

واکنش رقم‌ها و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی به تنش اسمزی و دمایی در شرایط درون‌شیشه‌ای

فروش جعفری^۱، جابر پناهانده^{۲*}، علیرضا مطلبی‌آذر^۲ و موسی ترابی‌گیگلو^۳

۱ و ۲. دانشجوی سابق دکتری و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۲۳)

چکیده

به منظور مطالعه واکنش گیاه سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه‌ای به تنش اسمزی و دمایی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. عامل اول چهار سطح تنش اسمزی ناشی از پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰ شامل شاهد، -۰/۵، -۱ و -۱/۵- مگاپاسکال به ترتیب معادل صفر، ۲۰۰ گرم در لیتر، ۳۰۰ گرم در لیتر و ۳۷۰ گرم در لیتر از ماده PEG-6000 بود و عامل دوم دما در سه سطح شامل ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد روی گیاهچه‌های سه کلون امیدبخش ۱۴۳، ۳۰۱ و ۳۰۶ و دو رقم تجاری پیکاسو و مارفونا در محیط کشت MS اعمال شدند. صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند مقدار آب نسبی برگ (RWC)، میزان نشت الکترولیت (EL)، مقدار پرولین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX) و اسکوربات‌پراکسیداز (APX) و محتوی پروتئین اندازه‌گیری شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده سه عامل و همچنین اثر متقابل عامل‌های مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد بر صفات یادشده به‌استثنای محتوی پروتئین، تأثیر معنی‌داری داشتند. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که با افزایش دما و مقدار پلی‌اتیلن‌گلیکول از میزان آب نسبی برگها کاسته شد، اما میزان نشت الکترولیت، مقدار پرولین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و اسکوربات‌پراکسیداز افزایش داشتند. رقم مارفونا نسبت به شرایط تنش متحمل‌ترین و کلون ۳۰۶ حساس‌ترین بود، گیاهچه‌های آن با افزایش شدت تنش از بین رفتند. تلفیق تنش اسمزی با افزایش درجه حرارت برای گیاهچه‌های سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه‌ای قابل تحمل نبود، به‌طوری‌که تنش اسمزی -۰/۵- مگاپاسکال به بالا و ۳۵ درجه سانتی‌گراد باعث خشک‌شدن گیاهچه‌ها گردیدند.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، پرولین، دما، سیب‌زمینی، کاتالاز، PEG.

Response of potato's cultivars and promising clones to osmotic and temperature stress under *in vitro* conditions

Farnush Jafari¹, Jaber Panahandeh^{2*}, Ali Reza Motallebi-Azar² and Mousa Torabie-Giglou³

1, 2. Former Ph. D. Student and Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3. Assistant Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohagege Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: May 17, 2018 - Accepted: Jul. 14, 2018)

ABSTRACT

In order to study responses of potato plantlets under *in vitro* conditions to osmotic and temperature stresses, a factorial experiment was conducted in a completely randomized blocks design with three replications. The first factor was osmotic stress caused by polyethylene glycol 6000 in four levels including control, 0.5, 0.1 and -1.5 MPa which were equal to 0, 200, 300 and 370 gr l^{-1} PEG. The second factor was temperature at three levels of 15, 25 and 35 °C applied on plantlets of three Promising clones (143, 301 and 306) and two commercial cultivars (Picasso and Marfona) in MS medium. Physiological and biochemical traits including relative water content (RWC), electrolyte leakage (EL), proline, catalase (CAT), peroxidase (POX) and ascorbate peroxidase (APX) as well as protein content were measured. Results of variance analysis showed that the simple effects of three factors as well as the interaction were significant at $1 \leq 0.01$ on the mentioned traits, but the protein content was not significant. Comparing the mean of treatments showed that by increasing the temperature and concentrations of PEG, RWC was reduced, while EL, proline content, CAT, POX and APX enzymes activity were increased. Also, results indicated that Marfona was more tolerant to stress conditions than other varieties and clones, which seems is due to preventing the effects of stress by increasing the accumulation of proline and the activity of antioxidant enzymes. Clone 306 was more susceptible than other varieties and clones and showed more vulnerability to stress and its plantlets were killed by increasing stress levels. The combination of osmotic and temperature stresses were not tolerated by potato's plantlets under *in vitro* conditions, because osmotic stress of -0.5 MPa and higher in combined with 35°C caused the plantlets to dry.

Keywords: Catalase, PEG, Peroxidase, potato, Proline, temperature.

* Corresponding author E-mail: panahandeh@tabrizu.ac.ir

مقدمه

رشد و تولید محصولات گیاهی همواره تحت تأثیر شرایط مختلف محیطی مانند خشکی، شوری، عدم تعادل مواد غذایی و دمای نامناسب است. خشکی از مهمترین عوامل محدود کننده رشد گیاهان و تولید محصولات گیاهی در بیشتر زمین‌های کشاورزی دنیاست. واکنش گیاهان نسبت به تنش خشکی در سطوح مختلف، از سلول تا تمام گیاه و بسته به شدت و مدت تنش و نیز برحسب گونه گیاه و حتی در ژنوتیپ‌های متعلق به یک گونه گیاهی متفاوت است. از طرف دیگر، گیاهان دارای دامنه دمایی مشخصی برای رشد و نمو بهینه می‌باشند که خارج از آن، تولید و پراکنش آنها محدود می‌شود. در همین زمینه، دمای بالا به‌عنوان یک عامل تنش‌زا در محیط پیرامون گیاهان می‌تواند سرعت فرآیندهای فیزیولوژی و بیوشیمیایی سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. مقدار نسبی آب برگ از پارامترهای فیزیولوژی مهمی هست که همبستگی خوبی با مقاومت به تنش نشان می‌دهد. بالا بودن محتوی نسبی آب برگ در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی می‌تواند به دلیل وجود ساز و کارهای کاهش‌دهنده تلفات آب از راه روزنه‌ها و یا به‌واسطه جذب بیشتر آب از طریق توسعه سیستم ریشه‌ای باشد. در تنش خشکی محتوی نسبی آب گیاه کاهش می‌یابد که باعث کاهش فشار تورژسانس سلول‌ها شده و سلول‌ها چروکیده می‌شوند. کاهش مقدار آب نسبی برگ در اثر تنش در پژوهش‌های متعددی و بر روی گونه‌های مختلف گیاهی انجام گرفته است و همگی بر این دلالت دارد که تنش موجب کاهش آن می‌شود (Sinclair & Ludlow, 1985). کاهش مقدار آب نسبی برگ در اثر تنش در گیاهانی مانند کدو (Hajjhasanloo et al., 2015) و شنبليله (Kakavand et al., 2017) مشاهده شده است. نتایج مطالعات انجام‌گرفته حاکی از این هستند که میزان ناپایداری غشای سلولی در اثر تنش‌های محیطی افزایش پیدا می‌کند. افزایش نشت یونی و کاهش محتوای نسبی آب برگ در نعنای فلفلی (Hokm Abadi et al., 2017)، نشت الکترولیت در اثر تنش خشکی در هندوانه ابوجهل (Hasan Dokht et al., 2017) گزارش شده است.

آنزیم‌هایی که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در پاکسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن سلول نقش دارند شامل کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز می‌باشند. آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن تولیدشده در سلول را به شکل H_2O و O_2 تجزیه می‌کند. لذا زمانی که آنزیم کاتالاز در محیط فعالیت می‌کند پراکسید هیدروژن تجزیه شده و از میزان H_2O_2 محیط کاسته می‌شود (Aebi, 1984). آنزیم پراکسیداز با استفاده از گوئیکول به‌عنوان سوبسترا، پراکسید هیدروژن را به‌صورت H_2O تجزیه می‌کند، لذا وقتی آنزیم پراکسیداز در محیط فعالیت نشان می‌دهد گوئیکول به تترگوئیکول اکسید شده و به تدریج غلظت تترگوئیکول در محیط افزایش پیدا می‌کند (Chance & Maehly, 1955). آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را با استفاده از آسکوربیت به‌عنوان سوبسترا تجزیه می‌کند، لذا زمانی که آنزیم آسکوربیت پراکسیداز در محیط باشد آسکوربیت اکسید شده و از میزان آسکوربیت محیط کاسته می‌شود (Nakano & Asada, 1987). در زیتون، با افزایش تنش خشکی فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ افزایش یافت، در صورتی که در وضعیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در گیاهان شاهد و تنش‌یافته تفاوتی مشاهده نگردید (Zarrabi et al., 2010). افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز و کاتالاز در اثر تنش در گوجه‌فرنگی (Nasibi, 2011) و آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز در بادام (Zokaii et al., 2014) مشاهده شده است. پرولین رایج‌ترین اسمولیتی است که در بسیاری از گیاهان به‌عنوان پاسخ طبیعی به انواع تنش‌های محیطی در گیاه تجمع می‌یابد و تجمع آن در سیتوپلاسم سلول موجب کاهش پتانسیل اسمزی شده و جذب آب در شرایط تنش را افزایش می‌دهد. پرولین در حفظ متابولیسم و سنتز پروتئین و در تعادل اسمزی داخل سلولی و محافظت آنزیم‌های سلولی و ساختار آنها نقش دارد (Anjum et al., 2014). در نهال‌های گلایی با افزایش شدت تنش، میزان پرولین افزایش یافت که میزان آن در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود (Javadi et al., 2004). افزایش پرولین در اثر تنش در کشت درون‌شیشه‌ای انگور (Mehri et al.,

و ۱/۵- مگا پاسکال بود. برای ایجاد تنش اسمزی ۰/۵-، ۱- ۱/۵- مگا پاسکال به ترتیب مقدار ۲۰۰، ۳۰۰ و ۳۷۰ گرم پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در یک لیتر آب مقطر حل شد (Michel & Kaufmann, 1973). عامل دوم دما بود که در سه سطح ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد بر روی رقم‌ها و کلون‌های سیب‌زمینی اعمال شدند. ریزنمونه‌ها پس از ضد عفونی در محیط ریشه‌زایی پایه شامل محیط کشت MS حاوی ۸ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، کشت شدند. پس از ریشه‌دهی و رشد مناسب ریزنمونه‌ها، واکنش و تهیه مواد گیاهی به حد کافی، ریز نمونه‌های تک‌جوانه به طول ۲ سانتی‌متر ریشه دار شده، به محیط کشت نهایی حاوی پلی اتیلن گلیکول انتقال داده شدند. ظروف شیشه‌ای حاوی ریزنمونه‌ها به اتاقک‌های رشدی که دمایشان تنظیم شده بودند با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. برای جلوگیری از ژله‌ای شدن آگار، پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ با استفاده از تکنیک انتشار به محیط کشت افزوده شد. هشت هفته پس از اعمال تنش، گیاهان از محیط کشت خارج و صفات مورد نظر اندازه‌گیری شدند.

برای اندازه‌گیری میزان محتوای نسبی آب برگ در پایان دوره تنش، از هر گیاهچه نمونه برگی انتخاب شد. پس از اندازه‌گیری وزن تر (FW)، نمونه‌ها در داخل آب مقطر به مدت چهار ساعت در داخل یخچال نگهداری شدند و سپس وزن اشباع‌شده آنها اندازه‌گیری گردید (TW). در ادامه نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس وزن شدند، وزن خشک (DW) آنها به دست آمد. میزان محتوای نسبی آب برگ از رابطه زیر به دست آمد (Smart & Bingham, 1974).

$$RWC\% = [(FW-DW)/(TW-DW)] \times 100 \quad (1)$$

و گندم (Gholipour et al., 2017) گزارش شده است. تحت تنش تغییراتی در پروتئین‌ها مشاهده می‌شود. تنش‌های دمای بالا، شوری و خشکی می‌توانند سبب تجزیه و غیرفعال شدن بسیاری از پروتئین‌ها گردند. پاسخ به تنش در سطح مولکولی به‌ویژه تغییرات ناگهانی در بیان ژن‌ها که افزایش ساخت گروه‌های پروتئینی نتیجه می‌دهد، در تمام موجودات زنده یافت می‌شود (Allagulova et al., 2003). سیب‌زمینی محصول فصل سرد می‌باشد و دماهای بالا برای رشد آن مناسب نمی‌باشد و به دلیل سطحی بودن ریشه‌هایش که بیشتر در عمق ۳۰ سانتی‌متری خاک پراکنده‌اند (Allen & Scott, 1998)، به کمبود آب حساسیت بیشتری نشان می‌دهد (Carr, 1989) با توجه به این‌که تنش آبی و دمایی (چه به صورت دمای بالا و چه به صورت دمای پایین) تمامی واکنش‌های سلولی را در تمام سطوح تنظیمی از همانندسازی DNA گرفته تا بروز صفات موفولوژیک تحت تأثیر قرار می‌دهد، پژوهش حاضر در شرایط درون شیشه‌ای، با هدف مطالعه واکنش ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی به این نوع از تنش‌های محیطی با توجه به حذف عوامل جانبی مؤثر بر واکنش به تنش‌ها انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت و ریز ازدیادی دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی بر روی سه کلون امیدبخش به شماره‌های ۱۴۳، ۳۰۱ و ۳۰۵ و دو رقم تجاری پیکاسو و مارفونا (جدول ۱) که از کلکسیون ایستگاه تحقیقات کشاورزی اردبیل تهیه شده بودند، به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در سه تکرار و هر تکرار شامل یک ظرف شیشه‌ای حاوی ۵ ریزنمونه انجام گرفت. عامل اول، تنش اسمزی ناشی از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در چهار سطح شاهد، ۰/۵-، ۱-

جدول ۱. منشأ کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی استفاده‌شده در آزمایش

Table 1. The origin of potato promising clones used in the experiment

| Clone | Male | Female |
|-------|--|---|
| 143 | Caeser | Exceptional 4x hybrids of <i>S.stoloniferum</i> × <i>S. tuberosum</i> |
| 301 | Promising Clone of <i>S. tuberosum</i> | Luka |
| 306 | Luka | Exceptional 4x hybrids of <i>S.stoloniferum</i> × <i>S. tuberosum</i> |

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت و شکل‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار Office Excel (2010) رسم شدند.

نتایج و بحث

نتایج نشان دادند گیاهچه‌های کلون ۳۰۶ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و تنش اسمزی ۰/۵MPa، کلون‌های ۱۴۳، ۳۰۴، ۳۰۶ و رقم پیکاسو در تنش اسمزی ۱MPa - مگا پاسکال و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، کلون‌های ۱۴۳ و ۳۰۶ در تنش اسمزی ۱/۵MPa - و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و کلیه کلون‌ها و رقم‌های مورد مطالعه در پتانسیل اسمزی ۱/۵MPa - و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در اثر هر دو تنش در طول دوره پژوهش، خشک‌شده و از بین رفتند. تجزیه و تحلیل واریانس برای بقیه داده‌ها (جدول ۲) نشان داد کلیه صفات اندازه‌گیری شده تحت تأثیر غلظت‌های مختلف PEG و سطوح دمایی و نیز رقم‌ها و کلون‌های سیب‌زمینی قرار گرفتند. همچنین اثر متقابل فاکتورهای مورد مطالعه نیز برای کلیه صفات معنی‌دار بودند. این در حالی بود که درصد پروتئین تحت تأثیر هیچ‌کدام از فاکتورها و اثر متقابل آنها قرار نگرفت.

برای اندازه‌گیری نشت الکترولیت، هشت هفته پس از اعمال تیمارها نمونه گیاهی تهیه گردید و پس از سه بار شستشو در فالكون‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیرشده قرار داده شدند. فالكون‌ها در دمای اتاق (۲۵ °C) به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با دور ۱۰۰rpm قرار داده شدند. سپس هدایت الکتریکی اولیه (EC₁) اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها اتوکلاو شدند و پس از سرد شدن و رسیدن به دمای محیط اتاق، هدایت الکتریکی ثانوی (EC₂) اندازه‌گیری شد (Lutts *et al.*, 1995) درصد نشت الکترولیت از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$EL\% = EC_1/EC_2 \times 100 \quad (2)$$

برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates *et al.* (1973) استفاده شد و میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Aebi (1984) در طول موج ۲۴۰ نانومتر، فعالیت آنزیم پراکسیداز با روش Chance & Maehly (1955) در طول موج ۳۷۰ نانومتر و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano & Asada (1987) در طول موج ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. ضمن این‌که پروتئین با استفاده از روش Bradford (1976) در طول موج ۵۲۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. آنالیز

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف PEG و تنش دمایی بر روی صفات مورد مطالعه در رقم‌ها و کلون‌های

امیدبخش سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 2. The results of variance analysis of different PEG concentrations and temperature stress on studied traits in potato varieties and promising clones under in vitro conditions

| S.O.V | d.f | Mean Squares | | | | | | |
|--------------------------------------|-----|--------------|------------|-------------|-----------|------------|---------|---------------------|
| | | RWC % | EL % | Pro | CAT | POX | APX | Protein content |
| PEG | 3 | 19076.88** | 656.3** | 261324.6** | 4032.97** | 5548.69** | 7.45** | 67.84 ^{ns} |
| Temperature | 2 | 15373.55** | 11554.11** | 306471.32** | 4931.15** | 41130.68** | 14.43** | 27.56 ^{ns} |
| Variety & Clone | 4 | 773.88** | 866** | 8354.99** | 731.54** | 4224.10** | 0.22** | 43.46 ^{ns} |
| PEG × Temperature | 6 | 4753.7** | 3889.14** | 156057.39** | 2292.78** | 18890** | 6.31** | 51.27 ^{ns} |
| PEG × cultivar & Clone | 12 | 497.06** | 400.7** | 2637.63** | 124.25** | 1554.63** | 0.24** | 51.27 ^{ns} |
| Temperature × cultivar & Clone | 8 | 627.65** | 395.5** | 1841.64** | 21.99** | 628.92** | 0.18** | 44.88 ^{ns} |
| PEG × Temperature × cultivar & Clone | 24 | 820.73** | 571.56** | 2609.88** | 99.12** | 715.28** | 0.17** | 45.18 ^{ns} |
| Error | 120 | 3.21 | 0.56 | 9.54 | 1.43 | 4.83 | 0.01 | 44.91 |
| C.V. (%) | - | 3.29 | 1.99 | 2.13 | 6.58 | 2.88 | 1.37 | 41.67 |

C.V. ضریب تأثیر؛ ** و ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و نبود اختلاف معنی‌دار.

RWC: محتوای آب نسبی، EL: نشت یونی، Pro: پرولین، CAT: کاتالاز، POX: پراکسیداز، APX: آسکوربات پراکسیداز

C.V. Coefficient of Variation, **, ns: Significant at 1% and non-significant, respectively.

RWC: Relative Water Content, EL: Electrolyte Leakage, Pro: Proline, CAT: Catalase, POX: Peroxidase, APX: Ascorbate Peroxidase

جدول ۳. ضریب همبستگی صفات در تیمار شاهد (فاقد PEG) در رقم و کلون‌های سیب‌زمینی تحت شرایط درون‌شیشه

Table 3. Correlation coefficient of studied traits at the control treatment (no PEG) in potato variety and clones under *in vitro* conditions

| | RWC | EL | Proline | CAT | POX | APX | Protein |
|---------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------|
| RWC | 1 | | | | | | |
| El | 0.480 ^{ns} | 1 | | | | | |
| Proline | 0.472 ^{ns} | 0.596* | 1 | | | | |
| CAT | 0.274 ^{ns} | -0.340 ^{ns} | 0.460 ^{ns} | 1 | | | |
| POX | 0.565* | 0.321 ^{ns} | 0.814** | 0.650** | 1 | | |
| APX | 0.009 ^{ns} | 0.439 ^{ns} | 0.444 ^{ns} | -0.157 ^{ns} | 0.141 ^{ns} | 1 | |
| Protein | 0.369 ^{ns} | 0.080 ^{ns} | 0.323 ^{ns} | 0.474 ^{ns} | 0.236 ^{ns} | 0.250 ^{ns} | 1 |

ns, *, **: غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, *, **: Non-significant and significant at 5% and 1% of probability levels, respectively.

جدول ۴. ضریب همبستگی صفات در تنش ۰/۵- مگاپاسکال PEG در رقم و کلون‌های سیب‌زمینی تحت شرایط درون‌شیشه

Table 4. Correlation coefficient of studied traits in -0.5 MPa PEG in potato cultivars under *in vitro* conditions

| | RWC | EL | Proline | CAT | POX | APX | Protein |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| RWC | 1 | | | | | | |
| El | 0.933** | 1 | | | | | |
| Proline | 0.875** | 0.914** | 1 | | | | |
| CAT | 0.751** | 0.764** | 0.943** | 1 | | | |
| POX | 0.878** | 0.906** | 0.955** | 0.925** | 1 | | |
| APX | 0.906** | 0.946** | 0.985** | 0.911** | 0.968** | 1 | |
| Protein | 0.956** | 0.974** | 0.939** | 0.811** | 0.900** | 0.951** | 1 |

** : Significant at 1% of probability level.

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۵. ضریب همبستگی صفات در تنش ۱- مگاپاسکال PEG در رقم و کلون‌های سیب‌زمینی تحت شرایط درون‌شیشه

Table 5. Correlation coefficient of studied traits in -1MPa PEG in potato variety and clones under *in vitro* conditions

| | RWC | EL | Proline | CAT | POX | APX | Protein |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| RWC | 1 | | | | | | |
| El | 0.975** | 1 | | | | | |
| Proline | 0.948** | 0.985** | 1 | | | | |
| CAT | 0.892** | 0.936** | 0.977** | 1 | | | |
| POX | 0.904** | 0.953** | 0.989** | 0.989** | 1 | | |
| APX | 0.917** | 0.967** | 0.985** | 0.978** | 0.983** | 1 | |
| Protein | 0.960** | 0.986** | 0.994** | 0.959** | 0.975** | 0.966** | 1 |

** : Significant at 1% of probability level.

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۶. ضریب همبستگی صفات در تنش ۱/۵- مگاپاسکال PEG در رقم و کلون‌های سیب‌زمینی تحت شرایط درون‌شیشه

Table 6. Correlation coefficient of the studied traits in the -1.5MPa PEG in potato variety and clones under *in vitro* conditions

| | RWC | EL | Proline | CAT | POX | APX | Protein |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| RWC | 1 | | | | | | |
| El | 0.994** | 1 | | | | | |
| Proline | 0.984** | 0.986** | 1 | | | | |
| CAT | 0.935** | 0.939** | 0.970** | 1 | | | |
| POX | 0.983** | 0.986** | 0.998** | 0.978** | 1 | | |
| APX | 0.991** | 0.994** | 0.998** | 0.964** | 0.997** | 1 | |
| Protein | 0.964** | 0.972** | 0.972** | 0.960** | 0.973** | 0.978** | 1 |

** : Significant at 1% of probability level.

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

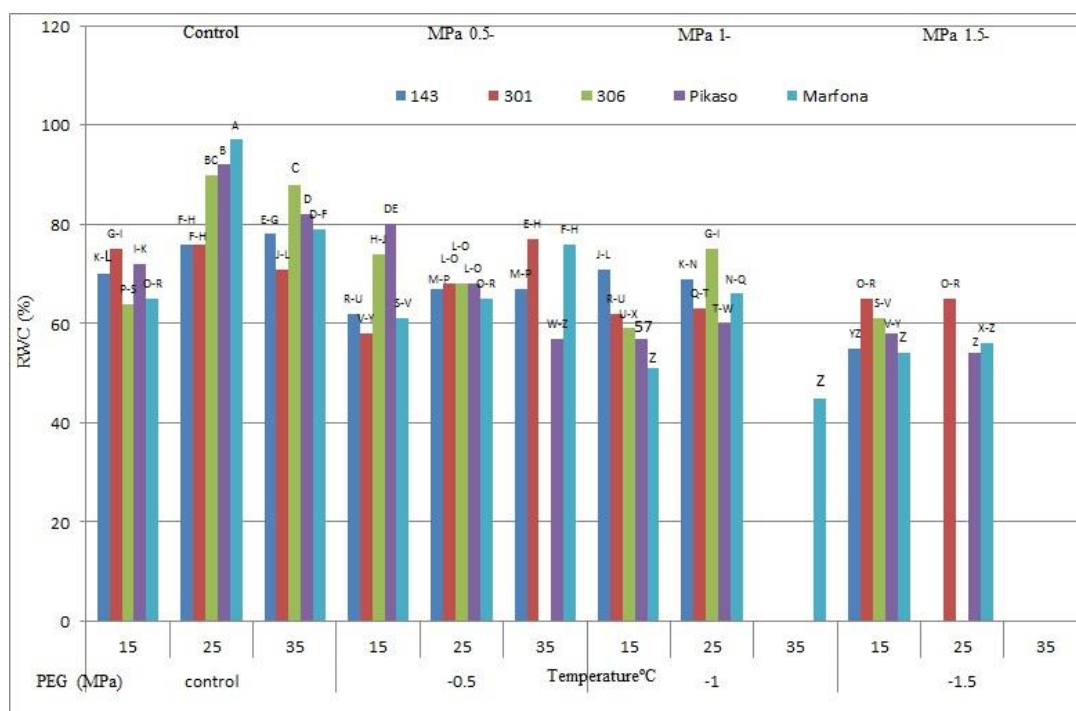
وضعیت آبی گیاهچه‌ها تأثیرگذار باشد، با این‌حال کلون ۳۰۶ توانست در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مقدار RWC خود را بالاتر از سایر رقم‌ها و کلون‌ها حفظ کند. از طرف دیگر، کشت‌هایی که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند مقایسه RWC آنها نشان داد که با افزایش مقدار پلی‌اتیلن‌گلیکول،

مقدار رطوبت نسبی برگ (RWC)

در کشت‌های شاهد، مقایسه RWC در سه دمای مورد مطالعه نشان داد که تنش دمایی ۱۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۲۵ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش معنی‌دار در مقدار RWC گردید و این امر نشان داد که افزایش و کاهش دما از مقدار بهینه می‌تواند بر

شاهد، RWC با صفات نشت یونی، مقدار پرولین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین همبستگی مثبت و غیرمعنی‌دار داشت، در صورتی‌که با پراکسیداز همبستگی مثبت معنی‌داری در سطح ۵٪ نشان داد (جدول ۳). با افزایش تنش اسمزی، نتایج نشان دادند که در ۰/۵- مگاپاسکال، ۱- مگاپاسکال و ۱/۵- مگاپاسکال همبستگی RWC با نشت یونی، آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین در سطح احتمال ۱٪ مثبت و معنی‌دار بود (جدول‌های ۴، ۵ و ۶). بالا بودن محتوی آب برگ در رقم، ممکن است به علت وجود ساز و کارهای کاهش‌دهنده تلفات آب از روزنه‌ها (بسته‌شدن روزنه‌ها)، افزایش غلظت شیره سلولی به دلیل جذب بیشتر آب از طریق توسعه سیستم ریشه باشد. مقدار نسبی آب برگ به طور مستقیم با آماس سلول و پتانسیل آبی گیاه بستگی دارد. از طرف دیگر تورم، در ارتباط با توسعه و تقسیم سلولی است و به این ترتیب ارتباط بین میزان تسبی آب برگ و عملکرد بیولوژیک وجود دارد (Yadav & Bhushan, 2001).

کاهش معنی‌داری در مقدار RWC مشاهده شد، در ۱/۵- مگا پاسکال، کلون‌های ۱۴۳ و ۳۰۶ نتوانستند زنده بمانند و این در حالی است که مقدار RWC در رقم‌های پیکاسو، مارفونا و کلون ۳۰۱ به ترتیب ۵۴، ۵۶ و ۶۵ درصد بود که کلون ۳۰۱ تحمل خوبی را به تنش اسمزی (درغیاب تنش دمایی) نشان داد. زمانی که این دو عامل تنشی به طور همزمان بر گیاهچه‌ها اعمال شدند مقدار RWC به شدت کاهش یافت، به طوری‌که عملاً گیاهچه‌هایی که در معرض تنش اسمزی بالاتر از ۰/۵- مگا پاسکال و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند، خشک شدند و از بین رفتند؛ با این حال، رقم مارفونا بالاترین تحمل را به تنش ۱- مگا پاسکال و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد. به نظر می‌رسد آستانه تحمل گیاهچه‌ها از نظر RWC به تنش اسمزی زمانی که دمای محیط کشت ۱۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد باشد، بیشتر است و گیاهچه‌ها نتوانستند حتی ۱/۵- مگا پاسکال را در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به خوبی تحمل کنند (شکل ۱). نتایج همبستگی صفات نشان داد که در تیمار



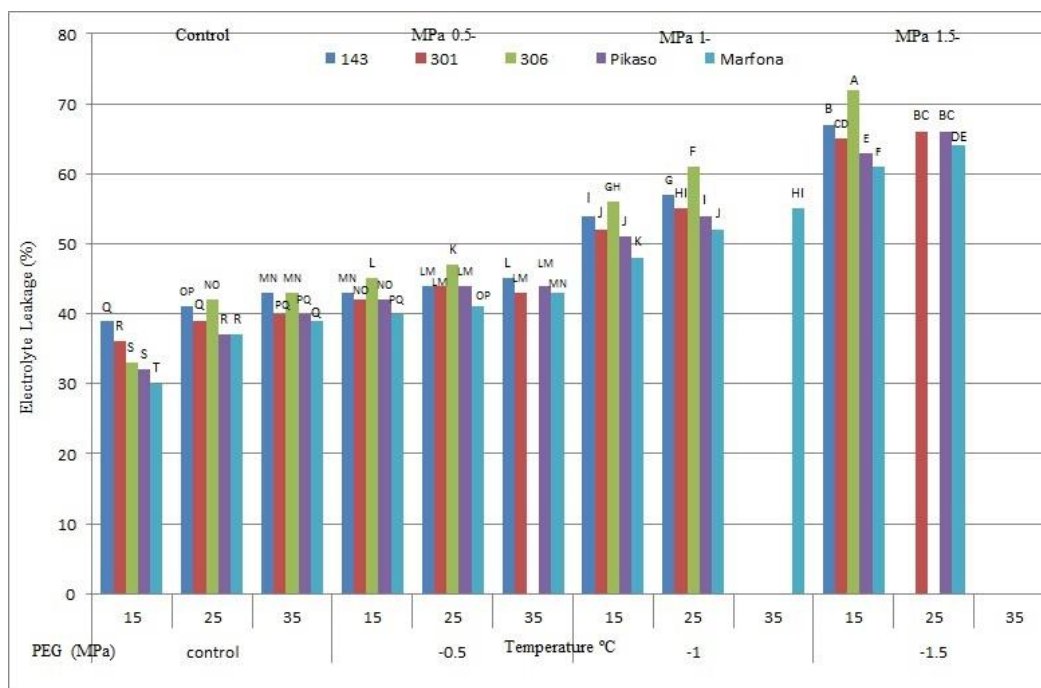
شکل ۱. تأثیر غلظت‌های PEG و تنش دمایی بر درصد آب نسبی برگ رقم‌ها و کلون‌های سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه‌ای
Figure 1. The effect of PEG concentrations and temperature stress on RWC percentage of potato varieties and clones under *in vitro* conditions

شرایط را بهتر تحمل نماید، در حالی که کلون ۳۰۶ با داشتن میزان نشت یونی بیشتر، به تنش حساسیت نشان داد. مقایسه نشت یونی در سه غلظت PEG زمانی که تنش دمایی وجود نداشته باشد (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نشان داد که افزایش غلظت PEG بر نشت الکترولیت به‌طور معنی‌داری نسبت به فقدان تنش اسمزی افزود، به‌طوری‌که مقدار آن در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱/۵- مگا-پاسکال به ۶۵ درصد در کلون ۳۰۶ افزایش یافت. از طرف دیگر، وقتی تنش‌های همزمان بر گیاهچه‌ها اعمال شدند، مقدار نشت الکترولیت افزایش محسوسی پیدا کرد و گیاهچه‌هایی که در معرض تنش اسمزی ۰/۵- مگا پاسکال و بالاتر از آن و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند، از بین رفتند و از بین رقم‌ها و کلون‌ها، کلون ۳۰۶ بیشترین آسیب‌پذیری را نشان داد و گیاهچه‌های آن خشک شدند. می‌توان نتیجه گرفت که گیاهچه‌ها در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد شرایط بهتری داشتند و در این دما توانستند بالاترین حد غلظت PEG را به‌خوبی تحمل کنند و خشک نشوند (شکل ۲).

در بررسی‌های به‌عمل‌آمده مشخص شده است که معمولاً رقم‌های مقاوم به تنش خشکی از RWC بالاتری در شرایط محدود بودن آب برخوردار هستند (Soukhtesaraee *et al.*, 2017). کاهش مقدار آب نسبی برگ انگور را در اثر تنش مشاهده نمودند و Hajihasanloo *et al.* (2015) در کدو تأثیر تنش آبی را مطالعه و کاهش مقدار رطوبت نسبی آب بر اثر تنش را مشاهده نمودند.

نشت الکترولیت (Electrolyte Leakage)

در تیمار شاهد که فاقد PEG بود، مقایسه دماهای مورد مطالعه نشان داد که تنش دمایی موجب افزایش میزان نشت الکترولیت گردید و بر این اساس دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد میزان نشت یونی کمتری نشان داد و بالا رفتن دما در غیاب تنش اسمزی از پایداری غشاها کاست و موجبات افزایش نشت الکترولیت را فراهم ساخت، با این حال رقم مارفونا با داشتن درصد کمتری از نشت الکترولیت در هر سه دمای مطالعه‌شده در مقایسه با سایر ارقام و کلون‌ها متمایز بود و توانست



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های PEG و تنش دمایی بر مقدار نشت الکترولیت رقم و کلون‌های سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه‌ای
 Figure 2. The effect of PEG concentrations and temperature stress on Electrolyte Leakage (EL) content of potato variety and clones under *in vitro* conditions

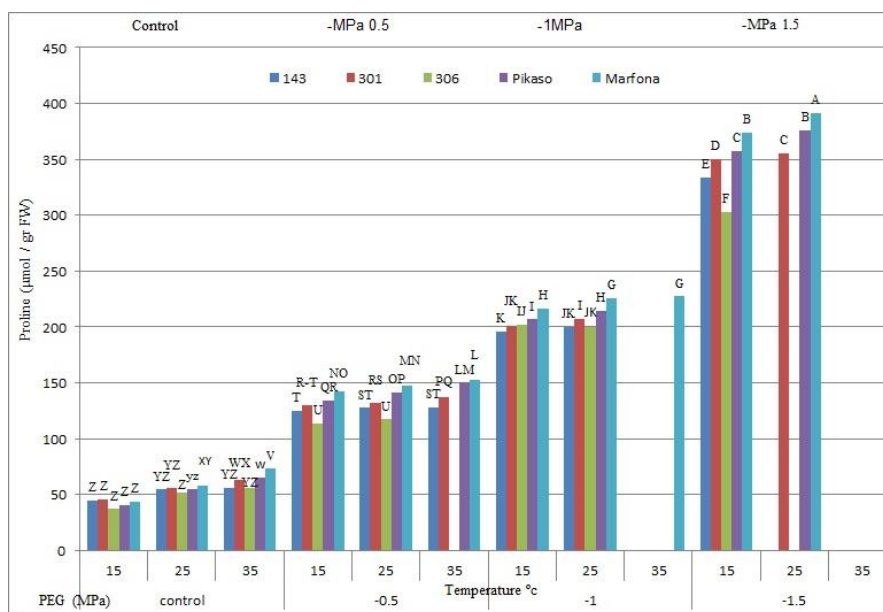
افزایش تحمل به خشکی می‌گردد (Mohsenzade *et al.*, 2006). در پژوهشی واکنش گیاهچه‌های ارزن دم‌روبهایی به تنش بررسی و همبستگی مثبت و معنی‌داری میان سلامت غشای سلولی و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاهچه‌های تحت تنش مشاهده شد (Sreenivasulu *et al.*, 2000). در بسیاری از محصولات، ثبات غشای سلولی به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان معیاری برای تمایز رقم‌های متحمل و حساس به تنش استفاده می‌شود و در برخی موارد، ثبات غشای بالاتر می‌تواند با تحمل به تنش غیرزنده ارتباط داشته باشد. افزایش نشت الکترولیتی مواد، نشانه‌ای از آسیب و کاهش پایداری غشاها می‌باشد که احتمالاً نتیجه تنش اکسیداتیو است. بر اثر تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع توسط ROS ترکیباتی مثل مالون‌دی‌آلدئید تولید می‌شود که برای سلول مسمومیت ایجاد می‌کند. تجمع مالون‌دی‌آلدئید در شرایط تنش سبب افزایش نفوذپذیری غشای پلاسمایی می‌شود. در نتیجه نشت یونی افزایش پیدا می‌کند که شاخصی از میزان صدمه اکسایشی به‌شمار می‌رود (Golen *et al.*, 2006). از طرف دیگر یکی از اولین بخش‌های گیاهی که آسیب می‌بیند غشای سلولی است که در اثر آن، تراوایی غشای سلولی افزایش می‌یابد و باعث می‌شود ترکیبات موجود در داخل سلول به سمت بیرون از سلول نشت کنند (Liu & Huang, 2000). در تحقیقی که توسط Nouri *et al.* (2016) بر روی ده رقم سیب‌زمینی انجام گرفت، مشاهده کردند که رقم مارفونا نسبت به سایر رقم‌ها از پایداری غشایی بیشتری برخوردار بود و میزان نشت یونی آن کمتر از سایر رقم‌ها بود. Hasani Moghadam *et al.* (2016) مشاهده کردند تنش آبی در برگ‌های انار مقدار نشت الکترولیت را افزایش داد. همچنین Karimi *et al.* (2013) نشان دادند که در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای بادام، مقدار آب برگ و پایداری غشای سلولی به‌طور معنی‌داری در رقم‌های مقاوم بالا بودند و بالا رفتن غلظت پلی‌اتیلن‌گلیکول در محیط کشت، نشت یونی را در برگ‌های ریزنمونه‌های حساس افزایش داد.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده نشت الکترولیت در تیمار شاهد با مقدار پرولین همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ داشت، اما با فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین همبستگی معنی‌دار نشان نداد (جدول ۳). افزایش غلظت PEG محیط کشت سبب شد که در تنش‌های اسمزی ۰/۵- و بالاتر ضریب همبستگی نشت الکترولیت با مقدار پرولین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین مثبت و معنی‌دار شود (جدول‌های ۴، ۵ و ۶). Molaahmad Nalousi *et al.* (2015) در پژوهشی همبستگی معنی‌داری را بین نشت یونی و آنزیم کاتالاز در طی دوران تنش خشکی در دو گونه چمن به‌دست آوردند. این نشان می‌دهد که با افزایش شدت تنش و افزایش نشت یونی، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برای کاهش سمیت ROS‌های تولیدشده افزایش می‌یابد. پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به کمبود آب، شدت تنش و نوع گونه گیاهی بستگی دارد. گونه‌های گیاهی مقاوم معمولاً ظرفیت حفاظتی کارآمدتری در مقابل تنش اکسیداتیو القاء شده توسط تنش کم‌آبی دارند که می‌تواند از طریق بالا بردن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش پیدا کند (Hosseini Boldaji *et al.*, 2012). در پژوهشی دیگر بین نشت الکترولیت و مقدار پرولین در گیاه لوبیا تحت شرایط تنش همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد؛ نتایج حاکی از آن است که هر چه میزان محتوای آب نسبی کاهش یابد نشت الکترولیتی غشای سلولی در اثر آسیب وارده به آن افزایش یافته و باعث تولید بیشتر پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌گردد؛ بنابراین گیاه در شرایط تنش با افزایش تجمع اسمولیت‌های سازگارکننده مانند پرولین باعث تنظیم اسمزی درون‌سلولی، حفظ تورژسانس سلولی و کاهش خسارت به غشای سلولی و جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها می‌گردد و تحمل به تنش افزایش می‌یابد (Boroujerdnia *et al.*, 2016). افزایش مقدار پرولین، پاسخی به تغییرات میزان محتوای نسبی آب و نشت الکترولیت غشای سلولی است که باعث

پرولین

در غیاب تنش اسمزی در محیط کشت، نتایج حاکی از افزایش میزان انباشت پرولین با بالا رفتن دما بود. بر این اساس مقایسه سه دمای مورد مطالعه نشان داد که دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد میزان تجمع پرولین بالاتری از دماهای ۱۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد داشت و این بیانگر تحمل دمای بالا توسط گیاهچه‌ها در تیمار شاهد به جهت وجود پرولین بیشتر بود؛ ضمن این‌که رقمی که بیشترین حد از تجمع آن را نشان داد، مارفونا بود و رقم پیکاسو، کلون‌های ۳۰۱، ۱۴۳ و ۳۰۶ در ردیف‌های بعدی قرار گرفتند. افزایش غلظت PEG محیط کشت بر میزان تولید پرولین در گیاهچه‌ها افزود تا گیاهچه‌ها بتوانند بدین‌وسیله در برابر شرایط تنش مقاومت نشان دهند، لذا بیشترین مقدار آن در ۱/۵- مگا پاسکال و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در رقم مارفونا بود و تجمع پرولین باعث شد که این رقم بتواند در مقابل تنش‌های اعمال‌شده تحمل داشته باشد. وقتی هر دو تنش همزمان بر گیاهچه‌ها اعمال گردیدند مقدار پرولین بیشتری تولید گردید، به‌طوری‌که غلظت‌های مختلف PEG برای گیاهچه‌ها در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به جهت وجود پرولین قابل تحمل بود و نمونه‌ها زنده ماندند. دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد حتی در غلظت ۰/۵- مگاپاسکال و بالاتر، باعث خشک‌شدن گیاهچه‌ها گردید (شکل ۳). ضریب همبستگی پرولین با فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین در تیمار شاهد معنی‌دار نبود، اما با فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح احتمال ۱٪ همبستگی مثبت و معنی‌دار داشت (جدول ۳). با افزایش میزان تنش اسمزی در محیط کشت، از ۰/۵- مگاپاسکال تا ۱/۵- مگاپاسکال، پرولین با فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ داشت (جدول‌های ۴، ۵ و ۶). در بررسی میزان همبستگی صفات در گیاه نخود تحت تنش خشکی مشخص شد که میزان پرولین همبستگی مثبت و معنی‌داری با میزان پروتئین کل محلول برگی داشت. وجود این همبستگی، نشان‌دهنده نقش مشترک این دو شاخص در ایجاد و حفظ سازگاری اسمزی در سلول‌ها

در شرایط تنش خشکی می‌باشد (Ganjeali *et al.*, 2014). انباشته‌شدن پرولین یک پاسخ رایج به طیف وسیعی از تنش‌های محیطی از جمله مقدار آب پایین و دماهای بالا و پایین در گیاهان به‌شمار می‌رود. گونه‌های گیاهی و حتی رقم‌های گوناگون در درون یک گونه تفاوت‌های زیادی در پاسخ به تنش اسمزی دارند. پرولین به‌عنوان یک محلول سازگار در گیاهان از ساختار پروتئینی سلول‌های گیاهی حفاظت می‌کند. علاوه بر این رادیکال‌های هیدروکسیل را از بین می‌برد. پرولین همچنین به‌عنوان منبع نیتروژن و ذخیره انرژی نیز استفاده می‌شود (Vendruscolo *et al.*, 2007). افزایش پرولین در شرایط تنش خشکی به‌عنوان یکی از پاسخ‌های دفاعی گیاه به تنش خشکی مطرح است. تجمع زیاد پرولین در سلول‌های تحت تنش، سبب محافظت از سلول در شرایط تنش و همچنین جلوگیری از ایجاد سمیت در سلول می‌شود (Tawfik *et al.*, 2008). پرولین همچنین در حفظ ساختار غشا، ایجاد سازگاری اسمزی و حفظ ساختار آنزیم‌ها در سلول، ایفای نقش می‌کند (Ashraf & Iram, 2005). در بعضی از گونه‌های گیاهی مانند سیب‌زمینی، پرولین نقش اصلی را در تنظیم فشار اسمزی بازی می‌کند. می‌توان گفت که حساس‌بودن رقمی به تنش ناشی از ساخته‌نشدن پرولین به‌مقدار کافی در رقم حساس می‌باشد و می‌توان نتیجه گرفت پرولین در گیاه سیب‌زمینی به‌عنوان یک شاخص مقاومت به تنش به‌شمار می‌آید و دارای نقش کلیدی در تنظیم اسمزی در شرایط تنش خشکی بوده و موجب افزایش مقاومت به خشکی شده و اثر تخریبی ناشی از تنش را تا حدودی کاهش می‌دهد (Amini *et al.*, 2015). Najafzadeh & Ehsanpour (2012) مشاهده کردند که با افزایش تنش خشکی در کشت درون‌شیشه‌ای سیب‌زمینی، مقدار پرولین در اندام‌های هوایی نسبت به محیط شاهد افزایش معنی‌داری یافت. ضمناً Masoudi Sadaghiani & Amini (2016) گزارش کردند که مقدار پرولین در سیب‌زمینی در اثر تنش خشکی افزایش یافته بود. مضاف بر اینها، رابطه مثبت بین تحمل به تنش و انباشته‌شدن پرولین در بادام نیز گزارش شده است (Zokaii *et al.*, 2013).



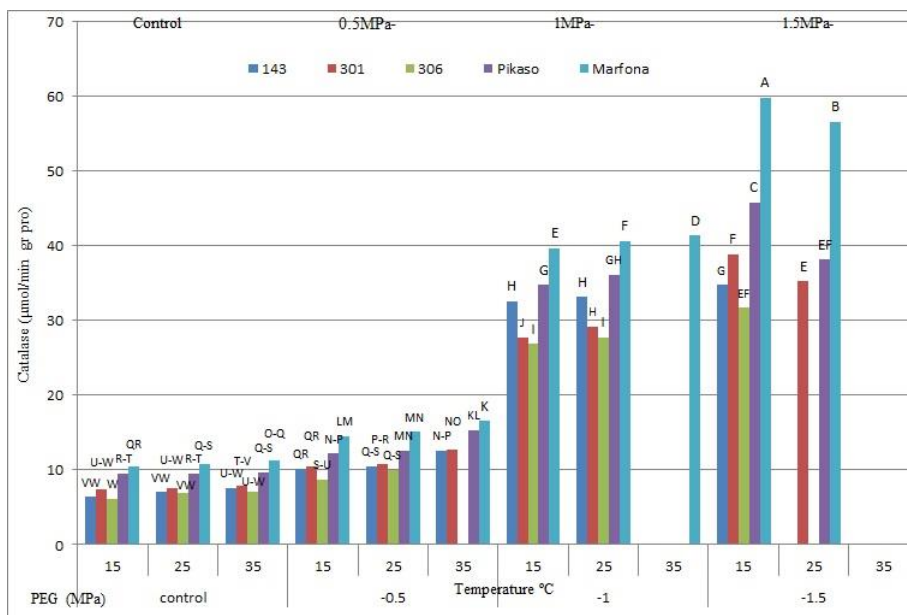
شکل ۳. تأثیر غلظت‌های PEG و تنش دمایی بر مقدار پرولین رقم و کلون‌های سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه
Figure 3. The effect of PEG concentrations and temperature stress on proline accumulation in potato variety and clones under *in vitro* conditions

آنزیم کاتالاز یکی از راهکارهای مقابله با تنش‌ها محسوب می‌شود، لذا گیاهچه‌هایی که در معرض تنش اسمزی قرار گرفتند، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برایشان قابل‌تحمل نبود و خشک شدند. به‌نظر می‌رسد آستانه تحمل گیاهچه‌ها از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به دماهای دیگر بیشتر بود و نمونه‌ها توانستند بالاترین میزان غلظت PEG را در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به‌خوبی تحمل نمایند (شکل ۴).

در تیمار فاقد PEG، ضریب همبستگی آنزیم کاتالاز با آنزیم پراکسیداز مثبت و معنی‌دار، ولی با آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین معنی‌دار نبود (جدول ۳). در سطوح مختلف PEG، همبستگی آنزیم کاتالاز با آنزیم‌های پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین مثبت و معنی‌دار بود (جدول‌های ۴، ۵ و ۶). بررسی ضرایب همبستگی بین صفات گیاه یونجه تحت شرایط تنش خشکی نشان داد که بین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز با همدیگر همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت که بیانگر نقش این آنزیم‌ها در کاهش آسیب‌های ناشی از وقوع تنش اکسیداتیو بود (Maghsoodi *et al.*, 2016).

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز

در رابطه با فعالیت آنزیم کاتالاز، مقایسه دماهای مورد مطالعه در غیاب PEG، نشان داد که دما در افزایش فعالیت آنزیم مؤثر بود، با این‌حال دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با دو دمای دیگر مقدار آنزیم بیشتری را به فعالیت واداشت. تا به این طریق گیاهچه‌ها بتوانند شرایط تنش را بهتر تحمل نمایند که این ویژگی در رقم مارفونا در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نمود بیشتری داشت، در صورتی‌که کلون ۳۰۶ با توجه به فعالیت آنزیمی پایین رقمی حساس نشان داد. بررسی غلظت‌های مختلف PEG نشان داد که افزایش غلظت این ماده در غیاب تنش دمایی (۲۵ درجه سانتی‌گراد) باعث افزایش شدید فعالیت آنزیم گردید، به‌طوری‌که در ۱/۵- مگاپاسکال و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گیاهچه‌های رقم مارفونا توانستند تحمل خوبی در برابر تنش نشان دهند. در سایر رقم‌ها و کلون‌ها فعالیت آنزیم با افت مواجه و از مقدار آن کاسته شد که در این وضعیت کلون‌های ۳۰۶ و ۱۴۳ امکان زنده‌ماندن را از دست دادند و خشک شدند. تأثیر همزمان هر دو عامل تنش بر نمونه‌ها باعث بیشتر شدن فعالیت آنزیم گردید و افزایش فعالیت



شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف PEG و تنش دمایی بر فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم‌ها و کلون‌های سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه
Figure 4. The effect of PEG concentrations and temperature stress on CAT activity in potato variety and clones under *in vitro* conditions

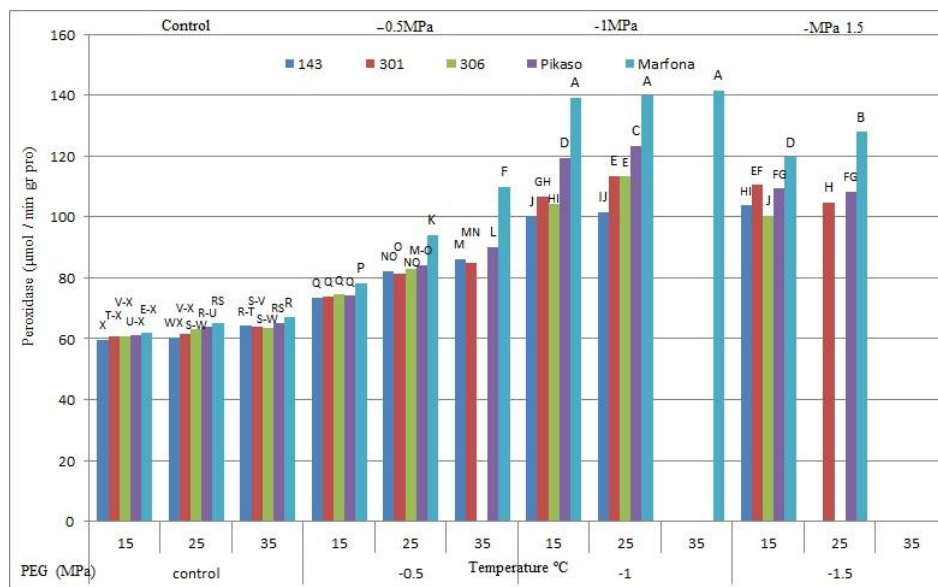
آنتی‌اکسیدان بیشترین صدمه را نشان دادند و از بین رفتند (شکل ۵). همبستگی آنزیم پراکسیداز با آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین در تیمار شاهد معنی‌دار نبود (جدول ۳)، اما همبستگی آنزیم پراکسیداز با آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین در تنش‌های اسمزی ۰/۵، -۱ و -۱/۵ مگاپاسکال مثبت و معنی‌دار بود (جدول‌های ۴، ۵ و ۶).

تنش دمایی در نبود تنش اسمزی موجب افزایش نسبی فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز گردید. در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد رقم‌ها و کلون‌های مورد مطالعه فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به دماهای ۱۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان دادند و مقدار آن در کلون‌های ۱۴۳، ۳۰۱، ۳۰۶، رقم‌های پیکاسو و مارفونا افزایش پیدا کرد، که رقم آخری با توجه به فعالیت بیشتر آنزیم در برابر شرایط واکنش نشان داد. از طرف دیگر افزایش غلظت PEG محیط کشت در غیاب تنش دمایی موجب شد که این آنزیم فعالیت بیشتری داشته باشد و در غلظت ۱/۵ مگاپاسکال به بالاترین حد تولید خود در رقم مارفونا (در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) برسد، به این ترتیب این رقم توانست تنش را در این شرایط تحمل نماید و گیاهچه‌هایش زنده ماندند. مطالعه تأثیر همزمان این دو تنش بر روی

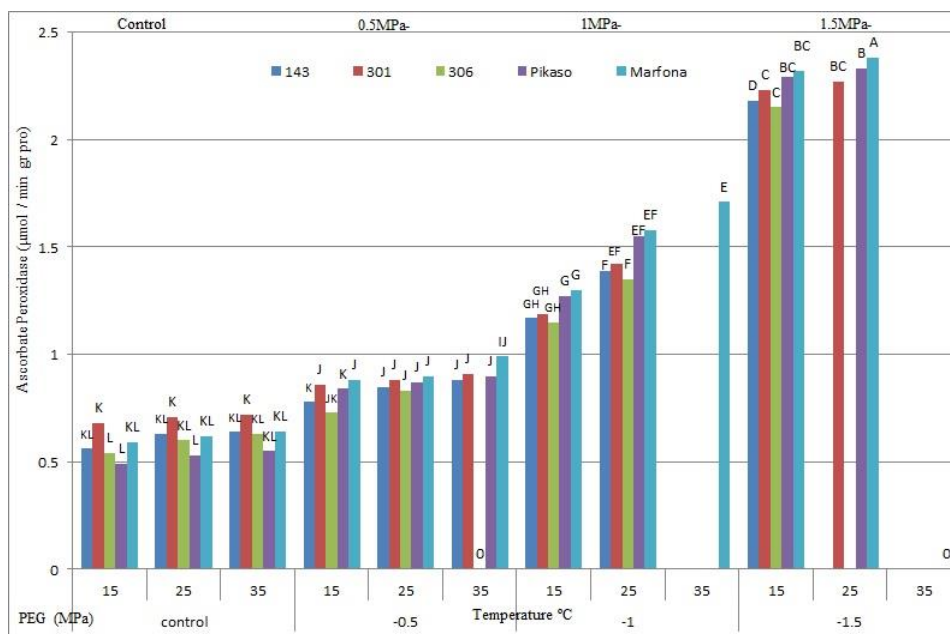
در تیمار شاهد و در نبود PEG، بررسی کشت‌های انجام‌گرفته در دماهای مورد مطالعه نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش دمای محیط رابطه مستقیم داشت و مقدار آن افزایش یافت، به طوری که در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد رقم مارفونا با مقدار عددی ۶۶/۹ میکرومول بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به دماهای ۱۵ درجه سانتی‌گراد (۶۱/۸ میکرومول بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) و ۲۵ درجه سانتی‌گراد (۶۵/۱ میکرومول بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در مقایسه با رقم و کلون‌های دیگر از خود نشان داد و می‌تواند به‌منزله متحمل‌بودن آن به شرایط تلقی گردد. مقایسه غلظت‌های PEG بدون در نظر گرفتن تنش دمایی نشان داد که افزایش غلظت PEG محیط کشت باعث شد که آنزیم فعالیت چشمگیری از خود نشان دهد و افزایش یابد، به طوری که رقم مارفونا در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱/۵ مگاپاسکال PEG با توجه به بالاترین حد فعالیت آنزیم (۱۲۷/۹ میکرومول بر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) به خوبی توانست تنش را تحمل نماید. تأثیر همزمان تنش‌ها نشان داد که تنش اسمزی ۰/۵ مگاپاسکال به بالا و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد باعث خشک‌شدن و از بین رفتن نمونه‌ها گردید و کلون ۳۰۶ با توجه به تولید کمتر آنزیم

آستانه تحمل گیاهچه‌ها به شرایط تنش با وجود افزایش فعالیت این آنزیم افزایش یافته و گیاهچه‌ها توانستند تنش اسمزی ۱/۵- مگاپاسکال را در دمای ۱۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌خوبی تحمل نمایند (شکل ۶).

گیاهچه‌ها نشان داد که فعالیت آنزیمی افزایش یافت، بر این اساس گیاهچه‌هایی که در معرض PEG به غلظت ۰/۵- مگاپاسکال و بالاتر و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، مقاومتی در برابر تنش نداشتند و خشک شدند. چنین به‌نظر می‌رسد که



شکل ۵. تأثیر غلظت‌های PEG و تنش دمایی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم‌ها و کلون‌های سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه
Figure 5. The effect of PEG concentrations and temperature stress on POX activity in potato variety and clones under *in vitro* conditions



شکل ۶. تأثیر غلظت‌های PEG و تنش دمایی بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم و کلون‌های سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه

Figure 6. The effect of PEG concentrations and temperature stress on APX activity in potato variety and clones under *in vitro* conditions

خسارت ناشی از تنش و آسیب‌های اکسیداتیو را کاهش دهد (Moussa & Abdel-Aziz, 2008). آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز نقش موازی و مشابهی را در سیستم دفاعی گیاه ایفا می‌کنند و وظیفه هر سه آنها تجزیه پراکسید هیدروژن تولید شده در سلول می‌باشد (Ariano *et al.*, 2005). گزارش شده است که در شرایط تنش، رونویسی از برخی ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برای بهبود وضعیت گیاه در شرایط تنش، افزایش پیدا می‌کند که نقش مهمی در کاهش گونه‌های اکسیژن فعال و آسیب‌های ناشی از آن ایفا می‌کند (Ratnayaka *et al.*, 2003). همچنین گزارش شده است که گیاهان قادر هستند با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش گرمایی مقاومت نمایند (Sariri *et al.*, 2011). می‌توان گفت که رشد بهتر گیاه در شرایط تنش خشکی مستلزم وجود مکانیسم‌های دفاعی از جمله سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و اسمولیت‌هایی نظیر پرولین جهت به حداقل رساندن اثرات تخریبی ناشی از تنش می‌باشد. Masoudi Sadaghiani & Amini Dehaghi (2016) نشان دادند که در سیب‌زمینی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تنش شدید به بیشترین مقدار بود، ولی تأثیری بر روی آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز نداشت، در صورتی که Sharma & Dubey (2005) افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز را در برنج گزارش کردند. افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گوجه‌فرنگی (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2010) و خیار (Amini *et al.*, 2017) در اثر تنش خشکی به‌دست آمده است. همچنین Razavizadeh & Shahrari (2017) در سورگوم افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز بر اثر تنش را تایید نمودند. Habibi (2013) در گیاه جو افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در اثر تنش خشکی را نشان داده است. در مطالعه‌ای که Zokaee *et al.* (2014) بر روی چند گونه از بادام انجام دادند، نشان دادند که در بعضی از گونه‌های بادام در بالاترین سطح تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و پراکسیداز در برگ بیشترین افزایش را داشتند. نهایت این‌که Dong *et al.* (2013) افزایش فعالیت

همبستگی بین فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز و محتوی پروتئین در غیاب تنش اسمزی و در تیمار شاهد معنی‌دار نبود (جدول ۳)، اما با افزایش غلظت PEG محیط کشت یعنی از ۰/۵- مگاپاسکال و بالاتر، همبستگی آن با محتوی پروتئین مثبت و معنی‌دار بود (جدول‌های ۴، ۵ و ۶). در پژوهشی که بر روی کدوی طبی تحت شرایط تنش خشکی انجام گرفت، ضریب همبستگی آنزیم کاتالاز با آنزیم پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و پرولین (دارای بیشترین میزان همبستگی) مثبت و معنی‌دار بود (Rabbi Angourani *et al.*, 2016). بررسی ضرایب همبستگی صفات گیاه یونجه تحت شرایط تنش خشکی نشان داد که بین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز با همدیگر همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت که بیانگر نقش این آنزیم‌ها در کاهش آسیب‌های ناشی از وقوع تنش اکسیداتیو بود (Maghsoodi *et al.*, 2016).

بین میزان تحمل به تنش‌های اکسیداتیو ایجادشده توسط تنش‌های محیطی و افزایش میزان غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان ارتباط بسیار قوی وجود دارد (Sairam & Srivastava, 2002). آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز از آنزیم‌های مهم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌باشند (Laspina *et al.*, 2005). گزارش شده است که آنزیم پراکسیداز پس از آنزیم کاتالاز در درجه دوم اهمیت در حذف پراکسید هیدروژن قرار دارد (Cook *et al.*, 2004) گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) تولیدی، نوکلئیک اسیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها روی بسیاری از جنبه‌های عملکردی سلول‌ها اثر می‌گذارند (Foryer & Noctor, 2000). Mitler (2002) گزارش کرد که سنتز آنزیم کاتالاز، پاسخ سازگار یافته در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشد. آنزیم کاتالاز با توانایی پاکسازی رادیکال H_2O_2 از تجمع ROS جلوگیری می‌کند و بنابراین گیاه را در برابر پراکسیداسیون لیپیدی سیستم‌های غشایی و آسیب‌های اکسیداتیو تحت تنش خشکی محافظت می‌کند (Mafakheri *et al.*, 2011). افزایش آنزیم پراکسیداز، از طریق لیگنینی‌شدن دیواره سلولی تا حدود زیادی می‌تواند

نیازمند بررسی در شرایط مزرعه‌ای نیز می‌باشد، از طرف دیگر کلون ۳۰۶ حساسیت بیشتری در برابر تنش‌ها نشان داد؛ زیرا در مقایسه با سایر رقم‌ها و کلون‌ها مقدار فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی کمتری داشت و گیاهچه‌هایش بر اثر تنش اسمزی ۰/۵- مگاپاسکال و بالاتر بالاخص در ترکیب با تنش دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد آسیب‌پذیر بودند و خشک شدند. با توجه به نتایج که در شرایط آزمایشگاهی به‌دست آمده است، رقم مارفونا می‌تواند به‌عنوان رقم متحمل به تنش در برنامه‌های اصلاحی سیب‌زمینی در شرایط مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.

آن‌تی‌اکسیدان‌های آنزیمی را در اثر افزایش سطوح تنش خشکی و سرما در گیاه خیار به‌دست آوردند.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد که در سطوح مختلف غلظت PEG و تنش دمایی و نیز تنش ترکیبی بین رقم‌ها و کلون‌های سیب‌زمینی از نظر صفات مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بر اساس مشاهدات و نتایج به‌دست‌آمده، رقم مارفونا در برابر تنش‌ها با افزایش فعالیت آنزیم‌های آن‌تی‌اکسیدانی و تجمع بیشتر پرولین متحمل بود؛ اما با وجود این،

REFERENCES

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
2. Allagulova, C. R., Gilamov, F. R., Shakirova, F. M. & Vakhitov, V. A. (2003). The plant dehydrins: structure and functions. *Biochemistry*, 68, 945-951.
3. Allen, E. J. & Scott, R. K. (1998). Principles of agronomy and their application in the potato industry. In: Harris, P. (Ed.), *Potato crop*. Chapman and Hall Ltd, London, 816-882.
4. Amini, F., Askari, M. & Haghiri, M. (2017). Changes in protein and antioxidant system of *Cucumis sativus* cv. Isfahani in response to drought stress. *Journal of Cell & Tissue*, 7(4), 375-385. (in Farsi)
5. Amini, S., Ghobadi, C. & Yamchi, A. (2015). Proline accumulation and osmotic stress: an overview of P5CS gene in plants. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 3, 44-55
6. Anjum, N. A., Arena, C. & Singhgill, S. (2014), Reactive Oxygen species and response of antioxidants as ROSscavengers during environmental stress in plant. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 1-13.
7. Ariano, S., Bartolomeo, D., Cristos, X. & Andras, M. (2005). Antioxidant defenses in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32, 45-53.
8. Ashraf, M. & Iram, A. (2005). Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Flora*, 200, 535-546.
9. Bates, L. S., Waldern, R. P. & Teares, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
10. Boroujerdnia, M., Bihamta, M., AlamiSaid, K. & Abdossi, V. (2016). Effect of drought tension on proline content, soluble carbohydrates, electrolytes leakage and relative water content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Physiology Journal*, 8(29), 23-41. (in Farsi)
11. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
12. Carr, M. K. V. (1989). Potato quality control with irrigation. *Water Irrigation Review*, 9, 28-29.
13. Chance, B. & Maehly, A. (1955). Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymology*, 2, 764-817.
14. Cook, D., Fowler, S., Fiehnand, O. & Etval, A. (2004). Prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low temperature metabolome of arabidopsis. *Plant Biology*, 101, 15243-8.
15. Dong, X., Bi, H., Wu, G. & Ai, X. (2013). Drought induced chilling tolerance in cucumber involves membrane stabilization improved by antioxidant system. *International Journal of Plant Production*, 7 (1), 67-80.
16. Foryer, C. & Noctor, G. (2000), Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*, 146, 359-388.
17. Ganjeali, A., Rahbarian, R., Bagheri, A. R. & Malekzadeh-Shafaroudi, S. (2014). Study on drought stress effects on morphological, physiological and biochemical characteristics of chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) under field condition. *Iranian Journal of Pulses Research*, 5(1), 91-102. (in Farsi)
18. Gholipour, S. & Ebadie, A. (2017). Study change compatibility metabolites and antioxidant enzyme activities of wheat cultivars under water stress. *Journal of Process and Function*, 6 (19), 219-232. (in Farsi)
19. Golen, H., Turhan, E. & Eris, A. (2006). Changes in peroxidase activities and soluble proteins in strawberry varieties under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28, 109-116.

20. Habibi, G. (2013). Effect of drought stress and selenium spraying on photosynthesis and antioxidant activity of spring barley. *Acta Agriculturae. Slovenica*, 101 (1), 31-39.
21. Hajhosseini, N., Hosseini Sargein, S. & Jamei, R. (2016). The study of interactive effects of UV-B Radiation and drought stress on some physiological traits of two cultivar of gourd (*Cucurbita pepo* L.). *Iranian Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 1(2), 16-26. (in Farsi)
22. Hassandokht, M. R., Bigdelo, M., Soltani, F. & Salehi Mohammadi, R. (2017). Evaluation of drought stress tolerance and its effects on growth characteristics in some accessions of colocynth (*Citrullus colocynthis* (L.) Schrad). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48(2), 275-284. (in Farsi)
23. Hassani Moghadam, E., Esna-Ashari, M. & Rezainejad, A. H. (2015). Effect of Drought Stress on Some Physiological Characteristics in Six Commercial Iranian Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars. *Plant Production Technology*, 7(1), 1-11. (in Farsi)
24. Hokmabadi, H., Noorian Bigdeli, S., Narimani, R. & Moghaddam, M. (2017). Study of beet bagasse effect on biochemical characteristics, photosynthetic pigments and antioxidant activity of leaf extracts of peppermint (*Mentha piperita* L.) under drought stress conditions. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture*, 8 (1), 135-145.
25. Hosseini Boldaji, S. A., Khavari-Nejad, R. A., Hassan Sajedi, R., Fahimi, H. & Saadatmand, S. (2012) Water availability effects on antioxidant enzyme activities lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Acta Physiologia Plantarum*, 34, 1177-1186.
26. Javadi, T., Arzani, K. & Ebrahimzadeh, H. (2004). Evaluation of soluble carbohydrate content and proline in 9 genotypes of Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd) under drought stress. *Iranian Journal of Plant Biology*, 17(3), 369-378. (in Farsi)
27. Kakulvand, R., Fallah, S. & Abassi Sourki, A. (2017), Effects of species competition on photosynthetic pigments, prolin relative water content, and essence fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) and black cumin (*Nigella sativa* L.) under drought stress conditions in intercropping system. *Journal of process and Function*, 6 (19), 255-270. (in Farsi)
28. Karimi, S., Yadollahi, A. & Arzani, K. (2013). Response of Almond Genotypes to Osmotic Stress Induced In Vitro. *Journal of Nuts*, 4(4), 1-7.
29. Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L. & Benavides, M. P. (2005). Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science*, 169, 323-330.
30. Liu, X. & Huang, B. (2000). Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Science*, 40, 503-510.
31. Lutts, S., Kinet, J. M. & Bouharmont, J. (1995). Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany*, 46 (12), 1843-1852.
32. Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B. & Struik, P. C. (2011). Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 5 (10), 1255-1260.
33. Maghsoodi, M., Razmjoo, J. & Gheysari, M. (2016). Effect of drought on biochemical properties of root and shoot of alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.). *Aridbiom Journal*, 6(1), 31-43. (in Farsi)
34. Masoudi Sadaghiani, F. & Amini Dehaghi, M. (2016). Changes in Some Osmolytes and Potosynthetic Pigments Accumulation and Antioxidant Enzymes Activity in Potato under Water Stress in Greenhouse Conditions. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 17 (1), 29-38. (in Farsi)
35. Mehri, H. R., Ghobadi, S., Baninasab, B., Ehsanzadeh, P. & Gholami, M. (2015). Evaluation of some physiological and morphological responses of four Iranian grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars to drought stress under in vitro conditions. *Journal of Plant Process and Function*, 3(10), 115-126. (in Farsi)
36. Michel, B. E. & Kaufmann, M. R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51, 914-916.
37. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Annual Review of Plant Science*, 7, 405-415
38. Mohsenzade, S., Malboobi, M.A., Razavi, K. & Farrahi Aschtiani, S. (2006). Physiological and molecular responses of *Aeluropus lagopoides* to water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 374-322
39. Molaahmad Nalousi, A., Hatamzadeh, A., Ghasemnezhad, M. & Alibiglouei, M. H. (2015). The study of physiological and biochemical responses of *Agrostis stolonifera* and *Festuca arundinacea* Schreb. under drought stress. *Iranian Journal of Plant Biology*, 6(22), 105-116. (in Farsi)
40. Moussa, H. & Abdel-Aziz, S. M. (2008). Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science*, 1, 31-36.

41. Najaf Zadeh, S. & Ehsanpour, A. (2012), Effect of drought stress on some physiological parameters of two potato cultivars (Kenebec and Concord) under in vitro culture condition. *Journal of Aridbiom*, 2(1), 70-82. (in Farsi)
42. Nakano, Y. & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydro ascorbate radical. *Plant Cell Physiology*, 28, 131-133.
43. Nasibi, F. (2011). Effect of different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on oxidative damages induced by drought stress in tomato plant. *Iranian Journal of Plant Biology*, 3(9), 63-74. (in Farsi)
44. Nouri, A., Nezami, A., Kafi, M. & Hassanpanah, D. (2016), Evaluation of Water Deficit Tolerance of 10 Potato Cultivars Based on some Physiological Traits and (*Solanum tuberosum* L.) Tuber Yield in Ardabil Region. *Journal of Crop Ecophysiology*, 19(1), 243-268. (in Farsi)
45. Rabbi Angourani, H., Panahandeh Yengejeh, J., Boland Nazar, S. A., Saba, J. & Zare Nahandi, F. (2016). *The effect of drought stress and salicylic acid on some morpho-physiological and phytochemistry characteristics of medicinal pumpkin (Cucurbita pepo var. styriaca)*. Ph.D. dissertation, Horticultural science, Tabriz University.
46. Ratnayaka, H. H., Molin, W. T. & Sterling, T. M. (2003). Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. *Journal of Experimental Botany*, 54, 2293-2305.
47. Razavizadeh, R. & Shahriari, E. (2017). Comparative study of drought stress effects on physiological and defense parameters of some varieties of sorghum under In vitro culture. *Journal of Process and Function*, 6 (19), 163-180. (in Farsi)
48. Sairam, R. K. & Srivastava, G. C. (2002). Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*, 162, 897-904.
49. Sanchez-Rodriguez, E., Rubio-Wilhelmi, M., Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosale, M. A. S., Romero, L. & Ruiz, J. M. (2010). Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science*, 178, 30-40.
50. Sariri, R., Galvani, M., Fotouhi Ghazvini, R. & Jafarian, V. (2011). The effect of cold temperature stress on antifreeze protein production and lipid peroxidation in two citrus species. *Iranian Journal of Plant Biology*, 3(7), 97-102. (in Farsi)
51. Sharma, P. & Dubey, R. S. (2005). Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 46, 209-221.
52. Sinclair, T. R. & Ludlow, M. M. (1985). Who taught plants the thermodynamics of water? The unfulfilled potential of plant water potential. *Australian Journal of Plant Physiology*, 12, 213-217.
53. Smart, R. E. & Bingham, G. E. (1974). Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*, 53(2), 258-260.
54. Soukhtesaraee, R., Ebadi, A., Salami, S. A. & Lesani, H. (2017). Evaluation of oxidative parameters in three grapevine cultivars under drought stress. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48(1), 85-98. (in Farsi)
55. Sreenivasulu, N., Grimm, B., Wobns, U. & Weschke, W. (2005). Asymmetrical leaves induced by water deficit show asymmetrical photosynthesis in common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(2), 223-227.
56. Tawfik, K. M. (2008). Effect of water stress in addition to potassium application on mung bean. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2, 42-52.
57. Vendruscolo, A. C. G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C. A., Molinari, H. B. C., Marur, C. J. & Vieira, L. G. C. (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1367-1376.
58. Yadav, R. S. & Bhushan, C. (2001). Effect of moisture stress on growth and yield in rice genotype. *Indian Journal of Agricultural Research*, 2, 104-107.
59. Zarrabi, M. M., Talaai, A., Soleimani, A. & Haddad, R. (2010), Physiological Characteristic and Biochemical Changes Six Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars under Drought Stress. *Journal of Horticultural Science*, 24(2), 234-244. (in Farsi)
60. Zokaei Khosro Shahi, M. R., Esna Ashari, M., Ershadi, A. & Imani, A. (2014). Physiological responses of five almond species to PEG-induced drought stress. *Plant Production Technology*, 5(2), 73-88. (in Farsi)