

## اثر سیدروفور باکتریایی بر رفتار بیولوژیک ذرت در شرایط آبیاری تأخیری

ساناز صرافی<sup>۱</sup>، آرمان آذری<sup>۱\*</sup>، روح‌الله صابری‌ریسه<sup>۲</sup> و علی‌اکبر محمدی‌میریک<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه

ولی‌عصر (عج) رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۰۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۱/۲۳)

### چکیده:

این پژوهشی بر کشت دوم ذرت (SC645) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. دور آبیاری به عنوان عامل اول در دو سطح شامل انجام آبیاری پس از ۷۵ (I<sub>1</sub>: به عنوان شاهد) و ۱۲۰ میلی‌متر (I<sub>2</sub>: آبیاری تأخیری) تبخیر از تشتک تبخیر کلاس آ و عامل دوم در دو سطح شامل کاربرد (S<sub>1</sub>) و عدم کاربرد سیدروفور (S<sub>2</sub>: به عنوان شاهد) بود. کاربرد سیدروفور به صورت محلول‌پاشی (غلظت ۲ در هزار در مراحل ۶-۴ و ۱۴-۱۲ برگ) و مصرف با آب آبیاری (۲۰ کیلوگرم در هکتار در مرحله گره بندی) صورت گرفت. نتایج آزمایش نشان داد دور آبیاری I<sub>1</sub> نسبت به I<sub>2</sub>، سبب افزایش رنگیزه‌های برگ، محتوای نسبی آب برگ (RWC)، پایداری غشاء، شاخص سطح برگ (LAI) و سطح مخصوص برگ (SLA) و کاهش ساکارز، پراکسیداسیون چربی‌ها (MDA)، فعالیت آنزیم‌های گایاکول‌پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز گردید. تیمار S<sub>1</sub> نیز در مقایسه با S<sub>2</sub>، موجب افزایش رنگیزه‌های برگ، قابلیت تنظیم اسمزی، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، RWC، پایداری غشاء، LAI و SLA و کاهش MDA شد. در برهمکنش عوامل آزمایش، در هر سطح آبیاری، کاربرد سیدروفور باعث افزایش کلروفیل (a، b و کل) برگ، پرولین و قندهای محلول شد. بیشترین عملکرد تر زیست‌توده (g/m<sup>2</sup>) ۸۶۹۷ از تیمار I<sub>1</sub> بدست آمد. تیمار S<sub>1</sub> نیز در مقایسه با S<sub>2</sub> عملکرد تر زیست‌توده به میزان ۱۶۴۴ g/m<sup>2</sup> گردید. در مجموع سیدروفور باکتریایی با بهبود قابلیت‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ذرت توانست در تخفیف اثرات تنش خشکی و افزایش ظرفیت فتوسنتزی آن مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم آنتی‌اکسیدان، پرولین، خشکی، سیدروفور، مالون دی‌آلدئید.

### مقدمه:

می‌نمایند و از ساختمان ماکرومولکول‌ها و غشاء طی از دست دادن آب شدید، محافظت می‌کنند. نقش اساسی قندها در حفاظت از سلول در برابر تنش خشکی تنها در ارتباط با درگیری مستقیم در سنتز ترکیبات دیگر و تولید انرژی نیست بلکه در ارتباط با پایداری غشاء، عمل به عنوان یک تنظیم کننده بیان ژن و مولکول‌های علامت دهنده می‌باشد. طی تنش، غلظت برخی از یون‌ها در واکوئل و همچنین برخی از ترکیبات

از نقطه نظر کشاورزی، خشکی عبارت از ناکافی بودن آب قابل دسترس در طی دوره رشد گیاهان زراعی است که باعث محدود شدن پتانسیل ژنتیکی عملکرد گیاه زراعی می‌شود (Gubis et al., 2007). تنظیم اسمزی یکی از رایج‌ترین پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های محیطی است. ساکارز و دیگر قندهای آلی در تنظیم اسمزی، در طول دوره تنش مشارکت

\*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: armanazari@vru.ac.ir

حساس است. از این رو به نظر می‌رسد آنزیم‌های آنتی اکسیدان در افزایش تحمل گیاهان به تنش خشکی دارای نقش مهمی می‌باشند (Guo *et al.*, 2006).

محتوای نسبی آب برگ ممکن است تعادل بین آب تأمین شده برای برگ و سرعت تعرق را بهتر از سایر اجزاء روابط آبی منعکس کند، لذا شاخص مناسبی برای نشان دادن وضعیت آبی برگ می‌باشد. محتوای نسبی آب برگ رابطه نزدیکی با پتانسیل آب گیاه دارد (Sanchez-Rodriguez, 2010). پایداری غشاء به وسیله ارزیابی تراوش یون‌ها از آن تعیین می‌شود. میزان پایداری غشاء سلولی به خوبی با تحمل سایر فرآیندهای گیاهی به تنش از جمله فتوسنتز مرتبط بوده و به عنوان شاخصی از تحمل به تنش ارائه شده است (Sairam *et al.*, 2002).

عمده‌ترین صدماتی که بر اثر کم آبی در گیاهان بروز می‌کند، کاهش رشد می‌باشد، که بر اثر کاهش آماس سلولی بروز می‌کند. با کاهش رشد، سطح فتوسنتز کننده گیاه و شاخص سطح برگ تقلیل یافته و باعث کاهش تولید مواد غذایی می‌گردد. کمبود عرضه مواد غذایی به نوبه خود، رشد ریشه‌ها را تقلیل داده و گیاه قادر به جذب آب و مواد مورد نیاز خود نخواهد بود (Praxedes *et al.*, 2006).

سیدروفور (Siderophore)، یک ترکیب آلی با اثرات بیولوژیک گسترده بر گیاه می‌باشد که در افزایش تحمل گیاه در مواجهه با پاتوژن‌های بیماری‌زا موثر است. این عوامل، کلات کننده اختصاصی یون آهن بوده که توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها در شرایط کمبود آهن تولید می‌شوند. سیدروفورها نه تنها باعث جذب آهن توسط باکتری‌ها شده بلکه مقاومت سیستمیک را هم در گیاه القاء می‌کند. بخش لیپوپلی ساکارید آن، عامل اصلی القاء مقاومت سیستمیک در شرایط فراوانی آهن است (Van Loon *et al.*, 1998). در نتیجه این تحریک‌ها، سیگنال‌های مقاومت تولید و در سراسر گیاه پخش می‌شوند. این سیگنال‌ها باعث تحریک بیان ژن‌های مقاومت در سراسر گیاه و در نتیجه، باعث تولید پروتئین‌های مرتبط با مقاومت به بیماری‌زایی (PR) می‌شوند (Cao *et al.*, 1994). این پروتئین‌ها، ترکیبات پروتئینی هستند که توسط گیاه

آلی و متابولیت‌های ثانویه مانند اسیدهای آمینه (به ویژه پرولین)، ساکارز و مونوساکاریدها در سیتوسول افزایش می‌یابد (Sankar *et al.*, 2007). پرولین اسید آمینه‌ای است که هم در تشکیل پروتئین‌ها دخالت دارد و هم یکی از اسمولیت‌ها بوده که با کاهش پتانسیل اسمزی، یکی از سازوکارهای سلولی برای مواجهه با تنش خشکی می‌باشد (Chen and Dickman, 2005). پرولین، یک منبع ذخیره برای کربن، نیتروژن و نیز جاروکننده (Scavenger) رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Chen and Murata, 2000). افزایش میزان پرولین برگ بر اثر تنش خشکی در گندم (احمدی و سی و سه مرده، ۱۳۸۳)، برنج (Pirdashti *et al.*, 2009) و ذرت (Valentovic *et al.*, 2006) گزارش شده است.

مولکول‌های کلروفیل نوع a و b، در کنار کارنوئیدها (کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها) مهم‌ترین رنگیزه‌های جذب کننده نور در گیاهان عالی هستند (Taiz and Zeiger, 2002). شرایط تنش باعث شکل‌گیری رادیکال سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌گردد. فعالیت این گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive oxygen species) باعث بروز صدماتی مثل اکسید شدن لیپیدها و تغییر ساختار غشاء و از هم پاشیدگی یکپارچگی آن، تغییر ساختمان پروتئین‌ها، غیر فعال شدن آنزیم‌ها، از بین رفتن رنگدانه‌هایی مثل کلروفیل و حمله به مولکول‌های آلی مثل DNA می‌گردد (Fu and Huang, 2001). یکی از واکنش‌هایی که در حضور گونه‌های فعال اکسیژن سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی است که باعث تولید مالون دی آلدئید و اتیلن می‌شود (Liu and Huang, 2000). گیاهان دارای ساز و کارهای ضد اکسیداسیونی جهت کاهش اثر رادیکال‌های آزاد می‌باشند. این سازوکارها شامل بروز تغییراتی در میزان آنزیم‌های دفاعی گیاه مانند کاتالاز (Catalase)، پلی فنل اکسیداز (Polyphenol oxidase)، پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیلایز و ترکیبات دیگری از جمله فنل‌ها می‌باشد (Honty *et al.*, 2005). مشاهده شده است که در شرایط تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهان متحمل بیش از گیاهان

تنش‌های محیطی مورد بررسی قرار نگرفته است. با توجه به این مطالب و نظر به اهمیت گیاه ذرت و ویژگی‌های خاص آن (گرمادوست بودن و بهره‌بری از سیستم فتوسنتزی C4 و سرعت رشد و تولید عملکرد بالا)، ضرورت انجام این تحقیق شکل گرفت.

#### مواد و روش‌ها:

شهر رفسنجان با عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و ۲۳ دقیقه و طول جغرافیایی ۵۶ درجه با ارتفاع ۱۴۶۹ متر از سطح دریا دارای اقلیمی خشک و زمستان نسبتاً سرد و تابستان گرم و خشک با حداکثر دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد و میزان بارندگی بلند مدت ۹۰ میلی‌متر در سال می‌باشد. این آزمایش با هدف بررسی اثرات بیولوژیک (مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی) کاربرد سیدروفور باکتریایی بر ذرت (SC645) در شرایط تنش خشکی ناشی از آبیاری تأخیری، در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. دور آبیاری به عنوان عامل اول در دو سطح شامل انجام آبیاری پس از I<sub>1</sub>: ۷۵: به عنوان شاهد) و I<sub>2</sub>: ۱۲۰ میلی‌متر (آبیاری تأخیری) تبخیر از تشتک تبخیر کلاس آ و عامل دوم در دو سطح شامل کاربرد (S<sub>1</sub>) و عدم کاربرد سیدروفور (S<sub>2</sub>: به عنوان شاهد) بود. کاربرد سیدروفور به دو صورت محلول‌پاشی (در دو مرحله ۶-۴ برگگی و ۱۴-۱۲ برگگی، با غلظت ۲ در هزار و در تیمار S<sub>2</sub>، محلول‌پاشی با آب مقطر) و مصرف با آب آبیاری (در آغاز گره‌بندی و به میزان ۲۰ کیلوگرم در هکتار) صورت گرفت (جدول ۱). کاشت به صورت جوی و پشته با فاصله ردیف ۷۵ سانتی‌متر و تراکم ۱۰ بوته در مترمربع، در اول تیر ماه سال ۱۳۹۳ (کشت تابستانه یا کشت دوم) انجام گرفت. هر کرت شامل ۴ ردیف کاشت و به طول ۹ متر بود. فاصله بین سطوح آبیاری، دو پشته به صورت نکاشت در نظر گرفته شد. اعمال تیمارهای دور آبیاری پس از استقرار گیاه و رسیدن به مرحله چهار تا شش برگگی اجرا و تا پایان دوره ادامه یافت.

میزبان در پاسخ به حمله عوامل بیماریزا یا تنش‌های محیطی مانند تنش شوری و خشکی، زخم شدن مکانیکی و کاربرد تعدادی از هورمون‌های گیاهی تولید می‌شوند (Van Loon and Van Strien, 1999) که معمولاً به طور سیستمیک در گیاه تولید شده و سبب پدیده القاء مقاومت سیستمیک (SAR) می‌شوند. در نتیجه آلودگی‌ها و تنش‌های بعدی کنترل می‌گردند (Ali and Vidhale, 2013).

ذرت (*Zea mays* L.) از خانواده Gramineae، گیاهی یک ساله، دگرگشن، ویژه مناطق گرم و فصول گرم سال در مناطق معتدل است. ذرت به دلیل قدرت سازگاری به شرایط اقلیمی گوناگونی که دارد، خیلی زود در تمام دنیا گسترش یافته و مکان سوم را بعد از گندم و برنج از نظر سطح زیر کشت به خود اختصاص داده است. بیشترین مصرف آن در تغذیه دام و طیور به صورت دانه، علوفه سبز و سیلو می‌باشد. به این ترتیب به طور غیرمستقیم از طریق گوشت، تخم‌مرغ و لبنیات مورد تغذیه انسان قرار می‌گیرد (خواججه‌پور، ۱۳۹۲).

با توجه به کمبود منابع آب تجدید شونده در دنیا، بزرگترین چالش در زمینه تولید کشاورزی، افزایش تولید محصولات کشاورزی با حداقل مصرف آب خواهد بود. انجام کشت تابستانه، امکان صرفه‌جویی در مصرف آب به میزان دو سوم کشت بهاره را فراهم می‌آورد. به عنوان مثال، نیاز آبی ذرت در کشت اول در حدود ۸۰۰۰ متر مکعب و در کشت دوم ۶۵۰۰ متر مکعب می‌باشد (خدابنده، ۱۳۷۹). با این حال، انجام آبیاری تأخیری در کشت تابستانه (کشت دوم یا فرعی) نیز قابل بررسی و توصیه بوده و در این زمینه، تحقیقات انجام شده محدود است. از آنجایی که آبیاری تأخیری، با شدت‌های مختلف تنش خشکی همراه می‌باشد، کاهش شدت تنش از طریق محلول‌پاشی برخی ترکیبات معدنی و آلی امکان‌پذیر است. از آن جمله، سیدروفور باکتریایی می‌باشد که در حال حاضر توسط شرکت پرشین بنیان آریا به تولید تجاری (با فرمول شیمیایی C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>) رسیده است که در زمینه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی بسیار موفق عمل کرده است. اما به صورت طرح تحقیقاتی در زمینه کاهش اثرات

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه

پH	EC	منگنز	روی	مس	آهن	فسفر	پتاسیم	نیترژن	ماده آلی	بافت خاک
	dS.m <sup>-1</sup>			میلی‌گرم در کیلوگرم				%		
۷/۶	۴/۴۱	۸/۳۵	۰/۵۱	۰/۸۲	۱/۵۴۷	۷	۲۵۲	۰/۰۹۷	۰/۰۹	لوم شنی

۰/۲ گرم از نمونه برگ تازه در هاون چینی با استون ۸۰ درصد ساییده شده و سپس محلول حاصله توسط کاغذ صافی، صاف شده و داخل بالن ژوژه به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. میزان جذب نور محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (T80 UV/VIS Spectrophotometer, PG Instruments Limited, UK) در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید.

رابطه ۳-۵:

$$\text{Chla} = \{12.25 (\text{A}663.2) - 2.79 (\text{A}646.8)\} \times V/1000 \times W$$

$$\text{Chlb} = \{12.21(\text{A}646.8) - 5.10 (\text{A}663.2)\} \times V/1000 \times W$$

$$\text{Car} = [(1000 (\text{A}470) - 1.8 (\text{chla}) - 85.02 (\text{chlb})) / 198$$

A: میزان جذب قرائت شده

V: حجم استون مصرف شده

W: وزن نمونه (گرم)

همچنین مقدار نسبت کلروفیل a/b از تقسیم میزان کلروفیل a به b محاسبه گردید.

**پروکلین برگ:** مقدار ۰/۲ گرم برگ بالغ را با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید در هاون چینی ساییده سپس محلول حاصل شده توسط کاغذ صافی صاف شد. دو میلی‌لیتر از عصاره فوق را با ۲ میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین (مخلوط ۱/۲۵ گرم ناین‌هیدرین در ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار) و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن اضافه کرده، سپس این مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از خنک شدن، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر نمونه اضافه کرده و توسط ورتکس بهم زده شدند تا پروکلین محلول وارد تولوئن شود. نمونه‌ها ۳۰ دقیقه به حال سکون رها شده تا مخلوط دو فاز شود. سپس فاز بالایی جدا شده و میزان جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر

نمونه برداری از برگ بلال و در مرحله تاسل دهی انجام و صفات زیر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت:

**محتوای نسبی آب برگ:** ابتدا ۱۰ عدد دیسک به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از پهنک جوان‌ترین برگ بالغ تهیه و وزن (FW) شدند. سپس داخل فالكون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند تا سلول‌های برگ به حالت تورژسانس کامل درآیند. پس از حذف رطوبت سطحی آن‌ها، توزین (TW) گردیده. بعد از آن نمونه‌ها در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند و وزن خشک دیسک‌ها (DW) اندازه‌گیری شد. RWC با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Ritchie et al., 1990).

$$\text{RWC} = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100$$

پایداری غشاء سلول: تعداد ۱۰ عدد دیسک به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از پهنک جوان‌ترین برگ بالغ تهیه در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون لوله فالكون ریخته و به مدت ۸ ساعت داخل یخچال قرار گرفتند. سپس میزان هدایت الکتریکی محلول (EC1) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سنجیده شد. در ادامه اتوکلاو فالكون‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام و بعد از سرد شدن کامل، دوباره میزان هدایت الکتریکی (EC2) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری و با رابطه زیر و میزان نشت الکترولیت‌ها به میزان پایداری غشاء سلولی (CMS: Cell Membrane Stability) تبدیل گردید (Sarim et al., 2002).

$$\text{CMS} = [1 - (\text{EC}1 / \text{EC}2)] \times 100$$

رنگدانه‌های برگ: میزان رنگدانه‌های برگ شامل کلروفیل a، b و نسبت کلروفیل a به b و کاروتنوئید، با استفاده از روش آرنون (Arnon, 1967) با نمونه‌گیری از جوان‌ترین برگ بالغ و عصاره‌گیری با استون اندازه‌گیری شد، بدین ترتیب که مقدار

در حمام آب گرم قرار داده شد و پس از خنک شدن جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت گردید. استانداردها از گلوکز خالص در غلظت‌های ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰، ۲۰۰۰، ۲۲۵۰ و ۲۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه و جذب آن‌ها اندازه‌گیری گردید. تعیین میزان قند بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر نمونه انجام شد (Irigoyen *et al.*, 1992).

**تهیه عصاره پروتئینی:** ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه گیاه در ۵ سی‌سی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۵ که حاوی پلی و نیل پیرولیدین (PVP) ۱ درصد و EDTA ۱ میلی‌مولار بود، ساییده شد. تمام مراحل استخراج در یخ انجام گرفت. سپس عصاره‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. از محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

**سنجش پروتئین کل:** به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، ۵ سی‌سی معرف بیوره افزوده شد و سریعاً ورتکس شدند. بعد از ۵ دقیقه جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1976).

**تهیه معرف برادفورد:** به منظور تهیه معرف بیوره ۱۰۰ میلی‌گرم رنگ کوماسی برلیانت بلو در ۵۰ سی‌سی اتانول ۹۵٪ به مدت یک ساعت حل گردید. سپس ۱۰۰ سی‌سی اسید فسفریک ۸۵٪ قطره قطره به آن افزوده شد و در پایان حجم کل با آب مقطر به ۱ لیتر رسانده شد و محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید (Bradford, 1976).

**تهیه بافر استخراج:** به منظور تهیه بافر استخراج ۶/۸ گرم KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> در بالن ژوژه به حجم ۵۰ سی‌سی رسانده شد، ۸/۷ گرم K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> نیز در بالن ژوژه به حجم ۵۰ سی‌سی رسانده شد (بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار). سپس ۷/۱۷ سی‌سی از K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> با ۲/۸۳ سی‌سی از KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ترکیب شد و کل آن به حجم ۲۰۰ سی‌سی رسانده شد. سپس ۰/۰۶ گرم EDTA اضافه گردید تا حل شود و پس از آن ۲ گرم (Poly Vinyl Pyrrolidone) اضافه شده و روی هیتر قرار گرفت تا کامل حل شود. پس از خنک شدن محلول pH به ۷/۵ رسانده شد.

سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز: به منظور اندازه‌گیری میزان

اندازه‌گیری شد. استانداردهای پرولین نیز با استفاده از ال‌پرولین در غلظت‌های ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ میلی‌گرم در لیتر تهیه و جذب آن‌ها اندازه‌گیری شد (Bates, 1973).

**پراکسیداسیون چربی‌های غشائی:** این آزمایش با استفاده از اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون چربی‌های غشا انجام شد. نمونه‌های برگ‌گی به میزان ۰/۲ گرم در ۳ میلی‌لیتر TCA (تری کلرواستیک اسید) ۱۰٪ عصاره‌گیری شدند. سپس به یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون صاف شده ۱ میلی‌لیتر TBA (تیوباری توریگ اسید) ۰/۵٪ اضافه شد و در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، لوله‌ها از حمام خارج شده و پس از سرد شدن میزان مالون دی‌آلدئید با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی  $\epsilon = 155 \mu\text{M} \cdot \text{cm}^{-1}$  محاسبه شد (De Vos and Schat, 1991).

$$\text{MDA} (\mu\text{M g}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{FW}) = ((A532 - A600) / 155) \times 1000$$
**ساکارز برگ:** مقدار ۰/۲ گرم برگ تازه را با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد در هاون چینی ساییده سپس محلول حاصل را در لوله فالکون ریخته و محلول بدست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره را برداشته و ۰/۱ میلی‌لیتر KOH ۳۰ درصد به همه نمونه‌ها اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. وقتی که نمونه‌ها خنک شدند (تا دمای اتاق) ۳ میلی‌لیتر محلول آنترون (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک رقیق شده ۷۶ میلی‌لیتر اسید سولفوریک در ۳۰ میلی‌لیتر آب) به نمونه‌ها اضافه شد و در ۴۰ درجه برای ۱۵-۱۰ دقیقه نگهداری شدند. بعد از خنک شدن نمونه‌ها، جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد. برای تهیه استاندارد از ساکارز در غلظت‌های صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد (Van handel, 1968).

**مجموع قندهای محلول برگ:** میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده در اتانول با ۳ میلی‌لیتر از آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون به علاوه ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه

آنزیم گایاکول پراکسیداز، ۲/۷۷ سی سی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7) با ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱٪ و ۱۰۰ میکرولیتر گایکول ۴٪ و ۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ترکیب شد. سپس عصاره نهایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتری و جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه اندازه گیری شد (Plewa et al., 1991).

**سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز:** برای اندازه گیری محتوای آنزیم پلی فنل اکسیداز، مخلوط واکنش شامل ۲/۵ سی سی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۷، ۲۰۰ میکرولیتر پیروگالال ۰/۰۲ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه و توسط دستگاه اسپکتروفتومتری جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر و بعد از ۳ دقیقه قرائت شد (Nicoli et al., 1991).

**سنجش آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز:** جهت اندازه گیری این آنزیم، ۱ سی سی بافر استخراج پتاسیم فسفات، ۰/۵ سی سی فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۰/۴ سی سی آب دو بار تقطیر و ۰/۱ سی سی عصاره آنزیمی مخلوط شدند و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بن ماری گردید. سپس واکنش با اضافه کردن ۰/۵ سی سی اسید کلریدریک ۶ مولار متوقف شد و جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد (Dcunha et al., 1996).

سطح برگ با استفاده از دستگاه سنجش سطح برگ مدل مخصوص برگ (حاصل تقسیم سطح برگ بر وزن خشک برگ) و شاخص پربرگی (حاصل تقسیم وزن خشک برگ بر وزن خشک زیست توده) محاسبه شد (کریمی و عزیزی، ۱۳۷۳).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS و ترسیم نمودارها نیز توسط نرم افزار Excel انجام گرفت. مقایسه بین میانگین ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح ۵ درصد انجام شد.

## نتایج و بحث:

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی دور آبیاری و

کاربرد سیدروفور بر تمامی صفات رنگیزه های برگ و اثر متقابل آنها نیز بر کلروفیل a و b و کلروفیل کل معنی دار گردید (جدول ۲). به گونه ای که با تأخیر در آبیاری و عدم کاربرد سیدروفور، میزان این رنگیزه ها کاهش یافت و بیشترین کمترین میزان کلروفیل a، b و کل به ترتیب مربوط به تیمار  $I_1S_1$  و  $I_2S_2$  می باشد (جدول ۳). کاهش کلروفیل ها، نتیجه منفی تنش خشکی ناشی از تأخیر در آبیاری است. علت این کاهش توسط برخی محققین نوعی ویژگی تطبیقی در گیاهان در حال رشد تحت تنش کمبود آب تلقی شده (Munne-Bosch and Alegre, 1999) و از طرف دیگر، علت آن را افزایش تولید رادیکال های آزاد که باعث پراکسیداسیون و تجزیه رنگیزه ها می گردند نیز ذکر شده است (Schutz and Fangmeir, 2001). کاربرد سیدروفور نیز با توجه به نقش آن در کمک به جذب عناصری نظیر آهن می تواند در ساخت رنگیزه کلروفیل موثر باشد. کلروفیل b دارای همبستگی مثبت و معنی دار با کلروفیل a ( $r = 0.91^{**}$ ) بود که بیان کننده ارتباط نزدیک این دو رنگیزه می باشد. مقایسه میانگین اثر دور آبیاری بر نسبت کلروفیل a/b و کارتنوئیدها نشان داد که تأخیر در آبیاری ( $I_2$ ) سبب کاهش نسبت کلروفیل a/b و کارتنوئیدها شد (جدول ۴). نسبت کلروفیل a/b دارای همبستگی مثبت و معنی دار با کلروفیل a ( $r = 0.88^{**}$ ) و نیز کلروفیل کل ( $r = 0.84^{**}$ ) بود. این نشان می دهد که تغییرات این نسبت بیشتر، از تغییرات کلروفیل a تبعیت می کند. کاربرد سیدروفور ( $S_1$ ) نیز نسبت به عدم کاربرد آن ( $S_2$ ) افزایش در هر دو صفت را به دنبال داشت (جدول ۵). کارتنوئیدها نیز همبستگی مثبتی با کلروفیل a ( $r = 0.96^{**}$ ) و کلروفیل b ( $r = 0.88^{**}$ )، نشان دادند که بیانگر نقش کارتنوئیدها در سیستم فتوسنتزی و همکاری با دو رنگدانه دیگر می باشد. چرا که تمامی رنگیزه های برگ به غیر از کلروفیل a، نقش کمکی (آنتن و حفاظتی) دارند و تغییرات آنها از تغییرات کلروفیل a تبعیت می کند.

اثر اصلی و متقابل عوامل آزمایشی بر محتوای پرولین برگ معنی دار بود (جدول ۲). بررسی جدول مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان پرولین در تیمار  $I_2S_2$  و کمترین آن در

جدول ۲- تجزیه واریانس رنگی‌های فتوسنتزی و پرولین برگ.

منابع تغییر	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a/b	کلروفیل کل	کارتنوئید	پرولین
بلوک	۲	۰/۰۶۰**	۰/۰۱۰۰**	۰/۰۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۱۲۲**	۱۸۳**	۱۷/۸*
دور آبیاری	۱	۰/۴۸۸**	۰/۰۲۴۳**	۰/۲۳۵**	۰/۸۳۰**	۹۱۸**	۳۹۱**
سیدروفور	۱	۰/۲۷۰**	۰/۰۱۲۰**	۰/۱۴۰**	۰/۳۸۹**	۶۹۰**	۸۹/۱**
دور آبیاری × سیدروفور	۱	۰/۰۲۶*	۰/۰۰۴۰*	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۴۸*	۲/۰۸ <sup>ns</sup>	۴۶/۰**
خطا	۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۶	۱۵/۸	۲/۷۵
ضریب تغییرات (%)		۳/۸۱	۳/۹۶	۳/۳۳	۳/۵۷	۴/۵۵	۹/۵۱

ns, \* و \*\* به ترتیب نشان دهنده غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل عوامل آزمایش بر کلروفیل a, b, کل، پرولین و قندهای محلول برگ ذرت دانه‌ای

دور آبیاری	سیدروفور	کلروفیل a mg/g FW	کلروفیل b mg/g FW	کلروفیل کل mg/g FW	پرولین µg/g FW	قندهای محلول mg/g FW
I <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	۱/۸۷۷ <sup>a</sup>	۰/۶۱۷ <sup>a</sup>	۲/۴۹ <sup>a</sup>	۱۲/۵ <sup>c</sup>	۲/۸۸ <sup>c</sup>
	S <sub>2</sub>	۱/۶۷۰ <sup>b</sup>	۰/۵۹۰ <sup>ab</sup>	۲/۲۶ <sup>b</sup>	۱۰/۱ <sup>c</sup>	۲/۵۱ <sup>c</sup>
I <sub>2</sub>	S <sub>1</sub>	۱/۵۶۶ <sup>b</sup>	۰/۵۶۳ <sup>b</sup>	۲/۱۳ <sup>b</sup>	۲۷/۸ <sup>a</sup>	۴/۶۹ <sup>a</sup>
	S <sub>2</sub>	۱/۱۷۳ <sup>c</sup>	۰/۴۶۳ <sup>c</sup>	۱/۶۴ <sup>c</sup>	۱۸/۵ <sup>b</sup>	۳/۶۶ <sup>b</sup>
LSD 5%		۰/۱۱۱	۰/۰۴۰	۰/۱۵۵	۳/۳۵۴	۰/۴۰۴

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هرستون، فاقد تفاوت آماری معنی‌دار بر اساس آزمون LSD در سطح ۵٪ می‌باشند.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر دور آبیاری بر کلروفیل a/b, کارتنوئیدها، ساکارز، مالون دی‌آلدئید و آنزیم گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز

دور آبیاری	کلروفیل a/b	کارتنوئیدها mg/g FW	ساکارز	مالون دی‌آلدئید mM/g FW	گایاکول پراکسیداز unit/mg protein	پلی فنل اکسیداز unit/mg protein
I <sub>1</sub>	۲/۹۴	۰/۹۶۰	۰/۲۱۳	۰/۶۸۲	۲/۱۶	۰/۱۸۵
I <sub>2</sub>	۲/۶۶	۰/۷۸۵	۰/۳۷۱	۱/۰۵	۳/۱۰	۰/۲۲۱
LSD 5%	۰/۱۳۲	۰/۰۵۶	۰/۰۵۹	۰/۰۸۶	۰/۱۰۶	۰/۰۲۴

FW: وزن تازه (Fresh Weight)

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر سیدروفور بر کلروفیل a/b, کارتنوئیدها، ساکارز، مالون دی‌آلدئید و آنزیم گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز

دور آبیاری	کلروفیل a/b	کارتنوئیدها mg/g FW	ساکارز	مالون دی‌آلدئید mM/g FW	گایاکول پراکسیداز unit/mg protein	پلی فنل اکسیداز unit/mg protein
I <sub>1</sub>	۲/۹۱	۰/۹۴۸	۰/۳۳۷	۰/۷۷۰	۲/۸۳	۰/۲۱۶
I <sub>2</sub>	۲/۶۹	۰/۷۹۷	۰/۲۴۸	۰/۹۶۳	۲/۴۲	۰/۱۹۰
LSD 5%	۰/۱۳۲	۰/۰۵۶	۰/۰۵۹	۰/۰۸۶	۰/۱۰۶	۰/۰۲۴

FW: وزن تازه

تیمار I<sub>1</sub>S<sub>1</sub> و I<sub>1</sub>S<sub>2</sub> مشاهده شد (جدول ۳). همان گونه که مشخص است اثر فراهمی رطوبت خاک غالب‌تر از اثر

سیدروفور بوده است. با این حال، در شرایط یکسان آبیاری، کاربرد سیدروفور توانسته اثر افزایشی بر سطح پرولین در برگ داشته باشد. پرولین یکی از اسیدهای آمینه فعال در پدیده تنظیم اسمزی می‌باشد که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش بسزایی دارد و تأخیر در آبیاری سبب افزایش تولید آن در برگ گردیده است. کاربرد سیدروفور نیز از طریق عواملی نظیر کمک به بهبود جذب عناصر غذایی احتمالاً در بهبود روند سنتز پرولین می‌تواند مؤثر بوده باشد. در پژوهشی دیگر نتیجه گرفتند که تنش خشکی در مراحل مختلف رشد در برنج، میزان پرولین را افزایش داده و ارقام با میزان بالای پرولین، دانه بیشتری را در طی تنش خشکی تولید کردند (Pirdashti et al., 2009). پرولین دارای همبستگی منفی و معنی‌دار با کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئیدها (به ترتیب  $0.76^*$ ،  $0.79^*$  و  $0.87^{**}$ ) بود (جدول ۶). پرولین و کلروفیل هر دو از پیش‌ماده گلوتامات به وجود می‌آیند (Matthews and Anderson, 1988) و این می‌تواند از دلایل همبستگی منفی بین کلروفیل و پرولین باشد. همبستگی منفی بین پرولین با کارتنوئیدها هم می‌تواند ناشی از ارتباط نزدیک و مستقیم کارتنوئیدها و کلروفیل‌ها باشد که از تغییرات آن تبعیت می‌کند. از طرف دیگر، با توجه به تشابه نقش حفاظتی کلروفیل b و کارتنوئیدها با پرولین، افزایش حضور پرولین سبب کاهش این وظیفه برای دو رنگیزه دیگر شده و ضرورت حضور آنها کمتر خواهد شد.

اثر اصلی عوامل آزمایشی بر میزان قندهای محلول برگ و ساکارز و اثر متقابل دور آبیاری و سیدروفور نیز بر محتوای قندهای محلول برگ معنی‌دار گردید (جدول ۷). نتایج جدول مقایسه میانگین نشان داد که تأخیر در آبیاری و کاربرد سیدروفور سبب افزایش محتوای قندهای محلول شد. به طوری که بیشترین میزان قندهای محلول در تیمار  $I_2S_1$  بدست آمد (جدول ۳). همچنین تأخیر در آبیاری ( $I_2$ ) نسبت به دور آبیاری شاهد ( $I_1$ ) (جدول ۴) و کاربرد سیدروفور ( $S_1$ ) نیز نسبت به عدم کاربرد آن ( $S_2$ ) میزان ساکارز را افزایش داد (جدول ۵). محدودیت رشد ناشی از کاهش فراهمی رطوبت

در خاک و تداوم فتوسنتز و همچنین نیاز به انجام تنظیم اسمزی و شکسته شدن کربوهیدرات‌های درشت نامحلول از دلایل تجمع کربوهیدرات‌های محلول و ساکارز در برگ می‌باشد. حضور سیدروفور، باعث تجمع بیشتر قندهای محلول نسبت به وضعیت عدم کاربرد آن می‌باشد که می‌تواند مربوط به اثرات بیولوژیک آن نظیر بهبود فعالیت آنزیم‌های سلولی (مؤثر در سنتز کربوهیدرات یا تجزیه نشاسته) ناشی از بهبود تغذیه گیاه باشد. قندهای محلول با کلروفیل a، b و کارتنوئیدها همبستگی منفی (به ترتیب  $0.72^*$ ،  $0.79^*$  و  $0.84^{**}$ ) و با پرولین همبستگی مثبت ( $0.99^*$ ) نشان داد. ساکارز نیز دارای همبستگی منفی با کلروفیل b و کارتنوئیدها (به ترتیب  $0.72^*$  و  $0.77^*$ ) و همبستگی مثبت با پرولین ( $0.98^{**}$ ) بود که تایید کننده مطالب گفته شده می‌باشد. تحقیقات نشان داد که افزایش سنتز کربوهیدرات‌ها به عنوان یک نشانه برای مقاومت به تنش خشکی محسوب می‌شود. تنش خشکی منجر به افزایش تجزیه نشاسته و تجمع قندهای محلول (ساکارز و فروکتوز) می‌شود که به حفظ تورژسانس کمک می‌کند. بنابراین هنگامی که پتانسیل آب برگ کاهش می‌یابد، تجمع قندها احتمالاً در تنظیم اسمزی نقش اصلی را ایفا می‌نمایند (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). اثر اصلی عوامل آزمایشی بر میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) برگ معنی‌دار بود (جدول ۷) و تأخیر در آبیاری ( $I_2$ ) و عدم کاربرد سیدروفور ( $S_2$ ) سبب افزایش میزان MDA شد (جدول ۴ و ۵). MDA با کلروفیل a، b و کارتنوئیدها همبستگی منفی (به ترتیب  $0.90^{**}$ ،  $0.81^*$  و  $0.96^{**}$ ) و با پرولین همبستگی مثبت ( $0.93^*$ ) نشان داد. تأخیر در آبیاری و بروز تنش خشکی، از طریق بسته شدن روزنه‌ها و اختلال در جذب  $CO_2$  باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد شده که پراکسیداسیون چربی‌ها و صدمه به فسفولیپیدهای غشاءهای سلولی را افزایش خواهد داد که صدمه به غشاءهای کلروپلاست با کاهش کلروفیل و اکسید شدن مولکول‌های آن همراه می‌باشد. همبستگی با پرولین، بیان‌کننده روند تغییرات یکسان این دو ترکیب می‌باشد که ظاهراً نشان‌دهنده عدم نقش حفاظتی پرولین در مقابل تنش اکسیداتیو می‌باشد و احتمالاً



جدول ۶- ضرایب همبستگی بین صفات

شماره صفت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a/b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	پروکلین	قندهای محلول	ساکارز	MDA <sup>۱</sup>	GPO <sup>۲</sup>	PPO <sup>۳</sup>	PAL <sup>۴</sup>	MS <sup>۵</sup>	زیست توده
۲	۰/۹۱ <sup>ns</sup>	۱												
۳	۰/۸۸ <sup>ns</sup>	۰/۶۰ <sup>ns</sup>	۱											
۴	۰/۹۹ <sup>ns</sup>	۰/۹۴ <sup>ns</sup>	۰/۸۴ <sup>ns</sup>	۱										
۵	۰/۹۶ <sup>ns</sup>	۰/۸۸ <sup>ns</sup>	۰/۸۲ <sup>ns</sup>	۰/۹۶ <sup>ns</sup>	۱									
۶	-۰/۷۶ <sup>ns</sup>	-۰/۷۹ <sup>ns</sup>	۰/۵۳ <sup>ns</sup>	-۰/۷۸ <sup>ns</sup>	-۰/۸۷ <sup>ns</sup>	۱								
۷	-۰/۷۲ <sup>ns</sup>	-۰/۷۹ <sup>ns</sup>	۰/۴۶ <sup>ns</sup>	-۰/۷۵ <sup>ns</sup>	-۰/۸۴ <sup>ns</sup>	۰/۹۹ <sup>ns</sup>	۱							
۸	۰/۵۵ <sup>ns</sup>	-۰/۷۲ <sup>ns</sup>	۰/۳۹ <sup>ns</sup>	۰/۵۷ <sup>ns</sup>	-۰/۷۷ <sup>ns</sup>	۰/۹۸ <sup>ns</sup>	۰/۹۹ <sup>ns</sup>	۱						
۹	-۰/۹۰ <sup>ns</sup>	-۰/۸۱ <sup>ns</sup>	-۰/۷۸ <sup>ns</sup>	-۰/۹۰ <sup>ns</sup>	-۰/۹۶ <sup>ns</sup>	۰/۹۳ <sup>ns</sup>	۰/۸۹ <sup>ns</sup>	۰/۸۵ <sup>ns</sup>	۱					
۱۰	-۰/۷۷ <sup>ns</sup>	-۰/۸۲ <sup>ns</sup>	۰/۵۲ <sup>ns</sup>	-۰/۷۹ <sup>ns</sup>	-۰/۸۷ <sup>ns</sup>	۰/۹۹ <sup>ns</sup>	۰/۹۹ <sup>ns</sup>	۰/۹۷ <sup>ns</sup>	۰/۹۲ <sup>ns</sup>	۱				
۱۱	۰/۴۱ <sup>ns</sup>	۰/۵۳ <sup>ns</sup>	۰/۱۸ <sup>ns</sup>	۰/۴۴ <sup>ns</sup>	۰/۵۶ <sup>ns</sup>	۰/۷۷ <sup>ns</sup>	۰/۸۰ <sup>ns</sup>	۰/۷۵ <sup>ns</sup>	۰/۶۳ <sup>ns</sup>	۰/۸۰ <sup>ns</sup>	۱			
۱۲	۰/۴۷ <sup>ns</sup>	۰/۵۶ <sup>ns</sup>	۰/۲۶ <sup>ns</sup>	۰/۵۰ <sup>ns</sup>	۰/۶۰ <sup>ns</sup>	۰/۷۸ <sup>ns</sup>	۰/۸۱ <sup>ns</sup>	۰/۷۴ <sup>ns</sup>	۰/۶۳ <sup>ns</sup>	۰/۸۲ <sup>ns</sup>	۰/۹۷ <sup>ns</sup>	۱		
۱۳	۰/۹۷ <sup>ns</sup>	۰/۸۳ <sup>ns</sup>	۰/۹۰ <sup>ns</sup>	۰/۹۶ <sup>ns</sup>	۰/۹۸ <sup>ns</sup>	-۰/۸۲ <sup>ns</sup>	-۰/۷۷ <sup>ns</sup>	-۰/۷۰ <sup>ns</sup>	-۰/۹۶ <sup>ns</sup>	-۰/۸۱ <sup>ns</sup>	-۰/۵ <sup>ns</sup>	-۰/۵۲ <sup>ns</sup>	۱	
۱۴	۰/۸۱ <sup>ns</sup>	۰/۶۶ <sup>ns</sup>	۰/۷۹ <sup>ns</sup>	۰/۷۹ <sup>ns</sup>	۰/۸۹ <sup>ns</sup>	-۰/۳۱ <sup>ns</sup>	-۰/۳۱ <sup>ns</sup>	-۰/۲۴ <sup>ns</sup>	-۰/۸۷ <sup>ns</sup>	-۰/۲۷ <sup>ns</sup>	-۰/۲ <sup>ns</sup>	۰/۲۳ <sup>ns</sup>	۰/۶۸ <sup>ns</sup>	۱

ns, \* و \*\* به ترتیب نشان دهنده غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می باشد.

<sup>۱</sup>مالون دی آلدئید (Malondialdehyde)، <sup>۲</sup>گایاکول پراکسیداز (Guaiacol Peroxidase)، <sup>۳</sup>پلی فنل اکسیداز (Polyphenol Oxidase)، <sup>۴</sup>فنیل آلانین آمونیا لیاز (Phenylalanine Ammonia Lyase)، <sup>۵</sup>پایداری غشاء (Membrane Stability)

جدول ۷- تجزیه واریانس قندهای محلول، ساکارز و مالون دی آلدئید و آنزیم های آنتی اکسیدان.

منابع تغییر	درجه آزادی	قندهای محلول	ساکارز	مالون دی آلدئید	گایاکول پراکسیداز	پلی فنل اکسیداز	فنیل آلانین آمونیا لیاز
بلوک	۲	۰/۱۶۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۹ <sup>*</sup>	۰/۰۷۹ <sup>**</sup>	۰/۰۰۰۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۴ <sup>ns</sup>
دور آبیاری	۱	۶/۵۸ <sup>**</sup>	۰/۰۷۴ <sup>**</sup>	۰/۴۰۴ <sup>**</sup>	۲/۶۲ <sup>**</sup>	۰/۰۰۳۹ <sup>**</sup>	۰/۰۱۹ <sup>ns</sup>
سیدروفور	۱	۱/۴۶ <sup>**</sup>	۰/۰۲۳ <sup>**</sup>	۰/۱۱۱ <sup>**</sup>	۰/۵۰۸ <sup>**</sup>	۰/۰۰۲۱ <sup>*</sup>	۰/۰۱۸ <sup>ns</sup>
دور آبیاری × سیدروفور	۱	۰/۳۱۶ <sup>*</sup>	۰/۰۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۳۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۱۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>
خطا	۶	۰/۰۴۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۲	۰/۰۱۲
ضریب تغییرات (%)		۵/۸۹	۱۴/۱۷	۷/۰۱	۲/۸۴	۸/۲۰	۱۲/۳۲

ns, \* و \*\* به ترتیب نشان دهنده غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می باشد.

طریق کمک به جذب عناصر معدنی کم مصرف (آهن، روی و مس) باعث تشکیل آیزوزایم های آنزیم های آنتی اکسیدان گردیده و کاهش رادیکال های آزاد تولیدی را به دنبال داشته باشد. نتایج تجزیه واریانس آنزیم های آنتی اکسیدان برگ نشان داد که اثر اصلی عوامل آزمایش بر میزان فعالیت آنزیم های گایاکول

پروکلین بیشتر به عنوان یک تنظیم کننده اسمزی ایفای نقش داشته است. کاربرد سیدروفور نیز باعث کاهش MDA شده که می تواند از طریق بهبود قابلیت تنظیم اسمزی و باز نگه داشتن روزنه ها برای تداوم فتوسنتز و ممانعت از کاهش پذیرنده نهایی الکترون و در نتیجه کاهش رادیکال های آزاد تولیدی باشد و یا از

دور آبیاری  $I_2$ ، برگ‌ها دارای محتوای نسبی آب بیشتری بودند (جدول ۹). انجام آبیاری با دور کوتاه‌تر، به دلیل فراهمی بیشتر رطوبت در ناحیه ریشه، سبب بیشتر شدن محتوای نسبی آب برگ شد. تیمار  $S_1$  در مقایسه با  $S_2$  باعث افزایش محتوای نسبی آب برگ گردید (جدول ۱۰). فراهمی رطوبت باعث افزایش محتوای نسبی آب برگ و انجام فتوسنتز بیشتر (افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی) و کاهش میزان پرولین برگ می‌گردد. کاربرد سیدروفور احتمالاً از طریق بهبود و تقویت راه‌کارهای تنظیم اسمزی سبب افزایش محتوای نسبی آب برگ گردیده است. این صفت در برنامه‌های اصلاحی به‌عنوان شاخص مناسب و مهمی در انتخاب برای مقاومت به خشکی مد نظر قرار می‌گیرد، بین پتانسیل آب گیاه و محتوای نسبی آب برگ همبستگی مثبت و بالایی وجود دارد و گیاهانی که در پایان دوره تنش بتوانند محتوای نسبی آب برگ بالاتری را حفظ کنند به لحاظ مقاومت به خشکی نیز برتر خواهند بود (حسن‌پور و همکاران، ۱۳۸۷).

پایداری غشاء تحت تأثیر اثر اصلی دور آبیاری و سیدروفور قرار گرفت (جدول ۸) و در تیمار  $I_1$  و همچنین  $S_1$  پایداری غشاء بیشتری حاصل شد (جدول ۹ و ۱۰). از آنجایی که انجام آبیاری و کاربرد سیدروفور باعث کاهش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (بر اساس نتایج فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان) پایداری و حفظ پیوستگی غشاهای سلولی نیز بیشتر خواهد بود. پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء توسط رادیکال‌های آزاد سبب کاهش پایداری غشاء سلول شده و در نتیجه، ترکیبات سیتوپلاسمی به خارج از اندامک‌ها نشت پیدا کرده و باعث آشفته‌گی عملکرد غشائی و برهم زدن تعادل متابولیسمی سلول می‌شود. بنابراین پایداری غشای سلولی یک شاخص مهم مقاومت گیاهان نسبت به تنش می‌باشد (Kocheva et al., 2013). پایداری غشاء با کلروفیل  $a$ ،  $b$  و کارتنوئیدها همبستگی مثبت (به ترتیب دارای همبستگی  $0.97^{**}$ ،  $0.83^*$  و  $0.98^{**}$ ) و با پرولین، قندهای محلول، MDA و گاپاکول پراکسیداز همبستگی منفی (به ترتیب  $0.82^*$ ،  $0.77^*$ ،  $0.96^{**}$  و  $0.81^*$ ) نشان داد. این گونه

پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز معنی‌دار شد (جدول ۷). مقایسات میانگین نشان داد که تأخیر در آبیاری ( $I_2$ ) و همچنین کاربرد سیدروفور ( $S_2$ ) سبب افزایش میزان فعالیت این آنزیم گاپاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز شد (جدول ۴ و ۵). اما تأثیری بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز نداشتند (جدول ۷). بسیاری از آنزیم‌ها از جمله پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز، کیتیناز و محتویات فنلی در ارتباط با مقاومت القایی سیستمیک می‌باشند که توسط سیدروفورها می‌تواند ایجاد گردد (Ali and Vidhale, 2013). از آنجایی که عناصری نظیر آهن و روی دارای نقش افزایشی در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان هستند (Molassiotis et al., 2005; Torabian et al., 2016)، کاربرد سیدروفور می‌تواند از طریق بهبود تغذیه، میزان فعالیت این آنزیم‌ها را افزایش دهد. گاپاکول پراکسیداز با کلروفیل  $a$ ،  $b$  و کارتنوئیدها همبستگی منفی (به ترتیب دارای همبستگی  $0.77^*$ ،  $0.82^*$  و  $0.87^{**}$ ) و با پرولین، قندهای محلول، ساکارز و MDA دارای همبستگی مثبت (به ترتیب دارای همبستگی  $0.99^{**}$ ،  $0.99^{**}$ ،  $0.97^{**}$  و  $0.92^{**}$ ) بود. پلی فنل اکسیداز با پرولین، قندهای محلول، ساکارز و گاپاکول پراکسیداز همبستگی مثبت (به ترتیب دارای همبستگی  $0.77^*$ ،  $0.80^*$ ،  $0.75^*$  و  $0.80^*$ ) داشت. فنیل آلانین آمونیا لایز نیز همبستگی مثبت با پرولین، قندهای محلول، ساکارز، گاپاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز (به ترتیب دارای همبستگی  $0.78^*$ ،  $0.81^*$ ،  $0.74^*$ ،  $0.82^*$  و  $0.97^{**}$ ) نشان داد. این ضرایب می‌تواند نشان دهد که در شرایط تنش، چندین راه‌کار (تنظیم اسمزی و حذف رادیکال‌های آزاد) برای کاهش اثر تنش در سلول فعال می‌شوند. Abedi و همکاران (۲۰۱۲) نیز نتیجه گرفتند که تنش خشکی باعث افزایش فعالیت در چندین آنزیم آنتی‌اکسیدان از جمله گاپاکول پراکسیداز می‌شود و بیان کردند که افزایش در گاپاکول پراکسیداز می‌تواند یک عامل مهم برای تجزیه آب اکسیژنه باشد، به ویژه در زمانی که کاتالاز غیرفعال شده است.

اثر اصلی دور آبیاری و سیدروفور بر محتوای نسبی آب برگ معنی‌دار گردید (جدول ۸). در دور آبیاری  $I_1$  نسبت به

جدول ۸- تجزیه واریانس محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشاء، شاخص سطح برگ و سطح مخصوص برگ

منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای نسبی آب برگ	پایداری غشاء	شاخص سطح برگ	سطح مخصوص برگ	زیست توده
بلوک	۲	۱۳/۲ <sup>ns</sup>	۴/۵۴ <sup>ns</sup>	۰/۲۴۱*	۸/۵۸ <sup>ns</sup>	۲۵۲۸۱۰۲/۰*
دور آبیاری	۱	۳۳۴**	۴۱/۴**	۱/۸۰**	۸۰۰**	۱۶۴۹۰۰۴۰**
سیدروفور	۱	۱۳۴**	۲۴/۹**	۰/۶۳۰**	۱۹۲*	۸۱۰۶۵۶۴/۰**
دور آبیاری × سیدروفور	۱	۴/۵۶ <sup>ns</sup>	۰/۱۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۶۶ <sup>ns</sup>	۶۵/۳ <sup>ns</sup>	۹۴۴۷۲۴/۰ <sup>ns</sup>
خطا	۶	۳/۹۲	۱/۷۱	۰/۰۴۱	۲۸/۵	۲۹۹۸۴۱
ضریب تغییرات (%)		۵۲۴	۱/۶۶	۵/۱۸	۴/۰۷	۷/۲۸

ns, \* و \*\* به ترتیب نشان دهنده غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می باشد. اعداد میانگین مربعات می باشد.

جدول ۹- مقایسه میانگین اثر دور آبیاری بر محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشاء، شاخص سطح برگ و سطح مخصوص برگ

دور آبیاری	محتوای نسبی آب برگ %	پایداری غشاء	شاخص سطح برگ	سطح مخصوص برگ cm <sup>2</sup> /g	زیست توده g/m <sup>2</sup>
I <sub>1</sub>	۸۶/۸	۸۰/۸	۴/۳۳	۱۳۹	۸۶۹۷
I <sub>2</sub>	۷۶/۳	۷۷/۰	۳/۵۶	۱۲۳	۶۳۵۳
LSD 5%	۲/۸	۱/۹	۰/۲۹	۷/۵	۷۷۴

جدول ۱۰- مقایسه میانگین اثر سیدروفور بر محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشاء، شاخص سطح برگ و سطح مخصوص برگ

دور آبیاری	محتوای نسبی آب برگ %	پایداری غشاء	شاخص سطح برگ	سطح مخصوص برگ cm <sup>2</sup> /g	زیست توده g/m <sup>2</sup>
I <sub>1</sub>	۸۴/۹	۸۰/۳	۴/۱۷	۱۳۵	۸۳۴۷
I <sub>2</sub>	۷۸/۲	۷۷/۵	۳/۷۲	۱۲۷	۶۷۰۳
LSD 5%	۲/۸	۱/۹	۰/۲۹	۷/۵	۷۷۴

همچنین تیمار S<sub>1</sub>، باعث افزایش در این صفات شد (جدول ۹ و ۱۰). فراهمی رطوبت و تامین نیروی تورژسانس لازم برای رشد و تقسیم سلولی از یک طرف و بهبود فعالیت آنزیمی و فتوسنتزی بیشتر توسط سیدروفور از طرف دیگر سبب رشد و گسترش بیشتر برگ شده که هم شاخص سطح برگ و هم سطح مخصوص برگ را افزایش می دهد. البته باید گفت میزان اثر گذاری کمبود رطوبت، غالب بر اثر سیدروفور بوده است. همچنین از راه کارهای کاهش تعرق در بروز تنش خشکی، کاهش سطح برگ می باشد و در این شرایط، برای افزایش ظرفیت فتوسنتز علی رغم کاهش سطح برگ، افزایش تعداد

استدلال می شود که در شرایطی که فتوسنتز بدون محدودیت و با حداکثر ظرفیت صورت می گیرد (فراوانی رنگیزه های برگ)، پایداری غشاء بیشتری نیز وجود دارد و زمانی که بر اثر عامل نامساعد، پرولین افزایش می یابد، از پایداری غشاء نیز کاسته خواهد شد. افزایش میزان MDA سبب کاهش پایداری غشاء می گردد. در شرایط عدم وجود تنش و باز بودن مسیر انتقال الکترون در سیستم فتوسنتز، تشکیل رادیکال های آزاد به طور قابل ملاحظه ای کم می باشد.

اثر اصلی عوامل آزمایشی بر شاخص سطح برگ و سطح مخصوص برگ معنی دار بود (جدول ۸). دور آبیاری I<sub>1</sub> و

لایه‌های سلولی پارانشیم نردبانی و اسفنجی در برگ و در نتیجه افزایش وزن مخصوص آن است (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی عوامل آزمایشی بر عملکرد تر زیست‌توده معنی‌دار گردید (جدول ۸). مقایسات میانگین اثر دور آبیاری بر عملکرد تر زیست‌توده نشان داد که با تأخیر در آبیاری عملکرد کاهش می‌یابد و بیشترین عملکرد تر زیست‌توده (۸۶۹۷ گرم بر مترمربع) در دور آبیاری ۷۵ میلی‌متر بوده است (جدول ۹). کاربرد سیدروفور نیز نسبت به عدم کاربرد سیدروفور تأثیر مثبت و معنی‌داری بر عملکرد تر زیست‌توده داشت و سبب افزایش عملکرد تر زیست‌توده به میزان ۸۳۴۷ در مقابل ۶۷۰۳ گرم بر مترمربع) گردید (جدول ۱۰). عملکرد تر زیست‌توده همبستگی مثبت و معنی‌داری با تعداد زیادی از صفات مورد بررسی (کلروفیل a، b، کارتنوئیدها، محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشاء، شاخص سطح برگ و شاخص مخصوص برگ) نشان داد (جدول ۶) که همگی موارد دال بر آن است که هر عاملی که سبب بهبود و افزایش توانایی فتوسنتزی و فراهمی رطوبت کافی در گیاه شود، باعث افزایش رشد و عملکرد تولیدی

می‌شود.

#### نتیجه‌گیری کلی:

کاربرد سیدروفور در شرایط آبیاری تأخیری موجب افزایش توانایی تولید اسمولیت‌ها (پرولین، قندهای محلول و ساکارز) و ارتقاع توانایی تنظیم اسمزی و محتوای نسبی آب برگ گردید که این قابلیت‌ها، افزایش میزان تحمل به خشکی در گیاه می‌گردد. ضمن اینکه تقویت توانایی‌های حفاظتی سلول (افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان) منجر به حفاظت غشاءها و کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها و در نتیجه افزایش سلامت و پایداری غشاهای سلول شده که موجب تداوم حیات سلول و انجام فتوسنتز می‌گردد. آبیاری شاهد (I<sub>1</sub>) و کاربرد سیدروفور (S<sub>1</sub>)، افزایش رنگیزه‌های برگ و شاخص سطح برگ و شاخص ظرفیت فتوسنتزی را به دنبال داشت. در عین حال باید در نظر داشت که کاربرد سیدروفور، باعث تخفیف اثرات تنش خشکی گردید، اما قادر به جبران اثرات آن نمی‌باشد.

#### منابع:

- احمدی، ع. و سی و سه مرده، ع. (۱۳۸۳) تأثیر تنش آبی بر میزان کربوهیدرات‌های محلول، کلروفیل و پرولین چهار رقم گندم ایرانی تحت رژیم‌های مختلف رطوبتی، مجله ایرانی علوم کشاورزی ۳۵: ۷۶۳-۷۵۳.
- حسن‌پور، ج.، کافی، م. و میرهادی، م. ج. (۱۳۸۷) اثر تنش خشکی بر عملکرد و برخی خصوصیات فیزیولوژیک جو، مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۹: ۱۷۷-۱۶۵.
- خدابنده، ن. (۱۳۷۹) غلات. انتشارات دانشگاه تهران.
- خواجه‌پور، م. ر. (۱۳۹۲) غلات. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان.
- رسولی صدقیانی، م. ح.، خاوازی، ک. و ملکوتی، م. ج. (۱۳۸۴) باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور و امکان تأمین آهن و روی مورد نیاز گیاهان. نشریه فنی شماره ۴۲۷. مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران.
- کافی، م.، برزویی، ا.، صالحی، م.، کمندی، ع.، معصومی، ع. و نباتی، ج. (۱۳۸۸) فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- کریمی، م. و عزیزی، م. (۱۳۷۳) آنالیزهای رشد گیاهان زراعی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- Abedi, T. and Pakniyat, H. (2012) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivar of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding* 46: 27-34.
- Ali, S. S. and Vidhale, N. N. (2013) Bacterial siderophore and their application: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2:303-312.
- Arnon, A. N. (1967) Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal* 23: 112-121.

- Bates, L. S., Walderen, R. D. and Taere, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- 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.
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S. and Dong, X. (1994) Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6:1583-1592.
- Chen, C. and Dickman, M. B. (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Plant of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 3459-3464.
- Chen, T. H. H., and Murata, N. (2000) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 250-257.
- Dcunha, G. B., Satyanarayan, V. and Nair, P. M. (1996) Purification of phenylalanine ammonialyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry* 42:17-20.
- De Vos, C. H. and Schat, H. (1991) Increased resistance to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiology Plantarum* 82: 523-528.
- Fu, J. and Huang, B. (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental Experimental Botany* 45: 105-114.
- Gubis, J., Vankova, R., Cervena, V., Dragunova, M., Hudcovicova, M., Lichtnerova, H., Dokupil, T. and Jurekova, Z. (2007) Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. *South African Journal of Botany* 73: 505-511.
- Guo, Z., Ou, W., Lu, S. and Zhong, Q. (2006) Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology Biochemistry* 44: 828-836.
- Honty, K., Hevesi, M., Toth, M. and Stefanovits-Banyai, E. (2005) Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia amylovora*, Proceedings of the 8<sup>th</sup> Hungarian Congress on Plant Physiology and the 6<sup>th</sup> Hungarian Conference on Photosynthesis. *Acta Biologica Szegediensis* 49: 127-129.
- Irigoyen, J. J., Emerich, D. W. and Sanchez Diaz, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Plant Physiology* 84: 55-60.
- Kocheva, K., Nenova, V., Karceva, T., Petrov, V., Georgiev, G. I., Borner, A. and Landjeva, S. (2013) Changes in Water Status, Membrane Stability and Antioxidant Capacity of Wheat Seedlings Carrying Different *Rht-B1* Dwarfing Alleles under Drought Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 200: 83-91.
- Liu, X. and Huang, B. (2000) Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Science* 40: 503-510.
- Matthews, M. A. and Anderson, M. M. (1988) Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: Responses to seasonal water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture* 39: 313-320.
- Molassiotis, A. N., Diamantidis, G. C., Therios, I. N., Tsirakoglou, V. and Dimassi, N. K. (2005) Oxidative stress, antioxidant activity and Fe (III)-chelate reductase activity of five Prunus rootstocks explants in response to Fe deficiency. *Plant Growth Regulation* 46:69-78.
- Munne-Bosch, S. and Alegre, L. (1999) Role of dew on the recovery of water-stressed *Melissa officinalis* L. plants. *J. Plant Physiology* 154: 759-766.
- Nicoli, M. C., Elizabale, B. E., Piotti, A. and Lericci, C. R. (1991) Effect of sugar and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *Journal of Food Biochemistry* 15:169-184.
- Pirdashti, H., Tahmasebi-Sarvestani, Z. and Bahmanyar, M. A. (2009) Comparison of physiological response among four contrast rice cultivars under drought stress conditions. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 49: 52-54.
- Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wanger, E. D. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research* 247: 57-64.
- Praxedes, S. C., Damatto, F. M., Loureiro, M. E., Ferrao, M. A. G. and Cordeiro, A. T. (2006) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee leaves. *Environmental and Experimental Botany* 56: 263-273.
- Ritchie, S. W. and Nguyen, H. T. (1990) Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science* 30: 105-111.
- Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. C. (2002) Differential response of wheat genotypes to longterm salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
- Sanchez-Rodriguez, E., Rubio-Wilhelmi, M., Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosales, M. A., Romero, L. and 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.
- Sankar, B., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2007) Drought induced biochemical modifications and proline metabolism in *Abelmoschus esculentus* L. Moench. *Acta Botanica Croatica* 66: 43-56.

- Sarim, R. R., Veerabhadra Rao, K. and Srivastava, G. C. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
- Schutz, M., and Fangmeir, E. (2001) Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv.Minaret) to elevated CO<sub>2</sub> and water limitation. *Environmental Pollution* 114:187-194.
- Sharma, A., Johri, B. N., Sharma, A. K. and Glick, B. R. (2003) Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. Strain GRP3 influences iron acquisition in Mung bean. *Soil Biology Biochemistry* 35:887-894.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2002) *Plant Physiology*, 3rd. edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. USA.
- Torabian, S., Zahedi, M. and Khoshgoftarmanesh, A. (2016). Effect of foliar spray of zinc oxide on some antioxidant enzymes activity of sunflower under salt stress. *Journal of Agricultural Science and Technology* 18: 1013-1025.
- Valentovic, P., Luxova, M., Kolarovic, L. and Gasparikova, O. (2006) Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relation in two maize cultivars. *Plant Soil Environment Journal* 52: 186 – 191.
- Van Handel, E. (1968) Direct micro determination of sucrose. *Analytical Biochemistry* 22: 280-283
- Van Loon, L. C., Bakker, P. and Reters, C. M. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.