



University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

Evaluation of the expression of some key genes of proline biosynthesis pathway and biochemical and physiological traits of two bread wheat varieties in response to salinity stress during the early growth stages

Elham Akbari¹, Saeid Navabpour^{2*} and Hourihe Najafi³

1. Graduate M.Sc., Department of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Professor, Department of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran (* Corresponding author: s.navabpour@gau.ac.ir)
3. Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Comprehensive abstract

Introduction

Salinity is one of the most important limiting factors for the production of all agricultural products in many regions of the world. In saline environments, the absorption of nutrients in plants is reduced. Adaptation of plants to environmental stresses requires morphological, physiological, and biochemical changes, including the accumulation of osmolytes, which can play an adaptive role during osmotic stress. One of the common responses of plants to osmotic stress is the accumulation of proline, which is an important and well-known osmolyte that accumulates in many plant organs during stress. The objective of the present study was to evaluate the expression pattern of *P5CS* and *P5CR* genes and to investigate some physiological traits in two bread wheat varieties at the early growth stages under salinity stress conditions.

Materials and methods

The experiment was conducted as a split plot factorial in completely randomized design with four replications. The seeds of the studied wheat cultivars were disinfected using 10% ethanol and washed with distilled water, and then sown in 32 pots filled with cocopeat and perlite in a ratio of 2:1. Fifteen seeds of each variety were sown in each pot. Salinity stress was applied after germination and establishment of the seedlings with irrigation water, so that during the irrigation of plants, the control pots were irrigated with sterile distilled water (0 dS/m) and the salinity treatment pots were irrigated with saline water containing NaCl (12 dS/m). After the plants reached the tillering and stemming growth stages, five plants were randomly sampled from each experimental pot, and biochemical traits including chlorophyll, proline, cellular oxidation index, potassium and sodium levels were measured at both growth stages. The expression of some genes including *P5CS* and *P5CR* was also evaluated on leaf samples.

Research findings

The results of this experiment showed that the effects of salinity stress and variety on all measured biochemical traits (except for the effect of variety on sodium content) were significant. Evaluation of chlorophyll a and b content showed a decrease in the content of both chlorophyll a and b in both varieties, and this decrease was more noticeable at the tillering growth stage. The levels of catalase and superoxide dismutase enzymes increased in both Ehsan and Baharan varieties under the influence of salinity stress, and this increase was more considerable in Ehsan variety at the stemming stage. Sodium content also increased under salinity stress, but this increase was not significant in Baharan



variety at the tillering stage and in Ehsan variety at the stemming stage. In contrast, the changes in potassium content due to salt stress were different in two varieties, so that the potassium level in Baharan showed a significant increase at both growth stages due to salinity stress, while in Ehsan it decreased significantly at tillering stage, but its change wasn't significant at stemming stage. Proline levels also showed a significant increase under salinity stress conditions at both growth stages and in both varieties. In addition, the activity of both genes *P5CS* and *P5CR* also increased in both wheat varieties under salinity stress, indicating that there is a direct relationship between the changes of proline levels and the activity of genes involved in its biosynthesis pathway (i.e. *P5CS* and *P5CR*) under salinity stress conditions.

Conclusion

Evaluation of biochemical traits and gene expression in the studied two wheat varieties in the current research showed that Ehsan variety can be introduced as a salinity-tolerant cultivar and used in future breeding programs to increase salinity tolerance in wheat.

Keywords: Abiotic stress, Catalase, *P5CS* and *P5CR* genes, Poline, Superoxide dismutase

Received: June 24, 2024

Accepted: September 12, 2024

Cite this article:

Akbari, E., Navabpour, S., & Najafi, H. (2024). Evaluation of the expression of some key genes of proline biosynthesis pathway and biochemical and physiological traits of two varieties of bread wheat in response to salt stress during the early growth stages. *Cereal Research*, 14(3), 213-230. doi: [10.22124/CR.2024.27777.1826](https://doi.org/10.22124/CR.2024.27777.1826)



ارزیابی بیان برخی ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز پرولین و صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک دو رقم گندم نان در واکنش به تنش شوری طی مراحل اولیه رشد

الهام اکبری^۱، سعید نواب پور^{۲*} و حوریه نجفی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

(* نویسنده مسئول: s.navabpour@gu.ac.ir)

۳- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده جامع

مقدمه: شوری یکی از مهم‌ترین عامل‌های محدود کننده تولید تمامی محصولات کشاورزی در بسیاری از مناطق جهان به‌شمار می‌رود. در محیط شور، جذب عناصر غذایی در گیاهان کاهش می‌یابد. سازگاری گیاهان به تنش‌های محیطی مستلزم تغییرات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی از جمله تجمع اسمولیت‌ها است که می‌توانند در زمان تنش اسمزی نقش سازگاری را ایفا کنند. یکی از پاسخ‌های عمومی و رایجی که گیاهان در ارتباط با تنش اسمزی از خود نشان می‌دهند، تجمع اسید آمینه پرولین است که به‌عنوان یک اسمولیت مهم و شناخته شده طی تنش در بسیاری از اندام‌های گیاهی تجمع پیدا می‌کند. پژوهش حاضر با هدف ارزیابی الگوی بیان ژن‌های *P5CS* و *P5CR* و بررسی برخی صفات فیزیولوژیک در دو رقم گندم نان طی تنش شوری در مراحل اولیه رشد انجام شد.

مواد و روش‌ها: آزمایش به‌صورت کرت‌های خرد شده فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. بذر رقم‌های گندم مورد مطالعه با استفاده از اتانول ۱۰ درصد ضدعفونی و پس از شست و شو با آب مقطر استریل، در ۳۲ گلدان که با کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۲:۱ پر شده بودند، کشت شد. در هر گلدان تعداد ۱۵ عدد بذر از هر رقم کشت شد. تنش شوری پس از جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌ها توسط آب آبیاری اعمال شد، به این ترتیب که در زمان نیاز آبی گیاه، گلدان‌های شاهد با آب مقطر استریل (صفر دسی‌زیمنس بر متر) و گلدان‌های تیمار شوری با آب شور حاوی NaCl (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) آبیاری شدند. پس از رسیدن گیاهان به مرحله رشد پنجه‌زنی و ساقه‌دهی، از هر گلدان آزمایشی تعداد پنج بوته تصادفی به‌عنوان نمونه برداشت شد و صفات بیوشیمیایی شامل کلروفیل، پرولین، شاخص اکسیداسیون سلولی، میزان پتاسیم و سدیم در هر دو مرحله از رشد گیاه اندازه‌گیری شد. همچنین، ارزیابی بیان برخی ژن‌ها شامل *P5CS* و *P5CR* نیز روی نمونه‌های برگ صورت گرفت.

یافته‌های تحقیق: نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که اثرات تنش شوری و رقم بر تمامی صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده (به‌جز اثر رقم بر میزان سدیم) معنی‌دار بود. بررسی محتوای کلروفیل‌های a و b نشان دهنده کاهش محتوای هر دو کلروفیل در هر دو رقم بود و این کاهش در مرحله رشد پنجه‌دهی محسوس‌تر بود. میزان آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در هر دو رقم احسان و بهاران تحت تاثیر تنش شوری افزایش یافت که این افزایش در رقم احسان در

مرحله ساقه‌دهی چشم‌گیرتر بود. میزان سدیم نیز در اثر تنش شوری افزایش یافت، اما این افزایش در رقم بهاران در مرحله پنجه‌زنی و در رقم احسان در مرحله ساقه‌دهی معنی‌دار نبود. در مقابل، تغییرات میزان پتاسیم در اثر تنش شوری در دو رقم متفاوت بود، به طوری که میزان پتاسیم در رقم بهاران در هر دو مرحله از رشد در اثر تنش شوری افزایش قابل توجه و معنی‌داری را نشان داد، در حالی که در رقم احسان در مرحله پنجه‌زنی به طور معنی‌داری کاهش یافت، اما در مرحله ساقه‌دهی تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد. بررسی میزان پرولین نیز افزایش معنی‌دار آن را در اثر تنش شوری در هر دو رقم و در هر دو مرحله از رشد نشان داد. علاوه بر این، میزان فعالیت هر دو ژن یعنی *P5CS* و *P5CR* نیز در هر دو رقم گندم مورد مطالعه در اثر تنش شوری افزایش یافت و نشان داد که رابطه مستقیمی بین تغییرات میزان پرولین با فعالیت ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آن یعنی *P5CR* و *P5CS* تحت تاثیر تنش شوری وجود دارد.

نتیجه‌گیری: ارزیابی صفات بیوشیمیایی و همچنین بررسی بیان ژن‌ها در دو رقم گندم مورد مطالعه در این تحقیق نشان داد که رقم احسان می‌تواند به عنوان یک رقم متحمل به شوری معرفی و در برنامه‌های به‌نژادی آینده برای افزایش تحمل به شوری در گندم استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پرولین، تنش غیرزیستی، ژن‌های *P5CS* و *P5CR*، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۲

نحوه استناد به این مقاله:

اکبری، الهام، نواب‌پور، سعید، و نجفی، حوریه. (۱۴۰۳). ارزیابی بیان برخی ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز پرولین و صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک دو رقم گندم نان در واکنش به تنش شوری طی مراحل اولیه رشد. *تحقیقات غلات*، ۱۴(۳)، ۲۳۰-۲۱۳. doi: [10.22124/CR.2024.27777.1826](https://doi.org/10.22124/CR.2024.27777.1826)

مقدمه

گندم با نام علمی (*Triticum aestivum* L.) از خانواده پوآسه و از مهم‌ترین غلاتی است که در سطح جهان کشت می‌شود. گندم غذای اصلی حدود ۶۵ درصد از جمعیت جهان است و تقاضا برای افزایش تولید آن همواره بیش‌تر از سایر محصولات زراعی است (Shiferaw *et al.*, 2011). با توجه به افزایش مداوم تقاضای جهانی برای گندم و سایر غلات، استمرار در افزایش تولید به‌منظور تأمین نیازهای غذایی اهمیت فراوانی پیدا کرده است (Amini *et al.*, 2016). برای تأمین تقاضای رو به رشد گندم، اصلاح واریته‌های جدید گندم که توانایی تحمل تنش‌های زیستی و غیرزیستی اعم از آفات، بیماری‌ها، سرما، خشکی و شوری را دارند، با حفظ شیوه‌های مدیریت حفاظت کشاورزی از اهمیت خاصی برخوردار است. برخلاف فرآیند سنتی انتخاب بر حسب فنوتیپ که بسیار پرهزینه و زمان‌بر است، استفاده از روش‌های ژنتیکی و ژنومیکس جدید به‌عنوان مکمل روش‌های سنتی برای بهبود ویژگی‌های ژرم‌پلاسما در سطح مولکولی ضروری است (Han *et al.*, 2015).

شوری یکی از مهم‌ترین عامل‌های محدود کننده تولید تمامی محصولات کشاورزی در بسیاری از مناطق جهان به‌شمار می‌رود. در محیط شور، جذب عناصر غذایی در گیاهان کاهش می‌یابد. هم‌اکنون نیمی از اراضی قابل کشت ایران (۹/۵ میلیون هکتار) متأثر از شوری است که اثر عمده‌ای در کاهش سطح زیر کشت و عملکرد محصولات زراعی دارند (Nabiollahi *et al.*, 2017). افزایش و انباشت انواع نمک‌ها در لایه‌های مختلف خاک موجب شوری بخش گسترده‌ای از اراضی قابل کشت در سطح جهانی شده است. بر اساس گزارش‌های موجود، تقریباً ۳۳ درصد از اراضی آبی و ۲۰ درصد از کل اراضی قابل کشت در سراسر دنیا متأثر از فرآیندهای شور شدن مستمر خاک هستند (Al-Tawaha *et al.*, 2021). تنش شوری عمدتاً از دو طریق بر گیاهان تأثیر می‌گذارد. نخست، تنش اسمزی که ناشی از رسوب مقادیر زیاد نمک‌های محلول در خاک است و باعث کاهش عرضه آب خاک به گیاهان می‌شود؛ دوم، سمیت یونی که ناشی از تجمع زیاد نمک در گیاه است و تعدادی از فرآیندهای متابولیک، از جمله غیرفعال شدن آنزیم‌های خاص را مختل می‌کند (Safdar *et al.*, 2019).

سازگاری گیاهان به تنش‌های محیطی مستلزم تغییرات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی از جمله تجمع اسمولیت‌ها است که می‌توانند در زمان تنش اسمزی نقش سازگاری را ایفا کنند. یکی از پاسخ‌های عمومی و رایجی که گیاهان در ارتباط با تنش اسمزی از خود نشان می‌دهند، تجمع اسید آمینه پرولین است که به‌عنوان یک اسمولیت مهم و شناخته شده طی تنش در بسیاری از اندام‌های گیاهی تجمع پیدا می‌کند (Lehmann *et al.*, 2010). دار و همکاران (Dar *et al.*, 2016) افزایش پرولین در شرایط تنش را یکی از معیارهای ایجاد تحمل در گیاه عنوان کردند. در گیاهان دو مسیر جهت سنتز پرولین وجود دارد. اولین مسیر از طریق گلوتامات است که طی آن، آنزیم پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) اسید گلوتامیک را به گلوتامات-سمی-آلدئید (GSA) تبدیل می‌کند و سپس این ماده به‌صورت خودبه‌خودی به پرولین-۵-کربوکسیلات (P5C) تبدیل می‌شود و در مرحله بعد آنزیم پرولین-۵-کربوکسیل ردوکتاز (P5CR)، P5C را به پرولین تبدیل می‌کند (Verbruggen & Hermans, 2008). مسیر دوم سنتز پرولین از طریق ارننتین (Orn) است که توسط آنزیم ارننتین-آمینوترانسفراز (OAT) انجام می‌شود (Verbruggen & Hermans, 2008). طی سنتز پرولین، ژن *P5CS* به‌عنوان عامل محدود کننده سرعت بیوسنتز (کندترین آنزیم مسیر) بوده و نقش بسیار کلیدی در سنتز پرولین در گیاهان دارد (Yoshida *et al.*, 1997). از طرف دیگر، ژن *P5CR* عامل محدود کننده مسیر بیوسنتز پرولین نیست، اما برخی محققان معتقدند که بیان ژن *P5CR* نیز طی تنش القا می‌شود (Verbruggen & Hermans, 2008). با توجه به مطالب مطرح شده و اهمیت ژن‌های *P5CR* و *P5CS* طی تنش شوری این تحقیق به‌منظور بررسی بیان ژن‌های *P5CR* و *P5CS* در مسیر بیوسنتز پرولین و نیز ارزیابی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در دو رقم گندم نان (احسان و بهاران) در واکنش به تنش شوری طی مراحل اولیه رشد انجام شد.

مواد و روش‌ها

روش اجرای آزمایش

آزمایش به‌صورت کرت‌های خرد شده فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. بذر ارقام گندم مورد مطالعه با استفاده از اتانول ۱۰ درصد

۱۱ میکرولیتر از محتویات مذکور بود، مقدار یک میکرولیتر آغازگر oligo dt افزوده شد و سپس با افزودن ۰/۵ میکرولیتر ddH₂O حجم نهایی محلول به ۱۲/۵ میکرولیتر رسید. نمونه‌های فوق ابتدا به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس به هر واکنش، چهار میکرولیتر بافر 5x (مخصوص ساخت cDNA)، ۰/۵ میکرولیتر مهار کننده RNase، دو میکرولیتر مخلوط dNTPs با غلظت ۱۰ میکرومولار و در انتها مقدار یک میکرولیتر آنزیم رونوشت‌برداری معکوس افزوده شد تا حجم محلول به ۲۰ میکرولیتر رسید. واکنش RT-PCR ابتدا به مدت پنج دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس انجام شد. برای تأیید ساخت cDNA، از روش RT-PCR و الکتروفورز ژل آگارز دو درصد استفاده شد.

بررسی بیان ژن‌ها

برای بررسی الگوی تظاهر ژن‌های مورد نظر (*P5CR*) و (*P5CS*) از دستگاه iQ5 شرکت BioRad بر اساس کیت سایبریوپارس با بهره‌گیری از تکنولوژی رنگ سایبرگرین I استفاده شد. به منظور نرمال‌سازی داده‌ها از ژن خانه‌دار *ACTIN* که دارای بیان یکسانی در تمام تیمارها است، استفاده شد. آغازگرهای مورد نیاز بر اساس اطلاعات موجود در سایت NCBI و با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ با در نظر گرفتن ویژگی‌های مطلوب برای استفاده در روش qRT-PCR طراحی شدند. با توجه به طول توالی محصولات که بین ۱۳۲ تا ۱۸۷ باز متغیر بود، دمای ذوب آغازگرها بر اساس درصد GC و طول باندها در محدوده ۵۱/۴ تا ۶۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. مشخصات دقیق آغازگرها در جدول ۱ ارائه شده است. پس از اتمام واکنش، داده‌ها به نرم‌افزار REST منتقل و تجزیه و تحلیل نتایج انجام شد (Moloudi *et al.*, 2013).

ضد عفونی و پس از شست و شو با آب مقطر در ۳۲ گلدان که با ترکیب کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۲:۱ پر شده بودند، کشت شدند. در هر گلدان تعداد ۱۵ عدد بذر از هر یک از رقم‌های مورد مطالعه کشت شد. تیمار شوری پس از جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌ها توسط آب آبیاری اعمال شد. در زمان نیاز آبی گیاه، گلدان‌های شاهد با آب مقطر (صفر دسی‌زیمنس بر متر) و گلدان‌های تیمار شوری با آب حاوی NaCl (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) آبیاری شدند. پس از رسیدن گیاهان به مرحله رشد پنجه‌زنی و ساقه‌دهی، از هر گلدان پنج بوته تصادفی انتخاب و از برگ‌های آن به‌عنوان نمونه برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی و ارزیابی بیان ژن‌ها استفاده شد.

صفات اندازه‌گیری شده

میزان سدیم و پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم‌فتمتر (Jenway-PFP7) اندازه‌گیری شد. میزان پرولین به روش بیتس و همکاران (Bates *et al.*, 1973)، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به روش ابی (Aebi, 1984)، میزان کل آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش بییر و فریدوویچ (Beyer & Fridovich 1987)، میزان کلروفیل به روش پورا و همکاران (Porra *et al.*, 1989) و میزان اکسیداسیون سلولی به روش هج و همکاران (Hagege *et al.*, 1990) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. RNA کل نیز با استفاده از بافر استخراج پی‌بایوزول شرکت بیوفلکس (توکیو، ژاپن) استخراج و کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد.

ساخت cDNA

به منظور ساخت cDNA از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (شرکت Thermo Scientific، ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. هر نمونه RNA ابتدا تحت تیمار DNaseI قرار گرفت و سپس به تیوب جدید منتقل شد. به هر یک از تیوب‌ها که حاوی

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش

Table 1. Sequence of primers used in this experiment

Gene name	Primer sequence
<i>P5CS</i>	F: 5' TCGGTGCTGAGGTTGGCATAAG 3' R: 5' TTGTCACCATTCACCACTTGCCC 3'
<i>P5CR</i>	F: 5' CGGGTAAACATCCAGGGCAGC 3' R: 5' TCGGCATCTTGTGTGGCAGC 3'
<i>ACTIN</i>	F: 5' GTTCCAATCTATGAGGGATACACGC 3' R: 5' GAACCTCCACTGAGAACAACATTACC 3'

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، محتوای پرولین، مقدار کلروفیل‌های a و b، میزان شاخص TBARM و مقدار سدیم و پتاسیم اندازه‌گیری شده در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که اثر مرحله رشد، به‌جز کلروفیل a و محتوای آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، بر سایر صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. همچنین، اثرات تنش شوری و رقم بر بیش‌تر صفات بیوشیمیایی مورد

مطالعه (به‌جز اثر رقم بر میزان سدیم) معنی‌دار بود. بررسی برهمکنش سه جانبه شوری × رقم × مرحله رشد نیز بیانگر معنی‌دار شدن اثر آن بر کلیه صفات مورد مطالعه، به‌جز میزان پتاسیم، بود. معنی‌دار شدن برهمکنش بین عامل‌ها نشان داد که دو رقم گندم مطالعه شده، واکنش‌های متفاوتی در مراحل رشد پنجه‌دهی و ساقه‌دهی در مقابل دو سطح تنش شوری اعمال شده داشتند. پایین بودن ضریب تغییرات خطای آزمایش نیز نشان دهنده دقت مناسب آزمایش می‌باشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مطالعه شده در دو رقم گندم طی دو از مرحله رشد تحت شرایط بدون تنش و تنش شوری

Table 2. Analysis of variance of the studied traits in two wheat cultivars during two growth stages under non-stress and salinity stress conditions

Source of variation	df	Mean square [†]							
		Chl.a	Chl.b	SOD	CAT	Proline	K	Na	TBARM
Growth stage (G)	1	41.01 ^{ns}	53.80 [*]	2.30 ^{ns}	0.84 ^{ns}	11.60 [*]	176.00 ^{**}	41.40 ^{**}	221.00 ^{**}
Error 1	6	7.92	5.56	0.10	0.09	1.46	12.16	0.10	25.63
Salinity (S)	1	264.01 ^{**}	254.66 ^{**}	14.08 ^{**}	5.34 ^{**}	6.51 ^{**}	155.45 ^{**}	26.79 ^{**}	634.00 ^{**}
Variety (V)	1	14.77 [*]	16.37 ^{**}	1.02 ^{**}	0.74 ^{**}	14.90 ^{**}	225.77 ^{**}	0.007 ^{ns}	320.00 ^{**}
S × V	1	12.47 [*]	14.71 ^{**}	0.82 ^{**}	0.67 ^{**}	0.63 ^{ns}	52.03 ^{ns}	1.13 ^{**}	120.00 [*]
S × G	1	20.07 ^{**}	40.01 ^{**}	5.20 ^{**}	10.20 ^{**}	8.40 ^{**}	121.10 [*]	4.20 ^{**}	51.01 ^{ns}
V × G	1	162.60 ^{**}	28.39 ^{**}	3.30 ^{**}	0.86 ^{**}	17.60 ^{**}	87.04 [*]	19.10 ^{**}	170.00 ^{**}
S × V × G	1	12.31 [*]	21.80 ^{**}	140.30 ^{**}	17.60 ^{**}	64.30 ^{**}	36.50 ^{ns}	10.60 ^{**}	291.30 ^{**}
Error 2	18	2.04	1.26	0.007	0.01	0.19	14.69	0.08	20.46
CV (%)	-	4.58	3.60	3.49	4.92	16.32	4.33	6.41	7.90

[†] Chl., chlorophyll; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; K, potassium; Na, sodium; TBARM, cellular oxidation. ^{ns}, * and ** Not-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

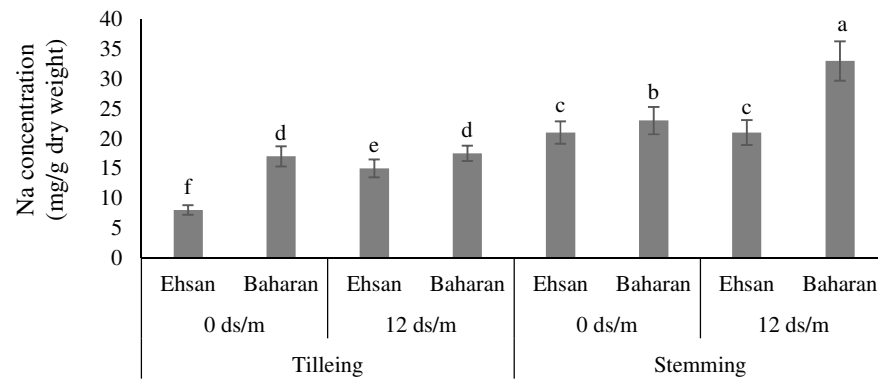
تفاوت بین دو رقم بر میزان سدیم معنی‌دار نبود. این نتیجه به‌وضوح نشان می‌دهد که غلظت سدیم در این دو رقم به مرحله رشد گیاه وابسته است. بر اساس جدول مقایسه میانگین، مرحله رشد تأثیر بسیار معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر غلظت سدیم داشت. به‌طورکلی، نتایج بررسی غلظت سدیم تحت تنش شوری نشان داد که با اعمال تنش، میزان سدیم در هر دو مرحله رشد پنجه‌دهی و ساقه‌دهی در مقایسه با تیمار شاهد (هدایت الکتریکی صفر دسی‌زیمنس) افزایش یافت. رقم بهاران در مرحله ساقه‌دهی دارای ۳۳ میلی‌گرم سدیم بر گرم وزن خشک و در مرحله پنجه‌دهی دارای ۱۷/۵ میلی‌گرم سدیم بر گرم وزن خشک بود. به‌طورکلی، در مرحله ساقه‌دهی، میزان سدیم در هر دو ژنوتیپ بیش‌تر از مرحله پنجه‌دهی بود و این تفاوت با تمام تیمارهای مرحله پنجه‌دهی از نظر آماری معنی‌دار بود.

تغییرات میزان پتاسیم در دو رقم (شکل ۲) نشان داد که در مرحله پنجه‌دهی، تنش شوری موجب افزایش قابل

تغییرات میزان سدیم دو رقم گندم نان مطالعه شده در دو مرحله رشد پنجه‌دهی و ساقه‌دهی تحت شرایط بدون تنش (آب مقطر صفر دسی‌زیمنس) و تنش شوری (آب شور حاوی NaCl با هدایت الکتریکی ۱۲ دسی‌زیمنس) در شکل ۱ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تأثیر تنش شوری بر دو رقم در دو مرحله از رشد کاملاً متفاوت بود، به‌طوری که شوری موجب افزایش معنی‌دار میزان سدیم در رقم احسان در مرحله پنجه‌دهی شد، اما در مرحله ساقه‌دهی تأثیر معنی‌داری بر آن نداشت. در مقابل در رقم بهاران، تأثیر تنش شوری در مرحله پنجه‌دهی معنی‌دار نبود، اما در مرحله ساقه‌دهی، افزایش قابل توجه و معنی‌داری در میزان سدیم مشاهده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که تنش شوری و مرحله رشد عامل‌های مؤثری در افزایش غلظت سدیم بودند و بر این اساس، برهم‌کنش بین تمامی عامل‌ها (شوری × مرحله رشد، شوری × رقم، مرحله رشد × رقم و شوری × مرحله رشد × رقم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در مقابل،

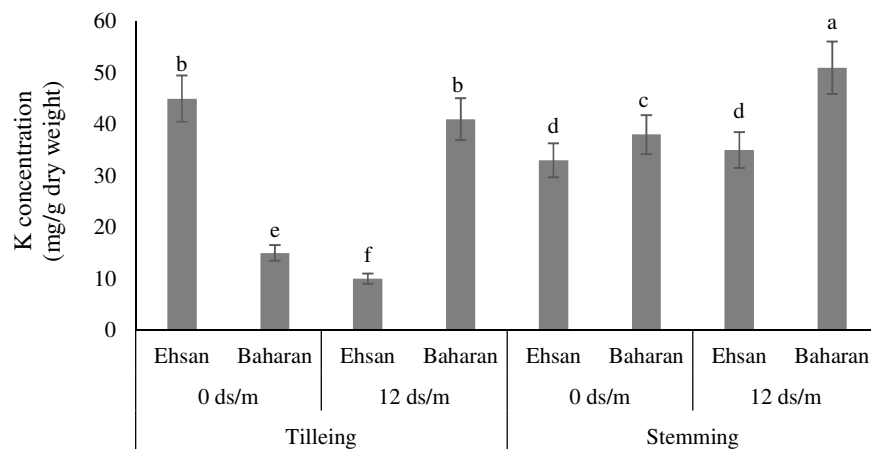
بود. از سوی دیگر، با افزایش شوری، میزان پتاسیم و نسبت سدیم به پتاسیم کاهش یافت، اما در رقم بهاران این روند معکوس بوده و افزایش مشاهده شد. افزایش غلظت سدیم با کاهش سایر کاتیون‌ها در گیاه همراه است و این عدم تعادل کاتیونی منجر به کاهش میزان کلسیم، منیزیم و پتاسیم در گیاه می‌شود (Jing *et al.*, 2007). تجمع میزان سدیم و کلر در گیاه موجب افزایش فشار اسمزی می‌شود و گیاه می‌تواند با کاهش پتانسیل اسمزی محیط ریشه با آن مقابله کند. پتاسیم یکی از عناصر ضروری برای رشد گیاه است که با افزایش شوری و غلظت یون سدیم در محیط، جذب آن در گیاه مختل شده و تحت این شرایط گیاه با کمبود این عنصر ضروری مواجه می‌شود (Jing *et al.*, 2007).

توجه و معنی‌دار غلظت پتاسیم در رقم بهاران شد، در حالی‌که در رقم احسان، غلظت پتاسیم در شرایط تنش شوری کاهش معنی‌داری نشان داد. در مرحله ساقه‌دهی، غلظت پتاسیم در رقم بهاران همانند مرحله پنجه‌دهی در اثر شوری افزایش یافت، در حالی‌که رقم احسان تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج مقایسه میانگین‌ها بیانگر آن بود که تغییر غلظت پتاسیم در تمامی برهم‌کنش‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین، نسبت سدیم به پتاسیم تحت شرایط تنش اختلاف معنی‌داری نشان داد، به این معنا که واکنش ارقام به تنش شوری بر غلظت این عناصر در گیاه یکسان نبوده است. بر اساس نتایج این آزمایش، تنش شوری موجب افزایش معنی‌دار غلظت سدیم شد که این تغییر وابسته به مرحله رشد گیاه



شکل ۱- تغییرات میزان سدیم دو رقم گندم نان در مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی تحت شرایط تنش شوری

Figure 1. The changes of Na content of two bread wheat varieties at tillering and stemming stages under salinity stress conditions



شکل ۲- تغییرات میزان پتاسیم دو رقم گندم نان در مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی تحت شرایط تنش شوری

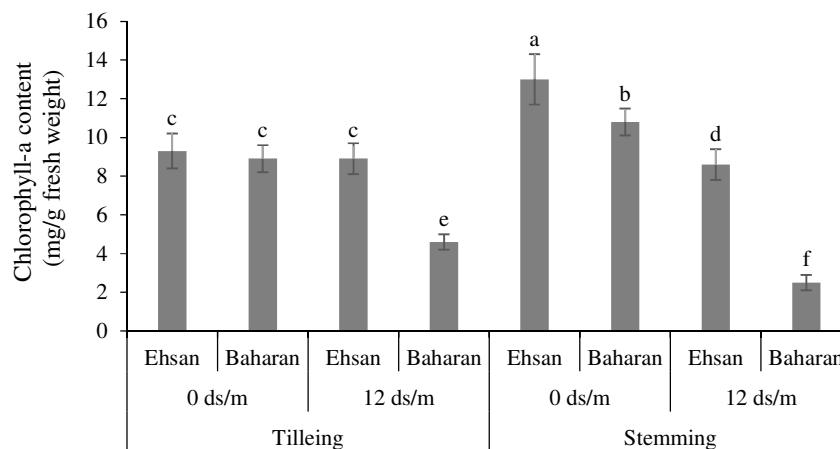
Figure 2. The changes of K content of two bread wheat varieties at the tillering and stemming stages under salinity stress conditions

کلروفیل‌های a و b

نتایج نشان داد که در مرحله رشد پنجه‌دهی، محتوای کلروفیل a در رقم بهاران به‌طور معنی‌داری تحت شرایط تنش شوری در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت، در حالی‌که در رقم احسان تغییر معنی‌داری در محتوای کلروفیل a در اثر تنش شوری مشاهده نشد (شکل ۳). در مرحله ساقه‌دهی، محتوای کلروفیل a در هر دو رقم در اثر تنش شوری کاهش یافت، اما این کاهش مشابه مرحله پنجه‌دهی در رقم بهاران چشم‌گیرتر بود. بررسی محتوای کلروفیل b (شکل ۴) نیز نشان داد که تنش شوری موجب کاهش معنی‌دار کلروفیل b در هر دو رقم در هر دو مرحله از رشد شد و این کاهش در مرحله ساقه‌دهی بیش‌تر بود، به‌طوری‌که کاهش شدیدی در میزان کلروفیل b تحت تنش شوری در هر دو رقم در مرحله ساقه‌دهی شد.

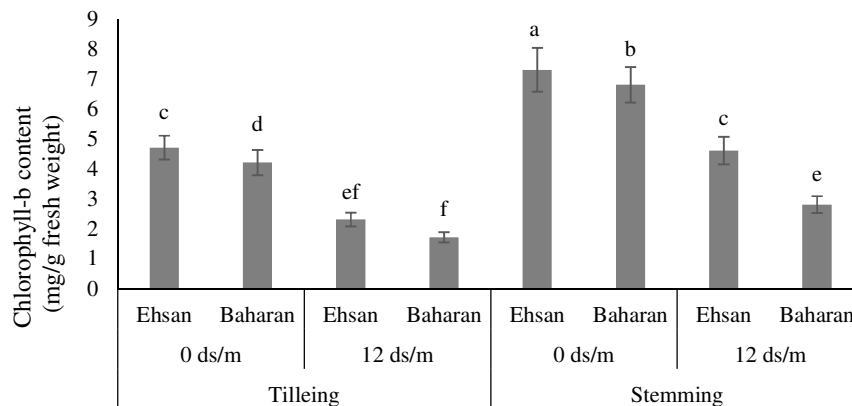
کاهش کلروفیل‌های a و b در مرحله ساقه‌دهی در رقم بهاران (به‌ترتیب حدوداً ۸ و ۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در غلظت ۱۲ دسی‌زیمنس بیش‌تر از رقم احسان بود و تفاوت بین دو ژنوتیپ از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. طبق یافته‌های پیشین هنگام رشد گیاه در شرایط شوری، فعالیت فتوسنتزی در آن کاهش یافته و در نتیجه میزان رشد، سطح برگ و محتوای کلروفیل آن کاهش می‌یابد (Viera Santos, 2004). همچنین با توجه

به آزمایش حاضر می‌توان گفت که علی‌رغم این‌که گیاهان در میزان تحمل به شوری با هم تفاوت دارند، اما در نهایت شوری موجب کاهش رشد در همه آن‌ها خواهد شد. این کاهش به‌طور گسترده با افت ظرفیت فتوسنتزی در ارتباط است که خود می‌تواند یک دلیل مهم در کاهش محتوای هر دو نوع کلروفیل a و b تحت شرایط تنش باشد (Anjum *et al.*, 2003; Farooq *et al.*, 2009). به‌طور خلاصه با توجه به نتایج به‌دست آمده از این آزمایش می‌توان بیان کرد که با اعمال تنش شوری، روند کاهشی در میزان کلروفیل‌های a و b در هر دو رقم مشاهده شد، اگرچه این کاهش در رقم بهاران بیش‌تر بود. طی تنش شوری مقدار اتیلن افزایش می‌یابد و در نتیجه به‌دلیل فعالیت آنزیم کلروفیلاز، کلروفیل گیاه کاهش می‌یابد (Prasad & Power, 1997). بسیاری از محققین بر این عقیده‌اند که بین تحمل به شوری و محتوای کلروفیل رابطه معنی‌داری وجود دارد. قلی‌زاده و همکاران (Gholizadeh *et al.*, 2016) در بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسما گندم نان ایرانی از نظر تحمل به شوری، صفت محتوای کلروفیل برگ را به‌دلیل این‌که روش اندازه‌گیری آسان و کم‌هزینه‌ای دارد و اندازه‌گیری آن نسبت به بسیاری از صفات دیگر غیرتخریبی است، به‌عنوان یک شاخص مناسب برای انتخاب ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا در شرایط تنش شوری در مزرعه پیشنهاد دادند.



شکل ۳ - تغییرات میزان کلروفیل a دو رقم گندم نان در مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی تحت شرایط تنش شوری

Figure 3. The changes of chlorophyll a content of two bread wheat varieties at the tillering and stemming stages under salinity stress conditions

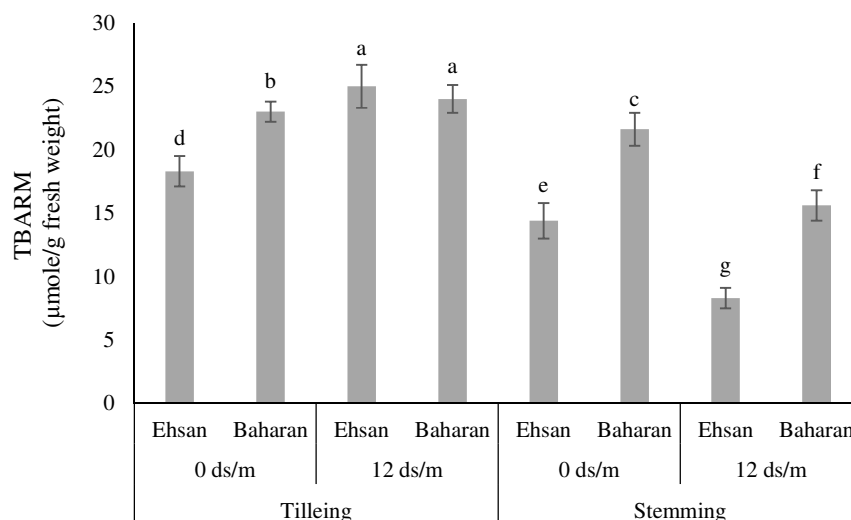


شکل ۴- تغییرات میزان کلروفیل b دو رقم گندم نان در مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی تحت شرایط تنش شوری
 Figure 4. The changes of chlorophyll b content of two bread wheat varieties at the tillering and stemming stages under salinity stress conditions

اکسیداسیون سلولی

دی‌آلدئید ترکیبی آلدئیدی می‌باشد که بسیار فعال و واکنش‌پذیر است، این ترکیب در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع تولید می‌شود. بنابراین برای بردن به میزان پراکسیداسیون چربی‌ها، می‌توان میزان مالون دی‌آلدئید موجود در نمونه‌ها را اندازه‌گیری کرد. با توجه به این‌که تنش شوری منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود، میزان تولید و تجمع رادیکال‌های آزاد فعال افزایش می‌یابد. این امر باعث اکسیداسیون پروتئین‌ها و چربی‌ها شده و در نهایت منجر به تخریب ساختار غشای سلولی می‌شود (Molassiotis *et al.*, 2006). با توجه به نقش مهم غشا در تنظیم متابولیسم سلول و عملکرد اندامک‌ها، بررسی میزان آسیب به غشاهای زیستی در اثر تنش‌های محیطی به‌طور ویژه مورد توجه پژوهش‌گران قرار گرفته است. بر همین اساس، امروزه از شاخص پایداری غشا و میزان پراکسیداسیون لیپیدی به‌عنوان معیار ارزیابی میزان آسیب وارد شده به غشاهای زیستی استفاده می‌شود. میزان پراکسیداسیون لیپیدی بیانگر شدت آسیب وارد شده به غشای زیستی بر اثر تنش‌های محیطی است (Esfandiari *et al.*, 2011). پایین بودن میزان مالون دی‌آلدئید، نشان دهنده کم بودن آسیب وارده به غشای سلولی بر اثر تنش است و مقاومت یا تحمل بیش‌تر گیاه در مقابله با تنش وارد شده را نشان می‌دهد (Hasanuzzaman *et al.*, 2014).

نتایج مقایسه میانگین تأثیر تنش شوری بر میزان اکسیداسیون سلولی دو رقم گندم نان مورد مطالعه در دو مرحله رشد پنجه‌زنی و ساقه‌دهی در شکل ۵ ارائه شده است. نتایج نشان داد که در مرحله پنجه‌زنی، تنش شوری با هدایت الکتریکی ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، محتوای TBARM را در هر دو رقم نسبت به تیمار شاهد بدون تنش افزایش داد، در حالی‌که در مرحله ساقه‌دهی، تنش شوری موجب کاهش معنی‌دار TBARM در هر دو رقم در مقایسه با تیمار شاهد بدون تنش شد. علاوه بر این، میزان اکسیداسیون سلولی در مجموع در رقم بهاران بیش‌تر از رقم احسان بود، به‌طوری‌که محتوای TBARM در رقم بهاران در شرایط بدون تنش در هر دو مرحله از رشد و در شرایط تنش شوری در مرحله ساقه‌دهی بیش‌تر از رقم احسان و تفاوت آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود و فقط در شرایط تنش شوری در مرحله پنجه‌زنی تفاوت معنی‌داری بین دو رقم مشاهده نشد. شوری باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول‌ها و اختلال در عملکرد فیزیولوژیکی آن‌ها می‌شود. این تنش ثانویه ناشی از افزایش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که درون سلول‌ها تولید و آزاد می‌شود. مالون دی‌آلدئید به‌عنوان یکی از شاخص‌های مناسب برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون غشا شناخته می‌شود (Sofa *et al.*, 2004). مالون



شکل ۵- تغییرات میزان اکسیداسیون سلولی دو رقم گندم نان در مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی تحت شرایط تنش شوری
 Figure 5. The changes of cellular oxidation levels of two bread wheat varieties at the tillering and stemming stages under salinity stress conditions

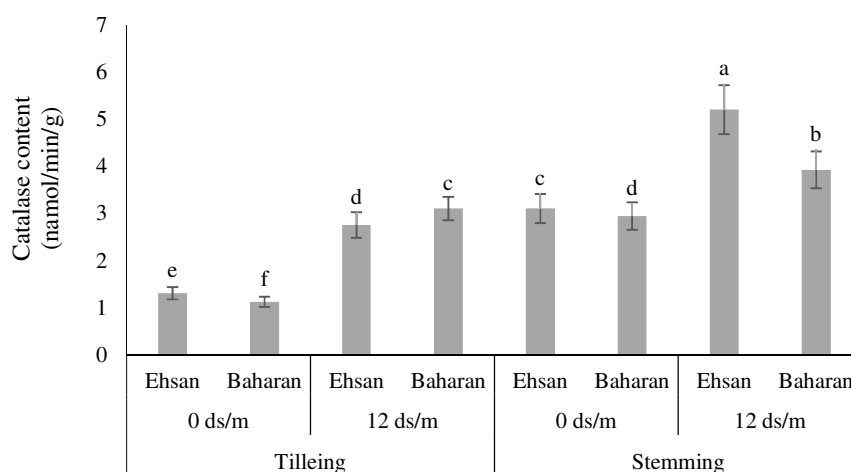
مانند آب و اکسیژن تبدیل می‌کند (Sharma *et al.*, 2012). فعالیت بالاتری در ژنوتیپ جهش‌یافته کاتالازین در شرایط استفاده از ۱۰۰ میلی‌مولار کلسیم دی سدیم (CaNa_2) مشاهده شد که نشان‌دهنده توانایی بهتر این ژنوتیپ در مهار ROS است. بیان بیش‌تر کاتالاز در شرایط تنش شوری در گونه‌های مختلف گیاهی مانند *Cucumis sativus* (Zhou *et al.*, 2018) گزارش شده است.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

تغییرات مقدار سوپراکسید دیسموتاز در دو رقم گندم مورد مطالعه در دو مرحله رشدی تحت شرایط بدون تنش و تنش شوری در شکل ۷ ارائه شده است. نتایج نشان داد که در هر دو رقم احسان و بهاران و در هر دو مرحله رشد پنجه‌زنی و ساقه‌دهی، فعالیت آنزیم SOD تحت شرایط تنش در مقایسه با تیمار شاهد بدون تنش، افزایش یافت. می‌توان گفت که میزان SOD در دو سطح تنش تقریباً برابر بوده و به یک اندازه تغییر کرده است. کم‌ترین مقدار SOD در رقم احسان در مرحله رشد جوانه‌زنی تحت شرایط بدون تنش (تیمار شاهد صفر دسی‌زیمنس بر متر) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با رقم بهاران در شرایط مشابه نداشت. در مقابل، بیش‌ترین مقدار SOD نیز متعلق به رقم احسان تحت تنش شوری ۱۲ دسی‌زیمنس برمتر در مرحله رشد ساقه‌دهی بود.

فعالیت آنزیم کاتالاز

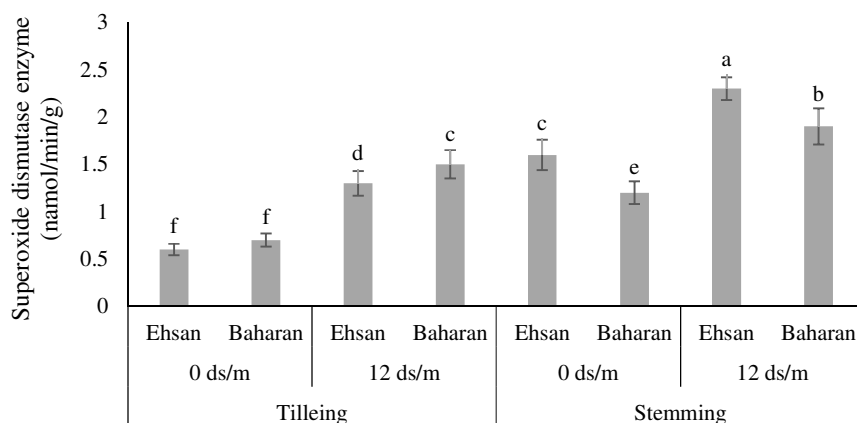
نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در دو مرحله مختلف پنجه‌زنی و ساقه‌دهی با افزایش تنش شوری افزایش یافت (شکل ۶). این افزایش، به‌ویژه در رقم احسان و طی مرحله ساقه‌دهی، بسیار چشم‌گیر بود. یکی از دلایل بروز این تغییرات می‌تواند این باشد که با افزایش شوری خاک در مراحل مختلف رشد، فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه افزایش می‌یابد. آنزیم کاتالاز دو مولکول H_2O_2 (هیدروژن پراکسید) را به آب و O_2 تبدیل می‌کند و تمام اشکال یوکاریوتی شناخته‌شده آن مبتنی بر هم (heme) هستند (Zamocky *et al.*, 2008). این واکنش در دو مرحله اتفاق می‌افتد: نخست یک مولکول پراکسید هیدروژن، مولکول hem را به انواع اکسی‌فریل اکسید می‌کند و یک رادیکال پورفیرین تولید می‌شود. سپس دومین مولکول پراکسید هیدروژن به‌عنوان احیاکننده عمل می‌کند و یک مولکول اکسیژن و آب تولید می‌شود (Niazkhani, *et al.*, 2018). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر تنش شوری در گونه‌های گیاهی مختلف مانند گندم نان (Askari Kolestani *et al.*, 2016)، جو (Kiani *et al.*, 2017) و برنج (Abdelaziz *et al.*, 2018) گزارش شده است. آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تولید شده توسط SOD را تجزیه می‌کند. این آنزیم در گیاهان و موجودات هوازی دیگر یافت می‌شود و در واقع کاتالاز پراکسید هیدروژن را به محصولات بی‌ضرری



شکل ۶- تغییرات میزان آنزیم کاتالاز دو رقم گندم نان در مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی تحت شرایط تنش شوری
Figure 6. The changes of catalase enzyme content of two bread wheat varieties at the tillering and stemming stages under salinity stress conditions

پایداری گیاهان در مقابل تنش‌ها می‌شود، معرفی کرده‌اند (Gill & Tuteja, 2010). سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیم از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که رادیکال‌های اکسیژن را خنثی و به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تبدیل می‌کند (Qiao *et al.*, 2020). نتایج پژوهش‌های انجام شده در گیاهان مختلف از جمله آراییدوپسیس (Shafi *et al.*, 2015) و گندم (Wang *et al.*, 2016) نشان می‌دهند که افزایش بیان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز باعث افزایش تحمل به تنش شوری می‌شود.

نیل و همکاران (Neill *et al.*, 2002) اعلام کردند که علاوه بر تغییرات یونی و تنظیم‌کننده‌های اسمزی، تغییر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز می‌تواند به‌عنوان یکی از موارد تأثیرگذار تنش شوری بر گیاهان در نظر گرفته شود و بسته به میزان حساسیت گونه گیاهی، مرحله رشد، شدت و نیز مدت تنش اعمال شده، غلظت و فعالیت این آنزیم‌ها تغییر خواهد کرد. یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) است. پژوهش‌های زیادی SOD را به‌عنوان قوی‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدانی که توانایی بالایی جهت حفاظت گیاهان در مقابل حمله ROSها دارد و سبب

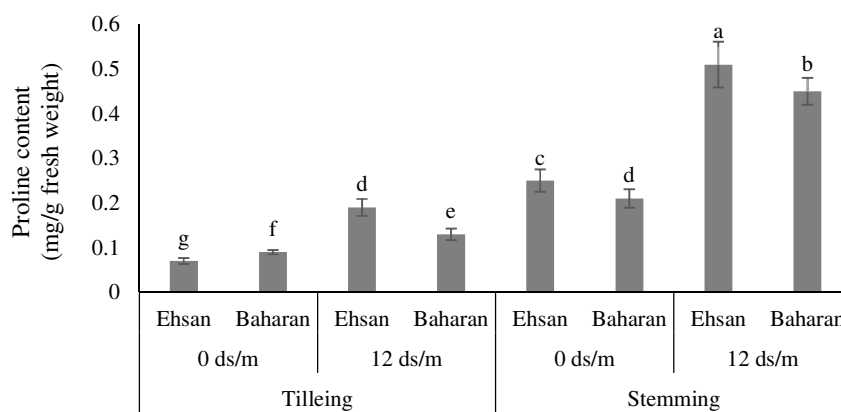


شکل ۷- تغییرات میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) دو رقم گندم نان در مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی تحت شرایط تنش شوری
Figure 7. The changes of superoxide dismutase (SOD) enzyme content of two bread wheat varieties at the tillering and stemming stages under salinity stress conditions

میزان پرولین

نتایج نشان داد که میزان پرولین در هر دو رقم گندم در مرحله رشد پنجه‌دهی در تیمار شاهد (غلظت صفر دسی‌زیمنس بر متر) بسیار پایین بود، اما در تنش شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر شوری افزایش معنی‌داری در میزان پرولین در هر دو رقم مشاهده شد (شکل ۸). در مرحله رشد ساقه‌دهی، میزان پرولین به‌طور کلی در هر دو رقم و در هر دو شرایط تنش و بدون تنش بیش‌تر از مرحله پنجه‌دهی بود. علاوه بر این در مرحله ساقه‌دهی، افزایش چشم‌گیری در غلظت پرولین در هر دو رقم تحت شرایط شوری در مقایسه با تیمار بدون تنش مشاهده شد. می‌توان چنین برداشت کرد که میزان فعالیت پرولین در شرایط تنش شوری افزایش می‌یابد که این امر خود وابسته به رقم و مرحله رشد است، یعنی در برخی ارقام یا برخی مراحل رشد میزان آن می‌تواند بسیار بالاتر باشد. سازوکارهای متعددی برای حفظ تورژسانس در گیاهان تحت تنش شوری وجود دارد که یکی از آن‌ها انباشت پرولین است. به گزارش ارسکین و همکاران (Erskine *et al.*, 1996) پرولین نقش دوگانه‌ای دارد، پرولین به‌عنوان

یک آنتی‌اکسیدانت، سلول‌ها را از اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کند (Kibria *et al.*, 2017) و از طرف دیگر به‌عنوان یک اسمولیت مانع تنش اسمزی در شرایط تنش شوری می‌شود (Hasegawa *et al.*, 2000). پرولین یک اسمولیت آنتی‌اکسیدان ارزشمند است که باعث افزایش قابلیت مهار گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز می‌شود و ساختار غشای سلولی و پروتئین را حفظ می‌کند (Yu *et al.*, 2020). افزایش بیوسنتز اسمولیت‌هایی مانند پرولین و قندها در تنش شوری، سبب محافظت سلول‌ها در برابر تنش اسمزی می‌شود (Nounjan *et al.*, 2012). این اسمولیت‌ها در متعادل کردن غلظت نمک خارج سلولی و خنثی کردن یون‌های سدیم و کلر در واکوئول‌ها نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند (Turkan & Demiral, 2009). فورلانی و همکاران (Forlani *et al.*, 2019) با بررسی هفده رقم برنج ایتالیایی در مرحله گیاهچه‌ای نشان دادند که بین میزان پرولین و تحمل به تنش شوری همبستگی معنی‌داری وجود داشت.



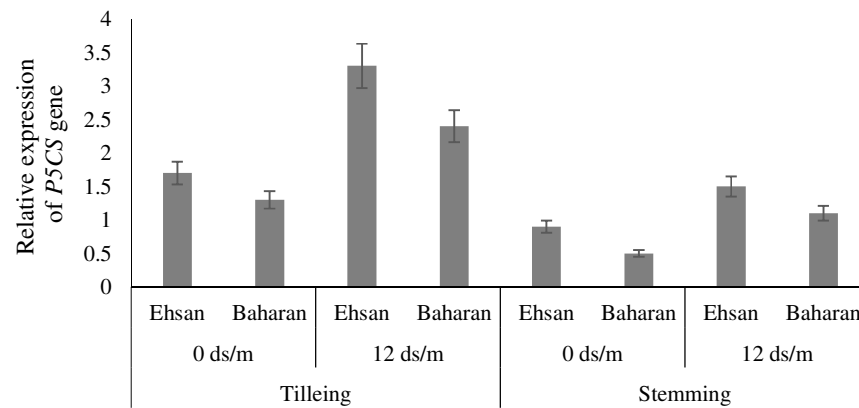
شکل ۸- تغییرات میزان پرولین دو رقم گندم نان در مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی تحت شرایط تنش شوری

Figure 8. The changes of proline content of two bread wheat varieties at the tillering and stemming stages under salinity stress conditions

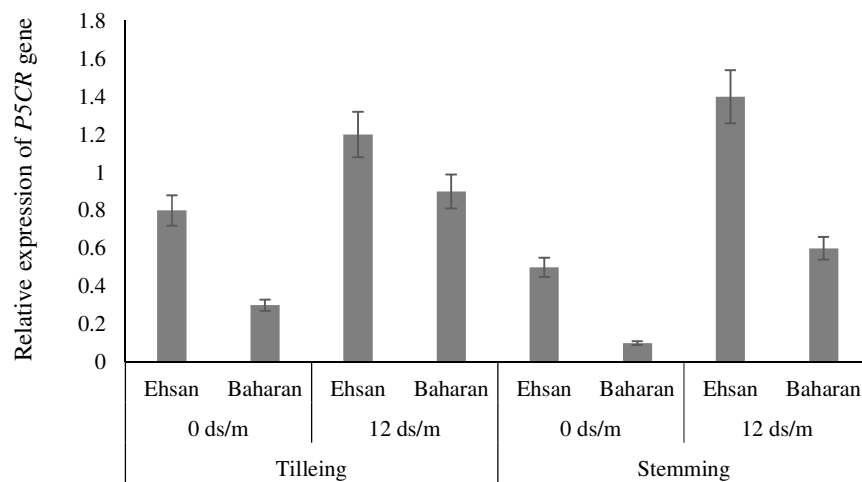
میزان بیان ژن‌های *P5CR* و *P5CS*

بیش‌تر بود. در مرحله ساقه‌دهی نیز بیان این ژن در شرایط تنش شوری در هر دو رقم افزایش یافت (شکل ۹). ژن پرولین-۵-کربوکسیلاز ردوکتاز (*P5CR*) دومین ژن دخیل در مسیر بیوسنتز پرولین است. همان‌طور که در شکل ۱۰ نشان داده شده است، میزان بیان ژن *P5CR* نیز تحت شرایط تنش شوری در هر دو رقم و در هر دو مرحله رشدی، افزایش یافت.

ژن پرولین-۵-کربوکسیلاز سنتتاز (*P5CS*) در نخستین مرحله از مسیر بیوسنتز پرولین فعالیت می‌کند. نتایج این آزمایش نشان داد که در مرحله رشد پنجه‌دهی، تحت شرایط تنش شوری، بیان ژن *P5CS* افزایش یافت، به‌طوری‌که میزان آن در رقم احسان به‌طور قابل‌توجهی



شکل ۹- بیان نسبی ژن *P5CS* در دو رقم گندم نان طی مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی تحت شرایط تنش شوری
Figure 9. Relative expression of *P5CS* gene in two bread wheat varieties during tillering and stemming stages under salinity stress conditions



شکل ۱۰- بیان نسبی ژن *P5CR* در دو رقم گندم نان طی مراحل پنجه‌زنی و ساقه‌دهی تحت شرایط تنش شوری
Figure 10. Relative expression of the *P5CR* gene in two bread wheat varieties during tillering and stemming stages under salinity stress conditions

P5CR در تجمع پرولین تحت شرایط دهیدراتاسیون در آرابیدوپسیس ایفا می‌کند (Funck *et al.*, 2020). نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی ناشی از تنش شوری و خشکی توسط محققین دیگر در گیاهان مختلف مانند یونجه (Dar *et al.*, 2016) و آرابیدوپسیس (Feng *et al.*, 2016) نیز گزارش شده است. نانجو و همکاران (Nanjo *et al.*, 1990) با استفاده از تراریختی در گیاه آرابیدوپسیس با آنتی‌سنس cDNA ژن *P5CS* نشان دادند که این ژن نقش کلیدی در بیوسنتز پرولین دارد، زیرا در این روش با ممانعت از تولید آرزیم *P5CS* مقدار پرولین در این گیاهان در سطح معنی‌داری کاهش یافت.

نتایج نشان داد که میزان بیان هر دو ژن دخیل در مسیر بیوسنتز پرولین در رقم احسان بیش‌تر بود، به‌طوری‌که میزان بیان ژن *P5CS* در مرحله رشد پنجه‌دهی و بیان ژن *P5CR* در مرحله رشد ساقه‌دهی به بیش‌ترین میزان خود رسید. در پژوهش دیگری تحت شرایط دهیدراتاسیون، بیان دو ژن *P5CS* و *P5CR* در آرابیدوپسیس بررسی شد (Funck *et al.*, 2020). با بررسی mRNA ژن *P5CR* پس از اعمال تنش افزایش قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد و سطح بیان ژن *P5CR* در مقایسه با ژن *P5CS* خیلی پایین بود. این محققین پیشنهاد دادند که ژن *P5CS* نقش اساسی‌تری نسبت به

می‌دهد. میزان بیان ژن *P5CS* در مرحله پنجه‌زنی و ژن *P5CR* در مرحله ساقه‌دهی افزایش یافت و رقم احسان، میزان بیان بیش‌تری نسبت به بهاران تحت تنش شوری داشت. گیاهان غالباً در معرض شرایط تنش هستند و بنابراین از طریق فرآیندهای فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و سلولی و مولکولی به این تنش‌ها پاسخ می‌دهند و خود را با شرایط محیطی منطبق و یا نسبت به آن متحمل می‌سازند. به محض تشخیص تغییرات درون سلولی در گیاه، مسیرهای پیام‌رسانی مختلفی به‌منظور تبدیل تنش فیزیکی به یک پاسخ بیوشیمیایی مناسب شروع شده و هر یک از آن‌ها سبب بیان دسته خاصی از ژن‌های پاسخ دهنده به تنش می‌شوند. شناسایی این‌گونه ژن‌ها و تعیین الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به انواع تنش‌ها موجب خواهد شد تا درک بهتری از عملکرد آن‌ها در سازگار یا متحمل کردن گیاهان به انواع تنش‌ها به‌دست آید و به‌دنبال آن راه‌کارهای مؤثرتری در به‌نژادی گیاهان جهت بهبود تحمل به تنش‌ها ایجاد شود.

تضاد منافع

نویسندگان تایید می‌کنند که این تحقیق در غیاب هرگونه روابط تجاری یا مالی می‌تواند به عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

رعایت اخلاق در نشر

نویسندگان اعلام می‌کنند که در نگارش این مقاله به‌طور کامل از اخلاق نشر از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و انتشار دوگانه، پیروی کرده‌اند. همچنین این مقاله حاصل یک کار تحقیقاتی اصیل بوده و تاکنون به‌طور کامل به هیچ زبانی و در هیچ نشریه یا همایشی چاپ و منتشر نشده است و هیچ اقدامی نیز برای انتشار آن در هیچ نشریه یا همایشی صورت نگرفته و نخواهد گرفت.

اجازه انتشار مقاله

نویسندگان با چاپ این مقاله به‌صورت دسترسی باز موافقت کرده و کلیه حقوق استفاده از محتوا، جدول‌ها، شکل‌ها، تصویرها و غیره را به ناشر واگذار می‌کنند.

در آزمایش دیگری، سطح بیان نسبی ژن‌های *P5CS* (شامل دو ایزوزوم *OsP5CS2* و *OsP5CS1*) و همچنین تجمع پرولین در کشت سوسپانسیون کالوس برنج تایلندی (KDML105) به‌میزان قابل‌توجهی در پاسخ به تنش شوری و خشکی افزایش یافت (Somboonwatthanaku *et al.*, 2010). این نتایج با نتایج مطالعات پیشین مطابقت داشت. ژن *P5CS* یکی از ژن‌های درگیر در مسیر متابولیسمی پاسخ به تنش خشکی است که بیوسنتز پرولین را کنترل می‌کند. به عبارت دیگر ژن *P5CS* یکی از ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز پرولین است که در لوبیا شناسایی شده است (Chen *et al.*, 2010). همان‌طور که نتایج آزمایش حاضر نشان داد، افزایش بیان ژن *P5CS* در رقم متحمل به خشکی (بهاران) نسبت به رقم حساس (پیش‌تاز) مشاهده شد و این افزایش احتمالاً منجر به افزایش سطح فرآورده نهایی این ژن (پرولین) شد (Kavi Kishor *et al.*, 2005). افزایش بیان ژن *P5CS* در بخش‌های رویشی بسیاری از گیاهان عالی از جمله سورگوم (Su *et al.*, 2011) و آرابیدوپسیس (Seki *et al.*, 2002) تحت تنش خشکی نیز گزارش شده است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی با توجه به نتایج حاضر از متابولیسم پرولین و همچنین میزان بیان دو ژن دخیل در مسیر بیوسنتز آن می‌توان گفت که رقم احسان نسبت به تنش شوری در مقایسه با رقم بهاران متحمل‌تر است. با بررسی میزان کلروفیل‌های *a* و *b* مشخص شد که غلظت هر دو نوع کلروفیل با میزان تنش رابطه غیرمستقیم دارد و با افزایش سطح تنش شوری، مقدار کلروفیل کاهش یافت. همچنین افزایش محتوای TBARM طی تنش شوری در پژوهش حاضر رخ داد که بیانگر بالا بودن میزان مالون دی‌آلدئید و افزایش آسیب وارده به غشای سلولی در اثر تنش است. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز نیز طی تنش اتفاق افتاد که به حفظ هموستازی اکسیژن فعال کمک می‌کند. افزایش فعالیت آنزیم SOD نیز در شرایط تنش مشاهده شد که به‌عنوان عامل از بین برنده یون سوپراکسید، باعث سم‌زدایی شده و آسیب‌های وارد شده به گیاه را کاهش

References

- Abdelaziz, M., Xuan, T., Mekawy, A., Wang, H., & Khanh, T. (2018). Relationship of salinity tolerance to Na⁺ exclusion, proline accumulation, and antioxidant enzyme activity in rice seedlings. *Agriculture*, 8(11), 166. doi: [10.3390/agriculture8110166](https://doi.org/10.3390/agriculture8110166).

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. doi: [10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Al-Tawaha, A. R., Samarah, N., & Ranga, A. D., Darvhankar, M. S., Saranraj, P., Pour-Aboughadareh, A., Siddique, K. H. M., Imran, A., Qaisi, A. M., Al-Tawaha, A. R., Khalid, S., Rauf, A., Thangadurai, D., Sangeetha, J., Fahad, S., Al-Taisan, W. A., & Al-Taey, D. K. A. (2021). Soil salinity and climate change. In: Fahad, S., Sonmez, O., Saud, S., Wang, D., Wu, C., Adnan, M., & Turan, V. (Eds.). *Sustainable Soil and Land Management and Climate Change*. CRC Press. pp. 83-93. doi: [10.1201/9781003108894](https://doi.org/10.1201/9781003108894).
- Amini, A., Amirnia, R., & Gazvini, H. (2016). Evaluation of relationship between physiological and agronomic traits related to salinity tolerance in bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 17(4), 329-348. [In Persian]. doi: [20.1001.1.15625540.1394.17.4.6.4](https://doi.org/20.1001.1.15625540.1394.17.4.6.4).
- Anjum, F., Yaseen, M., Rasool, E., Wahid, A., & Anjum, S. (2003). Water stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). II. Effect on chemical composition and chlorophyll contents. *Pakistan Journal of Agricultural Science*, 40(1-2), 43-49.
- Askari Kolestani, A. R., Ramadanpour, S. S., Barzoui, A., Sultanlou, H., & Nawabpour, S. (2016). Study of biochemical and molecular changes of salt tolerance in bread wheat lines (*Triticum aestivum* L.) irradiated with gamma rays. Ph. D. Dissertation, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources, Gorgan, Iran. [In Persian].
- Bates, L. S., Waldren, R. P. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant & Soil*, 39, 205-207. doi: [10.1007/BF00018060](https://doi.org/10.1007/BF00018060).
- Beyer Jr. W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2), 559-566. doi: [10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1).
- Chen, J., Zhang, X., & Jing, R. (2010). Cloning and genetic diversity analysis of a new *P5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical & Applied Genetics*, 120, 1393-1404. doi: [10.1007/s00122-010-1263-3](https://doi.org/10.1007/s00122-010-1263-3).
- Dar, M. I., Naikoo, M. I., Rehman, F., Naushin, F., & Khan, F. A. (2016). Proline accumulation in plants: Roles in stress tolerance and plant development. In: Iqbal, N., Nazar, R., & Khan, N. A. (Eds.). *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*. Springer, New Delhi. pp. 155-166. doi: [10.1007/978-81-322-2616-1_9](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1_9).
- Erskine, P. D., Stewart, G. R., Schmidt, S., Turnbull, M. H., Unkovich, M., & Pate, J. S. (1996). Water availability – A physiological constraint on nitrate utilization in plants of Australian semi-arid muiga woodlands. *Plant, Cell & Environment*, 19(10), 1149-1159. doi: [10.1111/j.1365-3040.1996.tb00430.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00430.x).
- Esfandiari, E., Enayati, V., & Abbasi, A. (2011). Biochemical and physiological changes in response to salinity in two durum wheat (*Triticum turgidum* L.) genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1), 165-170. doi: [10.15835/nbha3915625](https://doi.org/10.15835/nbha3915625).
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29, 185-212. doi: [10.1051/agro:2008021](https://doi.org/10.1051/agro:2008021).
- Feng, X. J., Li, J. R., Qi, S. L., Lin, Q. F., Jin, J. B., & Hua, X. J. (2016). Light affects salt stress-induced transcriptional memory of *P5CS1* in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(51), E8335-E8343. doi: [10.1073/pnas.1610670114](https://doi.org/10.1073/pnas.1610670114).
- Forlani, G., Bertazzini, M., & Cagnano, G. (2019). Stress-driven increase in proline levels, and not proline levels themselves, correlates with the ability to withstand excess salt in a group of 17 Italian rice genotypes. *Plant Biology*, 21(2), 336-342. doi: [10.1111/plb.12916](https://doi.org/10.1111/plb.12916).
- Funck, D., Baumgarten, L., Stift, M., Von Wirén, N., & Schönemann, L. (2020). Differential contribution of *P5CS* isoforms to stress tolerance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 565134. doi: [10.3389/fpls.2020.565134](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.565134).
- Gholizadeh, D., Amini, A., & Akbarpour, O. A. (2016). Investigating the genetic diversity of Iranian bread wheat germplasm in terms of tolerance to salt stress. *Journal of Crop Breeding*, 10(26), 173-184. [In Persian]. doi: [10.29252/jcb.10.26.173](https://doi.org/10.29252/jcb.10.26.173).
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology & Biochemistry*, 48(12), 909-930. doi: [10.1016/j.plaphy.2010.08.016](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016).

- Hagege, D., Nouvelot, A., Boucard, J., & Gaspar, T. (1990). Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: Avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis*, 1(2), 86-89. doi: [10.1002/pca.2800010208](https://doi.org/10.1002/pca.2800010208).
- Han, B., Wang, C., Tang, Z., Ren, Y., Li, Y., Zhang, D., Dong, Y., & Zhao, X. (2015). Genome-wide analysis of microsatellite markers based on sequenced database in Chinese spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One*, 10(11), e0141540. doi: [10.1371/journal.pone.0141540](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141540).
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S. S., & Fujita, M. (2014). Drought stress responses in plants, oxidative stress, and antioxidant defense. In: Tuteja, N., & Gill, S. S. (Eds.). *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 209-249. doi: [10.1002/9783527675265.ch09](https://doi.org/10.1002/9783527675265.ch09).
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology*, 51(1), 463-499. doi: [10.1146/annurev.arplant.51.1.463](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463).
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., & Rentsch, D. (2010). Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, 39, 949-62. doi: [10.1007/s00726-010-0525-3](https://doi.org/10.1007/s00726-010-0525-3).
- Kavi Kishor, P. B., Sangam, S., Amrutha, R. N., Sri Laxmi, P., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P., & Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and stress tolerance. *Current Science*, 88(3), 424-438.
- Kiani, D., Soltanloo, H., Ramezanpour, S. S., Nasrolahnezhad Qumi, A. A., Yamchi, A., Zaynali Nezhad, K., & Tavakol, E. (2017). A barley mutant with improved salt tolerance through ion homeostasis and ROS scavenging under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 90. doi: [10.1007/s11738-017-2359-z](https://doi.org/10.1007/s11738-017-2359-z).
- Kibria, M. G., Hossain, M., Murata, Y., & Hoque, M. A. (2017). Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. *Rice Science*, 24(3), 155-162. doi: [10.1016/j.rsci.2017.05.001](https://doi.org/10.1016/j.rsci.2017.05.001).
- Molassiotis, A., Tanou, G., Diamantidis, G., Patakas, A., & Therios, I. (2006). Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 163(2), 176-185. doi: [10.1016/j.jplph.2004.11.016](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.11.016).
- Moloudi, F., Navabpour, S., Soltanloo, H., Ramezanpour, S. S., & Sadeghipour, H. (2013). Catalase and metallothionein genes expression analysis in wheat cultivars under drought stress condition. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 1(2), 58-64. doi: [10.22058/JPMB.2013.3262](https://doi.org/10.22058/JPMB.2013.3262).
- Nabiollahi, K., Taghizadeh-Mehrjardi, R., Kerry, R., & Moradian, S. (2017). Assessment of soil quality indices for salt-affected agricultural land in Kurdistan Province, Iran. *Ecological Indicators*, 83, 482-494. doi: [10.1016/j.ecolind.2017.08.001](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.08.001).
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshihara, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journals*, 18(2), 185-193. doi: [10.1046/j.1365-3113x.1999.00438.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1999.00438.x).
- Neill, S., Desika, R., & Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 388-395. doi: [10.1016/s1369-5266\(02\)00282-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00282-0).
- Niazkhani, S. M., Mandolakani, B., Jafari, M., & Rasouli Sadkiani, M. M. (2018). The effect of soil zinc deficiency on the activity of antioxidant enzymes and biochemical parameters in bread wheat. *Crop Physiology Journal*, 11(41), 5-27. [In Persian]. doi: [20.1001.1.2008403.1398.11.41.1.6](https://doi.org/20.1001.1.2008403.1398.11.41.1.6).
- Nounjan, N., Nghia, P. T., & Theerakulpisut, P. (2012). Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. *Journal of Plant Physiology*, 169(6), 596-604. doi: [10.1016/j.jplph.2012.01.004](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.01.004).
- Porra, R. J., Thompson, W. A., & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975(3), 384-394. doi: [10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0).
- Prasad, R., & Power, J. F. (1997). *Soil Fertility Management for Sustainable Agriculture*. 1st Edition. CRC Press. 382 p.

- Qiao, K., Fang, C., Chen, B., Liu, Z., Pan, N., Peng, H., Hao, H., Xu, M., Wu, J., & Liu, S. (2020). Molecular characterization, purification, and antioxidant activity of recombinant superoxide dismutase from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 36, 115. doi: [10.1007/s11274-020-02892-5](https://doi.org/10.1007/s11274-020-02892-5).
- Safdar, H., Amin, A., Shafiq, Y., Ali, A., Yasin, R., Shoukat, A., & Sarwar, M. I. (2019). A review: Impact of salinity on plant growth. *Nature & Science*, 1(1), 34-40. doi: [10.7537/marsnsj170119.06](https://doi.org/10.7537/marsnsj170119.06).
- Seki, M., Narusaka, M., & Ishida, J. (2005) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, 31, 279-292. doi: [10.1046/j.1365-3113x.2002.01359.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2002.01359.x).
- Shafi, A., Gill, T., Sreenivasulu, Y., Kumar, S., Ahuja, P. S., & Singh, A. K. (2015). Improved callus induction, shoot regeneration, and salt stress tolerance in *Arabidopsis* overexpressing superoxide dismutase from *Potentilla atrosanguinea*. *Protoplasma*, 252(1), 41-51. doi: [10.1007/s00709-014-0653-9](https://doi.org/10.1007/s00709-014-0653-9).
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 217037. doi: [10.1155/2012/217037](https://doi.org/10.1155/2012/217037).
- Shiferaw, B., Smale, M., Braun, H. J., Duveiller, E., Reynolds, M., & Muricho, G. (2013). Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Security*, 5(3), 291-317. doi: [10.1007/s12571-013-0263-y](https://doi.org/10.1007/s12571-013-0263-y).
- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., & Masia, A. (2004). Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiologia Plantarum*, 121(1), 58-65. doi: [10.1111/j.0031-9317.2004.00294.x](https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00294.x).
- Somboonwatthanaku, I., Dorling, S., Leung, S., & McManus, M. T. (2010). Proline biosynthetic gene expression in tissue cultures of rice (*Oryza sativa* L.) in response to saline treatment. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 103, 369-376. doi: [10.1007/s11240-010-9790-9](https://doi.org/10.1007/s11240-010-9790-9).
- Su, M., Li, X. F., Ma, X. Y., Peng, X. J., Zhao, A. G., Cheng, L. Q., Chen, S. Y., & Liu, G. S. (2011). Cloning two *P5CS* genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. *Plant Science*, 181(6), 652-659. doi: [10.1016/j.plantsci.2011.03.002](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.03.002).
- Turkan, I., & Demiral, T. (2009). Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental & Experimental Botany*, 67(1), 2-9. doi: [10.1016/j.envexpbot.2009.05.008](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.008).
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*, 35, 753-759. doi: [10.1007/s00726-008-0061-6](https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6).
- Viera Santos, C. (2004). Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae*, 103(1), 93-99. doi: [10.1016/j.scienta.2004.04.009](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.04.009).
- Wang, M., Zhao, X., Xiao, Z., Yin, X., Xing, T., & Xia, G. (2016). A wheat superoxide dismutase gene TaSOD2 enhances salt resistance through modulating redox homeostasis by promoting NADPH oxidase activity. *Plant Molecular Biology*, 91(1-2), 115-130. doi: [10.1007/s11103-016-0446-y](https://doi.org/10.1007/s11103-016-0446-y).
- Jing, Yd., He, Zl, & Yang, Xe. (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8, 192-207. doi: [10.1631/jzus.2007.B0192](https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0192).
- Yu, Z., Duan, X., Luo, L., Dai, S., Ding, Z., & Xia, G. (2020). How plant hormones mediate salt stress responses. *Trends in Plant Science*, 25(11), 1117-1130. doi: [10.1016/j.tplants.2020.06.008](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.06.008).
- Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1527-1548. doi: [10.1089/ars.2008.2046](https://doi.org/10.1089/ars.2008.2046).
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant & Cell Physiology*, 38(10), 1095-1102. doi: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a029093](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029093).
- Zhou, Y., Tang, N., Huang, L., Zhao, Y., Tang, X., & Wang, K. (2018). Effects of salt stress on plant growth, antioxidant capacity, glandular trichome density, and volatile exudates of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 252. doi: [10.3390/ijms19010252](https://doi.org/10.3390/ijms19010252).