Evaluation of resistance to drought stress in seedlings of two lines of Triticale (*Triticosecale* × *Wittmack*) with emphasis on some enzymatic and non-enzymatic antioxidants

Seyedeh Sarah Hoseini, Monireh Cheniany *, Mehrdad Lahouti and Ali Ganjeali

Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

Drought is one of the most important factors that limit plant growth and development. In order to study the effect of drought stress in two lines of Triticale *Sanabad* and *ET83*-20 as the new man-made cereal, a greenhouse experiment was arranged in a three-replicate completely randomized factorial design. Drought stress was applied as limited irrigation by 30% and 60% of field capacity as a drought condition and 90% of field capacity as a control. One week after applying the stress, some growth criterions and biochemical parameters were evaluated for seedlings. Results of statistical analysis showed that drought stress reduced growth parameters (including dry weight of root and shoot, root length and diameter, root and leaf area) and increased the levels of chlorophyll a, b, total chlorophyll and carotenoid in both lines. However, the pigments content of *ET83-20* had a further increase than the other. The results also showed that proline content as non-enzymatic antioxidant and soluble sugars as osmolytes and antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase and guaiacol peroxidase increased under drought stress. However, these increases were more significant in line *Sanabad*. The damage levels of growth criterions and defence mechanisms show that *ET83-20* is less resistance to drought stress than *Sanabad*. So the line *Sanabad* could be introduced as a better alternative to wheat bread.

Keywords: Enzymatic Antioxidant, Non-enzymatic Antioxidant, Triticale, Drought stress

* Corresponding Author: cheniany@um.ac.ir

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هشتم، شماره سی‌ام، زمستان ۱۳۹۵، صفحه ۴۲-۲۷
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۶/۲۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۷/۱۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۹/۰۷

بررسی میزان مقاومت به تنش خشکی گیاهچه‌های دو لاین گیاه تریتیکاله (*Triticosecale* × *Wittmack*) با تأکید بر برخی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی

سیده سارا حسینی، منیره چنیانی *، مهرداد لاهوتی و علی گنجعلی
گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

خشکی، یکی از مهم‌ترین عوامل بازدارندهٔ رشد و نمو گیاهان در محیط است. بنابراین برای بررسی تنش خشکی و ارزیابی سیستم‌های مقاومتی دو لاین *ET83-20* و *Sanabad* گیاه تریتیکاله (*Triticosecale* × *Wittmack*)، غلهٔ جدید ساختهٔ دست بشر، آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار به‌شکل گلدانی در شرایط گلخانه انجام شد. سطوح خشکی آزمایش‌شده شامل ۳۰ و ۶۰ درصد ظرفیت زراعی برای شرایط تنش و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی برای شاهد انتخاب شد. یک هفته پس از اعمال تنش خشکی نمونه‌برداری برای بررسی برخی صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی درمرحلهٔ گیاهچه‌ای انجام شد. نتایج حاصل از بررسی آماری نشان داد که در هر دو لاین گیاه با افزایش سطح تنش خشکی، شاخص‌های رشد کاهش یافت. مقایسهٔ محتوای کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید نشان داد که با افزایش تنش خشکی محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی در هر دو لاین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$)؛ ولی میزان افزایش این رنگدانه‌ها در *ET83-20* بیشتر از *Sanabad* بود. گرچه تنش خشکی در هر دو لاین، محتوای آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی پرولین و کربوهیدرات‌های محلول (از انواع اسمولیت‌ها)، و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز را افزایش داد، این افزایش در *Sanabad* بیشتر از *ET83-20* بود. شدت آسیب‌دیدگی شاخص‌های رشد و نحوهٔ بروز سازوکارهای دفاعی دو لاین نشان می‌دهد که *ET83-20* در برابر تنش خشکی، نسبت به *Sanabad* مقاومت کمتری دارد. ازاین‌رو *Sanabad* جایگزین بهتری برای گندم نان معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان آنزیمی، آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی، تریتیکاله، تنش خشکی

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: cheniany@um.ac.ir، شماره تماس: ۰۵۱۳۸۸۰۵۵۲۲

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

تنش خشکی از جمله تنش‌های فیزیکی است که مهم‌ترین عامل محدودکنندهٔ رشد و تولید محصول در گیاهان زراعی شناخته شده است (Borzooi *et al.*, 2006; Razavizadeh *et al.*, 2014). برمبنای گزارش‌ها خشکی، عامل مهم کنترل‌کنندهٔ عملکرد محصولات، تقریبا بر کلیهٔ فرایندهای رشد گیاه تاثیرگذار است (Siddique *et al.*, 1999). در تنش خشکی و کمبود آب، روزنه‌های گیاه بسته می‌شوند؛ به‌دنبال آن، غلظت CO_2 در بافت مزوفیل برگ کاهش می‌یابد که پیامد آن، مختل‌شدن واکنش‌های تاریکی فتوسنتز و مصرف‌نشدن محصولات حاصل از واکنش‌های روشنایی (ATP و NADPH) است. در چنین وضعیتی به‌علت اکسیدنشدن مولکول NADPH، مصرف $NADP^+$ برای دریافت الکترون کاهش می‌یابد و مولکول اکسیژن (پذیرندهٔ الکترون) بیشتری در مسیر زنجیرهٔ انتقال الکترون عمل می‌کند. به‌این‌ترتیب شکل‌گیری رادیکال‌های سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot-}$) و ... افزایش می‌یابد (Sairam and Saxena, 2000). فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species؛ ROS) ممکن است بروز آسیب‌هایی مانند اکسیدشدن لیپیدهای غشا، اکسیدشدن گروه‌های سولفیدریل (-SH) و تغییر ساختار پروتئین‌ها، غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها، آسیب به سیستم‌های فتوسنتزی و... را سبب شود. کاهش تنش اکسیداتیو و افزایش مقاومت به چنین تنش‌های محیطی اغلب به سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی قوی مربوط می‌شود. این سیستم دفاعی، شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (سوپر اکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات‌پراکسیداز (APX)، گلوتاتیون‌ردوکتاز (GR)، گایاکول‌پراکسیداز (POD) و ...) و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (آسکوربات، توکوفرول، فلاونوئیدها، مانیتول‌ها، پرولین، قندهای محلول، پلی‌فنل‌ها و ...) است (Blokhin *et al.*, 2003). فراوانی سیستم‌های دفاعی شاید به‌علت تولید انواع ROSها در سلول‌ها و بخش‌های مختلف زیرسلولی باشد. ازسوی‌دیگر، این مولکول‌ها در ویژگی‌هایی مانند توانایی انتشار، حلالیت و گرایش به واکنش با مولکول‌های زیستی مختلف، بسیار متنوع هستند. بنابراین وجود مجموعهٔ به‌هم‌پیوسته ازسیستم‌های دفاعی برای عمل در بخش‌های ساختاری و غشایی، و در همهٔ قسمت‌های سلول برای غیرفعال‌کردن رادیکال‌ها ضروری است (Borzooi *et al.*, 2006).

تریتیکاله (*Triticosecale*)، گونه‌ای جدید و هیبرید در غلات، ساخته‌شده به‌دست بشر است. این گیاه در نتیجهٔ تلاقی ژنوم‌های جنس گندم (*Triticum*) (والد ماده) و جنس چاودار (*Secal*) (والد نر) به وجود آمده است. اگر در تلاقی بین گندم و چاودار از گندم تتراپلوئید یا هگزاپلوئید استفاده شود، تریتیکالهٔ حاصل به‌ترتیب هگزاپلوئید (6x=42) یا اکتاپلوئید (8x=56) خواهد بود. تریتیکالهٔ اکتاپلوئید به سبب عقیمی نسبی ناشی از تعداد زیاد کروموزوم، چندان مطلوب نیست و به همین دلیل محققان مطالعات خود را بر تریتیکاله‌های هگزاپلوئید که عملکرد بهتری دارند متمرکز کرده‌اند (Mergom and Maspherson, 2004). این گیاه را موفق‌ترین گیاه غلهٔ ساخت بشر می‌دانند که با هدف کسب محصولی با کیفیت برتر گندم (پتانسیل زیاد تولید محصول و کیفیت مطلوب دانه) و متحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی چاودار تولید شده است (Lelley, 2006; Mergoum and Gomez, 2009; Sairam and

Saxena, 2000). باتوجه‌به اینکه تریتیکاله مقاومت خوبی نسبت به وضعیت نامناسب محیطی نشان می‌دهد، جایگزین خوبی برای غلات (به‌ویژه گندم نان) در وضعیت محیطی نامناسب و کم‌بازده به شمار می‌رود (Erekul and Kohn, 2006; Campuzano *et al.*, 2008). باوجود این، مشخص شده است که بین لاین‌های مختلف این گیاه از نظر تحمل به تنش خشکی تفاوت وجود دارد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی معیارهای مقاومت دو لاین *ET83-20* و *Sanabad* نسبت به تنش خشکی و معرفی لاین مناسب‌تر برای جایگزینی احتمالی با سایر غلات است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر، در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح کاملا تصادفی، با سه تکرار و در شرایط گلخانه انجام شد. به این‌منظور، بذرهای چهار لاین گیاه تریتیکاله با نام‌های *Sanabad*، *Juanilo*، *ET83-20* و *ET84-17* از موسسهٔ تحقیقات جهاد کشاورزی مشهد تهیه شد. پس از بررسی ویژگی‌های جوانه‌زنی بذرها (درصد و سرعت جوانه‌زنی)، دو لاین *Sanabad* و *ET83-20* با بهترین صفات جوانه‌زنی انتخاب شدند. بذرهای سالم، هم‌اندازه و فاقد هرگونه ظاهر معیوب انتخاب شدند و پس از ضدعفونی با محلول سدیم هیپوکلریت ۱۰٪ (v/v) و شستشو با آب مقطر، به‌مدت نصف روز روی کاغذ صافی مرطوب قرار گرفتند. درنهایت بذرها به گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانهٔ ۲۵ سانتی‌متر، محتوی خاک رس و ماسه به نسبت ۳ به ۱ منتقل شدند. هر گلدان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد. در هر گلدان، ۸ بذر در عمق ۱/۵ سانتی‌متری خاک کاشته شدند. گلدان‌ها در سه رژیم رطوبتی شامل ۳۰ و ۶۰٪ ظرفیت زراعی (شرایط تنش) و ۹۰٪ ظرفیت زراعی (شاهد) قرار گرفتند. برای ایجاد ظرفیت‌های زراعی یادشده، در ابتدا سه گلدان انتخاب و به‌طور کامل آبیاری شدند. سپس سطح گلدان‌ها با کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شد و پس از گذشت ۱۲ ساعت، گلدان‌ها در فواصل زمانی معین توزین شدند. با ثابت‌ماندن وزن گلدان‌ها، ظرفیت زراعی ۱۰٪ مشخص شد و سایر سطوح خشکی نیز بر اساس این ظرفیت تعیین شدند. اعمال تنش، یک هفته پس از رشد گیاهچه‌ها و با توزین روزانهٔ گلدان‌ها با روش بالا انجام شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه و با درجه حرارت ۲۶ درجهٔ سانتیگراد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند.

روش بررسی شاخص‌های رشد: نمونه‌برداری گیاهچه‌ها یک هفته پس از اعمال تنش خشکی انجام شد. به‌این‌ترتیب که گلدان‌ها برای بررسی صفات مورفوفیزیولوژیک، تخریب شد و وزن تر بخش هوایی و ریشه (با ترازوی دیجیتال مدل TE313s، Sartorius، آلمان)، مجموع سطح برگ‌ها به ازای هر گیاه و مجموع سطح و قطر ریشه‌ها (با دستگاه اسکنر متصل به کامپیوتر مدل ADC، BioScientific Ltd، انگلستان) بررسی شدند. برای اندازه‌گیری وزن خشک اندام‌ها، بافت نمونه‌ها پس از ۴۸ ساعت قرارگیری در دمای ۷۰ درجهٔ سانتیگراد توزین شدند.

روش سنجش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی: برای ارزیابی محتوای کل رنگدانه‌های فتوسنتزی، ۰/۲ گرم از قطعات برگ گیاهچه‌ها، جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ ساییده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه

سانتریفوژ (مدل Z230، شرکت Berthold Hermle GmbH، آلمان) در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. حجم نهایی نمونه‌ها پس از پایان سانتریفوژ به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب نمونه‌های حاصل، در طول موج‌های ۴۴۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد و درنهایت محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل با روش Mackinney (۱۹۴۱) و محتوای کاروتنوئیدها با روش Arnon (۱۹۵۶) و برمبنای رابطه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه محاسبه شد.

رابطهٔ ۱:

$$Chl_a = [(12.25\ A_{663}) - (2.55\ A_{646})] \times V/W \times 1000$$

کلروفیل a (Chl_a) (واحد میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه= mg/g FW): A_{663} جذب نمونه در طول موج ۶۶۳ نانومتر، A_{646} جذب نمونه در طول موج ۶۴۶ نانومتر، V حجم نمونه، W وزن تر نمونه

رابطهٔ ۲:

$$Chl_b = [(22.31\ A_{646}) - (4.91\ A_{663})] \times V/W \times 1000$$

کلروفیل b (Chl_b) (واحد میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه= mg/g FW): A_{646} جذب نمونه در طول موج ۶۴۶ نانومتر، A_{663} جذب نمونه در طول موج ۶۶۳ نانومتر، V حجم نمونه، W وزن تر نمونه

رابطهٔ ۳:

$$Chl_{a+b} = [(17.76\ A_{646}) + (7.34\ A_{663})] \times V/W \times 1000$$

کلروفیل کل (Chl_{a+b}) (واحد میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه= mg/g FW): A_{646} جذب نمونه در طول موج ۶۴۶ نانومتر، A_{663} جذب نمونه در طول موج ۶۶۳ نانومتر، V حجم نمونه، W وزن تر نمونه

رابطهٔ ۴:

$$Car = [(4.69\ A_{440}) - (0.267\ Chl_{a+b})] \times V/W \times 1000$$

کاروتنوئید (Car) (واحد میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه= mg/g FW): A_{440} جذب نمونه در طول موج ۴۴۰ نانومتر، Chl_{a+b} میزان کلروفیل کل، V حجم نمونه، W وزن تر نمونه

روش تعیین شاخص پایداری غشاء: برای تعیین این شاخص، دو برگ میانی از هر گلدان انتخاب و ۰/۱ گرم از آن در وضعیت غوطه‌ور در آب، به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری (مدل سرولوژی، شرکت Kavoosh Mega، ایران) ۴۰ درجهٔ سانتیگراد و ۰/۱ گرم دیگر از آن به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجهٔ سانتیگراد قرار داده شد و سپس هدایت الکتریکی (EC) نمونه‌ها با دستگاه EC متر (مدل 10-45، شرکت Jenway، انگلستان) اندازه‌گیری و شاخص پایداری غشاء بر مبنای رابطهٔ ۵ محاسبه شد (Azizpour *et al.*, 2010).

رابطهٔ ۵:

$$MSI = ((1-EC_{40})/EC_{100}) \times 100$$

شاخص پایداری غشاء (MSI): EC_{40} هدایت الکتریکی نمونه در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد (واحد دسی‌زیمنس‌برمتر= ds/m)، EC_{100} هدایت الکتریکی نمونه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد (واحد دسی‌زیمنس بر متر = ds/m)

روش ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء: برای ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، از روش Heath و Packer (۱۹۶۹)، براساس تشکیل کمپلکس مالون دی آلدهید (MDA) حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا با تیو باربیتوریک اسید (TBA)، انجام شد. ۰/۲ گرم از بافت تازهٔ برگ با ۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱٪ (w/v) سائیده شد. عصارهٔ حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، ۴ میلی‌لیتر محلول TCA

۲۰٪ (w/v) محتوی ۰/۵٪ (w/v) تیو باربیتوریک اسید اضافه شد. مخلوط حاصل، ابتدا به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (دمای ۹۵ درجهٔ سانتیگراد) و سپس بلافاصله به‌مدت ۵ دقیقه در حمام آب یخ قرار داده شد و در نهایت به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب نوری این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر، با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV/Vis1800، شرکت JASCO، آلمان) خوانده شد. مادهٔ مد نظر برای جذب در این طول موج، کمپلکس قرمز (TBA–MDA) است. جذب سایر رنگدانه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبهٔ غلظت MDA برحسب میکرومول در گرم وزن تر نمونه، از ضریب خاموشی (ε) معادل ۱۵۵ میلی‌مول بر سانتی‌متر و برمبنای رابطهٔ ۶، استفاده شد:

رابطهٔ ۶: $A= \varepsilon bc$

جذب نمونه (A): ε ضریب خاموشی (واحد میلی‌مول بر سانتی‌متر)، b پهنای کووت (معادل ۱ سانتی‌متر)، c غلظت MDA

روش سنجش محتوای پرولین: محتوای پرولین برگ با روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) اندازگیری شد. ۰/۲ گرم از بافت تر برگ در ۴ میلی‌لیتر محلول سولفو سالیسیلیک اسید ۳٪ (w/v) ساییده و همگنای حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. ۲ میلی‌لیتر از روشناور با ۲ میلی گرم معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال مخلوط و به‌مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم (دمای ۱۰۰ درجهٔ سانتیگراد) قرار گرفت. برای قطع انجام کلیهٔ واکنش‌ها، لوله‌های محتوی محلول روشناور بلافاصله در حمام یخ قرار داده شدند و سپس ۴ میلی‌لیتر تولوئن به آن‌ها اضافه و به‌مدت ۳۰ ثانیه به‌شدت هم زده شدند. با ثابت نگه‌داشتن لوله‌ها به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه، ۲ لایهٔ کاملا مجزا تشکیل شد. از لایهٔ رنگی رویی که تولوئن حاوی پرولین بود، برای اندازه‌گیری غلظت پرولین استفاده شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، جذب مقدار معینی از این مادهٔ رنگی در طول موج ۵۲۰ نانومتر، با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV/Vis1800، شرکت JASCO، آلمان) تعیین شد و مقدار پرولین در هر نمونه برمبنای منحنی استاندارد پرولین (صفر تا ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) و معادلهٔ خط y=0.0177x+0.003، برحسب میکرومول در گرم وزن تر نمونهٔ گیاهی و براساس رابطهٔ ۷ محاسبه شد:

رابطهٔ ۷:

$$\text{میکرومول پرولین در گرم وزن تر نمونه} = \left[\frac{\mu g \text{prolin}}{ml} \times \frac{ml\ \text{Toloen}}{115/5\ (\mu g/\mu mol)}\right] \div \frac{gr\ sample}{5}$$

روش ارزیابی محتوای کربوهیدرات‌های محلول

محلول: برای سنجش کربوهیدرات‌های محلول از روش Dubious و همکاران (۱۹۵۶) استفاده شد. ۰/۰۲ گرم نمونهٔ خشک برگ در ۳ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ (v/v) کاملا سائیده، سپس همگنای حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و از محلول روشناور برای سنجش قندهای محلول استفاده شد. بدین‌منظور، به ۱ میلی‌لیتر از عصارهٔ حاوی کربوهیدرات‌های محلول،۱ میلی‌لیتر محلول ۵٪ فنل (w/v) افزوده و به‌خوبی هم زده شد. در مرحلهٔ نهایی، ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ به هر نمونه اضافه و به‌شدت مخلوط شد. نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. در نهایت مقادیر جذب آن‌ها در طول موج ۴۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV/Vis1800، شرکت JASCO،

آلمان) خوانده شد. با داشتن غلظت‌های معلوم گلوکز (صفر تا ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، رسم منحنی استاندارد و معادلهٔ خط y=0.0111x-0.0576، مقدار کربوهیدرات‌های محلول بر حسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بافت خشک نمونه محاسبه شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: برای سنجش فعالیت این آنزیم از روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) استفاده شد. فعالیت این آنزیم با قابلیت آن در بازدارندگی واکنش احیای فتوشیمیایی نیترو بلو تترازولیوم (NBT) تعیین شد. به این منظور، ابتدا محلول بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵ تهیه شد. سپس برای تهیهٔ مخلوط واکنش، به ترتیب ترکیبات نیترو بلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۴ میکرومولار و اتیلن دی‌آمید تترا استیک‌اسید (EDTA) ۰/۱ میل‌مولار، به بافر فسفات پتاسیم افزوده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونهٔ عصارهٔ آنزیمی، به ۳ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش افزوده و با قرار دادن آن‌ها در روشنایی لامپ فلورسنت ۴۰ وات با تابش ۷۵ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه، بلافاصله واکنش آغاز شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، تابش نور قطع و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV/Vis1800، شرکت JASCO، آلمان) خوانده شد. برای نمونهٔ شاهد ۳ میلی‌لیتر از محلول یادشده که فاقد عصارهٔ آنزیمی بود استفاده شد. برای سنجش فعالیت این آنزیم علاوه بر شاهد، نیاز به شاهد روشنایی شامل ۳ میلی‌لیتر از محلول واکنش (فاقد عصارهٔ آنزیمی) قرار گرفته در مقابل نور فلورسنت نیز بود تا میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه‌ها در مقایسه با شاهد روشنایی سنجیده شود. اختلاف جذب نمونه‌ها و شاهد روشنایی در طول موج ۵۶۰ نانومتر، نشان‌دهندهٔ مهار احیای نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه است. به بیان دقیق‌تر، یک واحد آنزیمی SOD، مقدار آنزیمی است که ۵۰٪ ممانعت را از احیای NBT موجب می‌شود. با داشتن این اختلاف جذب بین نمونه‌ها و شاهد روشنایی در طول موج ۵۶۰ نانومتر، واحد آنزیمی نمونه‌ها محاسبه و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: برای سنجش فعالیت این آنزیم براساس روش Putter (۱۹۷۴)، ۳ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷ با ۰/۰۳ میلی‌لیتر محلول پراکسید هیدروژن و ۰/۱ میلی‌لیتر عصارهٔ آنزیمی در کووت ریخته و مخلوط شد. سپس جذب آن در طول موج ۴۳۶ نانومتر خوانده و برای افزایش جذب تا ۰/۰۵ مکث شد. در این موقع، زمان آزمایش یادداشت شد تا جذب به ۰/۱ افزایش یابد و بتوان Δt را ارزیابی کرد. فعالیت آنزیمی در هر لیتر عصاره بر اساس رابطهٔ ۸ محاسبه شد.

رابطهٔ ۸: $u/lit=500/\Delta t$

(u): واحد فعالیت آنزیمی

Δt: مدت زمان آزمایش

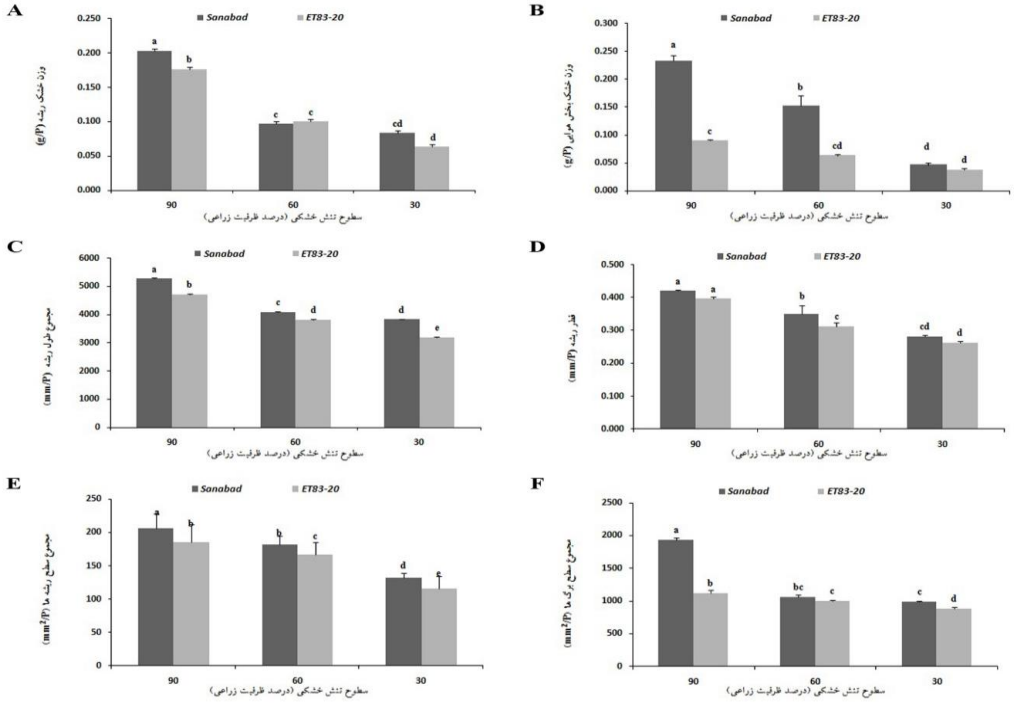
تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۰ انجام و برای مقایسهٔ میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ (P≤۰/۰۵) استفاده شد و نمودارهای مربوطه با نرم‌افزار Microsoft EXCEL (Office 2007) رسم شدند.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که تنش خشکی در هر دو لاین، تاثیر معنی‌داری بر بیشتر

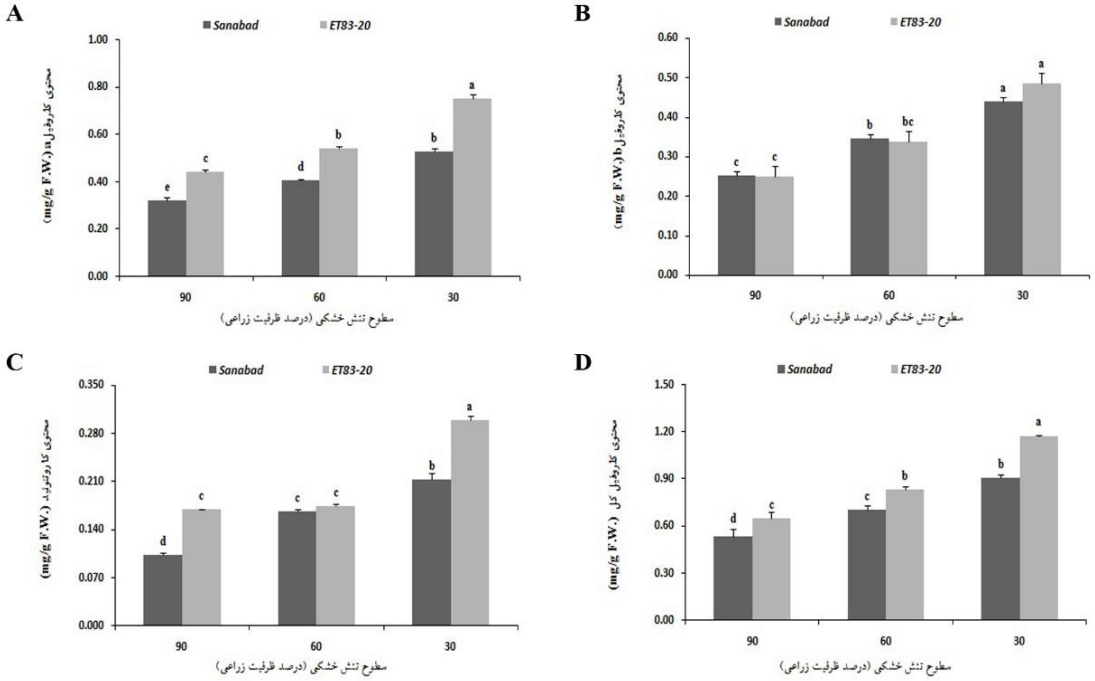
شاخص‌های رشد گیاهچه‌ها داشت (P<۰/۰۵). بررسی‌ها نشان داد که با افزایش سطح تنش، وزن خشک ریشه و بخش هوایی کاهش یافت و میزان این کاهش در لاین *ET83-20* بیشتر از *Sanabad* بود (شکل ۱– A و B). با افزایش سطح خشکی، سایر صفات مورفولوژیک گیاهچه‌ها از جمله مجموع سطح ریشه‌ها، قطر ریشه‌ها، میانگین طول ریشه‌ها و مجموع سطح برگ‌ها نیز کاهش یافت (شکل ۱– C، D، E و F). این روند کاهش معنی‌دار، در لاین *ET83-20*، درخورتوجه‌تر از *Sanabad* بود. ارزیابی‌ها نشان داد که لاین *Sanabad* در وضعیت فراهمی رطوبت، دارای سطح بیشتر این صفات و لاین *ET83-20* در وضعیت تنش ۳۰٪، کمترین حد صفات بیان‌شده را داشتند (شکل ۱).

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که تاثیر تنش خشکی بر کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). برمبنای مقایسهٔ میانگین‌ها، با افزایش سطح خشکی میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در هر دو لاین افزایش یافت (شکل ۲). افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیل a، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در لاین *ET83-20* نسبت به *Sanabad* شاخص بود. نکتهٔ شایان توجه، شیب بیشتر تغییرات مربوط به محتوای کارتنوئیدها در لاین *ET83-20* نسبت به *Sanabad* بود (شکل ۲– A، C و D).



شکل ۱– تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر A) وزن خشک ریشه؛ B) وزن خشک بخش هوایی؛ C) مجموع طول ریشه؛ D) قطر ریشه؛ E) مجموع سطح ریشه؛ F) مجموع سطح برگ. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± StD است. حروف مشترک بیانگر نبود تفاوت معنی‌دار برمبنای آزمون دانکن در سطح P<۰/۰۵ است. ۹۰٪ ظرفیت زراعی = شاهد.

تحلیل مقایسه‌ای داده‌ها نشان داد که تنش خشکی، لاین و برهم‌کنش این دو عامل، بر محتوای پرولین، کربوهیدرات محلول، مالون دی‌آلدهید، شاخص پایداری غشاء و میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و POD معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). بررسی محتوای پرولین در دو لاین نشان داد که با افزایش شدت تنش، در هر دو لاین، به‌طورپیوسته بر میزان پرولین برگ افزوده شد. در همهٔ سطوح بررسی‌شده، مقدار افزایش پرولین در لاین *Sanabad* بیشتر از *ET83-20* بوده است؛ به‌طوری‌که بیشترین محتوای پرولین گزارش شده، متعلق به لاین *Sanabad* در سطح خشکی ۳۰٪ بود (شکل ۳-A).

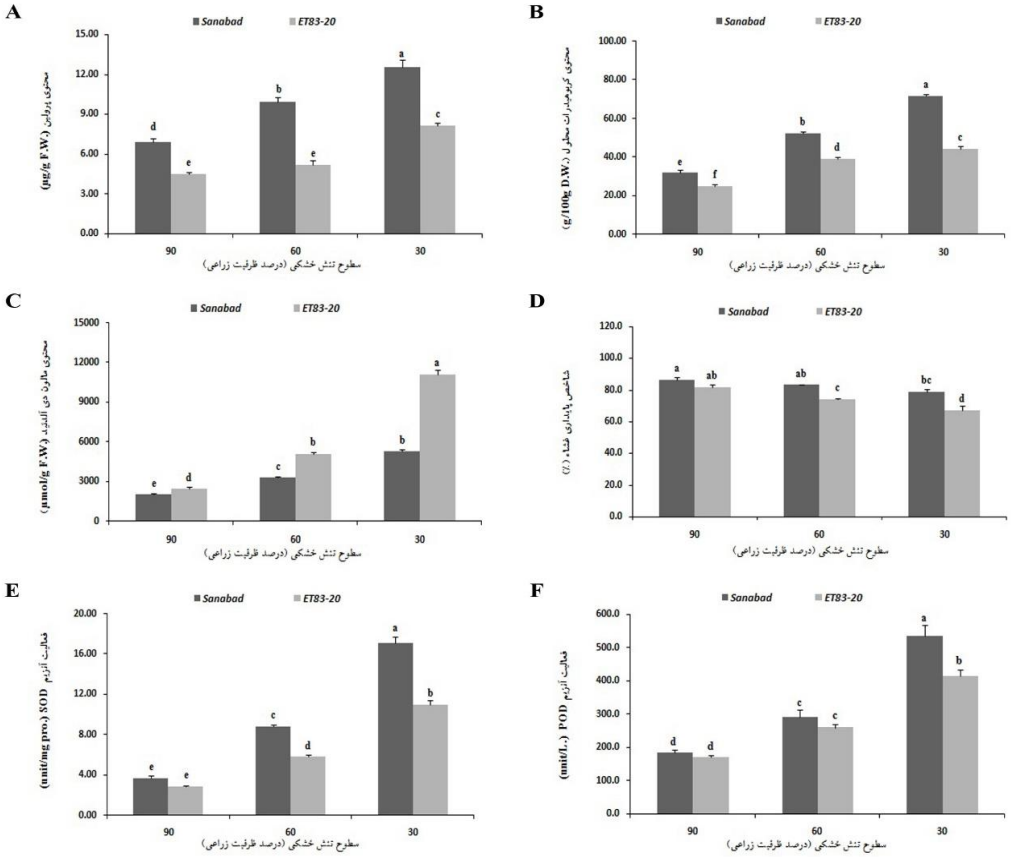


شکل ۲- تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر A) محتوای کلروفیلa؛ B) محتوای کلروفیلb؛ C) محتوای کاروتنوئید؛ D) محتوای کلروفیل کل. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± StD است. حروف مشترک بیانگر نبود تفاوت معنی‌دار برمبنای آزمون دانکن در سطح $P<۰/۰۵$ است. ۹۰٪ ظرفیت زراعی = شاهد.

بررسی‌ها معین کرد که تنش خشکی، بر محتوای کربوهیدرات‌های محلول نیز به‌شدت تاثیر گذاشت و افزایش معنی‌دار قندهای محلول در هر دو لاین را باعث شد؛ اما میزان این افزایش در لاین *Sanabad* بیشتر از لاین دیگر در همهٔ دوره‌های بررسی‌شده بود؛ به‌طوری‌که افزایش درخورتوجهی در مقدار کربوهیدرات اندازه‌گیری شدهٔ لاین *Sanabad* در سطح تنش ۳۰٪ ثبت شد (شکل ۳- B). بررسی نتایج در بخش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء نشان داد که روند تنشی، میزان تغییرات لیپیدهای غشا را افزایش داد؛ به‌طوری که این آسیب در لاین *ET83-20* و به‌طور عمده در سطح تنش ۳۰٪ شایان توجه بود (شکل ۳- C). بررسی شاخص پایداری غشاء نیز نشان داد که گرچه در هر دو لاین *Sanabad* و *ET83-20*، ثبات غشای

سلول‌ها در نتیجهٔ اعمال تنش خشکی کاهش یافت، آثار تخریبی آن بر غشای سلول‌های لاین *ET83-20* بیشتر بود (شکل ۳- D).

با مقایسهٔ میانگین نتایج در هر دو لاین مشخص شد تنش خشکی افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و POD را باعث شد؛ ولی میزان این افزایش در لاین *Sanabad* بیشتر از *ET83-20* بود. بیشترین میزان فعالیت SOD وPOD، متعلق به لاین *Sanabad* در سطح ظرفیت زراعی ۳۰٪ و با تفاوت معنی‌دار نسبت به لاین *ET83-20* بود (شکل ۳- E و F). فعالیت آنزیم SOD در سطح تنش ۳۰٪ در مقایسه با نمونه‌های شاهد، افزایش ۴/۷ برابری در لاین *Sanabad* و افزایش ۳/۸ برابری در لاین *ET83-20* نشان داد. همچنین فعالیت آنزیم POD در سطح تنش ۳۰٪، افزایش ۳ برابری را در لاین *Sanabad* و افزایش ۲/۵ برابری را در لاین *ET83-20* در مقایسه با نمونه‌های شاهد نشان داد.



شکل ۳- تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر A) محتوای پرولین؛ B) محتوای کربوهیدارت محلول؛ C) محتوای مالون دی آلدهید؛ D) شاخص پایداری غشاء؛ E) فعالیت آنزیم SOD؛ F) فعالیت آنزیم POD. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± StD است. حروف مشترک بیانگر نبود تفاوت معنی‌دار برمبنای آزمون دانکن در سطح P<۰/۰۵ است. ۹۰٪ ظرفیت زراعی = شاهد.

بحث

نتایج حاصل از اندازه‌گیری صفات رشد در مرحلهٔ گیاهچه‌ای دورهٔ رویشی نشان داد که تنش خشکی، کاهش معنی‌دار وزن خشک ریشه و بخش هوایی، مجموع سطح برگ‌ها، مجموع سطح، طول و قطر ریشه‌ها را در دو لاین گیاه تریتیکاله باعث می‌شود؛ ولی

میزان کاهش نهایی این تغییرات در لاین *ET83-20* بیشتر از *Sanabad* بود. Khazai و همکاران (۲۰۱۰) طبق آزمایشی که روی ژنوتیپ‌هایی از گیاه تریتیکاله انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که وزن خشک بخش هوایی، ریشه و سنبلهٔ گیاهان با اعمال محدودیت رطوبتی کاهش می‌یابد (Khazai *et al.*, 2010). مشخص شده است که پاسخ‌های فنولوژی ژنوتیپ‌های متفاوت تریتیکاله در برابر محدودیت‌های رطوبتی، متفاوت است (Campuzano *et al.*, 2008). با توجه به اینکه کاهش مدت این دوره، فتوسنتز را کاهش می‌دهد، نتیجه‌گیری می‌شود که در تحقیق حاضر، کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه در تنش خشکی ممکن است ناشی از کاهش فتوسنتز باشد. سایر محققان نیز این موضوع را تایید کرده‌اند (Grzesiak *et al.*, 2007; McMaster and Wilhelm, 2003; Ivandic *et al.*, 2000).

بررسی‌های انجام‌شده دربارهٔ رنگدانه‌های فتوسنتزی نشان داد که تنش خشکی، محتوای کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کاروتنوئید را در هر دو لاین افزایش داد؛ اما میزان این افزایش در لاین *ET83-20* بیشتر از لاین *Sanabad* بود. افزایش بیشتر محتوای رنگدانه‌ها در لاین *ET83-20* ممکن است به‌علت کاهش بیشتر سطح برگ، ایجاد شده باشد که خود سازوکاری برای اجتناب از خشکی است. در گزارش‌های به‌دست‌آمده از برخی محققان، تغییرات فیزیولوژیک سریع مانند لوله‌ای‌شدن برگ، کاهش سطح برگ و افزایش مقاومت روزنه‌ای جزء سازوکارهای اجتناب از تنش خشکی و شوری معرفی شده‌اند (Machado and Paulsen, 2001). طبق پژوهش انجام‌شده بر ارقام مختلف گندم در تنش خشکی، مشخص شد که نسبت کلروفیل a به b در وضعیت تنش، ۵٪ افزایش یافته است (Siosemardeh *et al.*, 2004). گرچه تحقیقات متعددی برکاهش میزان کلروفیل هنگام تنش خشکی دلالت دارد، بسیاری از تحقیقات دیگر بیانگر افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در وضعیت تنش است (Movahedi Dehnavi *et al.*, 2004؛ Rahbarian *et al.*, 2011؛ Matloubi, 2014). در برخی تحقیقات نیز افزایش محتوای کاروتنوئیدها، محافظان کلروفیل‌ها از فرایند تجزیه‌شدن، در هنگام تنش گزارش شده است (Sedghi *et al.*, 2012؛ Dias *et al.*, 2014).

افزایش چشمگیر محتوای پرولین در هر دو لاین تریتیکاله در تنش خشکی نشان‌دهندهٔ اهمیت این ترکیب در تنظیم فشار اسمزی در گیاه است. میزان افزایش این ماده در لاین *Sanabad* بسیار بیشتر از لاین *ET83-20* بوده است که این امر ممکن است یکی از دلایل مقاومت بیشتر این لاین به تنش خشکی باشد. اثبات شده است که تنش خشکی در گیاهان، نسخه‌برداری *mRNA* ژن‌های کدکنندهٔ آنزیم‌های مسیر بیوسنتز پرولین (دلتا پرولین ۵-کربوکسیلات سنتاز *P5CS* و دلتا پرولین ۵-کربوکسیلات ردوکتاز *P5CR*) و در نهایت محتوای پرولین را افزایش می‌دهد تا سازوکار دفاعی در برابر تنش اعمال شده باشد (Verslues *et al.*, 1998).

ارزیابی قندهای محلول دو لاین، روند افزایشی و معنی‌دار محتوای این ترکیبات را با افزایش تنش خشکی نشان داد. ثابت شده است که تجمع قندهای محلول در هنگام تنش خشکی به پایداری غشاء کمک می‌کند، پروتئین‌ها و آنزیم‌های عمل‌کننده را حفاظت می‌کند و آن‌ها را همچنان فعال نگه می‌دارد

(Arabzadeh, 2012؛ Lipiec *et al.*, 2013؛ Sinay and Karuwal, 2014). از سوی دیگر، یک راه ممکن برای تنظیم اسمزی گیاهان، تبدیل پلی‌ساکاریدهای نامحلول مانند نشاسته و فروکتان به قندهای محلول مانند الیگوساکاریدها، ساکارز و گلوکز است (Hendry, 1993). قندهای محلول که محافظت‌کننده‌های اسمزی هستند، در تنظیم اسمزی سلول نقش دارند و در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابند. از این رو تعیین میزان قندهای محلول در کنار ارزیابی سایر صفات بیوشیمیایی یکی از روش‌های مفید در انتخاب گونه‌های مقاوم و حساس به تنش خشکی و شوری است (Pagter *et al.*, 2005؛ Amirjani and Mahdiyeh, 2013).

در سایر گزارش‌ها آمده است که بین شدت تحمل به تنش خشکی و افزایش تجمع قندهای محلول در گونه‌های مختلف گیاهی ارتباط مستقیم وجود دارد و ژنوتیپ‌ها و ارقام با تحمل بیشتر، تجمع بیشتری از قندهای محلول دارند (Amirjani and Mahdiyeh, 2013؛ Salehi Shanjani *et al.*, 2014؛ Sinay and Karuwal, 2014). افزایش بیشتر قندهای محلول لاین *Sanabad* در پاسخ به تنش خشکی نسبت به *ET83-20* ممکن است یکی از دلایل سیستم مقاومتی کارآمدتر این لاین به تنش خشکی باشد.

تخریب غشای سلولی، یکی از پیامدهای مستقیم کمبود آب است و به‌این‌ترتیب، بین پایداری غشاء، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و شدت تنش خشکی ارتباط مستقیم وجود دارد (Sofo *et al.*, 2004). افزایش محتوای مالون دی‌آلدهید در برگ تریتیکاله در تنش خشکی نشان می‌دهد که سازوکار ترمیم سلولی با سازوکارهای تخریب حاصل از کمبود آب، همگام نبوده است و در نتیجه افزایش کنترل نشدهٔ ROSها در حین تنش خشکی، پراکسیداسیون انواع فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی و گلیکولیپیدهای تیلاکوئید کلروپلاستی و به دنبال آن تولید دی‌آسیل‌گلیسرول و تری‌آسیل‌گلیسرول و در نهایت اسیدهای چرب اتفاق می‌افتد که حاصل آن افزایش محتوای MDA در بافت گیاهی است (Smirnoff *et al.*, 1993؛ Ragab Mouss and Adbel-Aziz, 2008؛ Mohammadi *et al.*, 2011). در تحقیق حاضر، محتوای MDA لاین *ET83-20* بیشتر از لاین *Sanabad* به ثبت رسید؛ درحالی‌که لاین *ET83-20*، پایداری غشایی کمتری دارد. این نتایج نشان می‌دهد که لاین *Sanabad* می‌تواند در برابر پراکسیداسیون انواع لیپیدهای ساختاری ناشی از تجمع بیش از اندازهٔ انواع ROSها، مقاومت بیشتری از خود نشان دهد و ثبات سلول‌های خود را بهتر حفظ کند.

سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در همهٔ مراحل رشد گیاهان، فعال است (Hoshani *et al.*, 2012). در پژوهش حاضر، ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مشخص کرد که تنش خشکی، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول‌پراکسیداز را در هر دو لاین بررسی‌شده افزایش داد؛ اما میزان این افزایش در لاین *Sanabad* بیشتر از لاین *ET83-20* بود. Borzooi و همکاران (2006) گزارش کردند که تنش خشکی، افزایش SOD را در ارقام مختلف گندم موجب می‌شود و ارقام مقاوم به خشکی نسبت به ارقام حساس فعالیت بیشتر آنزیم SOD را دارند. افزایش فعالیت SOD در تنش خشکی در بسیاری از گونه‌های گیاهی مثل گندم (Bakalova *et al.*, 2004)، ذرت (Ragab Moussa

Populus cathayana، (and Adbel-Aziz, 2008) و... نیز گزارش شده است. بین روش‌های مختلف پیشرفته برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی در گونه‌های مختلف گیاهی، اندازه‌گیری و بررسی میزان فعالیت SOD، بسیار کارآمد تشخیص داده شده است (Amirjani and Mahdiyeh, 2013؛ Shinde and Laware, 2015). در واقع SOD، آنتی‌اکسیدانی قوی و جاروب‌کنندهٔ اصلی $O_2^{\cdot-}$ است که نخستین مادهٔ تولید شده از احیای یک ظرفیتی اکسیژن یعنی رادیکال سوپراکسید را از بین می‌برد. بنابراین نخستین خط دفاعی در برابر ROSها به شمار می‌رود (Abedi *et al.*, 2010؛ Borzooi *et al.*, 2006؛ Momeni *et al.*, 2012؛ Mohammadi *et al.*, 2011؛ Sharma *et al.*, 2012). به عبارت دیگر، فعالیت SOD به‌طور مستقیم مقدار ROSها را متعادل می‌کند و این موضوع نشان می‌دهد که سازگاری به تنش خشکی، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی را موجب می‌شود (Amirjani and Huseynova, 2012؛ Mahdiyeh, 2013).

POD جزء آنزیم‌هایی است که تبدیل H_2O_2 به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند (Gratao *et al.*, 2005). Abedi و همکاران (۲۰۱۰) براساس تحقیقی که روی ژنوتیپ‌های مختلف کلزا انجام دادند افزایش چشم‌گیر این آنزیم را در سطح تنش ۳۰٪ خشکی گزارش کردند. افزایش آنزیم POD تحت شرایط تنش خشکی در بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله مورد (*Myrtus communis*) (Caravaca *et al*. 2005)، جو (*Hordeum vulgare* L.) (Salekjalali *et al.*, 2012)، (*Achillea tinctoria* Salehi Shanjani *et al.*, 2014)، بادام زمینی (*Arachis hypogaea* L.) (Shinde and Laware, 2015) و... نیز گزارش شده است. در حین عملکرد SOD، مقدار زیادی H_2O_2 تولید می‌شود که به‌شدت برای سلول سمی هستند.آنزیم پراکسیداز در کنار سایر آنزیم‌های آنتی اکسیدان، در حذف سریع H_2O_2 حاصل از عمکرد SOD در حین تنش خشکی، نقش بسیار مهمی را بر عهده دارد (Gue *et al.*, 2006).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که لاین *ET83-20* در برابر تنش خشکی مقاومت کمتری نسبت به لاین *Sanabad* دارد. این مسئله به‌سبب کمتربودن ترکیبات تنظیم‌کنندهٔ اسمزی، فعالیت کمتر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و افزایش بیشتر پراکسیداسیون لیپیدها در لاین *ET83-20* است. باوجوداین، لاین *ET83-20* سعی می‌کند با سازوکارهای اجتناب از تنش، همانند کاهش سطح برگ و افزایش بیشتر محتوای کلروفیل‌ها به مقابله با تنش خشکی بپردازد. بر مبنای پژوهش حاضر، لاین *Sanabad* جایگزین بهتری برای سایر غلات معرفی می‌شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از حوزهٔ معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد برای تامین هزینه‌های مالی و از سازمان تحقیقات جهاد کشاورزی مشهد برای در اختیار قراردادن بذرهای گیاهی سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

Abedi, T. and Pakniyat, H. (2010) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 1: 27–34.

Amirjani, M. R. and Mahdiyeh, M. (2013) Antioxidative and biochemical response of wheat to drought stress. Journal of Agricultural and Biological Science 8(4): 291-301.

Arabzadeh, N. (2012) The effect of drought stress on soluble carbohydrates (sugars) in two species of *Haloxylon persicum* and *Haloxylon aphyllum*. Asian Journal of Plant Science 11(1): 44-51.

Arnon, D. J. (1956) Chlorophyll absorption spectrum and quantitative determination. Biochemical and Biophysical Acta 20: 449-461.

Azizpour, K., Shakiba, M. R., Khosh Kholgh Sima, N., Alyari, H., Moghaddam, M., Esfandiari, E. and Pessarakli, M. (2010) Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. Journal of Plant Nutrition 33: 859-873.

Bakalova, S., Nikolova, A. and Wedera, D. (2004) Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. Journal of Plant Physiology 30: 64–77.

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Tear, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39:205-207.

Blokhin, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. (2003) Antioxidant oxidative damage and oxygen deprivation stress. Annual Review of Botany 91: 179-194.

Borzooi, A., Khazai, H. and Shahriari, P. (2006) Effect of drought stress after pollination on physiological characteristics and the amount of antioxidants found in different varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) in greenhouse conditions. Journal of Agricultural Science and Technology 20(5): 65-75 (In Persian).

Campuzano, G. E., Miralles, D. J. and Slafer, G. A. (2008) Genotypic variability and response to water stress of pre- and post-anthesis phases in *Triticale*. European Journal of Agronomy 28: 171-177.

Caravaca, F., Alguacil, M. M., Hernandez, J. A. and Roldan, A. (2005) Involvement of antioxidant enzyme and nitrate reductase activities during water stress and recovery of mycorrhizal *Myrtus communis* and *Phillyrea angustifolia* plants. Plant Science 169: 191-197.

Das, R. and Uprety, D. C. (2006) Interactive effect of moisture stress and elevated CO_2 on the oxidative stress in *Brassica* species. Journal of Food Agriculture and Environment 4: 298–305.

Dias, M. C., Oliveira, H., Costa, A. and Santos, C. (2014) Improving elms performance under drought stress: The pretreatment with abscisic acid. Environmental and Experimental Botany 100: 64-73.

Dubious, M. K., Gilles, A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related. Annual Chemistry 28: 350-566.

Erekul, O. and Kohn, W. (2006) Effect of weather and soil conditions on yield components and bread-making quality of winter wheat (*Triticum aestivun* L.) and winter triticale (*Triticosecale X Wittmax*) varieties in North-East Germany. Journal of Agronomy and Crops Science 192: 452-464.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase. 1. Occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

Gratao, P. L., Polle, A., Lea, P. J. and Azevedo, R. A. (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional Plant Biology 32: 481-494.

Grzesiak, M. T., Rzepka, A., Hura, T., Hura, K. and Skoczowski, A. (2007) Changes in response to drought stress of Triticale and maize genotypes differing in drought tolerance. Photosynthetica 45(2): 280-287.

Gunes, A., Pilbeam, D., Inal, A. and Coban, S. (2008) Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: Growth, antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. Soil Science and Plant Nutrition 39: 1885–1903.

Gue, Z., Ou, W., Lu, S., Zhong, Q., (2006) Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Plant Physiology and Biochemistry 44: 828-836.

Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photo peroxidation in isolated chloroplast, 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Hendry, G. (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans. New Phytologist 123: 3-14.

Hoshani, M., Mianabadi, M., Aghdasi, M. and Azim Mohseni, M. (2012) An investigation of antioxidant activity of *Physalis alikekengi* methanolic extracts in different phenological stages. Journal of Plant Biology 4(14): 101-114 (In Persian).

Huseynova, I. M. (2012) Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. Biochemical Biophysical Acta 1817(8): 1516-1523.

Ivandic, V., Hackett, C. A., Zhang, Z. J., Staub, J. E., Nevo, E., Thomas, W. T. B. and Forster, B. P. (2000) Phenotypic responses of wild barley to experimentally imposed water stress. Journal of Experimental Botany 51(353): 2021–2029.

Khazai, H., Nezami, A. and Shojai, N. (2010) The effect of water stress on yield and distribution of dry matter between shoot and root of one-plant triticale genotypes (*Triticosecale* X *Wittmax*) under controlled conditions. Journal of Agricultural Ecology 2(1): 57-146 (In Persian).

Lelley, T. (2006) A low-input cereal with untapped potential. In: Genetic resources, Chromosome engineering and crop improvement cereals (Eds: Singh R.J. and Jauhar P.). 395-430. Cyclic Redundancy Check. Taylor. Boca Raton.

Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A. and Kondracka, K. (2013) Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield. International Agrophysica Journal 27: 463-477.

Machado, S. and Paulsen, G. M. (2001) Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. Plant and Soil 223: 179-187.

Mackinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solution. The Journal of Biological Chemistry 140: 315-319.

Matloubi, Z. (2014) The role of abscisic acid on antioxidant capacity and superoxide dismutase gene expression in chickpea (*Cicer arientinum* L.) under drought stress. MSc thesis, Ferdowsi University, Mashhad, Iran (In Persian).

McMaster, G. S. and Wilhelm, W. W. (2003) Simulating wheat and barley phonological responses to water and temperature stress. Journal of Agricultural Science 141: 129–147.

Mergom, M. and Maspherson, H. G. (2004) *Triticale* improvement and production. FAO Plant Production and Protection 11: 170-179.

Mergoum, M. and Gomez, H. (2009) *Triticale* improvement and production. FAO Plant Production and Protection 11: 123-145.

Mohammadi, A., Habibi, D., Rohamiand, M. and Mafakheri, M. (2011) Effect of drought stress on antioxidant enzymes activity of some chickpea cultivars. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 11(6): 782-785.

Momeni, N., Arvin, M. J., Khajouinejad, Gh., Daneshmand, F. and Keramat, B. (2012) Effect of sodium chloride and salicylic acid on antioxidant defense system in maize (*Zea mays* L.). Journal of Plant Biology 4(14): 23-34 (In Persian).

Movahedi Dehnavi, M., Modares Saanavi, A. M., Soroushzadeh, A. and Jalali, M. (2004) Changes of proline, total soluble carbohydrates, chlorophyll (SPAD) and chlorophyll fluorescence in safflower varieties under drought stress and foliar application of zinc and manganese. Desert Magazine 9(35): 93-107 (In Persian).

Pagter, M., Bragato, C. and Brix, H. (2005) Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. Aquatic Botany 81: 285-299.

Putter, J. (1974) In Methods of Enzymatic Analysis 2 (ED Bergmeyer). Academic press, New York.

Ragab Mossa, H. And Adbel-Aziz, S. (2008) Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. Australian Journal of Crop Science 1(1): 31-36.

Rahbarian, R., Khavari-Nejad, R., Ganjeali, A., Bagheri, A. and Najafi, F. (2011) Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 53(1): 47-56.

Rai, V. K., Singh, G., Thakur, P. S. and Banyal, S. (1983) Protein and amino acid relationship during water stress in relation to drought resistance. Plant Physiology and Biochemistry 10: 161-167.

Razavizadeh, R., Shafaghat, M. and Najafi, N. (2014) Effect of water stress on morphological and physiological indicators of *Carum copticum*. Journal of Plant Biology 6 (22): 25-38 (In Persian).

Sairam, R. K. and Saxena, D. C. (2000) Oxidative stress and antioxidant in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science 184: 55-61.

Salehi Shanjani, P., Izadpanah, M. and Calagari, M. (2014) Effects of drought on osmotic adjustment, antioxidant enzymes and pigments in wild *Achillea tinnctoria* populations. Ethno-Pharmaceutical Product 1(2): 43-54.

Salekjalali, M., Haddad, R. and Jafari, B. (2012) Effects of soil water shortages on the activity of antioxidant enzymes and the contents of cholorophylls and proteins in barley. American-Eurasian Journal Agricultural and Enviromental Science 12(1): 57-63.

Sedghi, M., SeyedSharifi, R., Pirzad, A. and Amanpour-Balaneji, B. (2012) Phytohormonal regulation of antioxidant systems in petals of drought stressed pot marigold (*Calendula officinalis* L.). Journal of Agricultural Science and Technology 14(4): 869-878.

Sharma, P., Bushan Jha, A., Shanker Dubeym, R. and Pessarakli, M. (2012) Reactive oxygen species oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany 12: 1-26.

Shinde, B. M. and Laware, S. L. (2015) Investigations of water stress on antioxidant enzyme activities in groundnout varieties (*Arachis hypogaea* L.). International Journal of Advanced Biological Research 5(1): 29-33.

Siddique, M. R. B., Hamid, A. and Islam, M. S. (1999) Drought stress effects on photosynthetic rate and leaf gas exchange of wheat. Botanical Bulletin of Academia Sinica 40: 141-145.

Sinay, H. and Karuwal, R. L. (2014) Proline and total soluble sugar content at the vegetative phase of six corn cultivars from Kisar Island Maluku, grown under drought stress conditions. International Journal of Advance Agriculture Research 2: 77-82.

Siosemardeh, A., Ahmadi, A., Poustini, K. and Ebrahimzadeh, H. (2004) Stomatal and non stomatal factors controlling photosynthesis and its relation with drought resistance in wheat cultivars. Iranian Journal of Agricultural Science 32(41): 191-202 (In Persian).

Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologist 125: 27–58.

Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. (2004) Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive tree in response to drought stress. Physiologia Plantarum 121: 56–58.

Verslues, P. E., Ober, E. S. and Sharp, R. E. (1998) Root growth and oxygen relations at low water potentials, impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. Plant Physiology 116: 1403-1412.

Xiao, X., Xu, X. and Yang, F. (2008) Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. Silva Fennica 42: 705–719.