نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۱، شماره ۱ ، بهار ۱۳۹۲، ص.۱۵۱-۱۴۱

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 11, No. 1, Spring. 2013, p. 141-151

واکنش ضد اکسندگی متفاوت چهار ژنوتیپ جو (*Hordeum vulgare* L.) به کمبود آب

زهره امینی[۱*]- فواد مرادی[۲]- رحیم حداد [۳]

تاریخ دریافت:۱۳۸۹/۱۲/۱۰
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۱۱/۲

چکیده

تغییرات شرایط آب و هوایی آینده خطر تنش خشکی را روز به روز افزایش می دهد و در حال حاضر تنش خشکی یکی از عمومی ترین مشکلات کشت جو در ایران می باشد. تا به امروز تحقیقات زیادی درباره اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده صورت گرفته است، اما اطلاعات اندکی درباره اثر تنش خشکی بر فعالیت این آنزیم‌ها در شرایط طبیعی رشد گیاهان (در مزرعه) وجود دارد. از این رو در این پژوهش اثر تنش خشکی ضعیف وشدید بر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX)، در مراحل شروع باروری، پر شدن دانه و شیری شدن دانه چهار ژنوتیپ جو با عملکرد دانه متفاوت در مزرعه بررسی گردید. نتایج نشان دادند که تنش کم آبی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در هر چهار ژنوتیپ گردید. در مرحله شروع باروری فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ Q22 از سایر ژنوتیپ‌ها بیشتر بود ($P<0.01$). با توجه به اینکه بر اساس عملکرد دانه در شرایط خشکی، این ژنوتیپ از ژنوتیپ‌های دیگر نسبت به تنش کم آبی مقاوم‌تر می باشد، به نظرمی رسد این آنزیم در مقاوم کردن این ژنوتیپ به تنش کم آبی نقش موثری داشته و می توان از آن در تحقیقات زیست فناوری و تولید ژنوتیپ های مقاوم به تنش خشکی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: تنش کم آبی، تنش اکسندگی، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز

مقدمه

در سلول‌های گیاهی یکی از نتایج بدیهی انتقال الکترون پیوسته با غشا در کلروپلاست، میتوکندری و غشای پلاسمایی انتقال الکترون به اکسیژن مولکولی و تشکیل انواع اکسیژن فعال می‌باشد. تقریباً ۱٪ از اکسیژنی که به وسیله گیاهان مصرف می‌گردد، در طی فرایندهای طبیعی سلول صرف تولید انواع اکسیژن فعال می‌شود. اما تنش‌های زنده و غیر زنده باعث افزایش تشکیل انواع اکسیژن فعال در سلول گیاهی می‌شوند. انواع اکسیژن فعال که می‌توانند منجر به تخریب اکسنده شوند شامل رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال پرهیدروکسیل (H_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (HO)، رادیکال الکاکسیل (RO)، رادیکال پروکسیل (ROO)، هیدروپراکسیدهای آلی (ROOH)، اکسیژن منفرد (RO) و کربونیل برانگیخته (RO) می‌باشد (۹). اکسیژن های فعال باعث تخریب ماکرومولکول‌ها و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند (۱۲، ۲۰، ۳۴ و ۳۵). گیاهان جهت مقابله با تنش اکسنده ناشی از انواع اکسیژن فعال دارای فعالیت ضد اکسنده آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند (۴). ضد اکسنده‌های غیرآنزیمی شامل آب دوست ها[۴] (شامل گلوتاتیون و آسکوربیک اسید) و چربی دوست ها[۵] (شامل توکوفرول و کاروتنوئیدها) می باشند (۲۹). ضد اکسنده‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1) که واکنش تبدیل رادیکال سوپر اکسید (O_2^-) به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را کاتالیز می کند، کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6)، آسکوربیت پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11) و پراکسیداز (POX, EC 1.11.1.7) که پراکسید هیدروژن تشکیل شده را به آب احیا می کنند (۶، ۱۶ و ۲۴) و آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR, EC 1.6.4.2) که مسیر متابولیکی "اسدا - هالیول" را از طریق باززایی مخزن گلوتاتیون به وسیله NADPH به عنوان دهنده الکترون کامل می‌کند (۲۱). تحقیقات اخیر نشان می دهد که تنش خشکی باعث تشکیل انواع اکسیژن فعال و به دنبال آن باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده می گردد، به طوری که افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در گیاهان مقاوم

۱و۳- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)
(*-نویسنده مسئول: Email: zohamini@gmail.com)
۲- استادیار فیزیولوژی گیاهی موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی

4- Hydrophilics
5- Lipophilics

به تنش خشکی نسبت به گیاهان حساس، نقش مهمی در مقاوم کردن آنها به تنش خشکی دارا می باشد (۱۷ و ۲۲).

خشکی یکی از مهمترین تنش های محیطی است که باعث کاهش رشد گیاهان و در نتیجه عملکرد آنها می شود (۲۶ و ۳۷). با توجه به اینکه ایران در منطقه گرم و نیمه خشک واقع شده است، تولید گیاهان مقاوم به خشکی با استفاده از روش های جدید زیست فناوری امری لازم و ضروری می باشد. جهت محقق شدن این امر، آگاهی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابله با تنش خشکی لازم است تا بتوان در مراحل بعدی ژن‌های مسئول این مکانیسم‌ها را شناسایی کرد. همچنین مشخص شده است که حساسیت گیاهان به کمبود آب در مراحل مختلف رشد و نمو متفاوت می باشد. جو در مقایسه با گندم، چاودار و یولاف احتیاج کمتری به آب دارد. این نیاز کم از یک طرف به دلیل مصرف کمتر آب و از طرف دیگر به دلیل رسیدن گیاه قبل از گرمای تابستان می‌باشد (۲). با وجود این جو نیز در طول دوره رشد و نمو خود در مراحل ساقه رفتن، گرده افشانی و تشکیل دانه و پر شدن آن نسبت به کمبود آب حساس است و تنش خشکی در این مراحل منجر به کاهش عملکرد آن می‌شود (۷، ۸ و ۱۱). تا به امروز تحقیقات زیادی درباره اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده در شرایط آزمایشگاه و در مرحله نشاء صورت گرفته است (۲۰، ۲۹، ۳۰، ۳۴ و ۳۶)، اما اطلاعات اندکی درباره اثر تنش خشکی بر فعالیت این آنزیم‌ها در مراحل رشد زایشی در شرایط طبیعی رشد گیاهان (در مزرعه) وجود دارد. از این رو با توجه به اهمیت نقش آنزیم‌های ضد اکسنده در محافظت سلول‌های گیاهی در مقابل تنش اکسنده ناشی از کمبود آب، در این پژوهش اثر تنش خشکی ضعیف و شدید بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز در مراحل شروع باروری، پر شدن دانه و شیری شدن دانه چهار ژنوتیپ جو در مزرعه بررسی شده است. همان طور که در جدول یک آورده شده است این ژنوتیپ ها از نظر میانگین عملکرد دانه با یکدیگر تفاوت دارند. هدف از گزینش آنها پاسخ به این پرسش بود که آیا این ژنوتیپ ها که از نظر عملکرد با هم تفاوت دارند از نظر میزان و چگونگی فعالیت آنزیم های ضد اکسنده نیز اختلافی دارند؟

مواد و روش‌ها

بذر چهار ژنوتیپ جو (*Hordeum vulgare* L.) به نام‌های Q13، Q15، Q20 و Q22 بر اساس آزمایش های مقدماتی از خزانه ژنتیکی موجود در گروه بیوتکنولوژی دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) انتخاب گردید. مشخصات ژنوتیپ‌ها شامل عملکرد دانه و برخی از صفات مرتبط با عملکرد در شرایط خشکی در جدول یک آورده شده است. بذرها با تراکم کشت ۲۵۰ بوته در متر مربع در تاریخ ۱۲ آبان ماه ۱۳۸۴ در مزرعه کاشته شدند. کشت آبی جو زمانی صورت می گیرد که میزان بارندگی در طول دوره رشد گیاه جو کمتر از ۲۰۰ میلی متر باشد (۲). با توجه به اینکه میزان بارندگی در منطقه قزوین از زمان کاشت تا آخر ماه فروردین بیش از ۲۵۵ میلی متر بود (مشخصات هواشناسی منطقه در طول دوره آزمایش در شکل ۱ آورده شده است). بنابراین تا اول ماه اردیبهشت ۱۳۸۵ گیاهان در شرایط طبیعی مزرعه بودند و فقط آب باران را دریافت می کردند. از این تاریخ به بعد (۱۶۸ روز بعد از کاشت) در اطراف گیاهانی که باید تحت تنش خشکی شدید قرار می گرفتند، چهار چوب فلزی قرارداده شد. سپس با توجه به پیش بینی هواشناسی در زمان هایی که احتمال بارندگی وجود داشت بر روی چارچوب فلزی پلاستیک قرار داده شد تا از رسیدن آب باران به آنها جلوگیری شود و پس از بارندگی پلاستیک برداشته می شد. در چنین شرایطی پوشش پلاستیکی تاثیری بر دما نداشت و گیاهان فقط تحت تنش کم آبی قرار داشتند. در طول دوره آزمایش گیاهان تیمار تنش خشکی ضعیف آبیاری نشدند و میزان آب دریافتی گیاه به میزان نزولات آسمانی بستگی داشت. گیاهان شاهد (آبیاری شده)، در طول دوره آزمایش هفته ای یک بار آبیاری شدند (۳). نمونه برداری‌ها در روزهای ۲۱۵، ۲۲۹ و ۲۳۶ بعد از کاشت و بر اساس روش دهدهی یا زادوکس به ترتیب در مراحل شروع باروری [۱](۶۰-۶۱)، پر شدن دانه (۷۱-۷۲)، شیری شدن دانه (۷۵-۷۶) و ۲۴ ساعت پس از آبیاری گیاهان شاهد از برگ‌های اول (برگ پرچمی)، دوم و سوم ساقه اصلی هر بوته صورت گرفت و بلافاصله بعد از قرار دادن نمونه‌ها در ورقه‌های آلومینیمی، در نیتروژن مایع منجمد گردیده و در پایان نمونه برداری در دمای $-80^{\circ}C$ نگهداری شدند (۲۹).

جهت تعیین میزان نسبی آب [۲] از برگ پرچم از روش ترکان و همکاران (۳۵) استفاده گردید. جهت استخراج پروتئین محلول کل [۳] یک گرم بافت برگ در حضور ۱۰۰ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP) و ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) و سدیم متابی‌سولفات یک میلی‌مولار) له شدند. عصاره گیاهی حاصل به لوله‌های سانتریفیوژ انتقال داده شد و نمونه‌ها در ۱۵۰۰۰ rpm و دمای $4^{\circ}C$ به مدت ۲۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (Beckman Culter مدل Allegra – 64R) سانتریفیوژ شدند. همه مراحل تهیه عصاره آنزیمی در دمای $4^{\circ}C$ صورت گرفت. میزان پروتئین محلول کل به روش بردفورد (۱۳) و میزان کلروفیل به روش آرنون (۵) اندازه گیری شد.

۱- این اعداد نشان دهنده مراحل رشد و نمو غلات بر اساس روش دهدهی یا دو صفر تا صد (زادوکس) می باشد.

2- Relative water conten

3- Total soluble protein

جدول ۱- عملکرد و برخی از صفات زراعی ژنوتیپ های بکار برده شده در این پژوهش در شرایط تنش خشکی

ژنوتیپ	میانگین عملکرد دانه (کیلو گرم / هکتار)	وزن هزار دانه (گرم)	عملکرد بیولوژیک (کیلو گرم / هکتار)	عرض برگ پرچم (سانتیمتر)	طول برگ پرچم (سانتیمتر)	ارتفاع بوته (سانتیمتر)
Q13	۱۳۹۰	۳۶/۱۱	۲۱۲۵	۰/۸۶	۵/۹۳	۶۷
Q15	۹۲۱	۳۱/۷۸	۱۴۲۰	۰/۷۲	۹/۶	۶۰
Q20	۱۵۸۲	۳۵/۹۹	۱۷۷۰	۰/۷۱	۱۲/۴	۷۱
Q22	۱۸۷۰	۴۳/۹۴	۲۱۶۰	۰/۶۹	۶/۲	۷۷

فعالیت آنزیم‌ها به روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر Labomed مدل UV-3200) در دمای آزمایشگاه (۲۵±۲°C) اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(SOD, EC ۱.۱۵.۱.۱) از طریق اندازه گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید (NBT) با تغییرات جزئی در روش دهیندسا و همکاران (۱۵) سنجش شد. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار(pH=۷/۸)، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیترو بلو تترازولیوم کلراید ۷۵ میکرومولار، اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ۰/۱ میلی مولار، ریبوفلاوین ۳۶۰ میکرومولار و ۳۰ میکرولیتر عصاره خام بود. پس از آن که مخلوط بهم زده شد سل‌های اسپکتروفتومتر به مدت ۱۰ دقیقه در زیر یک لامپ فلورسنت ۱۵W به فاصله ۳۵ سانتیمتر قرار داده شد. با خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند تا۵۰درصد مانع از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید گردد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC ۱.۱۱.۱.۱۱) به روش ناکانو و اسدا (۲۷) اندازه گیری گردید. یک میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار (pH=۷/۸)، آسکوربات ۱۰ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۱۰میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۲/۸ تعیین گردید.

جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC ۱.۱۱.۱.۶) از روش بیرز و سیزر (۱۰) استفاده شد. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار (pH=۷/۸)، پراکسید هیدروژن یک مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تجزیه شدن H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۳۹/۴ تعیین گردید.

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX, EC۱.۱۱.۱.۷) به روش همدا و کلین (۱۹) صورت گرفت. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم۵۰ میلی‌مولار (pH=۶/۶)، گایاکول ۱٪ و پراکسید هیدروژن۳ /۰٪ و۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۲۶/۶ تعیین گردید. فعالیت ویژه آنزیم های آسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز بصورت تعداد میکرومول H_2O_2 تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل پراکندگی مورد مطالعه در این تحقیق عبارت از الف: سه نوع تیمار (T) شامل تیمارهای آبیاری شده، خشکی ضعیف و خشکی شدید، ب: سه مرحله رشد گیاه (GS) شامل شروع باروری، پر شدن دانه و شیری شدن دانه و ج: چهار ژنوتیپ (G) شامل Q13، Q15، Q20 و Q22 بود. بررسی داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS 11.5 (Chicago, Il, USA) انجام گرفت و میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج و بحث

اثر تنش کم آبی

میزان آب برگ پرچم در تیمارهای خشکی ضعیف و شدید نسبت به گیاهان آبیاری شده کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲). کاهش میزان RWC در تیمار خشکی شدید نسبت به تیمار خشکی ضعیف معنی‌دار نبود. بین تیمارها از نظر میزان کلروفیل تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید و هر سه تیمار در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۲). بین گیاهان آبیاری شده و گیاهان تیمار خشکی ضعیف از نظر میزان پروتئین محلول کل تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۲). اما با افزایش شدت کم آبی، میزان پروتئین محلول کل در تیمار خشکی شدید به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (شکل ۲).

فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای خشکی ضعیف و شدید نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۳). اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای خشکی ضعیف و شدید مشاهده نگردید. فعالیت ویژه آنزیم‌های آسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز بین سه تیمار تفاوت معنی‌داری نشان داد و تیمارها در گروه‌های آماری متفاوتی قرار گرفتند. بیشترین فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در تیمار خشکی شدید مشاهده گردید (شکل ۳).

شکل ۱- میانگین دمای هوا، رطوبت نسبی و بارندگی ماهیانه در طول دوره آزمایش.

جدول ۲ – نتایج تجزیه واریانس برای صفات میزان نسبی آب برگ پرچم (RWC)، میزان کلروفیل (CHL) و پروتئین محلول کل (TSP) وفعالیت ویژه آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) در چهار ژنوتیپ جو.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		RWC	CHL	TSP	SOD	APX	CAT	POX
تیمار رطوبتی(T)	۲	۲۴۷۳۳**	۸/۹۵۸^{ns}	۲۸/۱۳۱**	۱۳۹۹۱**	۲۰۶۷۴۱**	۵۲۶۲۷**	۶۳۲۱۶۴**
مرحله رشد (GS)	۲	۲۲۱۷۴**	۷۹/۲۷۱**	۰/۶۰۰**	۸۳۵۶۳۴**	۱۰۹۸۹۹۱**	۱۱۳۸۳**	۱۱۸۹۳۳۶۱**
ژنوتیپ (G)	۳	۳۰۲/۹۸**	۱۲/۹۸۷**	۰/۰۱۴**	۳۴۴۲۱**	۶۲۸۷۴**	۲۳۶۱۱**	۹۸۹۰۷**
اثر متقابل (T×GS)	۴	۲۴۷۳/۱**	۰/۳۳۹**	۰/۰۴۶**	۵۵۳۰۲**	۱۵۴۴۱۰۱**	۲۹۹۹۲**	۴۶۰۹۲۳۷**
اثر متقابل (T×G)	۶	۱۹/۸۹۱^{ns}	۰/۱۵۸*	۰/۰۰۱^{ns}	۵۴۴۷*	۱۲۹۵۶۱**	۷۸۴۶**	۱۰۰۳۶۸**
اثر متقابل (GS×G)	۶	۱۸/۶۵۵^{ns}	۱/۸۲۳**	۰/۰۱۱**	۱۵۷۹۴**	۷۵۲۳۳**	۳۷۷۸**	۴۲۵۹۶۱**
اثرمتقابل (T×GS×G)	۱۲	۱۵/۹۷۳^{ns}	۰/۱۵۲**	۰/۰۲۲**	۱۸۹۵^{ns}	۲۷۰۴۱**	۴۷۶۸**	۱۰۶۵۹۸**
اشتباه آزمایشی	۷۲	۱۵/۲۸۱	۰/۰۷۰	۰/۰۰۱	۲۱۲۰	۹۳۳۹	۲۱۶۲	۲۶۴۶۹
ضریب تغییرات (درصد)		۶/۶۸۱	۱۰/۳۲۷	۰/۵۸۲	۱۴/۰۵۹	۷/۷۷۳	۹/۹۲۳	۱۱/۵۸۴

*- در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد.

**- در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد.

ns- در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشد.

تفاوت بین ژنوتیپ ها

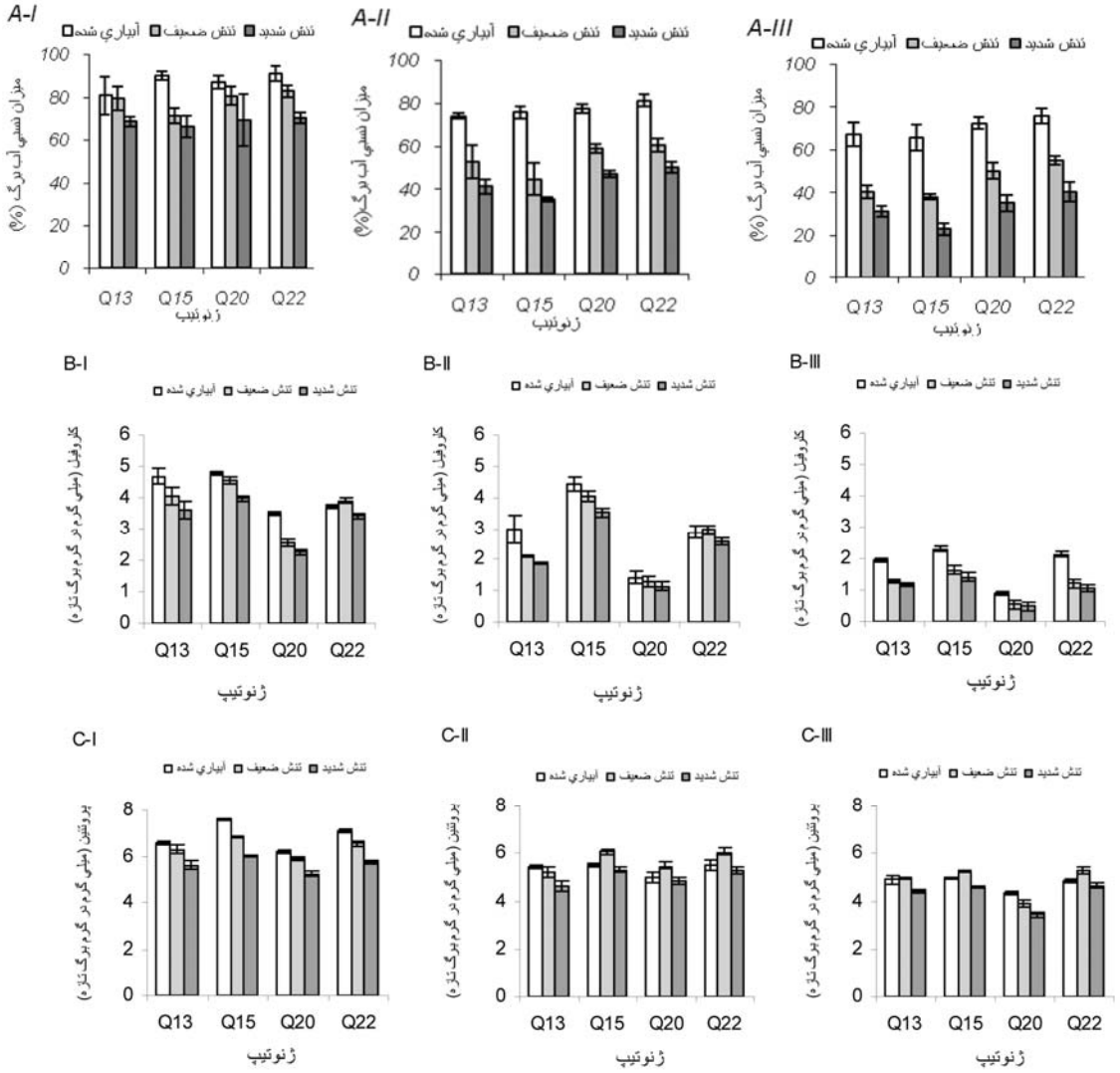
در میزان نسبی آب برگ پرچم (RWC) در مرحله شروع بـاروری سه رژیم آبی (شکل A-I–۴) و در مرحله پر شدن دانه گیاهان آبیاری شده تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد (شکل A- II–۴). در مرحلـه پـر شـدن دانـه تیمـار خشـکی ضـعیف میـزان RWC در ژنوتیپ‌های Q20 و Q22 به طور معنی دار بیش از ژنوتیپ‌های Q13 و Q15 بود (شکل A- II–۴). اما تفاوت بین دو ژنوتیپ Q20 و Q22 معنی دار نشد. در تیمار خشکی شدید میزان RWC ژنوتیپ Q15 بـه طور معنی دار کمتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود. در مرحله شیری شدن دانه نیز تفاوت بین ژنوتیپ‌ها در هر سه رژیم آبی معنی دار بود و بیشترین میزان RWC در هر سه تیمار در ژنوتیپ Q22 مشـاهده شـد (شـکل A- III–۴). در مطالعه میزان کلروفیل اختلاف بین ژنوتیپ‌هـا در هـر سه مرحله نمونه برداری سه رژیم آبـی معنـی دار بـود و در هـر سـه مرحله بیشترین میزان کلروفیل در ژنوتیپ Q15 مشاهده شـد (شـکل A- I, II and III–۴).

شکل۲- اثر تیمارهای آبیاری شده، خشکی ضعیف و شدید بر میزان نسبی آب برگ (RWC)، میزان کلروفیل و پروتئین محلول کل

شکل ۳- اثر تیمارهای آبیاری شده، خشکی ضعیف و شدید بر فعالیت یژه آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX)

در صورتی که برای پروتئین محلول کل در مرحله شروع باروری هر سه رژیم آبی و در مراحل پر شدن دانه و شیری شدن دانه گیاهان شاهد تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد (شکل B- I, II and III-۴). در مراحل پر شدن دانه و شیری شدن دانه تیمارهای خشکی ضعیف و شدید تفاوت بین ژنوتیپ‌ها معنی دار بود و بیشترین مقدار پروتئین محلول کل در ژنوتیپ‌های Q15 و Q22 مشاهده شد.

برای فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در مرحله شروع باروری هر سه رژیم آبی تفاوت بین ژنوتیپ ها معنی دار شد و ژنوتیپ Q15 کمترین فعالیت آنزیمی را نشان داد (شکل A-I-۵). اما بین ژنوتیپ‌های Q13، Q20 و Q22 تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. در مرحله پر شدن دانه در هر سه رژیم آبی ژنوتیپ های Q13 و Q20 بیشترین فعالیت آنزیمی را داشتند (شکل A- II-۵). در مرحله شیری شدن دانه گیاهان تحت تنش های خشکی ضعیف و شدید ژنوتیپ های Q15 و Q20 بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان دادند (شکل A- III-۵). برای آنزیم آسکوربیت پراکسیداز، در مرحله باروری فقط در گیاهان شاهد (شکل B- I-۵) و در مرحله پر شدن دانه در هر سه رژیم آبی تفاوت بین ژنوتیپ‌ها معنی دار نبود (شکل B- II-۵). در مرحله شروع باروری تیمارهای خشکی ضعیف و شدید فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ Q20 به طور معنی دار از ژنوتیپ‌های دیگر کمتر بود. بین ژنوتیپ‌های Q13، Q15 و Q22 تفاوت معنی داری مشاهده نشد.



شکل ٤- تغییرات (A) میزان نسبی آب برگ پرچم، (B) میزان کلروفیل و (C) پروتئین محلول کل در تیمارهای آبیاری شده، تیمار خشکی ضعیف و تیمار خشکی شدید چهار ژنوتیپ جو در مراحل شروع باروری (I)، پر شدن دانه (II) و شیری شدن دانه (III). میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱٪ مقایسه شدند. میله‌های عمودی نشانه SE ± می‌باشند. هر عدد میانگین سه تکرار می باشد.

در مرحله شیری شدن دانه گیاهان آبیاری شده بیشترین میزان فعالیت در ژنوتیپ Q22 وجود داشت. اما در تیمارهای خشکی ضعیف و شدید ژنوتیپ Q22 دارای کمترین میزان فعالیت آنزیمی بود (شکل ٤-B- III ۵). در فعالیت آنزیم کاتالاز در مرحله شروع باروری گیاهان شاهد تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نگردید (شکل ٤-C- I ۶). تنش کم آبی باعث گردید اختلاف بین ژنوتیپ‌ها معنی دار گردد. در تیمارهای خشکی ضعیف و شدید بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ Q15 و کمترین فعالیت در ژنوتیپ Q22 مشاهده شد. اما در مراحل پر شدن دانه و شیری شدن آن تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ‌ها در هر سه رژیم آبی وجود نداشت و ژنوتیپ‌ها در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل٤-C- II and III ۶). برای آنزیم پراکسیداز، در مرحله شروع باروری هر سه رژیم آبی، تفاوت بین ژنوتیپ‌ها معنی دار شد. در هر سه تیمار ژنوتیپ Q22 دارای بیشترین و ژنوتیپ Q15 دارای کمترین فعالیت پراکسیداز بود (شکل ٤-D- I ۶). در مرحله پر شدن دانه گیاهان شاهد، تفاوت بین ژنوتیپ‌ها معنی دار و ژنوتیپ Q15 دارای بیشترین و ژنوتیپ Q22 دارای کمترین فعالیت پراکسیداز بود. اما در تیمارهای خشکی ضعیف و شدید تفاوتی بین تیمارها مشاهده نشد (شکل ٤-D- II ۶). در مرحله شیری شدن دانه گیاهان

شاهد فعالیت پراکسیداز در ژنوتیپ‌های Q13 و Q22 بیش از ژنوتیپ‌های Q15 و Q20 و در تیمارهای خشکی ضعیف و شدید فعالیت پراکسیداز ژنوتیپ Q15 از سایر ژنوتیپ‌ها کمتر بود (شکل A- I -۴ و D- III -۶).

در این آزمایش جهت اطمینان از اعمال تنش کم آبی بر روی گیاهان تیمارهای خشکی ضعیف و خشکی شدید تغییرات میزان نسبی آب برگ پرچم [1] اندازه گیری گردید. تنش خشکی در این تیمارها باعث کاهش RWC گردید (شکل ۲). در پژوهش هایی جهت بررسی ارتباط خشکی و تنش اکسنده ناشی از آن در گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) (۲۵)، گندم (۳۳) و پسته (۲۶) گزارش گردید که با افزایش شدت تنش خشکی RWC نیز بتدریج کاهش می‌یابد. همانطور که در نتایج این گزارش آورده شد در مرحله شروع باروری در هر سه تیمار در میزان RWC تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ ها مشاهده نشد (شکل A- I -۴) . اما در مرحله پر شدن دانه در تیمار خشکی شدید ژنوتیپ Q15 (که بر اساس میزان عملکرد در شرایط تنش کم آبی حساس ترین ژنوتیپ به تنش کم آبی شناخته شده است) کمترین میزان RWC را نشان داد (A- II -۴) و در مرحله شیری شدن نیز بیشترین میزان RWC در ژنوتیپ Q22 (که بر اساس میزان عملکرد در شرایط تنش کم آبی مقاوم ترین ژنوتیپ به تنش کم آبی شناخته شده است) دیده شد (شکلA- III -۴). چنین نتیجه ای به وسیله سعید و همکاران (۳۱) و لاسکانو و همکاران (۲۳) نیز گزارش شده است. آنها اثر تنش کم آبی را بر میزان RWC در ارقام گندم مقاوم و حساس اندازه گیری کردند. نتایج نشان داد که در همه ارقام بکار برده شده در آزمایش در اثر تنش خشکی این شاخص کاهش می یابد اما درصد کاهش آن در ارقام حساس بطور معنی داری بیشتر از ارقام مقاوم بود. همچنین در اثر تنش خشکی میزان پروتئین محلول کل در گیاهان تحت تنش خشکی شدید نسبت به گیاهان آبیاری شده و تیمار خشکی ضعیف کاهش پیدا کرد (شکل ۲). کاهش پروتئین محلول کل در اثر تنش خشکی در سایر گیاهان مانند گندم، برنج، تنباکو و آفتابگردان نیز گزارش شده است (۱۸، ۲۸، ۳۲ و ۳۴).

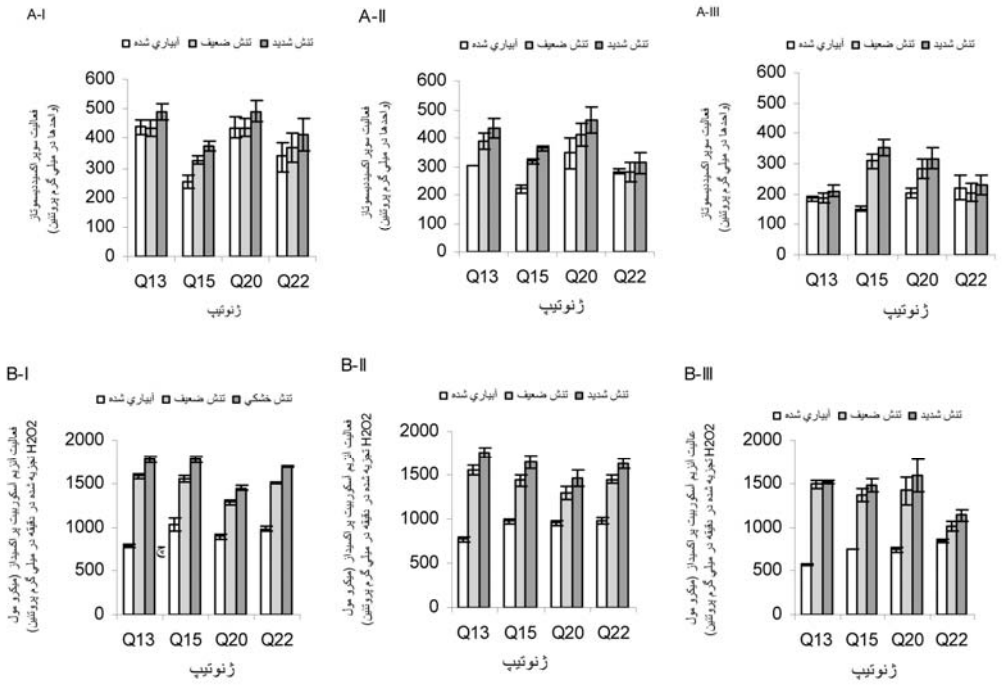
در این پژوهش در اثر تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز در مراحل شروع باروری، پر شدن دانه و شیری شدن دانه چهار ژنوتیپ جو افزایش یافت (شکل ۳). اسلوت و خاناچاپرا (۳۲) در بررسی اثر تنش خشکی بر عقیم شدن سنبلچه های برنج گزارش کردند که فعالیت SOD، APX در اثر تنش خشکی افزایش پیدا می کند. شارما و دوبی (۳۴) نیز گزارش کردند در نشاء برنج فعالیت APX و SODs با افزایش شدت تنش خشکی افزایش پیدا کرد. اما با بالا رفتن شدت تنش فعالیت POX کاهش پیدا کرد. فعالیت CAT در اثر تنش خشکی کاهش یافت. در آزمایشی بر روی گندم ژانگ و همکاران (۳۸) نشان دادند فعالیت SOD و CAT در ابتدای تنش خشکی افزایش پیدا کرد اما با طولانی شدن دوره تنش خشکی فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافت. در مقابل فعالیت POX و میزان MDA (فراورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدها) به طور قابل ملاحظه‌ای در پاسخ به تنش خشکی افزایش پیدا کرد.

همبستگی بین صفات

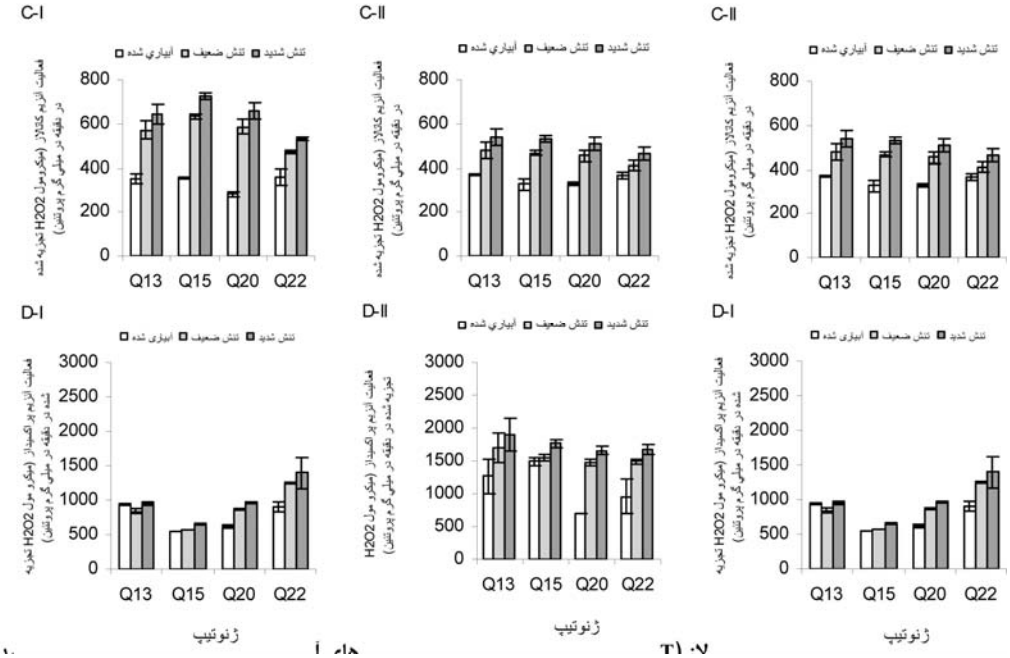
بین میزان فعالیت آنزیم های ضد اکسنده شامل سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربیت پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز با صفات اندازه گیری شده در ارتباط با عملکرد شامل عملکرد دانه، وزن هزار دانه و عملکرد بیولوژیک همبستگی مشاهده گردید (جدول ۳). همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با ارتفاع بوته، عملکرد دانه، وزن هزار دانه و عملکرد بیولوژیک معنی دار و مثبت است. همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با عملکرد دانه و وزن هزار دانه معنی دار و منفی است. همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز و آسکوربیت پراکسیداز با سایر صفات غیر معنی دار بود.

در این آزمایش فقط در مرحله شروع باروری بین صفت مقاومت به تنش خشکی ژنوتیپ Q22 و میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز رابطه مستقیمی مشاهده گردید. به نظر می رسد بالاتر بودن فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ Q22 در این مرحله‌می تواند در ایجاد تحمل به تنش خشکی نقش موثری داشته باشد. اما در سایر موارد رابطه مشخصی بین نحوه فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده و ژنوتیپ‌ها مشاهده نگردید. چنین نتیجه‌ای به وسیله دیگران نیز گزارش شده است. پینهرو و همکاران (۲۹) در آزمایشی فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده را در چهار همسانه (*Coffea canephora*) در شرایط مزرعه بررسی کردند. در این چهار همسانه، همسانه‌های ۱۴ و ۲۰ مقاوم به تنش خشکی و همسانه‌های ۴۶ و ۱۰۹A حساس به تنش خشکی بودند. آزمایش‌ها نشان داد که بین همسانه‌ها و فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده رابطه مشخصی وجود ندارد. حبیبی و همکاران (۱۸) گزارش کردند بین صفت مقاومت به خشکی اندازه گیری شده بر اساس عملکرد دانه و فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز رابطه مشخصی وجود ندارد. آنها نتیجه‌گیری کردند انتخاب رقم مقاوم به خشکی بر اساس ارزیابی فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده امکان پذیر نمی‌باشد. لاسکانو و همکاران (۲۳) واکنش چهار رقم گندم به تنش خشکی را براساس عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی تعیین کردند. ارقامی که عملکرد بالاتری داشتند به عنوان ارقام مقاوم و آنهایی که عملکرد پایین‌تری داشتند به عنوان ارقام حساس شناخته شدند.

1- Relative water conten (RWC)



شکل ۵- تغییرات فعالیت ویژه آنزیم‌های (A) سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، (B) آسکوربیت پراکسیداز (APX) در تیمارهای آبیاری شده، خشکی ضعیف و خشکی شدید چهار ژنوتیپ جو در مراحل شروع باروری (I)، پر شدن دانه (II) و شیری شدن دانه (III). میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱٪ مقایسه شدند. میله‌های عمودی نشانه SE ± می‌باشند. هر عدد میانگین سه تکرار می باشد.



شکل ٦- تغییرات فعالیت ویژه آنزیم‌های (C) کاتالاز (CAT) و (D) پراکسیداز (POX) در تیمارهای آبیاری شده، خشکی ضعیف و خشکی شدید چهار ژنوتیپ جو در مراحل شروع باروری (I)، پر شدن دانه (II) و شیری شدن دانه (III). میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱٪ مقایسه شدند. میله‌های عمودی نشانه SE ± می‌باشند. هر عدد میانگین سه تکرار می باشد.

جدول ۳- همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم های ضد اکسنده شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) با صفات اندازه گیری شده در ارتباط با عملکرد شامل ارتفاع بوته، عملکرد دانه، وزن هزار دانه و عملکرد بیولوژیک

صفات	POX	CAT	SOD	APX	عملکرد بیولوژیک	وزن هزار دانه	عملکرد دانه
ارتفاع بوته	*۰/۵۹۰	-۰/۵۳۷	ns۰/۰۸۵	ns-۰/۳۵۶	ns۰/۴۱۲	ns۰/۴۵۹	*۰/۵۸۵
عملکرد دانه	**۰/۹۳۷	**-۰/۷۴۹	ns۰/۲۵۲	ns-۰/۴۲۵	**۰/۷۷۴	**۰/۸۲۰	
وزن هزار دانه	**۰/۸۸۵	**-۰/۷۷۲	ns-۰/۱۰	ns-۰/۰۵۴	**۰/۷۴۹		
عملکرد بیولوژیک	**۰/۷۹۳	ns-۰/۶۶۲	ns۰/۳۸۴	ns۰/۰۱۹			
آسکوربیت پراکسیداز	ns-۰/۲۴۰	ns۰/۱۴۳	ns-۰/۳۵۱				
سوپراکسید دیسموتاز	ns۰/۱۳۲	ns-۰/۰۲۴					
کاتالاز	**-۰/۸۹۰						

*- در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد.

**- در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد.

ns - در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشد.

سنجش‌های مزرعه‌ای رابطه مشخصی را بین مقاومت به تنش خشکی و رفتار آنزیم‌های ضد اکسنده نشان نداد. اما وقتی برگ‌های این ارقام در آزمایشگاه با تنش اسمزی روبرو شدند، تفاوت آشکاری در نحوه عمل سیستم ضد اکسنده و تخریب اکسنده در بین ارقام مشاهده گردید. از این رو آنها پیشنهاد کردند که از تحقیقات انجام شده در شرایط آزمایشگاه فقط می‌توان در مراحل اولیه بعنوان ابزاری جهت انتخاب ارقام مقاوم به تنش خشکی استفاده کرد. بدین ترتیب آزمایش هایی که در گلخانه و شرایط آزمایشگاه صورت گرفته است رابطه مشخصی را بین نحوه فعالیت آنزیم‌های ضد اکسنده و میزان مقاومت ارقام به تنش خشکی نشان می دهد. اما آزمایش های انجام شده در شرایط مزرعه (شرایط طبیعی رشد گیاهان) نشان‌می دهد که واکنش گیاهان به تنش کم آبی در شرایط مزرعه متفاوت از شرایط گلخانه می باشد. از اینرو با توجه به نتایج این آزمایش و آزمایش‌های مشابه پیشنهاد می شود چنین آزمایش‌های در شرایط طبیعی رشد گیاهان صورت گیرد تا بتوان با اطمینان بیشتری نحوه فعالیت ضد اکسنده‌ها در مراحل مختلف رشد و نمو گیاهان و نقش آنها در مقابله با تنش اکسنده مورد بررسی قرار گیرد. همچنین با توجه به اینکه واکنش گیاهان به تنش کم آبی در مراحل مختلف رشد و نمو متفاوت می باشد، جهت بررسی نقش آنزیم‌های ضد اکسنده در ایجاد مقاومت به تنش کم آبی بهتر است نحوه فعالیت این آنزیم‌ها در مراحل حساس گیاهان به تنش کم آبی بررسی گردد تا مشخص شود که در مراحل حساس چه آنزیم‌هایی در ایجاد مقاومت به تنش کم آبی نقش دارند. در این آزمایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ Q22 (مقاوم ترین ژنوتیپ به تنش خشکی) در مرحله باروری و تشکیل دانه (یکی از مراحل حساس گیاه جو به تنش خشکی) بیش از ژنوتیپ‌های دیگر بود، به نظرمی رسد بالاتر بودن فعالیت پراکسیداز در این مرحله نقش مهمی در ایجاد مقاومت به تنش خشکی و جلوگیری از کاهش عملکرد دارد. همچنین امینی و همکاران (۱) گزارش کردند در مراحل پیری جو که سلول های گیاه در شرایط تنش اکسندگی به سر می‌برند فعالیت آنزیم پراکسیداز بر خلاف آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربیت پراکسیداز و کاتالاز افزایش می یابد. از این رو شاید بتوان با افزایش بیان این آنزیم در این مرحله از رشد گیاه ژنوتیپ های مقاومی را بوجود آورد تا بتوانند شرایط تنش اکسنده ناشی از تنش های محیطی و دوران پیری را بهتر تحمل کنند. طبق جدول ۱ و ۲ و نقش مهم آنزیم پراکسیداز در مقابله با تنش خشکی به نظر می رسد بیشتر بودن مقدار عملکرد دانه، وزن هزار دانه و عملکرد بیولوژیکی ژنوتیپ Q22 نسبت به سایر ژنوتیپ ها ناشی از پایداری بیشتر سیستم ضد اکسندگی در این ژنوتیپ می باشد.

منابع

۱- امینی، ز.، ر. حداد و ف. مرادی. ۱۳۸۷. بررسی اثر تنش کم آبی بر نحوه فعالیت آنزیم های ضد اکسنده در مراحل رشد زایشی گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.). علوم وفنون کشاورزی و منابع طبیعی. شماره ۴۶ (الف):۷۴-۶۵.

۲- فاجریا، ان. ک.، وی. اس. بالیگار و ا. چ. جونز. ۱۳۷۸. رشد و تغذیه گیاهان زراعی. ترجمه: فتحی، ق. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۳۷۲ ص.

۳- فرداد، ح. و ع. شیردلی. ۱۳۷۴. اثر دور آبیاری بر عملکرد محصول دانه جو و رشد آن .مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۶. شماره ۱: ۳۱-۲۴.

4- Alscher, R. G., N. Erturk, and L. S. Heath. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany. 53(372): 1331-1341.
5- Arnon D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polypheol oxide in *Beta vulgaris*. Plant Physiolgy. 24: 1-15.
6- Asada, K. 1999. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiologia Plantarum. 85: 235-241.
7- Aspinall, D., P. B. Nicholls and L. H. May. 1964. The effects of soil moisture stress on the growth of barley. I. Vegetative development and grain yield. Australian Journal of Agricultural and Resource Economics. 15: 729-745.
8- Aspinall, D. 1966. Effects of day length and light intensity on growth of barley. 4. Genetically controlled variation in response to photoperiod. Australian Journal of Biological Sciences. 19: 517-534.
9- Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. Current Science. 98(7): 1113-1121.
10-Beers, R. F., and I. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen by catalase. Journal of Biochemistry. 195: 133 – 140.
11-Blum, A. 1985. Photosynthesis and transpiration in leaves and ears of wheat and barley varieties. Journal of Experimental Botany. 36: 432-440.
12-Boyer, J. S. 1983. Subcellular mechanisms of plant response to low water potential. Agricultural Water Management. 7: 239-248.
13-Dellongo, O. T., C. A. Gonzalez, G. M. Pastori and V. S. Trippi. 1993. Antioxidant defenses under hyperoxygen and hyperosmotic conditions in leaves of 2 lines maize with differential sensitivity to drought. Plant and Cell Physiology. 34(7): 1023-1028.
14-Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
15-Dhindsa, R. A., P. Plumb-Dhindsa and T. A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany. 126: 93-101.
16-Foyer, C. H., and J. Harbinson**.** 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. *In* CH Foyer**,** PM Mullineaux, eds, Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence System in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp**:** 1-42
17-Guo, Z., W. Ou, S. Lu, and Q. Zhong. 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity**.** Plant Physiology and Biochemistry. 44: 828-836.
18-Habibi, D. (ed.) 2004. Antioxidant enzyme in sunflower subjseted to drought stress . 4th. International Crop Science Congress. 26 Sep – 1 Oct. 2004. Brisbane, Australia. Pub. CDROM. Web site www.regional.org.au/au/cs.
19-Hemeda, H.M. and B.P. Kelin. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts. Journal of Food Science. 55: 184-185.
20-Hsu, S. Y., and C. H. Kao. 2003. The protective effect of free radical scavengers and metal chelators on polyethylene glycol-treated rice leaves. Biology of Plant. 46: 617-619.
21-Kim, S. Y., J. H. Lim, M. R. Park, Y. J. Kim, T. I. Park, Y. W. Seo, K. W. Choi, and S. J. Yun. 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. Journal of Biochemistry and Molecular Biology**.** 38(2): 218-224.
22-Khanna - Chopra, R.. and D. S. Selote. 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. Journal of Enviromental and Experimental Botany. 60: 276-283.
23-Lascano, H. R., G. E. Antonicelli, C. M. Luna, M. N. Melchiorre, L. D. Gómez, R. W. Racca, V. S. Trippi and L. M. Casano. 2001. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and *in vitro* studies. Australian Journal of Plant Phsiology. 28, 1095-1102
24-Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7: 405-410.
25-Munne-Bosch S., and L. Alegre. 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plants survival under drought stress. Functional Plant Biology. 31(3): 203-216.
26-Munné-Bosch, S., and J. Peñuelas. 2003. Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. Planta. 217: 758-766.
27-Nakano, Y., and K. Asada. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiology. 28: 131-140.
28-Parry M. A. J., P. J. Andralojc, S. Khan, P. J. Lea, and A. J. Keys. 2002. Rubisco activity: effects of drought stress. Annals of Botany. 89: 833-839.
29-Pinheiro, H. A., F. M. DaMatta, A. R. M. Chaves, E. P. B. Fontes, and M. E. Loureiro. 2004. Drought tolerance in

relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. Plant Science. 167: 1307-1314.

30-Reddy, A. R., K. V. Chaitanya, P. P. Jutur, and K. Sumithra. 2004. Differential Antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. Environmental and Experimental Botany. 52: 33-42.

31-Saeed M., M. Mahmood, A. Khaliq, and R. Ahmad. 1996. Response of wheat to water stress at its various reproductive development stages. Journal of Animal and Plant Science. 6(3-4): 96-99.

32-Selote D. S., and R. Khanna-Chopra. 2004. Drought-induced spiklet sterility is associated with an inefficient antioxidant defence in rice panicles. Phsiologia Plantarum. 121(3): 462-471.

33-Selote D. S., and R. Khanna-Chopra. 2006. Drought acclimation conferes oxidative stress tolerance by inducing co-ordinate antioxidant defense at cellular subcellular level in leaves of wheat seedlings. Physiologia Plantarum. 127: 494-506.

34-Sharma, P., and R. S. Dubey. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Regulation. 46: 209-221.

35-Türkan, B. M., R. F. Özdem, and H. Koca. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science. 168: 223-231.

36-Yong T. L., S. Hongbo, and D. Feng. 2006. Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of Radix astragali at seedling stage. Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces. 49: 60-65.

37-Yordanov, I., V. Velikova, and T. Tsonev. 2000. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. Photosynthetica. 38: 171-186.

38-Zhang, J., and M. B. Kirkham 1994. Drought-Induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. Plant Physiology. 35: 785-791.