نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، ص. ۳۵۷-۳۵۰
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 27, No. 3, Fall 2013, P. 350-357
ISSN: 2008 - 4730

بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی دو پایه مرکبات به تنش شوری درون شیشه‌ای

فریبرز حبیبی[1*] - محمد اسماعیل امیری[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۴

چکیده

در این آزمایش، واکنش‌های فیزیولوژیکی دو پایه مرکبات [نارنج (*Citrus aurantium* L.) و پونسیروس (*Poncirus trifoliata* Raf.)] به تنش شوری در شرایط درون شیشه‌ای بررسی شد. این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. ریزنمونه‌های (گیاهچه‌های نوسلار حاصل از کشت بذر) هر دو پایه به محیط کشت پرآوری جامد موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۸/۹ میکرومولار BA و ۰/۵ میکرومولار NAA با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) در شش تکرار منتقل شدند. نتایج نشان داد که شاخص کلروفیل برگ، سرعت فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، غلظت CO_2 درون روزنه‌ای و پروتئین کل با افزایش سطح شوری کاهش یافت. گرچه اثر متقابل پایه و شوری در پارامترهای ذکر شده فوق، معنی‌دار نشد. کاهش پروتئین کل، کلروفیل، فتوسنتز و غلظت CO_2 درون روزنه‌ای در پایه پونسیروس بیشتر از پایه نارنج بود. همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش سطح شوری در هر دو پایه افزایش پیدا کرد که میزان افزایش در پونسیروس بیشتر از نارنج بود. با افزایش سطوح شوری در محیط کشت، جذب یون‌های سدیم (Na^+) و کلر (Cl^-) به طور معنی‌داری طی شش هفته کشت در هر دو پایه افزایش یافت. در مقایسه با پونسیروس، نارنج سدیم و کلر کمتری جذب کرد. بنابر نتایج حاصله می‌توان اظهار نمود که مقاومت به شوری یک همبستگی منفی با غلظت سدیم و کلر در بافت گیاه دارد و گیاهانی که سدیم و کلر کمتری در بافت داشته باشند، مقاوم‌ترند. بنابراین پایه نارنج مقاومتر از پونسیروس به تنش شوری بود و توانست مقاومت بیشتری در غلظت‌های بالای شوری داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پراکسیداز، پایه‌های مرکبات، تنش شوری، فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای

مقدمه

شوری یکی از مهمترین عوامل محدود کننده کشت مرکبات در نواحی خشک و نیمه‌خشک می‌باشد. با توجه به حساسیت مرکبات به شوری، می‌توان با مطالعه و استفاده از پایه‌های مناسب، تنوع زیادی در میزان مقاومت به شوری مرکبات ایجاد کرد. بنابراین تحقیقات بنیادی جهت شناخت آستانه و میزان مقاومت به شوری در پایه‌های مرکبات ضروری است (۳۲).

یکی از رایج‌ترین پایه‌های مرکبات نارنج (*Citrus aurantium* L.) است، که دارای سیستم ریشه عمیق و گسترده، مقاوم به سرما و خشکی است. خاک‌های سنگین با زهکشی ضعیف و نیز گموز را تحمل می‌کند (۲۶). پایه متداول دیگر مرکبات، پونسیروس (*Poncirus trifoliata* Raf.) است که تنها گونه خزان‌کننده و مقاوم‌ترین پایه مرکبات به سرما محسوب می‌شود. این پایه به ویروس تریستزا، زایلوپروسیس، نماتد مرکبات، پوسیدگی طوقه و خاک‌های سنگین با زهکش ضعیف مقاوم است (۳۳).

تاکنون مطالعات زیادی جهت شناخت آستانه و میزان مقاومت پایه‌های مرکبات به شوری در شرایط مزرعه انجام شده است و تفاوت قابل توجهی از نظر میزان تحمل به شوری در آن‌ها گزارش شده است (۱۱، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۳۲ و ۳۳). بعضی از محققین گزارش نمودند که تجمع یون‌های سمی سدیم و کلر در بافت گیاهی بسته به مکانیزم جذب سدیم و کلر و وضعیت توزیع آن‌ها که به رشد و عملکرد صدمه می‌رساند (۱۹). یون سدیم برای متابولیسم سلولی سمی است و بر فعالیت برخی آنزیم‌ها اثر می‌گذارد. غلظت بالای یون سدیم سبب بر هم خوردن تعادل اسمزی و ساختار غشا، کاهش رشد و ممانعت از تقسیم سلولی می‌گردد (۲). از علائم مسمومیت سدیم در مرکبات می‌توان به کلروز و سوختگی حاشیه‌ای برگ‌ها اشاره کرد (۲۶). افزایش بیش از حد کلر در بافت‌های گیاهی باعث کاهش میزان ذخیره جذبی (نسبت نشاسته به قند) و افزایش آبگیری بافت گیاه

۱و۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
(*- نویسنده مسئول: Email: fariborz_h659@yahoo.com)

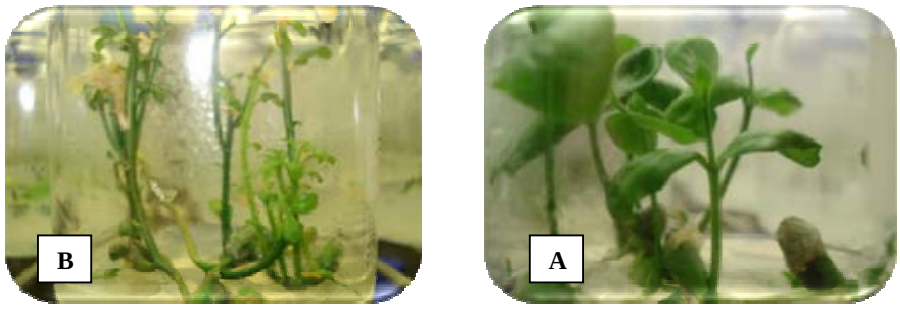
می‌گردد. از طرف دیگر شوری به علت وجود آنیون کلر باعث کاهش غلظت آنیون‌های آلی در گیاه می‌گردد (۱۵). در مرکبات، پایه‌هایی به عنوان پایه‌های متحمل به شوری رتبه‌بندی می‌شوند که در محدود کردن تجمع کلر در برگ‌ها توانایی داشته باشند (۲۲). یون‌های کلر برای مرکبات نسبت به سدیم مسمویت بیشتری ایجاد می‌کنند (۲۳). به طور کلی تأثیر شوری بر افزایش و یا کاهش فعالیت آنزیم‌ها بستگی به طبیعت آنزیم‌ها، میزان تنش، اندام گیاه و گونه‌های گیاهی دارد. فعالیت بعضی آنزیم‌های آمیلاز، آنزیم‌های مؤثر در سنتز بتائین و پرولین افزایش و فعالیت بعضی آنزیم‌ها مانند نیترات ردوکتاز به طور خطی با افزایش شوری کاهش می‌یابد (۱۴). محققان گزارش کردند که میزان کلروفیل در واکنش به تنش شوری در چند پایه مرکبات کاهش یافت. کاهش کلروفیل به علت تجمع کلر می‌باشد (۱۶). فتوسنتز و رشد سلول، از اولین فرآیندهایی هستند که توسط تنش شوری و خشکی مختل می‌شوند. این صدمات یا بطور غیر مستقیم در اثر محدودیت در انتشار گازها از میان روزنه‌ها و مزوفیل و تغییر در متابولیسم فتوسنتزی و یا ناشی از تنش اکسیداتیو می‌باشند (۸). شوری باعث کاهش هدایت روزنه‌ای، تعرق و تثبیت CO_2 طی فرآیند فتوسنتز و میزان فتوسنتز خالص در مرکبات می‌شود (۱۶). استفاده از تکنیک کشت بافت برای انتخاب گونه های گیاهی مقاوم به شوری و خشکی و سایر تنش ها بسیار متداول است، زیرا کنترل بیشتری از شرایط بیرون دارد و تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها می‌توانند در یک فضای محدود ارزیابی شوند (۲۶). در شرایط مزرعه، گیاهان در شرایط آب و هوایی متغیری هستند که انجام تحقیقات و پژوهش‌ها را دشوار می‌سازد. تکنیک کشت بافت بر این محدودیت‌ها غلبه کرده و اجازه به رشد همگروهی گیاه تحت شرایط تغذیه‌ای و آب و هوایی کنترل شده می‌دهد و امکان انجام آزمایش‌ها در شرایط یکسان در تمام طول سال امکان پذیر باشد (۳۴) و همچنین تکنیک کشت بافت به دلیل حذف سیستم ریشه، بهترین روش برای ارزیابی واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مرکبات محسوب می‌شود (۱۹). به عنوان مثال تنش شوری در کشت درون شیشه‌ای پایه‌های سیب (۲۵،۳۰)، کیوی‌فروت (۲۸)، پایه گلابی (OH×F333)؛ (۳۱)، پایه هلو (نماگارد و GF677) (۲۹)، جوجوبا (*Simmondsia chinensis*) (۲۴)، پایه گیلاس Gisela 5 (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*) (۱۰)، پایه‌های مرکبات (نارنگی کلئوپاترا، کاریزو سیترنج و سیترومیلو)؛ (۱۹)، لیموی ولکامر (۱۳)، پایه‌های انگور (۱)، پایه‌های پسته (۹) مورد بررسی قرار گرفته است. واکنش درون شیشه‌ای پایه گیلاس Gisela 5، در غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت از قبیل: سوپراکسیداز دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز با افزایش سطح شوری، افزایش پیدا کرد (۱۰). همچنین در پژوهشی اثر تنش شوری NaCl و $CaCl_2$ بر روی سیب M4 در شرایط دورن شیشه‌ای انجام شد. نتایج نشان دادند که با افزایش غلظت NaCl و $CaCl_2$، غلظت سدیم، کلر، پرولین و قندهای محلول در گیاهچه‌ها افزایش یافت، در حالیکه میزان کلروفیل برگ در مقایسه با شاهد کاهش یافت (۳۰). نتایج واکنش پایه‌های انگور (Dogridge, SO4, H-144, 3309C) به تنش شوری NaCl در غلظت صفر تا ۱۲۵ میلی‌مولار در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد، میزان پروتئین کل، پرولین، سدیم و پتاسیم در تمام پایه‌ها افزایش یافت در حالیکه میزان کلروفیل و قند کل کاهش پیدا کرد (۱).

بیشتر تحقیقات برای مقاومت به شوری در پایه‌های مرکبات بر پایه آسیب و تجمع یون در برگ‌ها بوده است و این یکی از دلایلی است که هنوز مکانیسم تحمل به شوری در پایه های مرکبات تاکنون شناسایی نشده است. بنابراین می‌توان با ارزیابی واکنش‌های فیزیولوژیکی پایه‌های مورد آزمایش (نارنج و پونسیروس) در شرایط تنش شوری درون شیشه‌ای میزان تحمل آن‌ها را مشخص نمود.

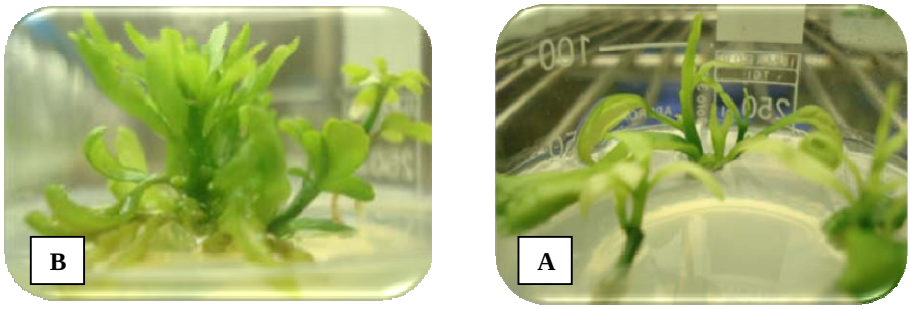
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

میوه‌های رسیده هر دو پایه (نارنج و پونسیروس) از مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور در شهر رامسر تهیه گردید. بذور از میوه‌های هر دو پایه استخراج، و پس از جداسازی پوسته خارجی، بذور نوسلار (بذور با بیش از دو لپه و شکل نامتقارن) از بذور جنسی جدا شدند. بذور نوسلار در زیر هود استریل با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و با هیپوکلریت‌سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس با اتانول ۷۰ درصد بطور کامل ضدعفونی شدند. بذور ضدعفونی شده با آب مقطر استریل سه بار (۵ دقیقه برای هربار) آبکشی شدند. سپس بذور هر دو پایه در محیط کشت جامد موراشیگ و اسکوگ (MS) (۲۱) در ظروف کشت ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط (MS) کشت شدند و داخل اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. ترکیب محیط کشت (MS) جهت جوانه زنی بذور، شامل عناصر ماکرو، میکرو، ویتامین و آهن با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و بدون تنظیم کننده‌های رشد بود. بعد از جوانه‌زنی بذور و رشد دانهال‌ها (۶ هفته بعد از کشت)، از گیاهچه‌های نوسلار به عنوان ریزنمونه برای هر دو پایه استفاده شد (شکل ۱). گیاهچه‌های نوسلار جهت پرآوری به محیط کشت جامد با ۸/۹ میکرومولار بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۵ میکرومولار نفتالین استیک اسید (NAA)، منتقل شدند و بعد از گذشت ۵۰ روز پرآوری انجام شد (شکل ۲).



شکل ۱- گیاهچه‌های نوسلار ٦ هفته‌ای حاصل از کشت بذر (A) نارنج B) پونسیروس)



شکل ۲- نمونه‌های پرآوری شده از گیاهچه‌های نوسلار بعد از گذشت ۵۰ روز واکشت در محیط پرآوری MS (A) نارنج B) پونسیروس)

طرح آزمایشی و اعمال تنش شوری

این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه زنجان، در سال ۱۳۹۱-۱۳۹۰ انجام گردید. به منظور بررسی اثر تنش شوری درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌های پرآوری شده پایه‌های نارنج و پونسیروس، در همان محیط کشت پرآوری با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (NaCl) [صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار] در شش تکرار (ظرف کشت)، که در هر ظرف کشت سه ریزنمونه یکنواخت (به اندازه ۲ سانتی‌متر) به مدت شش هفته واکشت شدند. نصف طول ریزنمونه ۲ سانتی‌متری در داخل محیط کشت قرار گرفت. به منظور جلوگیری از وارد آمدن تنش ناگهانی به گیاهان، تیمارهای شوری ده روز بعد از استقرار ریزنمونه‌ها اعمال گردید.

شرایط نگهداری تمامی کشت‌های انجام شده (کشت بذر، مرحله پرآوری، مرحله استقرار و تیمار شوری) در اتاقک رشد، در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۳۰۰۰- ۲۵۰۰ لوکس بود.

جمع آوری داده‌ها

در پایان دوره تنش (هفته ششم)، میزان فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و غلظت CO_2 درون روزنه‌ای با دستگاه فتوسنتزمتر مدل (LCI-ADC.CO.UK, England) اندازه‌گیری شد. در اواسط دوره روشنایی اتاقک رشد (ساعت هشتم) پارامترهای مذکور اندازه‌گیری شدند. شاخص کلروفیل برگ با دستگاه کلروفیل‌متر (SPAD) مدل (Konica Minolta 502, Japan)، قرائت شد و برگ وسط هر گیاهچه برای اندازه‌گیری انتخاب شدند.

برای اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز و پروتئین کل نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده شده و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفتند. فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش چانس و مهلی[1] (۶) اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین کل به روش برادفورد (۵) اندازه‌گیری شد، به منظور تهیه محلول استاندارد از سرم آلبومن گاوی استفاده شد. میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil.Series 2, England) قرائت گردید.

سدیم و کلر بافت گیاهچه‌ها هر دو هفته یکبار [هفته صفر (از نمونه های ده روز استقرار یافته قبل تیمار)، هفته ۲، ۴ و ۶] اندازه گیری شدند. پس از هضم تر گیاهچه‌ها، غلظت سدیم (Na^+) بافت با دستگاه فلیم فتومتر مدل (Jenway PFP7, England) اندازه‌گیری شد (۱۳). درصد کلر (Cl^-) بافت با روش تیتراسیون با نیترات نقره ($AgNo_3$) ۰/۱ نرمال اندازه‌گیری شد و با فرمول زیر محاسبه شد و به

1. Chance and Maehly

صورت پی‌پی‌ام گزارش شد (۱۹).

$$\%\ Cl = \frac{\text{۱۰۰×۳۵/۵×نرمالیته نیترات نقره×نیترات نقره مصرفی (میلی‌لیتر)}}{\text{۱۰۰×وزن نمونه}}$$

تجزیه تحلیل آماری داده‌ها

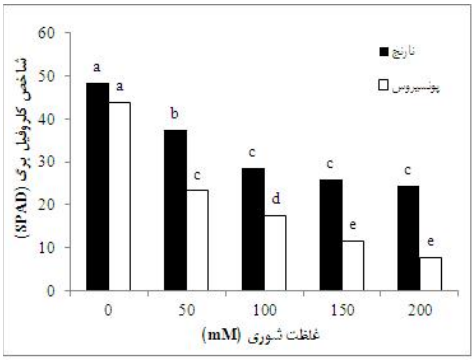
داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار آماری MSTAT-C تجزیه و تحلیل شدند و مقایسات میانگین به کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت و نمودارها توسط نرم افزار Excel رسم گردیدند.

نتایج و بحث

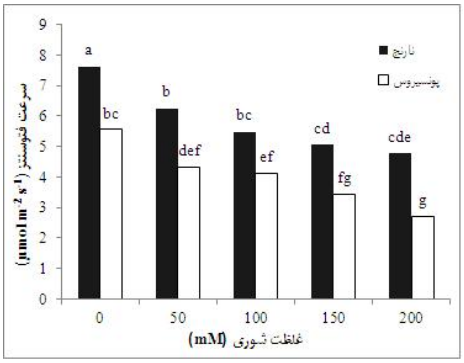
نتایج این تحقیق نشان داد با افزایش سطوح شوری درون شیشه‌ای (۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌مولار)، شاخص کلروفیل برگ (*SPAD* unit)، در هر دو پایه کاهش یافت. کمترین میزان آن (*SPAD* ۷/۷۷) در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار در پایه پونسیروس مشاهده شد. در صورتیکه بین تیمارهای ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار، شاخص کلروفیل برگ نارنج اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۳). همچنین با افزایش سطوح شوری، غلظت کلر در بافت افزایش یافت، این افزایش منجر به کاهش میزان کلروفیل برگ می‌گردد. بطوریکه میزان کلروفیل می‌تواند به عنوان یک شاخص حساس برای متابولیسم سلولی باشد، بنابراین احتمالاً کاهش کلروفیل به دلیل تجمع یون‌ها باشد (۱). کاهش کلروفیل در اثر تنش شوری کلرید سدیم در کشت درون شیشه‌ای پایه‌های انگور (۱)، سیب (۳۰)، گیلاس (۱۰) نیز بدست آمده است که کمترین میزان کلروفیل در سطوح بالای شوری مشاهده گردید. کاهش شاخص کلروفیل به سبب تجمع یون کلر در برگ‌ها (۱۶)، افزایش حساسیت برگ به اتیلن، تخریب بیوسنتز کلروفیل و احتمالاً به دلیل کاهش میزان عناصر نیتروژن (N)، منیزیم (Mg)، آهن (Fe) و منگنز (Mn) می‌باشد. این عناصر از اجزای ساختمان کلروفیل هستند و کمبود آن‌ها بر میزان کلروفیل اثر می‌گذارد (۱۲).

با افزایش سطح شوری میزان فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و غلظت CO_2 درون روزنه‌ای در هر دو پایه کاهش پیدا کرد. کمترین میزان فتوسنتز مربوط به پونسیروس در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار بود (شکل ۴) و در این غلظت کمترین میزان هدایت روزنه‌ای در پایه‌های نارنج و پونسیروس به ترتیب با ۱/۲۵ و ۱/۵ ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) بود (شکل ۵). کمترین غلظت CO_2 درون روزنه‌ای مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده شد، که در پایه‌های نارنج و پونسیروس به ترتیب ۳۵۴/۵ و ۳۴۸/۲۵ (µmol/mol) بود (شکل ۶).

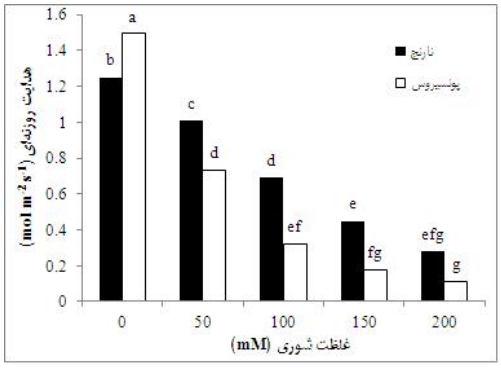
محققین گزارش نمودند که اثر تیمار نمک‌های کلرید سدیم (NaCl)، بر دو پایه مرکبات (ماکروفیلا و نارنگی کلئوپاترا)، در غلظت‌های (صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار) باعث افزایش میزان کلر در برگ‌ها و نهایتاً منجر به کاهش فتوسنتز می‌شود (۴). بر اساس این نتایج و مشاهدات مشابه، کاهش در فتوسنتز همبستگی زیادی با افزایش غلظت کلر در برگ دارد (۴، ۷ و ۱۶). به عنوان مثال تنش شوری کلرید سدیم در سطوح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار بر دانهال‌های شش ماهه رانگپور لایم (*Citrus limonia* Osbeck) و زیتون رقم آربیکن (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) به دلیل تجمع یون‌های سدیم و کلر در ریشه و بافت برگ، منجر به کاهش فتوسنتز خالص و کاهش هدایت روزنه‌ای در آن‌ها شد (۱۶). به همین دلیل، شوری و به ویژه تجمع یون کلر (Cl) در کلروپلاست با اثر بر ساختار این اندامک و تیلاکوئید و انتقال الکترون، از فعالیت فتوسیستم II جلوگیری می‌کند (۴ و ۷). سمیت مستقیم یون‌های سدیم و کلر در مزوفیل برگ و همچنین کاهش کلروفیل برگ نیز منجر به کاهش فتوسنتز می‌شود (۱۶). واکنش بیشتر گیاهان به شوری کاهش هدایت روزنه‌ای است و دلیل آن مختل شدن روابط آبی و تولید ABA است (۱۵، ۱۹). در پژوهشی واکنش‌های فیزیولوژیکی پایه‌های نارنج، کاریزو سیترنج و فلائینگ دراگون با سطوح مختلف کلرید سدیم (صفر، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار) بررسی شد.



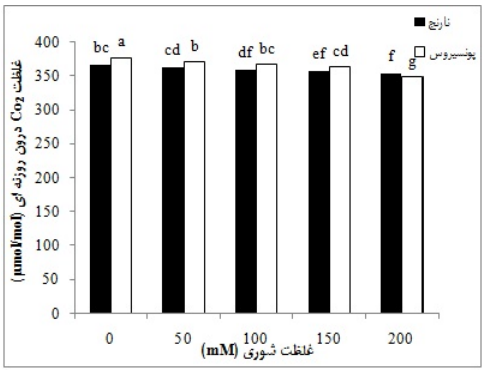
شکل۳- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر شاخص کلروفیل برگ پایه‌های نارنج و پونسیروس



شکل ٤- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر سرعت فتوسنتز پایه‌های نارنج و پونسیروس



شکل ۵- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر هدایت روزنه‌ای پایه‌های نارنج و پونسیروس



شکل ٦- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر غلظت CO2 درون روزنه‌ای پایه‌های نارنج و پونسیروس

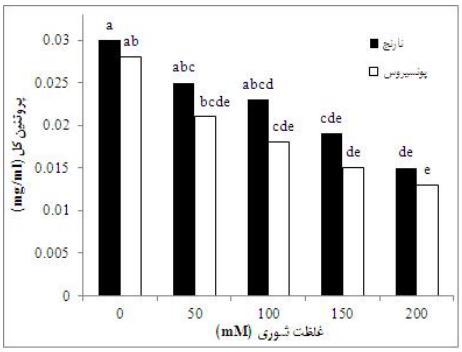
بعد از گذشت ۳۵ روز، میزان فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و CO_2 درون روزنه‌ای در تمامی پایه‌ها کاهش پیدا کرده بود، و بیشترین کاهش در تیمار ۹۰ میلی‌مولار مشاهده شد (۱۱). پونسیروس غلظت-های بیشتری از CO_2 درون روزنه‌ای نسبت به نارنج داشت که احتمال می‌رود به دلیل تجمع بیشتر یون کلر و بسته شدن روزنه‌های برگ و کاهش میزان فتوسنتز باشد (۱۱).

با افزایش سطح شوری میزان پروتئین کل در هر دو پایه کاهش یافت (شکل ۷). کمترین میزان پروتئین کل در پایه‌های نارنج و پونسیروس به ترتیب با ۰/۱۳ و ۰/۵۱ میلی‌گرم بر لیتر در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۷).

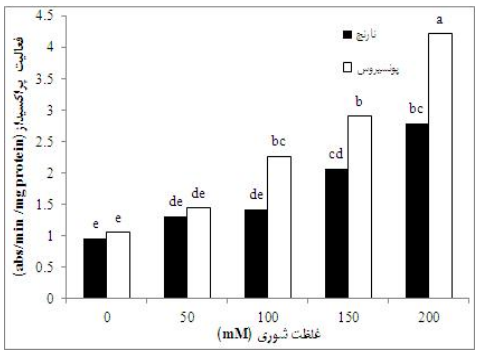
یکی از فرآیندهای مهم درون سلولی، سنتز پروتئین است که شدیداً تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرد و به همراه آن فتوسنتز، جابجایی متابولیت‌ها و جذب و انتقال یون‌ها نیز تأثیر می‌پذیرد. بسیاری از پروتئین‌ها طی تنش هیدرولیز می‌شوند و بر همین اساس، کاهش در غلظت پروتئین کل، می‌تواند از نتایج تنش باشد. این نتیجه در تنش شوری درون شیشه‌ای پایه سیب M4 در سطوح ۳۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده شد. بیشترین و کمترین میزان پروتئین کل، به ترتیب در تیمار ۳۵ و ۲۰۰ میلی‌مولار بدست آمد (۳۰). همچنین در تنش شوری درون شیشه‌ای پایه گیلاس Gisela 5 در سطوح صفر، ۵۰، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، منجر به کاهش میزان پروتئین کل شد، بطوریکه کمترین میزان پروتئین کل در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده گردید (۱۰). علت کاهش میزان پروتئین می‌تواند ناشی از اثر شوری (اثر ویژه یون‌ها و یا تنش اکسیداتیو) بر ساختار پروتئین‌ها و تخریب آن‌ها و یا در اثر صدمه به مسیرهای سنتز و کاهش تولید پروتئین باشد. تأثیر اکسیژن‌های فعال بر DNA و RNA می‌تواند از دلایل کاهش سنتز پروتئین‌ها در شرایط تنش باشد (۱۰).

فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش سطح شوری در هر دو پایه افزایش پیدا کرد، ولی میزان افزایش در پایه پونسیروس بیشتر از پایه نارنج بود، بطوریکه بیشترین مقدار (۴/۲ جذب در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در پونسیروس مشاهده می‌گردد (شکل ۸). با توجه به فعالیت آنزیم پراکسیداز، می‌توان استنباط نمود؛ تحمل به شوری، به یک سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمدتر بستگی دارد (۱۰). پراکسیداز به همراه آسکوربات‌پراکسیداز، پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) را درون سلول و در آپوپلاست خنثی می‌کند. پراکسیدهیدروژن نسبتاً پایدار و از نظر بار الکتریکی خنثی است، اما از آنجا که می‌تواند از میان غشای سلولی عبور کرده و وارد اجزای سلولی شود، بسیار زیان‌آور است (۱۷). پراکسیدهیدروژن در حضور رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH) را که بسیار فعال است، تولید می‌کند. بنابراین خنثی کردن پراکسیدهیدروژن برای بقای سلول اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۰). پراکسیدازها نسبت به سایر آنزیم‌ها کمتر اختصاصی هستند و با بسیاری از پیش‌ماده‌ها به عنوان دهنده الکترون، واکنش می‌دهند. تغییر در بیان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بسیاری از گونه‌های گیاهی در واکنش به شرایط نامساعد محیطی و تنش‌های زنده و غیر زنده و محرک‌های نمو مشاهده شده است (۲۷). فعالیت بیشتر آنزیم‌ها از میزان تنش اکسیداتیو کاسته و از فرآیندهای متابولیکی که ضامن بقای سلول و گیاه هستند محافظت می‌کند (۱۸). اگرچه در پونسیروس با افزایش سطح شوری، فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش پیدا کرد، ولی باز هم سطح تحمل کم بود، که این مسأله می‌تواند ناشی از صدمات عناصر به اجزای سلولی، اندامک و غشای مربوطه شود که اثر فعالیت دفاعی را کاهش داده و یا خنثی می‌کند (۳).

همانطوریکه شکل‌های ۹ و ۱۰ نشان می‌دهند، غلظت یون‌های سمی سدیم و کلر با افزایش سطح شوری در طی دوره شش هفته‌ای کشت، در هر دو پایه (نارنج و پونسیروس) افزایش یافت، ولی افزایش بصورت رابطه خطی نمی‌باشد.



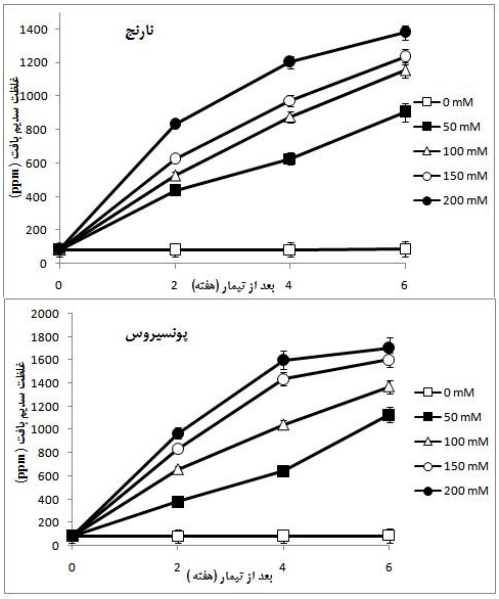
شکل ۷- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر پروتئین کل آنزیم پایه‌های نارنج و پونسیروس



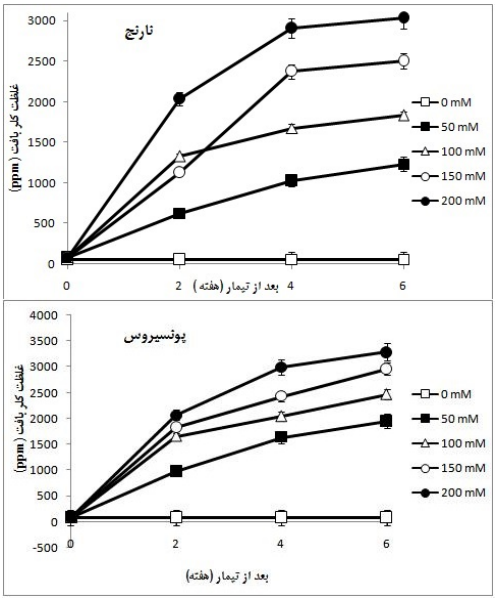
شکل ۸- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر فعالیت پراکسیداز پایه‌های نارنج و پونسیروس

حداکثر سرعت جذب و تجمع هر دو یون در بافت گیاهی تا هفته چهارم است، سپس شیب آن کاهش می‌یابد (شکل‌های ۹ و ۱۰). در مقایسه با پونسیروس، پایه نارنج، سدیم و کلر کمتری در بافت خود جذب نمود. بطوریکه در پایان دوره شش هفته‌ای کشت، بیشترین غلظت سدیم در بافت نارنج (۱۳۷۹ پی‌پی‌ام) و در پونسیروس (۱۷۰۶پی‌پی‌ام)؛ و بیشترین غلظت کلر بافت نارنج و پونسیروس به ترتیب با ۳۰۲۷ و ۳۲۹۴ پی‌پی‌ام، بطور مستقل، مشاهده می‌شود (شکل‌های ۹ و ۱۰). در همین رابطه برخی محققین گزارش نمودند که رابطه بین افزایش میزان کلرید سدیم در محیط کشت، با افزایش غلظت یون‌های سدیم و کلر در بافت گیاهی بصورت خطی است (۳۰). در پژوهشی در این رابطه، سطوح مختلف کلرید سدیم (۳۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) بر روی پایه سیب M4 بررسی شد و افزایش سطح شوری باعث افزایش غلظت یون سدیم و کلر در بافت گیاهچه‌ها شد که بیشترین غلظت سدیم و کلر در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده گردید (۳۰). همچنین در تنش شوری درون شیشه‌ای کلرید سدیم بر پایه‌های مرکبات (نارنگی کلئوپاترا، سیترومیلو و کاریزو سیترنج) با سطوح (صفر، ۳۰ و ۶۰ میلی‌مولار) که در آن غلظت یون‌های سدیم و کلر، هر ده روز یکبار طی یک ماه اندازه‌گیری شدند، نتایج نشان دادند، با گذشت زمان و افزایش سطوح شوری جذب یون‌های سدیم و کلر نیز افزایش یافت و در پایه حساس‌تر به شوری، تجمع یون بیشتری طی زمان مشاهده می‌شود که بیشترین تجمع یون‌های سدیم کلر در روز آخر اندازه‌گیری و در پایه کاریزو سیترنج بود در حالیکه در نارنگی کلئوپاترا غلظت سدیم و کلر کمتری نسبت به دو پایه دیگر داشت (۱۹). این امر دلالت بر این دارد که در مرکبات جذب بیشتر یون‌های سمی سدیم و کلر، نشان دهنده حساسیت بیشتر به تنش شوری می‌باشد (۲۳). در این تحقیق نیز، پونسیروس غلظت سدیم و کلر بیشتری نسبت به نارنج در بافت خود داشت.

یون سدیم برای متابولیسم سلولی سمی است و بر فعالیت برخی آنزیم‌ها اثر می‌گذارد. غلظت بالای یون سدیم سبب بر هم خوردن تعادل اسمزی و ساختار غشا، کاهش رشد و ممانعت از تقسیم سلولی می‌گردد (۱۵). میزان بالای سدیم در محلول غذایی شور می‌تواند باعث آسیب به هدایت هیدرولیکی یا نفوذپذیری بافت به آب و جابجایی پتاسیم در مکان‌های تبادلی شود، بنابراین با توجه به این مورد بقای گیاه کاهش می‌یابد (۲۶). ورود سدیم سبب برهم خوردن پتانسیل غشا شده و ورود یون کلر را به صورت غیر فعال از یک کانال آنیونی تسهیل می‌کند (۱۵). بیشترین صدمه شوری به مرکبات مربوط به یون کلر است (۱۹). در تحقیقی که به منظور تحمل به شوری، بصورت مقایسه‌ای بین پایه مرکبات (رانگپور لایم) و زیتون (آربیکن) انجام شد که در آن سطح شوری کلرید سدیم در سطوح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار بود. نتایج نشان داد که رقم آربیکن در بافت ریشه و اندام‌های هوایی (ساقه و برگ) غلظت سدیم و کلر کمتری نسبت به رانگپور لایم داشت که این تحمل به شوری به توانایی در کنترل جذب و انتقال یون‌های نمک از محیط به بافت مربوط می‌شود (۱۶). با توجه به نتایج بدست آمده، پایه نارنج یون‌های سمی سدیم و کلر کمتری را در مقایسه با پونسیروس جذب کرد که پایه‌ای مقاوم‌تر است که کنترل بیشتری در ورود یون‌های سمی داشت. تفاوت میان نارنج و پونسیروس در میزان سدیم و کلر بافت می‌تواند ناشی از تفاوت در عادت رشد، سیستم انتقال آوندها، توانایی محدودیت جذب این عناصر باشد (۲۰). مقاومت به شوری یک همبستگی منفی با میزان سدیم و کلر در برگ‌های گیاه دارد و گیاهانی که سدیم و کلر کمتری در بافت داشته باشند مقاوم ترند (۲۶)، بنابراین نارنج پایه مقاومتر از پونسیروس به تنش شوری محسوب می‌شود.



شکل ۹- غلظت سدیم بافت پایه‌های نارنج و پونسیروس در غلظت‌های مختلف شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار) کلرید سدیم



شکل ۱۰- غلظت کلر بافت پایه‌های نارنج و پونسیروس در غلظت‌های مختلف شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار) کلرید سدیم

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده و بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی می‌توان گفت پایه نارنج نسبت به پایه پونسیروس کاهش کمتری در میزان کلروفیل برگ، فتوسنتز و میزان پروتئین کل داشت. همچنین با توجه به اینکه مقاومت به شوری یک همبستگی منفی با میزان سدیم در بافت برگ گیاه دارد و غلظت سدیم در بافت نارنج کمتر از پونسیروس بود، بنابراین پایه نارنج یک پایه مقاوم نسبت به پونسیروس محسوب می‌شود و می‌توان آن را به عنوان یک پایه مقاوم به شوری به کار برد.

منابع

1- Alizadeh M., Singh S.K., Patel V.B., Bhattacharya R. C., and Yadav B.P. 2010. *In vitro* responses of grape rootstocks to NaCl. Biologia Plantarum, 54:381-385.

2- Anjum M.A. 2008. Effect of NaCl concentrations in irrigation water on growth and polyamine metabolism in two citrus rootstocks with different levels of salinity tolerance. Acta Physiologiae Plantarum, 30:43-52.

3- Arbona V., Flors V., Jacas J., Garcia-Agustin P., and Gomez-Cadenas A. 2003. Enzymatic and non− enzymatic antioxidant responses of *Carrizo citrange*, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. Plant and Cell Physiology, 44:388-394.

4- Bleda F. J., Madrid R., Garcia-Torres A. L., Garcia-Lidon A., and Porras I. 2011. Chlorophyll fluorescence and mineral nutrition in citrus leaves under salinity stress. Journal of Plant Nutrition, 34:1579-1592.

5- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Review of Biochemistry, 72:248-254.

6- Chance B., and Maehly A.C. 1995. Assay of catalas and peroxidase. Methods in Enzymology, 2:764-775.

7- Chartzoulakis K. S. 2005. Salinity and olive: Growth, salt tolerance, photosynthesis and yield. Agricultural Water Management, 78:108-12.

8- Chaves M.M., Flexas J., and Pinheir, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals Botany, 103:551-560.

9- Chelli-Chaabounia A., Ben Mosbah A., Maalej M., Gargouric K., Gargouri-Bouzid R., and Drira N. 2010. *In vitro* salinity tolerance of two pistachio rootstocks: *Pistacia vera* L. and *P. atlantica* Desf. Environmental and Experimental Botany, 69:302-312.

10- Erturk U., Sivritepe N., Yerlikaya C., Bor M., Ozdemir F., and Turkan I. 2007. Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*. Biologia Plantarum, 51:597-600.

11- Garcia S.F., Martinez V., Jifon J., Syvertsen J.P., and Grosser J.W. 2002. Salinity reduces growth, gas exchange, chlorophyll and nutrient concentrations in diploid sour orange and related allotetraploid somatic hybrids. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 77:379-386.
12- Garcia-Sanchez F., and Syvertsen J.P. 2009. Substrate type and salinity affect growth allocation, tissue ion concentration, and physiological responses of *Carrizo citrange* seedlings. Hort Science, 44:1432-1437.
13- Ghaleb W.Sh., Sawwan J.S., Akash M.W., and Al-Abdallat A.M. 2010. *In Vitro* response of two citrus rootstocks to salt stress. International Journal of Fruit Science, 10:40-53.
14- Jithesh M.N., Prashanth S.R., Sivaprakash K .R., and Parida A.K. 2006. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. Indian Academy of Sciences, 85:237-254.
15- Mahajan SH., and Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444:139-158.
16- Melgar J.C., Syvertsen J.P., Martinez V., and Garcia-sanchez F. 2008. Leaf gas exchange, water relations, nutrient content and growth in citrus and olive seedlings under salinity. Biologia Plantarum, 52:385-390.
17- Michalak A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies, 15:523-530.
18- Molassiotis A.N., Diamantidis G.C., Therios I.N., Tsirakoglou V., and Dimassi K.N. 2005. Oxidative stress, antioxidant activity and Fe (III)-chelate reductase activity of five *Prunus* rootstocks explants in response to Fe deficiency. Plant Growth Regulation, 46:69-78.
19- Montoliu A., Lopez-Climent M.F. Arbona V., Perez-Clemente R.M., and Gomez-Cadenas A. 2009. A novel *in vitro* tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. Plant Growth Regulation, 59:179-187.
20- Moya J.L., Gomez-Cadenas A., Primo- millo E., and Talon M. 2003. Chloride absorption in salt-sensitive *Carrizo Citrange* and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks in linked to water use. Journal of Experimental Botany, 54:825-833.
21- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiology, 15:473-497.
22- Murkute A.A., Sharma S., and Singh S.K. 2005. Citrus in terms of soil and water salinity: A review. Journal of Scientific and Industrial Research, 64:393-402.
23- Raveh E., and Levey V. 2005. Analysis of xylem water as an indicator of current chloride uptake status in citrus trees. Scientia Horticulturae, 103:317-327.
24- Roussos P.A., Gasparatos D., Tsantili E., and Pontikis C.A. 2007. Mineral nutrition of jojoba explants *in vitro* under sodium chloride salinity. Scientia Horticulturae, 114:59-66.
25- Shibli R., Mohammad M., Abu-Ein A., and Shatnawi M. 2000. Growth and micronutrient acquisition of some apple varieties in response to gradual *in vitro* induced salinity. Journal of Plant Nutrition, 23:1209-1215.
26- Shiyab M.S., Shibli R.A., and Mohammad M.M. 2003. Influence of sodium chloride salt stress on growth and nutrient acquisition of sour orange *in vitro*. Journal of Plant Nutrition, 26:985-996.
27- Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C., and Masia A. 2005. Antioxidant defences in olive trees during drought stress: Changes in activity of some antioxidant enzymes. Functional Plant Biology, 32:45-53.
28- Sotiropoulos T.E., and Dimassi K. 2004. Response to increasing rates of boron and NaCl on shoot proliferation and chemical composition of *in vitro* kiwifruit shoot tip cultures. Plant Cell Tissue Organ Culture, 79:285-289.
29- Sotiropoulos T.E., Dimassi K. N., Tsirakoglou V., and Therios I.N. 2006. Responses of two *Prunus* rootstock to KCl induced salinity *in vitro*. Biologia Plantarum, 50:477-480.
30- Sotiropoulos T.E. 2007. Effect of NaCl and $CaCl_2$ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured *in vitro*. Biologia Plantarum, 51:177-180.
31- Sotiropoulos T.E., Fotopoulos S., Dimassi K.N., Tsirakoglou V., and Therios I.N. 2006. Response of the pear rootstock to boron and salinity *in vitro*. Biologia Plantarum, 50:779-781.
32- Storey R., and Walker R.R. 1999. Citrus and salinity. Scientia Horticulturae, 78:39-81.
33- Tozlu I., Moore G.A., and Guy C.L. 2000. Effects of increasing NaCl concentration on stem elongation, dry mass production, and macro and micronutrient accumulation in *Poncirus trifoliata*. Australian Journal of Plant Physiology, 27:35-42.
34- Zhang Y.J., Qian Y.Q., Mu X., Cai Q.G., Zhou Y.L., and Wei X.P. 1998. Plant regeneration from *in vitro*-cultured seedling leaf protoplasts of *Actinidia eriantha* Benth. Plant Cell Report, 17:819-821.