زیست‌شناسی گیاهی، سال پنجم، شماره پانزدهم، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۶۹-۸۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۲/۲۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۵/۰۴
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۶/۱۸

مطالعه اثر تنش شوری بر برخی از شاخص‌های رشد در سه گونه از جنس اسپرس (*Onobrychis*) در ایران

رؤیا کرمیان * و صدیقه عطایی برازنده
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران

چکیده

اسپرس (*Onobrychis*) از گیاهان مرتعی و علوفه‌ای مهمی است که اغلب گونه‌های آن به صورت خودرو در ایران می‌روید. به منظور تعیین آثار سطوح مختلف شوری بر جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک در سه گونه اسپرس مرتعی (*O. subnitens*، *O. viciifolia* و *O. melanotricha*)، آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار با ۵ تیمار مختلف در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که با افزایش سطح شوری، جوانه‌زنی در هر سه گونه کاهش یافته، در تیمار ۴۰۰ میلی‌مولار متوقف می‌شود. مقایسه میانگین ویژگی‌های وزن تر و وزن خشک دانه‌رُست‌های رشد یافته در حضور نمک نشان داد که این ویژگی‌ها تا غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک کاهش یافته، اختلاف معنی‌داری نیز میان سطوح مختلف شوری مشاهده شد. نتایج حاصل از مطالعه کمّی و کیفی پروتئین‌ها نیز گویای افزایش محتوای پروتئین کل و کاهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در تنش شوری است. از آثار دیگر شوری می‌توان به افزایش درخور توجه محتوای پرولین آزاد در گیاهان مورد مطالعه اشاره نمود که در پاسخ به شوری برای تنظیم پتانسیل اسمزی به کار می‌رود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اسپرس، پرولین، تنش شوری، جوانه‌زنی بذر

مقدمه

یکی از مهمترین مشکلات منابع طبیعی و به ویژه مراتع، شور شدن خاک‌هاست که شرایط زندگی گیاه و در نهایت، کل اکوسیستم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (آذرنیوند و همکاران، ۱۳۸۳). شوری، تمام فرآیندهای اصلی مانند رشد، فتوسنتز، سنتز پروتئین و متابولیسم لیپید و انرژی و در نتیجه تمام مراحل زندگی گیاه از جوانه‌زنی تا تولید دانه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Maslenkova *et al*., 1999; Naidoo and Naidoo, 2001). شوری، از طریق کاهش پتانسیل اسمزی محیط رشد و سمیّت یون‌های خاص باعث تأخیر در جوانه‌زنی، کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی و کاهش

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: r_karamian@basu.ac.ir، شماره تماس: ۰۸۱۱۸۲۷۱۰۴۳

رشد گیاهچه شده (Huang and Remann, 1995; Ashraf and Harris, 2004)، فعالیت بیوشیمیایی و فیزیولوژیک بذر را توسط جلوگیری از تنفس هوازی یا تحریک مراحل کاتابولیسمی تغییر می‌دهد (Ejazrasll and Rehman, 1997).

پروتئین‌هایی که در گیاهان تحت شرایط شوری تجمع می یابند به عنوان ذخایری از نیتروژن در تنظیم اسمزی نقش دارند. پروتئین‌ها ممکن است در پاسخ به تنش شوری از نو سنتز شده و یا به طور ساختمانی در غلظت پایین موجود باشند (Pareek-Singla and Grover, 1997). تعمیر و ترمیم آسیب حاصل از تنش برای بقا سلول در سطوح مهار متابولیسمی در تنش‌های اسمزی یا یونی ضروری است. این راه‌کارها ممکن است سازگاری اسمزی و فیزیولوژیک دیگر مانند تغییر در رشد ریشه و بخش‌های هوایی و نیز تعرق را در برگیرد (Chinnusamy *et al.*, 2006) که گویای سنتز از نو پروتئین‌ها تحت تنش شوری است.

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) باعث آسیب اکسیداتیو به لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها واسیدهای نوکلئیک می شوند. ترکیبات آنتی‌اکسیدان مختلفی که در گیاهان برای جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن به کار می‌روند شامل آسکوربات، گلوتاتیون، آلفا توکوفرول و کاروتنوئیدها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آنزیم‌های چرخه گلوتاتیون- آسکوربات هستند. تنش شوری تجمع ROS را القا می کند و بیان آنزیم‌های سم‌زدایی کننده ROS را افزایش می‌دهد. کاهش آسیب اکسیداتیو از طریق جاروب کردن ROS، راهکار مهمی در گیاهان برای تحمل تنش است (Chinnusamy *et al.*, 2006).

مطالعات نشان داده است که پراکسیدازها در لیگنینی و سوبرینی شدن دیواره، کاتابولیسم اکسین و مقاومت در برابر پاتوژن‌ها، تحمل شوری و پیری نقش کلیدی ایفا می کنند (Atak *et al.*, 2007). این آنزیم‌ها گلیکو پروتئین‌های واجد هِم هستند که توسط یک خانواده چند ژنی در گیاهان رمزگذاری می‌شوند و در دیواره سلولی، شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی و واکوئل یافت شده، در تجزیه پراکسید هیدروژن نقش دارند (Schloss *et al.*, 1987). پلی فنل اکسیدازها در اکسیداسیون فنل‌ها به کوئینون‌ها و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی نقش مؤثری دارند. این آنزیم‌ها در فعالیت‌های دفاعی و فوق حساس در برابر ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها دخالت داشته، باعث واکنش‌های قهوه‌ای شدن بافت زخمی و تشکیل سدهای دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Mohammadi and Kazemi, 2002).

تجمع پرولین یکی از روش‌های متابولیک است که در پاسخ به تنش اسمزی و یا سایر تنش‌ها توسط گیاهان به کار می‌رود (Hua *et al.*, 1997; Levitte, 1980). پرولین تجمع یافته نقش‌هایی مانند ایجاد ترکیب اسمزی، ترکیب ذخیره‌ای ازت، جاروب کننده رادیکال‌های هیدروکسیل، تنظیم پتانسیل اکسیداسیون سلولی، تنظیم اسیدیته، حفظ تورژسانس و حجم سلول را به عهده دارد که در نهایت، باعث سازش و تحمل در برابر تنش شوری می‌شود (Hua *et al.*,1997; Levitte, 1980; Nakashima *et al.*, 1998). تغییر محتوای پرولین از رایج ترین پاسخ‌هایی است که توسط تنش شوری در گیاهان القا می‌شود و در سازوکارهای

بردباری به تنش دخیل است (Sudhakar *et al*., 1993; Lutts *et al*., 1999). آگاهی از نحوه پاسخ گونه‌ها و رقم‌های گیاهی به تنش شوری طی مرحله جوانه‌زنی از جنبه‌های بوم‌شناسی و فیزیولوژیک حایز اهمیت است، زیرا جوانه‌زنی مرحله‌ای بحرانی برای استقرار گیاه است (Aiazzi *et al*., 2004).

جنس اسپرس (*Onobrychis* Miller) از تیره بقولات، علوفه ارزشمندی است که قرن‌هاست در سطوح وسیعی از کشورهای مختلف، به ویژه مناطق معتدل آسیا و از جمله ایران کشت می‌شود. این گیاه در مناطق سرد کوهستانی نیز به شکل خودرو دیده می‌شود (Rechinger, 1984; Lock and Simpson, 1991; Mabberley, 1997). اکثر مطالعات انجام شده در زمینه آثار شوری بر گیاهان زراعی متمرکز بوده است. همچنین، در بررسی‌های اندکی که بر گیاهان مرتعی صورت گرفته، به بیشتر گیاهان مرتعی و علوفه‌ای کشت شده توجه شده و تحقیقات محدودی بر گیاهان خودرو و بومی انجام شده است. مجیدی و همکاران (۱۳۸۸) اثر تنش شوری بر جوانه‌زنی، ویژگی‌های دانه‌رُست و تجمع عناصر سدیم و پتاسیم را در توده‌های مختلف اسپرس زراعی مطالعه کرده، نشان دادند که افزایش غلظت نمک باعث کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول و وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه، درصد پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم در دانه‌رُست می‌شود.

در پژوهش حاضر، اثر شوری بر جوانه‌زنی، محتوای پروتئین کل، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و نیز محتوای پرولین علاوه بر گونه کشت شده و خودروی *O. viciifolia*، در دو گونه دیگر اسپرس خودرو بررسی شد. مطالعه جوانه‌زنی گونه‌های مختلف گیاهی در غلظت‌های مختلف شوری به توسعه روش‌های ممکن برای معرفی گونه‌های متحمل به شوری برای کشت در زمین‌های بایر و شور کمک می‌کند (Joshi *et al*., 2004).

مواد و روش‌ها

در این بررسی، بذرهای سه گونه مرتعی اسپرس *O. subnitens*، *O. viciifolia* و *O. melanotricha* از زیستگاه‌های طبیعی خود (به ترتیب استان‌های کردستان، آذربایجان و همدان) جمع‌آوری شده و برای اعمال تیمارهای شوری استفاده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با ۳ تکرار و با تیمارهای آب‌مقطر (شاهد) و ۴ سطح کلرید سدیم در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار انجام شد. ابتدا بذرهای به مدت ۱ تا ۳ دقیقه در سولفوریک اسید قرار داده شد سپس، ۳ بار با آب‌مقطر شستشو و در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت MS و غلظت‌های مختلف کلرید سدیم کشت داده شدند. پتری‌دیش‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در تاریکی قرار داده شدند. پس از خروج برگ‌های لپه‌ای، پتری‌دیش‌ها در همان شرایط دمایی به فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند و سپس شاخص‌های مختلف دانه‌رُست سه گونه مورد مطالعه پس از ۴ هفته ارزیابی شدند. معیار ارزیابی جوانه‌زنی، خروج ریشه‌چه از بذرها بود. دو ویژگی درصد و سرعت جوانه‌زنی در بذرها اندازه‌گیری و سرعت جوانه‌زنی از رابطه

$$X_1/Y_1 + (X_2-X_1)/Y_2 + \ldots + (X_n-X_{n-1})/Y_n$$

محاسبه شد که در آن X_n، درصد جوانه‌زنی در روز nام

و Y_n، تعداد روز پس از روز اول آزمایش است (Magurie, 1962).

به منظور تعیین وزن خشک گونه‌های مورد بررسی، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

مطالعه کمّی و کیفی پروتئین‌ها پس از استخراج و غلظت‌سنجی، به روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورزی SDS-PAGE انجام شد. برای عصاره‌گیری از بافر فسفات سدیم و به منظور جلوگیری از فعالیت فنل‌اکسیدازها و آثار سوء آنها در سنجش پروتئین، از پلی وینیل پیرولیدین (PVP) با وزن مولکولی ۴۰۰۰۰ استفاده شد. همه مراحل استخراج در دمای صفر تا ۴ درجه سانتیگراد انجام شد. سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار Eppendorf مدل 5417R به مدت ۶۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و پس از صاف کردن، محلول‌های رویی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. غلظت سنجی پروتئین با روش Bradford (۱۹۷۶) و جذب نمونه‌ها پس از ۲۵ دقیقه با اسپکتروفتومتر UV/Vis Perkin-Elmer مدل Lambda 45 در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت، محتوای پروتئین بر حسب میکروگرم بر گرم بافت تر و با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. برای مطالعه کیفی الگوی پروتئینی از روش SDS-PAGE استفاده شد (Hames and Rickwood, 1981). پس از انجام الکتروفورز، حرکت نسبی (RM, Relative Mobility) نوارهای پروتئینی استاندارد و نیز نوارهای پروتئینی موجود در نمونه‌های مختلف به دقت محاسبه و سپس با استفاده از منحنی استاندارد، وزن مولکولی هر نوار به دست آمد. به منظور مطالعه اسپکتروفتومتری فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز به ترتیب از روش‌های Raymond و همکاران (۱۹۹۳) و Liu و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد.

محتوای پرولین آزاد با روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۰۵ گرم ماده تر گیاهی در ۵ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید (۳ درصد) ساییده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر عصاره صاف شده با ۲ میلی‌لیتر محلول اسیدی نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از انتقال لوله‌های آزمایش به حمام یخ، ۶ میلی‌لیتر تولوئن به لوله‌های آزمایش اضافه و به خوبی تکان داده شدند. از لایه فوقانی حاوی تولوئن و پرولین، برای اندازه‌گیری محتوای پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر در برابر شاهد تولوئن خالص استفاده شد و محتوای آن با استفاده از منحنی استاندارد تعیین وبر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر بیان شد.

تحلیل داده‌ها

تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزارهای SAS و MSTATC انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن و در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد محاسبه شد.

نتایج

نتایج حاصل نشان داد که شوری اثر معنی‌داری بر شاخص‌های مختلف رشد دانه‌رُست در سه گونه اسپرس مورد مطالعه داشته است. درصد جوانه‌زنی در گونه‌های مورد مطالعه با افزایش غلظت نمک کاهش یافت، با وجود این، میان غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اثر شوری بر سه گونه مورد

مطالعه تفاوت معنی‌داری داشت و کمترین درصد جوانه‌زنی در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد. همچنین، در غلظت‌های مختلف نمک، هر سه گونه درصد جوانه‌زنی مشابهی نشان دادند و سرعت جوانه‌زنی آنها در محیط شاهد (فاقد نمک) بیشتر از سایر تیمارها بود. با افزایش سطح شوری سرعت جوانه‌زنی به طور منظم کاهش یافت. هرچند گونه *O. subnitens* از سرعت جوانه‌زنی کمتری نسبت به دو گونه دیگر برخوردار بود. مقایسه میانگین سه گونه اسپرس مورد مطالعه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم نشان داد که بیشترین سرعت جوانه‌زنی در محیط کشت شاهد در گونه‌های *O. viciifolia* (۷۹ درصد) و *O. melanotricha* (۹۰ درصد) مشاهده می‌شود و با افزایش شوری تا غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار، سرعت جوانه‌زنی به کمترین میزان خود می‌رسد. نتایج حاصل همچنین نشان داد که اثر متقابل شوری و گونه برای وزن تر و وزن خشک و نیز محتوای پرولین آزاد معنی‌دار بوده است. وزن تر و وزن خشک دانه‌رُست گونه‌های مورد مطالعه نیز تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نمک قرار گرفته، با افزایش غلظت نمک کاهش یافت، در حالی که ویژگی وزن تر در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری نداشت. از سه گونه مطالعه شده، *O. subnitens* کمترین وزن تر و خشک را نیز نشان داد. مقایسه میانگین وزن تر و وزن خشک تحت تأثیر سطوح مختلف شوری نشان داد که با افزایش شوری کاهش در هر دو ویژگی وزن تر و وزن خشک مشاهده می‌شود. در گونه *O. viciifolia* وزن تر و وزن خشک در غلظت ۵۰ میلی‌مولارنسبت به شاهد کاهش معنی‌دار و درخور توجهی نشان دادند. در غلظت‌های بالاتر روند کاهشی منظم بود، در حالی که در گونه‌های *O. melanotricha* و *O. subnitens* وزن تر و وزن خشک به طور منظم کاهش یافته، در بیشترین غلظت کلرید سدیم به کمینه مقدار خود رسید. هر چند میان غلظت‌های متوالی نمک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱).

مطالعه کمّی پروتئین‌ها نشان داد که محتوای پروتئین کل در هر سه گونه تحت تنش شوری افزایش یافته، بیشترین مقدار به ترتیب در *O. subnitens*، *O. melanotricha* و *O. viciifolia* مشاهده شد. در همه گونه‌ها محتوای پروتئینی در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار بیش از سایر تیمارها بود (شکل ۲). هر چند در گونه *O. subnitens* در غلظت ۵۰ میلی‌مولار نیز محتوای پروتئینی افزایش چشمگیری داشت (جدول ۲).

نتایج حاصل از مطالعه سینتیک فعالیت آنزیم‌ها گویای کاهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز همراه با افزایش غلظت نمک است. فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش غلظت نمک کاهش یافت. هرچند در دو گونه *O. subnitens* و *O. viciifolia* فعالیت این آنزیم در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار نسبت به تیمار پیشین افزایش و با افزایش شدت تنش دوباره کاهش یافت. همچنین، فعالیت آنزیم‌ها در همه تیمارها در گونه *O. melanotricha* بسیار بیشتر از دو گونه دیگر بود. اگرچه فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در گونه *O. melanotricha* کمتر از دو گونه دیگر بود، با وجود این، در هر سه گونه روند کاهشی در فعالیت آن مشاهده شد. فعالیت این آنزیم تنها در گونه *O. subnitens* در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش یافت، در حالی که در هر سه گونه بیشترین فعالیت در تیمار شاهد و کمترین فعالیت در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر شاخص‌های مختلف رشد دانه‌رُست در گونه‌های اسپرس مورد مطالعه. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

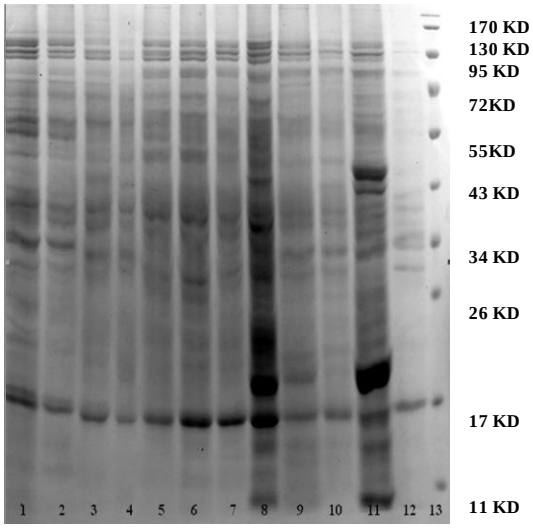
گونه	تیمار شوری (میلی‌مولار)	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	وزن تر (g)	وزن خشک (g)
O. viciifolia	شاهد	۹۰/۶۰±۴/۹ a	۷۹/۶۶±۷/۱ a	۱/۰۸±۰/۰۶ a	۰/۰۷۱ ±۰/۰۱ a
	۵۰	۶۹/۳۳±۴ b	۴۷/۵۳±۶/۶ bcd	۰/۶۸۸±۰/۲۲ bcd	۰/۰۴±۰/۰۰۳ bcd
	۱۰۰	۶۱/۶±۱۰/۴ b	۴۰/۱۸±۱۷/۵ de	۰/۵۰± ۰/۱۳ def	۰/۰۲۴±۰/۰۰۳ defg
	۲۰۰	۴۳/۶±۱۰/۹ c	۲۴/۷±۵ ef	۰/۱۹۸±۰/۰۲ g	۰/۰۱±۰/۰۰۱ fgh
O. melanotricha	شاهد	۹۰/۰۳±۲/۵ a	۹۰/۰۳±۲/۵ a	۱/۰۶۴±۰/۱۳ a	۰/۰۴۹±۰/۰۱۷ b
	۵۰	۷۰/۶۶±۸ b	۷۰/۶۶±۸ b	۰/۹۴۰±۰/۱۹ ab	۰/۰۴۳±۰/۰۱۴ bc
	۱۰۰	۶۹/۲۳±۳/۳ b	۶۹/۲۳±۳/۳ b	۰/۸۱۳±۰/۳۲ abc	۰/۰۲۶±۰/۰۰۴ def
	۲۰۰	۴۲/۸±۱۱/۱ c	۴۲/۸۳±۱۱/۱ c	۰/۱۸۸±۰/۰۶ g	۰/۰۰۸±۰/۰۰۲ gh
O. subnitens	شاهد	۷۵±۵ b	۵۸/۵±۱۰/۲ bc	۰/۵۷۶±۰/۰۸ cde	۰/۰۲±۰/۰۱۳ cde
	۵۰	۷۰/۱۶±۷/۷ b	۴۴/۳۳±۱۰ cd	۰/۳۳۰±۰/۰۹ efg	۰/۰۱۶±۰/۰۰۴ efgh
	۱۰۰	۶۹/۱۶±۶/۳ b	۲۹/۳۳±۶ def	۰/۲۴۱±۰/۱۱ fg	۰/۰۰۸±۰/۰۰۲ h
	۲۰۰	۳۲/۶۶±۶/۴ c	۱۳/۵۳±۲/۵ ef	۰/۱۲۳±۰/۰۱ g	۰/۰۰۷±۰/۰۰۱ h

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز (U mg^{-1} protein)، محتوای پروتئین کل و پرولین آزاد (µg gr^{-1} FW) در دانه‌رُست گونه‌های اسپرس مورد مطالعه. حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

گونه	تیمار شوری (میلی‌مولار)	فعالیت پراکسیداز	فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز	محتوای پروتئین	محتوای پرولین
O. viciifolia	شاهد	۱۵/۲۶±۲/۵ cd	۰/۷۵۳±۰/۰۶ a	۱۶۶/۱۶±۳۶/۴ cde	۱۸۹۰/۲ cd
	۵۰	۶/۲۳± ۱/۹ ef	۰/۶۶۶ ±۰/۱۲ ab	۱۶۸/۶۶±۳۶/۳ c	۱۱۷۵ cd
	۱۰۰	۱۱/۰۶ ±۵/۴ de	۰/۵۴۳±۰/۰۵ bc	۱۵۰/۶۶±۱۸/۴ cd	۲۳۵۶ cd
	۲۰۰	۶/۰۶±۱/۶ ef	۰/۱۹۳± ۰/۰۱ f	۳۳۰/۶±۴۱ a	۵۲۰۸ ab
O. melanotricha	شاهد	۴۱/۵۰±۵/۴ a	۰/۴۸۳ ±۰/۰۶ cd	۷۴/۶۶±۳/۵ e	۳۲۰/۲ d
	۵۰	۳۲/۵۶ ±۳/۶ b	۰/۳۸۳ ±۰/۱۲ de	۹۲/۸۰±۱۱/۷ de	۳۴۶/۱ d
	۱۰۰	۲۰/۴۱±۲/۱ c	۰/۳۴۶ ±۰/۰۹ de	۱۵۸/۹۸ ±۲۲/۸ cd	۵۰۵/۴ d
	۲۰۰	۱۳/۵ ±۳/۱ d	۰/۱۲۰ ±۰/۰۲ f	۲۴۴/۴۸±۱۴ b	۵۵۳۵/۲ a
O. subnitens	شاهد	۱۳/۷ ±۴/۳ d	۰/۷۸۳ ±۰/۰۰۵ a	۱۲۹/۱۸ ±۴۴ cde	۴۰۴/۱ d
	۵۰	۳/۰۳±۱/۳ f	۰/۳۲۳±۰/۰۲ e	۳۷۹/۶۳± ۲۶ a	۳۹۸/۳ d
	۱۰۰	۵/۴۶ ±۱ ef	۰/۶۴۶ ±۰/۱۳ ab	۲۶۱/۲۱ ±۶/۳ b	۱۴۹۰/۲ cd
	۲۰۰	۲/۹۱± ۱/۳ f	۰/۴۴۳ ±۰/۰۵ cde	۳۶۱/۵۶±۵۸/۶ a	۳۸۵۳/۳ b

محتوای پرولین در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم افزایش یافت و با آن که افزایش محتوای پرولین دانه‌رُست در سطوح شوری تا ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد، افزایش تنها در بالاترین سطح تنش معنی‌دار بود. به طورکلی، مقایسه میانگین محتوای پرولین تحت تأثیر سطوح مختلف شوری نیز نشان داد که در هر سه گونه با افزایش غلظت نمک مقدار پرولین گونه‌ها افزایش می یابد، به طوری که در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار افزایش معنی‌دار و درخور توجه مشاهده شد. با وجود این، میزان پرولین در غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میلی‌مولار در گونه *O. viciifolia* بیش از دو گونه دیگر بود، اما بیشترین محتوای پرولین در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار گونه *O. melanotricha* مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از مطالعه کیفی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE نشان داد که با وجود پروتئین‌های مشترک میان سه گونه مورد مطالعه مانند پروتئین‌های ۱۱، ۲۲، ۲۸، ۴۳، ۷۰، ۹۵ و ۱۳۰ کیلودالتونی، برخی تنها در بعضی از گونه‌ها حضور داشته، در سایرین وجود ندارند. برای مثال، پروتئین‌های ۴۰، ۶۶ و ۱۲۵ کیلودالتونی در *O. melanotricha* و پروتئین‌های ۱۷ و ۳۶ کیلودالتونی در *O. subnitens* حضور نداشتند. در گونه *O. melanotricha* پروتئین ۳۸ کیلودالتونی در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک ناپدید شد، در حالی که این پروتئین در همین غلظت‌ها در دو گونه دیگر حضور داشت. از سوی دیگر در این گونه‌ها القا پروتئین‌های ۵، ۵۰، ۱۲۰ و ۱۷۰ کیلودالتونی در غلظت‌های بالای نمک (۲۰۰ میلی‌مولار) مشاهده شد. ظهور این پروتئین‌ها در گونه‌های *O. subnitens* و *O. viciifolia* نیز تحت تنش شوری مشاهده شد. در گونه *O. viciifolia* پروتئین ۳۶ کیلودالتونی در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار نمک ناپدید شد. این پروتئین در تمام غلظت‌های نمک در گونه *O. subnitens* نیز مشاهده نشد. ظهور پروتئین‌های ۵۰، ۵۵، ۶۶، ۱۲۰ و ۱۷۰ کیلودالتونی در غلظت‌های بالای نمک در این گونه مشاهده شد و پروتئین ۱۷ کیلودالتونی در آن حضور نداشت. نوار مربوط به پروتئین ۸۰ کیلودالتونی در این گونه و گونه *O. viciifolia* و نوار پروتئینی ۴۸ کیلودالتونی در این گونه در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار بسیار ضعیف بود (شکل ۱).



شکل ۱- نیم‌رخ الکتروفورزی نوارهای پروتئینی دانه‌رُست در سه گونه اسپرس مورد مطالعه. *O. melanotricha* (۱-۴)، *O. viciifolia* (۵-۸)، *O. subnitens* (۹-۱۲) و پروتئین استاندارد (۱۳). از چپ به راست به ترتیب شاهد و غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک.

بحث

شوری یکی از مهم‌ترین مشکلات مناطق خشک و نیمه خشک دنیاست، از این رو یافتن گیاهان مقاوم به شوری می‌تواند راهکاری مناسب برای افزایش بهره‌وری از آب‌ها و زمین‌های شور باشد. نتایج حاصل

از تحقیقات نشان داده است که شوری میزان جوانه‌زنی بذرهای گیاهان مختلف را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در مناطقی با غلظت پایین نمک، افزایش شوری باعث کاهش تدریجی جوانه‌زنی می‌شود و در مناطقی با غلظت بالای نمک توانایی جوانه‌زنی با افزایش شوری کاهش می‌یابد. برخی از یون‌ها ممکن است دارای اثر سمّی باشند که باعث کاهش جوانه‌زنی یا ایجاد حالت غیر طبیعی در بذرهای می‌شوند. همچنین، همیشه میان مقاومت نسبی گیاهان به شوری در مرحله جوانه‌زنی و مراحل بعدی نمو، همبستگی وجود ندارد. اغلب گیاهان در مرحله دانه‌رُستی نسبت به شوری حساسیت بیشتری دارند (Gale, 1970). همچنین، Zapata و Serrano (۲۰۰۴) نشان دادند که شوری باعث کاهش درصد جوانه‌زنی بذرهای اسفناج، کاهو، چغندر قند و کلم می‌شود. نتایجی که از بررسی بسیاری از گیاهان یک ساله به دست آمده تأیید می‌کند که با افزایش شوری، جوانه‌زنی کاهش می‌یابد و بیشینه جوانه‌زنی در تیمار شاهد مشاهده می‌شود (آذرنیوند و همکاران، ۱۳۸۳). افزایش شوری باعث افزایش جذب یون های سدیم و کلر می‌شود. این یون‌ها علاوه بر مضر بودن، باعث اختلال در متابولیسم عناصر غذایی دیگر می‌شوند. برای مثال، رقابت یون سدیم با پتاسیم و یون کلر با نیترات باعث اختلال در جذب عناصر غذایی پتاسیم و نیترات می‌شود و این امر بر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه تأثیر منفی گذاشته، می‌تواند علت کاهش درصد جوانه‌زنی باشد (Gorham, 1996). در پژوهش حاضر، افزایش شوری باعث کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی در هر سه گونه اسپرس شد، با این حال روند کاهشی در غلظت‌های مختلف، متفاوت بود.

تنش شوری به عنوان عامل محیطی مؤثر بر سرعت جوانه‌زنی علاوه بر مسمومیّتی که در گیاه ایجاد می‌کند، جذب آب توسط بذر را نیز با اشکال روبرو می‌سازد. از سوی دیگر نفوذ سدیم و کلر به درون بافت باعث اختلال در متابولیسم سلول‌ها به‌ویژه فعالیت غشاهای سلولی و در نتیجه افزایش میزان نشت مواد درون سلولی به خارج می‌شود. هر قدر غلظت نمک در محیط بیشتر باشد، خسارت وارده سریع‌تر و شدیدتر اعمال می‌شود (کریمی و همکاران، ۱۳۸۳). در تحقیق حاضر نیز در غلظت‌های بالاتر نمک، شدت کاهش رشد و کاهش جوانه‌زنی بیشتر بود. همچنین، مقایسه میانگین ویژگی های مختلف تحت تأثیر سطوح مختلف شوری در مرحله جوانه‌زنی نشان داد که با افزایش غلظت کلرید سدیم درصد و سرعت جوانه‌زنی در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار به طور معنی‌داری کاهش می‌یابند. به نظر می‌رسد که غلظت بالای نمک در گونه ها توانسته است محیط جوانه‌زنی بذرها را نامناسب کند. نتایج حاصل از مطالعه مجیدی و همکاران (۱۳۸۸) بر توده های مختلف اسپرس زراعی نیز این مطلب را تأیید می‌کند. کاهش رشد ویژگی سازشی برای بقا گیاه تحت شرایط تنشی است و به گیاه اجازه می‌دهد که از انرژی متابولیسمی سلولی کمتری برای رشد استفاده کند و از آن بیشتر برای مقابله با تنش استفاده کند (Zhu, 2001).

وزن تر و وزن خشک در گونه‌های مورد مطالعه با افزایش غلظت نمک کاهش یافت، این کاهش ممکن است ناشی از هزینه انرژی متابولیک مربوط به سازگاری به شرایط تنش، کاهش نرخ فتوسنتز در واحد سطح برگ، کاهش جذب کربن، آسیب به بافت‌ها و

رسیدن به بیشینه غلظت نمکی باشد که گیاه آن را تحمل می‌کند (Shannon, 1997; Ashraf, 1994; Meneguzzo *et al.*, 2000). سمیّت احتمالی ناشی از تجمع بیش از حد یون‌ها، به ویژه سدیم در اندام‌های گیاهی، کاهش تولید ماده خشک گیاه را به دنبال خواهد داشت (Flowers and Yeo, 1995; Shannon, 1997). همچنین، Neumann (۱۹۹۷) Hassegawa و همکاران (۲۰۰۰) و Munns (۲۰۰۲) کاهش وزن خشک کل در اثر تنش شوری را گزارش و بیان کردند که علت این کاهش، تلفیق آثار تنش اسمزی با اثر سمیّت یونی و تغییر غلظت عناصر غذایی ناشی از نمک موجود در محلول خاک است. در سطوح شوری بیشتر احتمالاً جذب غیر متعارف یون، روندهای طبیعی متابولیسمی را مختل نموده، گیاه بخشی از انرژی مواد آلی را به جای تخصیص به رشد به تولید محلول های سازگار، به تعدیل اسمزی و حفظ سلول اختصاص می‌دهد. افزایش میزان پرولین دانه‌رُست در سطوح شوری بالا خود علتی بر این مدعاست (کریمی و همکاران، ۱۳۸۳).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت کلرید سدیم محتوای پروتئین در سه گونه مورد مطالعه افزایش می‌یابد. تحت شرایط شوری انباشتگی این پروتئین‌ها به عنوان ذخایری از نیتروژن ممکن است در تنظیم اسمزی نقش داشته باشند (Singh *et al.*, 1987). این پروتئین ها ممکن است در پاسخ به تنش شوری از نو سنتز شوند و یا به طور ساختمانی در غلظت پایین موجود باشند (Pareek-Singla and Grover, 1997). محتوای بالای پروتئین‌های محلول در رقم‌های متحمل به شوری جو، آفتابگردان و برنج مشاهده شده است (Ashraf and Harris, 2004). سازگاری اسمزی، تجمع ترکیبات اسمزی، مدیریت تنش اکسیداتیو، القای پروتئین های تنش و سازش‌های فیزیولوژیک دیگر مانند تغییر در رشد ریشه و بخش‌های هوایی و نیز تعرق (Chinnusamy *et al.*, 2006)، گویای سنتز از نو پروتئین‌ها تحت تنش شوری است.

ناپدید شدن برخی از نوارهای پروتئینی نیز به خاموش شدن سیستم ژنتیک سنتز پروتئین‌ها در پاسخ به نمک و یا به واسرشته شدن آنها مربوط می‌شود. کاهش سنتز پروتئین و تسریع در تخریب و فروپاشی برخی پروتئین‌ها در گیاهان در پاسخ به تنش شوری توسط برخی محققان دیگر نیز گزارش شده است (Sudhahar *et al.*, 1993). در حقیقت پروتئین‌هایی که به تازگی تحت تنش شوری سنتز می شوند، پروتئین‌های القا شدنی تحت تنش هستند که توسط ژن‌های مربوطه در پاسخ به شوری تنظیم شده‌اند. ظهور پروتئین‌های ۵۰، ۵۵، ۶۶، ۱۲۰ و ۱۷۰ کیلودالتونی در گونه‌های *O. subnitens* و *O. viciifolia* که عدد کروموزومی پایه یکسانی (x=۷) دارند، تحت تنش شوری مشاهده شد. گزارش‌های متعددی در مورد ظهور پروتئین‌های ۵۰ و ۶۶ کیلودالتونی در گیاهان تحت تنش شوری وجود دارد. Abd El-baky و همکاران (۲۰۰۳) پروتئین ۵۰ کیلودالتونی را در رقم‌های مختلف پیاز تحت اثر شوری گزارش کرده‌اند. القای پروتئین ۶۶ کیلودالتونی نیز در رقم‌های مختلف پیاز توسط Abd El-baky و همکاران (۲۰۰۳) و در گیاهان توتون توسط Ericson و Alfinito (۱۹۸۴) و نیز در گیاهان گوجه‌فرنگی توسط El-Farash و همکاران (۱۹۹۳) گزارش شده است. به علاوه، در نوار پروتئینی ۶۰ کیلودالتونی در غلظت‌های بالای نمک در

گونه *O. viciifolia* در مقایسه با سایر گونه‌های مورد مطالعه، افزایش شدت رنگ نوار مشاهده شد که گویای افزایش سنتز این پروتئین در این گونه تتراپلوئید در مقایسه با دو گونه دیگر دیپلوئید است. Meratan و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه اثر شوری بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیمی سه گونه *Acanthophyllum* با سطوح پلوئیدی مختلف نشان دادند که علی‌رغم عدم حضور پروتئین ۶۰ کیلودالتونی در گونه دیپلوئید *A. glandulosum*، بیان این پروتئین در گونه‌های تتراپلوئید و هگزاپلوئید تحت اثر شوری القا می‌شود.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که تنش شوری باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز می‌شود. در تأیید نتایج این پژوهش، Jia و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کرده‌اند که تیمار گیاهان نخودفرنگی با کلرید سدیم باعث کاهش درخور توجه بیان ژن مربوط به ۴ ایزوزیم پراکسیداز می‌شود. به علاوه کلرید سدیم باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان آرابیدوپسیس می‌شود (کیامقدم و باقریه نجار، ۱۳۸۸). با توجه به نقش ترکیبات و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مختلف در سازگاری و یا مقاومت در برابر تنش شوری، به نظر می‌رسد که در گیاهان مورد مطالعه ممکن است آنزیم‌ها یا ترکیبات آنتی‌اکسیدان دیگری مؤثرتر باشند. در مجموع با توجه به نتایج مطالعه آنزیمی و پروتئینی به نظر می‌رسد که گونه *O. subnitens* نسبت به تنش شوری بیش از دو گونه دیگر واکنش نشان داده و از حساسیت بیشتری برخوردار است.

در این مطالعه، انباشتگی پرولین در اثر تنش شوری در هر سه گونه اسپرس مورد مطالعه مشاهده شد. به نظر می‌رسد که پرولین هم به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی و هم به عنوان حفاظت کننده غشا عمل کرده باشد (نژاد علیمرادی و منوچهری کلانتری، ۱۳۸۷). گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود همبستگی میان تجمع پرولین و سازش به تنش اسمزی در گیاهان یاد شده است (Kiyosue *et al.*, 1996). گیاهان اسمولیت‌های آلی مانند پرولین، بتائین، پلی‌اول‌ها، الکل‌های قندی و قندهای محلول را انباشته می‌کنند تا تنش اسمزی را تحمل کنند. این محلول‌ها با سازگاری اسمزی، سمّزدایی گونه‌های فعال اکسیژن و تثبیت ساختار چهارم پروتئین‌ها گیاهان را حمایت می‌کنند (Chinnusamy *et al.*, 2006). پرولین در بسیاری از گیاهان در تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری، دمای بالا، یخ زدگی، پرتو فرابنفش و فلزات سنگین تجمع یافته و ساختار غشا و پروتئین‌ها را تثبیت نموده، به عنوان یک ماده اسمزی‌ساز، ساختارهای درون سلول را محافظت می‌کند (نژاد علیمرادی و منوچهری کلانتری ، ۱۳۸۷). پرولین در مقایسه با سایر اسمولیت‌های متداول به ویژه قندهای معمولی و الکلی، از کارآیی بالاتری برای حفاظت در برابر تنش برخوردار است و با اثر مستقیم در ثبات بخشیدن به ماکرومولکول‌ها و لایه‌های آبگیری آنها و نیز به علت ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی خود، به طور غیر مستقیم اثر حفاظتی نشان می‌دهد (Delauney and Verma, 1993). در مجموع، نتایج حاصل نشان داد که تنش شوری تأثیر شدیدی بر جوانه‌زنی و محتوای پرولین در گونه‌های اسپرس دارد.

منابع

آذرنیوند، ح.، احمدی، ز. و ناصری، ح. (۱۳۸۳) بررسی اثر فاکتور شوری بر جوانه‌زنی دو گونه مرتعی *Artemisia fragrans* و *Artemisia spicigera*. مجله بیابان ۹(۲): ۳۰۷-۳۱۵.

کریمی، ق.، حیدری شریف‌آباد، ح. و عصاره، م. ح. (۱۳۸۳) اثرات تنش شوری بر جوانه‌زنی، استقرار گیاهچه و محتوای پرولین در گونه مرتعی *Atriplex verrucifera*. فصلنامه علمی و پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۱۲(۴): ۴۱۹- ۴۳۲.

کیامقدم، م.، باقریه نجار، م. (۱۳۸۸) بررسی برخی از پارامترهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در گیاهان جهش یافته *Atrec Ql4A* تحت تنش شوری. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی ۱۶(۱) ۱۱۵-۱۳۲.

مجیدی، م. م.، جزایری، م. ر. و محمدی‌نژاد، ق. (۱۳۸۸) اثر شوری بر جوانه‌زنی و انباشت یون‌ها در توده‌های اسپرس زراعی. مجله تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۱۷(۲): ۲۵۶-۲۶۹.

نژاد علیمرادی، ح.، و منوچهری کلانتری، خ. (۱۳۸۷) بررسی اثر پیش تیمار پرتو فرابنفش بر جوانه‌زنی بذر و برخی از پارامترهای بیوشیمیایی دو رقم گندم (*Triticum aestivum* L.) تحت تنش شوری. مجله علمی پژوهشی دانشگاه اصفهان ۳۵ (۶): ۸۹-۱۰۲.

Abd El-baky, H., Hana, M., Amal, A. and Hussein, M. M. (2003) Influence of salinity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and electrophoretic patterns of protein and isozymes in leaves of some Onion cultivars. Asian Journal of Plant Science 2: 1220-1227.

Aiazzi, M. T., Carpane, P. D., Arguello, J. A. and Piotto, B. (2004) Salt tolerance at the germination stage of *Atriplex cordobensis* from different provinces. Seed Science and Technology 32: 43-52.

Ashraf, M. (1994) Breeding for salinity tolerance in plants. Critical Review of Plant Science 13: 17-42.

Ashraf, M. and Harris, P. J. C. (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science 160: 3-16.

Atak, C., Celik, O., Olgun, A., Alikamanoglu, S. and Rzakoulieva, A. (2007) Effect of magnetic field on peroxidase activities of soybean tissue culture. Biotechnology 2: 21-25.

Bates, L. S., Waldran, R. P. and Tear, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water studies. Plant and Soil 39: 205-208.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding. Anals of Biochemistry 72: 348-354.

Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J. K. (2006) Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. Genetic Engineering 27: 141-177.

Delauney, A. J. and Verma, D. P. S. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in Plant Journal 4: 215-223.

Ejazrasll, A. W. and Rehman, A. (1997) Germination response of sensitive and tolerant sugarcane lines to sodium chloride. Seed Science Technology 25: 465-471.

El-Farash, E. M., El-Enamy, A. E. and Mazen, A. (1993) Influence of genotype and NaCl on the levels of growth, proteins, proline, free amino acids, viability and protein regulation in tomato callus cultures. Physiologia Plantarum 4: 345-352.

Ericson, M. C. and Alfinito, S. H. (1984) Proteins produced during salt stress in tobacco cell cultures. Plant Physiology 74: 506-509.

Flowers, T. J. and Yeo, A. R. (1995) Breeding

for salinity resistance in crop plants: where next? Australian Journal of Plant Physiology 22: 875-884.

Gale, J. (1970) Growth of *Atriplex halimus* L. in sodium chloride salinated cultured solution as effected by the relative humidity of the air. Australian Journal of Biological Science 23: 947-952.

Gorham, J. (1996) Mechanisms of salt tolerance of halophytes. In: Plant cellular and molecular responses to high salinity (eds. Allah, R. C., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J.) 51: 463-499. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology. New York.

Hames, B. D. and Rickwood, D. (1981) Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. IRL Press, Washington DC.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology 51: 463-499.

Hua, X. J., Van De Cotte, B., Montagu, M. V., and Verbruggen, N. (1997) Developmental regulation of pyroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. Plant Physiology 114: 1215-1224.

Huang, J. and Remann, R. E. (1995) Salt tolerance of *Hordeum* and *Brassica* species during germination and early seedling growth. Canadian Journal of Plant Science 75: 815-819.

Jia, W., Wang, Y., Zhang, S. and Zhang, J. (2002) Salt stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. Journal of Experimental Botany 53: 2201-2206.

Joshi, A. J., Mali, B. S. and Hinglajia, H. (2004) Salt tolerance at germination and early growth of two forage grasses growing in marshy habitats. Environmental and Experimental Botany 5: 154-160.

Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamagueji-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1996) A nuclear gene encoding mitochonal proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. The Plant Cell 8: 1323-1335.

Levitte, J. (1980) Responses of plants to environmental stresses. 2nd Ed, Academic Press, New York.

Liu, W., Fang, J., Zhu, W. M., and Gaq, P. J. (1999) Isolation, purification and properties of the peroxidase from the hull of *Glycine max* var hhz. Science of Food and Agriculture 79: 779-785.

Lock, J. M. and Simpson, K. (1991) Legumes of West Asia, Royal Botanic Gardens, Kew.

Lutts, S., Majerus, V. and Kinet, J. M. (1999) NaCl effect on proline metabolism in rice seedlings. Physiologia Plantarum 105: 450-458

Mabberley, D. J. (1997) The plant book: a portable dictionary of the vascular plants, 2nd Ed, Cambridge University Press, Cambridge.

Magurie, J. D. (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seed vigor. Crop Science 2: 176-177.

Maslenkova, L. T., Miteva, T. S. and Popoval, P. (1999) Changes in the polypeptide patterns of barley seedling exposed to jasmonic acid and salinity. Plant Physiology 98: 700-707.

Meneguzzo, S., Navari-Izz, F. and Izzo, R. (2000) NaCl effects on water relations and accumulation of mineral nutrients in shoots, roots and cell sap of wheat seedling. Journal of Plant Physiology 156: 711-716.

Meratan, A. A., Ghaffari, S. M. and Niknam, V. (2008) Effects of salinity on growth, proteins and antioxidant enzymes in three *Acanthophyllum* species of different ploidy level. Journal of Science and Technology 33: 1-8.

Mohammadi, M. and Kazemi, H. (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with fusarium graminearum and induced

resistance. Plant Science 162: 491-498.

Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment 25: 239-250.

Naidoo, G. and Naidoo, Y. (2001) Effects of salinity and nitrogen on growth, ion relations and proline accumulation in *Triglochin bulbosa*. Wetlands Ecology and Management 9: 491-497.

Nakashima, K., Satoh, R., Kiyousue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozak, K. (1998) A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolanty but is also developmentally regulated in the reproductive organs of organs of *Arabidopsis*. Plant Physiology 118: 1233-1241.

Neumann, P. (1997) Salinity resistance and plant growth revisited. Plant Cell and Environment 20: 1193-1198.

Pareek-Singla, S. L. and Grover, A. (1997) Salt responsive proteins/genes in crop plants. In: Strategies for improving salt tolerance in higher plants (eds. Jaiwal, P. K., Singh, R. P. and Gulati, A.) 365-391 Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.

Raymond, J., Pakariyathan, N. and Azanza, J. L. (1993) Purification and some properties of polyphenoloxiases from sunflowers seeds. Phytochemistry 34: 927-931.

Rechinger, K. H. (ed) (1984) *Onobrychis*. In: Flora Iranica 157: 449-459. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.

Schloss, P., Walter, C., Mader, M. (1987) Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. Planta 170: 225-229.

Shannon, M. (1997) Adaption of plants to salinity. Advances in Agronomy Journal 60: 75-120.

Singh, N. K., Bracken, C. A., Hasegawa, P. M., Handa, A. K., Buckel, S., Hermodson, M. A., Pfankoch, F., Regnier, F. E. and Bressan, R. A. (1987) Characterization of osmotin. a thaumatin-like protein associated with osmotic adjustment in plant cells. Plant Physiology 85: 529-536.

Sudhakar, P. R., Reddy, M. P. and Veeranjaneyulu, K. (1993) Effect of salt stress on the enzymes of proline synthesis and oxidation in green seedling. Journal of Plant Physiology 141: 621-623.

Zapata, P. J. and Serrano, M. (2004) Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. Plant Science 167: 781-788.

Zhu, J. K. (2001) Over expression of a delta pyrpline-5-carbohydrate synthetase gene and analysis of tolerance of water and salt stress in transgenic rice. Trends in Plant Science 6: 66-72.

Effect of salinity on some growth parameters in three *Onobrychis* species (Fabaceae) in Iran

Roya Karamian * and Seddigheh Ataei Barazandeh

Department of Biology, Faculty of Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Abstract

Onobrychis is one of the important forage legume, which most of its wild species grow in Iran. In order to study of the effect of different salinity levels on percentage and rate of seed germination and also fresh and dry weights of seedlings in 3 *Onobrychis* species (*O. subnitens*, *O. viciifolia* and *O. melanotricha*), an experiment was carried out in three replicates using a factorial design with 5 treatments including 0 (control), 50, 100, 200 and 400 Mm NaCl. Results showed that as salinity increased, germination rate decreased in all species and was completely stopped in 400 mM NaCl. Results from mean comparison of fresh and dry weights of seedlings under salt stress showed that these parameters declined until 200 mM NaCl and there was a significant difference between different salinity levels. Results from guantitative and qualitative studies of proteins indicated that salt srtess decreased peroxidase and polyphenol oxidase activities, but increased total protein content. In addition, free proline content increased in response to salinity stress in the studied species, which was used for osmotic regulation.

Key words: Antioxidant enzymes, *Onobrychis*, Proline, Salinity stress, Seed germination

* Corresponding Author: r_karamian@basu.ac.ir