

بهبود تحمل تنش شوری در نارنج سه برگ (*Poncirus trifoliata* L.) با استفاده از

قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار^۱

Enhancing Salinity Stress Tolerance in *Poncirus trifoliata* L. Using Arbuscular Mycorrhizal Fungi

مرضیه هادیان دلجو و محمود اثنی‌عشری^{۲*}

چکیده

مرکبات جز گیاهان حساس به شوری می‌باشند. در پژوهش حاضر واکنش دانهال‌های نارنج سه‌برگ در شرایط تنش شوری و در حضور Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) مورد بررسی قرار گرفت. دانهال‌های ۴۰ روزه نارنج سه‌برگ، ۱۷۵ روز پس از مایه‌زنی با سه گونه AMF در ۵ سطح به‌صورت ترکیبی شامل *Glomus mosseae* + *Glomus intraradices*، *Glomus hoi* + *Glomus intraradices* + *Glomus mosseae* و بدون مایه‌زنی (شاهد)، به‌مدت ۴۵ روز در برابر غلظت‌های صفر (شاهد)، ۳۵ و ۷۰ میلی‌مولار کلرید سدیم قرار گرفتند. میکوریزاسیون به‌ویژه با ترکیب *G. mosseae* + *G. hoi* موجب افزایش محتوای نسبی آب برگ، کلروفیل و اسمولیت‌ها شد. کاهش قابل توجهی در مقدار مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن در برگ‌های دانهال‌های میکوریزی نسبت به دانهال‌های غیرمیکوریزی مشاهده گردید. با افزایش شوری، غلظت سدیم و کلر در برگ به‌طور معنی‌داری افزایش و غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم کاهش یافت. از سوی دیگر، مایه‌زنی با AMF منجر به افزایش معنی‌دار غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم در دانهال‌های میکوریزی گردید. به‌طور کلی، همزیستی AMF توانست از راه افزایش ماده‌های غذایی برگ و کاهش آسیب اکسیداتیو به دانهال‌های نارنج سه‌برگ در برابر شوری کمک موثری نماید.

واژه‌های کلیدی: مایه زنی، مالون دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، آسیب اکسیداتیو.

مقدمه

مرکبات بخشی از محصولات کشاورزی اقتصادی و مهم در بخش‌های شمال و جنوب ایران هستند. ایران با تولید به‌تقریب ۳/۱۵٪ مرکبات جهان جزء ۷ کشور برتر تولیدکننده این محصول در دنیاست. نارنج سه‌برگ، یکی از بهترین پایه‌های مرکبات است و دوره‌های متعدد تجاری از آن تهیه شده که با اهمیت می‌باشند و به عنوان پایه پاکوتاه‌کننده استفاده می‌شود. یکی از مهمترین عوامل محدودکننده کشت مرکبات در نواحی خشک و نیمه‌خشک، شوری می‌باشد که به‌طور پیوسته و آرام در جهان رو به گسترش است. در مقایسه با دیگر محصولات باغی، مرکبات جزء گیاهان خیلی حساس به شوری دسته‌بندی می‌شوند، زیرا سطح‌های به‌نسبت پایین شوری در این گیاهان منجر به ناهنجاری‌های فیزیولوژیکی می‌گردد. نارنج سه‌برگ به یون کلراید موجود در خاک حساس بوده و در واکنش به آن تحریک به تولید اتیلن می‌شود و در مدت زمان کوتاهی با نشان دادن نشانه‌های سمیت، برگ‌ها شروع به ریزش می‌کنند. هم‌چنین در خاک‌های شور، خاک‌های با pH بالا و آهکی رشد مطلوبی نداشته و این مسئله قدرت رشد و مقاومت آن را در برابر سرما کاهش می‌دهد. به‌منظور کاهش شوری خاک و کاستن از اثرهای مخرب آن روی گیاه، روش‌های متعددی پیشنهاد و به کار گرفته شده‌اند، اما عدم کارایی و هزینه‌بر بودن این روش‌ها باعث

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۲

۱- تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۹

۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (m.esnaashari@basu.ac.ir).

از آن جا که قارچ‌های آربوسکولار یکی از انواع کودهای زیستی محسوب می‌شوند و از راه همزیستی با ریشه گیاهان موجب افزایش کارایی جذب عنصرهای غذایی پرمصرف و کم‌مصرف و نیز کاهش اثر تنش‌های زنده و غیرزنده می‌گردند، این پژوهش برآن شد تا تأثیر ۳ گونه قارچ میکوریزا (*G. mosseae*, *G. intraradices* و *G. hoi*) روی نارنج سه‌برگ را در شرایط تنش شوری مورد مطالعه قرار دهد.

۳۴



Fig. 1. Seeds of *Poncirus trifoliata* L. (1), Three seeds in each pot (2), Forty-day-old seedlings (3 and 4), *Poncirus trifoliata* L. seedlings at the end of the experiment (5 and 6).

شکل ۱- بذره‌های نارنج سه برگ (۱)، سه عدد بذر درون هر گلدان (۲)، دانه‌های نارنج سه برگ ۴۰ روزه (۳ و ۴)، دانه‌های نارنج سه برگ در انتهای دوره (۵ و ۶).

گلدان‌های شاهد فقط دارای بستر بالا بدون مایه‌زنی بودند. در مدت انجام آزمایش، گیاهان با ۳۵۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند هفته‌ای یک بار تغذیه شدند (۱۱) و بسته به نیاز که بیشتر از نظر شرایط دمایی بود، به‌طور معمول آبیاری گردیدند، اما برای ترغیب همزیستی در گلدان‌های حاوی قارچ‌های میکوریزی، از محلول هوگلند بدون فسفر استفاده شد. دانه‌ها به مدت ۱۷۵ روز در این شرایط نگهداری و سپس به مدت ۴۵ روز در معرض تنش شوری با استفاده از کلرید سدیم قرار گرفتند. برای جلوگیری از تنش ناگهانی، شوری به‌صورت تدریجی اعمال شد که در انتها غلظت نمک به مقدار مد نظر رسید. گیاهان شاهد نیز تنها با آب مقطر آبیاری شدند. به‌منظور جلوگیری از انباشت نمک در داخل بستر، اجازه داده شد تا زهکشی کامل صورت گیرد. پس از ۴۵ روز از اعمال تیمارهای شوری، ارزیابی‌های مربوطه به عمل آمد. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹.۲ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید. میزان کلونیزاسیون، محتوی نسبی آب و نشت یونی برگ، کلروفیل کل برگ، کربوهیدرات محلول و پروتئین برگ، پراکسید هیدروژن برگ، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا برگ و عنصرهای غذایی برگ مورد بررسی قرار گرفتند.

کلونیزاسیون ریشه

از روش تلاقی خطوط مشبک برای ارزیابی درصد همزیستی قارچ‌ها با ریشه دانه‌ها استفاده شد (۱۹). ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده با تریپان‌بلو به قطعات ۱ تا ۲ سانتیمتری برش داده شدند و به‌طور تصادفی در داخل ظرف پتری پخش شدند. سپس زیر بینوکولار و با کمک کاغذ شطرنجی مقدار همزیستی ریشه برحسب طول ریشه همزیست تعیین شد. تعداد نقاطی از ریشه که با خطوط عمودی و افقی برخورد کرده بودند، شمرده شدند. سپس نقاطی که رنگ آبی پررنگ‌تری داشتند و اندام‌های قارچ را در برمی‌گرفتند نیز شمارش شدند. در پایان از تقسیم این عدد بر کل برخوردها، درصد همزیستی ریشه با قارچ تخمین زده شد. این کار برای همه تیمارهای میکوریز با ۳ تکرار انجام شد.

محتوی نسبی آب و نشت یونی برگ

محتوی نسبی آب و نشت یونی برگ برحسب درصد و طبق فرمول زیر و به‌ترتیب مطابق با روش Kaya و همکاران (۱۲) و Lutts و همکاران (۱۵) اندازه‌گیری شد.

$$\text{محتوی نسبی آب} = \frac{\text{وزن خشک برگ} - \text{وزن تر برگ}}{\text{وزن خشک برگ} - \text{وزن آماس برگ}} \times 100$$

$$\text{هدایت الکتریکی اولیه} = \frac{\text{هدایت الکتریکی ثانویه}}{\text{نشت یونی برگ}} \times 100$$

کلروفیل کل برگ

استخراج و ارزیابی مقدار کلروفیل برگ‌ها در طول موج‌های ۶۶۴ و ۶۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Carry 100, Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, CA, USA) و مطابق با روش Porra (۲۱) انجام شد.

کربوهیدرات محلول و پرولین برگ

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول از روش Paquin و Lechasseur (۱۸) در طول موج ۶۲۵ نانومتر و برای پرولین از روش Bates و همکاران (۴) در طول موج ۵۲۰ نانومتر از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد.

پراکسید هیدروژن برگ

مقدار پراکسید هیدروژن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۹۰ نانومتر بعد از واکنش با یدید پتاسیم و براساس روش Alexieva و همکاران (۳) اندازه‌گیری شد.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشا برگ

پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء براساس غلظت مالون‌دی‌آلدئید تولید شده در اثر آسیب به غشاء و واکنش آن با تیوباربیتوریک‌اسید که کمپلکس رنگی تیوباربیتوریک‌اسید-مالون‌دی‌آلدئید را تشکیل می‌دهد، اندازه‌گیری شد (۶). غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۳۲ نانومتر (A_{532}) تعیین شد. برای حذف اثر ترکیب‌های مزاحم، مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر (A_{600}) خوانده شد و از طول موج ۵۳۲ نانومتر کسر گردید. غلظت کمپلکس تیوباربیتوریک‌اسید-تری‌کلرواستیک‌اسید با استفاده از معادله زیر برحسب میکرومول در گرم وزن تر محاسبه شد.

$$\text{غلظت مالون‌دی‌آلدئید} = \frac{A_{532} - A_{600}}{155} \times 100$$

ضریب خاموشی = ۱۵۵ میلی‌مول در سانتیمتر

عنصرهای غذایی برگ

به منظور اندازه‌گیری مقدار عنصرهای نیتروژن، فسفر، پتاسیم، سدیم، کلسیم و منیزیم در برگ، ابتدا عصاره به روش هضم تر و براساس روش Abdel-Shafy و همکاران (۱) تهیه شد و سپس نیتروژن با روش کج‌لدال، فسفر با کمک نیترووانادوموایدات و به روش رنگ‌سنجی (۱) با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و پتاسیم و سدیم به روش نشر شعله‌ای با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر (مدل ۴۰۵ G ساخت ایران) اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری عنصرهای کلسیم با ICP (GBC Integra XL) و منیزیم با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل Varian ۲۲۰ انجام شد. برای اندازه‌گیری کلر در بافت گیاهی از روش تیتراسیون با استفاده از نیترات نقره ۰/۰۵ نرمال و در حضور شناساگر کرومات پتاسیم ۵٪ استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

کلونیزاسیون ریشه

کلونیزاسیون مایکوریزا در تمام سطح‌های شوری به جز در دانهال‌های بدون قارچ مایکوریزا مشاهده شد و بالاترین مقدار آن مربوط به دانهال‌های مایه‌زنی شده در فقدان شوری بود که اختلاف معنی‌داری با همه تیمارها داشت (جدول ۱)، ضمن این‌که درصد کلونیزاسیون ریشه با افزایش شوری کاهش یافت.

نتیجه‌های به‌دست آمده در این پژوهش، کارایی قارچ‌های مایکوریزا آربوسکولار را در کاهش تنش شوری در نارنج سه‌برگ نشان داد. نتیجه‌های مشابهی برای دیگر گونه‌های گیاهی گزارش شده است (۲۳). این اثربخشی مثبت به‌احتمال به بهبود تغذیه فسفر، جذب آب بیشتر توسط هیف‌های قارچ و افزایش تراکم طول ریشه مرتبط می‌باشد. براساس این نتیجه‌ها می‌توان گفت که گیاهان مایکوریزی نسبت به گیاهان غیرمایه‌زنی شده به مقدار کمتری زیر تاثیر تنش شوری قرار می‌گیرند.

جدول ۱- برهمکنش شوری و همزیستی قارچ بر کلونیزاسیون و ویژگی‌های فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی دانهال‌های نارنج سه‌برگ.

Table 1. Interaction of salinity and mycorrhizal symbiosis on the AMF colonization and physiological and biochemical characteristics of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L.) seedlings.

تیمار Treatment	کلونیزاسیون AMF (%)	محتوی نسبی آب RWC (%)	نشت یونی EC (%)	کلروفیل Chlorophyll (mg g ⁻¹ FW)	قندها Sugars (mg g ⁻¹ FW)	پرولین Proline (μmol g ⁻¹ FW)	پراکسید هیدروژن H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ FW)	مالون دی‌آلدئید MDA (μmol g ⁻¹ FW)
S ₁ G ₁	0 ^h	84.57 ^d	16.02 ^{fgh}	2.05 ^{d-g}	32.25 ^g	0.82 ^f	3.43 ^c	2.35 ^d
S ₁ G ₂	32 ^{bcd}	93.26 ^{ab}	9.44 ⁱ	2.49 ^b	42.58 ^{ef}	1.27 ^e	2.64 ^f	2.3 ^d
S ₁ G ₃	50.33 ^a	94.28 ^a	7.61 ⁱ	2.87 ^a	43.76 ^{ef}	1.48 ^{de}	2.15 ^g	1.7 ^e
S ₁ G ₄	38 ^b	94.11 ^a	15.61 ^{gh}	2.42 ^{bc}	38.51 ^f	0.83 ^f	3.31 ^e	1.86 ^e
S ₁ G ₅	35.33 ^{bc}	94.28 ^a	14.96 ^h	2.32 ^{bcd}	39.21 ^{ef}	1.44 ^{de}	3.21 ^e	2.2 ^d
S ₂ G ₁	0 ^h	84.78 ^d	21.65 ^{bcd}	1.57 ^h	43.97 ^{def}	1.5 ^{de}	5.64 ^c	2.7 ^c
S ₂ G ₂	26 ^{def}	91.38 ^{ab}	19.29 ^{cdef}	2.07 ^{defg}	44.58 ^{de}	1.59 ^d	4.58 ^d	2.7 ^c
S ₂ G ₃	29.66 ^{cde}	86.59 ^{cd}	16.47 ^{efgh}	2.1 ^{defg}	44.75 ^{de}	1.59 ^d	3.59 ^e	2.68 ^c
S ₂ G ₄	29.33 ^{cde}	93.51 ^{ab}	18.67 ^{defg}	2.17 ^{cde}	49.62 ^{cd}	1.56 ^d	4.44 ^d	2.3 ^d
S ₂ G ₅	28.33 ^{cdef}	89.63 ^{abc}	19.78 ^{cde}	2.13 ^{def}	44.57 ^{de}	1.53 ^d	5.36 ^c	2.65 ^c
S ₃ G ₁	0 ^h	75.09 ^e	25.6 ^a	1.5 ^h	44.1 ^{def}	1.53 ^d	7.93 ^a	3.01 ^a
S ₃ G ₂	13.33 ^g	89.35 ^{bcd}	23.66 ^{ab}	2.02 ^{efg}	70.81 ^a	1.86 ^c	6.63 ^b	2.71 ^c
S ₃ G ₃	23 ^{ef}	86.58 ^{cd}	24.66 ^{ab}	1.86 ^{fg}	51.51 ^{bc}	2.62 ^a	6.34 ^b	2.71 ^c
S ₃ G ₄	21.33 ^f	85.84 ^{cd}	23.99 ^{ab}	1.83 ^g	55.17 ^b	1.63 ^d	6.32 ^b	2.91 ^{ab}
S ₃ G ₅	21 ^f	86.27 ^{cd}	22.8 ^{abc}	1.96 ^{efg}	50.6 ^{bc}	2.28 ^b	6.54 ^b	2.76 ^{bc}

† The same letters within each column indicate no significant difference among treatments (P < 0.05).

†† S₁: control, S₂: 35 mmol NaCl, S₃: 70 mmol NaCl.

††† G₁: control, G₂: *G. intraradices* and *G. mosseae*, G₃: *G. mosseae* and *G. hoi*, G₄: *G. hoi* and *G. intraradices*, G₅: *G. hoi* and *G. intraradices* and *G. mosseae*.

+ حرف‌های مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵٪ می‌باشد.

محتوی نسبی آب برگ

تنش شوری موجب کاهش معنی‌دار در محتوی نسبی آب برگ گردید. بیشترین و کمترین محتوی نسبی آب به ترتیب در شوری‌های شاهد، ۳۵ و ۷۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده شد. همچنین کمترین محتوی نسبی آب در دانهال‌های غیرمایکوریزی مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با همه دانهال‌های مایه‌زنی شده نشان داد (جدول ۱). کاهش محتوی نسبی آب برگ همگام با افزایش تنش شوری می‌تواند مربوط به کاهش پتانسیل آب محیط ریشه و کاهش توان گیاه در جذب آب، افزایش مقاومت روزه‌ای و کاهش تعرق باشد. به‌طور کلی، شوری در تمام گیاهان باعث از دست رفتن آب برگ‌ها می‌شود که این امر باعث کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌گردد و در شوری شدیدتر، باعث آسیب به برگ‌ها و ریزش آن‌ها می‌گردد. همزیستی قارچ مایکوریزا، بیشتر منجر به کاهش مقدار پتانسیل آب برگ در طول تنش می‌شود (۲۳). به خوبی مشخص است که همزیستی قارچ می‌تواند وضعیت آبی را در گیاهان میزبان بهبود بخشد که برای رشد گیاه مفید است. در پژوهشی، که Sheng و همکاران (۲۱) روی ریشه‌های ذرت انجام دادند نیز نقش *G. mosseae* را در بهبود محتوی نسبی آب تایید کردند.

نشت یونی برگ

تنش شوری موجب افزایش معنی‌دار نشت یونی برگ گردید. بیشترین و کمترین مقدار نشت یونی به ترتیب در سطح‌های شوری ۷۰، ۳۵ و صفر میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده شد (جدول ۱). افزایش کلونیزاسیون نیز منجر به کاهش معنی‌دار نشت یونی برگ گردید، به‌طوری‌که بیشترین نشت یونی در دانهال‌های غیرمایکوریزی و با بالاترین سطح شوری مشاهده شد. اگرچه نشت یونی برگ با افزایش تنش شوری بالا رفت، اما این روند در دانهال‌های مایکوریزی شده کمتر بود. نشت یونی ملاک ارزیابی مناسبی برای اختلال در غشا پلاسمایی گیاهانی است که در معرض تنش می‌باشند. تنش شوری بر حفظ یکپارچگی غشا تاثیر منفی دارد که نتیجه آن خروج یون‌ها از یاخته است. گزارش‌های دیگری وجود دارد که بیان کرده‌اند تحمل تنش با

مایه زنی قارچ‌های میکوریزی در انواع گونه‌های گیاهی افزایش می‌یابد و نتیجه‌های پژوهش حاضر با آن گزارش‌ها مطابقت دارند (۱۴)

کلروفیل کل برگ

تیمار شوری موجب کاهش معنی‌دار میزان کلروفیل کل برگ شد، به‌طوری که بیشترین مقدار کلروفیل کل مربوط به تیمار شاهد و کمترین آن به‌ترتیب در تیمارهای تنش شدید و میانه مشاهده شد. در مقابل، تیمار قارچ منجر به افزایش معنی‌دار مقدار کلروفیل کل شد به‌طوری که بالاترین مقدار کلروفیل کل در دانهال‌های میکوریزی و کمترین آن در دانهال‌های مایه‌زنی نشده مشاهده شد. با افزایش شوری مقدار کلروفیل کل در همه دانهال‌ها کاهش یافت، اما این روند در دانهال‌های میکوریزی کندتر بود (جدول ۱). شوری باعث تخریب کلروپلاست، کمپلکس کلروفیل-پروتئین و کاهش مقدار کلروفیل و رنگدانه‌های دیگر می‌گردد. کاهش کلروفیل منجر به کاهش فتوسنتز شده و در پی آن کاهش فراورده‌های فتوسنتزی و نیز کاهش در رشد و عملکرد را به دنبال دارد. علت کاهش مقدار رنگدانه‌ها زیر تاثیر تنش شوری، می‌تواند به دلیل تغییر مسیر سوخت‌وساز نیتروژن در رابطه با ترکیب‌هایی مانند پرولین باشد که در تنظیم اسمزی به کار می‌رود. در این آزمایش، در تنش شوری مقدار کلروفیل کاهش ولی مقدار پرولین افزایش یافت. اگرچه در این مطالعه کلروفیل به‌طور معنی‌داری توسط شوری کاهش یافت، اما گیاهان مایه‌زنی شده کلروفیل کل بیشتری از گیاهان مایه‌زنی نشده در شوری‌های ۳۵ و ۷۰ میلی‌مولار داشتند. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اثر شوری در جلوگیری از ساخت کلروفیل در گیاهان میکوریزی نسبت به غیرمیکوریزی کمتر می‌باشد (۹، ۱۶). در پژوهش حاضر و برخی بررسی‌های انجام شده دیگر، غلظت بالای منیزیم در نتیجه کلونیزاسیون قارچ میکوریزا مشاهده شده است. قارچ‌های میکوریزا به جذب منیزیم در گیاه کمک می‌کنند، بدین مفهوم که این قارچ‌های اثر ضدیت سدیم بر جذب منیزیم را کاهش، غلظت کلروفیل را افزایش و بنابراین عملکرد فتوسنتز و رشد گیاه را بهبود می‌بخشند (۹، ۱۶).

کربوهیدرات محلول و پرولین برگ

در شوری ۷۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، بیشترین غلظت کربوهیدرات و پرولین مشاهده شد و کمترین آن‌ها در تیمار شاهد دیده شد. هم‌چنین، غلظت اسمولیت‌ها زیرتاثیر تیمار قارچ قرار گرفت، به‌طوری که کمترین میزان اسمولیت‌ها در دانهال‌های مایه‌زنی نشده مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با گیاهان میکوریزی نشان داد (جدول ۱). یکی از پاسخ‌های عمومی یاخته به تغییرهای فشار اسمزی خارجی، انباشت متابولیت‌هایی است که قابلیت انحلال داشته ولی سوخت‌وساز طبیعی گیاه را مختل نمی‌کنند و می‌توانند از ناهنجاری‌ها در غشای یاخته‌ای جلوگیری کنند. این ماده‌ها به اسمولیت معروف هستند. شوری بر متابولیسم اسمولیت‌ها اثر می‌گذارد و انباشت آن‌ها به عنوان پاسخی به تنش گزارش شده است (۸) که به تنظیم اسمزی درون یاخته‌های گیاه کمک می‌کنند و موجب حفظ و نگهداری مولکول‌های زیستی و غشاهای می‌شوند. پژوهشگران بر این باورند که انباشت اسمولیت‌ها در نتیجه تنش شوری در بافت‌ها و یاخته‌های گیاهی می‌تواند به حفظ فشار تورژسانس در بافت‌های گیاهی، دسترسی به آب، سازوکارهای حفاظتی، پایدار نمودن پروتئین‌ها و غشا یاخته‌ای کمک کند (۸). یکی از سازوکارهایی که به احتمال در افزایش تحمل گیاه به شوری در حضور قارچ‌های میکوریزا مورد توجه قرار می‌گیرد تحریک ساخت اسمولیت‌ها به وسیله قارچ‌های میکوریزا است. در چندین پژوهش مشخص شده که این قارچ‌ها روی ترکیب اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌های گیاهان میزبان در شرایط شوری تاثیر می‌گذارند (۲۲).

پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا برگ

زیرتاثیر تیمارهای شوری، پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء برگ در همه دانهال‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش نشان دادند. کمترین میزان آسیب وارده به غشاء در دانهال‌های میکوریزی و بالاترین آن در بیشترین سطح شوری در دانهال‌های مایه‌زنی نشده دیده شد (جدول ۱). با افزایش شوری آسیب اکسیداتیو افزایش یافت، اما این روند در دانهال‌های میکوریزی کمتر بود. به عبارت دیگر انباشت کمتر گونه‌های اکسیژن فعال^۱ و از جمله مقدار پراکسید هیدروژن در دانهال‌های مایه‌زنی شده نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی کمتر بود که نتیجه آن کاهش آسیب اکسیداتیو در دانهال‌های میکوریزی است.

اثرهای مخرب شوری می‌تواند به واسطه سمیت بیش از اندازه یون‌های سدیم و کلر در یاخته، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و ترکیبی از فاکتورهای یاد شده باشد. این اثرهای مخرب، باعث ایجاد تنش‌های ثانویه مانند تنش اکسیداتیو ناشی از تولید ROS در گیاهان می‌شوند. تنش اکسیداتیو یکی از دلایل مهم آسیب به گیاهان زیر تنش شوری است. تجمع ROS تولید شده در برگ‌ها، می‌تواند رشد و متابولیسم طبیعی گیاه را با پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، اکسیداسیون پروتئین‌ها و آسیب به اسیدهای نوکلئیک و DNA تخریب کند (۲). قرار گرفتن گیاهان در بسیاری از شرایط نامساعد محیطی موجب افزایش تولید ROS و به دنبال آن آسیب‌های اکسیداتیو می‌گردد. در پژوهش حاضر شوری خاک به‌طور معنی‌داری انباشت ROS از جمله پراکسید هیدروژن را در دانهال‌ها تحریک کرد (جدول ۱). بنابراین، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در گیاهان زیر تنش شوری افزایش یافت که این نتیجه‌ها با یافته‌های Ahmad و همکاران (۲) همسو است. از سویی، حضور قارچ‌های اندوفیت در ریشه‌ها می‌تواند به‌طور موثر از آسیب ایجاد شده توسط تنش شوری به غشاء جلوگیری کند. نتیجه‌های پژوهش حاضر نشان داد که غلظت پراکسید هیدروژن و آسیب به غشاء به‌طور معنی‌داری در دانهال‌های میکوریزی در مقایسه با دانهال‌های مایه‌زنی نشده کمتر بود (جدول ۱). انباشت قارچ‌های میکوریزا می‌تواند سازوکار دفاعی تنظیم اسمزی و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بیشتری را ایجاد کند (۲۴) که منجر به آسیب کمتری به غشاء در دانهال‌های مایه‌زنی شده می‌گردد (۲۵).

عنصرهای غذایی برگ

تنش شوری موجب کاهش غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم در برگ دانهال‌ها شد. از سوی دیگر، مایه‌زنی دانهال‌ها با قارچ‌های میکوریزا به‌طور معنی‌داری غلظت این عنصرهای را در برگ افزایش داد. در مقابل، برگ دانهال‌های غیرمیکوریزی کمترین غلظت این عنصرها را نشان دادند. اگرچه با افزایش شوری غلظت این عنصرها در همه دانهال‌ها کاهش یافت، اما این روند در دانهال‌های میکوریزی کندتر بود. به‌ویژه زیر تاثیر شوری، میزان سدیم و کلر افزایش یافت، اما تیمار قارچ منجر به کاهش غلظت آن‌ها در برگ گردید (جدول ۲).

جدول ۲- برهمکنش شوری و همزیستی قارچ بر درصد ترکیب ماده معدنی برگ دانهال‌های نارنج سه‌برگ.

Table 2. Interaction of salinity and mycorrhizal symbiosis on the percentage of leaf mineral composition of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L.) seedlings.

تیمار Treatment	N نیتروژن	P فسفر	K پتاسیم	Na سدیم	Cl کلر	Ca کلسیم	Mg منیزیم
S ₁ G ₁	3.2 ^{cd}	0.516 ^{bcd}	1.37 ^{ab}	0.08 ^f	0.354 ^{fg}	5.065 ^{cd}	0.271 ^{cd}
S ₁ G ₂	3.23 ^b	0.541 ^{abc}	1.37 ^{ab}	0.08 ^f	0.288 ^{gh}	5.384 ^b	0.321 ^a
S ₁ G ₃	3.25 ^a	0.594 ^{ab}	1.39 ^{ab}	0.08 ^f	0.177 ^h	5.603 ^a	0.275 ^c
S ₁ G ₄	3.19 ^{cde}	0.522 ^{abcd}	1.463 ^a	0.076 ^f	0.354 ^{fg}	5.491 ^{ab}	0.283 ^{bc}
S ₁ G ₅	3.21 ^c	0.598 ^a	1.443 ^a	0.073 ^f	0.332 ^{fg}	5.413 ^b	0.307 ^{ab}
S ₂ G ₁	3.15 ^{gh}	0.411 ^{ef}	1.22 ^{ab}	0.12 ^{def}	0.51 ^{de}	4.585 ^f	0.237 ^{ef}
S ₂ G ₂	3.173 ^{ef}	0.478 ^{cde}	1.27 ^{ab}	0.08 ^f	0.509 ^{de}	5.055 ^{cd}	0.26 ^{cde}
S ₂ G ₃	3.17 ^{efg}	0.489 ^{cde}	1.283 ^{ab}	0.083 ^f	0.428 ^{ef}	4.99 ^{de}	0.253 ^{cde}
S ₂ G ₄	3.183 ^{de}	0.475 ^{cde}	1.303 ^{ab}	0.083 ^f	0.369 ^{fg}	5.206 ^c	0.24 ^{def}
S ₂ G ₅	3.153 ^{fg}	0.483 ^{cde}	1.36 ^{ab}	0.11 ^{ef}	0.376 ^{fg}	4.847 ^e	0.24 ^{def}
S ₃ G ₁	3.1 ⁱ	0.386 ^f	1.1 ^b	0.34 ^a	0.953 ^a	3.794 ⁱ	0.181 ^g
S ₃ G ₂	3.13 ^h	0.411 ^{ef}	1.183 ^{ab}	0.143 ^{de}	0.621 ^{bcd}	4.291 ^{gh}	0.211 ^{fg}
S ₃ G ₃	3.13 ^h	0.469 ^{cdef}	1.166 ^{ab}	0.263 ^b	0.731 ^b	4.337 ^g	0.22 ^f
S ₃ G ₄	3.103 ⁱ	0.449 ^{def}	1.27 ^{ab}	0.19 ^c	0.606 ^{cd}	4.159 ^h	0.184 ^g
S ₃ G ₅	3.1 ⁱ	0.449 ^{def}	1.26 ^{ab}	0.16 ^{cd}	0.665 ^{bc}	4.16 ^h	0.211 ^{fg}

† The same letters within each column indicate no significant difference among treatments ($P < 0.05$).

†† S₁: control, S₂: 35mmol NaCl, S₃: 70mmol NaCl.

††† G₁: control, G₂: *G. intraradices* and *G. mosseae*, G₃: *G. mosseae* and *G. hoi*, G₄: *G. hoi* and *G. intraradices*, G₅: *G. hoi* and *G. intraradices* and *G. mosseae*.

† حرف‌های مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵٪ می‌باشد.

بیشتر گیاهان باغی به شوری حساس بوده و تنها سطح‌های پایین نمک را تحمل می‌کنند. بنابراین، غلظت بالای سدیم و کلر در محلول خاک می‌تواند اثر مخربی بر فعالیت یون‌های مورد نیاز گیاه گذاشته و در نهایت طی تنش شوری، گیاه متحمل خسارت‌های ناشی از اثر اسمزی و سمیت بعضی از یون‌ها می‌شود که به هم خوردن تعادل غذایی، کاهش رشد و کاهش عملکرد گیاه را به دنبال خواهد داشت.

در خاک‌های شور، سدیم مانع از جذب عنصرهای ضروری پتاسیم، کلسیم و منیزیم می‌شود. کلر نیز به دلیل برهمکنش با نیتروژن مانع از جذب نیترات می‌گردد. قارچ‌های میکوریزا از نظر بوم‌شناسی اهمیت بسیاری دارند، زیرا باعث افزایش ظرفیت جذب آب، جذب عنصرهای غذایی و تحمل گیاه به تنش‌ها می‌شوند. پژوهشگران بیان کرده‌اند که میکوریزا با بهبود جذب عنصرهای غذایی سبب افزایش رشد و وزن گیاهان می‌شوند (۵). در حقیقت، در گیاهان مایه‌زنی شده، جذب نیتروژن و فسفر نسبت به گیاهان مایه‌زنی نشده بیشتر بوده است. بهبود تغذیه نیتروژن در گیاهان توسط قارچ‌های میکوریزا نیز به اثبات رسیده است (۹). قارچ‌های میکوریزا دارای یک سیستم آنزیمی پیچیده برای جذب ترکیب‌های نیتروژن‌دار می‌باشند. این قارچ‌ها می‌توانند کمپلکس‌های ماده‌های آلی خاک را تجزیه کرده و مقدار جذب نیتروژن را از این راه افزایش دهند. خاک‌های شور کاهش قابل توجهی در جذب ماده‌های معدنی به ویژه فسفر به دلیل رسوب فسفر توسط یون‌های کلسیم، منیزیم و روی ایجاد می‌کنند. قارچ‌های میکوریزا با کلونیزاسیون ریشه و گسترش ریشه‌های خود سبب آسانی جذب و انتقال عنصرهای غذایی به ویژه عنصرهای کم‌تحرک مانند فسفر شده و از این راه، بر رشد گیاهان در شرایط شور تاثیر می‌گذارند و از اثرهای منفی شوری می‌کاهند. با افزایش نمک، یون‌های سدیم وارد یاخته‌ها شده و باعث خروج مقادیر زیاد یون پتاسیم می‌گردد یا از ورود پتاسیم جلوگیری می‌نماید. اثرهای ضدیت دو عنصر و کاهش جذب پتاسیم توسط یون سدیم در بسیاری از بررسی‌ها نشان داده شده است (۲۶). اساس تحمل بالاتر گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی در شرایط شوری جلوگیری از جذب یون‌های سدیم و کلر از خاک یا حبس نمودن آن‌ها در ریشه‌های درون یاخته‌ای قارچ، عدم انتقال آن به اندام هوایی گیاه و درنهایت ذخیره یون پتاسیم در گیاه به جای یون سدیم می‌باشد که موجب کاهش ورود آن‌ها به اندام‌های هوایی می‌شود (۱۰) و این اثرها نمایانگر توانایی قارچ میکوریزا در تنظیم اسمزی گیاه است و می‌تواند یکی از دلایل افزایش تحمل گیاهان مایه‌زنی شده به تنش شوری باشد. همچنین، پژوهشگران بیان نموده‌اند که افزایش ظرفیت رشد گیاهان میکوریزی در شرایط شوری بیشتر به نقش واسطه‌گری میکوریزا در افزایش جذب پتاسیم، کلسیم و منیزیم و بهبود نسبت پتاسیم به سدیم، کلسیم به سدیم و منیزیم به سدیم در گیاهان در تنش شوری برمی‌گردد (۷). به نظر می‌رسد یکی از سازوکارهای بهبود رشد گیاهان میکوریزی در شرایط شوری این است که این گیاهان به‌احتمال از یک مسیر مستقیم برای جذب ماده‌های غذایی از راه میکوریزاسیون بهره می‌برند که می‌تواند دلیل روشنی برای عملکرد میکوریزا در افزایش جذب فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم در شرایط تنش باشد که البته روشن شدن جزئیات آن نیازمند بررسی‌های بیشتری می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌های پژوهش حاضر نشان‌دهنده تاثیر مثبت کاربرد قارچ‌های میکوریزا بر افزایش تحمل شوری در دانهال‌های نارنج سه‌برگ است. هم‌چنین مشاهده شد که شوری موجب کاهش قابلیت دسترسی به عنصرهای غذایی گردید و نسبت جذب عنصرها و محتوی آن در داخل گیاه از حالت تعادل خارج شد. در تنش شوری نسبت سدیم به عنصرهای کلسیم، منیزیم و پتاسیم افزایش یافت. دانهال‌های رشد کرده در تنش شوری کمبود فسفر را نشان دادند، اما کاربرد قارچ‌های میکوریزا موجب افزایش جذب فسفر، پتاسیم، منیزیم و کلسیم در تنش شد و از این راه تعادل یونی داخل گیاه را حفظ نمود. هم‌چنین، قارچ‌های میکوریزا موجب ورود بیشتر نیتروژن به گیاهان شدند. بنابراین، رشد دانهال‌های میکوریزی در شرایط شوری با افزایش جذب عنصرهای غذایی، به‌ویژه نیتروژن و فسفر بهبود یافت. قارچ‌های میکوریزا سطح‌های اسمولیت‌ها (پرولین و کربوهیدرات‌ها) را در برگ افزایش و از این راه تحمل به شوری را بالا بردند. براساس یافته‌های این پژوهش، ترکیب *G. mosseae + G. hoi* به دلیل بیشترین درصد کلونیزاسیون، کمترین نشت یونی، کاهش کمتر در محتوی نسبی آب برگ، بالا بودن غلظت رنگدانه برگ، انباشت بالای قندهای محلول و پرولین آزاد در برگ‌ها (تنظیم اسمزی)، انباشت کمتر ROS و

کاهش آسیب اکسیداتیو و همچنین، انباشت بیشتر عنصرهای غذایی و کاهش سدیم و کلر، کارایی بیشتری در افزایش تحمل دانه‌ها به شوری داشت.

References

منابع

1. Abdel-Shafy, H., W. Hegemann and A. Teiner. 1994. Accumulation of metals by vascular plant. Environ. Manag. Health. 5: 21-24.
2. Ahmad, P., C.A. Jeleel, M.M. Azooz and G. Nabi. 2010. Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. Bot. Res. Inter. 2(1): 11-20.
3. Alexieva, V., I. Sergiev, S. Mapelli and E. Karanov. 2001. The effect of drought and ultra violet radiation growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell Environ. 24: 1337-1344.
4. Bates, L.S., R.P. Waldron and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 205-207.
5. Bdaradwaj, A. and S. Sharma. 2006. Reducing phosphorous requirement using AMF in Mulberry grown under alkaline condition. J. Agron. 5(3): 471-477.
6. Buege, J.A. and S.D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52: 302-310.
7. Daeia, G., M.R. Ardekanian, F. Rejalic, S. Teimurib and M. Miransarid. 2009. Alleviation of salinity stress on wheat yield, yield components, and nutrient uptake using arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. J. Plant Physiol. 166(6): 617-625.
8. Dong, Y.J., S.S. Jinc, S. Liu, L.L. Xu and J. Kon. 2014. Effects of exogenous nitric oxide on growth of cotton seedlings under NaCl stress. J. Soil Sci. Plant Nut. 14(1): 1-13.
9. Giri, B. and K.G. Mukerji. 2004. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in Sesbania aegyptica and Sesbania gradiflora under field condition: evidenced for reduced sodium and improved magnesium uptake. Mycorrhiza, 14: 307-312.
10. Hammer, E.C., H. Nasr, J. Pallon, P.A. Olsson and H. Wallander. 2011. Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity. Mycorrhiza, 21: 117-129.
11. Hoagland, D.R. and D.I. Arnon. 1950. The water culture method for growing plants without soil. Californai Agric. Exp. Stat. USA. 347.
12. Kaya, C., D. Higgs, H. Kirnak and I. Tas. 2003. Mycorrhizal colonization improves fruit yield ad water use efficiency in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb) grown under well-watered and water-stressed conditions. Plant Soil. 253: 287-292.
13. Khalil, H.A., A.M. Eissa, S.M. El-Shazly and A.M. Aboul Nasr. 2011. Improved growth of salinity stressed citrus after inoculation with mycorrhizal fungi. Sci. Hort. 130: 624-632.
14. Latef, A.A. and C.X. He. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. Sci. Hort. 127: 228-233.
15. Lutts, S., J.M. Kinet and J. Bouharmont. 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice varieties differing in salinity resistance. J. Exp. Bot. 46: 1843-1852.
16. Navarro, J.M., O. Perez-Tornero and A. Morte. 2014. Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi depends on the rootstock salt tolerance. J. Plant Physiol. 171: 76-85.
17. Olsson, P.A., Thingstrup, I., Jakobsen, I. and Bath, E. 1999. Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. Soil Biol. Biochem. 31: 1879-1887.
18. Paquin, R. and P. Lechasseur. 1979. Observation sur la method de dosage de la proline liberdans les extraits de plants. Canadian J. Bot. 57: 1851-1854.
19. Phillips, J.M. and D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. British Mycological Soc. 55: 158-61.
20. Porcel, R. and J.M. Ruiz-Lozano. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. J. Exp. Bot. 55: 1743-1750.
21. Porra, R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophyll a and b. Photo. Res. 73: 149-156.
22. Sheng, M., M. Tang, H. Chen, B. Yang, F. Zhang and Y. Huang. 2009. Influence of arbuscular mycorrhizae on the root system of maize plants under salt stress. Canadian J. Microbiol. 55: 879-886.
23. Wu, Q.S. and R.X. Xia. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. J. Plant Physiol. 163: 417-425.
24. Wu, Q.S., A.K. Srivastava and Y.N. Zou. 2013. AMF-induced tolerance to drought stress in citrus: A review. Sci. Hort. 164: 77-87.

25. Wu, Q.S., Y.N. Zou, W. Liu, X.F. Ye, H.F. Zai and L.J. Zhao. 2010. Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with mycorrhiza: changes in leaf antioxidant defense systems. Plant Soil Environ. 56:470-5.
26. Zuccarini, P. 2008. Effects of silicon on photosynthesis water relations and nutrient uptake of *Phaseolus vulgaris* under NaCl stress. Biol. Plant. 52(1):157-160.

Enhancing Salinity Stress Tolerance in *Poncirus trifoliata* L. Using Arbuscular Mycorrhizal Fungi

M. Hadian-Deljou and M. Esna-Ashari^{*1}

Citrus trees are susceptible to salinity. In the present study, the response of trifoliolate sour orange (*Poncirus trifoliata* L.) to the salinity stress at the presence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) was investigated. Forty-day-old seedlings were inoculated with three species of AMF in combinations including *Glomus mosseae* + *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* + *Glomus hoi*, *Glomus intraradices* + *Glomus hoi*, *Glomus mosseae* + *Glomus intraradices* + *Glomus hoi* and no fungi "control". After 175 days of inoculation, seedlings were exposed to 35 and 70 mM NaCl for 45 days. Mycorrhizal inoculation especially with the combination of *G. mosseae* + *G. hoi* increased the leaves relative water content as well as the amounts of chlorophyll and osmolites. There was a significant reduction in the amounts of malondialdehyde and hydrogen peroxide in the leaves in colonized seedlings compared to the control. The concentrations of Na and Cl in the leaves were higher when salinity increased, while the concentration of N, P, K, Ca and Mg were significantly decreased. On the other hand, inoculation with AMF resulted in a significant increase in the concentrations of N, P, K, Ca, and Mg in colonized seedlings. In general, AMF was able to help the sour orange seedlings against salinity by increasing the leaf nutrient elements and reducing oxidative damage.

Keywords: Inoculation, Malondealdehyde, Hydrogen peroxide, Oxidative damage.

1. Ph.D. Student and Professor, respectively. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

* Corresponding author, Email: (m.esnaashari@basu.ac.ir)