نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۲۱۵-۲۰۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 29, No. 2, Summer 2015, P. 207-215
ISSN: 2008 - 4730

بررسی واکنش‌های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی پایه GF677 (هیبرید هلو و بادام) به تنش شوری در شرایط درون‌شیشه‌ای

مهری مشایخی[1*]- محمد اسماعیل امیری[2]- فریبرز حبیبی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۱۹

چکیده

به منظور بررسی اثر تنش شوری بر واکنش‌های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمی پایه GF677 هیبرید هلو و بادام (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch)، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. گیاهچه‌های پایه GF677 به محیط کشت پرآوری موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (صفر، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار) در چهار تکرار واکشت شدند. بعد از گذشت شش هفته نتایج نشان داد که با افزایش سطوح شوری در محیط کشت، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (کاتالاز و پراکسیداز)، پروتئین کل، میزان پرولین و قندهای محلول به طور معنی‌داری افزایش یافتند. در تمام پارامترهای ذکر شده بیشترین میزان افزایش در غلظت ۸۰ میلی‌مولار مشاهده شد. گیاهچه‌ها در هفته چهارم در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار به شدت تحت تأثیر شوری قرار گرفتند. کلروفیل برگ با افزایش سطح شوری کاهش یافت. غلظت سدیم و کلر بافت با افزایش سطح شوری افزایش یافتند. این پایه توانست با مکانیسم‌های دفاعی همچون سیستم آنتی‌اکسیدانتی، تنظیم اسمزی توسط پرولین و قندهای محلول و همچنین افزایش پروتئین‌سازی با تنش اکسیداتیو مقابله کند. با توجه به این‌که حتی در بالاترین سطح شوری (۱۲۰ میلی‌مولار) گیاهچه‌های GF677 از بین نرفتند، طبق نتایج حاصله می‌توان بیان کرد پایه GF677 یک پایه متحمل به تنش شوری در شرایط درون‌شیشه‌ای محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، پایه GF677، پرولین، تنش اکسیداتیو، تنش شوری

مقدمه

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که اثرات منفی روی رشد و متابولیسم پایه‌های درختان میوه دارد (۸). اغلب پایه‌های درختان میوه به شوری حساسند و در اکثر موارد، تنش شوری مورفولوژی و آناتومی پایه‌ها را تغییر می‌دهد (۱۲)، بنابراین ارزیابی تحمل پایه‌های درختان میوه به تنش شوری اهمیت بسیار زیادی دارد.

یکی از پایه‌های بسیار مناسب برای هسته‌داران، پایه GF677 هیبرید طبیعی بین بادام (*Prunus amygdalus* Batsch) و هلو (*Prunus persica* L.) بوده که به طور گسترده در دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. به این دلیل که مقاوم به خشکی، خاک‌های آهکی، رطوبت خیلی زیاد خاک بوده و متحمل به کمبود آهن می‌باشد و تجانس خوبی با ارقام هلو و بادام دارد (۲).

شوری از چند طریق به گیاهان آسیب می‌رساند، نخست از طریق سمیت ویژه یون‌هایی چون سدیم و کلر و کمبود آب می‌باشد و موجب مختل‌شدن فرآیندهای فتوسنتز، تنفس، سنتز پروتئین و در نهایت باعث کمبود عناصر مختلف می‌شوند (۱۹). هم‌چنین تنش شوری باعث تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن[4] (ROS) مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل و اکسیژن می‌شوند (۱۵). فعالیت این گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن باعث متابولیسم غیرنرمال از طریق خسارت اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (۲۶). تحمل به شوری صفتی کمی و چندژنی است و در زمان تنش، ژن‌های متعدد و به درجات مختلفی بیان می‌شوند که سبب تغییر در واکنش گیاه می‌شوند (۲۷). از آن‌جا که تحمل به شوری در گیاهان یک فرآیند پیچیده است که در آن تغییرات مورفولوژیکی، فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی درگیر هستند، رشد در محیط‌های شور نیز نتیجه فرآیندهای سازگاری مانند انتقال یون و جایگزینی آن‌ها، سنتز محلول‌های اسمزی و تجمع آن‌ها در جهت تنظیم اسمزی و تغییر و تبدیل پروتئین‌ها برای حفظ و

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
(*-نویسنده مسئول: Email: mehri_m662004@yahoo.com)

4- Reactive Oxygen Species

بازسازی سلول‌ها است (۱۵). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مانند کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، گلوتاتیون ریدوکتاز و سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش شوری در گیاهان افزایش پیدا می‌کنند و ارتباطی بین میزان آنزیم‌ها و مقاومت به شوری وجود دارد (۱۸). تحمل به شوری به یک سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمد بستگی دارد و در پایه‌های متحمل‌تر و در سطوح بالای شوری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بیشتر است (۱۲).

تکنیک کشت بافت برای ارزیابی تحمل گونه‌های گیاهی به تنش‌های محیطی، کنترل بیشتری از شرایط بیرون دارد (۳۰). در مزرعه، گیاهان در معرض شرایط آب و هوایی و زیستی متغیری هستند که می‌تواند انجام تحقیقات و پژوهش‌ها را دشوار سازد. از طریق فن کشت بافت امکان انجام آزمایش‌ها در شرایط یکسان در تمام طول سال امکان‌پذیر می‌باشد (۲۸). در خصوص تنش شوری درون شیشه‌ای بررسی‌هایی بر روی پایه‌های سیب (۲۹ و ۳۱)، کیوی‌فروت (۳۲)، پایه گلابی (۳۳)، پایه گیلاس (۱۲)، پایه‌های مرکبات (۱۴ و ۲۲)، پایه‌های انگور (۱)، پایه‌های پسته (۸) انجام شده است.

تاکنون بیشتر مطالعات و تحقیقات انجام شده در زمینه تنش شوری پایه‌های هسته‌داران از جمله GF677، بر روی یک یا چند صفت از قبیل شاخص‌های رشدی و تجمع یون‌های سدیم و کلر در برگ‌ها متمرکز شده است در صورتی که برای شناسایی دقیق سازوکار تحمل یک پایه باید شاخص‌های مهم بیوشیمیایی و واکنش‌های آنتی‌اکسیدانتی در کنار هم اندازه‌گیری و مقایسه شوند تا شاخص‌های مهم بیوشیمیایی در تحمل گیاه به تنش شوری شناسایی شود. هدف از انجام این پژوهش شناسایی نشان‌گرهای بیوشیمیایی تحمل به تنش شوری پایه GF677 در شرایط درون‌شیشه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

در این آزمایش تهیه ریزنمونه از جوانه‌های شاخه یکساله استفاده شد. شاخه‌ها در اواخر زمستان تهیه شدند. نمونه‌های گیاهی پس از انتقال به آزمایشگاه با مایع ظرفشویی و آب مقطر شستشو داده شدند. سپس شاخه‌ها به قطعاتی کوچک‌تر بریده شدند به‌طوری‌که در هر قطعه یک جوانه وجود داشت. قطعات گیاهی پس از شستشوی مجدد با آب مقطر استریل، به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی گردیدند، ریزنمونه‌ها پس از تیمار سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس ریزنمونه‌های ضدعفونی شده به محیط کشت MS با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP انتقال داده شدند. پس از رشد جوانه‌ها، آن‌ها را به محیط پرآوری موراشیگ و اسکوک (MS) واکشت شدند. ترکیبات محیط پرآوری شامل عناصر ماکرو، عناصر میکرو، ویتامین‌ها و آهن، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) بود (۲۴). تنظیم pH محیط کشت روی ۵/۷ تا ۵/۸ با NaOH یک نرمال و HCl یک نرمال انجام شد. به محیط ۷ گرم بر لیتر آگار اضافه سپس محیط در ظروف کشت پخش شدند و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع[1] به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از واکشت ریزنمونه‌ها در محیط جامد (MS)، به اتاقک رشد در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی (شدت نور ۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ لوکس) منتقل شدند.

طرح آزمایشی و اعمال تنش شوری

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه زنجان، در سال ۱۳۹۲-۱۳۹۱ انجام گردید. در این تحقیق به منظور بررسی اثر تنش شوری درون شیشه‌ای، ریزنمونه‌های پرآوری شده پایه GF677 در محیط جامد MS با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (NaCl) [صفر (شاهد)، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار] در سه تکرار (ظرف کشت)، که هر ظرف کشت حاوی سه ریزنمونه یکنواخت (به اندازه ۲ سانتی‌متر) بود به مدت شش هفته واکشت شدند.

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

جمع‌آوری داده‌ها

در پایان دوره تنش (هفته ششم)، برگ وسط هر گیاهچه برای اندازه‌گیری انتخاب و شاخص کلروفیل برگ با دستگاه کلروفیل‌متر (SPAD) مدل (Konica Minolta 502, Japan)، قرائت شد. میزان پروتئین کل به روش برادفورد (۶) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز به روش چانس و مهلی (۷) اندازه‌گیری شد. میزان پرولین به روش بیتس و همکاران (۵) و قندهای محلول به روش دوبیوس و همکاران (۱۱) اندازه‌گیری شدند. سدیم و کلر بافت گیاهچه‌ها هر دو هفته یکبار [هفته صفر (از نمونه های ده روز استقرار یافته قبل از تیمار)، ۲، ۴ و ۶] اندازه‌گیری شدند. غلظت سدیم (Na^+) بافت با دستگاه فلیم فتومتر مدل (Jenway PFP7, England) و درصد کلر (Cl^-) بافت با روش تیتراسیون با نیترات نقره ($AgNo_3$) ۰/۱ نرمال اندازه‌گیری شد (۱۴).

1- Pounds per square inch

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

پس از جمع‌آوری داده‌ها، از نرم‌افزار آماری MSTAT-C برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت و نمودارها توسط نرم افزار Excel 2007 رسم گردیدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف شوری (NaCl) اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز، پروتئین کل، پرولین و قندهای محلول و شاخص کلروفیل وجود دارد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (کاتالاز و پراکسیداز) با افزایش سطوح شوری به‌طور معنی‌داری در پایه GF677 افزایش پیدا کردند (جدول ۲). فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش سطح شوری افزایش پیدا کرد، به‌طوری‌که بیشترین مقدار (۰/۶۱ جذب در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در تیمار ۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده گردید (جدول ۲). کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با ۰/۱۱ جذب در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار بود (جدول ۲). بیشترین مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز (۰/۱۰۹ و ۰/۱۰۵ جذب در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) به‌ترتیب در تیمار ۸۰ و ۴۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بدست آمد، که از نظر میزان فعالیت اختلاف معنی‌داری ندارند (جدول ۲). هم‌چنین با افزایش سطح شوری میزان پروتئین کل به طور معنی‌داری در پایه GF677 افزایش یافت. بیشترین میزان پروتئین کل با ۱/۴۸ میکروگرم بر لیتر در غلظت ۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر صفات اندازه‌گیری شده گیاهچه‌های GF677 (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch) بعد از شش هفته کشت در محیط کشت MS

Table 1- Analysis of variance the effects of sodium chloride (NaCl) on measured parameters of GF677 plantlets (*Prunus persica* L.×*Prunus amygdalus* Batsch) after six weeks in MS culture medium

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares					
		آنزیم کاتالاز Catalase enzyme	آنزیم پراکسیداز Peroxidase enzyme	پروتئین کل Total protein	پرولین Proline	قندهای محلول Soluble sugars	شاخص کلروفیل Chlorophyll index
شوری Salinity	3	0.157**	0.007**	0.938**	32.95**	0.025**	605.77**
خطا Error	8	0.001	0.001	0.004	0.072	0.001	3.44
ضریب تغییرات(٪) CV	-	7.72	16.93	7.21	1.79	1.44	8.25

**- معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**- significant in 1% of probability level

جدول ۲- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر فعالیت آنزیمی و پروتئین کل گیاهچه‌های GF677 (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch) بعد از شش هفته کشت در محیط کشت MS

Table 2- Influence of different sodium chloride levels (NaCl) on enzymatic activity and total protein of GF677 (*Prunus persica* L. ×*Prunus amygdalus* Batsch) plantlets after six weeks in MS medium culture

سطح شوری Salinity level (mM)	فعالیت آنزیم کاتالاز Catalase enzyme activity [abs/min /mg protein (f.m)]	فعالیت آنزیم پراکسیداز Peroxidase enzyme activity [abs/min /mg protein (f.m)]	پروتئین کل Total protein [µg/ml (f.m)]
0	*0.18c	0.019b	0.51c
40	0.43b	0.105a	1.28b
80	0.61a	0.109a	1.48a
120	0.11d	0.026c	0.35d

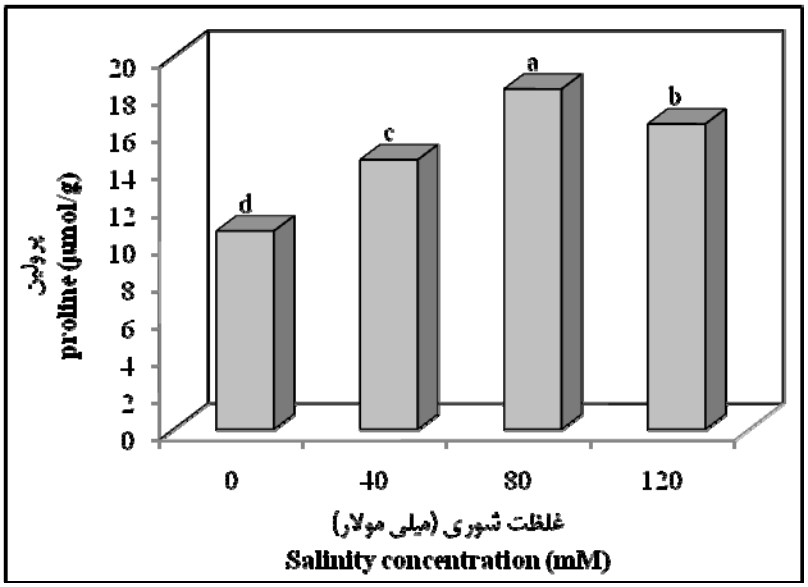
* در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

* Means in each column with similar letters are not significantly different at 5% level of probability using Duncan's multiple range tests.

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده شد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (کاتالاز و پراکسیداز) در پایه GF677 تحت تأثیر شوری قرار گرفت. قرارگیری گیاهان در شرایط نامساعد محیط نظیر تنش شوری موجب افزایش تولید پراکسیدهیدروژن می‌شود (۲۰). خنثی کردن پراکسیدهیدروژن برای بقای سلول اهمیت ویژه‌ای دارد (۳). برای محافظت در برابر این گونه‌های سمی، سلول‌های گیاه و اندامک‌هایی نظیر کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانت را به کار می‌برند (۱۸). گیاهان مقاوم به شوری دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمدتری هستند. فعالیت این آنزیم‌ها بسته به گونه گیاهی و شرایط تنش متغیر است. فعالیت بیشتر این آنزیم‌ها از میزان تنش اکسیداتیو کاسته و از فرآیندهای متابولیکی که ضامن بقای سلول و گیاه هستند محافظت می‌کند (۲۱). این افزایش فعالیت آنزیم‌ها یک واکنش دفاعی برای جلوگیری از آسیب سلولی است که گیاه در واکنش به غلظت‌های بالای کلرید سدیم از خود نشان می‌دهد. به عنوان مثال این افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تنش شوری درون شیشه‌ای پایه سیب MM106 (۲۱) و پایه گیلاس Gisela5 (۱۲) نیز گزارش شده است. در کل بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در پایه GF677 در غلظت ۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بود (جدول ۲). پایه GF677 با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تا غلظت ۸۰ میلی‌مولار توانست غلظت‌های بالای کلرید سدیم را تحمل کند. یکی از دلایلی که این پایه در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار تحت تأثیر اثرات شوری قرار گرفت و نتوانست این سطح شوری را تحمل کند فعالیت کمتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌باشد که نتوانسته اثرات منفی شوری را کاهش داده و یا خنثی کند (۴).

یکی از فرآیندهای مهم که تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرد، سنتز پروتئین‌هاست (۲۵). بر اساس نتایج بعضی تحقیقات، شوری باعث کاهش در مقدار پروتئین گیاه می‌شود و هم‌چنین شوری سبب شکستن باندهای هیدوراستاتیک و موجب افزایش واکنش‌های غیرآب‌دوست (هیدروفوبیک) می‌شود (۱۰). تنش باعث بیان ژن‌های ویژه‌ای می‌شود که گیاه را به سازگاری در شرایط نامساعد کمک می‌کند، بنابراین امکان افزایش غلظت پروتئین کل وجود دارد (۲۵). به عنوان مثال، تنش شوری کلرید سدیم در شرایط درون‌شیشه‌ای بر روی پایه‌های انگور موجب افزایش غلظت پروتئین کل شد (۱) همچنین این نتیجه در واکنش دو ژنوتیپ مرکبات (*Citrus jambhiri* و *Citrus karna*) به‌دست آمده است (۲۵). زمانی که میان تولید انواع واکنش‌گر اکسیژن و سیستم آنتی‌اکسیدانتی برای دفع این مولکول‌ها تعادل برقرار باشد، از صدمه اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک جلوگیری می‌کند و هم‌چنین متابولیسم طبیعی و تعادل سلولی می‌تواند به بیان ژن‌های ویژه برای ساخت پروتئین کمک کند (۳۴).

با افزایش سطح شوری میزان تجمع پرولین در پایه GF677 نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت، به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری بین سطوح شوری مشاهده شد (شکل ۱). بیشترین میزان تجمع پرولین با ۱۸/۴۲ و ۱۶/۳۷ میکرومول بر گرم به ترتیب در تیمار ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار بدست آمد، درحالی‌که کم‌ترین میزان پرولین در تیمار شاهد با ۱۰/۶۳ میکرومول بر گرم به‌دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر میزان پرولین گیاهچه‌های GF677 (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch)

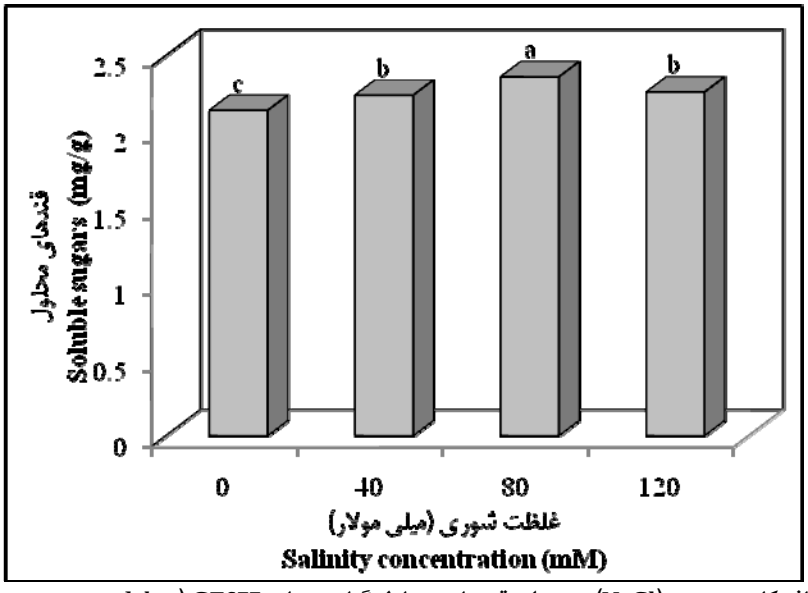
Figure 1- Influence of different sodium chloride levels (NaCl) on proline content of GF677 plantlets (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch)

با افزایش سطح شوری تجمع پرولین نیز افزایش یافت مشاهده شد که این نتیجه در تنش شوری درون شیشه‌ای ژنوتیپ‌های مرکبات (۲۵) پایه‌های انگور (۱)، پایه‌های سیب (۲۱ و ۳۱) و پایه گیلاس Gisela5(۱۲) نیز حاصل شده است. کاهش پتانسیل اسمزی در گیاه در شرایط تنش همراه با تجمع یون‌های معدنی مثل Na و Cl ایجاد می‌شود که اثرات زیانباری بر رشد گیاه دارد (۱۶). زمانی که یون‌هایی مانند سدیم و کلر در واکوئل سلول‌ها جای می‌گیرند، برای تعادل فشار اسمزی در سلول، پرولین در سیتوزول و اندامک‌ها سنتز و تجمع می‌یابد (۱۵). تجمع پرولین در پایه‌هایی که تحمل بیشتری به شوری دارند می‌تواند یک مکانیسم دفاعی برای مقابله و تحمل تنش باشد (۱). از آن‌جا که پرولین در تنش‌های محیطی در سلول‌ها تجمع می‌یابد و با توجه به نقش حفاظتی آن و تنظیم اسمزی، یکی از دلایل بالاتر بودن تحمل در پایه GF677 تا غلظت ۸۰ میلی‌مولار می‌تواند به علت تجمع بیشتر این اسیدآمینه باشد که از صدمات ناشی از تنش اسمزی و یونی کلرید سدیم کاسته است (۳۱). میزان تجمع پرولین در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار نتوانسته است اثرات شوری را کاهش دهد و گیاه در اثر تجمع بالای یون‌های سدیم و کلر آسیب دیده است (شکل ۱).

به‌طورکلی با افزایش سطح شوری میزان قندهای محلول نیز مانند پرولین در پایه GF677 افزایش یافت (شکل ۳). بیشترین میزان تجمع قندهای محلول در تیمار ۸۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۲).

افزایش قندهای محلول در تنش شوری کلرید سدیم در کشت درون شیشه‌ای ژنوتیپ‌های مرکبات (۲۵)، پایه‌های انگور (۱)، پایه سیب (۳۱)، پایه گیلاس (۱۲) نیز به‌دست آمده است که بیشترین تجمع قندهای محلول در سطوح بالای شوری مشاهده گردید. شوری بر متابولیسم قندهای محلول اثر می‌گذارد و مقدار آن را افزایش می‌دهد. در پاسخ‌های اسمزی گیاهان، تجمع کربوهیدرات از عواملی است که قادر است از اختلالات در غشای سلولی جلوگیری نماید (۲۱). مشخص شده است که قند طی تنش شوری علاوه بر نقش کارکردی به عنوان حفاظت کننده اسمزی و سوبسترای رشدی، به عنوان تنظیم‌کننده‌های بیان ژن نیز نقش‌های مهمی را ایفا می‌کنند (۲۳). عقیده بر این است که تجمع قندهای محلول و نشاسته در نتیجه تنش شوری در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی می‌تواند به عنوان تنظیم اسمزی و یا عامل ذخیره اسمزی عمل می‌کند. همچنین تجمع قندهای محلول می‌تواند در اثر تغییر شکل بیشتر نشاسته به قند و یا مصرف کمتر کربوهیدرات‌ها توسط بافت‌ها باشد (۹). تنظیم اسمزی و کاهش پتانسیل اسمزی سلول توسط محلول‌های اسمولیت به عنوان یک مکانیسم مهم در مقاومت به شوری بررسی شده است (۲۳). این مکانیسم توانسته است در پایه GF677 اثرات منفی شوری را کاهش دهد.

همان‌طوری‌که شکل ۳ نشان می‌دهد، غلظت یون‌های سدیم و کلر بافت با افزایش سطح شوری در طی دوره شش هفته‌ای کشت، در پایه GF677 افزایش یافت. حداکثر سرعت جذب و تجمع هر دو یون در بافت گیاهی تا هفته چهارم است (شکل ۳).



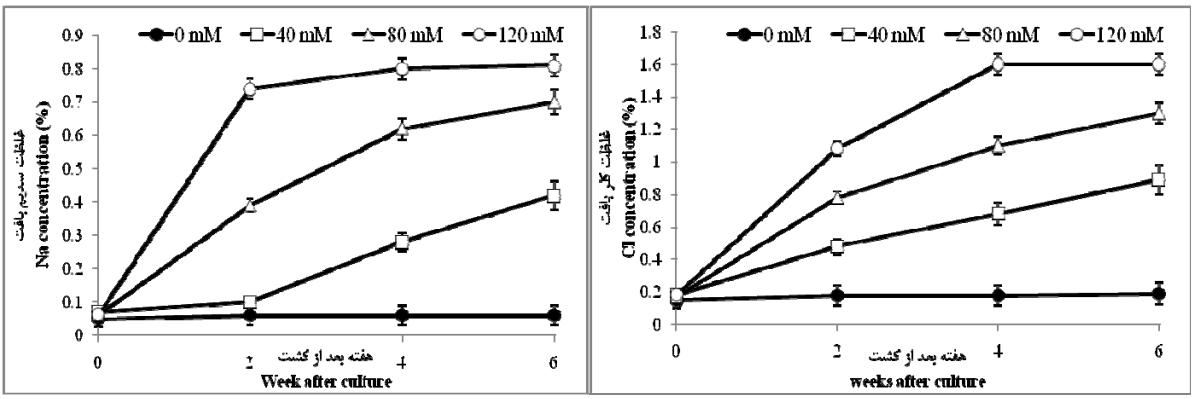
شکل ۲- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر میزان قندهای محلول گیاهچه‌های GF677 (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch)

Figure 2- Influence of different sodium chloride levels (NaCl) on soluble sugars content of GF677 plantlets (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch)

در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در اثر غلظت بالای عناصر کلر و سدیم به بافت گیاهی آسیب وارد شده است و گیاه نتوانسته به جذب عناصر ادامه دهد و اختلافی بین جذب از هفته چهارم به بعد در مقدار سدیم و کلر بافت مشاهده نشد (شکل ۳).

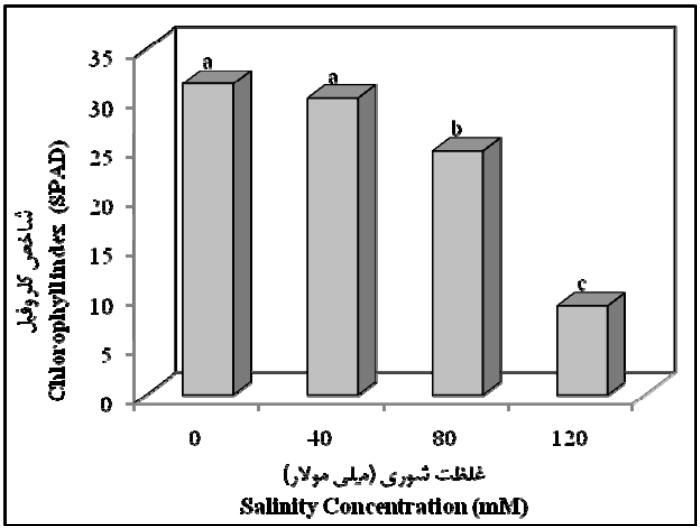
برخی محققین گزارش نمودند که رابطه بین افزایش میزان سطوح شوری در محیط کشت، با افزایش غلظت یون‌های سدیم و کلر در بافت گیاهی بصورت خطی است (۳۱). افزایش سطح شوری باعث افزایش غلظت یون سدیم و کلر در بافت گیاهچه‌ها در پایه سیب M4 (۳۱) و مرکبات (۲۲) شد. یون سدیم برای متابولیسم سلولی سمی است و بر فعالیت برخی آنزیم‌ها اثر می‌گذارد. غلظت بالای یون سدیم سبب بر هم خوردن تعادل اسمزی و ساختار غشا، کاهش رشد و ممانعت از تقسیم سلولی می‌گردد (۱۹). 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 (۳۰). ورود سدیم سبب برهم خوردن پتانسیل غشا شده و ورود یون کلر را به صورت غیر فعال از یک کانال آنیونی تسهیل می‌کند (۱۹).

نتایج این تحقیق نشان داد با افزایش سطوح شوری درون شیشه‌ای (۸۰ تا ۱۲۰ میلی‌مولار)، شاخص کلروفیل برگ (*SPAD* unit) در پایه GF677 کاهش یافت. کمترین مقدار آن در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار مشاهده شد. درحالی‌که بیشترین شاخص کلروفیل برگ در تیمار شاهد به‌دست آمد (شکل ۴).



شکل ۳- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر غلظت سدیم (A) و کلر (B) بافت گیاهچه‌های GF677 (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch) طی شش هفته کشت

Figure 3- Influence of different sodium chloride levels (NaCl) on sodium concentration (A) and chlorine (B) of GF677 plantlets (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch) during six weeks culture

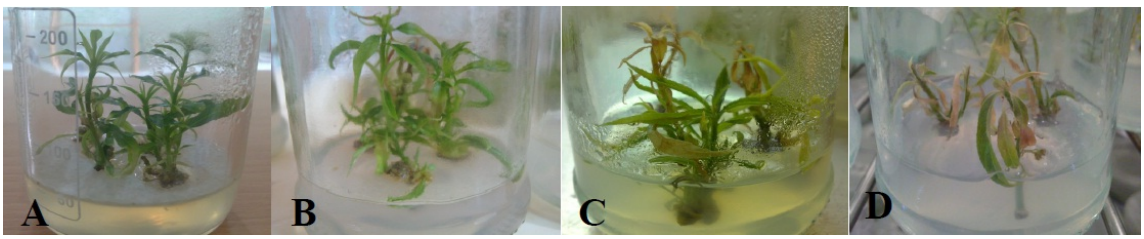


شکل ٤- اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر شاخص کلروفیل برگ گیاهچه‌های GF677 (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch)

Figure 4- Influence of different sodium chloride levels (NaCl) on leaf chlorophyll index of GF677 plantlets (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch)

کاهش کلروفیل در اثر تنش شوری کلرید سدیم در کشت درون شیشه‌ای پایه‌های انگور (۱)، سیب (۳۱)، گیلاس (۱۲) نیز به‌دست آمده است که کمترین میزان کلروفیل در سطوح بالای شوری مشاهده گردید. کاهش شاخص کلروفیل به سبب تجمع یون کلر در برگ‌ها، افزایش حساسیت برگ به اتیلن، تخریب بیوسنتز کلروفیل و احتمالاً به دلیل کاهش میزان 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 (۱۳).

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود پس از گذشت شش هفته از اعمال تیمار شوری، پایه GF677 توانست تا غلظت ۸۰ میلی‌مولار NaCl را تحمل کند. بین تیمار ۴۰ میلی مولار NaCl و شاهد از نظر رشد رویشی اختلافی وجود ندارد و گیاه به خوبی به رشد خود ادامه داد. در تیمار ۸۰ میلی‌مولار NaCl به دلیل تجمع عناصر کلر و سدیم رشد گیاه نسبت به شاهد کمی کاهش یافته است. در بالاترین سطح شوری (۱۲۰ میلی مولار NaCl) گیاه به شدت تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفته و باعث آسیب به بافت گیاهی شده است. از دلایل اصلی آسیب گیاه در غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl این است که گیاه از زمان اعمال این تیمار با غلظت بالای عناصر کلر و سدیم مواجه بوده و دچار شوک اسمزی و سمیت عناصر شده و نتوانست مکانیسم درونی خود را از قبیل فعالیت مناسب آنزیم های آنتی‌اکسیدانت و پروتئین سازی با شرایط تطبیق دهد. بنابراین فقط در سطح ۱۲۰ میلی‌مولار NaCl بافت گیاهی دچار آسیب شدید شد، اما به خوبی سطوح پایین‌تر شوری را تحمل کرد، همان‌طور که در قسمت نتایج و بحث توضیح داده شد، پایه GF677 توانست با افزایش فعالیت آنزیمی و پروتئین‌سازی و قندهای محلول تنش شوری را تحمل کند که نشان دهنده مقاومت و مکانیسم دفاعی درونی مناسب این پایه در مقاومت به تنش شوری است.



شکل ۵- واکنش گیاهچه‌های GF677 (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch) به سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) طی شش هفته کشت در محیط پرآوری MS، [A (0); B (40 mM); C (80 mM); D (120 mM)]

Figure 5- Response of GF677 plantlets (*Prunus persica* L. × *Prunus amygdalus* Batsch) to different sodium chloride levels (NaCl) during six week culture on MS proliferation medium [A (0); B (40 mM); C (80 mM); D (120 mM)]

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست آمده و بررسی واکنش‌های بیوشیمیایی و آنزیمی می‌توان گفت پایه GF677 یک پایه متحمل به تنش شوری تا غلظت ۱۲۰ میلی‌مولار است. بیشترین میزان واکنش‌های بیوشیمیایی و آنزیمی در غلظت ۸۰ میلی‌مولار مشاهده شد که موجب تداوم رشد مناسب گیاه در شرایط تنش شوری گردید. این پایه به دلیل دارا بودن مکانیسم‌های دفاعی همچون سیستم آنتی‌اکسیدانتی، تنظیم اسمزی توسط پرولین و قندهای محلول و همچنین افزایش پروتئین سازی می‌تواند در تداوم رشد رویشی حتی در شرایط تنش شوری، به عنوان یک پایه متحمل به شوری برای ارقام تجاری هلو و بادام استفاده شود.

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- Antonopoulou C., Dimassi K., Therios I., Chatzissavvidis C., and Tsirakoglou V. 2005. Inhibitory effects of riboflavin on *in vitro* rooting and nutrient concentration of explants of peach rootstock GF677. *Scientia Horticulturae*, 106: 268-272.

3- Asada K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology, 141:391-396.

4- Ashraf M., and Foolad M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59: 206-216.

5- Bates L.S., Waldren R.P., and Teare L.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39:205-208.
6- 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.
7- Chance B., and Maehly A.C. 1995. Assay of catalas and peroxidase. Methods in Enzymology, 2:764-775.
8- 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.
9- Djibril S. 2005. Growth and development of data palm seedlings under drought and salinity stresses. African Journal of Biotechnology, 4:968-972.
10- Doganlar Z.B., Demir K., Basak H., and Gul I. 2010. Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. African Journal Agriculture Research, 5:2056-2065.
11- Dubious M.K., Gilles A., Hamilton J.K., Roberts P.A., and Smith F. 1956. Colorimetrik method for determination in sugars and related. Annual Chemistry, 28:350-356.
12- 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.
13- 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.
14- 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.
15- Gill S.S., and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinary in abiotic stress tolerant in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry. 48: 909-930.
16- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K., and Bohnert H.J. 2000 Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Biology, 51:463-499.
17- Jebera S., Jebera M., Liman F., and Aouani M.E. 2005. Changes in ascorbat peroxidase, catalas, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules salt stress. *Plant Physiology*, 162:929-936.
18- 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.
19- Mahajan SH., and Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics, 444:139-158.
20- Michalak A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies, 15:523-530.
21- Molassiotis A.N., Sotiropoulos T., Tanou G., Kofidis G., Diamantidis C., and Therios I. 2006. Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM106 treated with NaCl, KCI, manitol or sorbitol. Biologia Plantarum, 50:331-338.
22- 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.
23- Munns R., and Tester R. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Physiology, 59: 651-681.
24- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiology, 15:473-497.
25- Murkute A.A., Satyawati Sh., and Singh. S.K. 2010. Biochemical alterations in foliar tissues of citrus genotypes screened *in vitro* for salinity tolerance. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 19:203-208.
26- Paridaa A.K., and Dasa A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology Environment Safety, 60:354-349.
27- Sairam R.K., and Tyagi A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science, 86:407-421.
28- Satyvathi V.V., Juhar P., Elias E.M., and Rao M.B. 2004. Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. Crop Science, 44:1839-1846.
29- 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.
30- 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.
31- 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.
32- 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.

33- 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.
34- Taylor N.L., Day D.A., and Harvey Millar A. 2004. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/ nitrogen metabolism. Journal of Experimental Botany, 55:1-10.