به‌زراعی کشاورزی
دوره ۱۵ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۲
صفحه‌های ۱۷۷-۱۶۵

بررسی فعالیت آنزیمی و واکنش‌های بیوشیمیایی دو پایهٔ مرکبات به تنش شوری درون‌شیشه‌ای

فریبرز حبیبی*[۱]، محمداسماعیل امیری[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زنجان
۲. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زنجان

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۴/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۱۲

چکیده

فعالیت آنزیمی و واکنش‌های بیوشیمیایی دو پایهٔ مرکبات [نارنج (*Citrus aurantium* L.) و پونسیروس (*Poncirus trifoliata Raf.*)] به تنش شوری درون‌شیشه‌ای بررسی شد. ریزنمونه‌های هر دو پایه به محیط کشت پرآوری جامد موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۸/۹ میکرومولار بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۵ میکرومولار نفتالین‌استیک اسید (NAA) با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در ۶ تکرار منتقل شدند. بعد از گذشت ۶ هفته، نتایج نشان داد، پایهٔ سطوح شوری و اثر متقابل آن‌ها، بر تمام پارامترهای اندازه‌گیری‌شده اثر معنی‌داری داشت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل: کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، میزان پرولین، قندهای محلول و میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) با افزایش سطح شوری در هر دو پایه افزایش یافت که میزان افزایش به‌جز آنزیم پراکسیداز و MDA در پایهٔ نارنج بیشتر از پایهٔ پونسیروس بود. پروتئین کل با افزایش سطح شوری در هر دو پایه کاهش یافت. پایهٔ نارنج پروتئین کل بیشتری نسبت پایهٔ پونسیروس داشت. طبق نتایج به‌دست‌آمده، پایهٔ نارنج در شرایط درون شیشه‌ای، مقاوم‌تر از پایهٔ پونسیروس به تنش شوری بود و تحمل بیشتری در سطوح بالای شوری داشت.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین کل، پرولین، قندهای محلول، مالون دی‌آلدئید.

* نویسنده مسئول Email: fariborz_h659@yahoo.com

۱. مقدمه

تنش شوری یکی از تنش‌های محیطی مهم است که تأثیرات منفی بر رشد و متابولیسم مرکبات دارد [۳۵]. تنش شوری از رشد مرکبات از طریق تنش‌های اسمزی، سمیت خاص یون، برهم‌زدن تعادل یون‌ها و تنش اُکسایشی جلوگیری می‌کند [۳۲].

یکی از پایه‌های مرکبات رایج، نارنج (*Citrus aurantium* L.) است که سیستم ریشه‌ای عمیق و گسترده دارد و مقاوم به سرما و خشکی است. خاک‌های سنگین با زهکشی ضعیف و نیز گموز را تحمل می‌کند [۴۲]. پونسیروس (*Poncirus trifoliata* Raf.) تنها گونهٔ خزان‌کننده و مقاوم‌ترین پایهٔ مرکبات به سرما محسوب می‌شود. این پایه به ویروس تریستزا، زایلوپروسیس، نماتد مرکبات، پوسیدگی طوقه و خاک‌های سنگین با زهکش ضعیف مقاوم است [۴۶]. اغلب پایه‌های مرکبات به شوری حساس‌اند و در اکثر موارد، تنش شوری مورفولوژی و آناتومی پایه‌های مرکبات را تغییر می‌دهد [۲]. در مرکبات، پایه‌هایی به‌عنوان پایه‌های متحمل به شوری طبقه‌بندی می‌شوند که در محدودکردن تجمع سدیم و کلر در برگ‌ها توانایی داشته باشند [۳۱]. یون کلر برای مرکبات نسبت به سدیم مسمومیت بیشتری ایجاد می‌کند [۴۰]. به‌طور کلی تأثیر شوری بر مرکبات در افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌ها بستگی به طبیعت آنزیم‌ها، میزان تنش، اندام گیاه و گونه‌های گیاهی دارد [۳۲]. همچنین، تنش شوری باعث تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن[1] (ROS) مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل و اکسیژن می‌شوند [۲۱]. فعالیت این گونه‌های واکنشگر اکسیژن، باعث متابولیسم غیرنرمال از طریق خسارت اُکسایشی به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود [۳۸]. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مانند کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش شوری در گیاهان افزایش پیدا می‌کنند و ارتباطی بین میزان آنزیم‌ها و مقاومت به شوری وجود دارد [۲۶]. برای مثال تحمل به شوری به یک سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمد بستگی دارد و در پایه‌های متحمل‌تر و در سطوح بالای شوری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بیشتر است [۱۹]. تنظیم اسمزی و کاهش پتانسیل اسمزی سلول به کمک محلول‌های اسمولیت به‌عنوان یک ساز و کار مهم در مقاومت به شوری بررسی شده است [۳۳].

در شرایط مزرعه، تعیین اختلاف تحمل به تنش‌ها در پایه‌های درختان میوه دشوار است، به‌دلیل اینکه بسیاری از عوامل محیطی نظیر حاصلخیزی خاک و شرایط فیزیولوژیکی آن، پراکندگی نمک در پروفیل خاک، روش‌های آبیاری و شرایط آب و هوایی و همچنین، عوامل گیاهی مثل مرحلهٔ رشد، رقم و پایه، میزان تحمل تغییر می‌کند [۴۱]. تکنیک کشت بافت بر این محدودیت‌ها غلبه می‌کند و به رشد گیاه تحت شرایط تغذیه‌ای و آب و هوایی کنترل‌شده اجازه می‌دهد و انجام آزمایش‌ها در شرایط یکسان در تمام طول سال امکان‌پذیر است [۴۲]. به‌عنوان مثال 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 حالی که، میزان کلروفیل و قند کل کاهش یافت [۱]. همچنین، اثر تنش شوری NaCl و $CaCl_2$ بر سیب M4 در شرایط درون شیشه‌ای به افزایش غلظت سدیم، کلر، پرولین و قندهای محلول در گیاهچه‌ها منجر شد و میزان کلروفیل برگ در مقایسه با شاهد کاهش یافت [۴۴]. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل:

1. Reactive Oxygen Species

سوپراکسیداز دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز با افزایش سطوح شوری کلرید سدیم در پایهٔ گیلاس Gisela5، افزایش یافت [۱۹].

تاکنون، مطالعات زیادی برای شناخت آستانه و میزان مقاومت پایه‌های مرکبات به تنش شوری در شرایط گلخانه و مزرعه انجام شده است و تفاوت چشمگیری از نظر میزان تحمل به شوری در آن‌ها گزارش شده است [۲۸، ۳۲، ۴۶]. بیشتر تحقیقات برای ارزیابی تحمل به شوری در پایه‌های مرکبات بر پایهٔ آسیب و تجمع یون در برگ‌ها بوده است و این یکی از دلایلی است که هنوز ساز و کار دقیق تحمل به شوری در پایه‌های مرکبات شناسایی نشده است. بنابراین، تحقیقات بنیادی و نوین برای شناخت آستانه و میزان تحمل به شوری در پایه‌های مرکبات امری ضروری است. بنابراین، با ارزیابی واکنش‌های آنتی‌اکسیدانی و بیوشیمیایی پایه‌های مورد مطالعه (نارنج و پونسیروس)، می‌توان میزان تحمل آن‌ها را به‌طور دقیق در شرایط تنش شوری درون شیشه‌ای مشخص کرد.

۲. مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه زنجان، در سال ۱۳۹۱ــ۱۳۹۰، انجام شد. ریزنمونه، میوه‌های رسیدهٔ هر دو پایه (نارنج و پونسیروس) از مؤسسهٔ تحقیقات مرکبات کشور، در شهر رامسر، تهیه شد. بذور از میوه‌های هر دو پایه استخراج و پس از جداکردن پوستهٔ خارجی، بذور چندجنین از بذرهای تک‌جنین جدا شدند. در بذور چندجنین یک دانهال جنسی و چند دانهال نوسلار وجود دارد. بذور چندجنین در زیر هود استریل با آب مقطر استریل شست و شو داده شدند و با هیپوکلریت‌سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس، با اتانول ۷۰ درصد به‌طور کامل ضدعفونی شدند. بذور ضدعفونی‌شده با آب مقطر استریل ۳ بار (۵ دقیقه برای هر بار) آبکشی شدند. سپس، بذور هر دو پایه در محیط کشت جامد موراشیگ و اسکوگ (MS) [۳۴] در ظروف کشت ۲۵۰ میلی‌لیتری دارای ۵۰ میلی‌لیتر محیط (MS) کشت شدند و داخل اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند.

ترکیب محیط کشت (MS) برای جوانه‌زنی بذور، شامل عناصر ماکرو، میکرو، ویتامین و آهن با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و بدون تنظیم‌کننده‌های رشد بود. بعد از جوانه‌زنی بذور و رشد دانهال‌های جنسی و نوسلار (۶ هفته بعد از کشت)، از گیاهچه‌های نوسلار (گیاهچه‌های با اندازهٔ یکنواخت) به‌عنوان ریزنمونه برای هر دو پایه استفاده شد.

گیاهچه‌های نوسلار برای پرآوری به محیط کشت جامد با ۸/۹ میکرومولار بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۵ میکرومولار نفتالین‌استیک اسید (NAA)، منتقل شدند و بعد از گذشت ۵۰ روز، پرآوری انجام شد. به منظور بررسی اثر تنش شوری درون شیشه‌ای، از گیاهچه‌های نوسلار نارنج و پونسیروس، در همان محیط کشت پرآوری با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (NaCl) [صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار] در ۶ تکرار (ظرف کشت)، که در هر ظرف کشت ۳ ریزنمونه یکنواخت (به اندازهٔ ۲ سانتی‌متر) به مدت ۶ هفته، واکشت شدند. شرایط نگه‌داری تمامی کشت‌های انجام‌شده (کشت بذر و اجرای تیمار شوری) در اتاقک رشد، در دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۳۰۰۰–۲۵۰۰ لوکس بود.

در پایان دورهٔ تنش (هفتهٔ ششم)، میزان پروتئین کل به روش برادفورد[1] [۱۲] اندازه‌گیری شد، به منظور تهیهٔ محلول استاندارد از آلبومین سرم گاوی[2] (BSA) استفاده شد. میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil.Series 2, England) خوانده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز به روش چانس و مهلی[3] [۱۳] و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش آسادا[4] [۵] اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید[5] (MDA) به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها با روش هیث و پیکر[6] [۲۴] انجام شد. میزان پرولین به روش بیتس و همکاران[7] [۱۱] و قندهای محلول با روش دوبویس و همکاران[8] [۱۸] اندازه‌گیری شدند.

داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTAT-C تجزیه و تحلیل شدند و مقایسهٔ میانگین‌ها به کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد و نمودارها با نرم‌افزار Excel 2007 رسم شدند.

۳. نتایج و بحث

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با افزایش سطوح شوری به‌طور معنی‌داری در هر دو پایه افزایش یافتند(جدول ۱). فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش سطح شوری در هر دو پایه افزایش یافت، ولی میزان افزایش در پایهٔ نارنج بیشتر از پایهٔ پونسیروس بود، به‌طوری که بیشترین مقدار (۳/۱۸ میکرومول بر گرم وزن تر در دقیقه) در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در پایهٔ نارنج مشاهده شد (جدول ۱). بیشترین مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز (۴/۲ میکرومول بر گرم وزن تر در دقیقه) در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در پونسیروس به‌دست آمد (جدول ۱). همچنین، با افزایش سطح شوری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در هر دو پایه افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین مقدار (۲/۴۵ میکرومول بر گرم وزن تر در دقیقه) در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در پایهٔ نارنج مشاهده شد (جدول ۱).

قرارگرفتن گیاهان در شرایط نامساعد محیط نظیر تنش شوری موجب افزایش تولید پراکسید هیدروژن می‌شود. پراکسید هیدروژن نسبتاً پایدار و از نظر بارالکتریکی خنثی است، اما از آنجا که می‌تواند از میان غشای سلولی عبور کند و وارد اجزای سلولی شود، بسیار زیان‌آور است [۲۹]. پراکسید هیدروژن در حضور رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH) را تولید می‌کند که بسیار فعال است. بنابراین، خنثی‌کردن پراکسید هیدروژن برای بقای سلول اهمیت ویژه‌ای دارد [۲۶]. برای محافظت در برابر این ترکیبات سمی، سلول‌های گیاه و اندامک‌هایی نظیر کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانت را به‌کار می‌برند [۴۳]. گیاهان با استفاده از سیستم آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی (بتاکاروتن، ترکیبات فنولی، آسکوربات) و آنزیمی (کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) آن‌ها را حذف می‌کنند [۲۵]. گیاهان مقاوم به شوری سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمدتری دارند [۶]. کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز تجزیهٔ پراکسید هیدروژن را درون سلول و در آپوپلاست کاتالیز می‌کنند [۴۳]. فعالیت بیشتر این آنزیم‌ها از میزان تنش اُکسایشی می‌کاهد و از فرآیندهای متابولیکی محافظت می‌کند که ضامن بقای سلول و گیاه هستند [۳۰]. فعالیت این آنزیم‌ها بسته به گونهٔ گیاهی و شرایط تنش متغیر است [۲۱]. به‌طوری که، در تنش شوری درون

1. Bradford
2. Bovine serum albumin
3. Chance and Maehly
4. Asada
5. Malondialdehyde
6. Heath and Packer
7. Bates et al
8. Dubious et al

شیشه‌ای پایهٔ گیلاس Gisela5 در سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت [۱۹]. این افزایش فعالیت آنزیم‌ها، واکنشی دفاعی برای جلوگیری از آسیب سلولی است که گیاه در واکنش به غلظت‌های بالای کلرید سدیم از خود نشان می‌دهد. به‌عنوان مثال این افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تنش شوری درون شیشه‌ای پایهٔ سیب MM106 نیز گزارش شده است [۳۰]. در نهایت، فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در پایهٔ نارنج بیشتر از پایهٔ پونسیروس بود، ولی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در پایهٔ پونسیروس بیشتر از پایهٔ نارنج بود، به‌طوری که بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور به‌ترتیب در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار شاهد حاصل شد (جدول ۱). پایهٔ نارنج با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحمل بیشتری به غلظت‌های بالای کلرید سدیم از خود نشان داد. هرچند در پایهٔ پونسیروس با افزایش سطوح شوری، فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش یافت، باز هم سطح تحمل کم بود که این مسئله می‌تواند ناشی از صدمات عناصر به اجزای سلولی، اندامک و غشا باشد که اثر فعالیت دفاعی را کاهش می‌دهد یا خنثی می‌کند [۴].

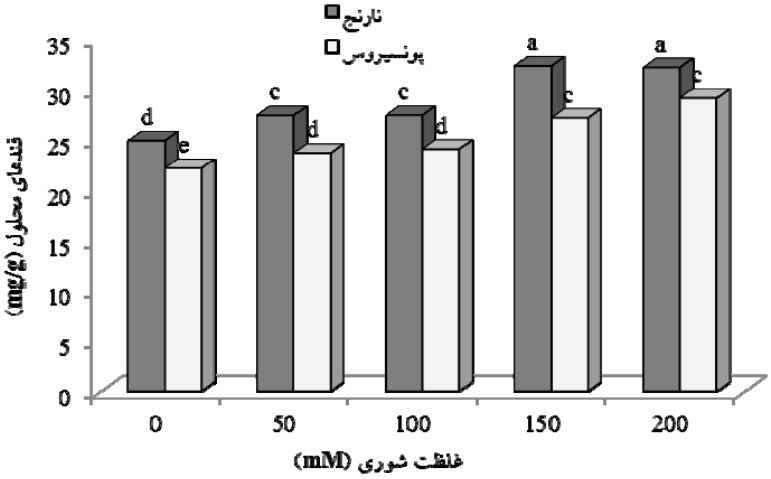
با افزایش سطح شوری میزان پروتئین کل در هر دو پایه کاهش یافت، در حالی که، اثر متقابل پایه و شوری معنی‌دار نشد. کمترین میزان پروتئین کل در پایه‌های نارنج و پونسیروس به‌ترتیب با ۰/۱۵ و ۰/۱۳ میلی‌گرم بر لیتر در غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱. اثر سطوح مختلف تنش شوری (NaCl) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پروتئین کل گیاهچه‌های نارنج (*Citrus aurantium* L) و پونسیروس (*Poncirus trifoliata* Raf) در محیط پرآوری MS جامد ۶ هفته بعد از کشت

پایه	سطح شوری (mM)	فعالیت آنزیم کاتالاز (میکرومول بر گرم وزن تر در دقیقه)	فعالیت آنزیم پراکسیداز (میکرومول بر گرم وزن تر در دقیقه)	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (میکرومول بر گرم وزن تر در دقیقه)	پروتئین کل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
نارنج	۰	۱/۱۴ g	۰/۹۵ e	۱/۳۵ e	۰/۳۱ a
	۵۰	۱/۲۳ f	۱/۲۹ de	۱/۵۷ d	۰/۲۵ abc
	۱۰۰	۱/۴۲ ef	۱/۴۱ de	۱/۸۹ c	۰/۲۳ abcd
	۱۵۰	۲/۵۴ c	۲/۰۶ cd	۲/۱۸ b	۰/۱۹ cde
	۲۰۰	۳/۱۸ a	۲/۷۸ bc	۲/۴۵ a	۰/۱۵ de
پونسیروس	۰	۰/۹۴ h	۱/۰۴ e	۱/۱۶ f	۰/۲۸ ab
	۵۰	۱/۵ e	۱/۴۳ de	۱/۲۳ ef	۰/۲۱ bcde
	۱۰۰	۱/۹۲ d	۲/۲۶ bc	۱/۳۷ e	۰/۱۸ cde
	۱۵۰	۲/۰۴ d	۲/۸۹ b	۱/۶۴ d	۰/۱۵ de
	۲۰۰	۲/۹ b	۴/۲ a	۲/۲۵ b	۰/۱۳ e

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند.

یکی از فرآیندهای مهم که تحت تأثیر تنش شوری قرار می‌گیرد، سنتز پروتئین‌هاست. مقدار پروتئین محلول علامت مهمی از وضعیت بیوشیمیایی گیاهان است [۱۷]. بسیاری از پروتئین‌ها طی تنش هیدرولیز می‌شوند و بر همین اساس، کاهش در غلظت پروتئین کل، می‌تواند از نتایج تنش باشد. براساس نتایج بعضی تحقیقات، شوری باعث کاهش در مقدار پروتئین گیاه می‌شود [۱۵]. اما مشخص نیست که این کاهش در نتیجهٔ تخریب پروتئین‌هاست یا سنتز کمتر آن‌ها. شوری سبب شکستن باندهای هیدوراستاتیک و موجب افزایش واکنش‌های غیرآبدوست (هیدروفوبیک) می‌شود [۱۷]. این نتیجه در تنش شوری درون شیشه‌ای پایهٔ سیب M4 در سطوح ۳۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده شد. بیشترین و کمترین میزان پروتئین کل، به‌ترتیب در تیمار ۳۵ و ۲۰۰ میلی‌مولار به‌دست آمد [۴۴]. همچنین، در تنش شوری درون شیشه‌ای پایهٔ گیلاس Gisela5 در سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، به کاهش میزان پروتئین کل منجر شد، به‌طوری که کمترین میزان پروتئین کل در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد [۱۹]. تنش باعث بیان ژن‌های ویژه‌ای می‌شود که گیاه را به سازگاری در شرایط نامساعد کمک می‌کند [۳۸]، بنابراین، امکان افزایش غلظت پروتئین کل نیز وجود دارد [۹]. به‌عنوان مثال، تنش شوری کلرید سدیم در شرایط درون‌شیشه‌ای بر پایه‌های انگور موجب افزایش غلظت پروتئین کل در تمامی پایه‌ها شد [۱]. همچنین، واکنش دو ژنوتیپ مرکبات (*Citrus jambhiri* و *Citrus karna*) در سطوح ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم به افزایش پروتئین کل در هر دو ژنوتیپ منجر شد [۳۶]. زمانی که میان تولید انواع واکنشگر اکسیژن و سیستم آنتی‌اکسیدانی برای دفع این مولکول‌ها تعادل برقرار نباشد، مقدار زیاد این ترکیبات، متابولیسم طبیعی و تعادل سلولی را برهم می‌زنند و سبب صدمات اُکسایشی به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند [۴۵]. همچنین، صدمهٔ مسیرهای سنتز پروتئین و یا تخریب آن‌ها می‌تواند علت کاهش میزان پروتئین و تولید آن باشد [۱۴]. تأثیر اکسیژن‌های واکنشگر بر DNA و RNA می‌تواند از دلایل کاهش سنتز پروتئین‌ها در شرایط تنش باشد [۲۷]. به‌طور کلی با افزایش سطح شوری میزان قندهای محلول هر دو پایه افزایش یافت (شکل ۱).

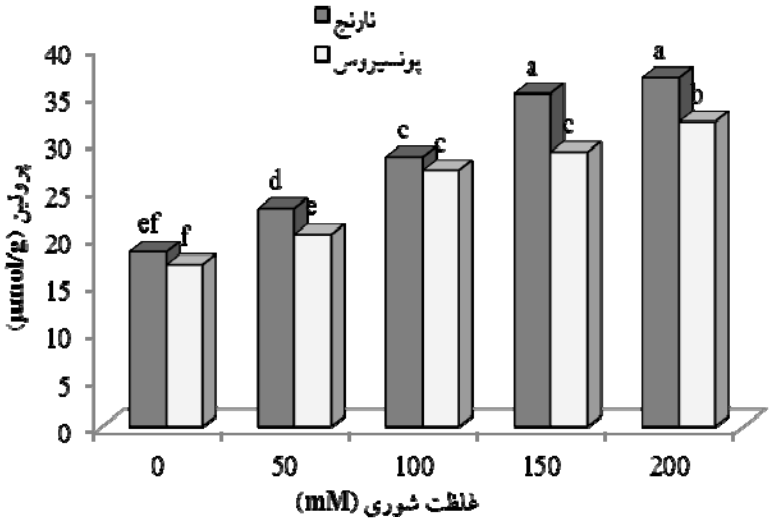


شکل ۱. اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر میزان قندهای محلول گیاهچه‌های نارنج و پونسیروس

(حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند)

بیشترین میزان تجمع قندهای محلول در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار و در هر دو پایه مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ و همچنین، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار در میزان تجمع قندهای محلول در پایهٔ نارنج مشاهده نشد (شکل ۱).

محققان همبستگی بالایی را بین تجمع قندهای محلول و میزان تحمل به شوری در پایه‌های درختان میوه ذکر کردند [۱، ۱۹، ۴۴]. در این آزمایش، پایهٔ نارنج تجمع قندهای محلول بیشتری نسبت به پایهٔ پونسیروس داشت که نشان از تحمل بیشتر این پایه به سطوح بالای شوری دارد. افزایش قندهای محلول در تنش شوری کلرید سدیم در کشت درون شیشه‌ای ژنوتیپ‌های مرکبات [۳۶]، پایه‌های انگور [۱]، سیب [۴۴]، گیلاس [۱۹] نیز به‌دست آمده است که بیشترین تجمع قندهای محلول در سطوح بالای شوری مشاهده شد. شوری بر متابولیسم قندهای محلول اثر می‌گذارد و مقدار آن را افزایش می‌دهد [۴۵]. در پاسخ‌های اسمزی گیاهان، تجمع کربوهیدرات از عواملی است که می‌تواند از اختلالات در غشای سلولی جلوگیری کند [۳۰]. مشخص شده است که قند طی تنش شوری علاوه بر نقش کارکردی به‌عنوان حفاظت‌کنندهٔ اسمزی و سوبسترای رشدی، به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ بیان ژن نیز نقش‌های مهمی را ایفا می‌کند [۱۶]. هرچند براساس بسیاری از تحقیقات انجام‌شده، تنش شوری سبب تجمع کربوهیدرات‌ها در گیاهان مختلف می‌شود [۹]، کاهش کربوهیدرات و قندهای محلول نیز گزارش شده است [۳] که می‌تواند بر اثر اختلال در ساز و کار آنزیم‌های شرکت‌کننده در مراحل مختلف تولید منابع ذخیره‌ای باشد [۱۰]. عقیده بر این است که تجمع قندهای محلول و نشاسته در نتیجهٔ تنش شوری در بافت‌ها و سلول‌های گیاهی می‌تواند به‌عنوان تنظیم اسمزی و یا عامل ذخیرهٔ اسمزی عمل کند [۲۰]. همچنین، تجمع قندهای محلول می‌تواند بر اثر تبدیل بیشتر نشاسته به قند و یا مصرف کمتر کربوهیدرات‌ها توسط بافت‌ها بر اثر صدمهٔ وارده به فرآیندهای سلولی و کاهش باشد [۳۹]. با افزایش سطح شوری میزان تجمع پرولین نیز مانند قندهای محلول هر دو پایه نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۲).



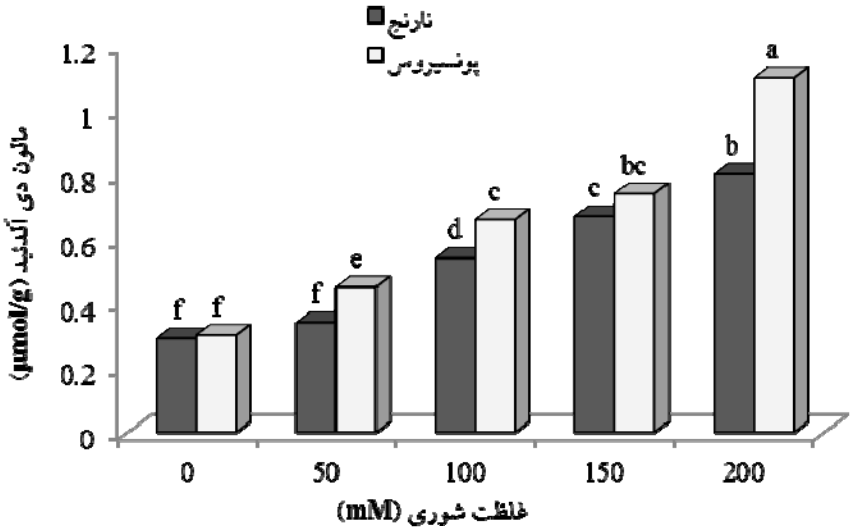
شکل ۲. اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر میزان پرولین گیاهچه‌های نارنج و پونسیروس

(حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند)

بیشترین میزان تجمع پرولین در تیمار ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار در پایهٔ نارنج مشاهده شد، به‌طوری که اختلاف معنی‌داری بین این دو سطح شوری مشاهده نشد. کمترین میزان تجمع پرولین در تیمار شاهد به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری بین هر دو پایه مشاهده نشد (شکل ۲). افزایش پرولین در بالاترین سطح تیمار شوری مشاهده شد که این نتیجه در تنش شوری درون شیشه‌ای ژنوتیپ‌های مرکبات [۳۶] پایه‌های انگور [۱]، پایه‌های سیب [۳۰، ۴۴]، پایهٔ گیلاس Gisela5 [۱۹] نیز حاصل شده است. هرچند پرولین در همهٔ اندام‌های گیاه طی تنش تجمع می‌یابد، سریع‌ترین انباشت را در برگ‌ها دارد [۳۰]. به‌دنبال تنش شوری، تجمع پرولین ممکن است به‌دلیل افزایش سنتز یا کاهش تجزیه رخ دهد [۷]. افزایش پرولین در شرایط تنش، می‌تواند ناشی از سنتز پرولین، کاهش اکسیدشدن پرولین به گلوتامات و یا کاهش مصرف آن در سنتز پروتئین و یا افزایش تجزیهٔ پروتئین‌ها باشد [۳۷]. کاهش پتانسیل اسمزی در گیاه در شرایط تنش با تجمع یون‌های معدنی مثل Na و Cl ایجاد می‌شود که تأثیرات زیان‌باری بر رشد گیاه دارد [۲۳]. 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 [۲۱]. تجمع پرولین در پایه‌هایی که تحمل بیشتری به شوری دارند، می‌تواند یک ساز و کار دفاعی برای مقابله و تحمل تنش باشد و هم به‌عنوان علامت تنش و هم واکنشی سازگارانه مورد توجه بوده است [۳۳]. از آنجا که پرولین در تنش‌های محیطی در سلول‌ها تجمع می‌یابد و با توجه به نقش حفاظتی آن و تنظیم اسمزی، یکی از دلایل بالاتربودن تحمل در پایهٔ نارنج می‌تواند به‌علت تجمع بیشتر این اسیدآمینه باشد که از صدمات ناشی از تنش اسمزی و یونی کلرید سدیم کاسته است [۳۶].

مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌طور گسترده به‌عنوان نشانگر زیستی برای پراکسیداسیون لیپیدها در تنش‌های اُکسایشی به‌کار می‌رود که علاوه بر لیپیدها به DNA نیز صدمه می‌رساند و به تولید ترکیبات زائد مثل دئوکسی‌گوانوزین و دئوکسی‌آدنوزین منجر می‌شود [۴۳]. با افزایش سطح شوری، میزان مالون دی‌آلدئید در هر دو پایه نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۳). بیشترین میزان MDA در تیمار ۲۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد. پراکسیداسیون لیپید در پایهٔ پونسیروس بیشتر از نارنج بود (شکل ۳).

پراکسیداسیون لیپیدها به‌عنوان خسارت‌زاترین فرآیند شناخته‌شده در هر موجود زنده، به آن توجه شده است. صدمه به غشا، گاهی اوقات به‌عنوان تنها پارامتر تعیین‌کنندهٔ سطح تخریب لیپید تحت تنش‌های مختلف، بررسی شده است و یکی از مهم‌ترین دلایل تخریب سلول طی تنش شوری است که تغییراتی در ترکیب اسیدهای چرب ایجاد می‌کند (غیرفعال‌شدن پروتئین‌های غشا و افزایش نفوذپذیری غشا) و از این طریق ساختار و فعالیت غشاهای سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۶]. پراکسیداسیون لیپید هم در غشای سلول و هم در غشای اندامک‌ها، وقتی رخ می‌دهد که سطوح گونه‌های واکنشگر اکسیژن به بیشتر از حد آستانه برسد، در نتیجه نه تنها به‌طور مستقیم بر فعالیت سلولی تأثیر می‌گذارد، بلکه تنش اُکسایشی را از طریق تولید رادیکال‌های ناشی از لیپیدها، تشدید می‌کند [۲۱]. اسیدهای چرب غیراشباع حساس‌ترین بخش غشا به اکسیدشدن و تخریب از طریق تنش اُکسایشی است. شوری با ایجاد تنش اسمزی و یونی سبب تشکیل گونه‌های واکنشگر اکسیژن می‌شود [۸]. بر اثر تجزیهٔ اسیدهای چرب غیراشباع به کمک اکسیژن واکنشگر، ترکیباتی مثل مالون دی‌آلدئید (MDA) تولید می‌شود که برای سلول مسمومیت ایجاد می‌کند. تجمع مالون دی‌آلدئید در شرایط تنش سبب افزایش نفوذپذیری غشای پلاسمایی می‌شود و نشت یونی افزایش می‌یابد که شاخصی از میزان صدمهٔ اُکسایشی به شمار می‌رود [۲۲].



شکل ۳. اثر سطوح مختلف کلرید سدیم (NaCl) بر میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) گیاهچه‌های نارنج و پونسیروس

(حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند)

این نتیجه با بیشتر مطالعات انجام‌شده مطابقت دارد، برای مثال در تحقیقی که در مورد پایهٔ کاریزوسیترنج در غلظت‌های صفر، ۳۰ ، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار کلرید سدیم انجام شد، افزایش سطوح شوری به افزایش مقدار MDA منجر شد، به‌طوری که بیشترین میزان تولید آن در تیمار ۹۰ میلی‌مولار مشاهده شد [۴]. همچنین، در تنش شوری درون شیشه‌ای کلرید سدیم در سطوح صفر، ۳۰ و ۶۰ میلی‌مولار روی پایه‌های نارنگی کلئوپاترا، سیتروملو و کاریزو سیترنج که در آن میزان MDA هر ۱۰ روز یک‌بار طی ۱ ماه اندازه‌گیری شدند، نتایج نشان داد، با گذشت زمان و افزایش سطوح شوری میزان MDA افزایش یافت و در پایهٔ حساس‌تر به شوری، میزان MDA بیشتری طی زمان مشاهده شد که بیشترین میزان MDA در روز آخر اندازه‌گیری شد و در پایهٔ حساس کاریزوسیترنج بود، در حالی که، در پایهٔ مقاوم نارنگی کلئوپاترا میزان MDA کمتری نسبت به دو پایهٔ دیگر داشت [۳۱]. در این تحقیق نیز، پایهٔ پونسیروس میزان MDA بیشتری نسبت به پایهٔ نارنج در بافت خود داشت. این امر دلالت بر این دارد که تجمع بیشتر MDA نشان‌دهندهٔ حساسیت بیشتر به تنش اُکسایشی است. پراکسیداسیون لیپید به پروتئین‌های غشا صدمه وارد و گیرنده‌ها، آنزیم‌ها و کانال‌های یونی را غیرفعال می‌کند [۴]. کمتربودن میزان MDA در پایهٔ نارنج نسبت به پایهٔ پونسیروس می‌تواند به‌دلیل فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تجمع بیشتر پرولین باشد که در این پایداری نقش داشته‌اند [۳۲].

۴. نتیجه‌گیری

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت پایهٔ نارنج در مقایسه با پایهٔ پونسیروس از نظر فعالیت آنزیمی و بیوشیمیایی مقاومت بیشتری در برابر تنش شوری در شرایط درون شیشه‌ای دارد. با توجه به بهره‌برداری پیش از حد از منابع آب زیرزمینی و کاهش سطح آن، استفاده از آب‌های دارای املاح دور از انتظار نیست. بنابراین، شوری ثانویهٔ خاک بر اثر کاهش کیفیت آب، پدیده‌ای

اجتناب‌ناپذیر است و مشکل اساسی در تولید تجاری مرکبات کشور به شمار می‌رود. همچنین، برای بالابردن تولید مرکبات در واحد سطح، مستلزم شناسایی پایه‌های مقاوم به تنش‌ها است، زیرا با توجه به قرارگرفتن پایه در خاک و قابل تعویض‌نبودن آن بعد از استقرار خیلی پراهمیت‌تر از رقم پیوندی است. پایهٔ نارنج به‌دلیل داشتن ساز و کارهای دفاعی همچون افزایش آنزیم‌های آنتی-اکسیدان، تنظیم اسمزی با پرولین و قندهای محلول می‌تواند در تداوم رشد رویشی پیوندک حتی در شرایط تنش شوری، به‌عنوان یک پایهٔ متحمل به شوری برای ارقام مختلف مرکبات استفاده شود.

منابع

1. Alizadeh M, Singh SK, Patel VB, Bhattacharya RC and Yadav BP (2010) *In vitro* responses of grape rootstocks to NaCl. Biologia Plantarum. 54: 381-385.
2. Al-yassin A (2004) Influence of salinity on citrus: A review paper. Journal of Central European Agriculture. 5: 263-272.
3. Anjum MA (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.
4. 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.
5. Asada K (1997) Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. *In*: Scandalios JG, (Eds.), Cold Spring Harbor Lab Press, New York. pp. 141-146.
6. Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology. 141: 391-396.
7. Ashraf M and Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 59: 206-216.
8. Azevedo H, Amorium-Silva V and Tavares RM (2009) Effect of salt on ROS homeostasis, lipid peroxidation and antioxidant mechanisms in *Pinus pinaster* suspension cells. Annals of Forest Science. 66: 1-10.
9. Azooz MM, Ismaiel AM and Abou elhamed MF (2009) Growth, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities as a selection criterion for the salt tolerance of maize cultivars grown under salinity stress. International Journal of Agriculture and Biology. 11: 21-26.
10. Azza Mazher AM, El-quesni EM and Farahat M (2007) Responses of ornamental and woody trees to salinity. World Journal Agriculture Science. 3: 386-395.
11. Bates LS, Waldren RP and Teare LD (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39: 205-208.
12. Bradford MM (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.
13. Chance B and Maehly AC (1995) Assay of catalas and peroxidase. Methods in Enzymology. 2: 764-775.

14. Dai QL, Chen Ch, Feng B, Lin TT, Tian X, Gong VV, Sun VK, Wang J and Du Sh (2009) Effect of NaCl treatment on the antioxidant enzymes of oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedlings. African Journal of Biotechnology. 8(20): 5400-5405.

15. Desingh R and Kauagaraj G (2007) Influence of salt stress on photosynthesis and antioxidative systems in two cotton varieties. General and Applied Plant Physiology. 33(3): 221-234.

16. Djibril S (2005) Growth and development of data palm seedlings under drought and salinity stresses. African Journal of Biotechnology. 4(9): 968-972.

17. Doganlar ZB, 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(15): 2056-2065.

18. Dubious M, Gilles KA, Hamilton JK, Roberts PA and Smith F (1956) Colorimetrik method for determination in sugars and related substances. Annual Chemistry. 28: 350-356.

19. 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.

20. Ferreira AL and Limma-costa ME (2008) Growth and ultrastructural characteristics of citrus cells grown in medium containing NaCl. Biologia Plantarum. 52(1): 129- 132.

21. Gill SS and Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinary in abiotic stress tolerant in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry. 48: 909-930.

22. Gulen H, Cetinkaya C, Kadlonglu M, kesici M, Cansev A and Eris A (2008) Peroxidase activity and lipid peroxidation in strawberry (*Fragaria ananassa*) plants under Low temperature. Journal Biology and Environmental Sciences. 2 (6): 95-100.

23. Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK and Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Biology. 51: 463-499.

24. Heath RL and Packer L (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast, 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics.125: 189-198.

25. Jebera S, Jebera M, Liman F and Aouani ME (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.

26. Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR and Parida AK (2006) Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. Indian Academy of Sciences. 85: 237-254.

27. Li V (2008) Kinetics of the antioxidant response to salinity in the halophyte *Limonium bicolor*. Plant Soil and environment. 54: 493-497.

28. Melgar JC, Syvertsen JP, 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.

29. Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies. 15: 523-530.

30. Molassiotis AN, 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.

31. Montoliu A, Lopez-Climent MF, Arbona V, Perez-Clemente RM 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.

32. Moya JL, 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.

33. Munns R and Tester R (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Physiology. 59: 651-681.

34. Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

35. Murkute AA, Sharma Sh and Singh SK (2005) Citrus in terms of soil and water salinity: A review. Journal of Scientific and Industrial Research. 64: 393-402.

36. Murkute AA, Satyawati Sh and Singh SK (2010) Biochemical alterations in foliar tissues of citrus genotypes screened *in vitro* for salinity tolerance. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 19: 203-208.

37. Nasir khan M, Siddiqui MH, Mohammad F, Masroor M, Khan A and Naeem M (2007) Salinity induced changes in growth, enzyme activities, photosynthesis, proline accumulation and yield in Linseed genotypes. World Journal of Agricultural Sciences. 3(5): 685-695.

38. Paridaa AK and Dasa AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology. Environment Safety. 60: 354-349.

39. Perez-perez JG, Syvertsen JP, Botia P and Garcia-sanchez F (2007) Leaf water relations and net gas exchange responses of salinized Carrizo Citrange seedlings during drought stress and recovery. Annals Botany. 1 -11.

40. 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.

41. Roussos PA, Gasparatos D, Tsantili E and Pontikis CA (2007) Mineral nutrition of jojoba explants *in vitro* under sodium chloride salinity. Scientia Horticulturae. 114: 59-66.

42. Shiyab MS, Shibli RA and Mohammad MM (2003) Influence of sodium chloride salt stress on growth and nutrient acquisition of sour orange *in vitro*. Journal of Plant Nutrition. 26: 985-996.

43. 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.

44. Sotiropoulos TE (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.

45. Taylor NL, Day DA 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 (394): 1-10.

46. Tozlu I, Moore GA and Guy CL (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.