

## بررسی نقاط کلیدی حساس به شوری در گندم با استفاده از فلوئورسانس سریع کلروفیل a، مکانیسم‌های دفاعی و شاخص پایداری غشا

عزت‌اله اسفندیاری<sup>1\*</sup>، واقف عنایتی<sup>1</sup>

تاریخ دریافت: 89/9/12 تاریخ پذیرش: 91/6/4  
گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه  
\*مسئول مکاتبه: Email: [esfand1977@yahoo.com](mailto:esfand1977@yahoo.com)

### چکیده

با توجه به اهمیت گندم در تغذیه جامعه بشری و پراکنش وسیع شوری در اراضی کشاورزی، رقم کرج 3 گندم نان با هدف بررسی برخی نقاط ضعف و قوت آن در پاسخ به شوری انتخاب و به روش هوا کشت پرورش یافت. پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله 4 تا 5 برگ، گیاهچه‌ها به مدت 10 روز در تنش شوری 200 میلی مولار قرار گرفتند. بعد از سپری شدن زمان مذکور میزان فلوئورسانس سریع کلروفیل a، فعالیت آنزیم‌های درگیر در مکانیسم‌های دفاعی گیاه، شاخص‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو و شاخص پایداری غشا اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان داد که فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کل و آیزوزیم‌های آن در شرایط تنش شوری تغییر معنی‌داری نداشتند. بعلاوه فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش شوری افزایش داشت. با وجود افزایش معنی‌دار آنزیم‌های جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن، این متابولیت سمی در سلول‌های برگ در اثر شوری تجمع یافت. همچنین در اثر شوری میزان پراکسیداسیون لیپیدی و شاخص پایداری غشا بطور معنی‌داری تغییر نمود. بررسی میزان سدیم و پتاسیم در رقم کرج 3 نشان داد که علی‌رغم افزایش معنی‌دار سدیم و کاهش قابل ملاحظه پتاسیم، نسبت پتاسیم به سدیم در شرایط شوری نیز بیشتر از یک بود. بررسی شاخص‌های مرتبط با فلوئورسانس سریع کلروفیل a نیز نشان داد که تنها پارامتر  $Fv/Fm$  در اثر شوری کاهش یافته‌است. لذا نتایج حاصل حاکی از آنست که گزینش ارقام متحمل به شوری تنها با استفاده از شاخص  $Fv/Fm$  چندان معتبر نبوده و بهتر است همزمان از شاخص‌های دیگر بویژه شاخص عملکرد استفاده گردد. همچنین فتوسیستم II در رقم کرج 3 حساس به شوری نیست. احتمال می‌رود که علت تجمع پراکسید هیدروژن و وقوع تنش اکسیداتیو، علی‌رغم افزایش فعالیت آنزیم‌های جمع‌آوری کننده آن ناشی از عدم افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و آیزوزیم‌های آن باشد.

واژه های کلیدی: فلوئورسانس سریع کلروفیل a، شاخص پایداری غشا، مکانیسم‌های دفاعی سلول، گندم، شوری

## Study of Key Points of Salt Response Using Rapid Chlorophyll a Fluorescence, Defense Mechanisms and Membrane Stability Index in Wheat

E Esfandiari<sup>1\*</sup> W Enayati<sup>1</sup>

Received: December 3, 2010 Accepted: August 25, 2012

<sup>1</sup>Dept. of plant agronomy and breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh

\* Corresponding author: Email: [esfand1977@yahoo.com](mailto:esfand1977@yahoo.com)

### Abstract

In attention to wheat importance in people nutrition and wide distribution of salt agricultural lands, bread wheat variety of *karaj3* were aeroponically way grown to investigate weak and power points in response to salinity. After growing the seedlings as 4-5 leaf stage, they were exposed to salt stress, 200 mM NaCl. Then, rapid chlorophyll a fluorescence, activities of enzymes involving plant defense mechanisms, indices related to oxidative stress and membrane stability index were measured. The obtained results displayed that total superoxide dismutase activity and its isozymes had no significant changes under stress conditions. In addition, activities of catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase were elevated under stress conditions. Hydrogen peroxide, a toxic metabolite, accumulated in leaf cells affecting by salt, though significant increasing of its scavenger enzymes. Also, significant alterations occurred for lipid peroxidation and membrane stability index by salt. Na and K values in variety of *karaj3* showed that K/Na ratio was more than one, however, significant increasing of Na and high decreasing of K were found. Assessing of indices related to rapid chlorophyll a fluorescence revealed that Fv/Fm parameter has been just decreased under salt. Therefore, results showed that selection of salt tolerant varieties just by Fv/Fm index was not enough reliable and it is better to apply simultaneously other indices particularly yield index. Photosystem II was not susceptible to salinity in *Karaj3* variety, too. It seems lack of increased activity of superoxide dismutase and its isozymes was the probable factor for accumulation of hydrogen peroxide and oxidative stress initiation, in spite of increased its scavenging enzymes activity.

**Key words:** Membrane stability index, Plant defense mechanisms, Rapid chlorophyll a fluorescence, Wheat, Salinity.

2002). در بیشتر خاک‌های شور عامل اصلی ایجاد شوری مقادیر بالای کلرید سدیم است (زورب و همکاران 2006). وجود مقادیر بالای این ترکیب در خاک سبب ایجاد تنش‌های یونی و اسمزی در گیاهان می‌گردد

مقدمه

شوری یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که جوانه‌زنی، رشد، تولید و کیفیت گیاهان زراعی از جمله گندم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (سیرم و همکاران

برخوردار هستند که می‌توان به چرخه‌های مه‌لر (آسادا 2000)، گلو تاتیون-آسکوروبات (ادروا 2005)، گزانتوفیل، مسیر آلترناتیو اکسیداز (ادروا 2005)، تغییر حالت تیلاکوئید (اورت 2002) و تنفس نوری (ادروا 2005) اشاره نمود. سلول‌های گیاه با اجرای این مکانیسم‌ها سعی دارند که پتانسیل ردوکس سلول را تعدیل نماید. 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 آنتی اکسیدان و آنزیم‌های آنها تشکیل شده‌است. از آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلو تاتیون ردوکتاز، آسکوروبات پراکسیداز، مونو دهیدرو آسکوروبات ردوکتاز و دهیدرو آسکوروبات ردوکتاز اشاره کرد. کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، آسکوروبات، گلو تاتیون و توکوفرول از جمله مهمترین آنتی اکسیدان‌ها محسوب می‌شوند (احمد و همکاران 2009).

یکی از واکنش‌های بسیار معمول گیاهان به تنش شوری کاهش میزان فتوسنتز آنهاست (کائو و همکاران 2006). کاهش در میزان فتوسنتز ممکن است ناشی از بسته شدن روزنه‌ها در اثر تنش شوری باشد. همچنین این عمل می‌تواند در پی بروز آسیب به دستگاه‌های فتوسنتزی (کاهش بیوسنتز کلروفیل و یا افزایش تجزیه کلروفیل، کاهش کارایی انتقال الکترون در زنجیر و آسیب به کمپلکس‌های برداشت کننده نور) رخ دهد (سانتوس 2004). سطوح بالای شوری با تحت تاثیر قرار دادن و کاهش انتقال انرژی از رنگیزه‌ها به مراکز واکنشی فتوسیستم II منجر به افزایش میزان فلئوئورسانس کلروفیلی می‌گردد. امروزه از این شاخص برای ارزیابی اثر تنش‌ها روی فتوسیستم II استفاده می‌گردد (عزیزپور و همکاران 2010).

شوری عامل محدودیت در 930 میلیون هکتار از اراضی دنیا محسوب می‌گردد که هر ساله نیز این میزان در حال افزایش است (مونس 2002). در ایران نیز

(مونس و تستر 2008). بروز تنش یونی در گیاهان در نتیجه تجمع عناصر سدیم و کلر در خاک است. در خاک‌های شور، سدیم مانع از جذب عناصر ضروری پتاسیم، کلسیم و منیزیم می‌شود. کلر نیز مانع از جذب نیترات می‌گردد (منصور و همکاران 2005). بدین ترتیب، کمبود عناصر ضروری مورد نیاز متابولیسم گیاه اتفاق می‌افتد.

تنش اسمزی، دیگر تنش ثانویه حاصل از شوری است که سبب کاهش جذب آب و تبادلات گازی در گیاهان می‌شود. مجموع اثرات تنش شوری، تنش اسمزی و یونی، منجر به وقوع تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی خواهد شد که ناشی از افزایش تولید انواع اکسیژن فعال است. انواع اکسیژن فعال از احیای ناقص اکسیژن اتمسفری در فرآیندهای حیاتی سلول نظیر فتوسنتز، تنفس و تنفس نوری تولید می‌شود (میتلر 2002). از جمله مهمترین انواع اکسیژن فعال می‌توان به رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن نوزاد اشاره نمود (ادروا 2005). این ترکیب‌ها به مولکول‌های حیاتی سلول مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه وارد می‌کند (ادروا 2005). در بین بخش‌های کلیدی سلول و اندامک‌ها، غشاها از اولین محل‌های آسیب به شمار می‌آیند. در تنش شوری میزان اسیدهای چرب اشباع بکار رفته در ساختار غشاها افزایش می‌یابد. بعلاوه این تنش ضمن تغییر در ترکیب پروتئین‌های بکار رفته در غشاها، کاهش کارایی آنها را نیز در پی دارد. تغییر در ساختار غشا و ترکیب آن منجر به افزایش نفوذپذیری غشا خواهد شد. برآیند این عوامل منجر به کاهش نفوذپذیری انتخابی غشا خواهد شد. بدین ترتیب دو طرف غشا به تعادل رسیده و در نهایت به مرگ سلول منجر خواهد شد (منصور و همکاران 2005).

سلول‌های گیاهی جهت مقابله با اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال از یکسری مکانیسم‌های دفاعی

0/2 و 0/1 میکرومولار استفاده شدند (اسفندیاری و همکاران 2010).

گیاهچه‌های گندم تا مرحله 2-3 برگی با محلول 50% و بعد از آن با محلول غذایی کامل تغذیه شدند. بعلاوه pH محلول مورد استفاده در محدود 5/2-5/5 تنظیم و هر روز کنترل گردید (اسفندیاری و همکاران 2010). در طول دوره رشد بوته‌های گندم، دمای محیط  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ، طول دوره روشنایی 14 ساعت و شدت نور 2500 لوکس بود (اسفندیاری و همکاران 2010). بعد از رسیدن گیاهچه‌های گندم به مرحله 4-5 برگی، آنها به دو گروه شاهد (ترکیب عناصر غذایی یاد شده) و تنش شوری (200 میلی‌مولار کلرید سدیم در محلول غذایی مذکور) تقسیم و به مدت 10 روز در شرایط ذکر شده نگهداری شد. سپس از برگ‌های جوان و بالغ، نمونه برگی تهیه و بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. نمونه‌های برگی تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر در دمای  $20^\circ\text{C}$  نگهداری شدند (اسفندیاری و همکاران 2009).

#### استخراج آنزیمی

جهت استخراج آنزیم‌های آنتی اکسیدان، 0/5 گرم از نمونه برگی در 5 میلی‌لیتر بافر فسفات سرد 100 میلی‌مولار (pH 7/5) محتوی EDTA 0/4 میلی‌مولار، آسکوربات 3 میلی‌مولار، پلی وینیل پیرولیدین 5% (وزنی-حجمی) قرار داده شد. نمونه‌های هموژن حاصل در 16000g و دمای  $4^\circ\text{C}$  به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شدند. از سوپرناتانت حاصل جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان استفاده گردید (اسفندیاری و همکاران 2009).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان:

فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، اسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به ترتیب براساس روش‌های مارتینز و همکاران (2001)،

طبق گزارش کافی (1387) 50 درصد اراضی کشاورزی فاریاب تحت تاثیر انواع اثرات شوری قرار دارند. همچنین طبق این گزارش ایران بعد از چین، هند و پاکستان بیشترین اراضی شور را در سطح جهانی داراست. از طرفی گندم گیاهی است که نقش بسیار مهمی در تغذیه مردم کشور ایفا می‌کند که شوری می‌تواند با کاهش عملکرد آن امنیت غذایی موجود را به‌خطر بیندازد. لذا با توجه به اثرات منفی تنش شوری بر عملکرد و به‌خطر انداختن امنیت غذایی شناخت الگوی رفتاری گیاهان در راستای غلبه بر محدودیت‌های ناشی از آن الزامی است. در پژوهش انجام شده توسط سادات قزاقی (1388) رقم کرج 3 در بین 50 رقم گندم مورد بررسی بعنوان رقم متحمل به شوری معرفی گردیده است. درحالی‌که مقادیر بالای کلرید سدیم بر روی رشد و نمو و مکانیسم‌های دفاعی این رقم اثرات منفی داشته‌است. لذا جهت شناخت نقاط حساس به شوری رقم مذکور، بذور آن کشت و در مرحله گیاهچه‌ای بعد از قرار گرفتن در معرض کلرید سدیم 200 میلی‌مولار به مدت 10 روز الگوی رفتاری آن با استفاده از برخی پارامترهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

در این پژوهش بذور یکنواخت رقم کرج 3 گندم نان انتخاب و به روش هواکشت در شرایط کنترل شده پرورش یافت. ترکیب عناصر غذایی پر مصرف مورد استفاده در طول دوره رشد گیاهچه‌های گندم عبارت بود از: نیترات کلسیم، نیترات پتاسیم، سولفات منیزیم و مونو پتاسیم فسفات. این عناصر به ترتیب در مقادیر 2/5، 3، 1/5 و 0/17 میلی‌مولار بکار رفتند. عناصر غذایی کم مصرف شامل سولفات آهن، اسید بوریک، سولفات منگنز، سولفات روی، سولفات مس و اسید مولیبدیک بودند که به ترتیب در مقادیر 0/4، 5، 23، 50،

گردید که به ترتیب بیانگر میزان فلئورسانس در زمان‌های مذکور بوده و با علامت  $F_{30ms}$ ,  $F_{2ms}$ ,  $F_{300\mu s}$ ,  $F_{50\mu s}$  نشان داده شد. در جریان‌ات مشخص، به ازای هر مرکز واکنشی شامل میزان انرژی جذبی به مرکز واکنشی (ABS/RC)، میزان به دام افتادن انرژی به مرکز واکنشی ( $TR_0/RC$ )، میزان جریان الکترون به مرکز واکنشی ( $ET_0/RC$ ) و میزان هدر رفت انرژی به مرکز واکنشی ( $DI_0/RC$ ) از تئوری جریان انرژی در غشاهای زیستی استخراج و با استفاده از منحنی-OJIP test محاسبه گردید (گونکالوز و همکاران 2007).

همچنین پارامترهای زیر نیز توسط دستگاه مذکور بدست آمد:

1) تراکم مرکز واکنشی به مقطع عرضی (CS/CS)، 2) حداکثر عملکرد کوانتومی اولیه  $PS II$  ( $ET_0/ABS$ )، 3)  $\phi_{P_0}$  حداکثر عملکرد خاموشی غیر فتو شیمیایی ( $\phi_{D_0} = DI_0/ABS$ ) 4) احتمال اینکه یک الکترون به دام افتاده ( $\psi_0 = ET_0/ABS$ ) یا فوتون جذب شده ( $\phi_{E_0} = ET_0/ABS$ ) می‌تواند یک الکترون را به ناقل‌های بعد از  $Q_A$  انتقال دهد (استراسر و همکاران 2000).

شاخص عملکرد (PI) نیز از دیگر شاخص‌های بیوفیزیک است که از ترکیب تعدادی شاخص‌های ساختاری - عملکردی حاصل می‌گردد. هنگامی که این شاخص بر پایه میزان کلروفیل آنتن فتوسیستم II بیان می‌شود می‌توان آنرا به شکل زیر نمایش داد:

$$PI_{ABS} = (RC/ABS) * [\rho_{p0}/(1-\rho_{p0})] * [\psi_0/(1-\psi_0)]$$

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تجزیه آماری داده‌های حاصل، پس از بررسی یکنواختی واریانس‌ها در شرایط شاهد و شوری، میانگین پارامترها و صفات مورد اندازه‌گیری در دو محیط مذکور از طریق آزمون t مناسب مورد بررسی قرار گرفت. در این ارتباط از نرم افزار SPSS نسخه 16 استفاده گردید.

ابی (1984)، یوشیمورا و همکاران (2000) و مارتینز و همکاران (2001) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پروتئین کل، میزان پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون لیپیدی و مرگ سلولی پروتئین کل براساس روش بردفورد (1976)، میزان پراکسید هیدروژن به روش سرژیو و همکاران (1997) و میزان پراکسیداسیون لیپیدی براساس روش استوارت و بولی (1980) اندازه‌گیری شدند.

#### اندازه‌گیری عناصر سدیم و پتاسیم

میزان عناصر سدیم و پتاسیم بر اساس روش مورد اشاره توسط عزیزپور و همکاران (2010) و با استفاده از دستگاه فیلم فتومتر (Jenway PFP7, UK) اندازه‌گیری شد.

#### اندازه‌گیری فلئورسانس سریع کلروفیل a:

فلئورسانس سریع کلروفیل a در برگ‌های سالم و کاملاً رشد یافته با استفاده از دستگاه Handy PEA (مدل Hansatech UK) اندازه‌گیری شد. برگ‌های انتخاب شده با استفاده از کلیپس‌های مخصوص به مدت 15 دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. این زمان پس از آزمایش زمان‌های مختلف تعیین شد. این دوره تاریکی جهت باز شدن کامل مراکز واکنشی موجود الزامی است. سپس به این برگ‌ها به مدت 4 ثانیه یک پالس نوری در طول موج 650 نانومتر با شدت 3000 میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه تابیده شد. نشر فلئورسانس تا 2 میلی‌ثانیه با فواصل زمانی 10 میکروثانیه و سپس با فواصل زمانی یک میلی‌ثانیه ثبت شد. سپس با استفاده از نرم افزار ویژه دستگاه (Handy PEA Software V1.30, 2001) پارامترهای OJIP از مقادیر متغیر فلئورسانس در زمان‌های 50، 300 میکروثانیه و 2 و 30 میلی‌ثانیه ثبت

## نتایج و بحث

بطور ناخواسته فعال یا غیرفعال شده و سبب بروز اختلالات متابولیسمی می‌شود (مارتینز و همکاران 2001).

در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن با فعالیت آنزیم‌های جمع‌آوری کننده آنها در این پژوهش، فرم‌های مذکور اکسیژن فعال تجمع می‌یابد (اسفندیاری و همکاران، 1387). تجمع رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن سبب اجرای واکنش هابر - ویز شده و رادیکال فوق‌العاده خطرناک هیدروکسیل بوجود می‌آید (میتلر 2002). در صورتیکه در شرایط کمبود آهن گزارش شده‌است که علی‌رغم تجمع پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید به همراه عدم افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش اکسیداتیو شدیدی اتفاق نیفتاده‌است (تویری و همکاران 2005). آنها این نتیجه را ناشی از عدم تولید رادیکال هیدروکسیل دانسته‌اند. یکی از نقاط اصلی آسیب به سلول توسط انواع اکسیژن فعال بویژه رادیکال هیدروکسیل غشاهاست. غشاهای دارای نفوذپذیری انتخابی بوده و مانع از به تعادل رسیدن دو طرف آن می‌گردد. اکسیدان‌ها نیز همواره نقاط حساس و کلیدی را هدف قرار داده و سعی بر ایجاد اختلال در متابولیسم سلول دارند. افزایش میزان مالون دی‌آلدئید (شکل 9) و کاهش شاخص پایداری غشا (شکل 10) نشان دهنده آسیب به غشاهای بیولوژیک می‌باشد.

شاخص پایداری غشا معیاری برای ارزیابی آسیب به پلاسمالماست. هرچه آسیب به آن کمتر، میزان نشت الکترولیتی نیز کمتر بوده و در نتیجه ویژگی نفوذ پذیری انتخابی آن حفظ شده و از تنش کمتر متاثر می‌شود (عزیزپور و همکاران 2010). برخی از محققین (منصور و استالدمن 1994، منصور و سلاما 1996) گزارش کرده‌اند که شاخص پایداری غشا در ارقام متحمل به شوری در مقایسه با ارقام حساس به آن در محیط‌های شور پایداری بیشتری داشته و کمتر آسیب

نتایج حاصل نشان داد که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز کل (شکل 1) و آیزوزیم‌های آن (شکل‌های 2، 3 و 4) از تنش شوری متاثر نشده‌است. از طرفی در شرایط تنش شوری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (شکل 5)، آسکوربات پراکسیداز (شکل 6) و گایاکول پراکسیداز (شکل 7) بعنوان مهمترین آنزیم‌های جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن نسبت به شاهد بطور معنی‌داری افزایش یافت. لذا انتظار می‌رود که ترکیب سمی و خطرناک پراکسید هیدروژن بطور موثری تحت کنترل بوده و تجمع آن در شرایط تنش شوری اتفاق نیفتد. در حالیکه میزان این ترکیب برخلاف انتظار افزایش چشمگیری داشت (شکل 8). احتمال می‌رود علت تجمع پراکسید هیدروژن ناشی از عدم افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کل و آیزوزیم‌های آن در طی تنش شوری باشد (اشکال 1، 2، 3 و 4) که در نتیجه آن رادیکال سوپراکسید در گیاه تجمع می‌یابد. مقادیر بالای رادیکال یاد شده سبب کاهش و یا توقف فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز می‌گردد. علاوه بر این رادیکال مذکور اسیدهای آمینه تریپتوفان، هیستیدین و متیونین را اکسیده می‌کند (نیل و همکاران 2002). اسید آمینه تریپتوفان در بیوسنتز اسید نیکوتینیک شرکت می‌کند. فرم آمید این اسید در ساختار کوآنزیم‌های  $NAD^+$  و  $NADP^+$  بکار می‌رود. لذا آسیب به اسید آمینه یاد شده سبب کاهش حجم خزانه کوآنزیم‌های ذکر شده بعنوان ناقل‌های زنجیر انتقال الکترون میتوکندری و کلروپلاست خواهد شد (اسفندیاری و همکاران 1388). همچنین، پراکسید هیدروژن در مقادیر بالا روی فعالیت آیزوزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، Fe-SOD و Cu/Zn-SOD، اثر بازدارندگی دارد (فرایدویچ 1389). پراکسید هیدروژن، علاوه بر کاهش فعالیت آنزیم یاد شده، یک اکسیدان قوی است که سبب اکسیده شدن گروه‌های تیولی می‌گردد (نیل و همکاران 2002). در پی این عمل آنزیم‌ها

تنش شوری این نسبت از 4/92 در شاهد به 1/32 در شوری کاهش یافته است.

#### پارامترهای فلوتورسانس کلروفیل a

در بررسی اثرات شوری بر فلوتورسانس سریع کلروفیل a پارامترهای ذکر شده در جدول 1 مورد ارزیابی قرار گرفتند که بین آنها تنها شاخص Fv/Fm در شوری کاهش یافت. منحنی OJIP حاوی اطلاعات بسیار زیادی است. بطوریکه از آن برای بدست آوردن پارامترهای متعددی استفاده می شود. از جمله می توان به فلوتورسانس کلروفیل در زمان های 50، 100 و 300 میکروثانیه و 2 و 30 میلی ثانیه اشاره کرد. همچنین حجم خزانه کینون ها به همراه کمی کردن مرحله به مرحله جریان انرژی در فتوسیستم II از دیگر پارامترهای حاصل از این منحنی می باشد. نسبت جذب انرژی به مرکز واکنشی (ABS/RC) نشان دهنده حجم آنتن عملکردی است. بعبارت دیگر می توان آنرا به معنای میزان جذب نور به ازای هر مرکز واکنشی فعال دانست (گونکالوز و همکاران 2007). این نسبت در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد تغییر معنی داری نداشت (جدول 1). ثابت بودن این نسبت نشان می دهد که در شرایط شوری همچنان مراکز واکنشی بفرم فعال خود باقی مانده اند. ثابت بودن نسبت مراکز واکنشی فعال به مقطع عرضی برگ (RC/CS) تأییدی بر این موضوع است (جدول 1). همچنین میزان انرژی به دام افتاده به مرکز واکنشی (TR<sub>o</sub>/RC) در هر دو شرایط شاهد و شوری ثابت بود (جدول 1). در این رقم نیز شاخص جریان الکترون به ازای مرکز واکنشی (ET<sub>o</sub>/RC) در شرایط شوری ثابت ماند (جدول 1). ثابت بودن میزان انرژی جذب شده به مرکز واکنشی، حجم خزانه کینون ها و فعال باقی ماندن مراکز واکنشی موجود مانع از کاهش جریان الکترون نسبت به شاهد در شرایط شوری گردید. به همین دلیل هدر رفت انرژی

می بینند. افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش پایداری غشا به همراه تجمع پراکسید هیدروژن، نشانگر بروز تنش اکسیداتیو در اثر شوری در رقم کرج 3 است.

در این پژوهش میزان سدیم در شرایط تنش شوری افزایش یافت (شکل 11). درحالیکه میزان پتاسیم کاهش داشت (شکل 12). نتایج مشابهی نیز توسط برخی از پژوهشگران گزارش شده است (سیرم و همکاران 2002، عزیزپور و همکاران 2010). وجود مقادیر بالای پتاسیم در شرایط شوری حاکی از توانایی گیاه در حفظ این عنصر در محیط های شور می باشد. بعلاوه میزان بالای پتاسیم در برگ نشانگر متحمل به شوری بودن گیاه باشد (الهنداوی و همکاران 2005). شایان ذکر است که محققان زیادی (یو و فلاورز 1983، گرامر و همکاران 1994، لیدی و سایز 1997) نیز در گیاهان مختلف گزارش کرده اند که میزان تحمل به شوری صرفاً به میزان سدیم موجود در برگ بستگی ندارد. بطوریکه مونس و جیمز (2003) نیز وجود مقادیر بالای سدیم را در چندین رقم مقاوم به شوری گندم تتراپلوئید گزارش کرده اند. توانایی تحمل به شوری توسط این ارقام ممکن است ناشی از توانایی آنها در ذخیره سازی یون های سمی در واکوئل ناشی شده باشد. در رقم کرج 3 نیز این احتمال وجود دارد که این رقم بتواند سدیم را در واکوئل ذخیره نموده و به این شکل از بروز سمیت آن در سیتوسول پیشگیری نماید. وجود این توانایی برای گیاه این فرصت را فراهم می کند که علی رغم جذب بیشتر سدیم و کاهش میزان پتاسیم موجود در برگ، عنصر سمی از محل فعالیت های کلیدی متابولیسم دور باشد. بعلاوه شاخص فیزیولوژیک مهم دیگر نسبت پتاسیم به سدیم است. اگر نسبت مذکور در گیاهان غیرهالوفیت در شرایط شوری بیشتر از یک باشد نشان می دهد که متابولیسم سلول در شرایط نرمال بوده و اختلالات متابولیسمی اتفاق نمی افتد (وین جونز و همکاران 1979). در این رقم نیز با اعمال

شرایط یکسان بود (جدول 1). همچنین افزایش فلئورسانس کلروفیل در 2 میلی ثانیه نشان دهنده تجمع  $Q_A^-$  می باشد (گونکالوز و همکاران 2007). این شاخص نیز در شرایط شوری ثابت بود (جدول 1). تمامی موارد فوق عدم کاهش جریان الکترون به میزان انرژی به دام افتاده را در شرایط شوری تأیید می نمایند.  $\Phi_{E0}$  پارامتری است که نشان دهنده میزان جریان الکترون به میزان انرژی جذبی می باشد. به عبارت دیگر شاخص مذکور بیانگر احتمال انتقال الکترون به ناقل های بعد از  $Q_A^-$  توسط انرژی فوتون جذبی است (وان هیردن 2003). این شاخص در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد ثابت بود (جدول 1).

شاخص عملکرد (PI<sub>ABS</sub>) در تنش شوری نیز نسبت به شاهد بدون تغییر بود که این امر احتمالاً نشان می دهد که بازدارندگی نوری در شرایط تنش شوری در رقم کرج 3 اتفاق نمی افتد (جدول 1). شاخص عملکرد پارامتری است که سه فاکتور درگیر در مراحل عملکردی فتوسنتز، شامل تعداد مراکز واکنشی موجود در بستر کلروفیل، میزان بدام انداختن انرژی برانگیخته و میزان تبدیل انرژی برانگیخته به انتقال الکترون، را به یک فاکتور چند متغیره تبدیل می کند (تسیمیلی و همکاران 2000). این شاخص نشان دهنده برآیند فاکتورهای  $\Psi_0$ ،  $\Phi_{P0}$  و RC/ABS می باشد (اسریواستاوا و همکاران 1999).

شاخص عملکرد یک شاخص مطلوب برای ارزیابی عملکرد گیاه در مورد جذب انرژی نوری، بدام انداختن انرژی برانگیخته و تبدیل انرژی برانگیخته به انتقال الکترون بوسیله فتوسنتز در شرایط تنش های محیطی نظیر شوری، خشکی، گرما و غیره می باشد (میشرا و همکاران 2001، استراتوس و همکاران 2006). در میان پارامترهایی که منجر به کاهش شاخص عملکرد می شوند می توان به غیرفعال شدن تعداد زیادی از مراکز واکنشی فعال در سطح برگ، شدت بالای انرژی نوری، کاهش پارامتر حداکثر عملکرد کوانتومی

در مسیرهای فرعی به شکل گرما و تولید انواع اکسیژن فعال نسبت به شاهد بدون تغییر ماند.

#### عملکردها و شاخص کارایی

$\Phi_{P0}$  یا  $Fv/Fm = TR_0/ABS$  نشان دهنده حداکثر کارایی فتوسیستم II است. افت این شاخص نشان دهنده بروز بازدارندگی نوری در اثر تنش های محیطی می باشد (کوچوا و همکاران 2004، گونکالوز و همکاران 2007). از جمله عوامل کنترل کننده این شاخص می توان به فتوشیمی اولیه فتوسیستم II (شامل جدا کردن شارژ، ترکیب و پایداری)، از دست دادن انرژی برانگیخته در آنتن های برداشت کننده نور به شکل غیر تشعشعی و خاموشی مولکول های برانگیخته با استفاده از احیای مولکول های پلاستوکینون اکسید موجود در خزانه کینون ها اشاره کرد (لازار 2003). در رقم کرج 3 در شرایط تنش شوری علی رغم کاهش  $Fv/Fm$  (جدول 1)، شاخص  $\Phi_{D0}$  نسبت به شاهد تغییر معنی داری نداشته است. افزایش  $\Phi_{D0}$  می تواند با افزایش منابع گرما ارتباط داشته باشد. منابع گرما ممکن است انرژی نوری را همانند مراکز واکنشی فعال جذب کنند. اما قادر به ذخیره انرژی برانگیخته به شکل انرژی ردوکس نیستند و انرژی کل دریافتی را به شکل گرما به هدر می دهند (هانکامر و همکاران 1997). بعلاوه در اثر انرژی مازاد، انتقال انرژی به دیگر سیستم ها نظیر تولید انواع اکسیژن فعال وابسته به انرژی اتفاق خواهد افتاد (استراسر و همکاران 2000).

کاهش  $\Psi_0$  یا  $ET_0/TR_0$  نشان دهنده کاهش در حجم خزانه پلاستوکینون در فرم اکسید آن می باشد. یا اینکه از برگشت فرم احیای کینون ( $Q_A^-$ ) به فرم اول خود ممانعت می گردد (فورس و همکاران 2003). شاخص مذکور در شرایط تنش شوری نسبت به شاهد ثابت بود (جدول 1). بعلاوه سطح زیر منحنی بعنوان شاخص ارزیابی حجم خزانه کینون ها نیز در هر دو



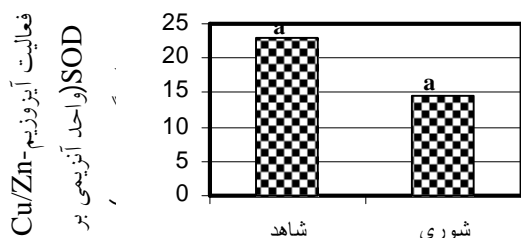
سانتوز 2005). بنابراین برای ارزیابی پاسخ فتوسیستم II به شرایط تنش، شاخص عملکرد پارامتر بهتری نسبت به  $\Phi_{P0}$  محسوب می‌شود.

به عنوان نتیجه کلی می‌توان اظهار داشت که علی‌رغم حساسیت فتوسیستم II به تنش شوری در رقم کرج 3 فتوسیستم II از این تنش متأثر نشده است. بعلاوه در بررسی اثرات شوری روی فتوسیستم II تنها استفاده از شاخص  $Fv/Fm$  قابل اعتماد کامل نبوده و بهتر است از دیگر شاخص‌های مرتبط بویژه شاخص عملکرد استفاده گردد. در رقم کرج 3 میزان پراکسیداسیون لیپیدی افزایش یافت ولی شاخص پایداری غشا کاهش نشان داد که این نتیجه نشان دهنده بروز تنش اکسیداتیو در اثر شوری می‌باشد. همچنین غشاهای بیولوژیک نقطه حساس به شوری در رقم مذکور می‌باشد. احتمال می‌رود عامل اصلی وقوع تنش اکسیداتیو، آسیب به غشاهای و تجمع پراکسید هیدروژن عدم افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز کل و آیزوزیم‌های آن باشد.

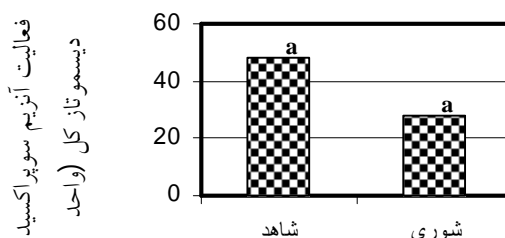
فتوسیستم II و کاهش شدت جریان الکترون به بعد از  $Q_A^-$  اشاره کرد. بعلاوه مقادیر کم  $RC/CS$  و  $\Phi_{P0}$  نشان می‌دهد که بخش بزرگی از انرژی جذب شده به شکل گرما و فلوئورسانس به هدر داده خواهد شد. شاخص عملکرد علاوه بر نشان دادن میزان عملکرد فلوئورسانس در محدوده‌های انتهایی  $F_0$  و  $F_m$ ، قادر است در نقاط حدواسط آنها مانند مرحله  $J$  میزان فلوئورسانس را نشان دهد. همچنین با استفاده از این شاخص می‌توان شبیهی که فلوئورسانس بروز می‌نماید را نیز مشخص نمود (استراثوس و همکاران 2006). درحالی‌که  $\Phi_{P0}$  یا  $Fv/Fm$  تنها فلوئورسانس  $F_0$  و  $F_m$  را بطور مستقل در زمانی‌که به حداکثر مقدار خود می‌رسد را نشان می‌دهد (استراثوس و همکاران 2006). شاخص عملکرد اجازه تجزیه همه جانبه عملکرد فتوسنتزی را فراهم می‌آورد. بطوری که با استفاده از این پارامتر می‌توان ارتباط بین کارایی جذب فوتون و تصرف انرژی برانگیخته در فتوسیستم II، تراکم تعداد مراکز واکنشی و احتمال انتقال الکترون به بعد از  $Q_A^-$  توسط انرژی برانگیخته را بررسی کرد (گونکالوز و

جدول 1- اثرات تنش شوری بر روی فلئورسانس اولیه (Fo)، شدت فلئورسانس در زمان‌های 50 میکروثانیه (نقطه O)، 100، 300 میکروثانیه و 2 میلی‌ثانیه (نقطه I) و 30 میلی‌ثانیه (نقطه J)، فلئورسانس متغیر (Fv)، فلئورسانس حداکثر (Fm)، سطح زیر منحنی OJIP، میزان مرکز واکنشی فعال به ازای مقطع عرضی برگ، حداکثر کارایی اولیه فتوسیستم II، حداکثر کارایی خاموشی غیرفتوشیمیایی، احتمال جریان الکترون به ناقل بعد از QA به ازای انرژی به‌دام افتاده (ET<sub>o</sub>/TR<sub>o</sub>(Ψ<sub>o</sub>)) یا فوتون جذبی (ET<sub>o</sub>/ABS(φE<sub>o</sub>)) و شاخص عملکرد (PI) در رقم کرج 3.

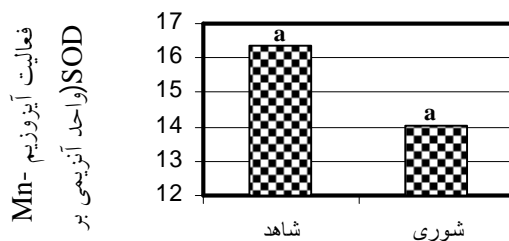
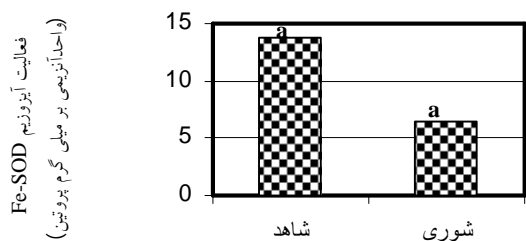
شاهد	تنش	شاهد
Fo	92/25±29/39a	75/80±6/97b
F50μs (O)	99/2±4/86a	93/4±4/10a
F100μs	100/73±4/33a	94/67±4/84a
F300μs	107/93±5/57a	101/33±5/82a
F2mS (J)	153/27±10/06a	145/33±7/19a
F30mS (I)	297/07±17/08a	277/87±16/55a
Fm	306/5±84/19a	354/47±38/10a
Fv	335/73±18/98b	278/67±31/73a
Area	21080/0±3260/85a	19053/33±1579/27a
Fv/Fm	0/676±0/127b	0/786±0/009a
RC/CS	139/34±16/02a	137/78±16/99a
TRo/ABS( φPo)	328/00±9/ 94a	339/067±9/994a
DIo/ABS(φDo)	0/209±0/011a	0/214±0/007a
ETo/TRo(Ψo)	17426/0±1609/06a	16760/0±1609/81a
ETo/ABS(φEo)	0/668±0/028a	0/659±0/012a
PI <sub>ABS</sub>	18/90±1/69a	21/93±1/70a



شکل 2- اثر تنش شوری بر فعالیت آیزوزیم Cu/Zn- SOD در رقم کرج 3

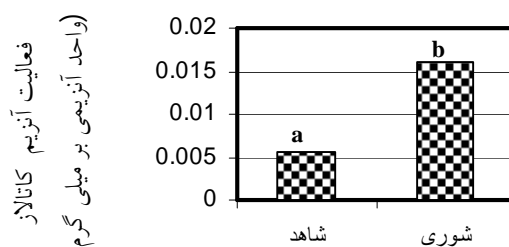
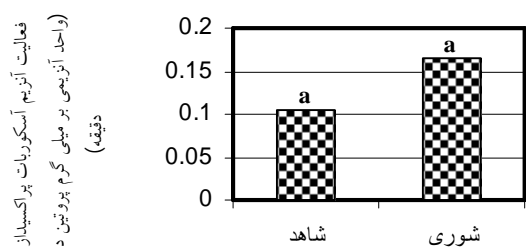


شکل 1- اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کل در رقم کرج 3



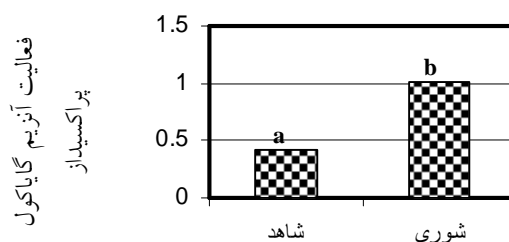
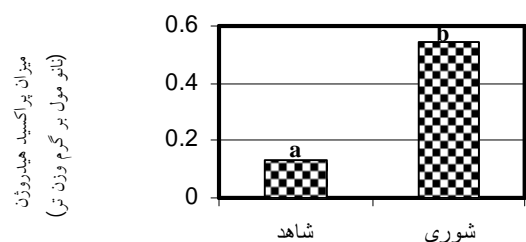
شکل 4- اثر تنش شوری بر فعالیت آیزوزیم Fe-SOD در رقم کرج 3

شکل 3- اثر تنش شوری بر فعالیت آیزوزیم Mn-SOD در رقم کرج 3



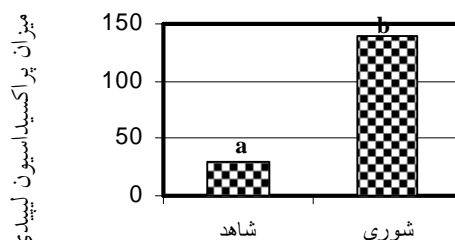
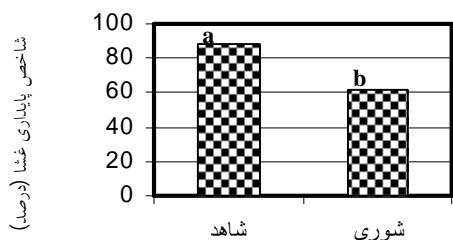
شکل 6- اثرات تنش شوری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم کرج 3

شکل 5- اثرات تنش شوری بر فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم کرج 3



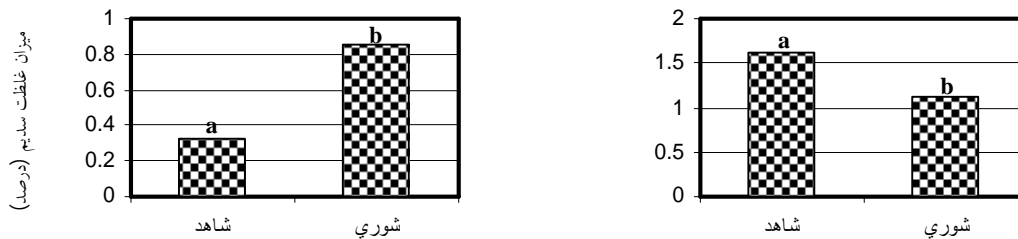
شکل 8- اثر تنش شوری بر میزان پراکسید هیدروژن در رقم کرج 3

شکل 7- اثرات تنش شوری بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در رقم کرج 3



شکل 10- اثر تنش شوری بر میزان شاخص پایداری غشا در رقم کرج 3

شکل 9- اثر تنش شوری بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی در رقم کرج 3



شکل 11- اثر تنش شوری بر میزان غلظت پتاسیم در رقم کرج 3  
 شکل 12- اثر تنش شوری بر میزان غلظت سدیم در رقم کرج 3

### منابع مورد استفاده

- اسفندیاری، ع، س محبوب و ف شکاری. 1387. اثرات مخرب انواع اکسیژن فعال، مکانیسم های محافظتی گیاه و ضرورت توجه به آن. مقالات کلیدی دهمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، کرج. صفحه های 22-1.
- اسفندیاری، ع، س محبوب و ف شکاری. 1388. اصول فیزیولوژی گیاهی (جلد اول). انتشارات عمیدی. تبریز
- سادات قزاقی، س. 1388. بررسی تنوع تحمل به شوری ارقام گندم با استفاده از مارکرهای مولکولی. پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات. دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی.
- Aebi H, 1984. Catalase in vitro. *Method of Enzymology* 105:121-126.
- Ahmed P, Jaleel C, Azooz M and Gowher N, 2009. Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. *Botany Research International* 2: 11-20.
- Asada K, 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 355:1419-1431.
- Azizpour K, Shakiba MR, Khosh Kholgh Sima NA, Alyari H, Moghaddam M, Esfandiari E and Pessarakli M, 2010. Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. *Journal of plant nutrition* 33: 859-873.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Breusegem FV, Vranova E, Dat JF and Inze D, 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161:405-414.
- Cramer GR, Alberico GJ and Schmidt C, 1994. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. *Australian Journal of Plant Physiology* 21: 675-692.
- Edreva A, 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 119-133.
- El-Hendawy SE, Hu Y and Schmidhalter U, 2005. Growth, ion content, gas exchange, and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerances. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 123-134.

- Esfandiari E, Alavi-Kia SS, Bahmani A and Aazami MA, 2009. The effect of light on ROS-scavenging systems and lipid peroxidation under cold conditions in saffron (*Crocus sativus* L.). *African Journal of Agricultural Research* 4: 378-382.
- Esfandiari E, Shokrpour M and Alavikia SS, 2010. Effect of Mg deficiency on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation. *Journal of Agricultural Science* 3: 131-136.
- Force L, Critchley C and Rensen J, 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis Research* 78: 17-33.
- Fridovich I, 1989. Superoxide dismutases: An adaptation to a paramagnetic gas. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 7761-7764.
- Goncalves J and Santos UM, 2005. Utilization of the chlorophyll a fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to environment of high irradiance. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 307-313.
- Goncalves J, Santos U, Nina A and Chevreuril L, 2007. Energetic flux and performance index in copaiba (*Copaifera multijuga* Hayna) and mahogany (*Swietenia macrophylla* King) seedling grown under two irradiance environments. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 171-184.
- Hankamer B, Barber J, Boekema E, 1997. Structure and membrane organization of photosystem II from green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 641-672.
- Kao WY, Tsai T, Tsai H and Shih CN, 2006. Response of three glycine species to salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 56: 120-125.
- Kocheva K, Lambrev P, Georgiev G, Goltsev V and Karabaliiev M, 2004. Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress. *Bioelectrochemistry* 63: 121-124.
- Lazar D and Ilik P, 1997. High temperature induced chlorophyll fluorescence changes in barley leaves: comparison of the critical temperatures determined from fluorescence induction and from fluorescence temperature curve. *Plant Science* 124: 159-164.
- Leidi E and Saiz JF, 1997. Is salinity tolerance related to Na<sup>+</sup> accumulation in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings? *Plant and Soil* 190: 67-75.
- Mansour MMF and Stadelmann EJ, 1994. NaCl-induced changes in protoplasmic characteristics of *Hordeum vulgare* cultivars differing in salt tolerance. *Physiologia Plantarum* 91: 389-394.
- Mansour MMF and Salama K, 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany* 52: 113-122.
- Mansour MMF, Salama K, Ali F and Abou Hadid A, 2005. Cell and plant responses to NaCl in *Zea mays* L. cultivars differing in salt tolerance. *General and Applied Plant Physiology* 31: 29-41.
- Martinez CA, Loureiro M, Oliva A and Maestri M, 2001. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Science* 160:505-515.

- Mishra A, Srivastava A and Strasser R, 2001. Utilization of fast chlorophyll a technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and brassica seedlings. *Journal of Plant Physiology* 158: 1173-1181.
- Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Munns R and Tester M, 2008. Mechanism of salinity tolerance. *The Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Murillo-Amador B, Jones H, Kaya C, Aguilar R, García-Hernández J, Troyo-Díéguez E, Avila-Serrano N and Rueda-Puente E, 2006. Effects of foliar application of calcium nitrate on growth and physiological attributes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 58: 188-196.
- Neill S, Desikan R and Hancock J, 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 388-395.
- Ort D, 2001. When there is too much light. *Plant Physiology* 125: 29-32.
- Sairam RK, Rao KV and Srivastava GC, 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
- Santos CV, 2004 Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae* 103: 93-99.
- Sergiev V, Alexieva E and Karanov E, 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare Sciences* 51:121-124.
- Srivastava A, Strasser R and Govindjee S, 1999. Greening of peas: parallel measurements of 77K emission spectra, O-J-I-P chlorophyll a fluorescence transient, period four oscillation of the initial fluorescence level, delayed light emission, and P700. *Photosynthetica* 37: 365-392.
- Stewart RRC and Bewley JD, 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiology* 65: 245-248.
- Strasser R, Srivastava A and Tsimilli M, 2000. The fluorescence transient as a tool characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U and Mohanty P (eds). *Probing photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Pp: 445-483. Taylor & Francis, London.
- Strauss A, Krüger G, Strasser R and Van Heerden P, 2006. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Environmental and Experimental Botany* 56: 147-157.
- Tewari R, Kumar P and Sharma P, 2005. Signs of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants. *Plant Science* 169: 1037-1045.

- Tsimilli M, Eggenberg P, Biro B, Köves K, Vörös I and Strasser R, 2000. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Applied Soil Ecology* 15: 169-182.
- Van Heerden P, Tsimilli M, Krüger G and Strasser R, 2003. Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll a fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation. *Physiologia Plantarum* 117: 476-491.
- Wyn Jones R, Brady C. J and Speirs J, 1979. Ionic and osmotic-regulation in plants. In: *Recent Advances in Biochemistry of Cereals*, eds. D. L. Laidman and R. G. Wyn Jones, pp. 63–103. London: Academic Press.
- Yeo A and Flowers T. J. 1983 Varietal differences in the toxicity of sodium-ions in rice leaves. *Physiologia Plantarum* 59: 189–195.
- Yoshimura K, Yabute Y, Ishikawa T and Shigeoka S, 2000 Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123: 223-233.
- Zörb C, Schmitt S, Neeb A, Karl S, Linder M and Schubert S, 2004 The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specie adaptation. *Plant Science* 167: 91–100.