اثر تنش شوری برمحتوای پروتئین، رنگیزه ها، قندها و ترکیبات فنلی در کشت بافت چند گونه از شنبلیله های ایران

منا صراحی نوبر، وحید نیکنام* ، بابک مرادی

گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی ، پردیس علوم ، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات- آدرس الکترونیکی: *vniknam@khayam.ut.ac.ir*

(دریافت: ۸۹/۳/۳؛ پذیرش: ۸۹/۹/۲۸)

چکیده

گیاهان از مکانیسم های متعددی برای پاسخ به تنش شوری استفاده می کنند. در این تحقیق، تاثیرات تنش NaCl بر وزن تر و خشک، محتوای پروتئین، پرولین، قندهای مختلف، رنگیزه های فتوسنتزی و محتوای ترکیبات فنلی در کشت بافت *T. foenum- graecum*،*T. aphanoneura*،*T. eliptica* و *T. tehranica* در شرایط در شیشه مورد مطالعه قرار گرفت. بافت کالوس از قطعات جداکشت محور زیر لپه دانه رست های ۱۰ روزه در محیط MS حاوی ۰/۵میلی گرم در لیتر دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2-4-D) و ۱ میلی گرم در لیتر کینتین به دست آمد. کالوس ها بعد از ۳۵ روز در محیط MS حاوی غلظت های ۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰و ۱۵۰ میلی مولار NaCl واکشت شدند. وزن تر و خشک هر چهار گونه تحت شوری کاهش نشان داد. تحت شوری محتوای پرولین، ترکیبات فنلی، قندهای محلول، الیگوساکاریدها و قندهای احیاکننده در هر چهارگونه افزایش یافت. در حالیکه محتوای پروتئین ها در سه گونه و پلی ساکاریدها در هر چهارگونه کاهش نشان داد. تنش شوری موجب کاهش معنی داری در محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در کالوس های هر چهار گونه شد.

واژه های کلیدی: کشت بافت، پرولین، رنگیزه های فتوسنتزی، شوری، ترکیبات فنلی.

مقدمه

تنش های غیر زیستی از قبیل خشکی و شوری، رشد، نمو و باروری گیاهان را تحت تاثیر قرار می دهد. شوری فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متعددی را که تعداد زیادی از آنها در سطح سلولی بررسی شده است را تحت تاثیر قرار می دهد. مطالعه تاثیر تنش شوری بر متابولیت ها در بافت کالوس در سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Olmos & Hellin 1996 , Al-Khayri 2002, Cherian & Reddy 2003 Niknam *et al*.2004).

تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) یکی از تغییرات بیوشیمیایی است که در گیاهان در معرض تنش های زیستی و غیر زیستی رخ می دهد. گیاهانی که در معرض تنش های محیطی هستند اغلب از آسیب های اکسیداتیو رنج می برند. سمیت یون نمک، دارای تاثیرات زیان آوری شامل تخریب آنزیم ها و تسریع تشکیل انواع اکسیژن فعال می باشد که به نوبه خود می تواند به غشاها و پروتئین ها آسیب وارد آورد. دفاع آنتی اکسیدانی برای محافظت از یاخته ها در برابر تاثیرات خطرناک گونه های اکسیژن فعال وارد عمل می شود. گیاهان سیستم های سلولی و زیر سلولی خود را از تاثیرات گونه های اکسیژن فعال به وسیله آنزیم هایی از قبیل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، پلی فنل اکسیداز و آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی نظیر آسکوربات و گلوتاتیون محافظت می کنند (Agarwal & Pandy 2004).

Trigonella جنس بزرگی با نزدیک به ۱۳۵ گونه متعلق به خانواده لگومینوزه می باشد. بسیاری از گونه های این جنس از جمله گونه *T. foenum-graecum* با تولید انواع متابولیت های ثانوی از لحاظ دارویی با اهمیت می باشند(Niknam *et al*. 2006).

در پژوهش حاضر وزن تر و خشک، محتوای قند ها، پرولین، پروتئین، ترکیبات فنلی و رنگیزه ها در کشت بافت چهار گونه از شنبلیله های ایران تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت.

یکی از پاسخ های گیاهان به تنش شوری تجمع قندهای محلول می باشد (Mohammadian *et al*. 2001, Pessarakli 1999). این تجمع در تنظیم اسمزی سلول های گیاهی نقش مهمی را به عهده دارد و به دلایل مختلفی حادث می شود. در سلول های گیاهان عالی ملکول های پلیمری به مولکول های کوچکتر شکسته می شوند، به عنوان مثال نشاسته به ساکارز و سپس به مولکول های کوچک تری

مانند گلوکز و فروکتوز تبدیل می شوند (Pessarakli 1999).
یکی از روش های متابولیسمی بارز دیگر تجمع پرولین در واکنش به تنش اسمزی است (Arshi *et al*. 2002, Safarnejad *et al.* 1997) که مکانیسم احتمالی افزایش تولید آن توسط پژوهشگران مشخص شده است
(Herrieu *et al*.1993 ،Kandpal &Rao 1982).

مواد و روش ها

سترون سازی بذرها

دانه های *T. foenum-graecum* L.، *T. elliptica* Boiss، *T. tehranica* Bomm، *T. aphanoneura* Rech با قرار گرفتن در محلول هیپو کلریت سدیم ۲۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند و سپس چندین بار با آب مقطر سترون مورد شستشو قرار گرفتند.

کشت بافت

بذرها در محیط MS (Murashige & Skoog 1962) حاوی ۷٪ آگار رشد پیدا کردند. بعد از جوانه زنی، بافت کالوس از قطعات جداکشت یک سانتی متری محور زیر لپه دانه رست های ۱۰ روزه در محیط MS حاوی ۰/۵میلی گرم در لیتر 2,4-D و ا میلی گرم در لیتر کینتین به دست آمد. کالوس ها بعد از ۳۵ روز در محیط MS حاوی غلظت های ۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰و ۱۵۰ میلی مولار NaCl با لامپ های فلورسنت با شدت ، $\mu molm^{-2}s^{-1}$ ۴۶ و دمای شب/ روز ۲۵/۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ روز واکشت شدند و سپس کالوس ها در درون آون در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت به منظور سنجش وزن تر و خشک ، خشک شدند.

استخراج و سنجش قندها

برای تعیین محتوای قند، ۰/۱ گرم از نمونه پودر شده به وسیله ۱۰ میلی لیتر از اتانول: آب مقطر (۸:۲ v/v) استخراج شد و تفاله ها بعد از ۲ بار سانتریفوژ جمع آوری شدند. تفاله ها بعد از استخراج اتانولی برای استخراج پلی ساکارید به وسیله جوشاندن آب استفاده شدند (Niknam *et al*. 2006).

سنجش محتوای قند کل به وسیله روش Dubois *et al*. 1956 و قندهای محلول بر طبق روش Nelson 1944 سنجیده شدند. محتوای الیگو ساکاریدها از تفاوت بین محتوای قندهای محلول و قندهای احیا کننده به دست آمدند.

استخراج و سنجش پرولین

برای تعیین محتوای پرولین ۰/۱ گرم ماده گیاهی خشک با ۱۰ میلی لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳٪ در یک هاون تا یکنواخت شدن کامل ساییده شد و محتوای پرولین بر طبق روش Bates *et al*. 1973 تعیین شد.

استخراج و سنجش پروتئین

برای تعیین محتوای پروتئین ۱۰۰۰ میلی گرم کالوس تر با ۰/۵ میلی لیتر از بافر استخراج Tris-HCL ۱ مولار در یک هاون چینی که به منظور حفظ فعالیت آنزیم ها بر روی یخ قرار دارد تا یکنواخت شدن کامل ساییده شد سپس نمونه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه دردو دوره ۳۰ دقیقه ای سانتریفوژ گردید. محتوای پروتئین کل با اسپکتروفتومتری به روش برادفورد (Bradford 1976) با استفاده از سرم آلبومین گاوی BSA به عنوان منحنی استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتراندازه گیری شد.

استخراج و سنجش کلروفیل و کاروتنوئیدها

کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای کالوس ها به وسیله استون ۸۰٪ استخراج و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شدند (Wellburn & Lichtenthaler 1983).

استخراج و سنجش ترکیبات فنلی

برای تعیین محتوای ترکیبات فنلی، ۰/۱ گرم از پودر نمونه گیاهی در ۲۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد در بن ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد مورد استخراج قرار گرفت و محتوای ترکیبات فنلی بر طبق روش Ranganna (1986) با استفاده از معرف فولین- دنیس اندازه گیری شد.

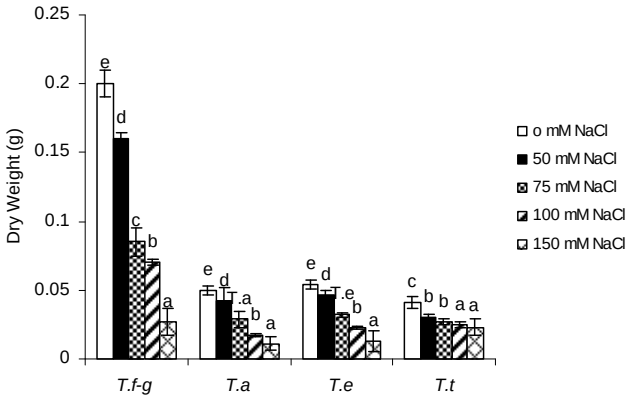
آنالیز آماری

آزمایشات بر اساس طرح کاملا تصادفی با سه بار تکرارانجام گرفت وآنالیزهای آماری داده ها با استفاده از آنالیز یک طرفه واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ و آزمون دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ انجام گردید.

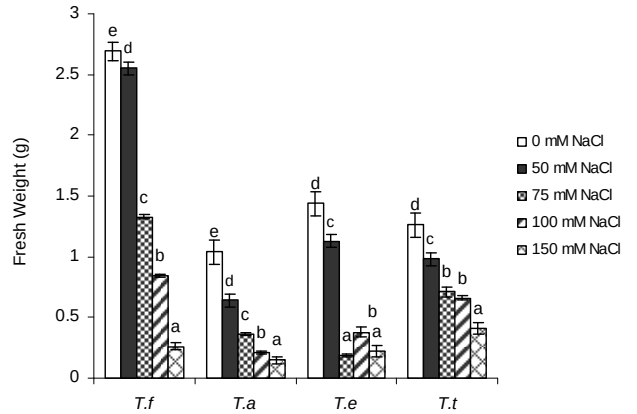
نتایج

نتایج حاکی از این است که میانگین وزن تر و خشک کالوس های هر چهار گونه با افزایش غلظت نمک در محیط از ۰ تا ۱۵۰ میلی مولار به طور پیوسته و معنی داری کاهش پیدا کرد (شکل۱و۲).
نتایج حاصل از بررسی اثر شوری بر محتوای قند محلول نشان می دهد که در کالوس های دو گونه *T.tehranica* و *T.foenum- graecum* با افزایش غلظت NaCl محتوای قندهای محلول به طور پیوسته افزایش می یابد اما محتوای قندهای محلول در کالوس های گونه *T.aphanoneura* تا غلظت ۱۰۰ میلی مولار و در گونه *T.elliptica* تا غلظت ۷۵ میلی مولار افزایش و سپس در غلظت های بالای شوری

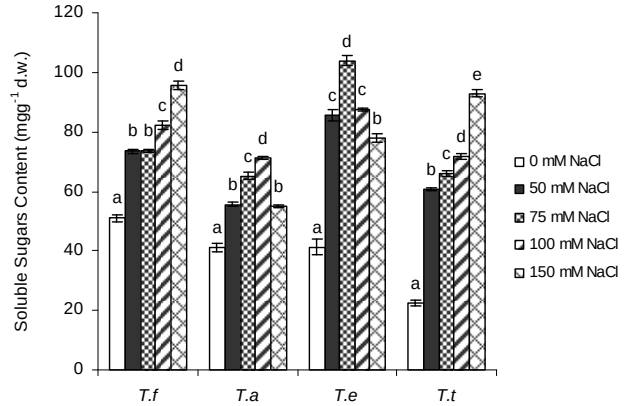
کاهش نشان می دهد(شکل ۳).



شکل۱: تغییرات وزن خشک کالوس های چهار گونه شنبلیله در غلظت های مختلف NaCl.

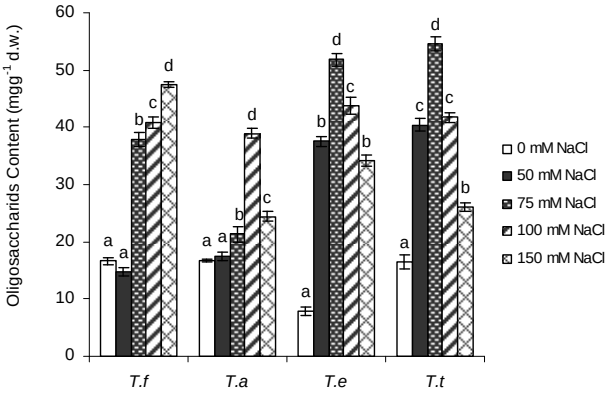


شکل ۲ : تغییرات وزن تر کالوس های چهار گونه شنبلیله در غلظت های مختلف NaCl.



شکل ۳: اثر غلظت های مختلف NaCl بر محتوای قندهای محلول (mgg^{-1} d.w.) کالوس های چهارگونه شنبلیله.

نتایج نشان داد کـه محتـوای الیگوسـاکاریدها در کـالوس هـای گونـه *T.aphanoneura* با افزایش غلظـت NaCl در محـیط تـا غلظـت ۱۰۰ میلی مولار افزایش نشان داد سپس در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کاهش معنی داری در محتوای الیگو ساکاریدها مشاهده شد. در کـالوس هـای دو گونه *T.elliptica* و *T.tehranica* با افزایش غلظت NaCl در محـیط تا غلظت ۷۵ میلی مولار محتوای الیگوساکاریدها افـزایش و سـپس تـا ۱۵۰ میلی مولار کاهش نشان می دهد البتـه لازم بـه ذکـر اسـت کـه محتوای الیگوساکاریدها در این غلظت هـا در هـر دو گونـه نسـبت بـه شاهد بیشتر می باشد. در کالوس های گونـه *T.foenum- graecum* بـا افزایش سطح شوری محیط، محتوای الیگوساکاریدها به طـور پیوسـته افزایش می یابد (شکل ۴).



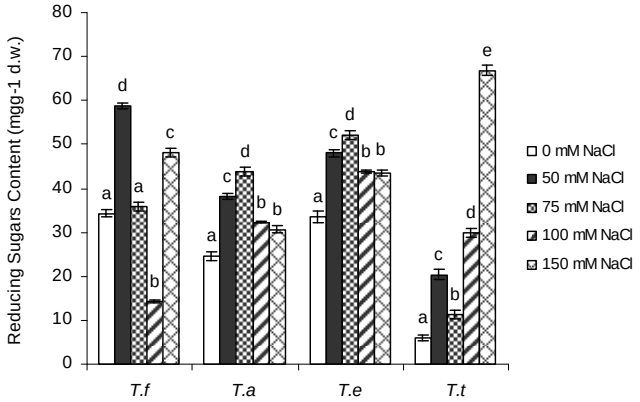
شکل ۴: اثر غلظت های مختلف NaCl بر محتوای الیگوساکاریدها (mgg^{-1} d.w.) کالوس های چهارگونه شنبلیله.

در حضور NaCl، محتوای قندهای احیاکننده، در کالوس هـای هـر دو گونه *T.elliptica* و*T.aphanoneura* به موازات افزایش غلظت NaCl در محیط تا غلظت ۷۵ میلی مولار افزایش نشان می دهد. امـا در غلظـت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار روند کاهشی در محتوای قنـدهای احیاکننـده مشاهده می گردد که البته این کاهش بین غلظـت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلـی مولار از لحـاظ آمـاری معنـی دار نمـی باشـد. در کـالوس هـای گونـه *T.tehranica* در غلظت ۷۵ میلی مـولار نسـبت بـه ۵۰ میلـی مـولار کاهش و سپس در غلظت های بالای شوری افزایش نشان مـی دهـد و در گونه *T.foenum- graecum* در غلظت ۵۰ میلی مولار افزایش و تـا غلظت ۱۰۰ میلی مولار کاهش و سپس با افزایش سطح شوری محیط، محتوای قندهای احیاکننده افزایش می یابد (شکل ۵).

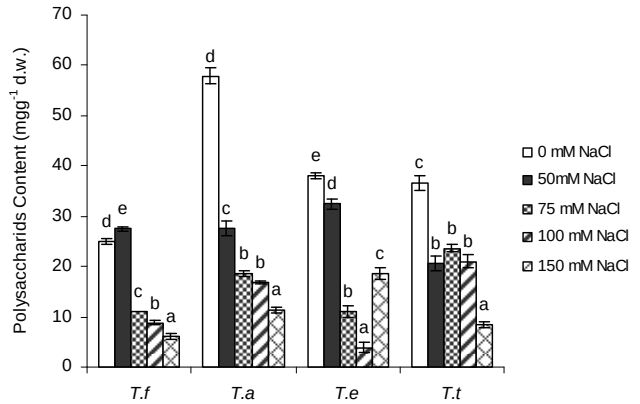
محتوای پلی ساکاریدها در هر چهار گونه تحت شـوری ناشـی از NaCl کاهش نشان داد (شکل ۶).

محتوای پـرولین دردو گونـه *T.elliptica* و*T.tehranica* تحـت تـنش شوری افزایش یافت و در کالوس های گونـه *T.foenum- graecum* تـا غلظت ۷۵ میلی مولار افزایش و در غلظت هـای بـالای NaCl کـاهش

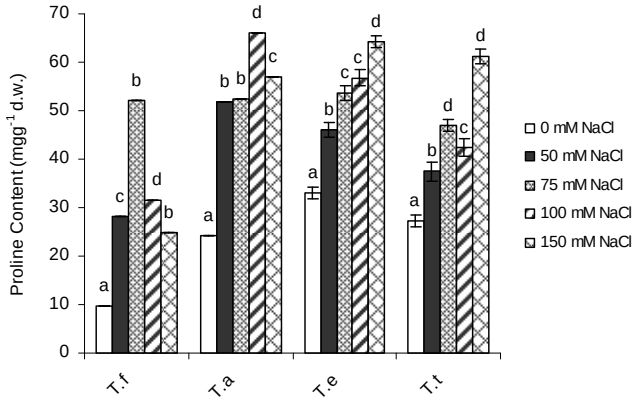
نشـان داد و در گونـه *T.aphanoneura* تـا غلظـت ۱۰۰ میلـی مـولار افزایش و سپس کاهش نشان داد (شکل ۷).



شکل ۵: اثر غلظت های مختلف NaCl بر محتوای قندهای احیاکننده (mgg^{-1} d.w.) کالوس های چهارگونه شنبلیله.



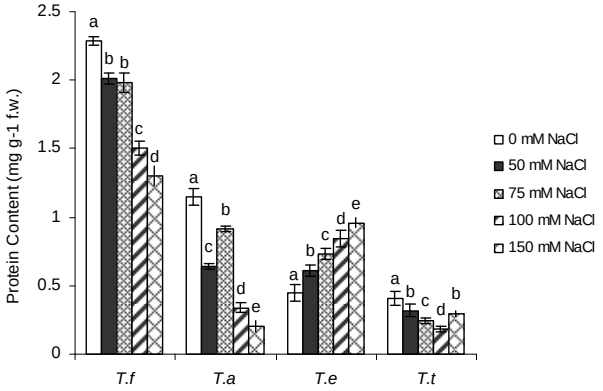
شکل ۶: اثر غلظت های مختلف NaCl بر محتوای پلی ساکاریدها (mgg^{-1} d.w.) کالوس های چهارگونه شنبلیله.



شکل ۷: اثر غلظت های مختلف NaCl بر محتوای پرولین (mgg^{-1} f.w.) کالوسهای چهارگونه شنبلیله.

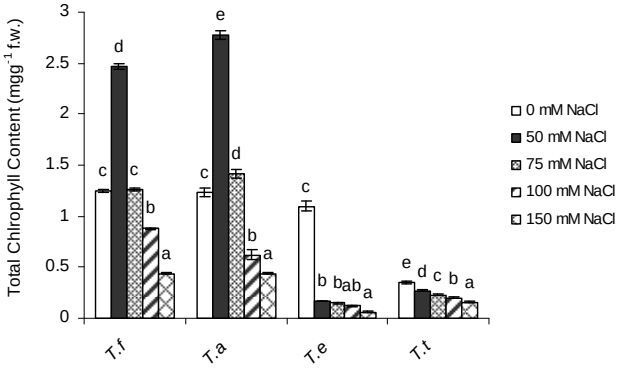
محتـــوای پـــروتئین در ســـه گونـــه *T. foenum-graecum*، *T. aphanoneura*، *T. tehranica* کاهش و در گونـه *T. elliptica* افـزایش نشان می دهد (شکل ۸).

محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در دو گونه *T. foenum-graecum* و *T. aphanoneura* در غلظت ۵۰ میلی مولار افزایش و در غلظت های

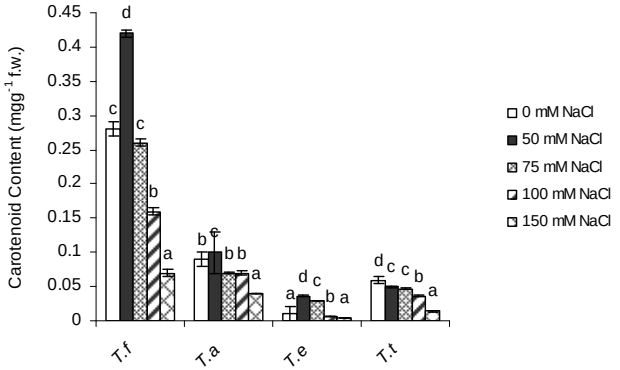


شکل ۸: اثر غلظت های مختلف NaCl بر محتوای پروتئین کل (mgg^{-1} f.w.) کالوس های چهارگونه شنبلیله.

بـالاتر شـوری کـاهش نشـان داد و در دو گونـه *T. tehranica* ، *T. elliptica* همراه با افزایش شوری کاهش دیده شد(شکل ۹ و ۱۰).



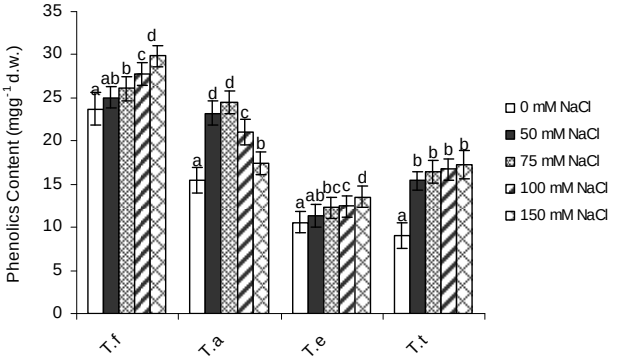
شکل ۹: اثر غلظت های مختلف NaCl بر محتوای کلروفیل کل (mgg^{-1} f.w.) کالوس های چهار گونه شنبلیله.



شکل۱۰ : اثر غلظت های مختلف NaCl بر محتوای کاروتنوئیدها (mgg^{-1} f.w.) کالوس های چهار گونه شنبلیله.

بـالاتر شـوری کـاهش نشـان داد و در دو گونـه *T. tehranica* ، *T.*

elliptica همراه با افزایش شوری کاهش دیده شد(شکل ۹ و ۱۰). محتوای ترکیبات فنلی در هر سه گونه *T.foenum- graecum*, *T.elliptica* و *T.tehranica* تحت شوری افزایش نشان می دهد اما در گونه *T.aphanoneura* تا غلظت ۷۵ میلی مولار افزایش و در غلظت های بالای شوری کاهش نشان می دهد (شکل ۱۱).



شکل۱۱: اثر غلظت های مختلف NaCl بر محتوای ترکیبات فنلی (mgg^{-1} d.w.) کالوس های چهارگونه شنبلیله.

بحث

تنش شوری می تواند با اثر بر روی بخش های مختلف به ویژه سیستم هورمونی و آنزیمی منجر به کاهش وزن تر و خشک کالوس ها شوند نتایج حاضر در توافق با داده های گزارش شده قبلی روی دو گونه *T foenum-graecum*، *T .aphanoneura* می باشد (رضوی،۱۳۸۳).

در حضور NaCl، محتوای قندهای احیاکننده، الیگوساکاریدها و قندهای محلول در همه گونه ها نسبت به شاهد افزایش یافت. در مقابل محتوای پلی ساکاریدها تحت شوری ناشی از نمک NaCl کاهش نشان داد.

تجمع قندهای محلول در پاسخ به تنش های شوری و خشکی گزارش شده است (Binzel *et al*.1989, Dubey & Singh 1999). بر طبق نتایج به دست آمده این تجمع در گونه *T. tehranica* نسبت به سه گونه دیگر بیشتر می باشد. تحت تنش شوری تجمع قندها به همراه محلول های سازگار دیگر به پایداری غشای سلولی و پروتئین ها کمک می کند

(Sanchez *et al*.1998) . تجمع قندهای محلول در تنظیم اسمزی سلول های گیاهی و تسهیل جذب آب نقش مهمی را بر عهده دارد (Pessarakli 1999). همچنین در سلولهای گیاهان عالی ملکول های پلیمری به مولکول های کوچکتر شکسته می شوند، به عنوان مثال نشاسته به ساکارز و سپس به مولکول های کوچک تری مانند گلوکز و فروکتوز تبدیل می شوند بنابراین افزایش در غلظت قندهای محلول ممکن است نتیجه تجزیه نشاسته باشد (Fischer & Holl 1991). کاهش نشاسته در برگ های *grapevine* همچنین در پاسخ به تنش خشکی گزارش شده است، در این تحقیق افزایش تجمع قندهای محلول با کاهش شدید در نشاسته همراه است (Patakas & Noitsakis). همچنین تحقیقات نشان داده است که محتوای کربوهیدرات های محلول درمحور رویانی و لپه های *Chenopoduim quinoa* Willd در غلظت ۰/۴ مولار NaCl افزایش یافته است این گزارش تجزیه پلی ساکاریدها در اثر تنش شوری را دلیل افزایش قندهای محلول در دانه رست های این گیاه می داند (Prado *et al*. 2000) که این مطلب با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد.

نقش پرولین به عنوان محافظت کننده اسمزی که در هنگام تنش در گیاه افزایش پیدا می کند کمک به پایداری غشا و کاهش اثرات NaCl بر تخریب غشای سلولی می باشد (Ashraf & Orooj 2006). Cherin و Reddy (2003) افزایش ۲ تا ۹ برابر محتوای پرولین در سلول های تحت تنش *Suaeda nudiflora* را گزارش داده اند. همچنین افزایش پرولین در برگ های دو رقم توت همراه با افزایش شوری گزارش شده است (Kumar *et al*. 2003).

کاهش در محتوای پروتئین کالوس ها در غلظت های بالای NaCl ممکن است به دلیل هیدرولیز یا کاهش در سنتز پروتئین ها باشد (Hall & Flowers 1973) به طور مشابه Cherian و Reddy (2003)، ۲ تا ۳ برابر کاهش در محتوای پروتئین کالوس ها تحت تنش شوری را گزارش دادند. افزایش محتوای پروتئین می تواند به علت القای پروتئین های متعددی باشد که یا در پاسخ به تنش شوری ممکن است به طور جدیدی ساخته شوند و یا به طور نهادی در غلظت های پایین وجود داشته و هنگامی که گیاهان در معرض شوری قرار می گیرند، غلظت آنها افزایش یابد.

کاهش کلروفیل ها تحت استرس شوری در ارتباط با مهار نوری یا تشکیل ROS می باشد (Kato & Shimizu 1985) . کاهش رنگیزه های فتوسنتزی توسط شوری در گونه های مختلفی گزارش شده است (Parida & Das 2002, Meloni *et al*. 2003).

محتوای ترکیبات فنلی در هر چهار گونه تحت شوری افزایش نشان می دهد. این ترکیبات آنتی اکسیدان های نیرومندی در بافت های گیاهی تحت شرایط تنش می باشند و این خاصیت به دلیل ساختار اسکلتی و گروه فنل این متابولیت ها می باشد. گروه های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک به وسیله جاروبگری رادیکال ها و سایر مکانیسم ها مانند فروکشی اکسیژن یکتایی و کلاته کردن فلز به وسیله باند شدن یون های سمی آسیب های اکسیداتیو ناشی از یون ها را کم کرده و به این ترتیب ساختارهای سیتوپلاسمی و کلروپلاستی را از تاثیرات منفی شوری محافظت می کنند و همچنین با جلوگیری از عمل لیپو اکسیژناز از اکسیداسیون لیپید جلوگیری کنند . افزایش

تولید ترکیبات فنلی تحت اثر شوری در گیاهان مختلفی گزارش شده است (Al-Amier & Craker 2007) .

در بررسی حاضر با مقایسه اثرات غلظت های مختلف نمک بر پارامترهای مختلف فیزیولوژیکی در کالوس های چهار گونه مختلف گیاه شنبلیله دو هدف دنبال می شود. هدف اول اینکه با استفاده از مزایای تکنیک های کشت بافت مدلی برای استفاده از این تکنیک در پژوهش های فیزیولوژی گیاه ارایه شود. هدف دوم این پژوهش مقایسه فیزیولوژیکی پدیده مقاومت به تنش شوری در این چهار گونه است. با نگاه به اثرات غلظت های مختلف نمک بر میزان رشد کالوس ها مشاهده شد که گونه *T. foenum-gracaeum* با کاهش هزار درصدی در وزن خشک کالوس ها از غلظت صفر تا غلظت ۱۵۰ میلی مولار نمک متحمل بیشترین خسارت شده است. این در حالی است که گونه های *T. aphanonoera* (۴۵۴٪)، *T. eleptica* (۳۸۴٪) و *T. tehranica* (۲۰۰٪) در مقام های بعدی در کاهش رشد قرار دارند. بر این اساس حساس ترین گونه *T. foenum-gracaeum* و مقاوم ترین گونه *T. tehranica* می باشد. گونه *T. tehranica* با اتخاذ استراتژی های افزایش محتوای پرولین (به میزان بیش از ۵۰ درصد)، ترکیبات فنولی (نزدیک به ۴۸ درصد) و قندهای محلول (بیش از ۱۰۰ درصد) به مدیریت تنش اعمال شده می پردازد به گونه ای که کمترین تاثیر بر رشد کالوس های این گونه مشاهده می شود.

با توجه به مطالب ذکر شده می توان گفت با وجود این که شنبلیله جزو گیاهان نسبتا مقاوم به شوری می باشد اما گونه های مختلف مربوط به یک سرده می توانند از نظر مقاومت به شوری با یکدیگر متفاوت باشند.

منابع:

رضوی ن. ۱۳۸۳: بررسی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی القاشده با تنش شوری در چند گونه از شنبلیله های ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دانشگاه تهران.

Agarwal S., Pandy V. 2004: Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia.Biol. Plant*.**48**: 555-560.

Al-Khayri J.M. 2002: Growth, proline accumulation and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm. *In Vitro* Cell. Dev. *Biol. Plant*. **38**: 79-82.

Arshi A., Abdin M.Z., Iqbal M.2002: Growth and metabolism of senna as affected by salt stress**.** *Biol. Plant*.**45**: 295-298.

Ashraf M., Orooj A. 2006: Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* [L.] Sprague). *J. Arid Environ*. **64**: 209-220.

Bates L.S.,Waldern R.P., Teare I.D. 1973: Rapid determination of free proline for water stress studies**.** *Plant Soil*. **39**: 205-207.

Binzel M.L., Hess F.D., Bressan R.A., Hasegawa P.M. 1989: Mechanism of adaptation to salinity in cultured glycophyte cells. In : Cherry, J.H.(ed): Biochemical and Physiological Mechanisms Associated with Environmental Stress Tolerance. 139-157.

Bradford M.M. 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein- dye binding. *Anal. Biochem***. 72**: 248-254.

Cherian S., Reddy M.P. 2003: Evaluation of NaCl tolerance in the callus cultures of *Suaeda nudiflora* Moq. *Biol. Plant*. **46**: 193-198.

Dubey R.S., Singh A.K. 1999: Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolizing enzymes in rice plants**.** *Biol.Plant*. **42**:233-239.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal.Chem***. 28**:350-356.

Fischer C., Holl W. 1991: Food reserves in scots Pine (*Pinus sylvestris* L.)

Hall J.L., Flowers T.J. 1973 : The effect of salt on protein synthesis in the halophyte Suaeda maritima. *Planta*. **110**:361-368.

Herrieu F., Dialy F. Le., Lesaos J., Billard J.P., Huault C. 1993: Inhibition of plant ornithine aminotransferase by gabaculine and 4-amino-5-hexynoic acid. *Phytochem*. **34**:1231-1234.

Kandpal R.P., Rao N.A. 1982: Water stress induced alternations in the properties of ornithine aminotransferase from ragi [Eleusine coracanal] leaves. *Biochem*. Int. **5**: 297-302.

Kato M., Shimizu S. 1985: Chlorophyll metabolism in higher plants .*Plant Cell Physiol***. 26**: 1291-1301.

Kumar S.G., Reddy A.M., Sudhakar C. 2003: NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (Morus alba L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Sci.* **165***:*1245-1251.

Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. 1983: Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc.* Trans. **603**:591-593.

Meloni D.A.,Oliva M.A., Martinez C.A., Cambraia J. 2003: Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and gluthatione reductase in cotten under salt stress. *Environ . Experi. Bot***. 49**:69-76.

Mohammadian R., Khoyi F.R., Rahimian H., Moghaddam M., Ghassemi-Golezani K., Sadeghian S.Y.2001: The effects of early season drought on stomatal conductance, leaf-air temperature different and proline accumulation in sugar beet genotype**s.** *J. Agric.Sci***.** *Technol.* **3**: 181-192.

Murashige T., Skoog F. 1962: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures . *Plant Physiol.* **15:**437-497.

Nelson N. 1944: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose**.** *J.Biol.Chem.* **153**:374-380.

Niknam V., Bagherzadeh M., Ebrahimzadeh H., Sokhansanj A. 2004: Effect of NaCl on biomass and content of sugars , proline and proteins in seedlings and leaf explants of *Nicotiana tabacum grown in vitro* **.** *Biol.Plant*. **48**:613-615.

Niknam V., Razavi N., Ebrahimzadeh H., Sharifizadeh B. 2006: Effect of NaCl on biomass , protein and proline contents and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two *Trigonella* species**.***Biol. Plant*. **50(4)**: 591-596.

Olmos E., Hellin E. 1996: Mechanisms of salt tolerance in a cell line of *Pisum sativum*: biochemical and physiological aspects. *Plant Sci.* **120**: 37-45.

Parida A.K., Das A.B. 2002: Effect of NaCl stress on nitrogen and phosphorous metabolism in a true mangrove *Bruguriera parviflora* grown under hydroponic culture. *J.Plant Physiol*. **161**: 921-928.

Pessarakli M.1999: Handbook of Plant and Crop Stress. Second Edition. Marcel Dekker, Inc.

Ranganna S. 1986: Polyphenols in Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products. TATA MsGraw-Hill publishing company , New Dehli.

Safarnejad A., Collin H.A., Bruce K.D., McNeilly T. 1997: Characterization of alfalfa
(*Medicago Sativa* L.) following in vitro selection for salt tolerance . *Euphytica*. **92** : 69-75.

Sanchez F.J., Manzanares M., Andres E.F., Tenorio J.L., Ayerbe L., Andres E.F. 1998: Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress . *Field Crops Res*. **59**: 225-235.