به‌زراعی کشاورزی

دوره ۲۱ ■ شماره ٤ ■ زمستان ۱۳۹۸

صفحه‌های ٤٥٨-٤٤٧

اثر تنش شوری بر واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاهچه‌های چهار پایه مرکبات در شرایط درون‌شیشه‌ای

لاله رستمیان[۱]، ویدا چالوی[۲*]، حسین صادقی[۲]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۲. دانشیار، گروه مهندسی باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۳/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۳۰

چکیده

شوری یکی از مشکلات تولید مرکبات در جهان است و تحمل یا مقاومت پایه‌های مرکبات به شوری به‌خوبی شناخته نشده است. در این پژوهش، واکنش‌های فیزیولوژیکی چهار پایه مرکبات شامل نارنج (*Citrus aurantium* L.)، پونسیروس (*Poncirus trifoliate* Raf.)، سیتروملو (*Citrumelo*) و سیترنج (*Citranges*) به تنش شوری در آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط درون‌شیشه‌ای در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری بررسی شد. ریزنمونه‌های تهیه‌شده از هر چهار پایه به محیط کشت جامد موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۸/۹ میکرومولار BA و نیم میکرومولار NAA با غلظت‌های مختلف کلریدسدیم (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) در سه تکرار منتقل شدند. براساس نتایج به‌دست‌آمده در پایان آزمایش، وزن تر و خشک، محتوای آب نسبی، نشت یونی و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی از قبیل کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید گیاهچه‌ها دارای همبستگی منفی با غلظت تیمار شوری و غلظت یون سدیم در بافت برگ‌ها بود. اگرچه نشت یونی با افزایش غلظت کلریدسدیم در هر چهار پایه افزایش یافت ولی، پایه نارنج نسبت به سایر پایه‌ها از نظر آماری کم‌ترین نشت یونی را نشان داد. در همه تیمارهای شوری میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی پایه‌ها، کاهش معنی‌داری در سطح یک درصد نسبت به شاهد داشتند. در بین پایه‌های مورد آزمایش، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و آب نسبی سیترنج بیش‌تر از دیگر پایه‌ها بود. در مجموع، پایه‌های سیترنج و نارنج مقاومت بهتری به آسیب‌های ناشی از تنش شوری نشان دادند.

کلیدواژه‌ها: پراکسیداسیون لیپیدی، کشت‌بافت، کلریدسدیم، محتوای آب‌نسبی، نشت‌یونی.

Effect of Salt Stress on Physiological Responses of Four Citrus Rootstock Plantlets under *In vitro* Condition

Laleh Rostamian[1], Vida Chalavi[2*], Hosein Sadeghi[2]

1. Former M.Sc. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agricultural Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

2. Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agricultural Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Received: June 15, 2019 Accepted: August 21, 2019

Abstract

Salinity is one of the problems citrus production faces around the world, and the tolerance or resistance mechanism of citrus rootstocks to salinity is not well known. This study investigates the physiological responses of four citrus rootstocks, namely Sour orange (*Citrus aurantium* L.), Poncirus (*Poncirus trifoliate* Raf.), Citromelo (*Citrumelo*), and Citrange (*Citranges*), to salinity stress in a factorial experiment, based on completely randomized design under *in vitro* conditions. The explants are prepared from all four rootstocks and transferred in a Murashige and Skoog (MS) solid culture medium, containing 8.9 µM BA and 0.5 µM NAA with different concentrations of sodium chloride (0, 50, 100, and 200 mM) in three replications. Based on the obtained results, fresh and dry weight of plantlets, water content, leakage, and photosynthetic pigments such as chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoid have had a negative correlation with salinity concentration and concentration of sodium ion in the tissue of the leaves. Although leakage increases by increasing concentration of sodium chloride on all four rootstocks, the sour orange rootstock statistically showed the least leakage as compared to other rootstocks. In all salinity treatments, the amount of rootstocks photosynthetic pigment reductions has been statistically significant ($p \leq 0.01$) in comparison to the control. Among the tested rootstocks, the amount of photosynthetic pigments in the Citrange rootstock surpassed that of other rootstocks. In conclusion, Citrange and Sour orange rootstocks show better resistance to the damages, caused by salt stress.

Keywords: Ion leakage, lipid Peroxidation, relative water content, sodium chloride, tissue culture.

* نویسنده مسئول Email: v.chalavi@sanru.ac.ir

۱. مقدمه

مرکبات (*Citrus*) مقام اول تولید را بین میوه‌ها در جهان دارند (FAO, 2016). مرکبات در مقایسه با سایر محصول‌های باغی و زراعی، به شوری حساس‌تر هستند و رشد و عملکرد محصول آن‌ها به‌دلیل شوری، کاهش می‌یابد و هم‌چنین ممکن است در اثر شوری ناهنجاری‌های ژنتیکی در مرکبات ظاهر شود (Deinlein *et al*., 2014). تنش شوری از چندین راه به گیاهان آسیب می‌زند. نخست، از طریق سمیت ویژه یون‌هایی چون کلر و سدیم که یون‌ها غالب در محلول‌های شور هستند و موجب نابسامان‌شدن فرآیند فتوسنتز، تنفس سلولی، سنتز پروتئین و درنهایت کمبود مواد غذایی و عناصر مختلف در گیاه می‌شوند (Anjum., 2008). به‌عنوان مثال، ممانعت از تنفس در آغاز با اثر مستقیم بر روی عملکرد آنزیم‌ها همراه است و پس از آن تغییرات فیزیولوژیکی در گیاه ایجاد می‌گردد، که دو مکانیسم می‌توانند علت این تغییرات باشند. اول، سمیت مستقیم سطوح بالای یون‌های سدیم و کلر که در برگ‌ها یا سایر بخش‌های گیاه تمرکز می‌یابند و دوم کاهش تدریجی آب قابل‌دسترس می‌باشد که به‌علت تشکیل باند الکتریکی آب با یون‌های هیدراته‌شده، سبب افزایش فشار اسمزی می‌شود (Montoliu *et al*., 2009).

بررسی صفت‌های فیزیولوژیکی می‌توانند برای ارزیابی میزان آسیب وارده به سلول‌های مرکبات تحت تنش شوری به‌کار روند (Chelli-Chaabounia *et al*., 2010). به‌عنوان مثال، اندازه‌گیری میزان قند محلول کل، پرولین، محتوای نسبی آب برگ، نشت یونی، میزان زیست‌توده و رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌توانند شاخص‌هایی برای سنجش میزان تحمل به تنش شوری در گیاهان باشند (Janagoudar, 2009; Murkute *et al*., 2005). تنش شوری در رقم‌های حساس مرکبات، سبب کاهش محتوای کلروفیل، کاهش انتقال الکترون‌های فتوسنتزی، به‌وسیله تجمع یون‌های سمی در پروتوپلاست می‌گردد (Melgar *et al*., 2008; Mahajan *et al*., 2005). شوری سبب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که نتیجه آن تنش اکسیداتیو مانند پراکسیده‌شدن لیپیدهای غشا و تغییر در نفوذپذیری غشا (نشت یونی) و خسارت سلول خواهد بود (Sudhakar *et al*., 2001; Mahajan *et al*., 2005). تاکنون برای بررسی تحمل و مقاومت به شوری مرکبات، از روش‌های گوناگون در باغ، گلخانه و آزمایشگاه استفاده شده است و انواع مرکبات تفاوت قابل‌توجهی را از نظر تحمل و مقاومت به شوری نشان داده‌اند (Simón-Grao *et al*., 2018; Khoshbakht *et al*., 2018; Aboutalebi, 2014; Aboutalebi *et al*., 2007; Moya *et al*., 2003; Tozlu *et al*., 2000; Storey & Walker, 1999).

یکی از روش‌های انتخاب گونه‌های گیاهی مقاوم به شوری و خشکی و سایر تنش‌ها در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی بهره‌گیری از سیستم کشت بافت گیاهی می‌باشد. گیاهان در محیط کشت بافت در شرایط تغذیه‌ای و محیطی کنترل‌شده رشد می‌یابند و با این روش می‌توان تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها را در یک فضای محدود ارزیابی نمود. هم‌چنین به‌دلیل حذف سیستم ریشه در این روش، کشت بافت گیاهی روشی مناسب برای ارزیابی واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مرکبات به‌حساب می‌آید (Montoliu *et al*., 2007).

تاکنون، کوشش‌هایی برای ارزیابی تحمل به شوری پایه‌های مرکبات انجام شده است، ولی به‌طور همزمان، چهار پایه نارنج، پونسیروس، سیتروملو و سیترنج جز پرکاربردترین پایه‌های مرکبات در شمال ایران هستند مورد آزمایش قرار نگرفته‌اند. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر شوری بر روی صفات فیزیولوژیکی برای این چهار پایه در شرایط کشت بافت گیاهی می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور، چهار پایه (پونسیروس، نارنج، سیتروملو و سیترنج) و در چهار سطح شوری (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم (NaCl)) و در سه تکرار و در هر تکرار پنج ریزنمونه در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری اجرا شد.

میوه‌های رسیده پایه‌های نارنج، پونسیروس، سیتروملو و سیترنج در سال ۱۳۹۷ از ایستگاه باغبانی شهرستان قائمشهر برداشت شدند. بذرهای متورم، درشت و سالم از میوه در آزمایشگاه، استخراج گردیدند و به‌مدت ۳۰ دقیقه در سدیم هیدروکسید یک مولار قرار گرفتند تا پکتین اطراف بذر از بین برود و بذرها سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو شدند. سپس بذرها ۲۰–۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم دو درصد غوطه‌ور گردیدند و دوباره با آب مقطر استریل سه بار شست‌وشو انجام شد. بذرهای ضدعفونی‌شده به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد با دمای ۳۰–۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی در ۷۵ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ و هشت ساعت تاریکی منتقل شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها، به‌منظور پرهیز از گوناگونی ژنتیکی در نمونه‌ها، تنها از جنین‌های غیرجنسی یا نوسلار (جنینی که با بقیه جنین‌ها از نظر ویژگی‌های رشدی تفاوت داشت، به‌عنوان جنین جنسی شناخته شد و مورد استفاده قرار نگرفت) برای تهیه ریزنمونه‌ها استفاده شد.

در پایان دوره اعمال تنش (هفته هشتم)، وزن تر و خشک، میزان محتوای آب‌نسبی به‌روش Qasim *et al.* (2003)، میزان نشت یونی به‌روش Lutts *et al.* (1996) و میزان کلروفیل‌ها و کاروتنوئید به‌روش Lichtenthaler (1987) اندازه‌گیری شد. جهت به‌دست‌آوردن میزان قند محلول کل، ابتدا استخراج به‌روش Omokolo *et al.* (1996) انجام شد. در این روش نیم گرم از ماده خشک با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم (بن‌ماری) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عصاره‌های الکلی به‌دست‌آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و محلول شفاف به‌دست‌آمده حاوی قندهای محلول به یک بشر منتقل شد و عمل فوق ٤ مرتبه دیگر تکرار گردید. در نهایت عصاره الکلی با حرارت تغلیظ‌شده و حجم آن به یک‌پنجم اولیه رسید و از آن برای اندازه‌گیری انواع قندهای محلول استفاده شد. سپس قند کل به‌روش McCready *et al.* (1950) اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری قند کل ۰/۲ میلی‌لیتر (۲۰۰ میکرولیتر) از عصاره تغلیظ‌شده با ۳ میلی‌لیتر آنترون مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. میزان جذب نور هر یک از نمونه‌ها پس از سردشدن در طول موج ٦۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. قبل از اندازه‌گیری قند کل نمونه، ابتدا منحنی استاندارد قند کل رسم گردید که برای رسم آن از محلول گلوگز ۱ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر آب استفاده شد. شاخص کلروفیل به‌وسیله کلروفیل‌متر (SPAD 502 Plus) و میزان پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید به‌روش Packer & Heath (1968) انجام شد. وآکاری آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.1 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد استفاده گردید. هم‌چنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل (۲۰۱٦) استفاده گردید.

۳. نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل پایه مرکبات و تنش شوری بر صفات نشت یونی، محتوای آب نسبی، نسبت وزن تر به خشک، کلروفیل a، کلروفیل b و

کاروتنوئید، شاخص کلروفیل، قند محلول کل و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱).

۳. ۱. نسبت وزن تر به خشک

بررسی نسبت وزن تر به خشک نشان داد که با افزایش غلظت شوری این نسبت کاهش می‌یابد. بیش‌ترین نسبت وزن تر به خشک در پایه سیترنج و تیمار شاهد حاصل شد، که با افزایش شوری کاهش معنی‌داری در این نسبت مشاهده گردید. هم‌چنین کم‌ترین میزان این نسبت در تیمار ۲۰۰ (میلی‌مولار) سیتروملو بود (شکل ۱- الف). نتایج این پژوهش نشان داد که افزایش غلظت شوری سبب کاهش وزن هر ٤ پایه می‌گردد، که با نتایج Habibi & Amiri (2013) و Ghaleb *et al.* (2010) مطابقت دارد. تنش شوری با اثرگذاری بر رشد و تقسیم سلولی، موجب کاهش ساخت سلول‌های جدید، کاهش رشد گیاه و در نتیجه کاهش وزن می‌گردد. هم‌چنین کاهش رشد می‌تواند به‌دلیل تأثیر تنش شوری بر پتانسیل اسمزی و تداخل در جذب و عملکرد عناصر و برهم‌زدن تعادل یون‌ها در سلول باشد Munns & Tester (2008). با افزایش غلظت نمک در محیط اطراف ریزنمونه و اثر آن بر میزان اسمز، رشد به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. با کاسته‌شدن از توسعه برگ‌ها به‌دلیل اعمال شوری بیش از آستانه تحمل گیاه، جوانه‌های انتهایی به حالت رکود درآمده و شاخساره کم‌تری تشکیل شده و وزن کاهش می‌یابد، تنش شوری باعث افت رشدونمو گیاهان شده و وزن تر و خشک اندام‌های مختلف گیاهان را کاهش می‌دهد (Munns & Tester, 2008).

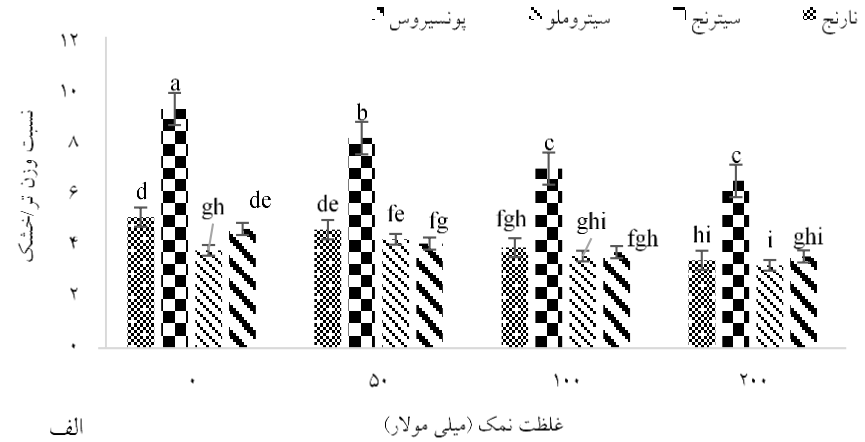
۳. ۲. محتوای آب‌نسبی

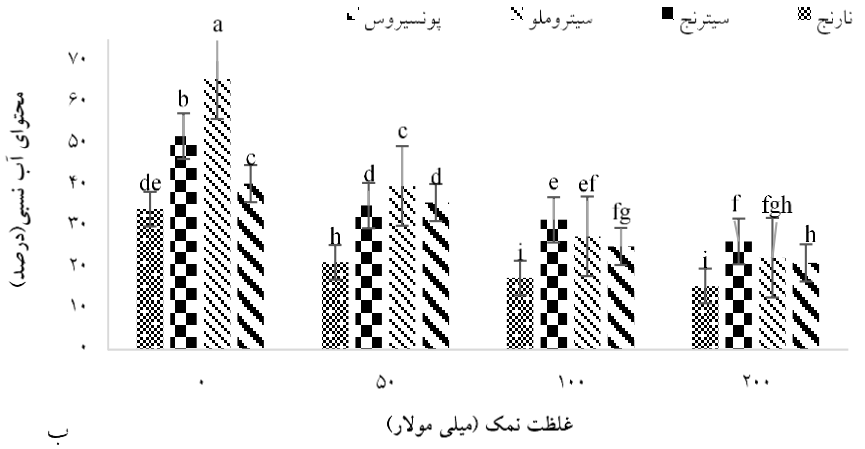
اندازه‌گیری محتوای آب‌نسبی مشخص نمود که تنش شوری موجب کاهش این پارامتر شده است. به‌طوری‌که در هر چهار پایه بیش‌ترین مقدار در تیمارهای شاهد به‌دست آمد و با افزایش غلظت شوری محتوی آب نسبی کاهش یافت. بیش‌ترین مقدار محتوی آب‌نسبی در تیمار شاهد پایه سیتروملو به میزان حاصل شد (شکل ۱- ب). این نتایج نشان می‌دهد که محتوی آب نسبی در پایه‌های مورد بررسی با افزایش غلظت شوری کاهش یافته است. کاهش محتوای آب‌نسبی برگ یک پاسخ عمومی به شرایط تنش اسمزی می‌باشد. محتوای آبی برگ‌ها به‌عنوان فاکتوری برای تعیین سطح آب گیاه شناخته شده است که منعکس‌کننده فعالیت‌های متابولیکی در بافت‌هاست. کاهش در محتوای نسبی آب برگ نشانگر یک کاهش تورمی می‌باشد که سبب کاهش آب مورد نیاز برای فرایندهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی از قبیل طویل‌شدن سلولی، باز شدن روزنه‌ها و فرآیندهای وابسته به فتوسنتز است (Farkhonded *et al.*, 2011).

جدول ۱. تجزیه واریانس پایه‌های مرکبات تحت تنش شوری در کشت درون‌شیشه‌ای

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		وزن تر/ خشک	نشت یونی	محتوای آب‌نسبی	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	شاخص کلروفیل	قند محلول	پراکسید شدن لیپیدها
پایه	۳	٤۳/۷۲**	۱۹۱/۵۲**	٦٥۹/٤**	٤/۲٦*	٤/۲٦*	۰/٤۷*	٦۸۰/۸**	۲۱۳/۱**	٤۲/۷۰**
شوری	٤	٥/۸٥**	۲۷۳۰/۷**	۱٦٦٦/٤**	۳/۲٤**	۳/۲٤**	۰/۳٦**	۲۹٥۰/٤**	٤٤٤/۱**	٤٤/۷٤**
پایه × شوری	۹	۰/٦۳**	٤٤/۰۲**	۹۲/۷**	۰/۱٥**	۰/۱٥**	۰/۰۱**	۳۹/۷۰**	۳٦/٦٤**	۷/۹٦ **
خطا	۳۲	۰/۰۹٤	۳/۲٦	۳/۱۷	۰/۰۱۸	۰/۰۱	۰/۰۰۲	۱۳/۲۲	٦/۰۲	۲/۰٤
ضریب تغییرات		٦/۱۸	٦/۰٥	٥/٥۸	۱۰/۲۹	۷/۳۷	۱۰/۲۹	۱۷/۸٤	۱٥/۲۹	۱۰/۷

* و **: به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ٥ و ۱ درصد.



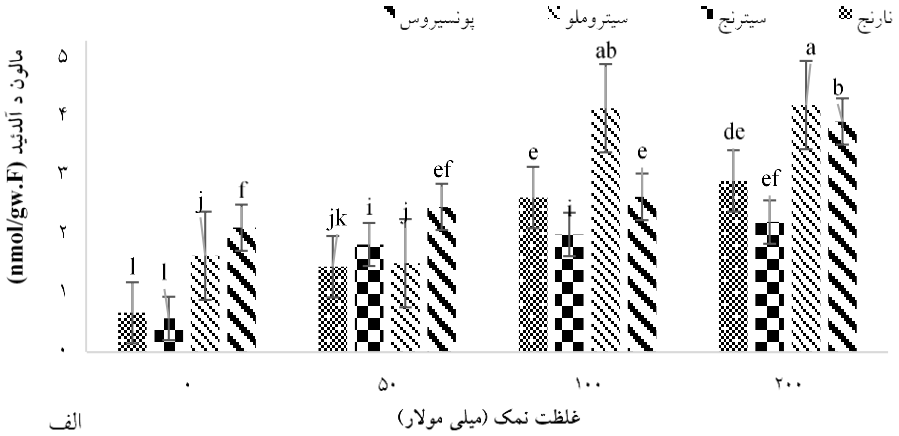


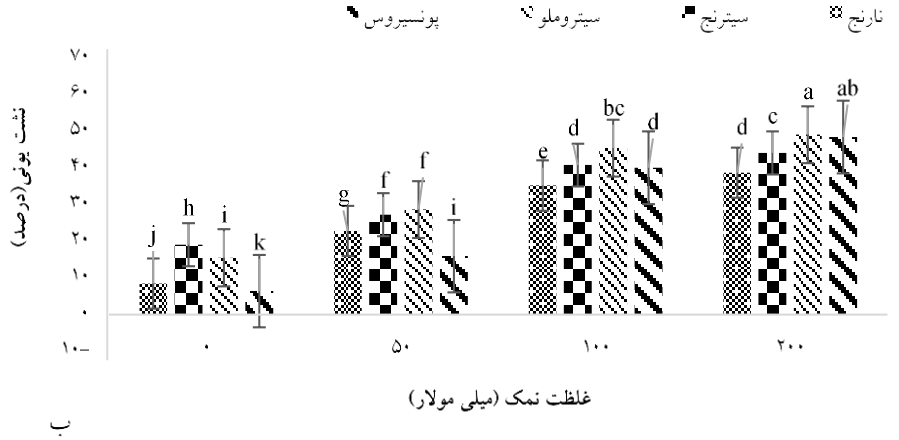
شکل ۱. نسبت وزن تر/ خشک (الف) و میزان محتوی آب نسبی (ب) چهار پایه مرکبات تحت تنش شوری در کشت درون‌شیشه‌ای

۳. ۳. پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و نشت یونی

بررسی‌ها نشان داد که میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در هر چهار پایه با افزایش غلظت شوری افزایش یافت. به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در پایه سیترنج و در غلظت‌های بالاتر سدیم کلرید مشاهده گردید (شکل ۲- الف). هم‌چنین در تیمار شاهد سیترنج کم‌ترین مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا نسبت به سایر غلظت‌ها و پایه‌ها حاصل شد (شکل ۲- الف). نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد که تنش شوری در چهار پایه مرکبات به صورت معنی‌داری درصد نشت یونی و پراکسیداسیون لیپیدها را افزایش داد. یکی از اثرات تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و القای تنش می‌باشد (Sudhakar *et al.*, 2001). گونه‌های فعال اکسیژن منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تغییر در نفوذپذیری غشا (نشت یونی) و خسارت به سلول می‌گردند و اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید و نشت یونی میزان آسیب واردشده به غشا و آسیب اکسیداتیو را نشان می‌دهد (Bandeoglu *et al.*, 2004). در صورت بروز تنش شوری، تنش‌های ثانویه مانند تنش اکسایش نیز محتمل است که در این صورت، تولید و تجمع اکسیژن فعال موجب اکسایش پروتئین‌ها و لیپیدها شده و باعث مرگ سلول می‌شود (Molassiotis *et al.*, 2006).

نتایج بررسی میزان نشت یونی نشان داد که در هر چهار پایه با افزایش غلظت شوری افزایش یافت. به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار در پایه سیتروملو و در غلظت ۲۰۰ (میلی‌مولار) به میزان ۴۸/۹۷ درصد مشاهده شد. هم‌چنین در تیمار شاهد هر چهار پایه کم‌ترین مقدار نشت یونی نسبت به سایر غلظت‌ها حاصل شد (شکل ۲- ب). هم‌چنین در پژوهش‌های دیگر، به‌عنوان مثال در توت (Sudhakar *et al.*, 2001)، در کشت درون‌شیشه‌ای گوجه‌فرنگی (Shibli *et al.*, 2007) و اسفناج (Eraslan *et al.*, 2008) هم نشان داد شد که افزایش غلظت نمک موجب آسیب به غشا و افزایش نشت یونی می‌گردد. این روند در گیاهان حساس بیش‌تر از گونه‌های مقاوم به شوری می‌باشد که به‌همین دلیل در پایه‌های مختلف میزان نشت یونی متفاوت بود. گزارش‌ها حاکی از آن است که گونه‌های مقاوم به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) قوی‌تر، با تنش‌های اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن بهتر مقابله می‌کنند.





شکل ۲. میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشای کل (الف) و میزان نشت یونی (ب) چهار پایه مرکبات تحت تنش شوری کشت درون‌شیشه‌ای

۳. ٤. میزان قند محلول کل

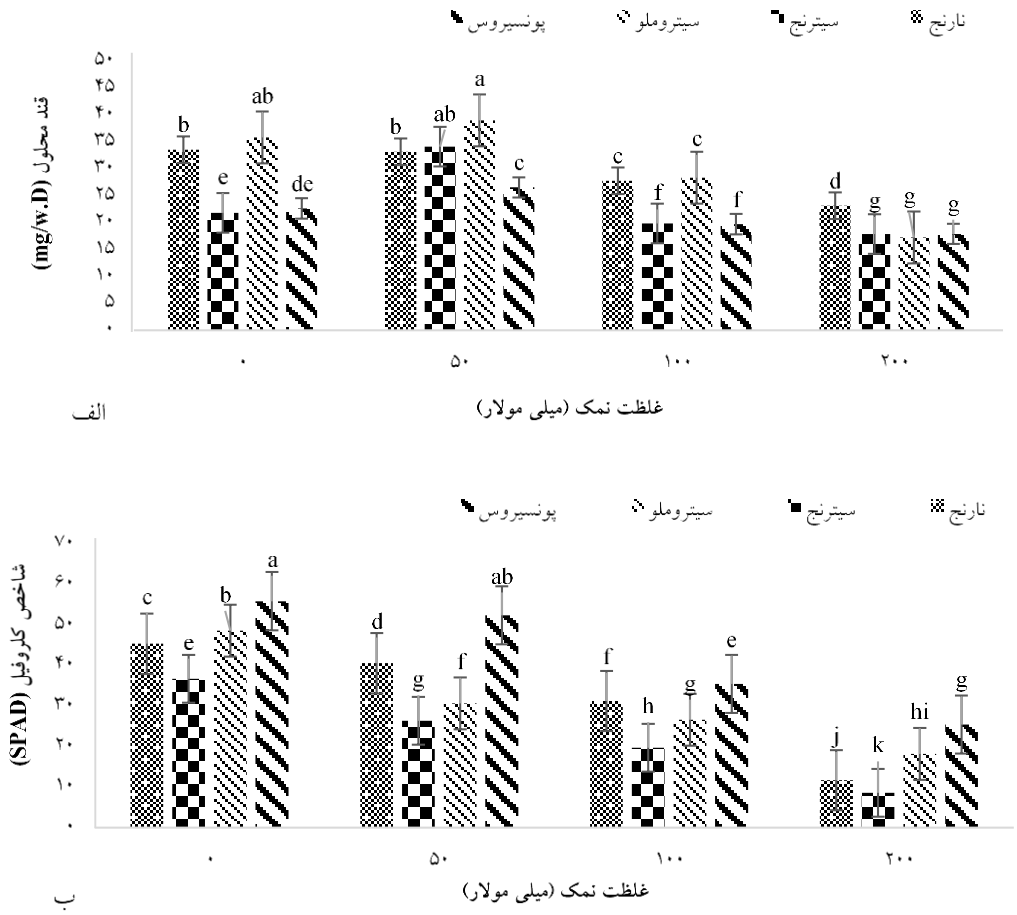
بررسی میزان قند محلول کل نشان داد که در پایه‌های سیترنج، سیتروملو و پونسیروس در غلظت ۵۰ میلی‌مولار ابتدا قند محلول کل افزایش یافت و سپس در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کاهش یافت. برای میزان قند محلول کل پایه نارنج در غلظت ۵۰ میلی‌مولار شوری تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد و میزان قند محلول کل در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار روند نزولی را طی نمود (شکل ۳- الف). گزارش وجود دارد که با افزایش غلظت شوری، قند محلول کل گیاه افزایش یافت (Hashem *et al*., 2015). در این پژوهش نیز در غلظت ۵۰ میلی‌مولار این افزایش حاصل شد. از طرف دیگر، برای پایه فلاینگ دراگون مرکبات هم گزارش شده است که این پایه قادر به تجمع قند جهت مقابله با شوری نمی‌باشد و در اثر تنش شوری کارایی فتوسنتز گیاه کاهش یافته و منجر به کاهش تجمع قندهای محلول در برگ شد (Abedy & Esfandiari, 2018). در این پژوهش هم، میزان قند کل پایه‌ها در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کاهش نشان داد.

۳. ۵. شاخص کلروفیل برگ

با اندازه‌گیری میزان شاخص کلروفیل برگ مشخص شد که تنش شوری موجب کاهش این پارامتر می‌شود. در هر چهار پایه بیش‌ترین مقدار کلروفیل برگ در تیمارهای شاهد به‌دست آمد و با افزایش غلظت شوری شاخص کلروفیل کاهش یافت. بیش‌ترین کلروفیل در تیمار شاهد پایه پونسیروس حاصل شد (شکل ۳- ب). افزایش سطح شوری باعث کاهش شاخص کلروفیل در هر چهار پایه گردید که با نتایج Melgar *et al*. (2008) و Habibi & Amiri (2013) مطابقت دارد. کم‌ترین میزان کلروفیل در پایه سیترنج و در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار اندازه‌گیری شد. در پونسیروس با افزایش سطح شوری میزان کلروفیل کم‌ترین کاهش را داشت که با نتایج Habibi & Amiri (2013) مطابقت نداشت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد با افزایش غلظت کلر میزان کلروفیل کاهش یافت.

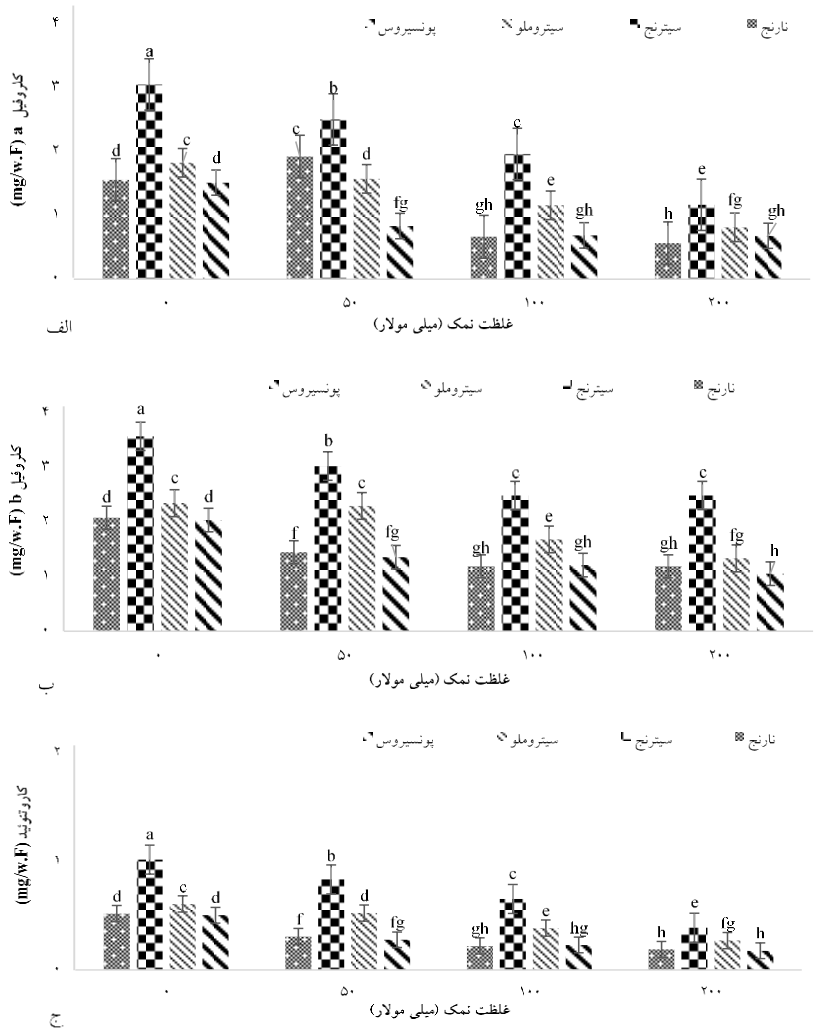
۳. ٦. رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کاروتنوئید

میزان رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کاروتنوئید در غلظت‌های بالای شوری نسبت به تیمار شاهد در هر چهار پایه با کاهش معنی‌داری همراه بود. میزان کلروفیل‌ها و کاروتنوئید با افزایش غلظت شوری کاهش یافت. به‌طوری‌که در تیمار شاهد پایه سیترنج بیش‌ترین مقدار رنگیزه‌ها مشاهده شد. کم‌ترین مقدار این رنگیزه‌ها در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار و در پایه‌های نارنج و پونسیروس به‌دست آمد (شکل ٤). Habibi & Amiri (2013) نیز بیان داشتند که با افزایش غلظت نمک بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌مولار در پایه‌های نارنج و پونسیروس، میزان کلروفیل کاهش می‌یابد. ایشان دلیل کاهش کلروفیل را افزایش غلظت کلر دانستند. هم‌چنین میزان کلروفیل می‌تواند به‌عنوان شاخصی حساس برای متابولیسم سلولی باشد. در تنش شوری، افزون بر تجمع یون کلر، افزایش حساسیت برگ به اتیلن، تخریب کلروفیل و کاهش عناصر اثرگذار مانند نیتروژن، منیزیم، آهن و منگنز در ساختمان کلروفیل هم اتفاق می‌افتد که بر مقدار کلروفیل اثر می‌گذارد (Garcia-Sanchez & Syvertsen, 2009). مقدار کلروفیل با افزایش شوری کاهش می‌یابد، زیرا گیاه با تشکیل آنزیم‌های پروتئینی هم‌چون کلروفیلاز، به کاهش کلروفیل یا صدمه به دستگاه فتوسنتزی واکنش نشان می‌دهد (Dogan, 2011). هم‌چنین، در پژوهشی دیگر بیان‌شده که کاهش کلروفیل با ممانعت یون‌های نمک از بیوسنتز مجدد پروتئین‌ها و تأثیر مخرب آن‌ها بر ساختار کلروپلاست مرتبط است (Jaleel *et al*., 2007).



شکل ۳. میزان قند محلول کل (الف) و شاخص کلروفیل (ب) چهار پایه مرکبات تحت تنش شوری کشت درون‌شیشه‌ای

اندازه‌گیری ضریب همبستگی صفات مورد بررسی در این پژوهش (جدول ۲) نشان داد که نشت یونی با محتوای‌آب نسبی، نسبت وزن تر و خشک، کلروفیل a، b و کاروتنوئید، شاخص سبزینگی و قند محلول کل رابطه معکوس و معنی‌داری دارد. به این معنی که با افزایش نشت یونی، این صفات کاهش می‌یابند. هم‌چنین میزان نشت یونی رابطه مستقیم و معنی‌داری با پراکسید شدن لیپیدها دارد. محتوای آب نسبی رابطه مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با نسبت وزن تر به خشک، کلروفیل a، b و کاروتنوئید، شاخص سبزینگی و قند محلول کل داشت (جدول ۲). نسبت وزن تر/ خشک دارای رابطه مستقیم و معنی‌داری با رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کاروتنوئید) می‌باشد. به این معنی است که افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی موجب افزایش فتوسنتز و در نهایت رشد سلول‌ها شده و وزن گیاه افزایش می‌یابد. کلروفیل a، b و کاروتنوئید با یکدیگر و میزان قند محلول کل رابطه مثبت و معنی‌داری دارا می‌باشند. با افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش غذاسازی در گیاه، میزان قند محلول نیز افزایش می‌یابد. شاخص سبزینگی با میزان قند محلول‌کل رابطه مستقیم و معنی‌دار و با پراکسید شدن لیپیدها رابطه منفی و معنی‌دار دارد.



شکل ٤. میزان کلروفیل a (الف)،کلروفیل b (ب) و کاروتنوئید(ج) چهار پایه مرکبات تحت تنش شوری در کشت درون‌شیشه‌ای

جدول ۲. جدول ضریب همبستگی صفات اندازه‌گیری‌شده چهار پایه مرکبات تحت تنش شوری درون‌شیشه‌ای

	نشت یونی	محتوای آب نسبی	وزن تر/خشک	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	شاخص کلروفیل	قند محلول کل	پراکسید شدن لیپیدها
نشت یونی	۱								
محتوای آب نسبی	-۰/٦۲۲**	۱							
وزن تر/ خشک	-۰/۲۱۱	۰/٤٥۲*	۱						
کلروفیل a	-۰/۷۰۸**	۰/٦۷٤**	۰/۷٦۹**	۱					
کلروفیل b	-۰/۳۹۷*	۰/۷۱۲**	۰/۸٦۱**	۰/۸٥۷**	۱				
کاروتنوئید	-۰/٦٥۷**	۰/٦۳۳**	۰/۸۱۱**	۰/۹۰٤**	۰/۸٤٦**	۱			
سبزینگی برگ	-۰/۸٥۱**	۰/٥۸۸**	-۰/۰۷۹	۰/٤۹٤*	۰/۱۹۸	۰/۱٥۲	۱		
قند محلول کل	-۰/٦٤٦**	۰/٦۱۰**	۰/٤۷۷	۰/٦۷٤**	۰/۳۹۷*	۰/۲۷۲	۰/٥۷۲**	۱	
پراکسید شدن لیپیدها	۰/۷۱۸**	۰/٦۳٤**	-۰/۱۳۱	-۰/۱۸٤	-۰/۲۰۱	۰/۱٥۷	-۰/٦٦٤**	-۰/٦۲۸**	۱

* و **: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥ و ۱ درصد.

٤. نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که وزن تر و خشک، محتوای آب نسبی، قند محلول کل و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید با شوری دارای همبستگی معکوس بودند. نشت یونی و پراکسیدشدن لیپیدها که دو پارامتر فعال هنگام تنش هستند که با افزایش غلظت شوری افزایش یافتند و دارای رابطه معکوس و معنی‌داری با محتوی‌آب نسبی، نسبت وزن تر و خشک، کلروفیل a، b و کاروتنوئید، شاخص سبزینگی و قند محلول کل بودند. باتوجه به این نتایج حاصل از همبستگی صفت‌های اندازه‌گیری‌شده، می‌توان نتیجه گرفت که به احتمال کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی موجب کاهش فتوسنتز و عدم رشد سلول‌ها گردید و در ادامه وزن گیاه کاهش یافت، غذاسازی در گیاه مختل گردید و از میزان قند محلول کل نیز کاسته شد. در مجموع، با افزایش غلظت کلریدسدیم میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و محتوای آب نسبی پایه سیترنج بیش‌تر از سایر پایه‌ها بود. هم‌چنین نسبت به سایر پایه‌ها و در بالاترین غلظت شوری مورد آزمایش، درصد نشت یونی کم‌تر و میزان قند محلول کل در پایه نارنج بیش‌تر بود که نشان‌دهنده آسیب کم‌تر تنش شوری به سلول‌های این پایه می‌باشد. بنابراین، آسیب حاصل از حضور نمک در پایه‌های سیترنج و نارنج کم‌تر از دو پایه دیگر بود و می‌توان آن‌ها را به عنوان پایه مقاوم‌تر به شوری توصیه نمود.

٥. منابع

Abedy, B. & Esfandiari, B. (2018). Effect of Mycorrhizal Fungi on Morphophysiologicaland Nutritional Factors of Flying Dragon Rootstock under Salt Stress. *Journal of Horticultural Science*, *32*(2), 335-344. https://doi.org/10.22067/jhorts4.v32i2.70246. (in Persian)

Aboutalebi Jahromi, A. (2014). Study on the effect of rootstocks and NaCl salinity on concentration of microelements in Valencia orange shoots. *Journal of Plant Ecophysiology*, *6*, 88-99. (in Persian)

Aboutalebi, A., Tafazoly, E., Kholdebarin, B. & Karimian, N. (2007). Effect of Salinity on Concentration and Distribution of Potassium, Sodium and Chloride Ions in Sweet Lime Scion on Five Rootstocks. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, *11*, 69-78. (in Persian)

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* (1), 43-52. DOI: 10.1007/s11738-007-0089-3.

Bandeoglu, E., Egidogan, F., Yucel, M. & Avni Oktem, H. (2004). Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl salinity stress. *Plant Growth Regulation*, *42*(1), 69-77.

Chelli-Chaabounia, A., Ben Mosbah, A., Maalej, M., Gargouric, K., Gargouri-Bouzid, R. & Drira N. (2010). In vitro salinity tolerance of two pistachio rootstocks: *Pistacia vera* L. and *P. atlantica* Desf. *Environmental and Experimental Botany*, *69*(3), 302-312. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.010

Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G. & Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, *19*(6), 371-379. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.02.001

Dogan, M. (2011). Antioxidative and proline potential as a protective mechanism in soybean plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology*, *10* (32), 5972-5978

Eraslan, F., Inal, A., Pilbeam, D. J. & Gunes, A. (2008). Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) grown under boron toxicity and salinity. *Plant Growth Regulation*, *55*(3), 207-219. DOI: 10.1007/s10725-008-9277-4

FAO. (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations Website. in: http:// http://www.faosat.org.

Garcia-Sanchez, F. & Syvertsen, J. P. (2009). Substrate type and salinity affect growth allocation, tissue ion concentration, and physiological responses of Carrizo citrange seedlings. *HortScience*, *44*(5), 1432-1437. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.5.1432.

Ghaleb, W. Sh., Sawwan, J. S., Akash, M. W. & Al-Abdallat, A. M. (2010). In Vitro response of two citrus rootstocks to salt stress. *International Journal of Fruit Science*, *10*, 40-53. https://doi.org/10.1080/15538361003676777.

Habibi, F. & Amiri, M. E. (2013). Investigation of Physiological Responses of Tow Citrus Rootstocks to in Vitro Salt Stress. *Journal of Horticultural Science*, *27*, 350-357. (in Persian)

Hashem A., Abd Allah E. F., Abdulaziz, A. & Alqarawi A. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi enhances salinity tolerance of Panicum turgidum Forssk by altering photosynthetic and antioxidant pathways. *Journal of Plant Interactions*, *10*, 230-242. https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1052025

Heath, R.L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *125*(1), 189-198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Lakshmanan, G. M. A., Sridharan, R. & Panneerselvam, R. (2007). NaCl as a physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in Phyllanthus amarus. *Comptes Rendus Biologies*, *330*(11), 806-813. DOI: 10.1016/j.crvi.2007.08.009.

Janagoudar, B. S. (2009). Physiological strategies of plant breeding for drought and salinity tolerance in cotton. *Biological Forum-An International Journal*, *1*(1), 105-106.

Khoshbakht, D., Asghari, M. R. & Haghighi, M. (2018). Effects of foliar applications of nitric oxide and spermidine on chlorophyll fluorescence, photosynthesis and antioxidant enzyme activities of citrus seedlings under salinity stress. *Photosynthetica*, *56*(4), 1313-1325. https://doi.org/10.1007/s11099-018-0839-z.

Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, *148*, 350-382. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1.

Lutts, S., Kinet, J. M. & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany Journal*, *78*(3), 389-398. https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0134.

Mahajan, S. & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *444*(2), 139-158. DOI: 10.1016/j.abb.2005.10.018.

McCready, R., Guggolz, M. J., Silviera, V. & Owens. H. S. (1950). Determination of starch and amylase in vegetables. *Journal of Analytical Chemistry*, *22*(9), 1156-1158. https://doi.org/10.1021/ac60045a016.

Melgar, J. C., Syvertsen, J. P., Martinez, V. & Garcia-sanchez, F. (2008). Leaf gas exchange, water relations, nutrient content and growth in citrus and olive seedlings under salinity. *Biologia Plantarum Journal*, *52*(2), 385-390. https://doi.org/10.1007/s10535-008-0081-9.

Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G. & Therios, I. (2006). Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh). *Environmental and Experimental Botany*, *56*(1), 54-62. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2005.01.002.

Montoliu, A., Lopez-Climent, M. F., Arbona, V., Perez-Clemente, R. M. & Gomez-Cadenas, A. (2009). A novel in vitro tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. *Plant Growth Regulation*, *59*(2), 179-187. DOI: 10.1007/s10725-009-9401-0.

Moya, J. L., Gómez- Cadenas, A., Primo- Millo, E. & Talon, M. (2003). Chloride absorption in salt- sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use. *Journal of Experimental Botany*, *54*(383), 825-833. DOI: 10.1093/jxb/erg064.

Munns, R. & Tester, R. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*, *59*, 651-681. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.

Murkute, A. A., Sharma, S. & Singh, S. K. (2005). Citrus in terms of soil and water salinity: a review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, *64*, 393-402.

Omokolo, N. D., Tsala, N. G. & Djocgoue, P. F. (1996). Changes in carbohydrate, amino acid and phenol content in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. *Annals of Botany*, *77*(2), 153 158. https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0017.

Qasim, M., Ashraf, M. M., Jamil, A. M., Rehman, Y. S. U. & Rha, E. S. (2003). Water relations and gas exchange properties in some elite canola (*Brassica napus* L.) lines under salt stress. *Annual Application of Biology*, *142*(*3*), 307-316. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2003.tb00255.x.

Shibli, R. A., Kushad, M., Yousef, G. G. & Lila, M. A. (2007). Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. *Plant Growth Regulation*, *51*(2), 159-169. DOI: 10.1007/s10725-006-9158-7

Simón-Grao, S., Nieves, M., Martínez-Nicolás, J. J., Cámara-Zapata, J. M., Alfosea-Simón, M. & García-Sánchez, F. (2018). Response of three citrus genotypes used as rootstocks grown under boron excess conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *159*, 10-19. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.04.042.

Storey R. & Walker R. R. (1999). Citrus and salinity. *Scientia Horticulturae*, *78*, 39-81.

Sudhakar, C., Lakshmi, A. & Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, *161*, 613-619. DOI:10.1016/s0168-9452(01)00450-2.

Tozlu, I., Moore, G. A. & Guy, C. L. (2000). Effects of increasing NaCl concentration on stem elongation, dry mass production, and macro and micro-nutrient accumulation in *Poncirus trifoliata*. *Functional Plant Biology*, *27*, 35-42. DOI: 10.1071/TT99074.