

## تأثیر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیک و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان دو رقم کلزا (*Brassica napus*)

فاطمه سادات سید ابراهیمی، حسن حسنی کومله<sup>\*</sup>، علی اعلمی و محمد حسین رضادوست

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۴/۰۴/۹۳ تاریخ پذیرش نهایی: ۰۷/۱۰/۱۳۹۳)

### چکیده:

خشکی پدیده‌ای بحرانی است که همه ساله در بخش‌هایی از دنیا در زمان‌های مختلف با دامنه و شدت متفاوت به تولید موافقیت‌آمیز محصول آسیب می‌رساند. تحقیق حاضر به منظور بررسی تأثیر تنش خشکی روی برخی صفات مربوط به برگ (مساحت برگ، وزن تر و کلروفیل)، ریشه (وزن تر)، ساقه (وزن تر و طول) و تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان سوپراکسیدیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POD) روی دو رقم کلزا (*Hyola308* و متحمل *SLM046*) به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار برای صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک و ۲ تکرار برای سنجش آنزیمی انجام شد. بدین منظور گیاهچه‌ها در محیط MS مایع سوسپانسیون در پنج سطح خشکی شامل صفر، ۳، ۶، ۱۲ و ۱۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول ۶۰۰۰ به طور شناور کشت شدند. صفر، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش، از گیاهان نمونه‌های برگی تهیه شد. اندازه‌گیری‌های صفات بین دو رقم تفاوت معنی‌داری نشان داد. طبق نتایج، سطح و وزن برگ، طول ساقه و وزن ریشه با افزایش مقدار PEG و پیشرفت زمان، در هر دو رقم کاهش یافت. با افزایش میزان کلروفیل در رقم حساس افزایش بیشتری نسبت به رقم متحمل داشت. در هر دو رقم تنش خشکی به طور معنی‌داری سبب کاهش وزن ساقه شد. بر اساس نتایج شدت واکنش و فعالیت آنزیم SOD در رقم مقاوم بیشتر بود. فعالیت آنزیم POD در رقم مقاوم در شرایط تنش خشکی شدید و فعالیت این آنزیم در رقم حساس در شرایط اولیه تنش خشکی افزایش داشته است.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، پلی‌اتیلن‌گلایکول، سوپراکسیدیسموتاز، کلروفیل

### مقدمه:

فرایندهای رشد گیاه تأثیر می‌گذارد (Panda *et al.*, 2004). گیاهان دارای مکانیسم‌های متعددی برای مقاومت به دوره‌های خشکی هستند. کمبود آب با تأثیر بر آماس سلولی و در نتیجه باز و بسته شدن روزنه‌ها، فرآیند فتوستتر، تنفس و تعرق را تحت تأثیر قرار داده و از طرف دیگر با تأثیر بر فرایندهای آنزیمی که به طور مستقیم با پتانسیل آب کنترل می‌شوند، بر رشد گیاه اثر منفی می‌گذارد (کافی و همکاران، ۱۳۸۴). در کلزا، کاهش سطح برگ اولین و متداول‌ترین پدیده

کلزا به عنوان یکی از گیاهان زراعی مقاوم به خشکی شناخته شده است و دارای صفات مطلوبی از جمله کیفیت بالای روغن دانه، درصد بالای اسیدهای چرب، صفات زراعی مطلوب دیگر مانند مقاومت به سرما، کم آبی، شوری، دارا بودن ژنوتیپ‌های بهاره و پاییزه و عملکرد بیشتر روغن در واحد سطح نسبت به دیگر دانه‌های روغنی کشت شده در کشور است. تنش خشکی و صدمات اکسیداتیو ناشی از آن روی کلیه

آن آسکوربیک اسید (ASC)، آلفا توکوفرول (ویتامین E) و کاروتونوئیدها هستند (Schwanz, 2001; Blokhin, 2003). گیاهان گروهی از سازگاری‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی را در پاسخ به تنفس‌ها نشان می‌دهند که از آن جمله می‌توان به تغییرات فعالیت برخی آنزیم‌ها مانند پراکسیدازها و سوپراکسیدیسموتازها اشاره کرد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان نقش حفاظتی را بر عهده دارد. سوپراکسید دیسموتاز (SOD) یک آنتی‌اکسیدان قوی است که اولین ماده تولید شده از احیای یک ظرفیتی اکسیژن، یعنی رادیکال سوپراکسید را از بین می‌برد و تبدیل به اکسیژن، سلول‌های گیاهی در خشکی می‌شود (Alscher, 2002). بنابراین SOD به عنوان دفاع اولیه در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن در نظر گرفته می‌شود (Alscher, 2002). فعالیت آنزیم SOD در سلول‌ها، در پاسخ به تنفس‌های مختلف محیطی و تنفس‌های غیر زیستی مانند شدت نور بالا (Mittler, 2002)، افزایش شوری (Badawi, 2003) و خشکی (Sairam, 2000) و خشکی پیدا می‌کند. پراکسیدازها، پراکسیدهیدروژن را با اکسیداسیون سوبستراها بی همچون ترکیبات فلزی و یا برخی ترکیبات دیگر نظیر آسکوربیات تجزیه می‌کند (Reddy *et al.*, 2008). پراکسیدازهای گیاهی نقش‌های مهمی از جمله دخالت در متابولیسم اکسین، از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ایجاد مقاومت نسبت به تنفس‌های اکسایشی، پاسخ به تنفس آلودگی هوا و ترمیم زخم در گیاهان ایفا می‌کنند. با وجود اینکه هنوز مکانیسم دقیق پراکسیدازها مشخص نشده است اما به نظر می‌رسد که آن‌ها نقش مهمی در دفاع گیاهان در برابر تنفس‌ها داشته باشند (Kanzok *et al.*, 2001). آنزیم POD در سمزدایی پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدهید که باعث پراکسیداسیون غشا و ناپایداری دیواره سلولی می‌شود نقش کلیدی دارد (Hojati *et al.*, 2011). این پژوهش با هدف بررسی تفاوت در واکنش‌های دو رقم حساس و متحمل کلزا در شرایط تنفس خشکی القا شده توسط پلی اتیلن گلایکول از منظر مورفولوژیک (سطح و وزن برگ، میانگین طول ساقه و

فیزیولوژیکی در واکنش به تنفس خشکی است. دوره خشکی باعث محدود شدن فتوستتر، افزایش تنفس نوری، کاهش فعالیت زنجیره انتقال الکترون در فتوستتر و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود. نتایج مطالعات نشان می‌دهد در شرایط تنفس و حتی تحت غلظت‌های بالای  $\text{CO}_2$  محیطی، فتوستتر کاهش می‌یابد. در شرایط تنفس کمبود آب روزنه‌ها در گیاه بسته می‌شوند و متعاقب آن غلظت  $\text{CO}_2$  در بافت مزووفیل کاهش می‌یابد. با ادامه‌ی این وضعیت، واکنش‌های تشیت کربن فتوستتری مختل شده و محصولات حاصل از واکنش‌های چرخه کالوین که شامل ATP و NADPH است، مصرف نمی‌شود. در چنین شرایطی به دلیل عدم اکسید شدن مولکول NADPH، مصرف  $\text{NADP}^+$  جهت دریافت الکترون کاهش می‌یابد، بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به عنوان پذیرنده جانشین الکترون عمل می‌کند و منجر به تشکیل رادیکال سوپراکسید ( $\text{O}_2^-$ ), پر اکسید هیدروژن ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) و رادیکال هیدروکسیل ( $\text{OH}^-$ ) می‌شود (Turkan *et al.*, 2000; Sairam *et al.*, 2005). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ممکن است سبب بروز صدماتی همچون اکسید شدن لیپیدها، تغییر ساختمان پروتئین‌ها و اکسید شدن گروه‌های سولفیدریل (SH-)، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، از بین رفتن رنگدانه‌هایی مانند کلروفیل و سایر ترکیبات رنگیزهای و هم‌چنین حمله مداوم به مولکول‌های آلی مثل DNA و در نتیجه تخریب در رشته‌های DNA شود (Mittler, 2002; Mohanty, 2003; Habibi *et al.*, 2004). ROS‌ها نقش مهمی در سیگنال دهنی سلول در پاسخ گیاهان به تنفس‌های محیطی از جمله خشکی دارند. از این رو ضروری است که گیاهان مکانیسمی داشته باشند که میزان ROS را در قسمت‌های مختلف سلولی کنترل کنند (Moller *et al.*, 2007). گیاهان برای مقابله با تنفس اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم دفاعی با کارایی بالایی شامل راهکارهای آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که رادیکال‌های آزاد را از بین برده یا خنثی می‌کنند (Loggini *et al.*, 1999). سیستم دفاعی آنزیمی شامل SOD، CAT، POD و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و سیستم غیرآنزیمی APX

**نمونه‌گیری و استخراج آنزیم‌ها:** برای استخراج آنزیم‌ها از روش اسفندياری و همکاران (۱۳۸۸) استفاده شد.

برای تهیه بافر استخراج (بافر فسفات ۵۰ میلی‌مolar)، ۰/۶۸ گرم نمک پتاسیم دی هیدروژن فسفات ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) به همراه ۲ گرم PVPP و  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و سپس حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد و محلول شماره یک نام گرفت. محلول شماره دو، با حل کردن ۰/۸۷ گرم نمک پتاسیم مونوهیدروژن فسفات ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) به همراه ۲ گرم PVPP و  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در مرحله بعد، ۳۹ میلی‌لیتر از محلول شماره یک با ۶۱ میلی‌لیتر از محلول شماره دو مخلوط شده و pH آن در ۶/۸-۷/۲ تنظیم گردید.

برگ‌های کلزای فریز شده در -۸۰ درجه سانتی‌گراد، در هاون چینی و با افزودن نیتروژن مایع کاملاً خرد شدند. نیم گرم از پودر برگ آسیاب شده به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد و با افزودن یک میلی‌لیتر از بافر استخراج، ورتکس شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ عصاره رویی به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ عصاره رویی به میکروتیوب‌هایی با همان حجم منتقل شد. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیدیسموتاز و پراکسیداز به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biochrom مدل S22 Libra) اندازه‌گیری شد.

**تعیین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز:** فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز با اندازه‌گیری میزان تغییر فتوشیمیایی نیترو بلو ترازوکلریوم (NBT) تعیین می‌شود (Beauchamp and Fridovich, 1971).

برای تعیین میزان فعالیت آنزیم SOD ابتدا بافرهای شماره یک (بافر فسفات ۵۰ میلی‌مolar، حاوی ۰/۱ میلی‌مolar EDTA، ۱۳ میلی‌مolar متیونین و ۷۵ میکرومolar نیترو بلو ترازوکلریوم (NBT) و با pH برابر ۷) و شماره دو (بافر ریبوفلاؤین ۰/۱۲ میلی‌مolar تهیه شده با بافر فسفات ۵۰ میلی‌مolar) ساخته شدند. نمونه کنترل و بلانک هر یک شامل ۹۷۵ میکرولیتر بافر

وزن ریشه، فیزیولوژیک (میزان کلروفیل) و بیوشیمیایی (اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز) انجام شد.

## مواد و روش‌ها:

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. در این آزمایش از ۲ رقم متحمل SLM046 و حساس Hyola308 کلزا و پنج سطح تیمار خشکی شامل ۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۱۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول (Michel and Kaufmann, 1973) به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۴ تکرار برای صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک و ۲ تکرار برای سنجش آنزیمی استفاده شد. بذرها با محلول ۲ درصد هیپوکلریت سدیم (به مدت ۱۵ دقیقه) ضدغفونی و پس از ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، در اتانول ۷۰ درصد (به مدت ۱ دقیقه) غوطه‌ور شده و درنهایت مجدداً با آب مقطر استریل سه مرتبه شسته شدند. بذرها ضدغفونی شده روی محیط کشت MS جامد حاوی ساکارز ۳ درصد (وزنی به حجمی)، pH برابر ۵/۸ به مدت ۵ روز در فتوپریود ۱۶ ساعت و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از جوانهزنی، جوانه‌ها به محیط MS مایع سوسپانسیون حاوی ساکارز ۳ درصد (وزنی به حجمی)، pH برابر ۵/۸ به مدت دو روز به منظور سازگاری منتقل شده و سپس در محیط MS مایع سوسپانسیون حاوی ساکارز ۳ درصد (وزنی به حجمی)، غلاظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول (۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۱۵ درصد)، pH=8 شناور کشت شده و در شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و در ۵۰ rpm شیکر قرار گرفتند.

ویژگی‌های مربوط به برگ (مساحت، وزن تر و میزان کلروفیل)، ریشه (وزن تر)، ساقه (وزن تر و طول) و همچنین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیدیسموتاز و پراکسیداز در زمانهای ۰، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از نمونه‌گیری، اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری سطح برگ از دستگاه LIGHTBOX مدل A3 و برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل از دستگاه کلروفیل متر SPAD مدل ۵۰۲ استفاده شد.

شده و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

### نتیجه و بحث:

اثر تنفس خشکی بر شاخص سطح برگ: سطح برگ در نمونه های PEG صفر درصد در هر دو رقم با توجه به مراحل PEG رشدی گیاه افزایش طبیعی نشان داد اما با افزایش مقدار PEG و پیشرفت زمان، سطح برگ کاهش معنی‌داری داشت. به طور کلی، سطح برگ در رقم متحمل کمتر از حساس بود که احتمالاً یکی از مهم‌ترین دلایل آن کاهش سطوح تبخیر برای جلوگیری از اثرات مخرب تنفس خشکی است. در رقم حساس با افزایش مقدار PEG، سطح برگ کاهش نشان داد. بیشترین میزان سطح برگ ( $3/167$  سانتیمتر مربع) در محیط حاوی PEG  $\frac{1}{3}$ % در ۶ ساعت پس از تنفس و کمترین مقدار این شاخص ( $5/62$  سانتیمتر مربع) در محیط حاوی PEG  $15\%$  در ۱۲ ساعت پس از شروع تنفس مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۱).

در رقم متحمل بیشترین مقدار شاخص سطح برگ ( $1/446$  سانتیمتر مربع) در محیط حاوی PEG  $6\%$  در ۲۴ ساعت پس از تنفس و کمترین مقدار این شاخص ( $0/387$  سانتیمتر مربع) در محیط حاوی PEG  $12\%$  در ۲۴ ساعت پس از تنفس مشاهده شد (شکل ۲). مطالعات انجام‌شده توسط Nielsen (۱۹۹۶) بر روی کلزا نشان داد با اعمال تنفس در دوره رشد رویشی مقدار شاخص سطح برگ کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج این پژوهش هم می‌توان گفت که با افزایش شدت و زمان تنفس خشکی سطح برگ در هر دو رقم حساس و متحمل کاهش یافته است که البته شروع این روند کاهشی در رقم متحمل در شدت‌های پایین تر تنفس خشکی رخ داده است.

اثر تنفس خشکی بر وزن برگ: طبق نتایج به دست آمده، تغییرات وزن برگ دو رقم مورد مطالعه در مواجهه با تنفس خشکی متفاوت بود (جدول ۱). در رقم متحمل با پیشرفت زمان در هر سطح تنفس وزن برگ افزایش نشان داد ولی به تدریج با افزایش مقدار PEG، وزن برگ به طور کلی کاهش

یک،  $15$  میکرولیتر بافر دو و  $10$  میکرولیتر بافر فسفات (تهیه شده برای استخراج عصاره) بوده و در نمونه تیمار، به جای بافر فسفات از  $10$  میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. نمونه بلانک به مدت  $15$  دقیقه در تاریکی و نمونه‌های کترل و عصاره آنزیمی، به مدت  $15$  دقیقه در شیکر انکوباتور در  $20^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به همراه دو عدد لامپ فلورسنت( $40\text{W}$ ) در دور  $100\text{ rpm}$  شیکر قرار داده شدند. سپس جذب در طول موج  $560$  نانومتر قرائت شد.

یک واحد SOD مقدار آنزیمی است که سبب مهار تبدیل  $50$  درصد NBT به فورمازان شود. تفاوت بین جذب هر عصاره آنزیمی (تیمار) در مدت زمان روشنایی  $15$  دقیقه و جذب بدون عصاره آنزیمی (کترل) و در حضور سوبسترا، در همان مدت زمان روشنایی در واقع نشان‌دهنده بازداشت نواکش خودبخودی و تشکیل فورمازان توسط SOD (Unit/mg) است که با فرمول زیر محاسبه می‌گردد.

$$\text{فعالیت آنزیم SOD} = \frac{(\text{OD Control} - \text{OD Sampel})}{\text{OD Control}} \times 100$$

تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز وابسته به گایاکول: برای تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش Amalok و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد.

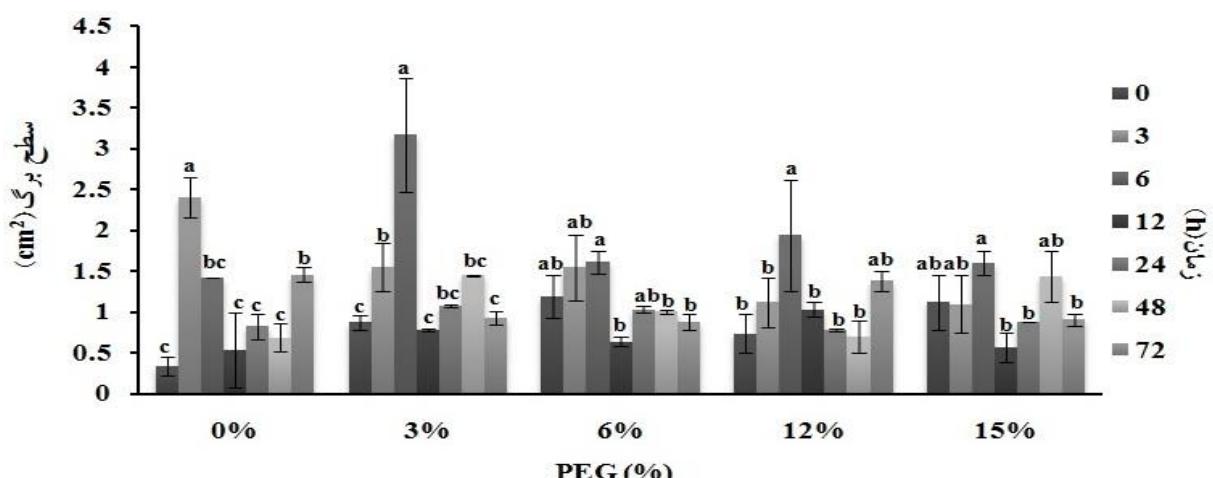
ابتدا بافرهای شماره یک (بافر آب اکسیژنه ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )) میلی مولار تهیه شده با استفاده از بافر فسفات  $50$  میلی مولار و شماره دو (بافر گایاکول  $45$  میلی مولار تهیه شده با استفاده از بافر فسفات  $50$  میلی مولار) ساخته شدند. بافر شماره یک و دو هر کدام به مقدار  $495$  میکرولیتر در دمای پایین (ظرف حاوی یخ) باهم مخلوط شده و با افزودن  $10$  میکرولیتر عصاره آنزیمی، جذب آن در طول موج  $470$  نانومتر قرائت شد. در محلول بلانک به جای عصاره آنزیمی، از  $10$  میکرولیتر بافر فسفات  $50$  میلی مولار ( $\text{pH}=7$ ) استفاده شد. فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی  $26/6 \mu\text{m}^{-1}\text{cm}^{-1}$  با  $26/6 \text{ گایاکول پراکسیداز بر حسب }\mu\text{mol/g FW.min}$  محاسبه شد.

کلیه آزمایشات به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با  $4$  تکرار برای صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک و  $2$  تکرار برای سنجش آنزیمی انجام شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS 9.1 آنالیز

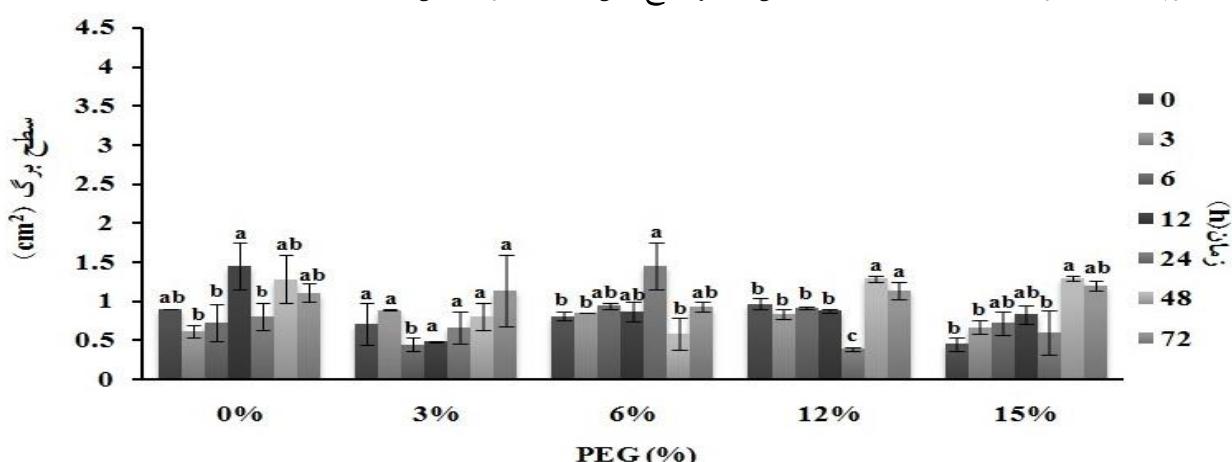
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات برگ (سطح، وزن و کلروفیل) تحت تیمار غلظت‌های مختلف PEG

منابع تغییرات	درجه آزادی	سطح برگ	وزن برگ	کلروفیل برگ	میانگین مربعات
ژنوتیپ	۱	۲/۹۲۴۳۰۴۰ **	۰/۰۱۰۵۹۹۵۷ *	۵۷۶/۴۳۱۰۵۶ **	۳۲/۰۴۸۵۱۷ ns
تیمار	۴	۰/۰۵۰۶۹۳۸۴ ns	۰/۰۱۴۷۰۰۴۸ **	۲۸۷/۸۷۶ **	۰/۱۵۰۷۱۹۶۴ **
زمان	۶	۰/۸۵۶۶۱۰۱۵ **	۰/۰۵۰۷۱۹۶۴ **	۵۰/۶۸۸۴۸۸ ns	۰/۰۰۶۶۸۰۶۸ **
ژنوتیپ*تیمار	۴	۰/۳۴۱۶۶۹۰۴ **	۰/۰۰۶۶۸۰۶۸ **	۹۱/۰۰۲۳۸۶ **	۰/۰۰۲۵۹۴۵۱ ns
ژنوتیپ*زمان	۶	۱/۲۶۵۵۴۲۴۴ **	۱/۰۰۲۵۹۴۵۱ ns	۷۱/۳۲۰۹۳۸ **	۰/۰۰۴۷۹۸۰۵ **
تیمار*زمان	۲۴	۰/۲۰۱۷۵۸۰۴ **	۰/۰۰۴۷۹۸۰۵ **	۴۲/۶۱۲۱۹ *	۰/۰۰۲۳۳۲۶۶ ns
ژنوتیپ*تیمار*زمان	۲۴	۰/۲۸۹۶۱۲۲۵ **	۰/۰۰۲۳۳۲۶۶ ns		

\* و \*\* به ترتیب عدم اختلاف معنی دار و اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد ns



شکل ۱- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی سطح برگ در رقم Hyola308  
حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ )



شکل ۲- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی سطح برگ در رقم SLM046  
حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ )

حاوی PEG ۶٪ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش از سایرین بیشتر بود (شکل ۵).

در رقم متحمل در محیط‌های حاوی PEG ۰٪، ۳٪، ۶٪ و ۱۲٪ میزان کلروفیل پس از ۴۸ ساعت به بیشترین مقدار خود رسید، که از این نظر تفاوت معنی‌داری با PEG ۰٪ نداشت اما گیاهان کشت شده در محیط حاوی PEG ۱۵٪ بیشترین میزان کلروفیل را در ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش نشان دادند (شکل ۶). مطالعات انجام شده توسط Anjum و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش مقدار کل کلروفیل در جو می‌شود. موحدی دهنوری و همکاران (۱۳۸۲) نیز بیان کردند که تنش خشکی موجب افزایش میزان کلروفیل در ارقام گلرنگ پائیزه شده است. بر اساس نتایج این آزمایش علاوه بر اینکه میزان کلی کلروفیل در رقم متحمل بیش از رقم حساس بود بلکه روند افزایش میزان کلروفیل متعاقب تنش خشکی در رقم متحمل نیز به طور معنی‌داری از رقم حساس بیشتر بود.

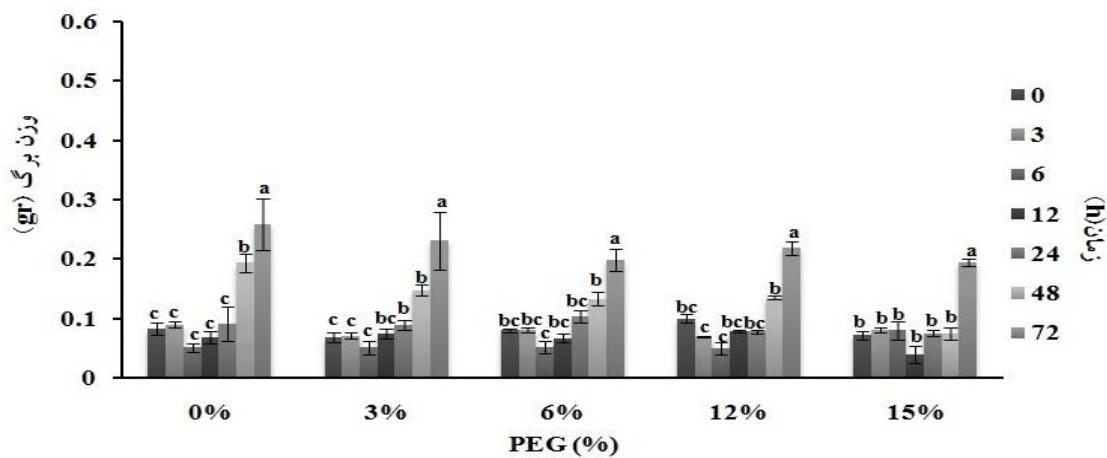
**اثر تنش خشکی بر وزن ریشه:** نتایج به دست آمده نشان داد که تفاوت معنی‌داری در وزن ریشه در شرایط مختلف تنش در دو رقم حساس و مقاوم وجود دارد (جدول ۲). در رقم حساس در محیط حاوی PEG ۳٪ در زمان ۲۴ ساعت پس از تنش وزن ریشه افزایش یافت. در محیط‌های حاوی PEG ۱۲٪ و ۱۵٪ وزن ریشه در زمان‌های ۰، ۳ و ۶ ساعت پس از تنش افزایش معنی‌دار نشان داد اما بعد از آن روند کاهشی مشاهده شد. کمترین مقدار وزن ریشه در این رقم (۰۰۳۱ گرم) در محیط حاوی PEG ۱۵٪ در ساعت ۱۲ پس از تنش و بیشترین مقدار (۰۰۶۲ گرم) در محیط حاوی PEG ۱۲٪ و ۶٪ ساعت پس از تنش مشاهده شد (شکل ۷).

در رقم متحمل در محیط حاوی PEG ۳٪ ابتدا با پیشرفت زمان وزن ریشه کاهش یافت و در زمان ۲۴ ساعت پس از شروع تنش افزایش ناگهانی مشاهده شد ولی در محیط‌های حاوی مقادیر بالای PEG با پیشرفت زمان، وزن ریشه تغییرات اندکی نشان داد. با پیشرفت زمان و افزایش مقدار PEG، وزن ریشه در این رقم کاهش معنی‌دار داشت. بیشترین مقدار این

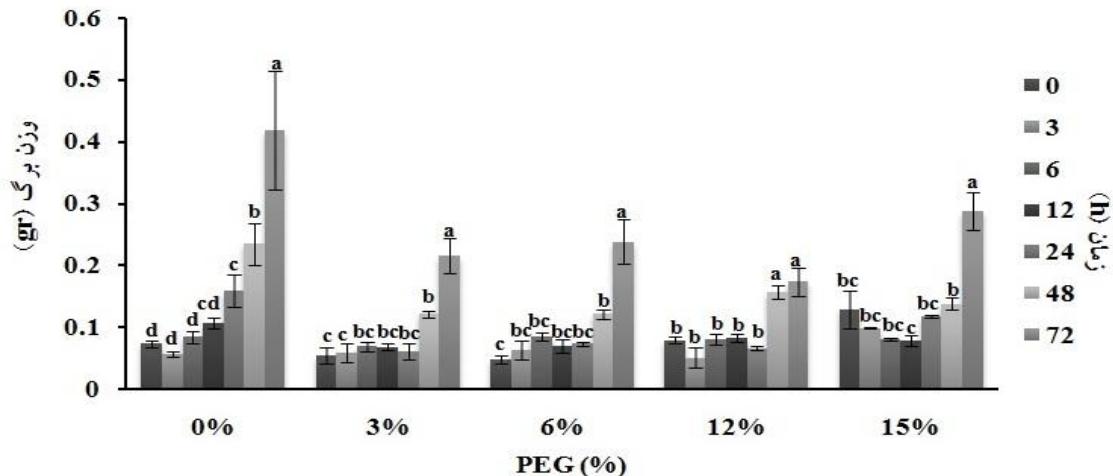
پیدا کرد. در رقم حساس با افزایش مقدار PEG، وزن برگ کاهش پیدا کرد. در کل در محیط‌های حاوی درصدهای مختلف PEG وزن برگ در رقم متحمل نسبت به رقم حساس بیشتر بود. در رقم حساس با اضافه شدن PEG به سوسپانسیون PEG وزن برگ به طور معنی‌داری در مقایسه با محیط فاقد PEG کاهش یافت. بیشترین میزان وزن برگ در محیط حاوی PEG در رقم حساس (۲۳۱ میلی‌گرم) در محیط حاوی PEG ۳٪ و در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش مشاهده شد (شکل ۳).

پس از اعمال تنش، وزن برگ در رقم متحمل همانند رقم حساس نسبت به محیط فاقد PEG کاهش معنی‌داری نشان داد. بیشترین میزان وزن برگ در محیط حاوی PEG در رقم متحمل در محیط حاوی PEG ۱۵٪ و در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش مشاهده شد (شکل ۴). Shikh و همکاران (۲۰۰۵) با انجام آزمایش تنش خشکی در مراحل مختلف رشد روی کلزا مشاهده کردند که اعمال تنش باعث کاهش مقدار پتانسیل آب برگ و وزن خشک قسمت‌های هوایی گیاه کلزا می‌شود. مطالعات انجام شده توسط Rao و Mendham (۱۹۹۵) با اندازه‌گیری پتانسیل اسمزی و فشار آماس در برگ کلزا نشان داد که با کاهش پتانسیل اسمزی، فشار آماس بالا رفته که خود مکانیسمی برای مقاومت گیاه در مقابل خشکی است. بیشترین افزایش وزن برگ در هر دو رقم، در هر سطح تنش پس از گذشت ۷۲ ساعت از شروع تنش مشاهده شد که در این زمان ها میزان کلی وزن برگ در رقم حساس کمتر از رقم متحمل بوده است.

**اثر تنش بر میزان کلروفیل برگ:** تحت تنش خشکی در محتوای کلروفیل برگ در هر دو رقم حساس و متحمل تفاوت‌های معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱). با افزایش میزان PEG مقدار کلروفیل در رقم حساس به میزان بیشتری نسبت به رقم متحمل افزایش داشت (شکل ۵ و ۶). در رقم حساس در محیط‌های حاوی PEG ۰٪ و PEG ۳٪ میزان کلروفیل پس از ۴۸ ساعت به بیشترین مقدار خود رسید. در محیط‌های حاوی PEG ۱۲٪، ۱۵٪ و ۱۲٪ پس از گذشت ۷۲ ساعت میزان کلروفیل به بیشترین مقدار رسید. مقدار کلروفیل در محیط



شکل ۳- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی وزن برگ در رقم Hyola308  
حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ )

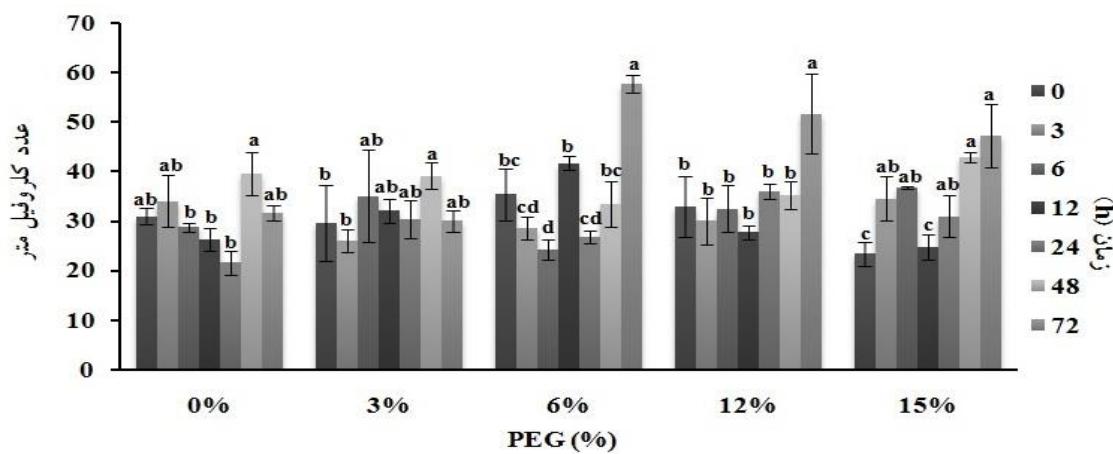


شکل ۴- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی وزن برگ در رقم SLM046  
حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ )

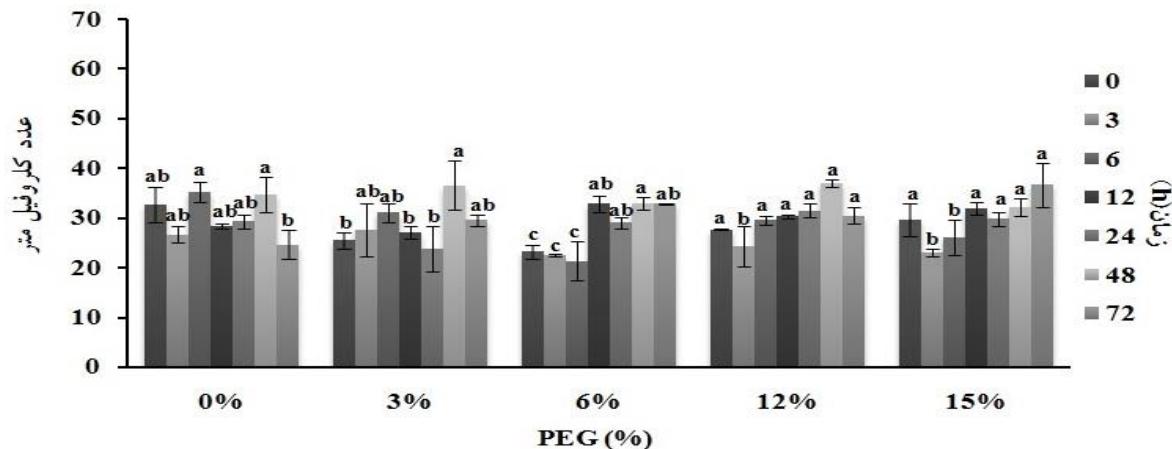
جدول ۲- تجزیه واریانس صفات وزن ریشه، ساقه (طول و وزن)، SOD و POD تحت تیمار غلظت‌های مختلف PEG

میانگین مربعات							
POD	SOD	وزن ساقه	طول ساقه	وزن ریشه	درجه آزادی	منابع تغییرات	
0/00038 **	0/07167 ns	0/01208 *	0/6295 ns	0/00112 **	1	زنوتیپ	
0/00031 **	17/7771 **	0/01970 **	19/7387 **	0/00043 **	4	تیمار	PEG
0/00031 **	12/1662 **	0/03809 **	40/1896 **	0/00074 **	6	زمان	
0/00023 **	17/9033 **	0/00525 ns	2/9097 ns	0/00132 **	4	زنوتیپ*تیمار	PEG
0/00026 **	16/77785 **	0/00229 ns	3/1642 *	0/00064 **	6	زنوتیپ*زمان	
0/00021 **	8/7376 **	0/00537 *	3/6047 **	0/00065 **	24	تیمار	PEG*زمان
0/00023 **	5/2919 **	0/00634 **	1/1168 ns	0/00033 **	24	زنوتیپ*تیمار	PEG*زمان

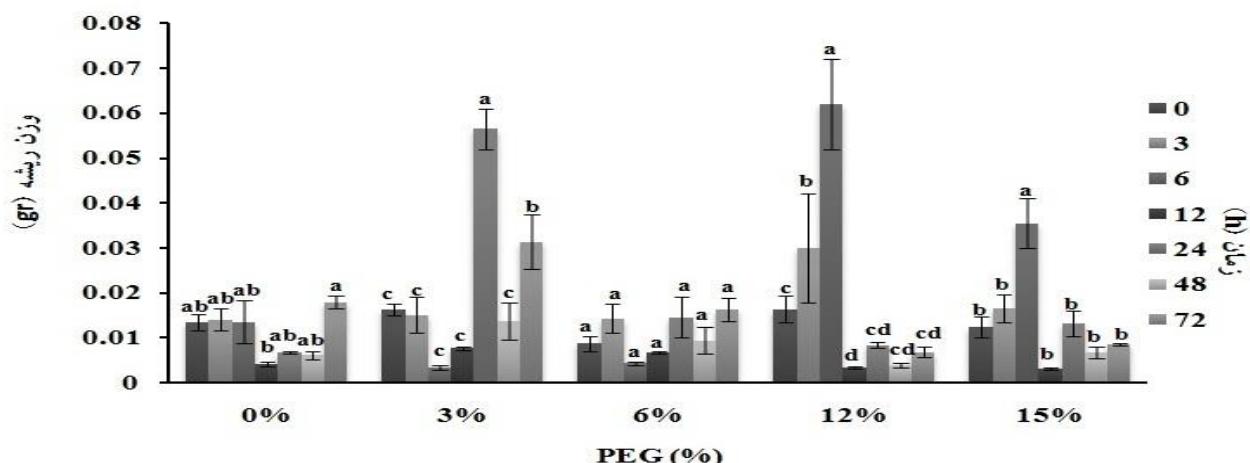
\* و \*\* به ترتیب عدم اختلاف معنی دار و اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد ns



شکل ۵- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی محتوای کلروفیل برگ در رقم Hyola308. حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).



شکل ۶- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی محتوای کلروفیل برگ در رقم SLM046. حروف کوچک روی نمودار بیانگر مقایسه میانگین در سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).



شکل ۷- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی وزن ریشه در رقم Hyola308. حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).

داری سبب کاهش وزن ساقه در هر دو رقم شد. در رقم حساس در محیط‌های حاوی PEG  $0\%$ ،  $3\%$ ،  $6\%$  و  $12\%$ ، ۶ ساعت پس از شروع تنش، با پیشرفت زمان وزن ساقه افزایش نشان داد. بیشترین مقدار وزن ساقه ( $20.53\text{ g}$ ) در رقم حساس در PEG  $3\%$  در ۷۲ ساعت پس از تنش مشاهده شد (جدول ۲ و شکل ۱۱).

در رقم متحمل در محیط‌های حاوی مقادیر مختلف PEG، بعد از زمان ۱۲ ساعت از شروع تنش افزایش در وزن ساقه مشاهده شد. در محیط‌های حاوی PEG  $0\%$ ،  $3\%$  و  $6\%$  بعد از ۷۲ ساعت از شروع تنش وزن ساقه به بیشترین مقدار رسید. در رقم متحمل بیشترین مقدار ( $27.43\text{ g}$ ) در محیط حاوی PEG  $0\%$  در ۷۲ ساعت پس از تنش و کمترین مقدار این شاخص ( $20.59\text{ g}$ ) در محیط حاوی PEG  $6\%$  در ۱۲ ساعت پس از تنش مشاهده شد (شکل ۱۲). به نظر می‌رسد کاهش وزن تر در گیاهان تیمار شده با خشکی به دلیل جلوگیری از توسعه و رشد سلولی ناشی از کاهش فشار تورگر باشد (Rane *et al.*, 2001).

**آنزیم سوپراکسیدیدیسموتاز:** فعالیت آنزیم SOD در دو رقم در پاسخ به تنش خشکی تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۳). بیشترین میزان فعالیت آنزیم SOD در رقم متحمل در PEG  $3\%$  پس از گذشت ۶ ساعت از شروع تنش و کمترین میزان در PEG  $12\%$  در زمان  $48\text{ h}$  پس از شروع تنش مشاهده شد. (شکل ۱۳).

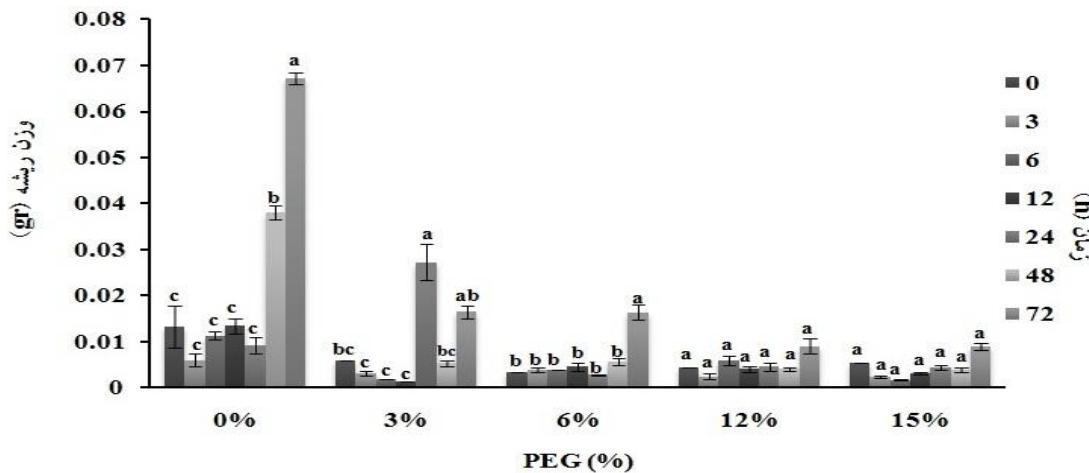
در رقم حساس بیشترین میزان فعالیت آنزیم در PEG  $3\%$  پس از گذشت ۶ ساعت از شروع تنش و کمترین میزان آن در همان مقدار PEG پس از گذشت  $48\text{ h}$  ساعت از شروع تنش بوده است (شکل ۱۴). فعالیت آنزیم SOD در رقم متحمل در PEG  $3\%$  پس از گذشت ۶ ساعت از شروع تنش در مقایسه با فعالیت این آنزیم در رقم حساس در شرایط یکسان به مراتب بیشتر بوده است. در آزمایشی بر روی گندم و Zhang و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند فعالیت SOD در ابتدای تنش خشکی افزایش پیدا کرد اما با طولانی شدن دوره تنش خشکی فعالیت این آنزیم کاهش یافت. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت سوپراکسیدیدیسموتاز در مراحل اولیه تنش خشکی، گیاه را از

شاخص ( $67.17\text{ g}$ ) در محیط حاوی PEG  $0\%$  در زمان ۷۲ ساعت پس از تنش مشاهده شد (شکل ۸). کمبود ملایم آب باعث توسعه ریشه به بخش‌های عمیق‌تر و مرطوب‌تر خاک می‌شود و فرآیند توسعه برگ را به سرعت تحت تأثیر قرار می‌دهد، اما فعالیت فتوستتزری به مقدار کمتری تحت تأثیر قرار می‌گیرد. جلوگیری از توسعه برگ میزان مصرف کرین و انرژی را در اندام هوایی کاهش می‌دهد و سهم بیشتری از مواد پرورده گیاه در ریشه توزیع شده و توانایی جذب آب و مواد معنی‌داری در ریشه افزایش می‌یابد. در نتیجه تنش کم آبی ملایم باعث از بین رفتن ریشه‌های کم عمق و افزایش ریشه‌های عمیق می‌گردد (Banwarie *et al.*, 1994). همچنین در آزمایشات Kriedemann (۱۹۸۰) بر روی گیاه *Aeluropus lagopoides* با افزایش سطح تنش خشکی وزن تر ریشه و ساقه نسبت به گیاهان شاهد کاهش پیدا کرد.

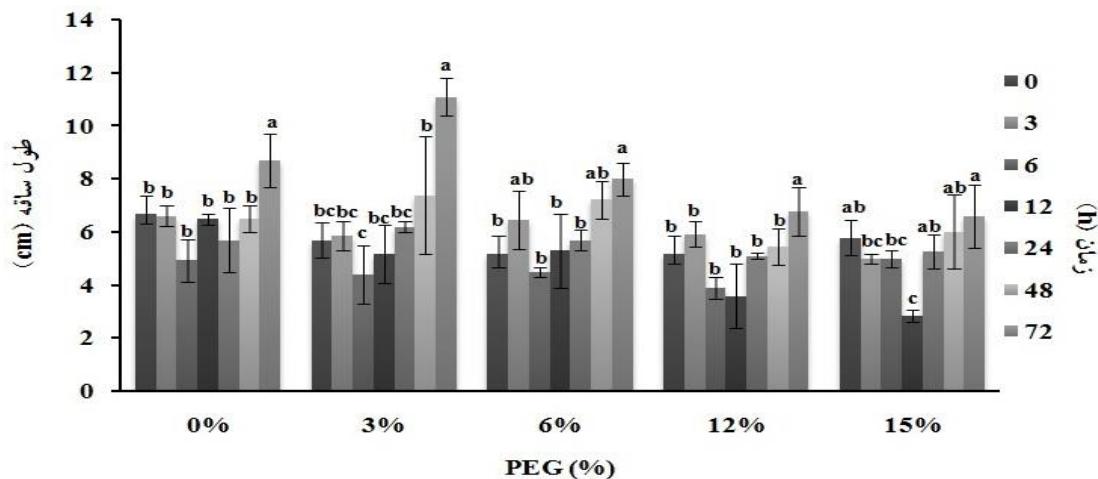
**اثر تنش خشکی بر طول ساقه:** طول ساقه در دو رقم در سوسپانسیون‌های حاوی PEG تفاوت‌های معنی‌داری داشت (جدول ۲). در رقم حساس بیشترین مقدار طول ساقه ( $11.11\text{ cm}$ ) در رقم  $0\%$  پس از شروع تنش و کمترین مقدار ( $3\text{ cm}$ ) در  $15\%$  PEG در زمان  $24\text{ h}$  پس از تنش مشاهده شد (شکل ۹).

در هر دو رقم، در هر سطح تنش پس از گذشت ۷۲ ساعت از شروع تنش طول ساقه به بیشترین مقدار رسید اما به طور کلی با افزایش سطح تنش میانگین کلی طول ساقه کاهش نشان داد. بیشترین مقدار طول ساقه ( $9.625\text{ cm}$ ) در PEG  $0\%$  پس از ۷۲ ساعت و کمترین مقدار ( $3.8\text{ cm}$ ) در  $3/8\text{ cm}$  در  $3/3\text{ cm}$  در زمان  $12\text{ h}$  پس از تنش مشاهده شد (شکل ۱۰). Okca و همکاران (۲۰۰۴) با اعمال سطوح تنش خشکی بر روی سه گونه از گیاه نخود، کاهش در طول اندام هوایی را گزارش کردند. Ahmad و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که در طی تنش خشکی ناشی از به کار بردن پلی‌اتیلن گلایکول  $6000$  بر روی  $6\text{ g}$  گونه هیبرید *Hellanthus australis* با افزایش سطوح خشکی طول اندام هوایی در آن کاهش می‌یابد.

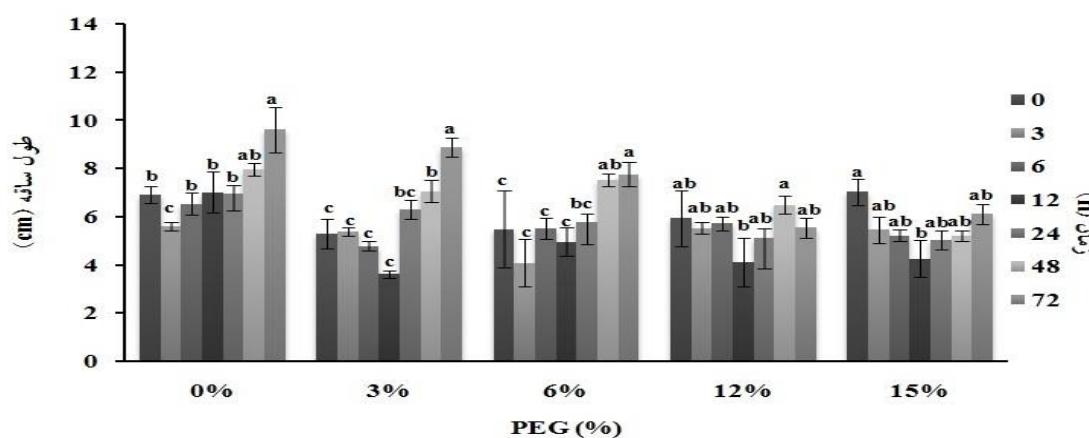
**اثر تنش خشکی بر وزن ساقه:** تنش خشکی به طور معنی



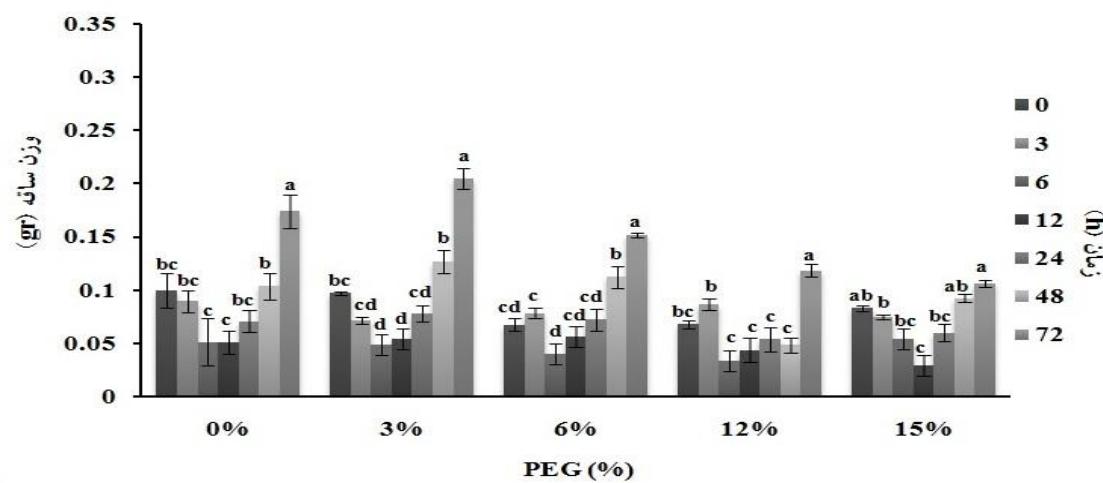
شکل ۸- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی وزن ریشه در رقم SLM046 حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).



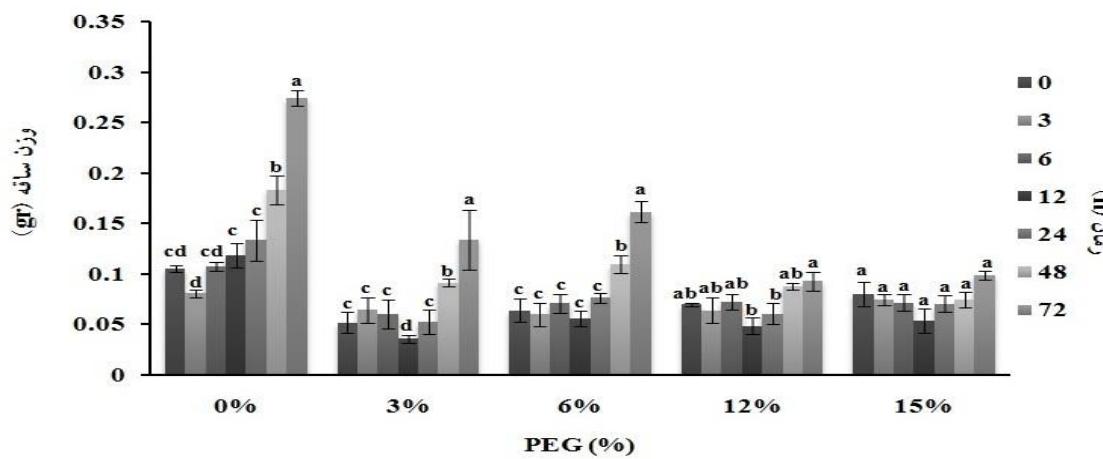
شکل ۹- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی طول ساقه در رقم Hyola308 حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).



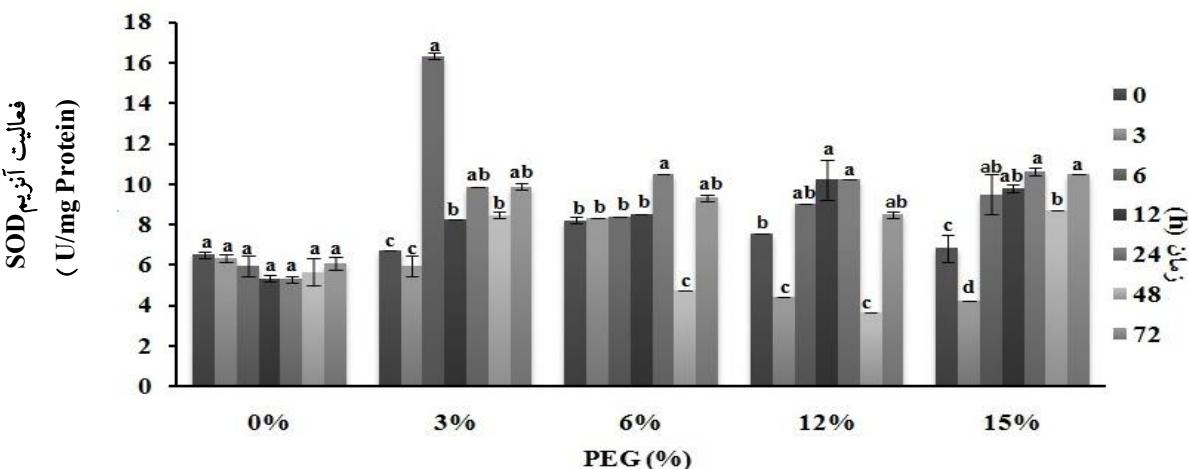
شکل ۱۰- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی طول ساقه در رقم SLM046 حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).



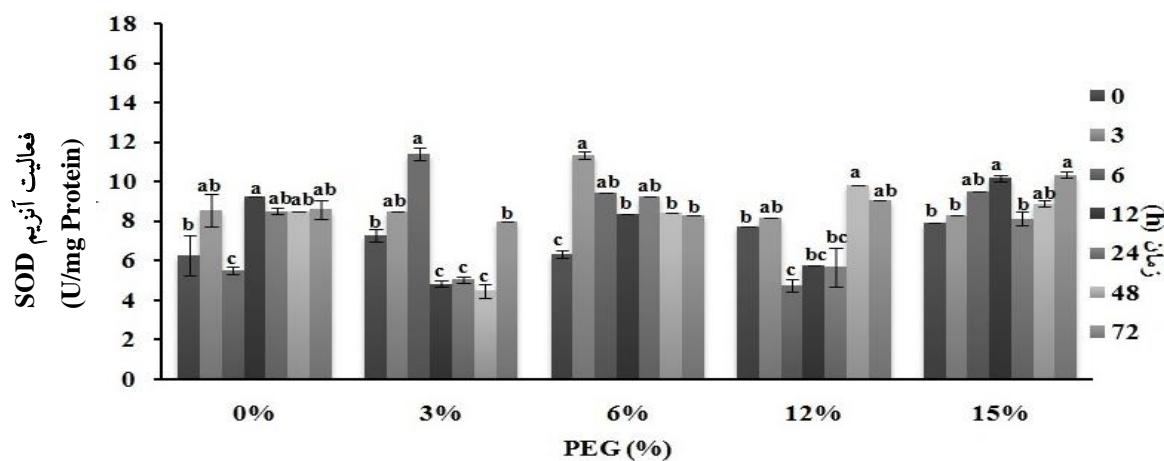
شکل ۱۱- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی وزن ساقه در رقم Hyola308. حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).



شکل ۱۲- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی وزن ساقه در رقم SLM046. حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).



شکل ۱۳- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی میزان فعالیت آنزیم SOD در رقم SLM046. حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).



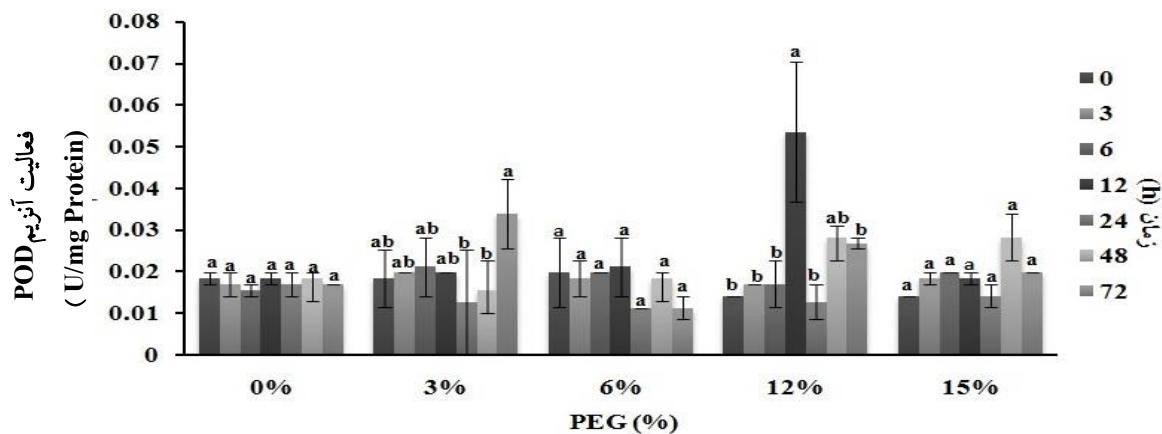
شکل ۱۴- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی میزان فعالیت آنزیم SOD در رقم Hyola308. حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.05$ )

مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت در شرایط تنش ۱۲ در ۱۲ ساعت پس از شروع تنش و کمترین میزان فعالیت آنزیم در شرایط تنش ۶٪، در ۲۴ ساعت پس از شروع تنش دیده شد (شکل ۱۵).

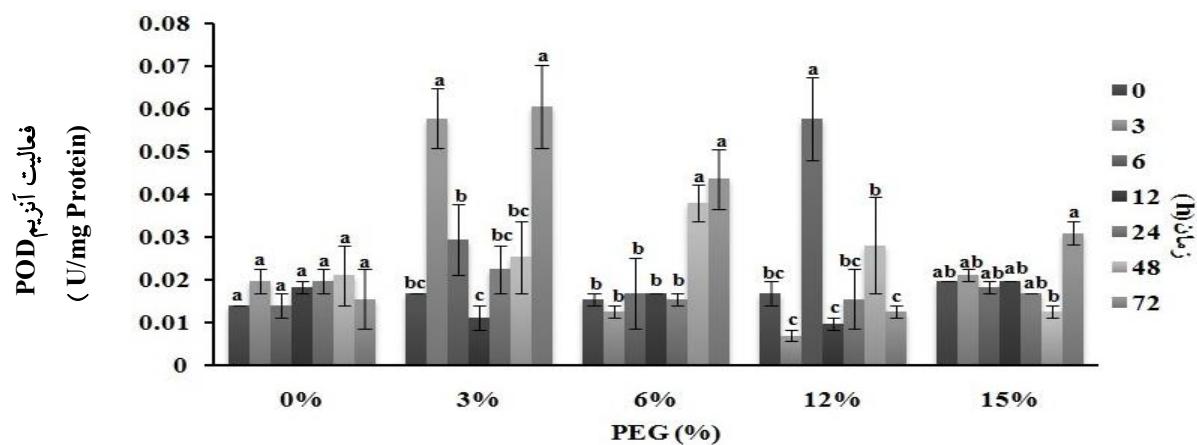
در رقم حساس در محیط حاوی PEG ۳٪ در زمان ۳ و ۷۲ ساعت پس از شروع تنش در شرایط تنش ۶٪ در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از شروع تنش و در شرایط تنش ۱۲٪ در زمان ۶ ساعت پس از آغاز تنش افزایش ناگهانی در فعالیت آنزیم مشاهده شد. در شرایط PEG ۱۵٪ با پیشرفت زمان، فعالیت آنزیم تغییرات اندکی داشت و در زمان ۷۲ ساعت افزایش فعالیت مشاهده شد. بیشترین فعالیت آنزیم در رقم حساس در محیط کشت سوسپانسیون حاوی PEG ۳٪ در زمان ۷۲ ساعت پس از اعمال تنش مشاهده شد (شکل ۱۶). فعالیت آنزیم POD در رقم متحمل در شرایط تنش خشکی شدید PEG ۱۲٪ افزایش یافت درحالی که افزایش فعالیت این آنزیم در رقم حساس در محیط حاوی PEG ۳٪ و ۶٪ نیز مشاهده شد. به نظر می‌رسد آنزیم POD در رقم متحمل در شرایط تنش شدیدتر نقش حفاظتی خود را اعمال می‌کند. Chopra و Selote (۲۰۰۷) گزارش کردند که فعالیت آنزیم POD در ارقام متحمل به خشکی گندم بیشتر از ارقام حساس است. مطالعات انجام شده توسط Merkado و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که فعالیت بیشتر POD همراه با قابلیت نگهداری آب

آسیب اکسایشی حفاظت می‌کند، کاهش یا عدم تغییر فعالیت SOD پس از طولانی شدن تنش خشکی نشان می‌دهد که عمل از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن در رقم مقاوم صرفاً به عهده سوپراکسیدیسموتاز نیست بنابراین با افزایش فعالیت این آنزیم در مراحل اولیه خشکی شدت پاکسازی یون سوپراکسید افزایش یافته و آسیب‌های به وجود آمده از آن در گیاه کاهش می‌یابد. به طور کلی محققان افزایش، کاهش و یا عدم تغییر فعالیت SOD را در گونه‌های مختلف در شرایط Gunes *et al.*, 2009; Tohidi- خشکی گزارش کردند (Moghaddam *et al.*, 2008). از این آزمایش می‌توان دریافت که فعالیت آنزیم SOD در رقم متحمل در محیط فاقد PEG کمتر از فعالیت این آنزیم در رقم حساس در شرایط یکسان بوده است. با توجه به این که آنزیم SOD اولین سد دفاعی در برابر ROS‌ها است، این رخداد می‌تواند نشان‌دهنده تولید ROS بیشتر در رقم حساس به طور طبیعی یا در شرایط محیط کشت سوسپانسیون باشد.

آنزیم پراکسیداز وابسته به گایاکول: هر چند که الگوی پاسخگویی آنزیم پراکسیداز به تنش خشکی در دو رقم مشابه بود اما از نظر میزان و شدت فعالیت این آنزیم در دو رقم تفاوت معنی داری وجود داشت (جدول ۳). در رقم متحمل در محیط‌های حاوی PEG ۳٪، ۱۲٪ و ۱۵٪ به ترتیب در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۱۲ ساعت پس از شروع تنش، افزایش فعالیت آنزیم



شکل ۱۵- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی میزان فعالیت آنزیم POD در رقم SLM046. حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).



شکل ۱۶- تأثیر مقادیر مختلف PEG در زمان‌های مختلف روی میزان فعالیت آنزیم POD در رقم Hyola308. حروف کوچک روی نمودار نشان‌دهنده مقایسه میانگین در هر سطح تنش است (آزمون دانکن و  $P \leq 0.01$ ).

و اثر بر طول سلول‌ها، کاهش ارتفاع رخ داد. کاهش ارتفاع گیاه دلیلی است بر این که تنش خشکی باعث کاهش تقسیمات سلولی شده و رشد گیاه را کاهش داده است. به طور کلی فعالیت آنزیم SOD رقم متحمل در محیط‌های حاوی مقادیر کمتر PEG در تمامی ساعات متناظر از رقم حساس بیشتر بود اما فعالیت آنزیم POD رقم حساس در محیط‌های حاوی مقادیر کمتر PEG در همه ساعات متناظر به طور قابل توجهی بیشتر از رقم مقاوم بود.

بیشتر در برگ‌ها است. همانند آنچه در مورد آنزیم SOD مشاهده شد، در اینجا نیز آنزیم POD در رقم حساس سریعتر از رقم متحمل و در مقادیر پایین تر PEG افزایش فعالیت داشته است. به طور حتم افزایش فعالیت این آنزیم پاسخی از جانب گیاه به افزایش ROS‌ها است. البته این نکته را نیز باید مدنظر قرار داد که مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی متعددی در مقاومت یا حساسیت گیاهان به تنش خشکی دخالت دارند.

### تشکر و قدردانی:

از همکاران و مسئولین دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان که نویسنده‌گان را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

### نتیجه‌گیری کلی:

در این پژوهش میزان سطح و وزن برگ به طور کلی در هر دو رقم حساس و متحمل کاهش یافت. در صورت عدم تأمین آب مورد نیاز به دلیل کاهش فشار توربوزانس سلول‌های در حال رشد

## منابع:

- drought stress generate oxidative stress tolerance in drought-resistant than-susceptible wheat cultivar under field conditions. Environmental and Experimental Botany 60: 276-283.
- Gunes, A., Pilbeam, D. J., Inal, A. and Coban, S. (2008) Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: Growth, antioxidant mechanisms, and lipid peroxidation. Communication in Soil Science and Plant Analysis 39: 1885-1903.
- Habibi, D., Mashdi Akbar Boojar, M., Mahmoudi, A., Ardashri, M. R. and Taleghani, D. (2004) Antioxidative enzyme in sunflower subjected to drought stress. 4<sup>th</sup> International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, 26 September-10 October pp. 1-4.
- Hojati, M., Modarres-Sanavy, A. M., Karimi, M. and Ghanati, F. (2011) Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* L. under water deficit stress. Acta Physiologia Plantarum 33: 105-112.
- Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Muller, H. M., Botella- Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R. and Becker, K. (2001) Substitution of the thioredoxin system for glutation reductase in *Drosophila melanogaster*. Science 291: 643-646.
- Kriedemann, P. E. (1980) Stomatal and photosynthetic limitations to leaf growth. Plant Physiology 13: 15-31.
- Loggini, B., Scartazza, A. and Brugnoli, E. (1999) Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. Plant Physiology 119: 1091-1099.
- Mendham, N. J. and Salisbury, P. A. (1995) Physiology, crop development, growth and yield of Brassica oilseeds. CAB International, pp 11-64.
- Mercado, J. A., Matas, A. J., Heredia, A., Valpuesta, V. and Quesada, M. (2004) Changes in the water binding characteristics of the cell walls from transgenic *Nicotiana tabacum* leaves with enhanced levels of peroxidase activity. Plant Physiology 122: 504-512.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405-415.
- Michel, B. E. and Kaufmann, M. R. (1973) The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. Plant Physiology 51: 914-916.
- Mohanty, N. (2003) Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of flag leaf and the grain yield in two cultivars of *Triticum aestivum* (L.) exposed to warmer growth conditions. Journal of Plant Physiology 160: 71-74.
- Moller, I. M., Jensen, P. E. and Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology 58: 459-481.
- Nielsen, D. C. (1996) Potential of canola as a dry land crop in north eastern Colorado. PP 281-287. In: Janick, J. Progress in New Crops. ASHS Press,
- اسفندیاری، ع. س، محبوب. و ف، شکاری. (۱۳۸۸) اصول فیزیولوژی گیاهی. جلد اول، انتشارات عمیدی، تبریز. ۱۵۴ صفحه.
- کافی، م. و ا، بروزئی. (۱۳۸۸) فیزیولوژی تنفس های محیطی در گیاهان. چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی، دانشگاه مشهد. ۵۰۲ صفحه.
- موحدی دهنی، م. ع ، مدرس ثانوی. و ع، سروش زاده. و م، جلالی. (۱۳۸۳) تغییرات میزان پرولین، قدهای محلول کل ، کلروفیل (SPAD) و فلورسانس کلروفیل در ارقام گلرنگ پائیزه تحت تنفس خشکی و محلول پاشی روی و منگنز. جلد ۹، مجله بیابان، شماره ۱: ۹۳-۱۰۷.
- Ahmad, S., Ahmad, R., Ashraf, M. and Waraich, E. A. (2006) Sunflower (*Helianthus annuus*) response to drought stress at germination and seedling growth stages. Pakistan Journal of Botany 41: 647-654.
- Alischer, R. G., Erturk, N. and Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plant. Journal of Experimental Botany 153: 1331-1341.
- Amalo K, Chen G. X. and Asade K. (1994) Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacal peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase implants. Plant Cell Physiology 35: 497-504.
- Anjum, F., Yaseen, M., Rasool, E., Wahid, A. and Anjum, S. (2003) water stress in barley (*Hordeum vulgar L.*) II. Effect on chemical composition and chlorophyll contents. Pakistan Journal of Agricultural Science 40: 41-49.
- Badawi, G. H., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, N., Kawano, N., Tanaka, K. and Tanaka, Ki. (2003) Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. Plant Science 166: 919-928.
- Banwarie, L., Kaushik, S. K. and Gautam, R. C. (1994) Effect of soil moisture regime, kaolin spray and phosphorus fertilizer on nodulation, P uptake and water use of lentil (*Lens culinaris*). Indian Journal of Agronomy 39: 241-245.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.
- Blokhin, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. (2003) Antioxidant oxidative damage and oxygen deprivation stress. Annual Review of Botany 91: 179-194.
- Chopra, R. K. and Selote, D. S. (2007) Acclimation to

- mechanism of water stress tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 184: 55-61.
- Schwanz, P. and Polle, A. (2001) Differential stress responses of antioxidative systems to drought in concentration. *Journal of Experimental Botany* 52: 133-143.
- Shikh, F., Toorchi, M., Valizadeh, M., Shakiba, M. R. and Islam, B. P. (2005) Drought resistance evaluation in spring rapeseed cultivars. *Agricultural Science* 15: 163-174.
- Tohidi-Moghaddam, H. R., Shirani-Rad, A. R., Noormohammadi, G., Habibi, D. and Boojar, M. M. A. (2009) Effect of super absorbent application on antioxidant enzyme activities in canola (*Brassica napus* L.) cultivars under water stress conditions. *American Journal of Agricultural and Biological Science* 4: 215-223.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought - tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168: 223-231.
- Zhang, J. and Kirkham M. B. (1994) Drought-Induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Physiology* 35: 785-791.
- Alexandria.
- Okcu, G., Kaya, M. D., Atak, M. (2004) Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of Pea (*Pisum sativum* L.) *Agriculture* 29: 237 -242.
- Panda, S. K. and Hussain Khan, M. (2004) Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16: 115-118.
- Rane, J., Maheshwari, M., and Nagarajan, S. (2001) Effect of pre-anthesis water stress on growth, photosynthesis and yield of six wheat cultivars differing in drought tolerance. *Indian Journal of Plant Physiology* 6: 53-60.
- Rao, M. S. S. and Mendham, N. J. (1991) Soil-plant-water relations of oilseed rape (*Brassica napus* and *B. campestris*). *Journal of Agricultural Science* 117: 197-205.
- Reddy, P. C. O., Sairanganayakulu, G., Thippeswamy, M., Reddy, P. S., Reddy, M. K. and Sudhakar, C. (2008) Identification of stress-induced genes from the drought tolerant Semi-arid legume crop horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam) Verdc.) though analysis of subtracted expressed sequence tags. *Plant Science* 175: 372-384.
- Sairam, R. K. and Saxena, D. C. (2000) Oxidative stress and antioxidant in wheat genotypes: possible