"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد یازدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
(ص ۲۶-۱۵)
مقاله پژوهشی

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 11, No.: 1, Spring 2022
(pp: 15-26)
DOI: 10.22034/ijsst.2021.355352.1402
Research Article

بررسی روش کاربرد پرولین بر کاهش اثرات تنش نیکل در مراحل اولیه رشد خیار چنبر (*Cucumis melo var.*flexousus)

جلیل عباس پور[۱]، بهروز صالحی اسکندری[۲]*، مریم منتظری نجف آبادی[۳]

[۱] دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اصفهان
[۲] استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ص.پ. ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵ - تهران- ایران
[۳] دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۶)

چکیده

نیکل از عناصر کم‌مصرف ضروری است اما افزایش غلظت آن در محیط، جوانه‌زنی و رشد گیاهان را به مخاطره می‌اندازد. در مطالعه حاضر، اثر پرولین به‌صورت پیش‌تیمار و تیمار خارجی بر مراحل اولیه رشد خیار چنبر تحت تنش نیکل بررسی شد. بدین منظور، گروهی از بذور پس از خیساندن در غلظت‌های ۰ و ۱۰ میلی‌مولار پرولین، به پتری‌دیش‌های حاوی غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی‌مولار) منتقل شدند درحالی‌که در گروه دیگر تیمار پرولین هم‌زمان با غلظت‌های نیکل اعمال گردید. پس از ۱۰ روز، شاخص‌های جوانه‌زنی بذر، رشد گیاهچه، مقدار پراکسیداسیون لیپید و نشت‌پذیری غشاء سلولی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد شاخص‌های جوانه‌زنی تحت تأثیر نیکل و پیش‌تیمار پرولین قرار نگرفت. حساسیت ریشه‌چه به افزایش غلظت نیکل بیشتر از ساقه‌چه بود و میزان مالون‌دآلدئید و نشت‌پذیری غشاء سلولی با بالا رفتن غلظت نیکل افزایش یافت. حضور پرولین، به‌همراه نیکل، به‌طور معنی‌داری باعث کاهش درصد و سرعت جوانی زنی شد و میانگین زمان جوانه‌زنی را افزایش داد. پیش‌تیمار پرولین در حضور تیمارهای نیکل باعث بهبود طول ریشه‌چه و نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه شد. اما افزودن پرولین خارجی باعث افزایش طول ساقه‌چه در غلظت پایین نیکل و گروه شاهد شد درصورتی‌که طول ریشه‌چه و نسبت آن‌ها را کاهش داد. حضور مداوم پرولین در محیط احتمالاً با جذب آب توانایی جذب آن را توسط رویان کاهش داده اما پیش‌تیمار پرولین در مقایسه با حضور آن در محیط، به‌عنوان یک محلول سازگار و آنتی اکسیدانت، باعث بهبود مراحل اولیه رشد و کاهش خسارت ناشی از سمیت نیکل در گیاهچه خیار می‌گردد.

کلمات کلیدی: پیش‌تیمار، پایداری غشاء، جوانه‌زنی، ریشه‌چه، ساقه‌چه

Comparison of different methods of proline application to alleviate the effect of nickel stress on germination and seedling growth of *Cucumis melo*var. Flexousus

B. Salehi-Eskandari[2], M. Montazeri Najafabadi[3] J. Abbaspour[1]

[1] PhD Graduate in Plant Physiology, Isfahan University, Iran.
[2] Department of Biology, Payame Noor University (PNU), P.O.Box 19395-4697, Tehran, Iran.
[3] MSc. Graduate in Plant Physiology, Arak University, Iran.
(Received: Jul. 28, 2021 – Accepted: Sept. 28, 2021)

Abstract

Nickel is an essential microelement, but the increased concentration it in the medium disrupts the germination and growth of plants. In the present study, the effect of pretreatment and exogenous proline in the seedling growth of *Cucumismelo* under nickel stress was investigated. For this purpose, seeds were divided into two groups. In one group, seeds were sterilized for 24h, then they soaked in 0, 10 mM proline and finally cultured in different nickel concentrations. Another group seeds were soaked in deionized water for 24 hours and then cultured in petri dishes containing the same from one another concentrations of nickel and proline. All seeds were kept for 10 days, then measured germination, and growth parametersand membrane stability. The results showed that germination parameters were not affected by nickel. Radicle was more sensitive to Ni excess than hypocotyl. The amount of malondialdehydeincreased with increasing nickel concentration. Add exogenous prolinesignificantly reduces germination percentage and germination index but it increased mean germination time. Proline pretreatment in the presence of nickel treatments improved radical length, root to shoot ratio. But the addition of exogenous proline increased hypocotyl length while radical length and their ratio decreased in lower exposure levels. However, exogenous proline reduced lipid peroxidation and membrane permeability more than similar treatments under nickel treatments. Proline, as a pretreatment as a compatible solution and antioxidant, improves the early stages of growth and reduces the damage caused by nickel toxicity in the early stages of cucumber seedling growth.

Keywords: Germination,Hypocotyl, Membrane stability,Pretreatment, Radical

* Email: behsalehi@Pnu.ac.ir

مقدمه

نیکل از عناصر سنگین کم‌مصرف است که برای فعالیت آنزیم‌هایی نظیر اوره‌آز و برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ضروری است (Iori *et al.*, 2013). اما مقادیر بالای آن به‌علت جایگزینی با عناصر ضروری و اختلال در ساختار و فرآیندهای متابولیسمی گیاه، سمی است و با علائمی چون کلروزه و نکروزه شدن، کاهش رشد و پژمردگی ظاهر می‌شود (Gajewska *et al.*, 2006). آلودگی نیکل در محیط اغلب به‌علت فعالیت انسانی از جمله استفاده از سوخت‌های فسیلی، استخراج و ذوب فلزات، دفع زباله‌های شهری و صنعتی، تولید فولاد و صنعت سیمان می‌باشد (Furini, 2012; Shahzad *et al.*,2018). هم‌چون دیگر فلزات سنگین، نیکل نیز در غلظت‌های بالا سمی است و می‌تواند منجر به تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر[1] (ROS) شود که آسیب‌های پراکسیداتیو در غشای لیپیدی را در پی‌دارد (Pandey *et al.*, 2009; Sakhai *et al.*, 2021). بررسی نشت‌پذیری غشاء سلولی می‌تواند بیان‌گر میزان تخریب غشاء سلولی باشد (Singh *et al.*, 2018).

جوانه‌زنی اولین فرآیندی است که تحت تأثیر تنش‌های محیطی چون فلزات سنگین قرار می‌گیرد. جذب آب در بذر برای جوانه‌زنی در سه مرحله رخ می‌دهد. در مرحله اول، جذب سریع آب رخ می‌دهد که وابسته به فرآیندهای فیزیولوژیکی است و در مرحله دوم به‌علت اشباع شدن دانه، جذب آب کاهش می‌یابد و در مرحله سوم، افزایش مجدد جذب آب با خروج ریشه‌چه همراه می‌شود (Hua-long *et al.*, 2014). اغلب تنش‌ها با کاهش جذب آب در رشد اختلال ایجاد می‌کنند. چندین راهبرد برای کاهش آسیب حاصل از تنش‌های غیرزیستی پیشنهاد شده است که تحمل گیاهان به تنش را بهبود می‌بخشند. در بین آن‌ها استعمال خارجی اسمولیت‌های سازگار مثل پرولین در کاهش اثرات تنش قابل توجه بوده است (Ashraf and Foolad, 2007). پرولین نقش مهمی در حفظ رشد و ایجاد مقاومت گیاه نسبت به تنش ایفا می‌کند (Arshi *et al.*, 2005). علاوه بر این می‌تواند موجب حفظ ماکروملکول‌ها و کاهش پراکسیداسیون لیپید شود (Ashraf and Foolad, 2007). پیش‌تیمار و آماده‌سازی دانه‌ها، به آن‌ها اجازه انجام، برخی فرآیندهای متابولیکی لازم برای جوانه‌زنی را می‌دهد، بدون آن‌که جوانه‌زنی در آن‌ها آشکار شود. پیش‌تیمار می‌تواند موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی و یکنواختی جوانه‌زنی شود و در نهایت درصد جوانه‌زنی را افزایش می‌دهد (Hua-long *et al.*, 2014). همچنین پیش‌تیمار پرولین منجر به تغییر فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک شده که درنهایت جذب آب و کش‌سانی دیواره سلولی ریشه را افزایش می‌دهد (Singh *et al.*, 2018). بنابراین پیش‌تیمار پرولین، مرحله اول جذب آب را در دانه‌ها افزایش می‌دهد. مطالعات نشان داده است که استفاده از پرولین خارجی در تنش نیکل و شوری در گیاه نخود فرنگی باعث اصلاح وضعیت آبی و فعالیت سیستم آنتی اکسیدانتی آن می شود (Shahid *et al.*, 2014).

خیارچنبر (*Cucumis melo* var. flexousus) یکی از واریته‌های *Cucumis melo* و از تیره Cucurbitaceae می‌باشد (Amini *et al.*, 2018). این گیاه دارای مقدار زیادی آب، ویتامین‌ها (مجموع ویتامین‌های A، C، B) و مواد معدنی (کلسیم، آهن، منیزیم، فسفر، پتاسیم و روی)، قند و دیگر کربوهیدرات‌ها است(Gafar *et al.*, 2013). خیارچنبر در مناطق مختلف ایران ازجمله مناطق زراعی نزدیک به نواحی سرپنینی انارک کشت می‌شود. ویژگی‌های این مناطق داشتن فلزات سنگین که شاخص‌ترین آن‌ها نیکل است می‌باشد (Salehi-Eskandari *et al.*, 2018). از آنجایی که

[1] Reactive Oxygene Species

جوانه‌زنی اولین فرایند در یک گیاه است که تحت تنش‌های محیطی قرار می‌گیرد، در این تحقیق ابتدا اثرات مضر تنش نیکل در مرحله جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه خیار چنبر از طریق اندازه‌گیری شاخص‌های جوانه‌زنی، رشد، پراکسیداسیون لیپید و نشت‌پذیری غشاء سلولی مشخص شد، سپس اثر بهبود بخشی پرولین خارجی و هم‌چنین مقایسه اثر دو روش استعمال پرولین (پیش‌تیمار پرولین و حضور پرولین در محیط کشت) بر شاخص‌های ذکر شده در گیاهچه‌ها تحت تنش نیکل بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه *Cucumis melo* var. flexousus (با منشاء نجف‌آباد و توده دُرچه اصفهان) ، در بهار سال ۱۳۹۸ از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بذرها پیش از استفاده در اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و سپس در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل و پس از آن نیز ۴ بار با آب مقطر استریل شست‌شو شدند (Nasri *et al.*, 2014). براساس آزمایش‌های اولیه و منابع موجود (Islam *et al.*, 2009; Amini *et al.*, 2018) بذور ضدعفونی شده به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول، بذرهای ضدعفونی شده در درون پتری‌دیش‌های حاوی صفر، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی‌مولار نیکل ($NiCl_2.6H_2O$) قرار گرفتند که برای تهیه این محلول‌ها به ترتیب، محلول صفر، ۰/۰۰۴۸، ۰/۰۰۹۵ و ۰/۰۱۴ گرم از نیکل ($NiCl_2.6H_2O$) را به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رساندیم. در گروه دوم بذرهای ضدعفونی شده با پرولین صفر (آب مقطر) و ۱۰ میلی‌مولار (۰/۱۱۵ گرم پرولین را به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.) به‌مدت ۲۴ ساعت پیش‌تیمار شدند. سپس، بذرهای پیش‌تیمار شده درون پتری‌دیش‌های حاوی غلظت‌های مختلف نیکل قرار گرفتند. در گروه سوم، بذرهای ضدعفونی شده، هم‌زمان در محیط‌های حاوی غلظت های مختلف نیکل، در معرض غلظت ۱۰ میلی‌مولار پرولین گرفتند که برای تهیه آنها به محلول‌های دارای نیکل، ۰/۱۱۵ گرم پرولین افزوده و آن‌ها را با همان محلول‌های نیکل به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رساندیم. سپس پتری‌دیش‌های حاوی بذور کشت شده به‌مدت ۱۰ روز، در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در همان شرایط اتاق کشت قرار داده شدند. در تمام مراحل فوق میزان رطوبت ۷۰ درصد و میزان نور ۱۸۰ میکرومول در مترمربع در ثانیه بود (Comlekcioglu *et al.*, 2009; Amini *et al.*, 2018).

اندازه‌گیری شاخص‌های جوانه‌زنی

بعد از ۱۲ روز تمام گیاهچه‌ها برداشت شدند و شاخص‌های زیر بررسی شد.

درصد جوانه‌زنی[1](GP) از طریق رابطه ۱ محاسبه شد (Salehi-Eskandari *et al.*, 2017) که در آن n تعداد بذر جوانه زده و N تعداد کل بذرها است.

رابطه ۱)

$$\text{درصد جوانه‌زنی (GP)} = \frac{\text{تعداد بذر جوانه زده در ۱۲ روز}}{\text{تعداد کل بذر}} \times ۱۰۰$$

میانگین زمان جوانه‌زنی از طریق رابطه ۲ محاسبه شد (Salehi-Eskandari *et al.*, 2017)

رابطه ۲) میانگین زمان جوانه‌زنی[2] (MGT) $= \frac{\sum Dn}{\sum n}$

n: تعداد بذور جوانه‌زده در روز D، D: تعداد روزهای شمرده شده از روز شروع

سرعت جوانه‌زنی نیز از رابطه ۳ به دست آمد (Salehi-Eskandari *et al.*, 2017).

رابطه ۳) سرعت جوانه‌زنی $= \sum \frac{ni}{Di}$

در این رابطه ni، تعداد بذر جوانه زده در هر روز و Di شماره روز پس از شروع آزمایش است.

[1] Germination Percentage
[2] Mean germination time

بعد از محاسبه شاخص‌های جوانه‌زنی، بعد از ده روز، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌ها برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد و سپس ساقه‌چه از ریشه‌چه جدا شد و پس از توزین قسمت‌های جدا شده گیاهچه‌ها، به‌مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از خشک شدن و رسیدن به وزن ثابت، وزن خشک گیاهچه‌ها مجدداً اندازه‌گیری شد. همچنین با تقسیم طول ریشه به ساقه‌چه، نسبت ریشه به ساقه محاسبه شد. محتوای آبی آن‌ها نیز از اختلاف میزان وزن تر و خشک ساقه‌چه محاسبه و برحسب گرم در هر گیاهچه بیان شد.

برای اندازه‌گیری نشت‌پذیری غشا سلولی از بافت تازه استفاده شد. در این روش ۰/۳ گرم بافت برگ (لپه‌ای) را پس از شست‌شو با آب مقطر، در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر در شیشه‌های استریل شناور کرده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتوری با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از این مدت هدایت الکتریکی (E_1) نمونه‌ها توسط هدایت‌سنج الکتریکی مدل (WTWLF315/SET) برحسب mS/cm (میلی زیمنس بر سانتی‌متر) در دمای اتاق سنجیده شد. هدایت الکتریکی نمونه‌ها (E_2) پس از حرارت دادن آن‌ها به مدت یک ساعت در دمای جوش انداره گیری شده و با کمک رابطه ۴ میزان نشت‌پذیری غشاء سلولی بر حسب درصد محاسبه گردید (Valentovic *et al.*, 2006).

رابطه ۴) میزان نشت‌پذیری غشاء = $(E_1/ E_2)\times 100$

مالون‌دی‌آلدئید، یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدی است که برای گیاهان تحت تنش، شاخص پراکسیداسیون لیپیدی محسوب می‌شود (Pandey *et al.*, 2009). برای بررسی غلظت مالون‌دی‌آلدئید ابتدا ۰/۰۵ گرم بافت برگ تازه در ازت مایع کاملاً ساییده و هموژن شد. سپس ۱ میلی‌لیتر محلول یک دهم درصد تری‌کلرواستیک‌اسید به آن اضافه گردید. محلول حاصل با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس به ۰/۲۵ میلی‌لیتر از عصاره رویی، ۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید اضافه گردید و محلول حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای جوش قرار داده شد و پس از سرد شدن در محیط، جذب محلول‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتردر طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با ضریب خاموشی $155\ mM^{-1}cm^{-1}$ و بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه شد (Valentovic *et al.*, 2006). تمام آزمایش‌ها، به‌صورت فاکتوریل، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد.که فاکتور اول شامل تیمارهای مختلف نیکل و فاکتور دوم شامل حضور یا عدم حضور پرولین (۱۰ میلی‌مولار) بود.

تحلیل آماری

جهت تجزیه داده‌ها از نرم افزارSPSS و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال کمتر از پنج درصد مقایسه شدند و برای رسم نمودارها از برنامه Excel 2007 استفاده گردید.

نتایج و بحث

شاخص‌های جوانه‌زنی

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، غلظت‌های مختلف نیکل تأثیری بر درصد جوانه‌زنی، میانگین زمان جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی بذرهای پیش‌تیمار شده با پرولین، نداشت و همانند محیط فاقد پرولین تمام غلظت‌های نیکل با گروه شاهد در یک سطح قرار گرفتند ($P>0.05$). بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که نیکل نمی‌تواند از سد پوشش دانه عبور کند و یا غلظت آن در دانه آن قدر ناچیز است که این شاخص‌ها را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد (Salehi-Eskandari *et al.*, 2017).

اما درصد جوانه‌زنی بذرها با حضور پرولین، در غلظت

صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ میلی مولار نیکل به‌ترتیب ۳۷، ۳۵، ۴۱، ۵۴ درصد نسبت تیمارهای مشابه فاقد پرولین کاهش داشت ($P<0.05$) اما بین غلظت‌های مختلف نیکل با وجود پرولین در محیط اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل A-۱). با حضور پرولین در محیط، احتمالاً مقدار زیادی از آن در فضای بین سلولی قرار گرفته و به‌علت کاهش پتانسیل اسمزی در این مکان، مانع از ورود آب به درون سلول‌ها شده به‌همین دلیل مرحله اول جذب آب توسط دانه را مختل می‌نماید که در نهایت موجب کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی شده و افزایش میانگین زمان جوانه‌زنی را در پی‌داشته است.

اثر غلظت‌های مختلف نیکل و تیمارهای مختلف پرولین بر صفات رویشی و محتوای آبی ساقه‌چه

طول ریشه‌چه و ساقه‌چه با افزایش غلظت نیکل کاهش یافت به‌طوری‌که طول ریشه‌چه با افزایش غلظت نیکل (۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی مولار نیکل) نسبت به گروه شاهد به‌ترتیب ۸۰، ۹۴، ۹۵ درصد کاهش داشت (شکل A-۲) اما روند کاهش طول ساقه‌چه نسبت به ریشه کم‌تر بود و در غلظت‌های بالای نیکل (۰/۴، ۰/۶ میلی مولار) طول ریشه‌چه و ساقه‌چه از لحاظ آماری با هم اختلاف معنی‌داری نداشته و باهم در یک سطح قرار گرفتند ($P>0.05$). تنش فلزات سنگین موجب کاهش رشد ریشه‌چه می‌شود. محققین کاهش رشد گیاهچه‌های گیاهان زراعی تحت تنش فلزات سنگین را ناشی از کاهش آب قابل دسترس و سمیت آن‌ها طی فرایند جوانه‌زنی می‌دانند (Di Salvatore *et al.*, 2008). برخلاف اندام‌های هوایی، طول و وزن خشک ریشه‌چه گیاهچه‌های خیار، تحت تأثیر غلظت بسیار پایین کادمیوم قرار گرفت. بنابراین سمیت کادمیوم بر طول و وزن تر ریشه‌چه بیشتر از بخش اندام‌های هوایی است (Gonçalves *et al.*, 2009). در این مطالعه نیز، حساسیت ریشه‌چه به تنش حاصل از غلظت‌های مختلف نیکل بیشتر از ساقه‌چه است. با توجه به نقش ریشه در جذب و انتقال، همچنین ارتباط مستقیم و مداوم با نیکل، میزان جذب و سمیت نیکل در ریشه با بالارفتن غلظت فلز در محیط افزایش می‌یابد (Gajewska *et al.*, 2013, Salehi-Eskandari *et al.*, 2017). کاهش رشد ریشه می‌تواند به‌علت تجمع نیکل در ریشه گیاه خیار چنبر باشد که این انباشت، از تقسیم و رشد طولی سلول‌های ریشه‌ها ممانعت به‌عمل می‌آورد. از طرفی حساسیت کمتر ساقه به افزایش غلظت نیکل در محیط، ممکن است به علت ارتباط غیرمستقیم و کاهش غلظت نیکل باشد که توانسته از سد ریشه عبور کرده و توسط سیستم آوندی به ساقه منتقل شود.

استعمال پرولین خارجی در گیاه شاهی (*Lepidium sativum*) در شرایط تنش شوری، موجب افزایش طول ساقه‌چه و ریشه‌چه شده است که این افزایش به‌علت افزایش تجمع پرولین در گیاهچه بوده است (Khalil and El-Noemani, 2012). پرولین نه تنها ساختار سه‌بعدی آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و غشاء اندامک‌ها را حفظ می‌کند بلکه به‌عنوان منبع غذایی محسوب شده و می‌تواند انرژی لازم برای رشد و مقاومت گیاه به تنش را فراهم کند (Zouari *et al.*, 2016). در این مطالعه نیز پیش‌تیمار پرولین توانست اثر مثبتی در افزایش طول ریشه‌چه در تمام تیمارهای نیکل بجز گروه شاهد داشته باشد. کاربرد پرولین خارجی در گیاه تنباکوی تحت تنش شوری، موجب افزایش طول و وزن تر ریشه‌چه شد. بهبود رشد گیاهچه تحت تنش‌ها توسط پرولین مربوط به نقش آن به‌عنوان یک محلول سازگار برای آنزیم‌ها و غشای سلولی می‌باشد (Okuma *et al.*, 2000). حضور پرولین در محیط موجب کاهش معنی‌دار طول ریشه در گروه شاهد نسبت به مابقی تیمارها در آن گروه شد اما در مابقی تیمارهای نیکل مشابه گروه فاقد تیمار پرولین بود. برخلاف اثر کاهشی حضور پرولین بر ریشه، در گروه شاهد و پایین‌ترین سطح تیمار نیکل (۰/۲ میلی‌مولار) افزایش‌دهنده طول ساقه‌چه بود. کاهش طول ریشه‌چه در گروه شاهد با حضور پرولین ممکن است به علت کاهش جذب آب توسط یاخته‌های مریستم

ریشه باشد که احتمالاً به‌دلیل استقرار پرولین در فضای بین سلولی است. با این وجود در تنش نیکل، پرولین با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و حفظ ساختار غشاء و پروتیئن‌ها توانسته آثار منفی تنش را خنثی کند و برخلاف تیمار شاهد، تنش مضاعفی بجز کاهش جذب آب بر ریشه اعمال نمی‌کند. طول ساقه‌چه با وجود پرولین در گروه شاهد و پایین‌ترین غلظت نیکل افزایش داشت. باتوجه به کاهش طول ریشه‌چه در این تیمارها احتمالاً اندام‌های هوایی با جذب پرولین و کاهش پتانسیل آبی خود توانسته بطور مستقل از ریشه، از محیط، آب جذب کرده و افزایش طول دهند.

مطابق شکل C-۲ نسبت ریشه به ساقه‌چه در محیط فاقد و دارای پرولین وابسته به غلظت نیکل نبود و تمام غلظت‌های نیکل از لحاظ آماری با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (P> 0.05). اما پیش‌تیمار پرولین موجب افزایش ۱/۶ و ۴/۵ برابری این نسبت در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌مولار نیکل در مقایسه با گروه شاهد شد و در بالاترین سطح از غلظت نیکل (۰/۶ میلی‌مولار) مجدداً این نسبت با گروه شاهد در یک سطح قرار گرفت. یکی از فاکتورهای اصلی بقاء در تنش‌های مختلف افزایش نسبت ریشه به اندام‌هوایی است که با گسترش سطح ریشه، میزان جذب آب و املاح افزایش می‌یابد (Salehi-Eskandari *et al.*, 2017). نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه در محیط فاقد پرولین تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نیکل قرار نگرفت ولی افزایش این نسبت در پیش‌تیمار پرولین با غلظت کم و متوسط نیکل نشان داد پیش‌تیمار پرولین رشد ریشه را نسبت به ساقه افزایش داده و مقاومت گیاه را در برابر تنش نیکل افزایش داده است. حضور مداوم پرولین در محیط منجر به افزایش بیشتر رشد ساقه شده که نسبت ریشه به ساقه را در گروه شاهد و غلظت کم و متوسط نیکل (۰/۲ و ۰/۴ میلی‌مولال) کاهش داده است. با توجه به پاسخ متفاوت طول ریشه و ساقه‌چه و نسبت آن‌ها به تیمارهای پرولین و نیکل مطابق جدول ۱-۱، اثر متقابل نیکل و پرولین بر این صفات معنی‌دار شد (P<0.05).

بر اساس شکل D-۲ محتوای آبی ساقه‌چه‌ها در محیط فاقد پرولین با افزایش غلظت نیکل کاهش داشت. این کاهش در غلظت ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ میلی‌مولار نیکل نسبت به گروه شاهد ۵۴، ۷۸/۹، ۸۶/۹ درصد بود که بجز بالاترین سطوح تنش (۰/۴ و ۰/۶ میلی‌مولار نیکل)، مابقی سطوح تنش نسبت به سطوح پایین‌تر اختلاف معنی‌دار نشان دادند (P<0.05). برهم خوردن تعادل آبی یکی از اولین پاسخ‌های گیاهان به غلظت‌های سمی فلزات سنگین است. گزارشات متعددی از نقش فلزات سنگین در دهیدراتاسیون گیاهان وجود دارد. به‌طور کلی کاهش رشد طولی ریشه و تارهای کشنده منجر به کاهش جذب آب شده و همچنین کاهش هدایت آبی ریشه از طریق ممانعت از انتقال سیمپلاستی و آپوپلاستی گیاهان نیز آن را تشدید می‌کند. در ساقه نیز انتقال در آوند آبکش به‌علت رسوب کالوز در آن کُند می‌شود (Rucińska-Sobkowiak, 2016).

پیش‌تیمار پرولین، محتوای آبی ساقه‌چه را نسبت به تیمارهای مشابه فاقد پرولین در غلظت صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ میلی‌مولار نیکل به‌ترتیب افزایش ۳۱/۵، ۱۱۳/۲، ۱۵۰/۸ و ۱۴۱ درصدی داد که این افزایش فقط در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار نیکل از لحاظ آماری نسبت به گروه مشابه فاقد پرولین معنی‌دار بود (P<0.05). پرولین در شرایط تنش سبب تثبیت تعادل آبی برگ می‌شود. علاوه بر این، پرولین از طریق اعمال نقش تنظیمی، بازگشایی روزنه‌ها را در شرایط تنش کاهش می‌دهد (Bekka *et al.*, 2018). محتوای آبی ساقچه‌ها تیمار شده با پرولین در مقایسه با تیمارهای فاقد پرولین در تیمارهای مختلف نیکل از لحاظ آماری در یک سطح قرار گرفت (P>0.05). حضور پرولین در محیط برخلاف پیش‌تیمار آن نتوانست اثر معنی‌داری در بهبود محتوای آبی ساقه‌چه داشته باشد. این اثر ممکن است ناشی از غلظت بالای این آمینواسید در محیط یا فضای بین سلولی بوده که باعث شده علاوه بر خواص مثبت ذکر شده این آمینواسید، جذب آب توسط گیاه را در شرایط تنش کاهش دهد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف پرولین و نیکل و برهمکنش آن‌ها بر صفات جوانه‌زنی، طول ریشه چه و طول ساقه‌چه گیاهچه خیارچنبر (*Cucumismelo var.* flexousus)

Table 1- Analysis of variance of the effect of different treatments and species and their interaction on germination parameters, Radicle length and hypocotyl length in *Cucumis melo var.* flexousus

منابع تغییرات Source of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square				
		درصد جوانه‌زنی GP	سرعت جوانه‌زنی GI	متوسط زمان جوانه‌زنی MGT	طول ریشه‌چه Radicle length	طول ساقه‌چه hypocotyl length
نیکل Nickel	3	177.9^{ns}	0.03 ^{ns}	0.053 ^{ns}	139.2***	30.6***
پرولین Proline	2	5041.8***	0.47***	3.2***	57.7***	2.6**
نیکل × پرولین Nickel ×Proline	6	130.7 ^{ns}	0.02^{ns}	0.05^{ns}	6.9***	0.7^{ns}
خطا Error	24	216.8	0.02	0.06	1.13	0.28
ضریب تغییرات (٪) C.V (%)		4.8	4.9	6.1	14.7	15.73

ns، *،** و*** بترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار بودن، معنی‌داردرسطح احتمال ۵ درصد، معنی‌داردرسطح احتمال ۱ درصد و معنی‌دار درسطح احتمال ۰/۱ درصد

ns, * , ** and *** showed non-significant, significant at P < 0.05 , P < 0.01 and p<0.001 respectively

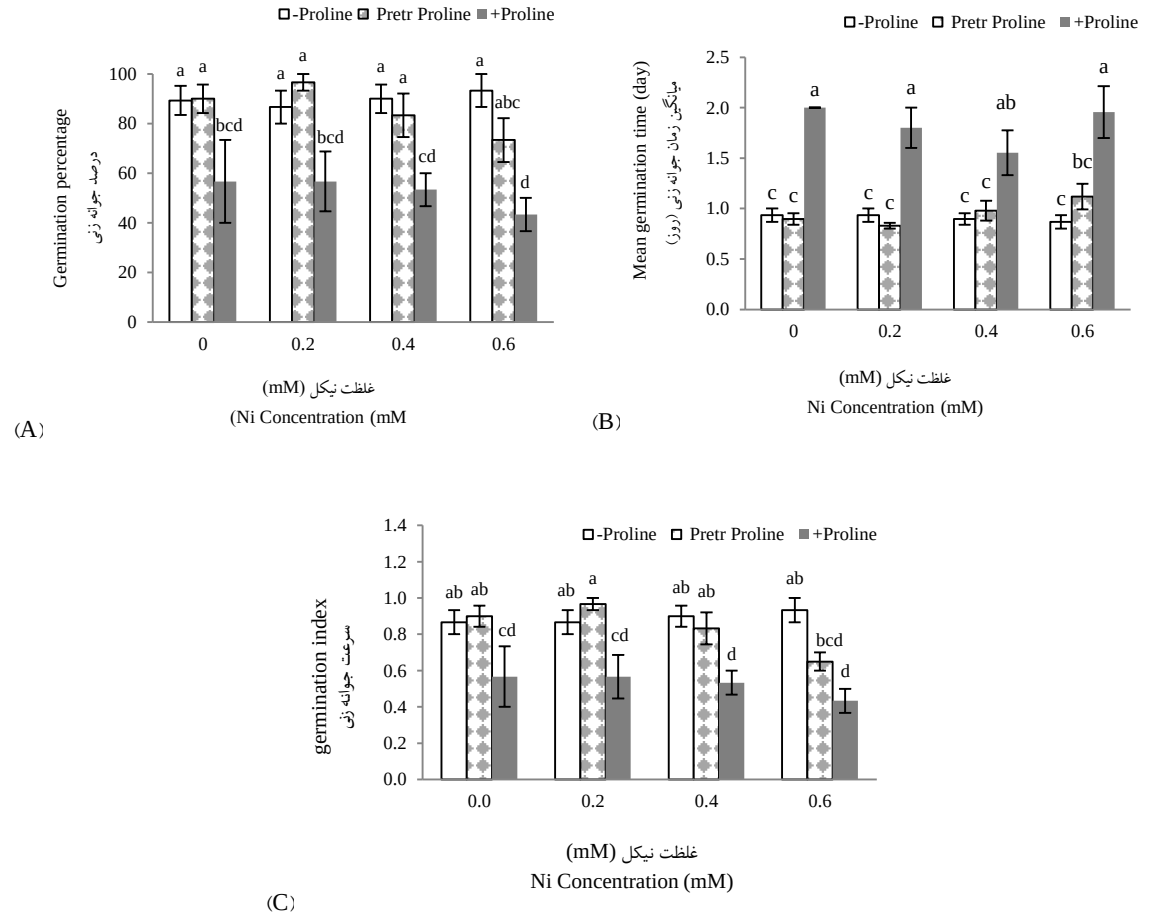
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف پرولین و نیکل و برهمکنش آن‌ها بر محتوای آبی، نسبت ریشه به ساقه، پراکسیداسیون لیپید و نشت‌پذیری غشاء سلولی گیاهچه خیارچنبر (*Cucumismelo var.* flexousus)

2- Analysis of variance of the effect of different treatments and species and their interaction on Water content, growth, Root to shoot ratio, malondialdehyde and ion leakage in *Cucumis melo var.* flexousus.

منابع تغییرات Source of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square			
		محتوای آبی Water content	نسبت ریشه به ساقه Root to shoot ratio	پراکسیداسیون لیپیدی MDA	نشت یونی Ion leakage
نیکل Nickel	3	1.03***	33.3***	0.000***	2689.6***
پرولین Proline	2	0.42***	178.2***	0.000***	2889.6***
نیکل × پرولین Nickel × Proline	6	0.09^{ns}	26.8***	0.000***	470.5***
خطا Error	24	0.04	0.85	0.000	27.3
ضریب تغییرات(٪) C.V (%)		11.6	16.5	6.98	7.7

ns، *،** و*** بترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار بودن، معنی‌داردرسطح احتمال ۵ درصد، معنی‌داردرسطح احتمال ۱ درصد و معنی‌دار درسطح احتمال ۰/۱ درصد

ns, * , ** and *** showed non-significant, significant at P < 0.05 , P < 0.01 and p<0.001 respectively



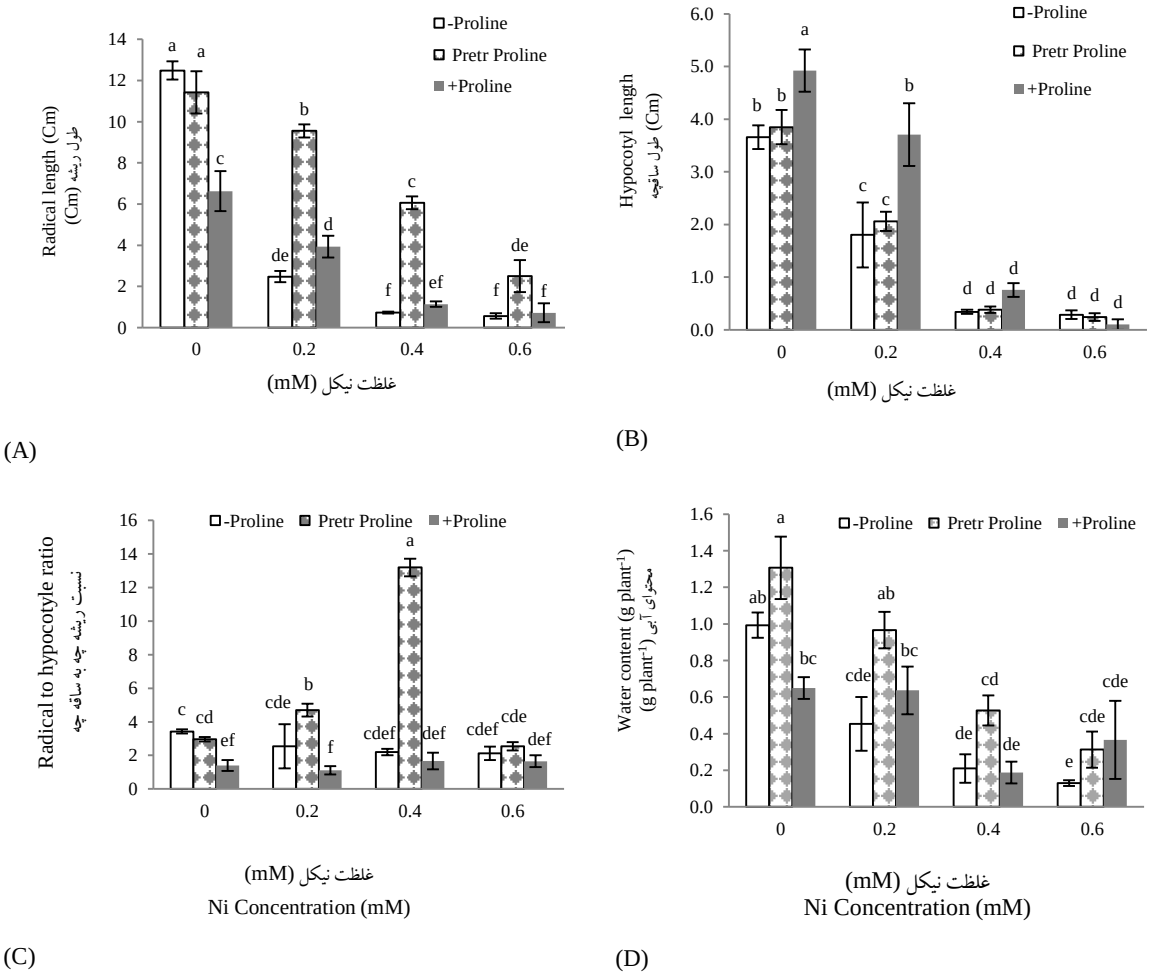
شکل۱- اثر تیمارهای مختلف پرولین بر درصد جوانه‌زنی (A)، میانگین زمان جوانه‌زنی (B) و سرعت جوانه‌زنی (C)گیاهچه خیار چنبر (*Cucumismelo var*.flexousus) تحت تنش نیکل (میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد).

حروف غیرمشابه بیان‌گر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن(P<۰/۰۵) است.

Figure 1- Effect of different treatments of prolineon germination percentage (A), mean germination time (B) and germination index (C) under nickel stress (mean three replications ± SE).
Different letters indicate statistically significant differences in Duncan's test ($p < 0.05$).

اثر غلظت‌های مختلف نیکل و تیمارهای مختلف پرولین بر پراکسیداسیون لیپیدی و نشت‌پذیری غشاء سلولی

میزان پراکسیداسیون لیپیدی با افزایش غلظت نیکل در محیط نسبت به گروه شاهد افزایش تدریجی داشت که از لحاظ آماری این افزایش فقط در بالاترین سطح تنش (۰/۶ میلی‌مولار نیکل) معنی‌دار شد و در این تیمار میزان مالون‌دآلدئید بیش از دو برابر گروه شاهد بود اما درصد نشت‌پذیری غشاء با افزایش غلظت نیکل در محیط بجز در پایین‌ترین سطح نیکل (۰/۲ میلی‌مولار) افزایش یافت (P<0.05). نتایج حاضر نشان می‌دهد افزایش غلظت نیکل در محیط موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء شده که با افزایش مالون‌دآلدئید (MDA) نمایان شده و به دنبال آن افزایش نشت یونی نیز صورت گرفته است. سمیت نیکل با برهم زدن متابولیسم اکسیداتیو، موجب افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان می‌شود که افزایش تولید MDA در نهایت موجب کاهش رشد می‌شود (Khan *et al*.2020) و با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

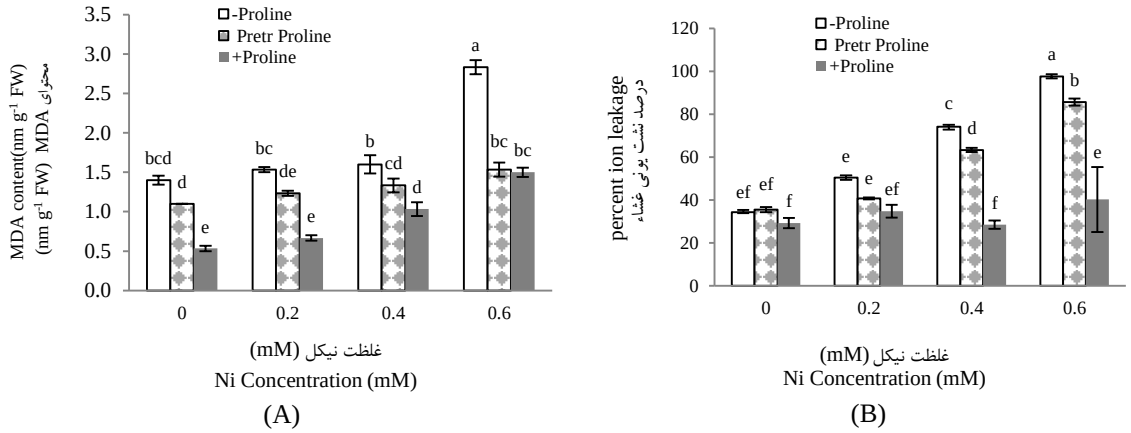


شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف پرولین بر طول ریشه‌چه (A)، طول ساقه‌چه (B)، نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه (C)، محتوای آبی (D)، گیاهچه خیارچنبر (*Cucumismelo var*.flexousus) تحت تنش نیکل (میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد).
حروف غیرمشابه بیان‌گر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن (P<۰/۰۵) است.

Figure 2- Effect of different treatments of prolineon Radical length (A), hypocotyl length (B) radical to hypocotyl ratio(C)and water content (D) under nickel stress (mean three replications ± SE).
Different letters indicate statistically significant differences in Duncan's test ($p < 0.05$).

میزان پراکسیداسیون لیپیدی با پیش‌تیمار بذرها با پرولین نیز روند مشابه با بذرهای فاقد پرولین داشت با این تفاوت که همواره در آن‌ها میزان مالون‌دآلدئید کمتر از تیمارهای مشابه فاقد پرولین بود به‌طوری‌که این کاهش در غلظت صفر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ میلی‌مولار نیکل نسبت به تیمارهای مشابه فاقد پرولین به ترتیب ۲۱/۴، ۱۹/۶، ۱۶/۷ و ۴۵/۹ درصدی بود. این کاهش فقط در گروه شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (شکل A-۳). میزان نشت یونی غشاء با پیش‌تیمار پرولین در حضور تیمارهای مختلف نیکل نیز روند مشابه با تیمارهای فاقد پرولین داشت با این تفاوت که همواره میزان نشت یونی غشاء در آن تیمارها کمتر بود. این کاهش فقط در غلظت‌های بالا (۰/۴، و ۰/۶ میلی‌مولار نیکل) معنی‌دار بود. با حضور پرولین در محیط، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی با غلظت نیکل رابطه خطی داشت که این افزایش بجز در پایین‌ترین سطح تنش (۰/۲ میلی مولار نیکل) در مابقی سطوح نسبت به تیمارهای قبلی

خود معنی‌دار بود (P<0.05). همواره میزان مالون‌دآلدئید در تیمارهای مختلف نیکل در حضور پرولین کمترین میزان را در مقایسه با تیمارهای مشابه فاقد پرولین و پیش‌تیمار آن داشت. مطابق جدول ۲-۱ و با توجه پاسخ متفاوت پراکسیداسیون لیپیدی به تیمارهای مختلف پرولین اثر متقابل نیکل و پرولین بر میزان مالون دآلدهید معنی‌دار شد (P<0.05). در حضور پرولین در محیط، درصد نشت‌پذیری غشاء برخلاف مابقی تیمارهای پرولین با تیمارهای مختلف نیکل رابطه خطی نداشت و فقط در بالاترین سطح از نیکل (۰/۶ میلی‌مولار نیکل) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و مابقی تیمارهای نیکل نشان داد (شکل B-۳). میزان نشت یونی غشاء با وجود پرولین و غلظت‌های بالای نیکل کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمارهای مشابه پرولین در آن غلظت‌ها داشت به‌طوری‌که در تیمار ۰/۴ میلی‌مولار نیکل نسبت به تیمار فاقد پرولین و پیش‌تیمار پرولین به‌ترتیب ۲/۶ و ۲/۲ برابر کاهش داشت و در تیمار ۰/۶ میلی‌مولار نیکل نسبت به تیمار فاقد پرولین و پیش‌تیمار پرولین به‌ترتیب ۲/۲ و ۲/۱ برابر کاهش داشت (P<0.05). بنابراین تیمارهای مختلف پرولین اثرات متفاوتی را بر نشت یونی غشاء اعمال کرده‌اند که منجر به معنی‌دار شدن اثر متقابل نیکل و پرولین بر این میزان نشت یونی غشاء شده است. داده‌های این پژوهش نشان می‌دهد پیش‌تیمار و به‌ویژه حضور پرولین در محیط تأثیر معنی‌داری در کاهش محتوای مالون‌دآلدئید و نشت یونی داشته است که با پژوهش‌های پیشین همخوانی دارد. با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانتی پرولین، این ترکیب می‌تواند اثرات بازدارندگی فلزات سنگین بر رشد گیاه را کاهش دهد و موجب بهبود رشد گیاهان شود (Khan *et al.*, 2020). حفظ پایداری غشاء از دیگر ویژگی‌های پرولین است (Matysik *et al.*,2002). از طرفی ممانعت از آسیب‌های اکسیداتیو القا شده با تنش، باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شود. مطالعات مشخص نموده است که در نتیجه تیمار خارجی پرولین، رابطه مستقیمی بین کاهش اثرات مخرب تنش اکسیداتیو و افزایش توان سیستم آنتی اکسیدانی گیاهان از جمله افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز وجود دارد (Pandey *et al.*2009, Bekka *et al.* 2018).



شکل ۳- اثر تیمارهای مختلف پرولین بر محنوای مالون‌دآلدئید (MDA) (A) و درصد نشت یونی غشاء (B) گیاهچه خیارچنبر (*Cucumismelo var*. flexousus) تحت تنش نیکل (میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد).
حروف غیرمشابه بیان‌گر اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن(P<۰/۰۵) است.

Figure 3- Effect of different treatments of proline on malondialdehyde content (A) and percent ion leakage (B) under nickel stress (mean three replications ± SE).
Different letters indicate statistically significant differences in Duncan's test ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری

براســـاس نتایج این پژوهش، شـــاخص‌های جوانه‌زنی به‌علت عدم نفوذپذیری پوشش بذر به نیکل تحت تأثیر آن قرار نمی‌گیرد و حضـــور دائم پرولین در محیط موجـب افـزایش مـدت زمـان جوانـه‌زنی و کـاهش درصـــد و سـرعت‌جوانه‌زنی می‌شـود که ممکن اسـت به‌علت کاهش توانـایی جـذب آب توســط رویـان بـاشـــد. اما برخلاف فاکتورهای جوانه‌زنی، رشـد گیاهچه بخصـوص ریشـه‌چه، بیشـتر از سـاقه‌چه به نیکل حسـاس اسـت. براسـاس نسـبت ریشـه به سـاقه و محتوای آبی، پیش‌تیمار پرولین برخلاف حضـــور آن بهترین تیمـار و بـه‌عنوان محلول اســـموتیکم سازگار و آنتی اکسیدانت، باعث بهبود مراحل اولیه رشد و کاهش اثرات منفی نیکل در این گیاه می شود.

منابع

Reference

Amini, F., M. Askary, and F. Mohtashami. 2018. Effects of salinity and external proline on seed germination and early growth of *Cucumis sativus* cv. super ps. Nus. Biosci. 10: 215-220.

Arshi, A., M. Abdin, and M. Iqbal. 2005. Ameliorative effects of $CaCl_2$ on growth, ionic relations, and proline content of *senna* under salinity stress. J. Plant Nutr. 28: 101-125.

Ashraf, M., and M. R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot. 59: 206-216.

Bekka, S., O. Abrous-Belbachir, and R. Djebbar. 2018. Effects of exogenous proline on the physiological characteristics of Triticum aestivum L. and *Lens culinaris* Medik. under drought stress. Acta Agric.

Slov. 111: 477-491.

Comlekcioglu, N., Y. Y. Mendi, S. Eldogan, and C. Unek. 2009. Effects of different combinations and concentrations of growth regulators and photoperiod on somatic embryogenesis of *cucumis melo* var. flexuosus. Afr. J. Biotechnol. 8: 6228-6232.

Di Salvatore, M., A. Carafa, and G.Carratù. 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: a comparison of two growth substrates. Chemosphere, 73: 1461-1464.

Furini, A., 2012. Plants and heavy metals. Springer Science and Business Media, Netherlands.

Gafar, M., A. Elhag, and M.Abdelgader. 2013. Impact of pesticides malathion and sevin on growth of snake cucumber (*Cucumis melo* L. var. Flexuosus) and soil. Univers. J. Agric. Res. 1(3): 81–84.

Gajewska, E., E. Niewiadomska, K. Tokarz, M. Słaba, and M. Skłodowska. 2013. Nickel-induced changes in carbon metabolism in wheat shoots. J. Plant Physiol. 170: 369-377.

Gajewska, E., M. Skłodowska, M. Słaba, and J. Mazur. 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. Biol. Plant. 50: 653-659.

Gonçalves, J. F., F. T.Nicoloso, A. G. Becker, L. B. Pereira, L. A. Tabaldi, D. Cargnelutti, C. M. de Pelegrin, V. L. Dressler, J. B. da Rocha, and M. R. C. Schetinger. 2009. Photosynthetic pigments content, δ-aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities and mineral nutrients concentration in cadmium-exposed *Cucumis sativus* L. Biologia. 64: 310-318.

Hua-long, L., S. Han-jing, W. Jing-guo, L.Yang, Z. De-tang, and Z.Hong-wei. 2014. Effect of seed soaking with exogenous proline on seed germination of rice under salt stress. J. Northeast Agri. (English Edition) 21: 1-6.

Iori, V., F. Pietrini, A. Cheremisina, N. I. Shevyakova, N. Radyukina, V. V. Kuznetsov, and M. Zacchini. 2013. Growth responses, metal accumulation and phytoremoval capability in *Amaranthus* plants exposed to nickel under hydroponics. Water Air Soil Pollut. 224: 1-10.

Islam, M.M., Hoque, M.A. Okuma, E. Banu, M.N.A. Shimoishi, Y. Nakamura, and Y. Murata. 2009. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. J. Plant Physiol. 166: 1587-1597.

Khalil, S. and A. El-Noemani. 2012. Effect of irrigation intervals and exogenous proline application in improving tolerance of garden cress plant (*Lepidium sativum* L.) to water stress. J. Appl. Sci. Res. 8(1): 157-167.

Khan, F., S. Hussain, S. Khan, and M. Geng. 2020. Seed priming improved antioxidant defense system and alleviated Ni-induced adversities in rice seedlings under N, P, or K deprivation. Front. Plant Sci. 11: 565647.

Matysik, J., B. Alia, Bhalu, and P.Mohanty. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Curr. Sci. 82: 525-532.

Nasri, F., Khosheh Saba, M., Ghaderi, A., Mozafari, A.A., Javadi, T., 2014. Improving germination and dormancy breaking in Alstromeria ligtu hybrid seeds. Trka. J. Sci. 1: 38-46.

Okuma, E., K. Soeda, M.Tada, and Y. Murata. 2000. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. J. Soil Sci. Plant Nutr. 46: 257-263.

Pandey, N., G. C. Pathak, D. K. Pandey, and R. Pandey. 2009. Heavy metals, Co, Ni, Cu, Zn and Cd, produce oxidative damage and evoke differential antioxidant responses in spinach. Braz. J. Plant Physiol. 21:103-111.

Rucińska-Sobkowiak, R. 2016. Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. Acta Physiol. Plant. 38: 1-13.

Sakhai, F., Z. Movahedi, M. Ghabooli, E. Mohseni fard. 2021. Effect of Piriformospora indica inoculation on some morphophysiological traits of fenugreek under cadmium stress. Iranian J.Seed Sci.Technol. 10: 123-140. (In Persian, with English Abstract)

Salehi-Eskandari, B., S. M. Ghaderian, R. Ghasemi, and H. Schat. 2017. Optimization of seed germination in an Iranian serpentine endemic, Fortuynia garcinii. Flora. 231: 38-42.

Salehi-Eskandari, B., S.M. Ghaderian, and H. Schat. 2018. Differential interactive effects of the Ca/Mg quotient and PEG-simulated drought in *Alyssum inflatum* and *Fortuynia garcinii.* Plant Soil. 428: 213-222.

Shahzad, B., M.Tanveer, A. Rehman, S. A. Cheema, S. Fahad, S. Rehman, and A. Sharma. 2018. Nickel; whether toxic or essential for plants and environment-A review. Plant Physiol. Biochem. 132: 641-651.

Shahid, M.A., R.M. Balal, M.A. Pervez, T. Abbas, M.A. Aqeel, M.M. Javaid, and F. Garcia Sanchez, 2014. Exogenous proline and proline-enriched *Lolium perenne* leaf extract protects against phytotoxic effects of nickel and salinity in *Pisum sativum* by altering polyamine metabolism in leaves. Turk. J. Bot. 38: 914–926.

Singh, M., A. Singh, N. Nehal, and N. Sharma. 2018. Effect of proline on germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. J. Pharmacogn. Phytochem. 7: 2449-2452.

Valentovic, P., M. Luxova, L. Kolarovic, and O. Gasparikova. 2006. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. Plant Soil Environ. 52: 184

Zouari, M., C. B. Ahmed, N. Elloumi, K. Bellassoued, D. Delmail, P. Labrousse, F. B. Abdallah, and B. B. Rouina. 2016. Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. Ecotoxicol. Environ. Saf. 128: 195-205.