

بررسی اثر تنش کم آبی بر میزان پروتئین محلول و اسید آمینه پرولین در سه رقم نخود ایرانی

منیژه سبکدست * و فرنگیس خیال پرست *

چکیده

اثر تنش ناشی از عدم تأمین آب کافی بر میزان پروتئین محلول و اسید آمینه پرولین در سه رقم نخود ایرانی (جم، پیروز و کوروش) در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در گلخانه بررسی شد. سطوح آبیاری شامل روزانه، سه، شش و نه روز یک نوبت بود. میزان پروتئین محلول و اسید آمینه پرولین برگ و ریشه در دو مرحله رویشی و زایشی اندازه‌گیری شد. بر اثر تنش ناشی از کم آبی میزان پروتئین‌های محلول در برگ و ریشه در دو مرحله رشد کاهش یافت. مقدار اسید آمینه پرولین در مرحله رویشی بیشتر از مرحله زایشی و میزان آن در رقم پیروز بیشتر از دو رقم جم و کوروش بود. این امر نشان می‌دهد که تحمل رقم نخود پیروز نسبت به تنش آبی بیشتر از دو رقم دیگر می‌باشد. واژه‌های کلیدی: پروتئین محلول؛ اسید آمینه پرولین؛ تنش کم آبی؛ مرحله رویشی و زایشی؛ نخود ایرانی

* - مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران - ایران

نخود از گیاهان تیره لگومینوز است و دانه آن ۱۸-۲۵ درصد پروتئین دارد (۲۷). این گیاه در مناطق وسیعی از ایران از جمله آذربایجان و کردستان به طور دیم و آبی کشت می‌شود.

در شرایط کمبود آب در گیاهان علاوه بر تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی، تغییرات بیوشیمیایی نیز به وجود می‌آید (۱۰ و ۲۶). بررسی این تغییرات از نظر شناخت چگونگی مقاومت گیاهان در مقابل کم‌آبی اهمیت دارد. از واکنش‌های بیوشیمیایی ناشی از کمبود رطوبت محیط تغییر میزان پروتئین‌ها و اسید آمینه‌های گیاه است (۴، ۷ و ۲۴). بر اثر تنش کم‌آبی میزان تجمع اسید آمینه پرولین و همچنین اسید آمینه‌های دیگر نظیر آسپارژین در گیاه افزایش می‌یابد.

معمولاً میزان پرولین آزاد در گیاهانی که در حد مطلوب آبیاری می‌شوند بسیار کم و در حدود ۰/۲-۰/۶ میلی‌گرم در گرم ماده خشک می‌باشد. مقدار این ماده پس از کاهش آب بافت‌ها تا ۵۰-۴۰ میلی‌گرم در هر گرم ماده خشک افزایش می‌یابد. در برخی از گیاهان در مراحل اولیه تنش کم‌آبی چندین اسید آمینه افزایش می‌یابند که با ادامه کم‌آبی فقط اسید آمینه پرولین بیشتر تجمع ذخیره می‌شود (۲۷).

این متابولیت‌ها که به صورت منفرد یا همراه با یکدیگر به منظور کمک به تنظیم و تعادل اسمزی در شرایط کاهش ظرفیت آب سلول ناشی از تنش کم‌آبی، سرما و غیره ذخیره می‌شوند محلول‌های

سازگار نامیده می‌شوند (۱۶، ۲۳ و ۳۱). نظر به اهمیت نخود به عنوان یکی از حبوب مهم در تغذیه انسان و کم بودن میزان تولید آن نسبت به مصرف قابل توجه این محصول در ایران ضرورت افزایش سطح کشت آن احساس می‌شود. با توجه به وجود مشکل کم‌آبی در ایران لازم است برای توسعه کشت این محصول در مورد مقاومت به خشکی و بهره‌وری مصرف آب گیاه تحقیق شود.

مواد و روشها

مهمترین ارقام اصلاح شده نخود ایران عبارت از نخود سفید جم^۱ و نخود سفید کوروش^۲ با ۱۸-۲۸ درصد پروتئین و نخود سیاه کاکا و قهوه‌ای پیروز^۳ با ۲۲-۲۸ درصد پروتئین می‌باشند. در تحقیق حاضر از این ارقام برای بررسی اثر تنش کم‌آبی بر تغییرات ترکیب شیمیایی استفاده شد.

بذر ارقام مورد نظر از بخش حبوب دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه و پس از ضدعفونی، چهار عدد بذر در هر گلدان خیاری با خاک استریل کشت شد. گلدان‌ها در شرایط طبیعی و براساس روال معمول آبیاری شدند.

پس از رشد بذر ها از بین گلدان‌های مزبور تعداد ۳۰ گلدان یکسان از نظر شکل و اندازه به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل

۱ - *Cicer arietinum* CV. Jam

۲ - *Cicer arietinum* CV. Koorosh

۳ - *Cicer arietinum* CV. Pyroze

شده است. تنش کم‌آبی سبب کاهش میزان پروتئین‌های محلول در اندام برگ و ریشه گیاه نخود شد. کاهش میزان پروتئین‌های محلول در مرحله رویشی و در مرحله زایشی در برگ معنی‌دار بود ($P < 0/01$). تفاوت میزان پروتئین در برگ ارقام مختلف نخود و دو مرحله رشد معنی‌دار نبود ولی در ریشه معنی‌دار بود ($P < 0/01$). اثر متقابل (رقم \times آبیاری) برای پروتئین محلول برگ معنی‌دار بود ($P < 0/01$). به‌طور کلی کم‌آبی سبب کاهش میزان پروتئین گیاه و بروز تغییرات متابولسمی می‌شود (۲۱). افزایش میزان آبسزیک اسید در تنش کم‌آبی گزارش شده است (۲ و ۳). افزایش غلظت آبسزیک اسید در آپوپلاست برگ گیاهانی که تحت تأثیر تنش کم‌آبی قرار دارند یک عامل مؤثر رفتار روزنه‌ای است. در سطح خارجی سلول‌های محافظ تعدادی گیرنده وجود دارند که با اتصال آبسزیک اسید به آن‌ها تغییراتی در تراوای غشاء صورت می‌گیرد. بر اثر کاهش اسمولاریته سلول‌های محافظ فشار تورژسانس کاهش می‌یابد و باعث بسته شدن روزنه می‌شود. بسته شدن روزنه باعث کاهش سرعت فتوسنتز و تنفس نوری می‌شود (۵). بدین‌ترتیب با کاهش انرژی قابل دسترس، سنتز پروتئین کاهش می‌یابد. همچنین کاهش غلظت پروتئین در شرایط تنش می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین نیز باشد (۲۹، ۳۰ و ۳۳). لذا از میزان پروتئین برگ به‌عنوان یک معیار به‌منظور ارزیابی مقاومت به خشکی استفاده می‌شود (۲۰).

تصادفی با چهار تیمار فواصل آبیاری یک، سه، شش و نه روز در سه تکرار تقسیم‌بندی شدند. در مرحله رویشی (۴۵ روز پس از کاشت) و زایشی (۶۵ روز پس از کاشت) برگ و ریشه گیاهان برداشت و خاک اطراف ریشه آنها به‌دقت شسته و تمیز شد.

برگ و ریشه هر کدام از گیاهان به‌طور جداگانه در بسته‌های پلاستیکی در فریزر با دمای -5 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول از طریق همگن کردن (۶)، یک گرم برگ یا ریشه تازه و آبدار به پنج میلی‌لیتر فسفات بافر $0/1$ مولار ($pH = 7$) اضافه شد. مخلوط همگن برای صاف شدن در دستگاه سانتریفوژ با سرعت 15000 دور و دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه قرار داده شد. میزان پروتئین محلول رویی با استفاده از سرم آلبومین گاوی^۱ به‌عنوان پروتئین استاندارد در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 595 نانومتر اندازه‌گیری شد (۹ و ۳۴).

محتوای $0/5$ گرم برگ یا ریشه آبدار استخراج شد و غلظت پرولین نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر به کمک غلظت‌های مشخص پرولین خالص به‌عنوان شاهد در طول موج 520 نانومتر تعیین شد (۸).

نتایج و بحث

میانگین مقادیر پرولین و پروتئین در تیمارهای مختلف در دو مرحله نمونه‌گیری در جدول ۱ ارایه

۱ - Bovine serum - albumin

جدول ۱ - میانگین پروتئین محلول (میلی گرم بر وزن تر) و پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر) برگ و ریشه سه رقم نخود

رقم	مرحله زایشی				مرحله رویشی				منابع تغییرات
	پرولین	برگ	ریشه	برگ	پرولین	برگ	ریشه	برگ	
۱۶/۳ ^b	۲۱/۵ ^b	۷/۱ ^b	۸/۳ ^b	۱۹/۹ ^b	۲۰/۷ ^a	۶/۶ ^a	۹/۲ ^a	جسم	
۱۸/۷ ^a	۲۴/۱ ^a	۹/۳ ^a	۹/۴ ^a	۱۷/۷ ^a	۲۰/۹ ^a	۶/۹ ^a	۸/۷ ^a	پیروز	
۱۶/۱ ^b	۲۱/۸ ^b	۷/۲ ^b	۶/۳ ^c	۱۸/۳ ^b	۲۱/۷ ^a	۶/۵ ^a	۶/۷ ^b	کوروش	
								آبیاری	
۱۲/۷ ^d	۱۴/۴ ^d	۹/۱ ^a	۱۱/۵ ^a	۱۳/۹ ^d	۱۱/۳ ^d	۹/۴ ^a	۱۱/۸ ^a	هرروز	
۱۵/۷ ^c	۱۹/۲ ^c	۸/۳ ^a	۸/۷ ^b	۱۷/۹ ^c	۱۶/۸ ^c	۸/۳ ^b	۹/۱ ^b	سه روز	
۱۸/۹ ^b	۲۷ ^b	۷/۵ ^b	۷/۲ ^c	۲۱/۱ ^b	۲۶/۶ ^b	۴/۹ ^c	۷/۴ ^c	شش روز	
۲۰/۸ ^a	۳۲/۹ ^a	۶/۳ ^c	۴/۵ ^d	۲۳ ^a	۲۹/۷ ^a	۳/۹ ^d	۴/۵ ^d	نه روز	

در هر ستون تفاوت بین میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک معنی دار نیست ($P < 0.05$).

مرحله زایشی		مرحله رویشی		منابع تغییرات				
پروتلین محلول		پروتلین محلول		پروتئین محلول				
ریشه	برگ	ریشه	برگ	ریشه	برگ			
۱۲/۸۷۷ ^a	۱۲/۷۵۳ ^a	۸/۱۹۰۷ ^b	۱۲/۱۳۵ ^a	۱۴/۰۸ ^b	۱۱/۸۱۳ ^a	۸/۵۶۶ ^a	۱۳/۵۶۲ ^a	هر روز آبیاری × جم
۱۴/۱۷۷ ^a	۱۶/۴۱۳ ^a	۱۰/۴۰۷۳ ^a	۱۲/۶۹۱ ^a	۱۶/۲۸۰۰ ^a	۱۲/۲۰۰ ^a	۱۰/۱۴۳۶ ^a	۱۳ ^a	هر روز آبیاری × پیروز
۱۰/۷۹۳ ^a	۱۳/۸۹۰ ^a	۸/۵۶۶ ^b	۹/۶۵ ^b	۱۱/۵۳۳ ^c	۱۰/۰۵۳۳ ^a	۹/۴۳۸۷ ^a	۱۲ ^a	هر روز آبیاری × کوروش
۱۴/۸۲ ^a	۱۸/۷۴۳ ^a	۸/۱۲۴۰ ^b	۸/۷۶۴ ^a	۱۸/۰۶۰ ^a	۱۵/۲۹۰ ^a	۷/۷۶۴۰ ^a	۹/۴۳ ^a	سه روز آبیاری × جم
۱۵/۱۱ ^a	۲۱/۲۷۰۰ ^b	۹/۸۳۲ ^a	۱۲/۱۴۵۳ ^b	۱۸/۸۵۰ ^a	۱۸/۰۳۳ ^a	۸/۶۸۲۰ ^a	۱۰/۲۷۹ ^a	سه روز آبیاری × پیروز
۱۴/۴۱ ^a	۱۷/۶۰۶ ^b	۸/۱۳۲۷ ^b	۶/۱۴۹ ^c	۱۶/۶۶۰ ^a	۱۷/۲۲۰ ^a	۸/۵۶۹۰ ^a	۷/۵۴۷ ^b	سه روز آبیاری × کوروش
۲۰/۴۵۰۰ ^a	۲۵/۵۰۶ ^b	۶/۴۶۷۳ ^b	۸/۰۵۱ ^b	۱۹/۶۸۳۳ ^b	۲۶/۳۲۳ ^a	۵/۶۸۳۳ ^a	۸/۲۸۸ ^a	شش روز آبیاری × جم
۱۸/۳۱۳ ^a	۲۸/۳۳۶ ^a	۹/۳۰۷۳ ^a	۱۲/۱۴۵۳ ^a	۲۱/۳۹۳ ^a	۲۷/۴۹۰ ^a	۴/۵۶۱۳ ^a	۷/۶۷۰ ^{ab}	شش روز آبیاری × پیروز
۱۸/۰۷۳ ^a	۲۷/۱۶۳ ^a	۶/۸۴۱۰ ^b	۵/۳۳۳ ^c	۲۲/۰۴۳ ^a	۲۶/۱۲۷ ^a	۴/۸۰۶۷ ^a	۶/۱۲۲ ^b	شش روز آبیاری × کوروش
۱۹/۷۱۳ ^b	۲۷/۷۶۷ ^a	۵/۶۹۴۳ ^b	۴/۲۸۹۳ ^{ab}	۲۰/۹۹۳ ^b	۲۹/۴۷۳ ^a	۴/۴۶۳۷ ^a	۵/۹۸۰ ^a	نه روز آبیاری × جم
۲۲/۴۹۳ ^a	۳۰/۴۳۷ ^a	۷/۶۶۰۰ ^a	۵/۴۴۱ ^a	۲۳/۳۹۷ ^{ab}	۲۹/۲۹۷ ^a	۳/۹۹۴۳ ^a	۵/۰۱۷۷ ^{ab}	نه روز آبیاری × پیروز
۱۹/۶۱۰ ^b	۲۸/۷۱۷ ^a	۵/۴۱۴۳ ^b	۳/۸۸۱ ^b	۲۴/۷۱۸ ^a	۳۰/۳۴۰ ^a	۳/۳۶۶۷ ^b	۲/۸۶۸۳ ^b	نه روز آبیاری × کوروش

میانگین‌ها به‌طور جداگانه برای ارقام و رژیم‌های رطوبتی با آزمون چنددامنه دانکن در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شده‌اند و در هر ستون تفاوت بین میانگین‌های دارای حداقل دارای یک حرف مشترک معنی‌دار نیست.

مقدار اسید آمینه پرولین با زیاد شدن شدت تنش کم آبی بیشتر بود و میزان پرولین در رقم پیروز بیشتر از دو رقم دیگر و در برگ بیشتر از ریشه بود. این امر در مورد نخود (۱۱ و ۱۸)، اسفناج (۲۵)، کلم (۱۴)، گوجه فرنگی (۱۵) و ذرت (۱۷ و ۲۲) نیز گزارش شده است. بسیاری از گیاهان در شرایط تنش کم آبی یا شوری مواد اسمزی سازگار را در خود ذخیره می نمایند. این مواد اسمزی نه تنها مانع واکنش های بیوشیمیایی طبیعی نمی شوند بلکه به عنوان ماده اسمزی محافظت کننده در مرحله تنش اسمزی عمل می نمایند. از جمله مواد محلول سازگار (سازشی) شناخته شده پرولین است (۲۳، ۲۸ و ۳۵).

در شرایط تنش ناشی از کم آبی افزایش سطح پرولین در تنظیم اسمزی نقش دارد و چاهک های^۱ غیرسمی برای نگهداری کربن و ازت فراهم می آورد (۱۹). همچنین میزان ذخیره پرولین با توانایی گیاه برای زنده ماندن در شرایط کمبود آب مرتبط می باشد (۲۳ و ۳۲).

مقدار اسید آمینه پرولین در برگ بیشتر از ریشه بود که علت آن ممکن است به چگونگی جذب و انتقال مواد مربوط باشد. اصولاً مقدار پروتئین در اندام هوایی و در برگ ها که محل سنتز و مصرف آنها می باشد بیشتر است (۱). مقدار اسید آمینه پرولین در مرحله رویشی بیشتر از مرحله زایشی بود ($P < 0/01$). در مرحله زایشی قسمت اعظم مواد تولید شده از برگ ها به طرف میوه ها حرکت می کند

و در نتیجه ذخیره مواد در برگ ها کاهش می یابد (۱۲). در ضمن گیاهان در مرحله رویشی در برابر تنش ناشی از کم آبی مقاوم تر از مرحله زایشی می باشند (۱۲). در حقیقت تنظیم اسمزی در آنها بهتر انجام می گیرد و تجمع بیشتر اسید آمینه در این مرحله ممکن است یکی از عوامل مؤثر باشد. افزایش میزان اسید آمینه پرولین در رقم پیروز بیشتر از دو رقم دیگر بود. این امر با نتایج گزارش های محققین دیگر مبنی بر ذخیره مقادیر بیشتر اسید آمینه پرولین در رقم مقاوم تر مطابقت دارد (۳۱).

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران برای تأمین اعتبار مالی این تحقیق سپاسگزاری و قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

- ۱ - حکمت شعار، ح. ۱۳۷۲. فیزیولوژی گیاهی در شرایط دشوار. صص: ۲۰۳ - ۱۷۸.
- 2 . Alfredo A, Alves C and Setter L (2003) Abscisic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. Environmental and Experimental Botany PP: 1-13.
- 3 . Alves ACC and Setter TL (2000) Response of cassava to water deficit: leaf area growth and abscisic acid. Crop. Sci. 40: 131-137.

- 4 . Amthor JS and Cree KJ (1990) Carbon balance of stressed plants, a conceptual model for integrating research results. In: Alscher R. G, Cumming J. R. (eds) stress responses in plants; Adaptation and Acclimation Mechanism. Wiley- Liss inc., New York, PP: 1-15.
- 5 . Antolin MC and Sonchez Diaz M (1993) Effects of temporary droughts on the photosynthesis of alfalfa plants. J. of Experimental Botany 44(265): 1341-1349.
- 6 . Arulsekar S and Parfitt DE (1986) Analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. Hortscience 21: 928-933.
- 7 . Aspinal D and Paleg FJ (1981) Proline accumulation: Physiological aspects. In: paleg L. G, Aspinal, D. (eds) The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants. Academic, Press, London, PP: 206-242.
- 8 . Bates L, Waldren RP and Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205-207.
- 9 . Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein - dye binding. Annals Biochem 72: 248-254.
- 10 . Bray EA (1993) Molecular responses to water deficit. Plant Physiol. 67: 1035-1040.
- 11 . Clive WF (1984) Accumulation of low molecular weight solute in water stressed tropical legumes. Phytochemistry 23(5): 1007-1015.
- 12 . Elnadi AHS (1969) Water relation of beans, effects of water stress on growth and flowering (*Vicia faba*) Exp. Agric (5): 195-207.
- 13 . Fedina IS and Popora AV (1996) Photosynthesis, photorespiration and proline accumulation in water - stressed pea leaves. Photosynthetica 32: 213-220.
- 14 . Good - Allen G and Steven T (1994) The effects of drought stress on free aminoacids accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. Physiologia Planntarum 90(11): 9-14.

- 15 . Handa Sangita, Ray. A. Bressan, Aurtor, k. Handad Nicolas. Carpeta and Paul. M. Hasegawa (1983) Solutes contributing to osmotic adjustment in culture Plant cell adaptated to water stress. *Plant Physiol.* 73(3): 834-843.
- 16 . Ibarra - Caballer J, Villanura - Verduzco C, Molina - Galsnj and Sanchezde Gimenez E (1988) Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: A tissue differentiation requirement. *J. Exp. BOT.* 39: 889-897.
- 17 . James J, Wasson R, Neil Reass, Tom E, Schumacher E and Zeho W (1993) Diurnal osmotic adjustment, prolione and drought tolerance of maze, *Plant Sci and Bio. Microbio. Dept. South state uni: Brooking touts. DS. PP: 75-79.*
- 18 . Jose F, Munoz, Emillia Labrador, and Berta Dopico (1993) Effect of water (osmotic) stress on the growth of epicotyl of Cicer arietinum in relation to changes in the autolytic process and glyconhydrolytic cell wall enzymes. *Physiologia, Plantarum* 87(4): 544-551.
- 19 . Joyce PA, Aspinall D and Paleg LG (1992) Photosynthesis and accumulation of proline in response to water deficite. *Aust. J. Plant Physiology* 19: 249-261.
- 20 . Kul shreshtha S, Mishara DP, and Gupta KR (1987) Changes in contents of cholorphyll, proteins and lipids in whole chloroplast and chloroplast membrane fractions at different leaf water potentials in drought resistant and sensitive genotype of wheat. *Photosynthetica* 21: 65-70.
- 21 . Levit J (1980) Responses of plants to environment stresses (Chapter 1 and 2). Vol. II. Academic Press. New York. PP: 1-40.
- 22 . Luna - Marcella, Mourisia, Badian, Marcella, Fillici Franc, Actimi and G-Gio Vannozzi Semanil (1995) Selective enzyme activation under water stress in maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*) seeding. *Environ. Exp. Bio.* 25(2): 153-156.
- 23 . Nanjo T, Yoshiba Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinzaki K (1998) Roles of proline in osmotic stress tolerance and morphogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol Suppl.* 39: 104-108.

- 24 . Narender K and Singh (1985) Protein associated with adaption of cultured tobacco cells to NaCl and water stress. *Plant Physiol.* 79: 126-137.
- 25 . Navari - IZZO F, Guartacci R and Izzo MF (1990) Water stress induced changes in protein and free amino acids in field grown maize and sunflower. *Plant Physiol. Biochem.* 28(4): 531-537.
- 26 . Paleg LG and Aspinall D (1981) The physiology and biochemistry drought resistance in plant (Chapter 1 and 2) Academic Press, Sydney. PP: 1-24.
- 27 . Rajinder SD (1987) Glutation status and proteine synthesis during drought and subsequent dehydration in *Tortula ruralis*. *Plant. Physiol.* 83: 816-819.
- 28 . Samaras Y, Bressan RAC, Sonka LN, Garcia - Rios MG, Paino Durazo M and Rhodes D (1995) Proline accumulation during drought and salinity. In: Smirnof, N.(ed) *Environment and Plant Metabiolism: Flexibility and Achimation* Bios Scientific Oxford, PP: 161-187.
- 29 . Schinozaki K and Jamaguchi - Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Plant Biotechnology.* 7: 161-167.
- 30 . Schinozaki K and Jamaguchi - Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 161-167.
- 31 . Singh GP, Thakur S and Pai UK (1983) Free amino acid pattern in stress leaves of chickpea (*Cicer arietinum*). *Experimentia* (4): 40-44.
- 32 . Singht TN, Paley LG and Aspinall D (1973) Stress metabolism. III variation in response to water deficit in barley plant. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 65-76.
- 33 . Smirno FFN (1998) Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, PP: 214-219.
- 34 . Spies JR (1957) *Methods in enzymology: Preparation of buffers.* Academic Press - New York. 3: 142-144.
- 35 . Yoshiba Y, Kiyouse T, Katagiri T, Udea H, Mizoguchi T, Yanaguchi Shinozaki K, Wada K, Harda Y, and Shinozaki K (1995) Correlation between the induction of a gene for α Proline-5-carboxylase synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* 7: 751-760.

