نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال سیزدهم، شماره ۴۹، بهار ۱۳۹۷ / صفحات: ۱۲-۱

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

مهدی رحیمی[1*]، مجتبی کردرستمی[2]، مجتبی مرتضوی[1]، صنم صفایی چایی‌کار[3]

[1]گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

[2]گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

[3]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

به‌منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ١٤ کلون چای در شرایط نرمال و تنش خشکی، دو آزمایش جداگانه به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو تکرار در سال زراعی ١٣٩٦ در ایستگاه تحقیقات چای فشالم (رشت) اجرا گردید. در هر دو طرح، آبیاری به‌صورت 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، سوپراُکسیددیس‌موتاز، کاتالاز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، لیپید پراکسیداز، میزان مالون‌دی‌آلدئید، بتاکاروتن و لیکوپن اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گردید. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مقایسات میانگین، کلون‌های ۱۰۰، ۳۹۹ و بذری تحت شرایط تنش خشکی دارای بیشترین مقادیر برای بیشترین مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت آسکوربات پراکسیداز، سوپراُکسیددیس‌موتاز، کاتالاز، پراکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، 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 ۲۷٦ با کمترین مقدار آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در شرایط تنش خشکی (بجز مالون‌دی‌آلدئید) به‌عنوان کلون‌های حساس در نظر گرفته شدند.

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

مقدمه

چای (*Camellia sinensis* L.) به‌واسطه 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 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 به‌عنوان تنش تلقّی می‌کنند. در گزارش سال ۲۰۱۲ فائو ذکر شده است که فقط ۳/۵ درصد از مناطق دنیا تحت تأثیر فشارهای محیطی قرار ندارند (FAOSTAT,

*نویسنده مسئول: mehdi83ra@yahoo.com

2012). 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 سمیّت 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 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 ($O_2^{\bullet-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (.OH)، اکسیژن نوزاد (O_2) جزیی 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 به‌دلیل شکل‌گیری گونه‌های 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 به‌وجود 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 دیس‌موتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز) و غیر آنزیمی (تولید مولکول‌های آنتی‌اکسیدان مانند: توکوفرول، آسکوربیک اسید، گلوتاتیون 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 دیس‌موتاز (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 هیدورژن در چرخه اسکوربات-گلوتاتیون توسط آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون 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

افـزایش اکسیداسـیون مضـر اجـزای سـلولی و تـنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بـه شـرایط تـنش محیطـی بسـیار حسـاس هسـتند و به‌عنوان علامت‌دهنده‌های افزایش یا کـاهش بیـان ژن در گیاهان برای شرایط کمبود آب عمل می‌کننـد. ایـن آنزیم‌ها می‌تواند به‌عنوان نشانگرهای مولکولی تحمـل بـه خشـکی اسـتفاده شـوند (Badawi et al., 2004). مکانیسم‌های بقای گیاهان در شرایط تنش وابسـته بـه پاسخ‌های مختلـف، از جملـه ظرفیـت گیـاه در حفـظ سطح آنتی‌اکسیدانت بالا، چه آنزیمـی و غیـر آنزیمـی است (Apel and Hirt, 2004). در مطالعـه‌ای فعالیـت آنـزیم سوپراکسـید دیـس‌موتـاز (SOD) و ایزوفـرم FeSOD موجب افزایش کارآیی مصـرف آب (WUE) در ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی تحت شـرایط کمبـود آب شـده اسـت (Huseynova et al., 2010) و در کـانولا (*Brassica napus*) افـزایش در کاتـالاز (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 خصوصیّات زراعی بوده است. خصوصیّات 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 Harris, 2004). لذا مطالعه حاضر به‌منظور واکنش‌های بیوشیمیایی کلون‌های مختلف چای ایران به تنش خشکی انجام گـردید تـا واکـنش آنزیم‌هـای 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 ۱٤ 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 اخر تیر انجام شد و پس از آن در طرح تنش خشکی تا آخر مرداد ماه که موقع برداشت برگ‌های چای است، انجام نشد. به‌دلیل 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 اخر 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 آنتی اکسیدانی اندازه‌گیری شوند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌هـای آنتـی‌اکسـیدانت: **به‌**منظور استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنـزیم، مقـدار کمی از نمونه‌هـای گیـاهی در هـاون چینـی ریختـه و نیتروژن مایع به آن اضافه شد و سـپس نمونـه‌هـا بـه‌خوبی کوبیده شدند تا کاملاً پـودر شـوند و بـه روش (Beauchamp and Fridovich, 1971) اسـتخراج شدند. از این عصاره برای سنجش فعالیت آنـزیم‌هـای

پراُکسیداز، سوپراکسید، آسکوربات‌پراکسیداز و کاتالاز استفاده شد.

سنجش فعالیت سوپراُکسید دیس‌موتاز (SOD): فعالیت سوپراُکسید دیس‌موتاز (SOD) با اندازه‌گیری توانایی‌اش در جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (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 سایز (Beers and Sizer, 1952) با کمی تغییرات انجام شد. فعالیّت آنزیمی با استفاده از قانون بیر لامبرت و باضریب خاموشی کاتالاز ($40\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) به‌دست آمد. درنهایت، فعالیت آنزیمی بر حسب µMol/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 ($\mu M^{-1}cm^{-1}$ ۲۶/۶) و بر حسب µMol/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 آسکوربیک اسید با کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر و سرعت واکنش که همان اکسیداسیون آسکوربیک اسید در حضور پراکسید هیدروژن است، به‌صورت 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:

$$\text{Units}\left(\mu\frac{\text{Mol}}{\text{gFW}}.\text{min}\right)=\frac{\left(100-\frac{OD_{560}\ Control\ \boxtimes\ OD_{560}\ Sample}{OD_{560}\ Control}\right)\times 100}{50}$$

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

سنجش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL): سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) با استفاده از غلظت اسید سینامیک تولیدشده و بر اساس میزان اسید سینامیک تولیدشده 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 سینامیک‌اسید تولید شده در یک دقیقه می‌باشد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

سنجش فعالیت لیپید پراکسیداز (LP) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA): فعالیت لیپید پراکسیداز (LP) مطابق روش استپاین و کلوبوس (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 یاماشیت

(Nagata and Yamashita, 1992) با اندکی تغییرات استفاده گردید. مقدار ۵۰ میلی‌گرم بافت گیاهی به کمک نیتروژن مایع آسیاب شده و عصاره‌گیری به کمک استون-هگزان (٦: ٤) انجام شد. سپس به مدت ۲ دقیقه در دور ٤۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از خارج کردن فاز بالایی (۱۰۰۰میکرولیتر)، میزان جذب به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٥٣-٥۰٥-٦٦٣ قرائت شد. سپس با استفاده از فرمول‌های زیر میزان لیکوپن و بتا- کاروتن محاسبه گردید.

$$\text{Lycopene (mg/100mL)} = 0.0458A_{663} + 0.372A_{505} + 0.0806A_{453}$$

$$\beta\text{-carotene (mg/100mL)} = 0.216A_{663} - 0.304A_{505} + 0.452A_{453}$$

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت.

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 فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت 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).

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		آسکوربات پراکسیداز (Ug-1FW min-1)	سوپراُکسیددیسموتاز (Ug-1FW min-1)	کاتالاز (Ug-1FW min-1)	پراکسیداز (Ug-1FW min-1)	فنیل آلانین آمونیالیاز (U/g Protein)
تنش	۱	۸۷۷/۳۸**	٤٥٥٦۱۱/۰۲**	۱٦٦/٥۲**	۱٤۲/۰٥**	۸۹۹/۲۸**
خطاء ۱	۲	۰/۰٦۸	٤۲/۲٥	۰/۰۰۰۲	۰۰/۰۰۷	۰/۰۲۳
کلون	۱۳	۲۹/۷٦**	۱۱۹۲٥/٤۰**	۸/۲۰**	۱۲/۱۱**	۲۲/۷۷**
کلون×تنش	۱۳	۲۷/۳۲**	۱٦۰۹۹/۸٥**	۷/۲۹**	۱۰/۱۹**	۱۸/۰٦**
خطاء	۲٦	۰/۰۲۹	۳٥/۰۳	۰/۰۰٥	۰/۰۱۱	۰/۰۰۸
درصد ضریب تغیرات		۳/۰۸	۲/٤۹	۳/۷۷	۳/۲۹	۱/٤٦

**: معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

ادامه جدول ۱-

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		لیپید پراکسیداز (nmol/gr fr wt)	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/gr fr wt)	بتاکاروتن (mg 100 mL-1 of extract)	لیکوپن (mg 100 mL-1 of extract)
تنش	۱	۹۱۱۹۱/۰۰۱**	۲۳۲۲۷/٥۰٤**	۱/۸٤**	۲/۷۷**
خطاء ۱	۲	۱/۷۹	۰/۱۰٥	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۰۱
کلون	۱۳	۲٥۷۲/٥۱**	۱۸۷/٤۹**	۰/۱٥۳**	۰/۱٦٤**
کلون×تنش	۱۳	۳۷۳۸/٤٦**	۲٥٤/٦۰**	۰/۰۹٦**	۰/۱٤۹**
خطا	۲٦	۰/٤٥۲	۰/۱۲۹	۰/۰۰۰٤	۰/۰۰۰۰۰٤
درصد ضریب تغیرات		۱/۰۷	۱/۳۲	٤/۳۲	۰/۸۱

**: معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

مقایسه میانگین نشان داد که کلون‌های ۱۰۰، ۳۹۹ و بذری در شرایط تنش خشکی برای اکثر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت (آسکوربات پراکسیداز، سوپراُکسیددیس‌موتاز، کاتالاز، پراکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیالیاز، لیپید پراکسیداز) مقدار بالایی داشتند در حالی که کلون‌های ۲۷۸ و ۲۷٦ کمترین مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت را در شرایط نرمال به خود اختصاص دادند (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کلون‌های ۲۷۸ و ۲۷٦ مقدار بیشتری از مالون‌دی آلدئید (MDA) 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 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 ۲۷٦ 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 فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت 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.

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

تیمارها (اثر متقابل)		میانگین تیمارها برای صفات مورد مطالعه								
تنش خشکی	کلون چای	آسکوربات پراکسیداز (Ug-1FW min-1)	سوپراُکسید دیسموتاز (Ug-1FW min-1)	کاتالاز (Ug-1FW min-1)	پراکسیداز (Ug-1FW min-1)	فنیل آلانین آمونیالیاز (U/g Protein)	لیپید پراکسیداز (nmol/gr fr wt)	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/gr fr wt)	بتاکاروتن (mg 100 mL-1 of extract)	لیکوپن (mg 100 mL-1 of extract)
۱	۷۴	۱/۸j-m	۱۴۹/۷۵g	۰/۲۴۵f-i	۲/۱۶۵d	۱/۵۸rs	۱۹/۵l	۷/۸kl	۰/۲۱mp	۰/۰۵۳i
۱	۱۰۰	۲/۱۵i-l	۱۲۰/۷۵h	۰/۲۱f-i	۱/۳۲۵g-j	۳/۰۵lm	۱۴/۵m	۸/۸۵jk	۰/۲۵k-o	۰/۰۱۲no
۱	۲۵۲	۱/٤٥l-n	۱۵۴/۴۵g	۰/۰۶۵hi	۱/۹۲۵de	۲/۱۸o-q	۲۶/۰۵jk	۴/۳no	۰/۳۷۵hi	۰/۰۱۸۵m-
۱	۲۶۱	۱/٦٥j-m	۱۲۱h	۰/۱۳۵hi	۱/۵۸۵e-h	۱/۷۴r	۲۴/۱۵k	۸/۰۵j-l	۰/۳۳۵ij	۰/۰۱۵۵m-o
۱	۲۶۹	۱/۲m-p	۱۱۷/۹h	۰/۰۸hi	۱/۶e-h	۲/۵۲no	۲۵/۵۵jk	۵/۶mn	۰/۲۶۵j-n	۰/۰۱۱o
۱	۲۷۰	۰/۹n-p	۱۵۲/۸g	۰/۱۱۵hi	۱/۵۸۵e-h	۳/۵۶۵k	۱۵/۷m	۷/۰۵lm	۰/۲۲m-p	۰/۰۵۶i
۱	۲۷۲	۱/۷۵j-m	۱۵۸/۹۲g	۰/۰۸۵hi	۱/۸۵۵de	۲/۳۳۵n-p	۲۷/۱۵j	۳/۶۵o	۰/۲۳l-p	۰/۰۲۰۵k-m
۱	۲۷۶	۲/۳h-k	۱۷۱/۸۵fg	۰/۱۷۵g-i	۱/۲۷g-j	۱/۸۸۵qr	۳۳/۸۵h	۷/۳۵l	۰/۱۸۵op	۰/۰۱۵m-o
۱	۲۷۷	۱/٦٣k-m	۱۵۳/۴۵g	۰/۱۷۵g-i	۱/۸۴de	۱/۷۵r	۲۰/۷۵l	۵/۲n	۰/۱۷۵op	۰/۰۷۴h
۱	۲۷۸	۰/۵۳p	۱۵۲/۳g	۰/۱hi	۱/۱۱j	۱/۲۳۵s	۲۵/۵۱jk	۸j-l	۰/۱۶p	۰/۰۲۲k-m
۱	۲۸۰	۰/۷۲op	۱۷۰/۳fg	۰/۱۵۵hi	۱/۷۹d-f	۲/۲۱o-q	۱۴/۱m	۴/۳۵no	۰/۱۹n-p	۰/۰۱۴۵m-o
۱	۲۸۵	۲/۳۵h-j	۱۶۰/۲۵g	۰/۰۴۵i	۱/۱۹۵h-j	۲/۱۳۵pq	۳۲/۷۵hi	۴/۶no	۰/۳i-l	۰/۰۱۷m-o

۱	۳۹۹	۲/۵۵hi	۱۱۸/۷۵h	۰/۳۵۵f-h	۱/۶۷۵e-g	۳/۳۷kl	۱۸/۷۵l	۹/۴j	۰/۳۲۵i-k	۰/۰۳۵j
۱	bazri	۱/۲۵m-o	۱۵۲/۲۵g	۰/۴۷fg	۱/۹۶de	۲/۷mn	۱۵/۲۵m	۱۱/۵i	۰/۴۹fg	۰/۰۲l-n
۲	۷۴	۱٤/۳۵c	۴۵۱/۲bc	۶/۸a	۸/۵۱b	۱۵/۱b	۱۵۷/۵c	۳۱/۲۵g	۰/۹۷۵c	۰/۹۴۴۵b
۲	۱۰۰	۱۸a	۴۹۹/۲a	۷a	۹/۰۳۵a	۱۶/۸۸a	۱۶۵/۱a	۲۹/۶۵h	۰/۹۷c	۰/۹۰۳۵e
۲	۲۵۲	۳/۳۵g	۱۹۷/۸e	۰/۳۱۵f-i	۱/۳۷۵f-j	۶/۰۵h	۳۰/۸۵i	۵۹/۹۵c	۰/۴۲۵gh	۰/۰۳۱j
۲	۲۶۱	۸/۱۵e	۳۱۱/۸۵d	۳/۶۵e	۴/۱c	۹/۶d	۱۱۳/۸۵f	۴۴/۸e	۰/۶۱۵d	۰/۴۴۷g
۲	۲۶۹	۹/۵۵d	۳۰۱/۴۵d	۳/۸e	۴/۴۷۵c	۹/۱۵e	۱۱۴/۸f	۴۷/۱d	۰/۵۸۵de	۰/۴۴۱g
۲	۲۷۰	۹/۵۵d	۳۰۸/۸۵d	۴/۵c	۴/۳۶c	۸/۶۷f	۱۲۶/۳۵d	۴۶/۴۵d	۰/۵۱۵ef	۰/۴۸۲۵f
۲	۲۷۲	٤/۲f	۲۰۲/۰۵e	۰/۲۶۵f-i	۱/۵۵۵e-i	۶/۳۵gh	۳۲/۹hi	۶۱/۱c	۰/۲۸۵j-m	۰/۰۳۰۵j
۲	۲۷۶	۳/٤g	۲۱۴/۳e	۰/۴۸f	۱/۱۲۵ij	۵/۴۵۵i	۳۹/۲۵g	۶۵/۶۵b	۰/۲۱۵m-p	۰/۰۲۷۵j-l
۲	۲۷۷	۱٤c	۴۴۰/۹c	۶/۴b	۸/۶۳ab	۱۴/۴۵c	۱۵۴/۷۵c	۳۳/۰۵f	۰/۹c	۰/۹۶۴a
۲	۲۷۸	۲/۹۵gh	۱۹۴/۴۵ef	۰/۳f-i	۱/۰۰۵j	۴/۹۰۵j	۳۰/۹i	۶۹/۹a	۰/۲op	۰/۰۳۲۵j
۲	۲۸۰	۱۰/۲۵d	۳۱۹/۳۵d	۴/۱d	۴/۵۲۵c	۸/۸ef	۱۲۰/۷۵e	۴۵/۷۵de	۰/۴۷۵fg	۰/۴۴۶۵g
۲	۲۸۵	٤/۲f	۲۰۲/۱۵e	۰/۲۳۵f-i	۱/۱۰۵j	۶/۷۲۵g	۳۸/۲g	۶۶/۷b	۰/۳۲۵i-k	۰/۰۲۸۵jk
۲	۳۹۹	۱۵/۹b	۴۷۱/۸۵b	۶/۵b	۸/۷۵ab	۱۶/۹۷۵a	۱۵۶/۶c	۳۱/۹fg	۱/۰۷۵b	۰/۹۲۳۵c
۲	bazri	۱۵/۲b	۴۶۴/۹bc	۶/۳۵b	۸/۹۲۵ab	۱۵/۳۵b	۱۶۱/۳b	۳۲/۷fg	۱/۲۲۵a	۰/۹۱۳d

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

بحث

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 تئوری، تنش خشکی تولید ROS در گیاهان را افزایش می‌دهد. اولاً: گیاهان با کاهش هدایت روزنه‌ای برای جلوگیری از از دست دادن بیش از حد آب، به تنش خشکی پاسخ می‌دهند. این کار به نوبه خود باعث کاهش غلظت CO_2 داخلی (Ci) و احیاء آهسته‌تر CO_2 توسط چرخه کالوین می‌شود. این پاسخ منجر به تخلیه $NADP^+$ اکسیدشده (که به‌عنوان یک پذیرنده نهایی الکترون در PSI عمل می‌کند)، و افزایش نشت الکترون به O_2 و تشکیل O_2^- می‌شود (Gossett et al., 1994; Borsani et al., 2001; Ślesak et al., 2002). ثانیاً: کاهش در غلظت CO_2 داخلی، سرعت واکنش‌های چرخه کالوین را کاهش داده، و تنفس نوری را بالأخص در گیاهان C_3 القاء می‌نماید. در نتیجه مقدار زیادی از H_2O_2 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_2^- را به H_2O_2 تبدیل نموده و پس از آن اقدام هماهنگ مجموعه‌ای از پنج آنزیم کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و پروکسی ردوکسین‌ها (Prx) که در نهایت مجموع فعالیت این آنزیم‌ها باعث احیا H_2O_2 می‌گردد. تمام آنزیم‌های مهارکننده ROS که تا به‌حال شناسایی شده‌اند، توسط ژن‌های هسته‌ای به‌نحوی کد می‌شوند که بتوانند به‌طرز کاملاً صحیحی در اجزای زیرسلولی مختلف

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 فعالیّت خود به حفظ سطح حالت 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 دیس‌موتازها (SODs) در خط مقدم دفاعی قرار دارند. آن‌ها به سرعت O_2^- را به H_2O_2 تبدیل می‌کنند. سوپراکسید دیس‌موتازها 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 دیس‌موتاز در بین گونه‌های گیاهی متفاوت است (Alscher et al., 2002). تعادل درون‌سلولی سوپراکسید دیس‌موتازها و آنزیم‌های مختلف مهارکننده H_2O_2 ظاهراً در تعیین سطح حالت پایدار $O2^-$ 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 $HO^{\cdot}$ 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 می‌توانند 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 ازجمله گایاکول، پیروگالول و فنل که برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده می‌شوند واکنش می‌دهد، اما سوبستراهای اختصاصی آن پراکسیدهیدروژن 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 پراکسیدهیدروژن، 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 گلوتاتیون 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 دی آلدئید را دارا بودند. تنش اکسیداتیو موجب افزایش MDA در همه کلون‌ها گردید و بیشترین میزان MDA در گیاهان مشاهده 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 می‌یابد (Sudhakar et al., 2001). در این مطالعه، تنش خشکی سبب افزایش معنی‌دار میزان بتاکاروتن در ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس گردید. عملکرد مسیر بیوسنتز کاروتنوییدها به شدت متاثر از تنش‌های محیطی می‌باشد. علاوه بر نقش کاروتنوییدها 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 متنابهی 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- بیس‌فسفات کربوکسیلاز/ اکسیژناز (Cornic et al., 1992) یا بازداری مستقیم آنزیم‌های فتوسنتزی (Haupt-Herting and Fock, 2000) یا ساخت ATP (Nogués and Baker, 2000) می‌گردد.

نتیجه‌گیری نهایی

بر طبق نتایج بدست آمده، بهترین کلون های چای از لحاظ کلیه صفات مورد مطالعه (فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی) 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 ۲٦٦ 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.

تشکر و قدردانی

از صندوق حمـایت از پژوهشگـــران و فنـــاوران کشور برای تأمین مالی ایـن پـژوهش از محـل طـرح پژوهشی به شماره ۹٤۸۰۲۷۰۵ سپاسگزاریم.

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 H2O2-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 O2.−/H2O2 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., Schülein, 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.