

## تعیین کلون‌های متحمل به تنش خشکی چای (*Camellia sinensis* L.) با بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

مهدی رحیمی<sup>۱\*</sup>، مجتبی کردرستمی<sup>۲</sup>، مجتبی مرتضوی<sup>۱</sup>، صنم صفایی چایی کار<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی،

دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

<sup>۲</sup>گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

<sup>۳</sup>پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۱۱

### چکیده

به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ۱۴ کلون چای در شرایط نرمال و تنش خشکی، دو آزمایش جداگانه به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو تکرار در سال زراعی ۱۳۹۶ در ایستگاه تحقیقات چای فشالم (رشت) اجرا گردید. در هر دو طرح، آبیاری به صورت معمول تا آخر تیر ماه انجام شد؛ اما در تیمار خشکی، از ابتدای مرداد تا موقع برداشت برگ‌های چای، آبیاری قطع گردید. در آخر مرداد، از هر کرت در هر دو آزمایش، برگ کلون‌های چای برداشته شده و به فریزر ۸۰- منتقل شدند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسیددیس موتاز، کاتالاز، فنیل‌آلانین آمونیا لیاز، لیپید پراکسیداز، مالون‌دی‌آلدئید، بتاکاروتن و لیکوپین اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گردید. بر اساس نتایج به دست آمده از مقایسات میانگین، کلون‌های ۱۰۰، ۳۹۹ و بذری تحت شرایط تنش خشکی دارای بیشترین مقادیر برای بیشترین مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسیددیس موتاز، کاتالاز، پراکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیا لیاز، لیپید پراکسیداز بودند. در طرف مقابل، این کلون‌ها کمترین مقدار را برای مالون‌دی‌آلدئید دارا بودند. این مساله تحمل نسبی آن‌ها را به خشکی نشان می‌دهد. کلون‌های ۲۷۸ و ۲۷۶ در طرف مقابل قرار داشتند و با کمترین مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در شرایط تنش خشکی (بجز مالون‌دی‌آلدئید) به عنوان کلون‌های حساس در نظر گرفته شدند.

**واژه‌های کلیدی:** بتاکاروتن، پراکسیداز، تحمل به خشکی، کاتالاز، مالون‌دی‌آلدئید.

### مقدمه

محیط‌های طبیعی دربردارنده تنش‌های زیستی و غیرزیستی برای گیاهان هستند. گیاهان دائماً در برابر تغییرات محیطی قرار دارند و چنانچه این تغییرات شدت و سرعت زیادی داشته باشند، آن‌ها را به عنوان تنش تلقی می‌کنند. در گزارش سال ۲۰۱۲ فائو ذکر شده است که فقط ۳/۵ درصد از مناطق دنیا تحت تأثیر فشارهای محیطی قرار ندارند (FAOSTAT, )

چای (*Camellia sinensis* L.) به واسطه ارزش غذایی و اثرات آن در بدن انسان، اهمیت ویژه‌ای داشته و جزء یکی از پرطرفدارترین نوشابه‌های آرام بخش شناخته شده است (Seraji et al., 2007). بیشتر

\*نویسنده مسئول: mehdi83ra@yahoo.com

اکسیژن فعال مانند سوپراکسیدها، هیدروکسیل و رادیکال پروکسی است (Wang et al., 2009).

تنش خشکی باعث کمبود آب در بافت‌های گیاهی می‌گردد که نتیجه آن، اثرات اسمزی بر روی طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های متابولیکی گیاهان است. گونه‌های فعال اکسیژن که به دلیل اثرات هیپراسموتیک و تنش یونی به وجود می‌آیند، باعث نقصان در غشاء و فرآیندهای غشایی و مرگ سلول می‌شوند (Parida and Das, 2005). بیشتر صدمات وارده به گیاهانی که در معرض خشکی قرار گرفته‌اند مربوط به صدمات اکسیداتیو در سطح سلولی می‌باشد (Foyer and Noctor, 2005). گیاهان مکانیسم‌هایی را برای جلوگیری از اثرات سمی این ROS دارند که به مکانیسم‌های آنزیمی (با استفاده از آنزیم‌های سوپراکسید دیس موتاز، کاتالاز، گلوکاتایون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز) و غیر آنزیمی (تولید مولکول‌های آنتی‌اکسیدان مانند: توکوفرول، آسکوربیک اسید، گلوکاتایون و غیره) تقسیم می‌شوند (Reddy et al., 2004; Demiral and Türkan, 2005; Sekmen et al., 2007). وقتی ROSها افزایش می‌یابند، واکنش‌های زنجیره‌ای شروع می‌گردد که در آن سوپراکسید دیس موتاز (SOD) رادیکال سوپر اکسید ( $O_2^{\cdot-}$ ) را به اکسیژن ( $O_2$ ) و پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) کاتالیز می‌کند (Meloni et al., 2003)، سپس پراکسید هیدروژن در چرخه اسکوربات-گلوکاتایون توسط آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) حذف می‌گردد (Cicek and Cakirlar, 2008). کاتالاز (CAT) نیز می‌تواند پراکسید هیدروژن را به آب تبدیل کند اما نسبت به APX تاثیر کمتری دارد (Sekmen et al., 2007).

گزارش‌ها نشان می‌دهد که قرار گرفتن گیاهان در معرض انواع تنش‌های محیطی از جمله خشکی، می‌تواند تولید ROS را تشدید کند، که منجر به

در منابع، تنش به‌عنوان عامل محیطی غیرمطلوب برای موجودات زنده و مقاومت به‌عنوان توانایی ادامه حیات موجود زنده در این شرایط نامساعد تعریف شده است، هر چند که در گیاهان زراعی علاوه بر ادامه حیات، توانایی تولید بخش قابل برداشت یا محصول نهایی نیز حائز اهمیت است (Ciarmiello et al., 2011). معمولاً تنش‌های غیرزیستی به‌صورت هم‌زمان با یکدیگر رخ می‌دهند. برای مثال، دمای زیاد یا تابش بیش از اندازه نور اغلب به همراه کاهش میزان آب در دسترس رخ می‌دهد که می‌تواند با اثر سمیت مواد معدنی موجود در خاک و اطراف ریشه گیاه تشدید شود. بنابراین یک تنش غیرزیستی می‌تواند توانایی گیاه برای مقابله با تنش ثانویه را نیز کاهش دهد (Tester and Bacic, 2005).

خشکی و شوری به‌عنوان دو تنش غیرزنده در پیشرفت فرآیند بیابان‌زایی تأثیر چشم‌گیری در محدودیت رشد گیاهان و کاهش تولید محصولات کشاورزی دارند. بنابراین، شناخت دقیق مکانیسم‌های درگیر در مقابله با این تنش‌ها در گیاهان کمک بسیار زیادی در بهبود صفات مقاومتی گیاهان خواهد کرد. در میان عوامل محیطی، خشکی عامل اصلی محدودکننده رشد و نمو گیاهان است (Manavalan et al., 2009). در شرایط کاملاً طبیعی، مقادیر کم گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند رادیکال سوپر اکسید ( $O_2^{\cdot-}$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، رادیکال هیدروکسیل ( $OH\cdot$ )، اکسیژن نوزاد ( $O_2$ ) جزئی از متابولیت‌ها می‌باشند که توسط سلول‌های گیاه تولید می‌شوند (Cai-Hong et al., 2005). وقتی بین قسمت‌های مختلف سلول از نظر تولید و حذف ROS تعادل به شدت به هم می‌خورد، تنش اکسیداتیو و خسارات ناشی از آن به وجود می‌آید (Mittler, 2002). بسیاری از تنش‌های محیطی منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردند که به دلیل شکل‌گیری گونه‌های

(Harris, 2004). لذا مطالعه حاضر به منظور واکنش‌های بیوشیمیایی کلون‌های مختلف چای ایران به تنش خشکی انجام گردید تا واکنش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلون‌های چای را در دو شرایط نرمال و تنش خشکی بررسی کرده و سپس با استفاده از آن بتوان کلون‌های متحمل به تنش خشکی را شناسایی نمود.

#### مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۱۴ کلون چای در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو تکرار، به‌طور مجزا در دو محیط تنش خشکی و بدون تنش در ایستگاه تحقیقاتی چای فشالم (رشت) مورد بررسی قرار گرفتند. آبیاری در هر دو طرح به‌صورت معمول تا آخر تیر انجام شد و پس از آن در طرح تنش خشکی تا آخر مرداد ماه که موقع برداشت برگ‌های چای است، انجام نشد. به دلیل اینکه بیشترین صدمه تنش خشکی در باغات چای در گیلان در ماه‌های تیر و مرداد اتفاق می‌افتد (Masoudian et al., 2014)، تنش خشکی در مردادماه انجام شد. همچنین در شرایط نرمال آبیاری کلون‌ها هر سه روز انجام گردید. در آخر مرداد از هر کرت در هر دو آزمایش برگ کلون‌های چای به صورت همزمان از هر دو تکرار برداشته شده و به فریزر ۸۰- منتقل شد تا فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شوند.

**اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت: به‌منظور استخراج و اندازه‌گیری آنزیم، مقدار کمی از نمونه‌های گیاهی در هاون چینی ریخته و نیتروژن مایع به آن اضافه شد و سپس نمونه‌ها به‌خوبی کوبیده شدند تا کاملاً پودر شوند و به روش (Beauchamp and Fridovich, 1971) استخراج شدند. از این عصاره برای سنجش آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز استفاده شد.**

افزایش اکسیداسیون مضر اجزای سلولی و تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به شرایط تنش محیطی بسیار حساس هستند و به‌عنوان علامت‌دهنده‌های افزایش یا کاهش بیان ژن در گیاهان برای شرایط کمبود آب عمل می‌کنند. این آنزیم‌ها می‌تواند به‌عنوان نشانگرهای مولکولی تحمل به خشکی استفاده شوند (Badawi et al., 2004). مکانیسم‌های بقای گیاهان در شرایط تنش وابسته به پاسخ‌های مختلف، از جمله ظرفیت گیاه در حفظ سطح آنتی‌اکسیدانت بالا، چه آنزیمی و غیر آنزیمی است (Apel and Hirt, 2004). در مطالعه‌ای فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز (SOD) و ایزوفرم FeSOD موجب افزایش کارایی مصرف آب (WUE) در ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی تحت شرایط کمبود آب شده است (Huseynova et al., 2010) و در کانولا (*Brassica napus*) افزایش در کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) را در شرایط کمبود آب نشان داده است (Omidi, 2010).

در دهه‌های اخیر، پیشرفت‌های قابل توجهی در تحمل به خشکی در ارقام زراعی از طریق روش‌های انتخاب و اصلاح مرسوم صورت گرفته است. با این حال، بسیاری از روش‌های انتخاب بر اساس تفاوت در خصوصیات زراعی بوده است. خصوصیات زراعی نشان‌دهنده ترکیب اثرات ژنتیکی و محیطی در رشد گیاه است و ادغام مکانیسم‌های فیزیولوژیکی اعطای تحمل به خشکی را در بر دارد. پارامترهای انتخاب زراعی معمول برای تحمل به خشکی شامل عملکرد، بقا، ارتفاع بوته، سطح برگ، آسیب‌های برگ، نرخ رشد نسبی و کاهش رشد نسبی می‌باشد. هنگامی که غربال‌گری برای اجزای تشکیل‌دهنده صفات پیچیده انجام می‌گیرد، معیارهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی قادر به تأمین اطلاعات بیشتری نسبت به پارامترهای زراعی و یا ارزیابی بصری می‌باشند (Ashraf and

(حجم آنزیمی × ضریب خاموشی) / (حجم محلول واکنش × تغییرات جذب در دقیقه) = فعالیت آنزیمی (U/g dw)  $(min^{-1})$

**سنجش فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL):** سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) با استفاده از غلظت اسید سینامیک تولید شده و بر اساس میزان اسید سینامیک تولید شده صورت گرفت (Wang et al., 2006). فعالیت این آنزیم با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی معادل  $9500 M^{-1} cm^{-1}$  تعیین گردید. یک واحد از فعالیت PAL معادل یک میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه می‌باشد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

**سنجش فعالیت لپید پراکسیداز (LP) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA):** فعالیت لپید پراکسیداز (LP) مطابق روش استپاین و کلویوس (Stepien and Klobus, 2005) مورد سنجش قرار گرفت. غلظت TBARS با استفاده از ضریب جذبی  $155 mM^{-1} cm^{-1}$  محاسبه شد. برای اندازه‌گیری پراکسید شدن لیپیدها، غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) نیز، با استفاده از روش هیت و پاکر (Heath and Packer, 1968) و در طول موج ۵۳۲ نانومتر استفاده شد. ماده‌ی مورد نظر برای جذب در این طول موج، کمپلکس قرمز MDA-TBA است. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل  $155 mM^{-1} cm^{-1}$  استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Heath and Packer, 1968).

**سنجش میزان بتاکاروتن و لیکوپن:** برای اندازه‌گیری بتاکاروتن و لیکوپن از روش نگاتا و یاماشیتا (Nagata and Yamashita, 1992) با اندکی تغییرات استفاده گردید. مقدار ۵۰ میلی‌گرم بافت گیاهی به

**سنجش فعالیت سوپراکسید دیس‌موتاز (SOD):** فعالیت سوپراکسید دیس‌موتاز (SOD) با اندازه‌گیری توانایی‌اش در جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیم (Nitro blue tetrazolium) تعیین شد (Beauchamp and Fridovich, 1971). فعالیت آنزیم SOD بر طبق رابطه زیر و بر حسب میکرومول (یونیت) در گرم وزن تر تعیین گردید

**سنجش فعالیت کاتالاز (CAT):** سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با استفاده از روش بیرز و سائز (Beers and Sizer, 1952) با کمی تغییرات انجام شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی کاتالاز  $(40 mM^{-1} cm^{-1})$  به دست آمد. در نهایت، فعالیت آنزیمی بر حسب  $\mu Mol/g$  FW.min محاسبه شد.

**سنجش فعالیت پراکسیداز (POD):** آنزیم پراکسیداز (POD) بر اساس روش چنس و ماهلی (Chance and Maehly, 1955) با اندکی تغییر مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی گایاکول POD  $(\mu M^{-1} cm^{-1})$  و بر حسب  $\mu Mol/g$  FW.min محاسبه شد.

**سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX):** فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX) با استفاده از روش ناکانو و آسادا (Nakano and Asada, 1981) اندازه‌گیری شد. میزان اکسیداسیون آسکوربیت اسید با کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر و سرعت واکنش که همان اکسیداسیون آسکوربیت اسید در حضور پراکسید هیدروژن است، به صورت خطی در هر ۱۰ ثانیه و به مدت ۱۲۰ ثانیه اندازه‌گیری گردید. فعالیت این آنزیم بر حسب یک واحد آنزیمی در گرم وزن خشک در دقیقه بر اساس فرمول زیر محاسبه خواهد

شد:  $Units(\mu Mol/gFW.min) =$

$$\left( \frac{100 - OD_{560} Control \otimes OD_{560} Sample}{OD_{560} Control} \right) \times 100$$

50

### نتایج

نتایج تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه نشان داد که اثر خشکی روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تاثیر داشته و در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، به این مفهوم که محیط طبیعی و تنش خشکی اثر یکسانی روی صفات مذکور نداشتند. همچنین بین کلون‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری از نظر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت وجود داشت که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین آن‌ها بود (جدول ۱). اثر متقابل کلون × خشکی نیز برای صفات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت معنی‌دار بود، به این مفهوم که واکنش کلون‌های مختلف در شرایط متفاوت خشکی یکسان نبوده است (جدول ۱).

کمک نیتروژن مایع آسیاب شده و عصاره‌گیری به کمک استون-هگزان (۶:۴) انجام شد. سپس به مدت ۲ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از خارج کردن فاز بالایی (۱۰۰۰ میکرولیتر)، میزان جذب به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۳-۵۰۵ قرائت شد. سپس با استفاده از فرمول‌های زیر میزان لیکوپن و بتا-کاروتن محاسبه گردید.

$$\begin{aligned} \text{Lycopene (mg/100mL)} &= -0.0458A_{663} + 0.372A_{505} + 0.0806A_{453} \\ \beta\text{-carotene (mg/100mL)} &= 0.216A_{663} - 0.304A_{505} + 0.452A_{453} \end{aligned}$$

جدول ۱: تجزیه واریانس مرکب آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در کلون‌های چای در شرایط تنش خشکی

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییرات
فنیل آلانین آمونیا لیاژ (U/g Protein)	پراکسیداز (Ug-1FW min-1)	کاتالاز (Ug-1FW min-1)	سوپراکسید دیسموتاز (Ug-1FW min-1)	آسکوربات پراکسیداز (Ug-1FW min-1)		
۸۹۹/۲۸**	۱۴۲/۰۵**	۱۶۶/۵۲**	۴۵۵۶۱۱/۰۲**	۸۷۷/۳۸**	۱	تنش
۰/۰۲۳	۰۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۲	۴۲/۲۵	۰/۰۶۸	۲	خطا ۱
۲۲/۷۷**	۱۲/۱۱**	۸/۲۰**	۱۱۹۲۵/۴۰**	۲۹/۷۶**	۱۳	کلون
۱۸/۰۶**	۱۰/۱۹**	۷/۲۹**	۱۶۰۹۹/۸۵**	۲۷/۳۲**	۱۳	کلون × تنش
۰/۰۰۸	۰/۰۱۱	۰/۰۰۵	۳۵/۰۳	۰/۰۲۹	۲۶	خطا ۲
۱/۴۶	۳/۲۹	۳/۷۷	۲/۴۹	۳/۰۸		درصد ضریب تغییرات

\*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

### ادامه جدول ۱-۱

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییرات
لیکوپن (mg 100 mL-1 of extract)	بتا کاروتن (mg 100 mL-1 of extract)	مالون دی‌آلدئید (nmol/gr fr wt)	لیپید پراکسیداز (nmol/gr fr wt)		
۲/۷۷**	۱/۸۴**	۲۳۲۲۷/۵۰۴**	۹۱۱۹۱/۰۰۱**	۱	تنش
۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳	۰/۱۰۵	۱/۷۹	۲	خطا ۱
۰/۱۶۴**	۰/۱۵۳**	۱۸۷/۴۹**	۲۵۷۲/۵۱**	۱۳	کلون
۰/۱۴۹**	۰/۰۹۶**	۲۵۴/۶۰**	۳۷۳۸/۴۶**	۱۳	کلون × تنش
۰/۰۰۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۴	۰/۱۲۹	۰/۴۵۲	۲۶	خطا ۲
۰/۸۱	۴/۳۲	۱/۳۲	۱/۰۷		درصد ضریب تغییرات

\*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

نسبت به سایر کلون‌ها در شرایط نرمال و تنش بودند (جدول ۲). بنابراین این کلون‌ها را می‌توان به‌عنوان کلون متحمل معرفی کرد. در حالی که کلون ۲۷۸ و ۲۷۶ و بعضی کلون‌های دیگر در شرایط تنش خشکی افزایش آنچنانی نداشتند یا کمتر از مقدار فعالیت این آنزیم در شرایط نرمال بودند. بنابراین می‌توان این کلون‌ها را به‌عنوان کلون حساس در نظر گرفت. کلون‌های ۱۰۰، ۳۹۹ و بذری از نظر کلیه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بیشترین مقدار را در شرایط تنش خشکی نسبت به سایر کلون‌ها در شرایط نرمال و خشکی داشتند (جدول ۲). همچنین در این ارقام، میزان مالون‌دی‌آلدهید نسبت به سایرین در بیشترین حد خود قرار داشت. نتایج همچنین نشان داد که ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس میزان رنگدانه‌های بیشتری تحت تنش خشکی بودند.

مقایسه میانگین نشان داد که کلون‌های ۱۰۰، ۳۹۹ و بذری در شرایط تنش خشکی برای اکثر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیس‌موتاز، کاتالاز، پراکسیداز، فیل‌آلانین آمونیازیاز، لیپید پراکسیداز) مقدار بالایی داشتند در حالی که کلون‌های ۲۷۸ و ۲۷۶ کمترین مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را در شرایط نرمال به خود اختصاص دادند (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کلون‌های ۲۷۸ و ۲۷۶ مقدار بیشتری از مالون‌دی‌آلدهید را نشان دادند (جدول ۲). تنش خشکی موجب افزایش MDA در همه کلون‌های چای گردید و بیشترین میزان MDA در گیاهانی که حساس بودند، مشاهده گردید (جدول ۲). نتایج جدول ۲ نشان داد که کلون‌های ۱۰۰ و ۳۹۹ و بذری دارای فعالیت آنزیم CAT بالاتری در تنش خشکی

جدول ۲: مقایسه میانگین اثر متقابل تنش در اکوتیپ برای صفات مورد مطالعه

میانگین تیمارها برای صفات مورد مطالعه										تیمارها (اثر متقابل)	
لیکوپن (mg 100 mL <sup>-1</sup> of extract)	بناکاروتن (mg 100 mL <sup>-1</sup> of extract)	مالون‌دی‌آلدهید (nmol/gr fr wt)	لیپید پراکسیداز (nmol/gr fr wt)	فیل‌آلانین آمونیازیاز (U/g Protein)	پراکسیداز (Ug-1FW min-1)	کاتالاز (Ug-1FW min-1)	سوپراکسید دیس‌موتاز (Ug-1FW min-1)	آسکوربات پراکسیداز (Ug-1FW min-1)	کلون چای	تنش خشکی	
۰/۰۵۳i	۰/۲۱nap	۷/۸kl	۱۹/۵l	۱/۵۸rs	۲/۱۶۵d	۰/۲۴۵f-i	۱۴۹/۷۵g	۱/۸j-m	۷۴	۱	
۰/۰۱۲no	۰/۲۵k-o	۸/۸۵jk	۱۴/۵m	۳/۰۵lm	۱/۳۲۵g-j	۰/۲۱f-i	۱۲۰/۷۵h	۲/۱۵i-l	۱۰۰	۱	
۰/۰۱۸۵m-	۰/۳۷۵hi	۴/۳no	۲۶/۰۵jk	۲/۱۸۰-q	۱/۹۲۵de	۰/۰۶۵hi	۱۵۴/۴۵g	۱/۴۵l-n	۲۵۲	۱	
۰/۰۱۵۵m-o	۰/۳۳۵jz	۸/۰۵j-l	۲۴/۱۵k	۱/۷۴r	۱/۵۸۵e-h	۰/۱۳۵hi	۱۲۱h	۱/۶۵j-m	۲۶۱	۱	
۰/۰۱۱۰	۰/۲۶۵j-n	۵/۶mn	۲۵/۵۵jk	۲/۵۲no	۱/۶e-h	۰/۰۸hi	۱۱۷/۹h	۱/۲m-p	۲۶۹	۱	
۰/۰۵۶i	۰/۲۲m-p	۷/۰۵lm	۱۵/۷m	۳/۵۶۵k	۱/۵۸۵e-h	۰/۱۱۵hi	۱۵۲/۸g	۰/۹n-p	۲۷۰	۱	
۰/۰۲۰۵k-m	۰/۲۳l-p	۳/۶۵o	۲۷/۱۵j	۲/۳۳۵n-p	۱/۸۵۵de	۰/۰۸۵hi	۱۵۸/۹۲g	۱/۷۵j-m	۲۷۲	۱	
۰/۰۱۵m-o	۰/۱۸۵op	۷/۳۵l	۳۳/۸۵h	۱/۸۸۵qr	۱/۲۷g-j	۰/۱۷۵g-i	۱۷۱/۸۵fg	۲/۳h-k	۲۷۶	۱	
۰/۰۷۴h	۰/۱۷۵op	۵/۲n	۲۰/۷۵l	۱/۷۵r	۱/۸۴de	۰/۱۷۵g-i	۱۵۳/۴۵g	۱/۶۳k-m	۲۷۷	۱	
۰/۰۲۲k-m	۰/۱۶p	۸j-l	۲۵/۵۱jk	۱/۳۳۵s	۱/۱۱j	۰/۱hi	۱۵۲/۳g	۰/۵۳p	۲۷۸	۱	
۰/۰۱۴۵m-o	۰/۱۹n-p	۴/۳۵no	۱۴/۱m	۲/۲۱۰-q	۱/۷۹d-f	۰/۱۵۵hi	۱۷۰/۳fg	۰/۷۲op	۲۸۰	۱	
۰/۰۱۷m-o	۰/۳i-l	۴/۶no	۳۲/۷۵hi	۲/۱۳۵pq	۱/۱۹۵h-j	۰/۰۴۵i	۱۶۰/۲۵g	۲/۳۵h-j	۲۸۵	۱	

۰/۰۳۵j	۰/۳۲۵i-k	۹/۴j	۱۸/۷۵l	۳/۳۷kl	۱/۶۷۵e-g	۰/۳۵۵f-h	۱۱۸/۷۵h	۲/۵۵hi	۳۹۹	۱
۰/۰۲l-n	۰/۴۹fg	۱۱/۵i	۱۵/۳۵m	۲/۷mn	۱/۹۶de	۰/۴۷fg	۱۵۲/۳۵g	۱/۲۵m-o	bazri	۱
۰/۹۴۴۵b	۰/۹۷۵c	۳۱/۳۵g	۱۵۷/۵c	۱۵/۱b	۸/۵۱b	۶/۸a	۴۵۱/۲bc	۱۴/۳۵c	۷۴	۲
۰/۹۰۳۵e	۰/۹۷c	۲۹/۶۵h	۱۶۵/۱a	۱۶/۸۸a	۹/۰۳۵a	۷a	۴۹۹/۳a	۱۸a	۱۰۰	۲
۰/۰۳۱j	۰/۴۲۵gh	۵۹/۹۵c	۳۰/۸۵i	۶/۰۵h	۱/۳۷۵f-j	۰/۳۱۵f-i	۱۹۷/۸e	۳/۳۵g	۲۵۲	۲
۰/۴۴۷g	۰/۶۱۵d	۴۴/۸e	۱۱۳/۸۵f	۹/۶d	۴/۱c	۳/۶۵e	۳۱۱/۸۵d	۸/۱۵e	۲۶۱	۲
۰/۴۴۱g	۰/۵۸۵de	۴۷/۱d	۱۱۴/۸f	۹/۱۵e	۴/۴۷۵c	۳/۸e	۳۰۱/۴۵d	۹/۵۵d	۲۶۹	۲
۰/۴۸۲۵f	۰/۵۱۵ef	۴۶/۴۵d	۱۲۶/۳۵d	۸/۶۷f	۴/۳۶c	۴/۵c	۳۰۸/۸۵d	۹/۵۵d	۲۷۰	۲
۰/۰۳۰۵j	۰/۲۸۵j-m	۶۱/۱c	۳۲/۹hi	۶/۳۵gh	۱/۵۵۵e-i	۰/۲۶۵f-i	۲۰۲/۰۵e	۴/۲f	۲۷۲	۲
۰/۰۲۷۵j-l	۰/۲۱۵m-p	۶۵/۶۵b	۳۹/۲۵g	۵/۴۵۵i	۱/۱۲۵ij	۰/۴۸f	۲۱۴/۳e	۳/۴g	۲۷۶	۲
۰/۹۶۴a	۰/۹c	۳۳/۰۵f	۱۵۴/۷۵c	۱۴/۴۵c	۸/۶۳ab	۶/۴b	۴۴/۹c	۱۴c	۲۷۷	۲
۰/۰۳۲۵j	۰/۲op	۶۹/۹a	۳۰/۹i	۴/۹۰۵j	۱/۰۰۵j	۰/۳f-i	۱۹۴/۴۵ef	۲/۹۵gh	۲۷۸	۲
۰/۴۴۶۵g	۰/۴۷۵fg	۴۵/۷۵de	۱۲۰/۷۵e	۸/۸ef	۴/۵۲۵c	۴/۱d	۳۱۹/۳۵d	۱۰/۲۵d	۲۸۰	۲
۰/۰۲۸۵jkl	۰/۳۲۵i-k	۶۶/۷b	۳۸/۲g	۶/۷۲۵g	۱/۱۰۵j	۰/۲۳۵f-i	۲۰۲/۱۵e	۴/۲f	۲۸۵	۲
۰/۹۲۳۵c	۱/۰۷۵b	۳۱/۹fg	۱۵۶/۶c	۱۶/۹۷۵a	۸/۷۵ab	۶/۵b	۴۷۱/۸۵b	۱۵/۹b	۳۹۹	۲
۰/۹۱۳d	۱/۲۲۵a	۳۲/۷fg	۱۶۱/۳b	۱۵/۳۵b	۸/۹۲۵ab	۶/۳۵b	۴۶۴/۹bc	۱۵/۲b	bazri	۲

تیمارهایی که حروف مشترک دارند از لحاظ آماری اختلافی با هم ندارند.

## بحث

نوری را بالأخص در گیاهان C<sub>3</sub> القاء می‌نماید. در نتیجه مقدار زیادی از H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در پراکسی‌زوم تولید می‌گردد. ثالثاً: NADPH- اکسیداز متصل به غشاء و دی آمین اکسیداز آپوپلاستی در طی تنش خشکی فعال می‌شوند و بنابراین در ساخت ROS کمک می‌نمایند (Cross et al., 1999; Hernández et al., 2001; Lin and Kao, 2001; Mazel et al., 2004). آنزیم‌های عمده مهارکننده ROS عبارتند از: سوپراکسید دیس‌موتاز (SOD) که O<sub>2</sub><sup>-</sup> را به H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تبدیل نموده و پس از آن اقدام هماهنگ مجموعه‌ای از پنج آنزیم کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPX) و پروکسی ردوکسین‌ها (Prx) که در نهایت مجموع فعالیت این آنزیم‌ها باعث احیا H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> می‌گردد. تمام آنزیم‌های مهارکننده ROS که تا به حال شناسایی شده‌اند، توسط ژن‌های هسته‌ای به‌نحوی کد می‌شوند که بتوانند به‌طرز کاملاً صحیحی در اجزای زیرسلولی مختلف

در این مطالعه، تنش خشکی در مجموع باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تمام کلون‌ها گردید که این مقدار در کلون‌های متحمل به مراتب بیشتر از کلون‌های حساس بود. از لحاظ تنوری، تنش خشکی تولید ROS در گیاهان را افزایش می‌دهد. اولاً: گیاهان با کاهش هدایت روزنه‌ای برای جلوگیری از دست دادن بیش از حد آب، به تنش خشکی پاسخ می‌دهند. این کار به نوبه خود باعث کاهش غلظت CO<sub>2</sub> داخلی (Ci) و احیاء آهسته‌تر CO<sub>2</sub> توسط چرخه کالوین می‌شود. این پاسخ منجر به تخلیه NADP<sup>+</sup> اکسیدشده (که به‌عنوان یک پذیرنده نهایی الکترون در PSI عمل می‌کند)، و افزایش نشت الکترون به O<sub>2</sub> و تشکیل O<sub>2</sub><sup>-</sup> می‌شود (Gossett et al., 1994; Borsani et al., 2001; Ślesak et al., 2002). ثانیاً: کاهش در غلظت CO<sub>2</sub> داخلی، سرعت واکنش‌های چرخه کالوین را کاهش داده، و تنفس

انجام وظیفه کنند (Mittler, 2002). در کنار آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی، از جمله اسید اسکوربیک (ویتامین C)، توکوفرول (ویتامین E) و گلوتاتیون (GSH)، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با فعالیت خود به حفظ سطح پایدار درون سلولی ROS کمک می‌نمایند که این امر منجر به رشد، نمو، چرخه سلولی، سیگنالینگ هورمون و پاسخ مناسب به عوامل تنش‌زای زیستی و غیر زیستی می‌گردد (Mittler, 2002; Foyer and Noctor, 2005; Van Breusegem and Dat, 2006). سوپراکسید دیس‌میوتازها (SODs) در خط مقدم دفاعی قرار دارند. آن‌ها به سرعت  $O_2^-$  را به  $H_2O_2$  تبدیل می‌کنند. سوپراکسید دیس‌میوتازها از یک خانواده چند ژنی تشکیل گردیده‌اند که آنزیم‌های حاضر در اجزای زیرسلولی نظیر کلروپلاست، میتوکندری، پراکسیزوم‌ها، گلی‌اکسی‌زوم‌ها، سیتوزول و آپوپلاست را کدگذاری می‌کنند. تعداد ژن‌های سوپراکسید دیس‌میوتاز در بین گونه‌های گیاهی متفاوت است (Alscher et al., 2002). تعادل درون‌سلولی سوپراکسید دیس‌میوتازها و آنزیم‌های مختلف مهارکننده  $H_2O_2$  ظاهراً در تعیین سطح حالت پایدار  $O_2^-$  و  $H_2O_2$  بسیار مهم می‌باشند. این تعادل، همراه با جداسازی یون‌های فلزی توسط فریتین و دیگر پروتئین‌های متصل به فلز، از طریق واکنش هابر-وایس وابسته به فلز یا واکنش فنتون، مانع از شکل‌گیری  $HO^\bullet$  بسیار سمی می‌گردد (Halliwell, 1993). افزایش سطوح درونی SODها در طول خشکی به‌طور گسترده‌ای گزارش شده است (Bowler et al., 1994). تفاوت در فعالیت SOD در میان گونه‌ها و در درون گونه‌ها مشاهده می‌گردد. همچنین بالاتر بودن فعالیت آنزیم SOD در ارقام متحمل‌تر به تنش اکسیداتیو در دیگر گیاهان نیز مشاهده گردیده است (Ashraf, 2009).

از لحاظ تئوری، تنش خشکی و شوری تولید ROS در گیاهان را افزایش می‌دهد (Ślesak et al., 2002). پراکسیدازها گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی هستند که در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شوند. آنزیم پراکسیداز موجب شکسته شدن پراکسید هیدروژن در سلول می‌شود و بدین شکل از تولید ROSها جلوگیری می‌کند و بنابراین با بالا رفتن سطوح فعالیت این آنزیم، گیاه کمتر مورد تهاجم ROS قرار می‌گیرد. به‌عبارت دیگر، آنزیم پراکسیداز با تجزیه  $H_2O_2$  به آب و  $O_2$  می‌تواند اثرات مخرب  $H_2O_2$  را خنثی کنند (Bowler et al., 1992). پراکسیدازهای گیاهی در چرخه فعالیت معمول خود، می‌توانند احیا  $H_2O_2$  را کاتالیز کنند، این گروه از آنزیم‌ها در سیتوزول، واکوئل، کلروپلاست و آپوپلاست وجود دارند (Kjalke et al., 1992). گایکول پراکسیداز با سوبستراهای زیادی از جمله گایاکول، پیروگالول و فنل که برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده می‌شوند واکنش می‌دهد، اما سوبستراهای اختصاصی آن پراکسید هیدروژن است. در این آنزیم‌ها ماهیت الکترون‌دهندگی تا حد زیادی به ساختار آنزیم بستگی دارد و ترکیبات فنلی مثل گایکول به‌عنوان دهنده الکترون به پراکسید هیدروژن عمل می‌کنند (Sharma et al., 2012).

یکی از آنزیم‌های دفاعی موثر کاتالاز است که در همه موجودات زنده تحت تنش تولید می‌شود. این آنزیم با اثر مستقیم بر پراکسید هیدروژن، سبب کاهش اثرهای سمی آن می‌شود. پراکسید هیدروژن ماده‌ای سمی است که طی بسیاری از مکانیزم‌ها و واکنش‌های طبیعی سلول ایجاد می‌شود. تجمع این ماده برای سلول‌ها و بافت‌ها بسیار آسیب رسان است و باید بلافاصله تجزیه شود. در واقع کاتالاز از پراکسید هیدروژن به‌عنوان پیش ماده استفاده می‌کند و با تجزیه سریع این ماده اثرهای مخرب آن را مهار می‌کند.



کاتالاز مولکول  $H_2O_2$  را بدون نیاز به انرژی تجزیه می‌کند اما فقط در غلظت‌های بالای  $H_2O_2$  فعال است و غلظت‌های پایین آن توسط سایر پراکسیدازها با همکاری احیاکننده‌های قوی مانند گلوکاتیون و آسکوربات حذف می‌شود. فعالیت کاتالاز احیای ۲ مولکول  $H_2O_2$  به دو مولکول  $H_2O$  و  $O_2$  را در بردارد. کاتالاز آنزیمی با شدت بیان بالا، به ویژه در انواع سلول‌های گیاهی خاص، و در نتیجه بخشی جدایی ناپذیر از سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه است ( Mhamdi et al., 2010).

نتایج این مطالعه نشان داد که کلون‌های حساس مقدار بیشتری از مالون دی‌آلدئید را نشان دادند. تنش اکسیداتیو موجب افزایش MDA در همه کلون‌ها گردید و بیشترین میزان MDA در گیاهان حساس گردید. تنش اکسیداتیو موجب افزایش سطوح پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان تحت تنش اکسیداتیو می‌شود. مالون دی‌آلدئید به‌عنوان محصول اصلی تجزیه اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاهای زیستی است که تحت تنش خشکی و شوری افزایش نشان می‌دهد (Sudhakar et al., 2001). در این مطالعه، تنش خشکی سبب افزایش معنی‌دار میزان بتاکاروتن در ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس گردید. عملکرد مسیر بیوستز کاروتنوئیدها به شدت متاثر از تنش‌های محیطی می‌باشد. علاوه بر نقش کاروتنوئیدها در خاموش‌سازی کلروفیل تحریک شده، گفته می‌شود که هر مولکول بتاکاروتن قادر است تعداد زیادی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن را خنثی کند. به‌طور کلی، عوامل تنش‌زای محیطی مانند خشکی، که باعث تولید انواع اکسیدانت‌ها در سلول می‌شوند، نهایتاً به تولید مقادیر متناهی از بتا-کاروتن‌ها نیز منجر می‌شوند (Dufossé et al., 2005). همچنین تنش خشکی باعث افزایش شدید لیکوپن در کلون‌های متحمل چای گردید. این در حالی است که میزان

لیکوپن در ارقام حساس بسیار کمتر بود. تصور بر این است که در شرایط تنش خشکی و کم‌آبی، تولید مواد مؤثره به‌دلیل جلوگیری از اکسیداسیون درون‌سلولی افزایش می‌یابد. تاثیر تنش خشکی بر کاهش درصد مواد مؤثره گیاهان را می‌توان اینگونه بیان داشت که به‌طور کلی، کمبود آب در هر مرحله از رشد گیاه، جذب، انتقال و مصرف عناصر غذایی را کاهش می‌دهد که پیامد آن کم شدن ذخیره کربن و کاهش درصد اسانس است. کاهش میزان متابولیت ثانویه در نتیجه کاهش رطوبت خاک می‌تواند ناشی از اثر زیان‌بار تنش آبی بر رشد و پیکر رویشی گیاه باشد. با شروع تنش خشکی، آب موجود در بافت‌های گیاهان کاهش می‌یابد و این مسئله موجب محدود شدن فتوسنتز می‌گردد. واکنش گیاه به کمبود آب، بستن سریع روزنه‌ها برای جلوگیری از دست دادن آب بیشتر از طریق تعرق می‌باشد. در نتیجه، انتشار  $CO_2$  از برگ محدود می‌گردد و این مسأله موجب محدود شدن فتوسنتز در محل پذیرش ریبولوز ۱ و ۵- بیس فسفات کربوکسیلاز/ اکسیژناز ( Cornic et al., 1992) یا بازدارنده مستقیم آنزیم‌های فتوسنتزی مانند روبیسکو (Haupt-Herting and Fock, 2000) یا ساخت ATP (Nogués and Baker, 2000) می‌گردد.

### نتیجه‌گیری نهایی

بر طبق نتایج مقایسات میانگین، بهترین کلون‌های چای از لحاظ کلیه صفات مورد مطالعه (آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) کلون‌های ۱۰۰، ۳۹۹ و بذری بودند چرا که تحمل به تنش خشکی در آنها نسبت به سایر اکوتیپ‌ها بهتر بود پس می‌توان آن‌ها را به عنوان کلون‌های مطلوب معرفی کرد. همچنین کلون‌های ۲۷۸ و ۲۶۶ در اکثر صفات مورد مطالعه ارزش پایین‌تری از سایر کلون‌ها داشت که می‌توان این کلون‌ها را کلون نامطلوب یا حساس به خشکی به شمار آورد.

کشور برای تأمین مالی این پژوهش از محل طرح پژوهشی به شماره ۹۴۸۰۲۷۰۵ سپاسگزاریم.

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران

## References

- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S. (2002).** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1331-1341.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 373-399.
- Ashraf, M. (2009).** Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*. 27: 84-93.
- Ashraf, M. and Harris, P. (2004).** Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 166: 3-16.
- Badawi, G.H., Kawano, N., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kubo, A. and Tanaka, K. (2004).** Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiologia Plantarum*. 121: 231-238.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971).** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44: 276-287.
- Beers, R.F. and Sizer, I.W. (1952).** A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*. 195: 133-140.
- Borsani, O., Valpuesta, V. and Botella, M.A. (2001).** Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*. 126: 1024-1030.
- Bowler, C., Montagu, M.v. and Inzé, D. (1992).** Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 43: 83-116.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D. and Asada, K. (1994).** Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 13: 199-218.
- Cai-Hong, P., Su-Jun, Z., Zhi-Zhong, G. and Bao-Shan, W. (2005).** NaCl treatment markedly enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging system in leaves of halophyte *Suaeda salsa*. *Physiologia Plantarum*. 125: 490-499.
- Chance, B. and Maehly, A. (1955).** Assay of catalases and peroxidases. Academic Press, New York.
- Ciarmiello, L.F., Woodrow, P., Fuggi, A., Pontecorvo, G. and Carillo, P. (2011).** Plant genes for abiotic stress. In: Shanker, A. and Venkateswarlu, B. (Eds.), *Abiotic stress in plants- mechanisms and adaptations*. InTech, London, United Kingdom, pp. 284-308.
- Cicek, N. and Cakirlar, H. (2008).** Changes in some antioxidant enzyme activities in six soybean cultivars in response to long-term salinity at two different temperatures. *General and Applied Plant Physiology*. 34: 267-280.
- Cornic, G., Ghashghaie, J., Genty, B. and Briantais, J. (1992).** Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. *Photosynthetica*. 27: 295-309.
- Cross, A.R., Erickson, R.W., Ellis, B.A. and Curnutte, J.T. (1999).** Spontaneous activation of NADPH oxidase in a cell-free system: unexpected multiple effects of magnesium ion concentrations. *Biochemical Journal*. 338: 229-233.
- Demiral, T. and Türkan, I. (2005).** Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 53: 247-257.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C. and Ravishankar, G.A. (2005).** Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*. 16: 389-406.

- FAOSTAT (2012).** Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT database, available at <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005).** Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*. 28: 1056-1071.
- Gossett, D.R., Millhollon, E.P. and Lucas, M. (1994).** Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science*. 34: 706-714.
- Halliwell, B. (1993).** The chemistry of free radicals. *Toxicology and Industrial Health*. 9: 1-21.
- Haupt-Herting, S. and Fock, H.P. (2000).** Exchange of oxygen and its role in energy dissipation during drought stress in tomato plants. *Physiologia Plantarum*. 110: 489-495.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1968).** Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125: 189-198.
- Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R. and Sevilla, F. (2001).** Antioxidant Systems and O<sub>2</sub>-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*. 127: 817-831.
- Huseynova, I.M., Suleymanov, S.Y. and Rustamova, S.M. (2010).** Response of photosynthetic apparatus and antioxidant defense systems in *Triticum aestivum* L. genotypes subjected to drought stress. *Proceedings of ANAS (Biological Sciences)*. 65: 49-59.
- Kjalke, M., Andersen, M.B., Schneider, P., Christensen, B., Schüle, M. and Welinder, K.G. (1992).** Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1120: 248-256.
- Lin, C.C. and Kao, C.H. (2001).** Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. *Plant and Soil*. 230: 135-143.
- Manavalan, L.P., Guttikonda, S.K., Phan Tran, L.-S. and Nguyen, H.T. (2009).** Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant and Cell Physiology*. 50: 1260-1276.
- Masoudian, Z., Norastehnia, A. and Falakroo, K. (2014).** Study of drought tolerance in selective clones of tea (*Camellia sinensis* L.). *Iranian Journal of Plant Biology*. 6: 155-170.
- Mazel, A., Leshem, Y., Tiwari, B.S. and Levine, A. (2004).** Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein *AtRab7 (AtRabG3e)*. *Plant Physiology*. 134: 118-128.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A. and Cambraia, J. (2003).** Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. 49: 69-76.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. and Noctor, G. (2010).** Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*. 61: 4197-4220.
- Mittler, R. (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7: 405-410.
- Nagata, M. and Yamashita, I. (1992).** Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 39: 925-928.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981).** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 22: 867-880.
- Nogués, S. and Baker, N.R. (2000).** Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1309-1317.
- Omidi, H. (2010).** Changes of proline content and activity of antioxidative enzymes in two canola genotype under drought stress.

- American Journal of Plant Physiology. 5: 338-349.
- Parida, A.K. and Das, A.B. (2005).** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 324-349.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M. (2004).** Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*. 161: 1189-1202.
- Sekmen, A.H., Türkan, İ. and Takio, S. (2007).** Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum*. 131: 399-411.
- Seraji, A., Pourjam, E., Tanha, M.Z. and Safaei, N. (2007).** Biology and population dynamics of tea root lesion nematode (*Pratylenchus loosi*) in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*. 43: 98-115. [In Persian with English Summary].
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessarakli, M. (2012).** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*. 2012.
- Ślesak, I., Miszalski, Z., Karpinska, B., Niewiadomska, E., Ratajczak, R. and Karpinski, S. (2002).** Redox control of oxidative stress responses in the C3-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 669-677.
- Stepien, P. and Klobus, G. (2005).** Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiologia Plantarum*. 125: 31-40.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S. (2001).** Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*. 161: 613-619.
- Tester, M. and Bacic, A. (2005).** Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology*. 137: 791-793.
- Van Breusegem, F. and Dat, J.F. (2006).** Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*. 141: 384-390.
- Wang, J.W., Zheng, L.P., Wu, J.Y. and Tan, R.X. (2006).** Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*. 15: 351-358.
- Wang, W.-B., Kim, Y.-H., Lee, H.-S., Kim, K.-Y., Deng, X.-P. and Kwak, S.-S. (2009).** Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47: 570-577.