

گزینش گامتوفیتی تحمل شوری در برخی ارقام مرکبات

اعظم برعدان^۱، بهروز گلچین^{۲*} و شهرام صداقت‌حور^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۲۵)

چکیده

مرکبات جزء گیاهان حساس به شوری هستند، ولی میزان حساسیت یا تحمل ارقام مختلف در این گروه به شوری متفاوت است. برای گزینش گامتوفیتی تحمل شوری در برخی ژنوتیپ‌های مرکبات، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دانه گرده نارنگی کلثوپاترا (*Citrus reshni*) و پونسیروس (*Poncirus trifoliata*) به ترتیب به عنوان شاهد متحمل و حساس به شوری به همراه ۱۳ ژنوتیپ مرکبات در پنج سطح کلرید سدیم (صفر، ۰/۸، ۱/۶، ۲/۴ و ۳/۱ دسی‌زیمنس بر متر) و سه تکرار، در محیط کشت حاوی ۱۵٪ ساکارز، ۰/۷٪ آگار و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدبوریک، به اجرا در آمد. هم‌چنین به منظور درک واکنش‌های بیوشیمیایی دانه گرده به تنش شوری، دانه گرده ژنوتیپ‌های مورد آزمایش در محیط کشت مایع و در سه سطح شوری صفر، ۰/۸ و ۱/۶ دسی‌زیمنس بر متر قرار گرفتند و میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) مورد بررسی قرار گرفت. سطوح مختلف شوری بر جوانه‌زنی دانه گرده اختلاف معنی‌داری را در سطح ۱٪ نشان داد، ولی در رشد لوله گرده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. دانه گرده کلثوپاترا شاخص رشد بهتری نسبت به پونسیروس نشان داد که بیانگر متحمل بودن این رقم است. میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های SOD و APX در سطح ۱٪ تحت تأثیر ژنوتیپ، سطح شوری و اثر متقابل آنها قرار گرفت. با توجه به سرعت و دقت این نوع آزمایش می‌توان این گونه عنوان داشت که ارزیابی واکنش دانه گرده مرکبات، امکان غربالگری اولیه ژنوتیپ‌های ناشناخته حساس و متحمل شوری را فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: جوانه‌زنی دانه گرده، ژنوتیپ، شوری، مرکبات

۱ و ۳. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد رشت

۲. دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، رامسر

*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bgoleincitrus@yahoo.com

مقدمه

گامتوفیت‌های هاپلوئید و هتروژن می‌تواند به‌طور مثبت با تغییرات بعدی در نتایج اسپوروفیت همبستگی داشته باشد. دانه گرده نه تنها به‌عنوان یک ناقل ژنتیکی عمل می‌کند، بلکه به‌عنوان یک موجود مستقل قابلیت بیان اطلاعات ژنتیکی خود را نیز دارد (۲۴). اندازه جمعیت بزرگ و نمایش مستقل صفات مغلوب به‌علت وجود حالت هاپلوئیدی از ویژگی‌های مهم دانه گرده می‌باشد که می‌تواند اهمیت گامتوفیت نر را در مطالعات به‌نژادی گیاهان روشن سازد. اگر هریک از مراحل رشدی گیاه و ویژگی‌های ژنتیکی مخصوص و مستقل خود را نشان دهند، پس انتخاب برای یک صفت ویژه در دانه گرده می‌تواند منجر به تغییر بروز صفت در نتاج اسپوروفیتی بعدی گردد. هم‌چنین در صورت بیان مشترک بعضی ژن‌ها در هر دو مرحله، ژن‌های مذکور و صفات متأثر از آنها می‌توانند از اهداف گزینش در برنامه‌های به‌نژادی باشند (۱۸). پاسخ نسل گامتوفیت گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌تواند نمایانگر عکس‌العمل گیاه کامل به تنش‌های مربوطه باشد (۳۰). همانند سایر تنش‌های غیر زیستی مثل شدت نور، کمبود آب، دما، آلودگی و غیره، تنش شوری می‌تواند تأثیراتی روی دانه گرده داشته باشد (۱۷ و ۳۳). کاهش قابلیت زیستی دانه گرده تحت شرایط شوری به‌طور چشم‌گیری در گیاهان ذرت، نخود و ماش گزارش شده است (۹، ۱۰ و ۳۲).

تعیین درجه تحمل به شوری به‌دلیل آنکه وابسته به عوامل متعددی مانند شرایط محیطی، درجه حاصلخیزی خاک، الگوی پراکنش نمک در پروفیل خاک، روش آبیاری و عوامل گیاهی (رقم، پایه) می‌باشد، کار دشواری است (۲۲). استفاده از پایه‌های متحمل به شوری از جمله کلنوپاتراماندارین و رانگ‌پورلایم (*C. limonia*) یکی از کارآمدترین روش‌های کاهش خسارت شوری است (۱۲ و ۱۵). بر همین اساس لازم است در بین ژنوتیپ‌های طبیعی به‌دنبال پایه‌هایی متحمل‌تر باشیم تا از خسارت تنش شوری هرچه بیشتر کاسته شود. در این پژوهش، درجه تحمل شوری در برخی از ژنوتیپ‌های مرکبات که قبلاً تحت شرایط مزرعه مشخص شده بود (۱۳)،

مرکبات از محصولات مهم باغبانی به‌شمار می‌روند که از دیرباز به‌عنوان بخشی از رژیم غذایی، دارای ارزش فراوانی بوده است (۱۲). شوری خاک و منابع آبی از مشکلات عمده توسعه کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک برای گیاهان حساس به شوری می‌باشد. محدودیت بارندگی، کاهش شستشوی خاک، آب حاوی املاح زیاد، زهکشی نامناسب خاک، هوازگی سنگ‌ها، بالا آمدن سفره‌های آب زیرزمینی و استفاده بیش از حد کودها، همگی سبب شوری خاک می‌شوند (۲۷).

مرکبات جزء گیاهان حساس به شوری هستند اما میزان تحمل پایه‌های مختلف مرکبات به شوری، تفاوت‌های واضحی با یکدیگر نشان می‌دهند. به‌عنوان مثال شوری در رافلمون (*Citrus jambhiri*) و پونسیروس در مقایسه با پایه‌های نارنج (*C. aurantium*) و نارنگی کلنوپاترا، باعث کاهش بیشتری در رشد می‌شود؛ در این گیاهان رشد تاج درخت بیشتر از سیستم ریشه تحت تأثیر شوری قرار می‌گیرد (۴ و ۳۵).

به‌منظور توسعه سطح زیرکشت مرکبات و افزایش تولید اقتصادی این محصول باید به‌دنبال روش‌هایی برای مقابله با شرایط نامساعد محیطی و کیفیت پائین آب و خاک باشیم. از مهم‌ترین روش‌هایی که می‌تواند در این زمینه مؤثر باشد، پژوهش‌هایی است که در جهت شناسایی ارقام و ژنوتیپ‌های متحمل و کاربرد آن در برنامه‌های به‌نژادی صورت می‌گیرد. با این وجود اکثر برنامه‌های به‌نژادی معمولاً نیاز به صرف زمان و هزینه‌های انسانی و مالی زیادی دارند که این موضوع در مورد گیاهان چندساله و چوبی نظیر مرکبات در مقایسه با گیاهان علفی و یک‌ساله از اهمیت بیشتری برخوردار است.

گامتوفیت نر به‌عنوان یک سیستم مناسب جهت تجزیه فرایندهای بیولوژی مهم در گیاهان عالی از قبیل نحوه تعیین سرنوشت سلول، رشد و طویل شدن سلول و پاسخ به تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی می‌باشد (۵). اساس تئوری انتخاب گامتوفیتی بیان می‌دارد که انتخاب در میان

مذکور (جدول ۱) و سه سطح کلرید سدیم (صفر، ۰/۸ و ۱/۶ دسی‌زیمنس بر متر) در سه تکرار به اجرا درآمد. جهت اجرای این آزمایش، ۵۰ میلی‌گرم دانه گرده هر نمونه با آب مقطر استریل مرطوب و سپس در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت قرار گرفت. پس از قرارگیری نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دانه‌های گرده با استفاده از کاغذ صافی جمع‌آوری و توسط ازت مایع پودر شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. شاخص‌های مورد سنجش در این آزمایش، پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز بود.

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین از روش برادفورد (۸) استفاده شد. به ۵۰ میلی‌گرم دانه گرده سائیده شده، یک میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7$ شامل EDTA ۰/۵ میلی‌مولار و PVP ۲٪ اضافه و ورتکس شد. عصاره‌ها در چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و محلول رویی جدا گردید، به ۵۰ میکرولیتر محلول رویی استخراج شده ۲۵۰ میکرولیتر از معرف برادفورد که شامل پودر کوماسی برلیانت بلو G۲۵، اتانل ۹۶٪ و اسید فسفریک (w/w) ۸۵٪ می‌باشد، اضافه شد. سپس محتویات لوله‌ها به خوبی مخلوط شده و پس از قرار گرفتن به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (NanoDrop ND-1000) قرائت شد. غلظت تام پروتئینی براساس مقایسه با منحنی استاندارد تهیه شده با سرم آلبومین گاوی (BSA (mg/ml)) به‌عنوان استاندارد محاسبه گردید.

برای استخراج SOD از دانه‌گرده سائیده شده، از بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7$ شامل EDTA ۰/۵ میلی‌مولار در چهار درجه سانتی‌گراد، استفاده شد. فعالیت SOD طبق روش جیانوپلیتیس و ریس (۱۱) و از طریق اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر محلول واکنش شامل EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، NBT ۷۵ میکرومولار و ریوفلاوین ۰/۲۱ میلی‌مولار و پنج میکرولیتر محلول رویی

با استفاده از تعیین درجه جوانه‌زنی و رشد دانه گرده در محیط شور آزمایشگاهی مورد بررسی قرار می‌گیرد تا بتوان ژنوتیپ‌های برتر را بدون از بین رفتن گیاه کامل و در مدت زمان کم شناسایی و معرفی نمود و به‌عنوان کاندید برای معرفی به‌عنوان پایه‌های متحمل به شوری مورد استفاده قرار داد.

مواد و روش‌ها

برای اجرای این پژوهش دو آزمایش انجام شد. آزمایش اول به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در محیط کشت جامد حاوی ۱۵٪ ساکارز، ۰/۷٪ آگار و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدبوریک، با دانه گرده نارنگی کلثوپترا و پونسیروس به ترتیب به‌عنوان شاهد متحمل و حساس شوری (۱۲ و ۳۵) به‌همراه ۱۳ ژنوتیپ دیگر مرکبات (جدول ۱) و پنج سطح کلرید سدیم (صفر، ۰/۸۷، ۱/۶، ۲/۴ و ۳/۱ دسی‌زیمنس بر متر) در سه تکرار به اجرا درآمد. دانه‌های گرده نمونه‌های مورد مطالعه از باغ کلکسیون پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری (رامسر) در سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری شدند. در این آزمایش، دانه‌های گرده به‌طور یکنواخت روی محیط کشت در پتری‌دیش کشت شدند و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس شاخص‌های درصد جوانه‌زنی دانه گرده و طول لوله گرده اندازه‌گیری شد. درصد جوانه‌زنی دانه گرده با شمارش ۳۰۰ عدد از دانه گرده در هر نمونه و تیمار به‌طور تصادفی از میدان‌های دید مختلف توسط میکروسکوپ نوری با عدسی چشمی 10X و عدسی شیئی 40X (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) انجام شد. به‌منظور اندازه‌گیری طول لوله گرده هر نمونه در هر تیمار، حداقل ۲۰ دانه گرده در هر میدان دید با استفاده از عدسی چشمی مدرج اندازه‌گیری شد.

آزمایش دوم (آزمایش تکمیلی) به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در محیط کشت مایع حاوی ۱۵٪ ساکارز و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدبوریک با دو فاکتور شامل نمونه‌های

جدول ۱. ژنوتیپ‌های استفاده شده در آزمایش و برخی صفات مورفولوژی آنها

کد گیاه	نام علمی گیاه	نام عمومی	زمان رسیدن میوه	رنگ میوه	شکل میوه	تعداد بذر	تعداد چنین در بذر	رنگ گل	شکل پهنک برگ	شکل تاج	شکل به شوری
Cleopatra	<i>Citrus reshni</i>	کلپواترا	میان‌رس	نارنجی	پخت	۲۰-۵۰	چند چنین	سفید	بیضی و کشیده	کروی	متحمل
Poncirus	<i>Poncirus trifoliata</i>	پونسیرس	زودرس	زرد	کروی	۲۰-۲۵	چند چنین	سفید	تخم‌زغی	کروی	حساس
Chinotto	<i>Citrus myrifolia</i>	نارنج خوشه‌ای	زودرس	نارنجی	پخت تا گرد	۵-۱۵	چند چنین	سفید	نیزه‌ای	کروی	نامشخص
Varigated sour	<i>Citrus aurantium</i>	نارنج ابلق	میان‌رس	سبز ابلق	کروی	۱۰-۱۹	چند چنین	سفید	تخم‌زغی	کروی	نامشخص
Kumquat	<i>Fortunella margarita</i>	کامکرات	میان‌رس	نارنجی روشن	تخم‌زغی	۳-۴	تک چنین	سفید	نیزه‌ای	کروی	نامشخص
G6	<i>Citrus sp</i>	نامشخص	میان‌رس	سبز - زرد	پخت	۲۰-۵۰	چند چنین	سفید	تخم‌زغی	پهن	حساس*
G7	<i>Citrus sp</i>	نامشخص	میان‌رس	نارنجی روشن	پخت	۲۰-۵۰	چند چنین	سفید	نیزه‌ای	کروی	حساس*
G8	<i>Citrus sp</i>	نامشخص	دیررس	سبز - زرد	کروی	۲۰-۵۰	چند چنین	سفید	بیضی و کشیده	پهن	حساس*
G9	<i>Citrus sp</i>	نامشخص	دیررس	زرد	کروی	۱۰-۱۹	چند چنین	سفید	نیزه‌ای	بیضی	متحمل*
G10	<i>Citrus sp</i>	نامشخص	دیررس	نارنجی	کروی	۲۰-۵۰	چند چنین	سفید	نیزه‌ای	کروی	متحمل*
G11	<i>Citrus sp</i>	نامشخص	دیررس	زرد	بیضی	۱۰-۱۹	چند چنین	سفید	بیضی و کشیده	بیضی	حساس*
G12	<i>Citrus sp</i>	نامشخص	میان‌رس	نارنجی روشن	پخت	۱۰-۱۹	چند چنین	سفید	بیضی و کشیده	بیضی	متحمل*
G13	<i>Citrus sp</i>	نامشخص	دیررس	زرد	بیضی	۲۰-۵۰	چند چنین	سفید	بیضی و کشیده	پهن	متحمل*
G14	<i>Citrus sp</i>	نامشخص	دیررس	زرد	پخت	۱۰-۱۹	چند چنین	سفید	بیضی و کشیده	پهن	حساس*
G15	<i>Citrus sp</i>	نامشخص	میان‌رس	زرد	گلابی شکل	۱۰-۱۹	چند چنین	سفید	بیضی و کشیده	بیضی	متحمل*

* ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به شوری در شرایط مزرعه براساس گزارش گل‌عین و همکاران (۱۳)

بیشترین و کمترین درصد جوانه‌زنی نسبت به کلئوپاترا نشان دادند (جدول ۳).

میزان پروتئین

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴)، میزان پروتئین کل در سطح ۱٪ تحت تأثیر ژنوتیپ، سطوح شوری و اثر متقابل آنها قرار گرفت. با افزایش سطح شوری مقدار پروتئین کل در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کاهش یافت (جدول ۵). در سطوح مختلف شوری میزان پروتئین کل در ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. در سطح شوری ۰/۸ دسی‌زیمنس بر متر در ژنوتیپ‌های کامکوات و G6 افزایش در میزان پروتئین کل در مقایسه با کلئوپاترا ماندارین دیده شد. نارنج ابلق و G7 نسبت به تیمار شاهد (کلئوپاترا ماندارین)، کمترین میزان پروتئین کل را در این سطح شوری نشان دادند. سایر ژنوتیپ‌ها در این سطح شوری کاهش در میزان پروتئین کل نشان دادند. ژنوتیپ‌های کامکوات، G8 و G13 نسبت به کلئوپاترا ماندارین در سطح شوری ۱/۶ دسی‌زیمنس بر متر افزایش در میزان پروتئین کل داشتند. در بقیه ژنوتیپ‌ها کاهش در میزان پروتئین کل وجود داشت و پونسیروس، نارنج ابلق، G6 و G11 کمترین میزان پروتئین کل را در این سطح شوری نشان دادند (جدول ۵).

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

نتایج پژوهش تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ میان سطوح شوری، ژنوتیپ و اثر متقابل آنها در خصوص میزان فعالیت آنزیم SOD نشان داد (جدول ۴). سطوح مختلف شوری باعث تغییر در فعالیت این آنزیم شد (جدول ۵). در سطح شوری ۰/۸ دسی‌زیمنس بر متر، ژنوتیپ‌های کلئوپاترا، کامکوات و G15 دارای افزایش در فعالیت آنزیم SOD بودند. در سایر ژنوتیپ‌ها در این سطح شوری کاهش در فعالیت آنزیم مشاهده شد. در سطح شوری ۱/۶ دسی‌زیمنس بر متر کلئوپاترا ماندارین، کامکوات، G12 و G15 فعالیت آنزیم SOD بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشتند.

استخراج شده می‌باشد، پس از تکان دادن محلول واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور فلورسانس، قرائت جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد.

به منظور تعیین فعالیت APX از روش ناکانو و آسادا (۲۶) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. برای تهیه محلول آنزیمی از دانه گرده، از بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار شامل EDTA یک میلی‌مولار و PVPP ۰/۲٪ استفاده شد. یک میلی‌لیتر محلول واکنش برای تعیین فعالیت APX، متشکل از پراکسید هیدروژن ۰/۱ میلی‌مولار، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و آسکوربیک اسید (ASA) ۰/۵ میلی‌مولار با pH = ۷ می‌باشد. فعالیت APX به دنبال اکسیداسیون آسکوربات به دی‌هیدروآسکوربات با ضریب خاموشی ($2/8 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}^{-1}$) به مدت ۲ دقیقه در ۲۹۰ نانومتر محاسبه شد.

پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه آماری توسط نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چنددامنه‌ای دانکن، با سطح احتمال ۱٪ انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های رشد دانه گرده

اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها، سطوح شوری و اثر متقابل آنها بر درصد جوانه‌زنی دانه گرده در سطح ۱٪ به دست آمد ولی اثر ژنوتیپ و سطوح شوری و اثر متقابل آنها بر طول لوله گرده معنی‌دار نشد (جدول ۲). افزایش سطح شوری سبب کاهش جوانه‌زنی دانه گرده در همه نمونه‌ها شد (جدول ۳). با توجه به اینکه رقم کلئوپاترا از ارقام متحمل شوری محسوب می‌شود، درصد جوانه‌زنی دانه گرده این رقم در بیشترین غلظت شوری ۱/۶۶ برابر نسبت به پونسیروس افزایش داشت. کامکوات و نارنج خوشه‌ای هم به ترتیب با ۱/۹ و ۱/۸۸ برابر افزایش نسبت به کلئوپاترا، بیشترین جوانه‌زنی را در سطح شوری ۳/۱ دسی‌زیمنس بر متر داشتند. در سطوح شوری ۰/۸۷، ۱/۶ و ۲/۴ دسی‌زیمنس بر متر کامکوات و پونسیروس به ترتیب

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار شوری بر شاخص‌های رشد دانه گرده

میانگین مربعات (MS)			
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی دانه گرده	طول لوله گرده
ژنوتیپ	۱۴	۲۳/۴۵ **	۰/۸۶ ns
شوری	۴	۳۳۰/۲۴ **	۱/۱۳ ns
ژنوتیپ × شوری	۵۶	۱/۸۲ **	۰/۸۵ ns
خطا	۱۵۰	۰/۲۷	۰/۸۵
ضریب تغییرات (%)	---	۸/۷۵	۵/۶۹

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و غیر معنی‌دار

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج نشان داد که میان ژنوتیپ‌ها و سطوح شوری و اثر متقابل آنها تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ در زمینه میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز وجود دارد (جدول ۴) و سطوح مختلف شوری سبب تغییر در فعالیت این آنزیم در همه ژنوتیپ‌ها شد (جدول ۵). در سطح شوری ۰/۸ دسی‌زیمنس بر متر، ژنوتیپ‌های کلئوپاترا ماندارین، کامکوات، G8 و G15 دارای بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم APX بودند ولی سایر ژنوتیپ‌ها در این سطح شوری دارای کمترین فعالیت آنزیم بودند و بیشترین کاهش هم در نارنج خوشه‌ای مشاهده شد. در سطح شوری ۱/۶ دسی‌زیمنس بر متر، در ژنوتیپ‌های کامکوات، G6، G9 و G15 افزایش در فعالیت آنزیم نسبت به کلئوپاترا دیده شد ولی در سایر ژنوتیپ‌های مورد آزمایش، کاهش در فعالیت این آنزیم مشاهده شد که بیشترین کاهش در پونسیروس بود (جدول ۵).

بحث

شاخص‌های رشد دانه گرده

نتایج نشان می‌دهد که از نظر تحمل شوری در مرحله گامتوفیتی گیاه، تفاوت‌های بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد که مؤید این مطلب است که دانه گرده مرکبات مانند سایر بافت‌های گیاهی می‌تواند اطلاعات ژنتیکی و مکانیسم‌های مولکولی مربوط به جوانه‌زنی

و رشد لوله گرده خود را داشته باشد. در این پژوهش درصد جوانه‌زنی دانه گرده تحت تأثیر رقم و شوری و اثر متقابل آنها در سطح ۱٪ قرار گرفت، ولی رشد لوله گرده تحت تأثیر هیچ‌یک از این فاکتورها قرار نگرفت. در مطالعاتی که بر روی قلمه و دانه گرده ارقام مختلف زیتون نسبت به تنش شوری انجام شد، درصد جوانه‌زنی و رشد لوله گرده در ارقام مختلف در طی تنش شوری کاهش داشته و با توجه به نوع رقم، نتایج متفاوتی حاصل آمد. هم‌چنین درصد جوانه‌زنی دانه گرده در مقایسه با طول لوله گرده به‌عنوان یک ویژگی برای پاسخ به تنش شوری در گیاه زیتون شناخته شد (۳۴). در پژوهشی که بر روی جوانه‌زنی بذر و دانه گرده پنج گونه مختلف پسته تحت شرایط تنش شوری مورد بررسی قرار گرفته بود، مشخص شد که افزایش غلظت نمک در محیط جوانه‌زنی بذر، باعث تأخیر و کاهش در جوانه‌زنی و در محیط کشت دانه‌گرده باعث کوتاه شدن لوله گرده و کاهش در ظرفیت جوانه‌زنی دانه‌های گرده می‌شود (۲۳)، که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. ارتباط بین پاسخ گامتوفیتی و اسپوروفیتی گیاهان به تنش‌های محیطی، قبلاً نیز گزارش شده است (۳۰ و ۳۶). اگرچه اثرات منفی تنش شوری بر جنبه‌های مختلف رشدونمو گیاهان را به دو عامل مهم فشار اسمزی بالا در محیط کشت و سمیت یون‌ها نسبت داده‌اند، ولی شاید سمیت یون‌ها بیشتر از فشار اسمزی بالا در کاهش جوانه‌زنی دانه گرده مؤثر باشد (۲۰). مارتینز-پال و همکاران (۲۳) این امر را به اثر سمیت یون سدیم (Na^+) نسبت داده‌اند.

جدول ۳. مقایسه میانگین شاخص جوانه‌زنی داده‌گرده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

شاخص شوری (dS m ⁻¹)	کلونیاترا	پونسیروس	نارنج خوشه‌ای	نارنج ابلق	کامکوات	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
۰	۷/۴۶ c	۹/۴۶ b	۱۰/۳۰ abc	۷/۸۳ c	۹/۸۳ b	۱۱/۹۰ a	۹/۷۶ b	۱۰/۲۰ abc	۸/۱۰ bc	۱۱/۳۰ ab	۱۲/۷۳ a	۹/۲۰ b	۸/۸۶ bc	۷/۶۶ c	۸/۶۰ bc
۰/۸۷	۶/۴۰ cd	۵/۴۶ d	۸/۹۳ bc	۶/۱۰ cd	۹/۷۵ b	۹/۱۳ b	۸/۵۰ bc	۸/۳۶ bc	۶/۴۰ cd	۹/۶۳ b	۸/۲۰ bc	۷/۷۶ c	۶/۱۰ cd	۵/۶۶ d	۷/۶۰ c
۱/۶	۵/۳۳ d	۴/۱۶ de	۷/۶۰ c	۴/۶۳ de	۸/۰۳ bc	۶/۳۶ cd	۶/۳۶ cd	۶/۱۶ cd	۵/۸۳ d	۸/۵۰ bc	۷/۰۶ c	۶/۰۶ cd	۴/۲۰ de	۳/۴۶ e	۶/۴۳ cd
۲/۴	۴/۲۰ de	۲/۱۰ ef	۶/۳۰ cd	۳/۰۶ e	۷/۰۰ c	۴/۸۶ de	۴/۵۶ de	۴/۱۰ de	۴/۰۶ de	۵/۶۰ d	۳/۴۶ e	۵/۶۰ d	۲/۵۶ ef	۲/۳۶ ef	۵/۵۶ d
۳/۱	۲/۲۶ ef	۱/۳۶ f	۴/۲۶ de	۱/۷۳ f	۴/۳۶ de	۲/۵۶ ef	۲/۶۰ ef	۱/۹۰ f	۲/۵۰ ef	۳/۷۶ e	۱/۵۰ f	۱/۷۰ e	۱/۴۰ f	۱/۳۳ f	۳/۰۰ e

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف متفاوت در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری با هم دارند.

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار شوری بر صفات بیوشیمیایی مورد مطالعه

میانگین مربعات (MS)				
منابع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین کل	فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز
ژنوتیپ	۱۴	۰/۰۲**	۱۵۹۰۸۳۹**	۱۲/۰۴**
شوری	۲	۰/۲۸**	۴۲۸۲۵**	۸/۵۶**
ژنوتیپ × شوری	۲۸	۰/۰۳**	۸۸۵۲۵**	۱۱/۷۰**
خطا	۹۰	۰/۰۴	۷۶۸۶	۰/۲۰
ضریب تغییرات (%)	---	۱۲/۳۴	۶/۸۷	۸/۷۵

** و ns به ترتیب معنی دار در سطح ۱٪ و غیر معنی دار

پروتئین

اولین واکنش هر گیاه در مقابله با تنش، کاهش فعالیت های متابولیکی طبیعی است که نتیجه آن کاهش رشد است. یکی از فرایندهای مهم درون سلولی، سنتز پروتئین است که شدیداً تحت تأثیر تغییر شرایط محیطی و تنش قرار گرفته و به همراه آن فتوسنتز، جابجایی متابولیت ها و جذب و انتقال یون ها نیز تأثیر می پذیرند. بسیاری از پروتئین ها طی تنش هیدرولیز می شوند و بر این اساس، کاهش در غلظت پروتئین کل می تواند از نتایج تنش باشد. دلیل کاهش مقدار پروتئین کل می تواند ناشی از اثر شوری (اثر ویژه یون ها و یا تنش اکسیداتیو) بر ساختار پروتئین ها و تخریب آنها و یا در اثر صدمه به مسیرهای سنتز و کاهش تولید پروتئین باشد. تأثیر اکسیژن های فعال بر DNA و RNA می تواند از دلایل کاهش سنتز پروتئین ها در شرایط تنش باشد، اما تنش سبب بیان بیشتر ژن های ویژه ای می شود که محصولات آنها به سازگاری گیاه در شرایط نامساعد کمک می کنند. بنابراین امکان افزایش در غلظت پروتئین کل نیز وجود دارد (۳، ۷ و ۲۱). با افزایش سطح شوری به ۱/۶ دسی زیمنس بر متر روند کاهشی در مقدار پروتئین کل در ژنوتیپ های پونسیروس، نارنج ابلق، G6 و G11 دیده شد، ولی در ارقام کلتوپاتراماندرین، کامکوات و G13 افزایش در مقدار پروتئین کل وجود داشت که شاید به دلیل القای پروتئین های جدید و بیان ژن های ویژه ای باشد که طی تنش تحریک شده اند.

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

تفاوت معنی داری در سطح ۱٪ میان سطوح شوری، ژنوتیپ و اثر متقابل آنها در خصوص فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز دیده شد. سوپر اکسید دیسموتاز اولین سد دفاعی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو می باشد و نقش اساسی و بارزی در مقابله با گونه های فعال اکسیژن دارد (۳۷). این آنزیم در میتوکندری تولید شده و همراه با گلوکاتایون پراکسیداز، باعث جلوگیری از اکسیدایش و تخریب غشاء میتوکندری می شود. در پژوهشی همبستگی بالایی بین تحمل به تنش های اکسیداتیو که به دلیل تنش های محیطی ایجاد می شود و افزایش در غلظت آنزیم های آنتی اکسیدان در گیاهان فتوسنتزکننده به دست آمد (۱). در پژوهش های انجام شده بر روی نهال مرکبات (۱۴) و انگور (۲۹) تحت تنش اکسیداتیو ناشی از شرایط نامساعد محیطی، افزایش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز گزارش گردید که بیانگر نقش این آنزیم در سیستم حفاظتی گیاهان می باشد. در مطالعات صورت گرفته بر کاریزو سیترنج، تنش شوری باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD شد (۲). فعالیت SOD در ریشه ها و شاخه های درختان مرکبات در اثر تنش شوری افزایش قابل توجهی می یابد. فعالیت ویژه این آنزیم تنها یک تا سه روز پس از اعمال تنش شوری در ریشه ها افزایش قابل ملاحظه و معنی داری پیدا می کند (۲). تولید H₂O₂ توسط آنزیم های مولد پراکسید سبب آسیب غشاء می گردد، علاوه بر این ممکن است

جدول ۵. مقایسه میانگین شاخص های بیوشیمیایی در ژنوتیپ های مورد مطالعه

شاخص	شوری (dS m ⁻¹)	کالیپاترا	پونسیرس	نارنج خوشه ای نارنج ابلق کامکرات	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	کالیپاترا		
															شوری	شاخص	
(mg/l)	۰	۰/۲۵ ^a	۰/۲۹ ^a	۰/۲۲ ^c	۰/۱۹ ^d	۰/۳۹ ^{ab}	۰/۴۰ ^{ab}	۰/۳۷ ^b	۰/۲۲ ^c	۰/۴۱ ^a	۰/۴۱ ^a	۰/۴۶ ^a	۰/۲۹ ^c	۰/۴۵ ^a	۰	۰/۲۹ ^c	۰/۲۵ ^a
زنجیره	۰/۸۷	۰/۲۹ ^c	۰/۲۰ ^{cd}	۰/۲۰ ^{cd}	۰/۱۰ ^{de}	۰/۳۲ ^b	۰/۲۸ ^c	۰/۲۱ ^c	۰/۱۹ ^d	۰/۳۳ ^c	۰/۱۸ ^d	۰/۲۴ ^c	۰/۲۰ ^{cd}	۰/۲۷ ^c	۰/۸۷	۰/۲۰ ^{cd}	۰/۲۹ ^c
زنجیره	۱/۶	۰/۲۰ ^{cd}	۰/۰۸ ^e	۰/۱۱ ^d	۰/۰۸ ^e	۰/۰۸ ^d	۰/۱۹ ^d	۰/۱۱ ^d	۰/۱۳ ^d	۰/۰۹ ^e	۰/۱۴ ^d	۰/۲۰ ^{cd}	۰/۱۲ ^d	۰/۱۶ ^d	۱/۶	۰/۱۲ ^d	۰/۲۰ ^{cd}
DOS (mg/l)	۰	۱۵۷/۹ ^{ab}	۲۹۹/۷ ^c	۱۳۶۶/۳ ^b	۲۵۷/۴ ^c	۱۴۶۵/۳ ^b	۱۱۹۴/۷ ^c	۱۲۸۷/۱ ^b	۱۳۵۳/۱ ^b	۱۵۳۱/۳ ^{ab}	۱۶۲۳/۵ ^a	۱۳۴۶/۵ ^a	۱۶۷۶/۵ ^a	۱۴۲۵/۵ ^b	۰	۱۶۷۶/۵ ^a	۱۵۳۱/۳ ^{ab}
زنجیره	۰/۸۷	۱۴۸۴/۱ ^b	۳۳۱ ^c	۱۰۷۲/۹ ^c	۱۷۶/۴ ^{cd}	۸۴۴/۸ ^d	۱۰۰۶/۳ ^c	۱۰۸۶/۱ ^c	۱۲۴۵/۵ ^{bc}	۱۰۹۱/۵ ^c	۱۰۲۴/۷ ^c	۱۱۳۳/۳ ^c	۱۱۶۳/۲ ^c	۱۴۰۸/۳ ^b	۰/۸۷	۱۱۶۳/۲ ^c	۱۰۹۱/۵ ^c
زنجیره	۱/۶	۱۴۸۸/۵ ^b	۶۷۹/۸ ^{de}	۱۱۴۲/۸ ^c	۲۲۱/۴ ^e	۱۰۷۳/۸ ^c	۱۱۱۳/۵ ^c	۱۰۹۰/۷ ^c	۱۲۷۰/۹ ^c	۱۱۱۶/۹ ^c	۱۵۰۵/۱ ^{bc}	۱۲۶۶/۷ ^{bc}	۱۲۴۴/۵ ^{bc}	۱۴۴۰/۹ ^b	۱/۶	۱۲۴۴/۵ ^{bc}	۱۱۱۶/۹ ^c
XpV (mg/l)	۰	۷/۲۴ ^b	۴/۶۹ ^c	۵/۶۵ ^c	۶/۶۱ ^b	۵/۲۶ ^c	۶/۳۶ ^b	۷/۶۲ ^b	۴/۳۱ ^c	۹/۱۶ ^a	۴/۳۰ ^c	۵/۰۱ ^c	۴/۳۶ ^c	۱۰/۳۱ ^a	۰	۴/۳۶ ^c	۹/۱۶ ^a
زنجیره	۰/۸۷	۵/۲۵ ^c	۴/۱۱ ^{cd}	۳/۳۳ ^d	۴/۲۸ ^c	۵/۰۷ ^c	۵/۱۸ ^c	۴/۰۳ ^{cd}	۳/۹۵ ^d	۳/۴۴ ^d	۴/۰۵ ^c	۴/۴۸ ^c	۴/۳۹ ^c	۶/۹۹ ^b	۰/۸۷	۴/۳۹ ^c	۳/۴۴ ^d
زنجیره	۱/۶	۷/۵۳ ^b	۴/۰۶ ^{cd}	۵/۸۶ ^c	۴/۵۷ ^c	۷/۵۹ ^b	۶/۶۴ ^b	۷/۹۸ ^b	۴/۳۳ ^c	۵/۱۵ ^c	۵/۷۱ ^c	۶/۳۹ ^b	۵/۷۵ ^c	۷/۷۷ ^b	۱/۶	۶/۳۹ ^b	۵/۱۵ ^c

در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی داری با هم دارند. SOD: سوپر اکسید دیسموتاز و APX: آسکوربات پراکسیداز، می باشد.

ژنوتیپ G9 و کمترین فعالیت آنزیم در پونسیروس بود. نتایج حاصل نشان می‌دهد که افزایش آنزیم APX در ارقام متحمل مانند کلئوپاترا بیشتر از ارقام حساس مثل پونسیروس بوده است که این می‌تواند بیانگر وجود سیستم آنزیمی مؤثرتر در متابولیسم رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد میزان تحمل شوری در ژنوتیپ‌های مختلف مرکبات متفاوت بوده و نسل گامتوفیت گیاه نیز در برابر تنش شوری عکس‌العمل نشان می‌دهد. این بیانگر این مطلب است که دانه‌گرده در گیاه مرکبات مانند سایر بافت‌های گیاهی می‌تواند اطلاعات ژنتیکی و مکانیسم‌های مولکولی مربوط به جوانه‌زنی و رشد لوله‌گرده خود را داشته باشد. وجود تفاوت معنی‌دار در درصد جوانه‌زنی دانه‌گرده در واکنش به شوری نشان داد که نسل گامتوفیت گیاه می‌تواند در ارزیابی گونه‌ها نسبت به تنش شوری مورد استفاده قرار بگیرد.

در مجموع با توجه به نتایج به‌دست آمده این موضوع حائز اهمیت است که پاسخ نسل گامتوفیت گیاه به تنش‌های غیر زیستی (شوری در این پژوهش)، می‌تواند واکنش نسل اسپوروفیت را در برابر این تنش‌ها مشخص کند و ارزیابی واکنش دانه‌گرده مرکبات، امکان غربالگری اولیه در برنامه‌های به‌نژادی و ژنوتیپ‌های ناشناخته مرکبات حساس و متحمل شوری را فراهم می‌آورد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه و پروژه تحقیقاتی پایان یافته با شماره فروست ۴۰۱۴۰ مورخ ۹۰/۱۲/۶ پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری (رامسر) است که از حمایت مالی آن مجموعه قدردانی می‌شود.

رادیکال‌های سوپراکسید با H_2O_2 واکنش داده و تشکیل رادیکال هیدروکسیل بدهد که منجر به صدمات بیشتری به غشاء می‌شود. افزایش فعالیت جاروگرهای H_2O_2 همانند سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز می‌توانند با از بین بردن H_2O_2 از تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل بکاهند (۱۹ و ۲۸). خصوصیت مقاومت در برابر شوری فقط براساس افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، با در نظر گرفتن متابولیسم پیچیده تنش اکسیداتیو، روش ساده‌ای به نظر می‌رسد که معمولاً در گیاهان عالی اتفاق می‌افتد (۲۵).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج نشان داد که میان ژنوتیپ‌ها و سطوح شوری و اثر متقابل آنها تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ در زمینه میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز وجود دارد و غلظت‌های مختلف شوری سبب تغییر در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در همه ژنوتیپ‌ها شد. تولید ROS در شرایط شوری افزایش قابل توجهی می‌یابد و خسارت حاصل از این افزایش که به غشاء‌ها وارد می‌شود می‌تواند عامل عمده‌ای برای ایجاد سمیت سلولی حاصله از شوری در مرکبات باشد (۲). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم دفاعی با کارایی بالا هستند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را از بین برده یا خنثی کنند. آسکوربات پراکسیداز (APX) یکی از پراکسیدهای اصلی در سمیت‌زدائی از H_2O_2 می‌باشد و به لحاظ تمایل زیاد که نسبت به H_2O_2 دارد، پراکسید هیدروژنی را که مورد مصرف کاتالاز قرار نمی‌گیرد خنثی می‌کند. فعالیت این آنزیم اولین بار در کلروپلاست و در چرخه گلوکاتیون آسکوربات شناخته شد (۱۶ و ۳۱). در مطالعه انجام شده روی مرکبات مشخص شد که شوری سبب افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم APX در مرکبات می‌شود و به نظر می‌رسد که آسکوربات پراکسیداز آنزیمی کلیدی برای تعیین تحمل شوری در مرکبات باشد (۳۵). در سطح شوری ۱/۶ دسی‌زیمنس بر متر در اکثر ژنوتیپ‌ها افزایش در فعالیت آنزیم APX مشاهده شد. بیشترین افزایش در

1. Alscher, R., J. Donahue and C. Cramer. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. *Physiologia Plantarum* 100: 224-233.
2. Arbona V., V. Flors, J. Jacas, P. Garcia-Agustin and A. Gomez- Cadenas. 2003. Enzymatic and non - enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiology* 44: 388-394.
3. Azooz, M. M. 2004. Proteins, sugars and ion leakage as a selection criterion for the salt tolerance of three sorghum cultivars at seedling state grown under NaCl and nicotinamide. *International Journal of Agriculture and Biology* 6(1): 27-35.
4. Banuls, J. and E. Primo-Millo. 1992. Effect of chloride and sodium on gas exchange parameters and water of citrus plants. *Physiologia Plantarum* 86:15-23.
5. Belostotsky, D. A. and B. B. Meagher 1996. A pollen, ovule, and early embryo specific poly (A) binding protein from Arabidopsis complements essential functions in yeast. *Plant Cell* 8: 1261-1275.
6. Ben-Hayyim, G. and G. A. Moore. 2007. Recent advances in breeding citrus for drought and saline stress tolerance. pp: 627-642. *In: M. A. Jenks, P. M. Hasegawa and S. M. Jain (Eds.), Advances in Molecular Breeding toward Drought and Salt Tolerant Crops.* Springer, New York.
7. Bonjoch, N. P. and P. R. Tamayo. 2001. Protein content quantification by Bradford method. pp. 283-295. *In: M. J. Reigosa Roger (Ed.), Handbook of Plant Ecophysiology Techniques.* Kluwer Academic Publishing. Netherlands.
8. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Annual Review of Biochemistry* 72: 248-254.
9. Dhingra, H. R. and P. K. Sharma. 1992. Reproductive performance of Pea (*Pisum sativum* L.) under saline conditions. *Indian Journal of Plant Physiology* 35: 204-207.
10. Dhingra, H. R. and T. M. Varghese. 1997. Flowering and sexual reproduction under salt stress. pp. 221-245. *In: P. K. Jaiwal, R. P. Singh and A. Gulati. (Eds.), Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plants.* Oxford and IBH Publishing Company. PVT. LTD., New Delhi.
11. Giannoplitis, C. N. and S. K. Ries. 1977. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
12. Golein, B. and B. Adouli. 2011. Citrus 1. Novin Poya Press, Tehran. (In Farsi).
13. Golein, B., F. Mirabbasi, V. Rabiei and R. Fifaei. 2013. Effect of salinity on chloride, sodium, potassium, chlorophyll and soluble sugars contents in citrus genotypes. *Journal of Crop Production and Processing* 3(7): 173-183. (In Farsi).
14. Golein, B., M. Mohammadian Afshar and Z. Mobraimi. 2013. Investigation of Superoxide Dismutase (SOD), enzyme activity, β -carotene, total phenol and antioxidant capacity in fruit peel of five citrus cultivars under low temperature. *Journal of Crop Production and Processing* 3(8): 177-189. (In Farsi).
15. Gomez C. A., V. Arbona, J. Jacas, E. Primo-Millo and M. Talon. 2003. Abscisic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 234-240.
16. Hafsi, C. M. Romero-Puertas, D. K. Gupta, L. A. del Río, L. M. Sandalio and C. Abdelly. 2010. Moderate salinity enhances the antioxidative response in the halophyte *Hordeum maritimum* L. under potassium deficiency. *Environmental and Experimental Botany* 69: 129-136.
17. Herpen, M. M. A., W. H. Van, J. A. M. Reijnen, P. F. M. Schranwen De Groot and G. J. Wullems. 1988. Heat shock proteins in germinating pollen of *Nicotiana tobacum* before and after heat shock. pp. 277-282. *In: M. Cresti, P. Gori and E. Pacini (Eds.), Sexual Reproduction in Higher Plants.* Springer-Verlag. Berlin – Heidelberg.
18. Hormaza, J. I. and M. Herrero. 1996. Male gametophytic selection as a plant breeding tool. *Scientia Horticulturae* 65: 321-333.
19. Inze, D. and M. V. Montagu. 2000. Oxidative Stress in Plants. TJ International Ltd, Pad Stow, Gornawall, Great Britain.
20. Jones, R. A. 1986. High salt tolerance potential in *Lycopersicon* species during germination. *Euphytica* 35: 575-582.
21. Kanlaya, K. N., D. Sakda, W. Chaisiri, B. Sumontip, K. Manit and T. Piyada. 2005. Protein profiles in response to salt stress in leaf sheets of rice seedlings. *Science Asia* 31: 403- 408.
22. Kozłowski T. T. 2007. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology Monograph* 1: 1-29.
23. Martinez-Palle, E., M. Herrero, R. Aragues and U. Suelosy Riegos, U. 1995. Salt response of seeds and pollen of five pistachio species. *Acta Horticulturae* 419: 49-54.
24. Mascarenhas, J. P. 1990. Gene activity during pollen development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 317-338.
25. Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, B. Van and F. Reusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants *Trends. Trends in Plant Science* 9: 490- 498.

26. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
27. Neto A. D. A., J. T. Prisco, J. Eneas-Filho, C. E. B. A. Abreu and E. Gomes-Filho. 2005. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 56:87-94.
28. Noreen, Z. and M. Ashraf. 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 (16): 1764-1774.
29. Ozden, M., U. Demirel and A. Kahraman. 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂ *Scientia Horticulturae* 119: 163-168.
30. Ravikumar, R. L., B. S. Patil and P. M. Salimath 2003. Drought tolerance in sorghum by pollen selection using osmotic stress. *Euphytica* 133: 371-376.
31. Seckin, B., I. Turkan, A. H. Sekmen and C. Ozfidan. 2010 The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (Sea barley grass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley). *Environmental and Experimental Botany* 69: 76-85.
32. Sharma, P. K. 1992. Study on reproductive behavior of mungbean (*Vigna radiata* L.) *Wilczek*) under saline conditions. MSc. Thesis, HAU, Hisar.
33. Sidhu, S. S. 1983. Effect of simulated acid rain on pollen germination and pollen tube growth of white spruce (*Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany* 61: 3095-3099.
34. Soleimani, A., A. R. Talaie, M. R. Naghavi and Z. Zamani. 2010. Male gametophytic and sporophytic screening of olive cultivars for salt stress tolerance. *Journal of Agricultural Science and Technology* 12: 173-180.
35. Storey, R. and R. R. Walker. 1999. Citrus and salinity. *Scientia Horticulturae* 78: 39-81.
36. Tyagi, R. K. and N. S. Rangaswamy. 1993. Screening of pollen grains vis-à-vis whole plants of oilseed Brassicas for tolerance to salt. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 343-346.
37. Yan, P., J. W. Li and L. Y. Zeng. 2006 Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Journal of Plant Growth Regulation* 49: 157-165.