

EFFECTS OF WATER DEFICIT ON GAS EXCHANGE OF DIFFERENT AGE LEAVES AND BOTH STEM AND LEAVES SOLUTE CONTENT OF SUNFLOWERS

EFFECTOS DEL DÉFICIT HÍDRICO EN EL INTERCAMBIO DE GASES EN HOJAS DE DIFERENTES EDADES Y CONTENIDO DE SOLUTOS EN TALLO Y HOJAS DE GIRASOL

Öner Canavar

Adnan Menderes University, Faculty of Agriculture, Crop Science Department. Aydın – 09100 Turkey. (oner.canavar@hotmail.com).

ABSTRACT

Water deficit alters biochemical and physiological processes ranging from photosynthesis to protein synthesis and solute accumulation in the different organs of the plant. The objectives of this study were to determine the effect of water deficit on photosynthetic responses of leaves at different ages and the accumulation of soluble sugar and starch in the stems and leaves of sunflowers (*Helianthus annuus* L.). Two sunflower cultivars (Sanbro and TR-3080) were used under two water regimes, well watered (70 % irrigation) and water deficit (20 % irrigation) according to the field capacity of soil under greenhouse conditions. The experimental design was randomized complete block with five replicates. The transpiration rate (E), the ratio of intercellular air space and atmospheric CO_2 molar fractions (C_i/C_a), the stomatal conductance (g_s), and the net CO_2 assimilation rate (A) were used to determine leaf gas-exchange parameters. These data were used to evaluate stomatal limitations to photosynthesis in relation to water deficit. It was found that water deficit (WD) reduced the rate of photosynthesis to a different level in young, fully developed and old leaves in both sunflower cultivars. Under water deficit condition, the sunflower leaves of varying ages showed different responses to water deficit in terms of their resistance to dehydration. Especially, as the net CO_2 assimilation rate was decreased among old leaves, transpiration rate was increased in mature leaves under water deficit. The percentage of soluble sugar was approximately 2-fold higher in the stem of water deficit plants as compared to well watered ones. This study suggests that the cv. Sanbro is likely to be more tolerant due to its high photosynthetic activity, high soluble sugar and starch accumulation and low relative membrane permeability (RMP) as compared to the cv. TR-3080.

RESUMEN

El déficit hídrico altera los procesos bioquímicos y fisiológicos, abarcando desde la fotosíntesis hasta la síntesis de proteínas y la acumulación de solutos en los distintos órganos de la planta. Los objetivos de este estudio fueron determinar el efecto del déficit hídrico en las respuestas fotosintéticas de las hojas a distintas edades y la acumulación de azúcar soluble y almidón en los tallos y hojas de girasol (*Helianthus annuus* L.). Dos cultivares de girasol (Sanbro y TR-3080) se usaron bajo dos regímenes hídricos, buena irrigación (70 % de irrigación) y déficit hídrico (20 % de irrigación), con base en la capacidad de campo del suelo en condiciones de invernadero. El diseño experimental fue en bloques completos al azar con cinco repeticiones. La tasa de transpiración (E), la proporción de espacio aéreo intercelular y CO_2 atmosféricos en fracciones molares (C_i/C_a), la conductancia estomática (g_s) y la tasa neta de asimilación de CO_2 (A) se usaron para determinar los parámetros de intercambio gaseoso. Estos datos se usaron para evaluar las limitaciones estomáticas para la fotosíntesis en relación con el déficit hídrico. El déficit hídrico (DH) redujo la tasa de fotosíntesis a un nivel diferente en las hojas jóvenes, completamente desarrolladas y viejas en ambos cultivares de girasol. Bajo condiciones de déficit hídrico, las hojas de girasol de distintas edades mostraron respuestas diferentes al déficit hídrico en términos de su resistencia a la deshidratación. En especial, al reducir la tasa neta de asimilación del CO_2 entre las hojas viejas, la tasa de transpiración aumentó en las hojas maduras bajo déficit hídrico. El porcentaje de azúcar soluble fue cercano al el doble en el tallo de las plantas con déficit hídrico comparado con las de buena irrigación. Este estudio sugiere que el cv. Sanbro puede ser más tolerante debido a su actividad fotosintética alta, alta azúcar soluble y acumulación de almidón, y baja permeabilidad relativa de la membrana (PRM) en comparación con el cv. TR-3080.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: March, 2015. Approved: June, 2015.

Published as ARTICLE in Agrociencia 49: 651-667. 2015.

Palabras clave: *Helianthus annuus* L., fotosíntesis, limitación estomática, déficit hídrico.

Key words: *Helianthus annuus* L., photosynthesis, stomatal limitation, water deficit.

INTRODUCTION

Water deficit is probably the most important factor controlling crop yield worldwide due to the fact that yield reduction is managed through lower photosynthetic activity (Pejić *et al.*, 2009) and a subsequent reduced leaf growth (Canavar *et al.*, 2014). Water deficit experiments have focused on improving crop genotypes for drought-prone areas. Mechanisms behind drought resistance because of water deficit alter a variety of biochemical and physiological processes ranging from photosynthesis to protein synthesis and solute accumulation (Hu and Schmidhalter, 1998). The reduction of osmotic potential in response to water stress is a well-established mechanism whereby many plants adjust to low soil water availability (Krizmanic *et al.*, 2003). According to Evans *et al.* (1994), the change in leaf anatomical characteristics can alter the CO₂ conductance diffusion components from the substomatal cavities to the sites of carboxylation and thus contribute to maintaining particular photosynthetic rates, despite the low stomatal conductance under drought stress. Similarly, measurements of leaf photosynthesis at high CO₂ concentration in several C₃ plants at saturating light showed that the photosynthetic capacity had not significantly decreased until leaf water deficit reached a critical value. Thus, the decrease of leaf net CO₂ uptake during mild drought stress is mainly attributed to stomatal closure (Morgan, 1984).

With the closure of the stomata, the plants reduce not only water loss by transpiration, but also CO₂ supply to the leaves (Baker, 1993; Chaves *et al.*, 2009). Reductions in net assimilation of CO₂ (A_{CO_2}) in leaves, stomatal conductance (g_s) and transpiration rate (E) are often used as indicators of drought stress (Baker and Rosenqvist, 2004). Cechin *et al.* (2010) pointed out that water stress reduced photosynthesis (P_n), g_s , and E in both young and mature leaves. However, the extent of the reduction depended on leaf age. The intercellular CO₂ concentration (C_i) increased in mature leaves but did not change in young leaves. Instantaneous water use efficiency (IWUE) in mature stressed leaves was reduced when compared to control leaves, whereas in young stressed

INTRODUCCIÓN

El déficit hídrico probablemente es el más importante factor de control del rendimiento de los cultivos en el mundo, porque la reducción en rendimiento se maneja a través de una menor actividad fotosintética (Pejić *et al.*, 2009) y una subsecuente reducción del crecimiento de la hoja (Canavar *et al.*, 2014). Los experimentos de déficit hídrico se han enfocado en mejorar los genotipos de los cultivos para las zonas con tendencia a sequía. Los mecanismos detrás de la resistencia a la sequía por déficit hídrico alteran varios procesos bioquímicos y fisiológicos, desde la fotosíntesis hasta la síntesis de proteínas y acumulación de solutos (Hu y Schmidhalter, 1998). La reducción del potencial osmótico en respuesta al estrés hídrico es un mecanismo bien establecido a través del cual muchas plantas se ajustan a una baja disponibilidad de agua en el suelo (Krizmanic *et al.*, 2003). Según Evans *et al.* (1994), el cambio en las características anatómicas de la hoja puede alterar los componentes de difusión en la conductancia de CO₂ de las cavidades subestomáticas hacia los sitios de carboxilación y así contribuye a mantener las tasas de fotosíntesis particulares, a pesar de la baja conductancia estomatal bajo estrés por sequía. De forma similar, las mediciones de fotosíntesis en la hoja con una alta concentración de CO₂ en varias plantas C₃ en luz saturada mostraron que la capacidad fotosintética no disminuía significativamente hasta que el déficit hídrico alcanzó un valor crítico. Así, la reducción de la absorción neta de CO₂ por la hoja durante estrés leve por sequía se atribuye principalmente al cierre estomático (Morgan, 1984).

Con el cierre de los estomas, las plantas reducen la pérdida de agua por transpiración y también el suministro de CO₂ a las hojas (Baker, 1993; Chaves *et al.*, 2009). Las reducciones en asimilación neta de CO₂ (A_{CO_2}) en hojas, conductancia estomática (g_s) y tasa de transpiración (E) se usan con frecuencia como indicadores de estrés por sequía (Baker y Rosenqvist, 2004). Cechin *et al.* (2010) señalaron que el estrés hídrico reduce la fotosíntesis (P_n), g_s , y E en hojas jóvenes y maduras. Sin embargo, el grado de la reducción depende de la edad de la hoja. La concentración intercelular de CO₂ (C_i) aumentó en hojas maduras pero no cambió en hojas jóvenes. La eficiencia instantánea de uso de agua (EIUA) en hojas maduras bajo estrés se redujo en comparación con las hojas

leaves it maintained the same level as the control. The acclimatization of photosynthesis to low leaf water potentials in *Helianthus* appears to involve changes primarily at the chloroplast level (Sayed, 2003).

Inorganic cations, organic acids, amino acids, and sugars, which are the primary osmotica, bring about osmotic adjustment through either internal synthesis or the uptake of osmotically active substances (Rhodes *et al.*, 1986; Pritchard *et al.*, 2000). There is little doubt that soluble sugars can contribute to osmotic adjustment. In agronomic crops there way an increament in soluble sugar concentration in response to water stress in roots and leaves (Premachandra *et al.*, 1992; Shahbaz *et al.*, 2011). Wingler *et al.* (2005) stated that by signaling a high availability of carbon relative to nitrogen in the old leaves, sugar accumulation could trigger leaf senescence. Sugar-induced senescence is therefore particularly important under low nitrogen availability and may also play a role in light signaling. Drought resistance and its components (stomatal and nonstomatal) are redefined to express the outstanding inventive capacity for terminology. But in the literature reviewed, the investigation of soluble sugar and starch in both leaf and stem of sunflowers and the photosynthetic response to water deficit of leaves of three different ages, are limited under water deficit conditions. Therefore, the objectives of this study were: 1) to determine the accumulation of soluble sugar and starch in leaves and stem of sunflowers under water deficit conditions; and 2) to compare differences of chlorophyll content and the response of photosynthesis among different age leaves (young, fully developed and old leaves) under water deficit conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and experiment establishment

This experiment was carried out at the research greenhouse of the Crop Science Department, Faculty of Agriculture, Adnan Menderes University, Turkey, and in collaboration with the Horticulture Faculty, Humboldt University, Germany, in 2013. Two sunflower cultivars were tested: Sanbro, breded by Syngenta ©, and TR-3080 (Directorate Trakya Agricultural Research Institute, Turkey). Sunflower cultivars were used to determine variation under two water regimes (water deficit and well-watered) and environmental conditions of approximately 12/12 h light/dark, 25/15 ± 3 °C and 40-50 % RH in a greenhouse

testigo, mientras que en hojas jóvenes bajo estrés mantuvo el mismo nivel que el testigo. La aclimatación de fotosíntesis a potenciales bajos de agua en *Helianthus* parece involucrar cambios principalmente en el nivel de cloroplasto (Sayed, 2003).

Los cationes inorgánicos, ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares, que son los principales osmóticos, producen un ajuste osmótico a través de la síntesis interna o la absorción de sustancias osmóticamente activas (Rhodes *et al.*, 1986; Pritchard *et al.*, 2000). Hay pocas dudas de que los azúcares solubles puedan contribuir al ajuste osmótico. En raíces y hojas de cultivos agrícolas aumentó la concentración de azúcar soluble aumentó en respuesta al estrés hídrico (Premachandra *et al.*, 1992; Shahbaz *et al.*, 2011). Según Wingler *et al.* (2005), al señalar una alta disponibilidad de carbono relativo al nitrógeno en las hojas viejas, la acumulación de azúcar podría desencadenar la senescencia de las hojas. Por tanto, la senescencia inducida por azúcar es particularmente importante cuando hay baja disponibilidad de nitrógeno y puede también tener una función en la transducción de luz. La resistencia a la sequía y sus componentes (estomáticos y no estomáticos) se redefinen para expresar la extraordinaria capacidad inventiva para terminología. Pero en la literatura revisada, el estudio de azúcar soluble y almidón, en hojas y tallos de girasoles, y la respuesta fotosintética al déficit hídrico de las hojas de tres distintas edades, están limitadas bajo condiciones de déficit hídrico. Por tanto, los objetivos de este estudio fueron: 1) determinar la acumulación de azúcar soluble y almidón en hojas y tallos de girasoles bajo condiciones de déficit hídrico; y 2) comparar las diferencias de contenido de clorofila y la respuesta en fotosíntesis entre hojas de distintas edades (jóvenes, totalmente desarrolladas y viejas) bajo condiciones de déficit hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y establecimiento del experimento

Este experimento se realizó en el vivero de investigación del Departamento de Ciencia de Cultivos Universidad Adnan Menderes, Turquía, y en colaboración con la Facultad de Horticultura, Universidad Humboldt, Alemania, en 2013. Dos variedades de girasol fueron usadas: Sanbro, desarrollada por Syngenta ©, y TR-3080 (Directorate Trakya, Instituto de Investigación Agrícola, Turquía). Las variedades de girasol se usaron para determinar la variación bajo dos regímenes de agua (déficit hídrico y buena

experiment. The sunflower cultivars were planted in Mitschelin pots (30 cm deep 20 cm in diameter) in the greenhouse and exposed to the natural sunlight of the summer months. We used clay loam soil to fill pots. The cultivars were set up in a completely randomized block design with five replications. We applied chemical fertilizers following the manufacturer's instructions of 1 g nitrogen from 3.70 g KAS (Kalkammonsalpeter) fertilizer according to field conditions, and then six seed were sowed. After sowing and once the seedlings had emerged, thinning was carried out and the plant populations were maintained (3 plants in a pot).

Determination of water holding capacity of soil

To determine the soil field capacity, soil samples with a pH 6.3, low carbon level 0.7 mg 100 g⁻¹ and sandy soil 73 %, was obtained from the experimental field area, they were air-dried and ground to pass through a 5 mm sieve at room temperature. Each pod was filled with 6 kg of ground soil. Water holding capacity was determined using a gravimetric method with five replicates and mean moisture was estimated (percentage). Firstly the bottoms of five 100 cm³ cylindrical tubes were covered with paper and a plastic strap for the filter and they were weighed without soil and then filled completely with soil (by compression). Each cylindrical tube with soil was weighed (g) and settled in a tray, which was approximately as deep as the height of the cylindrical tube. The tray was fully filled with water up to the top of the cylindrical tube for 3 h in order to allow soil water saturation. Further, all cylindrical tubes were left on the quartz soil for 2 h (for drainage and filtering). Ultimately, all the saturated cylindrical tubes were cleaned and weighed again (wet weight, g) while all the tubes were oven-dried at 105 °C for 24 h and the weight of the oven-dry soil samples was measured (dry weight, g). The field capacity of undisturbed soil was calculated with the following formula; F.C (%) = wet soil weight – dry weight / dry weight x 100

Water deficit treatment

The variation of soil water content of each pot were measured and checked daily by weighing each pot at the emergence of two cotyledon and end of the removed plant. The soil water factor included two irrigation regimes: irrigation at 20 % (water deficit) and 70 % (well-watered) of field capacity. The treatments began after cotyledon leaves appeared. Plants were harvested 45 d after sowing when they were at the R1 stage (bud visible).

Chlorophyll content

Leaves chlorophyll content (in SPAD unit) was assessed using a chlorophyll meter (SPAD-502, Minolta) and measurements

irrigación) y condiciones ambientales aproximadas 12/12 h luz/oscuridad, 25/15±3 °C y 40 – 50 % HR en un experimento en vivero. Los cultivares de girasol se plantaron en macetas Mitschelin (30 cm profundidad, 20 cm diámetro) en el vivero y se expusieron a la luz solar natural de los meses de verano. Para llenar las macetas, se usó suelo franco arcilloso. Los cultivares se establecieron en un diseño completo de bloques al azar con cinco repeticiones. Los fertilizantes químicos se aplicaron siguiendo las instrucciones del fabricante de 1 g nitrógeno a partir de 3.70 g KAS (Kalkammonsalpeter) fertilizante, de acuerdo con las condiciones de campo, y se plantaron seis semillas. Después de plantar y de emerger las plántulas, se realizó raleo y las poblaciones de plantas se mantuvieron (3 plantas por maceta).

Determinación de la capacidad de retención de agua del suelo

Para determinar la capacidad de campo del suelo, se obtuvieron muestras de suelo del área experimental en campo con un pH de 6.3, nivel de carbono bajo de 0.7 mg 100 g⁻¹ y suelo arenoso 73 %; se secaron al aire libre y se molieron para pasar por un tamiz de 5 mm a temperatura ambiente. Cada maceta se llenó con 6 kg de suelo molido. La capacidad de retención de agua se determinó usando un método gravimétrico con cinco repeticiones y se estimó la humedad promedio (porcentaje). Primero, se cubrieron los fondos de cinco tubos cilíndricos de 100 cm³ con papel y una correa de plástico para el filtro, y se pesaron sin tierra y después se llenaron completamente con tierra (por compresión). Cada tubo cilíndrico con suelo se pesó (g) y se colocó en una charola, con profundidad aproximada a la altura del tubo cilíndrico. La charola se llenó toda con agua hasta el tope del tubo cilíndrico durante 3 h para permitir la saturación de agua del suelo. Además, todos los tubos cilíndricos se dejaron 2 h en el suelo de cuarzo (para drenar y filtrar). Todos los tubos cilíndricos saturados se limpiaron y pesaron de nuevo (peso mojado, g), y se secaron 24 h en estufa a 105 °C y se midió el peso de las muestras de suelo secado en estufa (peso seco, g). La capacidad de campo del suelo sin perturbar se calculó con la fórmula: C.C. (%) = peso del suelo mojado – peso seco / peso seco x 100.

Tratamiento de déficit hídrico

La variación del contenido de agua en el suelo de cada maceta se midió y revisó cada día, pesando cada maceta después de la emergencia de dos cotiledones y al final de la planta retirada. El factor de agua en el suelo incluyó dos regímenes de irrigación: irrigación al 20 % (déficit hídrico) y al 70 % (buena irrigación) de la capacidad de campo. Los tratamientos comenzaron después de aparecer las hojas de cotiledones. Las plantas se cosecharon 45 d después de plantarlas, cuando estaban en la etapa R1 (con brote visible).

were taken at six points on the both sides of six young leaves, six young fully-developed leaves and six old leaves on just a cultivar in one replicate under two water regimes before harvest. One hundred eight readings were averaged for a plant in a replicate (36 readings for young, 36 readings for young fully developed and 36 readings for old leaves). Total readings were 2160 on three different age leaves of two sunflower cultivars within five replicates.

Leaf-gas exchange measurements

Leaf-gas exchange was measured on young leaves (top of the plant), mature fully developed young leaves (upper part of the plant) and old leaves (lower part of the plant) in both cultivars and treatments at 40 d after sowing using a portable infrared gas exchange analyzer-fluorescence system (WALZ GFS-3000, Effeltrich, Germany). Assimilation rates (A), stomatal conductance to water vapour (g_{sw}), transpiration rate (E), and intercellular CO_2 molar fractions (C_i) were calculated using the equations of von Caemmerer and Farquhar (1981). Measurements were made inside the greenhouse before the middle of the day and under atmospheric CO_2 concentration ($360 \mu\text{mol mol}^{-1}$) on each leaf. A leaf chamber with 4 cm^2 surface area was used. The flow rate was set to $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Chamber temperature ($T_{cuv} \text{ } ^\circ\text{C}$) was set to ambient temperature ($24 \text{ } ^\circ\text{C}$). Photosynthetic active radiation (PAR) of $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was supplied by a light unit containing blue LED's at 470 nm and red ones at 660 nm mounted on the top of the leaf chamber. Instantaneous water use efficiency (IWUE) was calculated by dividing A by E . Measurements were carried out on two young leaves, two young fully developed leaves, and two old leaves, with two measures per leaf in five replications for each treatment. Forty readings were averaged by readings of two leaves per plant for five replicates per genotype by one leaf group in both conditions.

Determination of leaf and stem soluble sugar

The young fully developed leaves from the shoot apex and stem were freeze-dried for 24 h and ground finely with a mortar and pestle. The frozen leaves were directly dried using the method of lyophilization (CHRIST Lyophilizer GAMMA 1-16 LSC model, London, England). Soluble sugars were extracted from 0.1 g dry matter with 80 % ethanol (v/v) at $70 \text{ } ^\circ\text{C}$ for 1 h. The extracts (centrifuge tube 10 mL) were mixed with a vibra mixer (Bender 8 Hobein AG, Zurich, Switzerland). All extracts were shaken (Julabo SW20 shaker) in a water bath at $70 \text{ } ^\circ\text{C}$ for 30 min. All tubes were centrifuged at 4000 rpm at $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ for 7 min in a Hettich centrifuge (Rotanta 460 R model). Retained

Contenido de clorofila

El contenido de clorofila en hojas (en unidades SPAD) se evaluó usando un medidor de clorofila (SPAD-502, Minolta) y se tomaron medidas en seis puntos en ambos lados de seis hojas jóvenes, seis hojas totalmente desarrolladas y seis hojas viejas en un solo cultivar, en una repetición bajo dos regímenes hídricos antes de la cosecha. Para una planta por repetición, se promediaron ciento ocho lecturas (36 lecturas para las jóvenes, 36 para las totalmente desarrolladas, y treinta y seis para las hojas viejas). En total fueron 2160 lecturas en tres grupos distintos de edad de las hojas, de dos cultivares de girasol, dentro de cinco repeticiones.

Medidas de intercambio gaseoso

El intercambio gaseoso se midió en hojas jóvenes (parte más alta de la planta), jóvenes totalmente desarrolladas (parte superior de la planta) y viejas (parte baja de la planta), en los cultivares y tratamientos a los 40 d después de plantar, usando un sistema portátil de análisis de intercambio gaseoso infrarrojo-fluorescente (WALZ GFS-3000, Effeltrich, Alemania). Las tasas de asimilación (A), la conductancia estomática de vapor de agua (g_{sw}), la tasa de transpiración (E), y las fracciones molares de CO_2 intercelular (C_i) se calcularon usando las ecuaciones de Von Caemmerer y Farquhar (1981). Las mediciones se hicieron dentro del invernadero antes del mediodía y bajo una concentración de CO_2 atmosférico de $360 \mu\text{mol mol}^{-1}$ en cada hoja. Una celda de hoja con superficie de área de 4 cm^2 se utilizó. La tasa de flujo se estableció a $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La temperatura de la celda ($T_{cuv} \text{ } ^\circ\text{C}$) se fijó a temperatura ambiente ($24 \text{ } ^\circ\text{C}$). La radiación fotosintética activa (RFA) de $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se suministró con una unidad de luz que contenía LED azules a 470 nm y las rojas a 660 nm se colocaron encima de la celda de las hojas. La eficiencia instantánea de uso de agua (EIUA) se calculó dividiendo A por E . Las mediciones se realizaron en dos hojas jóvenes, dos hojas jóvenes totalmente desarrolladas y dos hojas viejas, con dos mediciones por hoja en cinco repeticiones por tratamiento. Se promediaron cuarenta lecturas con lecturas de dos hojas por planta para cinco repeticiones por genotipo por grupo de hojas en ambas condiciones.

Determinación del azúcar soluble en hoja y tallo

Las hojas jóvenes totalmente desarrolladas del ápice del brote se liofilizaron 24 h y se molieron finamente con un mortero. Las hojas congeladas se secaron directamente usando el método de liofilización (CHRIST Lyophilizer modelo GAMMA 1-16 LSC, Londres, Inglaterra). Los azúcares solubles se extrajeron de 0.1 g de materia seca con 80 % etanol (v/v) a $70 \text{ } ^\circ\text{C}$ por 1 h. Los extractos

supernatant was transferred to a 25 mL flask. This procedure was repeated three times. The extract was filtered through Whatman no. 1 filter paper and the ethanol evaporated. The residue was redissolved in 25 mL of deionized water and an aliquot of the resultant solution was filtered through a 0.45 μm Millex-HA filter unit (Millipore; Bedford, Mass.). Then, 0.1 % anthrone solution (Alfa-Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany) in 1000 mL 95 % H_2SO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was prepared in a dark bottle. 1 mL of sample extract was transferred to a test tube and 2.5 mL of anthrone solution was added. All test tubes were mixed by a vibra mixer and put in boiling water for 15 min. Soluble sugar in leaf and stem was measured against a glucose standard spectrophotometrically at 620 nm (Analytikjena Specord model, Jena, Germany). Two zero standards were used as a reference. Standard solution: 500 mg L^{-1} glucose in 48 % ethanol (50 mg glucose in 100 mL 48 % ethanol). Soluble sugar of leaf and stem was determined from a standard curve calculated as $\mu\text{g g}^{-1}$ according to the following formula:

$$\text{Sugar concentration (mg L}^{-1}\text{)} = \text{glucose mg L}^{-1} \times 0.9.$$

Eight standard curves were constructed from a dilution series of mg L^{-1} glucose (0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 mg L^{-1}) of soluble sugar, from a stock solution in 25 mL flask (0, 0.625, 1.25, 2.5, 3.75, 5, 6.25, 7.5 mg L^{-1}), respectively.

Determination of leaf and stem starch

The sample remaining from sugar analysis in the centrifuge tube was added with 2 mL of distilled water and mixed with a vibra mixer (Bender 8 Hobein AG, Zurich, Switzerland). Afterwards all tubes were covered with aluminum foil and put in boiling water for 15 min. All tubes had 2 mL of perchloric acid (9.2 mol L^{-1}) and were mixed by a vibra mixer. After 15 min, 4 mL of distilled water was added to all tubes. The tubes were centrifuged for 10 min at 4000 rpm in a Hettich centrifuge (Rotanta 460 R model). The remains in the tube were transferred to 50 mL flask. This procedure was repeated three times with perchloric acid. 1 mL of sample was extracted and transferred to a test tube and 2.5 mL of anthrone solution was added. All test tubes were mixed with a vibra mixer and put in boiling water for 15 min. Starch in leaf and stem was measured spectrophotometrically against a glucose standard at 620 nm (Analytikjena, Specord model, Jena, Germany). Two zero standards were used as reference. Standard solution: 500 mg L^{-1} glucose (55 mg glucose-monohydrate in 100 mL distilled water). Starch of leaf and stem was determined from a standard curve calculated as mg L^{-1} . Eight standard curves were constructed from a dilution series of mg L^{-1} glucose

(tubo de centrifuga de 10 mL) se mezclaron con un mezclador Vibra (Bender 8 Hobein AG, Zurich, Suiza). Todos los extractos se agitaron (agitador Julabo SW20) en baño maría a 70 °C por 30 min. Todos los tubos se centrifugaron a 4000 rpm a 20 °C por 7 min en una centrifuga Hettich (Rotanta modelo 460 R). El sobrenadante retenido se transfirió a un matraz de 25 mL. Este procedimiento se repitió tres veces. El extracto se filtró a través de papel filtro Whatman núm. 1 y el etanol se evaporó. El residuo se redisolvió en 25 mL de agua desionizada y una alícuota de la solución resultante se filtró a través de una unidad de filtro 0.45 μm Millex-HA (Millipore; Bedford, Mass.). Después se preparó una solución de 0.1 % antrona (Alfa-Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Alemania) en 1000 mL 95 % H_2SO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), en una botella oscura. De la muestra del extracto, 1 mL se transfirió a una probeta y se añadieron 2.5 mL de solución de antrona. Todos los tubos de ensayo se mezclaron con un mezclador Vibra y se colocaron en agua hirviendo por 15 min. El azúcar soluble en hoja y tallo se midió espectrofotométricamente a 620 nm contra un estándar de glucosa (modelo Analytikjena Specord, Jena, Alemania). Dos estándares cero se usaron como referencia. Solución estándar: 500 mg L^{-1} glucosa en 48 % etanol (50 mg glucosa en 100 mL 48 % etanol). El azúcar soluble de hoja y tallo se determinó con una curva estándar calculada como $\mu\text{g g}^{-1}$ y la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de azúcar (mg L}^{-1}\text{)} = \text{glucosa mg L}^{-1} \times 0.9.$$

Ocho curvas estándar se construyeron desde una serie de dilución de mg L^{-1} glucosa (0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 mg L^{-1}) de azúcar soluble, desde una solución madre en un matraz de 25 mL (0, 0.625, 1.25, 2.5, 3.75, 5, 6.25, 7.5 mg L^{-1}), respectivamente.

Determinación del almidón de hoja y tallo

En la muestra remanente del análisis de azúcar en el tubo de centrifuga se añadieron 2 mL de agua y se mezclaron con un mezclador Vibra (Bender 8 Hobein AG, Zurich, Suiza). Todos los tubos se cubrieron con papel aluminio y se colocaron 15 min en agua hirviendo. Todos los tubos tenían 2 mL de ácido perclórico (9.2 mol L^{-1}) y se mezclaron con un mezclador Vibra. Después de 15 min, se añadieron 4 mL de agua destilada a todos los tubos, se centrifugaron 10 min a 4000 rpm en una centrifuga Hettich (modelo Rotanta 460 R). Los sobrantes del tubo se transfirieron a un matraz de 50 mL. Este procedimiento se repitió tres veces con ácido perclórico. Un mL de muestra se extrajo y se transfirió a un tubo de ensayo y se añadieron 2.5 mL de solución de antrona. Todos los tubos de ensayo se mezclaron con un mezclador Vibra y se colocaron 15 min en agua hirviendo.

(0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 mg L⁻¹) of soluble sugar in mL stock solution in 25 mL flask (0, 0.625, 1.25, 2.5, 3.75, 5, 6.25, 7.5 mg L⁻¹), respectively. Calculations were made by standard curves and the measured extinction coefficient was used to read concentration directly in the program to obtain soluble starch concentration (mg g⁻¹ dry weight) = Reading of standard × sample reading × dilution factor.

Relative membrane permeability (RMP)

The RMP of the leaf cells was determined by the method described by Yang *et al.* (1996), about the extent of ion leakage. The fully expanded young leaves from each plant were cut into three discs (1.0 cm diameter) and these discs (0.5 g) were placed into test tubes containing 20 mL distilled water. After vortexing the samples for 3 s, initial electrical conductivity (EC₀) of each sample was measured. Then the samples were incubated at 4 °C for 24 h and electrical conductivity (EC₁) was measured again. The samples were then autoclaved at 120 °C for 15 min, cooled to room temperature and (EC₂) was measured for the third time (Akram and Ashraf, 2008; Heideri *et al.*, 2011). The RMP was calculated using the following formula:

$$\text{RMP (\%)} = (\text{EC}_1 - \text{EC}_0) / (\text{EC}_2 - \text{EC}_0) \times 100.$$

Statistical analysis

To analyze the variance of water deficit in the two sunflower cultivars and the interaction of water deficit, cultivars and different organs an ANOVA was performed. The ANOVA and LSD values for each variable were analyzed by the variance of water regime, cultivars and their interactions. The analysis was performed using SPSS and Tarist (Açıkgöz *et al.*, 1994) statistical computer programs. Significant differences between the mean of replications were tested using Fisher's LSD method.

RESULTS AND DISCUSSIONS

There were statistically significant differences between *E*, the ratio *C_i/Ca*, *g_s*, *A* and IWUE between the two cultivars (Table 1 and Figure 1). Water deficit had statistically affected on *A*, *E*, *C_i/Ca*, *g_s* and IWUE except for Chl of sunflower plant (Table 1). There were also statistically significant differences in terms of *A*, *E*, *C_i/Ca*, *g_s*, IWUE and Chl among the young, mature (young fully-developed) and old leaves of both cultivars (Table 1). Cultivars × Leaves interaction was statistically significant in terms of *A*, *C_i/Ca*, *g_s*, IWUE and Chl except for *E* (Table 1).

El almidón en la hoja y en el tallo se midió espectrofotométricamente a 620 nm contra un estándar de glucosa (Analytikjena, modelo Specord, Jena, Alemania); dos estándares cero se usaron como referencia. Solución estándar: 500 mg L⁻¹ glucosa (55 mg glucosa-monohidrato en 100 mL agua destilada). El almidón de la hoja y del tallo se determinó desde una curva estándar calculada como mg L⁻¹. Ocho curvas estándar se construyeron desde una serie de diluciones de mg L⁻¹ glucosa (0, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 mg L⁻¹) de azúcar soluble en mL de solución stock en matraces de 25 mL (0, 0.625, 1.25, 2.5, 3.75, 5, 6.25, 7.5 mg L⁻¹), respectivamente. Los cálculos se hicieron con curvas estándar y el coeficiente de extinción medido se usó para leer la concentración directamente en el programa para obtener la concentración de almidón soluble (mg g⁻¹ peso seco) = Lectura del estándar × lectura de la muestra × factor de dilución.

Permeabilidad relativa de la membrana (PRM)

La PRM de las células de las hojas se determinó con el método descrito por Yang *et al.* (1996) acerca del grado de fuga de iones. Las hojas jóvenes completamente expandidas de cada planta se cortaron en tres discos (diámetro de 1.0 cm), y estos discos (0.5 g) se colocaron en tubos de ensayo con 20 mL de agua destilada. Después de pasar las muestras por el vórtex por 3 s, la conductividad eléctrica (EC₀) de cada muestra se midió. Luego las muestras se incubaron 24 h a 4 °C y la EC₁ se volvió a medir. Las muestras se colocaron, entonces, en la autoclave a 120 °C por 15 min, se enfriaron a temperatura ambiente y se midió la conductividad eléctrica (EC₂) por tercera vez (Akram y Ashraf, 2008; Heideri *et al.*, 2011). La PRM se calculó con la fórmula:

$$\text{PRM (\%)} = (\text{EC}_1 - \text{EC}_0) / (\text{EC}_2 - \text{EC}_0) \times 100.$$

Análisis estadístico

Para analizar la varianza del déficit hídrico en los dos cultivares de girasol y la interacción del déficit hídrico, las variedades y los distintos órganos, se realizó una prueba ANDEVA. Los valores de ANDEVA y LSD para cada variable se analizaron por varianza de régimen hídrico, variedades y sus interacciones. El análisis se realizó con los programas de computación estadísticos SPSS y Tarist (Açıkgöz *et al.*, 1994). Las diferencias significativas entre las medias de las réplicas se probaron con el método LSD de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre los dos cultivares, hubo diferencias significativas entre *E*, la proporción *C_i/Ca*, *g_s*, *A* y EIUA

Table 1. The mean of square and LSD value of net CO₂ assimilation rate (*A*), transpiration rate (*E*), the ratio of intercellular air space and atmospheric CO₂ molar fractions (*C_i/Ca*), stomatal conductance (*g_s*) and instantaneous water use efficiency (IWUE) in young, mature (young fully developed) and old leaves of two sunflower cultivars.

Cuadro 1. La media del valor cuadrado y LSD de la tasa de asimilación neta de CO₂ (*A*), la tasa de transpiración (*E*), la proporción de espacio aéreo intercelular y fracciones molares de CO₂ atmosférico (*C_i/Ca*), la conductancia estomática (*g_s*) y la eficiencia instantánea de uso de agua (EIUA) en hojas jóvenes, maduras (jóvenes totalmente desarrolladas) y viejas de dos variedades de girasol.

Variance source	Square mean					
	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>C_i/Ca</i>	<i>g_s</i>	IWUE	Chl
WD	1004.095**	43.350**	0.038**	0.437**	32.267**	22.817ns
C	8.325**	0.771*	0.015**	0.006**	0.150*	212.817**
L	14.694**	0.177**	0.017**	0.001**	1.485*	268.217**
WD x C	1.218**	0.096**	0.001**	0.000ns	0.171**	0.417ns
WD x L	6.710**	0.838**	0.056**	0.006**	0.192**	11.317ns
C x L	0.106**	0.008ns	0.005**	0.000ns	0.059**	4.617*
WD x C x L	0.050*	0.028**	0.001**	0.001*	0.022**	1.517ns
LSD _{0.05} WD	0.063	0.043	0.004	0.004	0.037	1.309
LSD _{0.05} C	0.063	0.043	0.004	0.004	0.037	1.309
LSD _{0.05} L	0.078	0.052	0.005	0.005	0.045	1.603
LSD _{0.05} WDxC	0.090	0.060	0.006	0.005	0.052	1.851
LSD _{0.05} WDxL	0.110	0.074	0.007	0.006	0.064	2.268
LSD _{0.05} CxL	0.110	0.074	0.007	0.006	0.064	2.268
LSD _{0.05} WDxCxL	0.155	0.105	0.010	0.009	0.091	3.207
Descriptive statistics						
Minimum	2.00	1.20	0.67	0.14	0.90	18.00
Maximum	13.10	3.80	0.88	0.38	3.40	33.00
Mean	6.95	2.36	0.75	0.27	2.10	27.12
Std. Deviation	4.23	0.89	0.06	0.08	0.88	4.29

WD: Water deficit; C: Cultivar; L: Leaves (young, mature, old leaves); ns: non-significant; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. ♦ WD: Déficit hídrico; C: Cultivar; L: Hojas (hojas jóvenes, maduras, viejas); ns: no significativo; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

Different leaves aged young, mature and old showed statistically remarkable response under both water regimes (Table 1). Two sunflower cultivars and young, mature and old leaves and between interactions, respond differently with regard to *A*, *E*, *C_i/Ca*, *g_s*, IWUE under the two water regimes (Table 1).

The mean *A* rates of both cultivars in young, mature and old leaves were 9.45, 8.05 and 7.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively, and they were significantly decreased by water deficit. The mean *A* rates of young, mature and old leaves of TR-3080 were 9.9, 6.5 and 7.0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively, and they were reduced by water deficit condition, as compared to well watered condition. Sanbro cultivar showed higher *A* than that of TR-3080 in terms of age of leaves, both under well watered and water deficit conditions (Figure 1). However, the highest reduction of *A* was recorded by Sanbro and TR-3080 with a mean value of 8.8 and 9.9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively, in young

(Cuadro 1 y Figura 1). El déficit hídrico tuvo efecto estadístico en *A*, *E*, *C_i/Ca*, *g_s*, EIUA excepto por Chl del girasol (Cuadro 1). También hubo diferencias estadísticas en términos de *A*, *E*, *C_i/Ca*, *g_s*, EIUA y Chl entre las hojas jóvenes, maduras (jóvenes totalmente desarrolladas) y viejas de ambos cultivares (Cuadro 1). La interacción Variedad x Hojas fue estadísticamente significativa en términos de *A*, *C_i/Ca*, *g_s*, EIUA y Chl excepto para *E* (Cuadro 1). Distintas hojas con edad joven, madura y vieja, mostraron una respuesta estadística notable bajo ambos regímenes hídricos (Cuadro 1). Los dos cultivares de girasol y las hojas jóvenes, maduras y viejas y entre interacciones, responden de manera diferente en términos de *A*, *E*, *C_i/Ca*, *g_s*, y EIUA bajo los dos regímenes hídricos (Cuadro 1).

Las tasas *A* promedio de ambos cultivares en hojas jóvenes, maduras y viejas fueron 9.45, 8.05 y 7.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, y disminuyeron

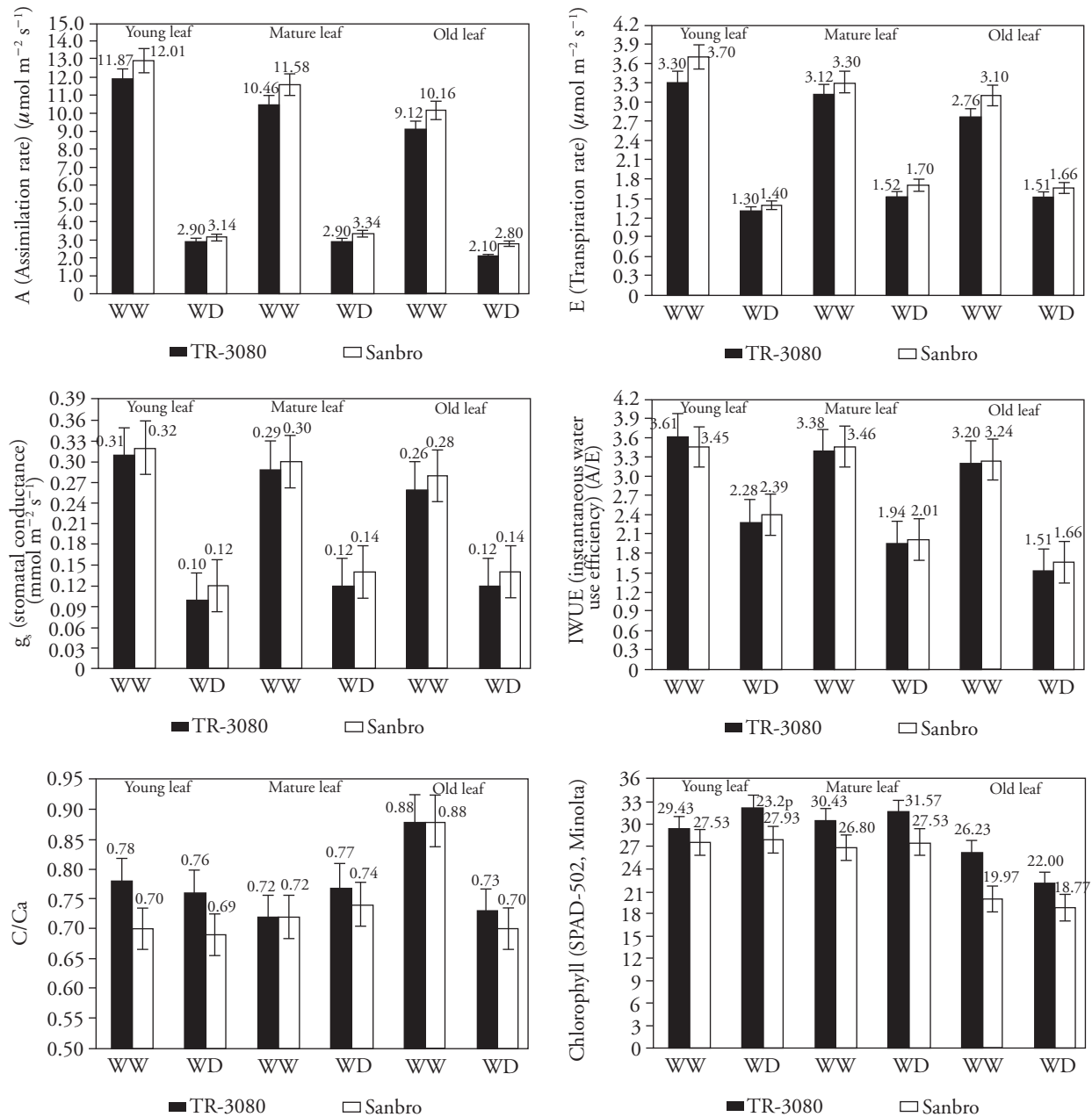


Figure 1. Net CO_2 assimilation rate (A), transpiration rate (E), the stomatal conductance (g), instantaneous water use efficiency (IWUE), the ratio of intercellular air space and atmospheric CO_2 molar fractions (C_i/C_a) and chlorophyll in young, mature (young fully developed leaves) and old leaves of two cultivars under well watered (WW) and water deficit (WD) irrigation.

Figura 1. Tasa de asimilación neta de CO_2 (A), tasa de transpiración (E), conductancia estomática (g), eficiencia instantánea de uso de agua (EIUA), proporción de espacio aéreo intercelular y fracciones molares de CO_2 atmosférico (C_i/C_a), y clorofila en hojas jóvenes, maduras (jóvenes totalmente desarrolladas) y viejas de dos cultivares bajo buena irrigación (WW) y déficit hídrico (WD).

leaves of both cultivars and under water deficit. However, young and mature leaves showed a greater rate of A than that in old leaves, under water deficit

significativamente con déficit hídrico. Las tasas A promedio de hojas jóvenes, maduras y viejas de TR-3080 fueron 9.9, 6.5 y 7.0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente,

conditions (Figure 1). The highest reduction in E under water deficit was also observed in young leaves of both cultivars (Figure 1). There were significant differences of E in the mature and old leaves between Sanbro and TR-3080 treatments (Figure 1). However, the reduction of E in young leaves of both cultivars under water deficit was lowest by $2.15 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Also, the old leaves in both cultivars had higher E than the young and mature leaves under water deficit (Figure 1). In our study, the E of young, mature and old leaves of Sanbro were higher by $0.1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ than that of TR-3080 under water deficit condition (Figure 1). It is considered that A in old leaves (senescent leaves) is associated with the increase in E , g_s and low chlorophyll content, low efficiency of leaf photochemistry and photosynthesis, low capacity for both electron transport through photosystem II (Johnson and Maxwell, 2000) and low CO_2 fixation under stress conditions. Flexas and Medrano (2002) also explained that the metabolism is impaired as a consequence of decreased synthesis of ribulose biphosphate, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activity, photochemistry and ATP synthesis in the early phases of water stress. Thus, old leaves lose more water by transpiration through high depletion energy. Also carbohydrate metabolism in the leaves changes greatly during leaf development. Young leaves are heterotrophic, which depends in part on carbohydrate imported from other regions of the plant, while mature leaves are the major source of transported sugars and minerals (Rennie and Turgeon, 2009). This result also corresponds with that of explained by Rawson and Hackett (1974), who found that the leaf position on the stem of tobacco affected gas exchange and transpiration rate, with intermediate position leaves (not young) having higher net photosynthesis and transpiration. Thereby, the surplus of carbohydrate is used to maintain young fully developed mature leaves.

Although young leaves of both cultivars had higher stomatal conductance (g_s) by a mean of $0.31 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ than the other leaves, mature and old leaves under well watered conditions, it was lower in younger leaves ($0.11 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) than that of the mature and old leaves under water deficit conditions (Figure 1). The lowest percentage reduction was recorded in mature and old leaves, compared with the percentage reduction in young leaves under water

y se redujeron con la condición de déficit hídrico, en comparación con la condición de buena irrigación. El cultivar Sanbro mostró una mayor A que TR-3080 en términos de la edad de las hojas, bajo condiciones de buena irrigación y de déficit hídrico (Figura 1). No obstante, la mayor reducción de A la registró Sanbro y TR-3080 con un valor promedio de 8.8 y $9.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, en hojas jóvenes de ambos cultivares y bajo déficit hídrico. Sin embargo, las hojas jóvenes y maduras mostraron una mayor tasa de A que las hojas viejas, bajo condiciones de déficit hídrico (Figura 1). La mayor reducción de E bajo déficit hídrico también se observó en hojas jóvenes de ambos cultivares (Figura 1). Hubo diferencias significativas de E en las hojas maduras y viejas entre Sanbro y TR-3080 en los tratamientos (Figura 1). Sin embargo, la reducción de E en hojas jóvenes de ambos cultivares bajo déficit hídrico fue la menor en $2.15 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Además, las hojas viejas de ambos cultivares tuvieron mayor E que las hojas jóvenes y maduras bajo déficit hídrico (Figura 1). En nuestro estudio, la E de hojas jóvenes, maduras y viejas de Sanbro fue mayor que las de TR-3080 en $0.1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, bajo la condición de déficit hídrico (Figura 1). Se considera que A en hojas viejas (hojas senescentes) está asociada con el aumento de E , g_s y bajo contenido de clorofila, baja eficiencia de la fotoquímica y la fotosíntesis de las hojas, baja capacidad de transporte de electrones a través del fotosistema II (Johnson y Maxwell, 2000), y baja fijación de CO_2 bajo condiciones de estrés. Flexas y Medrano (2002) también explicaron que el metabolismo se desajusta como consecuencia de las síntesis reducida de ribulosa bífosfato, ribulosa-1,5-bífosfato, actividad carboxilasa/oxygenasa, fotoquímica y síntesis de ATP en las fases iniciales del estrés hídrico. Así las hojas viejas pierden más agua por transpiración a través de un alto gasto de energía. Además, el metabolismo de los carbohidratos en las hojas cambia mucho durante el desarrollo de la hoja. Las hojas jóvenes son heterotróficas, lo cual depende en parte de los carbohidratos importados de otras regiones de la planta, mientras que las hojas maduras son la principal fuente de los azúcares y minerales transportados (Rennie y Turgeon, 2009). Este resultado también corresponde con lo explicado por Rawson y Hackett (1974), quienes encontraron que la posición de la hoja en el tallo del tabaco afecta el intercambio gaseoso y la tasa de transpiración; las hojas de posición intermedia (no

deficit condition (Figure 1). Sanbro cultivar had greater g_s than that of TR-3080 in all age leaves and under both water conditions (Figure 1). The reason why we consider an increase in abscisic acid (ABA) concentration within tissue of young leaves under water-deficit condition is because this stimulates efflux from guard cells, which leads to stomatal movement and closure (Raschke and Hedrich, 1985). Also, it may be due to the challenge of the old leaves of sunflowers in the complete and rapid recovery of photosynthesis from the adverse effects of water stress on both stomatal and nonstomatal factors (Raschke and Hedrich 1985).

IWUE in all leaves of both cultivars was significantly decreased by water deficit conditions (Figure 1). According to Raschke and Hedrich (1985) this effect appeared in order to close stoma under drought stress, limiting CO_2 availability and ultimately reducing photosynthesis. The IWUE of young leaves under both conditions was higher than that of mature and old leaves. However, the reduction percentage of old leaves (47 %) was higher than that of the other leaves, with an IWUE 1.69 and 1.50 for TR-3080 and Sanbro (data not shown). Especially, the results show that the young leaves of Sanbro contained higher IWUE than that of TR-3080 under water deficit conditions (Figure 1). According to Uzunova and Zlatev (2013) this is a molar ratio of assimilation to transpiration. In others words, they keep their stomata relatively open allowing to compensate for water losses or for a loss of stomatal control, the water use efficiency could remain unchanged or insignificantly reduced. The transpiration rates for Sanbro leaves across ageing were higher than those for TR-3080 (Figure 1) and also stomatal conductance of Sanbro was higher than TR-3080. Therefore, high transpiration losses of young, mature and old leaves of Sanbro can be attributed to more open stomata, which caused more water lost.

The results of our study showed that in the old leaves of sunflower plants, C_i/C_a decreased due to water deficit. Also C_i/C_a of young, mature and old leaves of Sanbro were lower than that of TR-3080 under water deficit conditions. There were markedly differences in terms of C_i/C_a among the leaves of different ages. The highest change ratio of intercellular air space and atmospheric CO_2 molar fractions, in response to water deficit conditions was observed in

jóvenes) muestran mayor fotosíntesis y transpiración neta. Por ende, el excedente de carbohidratos se usa para mantener a las hojas maduras jóvenes totalmente desarrolladas.

Aunque las hojas jóvenes de ambos cultivares tuvieron una conductancia estomática (g_s) más alta en promedio de $0.31 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ que las otras hojas, maduras y viejas, bajo condiciones de buena irrigación, fue menor en hojas más jóvenes ($0.11 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) que en hojas maduras y viejas bajo condiciones de déficit hídrico (Figura 1). La menor reducción porcentual se registró en hojas maduras y viejas, comparada con la reducción porcentual en hojas jóvenes bajo condición de déficit hídrico (Figura 1). El cultivar Sanbro tuvo un mayor g_s que la TR-3080 en hojas de todas las edades y bajo ambas condiciones hídricas (Figura 1). La razón por la cual consideramos un aumento en concentración de ácido abscísico (ABA) dentro del tejido de hojas jóvenes bajo condición de déficit hídrico se debe a que esto estimula la salida desde las células guardia, lo cual llevo al movimiento y cierre estomático (Raschke y Hedrich, 1985). Además, puede deberse al desafío de las viejas hojas de girasol en la recuperación completa y rápida de fotosíntesis de los efectos adversos del estrés hídrico en factores estomáticos y no estomáticos (Raschke y Hedrich 1985).

La EIUA en todas las hojas de ambos cultivares disminuyó significativamente por las condiciones de déficit hídrico (Figura 1). Según Raschke y Hedrich (1985), este efecto apareció para cerrar los estomas bajo estrés por sequía, limitando la disponibilidad de CO_2 y por último reduciendo la fotosíntesis. La EIUA de las hojas jóvenes bajo ambas condiciones fue mayor que la de hojas maduras y viejas. Sin embargo, el porcentaje de reducción de las hojas viejas (47 %) fue mayor que el de las otras hojas, con una EIUA de 1.69 y 1.50 para TR-3080 y Sanbro (datos no mostrados). En especial, los resultados muestran que las hojas jóvenes de Sanbro contenían mayor EIUA que las de TR-3080 bajo condiciones de déficit hídrico (Figura 1). Según Uzunova y Zlatev (2013), esta es una proporción molar de asimilación a transpiración. En otras palabras, mantienen sus estomas relativamente abiertos permitiendo compensar por pérdidas de agua o por una pérdida de control estomático, la eficiencia de uso del agua podría permanecer sin cambio o reducirse de manera no significativa. Las tasas de transpiración para las hojas

old leaves. Reduction in photosynthetic rate as leaves age is attributed to a reduction in concentrations of enzymes involved in the photosynthetic reactions (Lemonie *et al.*, 2013) and chloroplast membrane composition (Bruce, 2000).

The results show that there were significant negative effects of water deficit on the chlorophyll content or greening of old leaves in both genotypes (Figure 1). However, statistical analyses revealed that the chlorophyll in young and mature leaves of TR-3080 increased under the water deficit conditions. On average, the increase of chlorophyll in Sanbro, under water deficit conditions, was not statistically different (Figure 1). The increase in young and fully expanded leaves is attributed to biochemical changes in the production of fully developed chloroplasts, including synthesis of a variety of molecules and increases in the total number of chloroplasts (Leech and Baker 1983; Lieth and Pasian 1990; Burke, 2007).

There were statistically significant differences in soluble sugar, starch and relative membrane permeability (RMP) between the two sunflower cultivars (Table 2). Water deficit had statistically significant effect on soluble sugar, starch and RMP of sunflower plants (Table 2). There were also statistically significant differences results with regard to soluble sugar and starch between the stem and leaves of both sunflower cultivars (Table 2). Cultivars x organs (stem and leaves) interactions were statistically significant for soluble sugar and starch (Table 2). It was observed that different water regime x organs interaction was markedly significant for soluble sugar and starch of the sunflower plant (Table 2). In addition, WD x C x O interaction was statistically significant for soluble sugar and starch (Table 2). The RMP value of both sunflower cultivars responded statistically differently against the water deficit condition (Table 2).

Imposition of water deficit resulted in a significant increase in total soluble sugar content in both leaves and stem (Figure 2). TR-3080 cultivar had a higher soluble sugar content (172 mg g^{-1}) in its stem, as compared to Sanbro under well watered condition; however, Sanbro had higher soluble sugar content (24 mg g^{-1}) than TR-3080 under water deficit condition (Figure 2). These results agree with those of Prado *et al.* (2000) who indicated that water stress induce accumulation of soluble sugars, and Conroy *et al.* (1988) pointed out that the concentration of

Sanbro en el envejecimiento fueron mayores que las de TR-3080 (Figura 1) y también la conductancia estomática de Sanbro fue mayor que la de TR-3080. Por tanto, las pérdidas altas de transpiración para hojas jóvenes, maduras y viejas de Sanbro pueden atribuirse a más estomas abiertos, que causaron mayor pérdida de agua.

Los resultados de nuestro estudio mostraron que en las hojas viejas de las plantas de girasol, la C_i/C_a disminuyó debido al déficit hídrico. Además, la C_i/C_a de hojas jóvenes, maduras y viejas fue menor que la de TR-3080 bajo condiciones de déficit hídrico. Hubo diferencias marcadas en términos de C_i/C_a entre las hojas de distintas edades. La proporción de cambio más alta de espacio aéreo intercelular y las fracciones molares de CO_2 atmosférico, en respuesta a las condiciones de déficit hídrico, se observó en hojas viejas. La reducción en la tasa fotosintética conforme las hojas envejecen se atribuye a una reducción en las concentraciones de enzimas involucradas en las reacciones fotosintéticas (Lemonie *et al.*, 2013) y la composición de la membrana de los cloroplastos (Bruce, 2000).

Los resultados muestran que hubo efectos negativos significativos del déficit hídrico en el contenido de clorofila o enverdecimiento de las hojas viejas en ambos genotipos (Figura 1). Pero, los análisis estadísticos mostraron que la clorofila en las hojas jóvenes y maduras de TR-3080 aumentó bajo condiciones de déficit hídrico. En promedio, el aumento en clorofila en Sanbro, bajo condiciones de déficit hídrico, no fue estadísticamente distinto (Figura 1). El aumento en las hojas jóvenes y todas expandidas se atribuye a cambios bioquímicos en la producción de cloroplastos totalmente desarrollados, incluyendo la síntesis de moléculas y aumentos en el número total de cloroplastos (Leech y Baker 1983; Lieth y Pasian 1990; Burke, 2007).

Hubo diferencias estadísticamente significativas en azúcar soluble, almidón y permeabilidad relativa de la membrana (PRM) entre los dos cultivares de girasol (Cuadro 2). El déficit hídrico tuvo un efecto estadísticamente significativo en azúcar soluble, almidón y PRM de plantas de girasol (Cuadro 2). También hubo resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al azúcar soluble y almidón entre el tallo y las hojas de ambos cultivares de girasol (Cuadro 2). Las interacciones de variedad x órganos (tallo y hojas) fueron estadísticamente

Table 2. The mean of square and LSD value of relative membrane permeability of leaves, soluble sugar and starch in leaves and stem of sunflower under different water regime.**Cuadro 2.** Valores del cuadrado de la media y LSD de la permeabilidad relativa de las hojas, el azúcar soluble y almidón en hojas y tallos de girasol bajo distintos regímenes de agua.

Source of variance	Square mean		
	Soluble sugar	Soluble starch	RMP
WD	87609.600**	330.625**	1496.450**
C	14822.500**	112.225**	110.450**
O	1156680.100**	54686.025**	-
WD x C	23814.400**	1.225ns	22.050**
WD x O	85747.600**	46.225**	-
C x O	14212.900**	4.225**	-
WD x C x O	22467.600**	50.625**	-
LSD _{0.05} WD	1.813	0.396	0.648
LSD _{0.05} C	1.813	0.396	0.648
LSD _{0.05} T	1.813	0.396	-
LSD _{0.05} WDxC	2.564	0.560	0.916
LSD _{0.05} WDxT	2.564	0.560	-
LSD _{0.05} CxT	2.564	0.560	-
LSD _{0.05} WDxCxT	3.626	0.792	-
Descriptive statistics			
Minimum	87.00	18.00	17.00
Maximum	540.00	100.00	41.00
Mean	259.85	60.33	27.95
Std. Deviation	189.84	37.64	2.27

WD: Water deficit; C: Cultivar; O: Organs (stem and leaves); ns: non-significant; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ ♦ WD: Déficit hídrico; C: Cultivar; O: Órganos (tallos y hojas); ns: no significativo; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

ethanol, soluble sugars and potassium increased during drought conditions. The solutes accumulation may allow plants to maintain a positive pressure potential which is required to keep stomata open and to sustain gas exchange and growth (White *et al.*, 2000). In particular, the stem of the sunflower had higher total soluble sugar than that of leaves under both conditions. It was revealed that the percentage increase of the soluble sugar in the stem was higher than that of leaves under water deficit conditions. The rate of soluble sugar increment in Sanbro stem was higher (294 mg g⁻¹) than that of TR-3080, under water deficit conditions. Singh (2004) showed that a greater accumulation of sugar lowers the osmotic potential of cells and reduces turgidity loss in plants. Another possible role of sugar is indicated as a readily available energy source. Water-stress significantly

significativas para azúcar soluble y almidón (Cuadro 2). Se observó que una interacción de distinto régimen hídrico x órganos fue muy significativa para el azúcar soluble y el almidón del girasol (Cuadro 2). Además, la interacción WD x C x O fue estadísticamente significativa para azúcar soluble y almidón (Cuadro 2). El valor de PRM de los cultivares de girasol respondió de manera significativamente diferente contra la condición de déficit hídrico (Cuadro 2).

La imposición de un déficit hídrico resultó en un aumento significativo del contenido total de azúcar soluble en hojas y en tallo (Figura 2). TR-3080 tuvo un contenido de azúcar soluble más alto (172 mg g⁻¹) en el tallo, comparado con Sanbro bajo condición de buena irrigación, pero Sanbro tuvo un contenido de azúcar soluble mayor (24 mg g⁻¹) que TR-3080 bajo condición de déficit hídrico (Figura 2). Estos resultados coinciden con los de Prado *et al.* (2000), quienes indicaron que el estrés hídrico induce una acumulación de azúcares solubles, y con Conroy *et al.* (1988), quienes señalaron que la concentración de etanol, azúcares solubles y potasio aumentó durante condiciones de sequía. La acumulación de solutos puede permitir a las plantas mantener un potencial de presión positivo necesario para mantener los estomas abiertos y sustentar el intercambio gaseoso y el crecimiento (White *et al.*, 2000). En particular, el tallo de girasol tuvo mayor azúcar soluble total que las hojas bajo ambas condiciones. Se mostró que el aumento en porcentaje de azúcar soluble en el tallo fue mayor que el de las hojas bajo condiciones de déficit hídrico. La tasa de aumento de azúcar soluble en el tallo Sanbro fue mayor (294 mg g⁻¹) que en TR-3080, bajo condiciones de déficit hídrico. Singh (2004) mostró que una mayor acumulación de azúcar disminuye el potencial osmótico de las células y reduce la pérdida de turgencia en las plantas. Otra función posible del azúcar es como una fuente fácilmente disponible de energía. El estrés hídrico mejoró significativamente la cantidad absoluta y el porcentaje de carbono en la pared celular, y las fracciones de glucosa y sacarosa en las posiciones de hojas superior y media del dosel en relación con el testigo.

En contraste, se muestra que la acumulación de almidón soluble en hojas y tallos es la inversa del azúcar soluble bajo condición de déficit hídrico ($R^2=0.993$) (Figura 3). El aumento en niveles de azúcar acompañado por una disminución en el contenido de almidón en plántulas estuvo directamente vinculado con

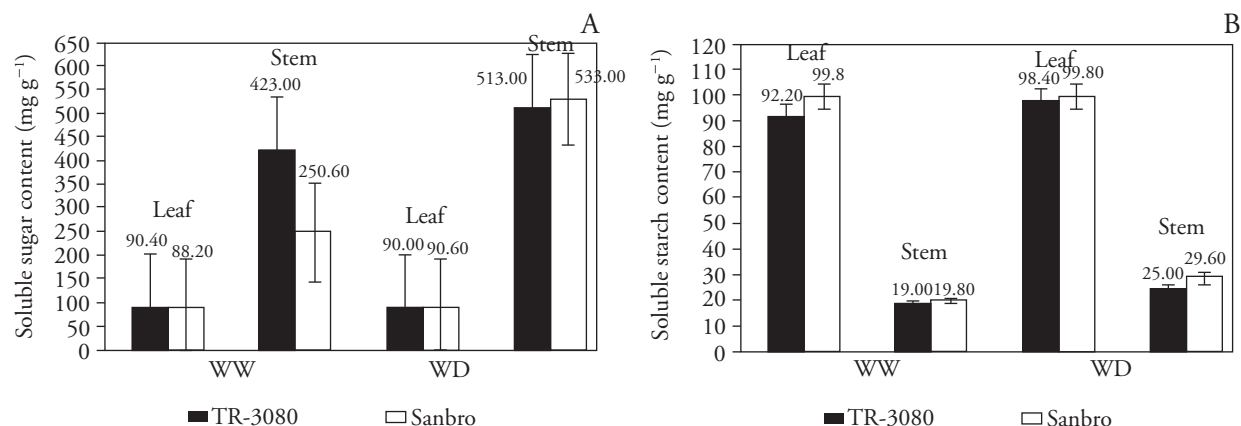


Figure 2. Soluble sugar (A) and starch (B) content in leaf and stem of two sunflower cultivars under well watered (WW) and water deficit (WD) irrigation.

Figura 2. Contenido de azúcar soluble (A) y almidón (B) en hoja y tallo de dos cultivares de girasol bajo condiciones de buena irrigación (WW) y déficit hídrico (WD).

enhanced the absolute amount and the percentage of carbon in the cell wall, glucose and sucrose fractions in both upper and middle canopy leaf positions relative to the control.

In contrast, accumulation of soluble starch in leaves and stems are shown to be the inverse of soluble sugar under water deficit condition ($R^2=0.993$) (Figure 3). The increase in sugar levels accompanied by a decrease in starch content in seedlings was directly linked to the activity of α and β -amylases, which is in agreement with reports by Sauer (2007). Koshkin and Tretiakov (1990) and Hummels *et al.*

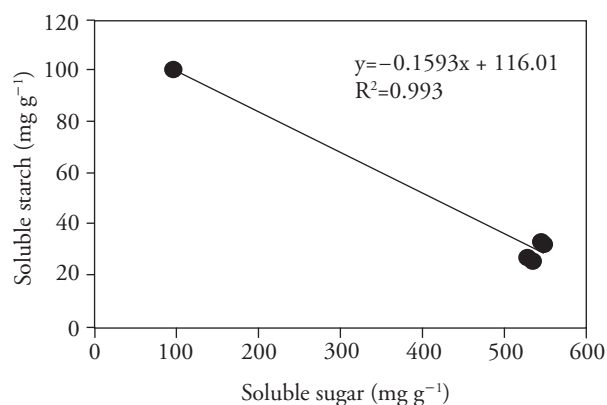


Figure 3. Relationship between soluble sugar and starch content in leaf and stem of two sunflower cultivars under water deficit condition.

Figura 3. Relación entre el contenido de azúcar soluble y almidón en hoja y tallo de dos cultivares de girasol bajo condiciones de déficit hídrico.

la actividad de las α y β -amilasas, lo cual coincide con lo reportado por Sauer (2007). Koshkin y Tretiakov (1990) y Hummels *et al.* (2010) también enfatizaron que las mediciones de azúcares solubles y contenidos de almidón en hojas de algodón indicaron que una porción significativa del carbono fijado durante el día se almacena como almidón, el cual apareció debido a su hidrolización gradual y se transportó activamente a otras partes de la planta durante la noche. Este resultado se observó debido a la estructura del carbono a partir de almidón en el cloroplasto y su conversión a sacarosa. La acumulación de almidón soluble en hojas fue mayor que en tallos en ambas condiciones (Figura 2). El cultivar Sanbro tuvo mayor almidón soluble en hojas y tallos que la TR-3080 bajo condiciones de déficit hídrico (Figura 2). Al parecer, Sanbro tuvo éxito al mostrar tolerancia en condiciones de déficit hídrico en comparación con TR-3080, en términos de tener una mayor acumulación de azúcar soluble y almidón en hojas y tallos que TR-3080. Kerepesi y Galiba (2000) señalaron que genotipos tolerantes acumularon más carbohidratos solubles que los sensibles.

En nuestro estudio, el estrés por déficit hídrico causó un aumento en la permeabilidad de la membrana celular de las hojas en girasoles (Figura 4). El cultivar TR-3080 tuvo valores de porcentaje estadísticamente mayores (8 %) para permeabilidad de la membrana celular que Sanbro, porque hubo mayor derrame de electrolitos en comparación con Sanbro bajo condiciones de déficit hídrico (Figura 4). Se

(2010) also emphasized that measurements of soluble sugars and starch contents in cotton leaves indicated that a significant portion of the carbon fixed during the daytime is stored as starch, which appeared due to gradually hydrolyzed and actively transported to other plant parts during the night. This result was performed due to carbon structure from starch in chloroplast and conversion to sucrose. Accumulation of soluble starch in leaves was higher than that of stems in both conditions (Figure 2). Sanbro cultivar had higher soluble starch in leaves and stems than that of TR-3080 under water deficit conditions (Figure 2). It seemed that Sanbro succeeded to show tolerance in water deficit conditions compared to TR-3080, in terms of having a higher accumulation of soluble sugar and starch in leaves and stems than that of TR-3080. Kerepesi and Galiba (2000) pointed out that tolerant genotypes accumulated more soluble carbohydrate than sensitive ones did.

In our study, water deficit stress caused an increase in cell membrane permeability of leaves of sunflowers (Figure 4). TR-3080 had statistically higher percent values (8 %) for cell membrane permeability than that of Sanbro, because there was more electrolyte leakage compared to Sanbro under water deficit conditions (Figure 4). This was speculated due to membrane damage by abiotic stresses owing to ROS (reactive oxygen species) production (Mansour and Salama, 2004). Thus, it can be assumed from the

especula que esto se debió a daño de la membrana a causa de estrés abiótico por la producción de EOR (especies de oxígeno reactivo) (Mansour y Salama, 2004). Por ende, se puede suponer a partir de la consistencia en los datos que Sanbro, con menor PRM que TR-3080, puede ser más tolerante al déficit hídrico debido a la protección de su membrana del daño por EOR.

CONCLUSIONES

Los efectos de los déficits hídricos sobre la fotosíntesis en las distintas edades de hojas en plantas de girasol son muy complejos, por el cambio observado en tasa neta de asimilación, conductancia estomática y proporción C_i/C_a en plantas de girasol con estrés por sequía. El efecto de la edad de la hoja sobre la capacidad fotosintética por unidad de área de la hoja fue similar, pero difirió levemente en la dirección esperada por la teoría de costo-beneficio. La fotosíntesis y la eficiencia fotoquímica dependieron de la posición del nodo, la cual en cada cultivar tiene una respuesta fotosintética diferente contra el déficit hídrico. En un estudio de fotosíntesis con un sistema analizador de intercambio gaseoso con infrarrojo, no se pueden usar todas las hojas de cualquier cultivar para determinar la capacidad fotosintética de un cultivar debido al prolongado tiempo de análisis para cada hoja, el exceso de muestras y tiempo, y la diferencia en el tiempo de medición de la primera hoja a la última en todos los tratamientos. Por tanto, un muestreo continuo de hojas jóvenes totalmente expandidas de una planta durante un periodo extendido puede probablemente ser adecuado para determinar la actividad fotosintética durante un experimento porque hay una medida más confiable de A , C_i/C_a , g_s y clorofila bajo condición de estrés hídrico.

El aumento de azúcar soluble y almidón en tallo fue mayor que en hojas bajo condiciones de estrés hídrico. El índice de tolerancia al déficit hídrico mostró que Sanbro podría ser relativamente tolerante al déficit hídrico en comparación con TR-3080, debido a su alta acumulación de azúcar soluble y almidón y a su actividad fotosintética.

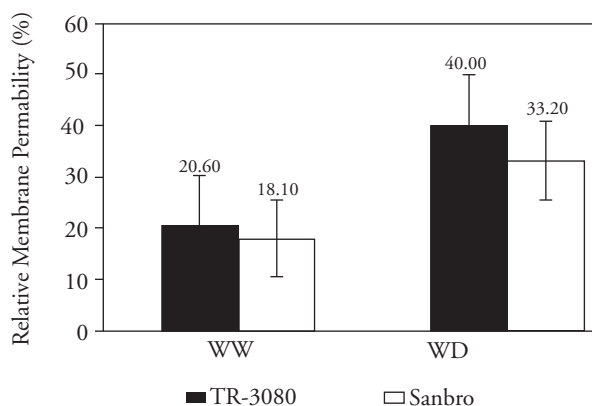


Figure 4. Leaf relative membrane permeability of sunflower cultivars under well watered (WW) and water deficit (WD) irrigation treatments.

Figura 4. Permeabilidad relativa de la membrana de las hojas de cultivares de girasol bajo tratamientos de buena irrigación (WW) y déficit hídrico (WD).

—End of the English version—

—*—

consistency in data that Sanbro, which had lower RMP than that of TR-3080, may be more water deficit tolerant because of protecting its membrane from damage by ROS.

CONCLUSIONS

The effects of water deficits on photosynthesis in the different leaf age of sunflower plants are very complex by the observed change in net assimilation rate, stomatal conductance and C_i/C_a ratio in drought-stressed sunflower plants. The effect of leaf age on photosynthetic capacity per unit leaf area was similar, but differed slightly in the direction expected by cost-benefit theory. Photosynthesis and photochemical efficiency depended on node position, which on each cultivar has a differently photosynthesis response against water deficit. In a photosynthesis study with infrared gas exchange analyzer system, all leaves of any cultivar cannot be used to determine photosynthetic capacity of a cultivar because of long analysis time for each leaf, oversampling, excessive time, the difference of measuring time from the first leaf to the last leaf in all treatments. Therefore, continued sampling of young fully expanded leaves from a plant over an extended period may likely to be suitable to determine photosynthetic activity throughout an experiment because there is a more reliable measurement of A , C_i/C_a , g , and chlorophyll under water stress condition.

The increase of soluble sugar and starch in stem was higher than that of leaves under water stress conditions. Water deficit tolerance index showed that Sanbro could be relatively water deficit tolerant as compared to TR-3080 because of its high soluble sugar starch accumulation and photosynthetic activity.

LITERATURE CITED

- Açıkgoz, N., M. E. Akba, A. Moghaddam, and K. Özcan. 1994. Turkish data based statistics programmer for PC. Turkey Field Crops Congress, Ege University Press pp: 264-267.
- Akram, M. S., and A. M. Ashraf. 2008. Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of potassium nitrate. J. Appl. Bot. Food Qual. 83: 19-27.
- Baker, N. R. 1993. Light-use efficiency and photoinhibition of photosynthesis in plants under environmental stress. In: Smith, J. A. C., and H. Griffiths (eds). Water Deficits Plant Responses from Cell Community. Oxford: Bios Scientific Publisher. pp: 221-235.
- Baker, N. R., and E. Rosenqvist. 2004. Review article: Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. J. Exp. Bot. 55: 1607-1621.
- Bruce, D. B. 2000. Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. Trends Cell Biol. 10: 440-447.
- Burke, J. J. 2007. Evaluation of source leaf responses to water-deficit stresses in cotton using a novel stress bioassay. Plant Physiol. 143: 108-121.
- Von Caemmerer, S., and G. D. Farquhar. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. Planta. 153: 376-387.
- Canavar, Ö., P. K. Götz, F. Ellmer, M. F. Chmielewski, and M. A. Kaynak. 2014. Determination of the relationship between water use efficiency, carbon isotope discrimination and proline in sunflower genotypes under drought stress. Austr. J. Crop Sci. 8: 232-242.
- Cechin, I., N. Corniani, T. F. Fumis, and A. C. Cataneo. 2010. Differential responses between mature and young leaves of sunflower plants to oxidative stress caused by water deficit. Cienc. Rural Santa Maria. 40: 1290-1294.
- Chaves, M. M., J. Flexas, and C. Pinheiro. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Ann. Bot. 103: 551-560.
- Conroy, J. P., J. M. Virgona, R. M. Smillie, and E. W. Barlow. 1988. Influence of drought acclimation and CO₂ enrichment on osmotic adjustment and chlorophyll *a* fluorescence of sunflower during drought. Plant Physiol. 4: 1108-1115.
- Evans, J. R., S. von Caemmerer, B. A. Setchell, and G. S. Hudson. 1994. The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. Aust. J. Plant Physiol. 21: 475-495.
- Flexas, J., and H. Medrano. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. Ann. Bot-London. 89: 183-189.
- Hu, Y., and U. Schmidhalter. 1998. Spatial distributions and net deposition rates of mineral elements in the elongating wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf under saline soil conditions. Planta. 204: 212-219.
- Hummels, I., F. Pantin, R. Sulpice, M. Piques, G. Rolland, and M. Dauzat. 2010. *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. Plant Physiol. 154: 357-72.
- Johnson, N. G., and K. Maxwell. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. J. Exp. Bot. 51: 659-668.
- Kerepesi, I., and G. Galiba. 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Sci. 2: 482-487.
- Koshkin, E., and N. Tretiakov. 1990. Gas exchange measurements required to predict the newly fixed carbon pool size in a source leaf of corn. Plant Cell Environ. 13: 147-153.
- Krizmanic, M., I. Liovic, A. Mijic, M. Bilandzic, and G. Krizmanic. 2003. Genetic potential of OS sunflower hybrids in different agroecological conditions. Sjemernarstvo 20: 237-245.
- Leech, R. M., and N. R. Baker. 1983. The development of photosynthetic capacity in leaves. In: Dale, J. E. and F. L. Milthorpe (eds). The Growth and Functioning of Leaves. Cambridge University Press, Cambridge, England. pp: 271-307.

- Lieth, J. H., and C. C. Pasian. 1990. A model for net photosynthesis of rose leaves as a function of photosynthetically active radiation, leaf temperature, and leaf age. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115: 486-491.
- Mansour, M. M. F., and K. H. A. Salama. 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environ. Exp. Bot.* 52: 113-122.
- Morgan, J. M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 299-319.
- Pejić, B., L. Maksimović, D. Škorić, S. Milić, R. Stričević, and B. Čupina. 2009. Effect of water stress on yield and evapotranspiration of sunflower. *Helia* 32: 19-32.
- Prado, F. E., C. Boero, M. Gallardo, and J. A. Gonzalez. 2000. Effect of NaCl on germination, growth and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* wild seeds. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 41: 27-34.
- Premachandra, G., H. Saneoka, K. Fujita, and S. Ogata. 1992. Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. *J. Exp. Bot.* 43: 1569-1576.
- Pritchard, S. G., Z. Ju, E. van Santen, J. Qiu, D. B. Weaver, S. A. Prior, and H. H. Rogers. 2000. The influence of elevated CO₂ on the activities of antioxidative enzymes in two soybean genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 1061-1068.
- Raschke, K., and R. Hedrich. 1985. Simultaneous and independent effects of abscisic acid on stomata and the photosynthetic apparatus in whole leaves. *Planta* 163: 105-118.
- Rawson, H. M., and C. Hackett. 1974. An Exploration of the carbon economy of the tobacco plant. III. Gas exchange of leaves in relation to position on the stem, ontogeny and nitrogen content. *Aust. J. Plant Physiol.* 1: 551-560.
- Rennie, E. A., and R. Turgeon. 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 14162-14167.10.1073/pnas.0902279106.
- Rhodes, D., S. Handa, and R. A. Bressan. 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 82: 890-903.
- Sauer, N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett.* 581 2309-2317.10.1016/j.febslet.2007.03.048.
- Sayed, O. H. 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* 41: 321-330.
- Shahbaz, M., M. Ashraf, N. A. Akram, A. Hanif, S. Hameed, S. Joham, and R. Rehman. 2011. Salt-induced modulation in growth, photosynthetic capacity, proline content and ion accumulation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Acta. Physiol. Plant.* 33: 1113-1122.
- Singh, A. K. 2004. The physiology of salt tolerance in four genotypes of chickpea during germination. *J. Agric. Sci. Techn.* 6: 87-93.
- Uzunova, K., and Z. Zlatev. 2013. Drought-induced changes in photosynthesis of young cowpea plants. *Agric. Sci. Techn.* 5: 32-34.
- Wingler, A., E. Brownhill, and N. Pourtau. 2005. Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence. *J. Exp. Bot.* 56: 2897-2905.
- White, D. A., N. C. Turner, and J. H. Galbraith. 2000. Leaf water relations and stomatal behavior of four allopatric *Eucalyptus* species planted in Mediterranean southwestern Australia. *Tree Physiol.* 20: 1157-1165.