



## به زراعی کشاورزی

دوره ۱۵ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۲  
صفحه‌های ۱۹۲-۱۷۹

# تأثیر سطوح مختلف شوری روی برخی تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بادام (*Prunus dulcis* Mill.)

حمید رهنمون\*<sup>۱</sup>، فرید شکاری<sup>۲</sup>، جلیل دژم‌پور<sup>۳</sup>، محمدباقر خورشیدی<sup>۴</sup>

۱. مربی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی، تبریز - ایران
۲. دانشیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان - ایران
۳. استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی، تبریز - ایران
۴. استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی، تبریز - ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۲/۳۱

تاریخ وصول مقاله: ۹۱/۱۲/۱

### چکیده

به منظور ارزیابی برخی تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بادام (*Prunus dulcis* Mill.) در شرایط تنش شوری و تعیین رابطه بین انباشت یون‌های سدیم و کلر با این تغییرات، آزمایشی بر مبنای طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار سطح تیماری شامل؛ صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مول بر لیتر نمک خالص کلرید سدیم طراحی و بین سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۱ اجرا شد. ماده آزمایشی استفاده شده در این تحقیق بذر ژنوتیپ‌های سالم و بارده بادام رشد یافته در مناطق شور استان آذربایجان شرقی بود. این بذرها بعد از رشد و رسیدن به مرحله ۲۰ - ۱۵ برگی به مدت هشت هفته تحت تأثیر سطوح شوری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که آستانه ظهور علائم سوختگی حاشیه‌ای در برگ‌های بادام با انباشت سدیم به میزان حداقل ۱۱ - ۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک در ارتباط است. همچنین، مشخص شد که به موازات انباشت یون‌های سدیم و کلر در برگ، میانگین محتوای پرولین آزاد به‌طور معنی‌دار و با الگوی خطی از ۳۷/۷ در ژنوتیپ‌های بادام شاهد به ۱۱۷/۹ میکرومول بر گرم ماده تر در ژنوتیپ‌های تحت ۷۵ میلی‌مول نمک افزایش می‌یابد. براساس نتایج به‌دست‌آمده فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش سطوح نمک روند افزایشی معنی‌دار داشت ( $P \leq 0.05$ ). همچنین، فعالیت آنزیم پراکسیداز تا سطح شوری ۵۰ میلی‌مول افزایشی و در سطوح بالاتر کاهش می‌یابد.

**کلیدواژه‌ها:** آسکوربات پراکسیداز، تنش، کاتالاز، کلرید سدیم، مناطق شور.

## ۱. مقدمه

تنش شوری به‌عنوان یکی از عوامل اصلی محدودکننده تولید محصول و ماده تر گیاهان شناخته شده است [۵] روند تأثیر این تنش روی گیاهان را می‌توان به دو مرحله متوالی تنش آبی و تنش یونی تفکیک کرد [۲۴]. توانایی گیاه در برقراری نسبت‌های متعادل  $Na^+/K^+$ ،  $Na^+/Ca^{2+}$ ،  $Na^+/Mg^{2+}$  و  $Cl^-$  و  $NO_3^-$  به منظور حفظ فشار اسمزی، جریان عادی فعل و انفعالات و انسجام اجزای درون سلول از شاخصه‌های اصلی تحمل به شوری در گیاهان حساس به شمار می‌آید [۱۵]. همچنین، ظهور علائم سوختگی حاشیه‌ای برگ در این گیاهان به‌طور مستقیم به تولید نسبت‌های افراطی سدیم با کاتیون‌های ضروری مرتبط است؛ در این زمینه آستانه ظهور علائم سوختگی برگ هلو انباشت این عنصر به میزان ۶ - ۴ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک تعیین شده است [۱۹]. هرچند در گونه بادام باغی نیز ظهور علائم مشابه در شوری ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نمک کلرید سدیم [۲۷] و در بادام تلخ، شوری ۵۰ میلی‌مول بر لیتر گزارش شده است [۳۱]، در هیچ‌یک از این دو تحقیق اشاره‌ای به مقدار انباشت اجزای نمک در بافت‌های گیاه نشده است. با تجمع تدریجی سدیم توازن آبی گیاه مختل می‌شود و محتوای آب نسبی برگ به‌طور معنی‌دار کاهش می‌یابد [۵]. در این شرایط گیاه به فراخور توانایی خود پتانسیل اسمزی سلول‌ها را با استفاده از جذب انتخابی و جایدهی یون‌ها یا بیوستز ترکیبات آلی محلول با وزن مولکولی کم تنظیم می‌کند [۴]. یکی از مهم‌ترین این ترکیبات اسیدآمینة پرولین است که معمولاً محتوای آن در گیاهان عالی تحت تنش شوری به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد [۴، ۲۰، ۲۶]. بنا به گزارش‌های موجود، این متابولیت علاوه بر ایفای نقش اسمولیتی<sup>۱</sup> و اسموپروتکتوری<sup>۲</sup>، با حذف رادیکال‌های آزاد در حفظ

انسجام ساختمان سلول و کاهش پتانسیل اکسیداتیو<sup>۳</sup> مشارکت دارد [۱۷]. ثابت شده است که مولکول پرولین اسیددیه سیتوپلاسم را افزایش می‌دهد و نسبت  $NADP^+/NADPH$  را در جریان متابولیسم حفظ می‌کند. این مولکول همچنین، بعد از رفع دوره تنش تخریب می‌شود و ATP تولید می‌کند که در بازسازی و جبران بخشی از آسیب‌های تنش، سلول از آن استفاده می‌کند [۱۶].

از دیگر تغییرات بیوشیمیایی مهم در گیاهان عالی تحت تنش شوری، افزایش سطح رادیکال‌های آزاد از جمله سوپراکسید ( $O_2^-$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و یون هیدروکسیل ( $OH^-$ ) و تأثیر اکسیداتیو آن‌ها روی سلول‌ها است [۲۳]. عامل اصلی این پدیده اختلال در زنجیره انتقال الکترون ناشی از تأثیر مخرب یون‌های سدیم روی غشای میتوکندری و کلروپلاست‌ها و متعاقب آن جذب الکترون‌ها توسط مولکول اکسیژن در غیاب پذیرنده‌های طبیعی، شناخته شده است [۲]. تأثیر رادیکال‌های آزاد روی پراکسیداسیون چربی‌ها، انعقاد پروتئین‌ها، جهش DNA و اکسیداسیون دیگر مولکول‌های زیستی آشکار شده است [۱۲]. گیاهان نیز طی واکنش‌های تدافعی اقدام به حذف این مولکول‌های مضر به طریق بیوستز متابولیت‌هایی با وزن مولکولی کم نظیر اسکوربات<sup>۴</sup>، آلفا‌توکوفرول<sup>۵</sup>، گلوکاتایون<sup>۶</sup>، کارتنوئیدها و ... (واکنش‌های آنتی‌اکسیداتیو غیرآنزیمی) و آنزیم‌های متعلق به گروه اکسیدوردوکتازها<sup>۷</sup> نظیر کاتالاز<sup>۸</sup>، پراکسیداز<sup>۹</sup>، اسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز<sup>۱۰</sup> و ... (واکنش‌های آنتی‌اکسیداتیو

3. Oxidative
4. Ascorbate
5.  $\alpha$ -tocopherol
6. Glutathione
7. Oxidoreductase
8. Catalase
9. Peroxidase
10. Superoxid-dismutase

1. Osmolyte
2. Osmoprotector

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. تهیه مواد گیاهی و شرایط آزمایش

در این تحقیق ابتدا ۴۷ ژنوتیپ بادام بالغ و سالم رشدیافته در عرصه‌های شور استان آذربایجان شرقی (با هدایت الکتریکی بیش از چهار دسی‌زیمنس بر متر در خاک عمق ریشه‌های جاذب) در طول فصل زراعی سال ۱۳۸۹ شناسایی و علامت‌گذاری شدند. از این تعداد درخت بادام حدود ۶۰۰ عدد بذر تشکیل یافته در شرایط گرده‌افشانی آزاد جمع‌آوری و همگی در مهر ماه همان سال در خزانه ایستگاه تحقیقات باغبانی سهند کشت شدند. در سال بعد، ۱۲۰ دانغال رشدیافته از میان آن‌ها براساس یکنواختی در برخی صفات مورفولوژیکی از جمله قطر، ارتفاع و طول میانگره انتخاب و پس از سرزنی، از بالای جوانه سوم، و آرایش یکسان ریشه‌ها داخل گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۲۵ و عمق ۳۰ سانتی‌متر بازکشت شدند. بستر استفاده‌شده برای دانغال‌های آزمایشی خاک همگن‌شده و شاخص منطقه بودند (جدول ۱).

تیمارهای آزمایشی شامل صفر مقدار (شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌مول بر لیتر نمک کلرید سدیم خالص بود که به دنبال ظهور ۲۰ - ۱۵ برگ به تدریج همراه با آب آبیاری به بستر دانغال‌ها اضافه شد. هشت هفته پس از تأثیر شوری در فصل زراعی سال ۱۳۹۱، یادداشت‌برداری از صفات شروع شد و طی این مدت رطوبت بستر در محدوده ۸۰ درصد ظرفیت زراعی ثابت نگه داشته شد.

آنزیمی) می‌کنند [۵]. از این میان آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با اینکه همگی از بین‌برنده پراکسید هیدروژن محسوب می‌شوند، ولی هر کدام حوزه فعالیت جداگانه‌ای در داخل سلول دارند [۳۲]. اختلاف سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان علاوه بر گونه‌های مختلف گیاهان حتی بین اندام‌های یک گیاه نیز آشکار شده است [۵]. از آنجا که این رخداد وضعیت عمومی گیاه در شرایط تنش را از طریق حذف رادیکال‌های آزاد بهبود می‌بخشد، می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی تحمل ژنوتیپ‌ها استفاده شود [۲۶]. بررسی منابع علمی مرتبط نشان می‌دهند به‌رغم مطالعه بیشتر صفات اکوفیزیولوژیکی بادام در شرایط شور، تاکنون، تحقیقی درباره فعالیت آنتی‌کسیداتیو آنزیمی این گیاه انجام نشده است. بنابراین، در این تحقیق مقرر شد ابتدا علائم سوختگی برگ ناشی از انباشت یون‌های سدیم و کلر به‌عنوان شاخص مورفولوژیکی اولیه برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل ارزیابی شود و در ادامه با تعیین دامنه تغییرات فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ارتباط هر کدام از آن‌ها با محتوای اسیدآمینة پرولین در ژنوتیپ‌های انتخابی، ضمن کسب اطلاعات جدید، امکان دستیابی به روشی مطمئن و کارآمد برای گزینش نهایی ژنوتیپ‌های امیدبخش متحمل به شوری فراهم شود.

جدول ۱. برخی خصوصیات مهم فیزیکی و شیمیایی خاک آزمایشی

هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)	اسیدیته فعال	مواد خنثی‌شونده (درصد)	کربن آلی (درصد)	نسبت جذب سدیم	ازت (درصد)	فسفر (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	پتاسیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	شن (درصد)	سیلت (درصد)	رس (درصد)
۲/۹	۷/۷۲	۳/۲۵	۰/۹۷	۱/۷	۰/۰۸	۷۵	۶۶۳	۸۰	۸	۱۲

حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت، با ۴ میلی‌لیتر تولوئن<sup>۶</sup> ترکیب شد تا به دو رنگ، ارغوانی در بالا و زرد در پایین، درآید [۶]. پرولین در فاز فوقانی قرار می‌گیرد که با سمپلر به‌طور برابر از هر محلول جدا و تفکیک شد و محتوای آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-1601 ساخت شرکت شیمادزو<sup>۷</sup> ژاپن) با تنظیم روی طیف جذبی ۵۲۰ نانومتر در حضور محلول‌های استاندارد تعیین شد.

### ۵.۲. تعیین محتوای پروتئین کل برگ

برای تعیین محتوای پروتئین کل برگ ترکیبی از نمک‌های  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  و  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  با غلظت ۵۰ میلی‌مول بر لیتر از هر کدام و اتیلن دی‌آمید تترا استیک اسید<sup>۸</sup> با غلظت ۲ میلی‌مول بر لیتر تهیه شد (pH=7). به این ترکیب مواد تریتون ایکس - ۱۰۰<sup>۹</sup> با غلظت ۰/۱ درصد و پی‌وی پی - ۴۰<sup>۱۰</sup> با غلظت ۱ درصد برای حذف استرها و مولکول‌های سنگین نیز اضافه شد [۸]. در ادامه ۰/۱ گرم از نمونه برگ با ۱ میلی‌لیتر از این بافر به‌طور کامل مخلوط و با سانتریفیوژ یخچالدار با ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه به دو بخش تفکیک شد. محلول شفاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها و تعیین مقدار کل پروتئین‌های نمونه گیاهی استفاده شد. بدین منظور ابتدا نسبت به تهیه محلول بردفورد<sup>۱۱</sup> [۷] به‌عنوان شاهد و محلول‌های پروتئین استاندارد تهیه‌شده از آلبومین گاوی (BSA) اقدام شد و در ادامه منحنی استاندارد پروتئین با استفاده از داده‌های اسپکتروفتومتر (V-530 ساخت شرکت جاسکو<sup>۱۲</sup> ژاپن) در طول موج جذبی ۵۹۵

### ۲.۲. تعیین گیاهان نشان‌دهنده علائم سوختگی برگ

برآورد این شاخص به‌صورت شمارش دانه‌های مبتلا به سوختگی حاشیه‌ای برگ و تعیین درصد آن‌ها اجرا شد.

### ۳.۲. تعیین مقادیر سدیم و کلر برگ

نمونه‌های تهیه‌شده از برگ‌های میانی هر دانه‌های پس از دوبار شست و شو با آب مقطر به مدت ۴۸ ساعت در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادند. به ۰/۳ گرم از هر نمونه پودری، ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط اسید سالیسیلیک<sup>۱</sup> (۷/۲ میلی‌لیتر)، با اسید سولفوریک (۱۰۰ میلی‌لیتر) اضافه و پس از طی مراحل حرارت‌دهی، افزودن آب اکسیژنه و حرارت‌دهی مجدد عصاره مورد نظر حاصل و مقدار سدیم آن با استفاده از دستگاه فلایم فتومتر، (Corning-410 ساخت شرکت شرود<sup>۲</sup> انگلستان)، تعیین شد. برای تعیین محتوای کلر نمونه‌ها نیز ابتدا به ۰/۵ گرم از هر نمونه ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از نیم ساعت هم زدن مقدار کلر عصاره صاف‌شده با دستگاه کلریدمتر (Jenway-pcm3 ساخت شرکت کیسون<sup>۳</sup> انگلستان) تعیین شد.

### ۴.۲. تعیین محتوای پرولین آزاد برگ

۰/۵ گرم نمونه برگی تهیه‌شده از قسمت میانی هر دانه‌های پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد، به مدت ۵ دقیقه ساینده شد و در نهایت، ۲ میلی‌لیتر محلول صاف‌شده از آن استخراج شد. به این محلول ۲ میلی‌لیتر از ترکیب نین هیدرین<sup>۴</sup>، اسید استیک گلاسیال و اسید فسفریک و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال<sup>۵</sup> اضافه شد (حجم کل ۶ میلی‌لیتر) محلول حاصل پس از دریافت

6. Toluene  
7. Shimadzu  
8. EDTA  
9. Triton-X100  
10. PVP-40  
11. Bradford  
12. Jasco

1. Salicylic acid  
2. Sherwood  
3. Keison  
4. Ninhydrine  
5. Glacial

### ۳. نتایج و بحث

در این آزمایش برای بستر دانهالها از خاک شاخص منطقه استفاده شد (جدول ۱). دلیل این کار تأمین شرایط طبیعی برای دانهالها و اخذ نتایج کاربردی از آزمایش بود. مشاهدات قبلی مبنی بر تفاوت مورفولوژیک ریشه‌های بادام رشدیافته در بسترهای مصنوعی نظیر پرلایت<sup>۳</sup> با ریشه بادام رشدیافته در خاک، احتمال وجود تفاوت بین نتایج به‌دست آمده از آنها را تقویت کرد [۲۹]. بیشتر نیز استفاده از بستر خاک در آزمایش‌های شوری مورد توجه بود [۳]، ۱۰، ۲۸، ۳۰. مقایسه میانگین‌های سطوح نمک اضافه‌شده به این خاک نشان داد که محتوای سدیم و کلر دانهال‌های بادام به موازات افزایش مقدار نمک با الگوی مشابه و معنی‌دار افزایش می‌یابد (جدول ۲).

یکی از تأثیرات بارز مورفولوژیکی تجمع یون‌های سدیم و کلر در برگ دانهال‌های بادام، بروز علائم سوختگی حاشیه‌ای در برگ‌ها بود (شکل ۱).

در این تحقیق پس از مقایسه نتایج تجزیه برگ با تغییرات مورفولوژیکی رخ داده در تک تک دانهال‌های بادام، انباشت سدیم به میزان ۱۱ - ۹ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک به‌عنوان متوسط آستانه ظهور علائم سوختگی حاشیه‌ای تعیین شد. هرچند اطلاعات درباره سهم تأثیر یون‌های کلر در بروز این پدیده و یا دیگر پاسخ‌های محیطی گیاهان به اندازه سدیم نیست، گزارش‌هایی مبنی بر آثار سمی این عنصر در درختان میوه در صورت تولید نسبت افراطی  $Cl^-$  در دست است [۱۵] افزایش معنی‌دار مقدار کلر و همبستگی قوی آن با محتوای پرولین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نشان می‌دهد که این یون به سهم خود مشارکت بالایی در نوع واکنش بادام به شوری دارد (جدول ۲). با وجود این، شیب کم خط

نانومتر ترسیم و محتوای پروتئین هر نمونه در حضور آن سنجیده شد.

### ۶.۲. سنجش فعالیت آنزیم‌ها

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, E.C. 1.11.1.6) ۳ میلی‌لیتر بافر سنجش با ۴/۵۱ میکرولیتر  $H_2O_2$  (۳۰ درصد) ترکیب و طول موج جذبی آن با اسپکتروفتومتر پس از تنظیم روی ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. در ادامه به ترکیب فوق ۵۰ میکرولیتر از عصاره نمونه گیاهی تهیه‌شده با بافر این آنزیم اضافه و طول موج جذبی هر کدام بعد از گذشت ۶۰ ثانیه مجدد قرائت شد [۱]. روش کار در مورد آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, E.C. 1.11.1.11) مشابه آنزیم کاتالاز است با این تفاوت که به ترکیب بافر ۱۰۰ میکرولیتر، محلول ۵ میلی‌مول آسکوربات اضافه شد. طول موج جذبی اسپکتروفتومتر برای این آنزیم ۲۹۰ نانومتر و زمان قرائت ۳۰ ثانیه بعد بود [۲۵]. در مورد آنزیم پراکسیداز (POD, E.C. 1.11.1.7) نیز تفاوت عمل افزودن ۳/۳۵ میکرولیتر ماده گویاکول<sup>۱</sup> به ترکیب بافر و قرائت اسپکتروفتومتر در طول موج جذبی ۴۷۰ نانومتر بعد از گذشت ۱۲۰ ثانیه بود [۸].

### ۷.۲. روش آماری استفاده‌شده

در این آزمایش طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار سطح تیمار نمک کلرید سدیم در سه تکرار و اختصاص ۱۰ گلدان (ژنوتیپ) برای هر کرت استفاده شد. همچنین، برای تجزیه داده‌ها و ترسیم تصاویر گرافیکی به ترتیب از نرم‌افزارهای SPSS و EXCEL و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن<sup>۲</sup> در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

3. Perlite

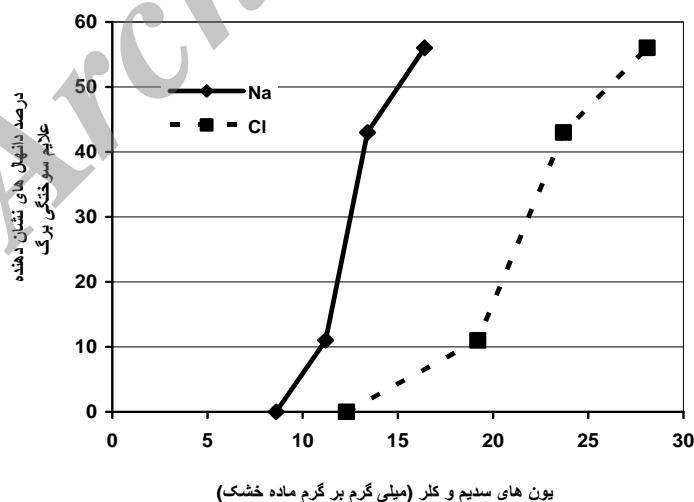
1. Guacol  
2. Duncan's Multiple Range Test

رگزیون کلر نسبت به سدیم (ضریب  $\beta$ ) در افزایش محتوای پرولین (شکل ۲) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (شکل‌های ۵، ۶) به نوعی تداعی‌کننده نقش کمتر آن حداقل در سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول نمک است.

جدول ۲. مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های انتخابی بادام تحت تنش شوری

صفات اندازه‌گیری شده				
سطوح نمک کلرید سدیم (میلی‌مول بر لیتر)				
صفر	۲۵	۵۰	۷۵	
مقدار سدیم (میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)	۸/۶±۰/۴۱a <sup>†</sup>	۱۱/۲±۰/۸۹ab	۱۳/۴±۱/۰۱b	۱۶/۴±۱/۱۲c
مقدار کلر (میلی‌گرم بر گرم ماده خشک)	۱۲/۳±۱/۵۳a <sup>††</sup>	۱۹/۲±۱/۲۱b	۲۳/۷±۱/۲۵c	۲۸/۱±۱/۸۵c
محتوای پرولین آزاد (میکرومول بر گرم ماده تر)	۳۷/۷±۱/۳۲a	۵۹/۵±۲/۵۷b	۸۱/۶±۱/۹۱c	۱۱۷/۹±۳/۱۰d
فعالیت آسکوربات پراکسیداز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۰/۰۱۶۸±۰/۰۰۳۳a	۰/۰۲۲۵±۰/۰۰۴۳a	۰/۰۳۵۹±۰/۰۰۶۸ab	۰/۰۵۱۴±۰/۰۰۸۶b
فعالیت کاتالاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۰/۰۰۰۸±۰/۰۰۰۰۳a	۰/۰۰۰۹±۰/۰۰۰۱۲a	۰/۰۰۱۸±۰/۰۰۰۸۵a	۰/۰۰۳۸±۰/۰۰۰۳۷b
فعالیت پراکسیداز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۰/۰۰۰۳۰±۰/۰۰۰۰۲a	۰/۰۰۳۹۷±۰/۰۰۰۹۰b	۰/۰۰۴۹۶±۰/۰۰۱۰۱b	۰/۰۰۴۷۷±۰/۰۰۰۷۴b

<sup>†</sup> میانگین‌های مشخص شده با حروف مشابه در هر ردیف اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد ندارند. <sup>††</sup> هر میانگین با اشتباه استاندارد محاسبه شده ارائه شده است.



شکل ۱. درصد دانه‌های بادام نشان‌دهنده علائم سوختگی حاشیه برگ‌ها به موازات انباشت یون‌های سدیم و کلر

افزایش محتوای اسیدآمینۀ پرولین آزاد ظاهر شد. براساس نتایج به دست آمده، میانگین محتوای این متابولیت از ۳۷/۷ میکرومول در دانهال‌های شاهد به ۱۱۷/۹ میکرومول در دانهال‌های تحت شوری ۷۵ میلی‌مول به‌طور معنی‌دار افزایش یافت (جدول ۲).

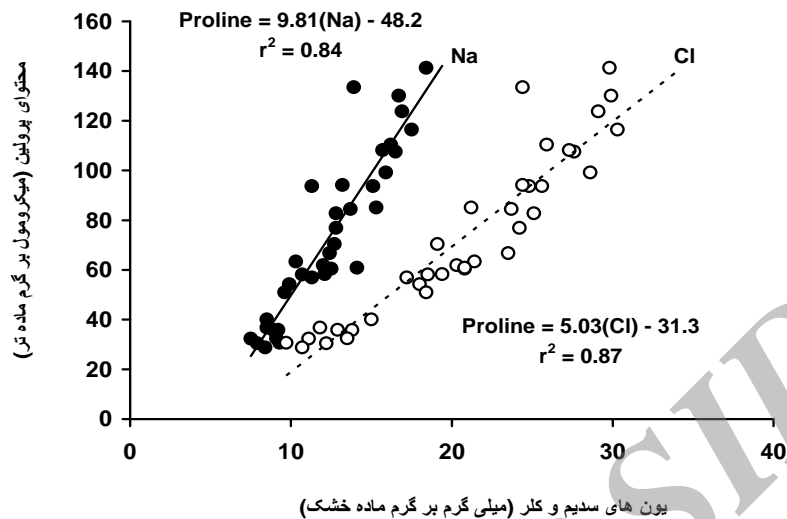
برخلاف نظر بعضی محققان که افزایش محتوای این اسیدآمینۀ در شرایط تنش را فقط یک واکنش ساده محیطی از سوی گیاه تلقی می‌کنند و ارزش چندانی برای آن قایل نیستند [۱۱، ۲۲]، به نظر می‌رسد پرولین در بادام نقش مؤثری در کاهش آثار اسمزی و سمی شوری ایفا می‌کند. همبستگی قوی میان میزان اجزای نمک با محتوای پرولین دانهال‌های انتخابی دلیل آماری این مدعاست (شکل ۲). از نظر فیزیولوژیکی نیز می‌توان چنین استدلال کرد که با افزایش محتوای پرولین دانهال‌ها، دشواری جذب آب تا حدودی تعدیل و محتوای نسبی آب برگ‌ها با نقصان کمتری مواجه می‌شود و در نتیجه ظهور علائم سوختگی حاشیۀ برگ‌ها با شدت کم و تأخیر زیاد رخ می‌دهد. اخیراً، نیز معلوم شده است که پرولین علاوه بر ایفای نقش مؤثر در فرآیند آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی، به‌عنوان محرکی برای فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز عمل می‌کند [۱۷]. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و محتوای پرولین احتمالاً بر وقوع همین فرآیند در بادام دلالت دارد (شکل ۳).

اخذ نتیجۀ مشابه در مورد آنزیم کاتالاز هرچند تصور وقوع رویداد مشابهی را تقویت کرد (شکل ۴)، نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. نتایج به دست آمده هرچند بر فقدان همبستگی معنی‌دار بین محتوای پرولین و فعالیت آنزیم پراکسیداز دلالت دارند، ولی در مجموع با تأیید سودمندی این متابولیت، نشان دادند که از تغییرات محتوای آن در برگ بادام می‌توان به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی تحمل به شوری استفاده کرد.

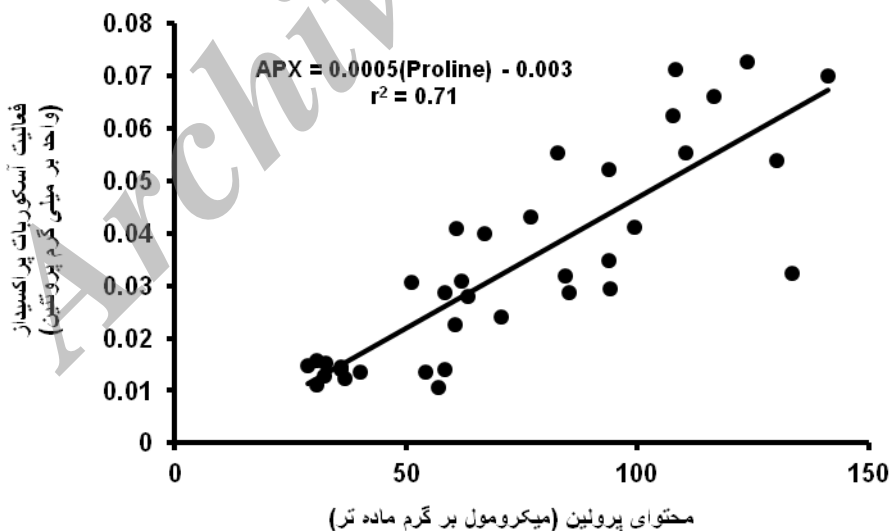
در این تحقیق پس از مقایسۀ نتایج تجزیۀ برگ با تغییرات مورفولوژیکی رخداده در تک تک دانهال‌های بادام، انباشت سدیم به میزان ۱۱ - ۹ میلی‌گرم بر گرم مادۀ خشک به‌عنوان متوسط آستانۀ ظهور علائم سوختگی حاشیۀ‌ای تعیین شد. هرچند اطلاعات درباره‌ی سهم تأثیر یون‌های کلر در بروز این پدیده و یا دیگر پاسخ‌های محیطی گیاهان به اندازه‌ی سدیم نیست، گزارش‌هایی مبنی بر آثار سمی این عنصر در درختان میوه در صورت تولید نسبت افراطی  $Cl^-/NO_3^-$  در دست است [۱۵] افزایش معنی‌دار مقدار کلر و همبستگی قوی آن با محتوای پرولین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نشان می‌دهد که این یون به سهم خود مشارکت بالایی در نوع واکنش بادام به شوری دارد (جدول ۲). با وجود این، شیب کم خط رگرسیون کلر نسبت به سدیم (ضریب  $\beta$ ) در افزایش محتوای پرولین (شکل ۲) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (شکل‌های ۵، ۶) به نوعی تداعی‌کننده‌ی نقش کمتر آن حداقل در سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول نمک است.

تعیین غلظت سدیم و کلر در برگ دانهال‌های آزمایشی علاوه بر تعیین آستانۀ ظهور علائم سوختگی حاشیۀ برگ‌ها، توانایی نسبی آن‌ها در ممانعت از ورود نمک به داخل گیاه را نیز آشکار کرد. براساس این یافته‌ها ۹ دانهال از مجموع ۳۰ دانهال اختصاص یافته برای هر تیمار (در کل ۳۶ دانهال) با کمترین مقدار یون‌های سدیم و کلر و علائم سوختگی برگی نسبت به بقیه با در نظر گرفتن امکانات آزمایشگاهی گزینش و تحت بررسی‌های بیوشیمیایی قرار گرفتند.

پیشتر معلوم شده بود که اغلب گلیکوفیت‌ها در مراحل مقدماتی مواجهه با تنش شوری، شروع به تغییر مسیر متابولیزم در سلول‌های ریشه کرده و از این طریق برخی متابولیت‌های سازگار را برای تنظیم پتانسیل اسمزی سلول‌های خود سنتز می‌کنند [۲۱]. رخداد اخیر در بادام با



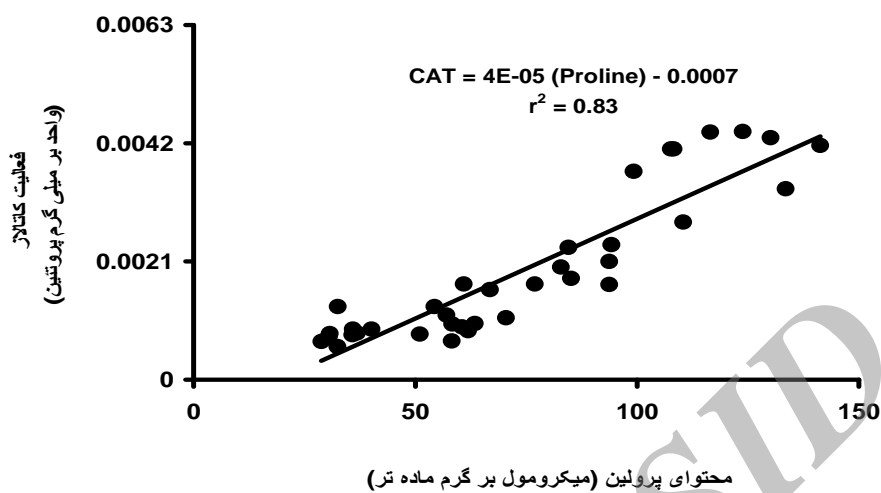
شکل ۲. روابط رگرسیونی بین محتوای پرولین و انباشت یون‌های سدیم و کلر در برگ دانه‌های بادام



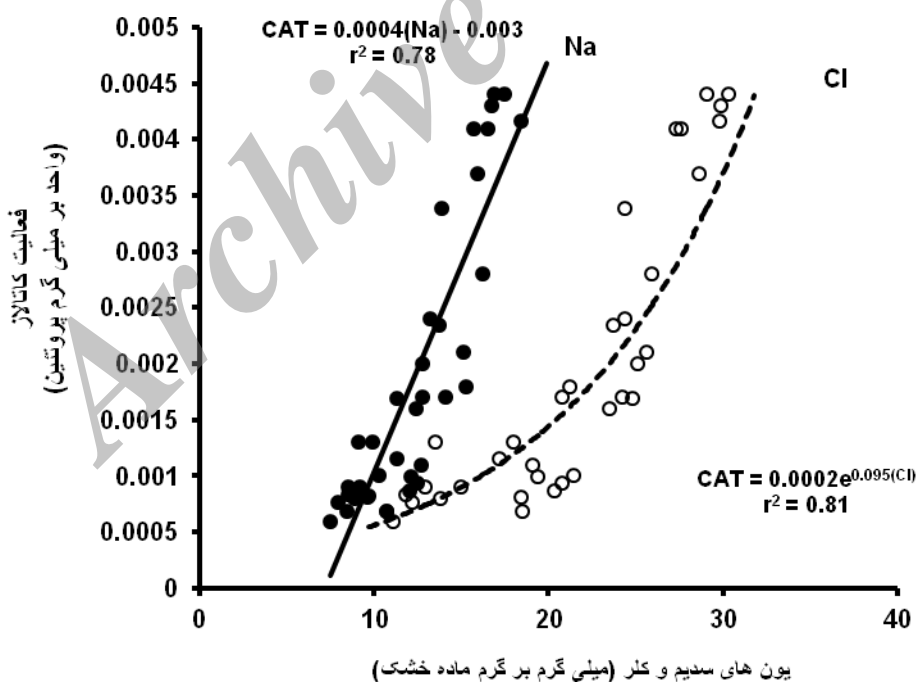
شکل ۳. رابطه رگرسیونی بین محتوای پرولین و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ دانه‌های بادام تحت تنش شوری



تأثیر سطوح مختلف شوری روی برخی تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بادام (*Prunus dulcis Mill.*)



شکل ۴. رابطه رگرسیونی بین محتوای پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ دانه‌های بادام تحت تنش شوری



شکل ۵. روابط رگرسیونی بین فعالیت آنزیم کاتالاز و انباشت یون‌های سدیم و کلر در برگ دانه‌های بادام

متفاوت بود. میانگین فعالیت این آنزیم تا سطح شوری ۵۰ میلی‌مول افزایشی، ولی در شوری فراتر روند کاهش داشت. هرچند نمک کلرید سدیم در کمترین سطح به‌کاررفته نیز تأثیر معنی‌دار روی افزایش فعالیت پراکسیداز دارد، ولی این افزایش بین سطوح دیگر نمک معنی‌دار نیست (جدول ۲). رخداد اخیر، باعث پیچیدگی رابطه و غیرمعنی‌دار شدن همبستگی بین غلظت یون‌های سدیم و کلر با میزان فعالیت این آنزیم شد. به‌رغم این نتیجه، الگوی تغییرات میانگین فعالیت پراکسیداز در دانه‌های بادام تحت شوری فزاینده با تحمل و درصد زنده‌مانی آن‌ها در طول یک فصل کامل زراعی مطابقت بیشتری دارد. به نظر می‌رسد حداکثر تحمل به نمک دانه‌های بادام در طول یک فصل زراعی بیش از ۵۰ میلی‌مول نباشد، زیرا در شوری ۷۵ میلی‌مول تقریباً همه دانه‌های آزمایشی تا پایان فصل دچار سوختگی کامل برگ و نهایتاً مرگ شدند. نتیجه به‌دست‌آمده مبنی بر کاهش فعالیت پراکسیداز در این سطح از شوری می‌تواند با تشدید اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی و توقف تدریجی متابولیسم در ارتباط باشد. همچنین، پیشتر نتیجه‌ای مشابه در گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) گزارش شده بود [۱۸].

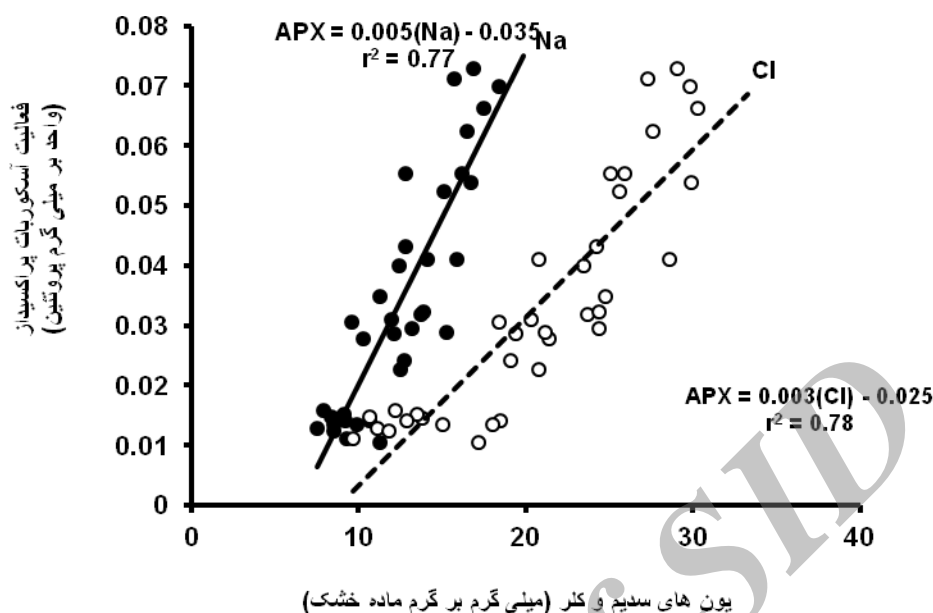
اختلاف بین میانگین‌های فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز در دانه‌های بادام تحت تنش شوری همانند آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز معنی‌دار بود، ولی برخلاف آن‌ها روند افزایشی منظم‌تری نسبت به شاهد داشت (جدول ۲). این یافته به‌رغم مطابقت با نتایج به‌دست‌آمده در پسته [۳۳] با نتیجه گزارش شده در نخود همخوانی نداشت [۱۴]. همچنین، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین غلظت یون‌های سدیم و کلر برگ با فعالیت اسکوربات پراکسیداز به‌دست آمد (شکل ۶).

حذف رادیکال‌های آزاد از دیگر واکنش‌های طبیعی گیاهان در شرایط تنش‌های اکسیداتیو است که در این تحقیق با تعیین میزان فعالیت ۳ آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده در مورد کاتالاز نشان داد که فعالیت این آنزیم به موازات تجمع یون‌های سدیم و کلر در برگ به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد؛ ولی الگوی افزایش فعالیت آن در ارتباط با انباشت یون‌های مذکور اندکی متفاوت است (شکل ۵). حذف رادیکال‌های آزاد از دیگر واکنش‌های طبیعی گیاهان در شرایط تنش‌های اکسیداتیو است که در این تحقیق با تعیین میزان فعالیت ۳ آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده در مورد کاتالاز نشان داد که فعالیت این آنزیم به موازات تجمع یون‌های سدیم و کلر در برگ به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد؛ ولی الگوی افزایش فعالیت آن در ارتباط با انباشت یون‌های مذکور اندکی متفاوت است (شکل ۵).

این نتیجه با گزارش‌های ارائه‌شده در پسته [۳۳] و آلبالو [۹] مطابقت دارد، ولی با نتایج به‌دست‌آمده در توت همخوانی ندارد [۱۷]. به نظر می‌رسد الگوی فعالیت این آنزیم در دانه‌های بادام تأثیر چشمگیری در حذف پراکسید هیدروژن و بهبود وضعیت آن‌ها در شرایط شور نداشته باشد، زیرا براساس نتایج به‌دست‌آمده، بین میانگین‌های فعالیت کاتالاز در سطوح صفر (شاهد)، ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول نمک اختلاف معنی‌دار وجود ندارد (جدول ۲) و افزایش معنی‌دار فعالیت آن در سطح ۷۵ میلی‌مول نمک به دلیل سمیت بالای یون‌های کلر و سدیم و آسیب‌دیدگی شدید دانه‌های بادام در این سطح، فاقد تأثیرگذاری و برآورد انتظار لازم است.

نتیجه به‌دست‌آمده در مورد آنزیم پراکسیداز تا حدی

تأثیر سطوح مختلف شوری روی برخی تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بادام (*Prunus dulcis Mill.*)



شکل ۶. روابط رگرسیونی بین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و انباشت یون‌های سدیم و کلر در برگ دانه‌های بادام

که سابقه تحقیق روی فعالیت آنتی‌اکسیداتیو آنزیمی در درختان میوه به‌ویژه هسته‌دارها در شرایط شور بسیار کمتر از حد تصور است و این موضوع ضمن سلب امکان تطبیق نتایج اخذشده با یافته‌های محققان دیگر، ضرورت احتیاط در تفسیر نتایج را ایجاد می‌کند. هرچند در این تحقیق تعیین آستانه انباشت یون‌های سدیم و کلر برای ظهور پدیده سوختگی حاشیه برگ‌ها، افزایش محتوای پروتئین آزاد و سطح فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و در نهایت، وجود روابط قوی بین بعضی از این رخدادها امیدواری برای استفاده از این شاخصه‌ها به‌عنوان روشی مؤثر برای دستیابی به ژنوتیپ‌هایی حداقل با تحمل محدوده ۲۵ میلی‌مول بر لیتر کلرید سدیم (تقریباً معادل ۵/۵ دسی‌زیمنس بر متر) از داخل جمعیت تحت مطالعه را تقویت کرد، این نکته را نیز نشان داد که سطح تحمل ژنوتیپ‌های آزمایشی بادام چندان بالا نیست. بر این مبنا صحیح‌تر این خواهد بود که در قضاوت کلی راجع به سطح تحمل شوری در یک ژنوتیپ بادام، پاسخ آنتی

الگوی افزایش میانگین‌های فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد بی‌شبهت به نتیجه به‌دست‌آمده برای آنزیم کاتالاز نیست؛ زیرا اختلاف بین میانگین‌های فعالیت هر ۲ آنزیم در دانه‌های شاهد و دانه‌های تحت ۲۵ و ۵۰ میلی‌مول نمک معنی‌دار نبود (جدول ۲). به عبارت دیگر با افزایش شدت تنش افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های اسکوربات پراکسیداز و کاتالاز رخ نمی‌دهد و این نتیجه ثمربخشی اسکوربات پراکسیداز را همانند کاتالاز در حذف پراکسید هیدروژن و در نهایت، کاهش چشمگیر تأثیرات منفی تنش با تردید مواجه می‌کند.

با توجه به مجموع نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد به‌رغم فعالیت قابل توجه مکانیزم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی در بادام در مواجهه با تنش شوری و کاهش بخشی از آثار منفی نمک از این طریق، هنوز نسبت به کارایی مطلوب این مکانیزم اطمینان کافی وجود ندارد. این تردید با مشاهده الگوی افزایش فعالیت آنزیم‌های اسکوربات پراکسیداز و کاتالاز حاصل شد (جدول ۲). باید متذکر شد

- Ashraf M and Harri s PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 166: 3-16.
- Bates LS, Waldren RP and Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205-207.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Chance B and Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidase. In: Colowick and SP and Kaplan NO (Eds.), *Methods in Enzymology*. New York Academic Press, pp. 764-775.
- Chatzissavvidis C, Veneti G and Papadakis I (2008) Effect of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on the antioxidant mechanism of leaves and stem of the rootstock CAB-6P (*Prunus cerasus* L.) under in vitro conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 95: 37-45.
- Chen S, Li J, Wang S, Huttermann A and Altman A (2001) Salt, nutrient uptake and transport, and ABA of *Populus euphratica*; a hybrid in response to increasing soil NaCl. *Trees Structure and Function*. 15: 186-194.
- De Lacerda CF, Cambraia J and Oliva MA (2003) Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. 49: 107-120.

اکسیداتیو با در نظر گرفتن سایر پاسخ‌های محیطی آن ژنوتیپ ارزیابی و تفسیر شود.

### پیشنهادها

به منظور کسب اطلاعات بیشتر درباره رفتار بیوشیمیایی بادام در شرایط تنش شوری، پیشنهاد می‌شود بررسی‌های جامعی در مورد بیوستنز سایر متابولیت‌های سازگار و فعالیت آنزیم‌های دیگری از گروه اکسیدوردوکتنازها در برگ و سایر اندام‌های گیاهی از جمله ریشه انجام شود. همچنین، با توجه به حساسیت بالای گونه بادام زراعی (*Prunus dulcis* Mill.) به شوری توصیه می‌شود در آزمایش‌های آبی فواصل تیمارهای شوری حداکثر ۱۰ میلی‌مول بر لیتر انتخاب شود تا بدین ترتیب امکان‌پذیرش دامنه وسیعی از ژنوتیپ‌ها فراهم شود.

### منابع

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. In: Colowick and SP and Kaplan NO (Eds.), *Methods in Enzymology*. New York Academic Press, pp. 121-126.
- Alscher RG, Erturk N and Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plant. *Journal of Experimental Botany*. 153: 1331-1341.
- Aragues R, Puy J, Royo A and Espada JL (2005) Three-year field response of young olive trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) to salinity: Trunk growth and leaf ion accumulation. *Plant and Soil*. 271: 265-273.
- 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.

12. Del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM and Barroso JB (2003) Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 55: 71-81.
13. Erturk U, Sivritepe N, Yerlikaya C, Bor M, Ozdemir F and Turkan I (2007) Response of the cherry rootstock to salinity in vitro. Biologia Plantarum. 51: 597-600.
14. Gomez JM, Jimenez A, Olmos E and Sevilla F (2004) Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide-dismutase and ascorbate-peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. Journal of Experimental Botany. 55 (394): 119-130.
15. Grattan SR and Grieger CM (1999) Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. Scientia Horticulturae. 78: 127-157.
16. Hare PD, Cress WA and Staden JV (1998) Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. Plant, Cell & Environment. 21: 535-553.
17. Harinasut P, Poonsopa D, Roengmongkol K and Charoensataporn R (2003) Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivars. ScienceAsia. 29: 109-113.
18. Hosseini T, Shekari F and Ghorbanli M (2010) Effect of salt stress on ion content, proline and oxidative enzymes of two safflower cultivars (*Carthamus tinctorius* L.) Journal of Food Agriculture and Environment. 8(2): 1080-1086.
19. Karakas B, Bianco RL and Rieger M (2000) Association of marginal leaf scorch with sodium accumulation in salt-stressed peach. HortScience. 35(1): 83-84.
20. Kavikishore PB, Sangam S and Amurtha RN (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Current Science. 88: 424-438.
21. Lauchli A (1984) Salt exclusion, an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. John Wiley Publishing, New York, 187 p.
22. Lutts S, Majerus V and Kinet JM (1999) NaCl effects of on proline metabolism in rice seedlings. Physiologia Plantarum, 105: 450-458.
23. Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7: 405-415.
24. Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. Plant, Cell & Environment. 25: 239-250.
25. Nakano Y and Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. 22: 867-880.
26. Ozturk L and Demir Y (2002) In Vivo and in vitro protective role of proline. Plant Growth Regulators. 38: 259-264.
27. Rahmani A, Daneshvar HA and Sardabi H (2003) Effect of salinity on growth of two wild almond species and two genotypes of the cultivated almond species. Iranian Journal of Forest and Poplar Research. 11(1): 1-8.
28. Rahman S, Vance GF and Munns LC (1993)

- Salinity induced effects on the nutrient status of soil, corn leaves and kernels. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 24: 2251-2269.
29. Rahnemoun H, Gasimov NA and Shekari F (2011) Primary testing of the resistance of almond genotypes to salinity. Baku State University News (Series of Natural Science). 1: 100-106.
30. Sharpley AN, Meisinger JJ, Power JF and Suarez DL (1992) Root extraction of nutrients associated with long-term soil management. Springer Verlag, Berlin, 217 p.
31. Shibli RA, Shatnawi MA and Swaidat IQ (2003) Growth, osmotic adjustment and nutrient acquisition of bitter almond under induced sodium chloride salinity in vitro. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 34: 13 (Abst.).
32. Smirnov N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologist. 125: 27-58.
33. Tavallali V, Rahemi M, Eshghi S, Kholdebarin B and Ramezani A (2010) Zinc alleviates salt stress and increase antioxidant enzyme activity in the leaves of pistachio (*Pistacia vera* L. 'Badami') seedlings. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 34: 349-359.