University of Tehran Press

Journal of Crops Improvement

Online ISSN: 2345-6957

Homepage: https://jci.ut.ac.ir/

The Effect of Water Stress on Some Physiological and Biochemical Indices of Pomegranate cv. 'Wonderful'

Farzaneh Paimard[1] | Abdolrahman Mohammadkhani[2]✉ | Ali Niazi[3] | Alireza Shahsavar[4] | Mohammad Reza Nouri Imamzadei[5]

1. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. E-mail: fpimard@yahoo.com
2. Corresponding Author, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. E-mail: mohammadkhani@sku.ac.ir
3. Institute of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. E-mail: niazi@shirazu.ac.ir
4. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. E-mail: shahsavar@shirazu.ac.ir
5. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. E-mail: nouri1351@sku.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received: November 01, 2021
Received in revised form: July 18, 2022
Accepted: September 12, 2022
Published online: April 16, 2023

Keywords:
Antioxidant,
drought stress,
membrane stability,
photosynthesis,
proline.

ABSTRACT

Drought stress is one of the limiting factors of agriculture in many parts of the world, especially Iran. Understanding the mechanism behind drought stress' effect on physiological and biochemical processes of genotypes is very useful for selecting and breeding genotypes compatible with Iranian conditions. For this purpose, the present study has been conducted in 2018-2019 in the Biotechnology Research Institute of Shiraz University to investigate the effect of drought stress on physiological and biochemical characteristics of both years' old pomegranate seedlings of Wonderful cultivar in greenhouse conditions. Irrigation has been carried out at four levels of 100% (control), 75%, 55%, and 35% of field capacity for 50 days. The experiment is based on a completely randomized design with three replications. The results show that drought stress has significantly increased carotenoids, flavonoids, malondialdehyde, and proline. The relative leaf water content, cell membrane stability and anthocyanins has decreased, though there has been no significant difference in chlorophyll and glycine betaine levels between drought treatments. Also, the hydrogen peroxide (81%) and activity of superoxide dismutase (480%), catalase (96%), and ascorbate peroxidase (96%) in 35% of field capacity significantly has increased. According to the results of this study, especially the increase in proline and antioxidant enzymes under drought stress, tolerance mechanisms in pomegranate cultivar Wonderful can be associated with active osmotic regulation and active enzymatic antioxidant system.

Cite this article: Paimard, F., Mohammadkhani, A., Niazi, A., Shahsavar, A. R., & Nouri Imamzadei, M. R. (2023). The Effect of Water Stress on Some Physiological and Biochemical Indices of Pomegranate cv. 'Wonderful. *Journal of Crops Improvement*, 25 (1), 279-296. DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2022.331937.2634

© The Authors.
Publisher: University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2022.331937.2634

انتشارات دانشگاه تهران

به زراعی کشاورزی

شاپا الکترونیکی: ۶۹۵۷-۲۳۴۵

Homepage: https://jci.ut.ac.ir/

اثر تنش کم‌آبی بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انار رقم "واندرفول"

فرزانه پایمرد[۱] | عبدالرحمان محمدخانی[۲]✉ | علی نیازی[۳] | علیرضا شهسوار[۴] | محمدرضا نوری امامزاده‌ای[۵]

۱. گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: fpimard@yahoo.com

۲. نویسنده مسئول، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: mohammadkhani@sku.ac.ir

۳. پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه: niazi@shirazu.ac.ir

۴. گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه: shahsavar@shirazu.ac.ir

۵. گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: nouri1351@sku.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۴/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۱/۲۷

کلیدواژه‌ها:
آنتی‌اکسیدان،
پایداری غشا،
پرولین،
تنش خشکی،
فتوسنتز.

چکیده

تنش خشکی یکی از عوامل محدودکننده کشاورزی در بسیاری از مناطق دنیا به‌ویژه ایران است. درک مکانیسم اثر تنش خشکی بر واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ژنوتیپ‌ها، برای انتخاب و اصلاح ژنوتیپ‌های سازگار با شرایط ایران بسیار مفید می‌باشد. بدین منظور، پژوهش حاضر در سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ در پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز با هدف بررسی تأثیر تنش خشکی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نهال‌های دوساله انار رقم واندرفول در شرایط گلخانه انجام شد. آبیاری در چهار سطح ۱۰۰ درصد (شاهد)، ۷۵ درصد، ۵۵ درصد و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی به‌مدت ۵۰ روز انجام شد. آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که تنش کم‌آبی باعث افزایش میزان کاروتنویید، فلاونویید، مالون‌دی‌آلدهید و پرولین شد. محتوای نسبی آب برگ، ثبات غشای سلول و میزان آنتوسیانین تحت تنش کم‌آبی کاهش یافت، اما در میزان کلروفیل کل و گلیسین بتائین بین سطوح مختلف آبیاری تفاوت معنی‌دار ایجاد نشد. میزان پراکسید هیدروژن (۸۱ درصد) و هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیداز دیسموتاز (۴۸۰ درصد)، کاتالاز (۹۶ درصد) و آسکوربات پراکسیداز (۱۵۳ درصد) در تیمار ۳۵ درصد در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان دادند. با توجه به نتایج این پژوهش به‌ویژه افزایش میزان پرولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در اثر تیمارهای کم‌آبی، مکانیسم‌های تحمل به خشکی در انار رقم واندرفول می‌تواند در ارتباط با تنظیم اسمزی فعال و هم‌چنین سیستم فعال آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در این رقم باشد.

استناد: پایمرد، ف.، محمدخانی، ع.، نیازی، ع.، شهسوار، ع. ر. و نوری امامزاده‌ای، م. ر (۱۴۰۲). اثر تنش کم‌آبی بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انار رقم "واندرفول". *به‌زراعی کشاورزی*، ۲۵ (۱)، ۲۷۹-۲۹۶. DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2022.331937.2634

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

CC BY NC

۱. مقدمه

خشکسالی خسارت‌های هنگفتی به محصولات کشاورزی در جهان به‌ویژه ایران که دارای اقلیمی خشک و نیمه‌خشک است، وارد می‌نماید (Doulati Baneh *et al.*, 2019). تنش خشکی فرایندهای حیاتی گیاه را تحت تأثیر قرار داده و کاهش رشد و عملکرد را به‌همراه دارد. خشکی منجر به تنوع گسترده‌ای از پاسخ‌های گیاهی، شامل تغییر در بیان ژن‌ها، تجمع متابولیت‌ها مانند هورمون گیاهی اسیدآبسیزیک یا ترکیبات فعال اسمزی و سنتز پروتئین‌های خاص، به‌طور مثال پروتئین‌های آب‌دوست می‌شود (He *et al.*, 2020). گیاهان هنگامی‌که تحت تنش خشکی قرار می‌گیرند، ممکن است با القای پاسخ‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نسبت به این شرایط سازگاری یابند. گیاهان هم‌چنین نسبت به کم‌آبی در دو سطح سلولی و مولکولی به‌عنوان مثال به‌وسیله تجمع اسمولیت‌ها و پروتئین‌های ویژه تحمل به تنش، واکنش و سازگاری نشان می‌دهند (Shinozaki & Yamaguchi, 2007). سنتز ترکیباتی مانند پلی‌آمین، کربوهیدرات، پرولین، گلیسین بتائین و ترهالوز با مقاومت به خشکی در ارتباط هستند (Da-Li *et al.*, 2019). گزارش شده که میزان خسارت تنش خشکی به شدت و طول مدت آن، مرحله رشدی گیاه، ظرفیت ژنوتیپی گونه‌ها و برهمکنش عوامل محیطی بستگی دارد (Wang *et al.*, 2018).

انار با نام علمی *Punica granatum* L. متعلق به خانواده Punicacea تحمل نسبتاً خوبی در برابر تنش خشکی دارد. بنابر شواهد موجود، انار بومی ایران و کشورهای همجوار می‌باشد (Bahantana & Lazarovitch, 2010). با توجه به توسعه کشت انار در مناطق خشک و نیمه‌خشک و طولانی‌بودن فصل رشد آن، کم‌آبی عامل اصلی محدودکننده توسعه باغات و کمیت و کیفیت محصول به حساب می‌آید. خشکی عوارضی مانند ترک‌خوردگی و آفتاب سوختگی میوه را تشدید می‌کند. میزان تحمل به خشکی در ارقام مختلف متفاوت است. با توجه به شرایط خشک و نیمه‌خشک در ایران، انتخاب ارقام مقاوم در برابر خشکی اهمیت زیادی دارد.

با افزایش تنش خشکی، سرعت فتوسنتز، تعرق، هدایت روزنه‌ای، دی‌اکسیدکربن زیر روزنه و محتوای نسبی آب، کاهش و میزان نشت الکترولیت‌های برگ افزایش می‌یابد (Hassani Moghadam *et al.*, 2015). هم‌چنین تنش خشکی موجب کاهش عملکرد، کاهش اندازه میوه انار و کاهش میزان اجزای میوه از جمله آریل، هسته، پوست و آب میوه و افزایش مواد جامد محلول، اسیدیته قابل تیتراسیون و کاهش pH شده است (Rad *et al.*, 2015). تیمار خشکی در نهال‌های نارنج سه برگ باعث کاهش محتوای آب نسبی برگ (RWC) و غلظت کلروفیل و افزایش سوپراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD)، نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، در برگ نهال‌های نارنج سه برگ تحت تنش کم‌آبی شد (He *et al.*, 2019). هم‌چنین تنش خشکی در گردو بعد از یک دوره خشکی باعث افزایش غلظت پراکسیدهیدروژن، مالون‌دی‌آلدهید و شاخص آسیب غشا و هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در برگ‌ها شد (Karimi *et al.*, 2020). با بررسی تنش خشکی در دو رقم انگور نیز میزان پرولین و مالون‌دی‌آلدهید برگ‌ها افزایش یافت (Xiaoyue *et al.,* 2020). فعالیت آنزیم‌های محافظ و مهارکننده رادیکال‌های آزاد در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی مانند SOD، POD و CAT، به‌طور مداوم در زردآلو تحت تنش خشکی، افزایش نشان داد (Liu *et al.*, 2020).تحت تنش خشکی میزان پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در ریشه درخت سیب افزایش قابل‌توجهی داشته است (Da-Li *et al.*, 2019). با افزایش تنش خشکی در پایه UCB1 پسته، سطح مالون‌دی‌آلدهید (MDA) به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی غشا، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گایاکول پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز افزایش یافت. علاوه بر این، تغییر فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز (GPX)، SOD، CAT و POD مشابه هستند،

که نشان می‌دهد این چهار آنزیم در طول تنش خشکی با یکدیگر همکاری می‌کنند (Pakzad *et al*., 2019). تنش خشکی منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در انار (رقم‌های رباب و شیشه‌کپ) (Ebtedaie & shekafandeh, 2017) و نهال‌های چهار ساله انار شد (Tavousi *et al*., 2014). با القای تنش خشکی در بادام، غلظت کلروفیل، آنتوسیانین و کارتنویید کاهش یافت. ارقام مقاوم‌تر دارای محتوای آب برگ، ثبات غشای سلولی و غلظت رنگدانه‌های بیش‌تری بودند (Karimi *et al*., 2013).

انار یکی از میوه‌های صادراتی مهم ایران است اما خشکسالی‌های اخیر کمیت و کیفیت آن را تحت تأثیر قرار داده است. درک نوع و مکانیسم خسارت تنش خشکی و واکنش‌های فیزیولویکی و بیوشیمیایی گیاه برای تحمل تنش اهمیت زیادی در انتخاب ارقام مقاوم و اصلاح ژنوتیپ‌های سازگار دارد. به توجه به اهمیت انار در کشور و صادرات آن، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر تنش خشکی و کم‌آبی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انار رقم واندرفول طراحی شد. این رقم، یکی از مهم‌ترین ارقام تجاری و بازارپسند در دنیاست که نسبتاً متحمل خشکی است و به‌تازگی کشت آن در ایران مورد توجه قرار گرفته است. رقم واندرفول دورگه، میان‌رس، دارای میوه درشت کروی شکل، پوست ضخیم و رنگ آریل قرمز تیره و بازارپسند است و از طریق قلمه‌گیری و کشت بافت تکثیر می‌شود. در این پژوهش ضمن بررسی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های مختلف) و سنجش متابولیت‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی، سعی شده مکانیسم تحمل خشکی در انار رقم واندرفول جهت بررسی سازگاری و برنامه‌ریزی کشت آن، مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ در گلخانه‌ای واقع در پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز (واقع در باجگاه) در عرض جغرافیایی ۵۲ درجه و ۵۸ دقیقه شرقی و طول جغرافیایی ۲۹ درجه و ۷۳ دقیقه شمالی و با هدف بررسی اثر تنش خشکی بر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی رقم واندرفول انار تحت تنش خشکی اجرا شد. آزمایش در شرایط گلخانه‌ای با دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره روشنایی ۱۶ ساعت با شدت نور حدود ۸۰۰ میکرومول در مترمربع بر ثانیه و رطوبت نسبی ۵۰ درصد روی نهال‌های دو ساله انار رقم واندرفول انجام شد. آزمایش برپایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار (هر تکرار سه گیاه) طراحی شد. نهال‌های دو ساله به گلدان‌های ۵ لیتری حاوی ترکیبی از خاک، ماسه و کمپوست به نسبت (۱:۱:۱) انتقال داده شد. پس از چهار ماه سازگاری در گلخانه، تنش به‌مدت ۵۰ روز با اعمال روش ظرفیت زراعی مزرعه (Esna-Ashari & Hassani Moghadam, 2021) انجام شد. ظرفیت زراعی براساس درصد رطوبت وزنی تعیین شد. در این معادله (رابطه ۱)، FC ظرفیت مزرعه، Fw وزن تر خاک و Dw وزن خشک خاک بود.

$$FC\% = (Fw- Dw / Dw) \times 100$$ رابطه ۱)

درصد آب خاک = {(وزن تر خاک – وزن خشک خاک)/ وزن خشک خاک} ×۱۰۰

نسبت رطوبت وزنی = (وزن آب موجود در خاک/ وزن خشک خاک) ×۱۰۰

با استفاده از میانگین عددی نسبت رطوبت وزنی و میانگین وزنی خاک خشک نمونه‌ها و هم‌چنین وزن خاک موجود در گلدان‌ها، میزان نیاز آبی هر گلدان براساس ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مشخص شد و سپس جهت مقادیر ۷۵ درصد، ۵۵ درصد و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی نیز محاسبه شد. هم‌چنین درصد رطوبت حجمی و حجم آب موردنیاز هر تیمار با استفاده از درصد آب خاک به‌دست‌آمده در حالت ظرفیت زراعی محاسبه و جهت اعمال تیمارهای تنش استفاده شد. در هر بار آبیاری، میزان آب براساس ۱۰۰ (شاهد)، ۷۵، ۵۵ و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی مزرعه (FC) محاسبه و تیمارها اعمال

گردید. پس از ۵۰ روز، نمونه‌برداری از برگ‌های بالغ در انتهای دوره تنش انجام گرفت. برخی نمونه‌ها به‌صورت تازه و بعضی پس از انتقال به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد و یا پس از خشک‌کردن در آون جهت اندازه‌گیری صفات مورداستفاده قرار گرفتند. صفات اندازه‌گیری‌شده شامل محتوای نسبی آب برگ، کلروفیل، کاروتنویید، آنتوسیانین، فلاونویید، ثبات غشا، مالون‌دی‌آلدهید، پرولین، گلیسین بتائین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بود.

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب، دیسک‌هایی از برگ توزین (FW) و ۲۴ ساعت درون آب مقطر در تاریکی نگهداری شد. سپس نمونه‌های برگ دوباره وزن شد (TW) و پس ازخشک‌کردن توسط آون وزن خشک (DW) تعیین شد. با قراردادن وزن تر، وزن اشباع و وزن خشک در رابطه (۲) محتوای نسبی آب محاسبه شد (Bastam *et al*., 2012).

رابطه ۲) $\% RWC = (FW-DW) / (TW- DW)\times 100$

برای سنجش کلروفیل و کاروتنویید، مقدار ۰/۱ گرم برگ تازه در پنج میلی‌لیتر متانول خالص به‌صورت محلول همگن در آمد و پس از ۲۴ ساعت ماندن در تاریکی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، محلول رویی در طول موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Jenway 7315 ساخت کشور انگلستان) قرائت شد (Karimi *et al*., 2013). اندازه‌گیری آنتوسیانین با استفاده از روش Alexieva *et al*. (2001) با عصاره‌گیری از ۰/۲ گرم بافت برگ با متانول اسیدی یک درصد انجام شد. نمونه‌ها ۴۸ ساعت در در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری و سپس عصاره حاصل سانتریفیوژ (مدل Z300، شرکت Hermle، آلمان) شد و در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر قرائت و مقدار آنتوسیانین با استفاده از معادله زیر (رابطه ۳) محاسبه شد.

رابطه ۳) $A=A530 - (0/25 \times A657)$

برای اندازه‌گیری مقدار فلاونویید از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. عصاره‌گیری از ۰/۲ گرم بافت برگ در سه میلی‌لیتر متانول اسیدی (۹۹:۱) انجام شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد با ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار آمیخته و ۲/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر به مخلوط اضافه شد. در آخر ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره به آمیخته افزوده شد. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه ماندن در تاریکی در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. مقدار فلاونویید کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین، به‌صورت میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر محاسبه شد (Karimi *et al*., 2013).

شاخص پایداری غشای سلولی (MSI) براساس روش Lutts *et al*. (1996) براساس تغییرات نشت یونی انجام شد. دیسک‌های برگی به‌مدت ۲۴ ساعت درون آب مقطر در دمای اتاق نگهداری و هدایت الکتریکی توسط ECمتر اندازه‌گیری شد (C1). سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو و بعد از سردشدن، هدایت الکتریکی نمونه‌ها دوباره اندازه‌گیری شد (C2). شاخص پایداری غشا براساس رابطه (۴) محاسبه شد.

رابطه ۴) $CMI \% = 1- (C1 / C2) \times 10$

برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates *et al*. (1973) استفاده شد. به ۰/۵ گرم نمونه برگ ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی، سولفوسالیسیلیک‌اسید سه درصد اضافه و مخلوط حاصل به‌طور کامل همگن و صاف شد. سپس دو میلی‌لیتر از این محلول را با دو میلی لیتر معرف ناین‌هیدرین مخلوط نموده و دو میلی‌لیتر استیک‌اسید به هر لوله اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و بلافاصله چند دقیقه در حمام یخ قرار داده شدند. سپس چهار میلی‌لیتر تولوئن به نمونه‌ها اضافه و ورتکس شدند. لوله‌ها برای مدتی در محیط آزمایشگاه قرار گرفت و سپس از فاز رویی برای تعیین غلظت پرولین در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد. از تولوئن خالص به‌عنوان بلنک دستگاه استفاده و مقدار پرولین با رسم نمودار استاندارد، برحسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

جهت سنجش گلیسین‌بتائین، ۰/۲۵ گرم نمونه برگ خشک با دو میلی‌لیتر آب مقطر هموژن شد. نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد روی شیکر قرار گرفت. سپس نمونه‌ها صاف و به نسبت ۱:۱ با اسیدسولفوریک دو نرمال رقیق شدند و مخلوط حاصل به‌مدت یک ساعت در حمام آب یخ قرار گرفت و در نهایت مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر معرف یدور پتاسیم سرد به نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد محلول روشناور جدا و کریستال‌های ته‌نشین‌شده پریدید با آب مقطر جهت حذف معرف رنگی روی آن‌ها شسته شدند، سپس کریستال‌های پریدید در یک میلی‌لیتر حلال ۱-۲ دی‌کلرواتان ورتکس شد تا رنگ قرمز ظاهر شد. محلول به‌مدت دو ساعت نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. به‌کمک نمودار استاندارد گلایسین بتائین خالص، مقدار گلیسین بتائین برحسب میکروگرم بر گرم وزن خشک گزارش شد (Grieve & Grattan, 1983).

برای سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2) از روش Velikova *et al.* (2000) استفاده شد. مقدار ۰/۲۵ گرم بافت تازه در حمام یخ با پنج میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد همگن و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و یک میلی‌لیتر یدیدپتاسیم یک مولار اضافه و به‌مدت یک ساعت در تاریکی قرار داده و جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. مقدار پراکسیدهیدروژن در نمونه، با استفاده از ضریب خاموشی $۰/۲۸\ cm^{-1}\ M^{-1}$ محاسبه و برحسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش شد (رابطه ۵).

$$A= €bc$$ رابطه ۵)

که در آن، A: میزان جذب قرائت‌شده، €: ضریب خاموشی، عدد قرائت‌شده تقسیم بر ۰/۲۸، b: عرض کووت برابر یک سانتی‌متر، C: غلظت برحسب مولار می‌باشد.

برای استخراج عصاره آنزیمی، ۰/۵ گرم نمونه برگ منجمد در دمای۸۰- درجه سانتی‌گراد را درون نیتروژن مایع ساییده، دو میلی‌لیتر بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار به آن اضافه و به‌خوبی ورتکس شد. محلول سانتریفیوژ شد و فاز رویی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Ozdon *et al.,* 2009). از این عصاره برای سنجش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و هم‌چنین میزان پراکسیداسیون لیپید استفاده شد.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشا با محاسبه میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA) توسط واکنش با تیوباربیتوریک‌اسید (TBA) با روش Lu *et al.* (2008) تعیین شد. به ۶۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی ۶۰۰ میکرولیتر محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید بود اضافه شد. نمونه‌ها را به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس به حمام آب یخ انتقال داده شد و دوباره به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۵۰۰ rpm در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. جذب محلول روشناور در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. جهت محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $۱۵۵\ cm^{-1}\ mM^{-1}$ استفاده شد. مقدار MDA که محصول پراکسیداسیون لیپیدها است براساس نانومول بر گرم وزن تر طبق معادله زیر (رابطه ۶) محاسبه شد (Health & Packer, 1968).

$$MDA = \{(A532-A600)/155\}\times1000 \qquad A= \varepsilon bc$$ رابطه ۶)

که در آن، ε: ضریب خاموشی، A: جذب خوانده‌شده، b: عرض کووت (یک سانتی‌متر)، c: غلظت کمپلکس مالون‌دی‌آلدهید می‌باشد.

جهت سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) از روش Beauchamp & Fridovich (1971) استفاده

شد. اندازه‌گیری براساس توانایی آنزیم SOD در متوقف‌کردن احیای فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) توسط رادیکال‌های سوپراکسید در حضور ریبوفلاوین در نور صورت گرفت. مقدار ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با یک میلی‌لیتر محلول سوپراکسید دیسموتاز (شامل بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸)، NBT ۷۵ میلی‌مولار، ال- متیونین ۱۳ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ریبوفلاوین دو میکرومولار) مخلوط شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در معرض منبع نوری (دو عدد لامپ فلورسنت ۱۵ وات) قرار گرفت و در پایان کووت‌ها با پوشش پارچه‌ای سیاه پوشانده شدند. یک کووت فاقد عصاره آنزیمی به‌عنوان شاهد و کووت دیگر حاوی کمپلکس واکنش کامل اما نور ندیده به‌عنوان بلنک در نظر گرفته شد. میزان جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. یک واحد فعالیت آنزیم معادل با کمیتی از آن تعریف می‌شود که توان کاهش در میزان جذب را به میزان ۵۰ درصد جذب قرائت‌شده برای شاهد دارا باشد. فعالیت ویژه آنزیمی به‌صورت واحد به‌ازای گرم وزن تازه نمونه گزارش شد ($Unit\ g^{-1}FW$). فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با بررسی کاهش میزان جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر (به‌دلیل تجزیه پراکسید هیدروژن) در طی مدت یک دقیقه ارزیابی شد (Dhindsa *et al*., 1981). مقدار سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش، حاوی بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، پراکسیدهیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده، بود. واکنش با اضافه‌کردن عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش شروع شد. با استفاده از ضریب خاموشی $۳۹/۴\ mM^{-1}cm^{-1}$ فعالیت آنزیم برحسب میکرومول پراکسیدهیدروژن تجزیه‌شده در مدت یک دقیقه به ازای یک گرم وزن تازه نمونه محاسبه شد. یک واحد آنزیمی کاتالاز برابر با تجزیه یک میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در یک دقیقه به‌ازای یک گرم وزن تازه نمونه است ($Unit.\ g^{-1}FW.\ Min^{-1}$).

برای سنجش غلظت آنزیم پراکسیداز (POD)، از روش Ozden *et al.* (2009) استفاده شد. نمونه شامل ۰/۰۵ میلی‌لیتر گوایکول (۲۰ میلی‌مولار)، ۲/۹ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۱۰ میلی‌مولار با pH=۷) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با اضافه‌کردن ۲۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۴۰ میلی‌مولار آغاز شد. اندازه‌گیری براساس میزان اکسیدشدن گوایکول توسط پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) طی دو دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر انجام شد. واحد آنزیم به‌صورت $\mu mol\ g^{-1}FW.\ Min^{-1}$ یعنی فعالیت آنزیم برحسب میکرومول گوایکول اکسیدشده در مدت یک دقیقه به‌ازای یک گرم وزن تازه نمونه می‌باشد.

برای سنجش آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) از روش Nakano & Asada (1981) استفاده شد. بر این اساس ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج‌شده را با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری آسکوربیک پراکسیداز که شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، اسید اسکوربیک (ASA) ۰/۵میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۰/۱۵ میلی‌مولار بود، مخلوط نموده سپس جذب آن در طول موج ۲۹۰nm به‌مدت یک دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد آنزیمی آسکوربیک پراکسیداز برابر با تجزیه یک میلی‌مولار آسکوربیک‌اسید در یک دقیقه در نظر گرفته شد.

نرمال‌سازی داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه 26) و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C (نسخه 1.42) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

۳. نتایج و بحث

۳. ۱. محتوای نسبی آب برگ

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش کم‌آبیاری بر محتوای نسبی آب برگ در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

مقایسه میانگین محتوای نسبی آب برگ تحت تنش خشکی نشان داد که بیش‌ترین مقدار در تیمار شاهد (۱۰۰ درصد طرفیت زراعی) و کم‌ترین میزان مربوط به تیمارهای آبیاری ۷۵ درصد و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی بود که به‌ترتیب ۲۱ درصد و ۲۱/۵ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد (جدول ۲). نتایج مشابهی در سایر درختان میوه تحت تنش خشکی از جمله گلابی (Wang *et al*., 2018)، مرکبات (Conceicao dos Santos *et al*., 2019) و سیب (Gao *et al*., 2020)، ارائه شده است. بنابراین نتایج این پژوهش در رابطه با کاهش RWC در برگ انار تحت تنش خشکی با گزارش‌های ذکرشده همسو می‌باشد. تحت شرایط تنش، میزان تعرق بیش از جذب آب گیاه بوده و در نتیجه با به هم خوردن تعادل آبی گیاه، محتوای نسبی آب برگ کاهش می‌یابد. کاهش محتوای نسبی آب برگ باعث بسته‌شدن روزنه‌ها و کاهش هدایت روزنه‌ای برای ورود دی‌اکسیدکربن به مزوفیل برگ شده و باعث کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی، کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو مؤثر در فتوسنتز و در نتیجه کاهش فتوسنتز و رشد و در نهایت کاهش عملکرد در گیاهان می‌شود. این متغیر را می‌توان در ارزیابی تحمل به خشکی مرتبط دانست (Conceicao dos Santos *et al*., 2019).

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انار رقم اندرفول تحت تنش خشکی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		محتوای نسبی آب	کلروفیل کل	کاروتنویید	آنتوسیانین	فلاونویید	پرولین	گلیسین بتائین	ثبات غشا	مالون‌دی‌آلدیید
تیمار	۳	۲۳۲*	۵/۵ ns	۴/۵**	۳/۷*	۷۹/۹**	۷۶/۸**	۱۴/۳ ns	۱۱۲**	۰/۱۷**
خطای آزمایش	۸	۷۰/۴	۲/۹	۰/۱۱	۰/۷۹	۲/۹	۰/۵۲	۱۶/۶	۵/۴	۰/۰۱
کل	۱۱	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ضریب تغییرات (%)	–	۱۱/۹	۹/۱	۲/۷۷	۱۵/۶	۵/۲	۱۱/۴	۲۴	۷/۸	۶/۱

**، * و ns: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و بدون اختلاف معنی‌دار.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر سطوح تنش خشکی بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برگ انار رقم "واندرفول"

خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی	تنش کم‌آبی (درصد ظرفیت زراعی)			
	۱۰۰	۷۵	۵۵	۳۵
محتوای نسبی آب برگ (%)	۸۰/۱ a	۶۳/۷ b	۷۶/۴ ab	۶۲/۹ b
کلروفیل کل (mg/g fw)	۲۰/۵ a	۱۸/۹ a	۱۹/۱ a	۱۷/۲ a
کاروتنویید (mg/g fw)	۱۱/۱ c	۱۱/۱ c	۱۲/۲ b	۱۳/۷ a
آنتوسیانین (mg/g fw)	۷/۱ a	۵/۷ ab	۵/۸ ab	۴/۳ b
فلاونویید (mg/g fw)	۲۹/۵ c	۲۸/۳ c	۳۳/۹ b	۳۹/۷ a
ثبات غشاء (٪)	۳۸/۶ a	۲۶ b	۲۵/۹ b	۲۸/۱ b
مالون دآلدئید (nmol/g fw)	۱/۲ b	۱/۱ b	۱/۲ ab	۱/۶ a
پرولین (µg/g fw)	۳/۸ bc	۲/۹ c	۴/۷ b	۱۳/۸ a
گلیسین بتائین (µmol/g fw)	۱۶/۱ a	۱۸/۳ a	۱۴/۳ a	۱۹/۱ a

* در هر ردیف میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، اختلاف معنی‌دار ندارند.

۳. ۲. کاروتنویید

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش کم‌آبی و خشکی بر کاروتنویید در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). طبق نتایج مقایسه میانگین، با افزایش سطح تنش خشکی مقدار کاروتنویید افزایش یافت. بیش‌ترین میزان کاروتنویید مربوط به سطح آبیاری ۳۵ درصد ظرفیت زراعی (۲۳ درصد افزایش نسبت به شاهد) بود که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از این مقدار در سایر تیمارها بود. کم‌ترین میزان کاروتنویید نیز مربوط به سطح ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) بود که تفاوت معنی‌داری با این مقدار در سطح ۷۵ درصد ظرفیت زراعی نداشت، اما به‌طور معنی‌داری کم‌تر از این مقدار در سایر

تیمارهای سطح خشکی بود (جدول ۲). نتایج پژوهش‌های انجام‌شده در نهال‌های گلابی وحشی تحت تنش خشکی (Zarafshar *et al*., 2014) گزارش شده است که میزان رنگدانه کاروتنویید افزایش یافت، درحالی‌که میزان رنگدانه کلروفیل در نهال‌های تحت تنش در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت که نتایج این پژوهش در رابطه با غلظت بیش‌تر کاروتنوییدهای برگ در مقایسه با کلروفیل در زمان تنش آبی، با این گزارش همسو می‌باشد. در گزارش‌های موجود در سایر درختان میوه تحت تنش خشکی از جمله انار (Eftekhari Shahabadi *et al*., 2017)، سیب (Gao *et al*., 2020)، مرکبات (Conceicao dos Santos *et al*., 2019) میزان کاروتنویید کاهش نشان داد که نتایج حاصل از این پژوهش در رابطه با افزایش کاروتنویید در برگ انار تحت تنش خشکی با نتایج گزارش شده همسو نمی‌باشد. کاروتنوییدها به‌عنوان ترکیبات محافظ نوری، با خاموش‌کردن کلروفیل نقش مهمی در محدود کردن خسارت ساختاری به غشای تیلاکوییدی کلروپلاست‌ها و جلوگیری از فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها و هم‌چنین وظیفه حذف اکسیژن منفرد را بر عهده دارند (Nishida *et al*., 2007). علاوه بر نقش ساختاری، آن‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، بازدارنده پراکسیداسیون چربی و پایدارساز غشاها شناخته شده‌اند (Hanci & Cebeci, 2014).

۳. ۳. آنتوسیانین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش خشکی و کم‌آبی بر میزان آنتوسیانین در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد، بیش‌ترین میزان آنتوسیانین مربوط به شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی بود که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سطح ۳۵ درصد بود ولی تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها، نداشت. کم‌ترین میزان آنتوسیانین نیز مربوط به تیمار ۳۵ درصد ظرفیت زراعی (۳۸ درصد کاهش نسبت به شاهد) بود (جدول ۲). در پژوهش‌های مشابهی در سایر گونه‌های تحت تنش خشکی از جمله انجیر (Gholami *et al*., 2012)، انار (Pena *et al*., 2013) و بادام (Karimi *et al*., 2013)، کاهش معنی‌دار آنتوسیانین در برگ به‌دست‌آمده که نتایج حاصل از این پژوهش در رابطه با کاهش آنتوسیانین در برگ انار تحت تنش خشکی با نتایج گزارش‌شده همسو می‌باشد. کاهش معنی‌دار میزان آنتوسیانین می‌تواند در نتیجه کاهش آسیمیلاسیون دی‌اکسیدکربن و کاهش کربوهیدرات‌ها (پیش‌مادهٔ لازم برای ساخت آنتوسیانین‌ها) باشد (He *et al*., 2019). آنتوسیانین‌ها، پلی‌فنل‌های محلول در آب هستند که در اندام‌های مختلف گیاه وجود دارند. علاوه بر فعالیت اصلاح رادیکال آزاد، آنتوسیانین‌ها در محافظت نوری رنگدانه‌های فتوسنتزی و تنظیم اسمزی نقش دارند (Karimi *et al*., 2020). آنتوسیانین‌ها در واقع رنگدانه‌های فلاونوییدی محلول در آب درون واکوئل هستند که در افزایش تحمل تنش‌های محیطی نقش دارند (Chalker *et al*., 1999).

۳. ۴. فلاونویید

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش کم‌آبی بر میزان فلاونویید در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بر طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها، با افزایش سطح تنش خشکی مقدار کاروتنویید افزایش یافت. هم‌چنین با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰ تا ۳۵ درصد نیاز آبی، میزان فلاونویید برگ افزایش نشان داد. بیش‌ترین میزان فلاونویید در سطح ۳۵ درصد ظرفیت زراعی (۳۴/۵ درصد افزایش نسبت به شاهد) مشاهده گردید که تفاوت معنی‌داری با این میزان در سایر تیمارها داشت. کم‌ترین میزان فلاونویید نیز مربوط به تیمار ۷۵ درصد ظرفیت زراعی و شاهد بود (جدول ۲). بررسی تأثیر کم‌آبیاری مداوم بر برخی ترکیبات بیواکتیو در میوه انار نیز نشان داد که میزان ترکیبات فلاونوییدی از جمله پروتوکاتکین اسید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فلورتین در میوه انار تحت تنش کم‌آبی، افزایش یافت (Pena *et al*., 2013). فلاونوییدها

از بزرگ‌ترین گروه ترکیبات فنلی و دارای نقش دفاعی در برابر تنش‌ها می‌باشند. این مواد در واکوئل سلول‌های لایه اپیدرمی برگ و ساقه تجمع یافته و اثرات تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند. از دلایل افزایش فلاونوییدها، ایجاد محدودیت در انتقال الکترون فتوسنتزی تحت تنش است که سبب ایجاد تغییرات متابولیکی در گیاه از جمله منجر به القای فلاونوییدها جهت تعدیل این وضعیت می‌شود. مسیر فنیل پروپانویید که مسئول ساخت ترکیبات فنلی مانند فلاونوییدها و تانن‌هاست در شرایط تنش القا می‌شود. این کار به‌واسطه آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) انجام می‌شود (Taiz & Zeiger, 2006).

۳. ۵. ثبات غشا

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش کم‌آبی و خشکی بر ثبات غشای سلول برگ در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). براساس نتایج مقایسه میانگین، بیش‌ترین میزان ثبات غشا در شاهد مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از ثبات غشا در سایر تیمارها بود. در سایر سطوح تنش کم‌آبی ۷۵، ۵۵ و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی، ثبات غشای سلول نسبت به شاهد (به‌ترتیب ۳۲/۶، ۳۳/۶ و ۲۶/۳ درصد) کاهش یافت (جدول ۲). پژوهش‌گران با بررسی میزان ثبات غشا در سایر درختان میوه تحت تنش خشکی از جمله گردو (Karimi *et al*., 2020; Parvin *et al*., 2014)، انار (Eftekhari Shahabadi, 2017)، نارنج سه برگ (He *et al*., 2019) و انگور (Xiaoyue *et al*., 2020)، نشان دادند که تنش خشکی باعث کاهش ثبات غشا و افزایش نشت یونی سلول شد که نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج ذکرشده همسو می‌باشد. تنش خشکی به ساختار سلول آسیب می‌رساند. نقص در متابولیسم سلولی در هنگام کم‌آبی باعث ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و آسیب به غشای سلولی می‌شود که منجر به افزایش نشت الکترولیت سلولی می‌شود (Karimi *et al*., 2013). نشت الکترولیت شاخصی است که نشان می‌دهد تمامیت سلول و پایداری غشای سلولی تحت تأثیر عوامل تنش به چه میزان صدمه دیده است. درواقع پراکسیداسیون لیپید باعث تغییر در غشا و افزایش نشت الکترولیت و عدم تعادل اسمزی می‌شود (Xiaoyue *et al*., 2020).

۳. ۶. مالون‌دی‌آلدهید (پراکسیداسیون چربی غشا)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش کم‌آبیاری بر میزان مالون‌دی‌آلدهید در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بر طبق نتایج مقایسه میانگین، بیش‌ترین میزان مالون‌دی‌آلدهید در سطح ۳۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از این میزان در سایر تیمارها بود (۳۷/۵ درصد افزایش نسبت به شاهد) (جدول ۲). نتایج مشابهی در سایر درختان میوه تحت تنش خشکی از انار (Catola *et al*., 2016)، نارنج سه برگ (He *et al*., 2019)، پسته (Pakzad *et al*., 2019) و زردآلو (Liu *et al*., 2020) در رابطه با افزایش میزان مالون‌دی‌آلدهید تحت تنش خشکی به‌دست‌آمده که نتایج حاصل از این پژوهش با این گزارش‌ها همسو می‌باشد. تجمع MDA در برگ گیاهان تحت تنش‌های غیرزنده، نشان‌دهنده آسیب ساختاری به غشای سلولی و کلروپلاست‌ها می‌باشد. معمولاً مقدار مالون‌دی‌آلدهید جهت سنجش میزان پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای پلاسما به‌علت تنش اکسیداتیو استفاده می‌شود (Karimi *et al*., 2020)، که از جمله دیگر شاخص‌های استرس اکسیداتیو مؤثر در گیاهان به‌حساب می‌آیند، زیرا سیال‌بودن و نفوذپذیری غشا ممکن است تحت تأثیر افزایش پراکسیداسیون لیپید غشای سلولی و اندامک‌ها تغییر یابد (Conceicao dos Santos *et al*., 2019). اندازه‌گیری درجه پراکسیداسیون لیپید به‌واسطه اندازه‌گیری میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهید یکی از مهم‌ترین مارکرهایی است که میزان نفوذ ROS به بافت‌های سلولی را مشخص می‌کند.

۳. ۷. پرولین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش کم‌آبیاری بر میزان پرولین در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). براساس مقایسه میانگین بیش‌ترین میزان پرولین در سطح ۳۵ درصد ظرفیت زراعی (۲۶۵ درصد افزایش نسبت به شاهد) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با این میزان در سایر تیمارها داشت کم‌ترین میزان پرولین نیز مربوط به تیمار ۵۵ درصد ظرفیت زراعی بود که تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت اما به‌طور معنی‌داری کم‌تر از میزان پرولین در سایر تیمارها بود (جدول ۲). Catola *et al.* (2016) گزارش دادند که با اعمال تنش خشکی میزان پرولین در برگ انار در مقایسه با شاهد افزایش یافت. افزایش پرولین با کاهش پتانسیل آب برگ آغاز می‌شود، که این افزایش منجر به حفظ تورم و کاهش خسارت غشا در گیاهان می‌شود. به این ترتیب با روش تنظیم اسمزی تحمل به تنش کم‌آبی افزایش می‌یابد (Parvin *et al.*, 2014).

۳. ۸. پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش کم‌آبیاری بر میزان پراکسیدهیدروژن در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). بر طبق نتایج، بیش‌ترین میزان رادیکال آزاد پراکسیدهیدروژن در سطح ۳۵ درصد ظرفیت زراعی (۴۳ درصد افزایش نسبت به شاهد) مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از این مقدار در شاهد بود اما تفاوت معنی‌داری با سایر سطوح تنش خشکی نداشت و این مقدار در شاهد دارای کم‌ترین میزان بود (جدول ۴). گونه‌های اکسیژن فعال (رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن) اولین پیام‌رسان‌ها در گیاهان تحت تنش خشکی بوده و این تنش باعث تحریک و القای افزایش آن‌ها می‌شود که با حمله به اندامک‌های حیاتی، رنگدانه‌ها و غشای پلاسما، چربی‌های غیراشباع را تجزیه کرده و به ساختار، سیالیت و یکپارچگی سلول‌های گیاهی صدمه وارد نموده و باعث مختل‌شدن متابولیسم طبیعی و عملکرد سلول می‌شود. هم‌چنین گزارش شده که در شرایط استرس کوتاه‌مدت در برگ گردو، تجمع H_2O_2، پاسخ‌های دفاعی گیاه را تنظیم می‌کند (Karimi *et al.*, 2020). نتایج مشابهی در سایر درختان میوه تحت تنش خشکی از جمله گردو (Parvin *et al.*, 2014)، گلابی (Zarafshar *et al.*, 2014)، انار (Catola *et al.*, 2015) و نارنج سه برگ (He *et al.*, 2019) به‌دست‌آمده که نتایج حاصل از این پژوهش در رابطه با افزایش پراکسیدهیدروژن در برگ انار با گزارش‌های ذکرشده در گونه‌های تحت تنش خشکی همسو می‌باشد.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس ویژگی‌های بیوشیمیایی (فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) در انار رقم "واندرفول" تحت تنش خشکی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		پراکسید هیدروژن	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز
تیمار	۳	۱/۴۵ **	۱۳۷۰/۶ **	۰/۰۰۶ **	۰/۷۵ **	۴۱۳/۲ **
خطای آزمایش	۸	۰/۰۹	۱۸/۷	۰/۰۰۰۱	۰/۰۲	۹/۶
کل	۱۱	–	–	–	–	–
ضریب تغییرات (%)	–	۸/ ۹	۱۰/۹	۶/۱	۹/۵	۱۶/۴

**، * و ns: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و بدون اختلاف معنی‌دار.

جدول ٤. مقایسه میانگین اثر سطح تنش خشکی بر ویژگی‌های بیوشیمیایی (فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) انار رقم "واندرفول"

خصوصیات بیوشیمیایی	تنش کم‌آبی (ظرفیت زراعی)			
	٪۱۰۰	٪۷۵	٪۵۵	٪۳۵
پراکسید هیدروژن (µmol/g fw)	۲/۶ c	۳/۶ b	۲/۹ c	۴/۲ a
سوپراکسید دیسموتاز (unit/g fw)	۸/۳ c	۴۷/۱ b	۵۵/۷ a	۴۸/۲ b
پراکسیداز (unit/g fw.min)	۰/۲۵ b	۰/۳ a	۰/۱۹ c	۰/۲۶ b
کاتالاز (unit/g fw.min)	۱/۰۷ b	۱/۱۷ b	۱/۸ a	۲/۱ a
آسکوربات پراکسیداز (unit/g fw.min)	۱۰/۲ b	۷/۷ b	۳۱/۷ a	۲۵/۹ a

* در هر ردیف میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، اختلاف معنی‌دار ندارند.

۳. ۹. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش خشکی بر میزان SOD در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). بر طبق نتایج مقایسه میانگین، بیش‌ترین میزان فعالیت در سطح ۵۵ درصد ظرفیت زراعی (۵۷ درصد افزایش) بود که با سطح ۳۵ درصد (۴۸ درصد افزایش در مقایسه با شاهد) تفاوت معنی‌داری نداشت ولی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از شاهد بود. کم‌ترین مقدار فعالیت این آنزیم نیز مربوط به تیمار شاهد با ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی بود (جدول ۴). گزارش شده که تنش آبی در ارقام مختلف درختان میوه فعالیت SOD را افزایش داد از جمله در نارنج سه برگ (He *et al*., 2019)، پسته (Pakzad *et al*., 2019)، سیب (Gao *et al*., 2020)، زردآلو (Liu *et al*., 2020). نتایج حاصل از این پژوهش در رابطه با افزایش فعالیت کاتالاز در برگ انار تحت تنش خشکی، با نتایج ذکرشده در سایر گونه‌ها همسو می‌باشد این آنزیم در انگور (Xiaoyue *et al*., 2020) و انار (Bompadre *et al*., 2014) تحت تنش بدون تغییر ماند. افزایش فعالیت SOD باعث تحمل بیش‌تری نسبت به استرس اکسیداتیو در برابر تنش شوری یا خشکی می‌شود. این آنزیم اولین خط دفاعی را در برابر اثرات سمی سطح بالای ROS فراهم می‌کند. سوپراکسید اولین رادیکال آزادی است که طی تنش تولید می‌شود و SOD رادیکال سوپراکسید را سریع به پراکسیدهیدروژن و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌کند و با حذف سوپراکسید نقش حیاتی‌تری را در سیستم آنتی‌اکسیدانتی نسبت به آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز ایفا می‌کند لذا سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود. تنش خشکی باعث افزایش رادیکال‌های سوپراکسید و فعال‌شدن مسیرهای انتقال پیام در سلول می‌شود که در نهایت بیان ژن‌های کدکننده آنزیم سوپراکسیددیسموتاز را افزایش می‌دهند (Gill & Tuteja, 2010). متغیربودن فعالیت SOD در پژوهش‌های مختلف تا حدودی به‌دلیل تفاوت در فاکتورهای مورد آزمایش مانند گونه گیاهی، نوع بافت، نوع فلز، غلظت فلز مورد نیاز و مدت زمان تیمار می‌باشد (Chin, 2007).

۳. ۱۰. آنزیم کاتالاز (CAT)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش کم‌آبیاری و خشکی بر میزان CAT در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). با تشدید تنش خشکی فعالیت آنزیم کاتالاز روندی افزایشی نشان داد. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۳۵ درصد (۹۶ درصد افزایش در مقایسه با شاهد) و سپس ۵۵ درصد ظرفیت زراعی (۷۰ درصد افزایش) مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیش از شاهد بود. کم‌ترین مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز نیز مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی بود (جدول ۴). نتایج بررسی تنش خشکی در گیاهانی چون گردو (Karimi *et al*., 2020) و پسته (Pkzad *et al*., 2019) نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز بود که نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج گزارش‌شده در رابطه با افزایش فعالیت کاتالاز در برگ انار تحت تنش خشکی همسو می‌باشد. کاتالاز سبب تجزیه H2O2 به آب و اکسیژن می‌شود و از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی است کـه در غلظت‌های پایین گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر فعال نمی‌شود (Anjum *et al*., 2016).

۳. ۱۱. آنزیم پراکسیداز (POD)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش خشکی و کم‌آبیاری بر میزان POD در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). با افزایش سطح تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح ۷۵ درصد ظرفیت زراعی (۲۱/۵ درصد) افزایش معنی‌دار، در سطح ۵۵ درصد (۲۱ درصد) کاهش معنی‌دار و در سطح ۳۵ درصد تفاوت معنی‌داری نسبت یه شاهد نداشت

(جدول ۴). نتایج بررسی تنش خشکی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در سایر درختان میوه از جمله قهوه (Marraccini, 2012)، انگور (Xiaoyue *et al*., 2020) و زردآلو (Liu *et al*., 2020)، نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز بود که نتایج حاصل از این پژوهش برای سطح ۷۵ درصد با نتایج گزارش‌شده همسو بود. فعالیت این آنزیم در گردو تحت تنش خشکی بدون تغییر ماند که با نتیجه سطح ۳۵ درصد ظرفیت زراعی همسو می‌باشد (Parvin *et al*., 2014). افزایش فعالیت پراکسیداز در گیاهان تحت تنش خشکی با واکنش‌های اکسیدکننده به‌وجودآورنده رادیکال‌های آزاد و پراکسیدهای آلی همبستگی دارد و پراکسیداز نقش مؤثری در پاکسازی H_2O_2 دارد. پراکسیداز با تجزیه H_2O_2، ترکیبات فنلی (مانند گایاکول) به‌عنوان دهنده الکترون را به ترکیبات فنوکسی‌اکسید می‌کند و این ترکیبات در تشکیل اجزای دیواره سلولی مانند لیگنین نقش دارد (Haddad & Mokhlesian, 2016).

۳. ۱۲. آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش خشکی و کم‌آبیاری بر APX در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). بیش‌ترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح ۵۵ درصد ظرفیت زراعی (۲۱۰ درصد افزایش نسبت به شاهد) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با فعالیت این آنزیم در سطح ۳۵ درصد (۱۵۳ درصد افزایش) نداشت، اما به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از این مقدار در سایر سطوح ظرفیت زراعی بود (جدول ۴). نتایج بررسی تنش خشکی بر فعالیت آنزیم APX در سایر درختان میوه از جمله، قهوه (Marracini, 2012)، گردو (Karimi *et al*., 2020)، گردو چینی (Sharma *et al*., 2020) و هم‌چنین بادام (Anjum *et al*., 2016)، نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بود که نتایج حاصل از این پژوهش با گزارش‌های ذکرشده، همسو می‌باشد. فعالیت این آنزیم در مرکبات بسته به رقم کاهش یا افزایش نشان داد (Conceicao dos Santos *et al*., 2019) و در انار تحت تنش خشکی بدون تغییر ماند (Bompadri *et al*., 2014). آنزیم آسکوربات پراکسیداز مانند یک سیگنال مولکولی می‌تواند پراکسیدهیدروژن را تنظیم کند و نقش مهمی در فعالیت روزنه‌ها از طریق تنظیم غلظت H_2O_2 در سلول گیاهان تحت تنش شوری دارد، چرا که غلظت این ترکیب به‌عنوان یکی از سیگنال‌های مهم در به حرکت درآوردن سلول‌های محافظ روزنه عمل می‌کند. گزارش شده این آنزیم به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها دارای چندین نقش اساسی در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه مانند رشد، نمو و متابولیسم است (Da-Li *et al*., 2019). هم‌چنین به‌عنوان یک احیاکننده برای بسیاری از رادیکال‌های آزاد و به‌ویژه پراکسیدهیدروژن عمل می‌کند و خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به کم‌ترین مقدار می‌رساند. آسکوربیک اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، با سوپراکسید و رادیکال پراکسیدهیدروژن برای تشکیل مونودهیدروآسکوربات و یا دهیدروآسکوربات واکنش می‌دهد. این شکل احیاشده، دوباره به‌وسیله آنزیم مونودهیدرواسکوربات ریداکتاز و دهیدرواسکوربات ریداکتاز و هم‌چنین با استفاده از مقادیر مساوی NADPH و گلوتاتیون به آسکوربیک‌اسید تبدیل می‌شود. پیشنهاد شده است که پراکسیدهیدروژن در کلروپلاست به‌وسیله به‌هم پیوستن چرخه آسکوربات و گلوتاتیون ریداکتاز از میان می‌رود. مشخص شده است کلروپلاست‌ها، سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن را در مکان‌هایی روی تیلاکوئید تولید می‌کنند که معمول‌ترین آن فتوسیستم I است (Kafi *et al*., 2010).

زمانی‌که گیاه در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرد با تنظیم تبادلات گازی (محدودکردن فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و تعرق) و فعال‌کردن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی به تنش خشکی پاسخ می‌دهد (Jain *et al*., 2011). پیشنهاد شده است تنش خشکی ابتدا باعث تولید آبسیزیک‌اسید شده که این هورمون تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر را افزایش می‌دهد و باعث بیان سامانه آنتی‌اکسیدانی می‌شود. دو نوع آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاهان وجود دارد.

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ریدوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و دیگر آنزیم‌های چرخه آسکوربات- گلوتاتیون می‌باشد. وظیفه عمده این آنزیم‌ها تجزیه پراکسید هیدروژن می‌باشد. ظرفیت و توانایی سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌تواند از آسیب ناشی از تنش جلوگیری کند که این مسئله به مقاومت گیاهان به تنش مربوط می‌شود (Khan *et al*., 2004). گیاهان تحت تنش در برابر اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌وسیله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز) محافظت می‌شوند و در واقع این سامانه آنتی‌اکسیدانی باعث مقاومت گیاهان به تنش می‌شود. در گیاهان تحت تنش، افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نوعی مکانیسم سازگاری در مواجهه با افزایش گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد. در گیاهان SOD نقش اصلی را در مقابل تنش اکسیداتیو دارد کـه سبب تبدیل رادیکال سوپراکسید به اکسیژن و پراکسید هیدروژن می‌شود که در نتیجه پراکسیدهیدروژن توسط آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به آب و مولکول اکسیژن تبدیل و تنظیف می‌شوند. سطح سلولی H_2O_2 در گیاهان بیش‌تر توسط فعالیت‌های آنزیمی کاتالاز و پراکسیدازها تنظیم می‌شود (Sharma *et al*., 2020)، با توجه به اهمیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در پاکسازی رادیکال پراکسیدهیدروژن و جلوگیری از تنش اکسیداتیو ناشی از کمبود آب، به‌نظر می‌رسد در این پژوهش با افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز همزمان با افزایش بیش‌تر فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم واندرفول باعث می‌شود که اثرات منفی تنش اکسنده ناشی از رادیکال‌های فعال اکسیژن کم‌تر صورت بگیرد و در نتیجه این رقم مقاومت بیش‌تری به تنش خشکی نشان دهد. به‌نظر می‌رسد آسکوربات پراکسیداز در رقم واندرفول درگیر حذف رادیکال‌های پراکسیدهیدروژنی است که به‌وسیله کاتالاز تنظیف نشدند.

۴. نتیجه‌گیری

تنش خشکی از طریق تأثیر بر برخی از فرایندهای متابولیسمی باعث تغییر در رفتار و درنهایت مقاوم‌سازی گیاه می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که نهال انار رقم واندرفول تحت تنش خشکی و کم‌آبی با افزایش و بهبود فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و هم‌چنین فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر-آنزیمی همانند رنگدانه‌های کاروتنویید، آنتوسیانین و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه همانند فلاونوییدها و تجمع اسمولیت‌های تنظیم اسمزی و محافظ سلولی نظیر پرولین، در مقابل تنش کم‌آبی و خشکی مقاومت می‌کند. مکانیسم‌های تحمل به خشکی در رقم واندرفول می‌تواند در ارتباط با تنظیم اسمزی فعال و هم‌چنین نتیجه سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی و آنزیمی فعال در این رقم باشد.

ارائه روش‌های مدیریتی مطلوب برای اصلاح ارقام برتر و مقاوم به شرایط نامناسب در ایران که جزو مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان محسوب می‌شود، اهمیت زیادی دارد. در این راستا واردکردن ارقام خارجی و شناسایی مقاومت‌های موجود در این ارقام و مقایسه با ارقام بومی، لازمه پیشبرد برنامه‌های اصلاح درختان میوه می‌باشد که ابتدا باید سازگاری این رقم با مناطق موردنظر برای کاشت بررسی شود. زیرا انار در مناطق مختلف صفات کمی و کیفی متفاوتی را نشان می‌دهد و باید پس از اخذ نتیجه در خصوص مقاومت یا حساسیت رقم به انواع تنش‌ها و بررسی عملکرد کمی و کیفی و بازارپسندی آن در جهت جلوگیری از خسارت‌های احتمالی در آینده، نسبت به توسعه کشت آن در آن مناطق مورد نظر اقدام گردد.

۵. تشکر و قدردانی

حمایت مالی از این پژوهش توسط دانشگاه شیراز و وزارت علوم، تحقیقات و فناوری (MSRT) انجام شده است.

۶. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۷. منابع

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanova, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell and Environment, 24(12), 1337-1344. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x

Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., khan, E. A., Kachhap, K., Mohamed, A. A., Thangave P Devi, G. D., Vasudhevan, P., Sofo, A., Khan, N. A., Misra, A. N., Lukatkin, A. S., Singh, H. P., Pereira, E., & Tuteja, N. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase-representative H2O2-detoxifying heme enzymes in plants. Environmental Science and Pollution Research, 23, 19002–19029. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6

Bahantana, P., & Lazarovitch, N. (2010). Evapotranspiration, crop coefficient and growth of two young pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties under salt stress. Agriculture Water Management. 97, 715-722. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2009.12.016

Bastam, N., Baninasab, B., & Ghobadi, C. (2012). Improving salt tolerance by exogenous application of salicylic acid in seedlings of pistachio. Journal of Plant Growth Regulation, 69, 275-284. https://doi.org/10.1007/s10725-012-9770-7

Bates, L., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39, 205-207. http://dx.doi.org/10.1007/BF00018060

Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44, 276-287. https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8

Bompadre, M. J., Silvani, V. A., Bidondo, L. F., Rios de Molina, M. D. C., Colombo, R. P., Pardo, A. G., & Godeas, A. M. (2014). Arbscular mycorrhizal fungi alleviate oxidative stress in pomegranate plants growning under different irrigation conditions. Botany, 92(3), 187-193. https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0169

Catola, S., Marino, G., Emiliani, G., Huseynova, T., Musayev, M., Akparov, Z., & Maserti, B. E. (2016). Physiological and metabolomic analysis of *Punica granatum* L. under drought. Planta, 243(2), 441-9. https://doi.org/ 10.1007/s00425-015-2414-1

Chalker-Scott, L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. Photochemistry and Photobiology, 70(1), 1-9. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb01944.x

Chin, L. (2007). Investigations into lead (Pb) accumulation in *Symphytum officinale* L.: A Phytoremediation Study. Ph.D Thesis, University of Canterbury, New Zealand.

Conceicao dos Santos, I., Furtado de Almeida, A. A., Priminho Pirovani, C., Gilberto, M., Costa, C., Santos da Conceicao, A., Soares, Filho, W. S., Coelho Filho, M. A., & Silva Gesteira, A. (2019). Physiological, biochemical and molecular responses to drought conditions in field-grown grafted and ungrafted citrus plants. Environmental and Experimental Botany, 37, 33-42. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.03.018

Da-Li, G., li-yuan, L., Ming-jia, Y., Xiao-xia, SH., Li-juan, J., Hai-yan, L., Li-ping, W., Yan, Y., Ji-di, X., Cui-ying, L., Jian-tao, Y., Feng-wang, M., & Qing-mei, G. (2019). Physiological and transcriptomic analyses of roots from Malus sieversii under drought stress. Journal of Integrative Agriculture, 18(6), 1280-1294. https://doi.org/10.1016/s2095-3119(19)62571-2

Dhindsa, R. S., Dhindsa, P. P., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased level of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany, 32, 93-101. https://doi-org.eres.qnl.qa/10.1093/jxb/32.1.93

Doulati Baneh, H., Ahmadaali, J., & Rasouli, M. (2019). Effects of drought stress on some morphophysiological traits of some iranian and foreign commercial grape varieties. Pomology research, 4(2), 127-142.

Ebtedaie, M., & Shekafandeh, A. (2017). Antioxidant and carbohydrate changes of two pomegranate cultivars under deficit irrigation stress. Spanish Journal of Agricultural Research, 14(4), 8-9. https://doi.org/10.5424/sjar/2016144-9317

Eftekhari Shahabadi, A. (2017). Interaction of drought stress and foliar application of salicylic acid and kaolin on morphophysiological and biochemical responses of two pomegranate cultivars. Master Thesis, Shiraz University. (In Persian)

Esna-Ashari, M., & Hassani Moghadam, E. (2021). Selection of six commercial iranian pomegranates (Punica granatum L.) cultivars for drought stress tolerance based on some leaf nutrient elements. Horticultural Science, 35(3), 355-365. (In Persian) https://doi.org/10.22067/jhs.2021.60222.0

Gao, T., Zhang. Z., Liu, X., Wu. Q., Chen, Q., Liu, Q., Nocker, S.V., Ma, F., & li, C. (2020). Physiological and transcriptome analyses of the effects of exogenous dopamine on drought tolerance in apple. Plant Physiology and Biochemistry, 148, 260-272. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.022

Gholami, M., Rahemi, M., Kholdebarin, B., & Rastegar, S. (2012). Biochemical responses in leaves of four fig cultivars subjected to water stress and recovery. Scientia Horticulturae, 148, 109-117. https://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.005

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinert in abiotic stress in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48(12), 909-930. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016

Grieve, C. M., & Grattan, S. R. (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant and Soil, 70, 303-307.

Haddad, R., & Mokhlesian, S. (2015). Effect of silicon on the peroxidase gene expression and morphological traits of barley under drought stress. Journal of Cell and Tissue, 6(4), 451-460. (In Persian) https://doi.org/10.52547/jct.6.4.451

Hanci, F., & Cebeci, E. (2014). Investigation of proline, chlorophyll and carotenoids changes under drought stress in some onion (*Allium Cepa* L.) cultivars. Turkish Journal Of Agricultural And Natural Sciences, 2, 1499-1504.

Hassani Moghadam, E., Esna-Ashari, M., & Rezaeinejad, A. (2015). Effect of drought stress on some physiological characteristics in six commercial iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars. Plant Products Thechnology, 15(1), 1-11. (In Persian).

He, J. D,. Zou, Y. N., Wu, Q. S., & Kca, K. (2020). Mycorrhizas enhance drought tolerance of trifoliate orange by enhancing activities and gene expression of antioxidant enzymes. Scientia Horticulturae, 256, 108745. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108745

Health, R. I., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics, 125(1), 189-198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1

Jain, S. M., Al-Khayri, J. M., & Johnson, D. V. (2011). Date Palm Biotechnology. Springer Science and Business Media, Heidelberg, London, New York, 743 p.

Kafi, M., Borzoee, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoumi, A., & Nabati, J. (2010). Physiology of Environmental Stresses in Plant. Mashhad university Jahad. (In Persian)

Karimi, S., Karami, H., Vahdati, K., & Mokhtassi-Bidgoli, A. (2020). Antioxidative responses to short-term salinity stress induce drought tolerance in walnut. Scientia Horticulturae, 267, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109322

Karimi, S., Yadollahi, A., & Arzani, K. (2013). Responses of almond genotypes to osmotic stress induced in vitro. Journal of Nuts, 4(4), 1-7. (In Persian)

Khan, M. A., Gul, B., & Weber, D.J. (2004). Action of plant growth regulators and salinity on seed germination of ceratoides lanata. Canadian Journal of Botany, 82, 37-42. https://doi.org/10.1139/B03-140

Liu, J., lin Deng, J., & Tian, Y. (2020). Transcriptome sequencing of the apricot (*Prunus armeniaca* L.) and identification of differentially expressed genes involved in drought stress. Phytochemistry, 171(6), 112226. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112226.

Lu, S., Wang, Z., Niu, Y., Guo, Z., & Huang, B. (2008). Antioxidant responses of radiation-induced dwarf mutants of bermudagrass to drought stress. Journal of the American Society for Horticultural Science, 133(3), 360-366. https://doi.org/10.21273/JASHS.133.3.360

Lutts, S., Kinet, J., & Bouharmont, J. (1996). Nacl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Annals of Botany, 78(3), 389-398. https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0134

Marraccini, P., Vinecky, F., Alves, G. S. C., Ramos, H. J. O., Elbelt, S., & Vieira, N. G. (2012). Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. Journal of Experimental Botany, 63(11), 4191-4212. https://doi.org/10.1093/jxb/ers103

Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and cell physiology, 22(5), 867-880. https://doi.org/10.4236/ajac.2014.511081

Nishida, Y., Yamashita, E., & Wataru, M. (2007). Quenching activities of common hydrophilic and lipophilic antioxidants against Singlet Oxygen Using Chemiluminescence Detection System. Carotenoid Science (An Interdisciplinary Journal of Research on Carotenoids), 11, 16-20.

Ozden, M., Demirel, U., & Kahraman, A. (2009). Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H2O2. Scientia Horticulturae, 119(2), 163-168. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.07.031

Pakzad, R., Fatehi, F., Kalantar, M., & Maleki, M. (2019). Evaluating the antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proteomic profile changing in UCB-1 pistachio rootstock leaf under drought stress. Scientia Horticulturae, 256 (108617), 1-12. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108617

Parvin, P., Khezri, M., & Tavasoliyan, I. (2014). Effects of drought stress on some morphological, physiological and biochemical parameters of persian walnut seedling (*Juglans regia* L.). Journal of Plant Production Research, 21(3), 1-25. (In Persian)

Pena, M. E., Artés-Hernández, F., Aguayo, E., Martínez-Hernández, G. B., Galindo, A., Artes, F., & Gomez, P. A. (2013). Effect of sustained deficit irrigation on physicochemical properties, bioactive compounds and postharvest life of pomegranate fruit (cv. 'Mollar de Elche'). Postharvest Biology and Technology, 86, 171-180. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.034

Rad, M. H., Asghari, M. R., & Asareh, M. H. (2015). The Effects of Drought Stress on Growth, Yield and Fruit Quality of Pomegranate (*Punica granatum* L.) cv. Rababe Niriz Under Dry Climate Condition. Seed and Plant Production Journal, 35(1), 75-90. (In Persian) https://doi.org/10.22092/sppj.2017.110567

Sharma, A., Wang, J., Xu, D., Tao, S., Chang, S., Yan, D., Li, Z., Yuan, H,., & Zheng, B. (2020). Melatonin regulates the functional components of photosynthesis, antioxidant system, gene expression, and metabolic pathways to induce drought resistance in grafted *Carya cathayensis* plants. Science of the Total Environment, 713(136675), 44 p. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136675.

Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal of Experimental Botany, 58(2), 221-227. https://doi.org/10.1093/jxb/erl164

Taiz., L., & Zeiger, E. (2006). Plant physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates. Inc: Publishers Sunderland Massachusetts, 738 p.

Tavousi, M., Kaveh, F., Alizadeh, A., Babazadeh, H., & Tehranifar, A. (2014). Integrated Impact of salinity and drought stress on quantity and quality of pomegranate (*Punica granatum* L.). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences, 4(1), 146-151.

Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidatative stress and some antioxidative systems in acid raine treated bean plants. Plant Science, 51, 59-99. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1

Wang, Z., Li, G., Sun, H., Li. M., Guo, Y., Zhao, Y., Gao, H., & Mei, L. (2018). Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. Biology Open, 7(11), https://doi.org/10.1242/bio.035279

Xiaoyue, c., Jianan, X., Bo, Zh., Chengcheng, Ch., Yunyun, T., Pingying, Zh., & Jianxia, Zh. (2020). Physiological change and screening of differentially expressed genes of wild Chinese *Vitis yeshanensis* and American *Vitis riparia* in response to drought stress. Scientia Horticulturae, 266, 109140. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109140

Zarafshar, M., Akbarinia, M., Askari, H., Hosseini, S. M., Rahaie, M., Struve, D., & Striker, G. G. (2014). Morphological, physiological and biochemical responses to soil water deficit in seedlings of three populations of wild pear tree (*Pyrus boisseriana*). Biotechnology Agronomy Society and Environment, 18(3), 353-366.