

ارزیابی تحمل به شوری برخی از اکوتیپ‌های یونجه با استفاده از صفات فیزیولوژیکی و

بیوشیمیایی

احمدعلی شوشی دزفولی^{۱*}، علیرضا پاک‌نژاد^۲، علی عصاره^۳ و ناصر ظریفی‌نیا^۴

(۴ و ۱) استادیار پژوهش بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، دزفول، ایران.

(۲) مربی پژوهش بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، دزفول، ایران.

(۳) استادیار گروه علوم و مهندسی آب، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول: aashoushi@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۰۳

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۱/۱۶

چکیده

شوری یکی از عوامل مهم کاهش‌دهنده رشد گیاهان در بسیاری از مناطق جهان است. غربالگری و انتخاب اکوتیپ‌ها متحمل بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی یکی از اقدامات مهم در جهت دستیابی به اکوتیپ‌های متحمل به شوری می‌باشد. در این آزمایش تغییرات برخی از صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، پنج اکوتیپ یونجه تحت سه سطح تنش شوری (شاهد، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مول نمک) در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و به صورت اسپلیت پلات با سه تکرار در مرکز تحقیقات کشاورزی صفی‌آباد دزفول در سال ۱۳۹۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. فاکتور اصلی، سطوح مختلف تنش شوری و فاکتور فرعی شامل پنج اکوتیپ یونجه بود. نتایج نشان داد تنش شوری اثر معنی‌دار بر عملکرد ماده خشک، میزان نشت الکترولیت، محتوای نسبی آب برگ (RWC)، میزان عناصر سدیم و پتاسیم، فعالیت آن‌تی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) داشت. مقایسه‌های میانگین سطوح تنش شوری به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد نشان داد که کم‌ترین میزان ماده خشک، محتوای نسبی آب برگ، یون پتاسیم و نسبت یون پتاسیم به یون سدیم و بیش‌ترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) مربوط به تنش شوری شدید (۱۰۰ میلی‌مولار) بود. این امر بیانگر آسیب زیاد اکوتیپ‌های یونجه مورد بررسی در نتیجه اعمال شوری شدید بود. بالا رفتن تنش شوری تا میزان ۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش فعالیت آن‌تی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در اکوتیپ‌ها یونجه شد ولی تنش شدید شوری باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز شد. این وضعیت نشان‌دهنده فعال شدن سیستم آن‌تی‌اکسیدانی در یونجه برای افزایش تحمل به شوری تا سطح ۵۰ میلی‌مولار نمک بود ولی با افزایش سطح تنش تا ۱۰۰ میلی‌مولار به علت تخریب سیستم سنتز پروتئین، کارایی سیستم آن‌تی‌اکسیدانی در یونجه کم شد.

واژه‌های کلیدی: آن‌تی‌اکسیدان، عملکرد علوفه و ماده خشک.

مقدمه

یونجه با نام علمی (*Medicago sativa* L.) مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای در ایران و بسیاری از نقاط جهان بوده و به‌عنوان ملکه نباتات علوفه‌ای مشهور شده است. بر اساس آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی متوسط سطح زیر کشت یونجه در ایران در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴، ۶۵۰ هزار هکتار با عملکرد ۹۲۴۸ کیلوگرم علوفه خشک در هکتار بوده است. استان خوزستان با سطح زیر کشت ۷۶۱۹ هکتار و عملکرد ۱۴۰۱۱ کیلوگرم علوفه خشک در هکتار یکی از مستعدترین مناطق کشور جهت کشت یونجه می‌باشد (مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۶). یونجه نسبت به سایر گیاهان علوفه‌ای به‌دلیل کیفیت بالای علوفه تولیدی (دارا بودن بیش از ۲۰ درصد پروتئین)، تنوع در مصرف (محصول تازه، خشک و سیلوی یونجه)، سازگاری بسیار بالا در اقلیم‌ها و شرایط مختلف طبیعی، نقش بالا در کشاورزی پایدار و پایداری تولید، وجود اکوتیپ‌های متنوع برای مناطق مختلف، ارتقای سطح حاصلخیزی خاک و جلوگیری از فرسایش خاک در دیم‌زارها و بالا بودن ضریب مکانیزاسیون تولید از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شوری پس از خشکی مهم‌ترین رایج‌ترین تنش محیطی در سطح جهان و از جمله ایران است. به‌دلیل قرار داشتن ایران در منطقه آب و هوایی خشک و نیمه‌خشک، نزدیک به ۵۰ درصد سطح زیر کشت محصولات کشاورزی به درجه‌های مختلف با مشکل شوری و قلیایی بودن روبه‌رو هستند (میرمحمدی و قره‌یاضی، ۱۳۸۱). لذا با توجه به سطح بالای اراضی شور در ایران، یکی از مهم‌ترین عوامل توسعه کشت یونجه در ایران و منطقه خوزستان، امکان کشت همراه با تولید محصول مناسب در مناطق شور می‌باشد. بنابراین پیدا کردن راهکارهایی که باعث افزایش تولید در واحد سطح در مناطق شور شود، از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی در سطوح مورفولوژی، آناتومی، سلولی و مولکولی متفاوت است (Yamaguchi-Shinozaki et al., 2002). توانایی گیاهان برای سازش به تنش‌های محیطی بستگی به نوع، شدت، مدت تنش و هم‌چنین گونه گیاهی و مرحله وقوع تنش دارد (Safarnejad, 2004). با توسعه تنش شوری، تمام فرآیندهای اساسی در یک گیاه مانند فتوسنتز، سنتز پروتئین و متابولیسم انرژی و چربی تحت اثر قرار می‌گیرد. اولین واکنش در اثر تنش شوری، کاهش در میزان توسعه سطح برگ می‌باشد ولی با برطرف شدن تنش، فرایند رشد برگ از سر گرفته می‌شود (Parida and Das, 2005). روش‌های مرسوم انتخاب و به‌نژادی در گیاهان جهت افزایش تحمل تنش، به میزان زیادی توسط محققان و به‌نژادگران استفاده شده است. پارامترهای زراعی مورد استفاده برای ارزیابی تحمل به شوری شامل عملکرد، بقا، ارتفاع بوته، سطح برگ، میزان خسارت به برگ و میزان کاهش رشد نسبی می‌باشد (Ashraf and Harris, 2004). ولی روش‌های مرسوم انتخاب و به‌نژادی در بسیاری از موارد در انتقال تحمل به شوری در بعضی از گونه‌های گیاهی ناموفق بوده است (Sairam and Tyagi, 2004) مجموع اثرهای تنش شوری، تنش اسمزی و

یونی، منجر به وقوع تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی خواهد شد که ناشی از افزایش تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) است که از جمله محصولات اجتناب‌ناپذیر فرآیندهای حیاتی سلول نظیر تنفس، فتوسنتز و تنفس نوری به‌شمار می‌آیند (Del Rio *et al.*, 2006; Mittler, 2002). احیای ناقص اکسیژن اتمسفری در فرآیندهای حیاتی مذکور سبب تولید آن‌ها می‌شود. هرگاه بنا به دلایلی مسیر اصلی انتقال الکترون مسدود شود نظیر زمان مواجهه گیاه با تنش‌های محیطی، انتقال الکترون در مسیر فرعی جریان یافته و سبب احیای ناقص اکسیژن و تولید انواع اکسیژن فعال می‌شود. در این مسیر فرعی، اکسیژن با گرفتن ۱، ۲ و ۳ الکترون به ترتیب سبب تشکیل رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) می‌شود (Mittler, 2002). سلول‌های گیاهی جهت مقابله با اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال، از یکسری مکانیسم‌های دفاعی برخوردار هستند که می‌توان به چرخه‌های مه‌لر (Asada, 2000) گلوکاتیون-آسکوربات (Edreva, 2005)، گزانتوفیل، مسیر آلترناتیو اکسیداز (Edreva, 2005)، تغییر حالت تیلاکوئید (Ort, 2001) و تنفس نوری (Edreva, 2005) اشاره نمود. مکانیسم‌های مذکور این عمل را از طریق ممانعت از تولید انواع اکسیژن فعال و یا جمع‌آوری آن‌ها عملی می‌کنند. اکثر مکانیسم‌های دفاعی فوق، از همکاری آنتی‌اکسیدان و آنزیم‌های آن‌ها تشکیل شده است. از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز، مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز اشاره کرد. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مختلف با میزان تحمل به شوری در گیاهان همبستگی دارد (Demiral and Turkan, 2005). به‌طور کلی گیاهان متحمل به شوری، توانایی بیش‌تری برای محافظت در برابر تنش، با استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را دارند (Sekman *et al.*, 2007) با توجه به این‌که تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است، بررسی روند تغییرات صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تحت تنش شوری با هدف بهبود و اصلاح عملکرد یونجه، از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. لذا این پژوهش به بررسی اثر تنش شوری بر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی یونجه پرداخته است، تا با استفاده از بررسی روند تغییرات این صفات در اکوتیپ‌های مورد مطالعه، تحت تنش شوری، اکوتیپ‌های یونجه متحمل و حساس به شوری بر اساس خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تعیین شود.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی

در این مطالعه مواد ژنتیکی بر اساس نتایج به‌دست آمده از دو تحقیق مقدماتی مربوط به اثر تنش شوری بر روی صفات مورفولوژیکی بر ۲۰ اکوتیپ یونجه انتخاب شدند (Shoushi Dezfuli *et al.*, 2016; Shoushi Dezfuli *et al.*, 2017).

در این تحقیق برای بررسی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تنش شوری در یونجه، پنج اکوتیپ از اکوتیپ‌هایی که در مطالعات قبلی (بر اساس صفات مورفولوژیکی) دارای طیفی از تحمل به تنش شوری بوده‌اند، جهت بررسی بیش‌تر انتخاب شدند. این اکوتیپ‌ها شامل اکوتیپ‌های یزدی، رهنانی، ملیسا و دفی بودند.

روش اجرای آزمایش

در این پژوهش پنج اکوتیپ یونجه در قالب طرح کاملاً تصادفی و به‌صورت کرت‌های خرد شده در گلخانه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد دزفول در سال ۱۳۹۵ کاشته شدند. فاکتور اصلی، سطوح مختلف تنش شوری و فاکتور فرعی پنج ژنوتیپ یونجه در نظر گرفته شد. تعداد تکرار به‌کار برده شده در این مطالعه ۳ بار بود. روش ارزیابی تنش شوری بر اساس روش استاندارد ارزیابی تنش شوری در یونجه در مرحله گیاهچه‌ای بود (Scasta et al., 2012). به‌منظور اجرای آزمایش، در ابتدا بذور ضدعفونی شده و برای جوانه‌زنی به مدت ۲ روز در شرایط تاریکی در ژرمیناتور و در درون پتری‌دیش جوانه‌دار شدند، سپس بذور یکنواخت جوانه‌دار شده در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۲۰ و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر حاوی کوکوپیت، پرلایت و شن به نسبت ۲:۳:۳ در عمق یک سانتی‌متری کشت شدند. تعداد بوته در هر گلدان که همان کرت آزمایشی است ۱۵ عدد بود (اسکاستا و همکاران، ۲۰۱۲). به منظور استقرار کامل گیاهچه‌ها، در ۱۴ روز اول بعد از کاشت تمام گلدان‌ها با محلول هوگلند ۱/۴ قدرت تغذیه شدند. بعد از استقرار و رشد گیاهچه (از روز چهاردهم به بعد)، سطوح تنش اعمال شدند. برای اعمال سطح بدون تنش شوری از محلول هوگلند بدون نمک (NaCl)، برای تنش ملایم از محلول هوگلند حاوی ۵۰ میلی‌مولار نمک و برای تنش شدید از محلول هوگلند شامل ۱۰۰ میلی‌مولار نمک استفاده شد. در طی دوره آزمایش دما در محدوده ۲۲ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد، شدت نور طبیعی و طول روز ۱۶ ساعت بود. به منظور بررسی اثر تنش شوری، عملیات چین‌برداری برای تعیین ماده خشک و تر و همچنین اندازه‌گیری سایر خصوصیات، ۳۶ روز پس از اعمال تیمارهای تنش شوری صورت گرفت. ارتفاع برداشت یا چین‌برداری برای تمام تیمارها از ۳ سانتی‌متری بالای سطح خاک بود. علاوه بر عملکرد ماده خشک، صفات فیزیولوژیکی (میزان نشت الکترولیت، محتوای نسبی آب برگ و میزان عناصر سدیم و پتاسیم)، ارزیابی آنتی‌اکسیدان‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری میزان ماده خشک اندام هوایی بوته‌های برداشتی مربوط به هر تیمار، در ابتدا اندام هوایی گیاه از ارتفاع ۲ سانتی‌متری از کف بریده شده و در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز خشک شده و سپس توزین شد. میزان محتوای نسبی آب برگ (RWC) نیز پس از نمونه‌برداری از سه برگچه و قطع کردن دم‌برگ آن‌ها و قراردادن هر سه برگچه جدا شده در ۱۰ سی‌سی آب دوبار تقطیر شده در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت به‌دست آمد و با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Weatherley, 1995).

رابطه ۱: $RWC = \frac{(وزن خشک شده - وزن آماس برگ)}{(وزن خشک شده - وزن اولیه)} \times 100$

برای اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از برگ‌های نمونه برداری شده، دیسک‌های برگ‌ی یک سانتی‌متر مربعی به‌وسیله پانچ تهیه شده و هر پنج دیسک برگ‌ی در ۱۰ سی‌سی محلول قند مانیتول یک مولار، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند و در مرحله بعد هدایت الکتریکی (EC) محلول‌ها که رابطه عکسی با مقاومت غشا سلولی دارد، اندازه‌گیری شد (Tripathy *et al.*, 2000). برای اندازه‌گیری عناصر سدیم و پتاسیم مقداری از بافت تر برگ گیاه (از ۱۵ برگ توسعه یافته انتهایی گیاه) به مدت ۴۸ ساعت در داخل آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد سپس به نیم گرم از بافت خشک، ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ اضافه شد. بعد از حدود دو ساعت، با استفاده از اجاق برقی به محلول‌ها حرارت داده شده (تا دمای تبخیر)، و در انتها با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر میزان عناصر پتاسیم و سدیم محاسبه شد (Akhondy *et al.*, 2006). فعالیت SOD، طبق روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) و به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد برای استخراج SOD در چهار درجه سانتی‌گراد، از بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ شامل EDTA ۰/۵ میلی‌مولار استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش شامل EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و NBT ۷۵ میکرومولار و ریبوفلاوین ۰/۲۱ میلی‌مولار و سوپرناتانت آنزیمی استخراج شده بود. هر واحد فعالیت SOD عبارت است از مقداری از آنزیم، که برای ۵۰ درصد مهار احیای فتوشیمیایی NBT تحت شرایط سنجش، مورد نیاز می‌باشد. سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا بر اساس تشکیل کمپلکس مالون‌دی‌آلدئید در اثر پراکسیداسیون لیپیدهای غشا انجام شد (Zaho *et al.*, 1994). ۰/۲۵ گرم از بافت تازه برگ با پنج میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی ساییده شد. عصاره‌ی به‌دست آمده به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ (۱۰۰۰g) شد. به یک میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی، چهار میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد که حاوی تیوباربتیوریک اسید ۰/۵ درصد بود افزوده شد. مخلوط به‌دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بلافاصله لوله‌های آزمایش در یخ قرار داده شد. محتوی لوله‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. در نهایت غلظت مالون‌دی‌آلدئید از تفاضل دو طول موج قرائت شده محاسبه شد. فعالیت آنزیم کاتالاز به دنبال کاهش جذب H_2O_2 با ضریب خاموشی ($3.9/4 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$) به مدت دو دقیقه در ۲۴۰ نانومتر طبق روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) تعیین شد. برای استخراج CAT در چهار درجه سانتی‌گراد از بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار شامل EDTA یک میلی‌مولار و PVPP دو درصد، استفاده شد. هر واحد فعالیت آنزیم کاتالاز، به‌صورت مقداری از آنزیم که یک میکرومولار H_2O_2 را در هر دقیقه در شرایط سنجش تجزیه می‌کند، قابل تعریف می‌باشد. استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از بافر فسفات ۲۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ و با استفاده از روش

Nakano و Asada (۱۹۸۱) صورت گرفت. دو میلی لیتر مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری آسکوربات پراکسیداز شامل، بافر فسفات ۲۵۰ میلی مولار با اسیدیت ۷، EDTA ۰/۱ میلی مولار، آسکوربات ۰/۵ میلی مولار و پراکسید هیدروژن ۱/۲ میلی-مولار با pH=۷ بود. فعالیت آسکوربات پراکسیداز براساس میزان اکسید شدن آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $2/8 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ تعیین شد. در این پژوهش جهت انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به شوری، از روش چند متغیره تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. در تکنیک تجزیه به مؤلفه‌های اصلی P متغیر $X_1, X_2, \dots, X_p$ با یکدیگر ترکیب شده و از این طریق، یک سری شاخص یا مؤلفه به نام $Z_1, Z_2, \dots, Z_p$ که با یکدیگر همبستگی ندارند، به دست آورده می‌شود. محاسبات آماری به کمک نرم افزار MINITAB و SAS انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های یونجه تحت تنش شوری در جدول شماره ۱ آورده شده است. اثرات شوری، اکوتیپ و هم‌چنین برهمکنش اکوتیپ و شوری بر کلیه صفات مورد مطالعه معنی‌دار بود. به دلیل معنی‌دار بودن اثرات متقابل شوری و اکوتیپ برای کلیه صفات، نتایج و بحث فقط برای اثرات برهمکنش اکوتیپ و شوری انجام شد. نتایج حاصل از مقایسه‌های میانگین اثرات برهمکنش اکوتیپ و شوری، برای صفت میزان ماده خشک تولیدی در شکل شماره ۱A نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان ماده خشک تولیدی (پس از ۳۶ روز اعمال تنش شوری) بین تیمارهای مورد بررسی در محیط بدون تنش شوری و مربوط به اکوتیپ ملیسا (۰/۸۸۷ گرم در بوته) بود و کم‌ترین آن به تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مول نمک در اکوتیپ دیابلورده (۰/۱۱۳ گرم در بوته) تعلق داشت. در تنش شوری شدید (۱۰۰ میلی‌مول نمک) اکوتیپ‌های دفی، ملیسا و دیابلورده روندی کاهشی نسبت به تیمار عدم اعمال تنش (شاهد) برای صفت میزان ماده خشک تولیدی داشتند به‌طوری‌که کم‌ترین میزان کاهش به اکوتیپ‌های رهنانی (۳/۶ درصد) و یزدی (۵/۲ درصد) و بیش‌ترین میزان کاهش به اکوتیپ دیابلورده (۷۸ درصد کاهش) تعلق داشت. کاهش ماده خشک بوته در اثر تنش شوری در این مطالعه مشهود بود چون معمول‌ترین و آشکارترین اثر شوری، تأخیر در رشد است (Zamanian et al., 2004). عدم ایجاد تغییر معنی‌دار میزان ماده خشک در اکوتیپ‌های یزدی و رهنانی بیانگر تحمل بالای اکوتیپ‌های مذکور تحت تنش شوری بود. بر اساس مطالعات انجام شده توسط دیگر محققین میزان RWC تحت تنش شوری بر اساس میزان تحمل اکوتیپ‌ها تغییر می‌کند و کاهش مقدار آن در اکوتیپ‌های حساس به شوری بیش‌تر از اکوتیپ‌های متحمل به شوری است (یارنیا و همکاران، ۱۳۸۰). نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های اثرات برهمکنش اکوتیپ و شوری، برای صفت میزان محتوای نسبی آب برگ (RWC) در شکل شماره ۱B نشان داده شده است. بیش‌ترین میزان RWC بین تیمارهای مورد

بررسی، در محیط بدون تنش شوری و کمترین آن در تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مول نمک مشاهده شد. در تنش شوری متوسط (۵۰ میلی‌مول نمک) به جز در اکوتیپ دفی، باقی اکوتیپ‌ها روندی کاهشی نسبت به تیمار عدم اعمال تنش (شاهد) داشتند. در تنش شوری شدید (۱۰۰ میلی‌مول نمک) تمامی اکوتیپ‌ها روندی کاهشی نسبت به تیمار شاهد داشتند و بیش‌ترین میزان کاهش در اکوتیپ رهنانی (۱۳/۴ درصد) مشاهده شد. کاهش RWC (شکل ۱B) تحت تنش شوری، نشان‌دهنده کاهش آماس سلول‌های برگ در این مطالعه بود. این وضعیت در نتیجه کاهش پتانسیل اسمزی در اثر شوری، در گیاهان ایجاد می‌گردد (Katerji et al., 1997). کاهش RWC، سبب کاهش آب مورد نیاز برای فرایندهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی از قبیل طویل شدن سلولی، باز شدن روزنه‌ها و فرایندهای وابسته به فتوسنتز است (Farkhonded et al., 2012). در گیاهان، نشت الکترولیتی غشا که شاخصی از میزان خسارت وارد شده به غشا می‌باشد، جهت شناسایی و انتخاب اکوتیپ‌های متحمل به شوری استفاده شده است به‌طوری‌که هرچه میزان نشت الکترولیت‌ها از غشا یک اکوتیپ کم‌تر باشد نشان‌دهنده تحمل بیش‌تر آن اکوتیپ تحت تنش است (Munns, 2010). نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ و شوری، برای صفت میزان نشت یونی با استفاده از اندازه‌گیری هدایت الکتریکی در شکل شماره ۱C آورده شده است. در تنش شوری متوسط (۵۰ میلی‌مول نمک) نسبت به محیط بدون تنش، به جز اکوتیپ دیابلورده در باقی اکوتیپ‌ها تفاوت معنی‌دار آماری برای میزان نشت یونی سلول‌های برگ، مشاهده نشد. ولی با افزایش سطح شوری از ۵۰ میلی‌مول به ۱۰۰ میلی‌مول نمک شاهد افزایش میزان نشت یونی در همه اکوتیپ‌ها در سلول‌های برگ بودیم. بیش‌ترین میزان نشت الکترولیت در تنش ۱۰۰ میلی‌مول نمک، مربوط به اکوتیپ دیابلورده با میانگین هدایت الکتریکی ۲۲۳ میکروموس بر سانتی‌متر بود. کم‌ترین میزان نشت الکترولیت در همین سطح تنش را اکوتیپ یزدی با میانگین هدایت الکتریکی ۵۹ میکروموس بر سانتی‌متر دارا بود هرچند که این اکوتیپ از نظر این صفت اختلاف آماری با اکوتیپ‌های رهنانی، دفی و ملیسا نداشت. بالا رفتن میزان نشت الکترولیت‌ها در این مطالعه تحت تنش شوری، نشان‌دهنده آسیب به غشا سلولی گیاهان مورد آزمایش در اثر شوری است. اختلال در غشای سلولی در نتیجه تنش شوری به خوبی به وسیله نفوذپذیری غشا برای یون و الکترولیت بیان می‌شود که می‌تواند به آسانی توسط انتشار (جریان به خارج) الکترولیت اندازه‌گیری شود (Lutts et al., 1999). میزان بالای نشت الکترولیت‌ها در اکوتیپ دیابلورده بیانگر حساسیت زیاد اکوتیپ مذکور به شوری بود. در این تحقیق شاهد افزایش غلظت یون سدیم و کاهش غلظت یون پتاسیم و نسبت یون پتاسیم به سدیم در اثر شوری بودیم. میزان سدیم نیز به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد تحت اثر سطوح مختلف شوری، اکوتیپ و برهمکنش آن‌ها قرار گرفت (شکل ۱D). با افزایش تنش شوری میزان سدیم در برگ‌ها به میزان قابل توجهی افزایش یافت.

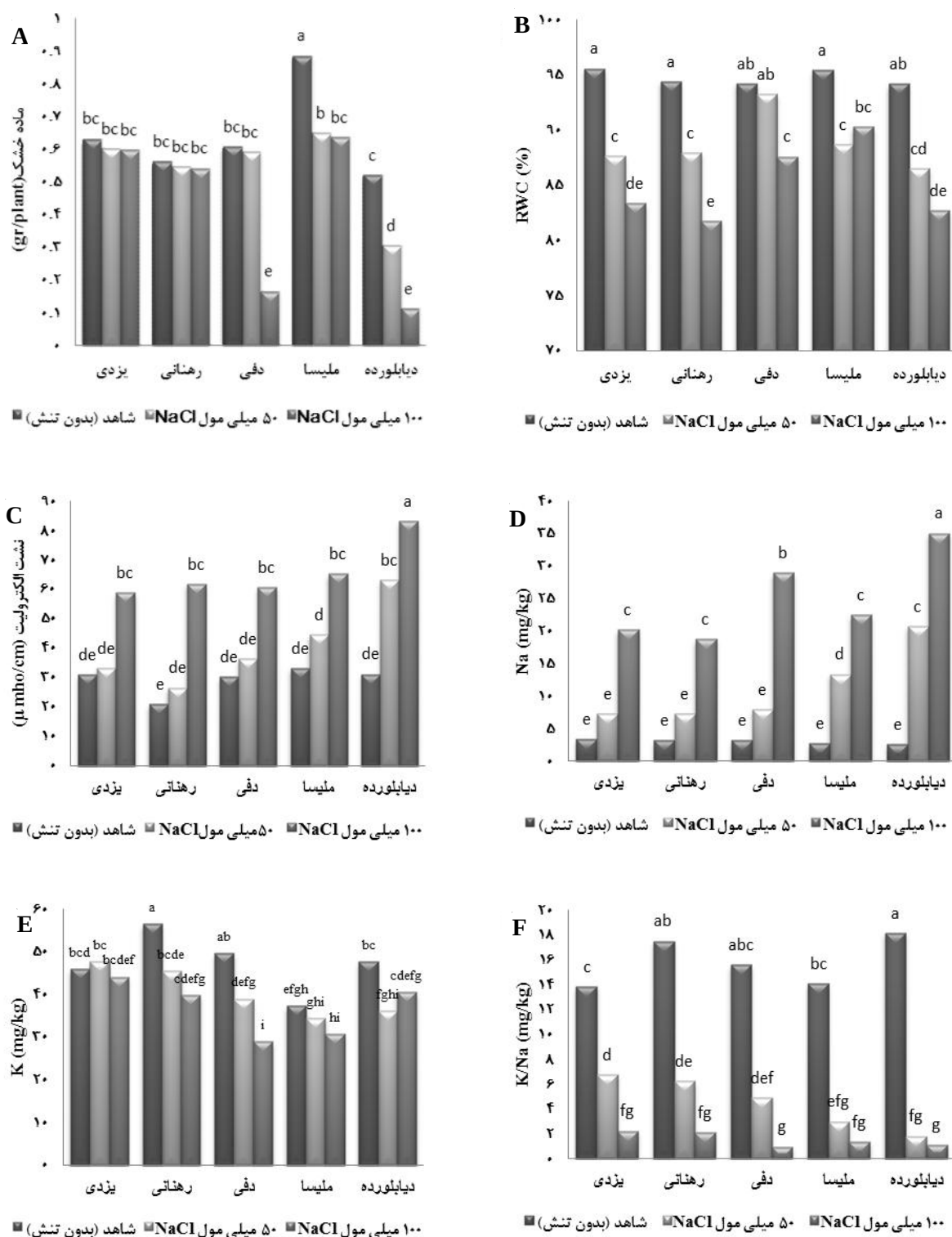
جدول ۱: تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های یونجه تحت تنش شوری

منابع تغییرات	درجه آزادی	ماده خشک بوته	محتوای نسبی آب برگ	میزان نشت یونی	میزان سدیم	میزان پتاسیم	نسبت پتاسیم به سدیم	مالون دی آلدئید	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوبات پراکسیداز
شوری	۲	۰/۷۲۶**	۱۰۳۸/۳**	۵۶۷۵۷**	۱۸۶۸/۲۷۹**	۴۳۴/۹۸۸*	۸۵۰/۵۳۴**	۷/۱۶۷**	۱۶۰/۱۰۸**	۲۵۴۶/۹**	۳/۲۵۴**
خطا	۶	۰/۰۰۴	۱۰/۰	۲۱	۹/۳۵۶	۵۳/۷۹۵	۹/۰۰۴	۰/۰۰۹	۱/۲۴۲	۴۳/۲۹۱	۰/۰۰۶
اکوتیپ	۴	۰/۱۹۸**	۶۲/۴**	۲۴۰۷**	۱۳۵/۰۳۵**	۲۵/۱۱۲**	۵۷/۳۹۵**	۷/۴۱۰**	۱۲/۷۴۵**	۷۶۹/۵۸۷**	۵/۹۲۹**
شوری×اکوتیپ	۸	۰/۰۳۱**	۱۱/۷**	۱۲۵۲**	۵۳/۴۳۱**	۶۲/۱۳۱*	۹/۲۶۸*	۰/۱۳۳*	۲۰/۰۳۹**	۶۰۵/۷۴۱**	۰/۵۳۷**
خطا	۲۴	۰/۰۰۴	۶/۲	۶۵	۹/۹۰۷	۱۹/۰۴۳	۳/۸۷۰	۰/۰۴۳	۰/۸۱۶	۱۹/۰۴۸	۰/۰۱۵
CV%		۱۴/۴۸	۲/۸۱	۱۶/۰۶	۲۳/۸۵	۱۰/۴۷	۲۶/۷۶	۶/۷۹	۷/۲۵	۷/۶۴	۵/۴۰

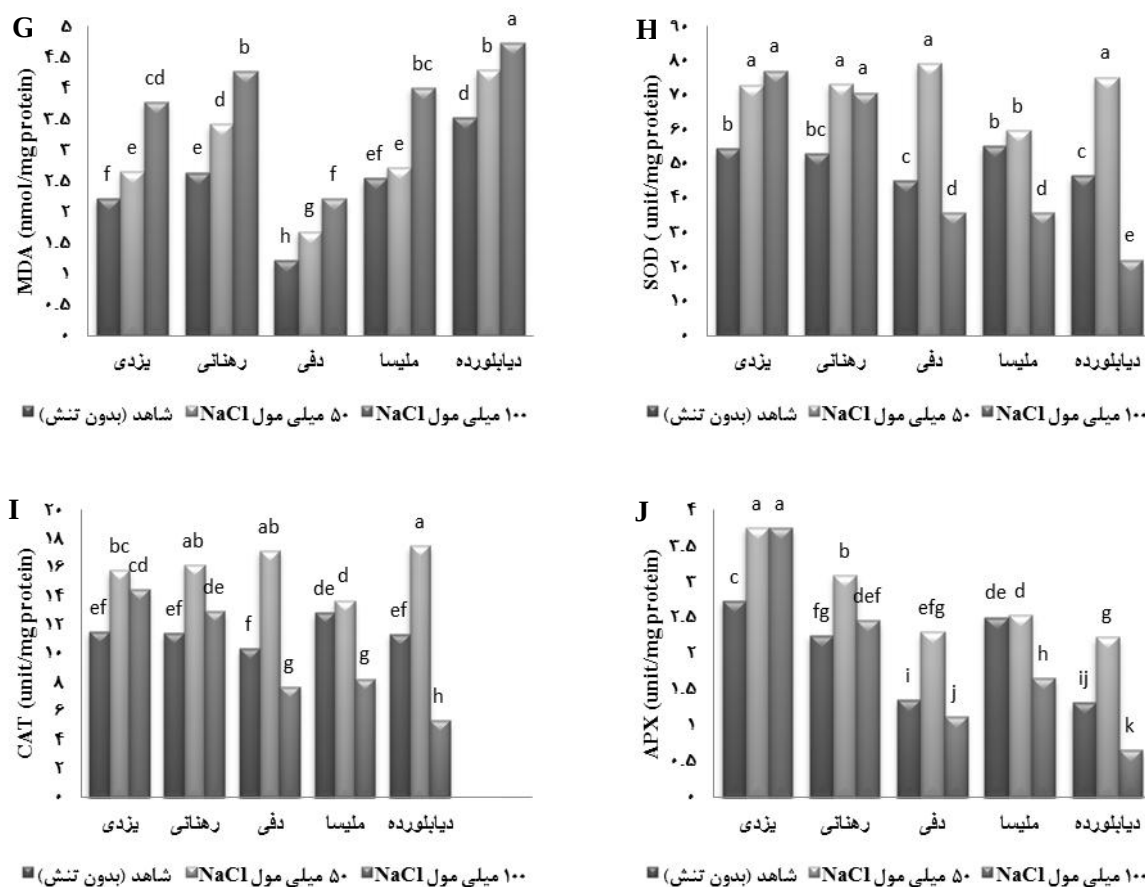
* و **: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد.

در تنش شوری ۵۰ میلی مول کلرید سدیم، در اکوتیپ‌های ملیسا و دیابلورده شاهد افزایش معنی‌داری برای میزان سدیم در برگ‌ها بودیم. در تنش ۱۰۰ میلی مول کلرید سدیم، تمامی اکوتیپ‌ها روندی افزایش را تجربه کردند و بیش‌ترین مقدار سدیم به اکوتیپ دیابلورده با میزان سدیم ۳۵/۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن خشک برگ، تعلق داشت. بر خلاف سدیم، سطوح مختلف تنش شوری ناشی از نمک، باعث کاهش میزان پتاسیم برگ‌ها در یونجه شد. بیش‌ترین میزان پتاسیم مربوط به تیمار بدون اعمال تنش و مربوط به اکوتیپ رهنانی با میانگین ۵۶/۶۳۷ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک برگ بود و کم‌ترین میزان پتاسیم را اکوتیپ دفی در تنش ۱۰۰ میلی مول کلرید سدیم (با میانگین ۲۸/۹۷۳ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک برگ) دارا بود (شکل ۱E). با افزایش تنش شوری نسبت پتاسیم به سدیم نیز به میزان قابل توجهی کاهش یافت (شکل ۱F). بیش‌ترین نسبت پتاسیم به سدیم را اکوتیپ‌های دیابلورده، رهنانی و دفی در تیمار بدون اعمال شوری (به ترتیب با میانگین‌های ۱۸/۱۹۹، ۱۷/۵۴۵ و ۱۵/۶۴۲ واحد) و کم‌ترین نسبت پتاسیم به سدیم مربوط به تیمار مصرف ۱۰۰ میلی مول کلرید سدیم و برای اکوتیپ‌های دفی و دیابلورده (به ترتیب با میانگین ۱/۰۰۶ و ۱/۱۶۴ واحد) به دست آمد (شکل ۱F). در اکوتیپ دیابلورده با اعمال تنش ۱۰۰ میلی مول کلرید سدیم، میزان صفت پتاسیم به سدیم نسبت به شاهد بدون شوری، ۹۵ درصد کاهش پیدا کرد ولی این میزان کاهش برای اکوتیپ یزدی (علی‌رغم میزان کم نسبت پتاسیم به سدیم در محیط بدون تنش) ۸۴ درصد بود. در این تحقیق افزایش غلظت یون سدیم و کاهش غلظت یون پتاسیم و نسبت یون پتاسیم به سدیم در اثر شوری مشاهده شد. Shiyab (۲۰۱۱) گزارش کرد که افزایش غلظت سدیم و کلر بر جذب رقابتی بسیاری از عناصر ضروری و انتخاب‌پذیری یونی در غشا اثر کرده و منجر به کاهش سایر عناصر غذایی از جمله پتاسیم در بافت گیاه می‌شود. به‌طور کلی در شوری بالا، یون سدیم با سایر یون‌ها به‌خصوص پتاسیم رقابت می‌کند و منجر به کاهش پتاسیم در گیاه می‌شود. یون پتاسیم برای حفظ پتانسیل اسمزی و افزایش جذب آب توسط گیاه ضروری است. نسبت K^+/Na^+ در طی تنش شوری کاهش می‌یابد و این کاهش در گونه‌های حساس به شوری بیش‌تر است (Rezayatmand et al., 2013). بر اساس شکل ۱G با افزایش میزان تنش شوری، مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در بافت برگ تمام اکوتیپ‌های یونجه افزایش یافت. بیش‌ترین میزان MDA در تیمارهای تنش ۵۰ و ۱۰۰ میلی مول نمک و مربوط به اکوتیپ دیابلورده بود (۴/۳ نانو مول در میلی گرم پروتئین در تنش ۵۰ میلی مول نمک و ۴/۷۴۳ نانو مول در میلی گرم پروتئین در تنش ۱۰۰ میلی مول نمک). بر اساس شکل‌های ۱G، ۱H و ۱I با افزایش میزان تنش شوری تا سطح ۵۰ میلی مول نمک، مقدار سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) در بافت برگ تمام اکوتیپ‌های یونجه افزایش یافت. ولی میزان تغییرات مقدار SOD از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی مول نمک در تمام اکوتیپ‌های یونجه یکسان نبود، به‌طوری که نمک نداشت. ولی در سه اکوتیپ دفی، ملیسا و دیابلورده شاهد کاهش میزان SOD،

با افزایش سطح تنش از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌مول نمک بودیم به‌طوری‌که در اکوتیپ حساس دیابلورده میزان کاهش SOD در تنش شدید نسبت به تنش متوسط شوری، به حدود ۷۰ درصد رسید (میزان SOD در تنش ۵۰ میلی‌مول نمک ۷۵/۳۱۳ و در تنش شدید ۲۲/۸۷۷ واحد بر میلی گرم پروتئین بود). روند تغییرات مقدار CAT و APX از سطح تنش ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌مول در تمام اکوتیپ‌های یونجه کاهشی بود (شکل‌های ۱G و ۱I). البته میزان و درصد این کاهش در اکوتیپ‌های مختلف یکسان نبود. در حالی‌که در تنش ۱۰۰ میلی‌مول نمک، مقدار CAT و APX در اکوتیپ متحمل یزدی اختلاف معنی‌داری با تنش ۵۰ میلی‌مول نمک نداشت ولی در اکوتیپ حساس دیابلورده کاهش میزان این آنزیم‌ها در حدود ۷۰ درصد به ازای افزایش سطح تنش از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌مول نمک مشاهده شد. در این پژوهش شوری باعث افزایش میزان MDA در بافت برگ گیاه یونجه شده بود. مقادیر بالای مالون‌دی‌آلدئید در تنش شوری نشانگر پراکسیداسیون بالای چربی‌های غشا سلولی در این گیاه بود. مالون‌دی‌آلدئید به عنوان یک معرف برای بررسی میزان صدمات وارد شده به غشاء در شرایط تنش، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Israr and Sahi, 2006). Esfandiari و همکاران (۲۰۰۸) نیز وجود همبستگی مستقیم بین کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید و افزایش تحمل به تنش شوری در گندم را گزارش دادند. افزایش SOD، CAT و APX تحت تنش شوری توسط بسیاری از محققین در گیاهان مختلف نشان داده شده است (Ahmad et al., 2007; Koca et al., 2010). تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مختلف با میزان تحمل به شوری در گیاهان همبستگی دارد (Demiral and Turkan, 2005). در این مطالعه نیز افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور تحت تنش شوری متوسط (۵۰ میلی‌مول NaCl) مشاهده شد. کاهش فعالیت SOD، CAT و APX در تنش ۱۰۰ میلی‌مول نمک در این آزمایش ممکن است به علت تخریب سیستم سنتز پروتئین در گیاه تحت تنش باشد (Asilan et al., 2010). بررسی همبستگی بین صفات مختلف، جهت تعیین همسویی و عدم همسویی تغییرات دو به دوی صفات، به به‌نژادگران نبات کمک شایانی می‌کند (Agrama, 1996). جهت تعیین روابط همبستگی بین صفات مورد مطالعه و میزان ماده خشک تولیدی، ضرایب همبستگی بین کلیه صفات محاسبه شد (جدول ۲). همبستگی مثبت و معنی‌دار میزان ماده خشک تولیدی با صفات نسبت یون پتاسیم به سدیم، میزان فعالیت SOD، CAT و APX نشان دهنده تغییرات همسوی صفات مذکور با صفت میزان ماده خشک تولیدی بود. در این پژوهش به منظور تعیین اکوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش شوری با استفاده از کلیه صفات مورد مطالعه، از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده گردید. نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در جدول ۳ نشان داده شده‌است. تجزیه به مؤلفه اصلی نشان داد که بیش‌ترین تغییرات بین داده‌ها توسط دو مؤلفه اصلی اول و دوم (PCA₁ و PCA₂) بیان می‌شود (به‌ترتیب ۶۲ و ۲۷ درصد).



شکل ۱: اثرات متقابل بین اکوتیپ‌ها و سطوح مختلف تنش شوری بر صفات مورد مطالعه در آزمایش، میانگین‌هایی که حروف غیرمشترک دارند، دارای اختلاف معنی‌دار به روش دانکن در سطح احتمال خطای پنج درصد می‌باشند.



ادامه شکل ۱: اثرات متقابل بین اکوتیپ‌ها و سطوح مختلف تنش شوری بر صفات مورد مطالعه در آزمایش، میانگین‌هایی که حروف غیر مشترک دارند، دارای اختلاف معنی‌دار به روش دانکن در سطح احتمال خطای پنج درصد می‌باشند.

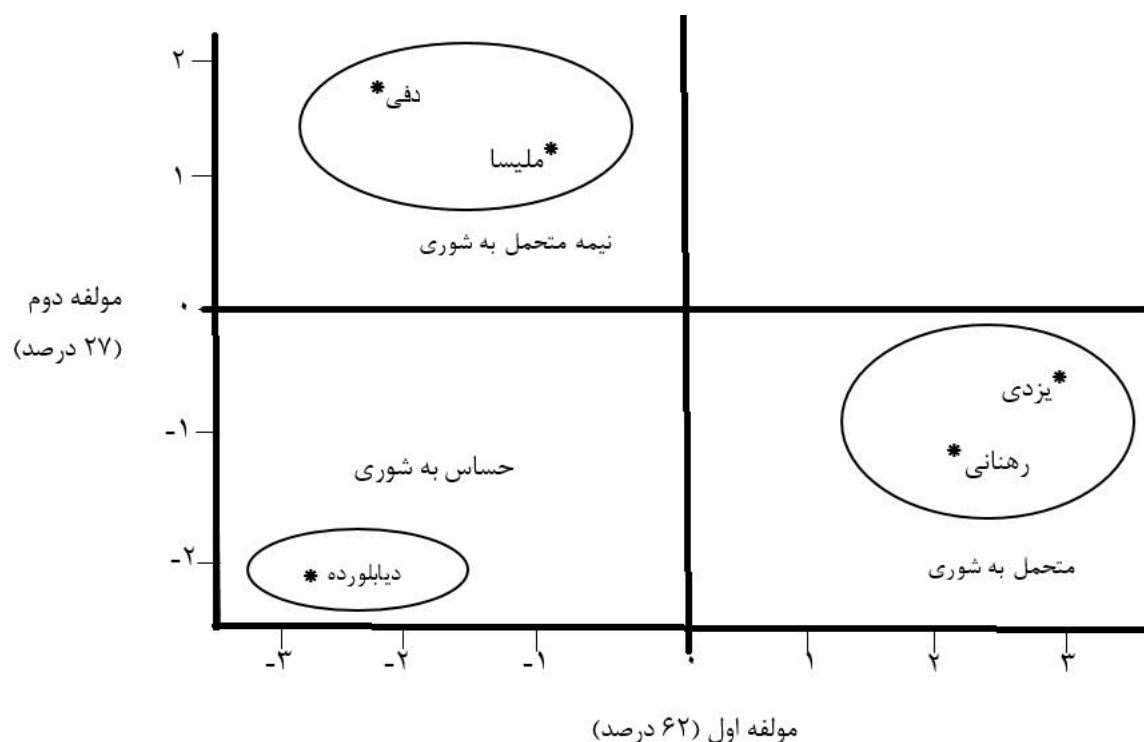
جدول ۲: ضرایب همبستگی ساده بین صفات مورد بررسی تحت تنش شوری

ماده خشک	K ⁺ /Na ⁺	Na ⁺	K ⁺	نشست الکترولیت	RWC	APX	SOD	CAT	MDA
								۱	MDA
								۱	CAT
							۱	۰/۹۸**	۰/۰۶ ^{ns}
							۱	۰/۹۵**	۰/۰۷ ^{ns}
					۱	۰/۱۳ ^{ns}	۰/۱۴ ^{ns}	۰/۱۴ ^{ns}	۰/۳۴ ^{ns}
				۱	۰/۵۲*	۰/۶۱*	۰/۶۲*	۰/۶۵**	۰/۴۲ ^{ns}
			۱	۰/۶۱*	۰/۵۲*	۰/۴۸ ^{ns}	۰/۴۲ ^{ns}	۰/۴۸ ^{ns}	۰/۵۶*
		۱	۰/۱۴ ^{ns}	۰/۳۰ ^{ns}	۰/۱۱ ^{ns}	۰/۸۰**	۰/۷۹**	۰/۸۱**	۰/۰۵ ^{ns}
	۱	۰/۸۳**	۰/۶۳*	۰/۵۷*	۰/۲۵ ^{ns}	۰/۸۴**	۰/۸۱**	۰/۸۴**	۰/۳۲ ^{ns}
۱	۰/۶۲*	۰/۷۸**	۰/۲۳ ^{ns}	۰/۳۱ ^{ns}	۰/۲۴ ^{ns}	۰/۷۸**	۰/۶۹**	۰/۷۱**	۰/۲۱ ^{ns}

ns: * و **: به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد.

جدول ۳: نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات مورد مطالعه در اکوتیپ‌های یونجه تحت تنش شوری

مؤلفه	مقدار ویژه	درصد واریانس	واریانس جمعی	ماده خشک	K^+/Na^+	Na^+	K^+	نشت الکترولیت	RWC	APX	SOD	CAT	MDA
۱	۶/۱۹	۰/۶۲	۰/۶۲	۰/۳۲۱	۰/۳۹۲	۰/۲۲۵	۰/۳۶۲	۰/۲۶۹	۰/۱۵۰	۰/۳۸۸	۰/۳۹۴	۰/۳۹۷	۰/۰۵۷
۲	۲/۶۵	۰/۲۷	۰/۸۹	۰/۱۵۷	۰/۱۳۴	۰/۴۸۹	۰/۱۹۹	۰/۴۳۵	۰/۴۹۶	۰/۰۲۵	۰/۰۰۲	۰/۰۳۶	۰/۴۹۰



شکل ۲: نمایش گرافیکی بای پلات برای پنج اکوتیپ یونجه براساس اولین و دومین مؤلفه اصلی تحت تنش

شوری

در نتیجه استفاده از این دو مؤلفه و چشم‌پوشی از سایر مؤلفه‌ها، تنها موجب از دست رفتن بخش کمی از تغییرات (در حدود ۱۲ درصد) شده و تفسیر نتایج بر اساس PCA_1 و PCA_2 دارای کارایی بالایی است. علاوه بر این، از بین تمام مؤلفه‌های محاسبه شده، فقط دو مؤلفه PCA_1 و PCA_2 دارای مقادیر ویژه بالای یک بودند (جدول ۳). لذا نمودار بای پلات جهت تعیین ژنوتیپ‌های متحمل و حساس، فقط بر اساس PCA_1 و PCA_2 و به همراه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه رسم شد (شکل ۲). طبق شکل مذکور بر اساس تمامی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد مطالعه، اکوتیپ‌های یزدی و رهنانی به عنوان اکوتیپ‌های متحمل، دفی و ملیسا به عنوان اکوتیپ‌های نیمه متحمل و اکوتیپ دیابلورده به عنوان اکوتیپ حساس به شوری معرفی شدند.

منابع

- مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات وزارت جهاد کشاورزی. ۱۳۹۶. میزان تولید محصولات زراعی در سال زراعی ۱۳۹۴-۹۵. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات.
- میرمحمدی میبدی، ع. و قره یاضی، ب. ۱۳۸۱. جنبه‌های فیزیولوژیک و به نژادی تنش شوری گیاهان. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان.
- یارنیا، م.، حیدری شریف آباد، ح.، هاشمی دزفولی، آ.، رحیم زاده خویی، ف. و قلاوند، آ. ۱۳۸۰. ارزیابی تحمل به شوری لاین‌های یونجه. مجله علوم زراعی ایران جلد ۳ شماره ۲، ص ۱۲-۲۶.
- Agrama, H. A. S. 1996.** Sequential path analysis of grain yield and its components in maize. *Plant Breeding* 115: 343-346.
- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G. and Sharma, S. 2010.** Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* 30: 161-175.
- Akhondy, M., Safarnegad, A. and Lahooti, M. 2006.** Effect of Drought Stress on Proline Accumulation and change elements in the Yazdi, Nikshahr and Ranger alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology* 1: 165-173.
- Asada, K. 2000.** The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Hilosophical Transactions of the Royal Society* 355: 1419-1431.
- Ashraf, M. and Harris, P. J. C. 2004.** Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.
- Asilan, K. S., Modares-Sanavi, M. and Hagilooei, S. 2010.** Effects of drought stress on antioxidant system of alfalfa seedlings Perennial. *Iranian Journal of Field Crop Science* 41(1): 67-77.
- Chance, B. and Maehly, A. C. 1955.** Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymologist* 11: 764-755.
- Del Rio, L., Sandalio, L., Corpas, F., Palma, J. and Barroso, J. 2006.** Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in paroxysms. Production, scavenging and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141: 330-335.
- Demiral, T. and Turkan, I. 2005.** Comparative lipid peroxidation, antioxidant systems and praline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 53: 247-257.
- Edreva, A. 2005.** Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A Submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 119-133.

- Esfandiari, E. A., Shakiba, M. R., Mahboob, S. A., Alyari, H. and Shahabivand, S. 2008.** The effect of water stress on the antioxidant content, protective enzyme activities, proline content and lipid peroxidation in wheat seedling. *Pakistan Journal Biology Science* 11: 1916-1922.
- Farkhonded, R., Nabizadeh, E. and Jalilnezhad, N. 2012.** Effect of salinity stress on proline content, membrane stability and water relation in two sugar beet cultivars. *International Journal of Agricultural Science* 2(5): 385-392.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. 1977.** Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59:309-314.
- Israr, M. and Sahi, S. V. 2006.** Antioxidative responses to mercury in the cell cultures of *Sesbania drummondii*. *Plant Physiology Biochemical* 44: 590-595.
- Katerji, N., Van Hoorn, J. W., Hamd, A. Y., Mastrorilli, M. and Mou Karzel, E. 1997.** Osmotic adjustment of sugar beets in response to soil salinity and its influence on stomatal conductance, growth and yield. *Agricultural Water Management* 34: 57-69.
- Koca, M., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. 2007.** The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 60: 344-351.
- Lacefield, G. D., Henning, J. C., Rasnake, M. and Collins, M. 2005.** Alfalfa the Queen of Forage Crops. University of Kentucky Cooperative Extension Service Publication AGR-76.
- Lutts, S., Magerus, V. and Kinet, J. M. 1999.** NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 105: 450-458.
- Mirmohammadi-meibodi, A. and Gharayazi, B. 2002.** Physiological aspects and breeding for salinity stress in plants. Isfahan University of Technology Publication Center.
- Mittler, R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
- Munns, R. 2010.** Plant salt tolerance. In: Sunkar R. (ed.) *Methods in Molecular Biology*. Springer, Berlin. pp. 25-38.
- Nakano, Y. and Asada, K. 1981.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Ort, D. 2001.** When there is too much light. *Plant Physiology* 125: 29-32.
- Parida, A. K. and Das, A. B. 2005.** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- Rezayatmand, Z., Khavari-Nejad, R. Z. and Asghari, G. 2013.** The effect of salicylic acid on some of physiological and biochemical parameters of *Artemisia aucheri* Boiss under salt stress. *Journal of Plant Biology* 16: 57-70.
- Safarnejad, A. 2004.** Characterization of somaclones of alfalfa (*Medicago sativa* L.) for drought.

tolerance. Journal of Agricultural Science and Technology 6: 121-127.

Sairam, R. K. and Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science 86(3): 407-421.

Scasta, J. D., Trostle, C. L. and Foster, M. A. 2012. Evaluating Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Cultivars for Salt Tolerance Using Laboratory, Greenhouse and Field Methods. Journal of Agricultural Science 4(9): 90-10.

Sekman, A. H., Turkan, I. and Takio, S. 2007. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt tolerance *Plantago maritime* and salt sensitive *Plantago media*. Physiologia Plantarum 131: 399-411.

Shiyab, S. 2011. Effects of NaCl application to hydroponic nutrient solution on macro and micro elements and protein content of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Food, Agriculture and Environment 9: 350-356.

Shoushi Dezful, A. A., Mohammady, S. Rafiei, F. and Shiran, B. 2016. Evaluation of salinity tolerance of alfalfa genotypes during germination stage using multivariate analysis. Journal of Applied Environmental and Biological Science 6(3): 51-56.

Shoushi Dezful, A. A., Mohammady, S. Rafiei, F. and Shiran, B. 2017. Variation among Iranian alfalfa genotypes for absolute growth rates and salt stress tolerance indices. Environment Conservation Journal 18: 27-39.

Tripathy, J. N., Zhng, J., Robin, S., Nguyen, T. T. and Nguyen, H. T. 2000. QTLs for cell membrane stability mapped in rice (*oryza sativa* L.) under drought stress. Theoretical and Applied Genetics 100: 1197-1202.

Weatherley, P. E. 1995. Studies in water relation of cotton plants, the field measurement of water deficit in leaves. New Phytologist 49: 81-87.

Yamaguchi-Shinozaki, K., Kasuga, M. and Liu, Q. 2002. Biological mechanisms of drought stress response. Japan International Research Center for Agricultural Science Working Reports. pp. 1-8.

Zaho, S. J., Xu, C. C. and Zou, Q. 1994. Improvements of the method for measurement of malondialdehyde in plant tissue. Plant Physiology Communications 30: 207-210.1

Zamanian, M., Vakeal, R. and Mirzapour, M. H. 2004. Performance comparison of five alfalfa cultivars under saline conditions. Journal of Soil and Water Sciences 18(1): 1-1