طوری که کمترین میزان کارتنوئید در لاین ۲ (۲/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در شرایط تنش شدید و مرحله دوم نمونه‌برداری مشاهده شد. با این وجود میزان کارتنوئید نیز پس از آبیاری مجدد افزایش معنی‌داری نشان داد. لاین ۴ بیشترین میزان کارتنوئید (۶/۰۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را در شرایط نرمال و سومین مرحله نمونه‌برداری نشان داد.

در این پژوهش مشاهده شد که محتوای کلروفیل در همه لاین‌ها تحت شرایط تنش خشکی متوسط و شدید به طور قابل توجهی کاهش یافت و لاین ۶ نسبت به سایر لاین‌ها کلروفیل و کارتنوئید بیشتری در شرایط نرمال و تنش نشان داد. میزان افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط بازیابی بسته به نوع رقم و سطح تنش خشکی متفاوت بود. کاهش محتوای کلروفیل در شرایط تنش ممکن است به گیاهان کمک کند آسیب‌های اکسیداتیو نوری را کاهش دهند که در این شرایط فتوسنتز مهار شده و انرژی تهییج نور بیش از حد است (Aranjuelo *et al.*, 2011). انرژی تهییجی که توسط رنگدانه فتوسنتزی در فتوسیستم II جذب می‌شود منجر به اختلال در عملکرد فتوسنتزی و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود که نتیجه آن ایجاد تنش اکسیداتیو است (Pintó-Marijuan & Munné-Bosch, 2014). سایر مطالعات نشان داده که فتوسنتز گیاهان به دلیل کاهش غلظت کلروفیل و اثرات مضر تنش خشکی بر چرخه کالوین مهار می‌شود (Monakhova & Chemyadev, 2002).

۲-۳. پرولین و پروتئین

نتایج نشان داد که اثر رقم، تنش خشکی و زمان و همچنین برهمکنش بین آن‌ها بر میزان پرولین و پروتئین در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). بین لاین‌های مختلف از نظر پرولین نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت؛ به طوری که پرولین در اثر تنش متوسط و شدید در تمامی لاین‌ها افزایش معنی‌داری یافت. لاین ۳ بیشترین میزان پرولین (۳/۶۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را در شرایط تنش شدید و دومین مرحله نمونه‌برداری (تنش ۳۰٪ ظرفیت زراعی شش روز) نشان دادند. در شرایط بازیابی کاهش میزان پرولین در تمامی لاین‌ها قابل مشاهده بود. همچنین کمترین میزان پرولین در تمامی لاین‌ها در شرایط شاهد (۸۰٪ ظرفیت زراعی) قابل مشاهده بود (جدول ۴). تنش موجب کاهش پروتئین کل در لاین ۱، ۲، ۳ و ۵ شد و این کاهش در شرایط تنش شدید به طور معنی‌داری بیشتر بود. با این حال، تنش خشکی موجب افزایش میزان پروتئین در لاین ۴ و ۶ شد. لاین ۳ بیشترین میزان پروتئین کل (۱/۰۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را در شرایط بدون تنش (۸۰٪ ظرفیت زراعی) و آبیاری مجدد نشان دادند. کمترین میزان پروتئین کل در لاین ۵ (۰/۳۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در شرایط تنش شدید و مرحله دوم نمونه‌برداری مشاهده شد (جدول ۴).

در انتخاب و اصلاح لاین‌های سازگار با خشکی، داشتن ویژگی‌های فیزیولوژیک مانند پرولین بیشتر، فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان در شرایط تنش از قابلیت‌های سازگاری با خشکی است (Hura *et al.*, 2007). افزایش غلظت پرولین در همه لاین‌ها تحت تنش خشکی در این آزمایش با نتایج Sinha *et al.* (2018) همخوانی دارد. افزایش پرولین احتمالاً به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز پرولین یعنی اورنیتین آمینوترانسفراز و پرولین کربوکسیلاز ردوکتاز و به علاوه به علت جلوگیری از فعالیت آنزیم پرولین اکسیداز و کاتابولاز است (Valentovic *et al.*, 2006). همچنین، نتایج Singh *et al.* (2019) نشان داد که ژنوتیپ‌های متحمل در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس، محتوای پرولین بیشتری را انباشته می‌کنند.

جدول ۴. تأثیر تنش خشکی و آبیاری مجدد بر صفات فیزیولوژیکی لاین‌های عدس.

Line	Drought stress	Sampling Time	Chl.a	Chl. b	Total Chl.	Carotenoid	Proline	Protein	
			mg.g ⁻¹ FW						
1	80%	3 day	3.16±0.05 ^{n-o}	0.42±0.04 ^{g-i}	3.58±0.08 ^{o-q}	4.36±0.08 ^{l-m}	1.09±0.04 ^{on}	0.57±0.01 ^{lm}	
		6 day	3.28±0.04 ^{n-o}	0.37±0.02 ^{n-j}	3.65±0.02 ^{o-q}	4.51±0.13 ^{j-h}	1.09±0.01 ^{on}	0.55±0.01 ^{lm}	
		Recovery	3.34±0.07 ^{n-j}	0.41±0.03 ^{g-i}	3.75±0.05 ^{o-n}	4.56±0.03 ^{j-h}	1.12±0.01 ^{m-n}	0.54±0.01 ^{n-m}	
	55%	3 day	3.12±0.09 ^{s-o}	0.21±0.01 ^{s-u}	3.34±0.11 ^v	4.56±0.17 ^{j-h}	1.06±0.03 ^{o-n}	0.58±0.02 ^{lk}	
		6 day	2.80±0.14 ^{w-x}	0.15±0.05 ^{w-u}	2.95±0.19 ^{w-v}	3.99±0.31 ^{p-m}	1.16±0.03 ^{m-n}	0.56±0.01 ^{lm}	
		Recovery	3.07±0.07 ^{s-t}	0.26±0.03 ^{s-p}	3.33±0.09 ^{s-v}	4.12±0.07 ^{l-m}	1.13±0.09 ^{m-n}	0.56±0.01 ^m	
	30%	3 day	2.99±0.32 ^{s-t}	0.27±0.09 ^{s-p}	3.26±0.41 ^{w-v}	4.79±0.72 ^{f-h}	1.16±0.10 ^{m-n}	0.51±0.02 ^{po}	
		6 day	1.78±0.50 ^{y-z}	0.20±0.01 ^{t-u}	1.98±0.49 ^z	2.33±0.81 ^{wx}	1.43±0.11 ^{kl}	0.50±0.03 ^{pq}	
		Recovery	2.90±0.36 ^{v-t}	0.30±0.02 ^{n-p}	3.20±0.35 ^{w-v}	4.09±0.69 ^{l-m}	1.16±0.07 ^{m-n}	0.56±0.01 ^{lm}	
	2	80%	3 day	2.97±0.05 ^{s-t}	0.40±0.03 ^{g-i}	3.37±0.07 ^{s-v}	3.62±0.07 ^{s-r}	1.04±0.00 ^o	0.99±0.01 ^c
			6 day	2.83±0.05 ^{v-x}	0.33±0.04 ^{n-p}	3.16±0.08 ^{xy}	3.86±0.05 ^{p-n}	1.04±0.04 ^o	0.98±0.01 ^{dc}
			Recovery	2.90±0.04 ^{v-t}	0.36±0.01 ^{n-o}	3.27±0.05 ^{w-v}	3.76±0.09 ^{p-r}	1.04±0.04 ^o	0.99±0.00 ^c
55%		3 day	2.67±0.09 ^y	0.24±0.05 ^{s-u}	2.91±0.09 ^w	3.09±0.21 ^{uv}	1.33±0.10 ^{m-l}	0.91±0.02 ^e	
		6 day	2.23±0.17 ^{y-x}	0.19±0.02 ^{w-u}	2.91±0.18 ^w	2.76±0.12 ^{wv}	1.59±0.12 ^{i-j}	0.84±0.03 ^f	
		Recovery	2.57±0.20 ^y	0.30±0.03 ^{n-p}	2.87±0.22 ^w	3.36±0.20 ^{s-r}	1.43±0.09 ^{m-l}	0.94±0.04 ^{de}	
30%		3 day	2.17±0.39 ^y	0.20±0.1 ^{t-u}	2.37±0.49 ^{y-z}	2.34±0.59 ^{wx}	2.02±0.27 ^d	0.70±0.04 ^h	
		6 day	1.49±0.42 ^z	0.093±0.08 ^w	1.59±0.51 ^z	2.04±0.47 ^x	2.01±0.32 ^d	0.63±0.03 ^j	
		Recovery	2.87±0.38 ^{v-x}	0.37±0.07 ^{h-j}	3.24±0.45 ^{w-v}	3.69±0.47 ^{s-r}	1.13±0.30 ^{m-n}	0.75±0.04 ^g	
3		80%	3 day	2.93±0.08 ^{s-t}	0.20±0.01 ^{t-u}	3.13±0.09 ^{w-v}	3.94±0.16 ^{p-m}	1.18±0.02 ^{m-n}	1.04±0.01 ^b
			6 day	2.75±0.07 ^{w-x}	0.236±0.02 ^{s-u}	2.99±0.06 ^{w-v}	3.52±0.14 ^{s-r}	1.18±0.06 ^{m-n}	1.08±0.03 ^{ba}
			Recovery	2.70±0.07 ^{v-x}	0.230±0.02 ^{s-u}	2.93±0.05 ^w	3.62±0.09 ^{s-r}	1.11±0.01 ^{o-n}	1.09±0.01 ^a
	55%	3 day	2.27±0.13 ^{y-x}	0.20±0.01 ^{t-u}	2.47±0.14 ^w	3.32±0.03 ^{s-r}	1.59±0.18 ^{i-j}	0.96±0.02 ^{dc}	
		6 day	2.73±0.21 ^{v-x}	0.184±0.02 ^{w-u}	2.92±0.21 ^w	3.22±0.03 ^{ut}	1.96±0.15 ^{e-d}	0.86±0.02 ^f	
		Recovery	2.70±0.12 ^{v-x}	0.196±0.02 ^{t-u}	2.9±0.10 ^{y-w}	3.29±0.12 ^{s-t}	1.79±0.17 ^{e-f}	0.94±0.05 ^{d-e}	
	30%	3 day	2.03±0.37 ^{y-z}	0.22±0.02 ^{s-u}	2.25±0.35 ^z	3.24±0.07 ^{s-t}	2.85±0.31 ^b	0.65±0.08 ^j	
		6 day	3.17±0.38 ^{n-o}	0.19±0.02 ^{w-u}	3.36±0.40 ^v	3.29±0.18 ^{s-t}	3.63±0.23 ^a	0.67±0.09 ^{i-h}	
		Recovery	3.22±0.42 ^{n-o}	0.21±0.04 ^{s-u}	3.43±0.39 ^q	3.49±0.08 ^{s-r}	2.86±0.26 ^b	0.92±0.09 ^e	
	4	80%	3 day	4.97±0.39 ^b	0.49±0.06 ^{g-c}	5.46±0.34 ^b	5.53±0.39 ^{bc}	1.03±0.02 ^o	0.52±0.02 ^{po}
			6 day	4.24±0.25 ^d	0.65±0.06 ^a	4.89±0.21 ^{d-e}	5.83±0.25 ^{ba}	1.15±0.05 ^{m-n}	0.52±0.00 ^{p-o}
			Recovery	3.9±0.32 ^e	0.58±0.02 ^{b-c}	4.48±0.32 ^h	6.08±0.24 ^a	1.1±0.03 ^{o-n}	0.54±0.01 ^{l-m}
55%		3 day	4.20±0.17 ^d	0.53±0.02 ^{b-c}	4.73±0.20 ^{ef}	5.56±0.17 ^{bc}	1.26±0.03 ^{m-n}	0.57±0.01 ^{lm}	
		6 day	3.27±0.30 ^{n-o}	0.44±0.03 ^{g-i}	3.71±0.32 ^{o-n}	5.06±0.17 ^{f-d}	1.33±0.07 ^{m-l}	0.58±0.01 ^{lm}	
		Recovery	3.87±0.35 ^{fe}	0.48±0.03 ^{g-c}	4.35±0.38 ⁱ	5.39±0.17 ^{b-c}	1.33±0.09 ^{m-l}	0.56±0.01 ^{lm}	
30%		3 day	3.41±0.68 ^{l-j}	0.51±0.07 ^{f-c}	3.92±0.74 ^{l-n}	5.72±0.56 ^{b-c}	1.72±0.03 ^{g-h}	0.67±0.03 ^{ih}	
		6 day	1.96±0.65 ^{y-z}	0.35±0.06 ^{w-p}	2.32±0.71 ^{y-z}	3.37±0.79 ^{s-r}	1.75±0.07 ^{e-f}	0.67±0.02 ^{ih}	
		Recovery	4.17±0.61 ^d	0.51±0.03 ^{f-c}	4.68±0.64 ^{g-h}	4.76±0.72 ^{f-h}	1.46±0.10 ^j	0.58±0.03 ^k	
5		80%	3 day	3.51±0.05 ^j	0.38±0.04 ^{n-j}	3.89±0.08 ^{l-n}	4.30±0.08 ^{l-m}	1.70±0.04 ^{g-h}	0.45±0.01 ^{r-s}
			6 day	3.63±0.04 ^{hg}	0.33±0.02 ^{n-p}	3.96±0.02 ^{lm}	4.45±0.13 ^{j-h}	1.70±0.01 ^{g-h}	0.43±0.01 ^{r-s}
			Recovery	3.69±0.07 ^{hg}	0.37±0.03 ^{n-j}	4.06±0.05 ^{lk}	4.5±0.03 ^{j-h}	1.73±0.01 ^{g-f}	0.42±0.01 ^{v-t}
	55%	3 day	3.47±0.09 ^{i-j}	0.176±0.01 ^{w-u}	3.65±0.11 ^{o-q}	4.5±0.17 ^{j-h}	1.67±0.03 ^{i-h}	0.46±0.02 ^{r-s}	
		6 day	3.15±0.14 ^{q-o}	0.11±0.05 ^{wu}	3.26±0.19 ^{w-v}	3.93±0.31 ^{p-m}	1.77±0.03 ^{e-f}	0.44±0.01 ^{r-s}	
		Recovery	3.42±0.07 ^{l-j}	0.22±0.03 ^{s-u}	3.64±0.09 ^{o-q}	4.06±0.07 ^{l-m}	1.74±0.09 ^{g-f}	0.44±0.01 ^{r-s}	
	30%	3 day	3.34±0.32 ^{n-j}	0.23±0.02 ^{s-u}	3.57±0.31 ^q	4.73±0.72 ^{f-h}	1.77±0.10 ^{e-f}	0.39±0.02 ^w	
		6 day	2.13±0.50 ^{y-z}	0.10±0.12 ^{wv}	2.24±0.62 ^z	2.27±0.81 ^{vx}	2.04±0.11 ^d	0.38±0.03 ^w	
		Recovery	3.25±0.36 ^{n-o}	0.26±0.04 ^{s-p}	3.51±0.39 ^q	4.03±0.69 ^{l-m}	1.77±0.07 ^{e-f}	0.44±0.01 ^{r-s}	
	6	80%	3 day	5.32±0.39 ^a	0.45±0.06 ^{g-i}	5.77±0.34 ^a	5.47±0.39 ^{b-c}	1.64±0.02 ^j	0.40±0.02 ^{v-w}
			6 day	4.6±0.25 ^c	0.61±0.06 ^{ba}	5.2±0.21 ^c	5.77±0.25 ^{b-c}	1.76±0.05 ^{e-f}	0.40±0.00 ^{v-w}
			Recovery	4.25±0.32 ^d	0.54±0.02 ^{bc}	4.79±0.32 ^{e-c}	6.02±0.24 ^a	1.71±0.03 ^{g-h}	0.42±0.01 ^{v-s}
55%		3 day	4.50±0.17 ^c	0.49±0.02 ^{g-c}	5.04±0.20 ^{dc}	5.5±0.17 ^{b-c}	1.87±0.03 ^{e-f}	0.45±0.01 ^{r-s}	
		6 day	3.62±0.30 ^{fg}	0.40±0.03 ^{g-i}	4.02±0.32 ^{lk}	5±0.17 ^g	1.94±0.07 ^{e-f}	0.46±0.01 ^{r-s}	
		Recovery	4.22±0.35 ^d	0.44±0.03 ^{g-i}	4.66±0.38 ^{gh}	5.33±0.17 ^{e-c}	1.94±0.09 ^{e-f}	0.44±0.01 ^{r-s}	
30%		3 day	3.76±0.68 ^{f-g}	0.47±0.07 ^{g-i}	4.23±0.74 ^{jk}	5.69±0.56 ^{b-c}	2.33±0.10 ^c	0.51±0.03 ^{po}	
		6 day	2.31±0.65 ^{x-y}	0.31±0.06 ^{n-p}	2.63±0.71 ^w	3.31±0.79 ^{s-r}	2.36±0.07 ^c	0.55±0.02 ^{lm}	
		Recovery	4.52±0.61 ^c	0.47±0.03 ^{gh}	4.99±0.64 ^{de}	4.7±0.72 ^{f-h}	2.07±0.10 ^d	0.46±0.03 ^q	

۳-۳. پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و مالون‌دی‌آلدید (MDA)

نتایج این پژوهش نشان داد که برهمکنش لاین، تنش خشکی و زمان نمونه‌برداری بر H_2O_2 و MDA در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). بین لاین‌های مختلف از نظر H_2O_2 و MDA نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت؛ به طوری که H_2O_2 و MDA در اثر تنش متوسط و تنش شدید در تمامی لاین‌ها افزایش معنی‌داری یافت. لاین ۶ بیشترین میزان H_2O_2 (۱۸/۱۵) میکرومول بر گرم وزن تر) را در شرایط تنش شدید و دومین مرحله نمونه‌برداری نشان دادند؛ در حالی که کمترین میزان H_2O_2 در لاین ۱ (۹/۳۷) میکرومول بر گرم وزن تر) در شرایط شاهد و مرحله سوم نمونه‌برداری مشاهده شد. همچنین مشاهده شد که در شرایط بازیابی میزان H_2O_2 به طور معنی‌داری کاهش یافت. کمترین میزان MDA در لاین یک، شرایط بدون تنش و در اولین مرحله نمونه‌برداری (۵/۰۱) میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد. همچنین لاین ۲، ۴ و ۶ بیشترین میزان تغییر را در شرایط تنش متوسط و شدید نسبت به سایر لاین‌ها از نظر میزان MDA داشت؛ به طوری که بیشترین میزان MDA در لاین ۶ و در شرایط تنش شدید و نمونه‌برداری شش روز (۲۵/۹۶) میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد.

به نظر می‌رسد که سطوح بالاتر MDA در لاین‌های عدس تحت شرایط تنش به دلیل افزایش قابل توجه تولید ROS (H_2O_2 و O_2^-) باشد (Tariq et al., 2018). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در لاین‌های عدس در هر دو سطح تنش متوسط و شدید میزان پراکسیداسیون لیپیدی به طور معنی‌داری افزایش یافت. با این حال کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در مرحله بازیابی قابل توجه بود که نشان می‌دهد پس از یک دوره تنش خشکی، گیاه قادر به بازگشت به شرایط نرمال بود. همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین میزان MDA و H_2O_2 مشاهده شد (شکل ۲) که نشان می‌دهد افزایش سطح H_2O_2 در شرایط تنش خشکی منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدها غشایی و احتمالاً در نهایت کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و نرخ فتوسنتز می‌شود.

۳-۴. فعالیت آنتی‌اکسیدانی

تنش موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز شد. با این حال میزان تغییر در فعالیت این آنزیم‌ها بسته به سطح تنش و نوع لاین متفاوت بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در لاین ۳ (۳۱/۱۲) واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و در مرحله دوم نمونه‌برداری و شرایط تنش شدید مشاهده شد. بیشترین تغییرات فعالیت کاتالاز در لاین ۲ و ۳ مشاهده شد. با این حال کمترین میزان فعالیت کاتالاز در مرحله اول نمونه‌برداری در شرایط نرمال در لاین ۱ (۹/۸۵) واحد بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد (جدول ۶). در شرایط تنش شدید فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز به طور معنی‌داری تشدید شد؛ به طوری که لاین ۳ (۸/۴۴) واحد بر میلی‌گرم پروتئین) بیشترین فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز را در شرایط تنش شدید و مرحله دوم نمونه‌برداری (شش روز پس از تنش) نشان دادند. با این وجود میزان فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز در مرحله بازیابی کاهش معنی‌داری نشان داد. لاین ۲ کمترین میزان پلی‌فنل‌اکسیداز (۲/۲۳) واحد بر میلی‌گرم پروتئین) را در شرایط شاهد و اولین مرحله نمونه‌برداری (۸۰٪ ظرفیت زراعی و سه روز پس از تنش) نشان داد. همچنین بیشترین میزان تغییر در فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در لاین ۳ و شرایط تنش شدید و آبیاری مجدد مشاهده شد. نتایج نشان داد که تنش خشکی به ویژه تنش شدید موجب افزایش فعالیت بیشتر آنزیم پراکسیداز در لاین ۲ و ۳ عدس شد؛ ولی در لاین ۴ و ۶ تغییر معنی‌داری در فعالیت این آنزیم در شرایط تنش مشاهده نشد (جدول ۶).

جدول ۵. تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی در لاین‌های عدس در شرایط تنش خشکی.

Source	DF	MDA	H_2O_2	CAT	PPO	POX
Genotype	5	270.72**	147.0**	305.8**	10.57**	232.3**
Stress	2	11.52**	54.22**	112.2**	29.72**	58.24**
Sampling time	2	112.9**	6.11**	56.34**	10.88**	102.9**
Stress* Genotype	10	118.57**	2.11**	44.08**	3.42**	59.25**
Genotype *Sampling time	10	8.27**	0.250 ^{ns}	13.53**	2.26**	45.46**
Stress *Sampling time	4	41.73**	2.23 ^{ns}	16.47**	4.40**	21.71**
Stress *Sampling time * Genotype	20	3.18**	0.580**	11.09**	1.05**	21.83**
Error	108	0.45	0.041	0.703	0.089	0.95
CV (%)		5.94	4.94	4.04	6.35	3.82

جدول ۶. تأثیر تنش خشکی و آبیاری مجدد بر صفات بیوشیمیایی لاین‌های عدس.

Line	Drought stress	Sampling Time	MDA $\mu\text{mol.g}^{-1}$	H ₂ O ₂	CAT U. mg ⁻¹ protein	PPO	POX
1	80%	3 day	5.01±0.03 ^s	11.29±0.32 ^{q+r}	18.2±0.69 ^{tu}	4.27±0.19 ^{r-t}	26.21±0.54 ^{po}
		6 day	5.2±0.15 ^{s-r}	12.96±0.38 ^{op}	20.64±0.68 ^{p-m}	4.84±0.20 ^{o-n}	28.45±0.87 ^{n-k}
		Recovery	5.3±0.15 ^{q-r}	12.04±0.18 ^{op}	20.08±0.96 ^{p-r}	4.60±0.17 ^{o-p}	27.62±1.15 ^{n-k}
	55%	3 day	11.88±1.73 ⁱ	12.70±0.33 ^{o-m}	20.42±0.67 ^{p-r}	4.47±0.15 ^{o-p}	25.12±0.73 ^{qp}
		6 day	15.21±1.86 ^{gf}	13.54±0.33 ^{k-j}	21.75±0.67 ^{i-j}	4.77±0.20 ^{o-p}	27.95±1.30 ^{n-k}
		Recovery	10.21±0.88 ^{ml}	12.70±0.17 ^{o-m}	20.75±0.33 ^{p-m}	4.80±0.17 ^{o-p}	27.22±0.58 ^{n-o}
	30%	3 day	17.35±2.73 ^e	14.86±0.61 ^{f-e}	24.27±1.73 ^{dc}	5.11±0.17 ^{m-k}	19.25±2.93 ^{yz}
		6 day	23.10±2.58 ^b	14.66±0.24 ^{i-c}	22.09±0.44 ^{i-j}	5.17±0.09 ^{i-k}	29.01±3.52 ^{h-i}
		Recovery	13.71±2.91 ^h	13.54±0.69 ^{k-j}	21.08±0.75 ^{o-j}	4.87±0.04 ^{o-n}	27.99±2.87 ^{n-k}
2	80%	3 day	6.40±0.13 ^p	9.54±0.10 ^v	10.09±0.10 ^y	2.38±0.07 ^{yz}	17.96±0.05 ^z
		6 day	6.38±0.13 ^{qp}	9.54±0.03 ^v	9.98±0.16 ^y	2.36±0.05 ^{yz}	17.85±0.29 ^z
		Recovery	6.08±0.06 ^{q-r}	9.37±0.03 ^v	9.85±0.13 ^y	2.23±0.03 ^z	18.62±0.41 ^{yz}
	55%	3 day	6.18±0.00 ^{q-r}	9.64±0.18 ^{uv}	13.58±0.88 ^w	2.97±1.00 ^{yz}	22.95±2.31 ^{v-w}
		6 day	6.41±0.22 ^p	9.64±0.09 ^{uv}	16.42±2.03 ^v	4.53±0.38 ^{o-p}	28.29±2.91 ^{n-k}
		Recovery	6.38±0.06 ^{qp}	9.60±0.09 ^v	11.75±1.17 ^x	2.60±0.44 ^{y-z}	19.29±2.40 ^{yz}
	30%	3 day	6.23±0.77 ^{q-r}	10.04±0.30 ^{u-v}	18.4±3.78 ^{tu}	5.87±1.16 ^{d-f}	32.09±5.50 ^{cb}
		6 day	9.15±1.0 ^{mm}	10.84±0.58 ^{q-r}	22.80±3.65 ^{g-f}	7.63±1.49 ^b	38.25±5.74 ^a
		Recovery	6.45±1.08 ^p	9.47±0.35 ^v	10.92±2.98 ^{yx}	2.83±1.56 ^{yz}	27.1±5.57 ^{n-o}
3	80%	3 day	8.57±0.03 ^{on}	9.50±0.04 ^v	19.19±0.40 ^{t-r}	3.42±0.06 ^{x-w}	27.10±0.14 ^{n-o}
		6 day	8.28±0.18 ^{on}	9.59±0.03 ^v	19.06±0.43 ^{t-r}	3.64±0.23 ^{x-w}	26.93±0.23 ^{n-o}
		Recovery	8.36±0.06 ^{on}	9.64±0.12 ^{uv}	18.75±0.20 ^{t-s}	3.43±0.05 ^{x-w}	27.12±0.39 ^{n-o}
	55%	3 day	8.55±0.32 ^{on}	10.54±0.19 ^{u-r}	20.42±0.93 ^{p-r}	4.17±0.44 ^{r-t}	27.79±0.37 ^{n-k}
		6 day	8.61±0.27 ^{on}	10.80±0.17 ^{q-r}	22.25±0.88 ^{i-j}	4.80±0.28 ^{o-p}	28.95±0.87 ^{h-k}
		Recovery	8.21±0.17 ⁿ	10.20±0.21 ^{u-v}	21.4±0.88 ^{i-j}	3.80±0.21 ^{x-t}	27.39±0.29 ^{n-k}
	30%	3 day	7.84±0.27 ^o	11.30±0.47 ^{q-r}	27.41±1.96 ^b	6.71±1.35	29.94±1.90 ^{h-d}
		6 day	8.48±0.39 ^{on}	11.47±0.57 ^{qp}	31.12±2.42 ^a	8.44±1.52 ^a	33.04±2.07 ^b
		Recovery	7.88±0.25 ^o	9.90±0.47 ^{u-v}	23.42±2.38 ^{de}	3.70±1.32 ^{x-w}	27.29±1.23 ^{n-o}
4	80%	3 day	7.90±0.10 ^o	13.20±0.26 ^{k-l}	20.51±0.40 ^{p-m}	3.74±0.24 ^{x-y}	20.34±0.27 ^{y-z}
		6 day	7.89±0.03 ^o	13.41±0.18 ^{k-l}	22.11±0.36 ^{i-j}	3.40±0.07 ^{x-w}	21.54±0.34 ^{y-w}
		Recovery	8.08±0.07 ^{on}	13.14±0.23 ^{n-l}	21.42±0.66 ^{i-j}	3.42±0.14 ^{x-w}	20.99±0.50 ^{y-w}
	55%	3 day	11.21±1.20 ^{i-k}	13.77±0.15 ^{ij}	21.08±0.33 ^{o-j}	4.17±0.19 ^{r-t}	21.95±0.17 ^{v-w}
		6 day	13.55±1.15 ^h	14.10±0.17 ^{i-j}	19.92±0.33 ^{pr}	4.33±0.15 ^{r-p}	22.29±1.00 ^{v-w}
		Recovery	10.88±0.67 ^{j-k}	13.84±0.15 ^{i-j}	20.75±0.44 ^{p-m}	3.83±0.12 ^{v-t}	20.79±0.29 ^{y-w}
	30%	3 day	22.96±2.39 ^b	14.95±1.27 ^{f-e}	16.42±1.82 ^v	4.71±0.24 ^{o-p}	24.25±0.85 ^{q-r}
		6 day	25.51±2.04 ^a	16.94±0.50 ^b	21.26±1.07 ^{i-j}	4.72±0.17 ^{o-p}	20.89±1.13 ^{y-z}
		Recovery	18.55±1.68 ^{dc}	14.87±0.74 ^{f-e}	20.75±1.76 ^{p-m}	4±0.30 ^{v-t}	20.29±1.74 ^{y-z}
5	80%	3 day	5.46±0.03 ^{q-r}	12.50±0.32 ^{on}	19.45±0.69 ^{p-r}	5.4±0.19 ^{i-k}	28.71±0.54 ^{h-k}
		6 day	5.7±0.15 ^{q-r}	13.40±0.38 ^{k-l}	21.89±0.68 ^{i-j}	5.97±0.20 ^{de}	30.95±0.87 ^{c-d}
		Recovery	5.7±0.15 ^{q-r}	13.25±0.18 ^{k-l}	21.33±0.96 ^{i-j}	5.73±0.17 ^{h-f}	30.12±1.15 ^{f-d}
	55%	3 day	12.33±1.73 ⁱ	13.91±0.33 ^{i-j}	21.67±0.67 ^{i-j}	5.6±0.15 ^{i-f}	27.62±0.73 ^{n-k}
		6 day	15.66±1.86 ^f	14.75±0.33 ^{f-e}	23±0.67 ^{d-f}	5.9±0.20 ^{d-f}	30.54±1.30 ^{f-d}
		Recovery	10.66±0.88 ^{lf}	13.9±0.17 ^j	22±0.33 ^{i-j}	5.93±0.17 ^{d-f}	29.72±0.58 ^{h-i}
	30%	3 day	17.8±2.73 ^{de}	16.07±0.61 ^{cb}	25.52±1.96 ^c	6.24±0.17	21.75±2.93 ^{v-w}
		6 day	23.56±2.58 ^b	15.87±0.24 ^{cd}	23.34±0.44 ^{d-f}	6.3±0.09 ^{dc}	31.51±3.52 ^{c-d}
		Recovery	14.16±2.91 ^{gh}	14.75±0.69 ^{f-e}	22±0.75 ^{i-j}	6±0.04 ^{de}	30.49±2.87 ^{f-d}
6	80%	3 day	8.35±0.10 ^{on}	14.41±0.26 ^{i-j}	21.76±0.40 ^{i-j}	4.92±0.24 ^{o-k}	22.84±0.27 ^{v-w}
		6 day	8.34±0.03 ^{on}	14.62±0.18 ^{i-e}	23.36±0.36 ^{d-f}	4.47±0.07 ^{o-p}	24.04±0.34 ^{q-r}
		Recovery	8.53±0.07 ^{on}	14.35±0.23 ^{i-j}	22.67±0.66 ^{h-f}	4.53±0.14 ^{o-p}	23.49±0.50 ^{u-r}
	55%	3 day	11.66±1.20 ^{i-k}	14.98±0.15 ^{f-e}	22.33±0.33 ^{i-j}	5.3±0.19 ^{i-k}	24.45±0.17 ^{q-r}
		6 day	14±1.15 ^h	15.31±0.17 ^{c-e}	21.17±0.33 ^{i-j}	5.46±0.15 ^{i-f}	24.79±1.00 ^{q-r}
		Recovery	11.33±0.67 ^{j-k}	15.05±0.15 ^{f-e}	22±0.44 ^{i-j}	4.96±0.12 ^{m-k}	23.29±0.29 ^{v-r}
	30%	3 day	23.4±2.39 ^b	16.16±1.27 ^{cb}	17.67±1.82 ^{uv}	5.84±0.24 ^{d-f}	26.75±.85 ^{no}
		6 day	25.96±2.04 ^a	18.15±0.50 ^a	22.51±1.07 ^{i-f}	5.85±0.17 ^{d-f}	23.39±1.13 ^{u-r}
		Recovery	19±1.67 ^c	16.08±0.74 ^{cb}	22±1.76 ^{i-j}	5.1±0.30 ^{i-k}	22.79±1.74 ^{v-w}

بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز در لاین ۲ (۳۸/۲۵ واحد بر میلی گرم پروتئین) در شرایط تنش شدید و مرحله دوم نمونه برداری (۳۰٪ ظرفیت زراعی و شش روز) مشاهده شد. با این وجود میزان فعالیت پراکسیداز در مرحله بازیابی کاهش معنی داری نشان داد

و این کاهش در لاین ۲ بیشتر از لاین‌ها دیگر بود. همچنین لاین ۲ کمترین میزان فعالیت پراکسیداز (۱۷/۸۵) واحد بر میلی‌گرم پروتئین را در شرایط نرمال و زمان دوم نمونه‌برداری نشان داد.

تحت تنش خشکی القای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی توسط گیاه یک سازوکار دفاعی است که از طریق آن بر آسیب سلولی ناشی از تنش اکسیداتیو غلبه می‌کند (Talaat et al., 2015). در این پژوهش مشاهده شد که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در لاین ۲ و ۳ بیشتر از سایر لاین‌ها در شرایط تنش متوسط و شدید بود. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش می‌تواند از آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو بکاهد. به نظر می‌رسد واکنش لاین‌ها در فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش خشکی و ریکاوری متفاوت باشد. بنابراین لاین‌های متحمل مانند لاین ۲ فعالیت آنزیمی (کاتالاز، پراکسیداز و پلی-فنل اکسیداز) بیشتری نسبت به سایر لاین‌ها نشان دادند. مطالعات مختلف تحت شرایط تنش تغییرات متعددی را در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان داده‌اند (Talaat et al., 2015).

۳-۵. عملکرد و اجزای عملکرد

نتایج نشان داد که اثر لاین، تنش خشکی و همچنین برهمکنش بین آنها بر میزان عملکرد دانه، وزن ۱۰۰ دانه، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در بوته در سطح یک درصد معنی‌دار است (جدول ۷). تعداد غلاف در بوته و تعداد دانه در بوته در اثر تنش خشکی متوسط (۵۵٪ ظرفیت زراعی) و شدید (۳۰٪ ظرفیت زراعی) در تمامی لاین‌ها کاهش یافت؛ به طوری که لاین ۲ بیشترین تعداد غلاف در بوته و تعداد دانه در بوته را (به ترتیب ۲۳/۹۴ و ۷/۱۴ گرم در بوته) در شرایط بدون تنش (۸۰٪ ظرفیت زراعی) نشان دادند. در حالی که کمترین تعداد غلاف در بوته در لاین ۱ و ۵ (به ترتیب ۱۳/۴۴ گرم در بوته) و کمترین تعداد دانه در بوته در لاین ۴ (۱/۹۷ گرم در بوته) در شرایط تنش شدید (۳۰٪ ظرفیت زراعی) مشاهده شد (جدول ۸). وزن صد دانه و عملکرد دانه نیز در اثر تنش خشکی متوسط و شدید (به ترتیب ۵۵ و ۳۰٪ ظرفیت زراعی) کاهش یافت؛ به طوری که بیشترین وزن صد دانه در لاین ۳ در شرایط نرمال (۴/۸۳ گرم در بوته) و بیشترین عملکرد دانه در لاین ۲ (۷/۵۳ گرم در بوته) در شرایط نرمال و کمترین وزن صد دانه در بوته در شرایط تنش خشکی شدید در لاین ۱ و ۶ (۲/۲۳ ~ گرم در بوته) مشاهده شد همچنین کمترین میزان عملکرد دانه در لاین ۱ و تنش خشکی شدید (۰/۶۰ گرم در بوته) مشاهده شد (جدول ۸).

تنش خشکی در مرحله گلدهی و پر شدن بذر باعث کاهش عملکرد و اجزای عملکرد شد. اگرچه لاین ۲ در شرایط نرمال و تنش متوسط (۵۵٪ ظرفیت زراعی) بیشترین عملکرد را داشتند، اما در شرایط تنش خشکی کاهش عملکرد نشان دادند. نتایج ما مطابق با گزارش‌های قبلی نشان‌دهنده تنوع قابل توجه بین لاین‌ها از نظر عملکرد و اجزای عملکرد است که نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی برای این ویژگی‌ها در مواد ژنتیکی ارزیابی شده در شرایط تنش آبی است (Sehgal et al., 2019). در یک مطالعه روی چهار ژنوتیپ عدس تحت تنش خشکی تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها از نظر پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی آنها گزارش شد. به نظر می‌رسد که عدم کارایی آب در این دوره حساس باعث کاهش قابل توجه عملکرد و اجزای عملکرد شده است. در مقابل، آبیاری مناسب در زمان پر شدن بذر منجر به افزایش محصول فتوسنتزی و انتقال آنها به بذر و در نتیجه افزایش وزن بذر شد (Taylor et al., 2013). همچنین عدم وجود رطوبت کافی در گلدهی به طور قابل توجهی تشکیل بذر و باروری آن را کاهش می‌دهد و اگر کمبود آب در مرحله پر شدن دانه رخ دهد، می‌تواند به طور قابل توجهی تولید محصولات فتوسنتزی و انتقال آن را به بذر کاهش دهد که نتیجه آن کوچک شدن دانه و کاهش وزن دانه می‌شود (Plaut et al., 2004). نتایج تحقیقات دیگر موید آن است که عملکرد دانه و اجزای عملکرد در شرایط تنش کاهش می‌یابد. تنش خشکی منجر به فتوسنتز غیر طبیعی و گرده‌های عقیم می‌شود و همچنین انتقال مواد ذخیره‌سازی بذر را کاهش می‌دهد که می‌تواند منجر به کاهش وزن بذر شود (Mollasadeghi & Dadbakhsh, 2011). براساس نتایج این پژوهش، لاین ۲ در هر دو شرایط تنش توانایی بالایی در حفظ عملکرد نسبت به سایر لاین‌ها نشان دادند.

۳-۶. همبستگی

نتایج تجزیه همبستگی بین صفات نشان داد که میزان کلروفیل و کارتنوئید برگ همبستگی مثبت و معنی‌داری با یکدیگر داشتند (شکل ۲). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همبستگی مثبت و معنی‌داری با یکدیگر داشتند. علاوه بر این، میزان کلروفیل با آنزیم‌های

آنتی اکسیدان همبستگی منفی و معنی داری داشت. همچنین همبستگی مثبت و معنی داری بین میزان MDA و میزان H_2O_2 مشاهده شد؛ در حالی که همبستگی H_2O_2 با پروتئین منفی و معنی دار بود (شکل ۲).

جدول ۷. جدول تجزیه واریانس صفات عملکرد لاین های عدس.

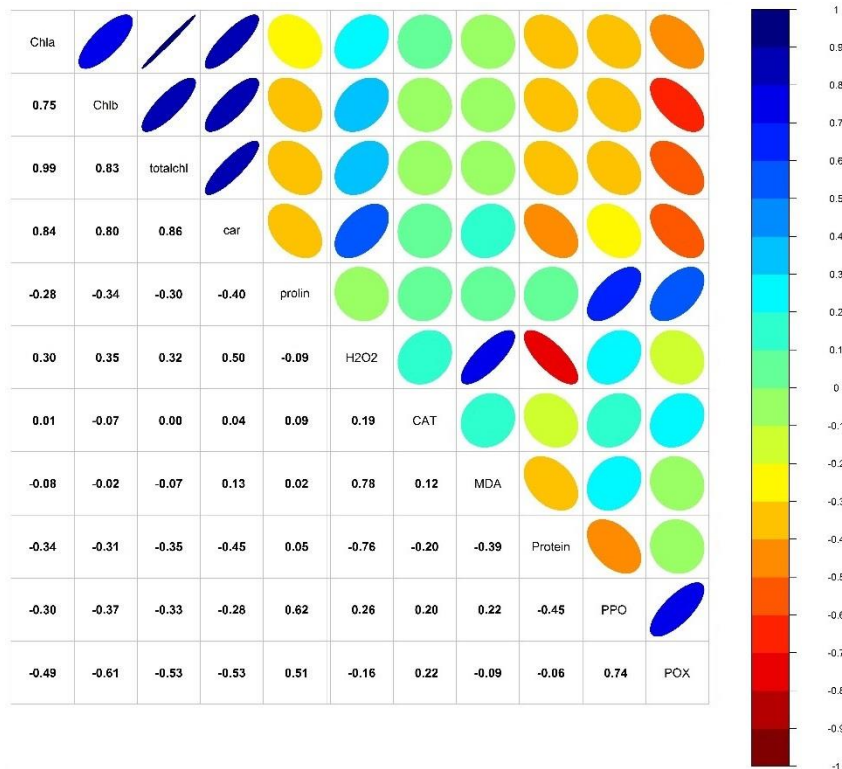
S.O.V	DF	100 seed number	seed number per plant	pod number per plant	Seed yield
Genotype	5	4.23**	12.40**	59.81*	39.07**
Drought stress	2	3.06**	6.97**	72.0*	7.53**
Genotype *drought	10	0.241**	0.95**	2.97**	0.34**
error	36	0.012	0.11	0.17	0.43
CV	-	3.55	8.33	2.40	3.88

جدول ۸. تأثیر تنش خشکی بر صفات عملکرد لاین های عدس.

Cultivars	Drought stress	100 seed number	seed number per plant	pod number per plant	Seed yield
1	Control(80%)	2.54±0.51 ⁱ	2.94±0.20 ^h	16.94±1.5 ^{fg}	1.24±0.05 ^{lk}
	drought stress(55%)	2.40±0.24 ^{i-j}	2.54±0.27 ^{i-h}	13.44±0.66 ^k	0.69±0.05 ^m
	drought stress(30%)	2.24±0.10 ^j	2.47±0.31 ^{i-h}	14.42±0.57 ^j	0.60±0.05 ^m
2	Control(80%)	4.41±0.06 ^b	7.14±0.22 ^a	23.94±0.57 ^a	7.53±0.13 ^a
	drought stress(55%)	4±0.09 ^c	5.54±0.24 ^b	23.04±0.33 ^b	6.53±0.15 ^b
	drought stress(30%)	3.20±0.11 ^f	5.87±0.22 ^b	18.94±0.88 ^d	5.79±0.17 ^c
3	Control(80%)	4.83±0.06 ^a	4.87±0.22 ^c	17.60±0.66 ^{fe}	4.10±0.41 ^d
	drought stress(55%)	3.9±0.85 ^{dc}	4.24±1.82 ^{de}	15.44±1.48 ⁱ	3.79±0.40 ^e
	drought stress(30%)	3.1±0.77 ^{ef}	3.04±1.41 ^g	14.60±1.34 ^j	2.69±0.239 ^f
4	Control(80%)	3.7±0.04 ^d	4.91±0.13 ^c	19.60±0.8 ^d	3.63±0.21 ^e
	drought stress(55%)	3.40±0.12 ^e	3.54±0.39 ^{ef}	17.44±0.13 ^{fe}	2.49±0.21 ^g
	drought stress(30%)	3±0.15 ^g	1.97±0.46 ⁱ	14.60±0.18 ^j	1.49±0.15 ^j
5	Control(80%)	3.49±0.04 ^e	4.87±0.15 ^c	16.94±0.43 ^{fg}	2.48±0.14 ^g
	drought stress(55%)	3.20±0.24 ^f	4.24±0.16 ^{de}	16.44±0.50 ^{hg}	2.19±0.17 ^h
	drought stress(30%)	2.87±0.27 ^h	4.20±0.08 ^{de}	13.44±0.56 ^k	1.28±0.09 ^k
6	Control(80%)	2.53±0.05 ⁱ	4.34±0.14 ^{d-e}	20.94±0.10 ^c	1.72±0.05 ⁱ
	drought stress(55%)	2.40±0.53 ^{i-j}	4.14±0.30 ^{de}	17.94±0.19 ^e	1.29±0.41 ^k
	drought stress(30%)	2.23±0.48 ⁱ	3.81±0.36 ^f	15.94±0.26 ^{hi}	1.09±0.44 ^l
LSD (5%)		0.184	0.570	0.688	0.181

۴. نتیجه گیری

در این پژوهش تنش خشکی باعث کاهش کلروفیل و پروتئین در همه لاین ها در شرایط تنش متوسط و شدید شد، اما کاهش این صفات در لاین های مختلف متفاوت بود. همچنین تنش خشکی به طور قابل توجهی غلظت پرولین و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان را در برگ ها تغییر داد. با این حال لاین های عدس در مراحل اول و دوم تنش شدید، کاهش شدیدی در صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نشان دادند؛ اما در مرحله بازیابی بهبود رشد و کاهش اثرات منفی تنش مانند کاهش میزان MDA و H_2O_2 قابل مشاهده بود. نتایج همبستگی نشان داد که آنزیم های آنتی اکسیدان همبستگی مثبت و معنی داری با پرولین داشتند. همچنین لاین ۲ دارای بیشترین عملکرد در شرایط نرمال و تنش خشکی بود. این لاین توانایی بالایی در تحمل به تنش خشکی نشان داد؛ در نتیجه، بر اساس نتایج این تحقیق لاین ۲ لاین مناسبی برای کشت در شرایط منطقه می تواند باشد. با این حال، مطالعات بیشتر روی این لاین ها در مورد بیان ژن مرتبط با تحمل به خشکی مورد نیاز خواهد بود.



شکل ۲. ضرایب همبستگی پیرسون در بین صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی عدس در شرایط تنش و نرمال. ضرایب همبستگی با مقادیر مطلق بالاتر از ۰/۲۰ و ۰/۲۶ به ترتیب در سطح احتمال آماری پنج و یک درصد معنی دار بود. اشکال بیضی با رنگ‌های تیره نشان‌دهنده همبستگی بیشتر (نزدیک به ۱ یا -۱) و اشکال کروی‌تر با رنگ‌های روشن نشان‌دهنده ضریب همبستگی نزدیک به صفر هستند.

۵. منابع

- Abrishamchi, P., Ganjeali, A., & Sakeni, H. (2012). Evaluation of morphological traits, proline content and antioxidant enzymes activity in chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Iranian Journal of Pulses Resarch*, 3, 17-30. (In Persian).
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Ahmed, I.M., Dai, H., Zheng, W., Cao, F., Zhang, G., Sun, D., & Wu, F. (2013). Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 49-60.
- Ahmadi, A., Amini Dehaghi, M., Sedghi, M., & Mansourifar, C. (2020). The effect of drought stress on antioxidant enzyme activity and chlorophyll content of some advanced genotypes of lentil (*Lens culinaris* Medik). *Enviromental Stress in Crope Seinces*, 12, 1105- 1116. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>.
- Aranjuelo, I., Molero, G., Erice, G., Avicé, J.C., & Nogués, S. (2011). Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62, 111-123. Doi: 10.1093/jxb/erq24.
- Arnon, A. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23, 112-121.
- Ashraf, S., Nazemi, A., & AghaKouchak, A. (2021). Anthropogenic drought dominates groundwater depletion in Iran. *Scientific Reports*, 11, 1-10.
- Bahadoran, M., Abrishamchi, P., Ejtehadi, H., & Ghassemzadeh, F. (2015). Study on some physiological characteristics of *Salsola richteri* in drought conditions in the two desert regions of the South Khorasan province. *Plant Biology*, 7(24), 1-14. (In Persian).
- Barnabás, B., Jäger, K., & Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment*, 31, 11-38.
- Bates, L., Waldren, S., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*, 91(2), 179-194.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*, 72, 248-254.

- [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Chen, D., Wang, S., Cao, B., *et al.* (2016). Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01241>.
- Demiral, T., & Türkan, I. (2004). Does exogenous glycine betaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment? *Journal of Plant Physiology*, 161, 1089-1100.
- Emadodin, I., Reinsch, T., & Taube, F. (2019). *Drought and desertification in Iran*. Hydrology 6.
- Guo, Z., Ou, W., Lu, S., & 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.
- Hazrati, R., Zare, N., Asghari, R., Sheikhzadeh, P., & Johari-Ahar, M. (2022). Biologically synthesized CuO nanoparticles induce physiological, metabolic, and molecular changes in the hazel cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 6017–603. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12107-6>.
- Hura, T., Grzesiak, S., Hura, K., Elisabeth Thiemt, E., Tokarz, K., & Wedzony, M. (2007). Physiological and biochemical tools useful in drought-tolerance detection in genotypes of winter triticale: Accumulation of ferulic acid correlates with drought tolerance. *Annals of Botany*, 100, 767–775.
- Kar, M., & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activity during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57, 315–319.
- Kumar, S., Barpete, S., Kumar, J., Gupta, P., & Sarker, A. (2013). Global lentil production: Constraints and strategies. *SATSA Mukhapatra-Annu Tech*, 17, 1-13.
- Ministry of Agricultural Jihad (2016). *Agricultural Products Statistics*. p. 19. (In Persian).
- Mollasadeghi, V., & Dadbakhsh, A. (2011). Evaluation of some yield components in wheat genotypes under the influence of drought stress after flowering. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 1137-1142.
- Monakhova, O.F., & Chemyadev II. (2002). Protective role of kartolin-4 in wheat plants exposed to soil drought. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38, 373–380.
- Nasimi, P., Karimi, A., & Motaghian, H. (2019). Effects of biochar produced from date palm's leaves on saturated hydraulic conductivity and soil moisture coefficients of sandy clay loam soil. *Iranian Water Researches Journal*, 13(3), 161-171.
- Pintó-Marijuan, M., & Munné-Bosch, S. (2014). Photo-oxidative stress markers as a measure of abiotic stress-induced leaf senescence: Advantages and limitations. *Journal of Experimental Botany*, 65, 3845–3857. Doi: 10.1093/jxb/eru086.
- Plaut, Z., Butow, B.J., Blumenthal, C.S., & Wrigley, C.W. (2004). Transport of dry matter into developing wheat kernels and its contribution to grain yield under post-anthesis water deficit and elevated temperature. *Field Crops Research*, 86(2–3), 185–98. Doi: 10.1016/j.fcr.2003.08.005.
- Rahbarian, R., Khavari-Nejad, R., Ganjeali, A., Bagheri, A.R., & Najafi, F. (2011). Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Acta Biologica Cracoviensia*, 53, 47-56.
- Reda, A. (2015). Lentil (*Lens culinaris* Medikus) current status and future prospect of production in Ethiopia. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2, 00040.
- Sehgal, A., Kumari, S., Kalpna, B., Shiv, K., Jitendra K., Vara Prasad, P.V., Kadambot Siddique, H., & Harsh Nayyar, M. (2019). Influence of drought and heat stress, applied independently or in combination during seed development, on qualitative and quantitative aspects of seeds of lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes, differing in drought sensitivity. *Plant Cell and Environment*, 42(1), 198–211. Doi: 10.1111/pce.13328.
- Singh, D., Singh, C.K., Taunk, J., Jadon, V., Pal, M., & Gailkwad, K. (2019). Genome wide transcriptome analysis reveals vital role of heat responsive genes in regulatory mechanisms of lentil (*Lens culinaris* Medikus). *Science Reporter*, 9, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49496-0>.
- Sinha, R., Kumar, A., Anil, P., & Singh, K. (2018). Physiological, biochemical and molecular responses of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes under drought stress. *Indian Journal of Plant Physiology*, 56, 47-57. <https://doi.org/10.1007/s40502-018-0411-7>.
- Srivastava, R., & Vasishtha, H. (2012). Saponins and lectins of Indian chickpeas (*Cicer arietinum*) and lentils (*Lens culinaris*). *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 25, 44-47.
- Talaat, N.B., Shawky, B.T., & Ibrahim, A.S. (2015). Alleviation of drought-induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants by dual application of 24-epibrassinolide and spermine. *Environmental and Experimental Botany*, 113, 47–58.
- Tariq, A., Pan, K., Olatunji, O.A., Graciano, C., Li, Z., Wu, X., Chen, W., Song, D., Huang, D., Xue, T., & Zhang, A. (2018). Phosphorous fertilization alleviates drought effects on *Alnus cremastogyne* by regulating its antioxidant and osmotic potential. *Scientific Reports*, 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24038-2>.
- Taylor, P., Adele, M., Maria, S., Umberto, A., Carmelo, S., Dipartimento, A., Università, M., Località, F., Reggio, C., Federico, I., & Via, U. (2013). Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes. *Journal of Plant Interactions*, 110, 37–41. Doi: 10.1080/17429145.2013.835880.

- Valentovic, P., Luxova, M., Kolarovic, L., & Gasparicova, O. (2006). Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil Environmental*, 52, 186-191.
- Ying, Y., Song, Q., Jacobs, L.L., Mei, D.F., Liu, L., Jin, S.H., *et al.* (2015). Physiological response to drought stress in *Camptotheca acuminata* seedlings from two provenances. *Frontiers in Plant Science*, 6, 361. Doi: 10.3389/fpls.2015.00361.
- Zaho, S., Xu, C., & Zou, Q. (1994). Improvements of the method for measurement of malondialdehyde in plant tissue. *Plant Physiology*, 30, 207-210.
- Zaragoza-Martínez, F., Lucho-Constantino, G.G., Ponce-Noyola, T., Esparza-García, F., Poggi-Varaldo, H., Cerda-García-Rojas, C.M., Trejo-Tapia, G., & Ramous-Valdivia, C. (2016). Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127, 47-56. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1028-z>.