مقاله کامل پژوهشی

ارتباط بین تحمل شوری در مرحله جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست با فعالیت ایزوفرم‌های مختلف آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سه رقم گیاه یونجه

سجاد محرم نژاد* و فرهاد باغبانی
گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

در این پژوهش، تاثیر شوری در سه سطح (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) بر روی درصد و سرعت جوانه‌زنی و رشد در سه رقم گیاه یونجه شامل «اسکویی»، «هروی» و «قره‌یونجه» در شرایط آزمایشگاهی مطالعه گردید. فعالیت ایزوفرم‌های آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از الکتروفورز بررسی شد و برای هر نوار در روی ژل، شاخص «مساحت × شدت» به‌عنوان فعالیت آنزیمی ارزیابی گردید. شوری درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای هر سه رقم را کاهش داد و به‌صورت معنی‌دار منجر به کاهش رشد دانه‌رست‌های جوان شد. از میان سه رقم بررسی شده، رقم «هروی» بیشترین سرعت جوانه‌زنی و وزن‌تر دانه‌رست را در شرایط شوری داشت. سه ایزوفرم برای سوپراکسید دیسموتاز تشخیص داده شد و فعالیت همه این ایزوفرم‌ها تحت شرایط شوری افزایش یافت. نتایج نشان داد ارتباط مستقیمی بین شدت تحمل شوری ارقام و افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در این شرایط وجود دارد. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که افزایش فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل دفاع آنتی اکسیداتیو بیشترین تاثیر را در تخفیف اثر تنش شوری در گیاه یونجه در مراحل ابتدایی رشد دارند.

واژه‌های کلیدی: سرعت جوانه‌زنی، سوپر اکسید دیسموتاز، شوری، دانه‌رست، یونجه.

مقدمه

شوری، تولیدات گیاهی و کیفیت آن را در نواحی خشک، نیمه خشک و مناطقی که بارش باران محدود است و برای شستشوی نمک‌ها از ریشه گیاه کافی نیست، تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲۰]. تاثیر شوری در گیاهان پیچیده است و از تاثیرات مضر آن می‌توان به سمیت یونی، کمبود آب، عدم تعادل و کمبود عناصر غذایی اشاره کرد. شوری با افزایش فشار اسمزی و در نتیجه کاهش جذب آب و همچنین از طریق اثرات سمیت یونی جوانه‌زنی بذور را تحت تأثیر قرار می‌دهد. لذا عمده‌ترین مشکل پیش‌رو در راستای تولید محصول در مزارع مناطق شور مربوط به جوانه‌زنی و استقرار مناسب دانه‌رست است. ظهور سریع و یکنواخت دانه‌رست‌ها در مزرعه عاملی مهم در دستیابی به عملکرد کمی و کیفی بالا در گیاهان زراعی می‌باشد [۱۶ و ۱۷].

پس از جوانه‌زنی، معمول‌ترین و آشکارترین اثر شوری، تأخیر در رشد است. گیاهان در محیط شور با دو عامل اصلی شامل کاهش پتانسیل اسمزی خاک و ایجاد سمیت یونی مواجه هستند. نمک زیاد در محلول خاک پتانسیل اسمزی خاک را

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: sm.chakherlo@yahoo.com

پایین آورده و باعث کاهش جذب و کمبود آب در گیاه می‌شود [۱]. این امر موجب اختلال در تقسیم سلول و بزرگ شدن سلول‌ها شده و تمام واکنش‌های متابولیکی گیاه تحت تأثیر قرار می‌گیرد. مقادیر بالای یون‌های سدیم و کلر موجب کاهش جذب یون‌های عناصر ضروری از جمله پتاسیم، کلسیم، آمونیوم و نیترات شده، و نیز از فعالیت آنزیم‌ها کاسته و ساختار غشاء را بر هم می‌زند. این اثرات سبب کاهش فعالیت‌های متابولیکی گیاه از جمله فتوسنتز شده و از رشد گیاهان در محیط‌های شور می‌کاهد. کاهش و تأخیر در جوانه‌زنی، کاهش رشد اندام هوایی و تولید ماده خشک، گاهی اوقات نابودی رستنی‌های مناطق خشک و نیمه خشک را به دنبال دارد [۵].

یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) به‌دلیل کیفیت، خوش خوراک بودن و غنای آن از نظر مواد پروتئینی و معدنی یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای دنیا محسوب می‌شود. تحقیقات زیادی در مورد واکنش گیاه یونجه در مراحل جوانه زدن بذر و استقرار دانه‌رست در حضور کلرید سدیم صورت گرفته و نشان داده شده است که تنوع قابل ملاحظه‌ای از نظر تحمل به شوری در بین و داخل جمعیت‌های یونجه وجود دارد. یونجه در مرحله جوانه زدن نسبت به شوری خاک حساس است، ولی بعد از تشکیل ریشه، سازش زیادی نسبت به شوری خاک از خود نشان می‌دهد. واریته‌های مختلف یونجه از نظر تحمل به شوری در موقع جوانه‌زدن در محلول غذایی و تحت شرایط کنترل شده اختلاف معنی‌داری با هم دارند [۱۰]. با افزایش غلظت نمک طول ریشه‌چه و ساقه‌چه کاهش می‌یابد [۳]. افزایش تحمل به شوری در بین و داخل توده‌های گیاه یونجه با افزایش وزن خشک ریشه و شاخساره، تعداد و طول ساقه اصلی همراه است [۱٤].

تنش شوری باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود و غلظت گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را افزایش می‌دهد [۲]. از گونه‌های فعال اکسیژن می‌توان به رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به‌عنوان مولکول‌های سمی اشاره کرد که انباشتگی آن‌ها باعث پراکسیداسیون چربی‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، آسیب به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاهای سلول می‌شود. گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو از روش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی استفاده می‌کنند [٦]. آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز و کاتالاز و متابولیت‌های غیر آنزیمی شامل گلوتاتیون، آسکوربیک اسید و ترکیبات فنلی از مهم‌ترین اجزای دفاع آنتی اکسیداتیو در گیاهان محسوب می‌شوند. نشان داده شده است که در ژنوتیپ-های مقاوم به شوری در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس، آنزیم-های آنتی‌اکسیداتیو فعالیت بالاتری دارند [۱۱]. گزارش‌های متعدد دیگری مبنی بر همبستگی بین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو و تحمل به تنش شوری وجود دارد [۱۵ و ۲۱].

این مطالعه با هدف ارزیابی اثر تنش شوری بر جوانه‌زنی، رشد دانه‌رست‌ها و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و تعیین ارتباط احتمالی بین فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز با تفاوت‌های بین رقمی از نظر جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست‌ها در سه رقم گیاه یونجه انجام گردید.

مواد و روش ها

بذور ارقام گیاه یونجه از دانشگاه پیام نور واحد ممقان استان آذربایجان شرقی تهیه شدند. بذور ابتدا با محلول سه درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت دو دقیقه ضد عفونی شدند و برای هر تیمار ۳۰ عدد بذر در پتری دیش قرار گرفت. برای ارزیابی جوانه‌زنی، بذرها بین دو عدد کاغذ صافی که با ۱۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم (شامل غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) خیس شده بودند، قرار گرفتند. سپس پتری دیش‌ها به ژرمیناتور تاریک با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ٤۲ درصد انتقال یافتند. شمارش بذور جوانه زده تا روز ششم، زمانی که در تعداد بذرهای جوانه زده تغییری مشاهده نشد، ادامه یافت و برای سرعت جوانه‌زنی (GR) از فرمول $GR= \sum(N_i/D_i)$ (N_i تعداد بذر جوانه زده در روز و D_i تعداد روز پس از شروع آزمایش) استفاده شد [۸]. شاخص جوانه‌زنی برای کلیه بذور خروج ریشه‌چه از بذر به اندازه دو میلی‌متر در نظر گرفته شد. بعد از رشد دانه‌رست‌ها، شاخص‌های درصد جوانه‌زنی، طول دانه‌رست، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و وزن‌تر دانه‌رست اندازه‌گیری شد.

استخراج و رنگ‌آمیزی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

نمونه‌های برگی تازه در بافر استخراج (تریس ۵۰ میلی‌مولار، پنج درصد ساکاروز، ۵۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید، ۲۰ میلی‌مولار سدیم متابی‌سولفیت و دو درصد پلی‌اتیلن‌گلیکول) با pH برابر ۷/۵ حاوی ۰/۱ درصد ۲-مرکاپتواتانول با نسبت وزنی یک از برگ و یک از بافر استخراج، به خوبی همگن شد و همگنای حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ و دمای

چهار درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. عصارهٔ آنزیمی با قطعات بریده شده کاغذ واتمن شماره سه و مناسب با ابعاد چاهک، جذب و در ژل با ابعاد ۰/۶×۱۲×۱۵ سانتی‌متر بارگذاری شد. برای خنک کردن ژل و نگه داشتن دمای پایین هنگام الکتروفورز، از ظرف واجد یخ آب‌دار استفاده شد. حدود چهار ساعت پس از راه‌اندازی دستگاه الکتروفورز با آمپراژ کمتر از ۳۰ میلی‌آمپر، آبی برومونفول با حرکت ۱۰-۸ سانتی‌متری به انتهای ژل رسید و ژل برای برش و رنگ‌آمیزی آماده شد [۱۲]. برای رنگ‌آمیزی آنزیم از روش سولتیس و سولتیس [۱۹] با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا محلول Tris-HCl با pH=۸ (۰/۳۰۲ گرم تریس در ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر) تهیه شد. یک میلی‌گرم EDTA، یک میلی‌گرم ریبوفلاوین و ۱/۵ میلی‌گرم NBT به‌طور همزمان داخل محلول Tris-HCl ریخته شد. ژل در داخل ۵۰ میلی‌لیتر از Tris-HCl حاوی ترکیبات بالا به‌مدت نیم ساعت در تاریکی، بعد به مدت نیم ساعت در نور شدید قرار داده شد تا نوارهای روشن تشکیل گردد. نوارهای ایزوزیمی با نام مخفف آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و اندیس‌های ۱، ۲ و ۳ نام‌گذاری شد.

تجزیه آماری

این پژوهش به‌صورت آزمایش عاملی در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار اجرا شد. عامل اول شامل سه رقم یونجه و عامل دوم سطوح مختلف کلرید سدیم بود. از نرم‌افزار MCID برای کمی‌سازی «مساحت × شدت» هر نوار ایزوزیمی به‌عنوان شاخص ارزیابی فعالیت آنزیمی روی ژل استفاده شد. پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس‌ها، تجزیه آماری داده‌های صفات مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 انجام شد.

نتایج و بحث

با افزایش غلظت کلرید سدیم، درصد و سرعت جوانه‌زنی همه ارقام کاهش یافت. در بین سه رقم، «هروی» درصد و سرعت جوانه‌زنی بیشتری نسبت به دیگر رقم‌ها نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱ شاخص‌های جوانه‌زنی شامل درصد و سرعت جوانه‌زنی در بذرهای سه رقم گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) که در سه سطح شوری برای جوانه‌زنی قرار گرفته‌اند. تفاوت ما بین داده‌های مربوط به هر ستون که با حروف یکسانی نشان داده شده‌اند، از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p \leq$ ۰/۰۵ و n=۳).

رقم	تیمار	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی (day^{-1})
	شاهد	۰/۹۶±۰/۰۱[a]	۱۸/۴۱±۱/۵۹[b]
اسکویی	۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۰/۵۴±۰/۰۲[b]	۵/۴۸±۰/۹۲[cd]
	۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۰/۲۳±۰/۰۱[c]	۲/۲۹±۰/۴۷[d]
	شاهد	۰/۹۶±۰/۰۲[a]	۲۳/۰۷±۰/۲۴[a]
هروی	۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۰/۷۱±۰/۰۳[b]	۸/۶۴±۱/۵۰[c]
	۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۰/۳۰±۰/۰۱[c]	۳/۰۹±۰/۴۳[d]
	شاهد	۰/۸۳±۰/۰۱[a]	۱۸/۶۲±۱/۱۳[b]
قره یونجه	۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۰/۳۳±۰/۰۵[b]	۳/۸۰±۱/۳۵[d]
	۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۰/۲۱±۰/۰۳[c]	۲/۹۹±۰/۸۱[d]

شوری منجر به کاهش رشد دانه‌رست در تمام ارقام شد. در بین سطوح مختلف شوری، کمترین وزن‌تر، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول دانه رست مربوط به سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بود. از نظر شاخص های رشد دانه رست، رقم «هروی» بیشترین مقادیر را نسبت به دیگر رقم‌ها در شرایط شوری نشان داد (جدول۲).

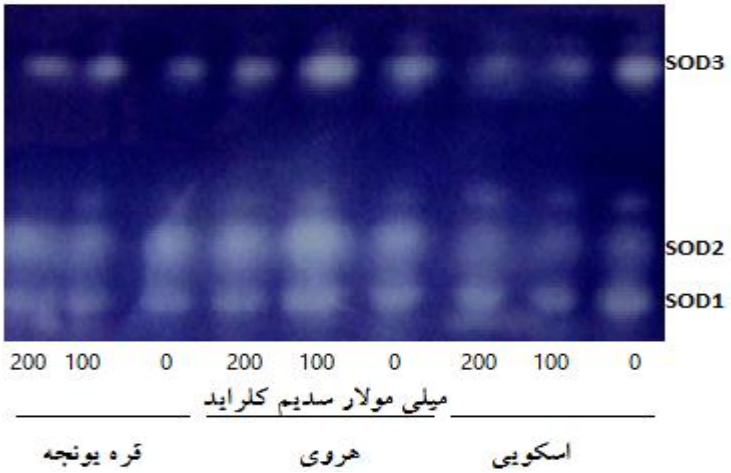
برای SOD سه ایزوفرم بر روی ژل پلی آکریل آمید تشخیص داده شد (شکل ۱). سوپراکسید دیسموتاز دارای سه ایزوفرم است که بر مبنای مکان استقرار و عنصر فلزی همراه آن‌ها طبقه‌بندی می‌شوند، ایزوفرم Mn-SOD در میتوکندری، Fe-SOD در کلروپلاست و Cu/Zn-SOD در سیتوسول و

کلروپلاست قرار دارند. این ایزوفرم‌ها حساسیت متفاوتی به پراکسید هیدروژن دارند و هر سه در هسته رمز می‌شوند [٤].

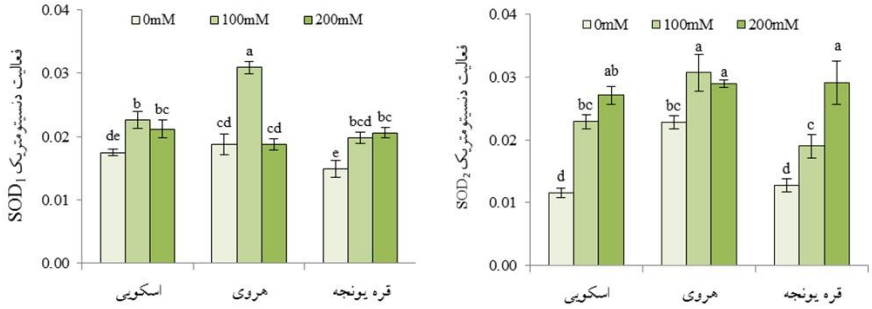
پاسخ فعالیت ایزوفرم‌های مختلف آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطوح مختلف شوری بسته به رقم متفاوت بود. فعالیت تمام ایزوفرم‌های این آنزیم در رقم «هروی» تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بیشتر از سایر سطوح شوری بود. در «قره‌یونجه» فعالیت تمام ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بیشتر از سایر سطوح شوری بود (شکل ۲).

جدول ۲ شاخص‌های رشدی دانه‌رست‌های سه رقم گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) که در سه سطح شوری برای جوانه‌زنی قرار گرفته‌اند. تفاوت مابین داده‌های مربوط به هر ستون که با حروف یکسانی نشان داده شده‌اند، از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p \leq$ ۰/۰۵ و n=۳).

رقم	تیمار	وزن‌تر (mg)	طول ریشه‌چه (mm)	طول ساقه‌چه (mm)	طول دانه رست (mm)
	شاهد	۲/۳۵±۰/۰٤^{a}	۲۲/۹۰±۰/٦۳^{a}	۵۲/۸۰±۲/۸۸^{a}	۷۵/۷۰±۲/۲۵^{a}
اسکویی	۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۱/۷۰±۰/۰۵^{b}	۱۷/۸۰±۱/۰۲^{b}	۱٦/۷۵±۱/۸۷^{b}	۲۹/۵۵±۲/۹۰^{b}
	۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۰/۸۹±/۰۵^{c}	۱۱/٦۰±/۸۰^{c}	۱۵/۳۰±/۰۵^{b}	۲۸/۹۰±/۸٦^{b}
	شاهد	۲/۵۵±۰/۱۰^{a}	۲٦/۵۰±۰/۷۵^{a}	۵۲/۷۰±۰/٦۳^{a}	۷۹/۲۰±۰/۱۱^{a}
هروی	۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۱/۹۸±۰/۰٤^{bc}	۱۸/۹۰±۱/۰۹^{b}	۳۰/۸۰±۱/٦۱^{b}	٤۹/۷۰±۰/۵۱^{b}
	۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۰/۹۳±/۰٤^{d}	۱۲/٤۰±۱/۰۱^{c}	۱٦/۲۳±۲/۰۵^{c}	۲۸/٦۳±۲/۵۳^{c}
	شاهد	۲/۲۳±۰/۱۰^{ab}	۱٦/۸۳±۱/۰۵^{a}	٤۵/۸۰±۲/٤۲^{a}	٦۲/۵۰±۰/۵۲^{a}
قره یونجه	۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۰/۸۹±۰/۰٤^{d}	۱۲/٦٦±۱/۵۳^{b}	۲٦/۱٦±۰/٦۷^{b}	۳۹/٦۰±۲/٦۷^{b}
	۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم	۰/۸۲±/۰۳^{d}	۱۰/۲۱±۱/۰۳^{b}	۱۰/۹٦±/٤٤^{c}	۲۱/۱۷±/۸۲^{c}



شکل ۱ تصویر ژل الکتروفورز ایزوفرم‌های SOD در سه رقم گیاه یونجه در شرایط شاهد (صفر میلی‌مولار) و شوری (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک).



شکل ۲ تاثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (میلی‌مولار) بر فعالیت دنسیتومتریک ایزوفرم SOD_1 و SOD_2 در رقم‌های یونجه. تفاوت مابین ستون‌های مربوط به هر رقم که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p \leq$ ۰/۰۵ و n=۳).

تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، وزن تر دانه‌رست، طول دانه‌رست، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، فعالیت SOD_1 و SOD_2 برای رقم‌ها و سطوح شوری وجود اختلاف معنی‌دار را اثبات کرد ($p \leq 0.01$). هم‌چنین اثر متقابل رقم یونجه × سطوح شوری برای سرعت جوانه‌زنی، وزن‌تر دانه‌رست، فعالیت SOD_1 و SOD_2 معنی‌دار بود ($p \leq$ ۰/۰۱) (جدول ۳).

جدول ۳ تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تاثیر شوری و رقم بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست‌ها و فعالیت ایزوفرم‌های SOD در گیاه یونجه.

منابع تغییر	درجه آزادی	سرعت جوانه‌زنی	درصد جوانه‌زنی	وزن‌تر دانه‌رست	طول دانه‌رست	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	SOD_1	SOD_2	SOD_3
رقم یونجه	۲	۱۲/۰۷**	۰/۰۹**	۰/٤۸**	۹۰/٤۷**	۸۳/۷٦**	۷۷/۲۳**	۱**	۱**	۰/۰۷ns
سطوح شوری	۲	۷۷/۰٦**	۱/۰٤**	۵/۰۵**	۵۹/۰٤**	۲۸/۵۵**	۳۰/۰۸**	۱**	۱**	۰/۰٦ns
رقم × شوری	٤	۱۷/۲۳**	۰/۰۲ns	۰/۲٦**	۱٤/۲۱ns	۱۵/۸٦ns	۹/٦۲ns	۰/۳۰**	۳**	۰/۱۱ns
خطا	۱۸	۵/۳۰	۰/۰۱	۰/۰٤	۱٤/٤۵	۷/٤٤	۸/۵٤	۰/۰۳	۰/۱۰	۰/۰۵
ضریب تغییرات (%CV)		۲٤/۲۸	۲/۰۵	۱۲/۲۵	۱۲/۷۳	۱۷/۷۷	۲۹/۲۰	۸/٤۰	۱۳/۸٦	۱٦/۹۳

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

بررسی همبستگی درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، رشد و ایزوفرم‌های SOD سه رقم یونجه نشان داد که بین وزن تر دانه‌رست‌ها با ایزوفرم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، طول دانه‌رست‌ها، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه همبستگی مثبت معنی‌داری وجود دارد. همچنین فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز با سایر شاخص‌های مورد مطالعه (به‌جز سرعت جوانه‌زنی) همبستگی مثبت معنی‌داری نشان داد (جدول ٤).

نشان داده شده است که شوری کلرید سدیم (۹ $dS\ m^{-1}$) در ۱۲ خانواده ناتنی گیاه یونجه باعث کاهش معنی‌دار ارتفاع بوته، وزن‌تر و وزن خشک می‌شود و رقم اصلاح شده رنجر و ارقام بومی زغال آغاج و تازه کند ویژگی‌های مطلوب‌تری در شرایط شوری داشتند [۲۲]. همچنین دیده شده است که شوری در ارقام یونجه در مرحله جوانه‌زنی، موجب کاهش معنی‌دار درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی می‌شود و غلظت‌های مختلف شوری (صفر، ۷۵، ۱۵۰، ۲۲۵ و ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) در سطح احتمال یک درصد باعث کاهش طول دانه‌رست، طول ساقه، طول ریشه، وزن‌تر دانه‌رست و وزن خشک دانه‌رست یونجه می‌شود [۱۸ و ۲۳]. در یک بررسی دیگر غلظت‌های مختلف شوری (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و

۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) در یونجه به‌طور معنی‌داری موجب کاهش سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، طول دانه‌رست، وزن‌تر دانه‌رست و وزن خشک دانه رست گردید [۱۲] که با نتایج ما مطابقت دارد.

جدول ٤ همبستگی بین جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، رشد و فعالیت ایزوفرم‌های SOD در سه رقم یونجه.

شاخص	سرعت جوانه‌زنی	درصد جوانه‌زنی	وزن تر دانه‌رست	طول دانه‌رست	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	SOD_1	SOD_2	SOD_3
سرعت جوانه‌زنی	۱								
درصد جوانه‌زنی	۰/۸۳*	۱							
وزن‌تر دانه رست	۰/۸۸*	۰/۹۹**	۱						
طول دانه رست	۰/٦٦ns	۰/۹۷**	۰/۹٤**	۱					
طول ریشه‌چه	۰/۷۵*	۰/۹۹**	۰/۹۹**	۰/۹۸**	۱				
طول ساقه‌چه	۰/۵۹ns	۰/۹٤**	۰/۹۹**	۰/۹۹**	۰/۹۷**	۱			
SOD_1	۰/۷٦*	۰/۹۹**	۰/۹۹**	۰/۹۱**	۰/۹۸**	۰/۹۰**	۱		
SOD_2	۰/٤۲ns	۰/۸۵*	۰/۹۵**	۰/۹۹**	۰/۹۷**	۰/۹۹**	۰/۹۱**	۱	
SOD_3	۰/۷٤*	۰/۹۸**	۰/۹۵**	۰/۹۸**	۰/۹۸**	۰/۹۸**	۰/۹۹**	۰/۹۲**	۱

ns، * و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

انواع اکسیژن فعال در حالت عادی به میزان کم در گیاهان تولید می‌شود و انواع مختلف آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو نیز به نوبه خود ایفای نقش می‌کنند [۱۳]. با افزایش تنش اکسیداتیو، سیستم آنتی‌اکسیداتیو گیاه فعال می‌شود به‌طوریکه SOD به عنوان اولین سد دفاعی در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن قرار می‌گیرد و در مقابل خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو مقاومت می‌نماید تا سوپر اکسید تولید شده را مهار کند [۲ و ٤ و ۱۱]. در یک بررسی قبلی شوری ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید فعالیت SOD را در برگ‌های دانه‌رست یونجه به‌طور معنی‌دار افزایش داد [۲٤ و ۲۵]. هم‌چنین فعالیت سه ایزوفرم سوپراکسید دیسموتاز در خانواده‌های ناتنی یونجه تحت تنش کلرید سدیم ($9\ dS\ m^{-1}$) افزایش یافت [۲۳] که با نتایج ما مطابقت دارد.

در مطالعه صورت گرفته روی گیاه شیرین بیان رشد یافته تحت تنش شوری، مشخص شده است که فعالیت آسکوربات پراکسیداز با طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه همبستگی مثبت و معنی‌داری دارد، در حالی‌که همبستگی صفات مذکور با فعالیت سوپراکسید دیسموتاز غیرمعنی‌دار بود [۷]. افزایش فعالیت کاتالاز در تنش ٤۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم با وزن تر در دانه‌رست‌های لوبیا قرمز ارتباط معنی‌داری داشت [۱۲]. افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز با تحمل به تنش شوری در مرحله دانه‌رستی یونجه تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار در ارتباط بود [۲۵]. همچنین فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش شوری با وزن تر و وزن خشک ۱۲ خانواده ناتنی گیاه یونجه ارتباط معنی‌داری داشت [۲۲] که با نتایج ما مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری کلی

تنش شوری باعث کاهش درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول دانه رست، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و وزن‌تر دانه رست در هر سه رقم گیاه یونجه شد. فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز در هر سه رقم یونجه تحت تنش شوری کلرید سدیم افزایش نشان داد و شدت این افزایش بستگی به رقم داشت. درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، رشد و فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز رقم «هروی» در شرایط شوری بیشتر از رقم‌های «اسکویی» و «قره یونجه» بود و ارتباط مثبت و معنی‌داری بین فعالیت ایزوفرم‌های سوپراکسید دیسموتاز با وزن‌تر دانه رست ارقام بررسی شده وجود داشت. نتایج پیشنهاد می دهد که می‌توان از فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان نشانگر تحمل به شوری در ارقام یونجه استفاده کرد.

منابع

1. Abdolzadeh A, Kazuto S, Chiba K (1998) Effect of salinity on growth and ion content in *Lolium*

multiflorum, L. perenne and Festuca arundinacea. *Journal of the Japanese Society of Revegetation Technology* **23**: 161–169.

2. Ashraf M (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advance* **27**: 84–93.
3. Bhardwaj SH, Sharma NK, Srivastava PK, Shukla G (2010) Salt tolerance assessment in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ecotypes. *Botany Research Journal* **3**: 1–6.
4. Gaber MA (2010) Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 369–374.
5. Greenway H, Munns R (2008) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**: 149–190.
6. Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2601–2609.
7. Hassanzadeh S (2014) Priming effects on growth and antioxidant enzymes activity at different levels of salinity of sweet corn (*Zea mays* cv. *Basin*). *Iranian Journal of Plant Ecophysiology* **33**: 21–28. (*In Persian*)
8. ISTA. (2013) ISTA Hand Book on Seedling Evaluation. Edinburgh, United Kingdom, International Seed Testing Association.
9. Kashani SF, Jafari AA (2009) Effect of salinity on seed germination of *Medicago sativa* and *Onobrychis sativa*. *Rangeland* **3**: 491–507. (*In Persian*)
10. Mass EV, Hoffman GJ (1999) Crop salt tolerance – current assessment. *Irrigation and Drainage* **103**: 115–134.
11. Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405–410.
12. Moharramnejad S, Valizadeh M (2014) Effect of salt stress on pigment content and catalase activity in seedlings of red bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Research in Crop Ecosystems* **1**: 73–80. (*In Persian*)
13. Nayyar H, Gupta D (2006) Differential sensitivity of C_3 and C_4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *Journal of Experimental Botany* **58**: 106–13.
14. Noble CL, Halloran GM, West DW (2011) Identification and selection for salt tolerance in lucerne (*Medicago Sativa*). *Australian Journal of Agricultural Research* **35**: 239–252.
15. Noreen Z, Ashraf M (2009) Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1764–1774.
16. Patanea C, Cavallaroa V, Cosentinob S (2009) Germination and radicle growth in unprimed and primed seeds of sweet sorghum as affected by reduced water potential in NaCl at different temperatures industrial. *Industrial Crops and Products* **30**: 1–8.
17. Quesada V, Ponceand MR, Micol JL (2000) Genetic analysis of salt–tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetic* **54**: 421–436.
18. Soltani1 A, Khodarahmpour Z, Jafari A (2012) Study of genetic diversity tolerance to salinity stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties basis on seedling growth. *Journal of Crop Plant Breeding* **10**: 29–45. (*In Persian*)
19. Soltis DE, Soltis PS (1990) Isozymes in Plant Biology. London, England, Chapman and Hall.
20. Tester M, Davenport R (2003) Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Annals of Botany* **91**: 503–527.
21. Tijen D, Ismail T (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 247–257.
22. Valizadeh M, Moharamnejad S, Ahmadi M, Mohammadzadeh Jalaly H (2013) Changes in activity profile of some antioxidant enzymes in alfalfa half-sib families under salt stress. *Journal of Agricultural Science and Technology* **15**: 801–809.
23. Wang X, Han J (2009) Changes of proline content, activity, and active isoforms of antioxidative enzymes in two Alfalfa cultivars under salt stress. *Agricultural Sciences in China* **8**: 431–440.
24. Wang X, Zhao G, Gu H (2009) Physiological and antioxidant responses of three leguminous species to saline environment during seed germination stage. *African Journal of Biotechnology* **8**: 5773–5779.
25. Wang W, Kim YH, Lee HS, Kim KY, Deng XP, Kwak SS (2009) Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology Biochemistry* **47**: 570–577.

Plant Stress Physiology Vol. 1, No. 1, September 2014 – March 2015, pp: 53-60

Seed germination and seedling growth is correlated with the activity of superoxide dismutase isoforms in three alfalfa cultivars

Sajjad Moharramnejad* and Farhad Baghbani

Department of Agriculture Sciences, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

Abstract

Effect of three levels of salinity (control, 100 and 200 mM NaCl) on seed germination and seedling growth was studied in three cultivars of alfalfa ('Oskouei', 'Heravi' and 'Ghara-yonje') plants under laboratory conditions. In addition, electrophoretic analysis of activity of superoxide dismutase (SOD) isoforms was performed using "density × area" score. Salt treatment decreased germination percentage and rate as well as seedling growth in all three alfalfa cultivars. 'Heravi' had the highest germination rate and seedling growth under salinity. Three SOD isoforms were detected on electrophoretic gel. It was observed that salinity increases activity of all these isoforms and higher activity of superoxide dismutase is associated with higher salt tolerance in tested cultivars. Our results suggested that activity of different isoforms of superoxide dismutase is an important factor determining growth of alfalfa plants at earlier stages under saline conditions.

Keywords: Alfalfa, Fresh weight, Germination rate, Salinity, Superoxide dismutase.

* Corresponding author, Email: sm.chakherlo@yahoo.com