جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی تأثیر تنش خشکی بر صفات فیزیولوژیکی جو بدون پوشینه (*Hordeum sativum* L.) در منطقه اقلید فارس

علیرضا باقری[۱*] و حجت‌اله مظاهری لقب[۲]

چکیده

در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری ایران رشد و عملکرد غلات به‌دلیل وجود تنش‌های خشکی و شوری کاهش پیدا می‌کند. در عین حال یکی از مناسب‌ترین گیاهان زراعی برای چنین شرایطی گیاه جو است. در حال حاضر، برای غلبه بر مشکلات تنش ژنوتیپ‌های مناسب و متحمل جو معمولی وجو بدون پوشینه تحت بررسی هستند. در این آزمایش به منظور بررسی میزان تحمل جو بدون پوشینه به خشکی، چهار ژنوتیپ (UH3، U46M، EHM81-12 و CM67) در ایستگاه تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد اقلید به مدت دو سال مورد بررسی قرار گرفتند. چهار تیمار (آبیاری پس از پتانسیل آب خاک ۰/۵- (شاهد)، ۱/۵- ، ۳- و ۵- bar) به‌کار برده شدند. تیمارها در آزمایش کرت‌های خرد شده بر اساس طرح پایه بلوک کامل تصادفی در چهار تکرار بررسی شدند. ژنوتیپ های جو بدون پوشینه به کرت‌های اصلی و تیمارهای آبیاری به کرت‌های فرعی تعلق گرفت. صفات مورد اندازه‌گیری شامل میزان فتوسنتز، تنفس و میزان کلروفیل، مقدارهورمون آبسیزیک اسید، پرولین و میزان آنزیم‌های پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در برگ پرچم بودند. داده ها با نرم افزار MSTATC تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد که تنش باعث کاهش فتوسنتز و میزان کلروفیل ولیکن باعث افزایش میزان آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز (به‌دلیل افزایش تولید مشتقات اکسیژن در تنش خشکی)، محتوی پرولین، ABA و میزان تنفس شد. ژنوتیپ UH3 کمترین مقدار فتوسنتز، کلروفیل، ABA وپرولین ولی ژنوتیپ CM67 بیشترین مقدار این صفات را داشتند. در مورد تنفس نتیجه عکس بود. به‌طورکلی، با توجه به صفات مورد بررسی، ژنوتیپ CM67 به‌عنوان ژنوتیپ متحمل و UH3 به‌عنوان ژنوتیپ حساس شناخته شدند.

واژه‌های کلیدی: آبسیزیک اسید، تنش خشکی، تنفس تاریکی، جو بدون پوشینه، فتوسنتز،

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۳

۱. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد اقلید
۲. دانشیار دانشگاه بوعلی سینا همدان
* مسئول مکاتبات: aliagrono@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه و بررسی منابع

گیاه جو بدون پوشینه دارای ریشه افشان و متراکم است و ریشه تا عمق ۱/۵ متری در خاک نفوذ می‌کند (El-Sayed, 2002). بیشترین تراکم ریشه‌ها در عمق ۱۵- ۲۵ سانتی‌متر مشاهده شده است. گوشوارک‌ها در این گیاه به طور کامل کشیده هستند و از روی یکدیگر عبور می‌کنند و زبانک بزرگ چسبیده به برگ و نامنظم است. ساقه سبز ترد و شکننده و ارتفاع ان زیاد است. دم گل آذین کشیده و محور اصلی سنبله[1] دارای ۲ تا ۳ انحناء است. پوشینه‌ها[2] در هنگام رسیدگی و برداشت از دانه جدا می‌شوند و به همین دلیل به آن جو لخت یا بدون پوشینه می‌گویند. به طور کلی در دانه جو ۱۸ـ۷ درصد پروتئین و ٦٠-٥٠ درصد نشاسته موجود می‌باشد در حالی که در جو بدون پوشینه میزان پروتئین ٢٤-١٤ درصد و مقدار نشاسته ٧٠-٦٠ درصد می‌باشد (El-Sayed, 2002). از نظر فیزیولوژی، خشکی باعث به‌وجود آمدن تنش‌های مختلف محیطی و کاهش ٣٠-٥٠ درصدی عملکرد گیاهان می‌شود. دلیل این رویداد رطوبت نسبی پایین در محیط رشد گیاه و به دنبال آن زیاد شدن تبخیر و تعرق، دمای زیاد و شدت نور می‌باشد. دمای زیاد ایجاد شده ناشی از تنش خشکی افزایش فعالیت آنزیمی، تنفس و کاهش فتوسنتز در گیاه را موجب می‌شود (Burke *et al.*, 1988). در شرایط تنش خشکی در توتون، تابش نور باعث تداوم واکنش نوری فتوسنتز و تولید رادیکال آزاد اکسیژن شده که منجر به اکسیداسیون نوری و در نهایت آن مرگ می‌شود (Broadbent *et al.*, 1995). جذب مواد غذایی نیز از اعماق زیر سطحی در شرایط تنش خشکی کاهش می یابد. هم‌چنین در شرایط افزایش شدت خشکی در برنج، تجمع نمک‌ها و یون‌ها در لایه‌های بالای خاک و اطراف ریشه باعث ایجاد تنش اسمزی و سمیت یونی می‌شود (Fukai and Cooper, 1995). اولین واکنش گیاه نسبت به تنش یک واکنش بیوفیزیکی است. در واقع با افزایش میزان تنش خشکی، دیواره سلولی چروکیده شده و باعث کاهش حجم سلول می‌گردد. در این شرایط توسعه سلول‌ها که وابسته به پتانسیل فشاری است نیز کاهش یافته و رشدگیاه کم می‌شود. لذا کوچک‌شدن اندازه برگ و تعداد برگ در گیاه نتیجه حضور و یا شدت تنش خشکی است (Mathews *et al.*, 1984). در شرایط تنش خشکی، ساخت ABA در سلول‌های محافظ و مزوفیل افزایش می‌یابد. با افزایش میزان ABA، پتاسیم از سلول محافظ خارج و کلسیم جای آن را می‌گیرد. این فرآیند بسته شدن روزنه را به‌دنبال خواهد داشت (Radin and Hendrix, 1988). در اثر کمبود آب، به‌دلیل کاهش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی، میزان فتوسنتز در گیاه کاهش می‌یابد. هم‌چنین کمبود آب باعث ایجاد کرک و تغییر رنگ برگ و افزایش روزنه در سطح زیرین برگ می‌شود. چنانچه کمبود آب شدید باشد ریشه چروکیده شده و خشبی می‌شود (Taize and Zeiger, 2006).

فوکایی و کوپر (Fukai and Cooper, 1995) بیان کردند که چون فتوسنتز بیشترین اثر را روی عملکرد دارد، تطابق اجزای انجام دهنده فتوسنتز با تنش خشکی یکی از سازوکارهای مهم در تحمل به خشکی است. هم‌چنین آن‌ها بیان داشتند که مطالعه روی تنش خشکی اغلب پیچیده است زیرا عواملی مانند زمان اعمال تنش و شدت واکنش گیاه به تنش روی اثر به‌وجود آمده دخالت دارند. هم‌چنین توانایی گیاهان در بهبود اثر ناشی از تنش، پس از گذراندن دوران تنش، نیز در این مورد مؤثر است. لودلو و همکاران (Ludlow *et al.*, 1990) شرایط نور زیاد، دمای زیاد و خشکی را عامل کاهش فتوسنتز و در نتیجه کاهش عملکرد در سورگوم گزارش کردند. هاوکس (Havaux, 1992) بیان داشت که تنش خشکی و دمای زیاد باعث کاهش کارایی فتوسنتزی و افزایش ممانعت نوری می‌شود. جاگ تاپ و همکاران (Jagtap *et al.*, 1998) اثر تنش زیادی نور، گرما و خشکی را روی میزان کلروفیل، فعالیت آنزیم های روبیسکو[3] و فسفوانول پایروات کربوکسیلاز[4]، میزان اکسیژن تولید شده در فتوسنتز و سطح فلورسانس کلروفیل در گیاه سورگوم را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند که راندمان فتوشیمیایی فتوسیستم II در چنین شرایطی کم شد و فعالیت PEPcase کاهش زیاد نشان داد. کاهش میزان فعالیت روبیسکو و مقدار کلروفیل فقط در شدت‌های بیشتر تنش‌های نور و خشکی اتفاق افتاد. ژنوتیپ‌های متحمل دارای فعالیت روبیسکو، مقدار اکسیژن تولیدی و راندمان فتوسیستم II بیشتری بودند. هم‌چنین

1. Rachis
2. Glumels (Lema, Palea)
3. Ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase (RUBISCO)
4. Phosphoenole pyrovate carboxylase (PEPcase)

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

در کلروپلاست آن‌ها میزان پروتئین کاپرونین ٦٠ بیشتر بود. نواری – ایزو و همکاران (Navari-Izzo *et al.*, 1994) بسیاری از خسارت‌های ناشی از تنش خشکی را به علت بازدارندگی اکسیداتیو دانستند. آن‌ها بیان داشتند که ارگانیسم‌های هوازی فتوسنتز کننده در طی دوره زندگی خود، گاهی در مقابل مقادیر قابل تغییری از خسارت‌های اکسیژن قرار می‌گیرند. این خسارت‌ها در شرایط کاهش میزان آب در دسترس بیشتر شده، نسبت NADP/CO2 کم و در نتیجه انتقال الکترون به اکسیژن بیشتر صورت می‌گیرد که این امر باعث تولید رادیکال‌های سوپراکسید می‌شود. این نوع رادیکال‌ها به لیپیدهای غشایی صدمه می‌زنند و آنزیم‌های حاوی گوگرد را غیر فعال می‌کنند. در حضور آهن و نمک رادیکال پراکسید تولید رادیکال هیدروکسیل می‌کند که به DNA، پروتئین، لیپید، کلروفیل و تقریباً کلیه اندامک‌های داخل سلول خسارت وارد می‌کند. Scandalios (1993) اظهار داشت که دو نوع مختلف اکسیژن سمی مانند $O2^-$، H2O2 و OH به عنوان عوامل اصلی آسیب در گیاهانی که در معرض تنش شوری قرار دارند مؤثر هستند. آسادا (Asada, 1994) اعلام کرد که پراکسید هیدروژن اولین ترکیب پایدار حاصل از اکسیژن است که اساساً از طریق دیسموتاسیون آنیون پراکسید و از واکنش‌های آنزیمی و یا غیر آنزیمی توسط سوپراکسید دیسموتاز[1] تولید می‌شود. در گیاهان عالی H2O2 توسط مسیر اسکوربات ـ گلوتاتیون و یا توسط یک نوع پراکسیداز غیر اختصاصی پالایش می‌شود. بناویدز و همکاران (Benavides *et al.*, 2000) در سورگوم، ارتباط بین تحمل به شوری و سیستم آنتی اکسیدانت را گزارش کردند. آن‌ها بیان داشتند که در ژنوتیپ‌های حساس، سیستم آنتی اکسیدانت به ۱۰۰ تا ۱۵۰ میلی مول کلرید سدیم واکنش نشان داد. در ۱۰۰ میلی مول کلرید سدیم میزان رشد و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز[2] و دی هیدرواسکوربات[3] بدون تغییر باقی ماند ولی میزان کلروفیل و نیز گلوتاتون احیا شده کم شد. در ژنوتیپ‌های متحمل حتی در میزان ۱۵۰ میلی مول کلرید سدیم تغییراتی در سیستم آنزیمی رخ نداد. اسمیرنوف (Smirnof, 1996) اعلام کرد که اسکوربات و گلوتاتیون احیا شده[4]، دو سیستم از مهم‌ترین آنتی اکسیدانت‌های موجود در گیاه هستند که باعث تطابق گیاهان به شرایط تنش می‌شوند. دمیرال و همکاران (Demiral *et al.*, 2005) اعلام کردندکه شوری باعث افزایش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و کاهش فعالیت پراکسیداز[5] در ارقام جو شد. در ژنوتیپ‌های متحمل میزان SOD بیشتر بود. مونوکس و همکاران (Monneveux *et al.*, 1990) گزارش کردند که یکی از تکنیک‌های بررسی اجزای فتوسنتزکننده در چنین شرایطی، اندازه‌گیری میزان فلورسانس کلروفیل است که در شرایط تنش خشکی و شوری تحت تأثیر قرار می‌گیرد. آن‌ها هم‌چنین اعلام کردند که هر گیاهی که اجزای فتوسنتزی آن دیرتر تحت تأثیر قرار گیرد، متحمل‌تر است. ژیبر و همکاران (Jibr *et al.*, 2002) اعلام کردند که شوری باعث افزایش میزان پرولین و کاهش فعالیت پراکسیداز در جو می‌شود. این اثر که چند ساعت پس از جوانه‌زنی قابل مشاهده بودند، در ژنوتیپ‌های حساس محسوس‌تر بودند. فعالیت آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسیلاز در تنش شوری در ژنوتیپ حساس کاهش نشان داد. آن‌ها هم‌چنین افزایش میزان سدیم در گیاه را زیاد و افزایش میزان کلر در آن را کم اعلام کردند. مورالس و همکاران (Morales *et al.*, 1992). اثر نمک را روی دو ژنوتیپ جو در اتاقک رشد مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان داشتند که شوری باعث کاهش پتانسیل آب برگ شد ولی روی ترکیب رنگیزه‌های فتوسنتزی اثر نداشت. آن‌ها نسبت‌های رنگیزه‌ای نئوگزانتین: وایولاگزانتین : ß ـ کاروتن : کلروفیل b : کلروفیل a را به ترتیب ۱۰۰:۲۵:۱۲:٦:۳ مول برمول به‌دست آوردند. شوری روی کارتنوئیدهای چرخه وایولاگزانتین و فتوشیمی در فتوسیستم II اثر نداشت. اما در غلظت‌های بالای نمک، فتوسیستم II آسیب دید. هدف از این آزمایش بررسی صفات فیزیولوژیکی مرتبط با تحمل به تنش خشکی و تعیین متحمل‌ترین رقم جو بدون پوشینه به خشکی بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مزرعه تحقیقاتی، گلخانه و آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد اقلید (طول جغرافیایی ′۷و° ۳٤ و عرض جغرافیایی ′۳ و°۵۹) طی سال‌های ۱۳۸٤و۱۳۸۵ انجام گرفت. اقلیم منطقه جزء مناطق کوهستانی با آب و هوای سرد

1. Super Oxide Dismutase (SOD)
2. Catalase
3. Dehydro ascorbate
4. Reduced Gluthation(GSH)
5. Peroxidase (POX)

جدول۱- میانگین دما و بارنگی منطقه اقلید در سال ۱۳۸٦

Table1. Mean temperature and precipitation of Eghlid region n 2007.

ماه Month		بارندگی(میلی‌متر) Precipitaion (mm)	دما (درجه سلسیوس) Temperature (◦C)		
			Min	Max	Mean
April	فروردین	3.7	4.1	17.7	109
May	اردیبهشت	1	7.8	23	15.4
June	خرداد	1.6	9.6	26.5	18.1
Jully	تیر	0	16.2	32.5	24.4
August	مرداد	0.5	13.4	30	21.7
September	شهریور	0	12.3	29.4	20.9
October	مهر	0	9.1	23.4	16.3
November	آبان	14.8	2.2	15.2	8.7
December	آذر	1	0	14	7
January	دی	136.3	-5	5	0
February	بهمن	31.4	-4.8	0.8	-2
March	اسفند	28.6	1.9	10.8	12.4
Total	جمع	218.9	66.8	228.3	153.6
Mean	میانگین	18.2	5.6	19	12.8

*ماخذ: اطلاعات ایستگاه هواشناسی شهرستان اقلید، سال ۱۳۸٤.

*Source: Data of meteorological station in Eghlid region

و نیمه‌مرطوب می‌باشد. داده‌های هواشناسی سال ۱۳۸٤ در جدول ۱ آورده شده است.

ژنوتیپ‌های گیاهی و نحوه انجام آزمایش

چهار ژنوتیپ جو بدون پوشینه (CM67, EHM81, UHM7, UH3) از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند که در بین آن‌ها ژنوتیپ CM67 به‌عنوان یکی از ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در مناطق معتدل مصرکشت و کار وسیعی داشته است (El-Sayed, 2002).

خاک مورد آزمایش لومی با ۲٤٪ رس، ٤٥٪ سیلت و ۳۱٪ شن و میزان ماده آلی آن ۱/۵در صد بود. اندازه کرت‌ها در مزرعه، ٤× ۲ متر مربع و فاصله ردیف‌های کاشت ۲۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. تراکم بوته ۵۰۰ بوته در هر متر مربع بود. تیمارهای تنش خشکی عبارت بودند از: آبیاری بر اساس پتانسیل آب خاک ۰/۵- باردر عمق ۲۰ سانتی‌متری (شاهد)، آبیاری در پتانسیل‌های ۱/۵- بار، ۳- بار و ۵- بار خاک. مرحله ساقه روی گیاهان در ابتدای اردیبهشت ماه اتفاق افتاد و در این ماه بارندگی قابل ملاحظه‌ای که در روند اعمال تیمارها اختلال ایجاد کند، صورت نگرفته بود (جدول۱). با این حال، جهت حصول اطمینان و به منظور جلوگیری از ایجاد خطا، سایه بان‌های سیاری از جنس پلاستیک در هنگام بارندگی بالای کرت‌هایی که تیمار تنش در آن‌ها اعمال شده بود کشیده می‌شد تا آب باران به‌داخل آن‌ها نفوذ نکند. فواصل بین کرت‌ها نیز یک متر در نظر گرفته شده بود تا آب کرت‌های مجاور به داخل یکدیگر نشت نکند و بدین طریق اثر حاشیه کرت‌ها به حداقل برسد. آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. ژنوتیپ‌های جو بدون پوشینه در کرت‌های اصلی و تیمارهای تنش خشکی در کرت‌های فرعی قرار گرفتند. تیمارهای آبیاری

پس از سبز شدن بذرها اعمال شدند. داده‌ها با نرم افزار آماری MSTATC تجزیه و تحلیل شدند.

میزان فتوسنتز، میزان تنفس و میزان تعرق، در برگ پرچم در انتهای مرحله گل‌دهی توسط دستگاه اندازه‌گیری تبادلات گازی مدل LI-COR 6400 در دمای ۲۵ درجه و شدت نور تقریبی ۱۲۰۰ میکرو مول بر متر مربع در ثانیه و مقدار CO2 تقریبی ۳۵۰ میکرو مول بر مول اندازه‌گیری شدند.

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل ۰/۰۵ گرم برگ پرچم در ۱۰میلی‌لیتر استون ۸۰٪ ساییده شد. پس از عبور از کاغذ صافی حجم نهایی آن را به ۲۰ میلی‌لیتر رساندیم. سپس در طول موج‌های ٦٤٦/٨ و ٦٦٣/٢ نانومتر میزان جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر مدل SPA 16K Lux طبق روش سامدور و همکاران (Samdur *et al*., 2000) اندازه‌گیری شد. میزان کلروفیل‌های a و b و کل کلروفیل از رابطه زیر به‌دست آمد:

(میزان جذب در طول موج ٦٤٦/٨) ۲/۷۹- (میزان جذب در طول موج ٦٦٣/٢) ۱۲/۲۵= میزان کلروفیل a

(میزان جذب در طول موج ٦٤٦/٨) ۵/۱- (میزان جذب در طول موج ٦٦٣/٢) ۲۱/۵= میزان کلروفیل b

(میزان کلروفیلa + میزان کلروفیل b) = میزان کل کلروفیل

برای اندازه‌گیری آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(SOD)، ۰/۵ گرم از کل بافت برگ پرچم که در دمای ۱۵- درجه سلسیوس منجمد شده بود، با ۵ میلی‌لیتر بافر سرد ۰/۱ مولار فسفات پتاسیم مخلوط شده، سپس با ۳ میلی‌لیتر از محلولی که شامل ۱۰ مول EDTA و بافر فسفات (pH =۷/۵) بود، مخلوط شد. مخلوط حاضر به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. ۱ میلی‌لیتر از سوپر ناتانت با ۳ میلی‌لیتر از محلول حاوی ۱۳ میلی‌مول متیونین، ۲۵ میکرومول تولوئن و ۰/۱ میلی‌مول EDTA و ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات pH =۷/۸ و ۵۰ میلی‌مول بی‌کربنات سدیم مخلوط و۲ میکرومول ریبو فلاوین به آن اضافه شد. سپس محلول به‌دست آمده در دمای صفر درجه سلسیوس، زیر نور لامپ فلورسانس قرار گرفت و پس از ۱۵ دقیقه با اسپکتروفتومتر میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز طبق روش دمیرال و همکاران (Demiral *et al*., 2005) در طول موج ٥٦٠ نانومتر اندازه گیری شد.

برای اندازه‌گیری میزان آنزیم پراکسیداز (POX)، ابتدا ۱ گرم دی اکسید تیتانیوم و ۱ گرم سولفات پتاسیم با هم مخلوط شده و در دمای ۷۰ درجه با ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک مخلوط شد (Benavides *et al*., 2000). پس از سرد شدن به منظور به‌دست آوردن معرف تیتانیوم، حجم محلول با آب مقطر به ۱/۵ برابر افزایش یافت. ۰/۵ گرم بافت برگ پرچم در ۱۰ میلی‌لیتر استون سرد قرار داده و پس از ساییدن در هاون، از کاغذ واتمن شماره ۱۰ گذرانده شد. ٤ میلی‌لیتر معرف تیتانیوم و ۵ میلی‌لیتر محلول آمونیوم به آن اضافه شد تا پراکسید تیتانیوم تشکیل شود. سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۵ درجه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از ۵ دقیقه محلول شفاف رویی جدا شده و در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۲ مولار حل و دوباره سانتریفوژ شد تا مواد غیر محلول حذف شدند. میزان جذب در طول موج ٤١٥ نانومتر، با منحنی‌های استاندارد مقایسه و میزان پراکسیداز مشخص گردید.

میزان ABA موجود در برگ پرچم در انتهای مرحله گرده‌افشانی (ZGS=67) اندازه‌گیری شد. برای این کار از برگ عصاره‌گیری شد و سپس توسط روش رایت (Wright, 1969) میزان ABA اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری پرولین ۰/۵ گرم بافت برگ در دمای ۱۵- درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس با ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفو سالیسیلیک اسید ساییده و از کاغذ صافی واتمن ۱ گذرانده شد. ۲ میلی‌لیتر از این محلول با ۲ میلی‌لیتر محلول معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس در حمام بخار قرار گرفت. پس از سرد شدن ٤ میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه و ۵ دقیقه روی شیکر بهم زده شد. سپس میزان جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۸ نانومتر اندازه‌گیری و با منحنی‌های استاندارد مقایسه شد (Demiral *et al*., 2005).

نتایج و بحث

اثر خشکی روی میزان فتوسنتز، میزان کلروفیل و میزان تنفس برگ پرچم

نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس (جدول۲) نشان داد که فقط در دو تیمار ۳- بار و ۵- بار میزان فتوسنتز کاهش یافت. بین ژنوتیپ‌ها از این نظر تفاوت وجود داشت. مشابه چنین نتیجه‌ای در سال دوم نیز گرفته شد. تنش خشکی اثر فزاینده تا ۲/۵ برابر بر میزان تنفس

جدول۲- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه.

Table 2. Analysis of variance for the studied characters.

صفت Trait / منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of Squares (MS)					
		فتوسنتز Photosynthesis	تنفس Respiration	کلروفیل Chlorophyll	سوپراکسید دیسموتاز SOD	پراکسیداز POD	آبسیسیک اسید ABA
تکرار(R) Replication	2	4107.213 ns	1.18 ns	0.042 ns	14531.108**	0.899**	0.380*
خشکی(D) Drought	3	22160448.35**	575.132**	9.39*	9867.097**	164.45**	23.575**
خطای آزمایش (Ea) Error a	6	2923.058	2.44	3	2315.251	0.091	0.115
ژنوتیپ (G) Genotype	3	217702176.950**	515.575**	10.063**	24627.63**	4.795**	17.783**
ژنوتیپ×خشکی (D×G) Drought× Genotype interaction	9	1135267.170**	16.262**	4.68*	2432.375 ns	3.110**	0.885**
خطای آزمایش (Eb) Error b	24	4284.105	1.382	1.29	1465.75	0.042	0.078
ضریب تغییرات(درصد) Coefficient of Variation	-	12.06	8.04	12.48	13.09	3	4.39

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ (دانکن)، ns : غیر معنی‌دار.

*and**, significant at the probability levels of 1% and 5%, respectively (Duncan) and ns, not significant.

تاریکی در تیمار شاهد داشت. در بین ژنوتیپ‌ها، ژنوتیپ CM67 بیشترین مقدار تنفس را داشت، اما در سال دوم بین ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. میزان کلروفیل فقط در تیمارهای ۳- و۵- بار کاهش نشان داد. بین ژنوتیپ‌ها از نظر میزان کلروفیل تفاوت وجود نداشت (جدول۳). مشخص شده است که تنش نه تنها باعث بهم ریختگی تعادل یون‌های گیاه و سمیت یونی می‌شود، بلکه میزان فتوسنتز را هم کاهش می‌دهد. در تنش‌های ملایم، سطح فتوسنتزکننده و در تنش‌های شدید میزان فتوسنتز در واحد سطح کاهش می‌یابد (Munns *et al*., 1995 ، Morales *et al*., 1992). در شرایط تنش شدید، کاهش فتوسنتز ابتدا به علت کاهش هدایت روزنه‌ای و عدم تعادل آبی و سپس به‌علت سمیت یونی و عوامل غیر روزنه‌ای رخ می‌دهد (Brugnoli and Lauteri, 1991). همبستگی شدید منفی بین میزان Na و Cl برگ و مقدار فتوسنتز در شرایط تنش در گیاه برنج (Yeo *et al*., 2006) و گندم (Rawson, 1986) مشاهده شده است. هم‌چنین میزان کلروفیل و هدایت روزنه‌ای در شرایط تنش کاهش پیدا می‌کنند و این عوامل با دستگاه‌های امروزه مانند پارومتر و SPAD متر، بدون این‌که آسیبی به گیاه برسد، قابل اندازه‌گیری هستند. رابطه این عوامل با تحمل به تنش نیز کاملاً ثابت شده است بهترین زمان اندازه‌گیری این عوامل نیز نزدیک گل‌دهی اعلام شده است (Ma *et al*., 1995; Moya *et al*., 1999; Samdur *et al*., 2000). کاهش هدایت روزانه‌ای و تعرق باعث تجمع املاح و سمیت آن‌ها و کاهش فتوسنتز و افزایش تنفس می‌شود (Morales *et al*., 1992). این یافته‌ها با نتایج این آزمایش مطابقت داشته است. میزان کاهش فتوسنتز در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل تقریباً یکسان بود. بنابراین، تنش میزان فتوسنتز را به طور تقریبا مساوی برای تمام ژنوتیپ‌ها کم می‌کند. در واقع یک حد مشخص از تنش باعث کاهش میزان فتوسنتز می‌شود و این امر ارتباطی به ژنوتیپ ندارد. احتمالا حساسیت آنزیم‌های فتوسنتزی به میزان تنش در همه ژئوتیپ‌ها یکسان باشد. در واقع هر کدام از تیمارهای تنش، قابلیت

جدول۳- میزان سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز(POX)، آبسیسیک اسید (ABA) و پرولین در تنش خشکی در گیاه جو بدون پوشینه.

Table 3. Amount of Superoxide dismutase (SOD), Peroxidase (POX), Abcsisic acid (ABA) and Prolin in hull- less barley under drought stresses.

ژنوتیپ Genotype	سطح تنش خشکی Drought stress level (-bar)	میزان SOD Superoxide desmutase (µmol/g DW)	میزان POX Reroxidase (µmol/g DW)	میزان ABA Abscisic acid (µg/g FW)	میزان پرولین Proline (µmol/g DW)
UH3	0.5	1.63 [f]	0.191 [a]	5.93 [d]	0.567 [d]
	1.5	2.61 [ab]	0.152 [ab]	14.33 [c]	0.773 [c]
	3	2.13 [de]	0.130 [bc]	20.20 [b]	0.863 [bc]
	5	2.03 [ef]	0.149 [c]	33.04 [a]	0.913 [a]
U46M	0.5	1.52 [d]	0.178 [a]	7.07 [d]	0.667 [fd]
	1.5	2.21 [c]	0.156 [b]	15.67 [c]	0.727 [c]
	3	2.51 [b]	0.117 [bc]	22.10 [b]	0.770 [b]
	5	2.57 [a]	0.165 [c]	23.20 [a]	0.963 [a]
EHM81-12	0.5	1.41 [c]	0.203 [a]	5.67 [f]	0.657 [d]
	1.5	2.31 [bc]	0.166 [ab]	15.17 [e]	0.740 [cd]
	3	2.50 [ab]	0.125 [b]	20.67 [d]	0.940 [bc]
	5	2.50 [ab]	0.144 [fc]	29.00 [b]	1.010 [a]
CM67	0.5	1.43 [d]	0.209 [a]	5.33 [f]	0.633 [d]
	1.5	1.66 [c]	0.165 [b]	13.33 [e]	0.880 [cd]
	3	2.63 [a]	0.149 [c]	22.67 [d]	0.952 [bc]
	5	2.43 [b]	0.136 [d]	26.10 [c]	1.011 [a]

اعداد هر ستون با حروف متفاوت با هم اختلاف معنی‌دار دارند ($p < ۰/۰۱$).

*Means with different letters in each column are significantly different ($p < 0.01$)

فعالیت Rubisco را به یک میزان در کل ژنوتیپ‌های مورد بررسی تحت تأثیر قرار داد. در شرایط تنش خشکی و شوری، بدلیل جذب کمتر منیزیم (که در این آزمایش نیز مشاهده شد ولی اعداد آن منتشر نشده اند) و هم بدلیل بازدارندگی تیو ردوکسین اکسیده شده، میزان فعالیت آنزیم روبیسکو کم می‌شود (Taize and Zeiger, 2006). هم‌چنین به دلیل افزایش دمای کنوپی و بسته شدن روزنه و نیز به‌دلیل مقاومت مزوفیلی برای ورود CO_2، تنفس نوری افزایش یافته و این امر نیز مقدار فتوسنتز را کم می‌کند. قابل ذکر است کاهش جذب منیزیم و احتمالاً آهن در شرایط خشکی نیز اثر مستقیم بر سنتز کلروفیل دارد. ثابت شده است که در شرایط خشکی میزان سنتز کلروفیل بشدت کاهش می‌یابد (Keles and Oncel, 2004). در ضمن مشخص شد که در شرایط تنش نسبت کلروفیل a/b کاهش می‌یابد (Demiral *et al*., 2005). در چنین شرایطی کارایی فئوفایتین که به عنوان دایمر کلروفیل a در واکنش‌های نوری فتوسنتز عمل می‌کند، کم شده و بنابراین میزان فتوسنتز کاهش می‌یابد. تنش، میزان تنفس نوری و تاریکی را افزایش داده و باعث افزایش اسیدهای آمینه

جدول٤- میزان فتوسنتز، تنفس و کلروفیل در برگ‌های پرچم در گیاه جو بدون پوشینه در شرایط تنش خشکی.

Table4. Rate of photosynthesis, respiration and chlorophyll content in flag leaves of hull-less barley under drought conditions

ژنوتیپ Genotype	سطح تنش خشکی Drought stress level (-bar)	میزان کلروفیل Chlorophyll content (mg/g)	میزان تنفس Respiration rate µmol (CO2/m²/s)	میزان فتوسنتز Photosynthesis rate µmol (CO2/m²/s)
UH3	0.5	1.66 [a]	6.47 [d]	26.67[ab]
	1.5	1.116 [b]	8.23[c]	24.22[bc]
	3	0.83 [cd]	12.62[b]	17.75[cd]
	5	0.73 [de]	16.67[ab]	12.70[d]
U46M	0.5	1.70[a]	5.27[d]	26.17[a]
	1.5	1.26[b]	7.50[c]	22.93[ab]
	3	0.85[cd]	11.41[b]	17.80[c]
	5	0.77[d]	16.00[a]	11.63[d]
EHM81-12	0.5	1.71[a]	7.23[d]	27.08[a]
	1.5	1.20[b]	9.27[cd]	21.97[b]
	3	0.86[cd]	10.71[b]	17.83[c]
	5	0.70[d]	16.06[a]	11.63[d]
CM67	0.5	1.83[a]	6.23[c]	27.24[a]
	1.5	1.28[b]	9.70[c]	23.03[bc]
	3	0.96[c]	15.24[b]	18.84[c]
	5	0.64[d]	17.96[a]	12.67[d]

اعداد هر ستون با حروف متفاوت با هم اختلاف معنی‌دار دارند ($p < ۰/۰۱$).

*Means with different letters in each column are significantly different ($p < 0.01$)

به‌خصوص سرین، گلسین و پرولین و کاهش تری فسفو گلسیریک اسید و اسیدهای آلی می‌شود (Ashraf and Waheed, 1993). در واقع به دلیل نیاز بیشتر به حفظ تعادل شیب غشا، بازچرخش پروتئین‌ها و نیز حفظ انرژی سلول، مقدار تنفس نگهداری افزایش می‌یابد. برای انجام این امر، گیاه ذخیره کربوهیدراتی خود را در چرخه کربس و مسیر گیکولیز مصرف و انرژی تولید می‌کند. هم‌چنین در تنش، هم به دلیل جذب کمتر پتاسیم به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی و هم به‌دلیل کاهش میزان RWC و هم‌چنین کاهش فعالیت PEPcase در سلول‌های محافظ روزنه، میزان تولید موادی که باعث حفظ آماس سلول محافظ و باز بودن روزنه می‌شوند (مانند مالات) کم می‌شود. این امر باعث افزایش مقاومت نسبی روزنه می‌شود.

اثر تنش خشکی بر میزان آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز برگ پرچم

در هیچ یک از سال‌های آزمایش از نظر میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز تفاوت معنی‌داری از نظر تنش خشکی و ژنوتیپ ایجاد نشد. منتها در برخی سطوح اثر متقابل ژنوتیپ در

تنش خشکی معنی‌دار شد. خشکی میزان آنزیم پراکسیداز را تا تیمار ۳- بار افزایش و سپس کاهش داد بین ژنوتیپ‌ها نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول٤). تنش خشکی هم‌چنین باعث افزایش میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شد. مشخص شده که تنش خشکی و شوری باعث افزایش میزان SOD و کاهش WUE می‌شود (Aldesuquy and Ibrahim, 2001). اسمیرنوف (Smirnof, 1996) بیان کرد که در شرایط تنشی خشکی به‌دلیل ایجاد اکسیژن رادیکال در سیستم فتوسنتزی اختلال ایجاد می‌شود لذا گیاهان، با تولید آنزیم‌هایی مانند پراکسید از سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز میزان سمیت اکسیژن را کاهش می‌دهند. بناویدز و همکاران (Benavides *et al.*, 2000) بیان کرد که با افزایش میزان شوری میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانت افزایش یافت. هم‌چنین ارتباط مستقیم بین میزان آنزیم‌ها و تحمل به شوری وجود داشت. آسادا (Asada, 1994) اعلام کرد که پراکسید هیدروژن و سوپراکسید هیدروژن اولین ترکیب‌های تولیدشده در شرایط تنش هستند، لذا پراکسیداز وسوپر اکسید دیسموتاز احتمالاً اولین آنزیم‌های مقابله با آن‌ها می‌باشند. در مطالعه حاضر مشاهده شد که میزان پراکسیداز قبل از افزایش سوپر اکسید دیسموتاز افزایش یافت. در واقع آنزیم پر اکسیداز به خشکی حساس‌تر است. در حالی که در سطوح بالای خشکی مقدار آن کاهش می‌یابد که این کاهش احتمالاً به دلیل آسیب دیدگی فتوسیستم II در تنش‌های زیاد است. در تنش خشکی سوپر اکسید دیسموتاز چندان نقشی نداشت زیرا با افزایش خشکی تولید آن تغییر معنی‌داری نکرد که این امر به دلیل حساسیت کمتر آن به خشکی است و یا دلیل این امر است که سطح حساسیت و اکنش‌دهی آن در سطوح بالاتر خشکی می‌باشد.

اثر تنش خشکی روی میزان ABA و پرولین برگ پرچم

تنش خشکی باعث افزایش میزان ABA و پرولین در گیاه شد. ژنوتیپ‌های متحمل دارای میزان ABA و پرولین بیشتری بودند. مشخص شد که میزان پرولین و بتائین-گلایسین در تنش خشکی افزایش می‌یابد (Ingram and Bartels, 1996). آلدسوکوی و ابراهیم (Aldesuquy and Ibrahim, 2001) بیان کردند که در تنش خشکی، ABA باعث افزایش میزان هدایت هیدرولیکی در ریشه شده جذب آب را زیاد کرده و روزنه‌ها را می‌بندد و تا حدودی از هدر روی آب می‌کاهد. با خشک شدن خاک، ژن‌های تولید کننده ABA فعال شده، چرخه موالوانیک اسید تنفسی راه اندازی شده و پس از تولید وایولاگزانتین، تولید ABA شروع می‌شود. ABA به همراه جریان تعرق به سمت برگ می‌آید و باعث بسته شدن روزنه‌ها می‌شود. از آن جایی‌که در تنش، pH سیتوسول قلیایی می‌شود و چون ABA به عنوان یک اسید ضعیف می‌تواند این قلیاییت را جبران کند، لذا ABA تجمع یافته در کلروپلاست به همراه ناقل پروتونی به فضای سیتوسول و سپس به آپوپلاست ترشح شده و باعث تداوم بسته بودن روزنه می‌شود. با رفع تنش و افزایش جذب آب، میزان پروتن در سلول زیاد شده و از ترشح ABA از کلروپلاست جلوگیری شده و اثرات آن کم می‌شود (Taize and Zeiger, 2006).

همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، ژنوتیپ‌های حساس‌تر میزان ABA بیشتری تولید می‌کنند و به‌دلیل اثر بازدارندگی ABA روی روزنه‌ها و در نتیجه افزایش مقاومت روزنه‌ای و هم‌چنین پیری و ریزش برگ و کاهش سطح فتوسنتزکننده، میزان عملکرد ژنوتیپ‌های حساس کمتر می‌شود. تجمع پرولین در طی پسابیدگی مستقیم و غیر مستقیم اتفاق می‌افتد و در شرایط پسابیدگی مستقیم میزان تولید آن بیشتر است (Keles and Oncel, 2004). افزایش پرولین به‌دلیل فعالیت بیشتر مسیر سنتزی گلوتامات می‌باشد که از چرخه کربس منشا می‌گیرد. ژنوتیپ‌های متحمل‌تر و یا ژنوتیپ‌هایی که عملکرد بیشتری در تنش داشتند میزان پرولین بیشتری تولید کردند. در واقع چون یکی از نقش‌های پرولین تنظیم اسمزی است، ژنوتیپ‌های متحمل‌تر به جای تجمع املاحی مانند سدیم و کلر، با سنتز موادی مانند پرولین تنظیم اسمزی انجام می‌دهند. لذا از سمیت املاح در بافت‌های خود جلوگیری می‌کنند. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپCM67 از بقیه ژنوتیپ‌های مورد آزمایش متحمل‌تر بود و دلیل این امر تجمع بیشتر پرولین، تولید میزان کمتر ABA، فتوسنتز بیشتر و تنفس تاریکی کمتر می‌باشد.

منابع

Aldesuquy HS, Ibrahim AH (2001) Interactive effect of sea water and growth bioregulators on water relation, abcisic acid concentration and yield of wheat plants. Journal of Agronomy and Crop Science 187:185-193.

Asada K (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foryer, CA, Mullineaux PM (eds), Causes of photo-oxidative stress and amelioration of defense systems in plants. C.R.C. Press: Boca Raton, Fl. pp.77-104.

Ashraf M, Waheed A (1993) Screening of local exotic accessions of lentil (*Lens culinaris* Medic.) for salt tolerance at two growth stages. Plant and Soil 128: 167-176

Benavides M, Marconi PL, Gallego SM, Comba ME, Tomaro ML (2000) Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. Australian Journal of Plant Physiology 27: 273-278.

Broadbent P, Creissen GP, Kullar B, Wellburn AR, Mullineun PM (1995) Oxidative stress responses in transgenic tobacco containing altered levels of gelutation reductase activity. Plant Journal 8: 247-255.

Brugnoli E, Lauteri M (1991) Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseulus vulgcris* L.) C3 non-halophytes. Plant Physiology 95: 628-635.

Burke JJ, Mahan JR, Hatfeild JL (1988) Crop-specific thermal kinetic windows in relation to cotton and wheat biomass production. Agronomy Journal 80: 535-556.

Demiral MA, Aydin M, Yorulmaz A (2005) Effect of salinity on growth, chemical composition and antioxidative enzyme activity of two malting barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. Turkish Journal of Biology 29: 117-123.

El-Sayed AA (2002) Improvement of hull - less barley in Egypt. Proceeding of the Food Early Workshop, organized by ICARDA and FAO, 14-17 January 2002. Hammamet, Tunisia. pp. 189.

Fukai S, Cooper M. (1995) Development of drought resistant cultivar using physiomorphological traits in rice. Field crops Research 40:67- 86.

Havaux M (1992) Stress tolerance of photosytem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat and photoinhibition stresses. Plant Physiology 100: 424-432.

Ibrahim, AH (1999) Control of growth of sorghum plants grown under stress conditions. Ph.D Thesis Faculty of Science, Mansura University. Egypt. 231 pp.

Ingram J and Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annul Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology 47: 377-403.

Jagtap V, Bhargava S, Stredo P, Feirabend J (1998) Comparative effects of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghurm biocolor* L. Journal of Experimental Botany 49: 1715-1721.

Jibr N, Ayadi A, Amar S, Chaibi W, Brulfert J (2002) Seed germination of two wheat species differing in their sensitivity to NaCl , in response to salt stress. Journal of Trace and Microprobe Techniques 20:625-637.

Keles Y, Oncel I (2004) Growth and solute composition on two wheat species experiencing combined influence of stress conditions. Russian Journal of Plant Physiology 51: 203-208.

Ludlow MM, Santamaria FJ, Fukai S (1990) Contribution of osmotic adjustment to grain yield of *Sorghum biocolor* L., under water limited conditions. I. Water stress after anthesis. Australian Journal of Agricultural Research 41: 67-78.

Ma BL, Morrison MG, Voldeng HD (1995) Leaf greenness and photosynthetic rate in soybean. Crop Science 35: 1411-1414.

Mass EV and Poss JA (1989) Salt sensitivity of cowpea at various growth stages. Irrig Science 10: 313-320.

Mathews MA, Van-Volkenburg E, Boyer JS (1984) Acclimation of leaf growth to low water potential in sunflower. Plant, Cell and Environment 7: 199-286

Monneveux P, Mekkaoui MR, Xu X (1990) Physiological basis of salt tolerance in wheat. Chlorophyll fluorescence as a new tool for screening tolerant genotypes. Proceedings of the Conference on Wheat Breeding. Prospects and Future Approaches. Varna, Bulgaria, pp. 1-33.

Morales F, Abadia A, Gomez–Apurisi J, Abadia J (1992) Effect of combined NaCl and CaCl2 salinity on photosynthetic parameters of barley grown in nutrient solution. Plant Physiology 86: 419-426.

Moya JL, Primo-Millo M, Talon M (1999) Morphological factors determining salt tolerance in citrus seedlings: the shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. Plant, Cell and Environment 22: 1425-1433.

Munns R, Schachtman DP, Condon AG (1995) The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. Australian Journal of Plant Physiology 22: 561-669.

Navari-Izzo F, Pineino C, Qurtacci MF, Sgherri CLM (1994) Interacellalar membranes: kinetic of superoxide production and changes in thylacoids of resurrection plants upon dehydration and hydration. Proc. Royal Society of England 102: 187-191.

Radin JW, Hendrix DL (1988) The apoplastic pool of abcisic acid in cotton leaves in relation to stomatal closure. Planta 174: 180-186.

Rawson, FLM (1986) Gas exchange and growth in wheat and barley grown in salt. Australian Journal of Plant Physiology 13: 475-489.

Samdur MY, Singh A L, Mathur RK, Manivel P, Chikani BM, Gor HK, Khan MA (2000) Field evaluation of chlorophyll meter for screening groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes tolerance to iron-deficiency chlorosis. Current Science 79: 211-214.

Scandalios GJ (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiology 101: 7-12.

Smirnof, N (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. Annual of Botany 78: 665-669.

Taize L, Zeiger E (2006) Plant physiology. Sinauer associated Inc. 4th ed. 690 pp.

Wright ST (1969) An increase in the inhibitor –B content of detached wheat leaves following in a period of wilting. Plant Physiology 86: 10-20.

Yeo ME, Flowers SA, Flowers TJ (1990) Screening of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars for physiological characters contributing to salinity resistance and their relationship to overall performance. Theoretical and Applied Genetics 79:377-384.