# การเปลี่ยนแปลงปริมาณ malondialdehyde และ total soluble sugar ของหญ้ารูซี่ที่ทนแล้งได้ต่างกัน เมื่อชักนำด้วย polyethylene glycol

# Changes in malondialdehyde and total soluble sugar contents induced by polyethylene glycol in two clones of ruzi grass (*Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evrard)) with different drought tolerance

วราพงษ์ เสนะวีระกุล (Warapong Saenaweerakul)* มาลี ณ นคร (Malee Nanakorn)**
ศรีสม สุวรรณวงศ์ (Srisom Suwanwong)** ลิลลี่ กาวีต๊ะ (Lily Kaveeta)**

## บทคัดย่อ

แม้ว่าหญ้ารูซี่สามารถปลูกได้ในพื้นที่แห้งแล้ง แต่ก็ประสบปัญหาผลผลิตต่ำในสภาพแห้งแล้งรุนแรง การคัดเลือกพันธุ์ที่ทนแล้งในสภาพหลอดทดลองเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหา ดังนั้น การทดลองครั้งนี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ malondialdehyde (MDA) และ total soluble sugar (TSS) ของหญ้ารูซี่ 2 โคลนที่มีความทนแล้งแตกต่างกัน เพื่อพิจารณาความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวชี้วัดสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ทนแล้งในระยะต่อไป โดยนำหญ้ารูซี่จากกรมปศุสัตว์ โคลน 22 (ทนแล้งต่ำกว่า) และโคลน 23 (ทนแล้งได้ดีกว่า) ชักนำให้เกิดสภาวะเครียดจากการขาดน้ำด้วย PEG ในสภาพปลอดเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้น 0-15% นาน 12 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น ปริมาณ MDA ของโคลน 23 ลดลงมากกว่าโคลน 22 ซึ่งแสดงถึงความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดขึ้นน้อยกว่า ส่วนปริมาณ TSS ซึ่งอาจแสดงถึงการปรับค่าออสโมติคโพเทนเชียลของเซลล์ใบ พบว่ามีความแตกต่างเฉพาะเมื่อได้รับ PEG 12 ชั่วโมง และโคลน 22 มีปริมาณ TSS สูงกว่าโคลน 23 ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงปริมาณ MDA ในใบจึงสัมพันธ์กับระดับการทนแล้งของหญ้ารูซี่ และสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดในการคัดเลือกหญ้ารูซี่ทนแล้ง

## ABSTRACT

Ruzi grass (*Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evrard)) can be grown widely in arid habitats but with low yielding under severe drought stress. *In vitro* selection for drought tolerant lines is a good alternative method for solving this problem. Therefore, the appropriate parameters for drought tolerant selection were determined by studying the alteration of malondialdehyde (MDA) and total soluble sugar (TSS) contents of two ruzi clones with different drought tolerance. Two clones of ruzi grass, clone 22 (less tolerance) and clone 23 (more tolerance) from the Department of Livestock, were induced to water deficit *in vitro* by using 0-15% polyethylene glycol (PEG) for 12 and 48 hours. The results showed that MDA content in clone 23 was lower than that of clone 22 which indicated lower membrane injury. While TSS content, which may indicate the osmotic adjustment of leaves cells, was significantly difference only at 12 hours and was higher in clone 22. Therefore, the alteration of MDA content in leaves related to drought tolerance level and can be used as the parameter for drought tolerant selection.

**คำสำคัญ :** สภาวะเครียดจากการขาดน้ำ หญ้ารูซี่ PEG

**Key Words:** drought stress, ruzi grass, PEG

* *มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*
** *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*

## บทนำ

หญ้ารูซี่(*Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & C.M.Evrard) หรือ *Brachiaria ruziziensis* Germain & Evrard) เป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีลักษณะที่ดีทางการเกษตร กล่าวคือสามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี ติดเมล็ดง่าย เมล็ดมีการพักตัวนาน สามารถเก็บสามารถรักษาคุณภาพให้สูงได้แม้เวลาแก่ (กอบแก้ว, 2535) หากประสบปัญหาสภาพแห้งแล้งรุนแรง หญ้ารูซี่ที่ปลูกจะให้ผลผลิตต่ำหรือไม่ให้ผลผลิต การคัดเลือกพืชในสภาพหลอดทดลอง เพื่อให้ได้ลักษณะที่เหมาะสมเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่แก้ปัญหานี้ได้ แต่อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาน้อยเกี่ยวกับดัชนีการทนแล้งของหญ้ารูซี่ ในปัจจุบันมีการใช้สารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพแห้งแล้ง นำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดระดับการทนแล้งของพืช เช่น น้ำตาลที่ละลายน้ำได้ (soluble sugar) ซึ่งพืชสร้างขึ้นเพื่อควบคุม osmotic potential ในรากให้สูงกว่าดิน ทำให้พืชใช้น้ำในดินที่มีอยู่น้อยได้ หรือ malondialdehyde (MDA) ที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน (กระบวนการ lipid peroxidation) (Halliwell and Gutterridge, 1999) ซึ่งแสดงถึงความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่เกิดจาก reactive oxygen species ในสภาพ oxidative stress ที่ถูกชักนำให้เกิดขึ้นจากการขาดน้ำ (Socias *et al*., 1997; González *et al*., 1998; Dat *et al*., 2000; Foyer and Noctor, 2000) ทั้ง total soluble sugar (TSS) และ MDA มีความสัมพันธ์กับการทนแล้งของพืชชนิดหลาย ๆ ชนิด โดยพบว่าพืชที่ทนแล้งมีปริมาณ MDA ต่ำกว่าพืชที่ไม่ทนแล้ง ส่วน TSS มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นกว่าพืชที่ไม่ทนแล้ง (Navari-Izzo and Rascio, 1999; Vajrabhaya *et al*., 2001; Türkan *et al*., 2005) ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ MDA และ TSS ในหญ้ารูซี่ที่มีระดับการทนแล้งต่างกัน เพื่อประเมินความเหมาะสมในการใช้เป็นดัชนีชี้วัดระดับการทนแล้งของหญ้ารูซี่ เมื่อได้รับสภาพเครียดจากการขาดน้ำที่ระดับต่าง ๆ เมื่อชักนำด้วย polyethylene glycol (PEG) ซึ่งเป็นสารโพลิเมอร์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ พืชไม่สามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ เสียสภาพเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ยาก และมีความเป็นพิษน้อย (Mexal *et al*., 1975; Heyser and Nabors, 1981)

## อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### การเตรียมตัวอย่างหญ้ารูซี่

นำต้นพันธุ์หญ้ารูซี่ที่คัดเลือกจากแปลงทดลองของกรมปศุสัตว์ 2 โคลน ที่มีระดับการทนแล้งต่างกัน โดยการประเมินจากค่า median lethal dose (LD 50) คือ โคลน 22 (ทนแล้งต่ำกว่า) และโคลน 23 (ทนแล้งได้ดีกว่า) (จากการศึกษาเบื้องต้น ไม่แสดงข้อมูล) นำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS ที่เติม benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 20 µM นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นชักนำรากด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม indole butyric acid (IBA) ความเข้มข้น 1 µM นาน 10-12 วัน นำต้นที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

### การทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ในหญ้ารูซี่ที่มีระดับการทนแล้งต่างกัน

นำต้นหญ้ารูซี่ที่ผ่านการชักนำราก มาทดลองในสภาพปลอดเชื้อ โดยวางแผนการทดลองแบบ completely random design (CRD) จัดสิ่งทดลองแบบ factorial จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ค่าสังเกต (โดย 1 ค่าสังเกต คือหญ้า 1 ต้น) ปัจจัยที่ศึกษามีดังนี้

ปัจจัย A คือ โคลนหญ้ารูซี่ (โคลน 22 และ 23)

ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของ polyethylene glycol 6000 (PEG) มี 4 ระดับ (0, 5, 10 และ 15% (โดยมีค่า osmotic potential เท่ากับ 0, -0.50, -1.48 และ -2.95 MPa ตามลำดับ)

ระยะเวลาทดลองนาน 12 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำใบหญ้ารูซี่มาสกัดตามวิธีของ Hodge *et al.*

(1999) นำสารละลายสกัดตัวอย่างพืชมาวิเคราะห์ปริมาณ MDA ตามวิธีการของ Hodge *et al.* (1999) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT

**การทดลองที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ total soluble sugar (TSS) ในหญ้ารูซี่ที่มีระดับการทนแล้งต่างกัน**

ทำการทดลอง วางแผนและจัดสิ่งทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ระยะเวลาทดลองนาน 12 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำใบหญ้ารูซี่มาสกัดตามวิธีของ Hodge *et al.* (1999) นำสารละลายสกัดตัวอย่างพืช มาวิเคราะห์ปริมาณ TSS ตามวิธีการของ Yemm and Willis (1954) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IRRISTAT

## ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

**การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ MDA ในหญ้ารูซี่ที่มีระดับการทนแล้งต่างกัน**

ในหญ้ารูซี่ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาที่ปัจจัยของโคลน (clone) พบว่า มีผลทำให้ปริมาณ MDA แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โคลน 23 ที่ทนแล้งได้ดีกว่า มีปริมาณ MDA (30.94 nmol/gFW) น้อยกว่า โคลน 22 ที่ทนแล้งน้อยกว่า (52.63 nmol/gFW) เมื่อพิจารณาปัจจัยของความเข้มข้นของ PEG พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PEG จาก 0% (ชุดควบคุม) ปริมาณ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การเพิ่ม PEG ที่ ความเข้มข้น 5-15% ไม่ทำให้ MDA แตกต่างกัน และไม่มีปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัย แต่ที่ PEG ความเข้มข้น 15% ปริมาณ MDA ในโคลน 23 มีแนวโน้มลดลงมากกว่าโคลน 22 (เมื่อเทียบกับชุดควบคุมของแต่ละโคลน)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ MDA ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) มีแนวโน้มเช่นเดียวกับที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง แต่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างโคลนและความเข้มข้นของ PEG โดยโคลน 23 มีปริมาณ MDA สูงสุด 58.17 nmol/gFW เมื่อได้รับ PEG 0% และปริมาณ MDA ลดลงต่ำสุด 20.69 nmol/gFW เมื่อได้รับ PEG 15% หญ้ารูซี่ทั้งสองโคลน มีปริมาณ MDA ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และโคลน 23 มีปริมาณ MDA ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนกว่าโคลน 22

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ MDA ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงของหญ้ารูซี่ทั้งสองโคลนมีแนวโน้มลดลงจากชุดควบคุม อาจเนื่องมากจากหญ้ารูซี่มีการตอบสนองต่อ ROS ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงสังเคราะห์ antioxidant enzyme หรือ antioxidant molecule มากำจัด ROS ที่เกิดขึ้น (Mittova *et al.*, 2000; Sharma and Duby, 2005; Liu *et al.*, 2008) แต่ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง โคลน 23 มีปริมาณ MDA ลดลงชัดเจนกว่าที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าโคลน 23 มีความสามารถในการกำจัด ROS ได้มากกว่า เมื่ออยู่ในสภาพ oxidative stress รุนแรง ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะที่พบคือ ใบเหลืองและม้วนงอน้อยกว่าโคลน 22

อย่างไรก็ตามการนำปริมาณ MDA มาใช้เป็นตัวชี้วัดระดับความทนแล้งของหญ้ารูซี่ที่คัดเลือก ควรนำโคลนที่ทราบระดับความทนแล้งมาทดสอบซ้ำอีกครั้ง เพื่อที่จะได้ทราบข้อมูลที่แน่ชัด เพื่อใช้ในการคัดเลือกพืชต่อไป

**การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ TSS ในหญ้ารูซี่ที่ระดับการทนแล้งต่างกัน**

หญ้ารูซี่ที่ได้รับ PEG ทั้ง 4 ระดับ ความเข้มข้น เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาที่ปัจจัยของโคลน พบว่า โคลน 22 มีปริมาณ TSS (12.91 mg/gFW) สูงกว่าโคลน 23 (10.61 mg/gFW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปัจจัยของความเข้มข้นของ PEG พบว่าไม่มีผลทำให้ปริมาณ TSS แตกต่างกันทางสถิติและไม่มีปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสอง จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ปริมาณ TSS ในโคลน

22 ที่มีความทนแล้งน้อยกว่าโคลน 23 มีแนวโน้มสูงขึ้น เมื่อระดับ PEG มากขึ้น ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานในพืชหลายชนิด เช่น ข้าว และ *Atriplex halimus* ที่พบว่า พันธุ์ที่ทนแล้งจะมีการสะสมของน้ำตาลสูงกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนแล้งซึ่งสะท้อนถึงความสามารถในการปรับค่า osmotic potential เพื่อให้เซลล์สามารถดูดน้ำ คงความเต่งและเจริญเติบโตได้ภายใต้สภาวะที่ขาดน้ำ (Vajrabhaya *et al*., 2001; Martinez *et al*., 2004; Kusaka *et al*., 2005) แต่สอดคล้องกับการทดลองของ Newton *et al*. (1986) ซึ่งได้เสนอความเห็นไว้ว่า การสะสมน้ำตาลในเซลล์มากอาจไม่เป็นลักษณะที่แสดงถึงการทนแล้งที่ดี

การเปลี่ยนแปลง TSS ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4) เมื่อพิจารณาปัจจัยของโคลน และความเข้มข้นของ PEG พบว่า ไม่มีผลทำให้ปริมาณ TSS แตกต่างกันทางสถิติ และ ไม่มีปฏิสัมพันธ์ของทั้งสองปัจจัย ถึงแม้ว่าปริมาณ TSS ในโคลน 23 มีแนวโน้มสูงกว่าโคลน 22 เล็กน้อย แต่ก็ยังไม่ชัดเจนเพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดระดับการทนแล้งของหญ้ารูซี่ที่นำมาทดสอบได้

จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณ TSS ของทั้งสองช่วงเวลา พบว่าไม่สามารถนำมาใช้แยกหญ้ารูซี่ที่ทนแล้งต่างระดับกันได้ ซึ่งต่างจากการทดลองของ Kerepesi and Galiba (2000) ซึ่งสามารถใช้ soluble total carbohydrate เป็นดัชนีชี้วัดการทนแล้งของข้าวสาลีได้ อาจเนื่องมาจากหญ้ารูซี่ทั้งสองโคลน มีการสังเคราะห์ osmolyte ชนิดอื่นๆ ขึ้นมาปรับระดับค่า osmotic potential แทนน้ำตาล เช่น proline, glycine betain (Hare and Cress 1997; Shvaleva *et al*., 2005; Ashraf and Foolad, 2007)

**ตารางที่ 1** ปริมาณ MDA ของหญ้าโคลน 22 และ 23 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม PEG ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 12 ชั่วโมง

| ความเข้มข้น PEG (%) | ปริมาณ MDA (nmol/gFW) | | เฉลี่ย [1/] |
|---|---|---|---|
| | โคลน 22 | โคลน 23 | |
| 0 | 59.05 | 39.45 | 49.25 A |
| 5 | 51.04 | 30.46 | 40.75 B |
| 10 | 50.73 | 30.61 | 40.67 B |
| 15 | 49.72 | 23.23 | 36.47 B |
| เฉลี่ย [2/] | 52.63 X | 30.94 Y | |
| % CV | 9.2 | | |

[1/, 2/] = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในลำดับเดียวกัน (X, Y, A, B) มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 2** ปริมาณ MDA ของหญ้าโคลน 22 และ 23 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม PEG ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 48 ชั่วโมง

| ความเข้มข้น PEG (%) | ปริมาณ MDA (nmol/gFW)[1/] | | เฉลี่ย[2/] |
|---|---|---|---|
| | โคลน 22 | โคลน 23 | |
| 0 | 48.00 bc | 58.17 a | 53.08 A |
| 5 | 48.71 b | 44.41 bc | 46.56 B |
| 10 | 44.47 bc | 24.75 de | 34.61 C |
| 15 | 39.53 c | 20.69 e | 30.11 C |
| เฉลี่ย[3/] | 45.17 X | 37.01 Y | |
| % CV | 12.8 | | |

[1/] [2/] [3/] = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในลำดับเดียวกัน (X, Y, A, B.., a, b..) มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 3** ปริมาณ TSS ของหญ้าโคลน 22 และ 23 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม PEG ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 12 ชั่วโมง

| ความเข้มข้น PEG (%) | ปริมาณ total soluble sugar (mg/gFW) | | เฉลี่ย |
|---|---|---|---|
| | โคลน 22 | โคลน 23 | |
| 0 | 12.40 | 11.33 | 11.86 |
| 5 | 13.06 | 10.31 | 11.68 |
| 10 | 12.86 | 10.90 | 11.88 |
| 15 | 13.32 | 9.88 | 11.60 |
| เฉลี่ย[1/] | 12.91 X | 10.61 Y | |
| % CV | 10.6 | | |

[1/] = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน แตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 4** ปริมาณ TSS ของหญ้าโคลน 22 และ 23 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม PEG ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 48 ชั่วโมง

| ความเข้มข้น PEG (%) | ปริมาณ total soluble sugar (mg/gFW) | | เฉลี่ย |
|---|---|---|---|
| | โคลน 22 | โคลน 23 | |
| 0 | 10.63 | 9.56 | 10.10 |
| 5 | 10.48 | 12.24 | 11.36 |
| 10 | 10.24 | 11.93 | 11.09 |
| 15 | 10.16 | 12.49 | 11.33 |
| เฉลี่ย | 10.38 | 11.56 | |
| % CV | 12.7 | | |

## สรุปผลการวิจัย

1. หญ้ารูซี่ทั้งสองโคลนมีปริมาณ MDA ลดลง เมื่อได้รับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ โดยโคลน 23 (ทนแล้งได้ดีกว่า) มีปริมาณ MDA ต่ำกว่าโคลน 22 (ทนแล้งต่ำกว่า)

2. ปริมาณ total soluble sugar ของหญ้ารูซี่ทั้งสองโคลนใกล้เคียงกับชุดควบคุม เมื่อได้รับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำนาน 12 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

3. ปริมาณ MDA สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดระดับการทนแล้งของหญ้ารูซี่โคลน 22 และโคลน 23 ได้

## เอกสารอ้างอิง

กอบแก้ว ตรงคงสิน. 2535. พืชอาหารสัตว์เขตร้อน. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

Ashraf, M. and M. R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot. 59: 206-216.

Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranova´, M. Van Montagu, D. Inze´ and F. Van Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell. Mol. Life Sci. 57: 779–795.

Foyer, C.H. and G. Noctor. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. New Phytol. 146: 359–88.

González, A., K. L. Steffen and J. P. Lynch. 1998. Light and excess manganese. Plant Physiol. 118: 493-504

Halliwell, B. and J. M. C. Gutterridge. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Science Publication, London

Hare, P. D. and W. A. Cress. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regulation 21: 79-102.

Heyser, J. W. and M. W. Nabors. 1981. Growth, water content and solute accumulation of two tobacco cell lines cultured on sodium chloride, dextran, and polyethylene glycol. Plant Physiol. 68: 1454-1459

Hodges, D. M., J. M. Delong, C. F. Forney and R. K. Prange. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta. 207: 604-611.

Kerepesi, I. and G. Galiba. 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Sci. 40: 482-487.

Kusaka, M., A. G. Lalusin and T. Fujimura. 2005. The maintenance of growth and turgor in pearl millet(Pennisetum glaucum [L.] Leeke) cultivars with different root structures and osmo-regulation under drought stress. Plant Sci. 168: 1-14

Liu, J., X. Xiaorong, J. Du, J. Sun and X. Bai. 2008. Effects of simultaneous drought and heat stress on Kentucky bluegrass. Sci. Hort. 115: 190-195.

Martinez, J. P., S. Lutts, A. Schanck, M. Bajji and J. M. Kinet. 2004. Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L?. J. Plant Physiol. 161(9): 1041-1051.

Mexal, J., J. T. Fisher, J. Osteryoung and C. P. P. Reid. 1975. Oxygen availability in polyethylene glycol solutions and its implications in plant-water relations. Plant Physiol. 55: 20-24.

Mittova, V., M. Volokita, M. Guy amd M. Tal. 2000. Activities of SOD and ascorbate-glutathione cycle enzyme in subcellular compartment in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. Physiol. Plant. 110: 42-51.

Navari-Izzo, F. and N. Rascio. 1999. Plant response to water-deficit condition, pp. 231-270. *In* M. Pessarakli, ed. Handbook of Plant and Crop Stress. Maracel Dekker, Inc., New York.

Newton, R. J., S. Bhaskaran, J. D., Puryear and R. H. Smith. 1986. Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. Plant Physiol. 81: 626-629.

Sharma, P. and R. S. Dubey. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Regul. 46: 209-221.

Shvaleva, A.L., F. C. E. Silva, E. Breia, L. Jouve, J. F. Hausman, M. H. Almeida. J. P. Maroco, M. L. Rodrigues, J. S. Pereira and M. M. Chaves. 2005. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. Tree Physiology. 26: 239-248.

Socias, F. X., M. J. Correia, M. M. Chaves and H. Medrano. 1997. The role of abscissic acid and water relations in drought responses of subterranean clover. J. Exp. Bot. 48: 1281–1288.

Türkan, I., M. Bor, F. Özdemir and H. Koca. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Sci. 168: 223-231.

Vajrabhaya, M., W. Kumpun and S. Chadchawan. 2001. The solute accumulation: the mechanism for drought tolerance in RD23 rice (*Oryza sativa* L.) lines. ScienceAsia 27: 93-97.

Yemm, E. W. and A. J. Willis. 1954. The Estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochem. J. 57: 508-514.