



پژوهشکده میوه‌های
معتدله و سردسیری



سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم باغبانی

تنش خشکی و شاخص‌های ارزیابی آن در درختان میوه



نگارندگان

داریوش آتشکار، مریم دودانگه بالاخانی

شماره نشریه: ۹۹/۱۳/ف

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی
پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری

عنوان نشریه: تنش خشکی و شاخص های ارزیابی آن در درختان میوه
نام و نام خانوادگی نگارندگان: داریوش آتشکار، مریم دودانگه بالاخانی
نوع نشریه: فنی

ویراستاران: قاسم حسنی، عیسی ارجی

ناشر: مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری

شمارگان (تیراژ): ۱۵ نسخه

تاریخ انتشار: ۱۳۹۹

مسئولیت درستی مطالب با نویسنده / نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی ۵۷۷۳۵ به تاریخ ۱۳۹۹/۴/۲ است.

نشانی: کرج شهرک نهال و بذر-پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری- صندوق پستی

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۴	مقدمه
۵	مقاومت به خشکی
۵	فرار از خشکی
۶	اجتناب از خشکی
۶	تحمل خشکی
۷	انعطاف پذیری فنوتیپی
۷	سطح برگ
۸	حرکات برگ
۱۰	اثرات تنش خشکی بر تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان
۱۰	وضعیت آبی گیاه
۱۱	فتوستت
۱۳	فلورسانس کلروفیل
۱۴	رنگیزه های فتوستتزی
۱۵	تجمع مالون دی آلدئید
۱۶	پایداری غشاء سلولی
۱۷	تنظیم اسمزی در واکنش به تنش خشکی
۱۸	پرولین
۱۹	قندها
۲۰	اثرات تنش خشکی بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان
۲۱	اثر تنش خشکی بر رشد گیاه
۲۲	ارزیابی نشانگرها
۲۲	نشانگرهای فیزیولوژیکی
۲۴	نشانگرهای مورفولوژیکی
۲۵	نشانگرهای بیوشیمیایی
۳۶	منابع

مقدمه

از بین انواع تنش‌های محیطی، خسارات وارده به محصولات کشاورزی در اثر تنش‌های خشکی، شوری و دما در سطح جهان گسترده‌تر بوده و به همین جهت بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (لویت، ۱۹۸۰). تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده است که گیاهان در طول دوران رشد و نمو با آن روبرو می‌شوند (شان و همکاران، ۲۰۱۴). خشکی یک پدیده هواشناسی است که با عدم وقوع بارندگی در یک دوره زمانی، همراه می‌شود، دوره‌ای که به اندازه کافی طولانی است تا باعث تخلیه رطوبتی خاک و اعمال تنش کمبود آب همراه با کاهش پتانسیل آب در بافت‌های گیاهی گردد. بنابراین قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش خشکی در برخی از مواقع سال امری اجتناب‌ناپذیر است و برای تولید رضایت‌بخش باید کمبود آب از طریق آبیاری جبران شود (هاشمی دزفولی و همکاران، ۱۳۷۴). اما از دیدگاه کشاورزی خشکی عبارت است از ناکافی بودن مقدار و توزیع آب قابل‌استفاده در طی دوره رشد گیاه که این امر موجب کاهش بروز توان کامل ژنتیکی گیاه می‌گردد. خشکی مهم‌ترین عامل محدودکننده تولیدات کشاورزی به شمار می‌رود که گیاه را از رسیدن به حداکثر توان محصول دهی بازمی‌دارد (میترا، ۲۰۰۱). خشکی شایع‌ترین تنش محیطی و مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید محصولات کشاورزی در سرتاسر جهان است و تقریباً تولید ۲۵ درصد زمین‌های کشاورزی و ۴۵ درصد از عملکرد محصولات زراعی جهان را کاهش داده است (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). در حدود یک‌سوم اراضی جهان با کمبود بارندگی مواجه هستند و نیمی از این اراضی دارای بارندگی سالیانه کمتر از ۲۵۰ میلی‌متر می‌باشند که یک‌چهارم تبخیر و تعرق بالقوه این مناطق است (علیزاده، ۱۳۸۷). به‌طور کلی، مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان در محدوده بین عرض‌های جغرافیایی ۱۵ تا ۳۰ درجه شمالی و جنوبی قرار گرفته‌اند و وسعتی در حدود ۴۴/۷ میلیون کیلومتر مربع را شامل می‌شوند. ایران نیز با متوسط بارندگی ۲۵۰ میلی‌متر در سال (کمتر از یک‌سوم متوسط بارندگی جهان) در زمره مناطق خشک جهان طبقه‌بندی می‌شود و به‌جز سواحل دریای خزر و قسمت‌های کوچکی از شمال غرب، بقیه مناطق کشور جزو نقاط خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌گردند (کوچکی و نصیری محلاتی، ۱۳۷۳). اگر نواحی تحت تنش را مناطقی با بارندگی سالیانه کمتر از ۵۰۰ میلی‌متر در نظر بگیریم، به‌راحتی می‌توان گفت که بیش از ۹۰ درصد سطح کشور ایران تحت تنش خشکی قرار دارد (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). کاهش تعرق، بسته شدن نسبی روزنه‌ها و تعدیل اسمزی از طریق تجمع آمینواسیدها به‌ویژه پرولین، پلی آمین‌ها و کربوهیدرات‌ها، صفات فیزیولوژیکی هستند که در مقاومت به تنش خشکی عموماً مورد مطالعه قرار می‌گیرند. تنش خشکی، اثرات چندگانه‌ای بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی گیاه بر جای گذاشته که از جمله آن‌ها می‌توان به کاهش عملکرد اقتصادی، کاهش پتانسیل آب، محتوی نسبی آب برگ، سنتز پروتئین، مقدار کلروفیل، هدایت روزنه‌ای و نرخ فتوسنتز اشاره نمود. تحت شرایط تنش خشکی، روزنه‌ها به‌سرعت بسته‌شده و در صورت تداوم این شرایط، رشد گیاه متوقف‌شده، جذب و مصرف خالص CO_2 کاهش می‌یابد. دلیل این کاهش از یک‌طرف، کم شدن ذخیره CO_2 سلول‌های مزوفیل برگ و از طرف دیگر، کاهش فعالیت آنزیم ریبولوز بی فسفات کربوکسیلاز اکسیژناز^۱ در برگ‌های تحت تنش است (برتامینی و

^۱-Ribulose 1, 5- Biphosphate Carbo×ylase O×ygenase (RUBISCO)

همکاران، ۲۰۰۶). در گیاهان تحت تنش خشکی، سلول‌ها کوچک‌تر شده، برگ‌ها کمتر توسعه پیدا کرده و عملکرد ماده خشک به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (سالیبوری و راس، ۱۹۹۲).

رشد یکی از حساس‌ترین مراحل فیزیولوژیکی گیاه است که تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد، زیرا تنش خشکی باعث کاهش فشار تورژسانس سلول می‌شود. تحت تأثیر تنش شدید خشکی تقسیم سلولی نیز به‌واسطه محدودیت جریان آب به درون سلول محدود می‌شود. بنابراین توقف میتوز، طولیل شدن سلول و گسترش آن و در نتیجه کاهش ارتفاع گیاه، سطح برگ، سبزینه، کاهش فرایند فتوسنتز و در نهایت کاهش تولید ماده خشک، عملکرد گیاه را به‌شدت کاهش می‌دهد (وحید و همکاران، ۲۰۰۵).

۱- مقاومت به خشکی

توانایی یک گیاه برای بقاء، رشد و تولید عملکرد در حد رضایت‌بخش در شرایط محدودیت ذخیره آب و یا تحت کمبودهای متوالی آب و یا از نظر تکاملی، توان زنده ماندن یک‌گونه از نسلی به نسل دیگر تحت شرایطی که آب قابل‌دسترس محدود باشد، مقاومت به خشکی نامیده می‌شود. گیاهان در مواجهه با کمبود رطوبت طی واکنش‌های مختلف مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیکی به تنش خشکی پاسخ و سازگاری نشان داده و تحت تنش خشکی زنده می‌مانند که این پاسخ‌ها مانند کاهش سطح برگ، خاردار شدن، کاهش اندام‌های هوایی، افزایش رشد ریشه، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش رشد، تجمع آنتی‌اکسیدان‌ها و مواد محلول و اسمولیت‌ها و فعالیت ژن‌های خاص بروز می‌کند (لباسچی و شریفی، ۱۳۸۳). سازوکارهای سازگاری مقاومت به خشکی در گیاهان را می‌توان به سه دسته سازوکارهای فرار از خشکی^۲، اجتناب از خشکی^۳ و تحمل به خشکی^۴ تقسیم نمود (بارسا، ۱۹۹۷).

۱-۱- فرار از خشکی

کوتاه بودن فصل رشد گیاه به‌عنوان مکانیزم فرار از خشکی نامبرده می‌شود و گیاه قبل از اینکه با خشکی شدید روبرو شود چرخه زندگی خود را تکمیل می‌نماید. طول عمر گیاه با ژنوتیپ، محیط و اثر متقابل آنها تعیین می‌شود و تعیین‌کننده فرار گیاه از شرایط تنش‌زای خشکی است. منطبق شدن زمان رشد گیاه با رطوبت قابل‌دسترس خاک برای رشد مطلوب گیاه ضروری است. فرار از خشکی هنگامی ایجاد می‌شود که مرحله فنولوژیکی نمو گیاه با رطوبت مناسب خاک مطابقت نماید، جایی که طول رشد کوتاه بوده و تنش خشکی به مراحل آخر رشد می‌رسد، زمان گلدهی مهم‌ترین صفت برای سازگاری گیاه به محیط است به‌ویژه هنگامی که فصل رشد با خشکی و درجه حرارت بالا محدود می‌شود. کوتاه بودن فصل رشد استراتژی موفق‌تری برای به حداقل رساندن تلفات محصول در مواجهه با خشکی و گرمای آخر فصل است که گیاه سریع بالغ شده و از تنش می‌گریزد (کافی و همکاران، ۱۳۸۸).

^۲-Drought escape

^۳-Drought avoidance

^۴-Drought tolerance

۱-۲- اجتناب از خشکی

دوری از خشکی شامل مکانیزم‌هایی می‌باشد که از دست رفتن آب از گیاه را به واسطه کنترل روزنه‌ای و تعرق کاهش داده و میزان جذب آب را با گسترش و عمق ریشه بهبود می‌بخشند. توانایی یک گیاه در بالا نگه داشتن پتانسیل آب و نگهداری حالت‌های آزاد آب در نسوج خود در طول دوره خشکی را اجتناب از خشکی می‌گویند. بنابراین، گیاه بدین وسیله از تنش و عواقب آن اجتناب می‌کند. این موضوع به دلیل خواص مورفولوژیکی و آناتومیکی گیاه می‌باشد. نگهداری وضعیت مطلوب آب در شرایط خشکی یا می‌تواند از طریق افزایش جذب ریشه‌ها و یا از طریق کاهش میزان خروج آب از برگ‌ها باشد (وان دام، ۱۹۹۱). گیاهان با توانایی اجتناب از خشکی ممکن است در پاسخ به تنش خشکی خصوصیات متفاوتی نظیر افزایش بیوماس، طول، تراکم، انعطاف‌پذیری و گسترش ریشه به اعماق پروفیل خاک، و یا کاهش در رشد و سطح برگ و افزایش در تعداد کرک، لوله‌ای شدن برگ، و ایجاد واکس بر روی برگ‌ها، تغییرات در میزان باز بودن روزنه را به‌عنوان، مهم‌ترین روش‌های اجتناب از خشکی از خود بروز دهند (کافی و همکاران، ۱۳۸۸) در محیط‌هایی که تنش متناوب در کل دوره رشد گیاه وجود دارد، سازوکارهای اجتناب مهم‌ترند و عمدتاً این راهکارها، آب را برای رشد زایشی گیاه ذخیره می‌کنند. گیاهانی که اثرات خشکی را به تأخیر می‌اندازند شامل گیاهان ذخیره‌کننده و مصرف‌کننده آب می‌باشند. گیاهان ذخیره‌کننده، آب را محافظه‌کارانه مصرف کرده، به‌طوری‌که بخشی از آب را برای استفاده‌های بعدی چرخه زندگی در خاک نگهداری می‌کنند، درحالی‌که گیاهان مصرف‌کننده، آب را به‌طور تهاجمی حتی در مقادیر بسیار کم مصرف می‌کنند (تایز وزایگر، ۲۰۰۶)

۱-۳- تحمل خشکی

قابلیت گیاه برای تحمل نوعی از تنش خشکی تدریجی که توام با کاهش پتانسیل آبی گیاه همراه است، تحمل خشکی گفته می‌شود (لویت، ۱۹۸۰). گیاهان متحمل می‌توانند پتانسیل پایین آب برگ را تحمل کرده و فعالیت متابولیکی را در این شرایط حفظ کنند. از راهبردهای تحمل در گیاه می‌توان به تنظیم اسمزی، نگهداری و حفظ حیات ریشه‌ها، پایداری غشاها در ضمن پسابدگی، تجمع پروتئین‌ها و متابولیت‌های دارای نقش‌های مستقیم و غیرمستقیم در پایداری ساختارهای سلولی اشاره کرد.

گیاهان متحمل به پسابدگی اساس فیزیولوژیکی منحصربه‌فردی در سطح سلولی برای مقابله با خشکی دارند. برای مثال، این گیاهان می‌توانند با کاهش حجم واکوئل بر تنش خشکی غلبه نمایند. کالتر و همکاران (۱۹۷۷) گزارش کردند وقتی گیاه کتان در شرایط رطوبت کم رشد می‌کند، تحمل به خشکی بیشتری نسبت به گیاه رشد یافته در شرایط عادی دارد و سلول‌های آن کوچک‌تر هستند. تحمل خشکی بستگی به توانایی در نگهداری غشای سلول در شرایط نرمال و جلوگیری از تغییر ماهیت پروتئین‌ها دارد. مواد محلول از جمله قندها، اسیدهای آمینه و ترکیبات آمونیومی (مثل گلايسين بتائين) موجب حفظ غشاء و آنزیم‌ها از خسارت پسابدگی می‌شوند (صباغ پور، ۱۳۸۵). مکانیسم تحمل به خشکی امکان ادامه متابولیسم و حیات در شرایط رطوبت کم را برای سلول‌های گیاه فراهم می‌سازد. ممکن است تحمل پسابدگی به علت قابلیت ویژه سلول‌های نگهدارنده روزنه از نظر نگهداری تورژسانس باشد. در چنین حالتی، حتی زمانی که سلول‌های برگ پژمرده‌اند، روزنه‌ها باز خواهند ماند. به احتمال زیاد این پدیده ناشی از افزایش املاح در سلول‌های نگهدارنده می‌باشد (کافی و همکاران، ۱۳۸۸).

لازم به ذکر است بیشتر گیاهان تنها از یک مکانیسم برای مقاومت در برابر تنش بهره نمی‌برند، بلکه یک گیاه ممکن است چندین راهکار برای سازگاری با تنش داشته باشد (علی، ۲۰۰۶؛ تائیز و زایگر، ۲۰۰۶). اهمیت نسبی هر راهکار به مدت، شدت تنش و نوع گونه گیاهی بستگی دارد. اجتناب از خشکی به گیاه این امکان را می‌دهد که در دوره خشکی کوتاه‌مدت بتواند عملکرد و رشد مطلوبی داشته باشد، درحالی‌که راهکار تحمل به گیاه این امکان را می‌دهد که بتواند تنش را در مدت طولانی‌تری تحمل نماید (کافی و همکاران، ۱۳۸۸).

۱-۲-۲-۱- انعطاف‌پذیری فنوتیپی

رشد گیاه به‌طور قابل‌توجهی با تنش خشکی تحت تأثیر قرار می‌گیرد و در سطح مورفولوژیکی شاخه، برگ و ریشه بیشتر از سایر اندام‌ها تحت تأثیر قرار گرفته و به‌عنوان اجزاء کلیدی برای سازگاری گیاه به تنش عمل می‌کنند (سیرسلج، ۲۰۰۷).

۱-۲-۱- سطح برگ

گیاهان عموماً در مواجهه با تنش، سطح برگ‌های خود را برای صرفه‌جویی در مصرف آب کم می‌کنند. به‌طور کلی، تنش خشکی در طول دوره رویشی باعث کوچک شدن برگ‌ها می‌شود. همچنین شاخص سطح برگ، دوره رسیدن محصول و میزان جذب نور توسط گیاه کاهش می‌یابد (لویت، ۱۹۸۰). یکی از راهکارهای گیاه در زمان وقوع تنش کاهش سطح و تعداد برگ می‌باشد. برگ به‌عنوان واحد فتوسنتزی در گیاه نقش ویژه‌ای دارد، ژنوتیپ‌های با تعداد برگ بیشتر در شرایط تنش توان فتوسنتزی بالایی دارند، اما این موضوع با تعرق بیشتر گیاه در این شرایط در تقابل است. باید بین کاهش میزان تعرق و سطح بحرانی برگ برای فتوسنتز تعادل پایداری وجود داشته باشد. وقتی این تعادل به دست نمی‌آید، مزیت کاهش تعرق به‌وسیله عدم دسترسی کافی به مواد فتوسنتزی از بین می‌رود (کافی و همکاران ۱۳۸۸).

ریزش برگ و تولید برگ‌های کوچک‌تر از راهکارهای عمومی گیاهان برای کاهش تلفات آب می‌باشند. در بسیاری از گیاهان نواحی خشک و نیمه‌خشک، سازگاری به خشکی با کاهش اندام‌های تعرق‌کننده از طریق ریزش برگ‌ها حاصل می‌شود. به‌عنوان مثال، ریزش برگ یکی از راهکارهای مقابله با تنش خشکی در گیاه قیچ می‌باشد (ساندبرگ، ۱۹۸۵). کاهش سطح برگ یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در زنده ماندن گیاهان بیابانی نظیر درمنه، قیچ و تاغ به شمار می‌رود. عموماً برگ‌های پایینی این گیاهان در شرایط تنش خشکی ریزش می‌نمایند. بدیهی است که کاهش سطح برگ میزان فتوسنتز را کاهش می‌دهد. ریزش سریع برگ‌ها در واکنش به تنش کم‌آبی در درختان بادام (دی هرال و همکاران، ۲۰۰۳) و مرکبات (آئورلیو و همکاران، ۱۹۹۶) نیز گزارش شده است. تعدادی از گیاهان مقاوم به خشکی چندین بار در سال برگ‌های خود را می‌ریزانند. پس از هر بار ریزش، برگ‌های جدیدی شروع به رشد می‌کنند که کوچک‌تر از برگ‌های ریزش یافته بوده و خصوصیات خشکی‌پسندی بیشتری دارند (رنجبرفردوئی و همکاران، ۲۰۰۲). فرایند ریزش برگ در طول تنش آب تا حدود زیادی ناشی از افزایش سنتز اتیلن و افزایش حساسیت گیاه به این هورمون می‌باشد (تائیز و زایگر، ۲۰۰۶).

۲-۱-۲-۲-حركات برگ

برگ‌هایی که با تغییر جهت خورشید موقعیت خود را حفظ می‌کنند را خورشید گریز^۵ می‌نامند، در مقابل آن‌هایی که با حفظ جهت خود در شرایط طبیعی (به‌طور عمودی) در مقابل خورشید انرژی کسب می‌کنند را خورشیدگرا^۶ گویند. عوامل دیگری که می‌تواند نفوذ نور خورشید را تغییر دهد شامل پژمردگی است که تغییراتی در زاویه برگ و لوله‌ای شدن برگ در علف‌های چمنی ایجاد می‌کند که در نتیجه آن، سطح بافت کمتر در معرض نور خورشید قرار می‌گیرد. لوله‌ای شدن به‌وسیله سلول‌های به نام بولی فرم^۷ تسهیل می‌گردد که به‌عنوان محور برای بقیه قسمت‌های برگ عمل می‌کند (تایز و زایگر ۲۰۰۶).

تغییر زاویه برگ (به‌صورت فعال یا غیرفعال) از پاسخ‌های معمول گیاهان به تنش آبی می‌باشد. در لگوم‌های دارای سطح برگ بزرگ، تغییر زاویه برگ مکانیسم مهمی در جهت تحمل خشکی می‌باشد (صباغ پور، ۱۳۸۵). خصوصیات نیمه‌خشکی‌پسندی شامل برگ‌های ضخیم با کوتیکل ضخیم و روزنه‌های فرورفته کرکی، برگ‌های پیچ‌خورده و پتانسیل کم آب برگ در گونه‌های وحشی زیتون به‌خوبی شناخته‌شده است. برگ‌های این گیاه (مخصوصاً برگ‌های یک‌ساله) در تابستان نسبت به اوایل فصل رو به بالا قرار می‌گیرند. همچنین، در اواسط روز که هوا گرم‌تر می‌شود، برگ‌های جوان پیچ‌خورده و لوله‌ای می‌شوند. به نظر می‌رسد که این امر به تغییرات آماس مربوط می‌شود. در نتیجه چنین حرکتی قسمت زیرین برگ‌ها که نقره‌ای و پوشیده از کرک است، بیشتر در معرض نور قرار گرفته و سبب انعکاس تابش آفتاب می‌شود. نتایج آزمایشی که بر روی درختان ۱۶ ساله زیتون صورت گرفت، حاکی از آن بود که انجام آبیاری بعد از یک دوره تنش خشکی موجب افزایش زاویه بین ساقه و برگ و همچنین، باعث باز شدن برگ‌های پیچ‌خورده گردید (شعیب و لیوناکیس، ۱۹۹۶).

۳-۲-۱-ویژگی‌های سطح برگ

جذب انرژی می‌تواند به‌وسیله پرزهای سطح گیاه و یا توسط لایه‌های روی کوتیکول کاهش یابد. برگ‌های بعضی گیاهان، ظاهری خاکستری-سفیددارند و به علت وجود کرک‌های متراکم روی سطح آن‌ها مقدار زیادی از نور را منعکس می‌کنند. این کرک‌ها به علت انعکاس تابش خورشیدی برگ را خنک‌تر نگه می‌دارند (تایز و زایگر ۲۰۰۶). کرک‌ها با کند نمودن سرعت حرکت هوا باعث کاهش تفرق می‌شوند و نیز مسافتی را که بخار هوا در حین تفرق طی می‌کند، افزایش می‌دهد. همچنین، کرک‌ها سرعت باد در نزدیکی سطح تفرق را کاهش می‌دهند و بدین‌وسیله موجب افزایش مقاومت در برابر انتشار بخار آب می‌گردند (وان دام، ۱۹۹۱). تحت شرایط تنش کرکی بودن برگ‌ها افزایش یافته و باعث انعکاس نور، کاهش دما و کاهش هدر رفت آب از برگ‌ها می‌شود. یک اثر عمومی تکاملی در طول تنش خشکی، تولید کوتیکول ضخیم‌تر است که از دست دادن آب را از اپیدرم کاهش می‌دهد. کوتیکول مومی و وجود موم در سطح بیرونی کوتیکول ابزار مؤثری برای جلوگیری از اتلاف آب از برگ‌ها هستند که تبادلات گاز و آب را به منافذ روزنه‌ای محدود می‌سازند. لویت (۱۹۸۰) اظهار داشت که علاوه بر وجود کوتیکول سطح برگ، ممکن است تجمع لیپیدها در دیواره سلول‌های مزوفیل نیز اتلاف آب برگ را کاهش دهد.

¹. Paraheliotropic

². Diaheliotropic

³. Buliform cells

روزنه ها نقش کلیدی در مسیرهای اتلاف آب و جذب گاز دی اکسید کربن دارند. به علت نفوذناپذیری نسبی کوتیکول نسبت به آب حدود ۹۰ درصد تعرق از راه روزنه تا صورت می گیرد. تعداد و اندازه روزنه ها که متأثر از ژنوتیپ و محیط اند، در مقایسه با باز و بسته شدنشان تأثیر کمتری بر میزان کل تعرق می گذارند (سرمدنیا و کوچکی، ۱۳۷۴؛ سی و سه مرده، ۱۳۸۳). هنگامی که گیاه در معرض تنش آبی قرار می گیرد، روزنه ها تمایل به بسته شدن دارند. این واکنش بسته شدن در ابتدا توسط آبسزیک اسید ریشه القا می شود. علاوه بر این، کاهش پتانسیل آماس در برگ نیز بر بسته شدن روزنه ها در تنش خشکی مؤثر است که احتمالاً از طریق آبسزیک اسید ساخته شده در برگ اثر می گذارد. آبسزیک اسید روی کانال پتاسیم اثر می گذارد که مانع باز شدن و سبب تحریک بسته شدن می شود و در حقیقت اجازه ورود پتاسیم را نمی دهد (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). باز شدن روزنه ها نتیجه افزایش پتانسیل فشاری سلول های محافظ روزنه ها نسبت به سلول های اطراف آن می باشد. تعرق هنگامی صورت می گیرد که بخار آب از طریق روزنه به بیرون منتشر شود. تنش آب می تواند موجب کاهش اندازه شکاف روزنه شود. برخی مواد شیمیایی مانند آترازین، سیمازین و دیدرون نیز باعث مسدود شدن روزنه می گردند. این مواد موجب کاهش مصرف آب و رشد می گردند (بدینگر، ۱۹۷۸). تقریباً در تمام گیاهان، اولین پاسخ به کمبود شدید آب، بستن روزنه های خود به منظور جلوگیری از اتلاف آب طی فرایند تعرق می باشد (مانسفیلد و اتکینسون، ۱۹۹۰). بستن روزنه ها ممکن است نتیجه پاسخ به کاهش در آماس برگ، یا پتانسیل آب خاک (لودلاو و موجو، ۱۹۹۰) و یا به رطوبت پایین اتمسفر باشد. این بحث وجود دارد که آیا خشکی به طور عمده فتوستز را از طریق بستن روزنه ها محدود می کند یا اختلالات متابولیکی ادامه دار برای مدت طولانی موجب کاهش فتوستز گردیده است (تزارا و همکاران، ۱۹۹۹؛ شارکی، ۱۹۹۰). طی دهه گذشته، به طور کلی بسته شدن روزنه ها به عنوان عامل تعیین کننده اصلی برای کاهش فتوستز تحت تنش خشکی متوسط تا خفیف پذیرفته شد (یو کوتا و همکاران، ۲۰۰۲).

زمانی که مقدار آب قابل دسترس دارای محدودیت خفیف یا شدیدی است، اولین گزینه برای گیاهان، بستن روزنه ها می باشد (کورنیک و ماساسی، ۱۹۹۶). بسته شدن روزنه ها باعث کاهش جریان CO_2 به درون برگ ها شده و بیشتر الکترون ها برای تشکیل گونه های اکسیژن فعال ذخیره می گردد در نتیجه کاهش میزان تعرق، مقدار گرمایی که از این طریق می توانست از بین برود افزایش می یابد (یو کوتا و همکاران، ۲۰۰۲). آزمایشات مختلف نشان داده اند که پاسخ های روزنه ها در اکثر اوقات بیشتر از اینکه به وضعیت آب برگ مرتبط باشد به مقدار رطوبت خاک ارتباط دارد. این نشان می دهد که روزنه به سیگنال های شیمیایی از قبیل آبسزیک اسید که توسط ریشه های دهیدراته شده تولید شده، واکنش نشان می دهد در حالی که وضعیت آب برگ را ثابت نگه می دارد (تورنر و همکاران، ۲۰۰۱؛ مورگان، ۱۹۹۰؛ تیلور، ۱۹۹۱). شرایط محیطی که میزان تعرق را افزایش می دهد نیز pH شیره برگ را افزایش می دهد که این می تواند موجب تحریک تجمع آبسزیک اسید و هم زمان کاهش هدایت روزنه گردد. افزایش غلظت سیتوکینین در شیره آوند چوبی باعث تحریک باز شدن روزنه ها به طور مستقیم گردیده و بر حساسیت روزنه نسبت به آبسزیک اسید اثر بگذارد (ویلکینسون و دیویس، ۲۰۰۲). مقایسه نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف، به دلیل تفاوت بین گونه ای در پاسخ هدایت روزنه ای و فتوستز به پتانسیل آب برگ و یا محتوی نسبی آب (پارامترهایی که اغلب به منظور ارزیابی میزان خشکی به کار می روند) پیچیده می باشد واضح است که روزنه ها در اثر فرایندهای تنش خشکی به تدریج بسته شده و در ادامه به موازات آن

فتوستنز خالص کاهش می‌یابد. هرچند هدایت روزنه‌ای تنها از طریق قابلیت دسترسی آب خاک کنترل نشده بلکه از طریق تعامل پیچیده عوامل بیرونی و درونی کنترل می‌گردد (کورنیک و ماساسی، ۱۹۹۶).

۵-۲-۱-ریشه

مطالعه در مورد اثر تنش رطوبتی خاک بر توسعه سیستم ریشه‌ای گونه‌های گیاهی مختلف به‌عنوان معیاری جهت تعیین مقاومت به خشکی و پتانسیل تولید در شرایط تنش می‌باشد. بررسی‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای متعدد بر این موضوع صحت می‌گذارند. گیاهان زراعی با داشتن نوعی حافظه ژنتیکی جهت ارزیابی مقدار آب قابل وصول در محیط زندگی خود نسبت به کنترل وضعیت آب و حفظ رطوبت خود اقدام می‌کنند. مطالعه پارامترهای طول، سطح، حجم ریشه و روابط بین آن‌ها از طریق ریشه ضروری است. در محیط‌های خشک آب قابل دسترس یک عامل محدودکننده کلیدی است، بنابراین استخراج آب از اعماق خاک و قابل دسترس نمودن آن برای گیاه، از طریق راهکارهای سازگاری مربوط به سیستم ریشه حاصل می‌شود. تفاوت‌های ژنوتیپی از نظر طول و گسترش سیستم ریشه در اکثر گیاهان گزارش شده است (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). ریشه‌ها مرکز اصلی جذب آب از خاک می‌باشند رشد، تراکم، انشعاب زایی و اندازه‌ی آن پاسخ‌های کلیدی گیاه به تنش خشکی به حساب می‌آید. داشتن ریشه‌های عمیق و ضخیم همین طور کوچک بودن، کرکی بودن و زاویه‌دار بودن برگ‌ها به‌عنوان مکانیزم‌های اجتناب از تنش خشکی محسوب می‌شوند. کیفیت ریشه‌ها یعنی ساختمان و توزیع آن نسبت به تعداد آن مهم‌تر است. برای تحمل به خشکی، گزینش گیاهان دارای سیستم ریشه‌ای عمیق کارآمد در تحمل به خشکی اهمیت دارد. داشتن ریشه‌های عمیق و ضخیم به گیاه اجازه می‌دهد که آب را از اعماق پایین جذب نمایند و مقاوم به خشکی شوند (فاروق و همکاران ۲۰۰۹). 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 فتوستنزی به مقدار کمتری تحت تأثیر قرار می‌گیرد. جلوگیری از توسعه برگ میزان مصرف کربن و انرژی را در اندام هوایی کاهش می‌دهد و سهم بیشتری از مواد آسمیله گیاه در ریشه توزیع می‌گردد که در آنجا ریشه توانایی جذب آب و مواد معدنی بیشتری را می‌یابد. در نتیجه افزایش نسبت ریشه به اندام هوایی حاصل می‌شود، البته تنش خشکی باعث از بین رفتن ریشه‌های کم‌عمق و افزایش ریشه‌های عمیق می‌گردد (تایز و زایگر ۲۰۰۶). همبستگی مثبتی بین نسبت بالای وزن ریشه به اندام هوایی و عملکرد بالا در شرایط تنش خشکی گزارش شده است.

۱-۲-۱-اثرات تنش خشکی بر تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان

۱-۲-۱-۱-وضعیت آبی گیاه

مقدار نسبی آب برگ، پتانسیل آب برگ، مقاومت روزنه‌ای، میزان تعرق و درجه حرارت تاج خصوصیات مهمی هستند که تحت تأثیر روابط آبی قرار می‌گیرند.

برای بررسی وضعیت آبی گیاه معمولاً سه ویژگی اصلی آن سنجیده می‌شوند (کافی و همکاران، ۱۳۸۸) که عبارت‌اند از:

1- پتانسیل آب (Ψ_w): اساساً وضعیت آب در خاک، گیاه و اتمسفر تحت عنوان پتانسیل آب تعریف می‌شود. پتانسیل شیمیایی آب مقدار انرژی مفید آب را برای انجام کار در یک محیط معین نشان می‌دهد. اختلاف پتانسیل آب بین دو نقطه نیروی محرکه لازم برای جابه‌جایی آب را فراهم می‌کند.

2- پتانسیل اسمزی (Ψ_s): وجود مواد حل‌شده در آب باعث کاهش انرژی آزاد آب‌شده و پتانسیل آب را کاهش می‌دهد. این کاهش پتانسیل آب ناشی از مواد حل‌شده را پتانسیل اسمزی می‌نامند.

3- محتوای نسبی آب (RWC): این ویژگی رطوبتی به صورت درصدی از محتوای آب اندام در حالت اشباع (آماس کامل) بیان می‌گردد. اندازه‌گیری محتوای نسبی آب قابل اطمینان‌ترین روش اندازه‌گیری مقدار آب در بافت‌های گیاهی بوده و به همین دلیل، کاربرد آن بیش از سایر روش‌ها است. اگر محتوی نسبی آب برگ کمتر از ۱۰۰ باشد، نشان‌دهنده کمبود آب در گیاه است (علیزاده، ۱۳۸۷). مقدار نسبی آب برگ در طول دوران رشد بالاست و هنگام تجمع مواد خشک در برگ‌های بالغ مقدار آن کاهش می‌یابد. بنابراین گیاهان تحت تنش آبی، گندم و برنج، محتوی نسبی آب برگ پایین‌تری نسبت به شرایط آبیاری نرمال دارند و قرار دادن مداوم این گیاهان در معرض تنش خشکی باعث کاهش پتانسیل آب برگ، مقدار نسبی آب برگ، میزان تعرق و افزایش دمای برگ خواهد شد، محتوی نسبی آب برگ در هنگام تنش گاهی تا ۵۰٪ کاهش می‌یابد. (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹). بین محتوای نسبی آب در گیاه و پتانسیل آب آن یک رابطه نزدیک وجود دارد؛ بدین معنی که هر چه پتانسیل آب در گیاه کاهش یابد (بیشتر منفی شود)، محتوای نسبی آب نیز تقلیل می‌یابد (علیزاده، ۱۳۸۷). محتوای نسبی آب بالاتر در شرایط تنش خشکی که ممکن است از طریق قابلیت تنظیم اسمزی و یا توانایی بیشتر ریشه در جذب آب حاصل شود، به معنی توانایی برگ در حفظ مقادیر بیشتر آب است. ژنوتیپ‌های با محتوی نسبی آب برگ بالا برای مناطق خشک مناسب‌اند؛ زیرا قادرند بدون بستن روزنه‌های خود آب بیشتری حفظ نمایند (کافی و همکاران، ۱۳۸۸).

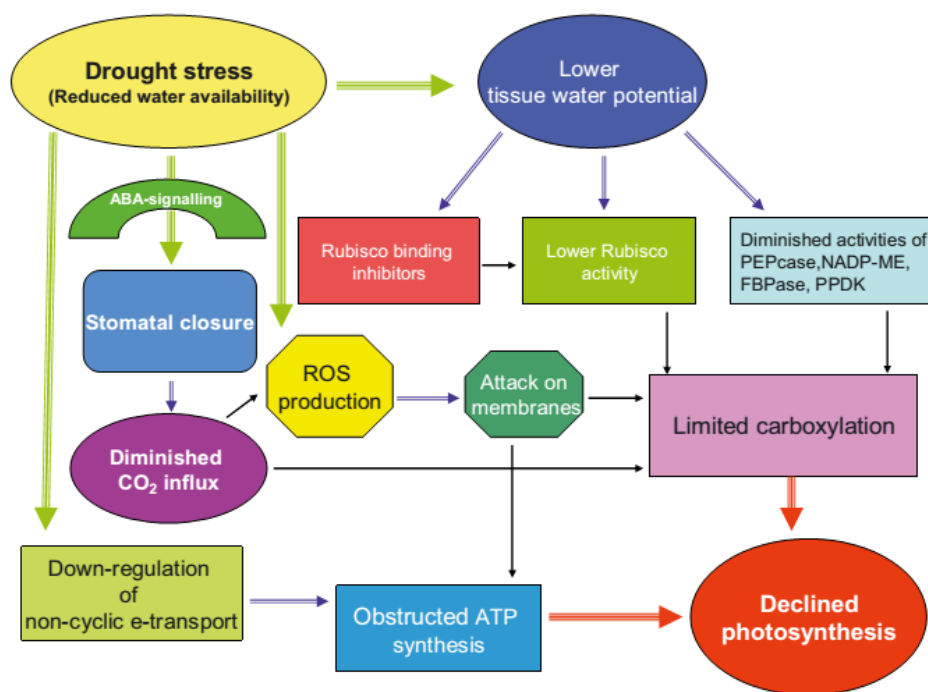
گیاهان در شرایط کم‌آبی به روش‌های مختلفی فعالیت‌های فیزیولوژیکی خود را حفظ می‌کنند. برای مثال، بسیاری از گیاهان با افزایش غلظت یون‌ها در سلول‌های برگ، ریشه و سایر اندام‌ها در واکنش به تنش خشکی، آماس خود را حفظ می‌کنند (مورگان، ۱۹۸۴). رسولی (۱۳۸۱) اظهار داشت ارقامی از انگور که در شرایط خشکی خاک، توانایی جذب آب بیشتر یا راندمان مصرف آب زیادتری داشته باشند و بتوانند محتوی نسبی آب اندام‌های خود را بالاتر نگه‌دارند، مقاومت بیشتری به خشکی خاک خواهند داشت. مطالعه درختان دوساله سیب رقم "گیل گالا" پیوند شده بر روی دو گونه *Malus Sieversii* و *Malus hupehensis* تحت تنش خشکی نشان داد که محتوی نسبی آب برگ فتوستتر، بیوماس کل، میزان کلروفیل و کارایی مصرف آب در نهال‌های سیب پیوند شده بر روی پایه مقاوم *Malus Sieversii* بیشتر از گونه دیگر بود (لی و همکاران ۲۰۱۲).

۲-۲-۲- فتوستتر

یکی از اثرات اصلی خشکی، کاهش فتوستتر است که ناشی از کاهش در توسعه برگ، اختلال سیستم فتوستتری، پیری زودرس برگ و به همراه آن کاهش در تولید مواد غذایی می‌باشد (وحید و رسول، ۲۰۰۵). نقش تنش خشکی در کاهش جذب CO_2 و فتوستتر بسیار مهم است. ظرفیت فتوستتری یک گیاه اساساً به وسیله سطح برگ کل و فعالیت فتوستتری برگ‌های منفرد

تعیین می‌گردد. هنگامی که گیاهان در معرض خشکی قرار می‌گیرند مقدار فتوسنتز آن‌ها کاهش می‌یابد. عوامل محدودکننده فتوسنتز در شرایط تنش آبی به دو گروه عوامل روزنه‌ای و عوامل غیر روزنه‌ای تقسیم می‌شوند. کاهش هدایت روزنه‌ای در اثر بسته شدن روزنه‌ها، به کاهش انتشار دی‌اکسید کربن به فضای بین سلولی منجر می‌شود (بلوم، ۱۹۹۶). مورد دیگری که اتفاق می‌افتد عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد اکسیژن و آنتی‌اکسیدان‌هاست که باعث تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و به دنبال آن ایجاد تنش اکسیداسیونی در پروتئین‌ها، چربی‌های غشاء و سایر اجزاء سلولی می‌شود (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹).

انتقال مواد فتوسنتزی نیز تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفته و موجب اشباع شدن برگ‌ها از این مواد می‌شود. این امر می‌تواند فتوسنتز را محدود سازد (شکل ۱-۲). همچنین، تنش آبی می‌تواند با کاهش سطح برگ موجب کاهش فتوسنتز شود. تنش خشکی ضمن کاهش سطح برگ، پیری آن‌ها را هم تسریع نموده و بدین وسیله می‌تواند میزان تولید را، خیلی بیشتر از آنچه به علت اثرات ناشی از کاهش شدت فتوسنتز خالص تقلیل می‌یابد، کاهش دهد. برای مثال، تنش خشکی به میزانی که شدت جذب خالص را فقط ۵۰ درصد کاهش دهد، کافی است که رشد برگ‌ها را کاملاً متوقف نماید. این موضوع نمایانگر آن است که سطح برگ‌ها بیشتر از شدت جذب خالص تحت تأثیر تنش کمبود آب قرار می‌گیرد (تایز و زایگر، ۲۰۰۶).



شکل ۱-۲-نمای طرح‌واره‌ای از فتوسنتز تحت تنش خشکی (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹)

تنش خشکی میزان فتوسنتز را از طریق عوامل غیر روزنه‌ای، از جمله تغییرات فعالیت آنزیم‌ها نیز کاهش می‌دهد. در شرایط تنش شدید خشکی میزان فتوسنتز به علت کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو کاهش پیدا می‌کند (فلیکس^۱ و همکاران، ۲۰۰۴).

^۱. Flexas

سطح آنزیم رویسکو در برگ‌ها از طریق سنتز و تجزیه آن تنظیم می‌گردد. تحت تنش خشکی هولو آنزیم رویسکو نسبتاً پایدار باقی می‌ماند (هوکسترا^۱ همکاران، ۲۰۰۱) اما تحت تنش خشکی گزارش شده است که رونوشت‌های ژن زیر واحد کوچک آنزیم رویسکو کاهش می‌یابد که نشانگر کاهش فراوانی این آنزیم تحت تنش خشکی است (وو^۲، همکاران ۱۹۹۹). گزارش شده است که تحت تنش خشکی فعالیت آنزیمی رویسکو در توتون^۳ به خاطر اتصال بازدارنده‌ها^۴ کاهش پیدا می‌کند (پاری^۵ و همکاران، ۲۰۰۱). تحت تنش خشکی سرعت کاتالیز ریبولوز ۱ و ۵ بی فسفات توسط رویسکو، فعالیت فروکتوز بی فسفات و کارایی کوانتومی فتوسیستم دو کاهش پیدا می‌کند (زو^۶ همکاران، ۲۰۰۷).

آنزیم‌های دیگر دخیل در فرآیند فتوسنتز شامل فسفو انول پیرووات، آنزیم آدنین دی فسفات دی نوکلئوتید فسفات - مالیک، فروکتوز ۱ و ۶ بیس فسفات و پیرووات ارتو فسفات دی کیناز تحت تنش به صورت خطی با کاهش پتانسیل آب برگ‌ها کاهش پیدا می‌کنند. میزان کاهش پیرووات ارتو فسفات دی کیناز تحت تنش خشکی ۹/۱ برابر می‌باشد بنابراین به نظر می‌رسد که این آنزیم تحت تنش خشکی، آنزیم محدود گر فتوسنتز می‌باشد چراکه نسبت به بقیه آنزیم‌ها که میزان کاهش آن‌ها ۲ تا ۴ برابر است، این آنزیم بیشتر کاهش پیدا می‌کند (دوپسانی^۷ همکاران، ۱۹۹۸).

در مطالعه‌ای روی برگ انگور در شرایط تنش خشکی مشاهده شد که کاهش فتوسنتز هم ناشی از کاهش جذب دی اکسید کربن و هم به دلیل کاهش فعالیت آنزیم‌ها است (چاوز و همکاران، ۲۰۰۲). قادری و همکاران (۱۳۸۵) با بررسی هدایت روزنه‌ای برگ انگور دریافتند که در شرایط تنش خشکی، میزان دی اکسید کربن زیر روزنه‌ای ابتدا کاهش و سپس افزایش یافت. کاهش اولیه دی اکسید کربن به دلیل بسته بودن روزنه‌ها و افزایش بعدی آن به دلیل عدم مصرف دی اکسید کربن در فرایند فتوسنتز بود. بنابراین، تنش خشکی علاوه بر کاهش هدایت روزنه‌ای، از طریق مکانیسم‌های درونی برگ از تثبیت دی اکسید کربن موجود نیز جلوگیری می‌نماید. کاهش اولیه فتوسنتز در نتیجه بسته شدن روزنه‌ها می‌باشد، اما تنش طولانی و شدید آب می‌تواند منجر به تخریب کلروپلاست و فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی نظیر رویسکو گردد (ماراچی و همکاران، ۱۹۹۴).

۳-۲-۲- فلورسانس کلروفیل

یکی از پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاهان به تنش خشکی تغییر در فلورسانس کلروفیل است که به علت سهولت اندازه‌گیری در مزرعه، ارزان و غیر تخریبی بودن، یکی از روش‌های مفید برای ارزیابی تحمل ژنوتیپ‌های مختلف به تنش‌ها است. امروزه فلورسانس کلروفیل به عنوان معیار سنجش برای اندازه‌گیری تأثیر تنش‌های محیطی، از جمله تنش خشکی بر گونه‌های باغی و میزان مقاومت آن‌ها به تنش خشکی پیشنهاد شده است (موفات و همکاران، ۱۹۹۰). فلورسانس کلروفیل به عنوان شاخص فعالیت فتوسیستم II شناخته شده است و تنش خشکی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (فرناندز و همکاران، ۱۹۹۷). در حقیقت مقدار فلورسانس

¹.Hoekstra

². Vu

³. *Nicotiana tabacum*

⁴.Inhibitors

⁵. Parry

⁶. Zhou

⁷.Du 'Pisani

کلروفیل، سالم بودن غشای تیلاکوئید و کارایی نسبی انتقال الکترون را از فتوسیستم II به فتوسیستم I نشان می‌دهد. وقتی مولکول‌های کینون (اولین کینون گیرنده الکترون فتوسیستم II^{۱۶} در وضعیت کاملاً اکسید شده (وضعیت باز مرکز واکنش فتوسیستم II) هستند، سیستم دارای کمترین فلورسانس (F₀) است که به تدریج با افزایش احیا شدن این مولکول‌ها، فلورسانس افزایش می‌یابد. این روند تا احیای کامل مولکول‌های آن ادامه پیدا می‌کند. در چنین حالتی مرکز فتوسیستم در حالت احیای کامل بوده، دارای بیشترین فلورسانس (F_m) است. درواقع، تنش خشکی، ظرفیت پذیرش و انتقال الکترون را کاهش داده، در نتیجه سیستم به سرعت به F_m می‌رسد که نتیجه آن کاهش فلورسانس متغیر (F_m-F₀=F_v) خواهد بود. کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II به صورت نسبت فلورسانس متغیر به فلورسانس ماکزیم (F_v/F_m) بیان می‌شود. تنش‌های محیطی با تأثیر بر فتوسیستم II باعث کاهش این نسبت می‌شوند (مائ و همکاران، ۱۹۹۵). با استفاده از پارامترهای فیزیولوژیکی شامل: فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، تعرق، فلورسانس کلروفیل و روابط آبی برگ، واکنش پایه‌های رویشی سیب مطالعه گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که پایه (M9) EMLA متحمل، پایه (MM111) دارای تحمل متوسط و پایه (Mark) حساس به خشکی است. فرناندز و همکاران (۱۹۹۷) مطالعه درختان دوساله سیب رقم "گیل گالا" پیوند شده بر روی دو گونه *Malus sieversii* و *Malus hupehensis* به عنوان پایه تحت تنش خشکی نشان داد که نسبت رشد، فتوسنتز، بیوماس کل، سطح برگ، میزان کلروفیل، محتوی نسبی آب برگ و کارایی مصرف آب در نهال‌های سیب پیوند شده بر روی پایه *Malus sieversii* بیشتر از گونه دیگر بود (لی و همکاران، ۲۰۱۲). تنش غرقابی باعث تغییرات شاخص فلورسانس کلروفیل (F_v/F_m) در نارنگی انشو پیوند شده بر پایه‌های مختلف گردید. در کل دوره غرقاب پایه گوتو بیشترین و پایه نارنج کمترین میانگین شاخص فلورسانس را نشان دادند (اسدی و همکاران، ۱۳۹۱).

۴-۲-۲- رنگیزه های فتوسنتزی

تنش کم آبی موجب تخریب رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، کاهش مقدار کلروفیل برگ و تخریب تشکیلات فتوسنتزی می‌گردد (کرناک^{۱۷} همکاران، ۲۰۰۱).

مولکول‌های کلروفیل نوع *a* و *b* در کنار کاروتنوئیدها (کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها) مهم‌ترین رنگیزه‌های جذب کننده نور در گیاهان عالی هستند (اسچیر، ۲۰۰۴) و حضور آن‌ها برای تبدیل انرژی نورانی به انرژی شیمیایی ذخیره شده در ناقل‌های الکترون، ضروری است گزارش گردیده که تنش خشکی در گیاهان باعث پیری زودرس، شکسته شدن کلروپلاست و تجزیه کلروفیل در اثر افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز می‌گردد (تایز و زایگر، ۲۰۰۶). محتوای رنگیزه های فتوسنتزی به عنوان نشانگر مهم تنش خشکی در بسیاری از گونه‌های گیاهی مطرح می‌باشد. مشخص شده است که کلروفیل و پرولین از پیش ماده مشترک (گلوتامات) ساخته می‌شوند. در شرایط خشکی میزان پرولین برگ افزایش پیدا می‌کند و شاید یکی از دلایل کاهش میزان کلروفیل افزایش سنتز پرولین باشد (خالید و همکاران، ۲۰۱۰). خشکی نه تنها باعث آسیب به رنگ‌دانه‌ها می‌گردد بلکه باعث به هم ریختگی غشاهای تیلاکوئید ها می‌گردد (لادجال، ۲۰۰۰). بر اساس تعدادی از گزارشات در زمان تنش خشکی باید کاهش محتوای کلروفیل را انتظار داشت (اورتگا، ۱۹۸۴) البته کولشرشتا و همکاران (۱۹۸۷) گزارش نمود که محتوای کلروفیل تحت تأثیر

¹. Primary quinone Electron acceptor of photosystem II

¹. Kirnak

تنش خشکی قرار نگرفت و در برخی گزارش ها با ایجاد تنش خشکی میزان محتوای کلروفیل افزایش یافت (استیل، ۱۹۹۱؛ هاماداو الحکیمی، ۲۰۰۱). اشرف (۱۹۹۱) افزایش محتوای کلروفیل در برخی ژنوتیپ های گندم را که تحت تنش خشکی قرار داشتند گزارش نمودند. تنش خشکی کوتاه مدت باعث عدم کاهش در میزان کلروفیل در گندم و افزایش در نسبت کلروفیل a/b در گندم (اشرف و همکاران، ۱۹۹۴) شد. افزایش فعالیت آنزیم های کلروفیلاز (ماجومدارو همکاران، ۱۹۹۱) و کاهش فعالیت پراکسیداز (اشرف و همکاران، ۱۹۹۴) از عوامل مؤثر در کاهش کلروفیل در شرایط تنش خشکی ذکر شده اند.

کاهش میزان کلروفیل برگ تحت شرایط تنش خشکی در تعداد زیادی از درختان میوه نظیر گلابی (جوادی و ارزانی، ۱۳۸۲) بادام (ایساکیدیس و همکاران، ۲۰۰۴) سیب (سیرسلج و همکاران، ۲۰۰۷؛ علیزاده و همکاران، ۲۰۱۱)، زیتون (گوئرفل و همکاران، ۲۰۰۹) و پسته (رنجبرفردویی و همکاران، ۲۰۰۰) گزارش شده است. گزارش های مشابه مبنی بر کاهش کلروفیل در تنش کم آبی در گیاهان زیتون، گندم و بادمجان وجود دارد (سوفو^۱ همکاران، ۲۰۰۴) که علت عمده آن را کاهش سنتز کلروفیل، تخریب کلروفیل پیری زودرس برگ ها و اختلال هورمونی ناشی از تنش کم آبی ذکر کرده اند (کافی، ۱۳۷۴).

۵-۲-۲-تجمع مالون دی آلدئید

تغییرات جزئی در غشاء می تواند در گیاهان به عنوان پیام های حضور تنش باشد و گیاه برای مقابله با این شرایط سطوح آنتی اکسیدان های مختلف آنزیمی مانند سوپر اکسید، کاتالاز، پراکسیداز خود را بالا می برد. تنش خشکی باعث افزایش پراکسیداسیون چربی ها و به دنبال آن کاهش شاخص پایداری غشای سلول در گیاهان مختلف می شود. پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء حاصل تنش اکسایشی است. اسیدهای چرب غیر اشباع حساس ترین بخش غشاء به اکسید شدن و تخریب توسط تنش اکسایشی هستند. تجزیه این اسیدها توسط اکسیژن فعال، تولید ترکیب هایی مانند مالون دی آلدئید کرده که برای سلول ایجاد مسمومیت می کند. مالون دی آلدئید یک آلدئید فعال و ترکیبی الکترون دوست است که به طور معمول به شکل خالص دیده نمی شود، تجمع مالون دی آلدئید، در شرایط تنش سبب افزایش نفوذپذیری غشاء پلاسمایی شده و نشت یونی را افزایش می دهد (فیفاثی و همکاران ۱۳۹۵). وانگ و همکاران (۲۰۱۱)، تأثیر تنش خشکی بر دو پایه مقاوم *Malus sieversii* و حساس سیب *Malus hupehensis* را بررسی کردند و نتیجه گیری نمودند که تحت تأثیر تنش خشکی غلظت مالون دی آلدئید در پایه سیب حساس به خشکی بیشتر از پایه مقاوم است.

وانگ جی و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر تنش خشکی را بر روی دانهالهای سیب گونه *Malus Micromalus* در شرایط درون شیشه ای بررسی کردند. تنش خشکی در این گونه سیب باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز و افزایش غلظت مالون دی آلدئید در برگ دانهالهای سیب تحت تنش گردید و افزایش غلظت مالون دی آلدئید در برگ دانهال ها با نفوذپذیری غشاء سلولی ارتباط مستقیم داشت. کاهش پایداری غشاء سلولی به دلیل پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی به وسیله ی رادیکال های آزاد سوپراکسید و هیدروکسید اتفاق می افتد. افزایش غلظت مالون دی آلدئید با فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز رابطه عکس دارد.

¹. Sofo

شان و همکاران (۲۰۱۴) اثر تنش خشکی را بر روی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دو رقم سیب مقاوم به تنش خشکی (کووین گوان) و حساس به تنش خشکی (ناگانوفوجی) پیوند شده بر پایه مالوس هوپهنسیس بررسی نمودند. آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که تنش خشکی در رقم حساس باعث کاهش فعالیت‌های فیزیولوژیکی برگ و افزایش غلظت مالون دی آلدئید نسبت به رقم مقاوم به تنش خشکی گردید.

۶-۲-۲- پایداری غشاء سلولی

غشاءهای بیولوژیکی اولین هدف بسیاری از تنش‌های غیرزنده می‌باشند. به‌طور کلی پذیرفته شده است که حفظ ثبات غشاءها تحت تنش آبی، جزء اصلی تحمل خشکی در گیاهان است (باجی، ۲۰۰۲). پایداری غشاء سلولی و متقابل آن آسیب به- غشاء سلولی شاخص فیزیولوژیکی است که به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی تحمل به خشکی به کار می‌رود (پرمچاندر، ۱۹۹۱) سلول‌های زنده از غشاهایی تشکیل شده‌اند که ساختمانی پویا داشته و دارای چرخه بازسازی چند ساعته هستند. زمانی که سلول‌ها به شدت پسابیده می‌شوند آماس آن‌ها از بین رفته، پروتوپلاست چروکیده می‌شود. پروتوپلاست در حال خشک شدن با کششی که نتیجه انقباض حجم و چسبیدگی آن به دیواره سلولی است، مواجه خواهد شد. مشاهدات اولیه در مورد گونه‌های متحمل به خشکی نشان داده پروتوپلاسم از دیواره جدا نمی‌شود ولی تا اندازه‌ای چین خورده و حفره‌های کوچک درون دیواره افزایش می‌یابد. در سلول‌های با دیواره ضخیم جدایی موضعی غشای پلاسمایی از دیواره اتفاق می‌افتد. در این شرایط، اگر دیواره نازک باشد ممکن است به پروتوپلاست چسبیده باشد و همراه آن متلاشی شود که به آن سیتوریز گویند و اگر دیواره ضخیم باشد در اثر چروکیدگی پروتوپلاست از آن جدا می‌شود که به آن پلاسمولیز گویند (کافی و همکاران، ۱۳۸۹). در تنش‌های شدید بعضی از قسمت‌های فسفولیپیدهای دولایه ای غشاء حالت هگزاگونال (کروی) و ساختار غشاء به ساختار منفذدار تبدیل می‌شود و نشت مواد روی می‌دهد. میزان خسارت غشاهای سلولی بر اثر تنش خشکی می‌تواند از طریق اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها از سلول سنجیده شود. هاندا و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که پایداری غشاء سلولی در برگ‌ها مهم‌ترین صفت برای غربال‌گری ژرم پلاسم گندم به تحمل خشکی بود. پایداری غشاء سلولی به سرعت در چمن پوآ که به‌طور هم‌زمان در معرض تنش خشکی و گرما قرار گرفته بود، کاهش یافت (وانگ و هونگ، ۲۰۰۴) تغذیه عنصر پتاسیم تحمل به خشکی را در گیاه ذرت بهبود بخشید که به‌طور عمده به علت بهبود یافتن پایداری غشاء سلولی بود (گناناسری و همکاران، ۱۹۹۱). در گیاهچه‌های بلوط همیشه سبز، مقاوم سازی در درجه اول تحمل به خشکی را با کاهش دادن پتانسیل اسمزی و تنظیم روزنه‌ای افزایش داد و ظرفیت رشد ریشه‌های جدید و افزایش پایداری غشاء سلولی را بهبود بخشید. در میان گیاهچه‌های تیمار شده، بیشترین پاسخ در گیاهچه‌های قرار گرفته در معرض مقاوم سازی متوسط رخ داد. دلایل اختلال غشایی ناشناخته است، با وجود این، کاهش در حجم سلولی موجب تراکم و افزایش ویسکوزیته اجزاء سیتوپلاسمی می‌گردد و این شانس تعاملات مولکولی که میتواند موجب تغییر ماهیت پروتئین و فیوژن غشاء شود را افزایش می‌دهد. برای نمونه سیستم‌های پروتئین و غشاء، طیف گسترده‌ای از ترکیبات شناسایی شده است که می‌توانند از این قبیل تعاملات مولکولی مضر جلوگیری نمایند. برخی از این قبیل ترکیبات شامل پرولین، گلو تامات، گلاسیسین بتائین، کارنیتین، مانیтол، سوربیتول، فراکتان‌ها، پلی‌اول‌ها، ترهالوز، سوکروز و الیگوساکاریدها می‌باشد (فولکرت و همکاران، ۲۰۰۱). از

طرفی ذکر شده که نشت یون از سلول ممکن است به خاطر گرمای ناشی از بازدارندگی آنزیم‌های متصل به غشاء مسئول در حفظ شیب شیمیایی داخل سلول باشد (رینولدز و همکاران، ۲۰۰۱).

۱-۳-تنظیم اسمزی در واکنش به تنش خشکی

با تجمع مواد محلول، پتانسیل اسمزی سلول کاهش یافته و باعث جذب آب به سلول و حفظ حالت تورژسانس سلولی و افزایش رشد در شرایط تنفس می‌شود. تنظیم اسمزی سلول صفت بسیار مهمی در نگهداری آب و جلوگیری از صدمات حاصل از کمبود آب سلول شده و باعث دوام فعالیت‌های فیزیولوژیکی و رشد سلولی در شرایط تنش می‌شود (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹).

طی این پدیده فیزیولوژیکی، سلول‌های گیاه بدون این که توقفی در متابولیسم عادی آن‌ها ایجاد شود، غلظت برخی از یون‌ها (مانند پتاسیم، سدیم، کلسیم، نیتрат و کلر) را در واکوئل و نیز برخی متابولیت‌ها نظیر اسیدهای آمینه (به خصوص پرولین)، قندها (به‌ویژه مونوساکاریدها)، پلی‌اول‌ها (قندهای الکلی مثل سوربیتول و مانیتول)، پلی‌آمین‌ها، ترکیبات آمونیومی چهارتایی (خصوصاً گلايسن بتائن) پروتئین‌های خاص و اسیدهای آلی (عمدتاً مالات و سترات) را در سیتوسول خود افزایش می‌دهند و بدین ترتیب، با کاهش پتانسیل اسمزی، فشار تورژسانس (آماس) سلول‌ها در سطح بالا حفظ شده و ادامه فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه ممکن می‌گردد (پتريدیس و همکاران، ۲۰۱۲). حفظ آماس سلول، ادامه طویل شدن سلول، بازنگاه داشتن شکاف روزنه‌ها و ادامه فتوسنتز، بقا در هنگام بروز پسابیدگی (دهیدراسیون) و گسترش بیشتر ریشه از مزایای پدیده تنظیم اسمزی بوده و محدودیت دامنه عمل تنظیم، ناپایداری و کم دوام بودن پدیده تنظیم اسمزی از معایب آن محسوس می‌شود (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). تنش خشکی به همراه شدت نور بالا باعث تجمع سیترویلین، گلوتمات و آرژنین در برگ‌های هندوانه ابوجهل می‌شود و با تنظیم اسمزی سلول‌ها مانع از دست رفتن آب سلول می‌شود. طالبی‌های وحشی در شرایط تنش خشکی با نگهداری آب سلولی، بدون پژمردگی برگ‌هایشان دوام می‌آورند (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹).

اسمولیت‌های دخیل در فرایند تنظیم اسمزی بیشتر آب دوست بوده و می‌توانند قابلیت جایگزینی آب در پروتئین‌ها و غشاء‌ها را داشته باشند. اسمولیت‌های مذکور که در این حالت به‌عنوان «محافظت‌کننده‌های اسمزی» عمل می‌نمایند، نقش کارکردی در گیاه نداشته و تنها نقش پایدار کننده دارند (رامانجولو و بارتلز، ۲۰۰۲)، نتایج آزمایشات متعدد نشان داده است که این مواد در غلظت‌های بالا قادرند اثرات بازدارندگی یون‌های سمی بر فعالیت آنزیم‌ها را کاهش و پایداری آن‌ها را افزایش دهند (پایاجورجیو و موراتا، ۱۹۹۵). به‌طور کلی، دو مدل نظری برای اثرات حفاظتی اسمولیت‌ها ذکر شده است (هوکسترا و بویتنیک، ۲۰۰۱):

۱-مدل بازدارندگی: فرض می‌شود که مواد قابل حل اساساً از حذف آب پوسته پروتئین‌ها ممانعت به عمل آورده و سبب حفظ و پایداری ساختار پروتئین‌ها می‌شوند. در این مدل، اسمولیت‌ها در لایه آبی پیرامون پروتئین اختلال ایجاد نکرده و در مقابل با آب درون سیتوسول فعل و انفعال دارند.

۲- مدل واکنشی: این نظریه جدیدتر است و اشاره بر این دارد که طی کمبود آب اسمولیت ها به طور مستقیم با دنباله آبدوست پروتئین ها واکنش داده و از به هم ریختگی ساختار پایدار آن ها جلوگیری می کنند. حتی در این مدل مطرح می شود که اسمولیت ها قابل جایگزینی با آب در پروتئین ها و غشاء ها هستند.

شاید دو مدل بالا باهم قابل جمع نباشند، اما ممکن است در هر زمان، بسته به نوع اسمولیت و ویژگی های آبدوستی یا آبگریزی و اثرات الکترواستاتیکی آن یکی از این دو مدل وجود داشته باشد.

۱-۱-۳- پرولین

پرولین یکی از اسید آمینه های فعال در پدیده تنظیم اسمزی است که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش به سزایی دارد (سوفو و همکاران، ۲۰۰۴). تجمع پرولین یکی از معمول ترین تغییرات متابولیکی است که تحت تأثیر تنش های مختلف به ویژه تنش خشکی و شوری در گیاهان گزارش شده است (تیلور، ۱۹۹۶؛ طباطبائی، ۱۳۹۲). افزایش ۳ تا ۳۰۰ برابری غلظت پرولین در گونه های مختلف و در پاسخ به سطوح متفاوت تنش اسمزی، گزارش گردیده است (دلآونی و ورما، ۱۹۹۳). پرولین پایدارترین اسید آمینه در میان اسیدهای آمینه است و نیز حداقل بازدارندگی را برای رشد سلول دارد. شاید به همین دلیل بیش از سایر اسیدهای آمینه با شرایط مطلوب سلول مطابقت داشته و در شرایط نامساعد تجمع آن بیشتر است (لویت، ۱۹۸۰). تجمع پرولین در اثر تنش خشکی در نتیجه سنتز پرولین در بافت های مختلف، ممانعت از اکسیداسیون پرولین و جلوگیری از شرکت پرولین در ساخت پروتئین ها می باشد. مشخص شده که تنش خشکی از اکسیداسیون پرولین در میتوکنندری جلوگیری می نماید و نفوذپذیری غشاء های میتوکندریایی را تغییر می دهد (ولکامر همکاران، ۱۹۹۲). با این حال، پرولین به عنوان منبع ذخیره ای از نیتروژن در طی دوره بازیابی نیز به شمار می رود (تیلور، ۱۹۹۶) با وجود این که پرولین به عنوان یکی از تنظیم کننده های پتانسیل آب بافت طی دوره خشکی شناخته می شود، ولی چون در بافت های گیاهان در اثر تنش های مختلف تولید می شود یا تجمع پیدا می کند، شاخص مناسبی برای تعیین بردباری گونه های گیاهی به کم آبی لحاظ نمی شود (ناتالی و همکاران، ۱۹۸۵). اگرچه پرولین در همه اندام های گیاه کامل در طی تنش خشکی تجمع می یابد، ولی سریع ترین انباشت را در برگ ها دارد (حکمت شعار، ۱۳۷۲). نقش دقیق پرولین به عنوان یکی از معیارهای تحمل به خشکی گیاهان، هنوز مورد مباحثه جدی قرار دارد (تامایو و بونچ، ۲۰۰۳؛ برتامینی و همکاران، ۲۰۰۶). سنتز پرولین در برگ ها تحت شرایط پتانسیل آبی کم، ناشی از افزایش بیوسنتز و اکسیداسیون آهسته آن در میتوکنندری می باشد.

پرولین در سیستم برگی تجمع پیدا می کند. در حالت عادی، حدود ۸٪ پرولین ساخته شده در سلول های گیاهان تجزیه می شود، در حالی که در شرایط تنش خشکی ملایم، تجزیه شدن آن به ۴/۷٪ کاهش می یابد (رودس و همکاران، ۱۹۸۶). دلیل تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش خشکی افزایش سنتز پرولین (در اثر کاهش اکسیداسیون گلوتامات) و نیز کاهش مصرف آن برای ساخته شدن پروتئین ها (به خاطر توقف رشد گیاه) می باشد (لارهر و همکاران، ۲۰۰۹). هنگامی که پتانسیل آب برگ به زیر حد آستانه لازم برای رشد آن رسیده باشد، تجمع پرولین در گیاه شروع می شود و در بالای حد آستانه تغییرات پرولین اندک

است. گزارش شده است که تجمع پرولین عموماً وقتی شروع می‌شود که تنش آبی به حدی شدید باشد که رشد متوقف و روزه‌ها بسته‌شده باشند (گیروس و همکاران، ۱۹۹۶).

به‌منظور انتخاب ارقام مقاوم، اثر تنش خشکی برعکس العمل‌های بیوشیمیایی برخی از ارقام زیتون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج دلالت بر تأثیر معنی‌دار شدن تنش خشکی بر میزان پرولین برگ داشت. پس از آبیاری میزان پرولین به مقدار زیادی کاهش نشان داد. چنین کاهشی احتمالاً از ناپایداری پرولین ناشی می‌شود (ارجی و ارزانی، ۱۳۸۲).

۲-۱-۳- قندها

قندهای محلول گروه دیگری از اسمولیت‌ها هستند که تجمع آن‌ها با مقاومت گیاهان به خشکی در ارتباط می‌باشد (هوکسترا و بوییتنیک، ۲۰۰۱). قندهای محلول نظیر سوکروز، گلوکز، فروکتوز و سوربیتول در شرایط تنش خشکی تجمع یافته و ممکن است به‌عنوان عامل اسمزی و یا محافظ اسمزی عمل نمایند. این قندها در حالت اول، با تنظیم اسمزی و نگهداری تورژسانس سلول‌ها و در حالت دوم، با حفظ پایداری پروتئین‌ها و غشاءها در ارتباط می‌باشند (اینگرام و بارتلز، ۱۹۹۶). دو راهکار برای نقش حفاظتی قندها در تنش خشکی پیشنهاد شده است (لئوپولد و همکاران، ۱۹۹۴): اول این که گروه‌های هیدروکسیل قندها جایگزین آب غشاءها و پروتئین‌ها می‌شود تا واکنش‌های آبدوستی در طی پسابیدگی حفظ شود. در این راهکار قندها با غشاءها و پروتئین‌ها پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهند و از تغییر شکل آن‌ها جلوگیری می‌کنند. دوم این که قندها یک عامل مهم در پدیده شیشه‌ای شدن (یعنی تشکیل نوعی شیشه بیولوژیکی در سیتوپلاسم سلول‌هایی که آب خود را از دست داده‌اند) هستند. این شیشه‌های درون‌سلولی به دلیل ویسکوزیته بالای خود حرکات و انتقالات مولکولی را به‌شدت محدود می‌کنند و از انتشار اجزای فعال واکنش‌زا در سلول ممانعت کرده و در نتیجه، در حفظ ساختار و کارکرد ماکرومولکول‌ها نقش ایفا می‌کنند. این شیشه‌ها از طریق کاهش سرعت فرایندهای تجزیه مواد در بافت‌هایی که دچار پسابیدگی شده‌اند باعث افزایش طول عمر آن‌ها می‌شوند.

تنظیم اسمزی از طریق تجمع قندهای محلول به‌عنوان یکی از مکانسیم‌های مقاومت به تنش خشکی در تعداد زیادی از درختان میوه مورد مطالعه قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، مشخص شده است که درخت سیب به هنگام مواجهه با تنش خشکی، میزان نشاسته و سوکروز را در برگ‌های بالغ خود کاهش داده و میزان سوربیتول را افزایش می‌دهد. تجزیه سوکروز به گلوکز و فروکتوز در شرایط تنش، زمینه مناسبی را برای سنتز سوربیتول فراهم می‌کند. قند سوربیتول پس از انتقال به برگ‌های جوان تبدیل به فروکتوز می‌شود (ونگ و برنو، ۱۹۹۶). در بررسی میزان قندهای محلول در برگ، ساقه و ریشه سیب رقم جان‌اتان تحت شرایط تنش خشکی بیشترین مقدار کربوهیدرات‌های محلول به ترتیب در برگ‌های بالغ، برگ‌های جوان، ساقه و ریشه مشاهده شد. قند سوربیتول یکی از اجزای اصلی قندهای محلول بوده به‌طوری‌که ۷۳ درصد قندهای محلول برگ‌های بالغ و ۵۳ درصد قندهای محلول برگ‌های جوان را تشکیل می‌داد. در ریشه‌ها با افزایش مقدار تنش آبی از درصد سوربیتول کاسته شد. از طرفی مقدار سوکروز در برگ‌های جوان و ریشه افزایش پیدا کرد، ولی در برگ‌های بالغ کاهش یافت (ونگ و استات، ۱۹۹۹).

۳-۱-۳- اثرات تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان

بسته شدن روزنه‌ها طی تنش خشکی معمولاً تثبیت دی‌اکسید کربن را کاهش داده، زنجیره انتقال الکترون را مختل می‌سازد و باعث تولید مقادیر زیادی از گونه‌های واکنشگر اکسیژن در کلروپلاست و میتوکندری می‌شود. گونه‌های واکنشگر اکسیژن که محصولات فرعی متابولیسم هوازی در سلول هستند، دارای نقش‌های مثبتی می‌باشند، برای مثال، در مسیر انتقال پیام، به‌عنوان پیام‌رسان‌های ثانویه تنش عمل نموده و باعث فعال شدن چندین واکنش دفاعی می‌شوند (سوفو و همکاران، ۲۰۰۵)، اما تولید بیش از حد آن‌ها طی تنش خشکی به بروز تنش اکسایشی در گیاه منجر می‌گردد (آرورا و همکاران، ۲۰۰۲). گونه‌های واکنشگر اکسیژن از جمله رادیکال‌های سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، اکسیژن اتمی (O_2) و هیدروکسیل ($HO^{\cdot}$) از طریق صدمه اکسیداتیو به لیپیدهای غشاء پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، رنگیزه‌ها و آنزیم‌های فتوسنتزی متابولیسم عادی سلول و گیاه را مختل می‌سازند (اوزکور و همکاران، ۲۰۰۹).

گیاهان برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد اضافی و کاهش آسیب ناشی از تنش اکسایشی بر سلول‌ها به انواع مکانیسم‌های دفاعی آنتی اکسیدان (آنزیمی و غیر آنزیمی) مجهز شده‌اند (لیو و همکاران، ۲۰۱۱). مهم‌ترین آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی عبارت‌اند از اسید آسکوربیک، آلفا-توکوفرول و گلوتاتیون احیاء شده می‌باشند. علاوه بر این، کاروتنوئیدهایی نظیر بتا-کاروتن و زانتوفیل‌ها که به‌عنوان گروهی از ترکیبات آنتی اکسیدان غیر آنزیمی مطرح هستند، می‌توانند با از بین بردن رادیکال‌های آزاد باعث پایداری بیشتر مراکز فتوسنتزی شوند (مانه-بوش و پنولاس، ۲۰۰۴). سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز یا گایکول پراکسیداز، پلی‌فل اکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی اکسیدان موجود در سلول‌های گیاهان می‌باشند (زو و همکاران، ۲۰۰۸). سوپراکسید دیسموتازها که اولین عامل دفاعی در برابر گونه‌های واکنشگر اکسیژن محسوب می‌گردند، باعث تبدیل سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی (O_2) می‌شوند. سه آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایکول پراکسیداز مولکول‌های پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل کرده، خاصیت واکنشگری آن‌ها را خنثی می‌سازند (ونگ و همکاران، ۲۰۰۹).

تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان حائز اهمیت ویژه‌ای بوده و تعیین می‌کند که آیا فرایند پیام‌رسانی و یا آسیب اکسیداتیو اتفاق خواهد افتاد (مولرو همکاران، ۲۰۰۷). توانایی گیاهان در از بین بردن گونه‌های واکنشگر اکسیژن و کاهش اثرات مضر آن‌ها ممکن است با تحمل آن‌ها در برابر تنش خشکی ارتباط داشته باشد (تسوگان و همکاران، ۱۹۹۹). علاوه بر این، گیاهان بسته به شدت و طول دوره تنش، گونه گیاهی و مرحله نموی آن، واکنش‌های متفاوتی در برابر تنش خشکی بروز می‌دهند (داکوستا و هوانگ، ۲۰۰۷).

در منابع علمی، وجود رابطه تنگاتنگ بین فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی اکسیدان و مقاومت بالا به تنش خشکی در بسیاری از گیاهان زراعی و باغبانی گزارش شده است. به‌عنوان مثال، عابدی و پاک‌نیت (۲۰۱۰) تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در واکنش به تنش خشکی را در برگ‌های ۱۰ رقم کلزا بررسی نموده و مشاهده کردند که تحت شرایط تنش خشکی فعالیت دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز افزایش و فعالیت کاتالاز کاهش یافت. سوفو و همکاران (۲۰۰۵) فعالیت چهار آنزیم

مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و گلوکاتیون ردوکتاز در برگ‌های تعدادی از دو رگ‌های بین گونه ای جنس پرونوس را تحت شرایط تنش خشکی مورد مطالعه قرار داده و مشاهده نمودند که در همه دورگ‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان با افزایش شدت تنش افزایش و با آبیاری مجدد درختان دوباره کاهش یافت. در آزمایش دیگری که توسط لیو و همکاران (۲۰۱۱) روی ۶ گونه چوبی، شامل ۴ درخت و ۲ درختچه انجام گرفت، سطوح بالای تنش خشکی باعث کاهش شدید فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گونه‌های درختی شد، اما فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در دو گونه درختچه ای و فعالیت پراکسیداز در یکی از گونه‌های درختی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین، رابطه مثبتی بین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و محتوای مواد محلول اسمزی (پروлін و کربوهیدرات‌های محلول) مشاهده گردید. نتایج این آزمایش نشان داد که دو گونه درختچه ای به دلیل ظرفیت بالای تنظیم اسمزی و محافظت آنتی اکسیدانی، در مقایسه با گونه‌های درختی مقاومت بیشتری به خشکی داشتند. رابطه بین مقاومت به خشکی و فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی اکسیدان در تعداد دیگری از گونه‌های درختی از جمله توت سفید (ردی و همکاران، ۲۰۰۴) زیتون (بن احمد و همکاران، ۲۰۰۹) و کیوی (ونگ و همکاران، ۲۰۱۱) به اثبات رسیده است. بیشتر گیاهان، از جمله درختان خزان دار، از اجدادی تکامل یافته اند که در اکوسیستم های طبیعی رشد کرده اند. بنابراین دارای گونه‌های هستند که مرحله انتخاب طبیعی را طی کرده و خصوصاً در بعضی شرایط به کمبود آب مقاوم می باشند (موسوی، ۱۳۷۱).

۴-۱-۳- اثر تنش خشکی بر رشد گیاه

رشد گیاه ناشی از اثرات متقابل فرایندهای درونی گیاه از قبیل فتوسنتز، تنفس، انتقال، روابط آبی، میزان تورژسانس و تعادل عناصر غذایی می‌باشد (تایز وزایگر، ۲۰۰۶). میزان کاهش رشد یکی از صفات اساسی در مورد مطالعه در تنش‌های خشکی است و رابطه مهمی با میزان مقاومت یا حساسیت گیاه دارد (لویت، ۱۹۸۰). اساساً رشد به دو طریق کاهش می‌یابد. ۱- کاهش میزان دسترسی به کربوهیدرات‌ها و ۲- کاهش آماس سلول به صفر. کاهش رشد طولی سلول حساس‌ترین پاسخ گیاهان به تنش خشکی می‌باشد؛ زیرا رشد طولی سلول در ارتباط با آماس سلولی بوده و آماس سلول با کاهش پتانسیل آب سلول کاهش می‌یابد (زیدان و همکاران، ۱۹۹۰). عکس العمل بافت‌ها و اندام‌های مختلف نسبت به افت پتانسیل آب یکسان نبوده و مشخص شده است که رشد ریشه‌ها کمتر از شاخه‌ها تحت تأثیر قرار گرفته و منجر به افزایش نسبت ریشه به شاخه می‌شود. این مسئله به دلیل حساسیت کمتر ریشه‌ها نسبت به آب‌سبزیک اسید است. از طرفی رشد شاخه و برگ‌ها کاهش یافته، بنابراین مواد اندوخته ای زیاده‌تری در اختیار ریشه قرار می‌گیرد (بلوم، ۱۹۹۶).

یکی از مهم‌ترین اثرات کمبود آب طی فصل رویشی کاهش رشد سبزینه ای گیاهان است. ارجی و همکاران (۱۳۸۱) دریافتند که با افزایش تنش آب میزان سطح رویشی اعم از تعداد و سطح برگ نهال‌های جوان زیتون کاهش نشان داد. کاهش سطح رویشی سبب می‌شود تا توانایی گیاه برای جذب نور و در نهایت تولید مواد فتوسنتزی کاهش یابد که خود دلیلی بر کاهش وزن اندام‌ها می‌باشد. چارترزولاکیس و همکاران (۲۰۰۲) با اعمال تنش خشکی ملایم به مدت ۶ ماه روی دو رقم آواکادوی فوئرتو هاوس کاهش چشمگیری را در قطر تنه آن‌ها (به ترتیب، ۳۴ و ۳۹ درصد) مشاهده نمودند. به علاوه در هر دو رقم، کاهش معنی‌داری در سطح برگ کل (به ترتیب ۵۷ و ۶۹ درصد) و وزن خشک کل گیاه (به ترتیب ۶۳ و ۸۰ درصد) مشاهده شد. گیاهان

تحت تنش خشکی برگ‌های کوچک تر و وزن مخصوص برگ کمتری در هر دو رقم داشتند. گذشته از این، در اثر تنش آبی، زیست توده ریشه‌ها در هر دو رقم کاهش یافت و آسیب قابل مشاهده ای در سیستم ریشه آن‌ها حاصل شد. رومرو و همکاران (۲۰۰۴) طی یک آزمایش چهارساله، اثر رژیم های مختلف آبیاری را بر رشد و عملکرد درختان بالغ بادام بررسی نموده و مشاهده کردند که رابطه تنگاتنگی بین میزان آبیاری، وضعیت آب گیاه (پتانسیل آب قبل از طلوع آفتاب) و شاخص‌های رشد (میزان رشد تنه شاخه های جانبی، حجم تاج و وزن بخش هرس شده هر درخت) وجود دارد. تنش آبی باعث کاهش رشد و اندازه درختان در مقایسه با شاهد گردید. علاوه بر این، تنش آبی طی دوره پر شدن مغز، باعث کاهش معنی‌داری در اندازه برگ‌ها و تحریک ریزش زودهنگام آن‌ها گردید. در آزمایشی که توسط نوزو و همکاران (۱۹۹۷) در ایتالیا روی رشد و عملکرد درختان آبیاری شده و آبیاری نشده زیتون رقم کراتینا صورت گرفت، کمبود آب به کاهش سطح برگ درختان منجر شد. طی سه سال متوالی آزمایش، سطح برگ درختان آبیاری شده به ترتیب ۳۷، ۳۸ و ۲۹ درصد بیشتر از درختان تحت تنش بود. همچنین، وزن خشک نهائی گیاهان آبیاری شده حدود ۳۰ درصد بیشتر از آبیاری نشده ها بود. نتایج آزمایشی بر روی نهال‌های تازه جوانه زده بادام نشان داد که با افزایش دور آبیاری، صفات رویشی نظیر ارتفاع گیاه، قطر ساقه، تعداد میانگره، تعداد شاخه های فرعی، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی و ریشه کاهش معنی‌داری داشت (موسوی و همکاران، ۱۳۸۸). رضایی و همکاران (۱۳۸۶) در بررسی سطوح مختلف رطوبتی روی برخی صفات رشد شامل ارتفاع بوته، تعداد گره، سطح برگ، تعداد برگ و وزن خشک برگ در پنج رقم انگور گزارش نمودند که در همه ارقام با افزایش شدت تنش، پارامترهای رشد کاهش پیدا کردند و میزان کاهش در ارقام مختلف، متفاوت بود. در آزمایش دیگری که اثر رژیم های رطوبتی مختلف بر نهال‌های بادام ایرانی مورد بررسی قرار گرفت، با افزایش فواصل آبیاری سطح برگ، طول شاخه، وزن خشک ساقه و ریشه کاهش پیدا نمود (زمانی و همکاران، ۲۰۰۲). جلیلی مرندی و همکاران (۱۳۹۰) گزارش نمودند که تنش آبی روی کلیه پارامترهای رشد در سه رقم انگور تأثیر داشت و با کاهش میزان آب خاک، ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد برگ، سطح برگ، وزن تر و خشک برگ و ساقه و وزن خشک ریشه کاهش یافت. تورسیلاس و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که تنش خشکی رشد شاخساره زردآلو را کاهش داد و باعث کاهش معنی دار در وزن خشک ساقه، برگ و کل گیاه گردید.

۴-ارزیابی نشانگرها

پس از اعمال تیمارهای خشکی، ویژگی‌های فیزیولوژیکی، مرفولوژیکی بیوشیمیایی و رشدی ذیل که بر اساس گزارشات رابطه نزدیکی با درجاتی از مقاومت و یا تحمل به خشکی در گیاهان دارند.

۴-۱- نشانگرهای فیزیولوژیکی

الف- فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm)

میزان فلورسانس کلروفیل مبداء (F_0) فلورسانس ماگزیم (F_m)، فلورسانس متغیر ($F_v = F_m - F_0$) و شاخص فلورسانس کلروفیل (FV/FM)، پس از پوشانیدن سطح برگ با فویل آلومینیومی به مدت نیم ساعت با استفاده از دستگاه فلوریمتر (مدل OS-30P) از ساعت ۹ تا ۱۱ صبح اندازه گیری می‌شود (شکل ۱-۲ ب).

ب- شاخص سبزینگی

شاخص سبزینگی در پنجمین برگ هر گیاه از سمت نوک شاخه و با استفاده از دستگاه Spad (مدل GCM-200) قرائت می شود (شکل ۱-۲ ج).

ج- پایداری غشاء سلولی

شاخص پایداری غشاء سلولی بر اساس روش سایرام^{۱۹} و همکاران ۱۹۹۴ محاسبه می شود، بر اساس این روش دو گروه نمونه آماده می شوند. در هر گروه ۰/۱ گرم از نواحی مشابه برگ در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر قرار داده می شود. لوله های گروه اول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد درون حمام آب گرم قرار داده شده و سپس هدایت الکتریکی (EC) آن توسط دستگاه EC متر (Walk lab مدل TRANS INSTRUMENTS) خوانده می شود (C₁)، لوله های گروه دوم به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده می شوند و پس از سرد شدن نمونه ها هدایت الکتریکی آنها نیز اندازه گیری می شود (C₂)، سپس شاخص پایداری غشاء سلولی بر اساس رابطه زیر اندازه گیری می شود. $MSI=[1-(C_1/C_2)] \times 100$.

پ- صفات فتوسنتزی

در دو نوبت (۳ هفته و ۹ هفته پس از شروع تنش) صفات فیزیولوژیکی شامل: فتوسنتز (A) (میکرو مول CO₂ بر مترمربع بر ثانیه)، هدایت روزنه ای (gs) (میلی مول بر مترمربع بر ثانیه)، تعرق (E) (میلی مول آب بر مترمربع بر ثانیه)، Co₂ زیر روزنه ای (میلی مول)، کارایی مصرف آب با تقسیم فتوسنتز بر تعرق (A/E)، هدایت مزوفیلی (MC) از تقسیم مقدار فتوسنتز بر میزان CO₂ زیر روزنه ای (Bassett, 2013) و دمای سطح برگ با استفاده از دستگاه فتوسنتز متر (مدل LCI شرکت UK-ABC) در روزهای آفتابی (از ساعت ۱۰ تا ۱۲) اندازه گیری و محاسبه می شود (شکل ۲-۲)، دمای درون تاج با استفاده از دماسنج فروسرخ مدل 830-T1 با فاصله ۵۰ سانتی متری از سطح برگ و با قطر میدان اندازه گیری ۶۶ میلی متر اندازه گیری می شود (شکل ۲-۱ د).



شکل ۱-۲ الف- گیاهان گلدانی ب- دستگاه فلوریمتر (مدل OS-30P) ج- دستگاه سنجش سبزینه (مدل GCM-

200) د- دماسنج لیزری مدل (830-T1)

¹.Sairam

صفات طول، عرض و سطح پهنک برگ به کمک یک نرم افزار آنالیز تصویر (Image J، نسخه 1.32) و از طریق عکس برداری از برگ‌ها اندازه‌گیری می‌شود. برای این منظور، در پایان آزمایش، تعداد برگ‌های هر دانهال شمارش شده و سطح برگ کل گیاه محاسبه می‌گردد.

وزن تر و خشک برگ، ساقه، ریشه و کل گیاه و نسبت وزن تر و خشک ریشه به ساقه نیز محاسبه می‌شود. برای اندازه‌گیری وزن خشک، طبق دستورالعمل لیو و همکاران (۲۰۱۱)، نمونه‌های مورد نظر به مدت ۴۸ ساعت در آون الکتریکی با دمای 70°C قرار داده می‌شود.



شکل ۳-الف- اندازه‌گیری سیستم ریشه پایه سیب در شرایط آبیاری شاهد، ب- تحت تنش خشکی وج- سطح برگ

۳-۴-۴- نشاتگرهای بیوشیمیایی

۱-۳-۴-۴- پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء

این آزمایش با استفاده از اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید و بر اساس روش هیث و پاکر^{۲۰} (۱۹۶۸) به‌عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء انجام می‌شود. برای این کار نمونه‌های منجمد به میزان ۰/۲ گرم در ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱ درصد عصاره‌گیری به عمل می‌آید و عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفوژ (NAPCO مدل ۲۰۲۸) به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شود. سپس به یک میلی لیتر از سوسپانسیون صاف شده هر نمونه ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصدی که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید است، اضافه می‌شود و در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار می‌گیرد، بعد از ۳۰ دقیقه لوله‌ها از حمام خارج شده و پس از سرد شدن دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شود. غلظت مالون دی آلدئید با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۵۳۲ خوانده می‌شود. ماده مورد

¹.Heath and Packer

نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز رنگ مالون دی آلدئید- تیو باریتوریک اسید است. جذب بقیه رنگ های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شده و از این مقدار کم می شود. برای محاسبه غلظت مالون دی آلدئید از ضریب خاموشی معادل استفاده می گردد و نتایج حاصل از اندازه گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه می شود

$$(A532-A600)/155 \times 1000 = \text{غلظت مالون دی آلدئید}$$

$$1 \text{ cm}^{-1} \times 155 \text{ mM} = \text{ضریب خاموشی}$$

۲-۳-۴-۴- پرولین

تهیه عصاره و اندازه گیری پرولین آزاد برگ به روش بیتز و همکاران (۱۹۷۳) انجام می شود. برای عصاره گیری، ابتدا ۰/۳ گرم از بافت برگ تازه با ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳٪ (وزن به حجم) در هاون چینی ساییده می شود، سپس نمونه ساییده شده درون لوله آزمایش ریخته و به مدت ۲ دقیقه به شدت تکان داده می شوند. بدین ترتیب، دو فاز جامد و مایع نمونه ها به دقت تفکیک می گردند. فاز مایع با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و بخش بالایی آن جدا می شود.

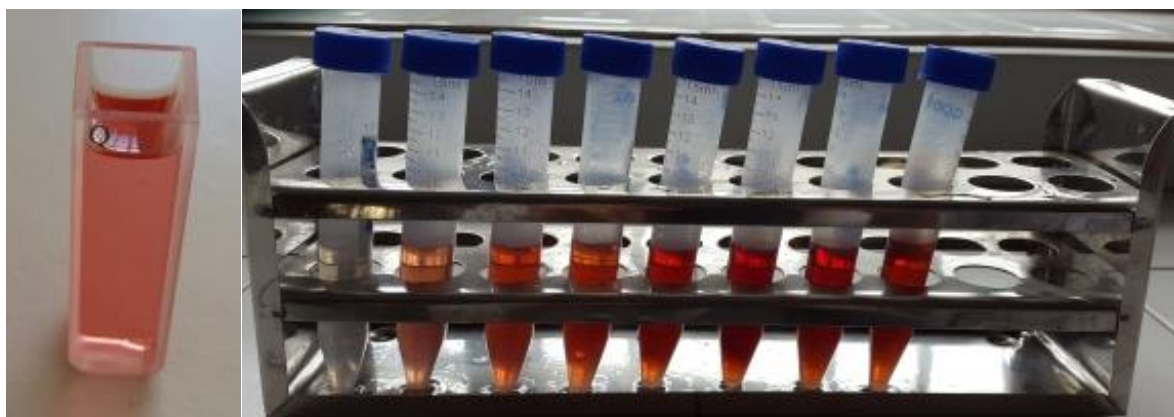
برای اندازه گیری میزان پرولین، مقدار ۲ میلی لیتر از عصاره فوق جدا و داخل لوله آزمایش ریخته می شود. ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به هر یک از نمونه ها اضافه و به هم زده می شود. به هر نمونه مقدار ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و سپس، ۲ میلی لیتر اسید استیک اضافه می گردد. پس از طی مراحل فوق، نمونه ها به مدت ۴۵ دقیقه در داخل بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده می شود. پس از خنک کردن نمونه ها در آب یخ، ۴ میلی لیتر تولوئن به هر نمونه اضافه و به خوبی تکان داده می شود تا پرولین وارد فاز تولوئن شود. سپس، نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه به حال سکون رها می شوند و نهایتاً میزان جذب نور فاز بالایی نمونه تا به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (varian، مدل CARY-100) در طول موج ۵۱۵ نانومتر و با استفاده از تولوئن به عنوان شاهد تعیین می شود. میزان پرولین نمونه های برگ بر حسب میکرومول در گرم وزن تر برگ محاسبه می گردد.

$$\text{وزن نمونه (گرم)} \times \frac{\text{حجم عصاره (میلی لیتر)} \times \text{پرولین عصاره (میکرو گرم در میلی لیتر)}}{(115/5) \times \text{پرولین (میکرو مول در گرم وزن تازه برگ)}} =$$

در رابطه فوق، عدد ۱۱۵/۵ وزن مولکولی پرولین می باشد

برای تعیین غلظت پرولین نمونه ها از محلول های استاندارد پرولین خالص با غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استفاده می شود و پس از تعیین فرمول خطی نمونه های استاندارد، اعداد قرائت شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر را در فرمول مربوطه قرار داده و غلظت پرولین نمونه ها تعیین می شود.

معرف نین هیدرین با حل نمودن مقدار ۱/۲۵ گرم نین هیدرین در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک و ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۶ مولار (همراه با حرارت دهی و هم زدن مرتب)، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش تهیه و پس از خنک شدن آن، در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شود.



شکل ۴- اندازه گیری مقادیر پرولین در نمونه های برگ

۳-۳-۴- کربوهیدرات های محلول

استخراج و اندازه گیری میزان کربوهیدرات های محلول برگ طبق روش به کار رفته توسط بایسه و مرکس^{۲۱} (۱۹۹۳) انجام می شود. برای این منظور، ابتدا ۰/۳ گرم از بافت برگ تازه با ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ در هاون چینی ساییده می شود. سپس نمونه ساییده شده درون لوله آزمایش ریخته و به مدت ۲ دقیقه به شدت تکان داده می شود. بدین ترتیب، از نمونه ها دو فاز جامد و مایع به دقت جدا و مجدداً به فاز جامد دوبار و هر بار ۵ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه و به شدت تکان داده می شود تا فاز مایع تفکیک گردد. کل فاز مایع با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و بخش بالایی آن جدا می شود.

از عصاره الکلی فوق الذکر، مقدار ۰/۱ میلی لیتر جدا و با ۳ میلی لیتر معرف آنترون تازه تهیه شده مخلوط می شود (از واکنش آنترون با قندها در محیط اسیدی رنگ سبز مایل به آبی تولید می شود) این محلول ده دقیقه در داخل بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده می شود تا واکنش رنگی انجام شود. پس از خنک شدن نمونه تا میزان جذب نور آن ها با اسپکتروفتومتر (Varian، مدل CARY-100) در طول موج ۶۲۵ نانومتر و با استفاده از آب مقطر به عنوان شاهد قرائت می شود و مقدار قندهای محلول بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر برگ از رابطه زیر محاسبه می شود:

$$\text{حجم عصاره (میلی لیتر)} \times \text{قند عصاره (میلی گرم در لیتر)} = \frac{\text{قندهای محلول (میلی گرم بر گرم وزن تازه)}}{\text{وزن نمونه (گرم)} \times \frac{16}{180} \times 100}$$

برای تعیین غلظت کربوهیدرات نمونه ها استانداردهای از گلوکز خالص با غلظت های ۲۵۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم در لیتر تهیه و کلیه مراحل آزمایش روی آن ها انجام می شود.

برای تهیه معروف آنترون، ۱۵۰ میلی گرم آنترون به ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۷۲٪ اضافه می شود.

¹. Busse and Merckx

۴-۳-۴-۴- رنگیزه ها

اندازه گیری غلظت رنگیزه های مختلف شامل کلروفیل های a و b و کل و کاروتنوئید کل در پایان دوره تنش و طبق روش گزارش شده توسط آرنون^{۲۲} (۱۹۶۷) صورت می گیرد. برای این منظور، ۰/۱۲۵ گرم بافت برگ تازه با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ و ۰/۱ گرم کربنات کلسیم $CaCO_3$ (برای خنثی نمودن حالت اسیدی مایع درون سلولی و ممانعت از تخریب کلروفیل) در یک هاون چینی ساییده شده تا به صورت توده یکنواختی در آید. این عمل در نور کم و محیط خنک انجام می شود.

پس از سانتریفیوژ کردن عصاره حاصل (۱۰ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه)، محلول رویی برداشته شده و جذب نور توسط آن در طول موج های ۶۶۳ نانومتر (حداکثر جذب نور کلروفیل a)، ۶۴۵ نانومتر (حداکثر جذب نور کلروفیل b) و ۴۷۰ نانومتر (حداکثر جذب نور کاروتنوئیدها) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian، مدل CARY-100) و با استفاده از استون ۸۰٪ به عنوان شاهد قرائت می شود. در مواردی که عدد قرائت شده بسیار بالا (بیش از ۰/۸ واحد بود، عصاره با استفاده از استون ۸۰٪ با نسبت معین رقیق می شود.

غلظت هر یک از رنگیزه ها در عصاره بر حسب میلی گرم در لیتر با استفاده از روابط ارائه شده در منابع علمی [کلروفیل ها و کاروتنوئیدها (دره^{۲۳} و همکاران، ۱۹۹۸) به شرح ذیل محاسبه می شود:

$$Chl_a (mg/L) = (12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})$$

$$Chl_b (mg/L) = (25.8 \times A_{645}) - (4.68 \times A_{663})$$

$$Chl_{total} (mg/L) = (20.21 \times A_{645}) + (8.02 \times A_{663})$$

$$Carotenoids (mg/L) = (1000 \times A_{470} - 2.27 Chl_a - 81.4 Chl_b) / 227$$

که در روابط فوق A_{663} ، A_{645} ، A_{470} به ترتیب، میزان قرائت شده جذب نور در طول موج های ۶۶۳، ۶۴۵، ۴۷۰ نانومتر می باشند.

نهایتاً غلظت رنگیزه ها در نمونه های برگ به کمک رابطه زیر و بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر برگ محاسبه می شود:

$$\text{رنگیزه برگ (میلی گرم در گرم وزن تر)} = \frac{C_x \times V_g \times D}{w_g \times 1000}$$

که در آن، C_x بیانگر غلظت مشاهده شده هر رنگیزه در عصاره (میلی گرم در لیتر)، V_g حجم کل عصاره (میلی لیتر)، D فاکتور رقت و w_g وزن تر نمونه برگ (گرم) است.

¹.Arnon

¹.Dere



شکل ۵- اندازه گیری میزان کلروفیل برگ با دستگاه اسپکتوفتومتر

۵-۳-۴-۲- فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان

تهیه نمونه‌های برگ جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در پایان دوره تنش صورت می‌گیرد. برای این منظور، بافت برگ تازه با استفاده از ازت مایع در یک هاون چینی کوبیده شده و به صورت پودر ریز درمی‌آید. نمونه‌هایی از برگ پودر شده به وزن ۱ گرم در یک تیوب پلاستیکی کوچک ریخته شده و تا زمان اندازه‌گیری (مدت حدود ۴ ماه) در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود. از این نمونه‌های منجمد جهت اندازه‌گیری فعالیت هر یک از آنزیم‌های آنتی اکسیدان به شرح ذیل استفاده می‌شود:

الف- سوپر اکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به روش اسپکتروفوتومتری و بر اساس قابلیت بازدارندگی آن در احیای فتوشیمیایی نیتروبلوترازولیوم در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود (بیچامپ و فریدوویچ^{۲۴}، ۱۹۷۱). جهت استخراج آنزیم، ۰/۱ گرم بافت برگ که قبلاً تهیه شده و در فریزر نگهداری می‌شود، در ۱ میلی لیتر «بافر استخراج» ریخته و به هم زده می‌شود. مخلوط از پارچه مل مل عبور داده شده و عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌گردد. محلول شفاف بالائی که عصاره آنزیم تلقی می‌شود، به آرامی جدا می‌شود.

برای تعیین میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، مقدار ۳ میلی لیتر «محلول واکنش»، ۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج و ۱۰۰ میکرولیتر «عصاره آنزیم» باهم مخلوط شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد. با قرار دادن لوله‌های آزمایش زیر نور لامپ فلورسانس ۱۵ وات در فاصله ۳۰ سانتی متری و به مدت ۱۰ دقیقه واکنش آنزیمی آغاز می‌گردد. پس از ۱۰ دقیقه، لوله‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده و لامپ‌ها خاموش می‌شود. به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر (varian مدل CARY-100)، اعداد جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر ثبت می‌شود. هر یک واحد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به عنوان مقداری از آنزیم یا پروتئین (بر حسب میلی گرم) منظور می‌گردد که در طول موج ذکر شده موجب ۵۰ درصد کاهش احیای فتوشیمیایی نیترو بلوترازولیوم در

¹. Beauchamp and Fridovich

مقایسه با نمونه شاهد می گردد. لوله شاهد که فاقد عصاره آنزیم و تنها محتوی ۳ میلی لیتر محلول واکنش و ۲۰۰ میکرولیتر بافر استخراج است در معرض نور بیشترین رنگ را ایجاد می کند. در این آزمایش، از مخلوط ۳ میلی لیتر محلول واکنش و ۲۰۰ میکرولیتر بافر استخراج که در تاریکی قرار دارد، به عنوان شاهد استفاده می شود. فعالیت آنزیم (بر حسب واحد در میلی گرم برگ) از رابطه زیر محاسبه می شود:

$$\text{فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز} = \frac{100 - \left[\frac{(\text{OD Control} - \text{OD Sample})}{\text{OD Control}} \times 100 \right]}{50}$$

که در آن A_{control} و A_{sample} به ترتیب مقادیر جذب نور محلول شاهد و نمونه مورد بررسی در طول موج ۵۶۰ نانومتر هستند.

بافر استخراج مورد استفاده در این آزمایش مخلوط ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم (pH=7/8)، میلی مولار EDTA و ۲ درصد (وزن به حجم) پلی وینیل پلی پیرولیدون (PVPP) بود. برای تهیه هر ۱۰۰ میلی لیتر بافر استخراج، ۱/۷۹ گرم فسفات سدیم آبدار ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)؛ وزن مولکولی ۳۵۸/۱۴ گرم بر مول در آب مقطر حل و به حجم رسانده می شود، سپس مقدار ۰/۰۳۷ گرم EDTA و ۲ گرم PVPP به آن اضافه می شود.

همچنین، محلول واکنش شامل ۵۰ میلی مولار بافر فسفات سدیم (pH=7/8)، ۱ میلی مولار نیترو بلو تترازولیوم، ۲۰ میلی مول متیونین، ۰/۱ مولار EDTA و ۰/۲ میلی مولار ریوفلاوین است که برای تهیه هر ۱۰۰ میلی لیتر از آن، مقدار ۱/۷۹ گرم فسفات سدیم آبدار ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل می شود و پس از افزودن ۰/۰۸۸ گرم نیترو بلو تترازولیوم، ۰/۷۴۵ گرم متیونین، ۰/۳۷۲ گرم EDTA و ۰/۰۷۵ گرم ریوفلاوین به حجم نهایی رسانده می شود.

ب- کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش اسپکتروفتومتری ارائه شده توسط آبیای^{۲۵} (۱۹۸۴) و بر اساس میزان ناپدید شدن آب اکسیژنه (H_2O_2) در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری می شود. جهت استخراج آنزیم، ۰/۱ گرم بافت برگ که قبلاً تهیه شده و در فریزر نگهداری شده، در ۱ میلی لیتر بافر استخراج ریخته و به هم زده می شود، سپس مخلوط از پارچه مل مل عبور داده و عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می گردد. محلول شفاف بالایی که عصاره آنزیم تلقی می شود، به آرامی جدا شده و برای تعیین فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار می گیرد. برای این منظور، ۱۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیم و ۲۰ میکرولیتر از محلول ۳٪ H_2O_2 به ۱/۸۴ میلی لیتر محلول واکنش اضافه می شود (واکنش آنزیم کاتالاز با اضافه نمودن عصاره آنزیم آغاز می شود) ثبت تغییرات جذب نور نمونه ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر که بیانگر میزان کاهش غلظت H_2O_2 می باشد، هر ۱۰ ثانیه و به مدت ۱۲۰ ثانیه انجام می شود. هر یک واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته می شود که موجب کاهش یک میکرومول H_2O_2 در هر دقیقه می شود. در این آزمایش، از مخلوط

¹.Aebi

۱/۸۴ میلی لیتر محلول واکنش، ۱۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیم و ۲۰ میکرولیتر آب مقطر به عنوان شاهد استفاده می شود. میزان فعالیت آنزیم (بر حسب واحد در میلی گرم برگ) از رابطه زیر محاسبه می شود:

$$CAT \text{ activity} = \frac{|A_{\text{ref.}}(t_2) - A_{\text{ref.}}(t_1)|}{t_2 - t_1} \times \frac{V_t}{E \times V_s}$$

که در آن:

t_1 و t_2 به ترتیب، ابتدا و انتهای بازه زمانی مورد بررسی (بر حسب دقیقه)،

$A_{\text{ref.}}(t_1)$ و $A_{\text{ref.}}(t_2)$ به ترتیب، مقادیر جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر در زمان های t_1 و t_2 ،

V_t حجم نهایی محلول واکنش (در این آزمایش: ۱/۸۴ + ۰/۰۲ میلی لیتر)،

V_s حجم عصاره آنزیمی مورد استفاده (در این آزمایش: ۰/۱۴ میلی لیتر)

E ضریب تجزیه H_2O_2 (عدد ثابت ۳۹/۴) می باشد.

لازم به ذکر است که فاصله دونقطه در قسمت خطی منحنی جذب نور t_1 و t_2 طول بازه زمانی مورد بررسی در نظر گرفته می شود (کل منحنی که بیانگر تغییرات جذب نور طی مدت ۱۸۰ ثانیه بود، منظور نمی گردد). همین روند در مورد آنزیم های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز نیز به کار گرفته می شود.

بافر استخراج مورد استفاده محتوی ۵۰ میلی مولار تریس - هیدروکلراید (pH = ۷/۸)، ۰/۱ میلی مولار EDTA، ۰/۲ درصد Triton×-100 میلی مولار فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF) و ۲ میلی مولار دیتوتربتول (DDT) می باشد. برای تهیه بافر استخراج، ابتدا ۰/۷۸۸ گرم تریس هیدروکلراید در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل می گردد. سپس مقادیر ۰/۰۰۲۹۲ گرم EDTA، ۲۰۰ میکرولیتر Triton×-100، ۰/۱۷۴۲ گرم و ۰/۰۳۱ گرم DDT در ۸۰ میلی لیتر از بافر تریس-هیدروکلراید حل و با افزودن مجدد بافر تریس-هیدروکلراید به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می شود.

محلول واکنش که برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز مورد استفاده قرار می گیرد، شامل غلظت ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم و ۰/۱ میلی مولار EDTA است. ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH = ۷/۰) تهیه شده و ۰/۰۱۲ گرم EDTA به آن اضافه می شود.

همچنین، برای تهیه محلول ۳٪ H_2O_2 ، ابتدا محلول پایه ۳۵٪ (وزنی - حجمی) H_2O_2 ساخته شده و سپس، ۸/۵۷ میلی لیتر از آن برداشته و با افزودن بافر ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می شود.

ج-پراکسیداز

فعالیت این آنزیم به روش اسپکتروفتومتری ارائه شده توسط هرزاگ و فهیمی^{۲۶} (۱۹۷۳) مورد ارزیابی قرار می گیرد. جهت استخراج آنزیم، ۰/۱ گرم بافت برگ که قبلاً تهیه شده و در فریزر ۸۰- درجه نگهداری می شود، در ۱ میلی لیتر «بافر استخراج» ریخته و به هم زده می شود. پس از صاف نمودن مخلوط عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می گردد. سپس محلول شفاف بالائی (عصاره آنزیم) به آرامی جدا می شود.

برای شروع واکنش آنزیم پراکسیداز، ۳۰ میکرولیتر از محلول ۰/۶ درصد H_2O_2 (از قبل تهیه شده)، به همراه ۱۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیم به ۱/۸۴ میلی لیتر محلول واکنش اضافه می شود. همچنین، از مخلوط ۱/۸۴ میلی لیتر محلول واکنش، ۱۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیم و ۳۰ میکرولیتر آب مقطر به عنوان شاهد استفاده می شود

ثبت تغییرات جذب نور نمونه ها در طول موج ۴۶۵ نانومتر که بیانگر میزان تخریب و کاهش غلظت H_2O_2 است، هر ۱۰ ثانیه و به مدت ۱۲۰ ثانیه انجام می شود. هر یک واحد از فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته می شود که در هر دقیقه موجب کاهش یک میکرومول H_2O_2 در هر میلی لیتر می شود. میزان فعالیت آنزیم (بر حسب واحد در میلی گرم برگ) از رابطه زیر محاسبه می گردد:

$$POD \text{ activity} = \frac{|A_{465}(t_2) - A_{465}(t_1)|}{t_2 - t_1} \times \frac{V_t}{E \times V_s}$$

فعالیت آنزیم پراکسیداز

که در آن:

t_1 و t_2 ابتدا و انتهای بازه زمانی مورد بررسی (بر حسب دقیقه)،

$A_{465}(t_1)$ و $A_{465}(t_2)$ به ترتیب، مقادیر جذب نور در طول موج ۴۶۵ نانومتر در زمان های t_1 و t_2 ،

V_t حجم نهایی محلول واکنش (در این آزمایش: ۰/۳ + ۱/۸۴ میلی لیتر)،

V_s حجم عصاره آنزیمی مورد استفاده (در این آزمایش: ۰/۱۳ میلی لیتر)، و

E ضریب تجزیه H_2O_2 (عدد ثابت ۲۶/۶) می باشد.

بافر مورد استفاده جهت استخراج آنزیم محتوی ۵۰ میلی مولار تریس - هیدروکلراید (pH=۷/۸)، ۰/۱ میلی مولار EDTA، ۰/۲ درصد Triton×-100، ۱ میلی مولار فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF) و ۲ میلی مولار دیتئوتریتول (DDT) می باشد. برای تهیه بافر استخراج، ابتدا ۰/۷۸۸ گرم تریس هیدروکلراید در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل می گردد. سپس مقادیر ۰/۰۰۲۹۲ گرم EDTA، ۲۰۰ میکرولیتر Triton×-100، ۰/۰۱۷۴۲ گرم و ۰/۰۳۱ گرم DDT در ۸۰ میلی لیتر از بافر تریس-هیدروکلراید حل و با افزودن مجدد بافر تریس-هیدروکلراید به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می شود.

¹.Herzog and Fahimi

برای تهیه محلول واکنش، ابتدا دو محلول با شماره های ۱ و ۲ به صورت جداگانه تهیه و با یکدیگر مخلوط می شوند. محلول شماره ۱ شامل ۰/۱ درصد (وزن به حجم) ژلاتین و ۱/۶۸ میلی مول دی آمینوبنزیدین - تتراهیدروکلراید دی هیدرات (DAB) است که برای تهیه آن ۰/۱ گرم ژلاتین همراه با حرارت دهی در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل می شود و پس از سرد شدن، ۰/۰۳۶ گرم DAB به آن اضافه می شود. محلول شماره ۲ شامل ۵۵ میلی مولار اسید سیتریک و ۸۸ میلی مولار فسفات سدیم آبدار ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) است که برای تهیه آن ۱/۰۶ گرم اسید سیتریک و ۳/۱۶ گرم فسفات سدیم آبدار (با وزن مولکولی ۳۵۸/۱۴ گرم بر مول) در ۴۰ میلی لیتر آب مقطر حل و سپس به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده می شود.

همچنین، محلول ۰/۶ درصد H_2O_2 برای شروع واکنش آنزیم تهیه می شود. بدین ترتیب که ابتدا محلول پایه ۳۰ درصد H_2O_2 تهیه نموده و سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول پایه برداشته و به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده می شود.

د-آسکوربات پراکسیداز

فعالیت این آنزیم به روش اسپکتروفتومتری ارائه شده توسط ناکانو و آسادا^{۲۷} (۱۹۸۱) اندازه گیری می شود. اساس این روش کاهش جذب نور در طول موج ۲۹۰ نانومتر است که ناشی از اکسیده شدن آسکوربات می باشد. جهت استخراج آنزیم، ۰/۱ گرم بافت برگ که قبلاً تهیه شده و در فریزر نگهداری می شود، در ۱ میلی لیتر «بافر استخراج» ریخته و به هم زده می شود پس از صاف کردن این مخلوط، عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می شود. محلول شفاف بالائی عصاره آنزیم تلقی شده و به آرامی جدا می شود.

مقدار ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم به ۱/۸ میلی لیتر محلول واکنش (شامل ۱/۲ میلی لیتر بافر ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم، ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی مولار آسکوربات، ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۱ میلی مولار EDTA و ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۱ میلی مولار H_2O_2 اضافه می شود و برای تعیین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین، از مخلوط ۱/۴ میلی لیتر بافر ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم، ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی مولار آسکوربات، ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۱ میلی مولار EDTA و ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۱ میلی مولار H_2O_2 به عنوان شاهد استفاده می شود.

ثبت تغییرات جذب نور نمونه تا در طول موج ۲۹۰ نانومتر که بیانگر میزان اکسیداسیون و کاهش غلظت آسکوربات است، هر ۱۰ ثانیه و به مدت ۱۲۰ ثانیه انجام می شود. هر واحد از فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته می شود که موجب اکسیده شدن یک میکرومول آسکوربات در هر دقیقه می شود. میزان فعالیت آنزیم (بر حسب واحد در میلی گرم برگ) از رابطه زیر محاسبه می شود:

$$APX \text{ activity} = \frac{|A_{290}(t_2) - A_{290}(t_1)|}{t_2 - t_1} \times \frac{V_t}{E \times V_s}$$

¹.Nakano and Asada

که در آن:

t_1 و t_2 ابتدا و انتهای بازه زمانی مورد بررسی (بر حسب دقیقه)،

$A_{\lambda}(t_1)$ و $A_{\lambda}(t_2)$ به ترتیب، مقادیر جذب نور در طول موج ۲۹۰ نانومتر در زمانهای t_1 و t_2 ،

V_t حجم نهایی محلول واکنش (در این آزمایش: ۱/۸ میلی لیتر)،

V_s حجم عصاره آنزیمی مورد استفاده (در این آزمایش: ۰/۲ میلی لیتر)، و E ضریب تجزیه آسکوربات (عدد ثابت ۲/۸) می باشد.

بافر استخراج مورد استفاده شامل ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم (PH=۷/۸)، ۰/۱ میلی مول EDTA، ۰/۲ درصد (وزن به حجم) ۲ پلی وینیل پلی پیرولیدون (PVPP) و ۲ میلی مول آسکوربات است. برای تهیه هر ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات مقدار ۱/۷۹ گرم فسفات سدیم آبدار ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) در آب مقطر حل و به حجم رسانده می شود. سپس ۰/۰۰۲۹۲ گرم EDTA، ۲ گرم PVPP و ۰/۰۳۵۲۲ گرم اسکوربات در ۸۰ میلی لیتر بافر فسفات حل می گردد و با افزودن بافر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می شود.

محلول واکنش مشتمل بر نسبت های مختلف ۴ محلول زیر است که به طور جداگانه ساخته می شوند:

۱- بافر ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم

۲- محلول ۵ میلی مولار آسکوربات، به حجم ۳۰ میلی لیتر: مقدار ۰/۰۲۶۴ گرم اسکوربات در ۳۰ میلی لیتر بافر ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم حل می گردد.

۳- محلول ۱ میلی مولار EDTA، به حجم ۱۰۰ میلی لیتر: مقدار ۰/۰۲۹۲ گرم EDTA در ۱۰۰ میلی لیتر بافر ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم حل می گردد.

۴- محلول ۱ میلی مولار H_2O_2 به حجم ۱۰۰ میلی لیتر: ابتدا محلول پایه ۳۰٪ (وزنی - حجمی) H_2O_2 تهیه شده و سپس ۸/۶ میلی لیتر از محلول پایه برداشته و با افزودن بافر ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می شود.

۶-۳-۴-۲- پروتئین های محلول

برای اندازه گیری غلظت پروتئین های محلول در گیاه از روش برادفورد ۱۹۷۶ استفاده می شود. بدین منظور ۳ میلی لیتر از معرف برادفورد به همراه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی آلبومین گاوی تهیه شده، پس از اختلاط کامل در دستگاه اسپکترومتر قرار داده می شود و جذب محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت می شود. غلظت پروتئین بر حسب میلی گرم بر گرم بافت تازه با استفاده از منحنی استاندارد که توسط سرم آلبومین گاوی تهیه شده بود محاسبه می شود.

تهیه معرف

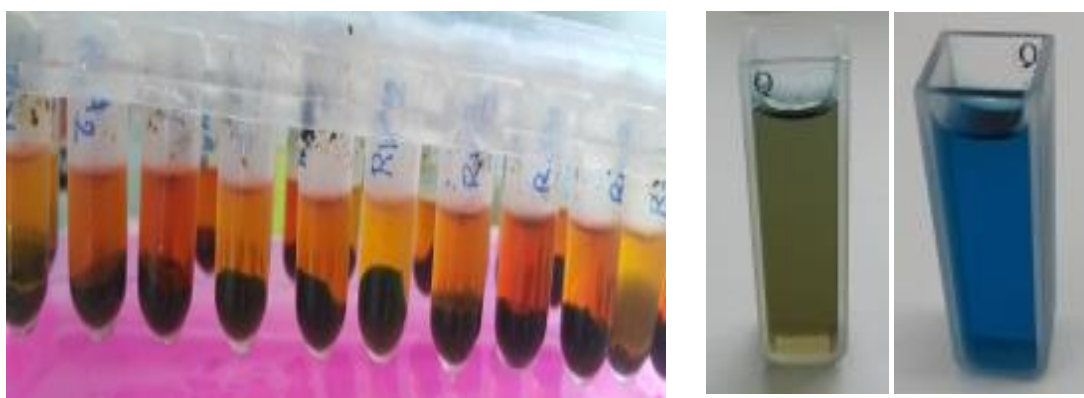
معرف برادفورد: ۰/۱ گرم کوماسی بلو G250 در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ حل می‌شود، سپس ۱۰۰ میلی لیتر اسیدفسفریک ۸۵٪ به آن اضافه شده و حجم نهایی محلول با استفاده از آب مقطر استریل شده به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده می‌شود. این محلول از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود.

تهیه استانداردهای پروتئینی با استفاده از سرم آلبومین گاوی

۵ میلی گرم از پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی را در ۵۰ میلی لیتر محلول ۰/۱۵NACL مولار حل نموده و به این ترتیب غلظت محلول به ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) می‌رسد. این محلول به عنوان محلول مادر بوده و برای تهیه غلظت‌های مختلف استاندارد پروتئینی به کار می‌رود. در این آزمایش به طور جداگانه غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۹۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول پایه تهیه کرده که به همراه غلظت اولیه این محلول (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و محلول شاهد با آب مقطر خالص در کالیبره کردن و رسم منحنی استاندارد با دستگاه طیف سنج به کار برده می‌شود.

تعیین غلظت کل پروتئین عصاره گیاه

به منظور تعیین غلظت پروتئین عصاره‌ی به دست آمده در آزمایش‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی هر نمونه به اضافه ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر با ۳ میلی لیتر معرف برادفورد در یک لوله آزمایش کوچک مخلوط می‌شود تا در مجموع ۴ میلی لیتر در کووت می‌ریزیم و به مدت ۲ تا ۵ دقیقه در دستگاه اسپکترومتر قرار داده و سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت می‌کنیم.



شکل ۶- مراحل اندازه گیری پروتئین‌های محلول در نمونه های برگ

۲-۳-۴-۲- پراکسید هیدروژن

غلظت پراکسید هیدروژن بر اساس واکنش H_2O_2 با پتاسیم یدید (KI) وبا روش آلکسیوا^۱ (2001) انجام می شود. در این روش ۰/۱ گرم از بافت تازه گیاه در تری کلرو استیک اسید ۱ درصد سائیده می شود. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می شود. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی ۵۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH=7) و ۲ میلی لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه می گردد. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شده و سپس جذب نمونه ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه گیری می شود. برای محاسبه غلظت پراکسید هیدروژن از منحنی استاندارد استفاده می شود. برای رسم منحنی استاندارد غلظت های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن تهیه و منحنی جذب بر حسب غلظت رسم و معادله آن به دست می آید.

منابع مورد استفاده

- ارجی، عیسی و ارزانی، کاظم . (۱۳۸۲) پاسخ های رشدی و تجمع پرولین در سه رقم زیتون بومی ایران به خشکی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۰ (۲)، ۹۱-۱۰۰.
- ارجی، عیسی ؛ ارزانی، کاظم و میر لطیفی ، سید مجید . (۱۳۸۱) . تأثیر مقادیر مختلف آبیاری برعکس العمل های فیزیولوژیکی و رشدی نهال های جوان زیتون رقم زرد . مجله علوم خاک و آب، ۱۶، (۱)، ۱۱۱-۱۲۰.
- اسدی کنگر شاهی، علی؛ ثوابی، غلامرضا؛ سمر، محمود و فرحبخش، محسن. (۱۳۹۲). امکان استفاده از فلورسنس کلروفیل برای ارزیابی تحمل تعدادی از پایه های مرکبات به تنش غرقاب. به زراعی کشاورزی، ۱۵، (۴)، ۶۵-۷۸.
- جلیلی مرندي ، رسول ؛ حسنی؛ عباس؛ دولتی بانه؛ حامد؛ عزیزی ، حسین و حاجی تقی لو ، رامین . (۱۳۹۰) . تأثیر سطوح مختلف رطوبت خاک بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی سه رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) . مجله علوم باغبانی ایران، ۴۲، (۱)، ۳۰-۴۰.
- جوادی، تیمور و ارزانی، کاظم . (۱۳۸۳) . بررسی میزان کربوهیدرات های محلول و پرولین در نه ژنوتیپ گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd) تحت تنش خشکی . مجله زیست شناسی ایران ، ۱۷، (۴)، ۳۸۷-۳۹۹.
- جوادی ، تیمور و ارزانی ، کاظم. (۱۳۸۲) . مطالعه تجمع پرولین و روابط آبی برگ در ۹ ژنوتیپ گلابی آسیایی تحت رژیم های مختلف آبیاری. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۰، (۳)، ۸۷-۹۷.
- جوادی ، تیمور و بهرام نژاد ، بهمن. (۱۳۸۹). اثر تنش آبی بر رشد و برخی خصوصیات بیوشیمیایی سه ژنوتیپ گلابی بومی استان کردستان . مجله علوم باغبانی ایران ، ۴۱، (۴)، ۳۲۷-۳۳۵.
- حکمت شعار، حسن. (۱۳۷۲) . فیزیولوژی گیاهان در شرایط دشوار . انتشارات نیکنام ، تبریز، ۲۵۱ صفحه .

¹. Alexieva

- حیدری شریف آباد، حسین. (۱۳۷۹). گیاه خشکی و خشکسالی. انتشارات مؤسسه تحقیقاتی جنگل ها و مراتع، تهران، شماره ۲۵۰، ۲۰۰ صفحه.
- رسولی، ولی اله. (۱۳۸۱). معرفی سه رقم انگور متحمل به تنش خشکی در استان قزوین. مجله مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی قزوین. ۳ صفحه.
- رضایی طاهره، غلامی، منصور؛ ارشادی، احمد و مصدقی، محمدرضا. (۱۳۸۶) اثر تنش کم آبی بر خصوصیات رشدی و فیزیولوژیکی پنج رقم انگور (*Vitis vinifera* L.). پژوهش کشاورزی: آب، خاک و گیاه در کشاورزی، ۷(۴ الف)، ۱۹۹-۲۱۰.
- صباغ پور، سید حسین. (۱۳۸۵). شاخص ها و مکانیزم های مقاومت به تنش خشکی در گیاهان. کمیته ملی خشکی و خشکسالی معاونت زراعت وزارت جهاد کشاورزی، ۱۵۴ صفحه.
- علیزاده، امین. (۱۳۸۷). رابطه آب و خاک و گیاه. چاپ هشتم. انتشارات دانشگاه امام رضا (ع)، مشهد، شماره ۷۵، ۴۸۴ صفحه.
- قادری، ناصر؛ سی و سه مرده، عادل و شاهویی، سید صابر. (۱۳۸۵). بررسی اثر خشکی بر خصوصیات فیزیولوژیکی دو رقم انگور. مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۷، (۱)، ۴۵-۵۵.
- طباطبایی، سید جلال. (۱۳۹۲). اصول تغذیه معدنی گیاهان. انتشارات دانشگاه تبریز. ۳۸۹ صفحه.
- کافی، محمد؛ برزوئی، اعظم، صالحی، معصومه؛ کمندی، علی، معصومی، علی و نباتی، جعفر. (۱۳۸۸). فیزیولوژی تنش های محیطی در گیاهان. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۳۹۴، ۵۰۲ صفحه.
- کوچکی، عوض و نصیری محلاتی، مهدی (۱۳۷۳). اکولوژی گیاهان زراعی. چاپ دوم. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲۹۱ صفحه.
- هاشمی دزفولی، ابوالحسن، کوچکی، عوض و بنایان، محمد. (۱۳۷۴). افزایش عملکرد گیاهان زراعی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲۸۷ صفحه.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105:121-126
- Alizadeh, A., Alizadeh, V., Nassery, L., Eivazi, A. (2011). Effect of drought stress on apple dwarf rootstocks. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 1(3), 86-94.
- Ashraf, M. and F. Karim. (1991). Screening of some cultivars/ lines of black gram for resistance to water stress. *Tropical. Agriculture*, 68: 57-62.
- Arnon, D.I. Photosynthetic activity of isolated chloroplasts. (1967). *The American Physiological Society*, 47(3). 318-353
- Aurelio, G.C., Francisco, R.T., Manuel, T. and Eduardo, P.M. (1996). Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedling of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiology*, 112; 401-408.

- Bajji M., Kinet J., Lutts S .(2002). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat, *Plant Growth Regulation*. 36, 61–70.
- Basra, A.S. and Basra, R.K. (1997). Mechanisms of environmental stress resistance in plants. *Harwood Academic, Amsterdam, Netherlands*. 1-43.
- Bates, L. S., Waldren, R.P. and Teare, I.D.(1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies . *Plant and Soil*, 39:205-207
- Beauchamp, C. and Fridovich, I.(1971). Superoxide dismutase : improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44:276-287
- Bidinger, F. R., Mahalakshmi, V. and rao, G. D. p. (1987). Assessment of droghut resistance in pearl millet(*Pennisetum americanum* L.). I. Factors affected yields under stress. II. Estimation of genotype response to stress. *Australian Journal of Agricultutal Research*, 38:37-48.
- Blum, A. (2005). Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential: are they compatible, dissonant, or mutually exclusive *Crop& Pasture Science*, 56 (11), 1159-1168.
- Bolat, E., Dikilitas, M., Ercisli, S., Ikinici, A., Tonkaz,T. (2014). The effect of water stress on some morphological, physiological, and biochemical characteristics and bud success on apple and quince rootstocks. *Hindawi Publishing Corporation, The Scientific World Journal*, 1,1-8.
- Bradford, M. M. A. (1976). Rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye Binding. *Analitical Biochimistry*, 72, 248-254.
- Busse, J. Merckx, R.(1993). An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *Journal of Experimental Botany*, 44(267):1627-1629.
- Chaves, M. M, Flexas, J. and Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress:regulation mechanisms from whole plant to cell *Journal of Integrative Plant Biology*, 103, 551-560.
- Culter, J,M. ,Rains, D.W.and Loomis,R.S. (1997). The importanve of cell size in the water relations of plants. *Plant Physiology*, 40;255-260
- Dacosta, M. and Huang, B. (2007). Changes in antioxidant enzyme activities and lipid pero×idation for bentgrass species in responses to drought stress.*Jornal of the American Society for Horticultureal Science*, 132;319-326.
- Delauney, A.J., and Verma, D.P. (1993). Proline biosynthesis and osmo-regulation in plants. *Plant Journal*, 4: 215-223.
- De Herralde, F., Biel,C. and Save,R.(2003a). Leaf photosynthesis of eight almond tree cultivars. *Biologia Plantarum*, 46;557-561.
- Du Pisani L., Fouché H, Venter J. (1998). Assessing rangeland drought in South Africa. *Agricultural Systems*, 57 (3):367-380.
- Fernandez, R., Perry ,T., Flore, R.L. (1997). Drought response of young apple trees on three rootstocks: growth and development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*,122(1),14-19.

- Fernandez, R., Perry, T., Flore, R.L. (1997). Drought response of young apple trees on three rootstocks. II. gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations, and leaf abscisic acid. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(6), 841-848.
- Fifaei, R., Fotouhi Ghazvini, R., Golein, B., Hamidoghli, Y. (2016). Effect of severe water stress on some characteristics in *Citrus* seedlings. *Iranian Journal of Horticultural Sciences*, 47(3), 397-405.
- Flexas J., Bota J., Loreto F. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, 6 (03):269-279.
- Folkert A.H., Elena A.G., Buitink J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance, *Trends Plant Science*. 6, 431-438.
- Heath RL, Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125, 189-198.
- Herzog, V. and Fahimi, H. (1973). Determination of the activity of peroxidase. *Annual Biochemistry*, 55:554-562.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitink J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance, *Trends Plant Sciences*. 6, 431-438.
- Jie, Z., Yun, K., Shaohui, W., Yuncong, Y. (2010). Activities of some enzymes associated with oxygen metabolism, lipid peroxidation and cell permeability in dehydrated *Malus micromalus* seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 9(17), 2521-2526.
- Liu, B., Li, M., Chen, J., Liang, D., Zou, Y., Ma, F. (2012). Influence of rootstock on antioxidant system in leaves and roots of young apple trees in response to drought stress. *Plant Growth Regulators*, 67, 247-256.
- Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, Z HENG, Y., Yu, L, and Yang, R. (2011). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany*, 71:174-183.
- Khalid, K.A. (2006). Influence of water stress on growth, essential oil and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). *International Agrophysics* 20: 289- 296.
- Kirnak H., Kaya C., Tas I, Higgs D. (2001). The influence of water deficit on vegetative growth, physiology, fruit yield and quality in eggplants. *Bulg. Journal of Plant Physiology*, 27 (3-4):34-46.
- Klushreshtha, S., D. P. Mishra, and R. K. Gupta. (1987). Changes in contents of chlorophyll, proteins and lipids in whole chloroplasts and chloroplast membrane fraction at different leaf water potentials in drought resistant and sensitive genotypes of wheat. *Photosynthetica*, 21: 65-70.
- Moffat, J., Sears, M.R.G. and Paulsen, G. (1990). wheat height temperature tolerance during reproductive growth. I: Evaluation by chlorophyll fluorescence. *Crop Science*, :881-885.
- Morgan, P.W. (1990). Effect of abiotic stresses on plant hormone systems, in : *Stress Responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*, Wiley- Liss, Inc., pp.113-146.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts . *Plant Cell Physiology*, 22:867-880

- Natali, S., xiloyannis, C. and Angellini, P. (1985). Water consumptive use of olive trees (*Olea europea* L.) and effect of water stress on leaf water potential and different resistance. *Acta Horticulture*, 171: 341-351.
- Nuzzo,V., xilloyannis,C., Dichio,B., Montanaro,G.and Celano,G. (1997). Growth and yield in irrigated and nonirrigated olive trees cv.cratina over four years after planting. *Acta Horticulturae*, 449;75-82.
- Ozkur O., Ozdemir F., Bor M, Turkan I. (2009). Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. *Environmental and Experimental Botany*, 66 (3):487-492.
- Premachandra G.S., Saneoka H., Kanaya M., Ogata S. (1991). Cell membrane stability and leaf surface wax content as affected by increasing water deficits in maize, *Journal Express of Botanical*. 42, 167–171.
- Romero,P., Botia,P. and Garica,F. (2004a). Effects of regulated deficit irrigation under subsurface drip irrigation conditions on vegetative development and yield of mature almond tress. *Plant and Soil*,260;169-181
- Ranjbarfardoei,A., Samson R., Van Damme,P. and Lemeur,R. (2000). Effects of drought stress induced by polyethylene glycol on pigment content and photosynthetic gas exchange of *Pistacia khinjuk* and *P.mutica*. *Photosynthetica* , 38;443-447.
- Sairam, R.K. (1994). Effect of moisture stress on physiological activities of two contrasting wheat genotypes.*Indian Journal of Experimental Biology*, 32, 594-597.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W. (1992). *Plant physiology (4th edition)*. Wadsworth Publishing Company, California, USA.
- Sakalauskaite, J., Kviklys, D., Lanauskas, J., Duchovskis, P. (2006). Biomas production, dry weight partitioning and leaf area of apple rootstocks under drought stress. *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. Sodinnikyste IR Darzininkyste*, 25(3),283-291.
- Schwabe, W.W. and Lionakis, S.M. (1996). Leaf attitude in olive in relation to drought resistance. *Journal of Horticultural Science*, 71;156-166.
- Schwarz, D., Roupael, Y., Colla, G. and Venema, JH. (2010). Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses:thermal stress, water stress and organic pollutants. *Scientia Horticulturae*, 127, 162-171.
- Shan, W., Liang, D., Ma, F. (2014). Leaf micromorphology and suger may contribute to differences in drought tolerance for two apple cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 249-258.
- Sharkey, TD. (1990). Water stress effects on photosynthesis, *Photosynthetica* 24, 651–661.
- Sircelj, H., Tausz, M., Grill, D., Batic, F. (2007). Detecting different levels of drought stress in apple trees(*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Scientia Horticulturae*, 113, 362-369.
- Sofo A., Dichio B., xiloyannis C, Masia A. (2004). Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science*. 166 (2):293-302.

- Sundberg, M. D. (1985). Trend in distribution of stomata in desert plants. *Desert Plants*, 7;154-157.
- Taiz L., Zeiger E. (2006). *Plant Physiology*, 4th Ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts.
- Taylor, C.B. (1996). Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. *The Plant Cell*, 8: 1221-1224.
- Tsugane, K., Kobayarabidopsis shi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K. and Kobayashi, H. (1999). A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell*, 11;1195-1206.
- Turner N.C., Wright G.C., Siddique K. H. M. (2001). Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments, *Advance Agronomy*. 71, 123–231.
- Van Damme, P. (1991). Adaptation to drought stress in plants. II; Morphological adaptations. *Med Fac. Landbouww. Rijksuniv, Gent*, 52(1);1-8.
- Volkmar, K.M., Hu, Y. and Steppuhn, H. (1997). Physiological responses of plants to salinity: a review. *Canadian Journal of Plant Science*, 78:19-27.
- Vu JC., Gesch RW., Allen LH, (1999). CO₂ Enrichment Delays a Rapid, Drought-Induced Decrease in Rubisco Small Subunit Transcript Abundance. *Journal of Plant Physiology*, 155 (1):139-142.
- Wahid, A., Rasul, E. (2005). Photosynthesis in leaf, stem, flower and fruit, in: Pessarakli, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*, 2nd ed., CRC Press, Florida, pp. 479-497.
- Wang, S., Liang, D., Lli, C., Hao, Y., Ma, F., and Sho, H., (2012). Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 51, pp. 81-89.
- Yokota A., Kawasaki S., Iwano M., Nakamura C., Miyake C., Akashi K. (2002). Citrulline and DRIP-1 Protein (ArgE Homologue in Drought Tolerance of Wild Watermelon, *Annual Botanical*. 89, 825–832.
- Zhou J., Wang X., Jiao Y, et al. (2007). Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. *Plant Molecular Biology*, 63 (5):591-608.
- Zidan, L., Azaizeh, H. and Neumann, P.M. (1990). Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification, *Plant Physiology*, 93;7-11.

پژوهشکده میوه های
معتدله و سردسیری

کرج: جاده محمد شهر

شهرک نهال و بذر

تلفن: ۰۲۶-۳۶۷۰۲۵۴۱

دورنگار: ۰۲۶-۳۶۷۰۰۹۰۸

www.tfri.areeo.ac.ir

