

## اثر تغییرات فصلی بر برخی فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه صنوبر (*Populus deltoides* Marsh.)

مژگان فرزামী سپهر<sup>۱\*</sup>، محبوبه محمدی<sup>۲</sup> و مه‌لقا قربانلی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه

<sup>۳</sup> استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۴

### چکیده

در این مطالعه به منظور بررسی اثر تغییرات فصلی بر برخی فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی صنوبر در منطقه لنگرود، نمونه‌های برگ و ریشه این گیاه در سه فصل بهار، تابستان و پاییز سال ۱۳۸۹ با چهار بار تکرار جمع‌آوری شدند. نتایج نشان داد در برگ‌ها و در فصل تابستان، همزمان با افزایش دما و خشکی هوا، میزان کلروفیل a و b، قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز افزایش معنی‌داری نسبت به فصل بهار نشان داد در حالیکه در مورد فعالیت آنزیم پراکسیداز، این افزایش معنی‌دار نبود. در ریشه میزان قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در فصل تابستان نسبت به بهار، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد اما فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز افزایش معنی‌داری یافت. میزان پرولین برگ و ریشه در فصل بهار که دارای پایین‌ترین دما بود نسبت به دو فصل دیگر افزایش معنی‌داری داشت. به همین ترتیب میزان آهن، مس و منگنز، هم در برگ و هم در ریشه در فصل بهار نسبت به فصول دیگر افزایش معنی‌داری نشان داد. میزان تجمع آهن و منگنز در ریشه‌ها بیشتر از برگ‌ها و میزان تجمع مس در دو فصل بهار و تابستان در برگ‌ها بیشتر از ریشه‌ها بود.

**واژگان کلیدی:** آنتی‌اکسیدان‌ها، تغییرات فصلی، صنوبر، عناصر معدنی، کلروفیل‌ها

### مقدمه

سیکل فصلی رشد درختان درگیر می‌شوند (Forshey,

1989).

رشد گیاه، قابلیت تولید و پراکندگی آنها به شدت توسط تنش‌های محیطی مانند یخ زدگی، خشکی، شوری و بطور کلی هر چیزی که تعادل آب را در سلول به هم بزند، محدود می‌شود. گیاهان راهکارهای سازشی متفاوتی را برای کم کردن اثرات مضر چنین تنش‌هایی از خود بروز می‌دهند (Palva et al, 2002). از جمله این راهکارها ذخیره کردن مواد تنظیم‌کننده

سیکل فصلی دما، طول روز، بارندگی، رطوبت و باد می‌تواند روی فرایندهای فیزیولوژیکی و تولید مثلی گیاهان اثر گذارد و آنها را کنترل کند. فاکتورهای محیطی از قبیل دما، نور، دسترسی به آب و مواد مغذی و همچنین فاکتورهای داخلی از قبیل سطح کربوهیدرات‌ها، هورمون‌ها و فعالیت آنزیم‌ها در

\*نویسنده مسئول: farzamisepehr@iau-saveh.ac.ir

اسمزی مانند قندها می‌باشند (عباس‌زاده و همکاران، ۱۳۸۶). کربوهیدرات‌ها تولیدات مستقیم فرایند فتوسنتز هستند که به‌عنوان یک منبع انرژی عمل کرده و کربن مورد نیاز برای تولید بافت‌ها یا مواد جدید را فراهم می‌کنند. اثر تغییرات فصلی در غلظت کربوهیدرات‌های تعدادی از گیاهان گزارش شده است (Sivaci, 2006). Stewart و Bannister (۱۹۷۳) نشان دادند که محتویات کربوهیدرات‌ها در گونه‌های *Vaccinium* به‌طور فصلی تغییر پیدا می‌کنند. به‌طوری‌که در دو گونه *Vaccinium myrtillus* و *Vaccinium vitis-idaea*، محتویات کربوهیدرات در اوایل بهار شروع به افزایش و در زمستان شروع به کاهش نمود.

ماکزیمم محتوی کل کربوهیدرات‌ها در فصل پاییز، همزمان با ریزش برگ‌ها و کاهش آنها در فصل بهار، همزمان با شدت گرفتن تنفس، نتیجه‌ای بود که Kramer و Kozlowski (۱۹۷۹) از بررسی اثر تغییرات فصلی بر کربوهیدرات‌ها در تعدادی از درختان برگ ریز منطقه معتدله به دست آوردند. همچنین کاهش محتویات کل کربوهیدرات‌ها در فصل بهار نتیجه‌ای بود که Sivaci (۲۰۰۶) طی تحقیق خود بر روی ساقه‌های سه نوع سیب گزارش کرد. او عقیده داشت که علت کاهش، باز شدن جوانه‌ها و تشکیل برگ‌های جدید می‌باشد که در این صورت کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای به کربوهیدرات‌های ساختاری تبدیل می‌شوند.

قرار گرفتن گیاهان در معرض شرایط ناسازگار باعث ایجاد تنش اکسیداتیو شده که این تنش بخاطر تولید گونه‌های اکسیژن فعال، روی رشد اثر می‌گذارد (Mittler et al., 2004). گیاهان از طریق فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی که شامل سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، پلی فنل اکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز می‌باشد با این تنش مقابله می‌کنند (Prochazkova et al., 2001). میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز درختان پسته در فصل زمستان یعنی زمانی که درختان به علت تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط سرما به خواب می‌روند افزایش یافت که این افزایش موجب خو گرفتن آنها به سرما و مقاومت آنها گشت. همچنین میزان فعالیت این آنزیم‌ها در اواخر زمستان و اوایل بهار کاهش یافت (Pakkish et al., 2009).

پرولین از جمله ترکیباتی است که در شرایط تنش‌های زیستی و غیر زیستی مثلاً دمای پایین، در گیاه تجمع می‌یابد و باعث حفظ فشار اسمزی و همچنین تثبیت ساختار پروتئین و غشاء، تحت استرس می‌شود. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو مانند کاتالاز و پراکسیداز و همچنین محتوی پرولین در برگ‌های گیاهان چوبی همیشه سبز *Sabina*، در نتیجه کاهش دما در زمستان، افزایش یافت که این افزایش لازمه خو گرفتن آنها با سرمای زمستان بود (Chen et al., 2006).

تغییر در مقدار پیگمان‌های فتوسنتزی، ارتباط نزدیکی با تولید زی‌توده دارد (Jaleel et al., 2009). محتوی کلروفیل در چهار گونه گیاهی در منطقه زیارت پاکستان، طی ماه‌های خشک سال کاهش نشان داد که علت آن ممکن است به دلیل بالا بودن نسبت تجزیه کلروفیل در مقایسه نسبت سنتز آن تحت شرایط خشکی باشد (Aziz, 2007).

فلزات سنگین به عنوان فلزاتی با خواص فلزی (قابلیت چکش خواری، قابلیت هدایت و پایداری) عدد اتمی بزرگتر از ۲۰ و وزن‌های بالاتر از 5 gr.cm<sup>3</sup> تعریف شده‌اند. تعدادی از آنها (Fe, Mn, Mo, Ni, Zn, Cu, Co) ریز مغذی‌هایی هستند که برای رشد طبیعی ضروری بوده و در واکنش‌های ردوکسی، انتقال الکترون و دیگر فرایندهای مهم متابولیکی شرکت می‌کنند. تعدادی دیگر (Hg, Cr, Cd, Pb,...) فلزات غیر ضروری در نظر گرفته می‌شوند و به‌طور

گیلان به‌شمار می‌آیند. در این مطالعه برای پی‌بردن به مکانیسم فیزیولوژیکی بردباری گیاه صنوبر تحت تغییرات دمایی و آب و هوایی در فصول مختلف، برخی از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه صنوبر دلتوئیدس در منطقه لنگرود مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

نمونه‌های برگ و ریشه صنوبر (*Populus deltoides*) جهت انجام تحقیق از زمینی به وسعت ۲۰۰۰ متر مربع واقع در منطقه قاضی محله شهر سلمان (شهر سلمان واقع در بخش مرکزی شهرستان لنگرود، در طول جغرافیایی ۳۷°/۱۷' شمالی و عرض جغرافیایی ۵۰°/۲۲' شرقی) که دارای درختان دو ساله صنوبر دلتوئیدس بودند در سه فصل بهار (اردیبهشت)، تابستان (مرداد) و پاییز (اواخر مهرماه و قبل از زرد شدن برگ‌ها) در سال ۱۳۸۹ و بصورت تصادفی از چهار نقطه باغ جمع‌آوری شدند. بعد از شستشوی نمونه‌ها، جهت انجام سنجش‌های آزمایشگاهی، بخشی با قرار دادن داخل آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند و بخشی دیگر تا زمان سنجش در دمای ۱۹- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. خاک منطقه هم، در هر فصل، از چهار نقطه باغ که محل جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی بود و از عمق ۲۰ سانتی‌متری سطح زمین جمع‌آوری و جهت انجام آزمایش‌های مربوطه به آزمایشگاه خاک‌شناسی انتقال یافتند (جدول ۱). جدول ۲ ویژگی آب و هوایی منطقه مورد مطالعه را در فصول مختلف نشان می‌دهد.

عمده سمیت بالاتری برای گیاهان دارند (Sebastiani et al., 2004). ورود این آلاینده‌ها به محیط از طریق فعالیت‌های شهری، عملیات کشاورزی و صنعتی است (Clemens, 2001). فلزات سنگین مانع از فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر تنفس، فتوسنتز، رشد طولی سلول، ارتباط آبی گیاه، متابولیسم نیتروژن و تغذیه معدنی می‌شوند (Zornoza et al., 2002).

Zalesny و همکاران (۲۰۰۶) پیشنهاد کردند که صنوبرها بخاطر استفاده زیاد از آب، رشد سریع و سیستم ریشه‌ای عمیق برای گیاه پالایی ایده آل می‌باشند جذب فلزات سنگین و ذخیره آنها توسط گیاهان به طبیعت و ویژگی فلز، ویژگی خاک و ویژگی خود گیاه بستگی دارد (Baragagli, 1998). تجمع فلزات ممکن است به تغییرات فصلی نیز وابسته باشد. Martin و Couphrey (۱۹۸۲) بالاترین میزان فلزات سنگین را در طول فصل بهار و پایین‌ترین میزان آنرا در طول فصل زمستان مشاهده کردند در حالی که Stennes و Brekken (۲۰۰۴)، بالاترین محتوی فلزاتی مانند Zn, Sn, Pb, Ni, Cu, Cd را در طول پاییز و پایین‌ترین آنها را در فصل بهار مشاهده نمودند.

صنوبرها، از پهن برگان خزان کننده دو پایه‌ای هستند که به خانواده بزرگی بنام بیدیان (*Salicaceae*) تعلق دارند. دارای ۲۵-۳۵ گونه بوده که اکثراً در نیمکره شمالی یافت می‌شوند. *Populus deltoides* Marsh. یکی از گونه‌های این جنس است که رویشگاه اصلی آن حواشی رودخانه می‌سی‌سی‌پی و جلگه‌های آبرفتی می‌باشد که از نظر خصوصیات آبی و خاکی شبیه به حواشی رودخانه سفید رود گیلان است. به همین دلیل یکی از کلن‌های سازگار در استان

جدول ۱: مشخصات خاک منطقه در سه فصل

کشت	Ec Ds/m	pH	T.N.V. %	O.C. %	TotalN %	P(ava) p.p.m	K(ava) p.p.m	Clay %	Slit %	Sand %	بافت	Fe p.p.m	Cu p.p.m	Mn p.p.m
نوع آزمایش	هدایت الکتریکی	اسیدیته	مواد خنثی شونده	کربنی آلی	ازت کل	فسفر قابل جذب	پتاسیم قابل جذب	رس	سیلت	ماسه	-	آهن	مس	منگنز
روش آزمایش	عصاره اشباع گل اشباع	گل اشباع	تیتراسیون	والکی پلک	کجدال	اولسون	فلیم فتومتر	هیدرومتر	هیدرومتر	هیدرومتر	هیدرومتر	اتمیک	اتمیک	اتمیک
بهار	۱/۲	۷	۹/۹	۱/۲	۰/۱	۲۵/۴	۳۸۴	۱۷	۲۵	۵۸	لوم ماسه	۳۰/۱	۱/۸۲	۴/۵۴
تابستان	۰/۷	۷/۲	۴/۷	۰/۷۶	۰/۰۷	۲۳/۳	۳۶۲	۱۴	۲۴	۶۲	لوم ماسه	۳۶/۹	۲/۰۶	۳/۸۴
پاییز	۰/۷۷	۷/۱	۸/۵	۰/۸۸	۰/۰۸	۵۴/۵	۳۷۱	۱۵	۲۵	۶۰	لوم ماسه	۳۳/۲	۱/۸	۴/۲۲

جدول ۲: میزان تبخیر، بارندگی و سرعت باد در منطقه مورد مطالعه در سال آبی ۱۳۸۸-۸۹

ماه	مجموع تبخیر (میلی متر)	مجموع باران (میلی متر)	مجموع سرعت باد (کیلومتر)	میانگین دما
مهر	۲۷/۳	۲۲۰	۲۲۲	۱۸/۸
آبان	۱۱	۹۴/۵	۳۰۱	۱۵
آذر	۹/۲	۱۰۴/۵	۳۳۰	۸/۹
دی	۱۱	۲۷/۵	۳۳۴	۱۰
بهمن	۹/۶	۹۴/۵	۴۸۱	۷/۱
اسفند	۱۴/۲	۱۰۱	۶۶۷	۹/۸
فروردین	۳۴/۱	۷۳	۷۰۰	۱۱/۹
اردیبهشت	۴۰/۹	۸۴/۵	۵۲۶	۱۶/۶
خرداد	۱۱۵/۳	۰	۴۷۶	۲۴/۸
تیر	۱۳۲/۵	۷۱	۵۳۵	۲۷/۸
مرداد	۱۴۸/۷	۲۱	۵۶۱	۲۸/۲
شهریور	۶۹/۷	۶۳	۳۹۵	۲۴/۳
سالیانه	۶۲۳/۵	۹۹۰/۵	۵۵۲۷	۱۶/۹

اندازه‌گیری مقدار کلروفیل: کلروفیل‌های a و b با استون ۸۰ درصد استخراج شده و با استفاده از روش Arnon (۱۹۴۹) اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری مقدار پرولین: استخراج پرولین از نمونه‌های مورد آزمون و سنجش آن، با روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل JENWAY 6405 انجام شد سپس محلول‌هایی به غلظت ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر پرولین آماده و جذب آنها توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. منحنی استاندارد پرولین بر اساس جذب‌های بدست آمده رسم گردید و با استفاده از

معادله خط بدست آمد که با استفاده از آن، مقدار پرولین در نمونه‌های مجهول، محاسبه شد.

اندازه‌گیری مقدار فندهای محلول: بر اساس روش Fulai و همکاران (۲۰۰۱) انجام گرفت. ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاه با یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه تحت حرارت جوش قرار گرفت. سپس توسط سانتریفیوژ در rpm ۲۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه رسوب آن جدا شد. این رسوب دو مرتبه توسط اتانول استخراج گردید. به مایع رویی ۲ میلی‌لیتر دی کلرومتان اضافه و پس از مخلوط شدن اجازه داده شد دو فاز به آرامی و طی

و بلافاصله ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی بدان افزوده شد و منحنی تغییرات جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (حدادچی، ۱۳۶۵). تغییرات جذب با منحنی استاندارد مقایسه و فعالیت آنزیم ارزیابی شد و بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان گردید.

**سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز:** پس از آماده سازی عصاره پروتئینی به منظور سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، از معرف‌های زیر استفاده شد:

۱/۵ میلی لیتر بافر تریس (۰/۲ مولار، pH ۷/۶) با ۰/۴ میلی لیتر پیروگالل (۰/۲ مولار) در حمام یخ با یکدیگر مخلوط و بلافاصله ۰/۰۵ میلی لیتر عصاره آنزیمی بدان افزوده شد. منحنی تغییرات در ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Mishra et al., 1976). تغییرات جذب با منحنی استاندارد مقایسه و فعالیت آنزیم ارزیابی شد و بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بیان گردید.

**اندازه‌گیری مقدار آهن، مس و منگنز:** یک گرم نمونه خشک شده ریشه یا برگ (هر کدام بصورت جداگانه) بعد از توزین، داخل بوته چینی ریخته شد و برای تهیه خاکستر به مدت ۵ ساعت داخل کوره با دمای ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سپری شدن این مدت زمان، بوته‌ها از کوره خارج و خنک شدند. سپس پودر خاکستر در ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال حل گردید و توسط کاغذ صافی، صاف شد. محلول زیر کاغذ صافی به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد و برای اندازه‌گیری آهن، مس و منگنز توسط دستگاه جذب اتمی Biotech مدل Phoenix 986 استفاده شد.

نتایج آزمایشات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (One way Anova) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. اختلاف میانگین‌ها نیز با آزمون LSD در سطح

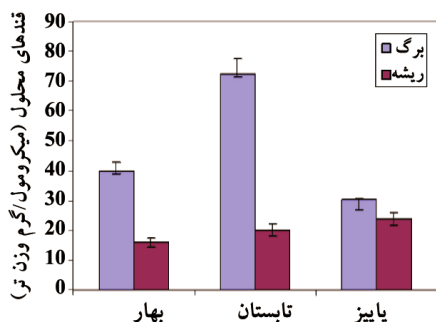
یک شبانه روز از هم جدا شوند. بر روی فاز دی کلرومتان، ۲ میلی لیتر آب اضافه گردید فاز الکل آبی جدا و توسط مبرد خشک شد سپس یک میلی لیتر آب اضافه و ماده خشک شده حل گردید و بر کروماتوگرافی تعویض یونی QAE-۲۵ سفادکس مستقر شد. پس از تعادل، ستون با ۵۰ میلی لیتر فورمات سدیم ۰/۰۵ مولار شستشو گردید. محلول استخراجی از ستون، خشک شد و در ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید و به ستون Hyderrsil با ابعاد ۳۰ سانتی متر طول و ۷/۸ میلی متر قطر تزریق گردید و توسط دستگاه HPLC (ساخت کارخانه Knauer شامل پمپ K1001، دتکتور UV مدل K2501 و اتوسمپلر Marathon) با محلول اسید سولفوریک ۰/۰۰۵ مولار و سرعت ۰/۶ میلی لیتر بر دقیقه شستشو گردید. پیک قندی محلول، به استناد پیک استاندارد آن قندها، مشخص و تعیین غلظت شدند.

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها:** استخراج آنزیم از بافت برگ و ریشه انجام شد (Sudhakar et al., 2001) و نمونه‌های همگن شده به طریق زیر مورد مطالعه قرار گرفتند:

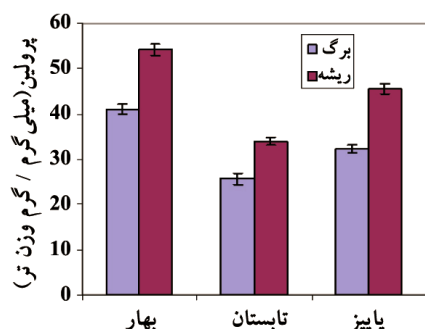
**سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز:** بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با بررسی کاهش مقدار  $H_2O_2$  در ۲۴۰ نانومتر برای یک دقیقه و با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۴) انجام شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی معادل  $39/4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  محاسبه و بر حسب یک واحد (میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه) به ازای میلی گرم پروتئین بیان گردید.

**سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز:** پس از آماده سازی عصاره پروتئینی، برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از معرف‌های زیر استفاده شد:

۲ میلی لیتر بافر استات (۰/۲ مولار، pH ۴/۸) با ۰/۲ میلی لیتر آب اکسیژنه (۳ v/v) و ۰/۲ میلی لیتر بنزیدین (۰/۰۴ مولار محلول) در حمام یخ با یکدیگر مخلوط



شکل ۲: میزان قندهای محلول در برگ و ریشه در فصل‌های مختلف



شکل ۳: میزان پرولین در برگ و ریشه در فصل‌های مختلف

میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز در این مطالعه، تغییرات فصلی را نشان داد بطوری‌که در مورد آنزیم پراکسیداز و کاتالاز بالاترین میزان فعالیت آنها در برگ‌ها، در فصل تابستان و پایین‌ترین میزان فعالیت در فصل بهار مشاهده شد (شکل‌های ۵ و ۶) که اختلاف بین بالاترین و پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، معنی‌دار بود اما میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در فصول متفاوت، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در ریشه، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در فصول مختلف، تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۶). میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز هم، در فصل بهار و تابستان اختلاف معنی‌داری را نشان نداد اما میزان فعالیت این آنزیم در فصل پاییز کاهش معنی‌داری یافت. میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در برگ‌ها از فصل بهار به پاییز افزایش معنی‌داری یافت. در

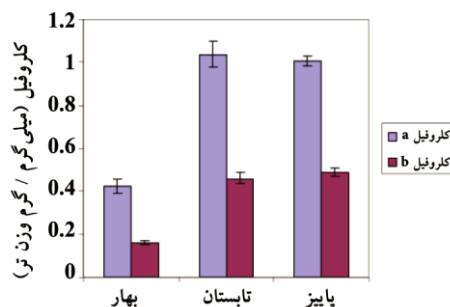
$P < 0/05$  مورد مقایسه قرار گرفتند و شکل‌های مربوط به کمک نرم‌افزار Excel رسم گردیدند.

### نتایج

بیشترین میزان کلروفیل a در فصل تابستان و کمترین میزان در فصل بهار مشاهده شد (شکل ۱) که در سطح احتمال  $P < 0/05$  این اختلاف معنی‌دار بود اما بالاترین میزان کلروفیل b در فصل پاییز مشاهده شد (شکل ۱) که نسبت به فصل تابستان، این اختلاف در سطح  $P < 0/05$  فاقد معنی بود، کمترین میزان آن هم مانند کلروفیل a در فصل بهار مشاهده شد که نسبت به فصول تابستان و پاییز این اختلاف معنی‌دار بود.

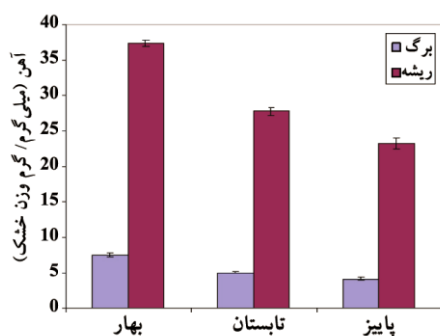
بیشترین میزان قندهای محلول برگ متعلق به فصل تابستان بود (شکل ۲) که در سطح احتمال  $P < 0/05$  اختلاف بین فصل تابستان با فصول بهار و پاییز معنی‌دار بود. در ریشه بالاترین میزان قند در فصل پاییز و پایین‌ترین میزان آن در فصل بهار مشاهده شد (شکل ۲). بطوری‌که این اختلاف معنی‌دار بود. نتایج همچنین بیان‌کننده بالا بودن میزان کربوهیدرات‌های محلول در برگ‌ها نسبت به ریشه‌ها بود.

بیشترین میزان پرولین هم در برگ و هم در ریشه، در فصل بهار و کمترین میزان آن، در فصل تابستان مشاهده شد (شکل ۳) که در سطح احتمال  $P < 0/05$ ، اختلاف بین تمام فصول معنی‌دار بود همچنین میزان پرولین در ریشه و در هر سه فصل نسبت به میزان پرولین در برگ افزایش نشان داد.

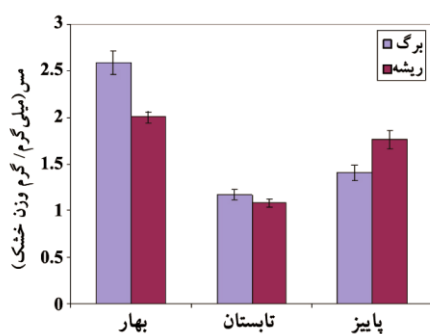


شکل ۱: میزان کلروفیل a و b در فصل‌های مختلف

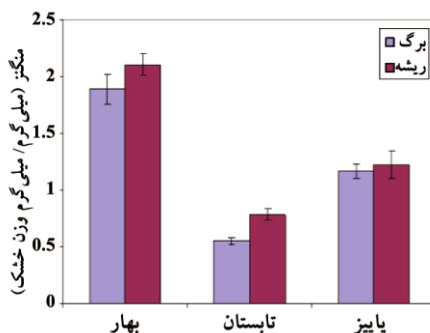
میزان تجمع مس در دو فصل بهار و تابستان در برگ‌ها بیشتر از ریشه‌ها بود (شکل ۸).



شکل ۷: میزان آهن در برگ و ریشه در فصول مختلف



شکل ۸: میزان مس در برگ و ریشه در فصول مختلف

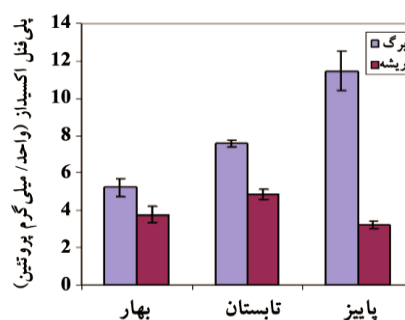


شکل ۹: میزان منگنز در برگ و ریشه در فصول مختلف

#### بحث

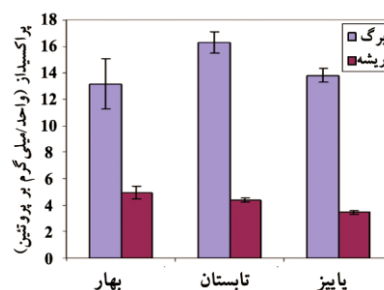
میزان کلروفیل در گیاهان یکی از فاکتورهای مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی است (Huang and Jiang, 2001). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان کلروفیل با تغییر فصل تغییر می‌یابد به طوری که در مورد کلروفیل a بیشترین میزان آن در فصل تابستان (مرداد) و کمترین میزان در فصل بهار (اردیبهشت) مشاهده شد. با توجه به جدول ۲، بین

ریشه بالاترین میزان فعالیت این آنزیم در فصل تابستان مشاهده شد (شکل ۴).



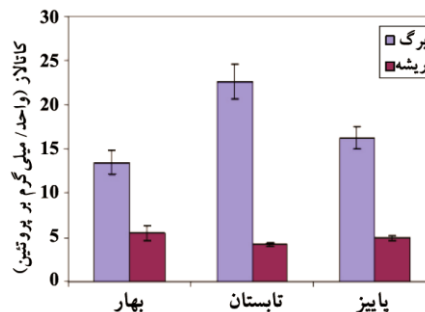
شکل ۴: میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در برگ و ریشه در فصول مختلف

ریشه در فصول مختلف



شکل ۵: میزان فعالیت آنزیم پرکسیداز در برگ و ریشه در فصول مختلف

فصول مختلف



شکل ۶: میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ و ریشه در فصول مختلف

فصول مختلف

میزان آهن، مس و منگنز، هم در برگ و هم در ریشه در فصل بهار افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل‌های ۷، ۸ و ۹). در مورد آهن پایین‌ترین میزان آن هم در برگ و هم در ریشه متعلق به فصل پاییز و در مورد مس و منگنز پایین‌ترین میزان آن هم در برگ و هم در ریشه متعلق به فصل تابستان بود. میزان تجمع آهن و منگنز در ریشه‌ها بیشتر از برگ‌ها و

فستوز از جمله میزان کربوهیدرات‌ها را تغییر می‌دهد. کربوهیدرات‌های مرکب به کربوهیدرات‌های ساده تجزیه شده و بنابراین در اثر خشکی بر میزان قندهای محلول افزوده می‌شود (باهرنیک و همکاران، ۱۳۸۶). قندهای محلول نقش مهمی در تنظیم اسمزی سلولها طی شرایطی مانند خشکی و همچنین دمای پایین به عهده دارند (Joshi et al., 2007).

نتیجه حاصل از این مطالعه در مورد افزایش میزان قندهای محلول برگ در فصل خشک تابستان، با تحقیق Xu و همکاران (۲۰۰۶) بر روی گیاه *Lonicera japonica* که نشان دادند محتوی قندهای محلول تحت تاثیر خشکی افزایش می‌یابد و همچنین با تحقیق Sircelj و همکاران (۲۰۰۵) که گزارش کردند میزان تجمع قندهای محلول در دو رقم سیب تحت خشکی متوسط افزایش می‌یابد، مطابقت داشت. Souza و همکاران (۲۰۱۰) بالاترین میزان کربوهیدرات‌های محلول را در یک گونه چمن در برزیل، در ماه جولای (تابستان) مشاهده کردند که با نتیجه بدست آمده از این مطالعه سازگاری داشت اما نتیجه مطالعه حاضر با نتیجه‌ای که Kramer و Kozlowski (۱۹۷۹) از بررسی تغییرات فصلی کربوهیدرات‌ها بر روی تعدادی از درختان برگ ریز منطقه معتدله گرفتند مبنی بر اینکه محتوی کل کربوهیدرات‌های ساقه‌ها و شاخه‌ها در فصل پاییز یعنی همزمان با ریزش برگ‌ها در حد ماکزیمم بود مطابقت نداشت ولی کاهش میزان کربوهیدرات‌های محلول در فصل بهار با نتیجه آنها و همچنین با تحقیق Sivaci (۲۰۰۶) بر روی ساقه‌های سه نوع سیب، همسویی داشت. Kramer و Kozlowski (۱۹۷۹) کاهش کربوهیدرات‌ها را در فصل بهار مربوط به شدت گرفتن تنفس و مصرف شدن کربوهیدرات‌ها برای رشد بافت‌های جدید می‌دانستند. همچنین Sivaci (۲۰۰۶) کاهش قندهای محلول در بهار را به

ماه‌های اردیبهشت، مرداد و مهر که زمان جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی بود، مرداد دارای حداکثر دما و اردیبهشت دارای حداقل دما می‌باشد یعنی با افزایش دما از فصل بهار به تابستان، میزان کلروفیل a در برگ‌ها افزایش یافت و بعد از آن دوباره با شروع کاهش دما در پاییز (مهر) میزان کلروفیل a کاهش یافت اما این کاهش به اندازه‌ای بود که هیچ تفاوت معنی‌داری بین دو فصل تابستان و پاییز مشاهده نشد. بیشینه میزان کلروفیل a در تابستان با نتیجه Kaleem و همکاران (۲۰۰۹) در مورد گل آفتابگردان که نشان دادند محتوی کلروفیل با افزایش دما به یک حد ماکزیمم می‌رسد و همچنین با تحقیق Kingston و همکاران (۱۹۹۹) بر روی ذرت که نشان دادند برگ‌های گیاهان رشد یافته در دمای پایین‌تر میزان کلروفیل پایین‌تری نسبت به گیاهان رشد یافته در دمای بالاتر دارند مطابقت داشت. میزان کلروفیل a و b در اردیبهشت با حداقل دما، در حد مینیمم بود.

در زمان بروز سرما انتقال الکترون از فتوسیستم II به فتوسیستم I و گیرنده اصلی الکترون ( $\text{NADP}^+$ ) مختل شده و الکترون به مولکول اکسیژن منتقل می‌شود. در این زمان بالا بودن میزان کلروفیل باعث افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شود که اثرات مخربی بر روی کلروپلاست و سلول دارد. یکی از راهکارهای گیاهان برای کاهش تولید ROS، افزایش فعالیت آنزیمی بنام کلروفیلاز است که باعث تجزیه کلروفیل می‌شود در نتیجه میزان کلروفیل کاهش می‌یابد (Adeniyi et al., 2004).

میزان قندهای محلول نیز با تغییر فصل تغییر یافت بطوری‌که در برگ‌ها بالاترین میزان قند، در فصل تابستان که در منطقه مورد مطالعه دارای حداکثر دما و حداقل بارندگی بود (فصل خشک) دیده شد. خشکی بر فرایند فتوسنتز در گیاهان تاثیر مهمی گذاشته، انتقال سریع الکترون‌ها را کاهش داده و تشکیل مواد اولیه



Ashraf و Foolad و همچنین Saradhi (۱۹۹۱) و همچنین (۲۰۰۷) که عقیده داشتند تحت تنش سرما، سنتز پرولین به مقدار زیادی افزایش می‌یابد مطابقت داشت. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز در این مطالعه، با تغییر فصول، تغییر یافت. همانطور که اشاره شد فصل تابستان در منطقه مورد مطالعه دارای حداکثر دما و حداقل بارندگی بود. با توجه به این موضوع، نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در فصل تابستان یعنی هم‌زمان با وجود آمدن شرایط خشکی، افزایش می‌یابد. در شرایط خشکی یعنی زمانی که حداکثر تشعشع وجود دارد، بسته شدن روزنه‌ها در واکنش به تنش آب یا درجه حرارت، منجر به کاهش تثبیت دی‌اکسید کربن خواهد شد در حالی که واکنش نوری و انتقال الکترون در مقادیر طبیعی صورت خواهد گرفت. تحت چنین شرایطی، مقدار محدودی NADP برای پذیرش الکترون وجود خواهد داشت بنابراین اکسیژن می‌تواند به‌عنوان یک گیرنده الکترون جایگزین عمل نماید (Egneus et al., 1975). این امر منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌گردد (Bowler et al., 1992). که این گونه‌های فعال اکسیژنی به بسیاری از ترکیبات سلولی نظیر چربی‌ها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدها نوکلئیک صدمه می‌زنند (Halliwell, 1982). Prochazkova و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که گیاهان جهت کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ایجاد شده توسط تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های خود مانند کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز را افزایش می‌دهند. Sairam و Srivastave (۲۰۰۲) نشان دادند که یک ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان فتوسنتز کننده وجود دارد. Sharma و Dubey (۲۰۰۵) گزارش کردند که با اعمال تنش ملایم خشکی

باز شدن جوانه‌ها و تشکیل برگ‌های جدید نسبت داد. در ریشه، بالاترین میزان کربوهیدرات‌های محلول در فصل پاییز و پایین‌ترین در فصل بهار مشاهده شد. همچنین میزان قندهای محلول ریشه نسبت به برگ در فصل تابستان در مقایسه با دو فصل دیگر بیشتر کاهش نشان داد. در شرایط خشکی، سیستم ریشه، لایه‌های سطحی خاک را خشک می‌نماید (۹۹ درصد آب قابل استحصال در ۳۰ سانتی‌متری سطح خاک در تابستان به وسیله ریشه‌ها جذب می‌شود) در نتیجه جذب آب به تدریج از قسمت‌های پایین‌تر خاک صورت می‌گیرد. در این شرایط ریشه‌های نزدیک سطح خاک می‌میرند (میرزایی و همکاران، ۱۳۸۴).

در مورد پرولین، نتایج نشان داد که فصول مختلف از نظر میزان پرولین هم در برگ و هم در ریشه، با هم اختلاف معنی‌دار داشتند به‌طوری‌که بالاترین میزان پرولین در فصل بهار (اردیبهشت) که نسبت به مرداد و مهر، دارای حداقل دما بود و همچنین پایین‌ترین میزان پرولین در فصل تابستان (مردادماه) که دارای حداکثر دما بود مشاهده شد. پرولین از جمله ترکیباتی است که در شرایط تنش‌های غیر زیستی مثلاً دمای پایین در گیاه تجمع می‌یابد. در واقع گیاهان در مقابل تنش‌های مختلف مکانیسم‌های دفاعی مختلفی دارند که تحت تنشی مانند سرما، باعث تجمع بالای ترکیبات محلول‌های سازگار می‌شوند. این ترکیبات بدون تغییر در pH فیزیولوژی و غیر سمی در غلظت بالا هستند که باعث حفظ فشار اسمزی و همچنین باعث تثبیت ساختار پروتئین و غشاء تحت تنش می‌شوند و نقش مهمی در سازگاری سلول به تنش‌های مختلف دارند. پرولین یکی از مهمترین این ترکیبات می‌باشد که تحت استرس سرما سنتز آن افزایش می‌یابد (Ashraf and Foolad, 2007). نتیجه بدست آمده از این بررسی نشان‌دهنده افزایش پرولین هم‌زمان با کاهش دما (تنش سرما) بود که با نتایج حاصل از تحقیقات Alia و

مبنی بر اینکه افزایش مس موجب بازدارندگی فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود همسویی داشت. بیشترین میزان قندهای محلول و کلروفیل‌ها در فصول گرم با حداکثر رشد در برگ گیاه صنوبر دیده شد. این در حالیکه با گذار از فصل گرم به فصل سرد میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانیو در گیاه افزایش یافت و اندام هوایی در مقایسه با ریشه از میزان بالاتری از فعالیت آنتی‌اکسیدانیوی برخوردار بود.

### نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد میزان رنگیزه‌های کلروفیلی، قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز در برگ درخت صنوبر در فصل تابستان افزایش معنی‌داری نسبت به فصل بهار داشت. از سوی دیگر در ریشه میزان قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در فصل تابستان نسبت به بهار، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد اما فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز افزایش معنی‌داری یافت. میزان پرولین، آهن، مس و منگنز برگ و ریشه نیز در فصل بهار که دارای پایین‌ترین دما بود نسبت به دو فصل دیگر افزایش معنی‌داری داشت.

### منابع

بهرنیک، ز، میرزا، م، عباس‌زاده، ب. و نادری حاجی باقر کندی، م. (۱۳۸۶). تایید تنش خشکی بر برخی فرایندهای متابولیسمی گیاه *Parthenium argentatum* Gray. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۳ شماره ۳. صفحات ۳۲۲-۳۱۵.

حدادچی، غ. (۱۳۶۵). بیوشیمی و فیزیولوژی گیاهی عملی، انتشارات جهاد دانشگاهی منابع طبیعی دانشگاه مازندران. صفحه ۲۸۶.

عباس‌زاده، ب.، شریفی عاشورآبادی، الف.، لباسچی، م.ح.، نادری حاجی باقر کندی، م. و مقدمی، ف. (۱۳۸۶). اثر خشکی بر میزان پرولین، قندهای محلول،

بر گیاه برنج، فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش یافت. همچنین Zhang و همکاران (۲۰۰۶) گزارش مشابهی منتشر کردند که اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های ضد اکسیداتیو مانند کاتالاز و پراکسیداز در گیاه گندم منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های مذکور شده است. Egert و Tenini (۲۰۰۲) هم مشاهده کردند که در پیاز کوهی (*Allium schoenoprasum*) ۹ روز پس از قطع آبیاری، فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش یافت و نتایج ذکر شده با مطالعه حاضر که نشان داد میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در فصل خشک تابستان افزایش می‌یابد مطابقت داشت، اما با نتایج بدست آمده از تحقیقات Chen و همکاران (۲۰۰۶) مبنی بر اینکه فعالیت و محتوی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نتیجه کاهش دما افزایش می‌یابد مطابقت نداشت.

نتیجه بدست آمده در مورد میزان تجمع عناصر موجود در خاک، در برگ‌ها و ریشه‌های صنوبر نشان داد که میزان عناصر آهن، مس و منگنز با تغییرات فصل تغییر می‌یابند به طوری که بالاترین میزان هر سه عنصر، هم در برگ و هم در ریشه، در فصل بهار مشاهده شد که با تحقیق Couphrey و Martin (۱۹۸۲) که نشان دادند بالاترین میزان فلزات سنگین در طول فصل بهار مشاهده می‌شوند مطابقت داشت. مس عنصری است که می‌تواند تغییرات زیادی در سلول‌های گیاهی ایجاد کند. از جمله این تغییرات، تاثیر آن بر سنتز کلروفیل و انتقال الکترون و همچنین اثر سمی آن بر واکنش‌های اولیه فتوسنتز می‌باشد (Yruela, 2005). نتیجه بدست آمده از این تحقیق در مورد کلروفیل (پایین‌بودن میزان کلروفیل در فصل بهار) و زمانی که میزان عنصر مس در گیاه در حد ماکزیمم بود با نظر Yruela (۲۰۰۵) مطابقت داشت. همچنین پایین بودن میزان فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در فصل بهار، همزمان با ماکزیمم بودن میزان تجمع مس، با نتیجه تحقیقات Chaoui و Ferjani (۲۰۰۵)

- Chaoui, A. and Ferjani, E.E. (2005).** Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Plant Biology and Pathology*. 328: 23-31.
- Chen, Y., Zhany, M., Chen, T., Zhang, Y. and An, L. (2006).** The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of sabina. *South African Journal of Botany*. 72:272-279.
- Clemens, S. (2001).** Molecular mechanism of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 12(4):475-486.
- Egert, M. and Tevini, M. (2002).** Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chires (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany*. 48:43-49.
- Egneus, H., Heber, H. and Krik, M. (1975).** Reduction of oxygen by the electron chain of chloroplast during assimilation of carbon dioxide. *Biochemical and Biophysics. Acta*. 408:252-268.
- Forshey, C.G. and Elfving, D.C. (1989).** The relationship between vegetative growth and fruiting in apple trees. *Horticultural Reviews*. 11: 229-287.
- Fulai, L., Christain, R.J. and Mathias, N.A. (2001).** Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods early reproductive development. *Field Crops Research*. 86:1-3.
- Halliwell, B. (1982).** The toxic effects of oxygen on plant tissue. In: L.W. oberley (ed.). *Superoxide dismutase*. 1:89-123. CRC press Inc., Boca Raton.USA.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R. and Pannerselvam, R. (2009).** Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agricultural and Biological*. 11:100-105.
- Jiang, Y. and Huang, N. (2001).** Drought and heat stress injury to two cool-season turf grasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science*. 41: 436-442.
- Joshi, S.C., Chandra, S. and Palni, L.M.S. (2007).** Differences in photosynthetic characteristics and accumulation of osmoprotectants in saplings of evergreen کلروفیل و آب نسبی (RWC) بادر نجبویه (*Melissa officinalis* L. گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۳. شماره ۴. صفحات ۵۱۳-۵۰۴.
- میزایی، م.، رضوانی، س.م. و گوهری، ج. (۱۳۸۴). تایید تنش خشکی در مراحل مختلف رشد بر عملکرد و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی چغندر قند. چغندر قند. جلد ۲۳. شماره ۱. صفحات ۱-۱۴.
- Aebi, H. (1984).** Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*. 105:121-126.
- Adeniyi, O.T., Akparobi, S.O. and Ekanayake, I.J. (2004).** Field studies on chlorophyll a fluorescence for low temperature tolerance testing of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Food Agriculture and Environment*. 2(1):166-170.
- Alia, P. and Saradhi, P. (1991).** Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*. 138:554-558.
- Arnon, O.I. (1949).** Copper enzyme in isolated chloroplast, polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*. 24:1-15
- Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007).** Roles glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59:206-216.
- Aziz, I. (2007).** Seasonal flux in water potential, chlorophyll and proline content in plants at Ziarat Valley balochistan, *Pakistan Journal of Botany*. 39(6):1995-2002.
- Baragagli, R. (1998).** Chemical elements and plant life. In: Baragagli, R. (Ed.), *Trace elements in terrestrial plants an eco physiological approach to biomonitoring and biorecovery*. Springer, New York, 324 pp.
- Bates, L., Waldren, P.P. and Teare, J.D. (1973).** Rapid determination of the free proline of water stress studies. *Plant soil*. 39: 201-205.
- Bowler, C., Van Montagu, M. and Inze, D. (1992).** Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*. 43:83-116.
- Brekken, A. and Steinnes, E. (2004).** Seasonal concentration of cadmium and zinc in native pasture plants. Consequences for grazing animals. *Science of the total environment*. 326(1-3): 181-195.

- plants grown inside and outside a glasshouse during the winter season. *Photosynthetica*. 45 (4): 594-600
- Kaleem, S., Hassan, F.U. and Saleem, A. (2009).** Influence of environmental variations on physiological attributes of sunflowers. *African Journal Biotechnology*. 8:3531-3539.
- Kingston, S.A.H., Harbinson, J. and Foyer, C.H. (1999).** Acclimation of photosynthesis, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents and anti oxidants in maize growth at sub-optimal temperatures. *Plant cell Environmental*. 22:1071-1083.
- Kramer, P.J. and Kozlowski, T.T. (1979).** *Physiology of woody plants*. Academic press, London, 258-274.
- Martin, M. and Couphrey, P. (1982).** Biological monitoring of heavy metal pollution. Applied Sciences Publications, London/New York.
- Mishra, S.N., Singh, D.B., Anju, Ch. and Chaudhary, A. (1976).** Nitrate and ammonium effect on Indian mustard seeding grown under salinity stress. *Indian Journal of Plant Physiology*. 1:93-97
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Breusegem, F.V. (2004).** Abiotic stress series. Reactive oxygen gene network of plant. *Trends in Plant Science*. 9 (10):490-498
- Pakkish, Z., Rahemi, M. and Baghizadeh, A. (2009).** Seasonal changes of peroxidase, polyphenol oxidase enzyme activity and phenol content during and after rest in Pistachio (*Pistacia vera* L.) flower buds. *World Applied Science Journal*. 6(9):1193-1199.
- Palva, T.E., Thtiharju, S., Tamminen, I., Puhakainen, T., Laitinen, R., Svensson, J., Helenius, E. and Heino, P. (2002).** Biological mechanisms of low temperature stress response: cold acclimation and development of freezing tolerance in plants. *JIRACAS work*, pp: 9-15.
- Prochazkova, D., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. and Singh, D.V. (2001).** Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*. 161:765-771.
- Sairam, R.K. and Srivastava, G.C. (2002).** Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*. 162:897-904.
- Sebastiani, L., Scebba, F. and Tongetti, R. (2004).** Heavy metal accumulation and growth response in poplar colnes eridano (*Populus deltoides*×*maximowiczii*) and I-214(P.×*euramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany*. 52: 79-88.
- Sircelj, H., Tausz, M., Grill, D. and Batic, F. (2005).** Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. *Journal of Plant Physiology*. 162(12): 1308-1318.
- Sivaci, A. (2006).** Seasonal changes of total carbohydrate contents in three varieties of apple (*Malus sylvestris* Miller.) stem cuttings. *Scientia Horticulture*. 109:234-237.
- Sharma, P. and Dubey, R.S. (2005).** Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seeding. *Plant Growth Regulation*. 46:209-221.
- Souza, A., Sandrin, C.Z., Calio, M.F.A., Meirelles, S.T., Pivello, V.R. and Figueiredo-Riberio, R.C.L. (2010).** Seasonal variation of soluble carbohydrates and starch in *Echinolaena inflexa*, a native grass species from the Brazilian Savanna, and in the invasive grass *Melinis minutiflora*. *Brazilian Journal of Biology*. 70(2):1-11.
- Stewart, C.R. and Bannister, P. (1973).** Seasonal changes in carbohydrate content of tree *Vaccinium sp.* With particular reference to *V. uliginosum* and its distribution in the British isles. *Flora*. 162:134-155.
- Sudhakar, Ch., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S. (2001).** Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl Sanility. *Plant Science*. 161(3):613-619
- Xu, Y.C., Zhang, J.B., Jiang, Q.A., Zhou, L.Y. and Miao, H.B. (2006).** Effects of water stress on the growth of *Lonicera japonica* and quality of honeysuckle. *Zhong Yao Cai*. 29(5): 420-423.
- Yruela, I. (2005).** Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 145-1.
- Zalesny, R.S., Wiese, H., Bauer, E.O. and Riemenschneider, D.E. (2006).** Sapflow of hybrid poplar (*Populus nigra* L.×*P. Maximowiczii* A. Henry 'NM6') during phytoremediation of landfill leachate. *Biomass and Bioenergy*. 30(8-9):784-793.

**Zhang, G., Tanakamaru, K., Abe, J. and Morita, S. (2006).** Influence of water logging on some anti-oxidative enzymatic activities of two barley genotypes differing in anoxia tolerance. *Acta Physiologia Plantarum*. 29(2):171-176.

**Zornoza, P., Vazquez, S., Esteban, E., Fernandez- Pascual M. and Carpena, R. (2002).** Cadmium- stress in nodulated with lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40:1003-1009.