تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در نهال‌های گلابی وحشی (*Pyrus boisseriana*) در پاسخ به تغییرات آبیاری[۱]

مهرداد زرافشار[۲]، مسلم اکبری‌نیا[۳]، حسین عسکری[۴]، سید محسن حسینی[۵] و مهدی رهایی[۶]

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/٤
تاریخ تصویب: ۹۳/۱۱/۲۷

چکیده

بهترین راه مقابله با خشکی همراهی با آن می‌باشد که در این بین استفاده از ژنوتیپ‌های وحشی از اهمیت ویژه‌ایی برخوردار است. هدف تحقیق حاضر، درک عمیق از مکانیسم‌های ژرم پلاسم وحشی گلابی (Pyrus biosseriana) در پاسخ به تنش قطع آبیاری و ارزیابی قدرت بازیابی آن می‌باشد. در همین راستا بعد از قطع آبیاری به مدت ۱۸ روز، مصادف با علائم پژمردگی برگ، شاخص های فیزیولوژیکی و

[۱] مقاله حاضر مستخرج از رساله دکتری نگارنده اول در دانشگاه تربیت مدرس می باشد که به راهنمایی دکتر مسلم اکبری نیا و دکتر حسین عسکری انجام شده است.

[۲] دانش‌آموخته مقطع دکتری گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس.

[۳] دانشیار گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس (نویسنده مسئول)؛ Akbarim@modares.ac.ir

[٤] استادیار گروه مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی.

[۵] استاد گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس.

[۶] استادیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران.

بیوشیمیایی در برخی از نهال‌ها ارزیابی شد و با آبیاری دوباره‌ی نهال‌های باقی مانده به مدت یک هفته، قدرت بازیابی گیاه مورد مطالعه قرار گرفت. همزمان با ظهور پژمردگی برگ، محتوی نسبی رطوبت برگ با حدود ۵۸٪ کاهش در مقایسه با نهال های کنترل، در حد بحران و حیاتی (۳۵٪) اندازه گیری شد که البته بعد از آبیاری، گیاه توانست خود را تا حد قابل قبولی بازیابی کند. پتانسیل آبی گیاه در آوند چوبی در انتهای آزمایش تا ۲/۲۲- مگاپاسکال کاهش پیدا کرد و دوباره با جذب آب از ریشه، به شرایط کنترل نزدیک شد. به منظور تعدیل اسمزی در سلول گیاهی، مقدار پرولین آزاد و گلوکز حدود ۶-۵٪ در مقایسه با نهال‌های کنترل افزایش یافت. نتایج نشان داد که افزایش محتوی کارتنوئید یکی از مکانیسم آنتی اکسیداتیو در این ژرم پلاسم وحشی می‌باشد چرا که حضور اکسیژن‌های آزاد نتوانسته است محتوی کلروفیل را کاهش دهد. از طرفی دیگر، محتوی مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن به ترتیب بعنوان شاخص‌های پراکسیداسیون لیپید و تنش اکسیداتیو افزایش بسیار جزئی و غیر معنی‌داری داشت. در نهایت می‌توان اذعان کرد که افزایش پرولین بعنوان یکی از اسمولیت‌های محلول و کارتنوئید بعنوان یکی از مکانیسم آنتی اکسیداتیو، سازوکار این گیاه برای مقابله با کم آبی است. بنظر می‌رسد که ژرم پلاسم وحشی گلابی در سنین اولیه تا حدود ۱۸ روز می‌تواند بی‌آبی را تحمل کند و علائم پژمردگی برگ شاخص مناسبی برای تشخیص میزان مقاومت آن به خشکی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: خشکی، گلابی وحشی، پژمردگی برگ، تنش اکسیداتیو، تعدیل اسمزی.

مقدمه

گلابی (*Pyrus* spp.) از خانواده Rosaceae و زیر خانواده Pomoideae، بعنوان یکی از مهم‌ترین محصولات باغی در دنیا مطرح می‌باشد (Bao et al., 2007) که از دیر باز کشت ارقام مختلف آن در ایران مرسوم بوده است. جنگل‌های قفقاز و شمال ایران منابع ارزشمند و غنی از ژرم پلاسم وحشی گلابی

می‌باشند (Vavilov, 1994) که از حدود ۵۰ سال پیش تا کنون، افراد بومی و باغداران محلی به جمع‌آوری بذر آنها می‌پردازند چرا که تجربه‌ها نشان داده است که این ژنوتیپ‌های وحشی اگرچه میوه قابل توجهی تولید نمی‌کنند ولی مقاومت قابل ملاحظه‌ایی به انواع تنش‌های زنده و غیر زنده دارند و می‌توان از آنها به عنوان پایک استفاده کرد (Volk et al., 2006). خشکی بعنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده و چند بعدی، بر روی اکثر مراحل رشد، ساختار اندام و فعالیت‌های زیستی یک گیاه تاثیرات مخرب دارد (Yordanov and Tsoev, 2000) ولی گیاهان در طی فرآیند خوگیری (Acclimation) و به واسطه تغییرات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نسبت به تنش خشکی واکنش نشان می‌دهند (Chaves et al., 2003). زیست‌شناسان گیاهی اعتقاد دارند که توده‌های وحشی گیاهان در اکوسیستم‌های طبیعی، به جهت مواجهه مکرر با انواع تنش‌ها در طولی سالیان متمادی، مکانسیم‌های متنوعی برای مقابله کسب می‌کنند (Ashraf et al.. 1991) بنابراین شناخت مکانیسم‌های مقاومت در ژنوتیپ‌های وحشی گلابی در پاسخ به تنش خشکی برای شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم مفید خواهد بود (جوادی و بهرام نژاد، ۱۳۸۹). تنش خشکی در حقیقت کاهش پتانسیل آبی در خاک است (شریعت و عصاره، ۱۳۸۵) و گیاه سعی می‌کند که پتانسیل کل آب خود را طی فرآیند تنظیم اسمزی حفظ و تنظیم نماید (Ingram and Bartles, 1996). پرولین و کربوهیدرات های محلول از جمله مهمترین ترکیبات اسمزی هستند که سلول گیاهی به جهت کاهش پتانسیل اسمزی تجمع آن‌ها را افزایش می‌دهد (Martin et al., 1993., Zhang et al., 1999). در واقع پرولین و قندهای محلول به واسطه وزن مولکولی کم بنام اسمولیت‌های سازگار کننده معروف هستند و تجمع آنها در سلول گیاهی در پاسخ به تنش‌های محیطی گزارش شده است (آخوندی و همکاران، ۱۳۸۵.، نیاکان و قربانلی، ۱۳۸٦). در شرایط خشکی تنظیم اسمزی، حفظ تورژسانس سلول و پایداری غشاء و پروتئین‌ها از جمله وظایف مهم کربوهیدرات‌های محلول می‌باشد (Bohnert et al., 1995). پرولین نیز علاوه بر تنظیم اسمزی بعنوان یک محافظ، از آسیب ماکرومولکول‌ها جلوگیری می‌کند (Kuznetsov and Shevyakova, 1999). Hao و همکاران (۱۹۹۹) اعتقاد دارند که عملکرد فتوسیستم II از دیگر جایگاههایی است که به شدت تحت تاثیر خشکی قرار می‌گیرد لذا میزان پلاستیدهای جدید، کلروفیل a و b و همچنین کارتنوئید کاهش می‌یابد (حیدری شریف‌آباد، ۱۳۷۹). حفظ میزان کلروفیل در زمان خشکی نماد مقاومت

فیزویولوژیک گیاه به تنش می‌باشد چرا که تولید اکسیژن‌های آزاد در طی تنش خشکی مسبب اصلی تخریب کلروفیل می‌باشد (Sairam et al., 1998). زمانی می‌توان گفت که یک گیاه به خشکی سازگار شده است که سیستم آنتی اکسیدانتی آن از افزایش گونه‌های اکسیژن فعال جلوگیری کند. گیاهان با برخی از سیستم‌های ضد انتی اکسیدانی تجهیز شده‌اند که در طی مکانیسم‌های غیرآنزیمی و یا آنزیمی از سیر اکسیداتیو شدن در اندام‌های سلولی جلوگیری می‌کنند (Noctor and Foyer, 1998). این مواد آنتی اکسیدانی در سلول باقی می‌مانند تا زمانی که گونه‌های اکسیژن آزاد تخلیه بشوند و تخریب رادیکال‌های آزاد پایان یابد (Schwanz et al., 1996., Shalata et al, 1998). در صورت عدم دفع گونه‌های اکسیژن فعال در سلول گیاهی پراکسیداسیون باعث تخریب لیپیدها می‌شود (Al-Ghamdi, 2009). مالون دی آلدئید (MDA) شاخصی است از مقدار پراکسیداسیون لیپید و برای سلول سمی محسوب می‌شود (Chaves et al., 2003., Shao et al., 2005). پراکسید هیدروژن (H_2O_2) نیز بعنوان شاخصی از استرس خشکی محسوب می‌شود چرا که توسط گونه‌های اکسیژن آزاد تحریک شده و در پراکسیداسیون لیپیدها نیز نقش دارد (Mittler, 2002). مطالعه بانک‌های اطلاعاتی در زمینه علوم گیاهی حاکی از افزایش روز افزون پژوهش در ارتباط با تنش خشکی با تاکید بر شاخص‌های یاد شده می‌باشد ولی میزان بازیابی این صفات بعد از رفع تنش کمتر مورد توجه قرار گرفته است (Salekdeh et al., 2002., Bogeat-Triboulot et al., 2007., Gazanchian et al., 2007., Jiang et al., 2007). مطالعه Morales و همکاران (۲۰۱۳) حاکی از آن است که گونه‌های تمشک با افزایش پرولین و کربوهیدرات‌های محلول با خشکی مقابله می‌کنند. افزایش MDA و گونه‌های اکسیژن آزاد از قبیل پراکسید هیدروژن و به دنبال آن افزایش بیان آنزیم‌های کاتلاز و سوپراکسید دیسموتاز و میزان پرولین در نهال‌های تحت استرس گونه آیلان (*Ailanthus altissima*) توسط Filippou و همکاران (۲۰۱٤) گزارش شده است. در ایران ارقام داخلی و وارداتی گلابی به منظور مقایسه مقاومت به خشکی مدنظر قرار گرفته است (جوادی و همکاران، ۱۳۸۳.، جوادی و بهرام‌نژاد، ۱۳۸۹) ولی مرور پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که تاکنون مکانیسم‌های ژرم پلاسم وحشی گلابی (*Pyrus boisseriana* Buhse.) در مقابله با خشکی شناخته نشده است لذا در این پژوهش، تاثیر قطع آبیاری بر محتوای نسبی رطوبت، پتانسیل آبی گیاه، میزان رنگیزه‌های برگ و محتوای پرولین، قندهای محلول، مالدون دی آلدئید و پراکسیدهیدروژن در رابطه با گلابی وحشی بررسی و قدرت بازیابی صفات یاد شده ارزیابی شده است.

روش کار

بـا جمـع آوری بـذر از پایـه‌هـای مـادری (*P. boisseriana*) اقدام به تولید ۱۰۰ اصـله نهال یکساله و همگن (میانگین قطر نهـال‌هـا= ۰/۰۸±۰/۵۲ ٤ میلـی متـر و میـانگین ارتفـاع نهال‌هـا=۰/۸±۲۱/۹٤ سـانتی متـر) در داخـل گلدان‌های پلاستیکی با حجم ۳ لیتر شد. بافت خاک برای تمامی گلدان‌ها یکسان و بصـورت شـنی- رسـی- لـومی (بـه نسـبت۱:۲:۱ و بـا اسیدیته ۷/۹) در نظر گرفته شد. برای اعمـال تنش خشکی از روش قطـع آبیـاری تـا زمـان مشاهده علائم پژمردگـی بـرگ اسـتفاده شـد (Siemens and Zwiazek, 2003). نهال‌های کنترل دو تا سه بـار در طـول هفتـه آبیاری می‌شدند تا حد ظرفیـت زراعـی بـرای خـاک حفـظ بشـود. علائـم پژمردگـی بـرگ (Leaf rolling) در نهال‌هـای تحـت اسـترس خشکی پس از ۱۸ روز از قطع آبیـاری ظـاهر گردید بنابراین شاخص‌های مورد نظر بعد از یـک دوره ۱۸ روز بـدون آبیـاری بـر روی تعدادی از نهال از هـر تیمـار مـورد ارزیـابی قرار گرفت. در ادامه بـه گیاهـان بـاقی مانـده فرصت داده شد که به مدت یـک هفتـه شـبیه گیاهان شاهد آبیاری بشوند تا قدرت بازیابی گیـاه نیـز مـورد ارزیـابی قـرار گیـرد (Echevarrı´a-Zomen˜o et al., 2009). مطالعه حاضر در یک گلخانه تحقیقـاتی واقـع در دانشـکده منـابع طبیعـی و علـوم دریـایی دانشگاه تربیت مدرس (مازندران- نور) انجام شد که متوسط دمای ٤۰ درجه سـانتی‌گـراد، رطوبت نسبی ۳۵ درصد و شـدت نـور ۱۵۰۰ لوکس (در سـاعت ۱۳) از مهـم‌تـرین شـرایط گلخانه تحقیقاتی بوده است. تحقیق حاضر در قالب یک طرح کاملا تصادفی و در مرداد مـاه سال ۱۳۹۱ اجرا شده است.

- شاخص‌های فیزیولوژیکی

در انتهای دوره آزمایش و در سحرگاه (قبـل طلوع آفتـاب) پتانسـیل آبـی در آونـد چـوبی (Xylem water potential) در ۲۰ گیـاه از هر تیمار با اسـتفاده از دسـتگاه بمـب فشـار قابـل حمـل (Skye, SKPM 1400, UK) اندازه‌گیری و ثبت شد. وزن سه برگ بـالغ از هر نهال منتخب (از قسـمت میانـه هـر نهـال) اندازه‌گیـری و بـه عنـوان وزن‌تـر ثبـت شـد. سپس برگ‌ها بمدت ٢٤ ساعت در بطری‌هـای حـاوی آب مقطـر و در دمـای ٤ درجـه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا به حالت اشـباع خود برسند و پس از خشک شدن آب موجود بـر روی آن‌هـا بـا اسـتفاده از کاغـذ صـافی، دوبـاره وزن شـدند تـا وزن اشـباع محاسـبه شود. در نهایت برگ‌های اشـباع شـده بمـدت ٤٨ ساعت در آون با دمای ۸۰ درجه سـانتی گـراد قـرار گرفتنـد و وزن خشـک آنهـا اندازه‌گیری شـد. بـا اسـتفاده از فرمـول ذیـل محاسبه گردید (Martinez et al., 2007).

$$\text{محتوای رطوبت نسبی} = \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تر})}{(\text{وزن خشک} - \text{وزن اشباع})} \times 100$$

- شاخص‌های بیوشیمیایی

به منظور مطالعه شاخص‌های بیوشیمیایی ۵ نهال از هر تیمار انتخاب و برگ‌ها بعد از انجماد خشک با ازت مایع در فریزر با دمای ۸۵- درجه سانتی گراد تا روز آزمایش نگه داری شدند. به منظور مطالعه رنگیزه‌های گیاهی، ابتدا ۰/۱ گرم از برگ‌های منجمد شده (سه تکرار برای هر گیاه) در ۸۵- درجه سانتی‌گراد به همراه ۰/۱ گرم کربنات کلسیم و ٤ میلی لیتر استون ۸۰ درصد در تاریکی عصاره‌گیری گردید. عصاره حاصل در ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. میزان جذب محلول رویی در طول موج‌های ٤۷۰، ٦٤٥، ٦٦۳ و با استفاده از دستگاه ELISA redear (BioTec Instrument, Inc.-USA) قرائت گردید. محتوی کلروفیل برحسب گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید (Arnon, 1949).

غلظت کلروفیل a= ۰/۰۱۲۷ (A663) - ۰/۰۰۲٦۹ (A645)

غلظت کلروفیل b= ۰/۰۲۲۹ (A645) - ۰/۰۰٤٦۸ (A663)

غلظت کارتنوئید= (A470) - ۰/۰۱٤٤ (A663) - ۰/٦۳۰۸ (A645)

اندازه‌گیری پرولین در برگ‌های فریز شده با استفاده از روش (Bates et al., 1973) انجام شد. برای این منظور ۰/۱ گرم از نمونه‌ی فریز شده در دمای ۸۵- درجه سانتی‌گراد با ۵ میلی‌لیتر محلول اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد عصاره‌گیری شد و پس از سانتریفوژ کردن (٦۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه، ٤ درجه سانتی‌گراد)، ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده برداشته و با ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۳۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط گشته و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک نیز اضافه گردید و در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ ساعت) قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها در یخ، ٤ میلی‌لیتر تولوئن به نمونه‌ها پس از مخلوط نمودن به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و سپس ۱۵ دقیقه ورتکس گردیدند. میزان جذب مایع رویی که در تولوئن حل شده بود و به رنگ صورتی بود در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA redear قرائت گردید. کربوهیدرات‌های محلول با استفاده از روش آنترون در برگ‌ها اندازه‌گیری گردید. نمونه برگ‌های فریز شده در دمای ۸۵- درجه سانتی گراد پس از عصاره‌گیری با ٤

میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد سانتریفیوژ گردید (۶۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه) تا مایع خالصی از عصاره برگ بدست بیاید. عصاره خالص بدست آمده با ۲ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ مخلوط و نمونه‌ها به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شدند. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل با ۳ میلی‌لیتر آنترون به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس گشته و درون حمام بخار (بن ماری) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند، سپس نمونه را سریعا به مدت ۵ دقیقه درون ظرف یخ گذاشتیم تا به دمای اتاق برسند و واکنش متوقف گردد. در مرحله آخر نیز میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه ELISA redear در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید. پراکسیداسیون لیپیدها با اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) بررسی شد. ۰/۲۵گرم برگ با نیتروژن مایع پودر شد و سپس چهار میلی‌لیتر محلول تری-کلرواستیکاسید ۱٪ به آن اضافه شد و کاملاً هموژنیزه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و دو میلی‌لیتر از محلول روشناور آن جمع‌آوری گردید. به محلول رو شناور جمع‌آوری شده ۲/۵ میلی‌لیتر تیوباربیتوریکاسید ۰/۵٪ اضافه شد. محلول به مدت پنج دقیقه در۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژگردید. به یک میلی‌لیتر از روشناور فوق چهار میلی‌لیتر محلول ۵٪ تیوباربیتوریکاسید حاوی ۲۰٪ تریکلرواستیکاسید افزوده شد. محلول حاصل ۳۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بلافاصله روی یخ سرد گردید و سپس به مدت ۱۵دقیقه در۱۰۰۰۰دور سانتریفوژ شد. جذب روشناور فوق در طول موج ۶۰۰ و ۵۲۳ نانومتر قرائت گردید. میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۲۳ نانومتر قرائت شد و پس از کسر میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر از آن، با استفاده از ضریب خاموشی ($۱۵۵Mm^{-1}cm^{-1}$) محاسبه شد. محتوای پراکسید هیدروژن طبق روش Velikova و Loreto (۲۰۰۵) اندازه گیری شد. ابتدا ۱ گرم برگ توزین و سپس با ده میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیکاسید ۱٪ به کاملاً هموژنیزه گردید. محلول خاصل به مدت ۱۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریوفیوژ شد. به ۰/۵ میلی لیتر از محلول رو شناور جمع‌آوری شده ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=7) و ۱ میلی لیتر معرف یدید پتاسیم (۱ مولار) اضافه شده و میزان جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

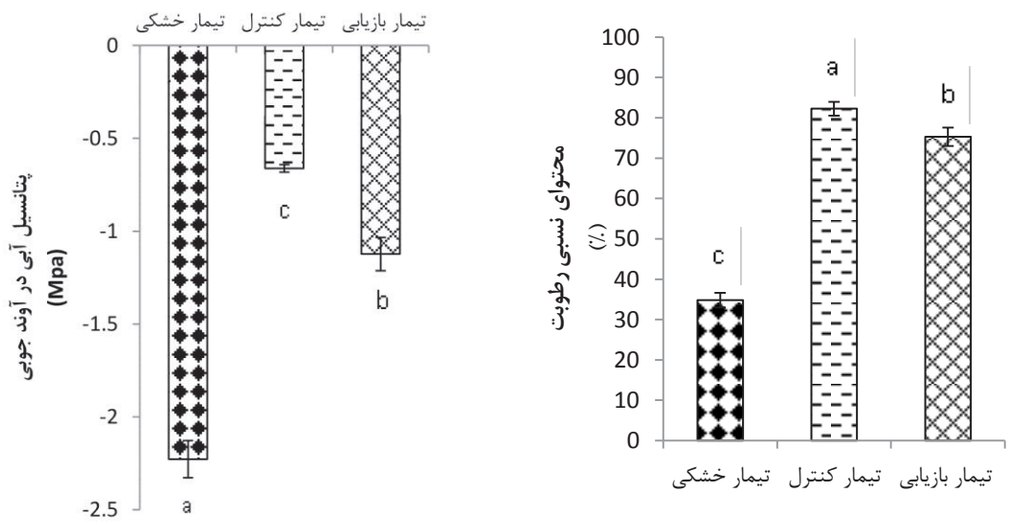
تمامی اطلاعات بدست آمده در محیط نرم افزار Excel (۲۰۰۳) سازماندهی و نمودارهای مربوطه با استفاده از این نرم افزار ترسیم شد. تجزیه و تحلیل های آماری

با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. پس از آزمون نرمالیتی و همگنی داده‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف و لون، با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل آماری انجام شد.

نتایج

- شاخص‌های فیزیولوژیکی

نتایج آنالیز واریانس یک طرفه حاکی از آن است که پتانسیل آبی گیاه به شدت تحت تاثیر تیمارهای اعمال شده قرار گرفته چرا که در سطح احتمال یک درصد بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری ثبت شده است ($P < 0.0001$) (جدول ۱). در همین راستا نتایج مقایسه میانگین‌ها نیز موید آن است که گیاهان تحت تنش، پتانسیل آبی خود را به سمت منفی افزایش داده‌اند که نشان از کاهش پتانسیل آبی گیاه است و اما بعد از عملیات بازیابی، گیاه پتانسیل آبی خود را تاحدودی افزایش داده است ولی بطور کامل به مقادیر گیاهان کنترل نرسیده است (نمودار ۱). آنالیز آماری نیز اختلاف معنی‌دار را بین مقادیر رطوبت نسبی در سه تیمار اعمال شده نشان داد (جدول ۱) بطوری که بیشترین و کم‌ترین مقدار RWC به ترتیب در گیاهان کنترل و تحت تنش اندازه‌گیری شده است. بعد از رفع تنش گیاه توانسته است به مقدار قابل توجهی خود را بازیابی کند (نمودار ۱).



نمودار ۱: بررسی مقادیر پتانسیل آبی و محتوی نسبی رطوبت در گیاهان تحت تنش خشکی و میزان بازیابی آن بعد از آبیاری دوباره.

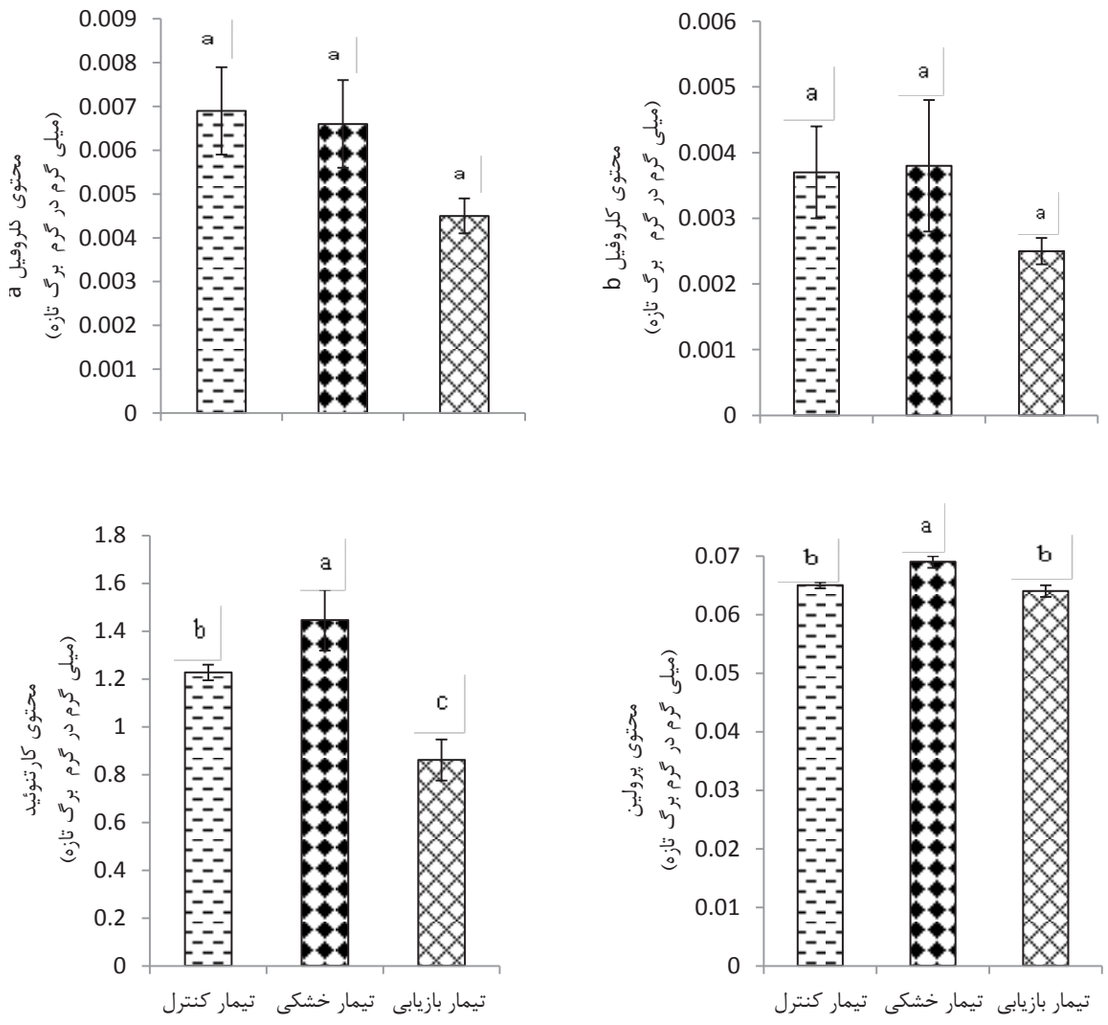
- شاخص‌های بیوشیمیایی

اعمال تنش خشکی نتوانست تاثیر قابل توجهی بر محتوای کلروفیل در برگ گیاه داشته باشد چرا که از لحاظ محتوای کلروفیل a و b بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد (جدول ۱). در مقایسه با گیاهان شاهد، کاهش بسیار محدودی در میزان کلروفیل a برای گیاهان تحت تنش ثبت شده است که البته آزمون آماری آن را تایید نکرده است و همچنین کاهش مقادیر کلروفیل بعد از آبیاری مجدد گیاهان نیز از لحاظ آماری تایید نشده است (نمودار ۲). محتوای کارتنوئید در پاسخ به تنش خشکی کاهش جزئی ولی معنی‌داری داشته است (نمودار ۲). بنظر می‌رسد که کاهش غیرمتعارف رنگدانه های برگ در تیمار بازیابی را می توان به افزایش نسبت وزن به حجم نمونه های برگ پس از آبگیری نسبت داد. نتایج آنالیز واریانس نشان می‌دهد که از لحاظ محتوای پرولین آزاد بین سه تیمار اعمال شده اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۱) بطوری که حدود ٦ درصد افزایش در میزان پرولین در برگ گیاهان تحت تنش خشکی مشاهده می‌شود. از طرفی دیگر بین گیاهان کنترل و بازیابی شده اختلاف معنی‌داری از این لحاظ وجود ندارد. تنش خشکی نتوانسته است باعث ایجاد پراکسیداسیون لیپید بشود چرا که آزمون آماری و به تبعیت از آن مقایسه میانگین ها به روش دانکن اختلاف معنی‌داری را بین تیمار کنترل، قطع آبیاری و بازیابی از جهت میزان مالون در آلدئید نشان نمی‌دهد (نمودار ۳). همچنین میزان پراکسید هیدروژن نیز تحت تاثیر تنش خشکی قرار نگرفته است. آنالیز واریانس یک طرفه افزایش بسیار جزئی در محتوی کربوهیدرات‌های محلول (حدود ۰/٦ درصد) در گیاهان تحت تنش خشکی را معنی‌دار نشان داده است و از طرفی بعد از آبیاری مجدد، گیاهان تحت خشکی محتوای کربوهیدرات خود را به مقدار گیاهان شاهد برگردانده‌اند (نمودار ۳).

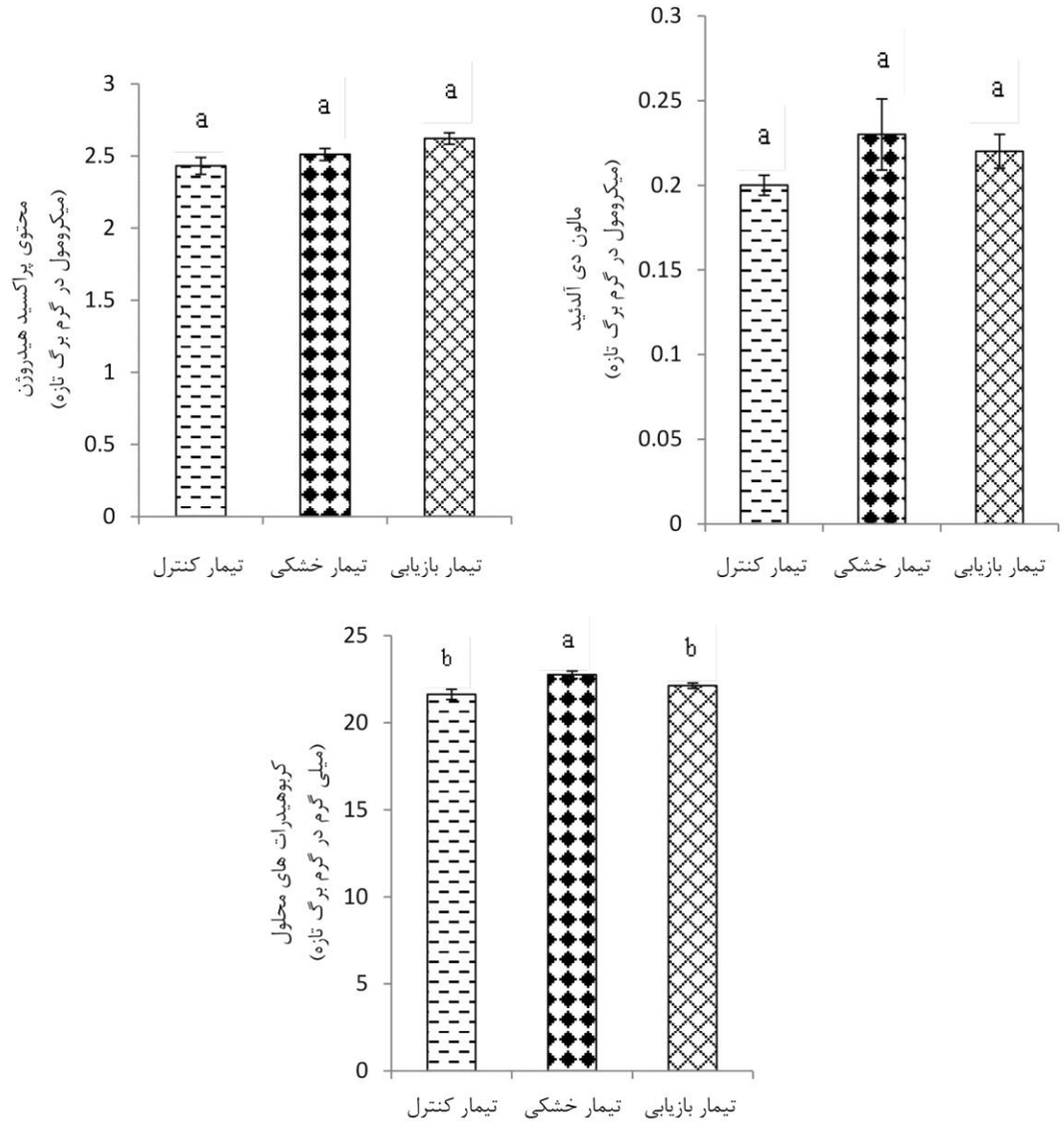
جدول ۱: نتایج آنالیز واریانس در رابطه با تاثیر تنش خشکی بر شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی

پارامترهای مورد بررسی	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره F	sig
شاخص‌های فیزیولوژیک				
پتانسیل آبی گیاه	۲	۲/۹۱٦	۸٦/۰۲۱	۰/۰۰۰**
محتوی نسبی رطوبت	۲	۲۹۵۲/٦	۱۲٦/۷۳٤	۰/۰۰۰**
شاخص‌های بیوشیمیایی				
محتوی کلروفیل a	۲	۰/۰۰۱	۱/۳٤۳	۰/۲۹۱ns

پارامترهای مورد بررسی	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره F	sig
محتوی کلروفیل b	۲	۰/۰۰٤۱	۰/۹٤۱	۰/٤۱۲^{ns}
محتوی کارتنوئید	۲	۰/۹٥۳	۰/۰۱۳	۰/۰۰٥**
محتوی پرولین	۲	۰/۰۰۱	۰/٦۱۱	۰/۰٤٤*
محتوی کربوهیدرات های محلول	۲	۱۰/٥۸٦	٦/۲۳۲	۰/۰۱۱*
محتوی پراکسید هیدروژن	۲	۰/۰۰۱۱	۳/۸۹۷	۰/۰٥۳^{ns}
محتوی مالون دی آلدئید	۲	۰/۰۰۰۱	۰/۹۳۹	۰/٤۱٤^{ns}
توضیح: **، * به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۱ و ٥ درصد است.				



نمودار ۲: تغییرات رنگدانه‌های گیاهی و میزان پرولین برگ در پاسخ به تنش خشکی و میزان بازیابی آنها بعد از آبیاری مجدد. توضیح: حروف نامشابه نشان از اختلاف معنی‌دار در سطح ٥ درصد می باشد.



نمودار ۳: تغییرات مالون‌دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و کربوهیدرات‌های محلول در پاسخ به تنش خشکی و میزان بازیابی آنها بعد از آبیاری مجدد. توضیح: حروف نامشابه نشان از اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

عکس‌العمل‌های فیزیولوژیکی و کوتاه مدت یکی از رایج‌ترین راه‌های مقابله گیاهان با تنش خشکی است (Pessarakli, 1999) لذا غربال‌گری ژنوتیپ‌های مقاوم بر اساس پاسخ‌های فیزیولوژیک (Winter et al., 1988) و بیوشیمیایی (Martine et al., 1993) بسیار کارا و

سودمند می‌باشد. در این مطالعه پتانسیل آبی گیاه و محتوای نسبی رطوبت در ژرم پلاسم وحشی گلابی (*P. boisseriana*) مورد مطالعه قرار گرفت. پتانسیل آبی در نهال گلابی وحشی بعد از ۱۸ روز بدون آبیاری تا حدود ۷۳ درصد کاهش یافته است این در حالی است که بعد از آبیاری مجدد در طول یک هفته، پتانسیل آبی در گیاهان تحت خشکی تا ٤٢ درصد به نهال‌های شاهد نزدیک شد. بطور کل گیاه تا زمانی می‌تواند از مقدار رطوبت خاک استفاده کند که پتانسیل آب گیاه پایین‌تر از پتانسیل آبی خاک باشد (احمدی موسوی و همکاران، ۱۳۸٤) لذا حداقل میزان پتانسیل آبی در گلابی وحشی همزمان با پژمردگی برگ ۲/۲۲- مگاپاسکال ثبت شده است. حفظ پتانسیل آبی در حد مطلوب تا قبل از پژمردگی برگ یکی از نشانه های مقاومت گیاه به تنش خشکی می‌باشد (راد و همکاران، ۱۳۹۱) چرا که گیاه توانسته است پس از مدت یک هفته خود را تا حد قابل قبولی بازیابی کند. از آنجایی که بین پتانسیل آبی گیاه و رطویت نسبی همبستگی مثبت وجود دارد (Oneill et al., 2006) لذا به سبب کاهش جذب آب از ریشه، محتوی نسبی رطوبت در برگ نیز کاهش قابل ملاحظه‌ایی داشته است بطوری که حداقل آن به مقدار ۳۵٪ در تیمار خشکی و حداکثر آن به مقدار ۸۳٪ در تیمار شاهد اندازه‌گیری شده است پس بطور کل می‌توان اذعان داشت که تنش خشکی حدود ۵۸٪ مقدار رطوبت نسبی در برگ را کاهش داده است. اغلب این موضوع مطرح می باشد که برای حفظ عملکرد گیاه در حد اپتیمم و نرمال چه درصدی از آب در برگ احتیاج است (راد و همکاران، ۱۳۹۱). از آن جایی که همزمان با پدیده پژمردگی برگ در گلابی وحشی مقدار رطوبت نسبی ۳۵٪ اندازه گیری شده است همراستا با نظر Kaiser (۱۹۸۷) بنظر می‌رسد که این مقدار برای گیاه گلابی وحشی نیز حد حیاتی و بحرانی می‌باشد. طبق نظر این محقق در صورتی که مقدار RWC از ۳۵٪ کمتر شود فرآیند بازیابی انجام نخواهد شد و مرگ گیاه حتمی است ولی در این تحقیق مشاهده شد که بعد از یک هفته آبیاری مجدد برای گیاهان تحت خشکی، این ژرم پلاسم وحشی توانسته است که تا حدود ۵۳٪ مقدار RWC خود را افزایش بدهد و به شرایط کنترل نزدیک کند که این یافته حاکی از قدرت بازیابی قابل قبول در گیاه گلابی وحشی می باشد. تطبیق اسمزی فرایندی است که به سلول گیاهی این توانایی را می‌دهد که علی‌رغم پایین بودن پتانسیل آبی تورژسانس خود را حفظ کند (Maricle et al., 2007). اعتقاد بر این است که سلول گیاهی در پاسخ به تنش خشکی و شوری شروع به سنتز و تجمع برخی از آمینو اسیدها (از قبیل پرولین)، پروتئین ها، قندها (از قبیل گلوکز و ساکارز)، ترکیبات

الکلی، سیکلیتول‌ها و اسیدهای آلی می‌نماید (Hasegawa et al., 2000., Arndt et al., 2000., Masinde et al., 2005). مطالعه تغییرات غلظت پرولین در برگ گلابی وحشی بعد از اعمال تنش خشکی نشان می‌دهد که گیاه برای تعدیل فشار اسمزی افزایش محدود ولی معنی‌داری (حدود ٦٪) در محتوی پرولین داشته است و بعد از رفع خشکی مجددا میزان آن کاهش یافته است. جوادی و همکاران (۱۳۸۳) نیز افزایش پرولین در ژنوتیپ های گلابی آسیایی را گزارش کرده‌اند. در رابطه با پرولین و نقش آن در تعدیل اثرات خشکی نظرات متفاوت وجود دارد. هانسون و همکاران (۱۹۹۹) در گیاه جو بعنوان یک گیاه تک لپه بین مقاومت به خشکی و میزان پرولین یک رابطه معکوس را گزارش کرده‌اند (Hanson et al., 1979) حال آنکه در بیشتر مطالعات پرولین بعنوان یک عامل مثبت مطرح می‌باشد (Blum and Ebercon, 1976). افزایش غلظت این اسید آمینه به تعادل اسمزی کمک می‌کند (آقایی سربزه و همکاران، ۱۳۸۸). حداقل میزان پرولین در نهال‌های آبیاری (۰/۰۰٦٥ میلی‌گرم در گرم وزن برگ تازه) و بازیابی شده (۰/۰۰٦٤ میلی‌گرم در گرم وزن برگ تازه) اندازه گیری شده است چرا که پرولین در این شرایط با اکسیژن ترکیب شده و تبدیل به گلوتامیک اسید و دیگر ترکیبات می‌شود (Stewart et al., 1977., Sarker et al., 1999). تجزیه پروتئین در برگ‌های بالغ (Kao, 1981)، تاثیرات تنظیمی ABA بر متابولیسم پرولین (Rontein et al., 2002., Serraj and Sinclair, 2002)، وجود ترکیبات پرانرژی حاصل از فتوسنتز (Mattioni et al., 1997., Hare et al., 1999) و کاهش کاتابولیسم پرولین (Blum et al., 1996) مهم‌ترین عوامل افزایش پرولین در گیاهان تحت خشکی می‌باشد. تجمع قندهای محلول بعنوان اسمولیت، یکی دیگر از مکانیسم های سلول گیاهی در تعدیل اسمزی می‌باشد (Orcutt and Nilsen, 2000) که به جهت وزن مولکولی پایین و حلالیت بالا برای سلول گیاهی ایجاد سمیت نمی‌کنند (Ashraf and Foolad, 2007). قندهای محلول در نهال‌های تحت تنش خشکی مورد مطالعه قرار گرفت. همانند پرولین، میزان قندهای محلول نیز افزایش محدودی را در پاسخ به تنش خشکی در نهال های گلابی وحشی داشته است (حدود ٥٪) و بعد از آبیاری مجدد بازگشت به شرایط گیاه کنترل انجام گرفته است. مهمترین فعالیت فیزیولوژیک این قندها ممانعت از اتصال غشاهای مجاور، نگه داری از پروتئین ها و لیپیدها و تنظیم ژن و تعادل اسمزی می باشد (Ho et al., 2001) که افزایش آن پیش از این در گونه های اکالیپتوس (شریعت و عصاره، ۱۳۸۷) و ارقام گلابی (جوادی و

همکاران، ۱۳۸۳) نیز گزارش شده است. تنش خشکی یک تنش چند بعدی و یکی از پیامدهای آن ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول گیاهی است (Chaves et al., 2003) تحمیل تنش خشکی باعث افزایش بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (Active Oxygen Species) و در نتیجه باعث تخریب اکسیداتیو سلول گیاهی می‌شود. این اکسیژن‌های فعال محصول متابولیسم‌های هوازی می‌باشند که در طی تنش خشکی با قطع سیستم انتقال الکترون تولید آنها بیشتر می‌شود (Asada, 1999., Van Breusegem et al., 2001). به هنگام تنش خشکی فعالیت فتوسنتز محدود می‌شود و در ادامه، در کلروپلاست تولید برخی از اکسیژن‌های فعال از قبیل رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) افزایش می‌یابد (Foyer et al., 1994., Asada, 1999). حضور اکسیژن‌های فعال در کلروپلاست باعث تجزیه و تخریب رنگیزه‌های گیاهی می‌شود (Sairam et al., 2002). اندازه‌گیری محتوی کلروفیل a و b در نهال‌های گلابی وحشی بعد از ۱۸ روز بدون آبیاری حاکی از عدم اثر منفی و قابل ملاحظه تنش اکسیداتیو می‌باشد چرا که آنالیز آماری از این لحاظ بین تیمار شاهد و خشکی اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. بنظر می رسد که کاهش غیرمتعارف رنگدانه های برگ در تیمار بازیابی را می‌توان به افزایش نسبت وزن به حجم نمونه‌های برگ پس از آبگیری نسبت داد. کلروفیل a نسبت به کلروفیل b حساسیت بیشتری به استرس خشکی دارد (Oncel *et al.*, 2000) بطوری که در این تحقیق نیز مشاهده می‌شود که کلروفیل a حدود ۵ درصد کاهش داشته است ولی از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. محتوی کارتنوئید پس از تحمیل تنش خشکی افرایش معنی‌داری داشته است که این موضوع به توان آنتی اکسیدانتی کارتنوئید و نقش آن در جاروب کردن گونه های اکسیژن فعال مرتبط است (Inze & Montagu, 2000) لذا می‌توان اذعان داشت که یکی از مکانیسم‌های ژرم‌پلاسم وحشی گلابی برای مقابله با تنش اکسیداتیو و جلوگیری از کلروفیلاز، افزایش محتوی کارتنوئید می‌باشد. گونه‌های اکسیژن فعال به نوبه خود می‌توانند با پراکسیداسیون باعث تخریب لیپیدها نیز بشوند. مالون دی آلدئید (MDA) شاخصی است که می توان از طریق آن مقدار تخریب پراکسیداسیون لیپید را مورد ارزیابی قرار داد (Chaves et al., 2003., Shao et al., 2005). مطالعه مالون دی آلدئید در نهال‌های گلابی وحشی حاکی از آن است که شرایط بدون آبیاری تا ۱۸ روز نمی‌تواند تنش اکسیداتیو قابل ملاحظه در سلول گیاهی آن داشته باشد چرا که میزان این ماده سمی تنها حدود ۱۳٪ افزایش

نشان داده که پس از دریافت آب مقدار آن سریعا کاهش یافته است. از طرف دیگر مقدار پراکسید هیدروژن نیز موید این ادعاست چرا که هیچ گونه تفاوت معنی‌دار و قابل توجهی مشاهده نشده است. پراکسید هیدروژن بعلت نقش اکسیداتیو برای سلول گیاه سمی محسوب می‌شود و توسط برخی از آنزیم‌های آنتی کسیداتیو از قبیل پراکسیداز حذف می شود (Ames et al., 1993).

نتیجه‌گیری نهایی

ارزیابی شاخص‌های فیزیولوژیکی از قبیل پتانسیل آبی گیاه و محتوی نسبی رطوبت نشان داد که ظهور علائم پژمردگی برگ (Leaf rolling) شاخص مناسبی برای درک میزان مقاومت ژرم پلاسم وحشی گلابی به شرایط بدون آبیاری می باشد چرا که مقدار RWC در این زمان در حد بحرانی بوده و امکان بازیابی گیاه پس از دریافت آب مجددا امکان‌پذیر است. در صورتی که شرایط خشکی ادامه یابد مرگ گیاه محتمل است. در طول یک دوره ۱۸ روزه، تنش اکسیداتیو توسط برخی از سیستم‌های دفاعی از قبیل افزایش میزان کارتنوئید تعدیل و کاهش یافته است که البته باید نقش آنزیم‌های اکسیداتیو نیز در مطالعات آینده تعیین گردد. در نهایت می‌توان ادعا کرد که این ژرم پلاسم وحشی قادر است در مرحله نهال حدود ۱۸ روز را بدون آبیاری تحمل کند.

منابع

احمدی موسوی، ع. ا.، منوچهری کلانتری، خ.، ترکزاده، م. (۱۳۸٤). اثر نوعی براسینواستروئید بر مقدار تجمع مالون دآلدئید، پرولین، قند و رنگیزه های فتوسنتزی در گیاه کلزا تحت تنش کم آبی. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۱۸ شماره (٤): ۲۹۵-۳۰٦.

آخوندی، م.، صفرنژاد، ع.، لاهوتی، م. (۱۳۸۵). اثر تنش خشکی بر تجمع پرولین و تغییرات عناصر در یونجه های یزدی، نیکشهری و رنجبر (*Medicago sative*). علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۱۰ شماره (۱): ۱٦۵-۱۷٤.

آقائی سربرزه، م.، رجبی ، ر.، حقپرست، ر.، محمدی، ر. (۱۳۸۸). مطالعه تغییر محتوی پرولین، خسارت غشاء سلولی و تحمل به تنش خشکی در ژنوتیپ‌های گندم دوروم (*Triticum turgidum* var. durum) در شرایط کنترل شده. مجله به زراعی نهال و بذر. جلد ۲ شماره (۳): ۳٤۷-۳۵٤.

جوادی، ت. و بهرام نژاد، ب. (۱۳۸۹) محتوای نسبی آب و تبادلات گازی سه ژنوتیپ وحشی گلابی در شرایط تنش آبی، نشریه علوم باغبانی. جلد ۲٤ شماره (۲): ۲۲۳-۲۳۳.

جوادی، ت.، ارزانی، ک. و ابراهیم زاده، ح. (۱۳۸۳) بررسی میزان کربوهیدراتهای محلول و پرولین در نه ژنوتیپ گلابی آسیایی (*Pyrus seratonia*) تحت تنش خشکی، مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۱۷ شماره (٤):۱۲- ۲٤.

حیدری شریف آباد، ح . (۱۳۷۹). گیاه خشکی و خشکسالی. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع. ۱۰۲ صفحه.

راد، م.ه.، عصاره، م. ح.، سلطانی، م.، شریعت، آ. (۱۳۹۱). تاثیر تنش خشکی خاک بر روابط آبی اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*). مجلهٔ جنگل ایران، انجمن جنگلبانی ایران. جلد٤ شماره (۲): ۸۹-۹۹.

شریعت، آ.، عصاره، م. ح. (۱۳۸۷). اثر تنش خشکی بر رنگیزه‌های گیاهی، پرولین، قندهای محلول و پارامترهای رشد چهار گونه از اکالیپتوس. مجله پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی. جلد ۱۳۹:۷۸-۱٤۸.

نیاکان، م.، قربانلی، م. ل. (۱۳۸٦). اثر تنش خشکی بر شاخص‌های رشد، فاکتورهای فتوسنتزی، میزان پروتئین و محتوی یونی در بخش‌های هوایی و زیرزمینی دو رقم سویا. مجله رستنیها. جلد ۸ شماره (۱):۱۷-۳۲.

Al-Ghamdi, A. (2009). Evolution of oxidative stress tolerance in two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in response to drought. Int. J. Agr. Biol. (11): 7-12.

Ames, B.M., Shigena, M.K. and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 90: 7915-7922.

Arndt, S.K., Wanek, W., Clifford, S.C., Popp, M. (2000). Contrasting adaptations to drought stress in field-grown *Ziziphus mauritiana* and *Prunus persica* trees: Water relations, osmotic adjustment and carbon isotope composition. Aust J Plant Physiol. 27:985–996.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, Plant Physiol. 24: 1-15.

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 601–639.

Ashraf, M. and Karimi, F. (1991). Screening for some cultivar/line of black gram for resistance to water stress, J Trop Agr. 68:57-62.

Ashraf, M. and M.R. Foolad. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot. 59: 206-216.

Bao, L., Chen, K.S., Zhang, D., Cao, Y.F., Yamamoto, T. and Teng, Y.W. (2007). Genetic diversity and similarity of pear cultivars native to East Asia revealed by SSR (Simple Sequence Repeat) markers. Genet. Resour. Crop Evol. 54:959-971.

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

Blum, A., Ebercon, A. (1976). Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. Crop Sci. 16:428–431.

Blum A, Munns R, Passioura JB, Turner N.C. (1996). Genetically engineered plants resistant to soil drying and salt stress: how to interpret osmotic relations? Plant Physiol. 110: 1051-1053.

Bogeat-Triboulot MB, Brosché M, Renaut J, Jouve L, Le Thiec D, Fayyaz P, Vinocur B, Witters E, Laukens K, Teichmann T. (2007) Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. Plant Physiol.143: 876–89

Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. Plant Cell. 7: 1099-1111.

Chaves, M. M., Maroco, J. P. and Pereira, J. S. (2003) Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. Funct Plant Biol. 30: 239–264.

Filippou, P., Bouchagier, P., Skotti, E., Fotopoulos, V. (2014). Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species Ailanthus altissima to drought and salinity. Environ. exp. bot. 97:1-10.

Echevarrı´a-Zomen˜o., S., Ariza, D., Jorge, I., Lenz, C., DelCampo, A., Jorrı ´n, J.V., Navarro, R. M. (2009). Changes in the protein profile of Quercus ilex leaves in response to drought stress and recovery. J Plant Physiol. 166:233—245.

Foyer, C.H., Descourvieres, P. and Kunert, K.J. (1994). Protection against oxygen radicals: An important defense mechanism studied in transgenic plants. Plant, Cell Environ.17: 507-523.

Gazanchian, A., Hajheidari, M., Sima, N.K. and Salekdeh, G.H. (2007). Proteome response of Elymus elongatum to severe water stress and recovery. J Exp Bot., 58: 291-300.

Hanson, A.D., C.E. Nelsen, A.R. Pedersen and E.H. Everson. (1979). Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance. Crop Sci., 19: 489-493.

Hao, L., Houguo, L., Zongling W., Xinmin L. (1999). Effect of water stress and rewateing on turnover and gene expression of photosystemaII reaction center polypeptide D1 in *Zea mays*. Funct Plant Biol: 26(4): 375-378.

Hare, P.D., Cress, W.A., van Staden, J. (1999). Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. J Exp Bot. 50: 413–434.

Hasegawa, P.M., R.A. Bressan, J.K. Zhu and H.J. Bohnert. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 51: 463-499.

Heath, R.L. and L. Packer. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189-198.

Ho, S.L., Chao, Y.C., Tong, W.F and Yu, S.M. (2001). Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-regulated gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. Plant Physiol. 125: 877– 890.

Ingram, J., and D. Bartels. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 47:377-403.

Inze, J., Montagu, M.V. (2000). Oxidative stress in plants. TJ International Ltd, Padstow, Carnawell. Great Britain. 321 p.

Jiang G, Wang, Z., Shang, H., Yang, W., Hu, Z., Phillips, J., Deng, X. (2007). Proteome analysis of leaves from the resurrection plant *Boea hygrometrica* in response to dehydration and rehydration. Planta. 225:1405–1420.

Kaiser, W. M. (1987) Effect of water deficit on photosynthetic capacity, Physiol Plantarum 71:142-144.

Kao, C.H. (1981). Senescence of rice leaves. VI. Comparative study of the metabolic changes of senescing turgid and water stressed excised leaves. Plant cell physiol. 22:683-685.

Kuznetsov, Vl.V., Shevyakova, N.I. (1999). Proline under stress: biological role, metabolism, and regulation, Russ J Plant Physiol.46: 274-289.

Maricle, B.R., D.R. Cobos and C.S. Campbell. (2007). Biophysical and morphological leaf adaptations to drought and salinity in salt marsh grasses. Environ Exp Bot. 60:458–467

Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H, Chunwongse, J., Frary, A., Ganal, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D., Tanksley, S.D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science. 262: 1432-1436.

Martin, M., Micell, F., Morgan, J.A., Scalet, M., Zebi, G. (1993) Synthesis of osmotically active substances in winter wheat leaves as related to drought resistance of different genotypes. J Agron Crop Sci, 171: 176-184.

Martínez, JP., Silva, H., Ledent, J.F. and Pinto, M. (2007) Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), Eur J Agron. 26: 30-38.

Masinde P.W., Stützel, H., Agong, S.G. and Frickle, A. (2005). Plant growth, water relations and transpiration of spider plant (*Gynandropsis gynandra* (L.) Briq) under water limited conditions. J Amer Soc Hort Sci. 130(3): 469-477.

Mattioni, C., N.G. Lacerenza., A. Troccoli., A.M. De Leonardis., and N. Di Fonzo. (1997). Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of Triticum durum seedlings. Physiol Plantarum. 101:787– 792.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci 9, 405-410.

Morales, C.G., Pino, M.T. del Pozo, A. (2013). Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent rehydration cycles in two raspberry cultivars. Sci Horticulturae. 162:234–241.

Noctor, G., Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 49:249–279.

Oncel, I., Keles, Y., and Ustun, A.S. (2000). Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. Environ Pollut. 107: 315–320.

Oneill, P. M., Shanahan, J. F. and Schepers, J. S. (2006) Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions, Crop Sci, Plant Physiol. 24:1-15

Orcutt, D.M., Nilsen, E.T. (2000). The physiology of plants under stress—soil and biotic factors. New York: John Wiley & Sons. 684 pp

Pessarakli, M. (Ed.). (1999). Handbook of Plant and Crop Stress, 2nd Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, Inc., New York, 1254 p.

Rontein, D., Basset, G,. Hanson, A.D. (2002). Metabolic Engineering of Osmoprotectant Accumulation in Plants. Metab Eng. 4: 49–56.

Sairam, R.K., K.V. Roa and G.C. Srivastava. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Sci. 163: 1037-1046.

Sairam, R.K., P.S. Deshmukh and D.C. Saxena. (1998). Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerant to water stress. Biol Plantarum. 41: 387-394.

Salekdeh, G.H., J. Siopongco, L.J. Wade, B. Ghareyazie and J. Bennett. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics, 2: 1131-1145.

Sarkar, S., Azad, A.K., and Hopper, A.K. (1999). Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNAs in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci. USA 96, 14366– 14371.

Schwanz, P., C. Picon, P. Vivin, E. Dreyer, J.M. Guehl and A. Polle. (1996). Responses of antioxidative systems to drought stress in pendunculate oak and maritime pine as modulated by elevated CO_2. Plant Physiol. 110: 393-402.

Serraj, R., Sinclair, T.R. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. Plant, Cell Environ. 25(2): 333-341.

Shalata, A. and M. Tal. (1998). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative Lycopersicon pennelli. Physiol Plantarum., 104: 169-174.

Shao, H.B., Z.S. Liang and M.A. Shao. (2005). Changes of some anti-oxidative enzymes under soil water deficits among 10 wheat genotypes at maturation stage. Colloids Surf. B: Biointerfaces, 45: 7–13

Siemens, J. A. and Zwiazek, J. J. (2003) Effects of water deficit stress and recovery on the root water relations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings, Plant Sci. 165 :113-120.

Stewart, C.R., Boggess, S.F., Aspinall, D., Paleg, G. (1977). Inhibition of proline oxidation by water stress. Plant Physiol. 59: 930-932.

Van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J.F., and Inze, D. *(*2001*).* The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Sci. 131: 405–414.

Vavilov, V. (1994) Origin and geography of cultivated plants. D. Love (translator). Cambridge university press. Cambridge. England.

Velikova, V., Loreto, F. (2005). On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. Plant Cell Environ. 28:318-327.

Volk, G.M., Richards, C.M., Henk, A.D., Reilley, A.A., Bassil, N.V., Postman, J.D. (2006). Diversity of wild *Pyrus communis* based on microsatellite analysis. J Amer Soc Hort Sci. 131: 408-417.

Winter, S.R., J.T. Musick, and K.B. Porter. (1988). Evaluations of screening techniques for breeding drought-resistant winter wheat. Crop Sci. 28: 512-516.

Yardanov, V., and Tsoev, T. (2000). Plant Responses to Drought, Acclimation and Stress Tolerance. Photosynthica, 38(1): 171-186.

Zhang, J., Nguyen, H.T., Blum, A. (1999). Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. J. Exp. Bot., 50:291–302.