مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۷۷-۶۷)

بررسی اثر تنش خشکی بر سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاهچه‌های برخی از اکوتیپ‌های یونجه چند ساله

کمال سادات اسیلان [۱]*، سیدعلی‌محمد مدرس ثانوی [۲] و سعید حاجیلویی [۳]
۱، دانشجوی سابق دانشگاه تربیت مدرس و استادیار دانشگاه پیام نور
۲، دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
۳، عضو هیأت علمی پژوهشی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال
(تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۲۱- تاریخ تصویب: ۸۷/۱۲/۱۱)

چکیده

تحقیق حاضر با هدف شناسایی و مقایسه میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در گیاهچه ده اکوتیپ یونجه‌ی چند ساله در سه سطح تنش خشکی با یک آزمایش فاکتوریل ۱۰ × ۳ و ۳ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اکوتیپ‌ها، سطوح تنش و اثرات متقابل آن‌ها اثر معنی‌داری بر سطح فعالیت کلیه‌ی آنزیم‌های مورد بررسی داشته‌اند. نتایج مقایسه میانگین نیز نشان داد که تنش متوسط خشکی (٤- بار) بیشترین سطح فعالیت چهار نوع آنزیم مورد مطالعه را به همراه داشته در حالیکه تنش شدیدتر (٦- بار) احتمالاً با تخریب سیستم سنتز پروتئین، موجبات کاهش سطح فعالیت این آنزیم‌ها را فراهم نموده است. مقایسه میانگین سطح فعالیت آنزیم‌ها نیز نشان داد که سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز به ترتیب با میانگین تغییرات جذب ۷۸۰/۱ و ۸/۲ میلی‌گرم پروتئین در دقیقه، بیشترین و کمترین سطح فعالیت آنزیمی را داشته‌اند. اکثر اکوتیپ‌های مورد بررسی نیز روند تغییرات فعالیت آنزیمی مشابهی را در سطوح مختلف خشکی نشان دادند. با این حال روند تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در اکوتیپ‌های خارجی کاملاً متفاوت نسبت به اکوتیپ‌های ایرانی بود به گونه‌ای که فعالیت آنزیم پراکسیداز در تنش خشکی متوسط و شدید روندی کاهشی داشت. این در حالی بودکه اکوتیپ‌های ایرانی در تنش خشکی متوسط با افزایش و در تنش شدید خشکی با کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز، عکس‌العمل نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، یونجه‌های چند ساله.

مقدمه

یونجه از گیاهان بومی ایران است و در شرایط آب و هوایی کشور ارقام مختلفی از آن مورد کشت وکار قرار می گیرد که خود بیانگر سازگاری وسیع این گیاه به شرایط مختلف اقلیمی می‌باشد. سطح زیر کشت این گیاه با ارزش در کشور حدود ۶۱۶۱۰۶/۲ هکتار، میزان تولید سالیانه آن ۴۷۶۲۳۹۱/۳ تن (علوفه خشک) و متوسط عملکرد علوفه خشک آن نیز ۸۲۸۷ کیلوگرم در هکتار می باشد (Anonymous, 2005).

تنش خشکی عاملی است که تولید و توسعه سطح زیر کشت گیاهان زراعی را در مناطق خشک و نیمه خشک محدود نموده است (Reddy et al., 2004). تنش خشکی باعث بروز دامنه وسیعی از واکنش‌ها در گیاهان از تغییر بیان ژن و متابولیسم سلول تا تغییر در سرعت رشد و عملکرد محصولات می‌شود (Polle, 1997). تنش خشکی بیشتر از هر عامل محیطی دیگری رشد گیاهان را محدود می‌کند (Hegar et al., 1996) و وقتی حادث می‌شود که خروج آب از گیاه به واسطه فرآیند تعرق

* نویسنده مسئول: کمال سادات اسیلان تلفن: ۰۹۱۲-۱۴۸۱۶۳۷ E-mail: sadatesmaelan@yahoo.com

بیشتر از جذب آن از طریق ریشه باشد (Salin, 1991).

در شرایط خشکی، در همان زمان که حداکثر تشعشع وجود دارد و بسته شدن روزنه‌ها در واکنش به تنش آب یا دما رخ می‌دهد، منجر به کاهش تثبیت دی‌اکسیدکربن می‌شود ولی واکنش نوری و انتقال الکترون در مقادیر طبیعی صورت می‌گیرد. تحت چنین شرایطی، مقدار محدودی NADP برای پذیرش الکترون وجود خواهد داشت. بنابراین اکسیژن می‌تواند به عنوان یک گیرنده الکترون جایگزین عمل نماید (Elstner, 1991). این امر منجر به تجمع انواع سمی اکسیژن نظیر رادیکال‌های سوپراکسید [1](O_2^-)، پراکسید هیدروژن [2](H_2O_2) و هیدروکسیل [3](OH^-) می‌گردد (Giannopolitis & Ries, 1977; Huan, 2000; Shepherd et al., 2002). تولید انواع اکسیژن فعال، سبب پراکسیداسیون چربی‌های غشاء (Chang & Kao, 1998)، تخریب پروتئین‌ها (Ito et al., 1991) و اسیدهای نوکلئیک شده (Bowler et al., 1992; Giannopolitis & Ries, 1977)، محتوای کلروفیل برگ را کاهش داده (Cakmak & Horst, 1991; Ghanati et al., 2002; Jagtap & Bharagava, 1995; Polle, 1997; Reddy et al., 2004) و در نتیجه پراکسیداسیون چربی‌ها (Huang, 2000; Jiang & Zhang, 2001; Noctor & Foyer, 1998)، غشاءهای سلولی آسیب می‌بینند (Caruso et al., 1999; Comva et al., 1998; Del Rio et al., 1991; Reddy et al., 2004). در سلول‌های گیاهی کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها و پراکسی‌زوم‌ها مکان‌های مهم تولید انواع اکسیژن فعال هستند (Dat et al., 1998; Egnews et al., 1975; Pattangual & Madore, 1999; Rensburg & Krugen, 1994)، اما کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها تولیدکننده‌های قوی درون سلولی می‌باشند. تولید انواع اکسیژن فعال در کلروپلاست‌ها به وسیله انتقال مستقیم انرژی از کلروفیل به مولکول اکسیژن یابه وسیله کاهش تک‌ظرفیتی اکسیژن در فتوسیستم یک طی چرخه مهلر [4] انجام می‌شود (Agarwal & Pandey, 2004).

گیاهان برای کاهش اثر مخرب انواع اکسیژن فعال مکانیزم‌های متفاوتی دارند. از جمله این مکانیزم‌ها می‌توان به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی اشاره نمود. این سیستم شامل سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی است. سیستم‌های غیرآنزیمی شامل اسکوربات [5]، گلوتاتیون [6]، آلفاتوکوفورل [7]، زآزانتین [8] و آنترازانتین [9] و فلاونوئیدها [10] می‌باشند (Mac Adam et al., 1992; Salin, 1991).

آنزیم‌های دخیل در فرآیند غیرسمی کردن انواع اکسیژن فعال شامل سوپراکسیددیسموتاز [11]، گلوتاتیون ردوکتاز [12]، پراکسیداز [13] و کاتالاز [14] می‌باشند که در پاکسازی انواع اکسیژن فعال به طور مستقیم نقش دارند (Serraj & Sinclair, 1996; Siosemardeh, 2002).

پراکسیداز یک اکسیدوریدوکتاز [15] است که دارای یک هم نوعb به‌عنوان گروه پروستتیک [16] است‌که اکسیداسیون ترکیبات پروتون‌دهنده را به پراکسید هیدروژن کاتالیز می‌کند و در نتیجه باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌گردد (Halliwell, 1982). پراکسیداز در مقاومت به خشکی و گرما (Ito et al., 1991)، مقاومت به شوری (Liang et al., 2003)، مقاومت به آلودگی به پاتوژن‌ها (Cakmak & Horst, 1991) و توسعه سلولی (Jung, 2004) نقش دارد. همبستگی‌های گوناگونی بین تنش کمبود آب و میزان آنتی‌اکسیدانت‌های محلول در آب درون سلولی گزارش شده است (Salin, 1991). Sairam et al. (1997) اظهار داشته‌اند که در شرایط تنش خشکی فعالیت پراکسیداز نسبت به شاهد در گندم افزایش یافت و میزان این افزایش در ژنوتیپ‌های مقاوم گندم به خشکی بیشتر بوده و شاخص پایداری کلروفیل بیشتری داشتند و خسارت وارده بر غشاء سلولی آن‌ها نیز کمتر بود.

1. Superoxide
2. Peroxide hydrogen
3. Hydroxyl
4. Mahler's cycle

5. Ascorbate
6. Glutathione
7. Alfa-tocopherol
8. Zeanthin
9. Antra zeanthin
10. Flavonoids
11. Superoxide-dismutase
12. Glutathione reductase
13. Peroxidase
14. Catalase
15. Oxidoreductase
16. Prosthetic

سمیت‌زدایی انواع اکسیژن فعال از طریق انتقال ژن مقاومت قابل افزایش است. اما راه دیگر افزایش این مقاومت بالا بردن سطح سوبستراهای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و مواد آنتی‌اکسیدانت درون سلول مانند انواع اسیدهای اسکوربیک می‌باشد (Mac Adam et al., 1992).

کاتالاز نیز یک اکسیدوریدوکتاز است که در پراکسی‌زوم‌ها[1] وجود دارد و نقش آن غیرسمی کردن پراکسیدهیدروژن از طریق تجزیه آن است (Huang, 2000). کاتالاز علاوه بر تحمل به خشکی (Basaga, 1989) در به تعویق انداختن پیری (Caruso et al., 1999) نیز نقش دارد.

سوپراکسیددیسموتاز تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن که یک مولکول غیررادیکالی است را بر عهده دارد. پراکسید هیدروژن تولید شده، توسط آنزیم کاتالاز (Huang, 2000) و یا اسکوربات پراکسیداز، تبدیل به آب و اکسیژن می‌گردد. پراکسیدهیدروژن در غلظت بالا سمی بوده ولی در غلظت پایین به عنوان یک پیام، در تجلی ژن‌های مقاومت و تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نقش دارد (Cakmak & Horst, 1991).

آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز[2]، هیدرولاسیون مونوفنل‌ها را به دی‌فنل‌ها کاتالیزمی‌نماید.همچنین این آنزیم اکسیداسیون دی‌فنل‌ها را به کوئینون‌ها که در پلیمریزاسیون رنگدانه‌ها نقش دارند، کاتالیز می‌نماید. اختلال تغییرات در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در شرایط تنش‌های محیطی از جمله تنش کمبود آب گزارش شده است (Halliwell, 1982). تنش کمبود آب باعث ایجاد اختلال در سیستم‌های آنزیمی خنثی‌کننده‌ی انواع اکسیژن فعال می‌گردد که این امر منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی و در نتیجه خسارت به غشاء سلولی و تخریب رنگدانه‌ها می‌شود (Basiak et al., 1994; Chen et al., 2000; Comva et al., 1998; Irigoyen et al., 1992; Scandalios, 1993).

گیاهان تیره لگومینوز عموماً گیاهانی متحمل به تنش خشکی هستند. گیاه یونجه در بین گیاهان زراعی متحمل‌ترین عضو این تیره به تنش خشکی محسوب می‌شود. Seraj et al. (1996) نشان دادند که شدت فتوسنتز در نخود در تنش رطوبتی ۱/۳- بار ۷۷ درصد کاهش یافت، در حالی‌که تنش‌های شدیدتر رطوبتی (۱/۸- بار) تنها توانست شدت فتوسنتز را در یونجه ۲۸ درصد کاهش دهد. کاهش شدت فتوسنتز در گیاه نخود ناشی از کاهش شدید مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پروتئین‌های محلول در بافت سبز گیاه بود. این در حالی بود که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پروتئین‌های محلول در یونجه حتی در تنش‌های شدید خشکی نیز کاهش محسوسی نشان نداد.

Maria et al. (2002) در تحقیقی دریافتند که تنش خشکی موجب کاهش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت سوپراکسیددیسموتاز در برگ و ساقه لاین‌های خالص یونجه‌های چند ساله و یونجه‌های تراریخته شده است. آنها همچنین نشان دادند که تنش خشکی در بیشتر لاین‌ها موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در برگ‌ها و کاهش فعالیت آن در ریشه‌ها می‌شود.

Irigoyen et al. (1992) در یک بررسی روی اثر تنش خشکی بر پیری زودرس برگ‌های یونجه چند ساله نشان دادند که با افزایش خشکی ضریب پراکسیداسیون لایه چربی غشاهای سلولی و مقدار پراکسید در سلول افزایش یافت. با این حال افزایش خشکی فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت سوپراکسیددیسموتاز را تحت تأثیر خود قرار نداد، فعالیت آنزیم کاتالاز را در تنش‌های خشکی کم، کاهش و در تنش‌های خشکی زیاد، به طور معنی‌داری افزایش داد و فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز با افزایش تنش خشکی روندی کاهشی نشان داد.

از آنجا که تنش خشکی با خسارتی که به تولید محصولات کشاورزی وارد می‌نماید یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است و یونجه نیز یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای است که سطح وسیعی از مزارع و مراتع مناطق خشک و نیمه خشک کشور را پوشش داده است، شناسایی مکانیزم‌های تحمل به تنش خشکی با هدف اصلاح و بهبود عملکرد آن در این مناطق از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا این پژوهش به بررسی اثر

1. Peroxysomes
2. Polyphenol oxidase

تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت یونجه پرداخته است، تا با شناسایی این اثر، ضمن تعیین چگونگی پاسخ اکوتیپ‌های یونجه به تنش خشکی، امکان شناسایی و استفاده از شاخص‌های مناسب تحمل به تنش در یونجه در فرآیند غربال اکوتیپ‌های متحمل، ایجاد گردد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق اثر دو سطح تنش خشکی (فشارهای اسمزی ۴- و ۶- بار) به همراه شاهد (بدون تنش) بر میزان فعالیت چهار نوع آنزیم آنتی‌اکسیدانت شامل آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز، کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز در گیاهچه‌های ۱۰ اکوتیپ یونجه چند ساله شامل ۶ اکوتیپ ایرانی، A1= قره‌یونجه، A2= همدانی، A3= فراهان اراک، A4= سنتتیک کرج، A5= مهاجران کرج و A6= شورکات و ۴ اکوتیپ خارجی شامل، A7= هارپ، A8= جولیا، A9= دفت و A10= دیان مورد بررسی قرار گرفتند. بذرهای اکوتیپ‌های مورد بررسی نمونه‌هایی از بذرهای تهیه شده توسط بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در سال زراعی ۸۷-۸۶ بودند. آزمایش در تابستان ۱۳۸۷ به صورت فاکتوریل و با طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در آزمایشگاه پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. برای ایجاد ۳ سطح تنش خشکی با پتانسیل‌های اسمزی B1= ۰، B2= ۴- و B3 = ۶- بار از حل کردن ماده‌ی کریستاله پلی‌اتیلن‌گلیکول[1] ۶۰۰۰ به ترتیب به میزان ۰، ۱۷۵ و ۲۱۸/۵ گرم در لیتر آب مقطر استفاده شد. برای تعیین مقادیر لازم از پلی‌اتیلن‌گلیکول جهت ایجاد پتانسیل‌های اسمزی مورد نظر از رابطه‌ی شماره ۱ استفاده گردید (Mac Adam et al., 1992). این ماده یک ترکیب خنثی با وزن مولکولی بالا (۸۰۰۰-۶۰۰۰ دالتون) است که بزرگی اندازه مولکول‌ها از ورود آن به بذر ممانعت کرده و تأثیرات منفی مربوط به استفاده از نمک‌ها را ندارد.

$$\varphi_s = -(۱/۱۸ \times ۱۰^{-۲})\, C - (۱/۱۸ \times ۱۰^{-۴})\, C^۲ + (۲/۶۷ \times ۱۰^{-۴})\, CT + (۸/۳۹ \times ۱۰^{-۷})\, C^۲T \qquad (۱$$

در این رابطه:

φ_s: پتانسیل اسمزی برحسب بار.

C: غلظت (PEG) بر حسب گرم در لیتر.

T: دمای محیط آزمایش بر حسب سانتی‌گراد می‌باشند.

در این آزمایش برای هر سطح تنش ۵۰ بذر یکنواخت از هر اکوتیپ انتخاب و ابتدا با آب مقطر شسته شده و بعد با هیپوکلریت‌سدیم ۵٪ ضدعفونی سطحی شدند. پس از شستشوی مجدد با آب مقطر، بذرها در ظرف‌های پتری (به قطر ۹ و ارتفاع ۱/۵ سانتی‌متر) بین دو لایه کاغذ صافی واتمن قرار گرفتند. به هر ظرف پتری ۵ تا ۷ میلی‌لیتر از محلول‌های مورد نظر اضافه گشت. سپس ظرف‌های پتری به مدت دو هفته درون دستگاه ژرمیناتور با دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. هر روز بذرها از نظر جوانه‌زنی و نیاز به افزودن محلول مورد بررسی قرار گرفتند. در تیمارهایی که رطوبت ظرف زایل شده بود، ابتدا کاغذ صافی مربوطه تعویض و سپس محلول مورد نظر اضافه شد. در پایان هفته دوم پس از خروج گیاهچه‌ها از بذر، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت موجود در آنها به روش‌های ذیل مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز

برای بررسی فعالیت پراکسیداز ۰/۲ گرم از بافت گیاهچه‌ی تازه در نیتروژن مایع سائیده و در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۲ مولار و pH=۶/۸ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری شده و سپس همگن حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دمای ۴-۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول روئی جهت اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز مورد استفاده قرار گرفت (Hegar et al., 1996).

فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزودن مقادیر مناسبی از عصاره آنزیمی، بافر، گایاکول با غلظت نهائی ۲۸ میلی‌مولار و پراکسیدهیدروژن با غلظت نهائی ۵ میلی‌مولار در طول موج۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفومترخوانده شد. فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان گشت. برای تعیین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نیز مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر از عصارهآنزیمی،۵۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار

1. Polyethylene Glycol 6000

و ۵۰۰ میکرولیتر متیل‌کاتکول ۲۸ میلی‌مولار در ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم با pH= ۶/۱ استفاده شد. افزایش جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد و واحد فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان گشت (Foyer et al., 1994).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

۰/۲ گرم نمونه منجمد در ۳ میلی‌لیتر بافر HEPES-KOH با pH=۷/۸ حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار عصاره‌گیری شد. همگن‌های حاصل در۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول روئی برای سنجش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز مورد استفاده قرار گرفت (Hernandez et al., 2000). مخلوط واکنش شامل: بافر HEPES-KOH ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۸، حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۵۰ میلی‌مولار کربنات سدیم با pH=۱۰/۲، ۱۲ میلی‌مولار ال- متیونین، ۷۵ میکرومولار نیتروبلوتترازولیوم، ۱ میکرومولار ریبوفلاوین و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی بود. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور قرار داده شدند و پس از این مدت جذب آن‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. همچنین از یک لوله‌ی آزمایش حاوی مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی به عنوان بلانک استفاده گشت. یک واحد فعالیت سوپراکسیددیسموتاز به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که منجر به مهار ۵۰ درصد احیای نور نیتروبلوتترازولیوم گردید. واحد فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان گشت.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، ۰/۲ گرم نمونه منجمد در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار باpH= ۶/۸ عصاره‌گیری شد. مخلوط همگن حاصل در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و سپس محلول روئی برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد. تجزیه آب‌اکسیژنه با کاهش جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر پیگیری شده و به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در عصاره آنزیمی بیان گردید (Del Rio et al., 1991).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL استفاده گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اکوتیپ‌های یونجه، سطوح تنش خشکی و اثرات متقابل اکوتیپ × تنش خشکی بر میزان فعالیت چهار نوع آنزیم آنتی‌اکسیدانت در گیاهچه‌های جوان اکوتیپ‌های یونجه مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۱ درصد داشتند (جدول۱).

فعالیت آنزیم کاتالاز

مقایسه میانگین فعالیت این آنزیم برای اثر متقابل اکوتیپ × تنش نشان داد (شکل۱) که تیمار تنش خشکی متوسط (۴- بار) با بیشترین سطح فعالیت این آنزیم و تیمار تنش خشکی شدید (۶- بار) با کمترین سطح فعالیت این آنزیم در همه اکوتیپ‌ها همراه بود. با این حال شدت این تغییرات برای هر اکوتیپ متفاوت بوده به طوری‌که اکوتیپ قره‌یونجه و همدانی دارای کمترین سطح تغییرات (انحراف معیار) و اکوتیپ جولیا بیشترین سطح تغییرات (انحراف معیار) را دارا بودند. به طور کلی در تنش ۴- بار اکوتیپ‌ها کمترین تنوع و در تنش ۶- بار بیشترین تنوع را در سطح فعالیت آنزیم کاتالاز نشان دادند. بنابر این سطوح تنش بالاتر ممکن است به دو دلیل سهولت بیشتری را در غربال نمودن اکوتیپ‌های متحمل به خشکی فراهم نماید. دلیل اول این‌که اکوتیپ‌هایی که در تنش‌های شدیدتر خشکی کاهش کمتری در سطح فعالیت این آنزیم را نشان دهند قابل شناسایی بوده و دلیل دوم این‌که تنش‌های شدیدتر خشکی با ایجاد تنوع بیشتردر بین اکوتیپ‌ها، زمینه تشخیص دقیق‌تر اکوتیپ‌های متحمل به خشکی را به سهولت فراهم می‌نماید. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در واکنش به تنش خشکی توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است (Jagtap & Bharagava, 1995). این آنزیم طی واکنش آنزیمی با زدودن انواع فعال اکسیژن و جلوگیری از تخریب دیواره سلولی به بقاء گیاه کمک

می‌نماید (Jiang & Zhang, 2001). از آنجا که برخی معتقدند به دلیل این‌که سنتز پروتئین‌ها در اثر تنش‌های شدید خشکی کاهش می‌یابد، فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در تنش‌های شدید خشکی ممکن است کاهش یابد (Basaga, 1989; Caruso et al., 1999).

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز

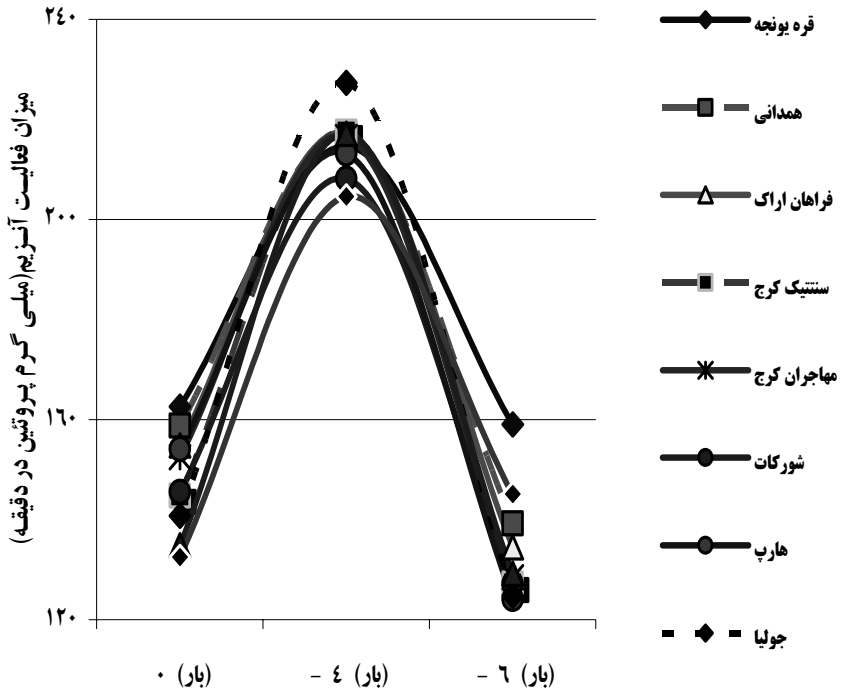
مقایسه میانگین فعالیت این آنزیم برای اثر متقابل اکوتیپ×تنش نشان داد (شکل۲) که تیمار تنش خشکی متوسط (۴- بار) با بیشترین سطح فعالیت این آنزیم و تیمار تنش خشکی شدید (۶- بار) با کمترین سطح فعالیت این آنزیم در همه اکوتیپ‌ها همراه است. با این حال شدت این تغییرات برای هر اکوتیپ متفاوت بوده به طوری‌که اکوتیپ قره‌یونجه، همدانی (δ=۱۲۳) و مهاجران کرج (δ=۱۲۵) دارای کمترین سطح تغییرات (انحراف معیار) و اکوتیپ فراهان اراک (δ= ۱۸۳) و سنتتیک کرج (δ=۱۸۰) بیشترین سطح تغییرات (انحراف معیار) را دارا بودند.

به طور کلی در تنش ۴- بار اکوتیپ‌ها کمترین تنوع (δ=۷) و در تنش ۶- بار بیشترین تنوع (δ=۴۷) را در سطح فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نشان دادند.

جدول ۱- خلاصه تجزیه واریانس میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گیاهچه‌ی اکوتیپ‌های یونجه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		کاتالاز	سوپراکسیددیسموتاز	پراکسیداز	پلی‌فنل‌اکسیداز
اکوتیپ	۹	۴۲۹/۸۷**	۳۵۷۷/۸۸**	۰/۴۱**	۱۸۷/۳۶**
تنش خشکی	۲	۵۶۶۹۰/۱۲**	۷۱۹۲۲۷/۶۸**	۸/۰۸**	۴۷۳۵۷/۰۱**
اکوتیپ × تنش خشکی	۱۸	۱۷۷/۰۰**	۱۹۶۹/۵۹**	۰/۸۳**	۵۴/۶۰**
اشتباه آزمایشی	۶۰	۳۰/۴۰	۳۵/۷۲	۰/۰۸	۶/۵۴
ضریب تغییرات (درصد)		۳/۳۳	۰/۷۶	۳/۴۸	۱/۳۷

**: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۱- تنش خشکی و اکوتیپ بر میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت کاتالاز

بنابراین سطوح تنش بالاتر ممکن است به دو دلیل سهولت بیشتری را در غربال نمودن اکوتیپ‌های متحمل به خشکی فراهم نماید. دلیل اول این‌که اکوتیپ‌هایی که در تنش‌های شدیدتر خشکی کاهش کمتری در سطح فعالیت این آنزیم را نشان دهند (مانند اکوتیپ‌های همدانی و مهاجران کرج) قابل شناسایی بوده و دلیل دوم این‌که تنش‌های شدیدتر خشکی با ایجاد تنوع بیشتردر بین اکوتیپ‌ها (با ۷ برابر نمودن تنوع در بین اکوتیپ‌ها برای این خصوصیت)، زمینه تشخیص دقیق‌تر اکوتیپ‌های متحمل به خشکی را به سهولت فراهم می‌نماید. گزارش‌های سایر محققین نیز نشان داده‌است که آنزیم سوپراکسیددیسموتاز از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بوده که در شرایط تنش، افزایش فعالیت آن در بیشتر گیاهان گزارش شده‌است. افزایش فعالیت در این آنزیم زمانی رخ می‌دهد که یون سوپراکسید درون سلولی افزایش یابد. میزان این نوع اکسیژن فعال در اثر تنش‌های محیطی مختلف از جمله کم آبی، شوری و تشعشع بالا افزایش می‌یابد (Sairam et al., 1997). همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به تنش کمبود آب در گونه‌های مختلف عکس‌العمل‌های متفاوتی نشان داده است، به طوری‌که این میزان فعالیت در بعضی گونه‌ها افزایش و در برخی دیگر کاهش یافته است (Mac Adam et al., 1992). به عنوان مثال در گونه‌های گندم و جو که در شرایط تنش کمبود آب قرار گرفته بودند میزان فعالیت این آنزیم افزایش ولی در آفتابگردان کاهش یافت (Sairam et al., 1997).

فعالیت آنزیم پراکسیداز

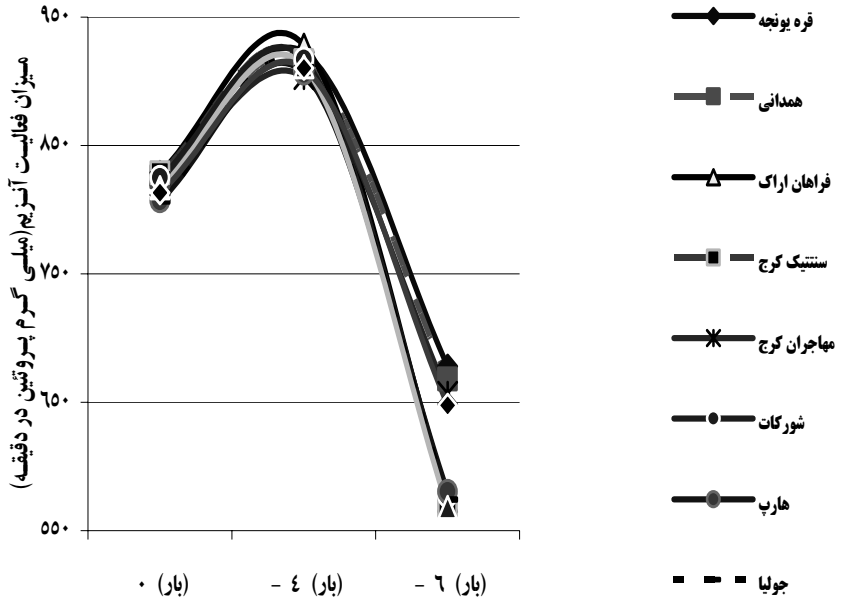
مقایسه اثر متقابل اکوتیپ × تنش برای فعالیت این آنزیم نشان داد (شکل ۳) که تیمار تنش متوسط خشکی (۴- بار) با بیشترین سطح فعالیت این آنزیم و تیمار تنش شدید خشکی (۶- بار) با کمترین سطح فعالیت این آنزیم در همه اکوتیپ‌ها ایرانی همراه بود. در مقابل در همه اکوتیپ‌های خارجی (شورکات، هارپ، جولیا، دفت و دیان) با افزایش سطح تنش، فعالیت این آنزیم کاهش یافت، به طوری که در شرایط بدون تنش این اکوتیپ‌ها دارای حداکثر فعالیت این آنزیم بوده و هر چه سطح تنش افزایش یافت. از میزان فعالیت آن کاسته شد. با این حال شدت این تغییرات برای هر اکوتیپ متفاوت بود. به طوری که اکوتیپ سنتتیک کرج (δ= ۱/۲) دارای بیشترین سطح تغییرات (انحراف معیار) و اکوتیپ هارپ (δ=۰/۱۲) کمترین سطح تغییرات (انحراف معیار) را دارا بودند. بر عکس سایر آنزیم‌ها، تمامی اکوتیپ‌ها در شرایط بدون تنش بیشترین تنوع (δ= ۰/۶) و در شرایط شدیدترین سطح تنش کمترین تنوع را نشان دادند. این امر نشانگر حساسیت زیاد این سیستم آنزیمی (خصوصاً در مورد اکوتیپ‌های خارجی) در مقابله با تنش خشکی است. به عبارت دیگر می توان نتیجه‌گیری نمود که سیستم آنزیمی اکوتیپ‌های ایرانی در مقایسه با اکوتیپ‌های خارجی برای مواجهه با تنش خشکی متکامل‌ترند. Jabari et al. (2006) نیز در بررسی ارقام گندم تحت تنش شدید خشکی با اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانتی پراکسیداز نشان دادند که با افزایش سطح تنش خشکی سطح فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد. Jung (2004) عنوان کرد که فعالیت پراکسیداز در برگ‌های بالغ در اثر تنش خشکی تا ۳ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت، اما چنین افزایشی در برگ‌های جوان مشاهده نشد. در یک بررسی دیگر مشاهده شد که فعالیت پراکسیداز در طی مراحل اولیه تنش خشکی یا گرما و یا ترکیب این دو تنش افزایش یافت ولی وقتی تنش طولانی شد، فعالیت این آنزیم کاهش یافت. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که تنش خشکی از طریق افزایش فعالیت پراکسیداز تا حد امکان از اثرات زیان بار انواع اکسیژن فعال بر غشای سلولی جلوگیری می‌کند (Jagtap & Bharagava, 1995). Siosemardeh (2002) نیز اظهار داشت که در شرایط تنش خشکی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارقام مقاوم افزایش بیشتری داشته است. او همچنین بین فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش و عملکرد نیز همبستگی مثبتی را گزارش نمود. نتایج حاصل از سایر بررسی‌ها نیز بر افزایش فعالیت پراکسیداز در شرایط تنش خشکی دلالت می‌نماید (Jagtap & Bharagava, 1995).

فعالیت آنزیم پلی فنل‌اکسیداز

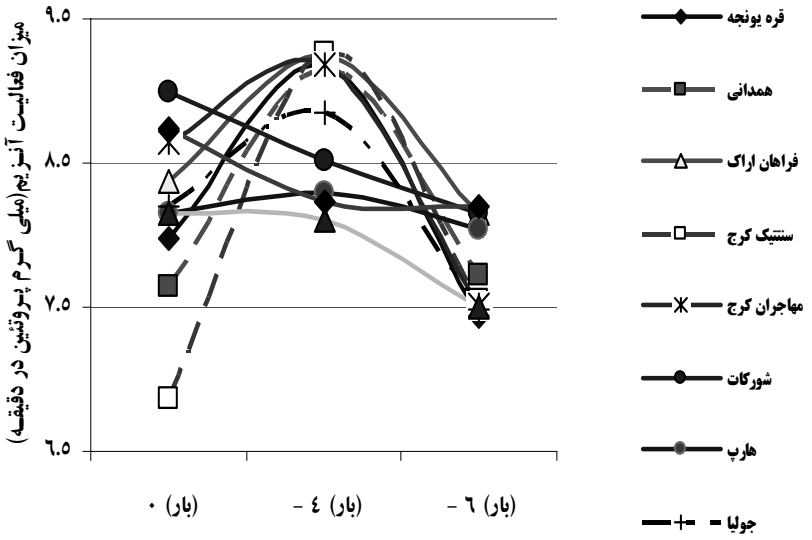
مقایسه میانگین فعالیت این آنزیم برای اثر متقابل اکوتیپ×تنش نشان داد (شکل ۴) که تیمار تنش

خشکی متوسط (۴- بار) با بیشترین سطح فعالیت این آنزیم (۲۳۰واحد) و تیمار تنش شدید خشکی (۶- بار) با کمترین سطح فعالیت این آنزیم (۱۵۱ واحد) در همه اکوتیپ‌ها همراه بود.

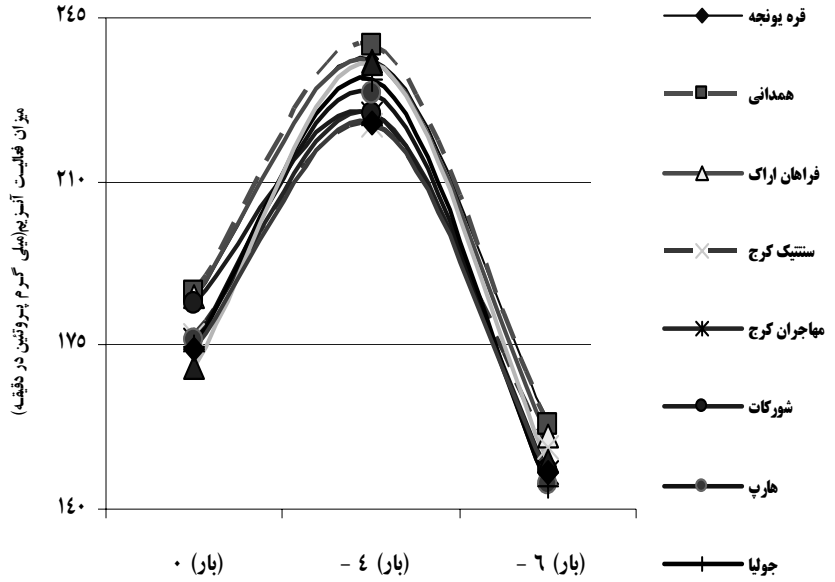
با این حال شدت این تغییرات برای هر اکوتیپ متفاوت بوده به طوری که اکوتیپ سنتتیک کرج (δ=۱/۲) دارای بیشترین سطح تغییرات (انحراف معیار) و اکوتیپ هارپ (δ=۰/۱۲) کمترین سطح تغییرات (انحراف معیار) را دارا بودند. بر عکس سایر آنزیم‌ها، تمامی اکوتیپ‌ها در شرایط بدون تنش بیشترین تنوع (δ=۰/۶۰) و در شرایط شدیدترین سطح تنش کمترین تنوع را نشان دادند. این امر نشانگر حساسیت زیاد این سیستم آنزیمی در مقابله با تنش خشکی است.



شکل ۲- تنش خشکی و اکوتیپ بر میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز



شکل ۳- تنش خشکی و اکوتیپ بر میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت پراکسیداز



شکل ۴- تنش خشکی و اکوتیپ بر میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت پلی فنل اکسیداز

نتیجه‌گیری

انتخاب اکوتیپ‌های یونجه چند ساله که تحت تنش‌های محیطی به ویژه تنش خشکی دارای سطوح بالایی از فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت باشند می‌تواند از اهمیت ویژه‌ای در افزایش تولید علوفه در مناطق خشک نیمه خشک برخوردار باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عموماً افزایش تنش خشکی تا سطح مشخصی با افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت همراه بوده است. این در حالی است که افزایش شدت تنش خشکی از حد مشخصی احتمالاً به دلیل وارد شدن صدمه به سنتز پروتئین‌ها، موجب کاهش شدید فعالیت اکثر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گردیده است. به گونه‌ای که بالاترین سطح تنش خشکی (۶- بار) کمترین سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی را در همه اکوتیپ‌های یونجه‌ی چند ساله مورد مطالعه، القاء نموده و تنش متوسط خشکی (۴- بار) با بیشترین سطح فعالیت این آنزیم‌ها (به استثناء آنزیم پراکسیداز در اکوتیپ‌های خارجی) همراه بود. در بین اکوتیپ‌های یونجه چند ساله عموماً اکوتیپ‌های ایرانی (قره‌یونجه، همدانی و فراهان اراک) در مقایسه با اکوتیپ‌های خارجی (جولیا، دفت و دیان) از سطوح بالاتر فعالیت این آنزیم‌ها برخوردار بودند. بنابراین به منظور توسعه سطح کشت ارقام یونجه در مناطق خشک و یا اصلاح ارقام حساس به خشکی می‌توان از نتایج این تحقیق بهره‌مند شد.

REFERENCES

1. Agarwal, S. & Pandey, V. (2004). Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biol Plant*, 48, 555-560.
2. Anonymous. (2005). *Census data of ministry of Jihad-e-Agriculture*. Iran.
3. Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen in photosynthetic tissues. In: C. H. Foyer and P. M. Mullineaux(eds), *Causes of photooxidative stress in plants and amelinoration of defense system*. CRC Press, Boca Raton. USA.
4. Basaga, H. S. (1989). Biochemical aspects of free radicals. *Biochemistry of Cell Biology*, 68, 989-998.
5. Basiak, R., Rana, D., Acharya, P. B. B. & Kar, M. (1994). Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. *Plant Cell Physiol*, 35, 48-495.
6. Bowler, C., Van Montagu, M. & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann Rev Plant Physiol*, 43, 83-116.
7. Cakmak, L. & Horst, W. (1991). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Review Biochemistry*, 72, 248-254.

8. Caruso, C., Chilosi, G., Caporale, C., Leonardo, L., Bertini, L., Margo, P. & Buonocore, V. (1999). Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *fusarius culmorum*. *Plant Sci*, 140, 87-97.
9. Chang, C. J., & Kao, C. H. (1998). H_2O_2 Metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. *Plant Growth Reg*, 25, 11-15.
10. Chen, W. P., Li, P. H. & Chen, T. H. H. (2000). Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling- induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environ*, 23, 609-618.
11. Chowdhury, S. R. & Choudhuri, M. A. (1985). Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in jute. *Physiol Plant*, 65, 503-507.
12. Comva, M. E., Benavides, M. P. & Tomaro, M. L. (1998). Effect of salt stress on antioxidant defense system in soybean root nodules. *Aust J Plant Physiol*, 25, 665-671.
13. Dat. J. F., Lopez-Delgado, Foyer, C. H. & Scott, I. M. (1998). Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol*, 116, 1351-1357.
14. Del Rio, L. A., Sevilla, F., Sandalio, L. M. & Plama, J. M. L. (1991). Nutritional effects and expression of superoxide dismutase: induction and gene expression, diagnostics, prospective protection against oxygen toxicity. *Free Radical Res Commun*, 12-13, 819-828.
15. Dhindsa, R. S. (1991). Drought stress, enzyme of glutathione metabolism, oxidation injury and protein synthesis in *Tortula ruralis*. *Plant Physiol*, 95, 64-651.
16. Egnews, H., Heber, U. & Krik, M. (1975). Reduction of Oxygen by the electron chain of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide. *Bioch Biophys Acta*, 408, 252-268.
17. Elstner, E. F. (1991). Mechaism of oxygen activation in different compartments of plant cell. In: E. J. Pell and K. L. Steffen (eds), *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville.
18. Foyer, C. H., Leandais, M. & Kunert, K. J. (1994). Photoxidative stress in plants. *Physiol Plants*, 92, 696-717.
19. Ghanati, F., Morita, A. & Yokota, H. (2002). Induction of suberin and increase of lignin content by excess boron in tobacco cells. *Soil Sci Plant Nutr*, 48, 357-364.
20. Giannopolitis, C. N. & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*, 59, 309–314.
21. Halliwell, B. (1982). The toxic effects of oxygen on plant tissue. In: L. W. Oberley(ed), *Superoxide dismutase*. CRC press Inc., Boca Raton. USA.
22. Hegar, H., Ueda, N. & Shal, S. V. (1996). Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury LLC-PK1 cells. *Amer J Physiol*, 271, 209-215.
23. Hernandez, J. A., Jimenezm, A., Mullineaux, P. & Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell Environ*, 23, 853-862.
24. Huang, B. (2000). Role of morphological and physiological characteristics in drought resistance of plants. In: R. E. Willkinsion (ed), *Plant-environmental interactions*. Marcel Dekker Inc. New York.
25. Inze, D. & Van Montago, M. (1995). Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotechnol*, 6, 153-158.
26. Irigoyen, J. J., Emerich, D. W. & Sanchex-Diaz, M. (1992). Alfalfa leaf senescence induced by drought stress. Photosynthesis hydrogen peroxidase metabolism. Lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiol Plant*, 84, 64-72.
27. Ito, H., Nobutusugu, H. & Ohbayashi, A. (1991). Purification and characterization of rice peroxidase. *Agric Biol Che*, 55, 2445-2454.
28. Jabari, F., Ahmadi, A., Poustini, K. & Alizadeh, H. (2006). Evaluation of some antioxidant enzyme effects on chlorophyll and cell membrane in drought susceptible and tolerant wheat varieties. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 37, 307-316.
29. Jagtap, V. & Bharagava, S. (1995). Variation in antioxidant metabolism of drought tolerant and susceptible varieties of S*orghum biolcolor* L. *Agric Biol Chem*, 65, 445-454.
30. Jiang, M. & Zhang, J. (2001). Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative offence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol*, 42, 1265-1273.
31. Jiang, Y. & Huang, N. (2001). Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Sci*, 41, 436-442.
32. Jung, S. (2004). Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Sci*, 166, 459-466.
33. Liang, Y., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W. & Ding, R. (2003). Exogenous silicon(Si) increases antoxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgar* L.). *J Plant Physiol*, 160, 1157-1164.

34. Mac Adam, J. W., Nelson, C. J. & Sharp, R. E. (1992). Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiol*, 99, 294-878.
35. Maria, C., Esther, R., González, M., Minchin, F. R., Judith, K., Arrese-Igor, W. C., Ramos, J. & Becana, M. (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum*, 115, 531–540.
36. Michel, B., Wiggins, E., Olson, K. & Outlaw, W. H. (1983). A guide to establishing water potential of aqueous two-phase solutions(polyethylene glycol plus dextran) by amendment with mannitol. *Plant Physiol*, 72(1), 60–65.
37. Mittal, K. & Dubey, R. S. (1991). Behavior of peroxidase in rice: in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. *J Physiol Biochem*, 29(1), 31-40.
38. Noctor, G. & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Ann. Rev Plant Physio Plant Mole Bio*, 49, 249-279.
39. Pattangual, W. & Madore, M. (1999). Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in coleus. *Plant Physiol*, 121, 998.
40. Polle, A. (1997). Defense against photooxidative damage in plants. In: J.S. Candalios (ed), *Oxidative stress and the molecular biology of oxidative defense*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harboor.
41. Reddy, A. R., Chaitanya, K. V. & Vivikanadan, M. V. (2004). Drought-induced response of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol*, 161, 1189-1202.
42. Rensburg, L. V. & Krugen, G. H. J. (1994). Evaluation of components of oxidative stress metabolism for use in selection of drought tolerance and cultivars of *Nicotiana tabcum* L. *J Plant Physiol*, 139, 621-625.
43. Rich, P. R. & Bonner, W. D. J. (1978). The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 188, 206-213.
44. Sairam, R. K. (1994). Effect of moisture stress on physiological activity of two contrasiting wheat genotypes. *Indian Exp Biol*, 32, 594-597.
45. Sairam, R. K., Desmuk, P. S. & Shukla, D. S. (1997). Tolerance of drought and temperature stress in relation to increase antioxidant enzyme activity in wheat. *J Agron Crop Sci*, 178, 171-178.
46. Salin, M. L. (1991). Chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. *Free Radical Res Commun*, 12, 851-858.
47. Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol*, 101, 7-12.
48. Serraj, R. & Sinclair, T. R. (1996). Inhibition of nitrogenase activity and nodule oxygen permeability by water deficit. *J Exp Bot*, 47, 1067-1073.
49. Shepherd, A., MC-Ginn, S. M. & Wyseure, C. L. (2002). Simulation of the effect of water shortage on the yields of winter wheat in North–East England. *Ecol Modeling*, 147, 41-52.
50. Siosemardeh, A. (2002). *Yield and growth physiological aspects in relation to drought tolerance of wheat varieties*. Ph. D. thesis. Agronomy and plant breeding faculty. Tehran university.
51. Smirnoff, N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotechnol*, 9, 214-219.
52. Tsugane K., Koboyashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K. & Koboyashi, H. (1999). A recessive *Arabidobsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cells*, 11, 1195-1206.
53. Wise, R. R. & Naylor, A. W. (1987). Chilling enhanced photo oxidation. The proxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastracture. *Plant Physiol*, 83, 278-282.
54. Zhang, J. & Kirkham, M. B. (1994). Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol*, 35, 785-791.
55. Zhu, J. K. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance rising *Arabidopsis. Plant Physiol*, 1249, 41-948.