مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۲ شماره ۳ صفحه های ۳۴۹ تا ۳۷۰ (۱۴۰۰)
مقاله پژوهشی

پاسخ‌های فیزیولوژیک و زیست‌شیمیایی پایه‌های دانهالی مرکبات به تنش خشکی و آبیاری دوباره[1]

Physiological and Biochemical Responses of Citrus Seedling Rootstocks to Drought Stress and Rewatering

پدرام عصار*، اختر شکافنده و لیلا تقی‌پور[2]

چکیده

سازوکارهای پاسخ‌گویی به شرایط تنش خشکی در پایه‌های دانهالی هشت ماهه لیموی آب، نارنج، ولکامریانا و رانگپورلایم در شرایط گلخانه‌ای ارزیابی شد. رژیم آبیاری به‌صورت ۱۴ روز قطع کامل آبیاری و سپس ۳ روز آبیاری در حد ظرفیت مزرعه بود. شاخص‌های فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی در دو زمان (پایان دوره‌های تنش و آبیاری دوباره) در برگ دانهال‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. خشکی سبب کاهش معنی‌دار پتانسیل آب و محتوای نسبی آب تمام پایه‌ها نسبت به شاهد شد، اما با آبیاری دوباره تمام تفاوت‌ها از بین رفت. ارزیابی بیشینه کارایی کوانتومی سیستم نوری ۲، محتوای مالون‌دی‌آلدهاید و نشت یونی نشان داد که دستگاه فتوسنتزی همه پایه‌ها به جز ولکامریانا، دچار آسیب اکسایشی ناشی از بازدارندگی نوری شد، اما پس از آبیاری دوباره تنها نارنج وضعیت فیزیولوژیکی نرمال را بازیابی ننمود. تفسیر نتیجه‌ها نشان داد کاهش محتوای کلروفیل برگ لیموی آب و رانگپورلایم در شرایط تنش بخشی از سازوکار تخفیف آسیب اکسیداتیو ناشی از بازدارندگی نوری به دستگاه فتوسنتزی بود. در شرایط تنش، محتوای کلروفیل برگ‌های ولکامریانا و نارنج به‌ترتیب افزایش و کاهش یافت که در مورد نارنج برگشت‌ناپذیر بود. عملکرد سازوکار پاداکسایشی آنزیمی پایه‌های ولکامریانا، لیموی آب و رانگپورلایم زیر تنش مطلوب ارزیابی شد و بهبود این سازوکار در پاسخ به دوره آبیاری دوباره، منجر به خوگیری به شرایط تنش شد. نتیجه این که پایه ولکامریانا نسبت به دیگر پایه‌های ارزیابی شده کارایی بهتری در تحمل تنش داشت. الگوی پاسخ‌گویی فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی پایه‌های لیموی آب و رانگپورلایم به تنش و آبیاری دوباره مشابه بود. پایه نارنج پاسخ‌های مناسبی در برابر تنش یا بازیابی وضعیت طبیعی خود پس از آبیاری دوباره نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: لیموی آب، تنش خشکی، رانگپورلایم، فعالیت آنزیمی، فلورسانس کلروفیل، ولکامریانا.

مقدمه

خشکی را به ساده‌ترین شکل می‌توان دوره‌ای با بارندگی کمتر از حد نرمال تعریف نمود که تولید گیاه را در طبیعت یا نظام‌های کشاورزی محدود می‌کند. در شرایط مزرعه، خشکی می‌تواند باعث بروز چندین تنش همزمان به گیاه از جمله تنش‌های دما، نور و تغذیه‌ای شود، اما جزئی از تنش که به‌عنوان خشکی تعریف می‌شود کاهش در آب قابل‌دسترس خاک است (۴۷). تنش خشکی در گیاه زمانی ایجاد می‌شود که تلفات آب در اثر تعرق بیش از میزان جذب آن باشد. این امر ممکن است به علت افزایش ناگهانی سرعت تعرق و اتلاف بیش‌ازحد آب، یا کاهش جذب آب و یا وجود هر دو مورد باشد. دلیل کاهش جذب آب توسط گیاه

۱- تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۹

۲- به‌ترتیب دانشجوی سابق دکتری دانشگاه شیراز و استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، صندوق پستی: ۱۱۱-۷۴۱۳۵، جهرم، دانشیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، صندوق پستی: ۶۵۱۸۶-۷۱۴۴۱، شیراز، استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، صندوق پستی: ۱۱۱-۷۴۱۳۵، جهرم، ایران.
* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (Pedramassar@gmail.com, Pedramassar@jahromu.ac.ir).

نیز می‌تواند محدودیت آب یا کاهش توانایی جذب آب در گیاه در شرایطی مانند پایین بودن دمای خاک، وجود نمک‌ها در محلول خاک و یا عدم تهویه کافی در محیط ریشه باشد (۲۳). خشکی سبب کاهش پتانسیل اسمزی و پتانسیل کل آب همراه با از بین رفتن آماس، بسته شدن روزنه‌ها و کاهش رشد می‌شود و درصورتی‌که شدت تنش زیاد باشد موجب کاهش شدید فتوسنتز و مختل شدن فرایندهای فیزیولوژیک، توقف رشد و سرانجام مرگ گیاه در اثر پسابیدگی[۱] خواهد شد (۲۴). البته باید توجه داشت که در واقع آنچه در شرایط مزرعه‌ای و هوای آزاد رخ می‌دهد، تناوب دوره‌های خشکی و آبیاری دوباره است. تغییر چرخه آبی می‌تواند به‌شدت بر رشد گیاهی، فتوسنتز و بسیاری از عملکردهای متابولیکی حیاتی و از این راه بر میزان پویایی اکوسیستم و کسب موفقیت در نظام‌های کشاورزی تأثیر بگذارد (۱۱). در واقع، بارش‌های معدود و گهگاه که اتفاق می‌افتند برای حفظ ثبات ساختار اکوسیستم و بقای آن در مناطق خشک و نیمه‌خشک ضروری هستند. به‌محض تامین دوباره آب، باز شدن دوباره روزنه‌ها، بازیابی رشد و فتوسنتز گیاه اتفاق می‌افتند و میزان بازیابی به‌طور کامل به شدت تنش خشکی وارد شده بستگی دارد (۴۹). در اغلب پژوهش‌ها اثرهای تنش خشکی بر گیاهان به‌تنهایی مورد بررسی قرار گرفته است، اما در حال حاضر، پاسخ‌های کلی گیاه به مجموعه دو پدیده متوالی خشکی و آبیاری دوباره و سازوکارهای آن‌ها تا حد بسیاری ناشناخته هستند (۴۹).

بر اساس آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۹۷، استان فارس با سهم ۱۲/۵ درصد از سطح زیرکشت بارور و ۱۴/۹ درصد از میزان تولید محصول‌های باغبانی، جایگاه اول را از نظر شاخص‌های بیان‌شده در بین تمام استان‌ها دارا است (۳). سهم سطح زیر کشت بارور و میزان تولید انواع مرکبات به ترتیب ۵۱۱۱۳ هکتار و ۱۴۰۶۰۴۲ تن می باشد. شایان ذکر است سهم سطح زیر کشت و میزان تولید دیم از مجموع سطح زیر کشت بارور و تولید مرکبات استان به ترتیب ۴ هکتار و ۳ تن می‌باشد و مبنای تولید مرکبات شامل پرتقال، نارنگی، لیمو ترش، لیمو شیرین، گریپ فروت، نارنج و سایر محصولات مرتبط بر پرورش آبی استوار است. یکی از پایه‌های متداول در مناطق مرکبات‌خیز جنوب کشور مکزیکن لایم (لیموی آب) (*Citrus aurantifolia* Swingle cv. Mexican Lime) است. سال‌های زیادی است که این رقم در جنوب کشور کشت می‌شود و افزون بر کاربرد به‌عنوان پیوندکی محبوب، به‌مرور به‌عنوان پایه غالب جایگاه خود را پیدا کرده است. به احتمال، دسترسی آسان به بذرهای این رقم و نیز رشد و عملکرد زیاد و کیفیت خوب محصول ارقام پیوند شده روی آن را می‌توان از دلایل محبوبیت آن به‌عنوان پایه نزد باغداران مناطق جنوبی کشور دانست. نارنج[۲] (*C. aurantium* L.) رایج‌ترین پایه در مناطق مرکبات‌خیز دنیا است و در ایران هنوز کاربرد دارد. ضمن تحمل در برابر سرما و شوری، دارای تحمل نسبی به خشکی است (۱). رانگپورلایم[۳] (*C. limonia* Osbeck) دورگه نارنگی و لایم است و از نظر رشد و تولید میوه شبیه لیموها است و غیر از برزیل، در سایر مناطق مرکبات‌خیز دنیا گسترش چندانی نیافته است. این پایه به شوری و خشکی خاک متحمل و به سرما تا حدودی متحمل است (۴۰). پایه لیموی ولکامریانا[۴] (*C. volkameriana* Ten & Pasq) نیز دورگه بین نارنج و لیموترش ایتالیایی است و ارقام پیوندی روی آن نسبت به سایر لیموها به سرما متحمل‌تر هستند (۱۴). کاربرد دو پایه رانگپورلایم و ولکامریانا در صنعت مرکبات‌کاری ایران مرسوم نیست.

شناسایی و انتخاب پایه و ترکیب‌های پیوندی مناسب برای هر منطقه، از نکات مهم و قابل‌توجه در احداث باغ است. با توجه به این‌که در زمان حاضر و در پی خشکسالی‌های مستمر، مرکبات استان فارس با کاهش کیفیت و میزان محصول مواجه است و بخش زیادی از باغ‌ها خشک شده‌اند و یا در معرض تهدید هستند، شایسته است که در زمینه ارزیابی و شناسایی پایه‌های مناسب پژوهش‌های بومی بیش‌تری صورت گیرد. نگارندگان بر این باور هستند که بررسی چگونگی پاسخ‌گویی پایه لیموی آب (پایه غالب مورد استفاده در منطقه) و مقایسه آن با پایه‌هایی مانند نارنج (قدیمی‌ترین پایه مورد استفاده در ایران)، رانگپورلایم و ولکامریانا، می‌تواند جایگاه و ارزش این پایه‌ها در شرایط تنش خشکی را مشخص و به تصمیم‌گیری‌های آتی برای انتخاب ترکیب‌های پیوندی برتر برای احداث باغ در شرایط تنش کمک نماید. افزون بر آن، فهم چگونگی پاسخ‌گویی گیاهان به دوره‌های متناوب خشکی و آبیاری و درک سازوکارهای آن می‌تواند در بحث برنامه‌ریزی عملیات مدیریت گیاهی به‌ویژه در شرایط تغییر اقلیم دارای اهمیت و ارزش بسیار باشد. نتیجه‌های پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که درختان مرکبات پیوندی روی پایه‌های با قدرت رشدی زیاد (مانند رانگپورلایم و ولکامریانا)، نسبت به پایه‌های بدون این ویژگی، دارای هدایت هیدرولیکی بیش‌تری هستند (۱۴، ۳۰، ۴۳، ۴۴). انگیزش تحمل به تنش خشکی توسط پایه‌های رانگپورلایم و ولکامریانا گزارش شده است (۳۶، ۴۳).

۱- Dehydration ۲- Sour orange ۳- Rangpur lime ۴- Volkamer lemon

یافته‌های علمی نشان می‌دهد که پایه‌های دارای قدرت رشدی زیاد و توان بالای هدایت هیدرولیکی، به دلیل داشتن سیستم آوندی کارا و توان بالای جذب آب قابل‌دسترس از خاک، توانایی بیش‌تری در انگیزش تحمل به تنش خشکی دارند (۴۶). به عنوان مثال، Syvertsen (۴۳) گزارش نمود که پایه رانگپورلایم به دلیل دارا بودن سیستم ریشه‌ای ژرف و با پراکنش خوب که حجم زیادی از خاک را دربر می‌گیرد، به صورت کارآمدی آب و مواد معدنی موجود در خاک را جذب می‌کند و در نتیجه سبب ایجاد توان بالای تحمل تنش خشکی می‌شود. در حال حاضر پاسخ دقیق و قطعی برای این سوال وجود ندارد که آیا میزان قدرت رشدی پایه‌ها عامل اصلی تعیین‌کننده روابط آبی است یا خیر (۲۲)؟ شیوه پاسخ‌گویی این پایه‌ها در شرایط تنش شدید و کمبود شدید آب در دسترس در خاک چگونه خواهد بود و آیا در چنین شرایطی توان بیش‌تر آن‌ها در تخلیه منابع آبی موجود به ضرر آن‌ها است و یا این که با سازوکارهایی دیگر همچنان تنش خشکی را تحمل می‌نمایند؟ بنابراین هدف از پژوهش حاضر، بررسی و مقایسه پاسخ‌های فیزیولوژیک و زیست‌شیمیایی پایه‌های بذری لیموی آب، نارنج، ولکامریانا و رانگپورلایم در شرایط تنش خشکی و نیز پس از آبیاری دوباره بود.

مواد و روش‌ها

بذرهای مورد نیاز برای تولید پایه‌های نارنج، لیموی آب، ولکامریانا و رانگپورلایم از ایستگاه تحقیقات کشاورزی شهرستان داراب در استان فارس تهیه شد. برای این منظور، میوه‌ها چیده شدند و پس از بذرگیری، شستشو و جداسازی ماده ژله‌ای اطراف بذرها و خیساندن آن‌ها در قارچ‌کش بنومیل (به مدت ۵ دقیقه) انجام شد. سپس بذرها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای اتاق قرار گرفتند تا در حد لازم (رطوبت حدود ۷۰ درصد) خشک شوند. بذرهایی که به لحاظ ظاهری نسبت به بقیه بذرها درشت‌تر و سالم‌تر بودند انتخاب و در درون کیسه‌های نایلونی و در یخچال با دمای ۵ درجه سلسیوس تا زمان کشت نگهداری شدند. در بهمن ماه، بذرها در گلدان‌های نایلونی سیاه مناسب (قطر دهانه گلدان ۲۵ سانتی‌متر- حجم گلدان ۴/۲ لیتر) پرشده از مخلوط خاکی شامل ماسه‌بادی، خاک و خاک‌برگ به نسبت حجمی مساوی و لایه‌ای از سنگریزه در کف گلدان کشت شدند. گلدان‌های کشت شده تا زمان شروع آزمایش در گلخانه شیشه‌ای با مختصات عرض جغرافیایی ′۳۶°۲۹ شمالی، طول جغرافیایی ′۳۲°۵۲ شرقی و ارتفاع ۱۸۱۰ متر از سطح دریا نگهداری شدند و در طول این مدت، گیاهان به‌خوبی رشد و نمو یافتند. آبیاری گلدان‌ها به‌صورت مستمر و در حد ظرفیت مزرعه و همه مراقبت‌های باغبانی مانند کوددهی و مبارزه با آفات و بیماری‌ها برای همه پایه‌های دانهالی به‌صورت یکسان اجرا شد. در طول مدت آزمایش، محدوده دمایی شبانه و روزانه گلخانه به ترتیب، ۱۴ الی ۱۸ و ۳۰ الی ۳۴ درجه سلسیوس و میانگین رطوبت نسبی گلخانه حدود ۶۷ درصد بود. پس از ۸ ماه، گیاهان مشابه از نظر اندازه و وضعیت سلامت ظاهری انتخاب شدند. بر اساس پیش‌تیماری که قبل از شروع آزمایش انجام شد، طول دوره‌های تنش خشکی و آبیاری دوباره تعیین شد. شروع آزمایش با جست رشدی تابستانه در شهریورماه همزمان بود. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر اساس طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار (۴ گیاه در هر تکرار) انجام شد. فاکتورهای آزمایشی نوع پایه در چهار سطح (لیموی آب، نارنج، ولکامریانا و رانگپورلایم)، تنش خشکی در دو سطح (قطع آبیاری به مدت ۱۴ روز و آبیاری روزانه در حد ظرفیت مزرعه) و زمان نمونه‌گیری در دو سطح (انتهای دوره تنش و پس از دوره آبیاری دوباره سه روزه) و یا سه سطح (نیمه دوره تنش، انتهای دوره تنش و پس از دوره آبیاری دوباره سه روزه) بسته به پارامتر مورد اندازه‌گیری بود. تعداد ۱۶ گیاه از هر نوع پایه با قطع کامل آبیاری در معرض تنش خشکی ۱۴ روزه (تا زمانی که اغلب گیاهان آزمایشی کاهشی آشکار در شادابی و آماس خود نشان دادند و بخش بزرگ برگ‌ها پژمرده شدند) و سپس آبیاری دوباره ۳ روزه (در حد ظرفیت مزرعه، تا زمان برطرف شدن نشانه‌های ظاهری بیان‌شده) قرار گرفتند. در مورد پایه‌های دانهالی شاهد نیز با انجام آبیاری روزانه در حد ظرفیت مزرعه، وضعیت بهینه میزان آب در خاک در طول دوره اجرای آزمایش تأمین و حفظ شد. ظرفیت مزرعه مخلوط خاکی به کار رفته بر اساس روش Richards تعیین شد (۳۷). با هدف انجام ارزیابی‌های فیزیولوژیک و زیست‌شیمیایی، برگ‌های جوان به‌طور کامل نمو یافته مورد استفاده قرار گرفتند. برگ‌های جدا شده بی‌درنگ در نیتروژن مایع قرار گرفتند و تا زمان استفاده، در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بیشینه کارآیی کوانتومی سیستم نوری۲

فلورسانس کلروفیل با استفاده از دستگاه فلوریمتر (OS-30p hand held portable modulated chlorophyll fluorometer (Opti-Sciences, Inc., Hudson, NH, USA)) و بر اساس دستورالعمل منتشرشده توسط شرکت سازنده آن در بازه زمانی ۹ تا ۱۰ صبح ارزیابی شد. در نهایت شاخص بیشینه کارآیی کوانتومی سیستم نوری ۲ از رابطه زیر به دست آمد:

$$Fv/Fm = (Fm - F0)/Fm$$

در رابطه فوق، F_m و F_0 به ترتیب معرف فلورسانس بیشینه و کمینه مربوط به برگ‌های سازش‌یافته به تاریکی و F_v معرف فلورسانس متغیر بود (۲۹).

پتانسیل آب و محتوای نسبی آب

ارزیابی پتانسیل آب برگ توسط دستگاه بمب فشاری (Model 1000 pressure chamber instrument, PMS Instrument Company, Albany, Oregon, USA) در محدوده زمانی ۱۱:۳۰ تا ۱۲:۳۰ ظهر انجام شد.

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ، از دیسک‌های برگی تهیه‌شده از برگ‌های جوان به‌طور کامل توسعه یافته و روش Morgan (۳۱) و رابطه زیر استفاده شد:

$$RWC\ (\%) = (FW-DW) \times (TW-DW)^{-1} \times 100$$

در این معادله، FW وزن تازه نمونه‌های برگ، TW وزن آن‌ها پس از غوطه‌ور شدن در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت و DW وزن خشک آن‌ها پس از قرارگیری به مدت ۲۴ ساعت در آون ۸۰ درجه سلسیوس بود.

نشت یونی و محتوای مالون‌دی‌آلدهاید

میزان نشت یونی براساس روش Sairam و همکاران (۳۹) با استفاده از دیسک‌های برگی و با اندازه‌گیری هدایت الکتریکی به‌کمک هدایت‌سنج (644 Conductometer, Metrohm, Herisau, Switzerland) مورد ارزیابی قرار گرفت.

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در بافت برگ با ارزیابی میزان تشکیل مالون‌دی‌آلدهاید (به‌عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی) به روش Heath و Packer (۱۸) و با کاربرد تیوباربیتیوریک اسید (TBA) به‌عنوان ماده مسبب واکنش تعیین شد. برای این منظور، از اسپکتروفوتومتر مدل Biowave II UV/vis spectrophotometer, Biochrom Ltd, Cambridge, UK استفاده شد و با استفاده از ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی‌مولار بر سانتی‌متر، برحسب میکرو مول در هر گرم وزن تازه گزارش شد.

مقدار کل کلروفیل

در ابتدا با استفاده از دستگاه سنجش کلروفیل (SPAD-502, Minolta, Japan)، شاخص سبزینگی برگ‌های جوان به‌طور کامل توسعه یافته خوانده شد. سپس، بیست برگ منتخب که دارای دامنه‌ای از خوانش‌های متفاوت، شامل خوانش‌های کمینه و بیشینه بودند برای سنجش شیمیایی میزان کلروفیل به روش Lichtenthaler (۲۷) و رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت، منحنی استاندارد برای تبدیل دقیق سایر خوانش‌های برگی به مقادیر شیمیایی کلروفیل مورد استفاده قرار گرفت.

محتوای پراکسید هیدروژن

ارزیابی غلظت پراکسید هیدروژن با روش Singh و همکاران (۴۱) انجام شد. با استفاده از ضریب خاموشی ۰/۲۸ میکرومولار بر سانتی‌متر محتوای پراکسید هیدروژن برحسب میکرو مول در هر گرم وزن تازه محاسبه و گزارش شد.

عصاره‌گیری و سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی

به هدف تهیه عصاره لازم برای ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ۱ گرم بافت نمونه منجمد نگهداری شده (در دمای ۸۰- درجه سلسیوس) در ۴ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار خنک (pH=۷)، حاوی ۲ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک اسید و ۱٪ (وزنی به حجمی) پلی‌وینیل‌پیرولیدون (در مجموع به‌عنوان بافر استخراج)، همگن‌سازی شد. مخلوط همگن به‌دست‌آمده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و پس از آن، روشناور در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه نگهداری شد (۳۵).

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز با سنجش کاهش میزان جذب نوری کمپلکس سوپراکسید - نیتروبلوتترازولیوم در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر زیر تأثیر فعالیت آنزیم ارزیابی شد (۵). یک واحد فعالیت آنزیم معادل با کمیتی از آن تعریف شد که توان کاهش

در میزان جذب را به میزان ۵۰٪ جذب خوانده‌شده برای شاهد دارا بود. فعالیت ویژه آنزیمی به‌صورت واحد به ازای یک گرم وزن تازه نمونه گزارش شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز با بررسی کاهش میزان جذب نوری در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر (به دلیل تجزیه پراکسید هیدروژن) در طی مدت ۱ دقیقه ارزیابی شد (۱۲). با استفاده از ضریب خاموشی ۳۶/۶ میلی‌مولار بر سانتی‌متر، فعالیت آنزیم برحسب میکرو مول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در مدت یک دقیقه به ازای یک گرم وزن تازه نمونه محاسبه و گزارش شد.

فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز با ارزیابی افزایش میزان جذب نوری در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر (به دلیل اکسید شدن گوایاکول در حضور پراکسیدهیدروژن) در طی مدت ۱ دقیقه ارزیابی شد (۱۰). با استفاده از ضریب خاموشی ۲۶/۶ میلی‌مولار بر سانتی‌متر، فعالیت آنزیم برحسب میکرومول گوایاکول اکسیدشده در مدت یک دقیقه به ازای یک گرم وزن تازه نمونه محاسبه و گزارش شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با ارزیابی کاهش میزان جذب نوری در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر (به دلیل اکسید شدن آسکوربات) در طی مدت ۱ دقیقه ارزیابی شد (۳۳). با استفاده از ضریب خاموشی ۲/۸ میلی‌مولار بر سانتی‌متر، فعالیت آنزیم برحسب میکرومول آسکوربات اکسیدشده در مدت یک دقیقه به ازای یک گرم وزن تازه نمونه محاسبه و گزارش شد.

واکاوی آماری

آزمایش حاضر به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح به طور کامل تصادفی اجرا شد. واکاوی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1.3 service pack 4 انجام شد و به کمک آزمون کمینه اختلاف معنی‌دار (LSD)، تفاوت‌های موجود بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد محاسبه و گزارش شد.

نتایج و بحث

ارزیابی بیشینه کارآیی کوانتومی سیستم نوری ۲

مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر سطوح فاکتورها نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین لیموی آب و رانگپورلایم وجود نداشت ولی تفاوت این دو پایه با پایه‌های دانهالی ولکامریانا و نارنج که به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین کارآیی فتوسنتزی را داشتند، معنی‌دار بود. همچنین، کارآیی فتوسنتزی گیاهان در پایان دوره آبیاری دوباره بیشینه بود و پس از آن روزهای نیمه دوره تنش و پایان آن در رتبه‌های بعدی قرار داشتند و تمام اختلاف‌های موجود معنی‌دار بودند. افزون بر این، میزان شاخص بیان‌شده در گیاهان شاهد نسبت به تنش‌دیده به صورت معنی‌داری بیش‌تر بود (جدول ۱).

در شرایط تنش شدید، محدودیت عملکرد چرخه کالوین-بنسن و کاهش تثبیت دی‌اکسید کربن می‌تواند به عدم توازن بین میزان فعالیت فتوشیمیایی سیستم نوری ۲ و میزان نیاز به نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات[۱] منجر شود. بنابراین، دستگاه فتوسنتزی[۲] در معرض آسیب ناشی از نور اضافی قرار می‌گیرند که به آن بازدارندگی نوری[۳] گفته می‌شود (۳۴). میزان آسیبی که در اثر خشکی به گیاه تحمیل می‌شود بسته به طول مدت خشکی، زمان بروز تنش (مرحله نمو گیاه)، شدت تنش، نوع گیاه و ویژگی‌های خاک متفاوت است (۲۵). با اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل امکان بررسی کارآیی فتوشیمیایی سیستم نوری ۲ به‌منظور ارزیابی عملکرد دستگاه فتوسنتزی وجود دارد. در حال حاضر، شاخص بیشینه کارآیی کوانتومی سیستم نوری ۲ (F_v/F_m) یکی از پارامترهای ارزیابی فلورسانس کلروفیل است که به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان شاخص و زیست نشانگر[۴] قابل اعتماد تشخیص بروز صدمه‌های ناشی از بازدارندگی نوری مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۹). دامنه عددی این شاخص برای برگی با عملکرد طبیعی بین ۰/۷۵ تا ۰/۸۵ است و هرگونه کاهش در این نسبت، بیانگر بروز بازدارندگی نوری و آسیب‌دیدگی برخی از اجزای دستگاه فتوسنتزی در گیاهان زیر تنش است (۷). با ارزیابی این شاخص در روزهای هفتم و چهاردهم تنش مشاهده شد که به استثنای پایه‌های دانهالی ولکامریانا، اعمال تنش خشکی سبب کاهش معنی‌دار این شاخص در تمام پایه‌های تنش دیده به کمتر از بازه مربوط به برگ‌های با عملکرد طبیعی رسید. البته پس از آبیاری دوباره، تنها پایه‌های نارنج نتوانستند کامل بهبود یابند (شکل ۱). بنابراین، تنها بر اساس واکاوی اطلاعات مربوط به فلورسانس کلروفیل چنین برداشت شد که پایه‌های دانهالی ولکامریانا

۱- NADPH ۲- Photosynthetic apparatus ۳- Photoinhibition ۴- Biomarker

متحمل‌ترین پایه‌ها به تنش بودند و افزون بر این، لیموی آب و رانگپورلایم پس از آبیاری دوباره کامل بهبود نیافتند. مطلوب بودن بازه عددی شاخص مذکور دال بر کارا بودن سیستم دفاعی پاداکسایشی است (۲۸). با توجه به نتیجه‌های بررسی‌های آنزیمی (در ادامه بحث به آن‌ها پرداخته شده است) (شکل ۳) کارآ بودن سیستم دفاعی آنزیمی و بهبود عملکرد این سیستم زیر تأثیر تیمار آبیاری دوباره در پایه‌های تنش دیده ولکامریانا، لیموی آب و رانگپورلایم قابل استنباط بود.

ارزیابی پتانسیل آب و محتوای نسبی آب

مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر سطوح فاکتورها نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین لیموی آب و رانگپورلایم وجود نداشت و این دو پایه بیش‌ترین مقدار عددی پتانسیل آب را داشتند. پس از آن‌ها به‌ترتیب نارنج و ولکامریانا در رتبه‌های بعدی قرار داشتند که تمام تفاوت‌های موجود معنی‌دار بودند. همچنین مقدار این شاخص در پایان دوره آبیاری دوباره نسبت به پایان دوره تنش و در مورد گیاهان شاهد نسبت به تنش‌دیده به صورت معنی‌داری بیش‌تر بود. همچنین از نظر مقدار عددی محتوای نسبی آب تفاوت معنی‌داری بین رانگپورلایم، لیموی آب و نارنج وجود نداشت و این ۳ پایه به ترتیب بیش‌ترین مقادیر شاخص مذکور را دارا بودند. همچنین مقدار این شاخص در پایان دوره آبیاری دوباره نسبت به پایان دوره تنش و در مورد گیاهان شاهد نسبت به تنش‌دیده به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر بود (جدول ۱).

زیر تأثیر تنش خشکی، پتانسیل آب برگ‌ها در تمام پایه‌های دانهالی آزمایشی به صورت معنی‌دار کاهش یافت (منفی‌تر شد). به عبارت دیگر، میزان این شاخص در گیاهان شاهد نسبت به گیاهان تنش‌دیده نارنج، لیموی آب، رانگپورلایم و ولکامریانا به ترتیب ۱/۲۵، ۱/۲۶، ۱/۲۴ و ۳/۰۳ برابر بیش‌تر بود. در پایان دوره بهبودیابی، تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تنش دیده و شاهد وجود نداشت و بازیابی کامل در مورد همه پایه‌های دانهالی تنش دیده اتفاق افتاد. افزون بر این، به صورت مشابه، کاهش معنی‌دار محتوای نسبی آب در پایان دوره تنش در همه گیاهان تنش دیده مشاهده شد (در نارنج، لیموی آب، رانگپورلایم و ولکامریانا به ترتیب ۳۳/۵۲، ۴۷/۹۶، ۲۷/۷۴ و۶۲/۲۰ درصد) که همگی توان بازیابی کامل این شاخص را در پایان دوره بهبودیابی داشتند (شکل ۱).

با کاهش پتانسیل آب و کاهش محتوای نسبی آب (RWC) برگ در گیاهان عالی، نرخ فتوسنتز کاهش می‌یابد. مادامی‌که دستگاه فتوسنتزی دچار آسیب دائمی نشده باشند امکان بهبودی سریع به‌محض آبیاری دوباره وجود دارد (۲۶). چنین عنوان شده است که در شرایط تنش خشکی و پتانسیل آب درونی اندک، گیاهانی که محتوای نسبی آب در آن‌ها کاهش کمتری می‌یابد می‌توانند با انجام بهینه تنظیم اسمزی، وضعیت آب درونی خود را برای مدت طولانی‌تری حفظ کنند (۴۵). تنظیم اسمزی، به معنی انباشت فعال مواد محلول شامل مواد محلول معدنی جذب‌شده از خاک و مواد محلول آلی زیست‌سنتز شده، پاسخی به تنش خشکی است که تداوم جذب آب و حفظ فشار آماس یاخته را ممکن می‌سازد (۹). بنابراین، به نظر می‌رسد که در شرایط این آزمایش، هیچ‌کدام از پایه‌های دانهالی توان بهره‌مندی از تنظیم اسمزی با بیشینه کارآیی ممکن، به‌عنوان یکی از راهکارهای مهم رویارویی با تنش خشکی را نداشته‌اند؛ چون اگر چنین بود نباید در اثر تنش کاهش معنی‌داری در شاخص محتوای نسبی آب اتفاق می‌افتاد. البته، ممکن است دلیل وقوع این وضعیت، شرایط ویژه این آزمایش از نظر نوع و مدت اعمال تیمار تنش خشکی به صورت قطع کامل آبیاری به مدت ۱۴ روز باشد؛ به این مفهوم که، در چنین شرایطی به دلیل عدم وجود آب در دسترس در خاک نمی‌توان انتظار حفظ وضعیت آب درونی گیاهان تنش دیده را از راه تنظیم اسمزی داشت. بیان شده است در شرایط آبیاری مناسب، سهم توان هدایت هیدرولیکی ریشه در فرآیند جذب آب تا حدود ۶۷ درصد از کل محدودیت‌های موجود است، اما در شرایط کمبود آب در دسترس خاک، ماتریکس خاک مهم‌ترین فاکتور محدودکننده جذب آب است (۱۹). به عبارت دیگر، در چنین شرایطی تحمیل کاهش در هدایت هیدرولیکی گیاه می‌تواند بر کارآیی تنظیم اسمزی در حفظ وضعیت آبی شاخساره‌ها تأثیر منفی داشته باشد (۳۸). بنابراین، چنین برداشت شد که کاهش معنی‌دار پتانسیل آب برگی در اثر تنش به طور مشخص و بیش‌تر با کاهش محتوای آب درونی گیاهان و نه تنظیم اسمزی مرتبط بود.

جدول ۱- اثر فاکتورهای آزمایشی بر شاخص‌های فیزیولوژیک و زیست‌شیمیایی ارزیابی شده در برگ.

Table 1. Effect of experimental factors on the physiological and biochemical indices evaluated in leaves.

	بیشینه کارآیی کوانتومی سیستم نوری ۲ (Fv/Fm)	پتانسیل آب Water potential (Bar)	محتوای نسبی آب RWC (%)	نشت یونی Ion leakage (%)	محتوای مالون‌دی‌آلدهاید Malondialdehyde content (µmol g-1 FW)	محتوای کل کلروفیل Total chlorophyll content (µg g^{-1} FW)	محتوای پراکسید هیدروژن H_2O_2 content (µmol g^{-1} FW)	فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز SOD activity (Unit g^{-1} FW)	فعالیت آنزیم کاتالاز CAT activity (µmol H_2O_2 min^{-1} g^{-1} FW)	فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز GPX activity (µmol guaiacol min^{-1} g^{-1} FW)	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز APX activity (µmol ascorbate min^{-1} g^{-1} FW)
پایه **Rootstock**											
نارنج Souer orange	0.640 c	-14.250 b	69.045 a	32.220 a	0.458 a	199.104 d	1.315 a	92.750 a	2.552 c	412.697 d	46.480 c
ولکامریانا Volkameriana	0.792 a	-20.650 c	63.426 b	30.250 ab	0.240 d	290.521 b	0.615 d	75.750 c	4.983 a	633.271 c	83.713 b
لیموی آب Mexican lime	0.753 b	-11.781 a	69.516 a	28.940 b	0.337 b	317.250 a	0.813 c	76.500 c	4.119 b	880.517 a	120.191 a
رانگپورلایم Rangpur lime	0.738 b	-11.875 a	72.348 a	24.235 c	0.309 c	259.333 c	0.868 b	79.500 b	2.332 d	834.857 b	117.585 a
زمان نمونه‌گیری **Sampling time**											
نیمه دوره تنش خشکی Middle of drought stress period	0.731 b	-	-	-	-	260.906 b	-	-	-	-	-
پایان دوره تنش خشکی End of drought stress period	0.701 c	-18.656 b	58.292 b	30.850 a	0.390 a	273.375 a	0.916 a	89.250 a	3.596 a	741.518 a	81.417 b
پایان دوره آبیاری دوباره End of rewatering period	0.760 a	-10.622	78.876 a	26.972 b	0.282 b	265.375 b	0.890 b	73.000 b	3.396 b	639.153 b	102.568 a
تنش خشکی **Drought stress**											
شاهد Control	0.787 a	-12.031 a	76.864 a	25.833 b	0.213 b	277.094 a	0.736 b	61.000 b	2.253 b	674.204 b	88.907 b
زیر تنش Under stress	0.674 b	-17.247 b	60.304 b	31.989 a	0.459 a	256.010 b	1.070 a	101.250 a	4.740 a	706.466 a	95.077 a

For each experimental factor and evaluated index, means followed by the same letter are not significantly different by LSD test at $p \leq 0.05$.

بر اساس آزمون کمینه اختلاف معنی‌دار، برای هر فاکتور آزمایشی و شاخص ارزیابی شده، میانگین‌های دارای حرف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

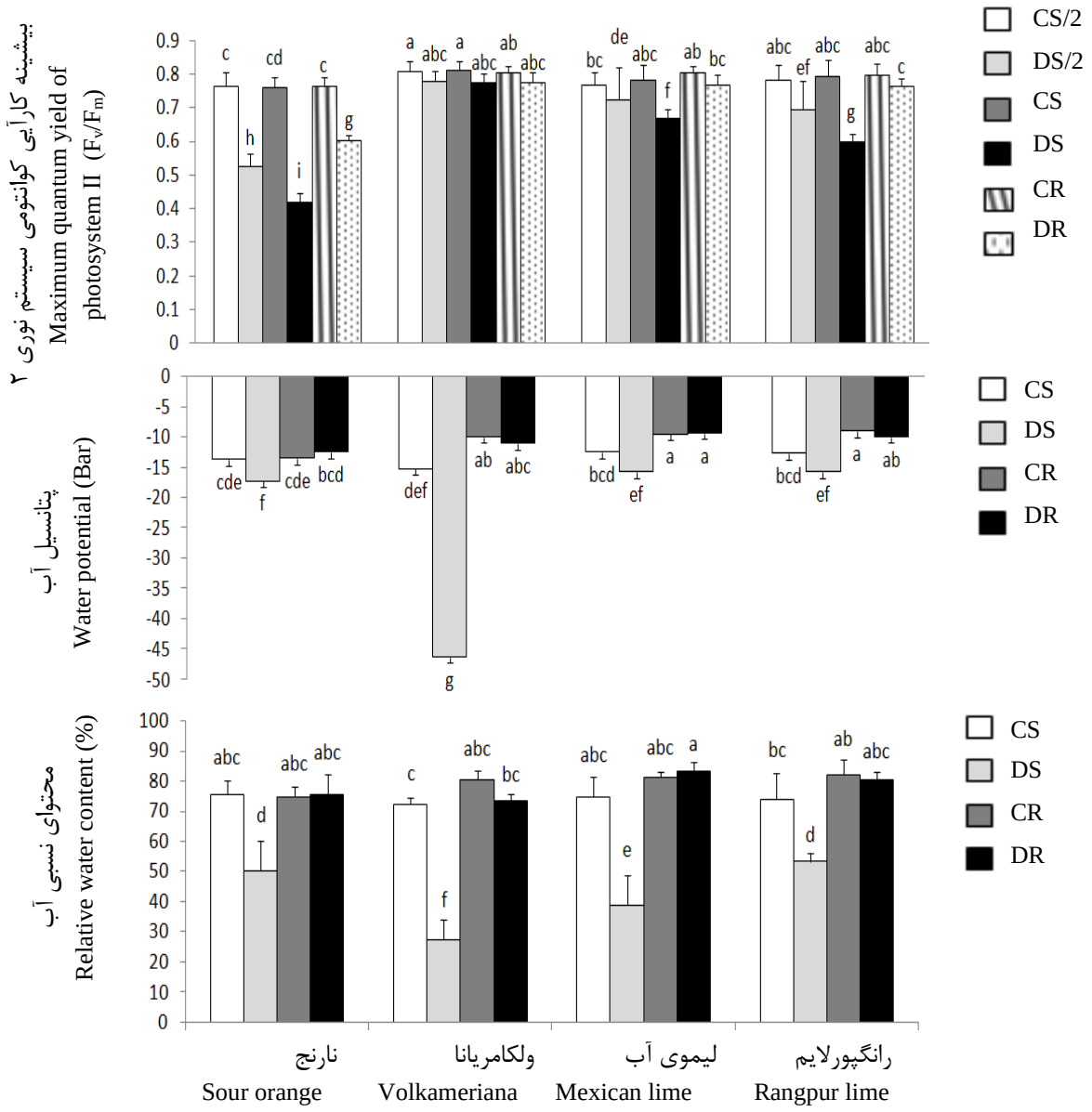

Fig. 1. Maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm), water potential and relative water content (RWC) in leaves of citrus seedlings under water stress and after rewatering. $C^{S}/_{2}$: control plant at the middle of stress period, $D^{S}/_{2}$: drought treated plant at the middle of stress period, CS: control plant at the end of stress period, DS: drought treated plant at the end of stress period, CR: control plant after rewatering period, DR: drought treated plant after rewatering period. Data are means of 4 replicates ± SD. Bars with the same letter are not significantly different using LSD test at $P \leq 0.05$

شکل ۱- بیشینه کارآیی کوانتومی سیستم نوری ۲ (Fv/Fm)، پتانسیل آب و محتوای نسبی آب (RWC) برگ‌های دانهال‌های مرکبات در شرایط تنش خشکی و پس از انجام آبیاری دوباره. $C^{S}/_{2}$: گیاه شاهد در نیمه دوره تنش، $D^{S}/_{2}$: گیاه زیر تنش در نیمه دوره تنش، CS: گیاه شاهد در پایان دوره تنش، SD: گیاه زیر تنش در پایان دوره تنش، CR: گیاه شاهد پس از دوره آبیاری دوباره، DR: گیاه زیر تنش پس از دوره آبیاری دوباره. داده‌ها میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار هستند. بر اساس آزمون کمینه اختلاف معنی‌دار، ستون‌های دارای حرف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

ارزیابی میزان نشت یونی و محتوای مالون‌دی‌آلدهاید

مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر سطوح فاکتورها نشان داد که نارنج بیش‌ترین میزان مطلق نشت یونی را دارا بود و لیموی آب و رانگپورلایم در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. البته تفاوت معنی‌داری بین ولکامریانا با نارنج و لیموی آب وجود نداشت. همچنین مقدار این شاخص در پایان دوره تنش نسبت به پایان دوره آبیاری دوباره و در مورد گیاهان تنش‌دیده نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری بیش‌تر بود. افزون بر این، به طور کلی تفاوت‌های معنی‌داری بین پایه‌های دانهالی آزمایشی از نظر مقدار مطلق عددی میزان مالون‌دی‌آلدهاید وجود داشت و به ترتیب نارنج، لیموی‌آب، رانگپورلایم و ولکامریانا بیش‌ترین تا کم‌ترین میزان پراکسیداسیون لیپیدی را دارا بودند. همچنین، مقدار این شاخص در پایان دوره تنش نسبت به پایان دوره آبیاری دوباره و در گیاهان تنش‌دیده نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری بیش‌تر بود (جدول ۱).

غشاهای زیستی، ساختارهایی پویا هستند که واکنش‌های زیست‌شیمیایی و زیست‌فیزیکی متعددی را مورد حمایت قرار می‌دهند و یکی از اهداف اصلی مورد حمله تنش‌های محیطی محسوب می‌شوند. اسیدهای چرب غیراشباع موجود در غشاها که به فراوانی در مولکول‌های گالاکتولیپیدها یافت می‌شوند، زیر تأثیر تنش به شدت پراکسیده می‌شوند (۸). مالون‌دی‌آلدهاید، محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی است. شدت بروز پراکسیداسیون لیپیدی و نشت یونی به میزان تولید رادیکال‌های آزاد در گیاهان بستگی دارد و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، یکی از دلایل اصلی کاهش سلامت و یکپارچگی غشاها است که منجر به افزایش نشت یونی می‌شود. بنابراین، شدت آسیب‌دیدگی غشاءها را در شرایط تنش‌های گوناگون محیطی (مانند تنش خشکی) می‌توان با ارزیابی محتوای مالون‌دی‌آلدهاید و نشت یونی ارزیابی نمود (۱۷). افزون بر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، افزایش نشت یونی می‌تواند به دلیل بروز تغییر در پیکربندی غشاءها و بروز تغییرهای زیست‌فیزیکی در ساختار آن‌ها باشد که احتمال بهبودیابی غشای آسیب‌دیده در این مورد بیش‌تر است. به بیان دیگر، پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به تغییرات بیوفیزیکی غشاءها آسیب جدی‌تری تلقی می‌شود (۸). حفظ محتوای نسبی آب در شرایط پتانسیل آبی اندک می‌تواند بیانگر استحکام بیشتر غشاءها و دیواره‌های یاخته‌ی و توانایی بیش‌تر گیاهان در پیش‌گیری و کاهش میزان تخریب‌ها و آسیب‌های ناشی از پسابیدگی بافت‌ها باشد (۲۱).

بررسی روند تغییر میزان نشت یونی (شکل ۲) نشان داد که در پایان دوره تنش خشکی میزان این شاخص به‌صورت معنی‌داری در تمام پایه‌های دانهالی آزمایشی افزایش یافته است (در نارنج، لیموی آب، رانگپورلایم و ولکامریانا به ترتیب ۱/۵۳، ۱/۳۲، ۱/۳۹ و ۱/۲۰ برابر) که با توجه به کاهش همزمان شاخص‌های محتوای نسبی آب و پتانسیل آب برگی در همه گیاهان (شکل ۱)، این انتظار نیز وجود داشت که نشت یونی در مورد همه پایه‌های تنش دیده افزایش یابد. در پایان دوره آبیاری دوباره، به استثنای نارنج، تفاوت معنی‌داری بین گیاهان شاهد و تنش‌دیده وجود نداشت و فقط در پایه‌های تنش‌دیده نارنج همچنان افزایش معنی‌دار و ۱/۴۹ برابری نشت یونی نسبت به شاهد وجود داشت و سایر پایه‌ها به صورت کامل بهبود یافتند (شکل ۲). ارزیابی محتوای مالون‌دی‌آلدهاید برگ‌ها به عنوان شاخص آسیب پراکسیداسیونی لیپیدهای غشایی نیز نشان داد که زیر تأثیر تنش، افزایش چشمگیر و معنی‌داری در مقدار آن در گیاهان نارنج، لیموی آب و رانگپور لایم (به ترتیب ۴/۲، ۲/۵ و ۳/۷۶ برابر) اتفاق افتاد و در تضاد با لیموی آب و رانگپورلایم، نارنج تنش دیده وضعیت نرمال را پس از آبیاری دوباره بازیابی ننمود و همچنان مقدار مالون‌دی‌آلدهاید آن به شدت نسبت به شاهد بیشتر بود (۴/۳۲ برابر). البته در مورد گیاهان تنش دیده ولکامریانا در پایان دوره‌های تنش و بهبودیابی کاهش این شاخص مشاهده شد که تفاوت‌های موجود با شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۲). بنابراین، اطلاعات مربوط به نشت یونی و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی دال بر آسیب ساختاری یاخته‌های برگی تمام گیاهان آزمایشی زیر تنش بود که البته در تضاد با نارنج، در مورد سایر پایه‌ها آسیب وارد شده از نوع برگشت‌پذیر بود و این گیاهان توانایی بازیابی وضعیت طبیعی را داشتند. افزون بر این، با توجه به این که خلاف سایر پایه‌ها، افزایش نشت یونی مشاهده شده در پایه‌های تنش دیده ولکامریانا با افزایش میزان مالون‌دی آلدهاید همراه نبود این نتیجه به دست آمد که تغییرات ایجاد شده در ساختار غشاءهای زیستی این گونه در اثر تنش، فقط از نوع بیوفیزیکی (و نه پراکسیداسیون لیپیدی) بوده است (۸). همچنین، عدم تغییر در میزان مالون‌دی‌آلدهاید در گیاهان تنش دیده ولکامریانا می‌تواند به دلیل وجود سیستم پاداکسایشی آنزیمی قوی باشد که مانع وقوع پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۸). در پژوهش انجام شده روی پایه‌های دانهالی ماکروفیلا، Gimeno و همکاران (۱۷) گزارش کردند که در شرایط تنش خشکی ملایم، محتوای مالون‌دی‌آلدهاید برگ‌ها و ریشه‌ها تغییر نکرد و آن را

با قدرت کافی نظام پاداکسایشی در این شرایط، برای مقابله با خسارت گونه‌های اکسیژن فعال مربوط دانستند. یافته‌های حاصل از بررسی روند تغییرات آنزیمی (که در ادامه به آن پرداخته شده است) (شکل ۳) نشان داد که به طور کلی عملکرد پاداکسایشی آنزیمی مربوط به پایه‌های تنش دیده ولکامریانا، لیموی آب و رانگپورلایم مطلوب بود و حتی پس از انجام آبیاری دوباره توان آنزیمی افزایش یافت و بنابراین کاهش مشاهده شده در میزان مالون‌دی‌آلدهاید برگ‌های پایه‌های لیموی آب و رانگپورلایم در این زمان (نسبت به پایان دوره تنش) را می‌توان به بهبود فعالیت سیستم آنزیمی آن‌ها مربوط دانست.

ارزیابی مقدار کل کلروفیل

مقدار کل کلروفیل برگ گیاهان در سه زمان (روزهای هفتم و چهاردهم تنش و روز هفدهم به عنوان پایان دوره آبیاری دوباره) ارزیابی شد. مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر سطوح فاکتورها نشان داد که به طور کلی تفاوت‌های معنی‌داری بین پایه‌های آزمایشی وجود داشت و از نظر مقدار مطلق عددی، به ترتیب لیموی آب، ولکامریانا، رانگپورلایم و نارنج بیش‌ترین تا کم‌ترین میزان کل کلروفیل برگی را دارا بودند. همچنین مقدار مطلق این شاخص در روز پایان دوره تنش نسبت به پایان دوره آبیاری دوباره و روز هفتم تنش به صورت معنی‌داری بیش‌تر بود و تفاوت معنی‌داری بین روزهای هفتم و هفدهم وجود نداشت. مقدار مطلق کلروفیل در گیاهان شاهد نسبت به تنش دیده به صورت معنی‌داری بیش‌تر بود (جدول ۱).

ارزیابی روند تغییرات میزان کل کلروفیل بیان‌گر این بود که زیر تأثیر تنش، مقدار کلروفیل پایه‌های دانهالی نارنج به صورت برگشت ناپذیری کاهش یافت. افزون بر این، کاهش برگشت‌پذیر میزان این شاخص در مورد گیاهان تنش دیده رانگپورلایم و لیموی آب مشاهده شد که وقوع کاهش معنی‌دار برای دو پایه مذکور به ترتیب در روزهای ۷ و ۱۴ تنش ثبت شد (شکل ۲). کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، به دلیل کاهش سرعت سنتز و یا تجزیه فوری آن‌ها، به عنوان یکی از نشانه‌های بارز وقوع تنش اکسایشی گزارش شده است. به عبارت دیگر، کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش خشکی می‌تواند به وقوع آسیب‌های اکسایشی ساختاری کلروپلاست و تخریب نوری این رنگیزه مربوط باشد (۴). گزارش شده است که در شرایط تنش خشکی ملایم تا متوسط، کاهش در محتوای رنگیزه‌های گیاهان تنش دیده بدون کاهش در نسبت Fv/Fm اتفاق می‌افتد و ارتباطی بین کاهش این دو شاخص وجود ندارد (۲۸). برخی پژوهشگران بر این باور هستند که این رفتار، سازوکاری محافظتی است؛ به این مفهوم که با کاهش محتوای رنگیزه‌ها، میزان جذب نور و احتمال وقوع آسیب ناشی از پدیده بازدارندگی نوری به دستگاه فتوسنتزی کاهش می‌یابد (۱۳). به هر حال، نکته قابل توجه در مورد پایه‌های لیموی آب و رانگپورلایم این است که در شرایط آبیاری دوباره، از نظر شاخص‌های میزان کلروفیل (شکل ۲) و بیشینه کارآیی کوانتومی سیستم نوری ۲ (شکل ۱) وضعیت بهبودی کامل را به دست آوردند. همان‌طور که بیان شد در روز هفتم از دوره تنش خشکی، با وجود کاهش معنی‌دار شاخص Fv/Fm در گیاهان تنش دیده لیموی آب (شکل ۱)، میزان کاهش محتوای کل کلروفیل معنی‌دار نبود (شکل ۲). افزون بر این، با وجود تشدید معنی‌دار آسیب اکسایشی دستگاه فتوسنتزی از منظر شاخص Fv/Fm (شکل ۱)، بین غلظت کلروفیل این گیاهان در روز هفتم و چهاردهم دوره تنش تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲). به صورت مشابه، روند اخیر در گیاهان تنش دیده رانگپورلایم نیز ثبت شد (شکل ۱ و ۲). بنابراین، این احتمال وجود دارد که کاهش محتوای کلروفیل این پایه‌ها به دلیل تخریب آن در اثر تنش اکسایشی نباشد، بلکه به عنوان سازوکار محافظتی، یکی از دلایل تخفیف شدت تنش وارده و برگشت‌پذیر بودن صدمه‌های وارده به دستگاه فتوسنتزی آن‌ها در شرایط این آزمایش باشد.

در مورد گیاهان تنش دیده ولکامریانا، در طول دوران تنش روند افزایشی در میزان کلروفیل مشاهده شد که مقدار این افزایش در روز ۱۴ تنش معنی‌دار بود. افزون بر این، میزان کلروفیل این گیاهان در پایان دوره بهبودیابی نیز بیش از پایه‌های شاهد بود که تفاوت موجود معنی‌دار نبود (شکل ۲). شاید دلیل افزایش کلروفیل پایه‌های تنش دیده ولکامریانا در شرایط این آزمایش، کاهش شدید محتوای نسبی آب و میزان آب درونی در شرایط تنش باشد که سبب افزایش غلظت این رنگیزه در این شرایط شده است. گزارش‌هایی مبنی بر افزایش میزان کلروفیل در اثر تیمار خشکی (۴۲) و نیز کاهش آن در این شرایط (۳۲) وجود دارند.

ارزیابی محتوای پراکسید هیدروژن

مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر سطوح فاکتورها نشان داد که به طور کلی تفاوت‌های معنی‌داری بین پایه‌های آزمایشی وجود داشت و از نظر مقدار مطلق عددی، به ترتیب نارنج، رانگپورلایم، لیموی آب و ولکامریانا بیش‌ترین تا کم‌ترین میزان پراکسید

هیدروژن را دارا بودند. همچنین مقدار مطلق این شاخص در پایان دوره تنش نسبت به پایان دوره آبیاری دوباره و در گیاهان تنش‌دیده نسبت به شاهد به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر بود (جدول ۱).

پراکسید هیدروژن یکی از انواع گونه‌های اکسیژن فعال و مولکولی پیام‌رسان و مهم در گیاهان است که البته میزان آن زیر فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده آن کنترل می‌شود. افزایش متعادل میزان پراکسید هیدروژن در شرایط تنش‌های محیطی مانند تنش خشکی، می‌تواند به عنوان پیام محرک بیان ژن‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان عمل کند و افزایش بیش از حد آن نیز می‌تواند برهم زننده توازن اکسیداسیون و احیای درون یاخته‌ها باشد و بنابراین خود سبب وقوع تنش اکسایشی بیش‌تر به اجزای یاخته‌ی شود که وقوع این وضعیت، بیانگر عملکرد غیر بهینه آنزیم‌های تجزیه‌کننده مسئول است (۶). پراکسید هیدروژن تولیدشده در شرایط تنش می‌تواند با رادیکال سوپراکسید واکنش دهد و به این ترتیب، رادیکال هیدروکسیل که به شدت واکنش‌پذیر است و محرک وقوع واکنش‌های زنجیره‌ای منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و تخریب پروتئین‌ها است، تولید شود (۶).

بررسی روند تغییرهای میزان پراکسید هیدروژن در شرایط پژوهش حاضر بیانگر افزایش معنی‌دار میزان آن نسبت به شاهد در گیاهان تنش دیده نارنج، لیموی آب و رانگپورلایم (به ترتیب ۲/۵۷، ۱/۱۹ و ۱/۶۵ برابر) بود. روند بالا در پایان دوره بهبودیابی نیز برقرار بود و مقادیر غلظت پراکسید هیدروژن گیاهان مذکور به ترتیب ۲/۱۸، ۱/۲۵ و ۱/۲۳ برابر بیش‌تر از گیاهان شاهد بود. از سوی دیگر، در پایان دوره تنش، در پایه‌های تنش دیده ولکامریانا کاهش معنی‌دار میزان پراکسید هیدروژن مشاهده شد که این روند در پایان دوره آبیاری دوباره نیز درست بود (شکل ۲). به علت ناتوانی پایه‌های تنش دیده نارنج در بازیابی وضعیت طبیعی خود در زمینه ویژگی‌هایی مانند بیشینه کارآیی کوانتومی سیستم نوری ۲ (شکل ۱)، میزان نشت یونی و محتوای مالون‌دی آلدهاید (شکل ۲)، این امکان وجود دارد که بخشی از آسیب ناشی از تنش با افزایش چشمگیر محتوای پراکسید هیدروژن به عنوان عامل وقوع تنش اکسایشی به غشاهای زیستی مربوط باشد. همان‌طور که اشاره شد کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهاید در گیاهان تنش دیده می‌تواند به دلیل وجود سیستم پاداکسایشی آنزیمی قوی باشد که مانع وقوع پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۸). عدم تغییر معنی‌دار در میزان مالون‌دی‌آلدهاید پایه‌های تنش دیده ولکامریانا همگام با کاهش معنی‌دار میزان پراکسید هیدروژن (شکل ۲) می‌تواند گویای عملکرد بهینه فعالیت‌های پاداکسایشی در پاسخ به تنش باشد. در مورد پایه‌های تنش‌دیده لیموی آب و رانگپورلایم نیز افزایش معنی‌دار میزان پراکسید هیدروژن در هر دو زمان انجام ارزیابی‌ها اتفاق افتاد که البته شدت افزایش نسبت به آنچه در مورد نارنج مشاهده شد، کمتر بود (شکل ۲). افزون بر این، فعالیت پاداکسایشی آنزیمی گیاهان تنش دیده این دو پایه نسبت به پایه نارنج، چه از نظر مقدار مطلق عددی و چه از نظر شدت افزایش وضعیت بهتری داشت (در ادامه شرح داده شده است) (شکل ۳). همان‌طور که بیان شد آسیب‌های وارد شده ناشی از تنش به این گیاهان قابل ترمیم بود و در نهایت بازیابی کامل در مورد شاخص‌های حیاتی پایه‌های مذکور اتفاق افتاد. بنابراین، چنین نتیجه‌گیری شد که به احتمال، تفسیر عادلانه این است که در پایه‌های مذکور میزان افزایش پراکسیدهیدروژن در حد ایجاد صدمه‌های اکسایشی برگشت‌ناپذیر ناشی از تنش نبوده است و در نهایت، در صورت پذیرفتن نقش پراکسید هیدروژن به عنوان عامل وقوع تنش اکسایشی، سازوکار پاداکسایشی آنزیمی این گونه‌ها در برقراری توازن اکسیداسیون و احیای یاخته‌ی موفق بوده است. به طور حتم، افزایش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌آلدهاید در پایه‌های تنش دیده لیموی آب و رانگپورلایم به معنی وقوع آسیب ناشی از تنش اکسایشی است، اما با توجه به عدم تشابه نسبت افزایش این شاخص با میزان افزایش پراکسید هیدروژن در شرایط تنش، محتمل به نظر می‌رسد که افزایش میزان پراکسید هیدروژن نقشی در وقوع تنش اکسایشی نداشته است؛ بلکه در زمینه پیام‌رسانی‌های دفاعی ایفای وظیفه نموده است که نقشی مثبت در برقراری دوباره توازن اکسایش و احیای یاخته تنش دیده محسوب می‌شود. پس از انجام آبیاری دوباره، مقدار پراکسید هیدروژن پایه‌های تنش دیده مذکور، نسبت به گیاهان شاهد، به صورت معنی‌دار بیش‌تر بود (شکل ۲) که این خود می‌تواند گواه اثبات ادعای بالا باشد. به عبارت دیگر، مقدار بیش‌تر پراکسید هیدروژن در حالی که گیاهان تنش دیده وضعیت طبیعی خود را در زمینه سایر ویژگی‌های حیاتی ارزیابی شده بازیابی نموده‌اند، می‌تواند مؤید نقش پیام‌رسانی این مولکول در فعال‌سازی سازوکار پاداکسایشی آنزیمی مسئول وقوع بهبودیابی در این دو پایه باشد که توجه به روند تغییر فعالیت آنزیمی پس از انجام آبیاری دوباره، تائید کننده مطلب بالا است (در ادامه به بحث روند تغییرهای آنزیمی پرداخته شده است) (شکل ۳).

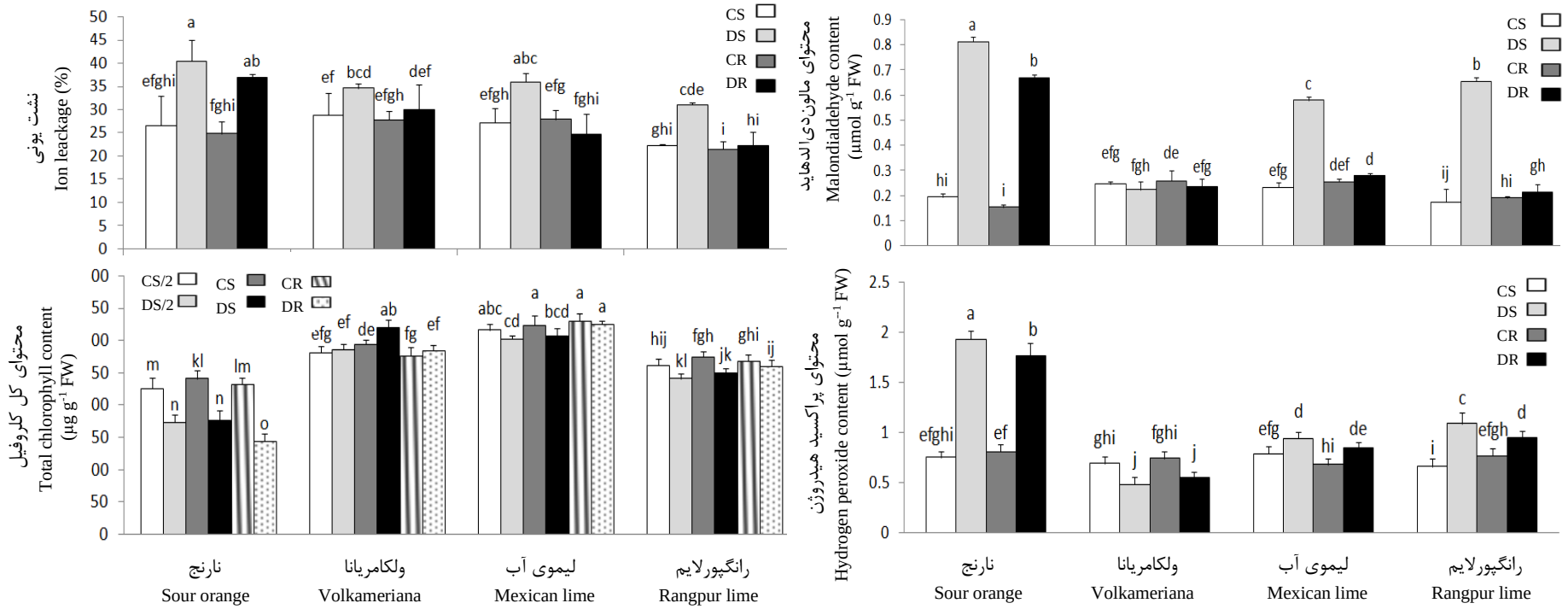

Fig. 2. Ion leackage, malondialdehyde (MDA) content, total chlorophyll content and hydrogen peroxide (H_2O_2) content in leaves of citrus seedlings under water stress and after rewatering. C $^{S}/_{2}$: control plant at the middle of stress period, D $^{S}/_{2}$: drought treated plant at the middle of stress period, CS: control plant at the end of stress period, DS: drought treated plant at the end of stress period, CR: control plant after rewatering period, DR: drought treated plant after rewatering period. Data are means of 4 replicates ± SD. Bars with the same letter are not significantly different using LSD test at $P \leq 0.05$.

شکل ۲- نشت یونی، محتوای مالون‌دی‌آلدهاید (MDA)، محتوای کل کلروفیل و محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2) برگ‌های دانهال‌های مرکبات در شرایط تنش خشکی و پس از انجام آبیاری دوباره. C $^{S}/_{2}$: گیاه شاهد در نیمه دوره تنش، D $^{S}/_{2}$: گیاه زیر تنش در نیمه دوره تنش، CS: گیاه شاهد در پایان دوره تنش، SD: گیاه زیر تنش در پایان دوره تنش، CR: گیاه شاهد پس از دوره آبیاری دوباره، DR: گیاه زیر تنش پس از دوره آبیاری دوباره. داده‌ها میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار هستند. بر اساس آزمون کمینه اختلاف معنی‌دار، ستون‌های دارای حرف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی

مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر سطوح فاکتورها نشان داد که از نظر مقدار مطلق عددی، به ترتیب نارنج و رانگپورلایم بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را دارا بودند. لیموی آب و ولکامریانا در رتبه‌های بعدی قرار داشتند و از نظر آماری تفاوتی میان آن‌ها وجود نداشت، اما تفاوت این دو پایه با پایه‌های قبلی معنی‌دار بود. افزون بر این، به طور کلی تفاوت‌های معنی‌داری بین پایه‌های آزمایشی از نظر مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز وجود داشت و به‌ترتیب ولکامریانا، لیموی آب، نارنج و رانگپورلایم بیش‌ترین تا کم‌ترین میزان فعالیت آنزیمی را دارا بودند. از نظر مقدار فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز به ترتیب لیموی آب، رانگپورلایم، ولکامریانا و نارنج بیش‌ترین تا کم‌ترین میزان فعالیت آنزیمی را دارا بودند و تمام تفاوت‌های موجود معنی‌دار بود. همچنین، مقدار مطلق فعالیت تمام آنزیم‌های بالا در پایان دوره تنش نسبت به پایان دوره آبیاری دوباره و در گیاهان تنش‌دیده نسبت به شاهد به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر بود. به ترتیب لیموی آب و رانگپورلایم بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را دارا بودند. ولکامریانا و نارنج در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. همچنین، این شاخص در پایان دوره آبیاری دوباره نسبت به پایان دوره تنش و در گیاهان تنش‌دیده نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری بیش‌تر بود (جدول ۱).

به طور معمول به دنبال بسته شدن روزنه‌ها در شرایط تنش خشکی، تنش اکسایشی اتفاق می‌افتد که با تولید زیاد گونه‌های فعال اکسیژن[۱] در یاخته‌ها همراه است (۲۸). خطر ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال به توانایی آن‌ها در تحریک شروع واکنش‌های منتهی به تولید رادیکال هیدروکسیل و انواع دیگر گونه‌های مخرب اکسیژن فعال مربوط است که می‌تواند سبب آسیب دیدگی پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدی، تخریب ماده ژنتیکی و در نهایت مرگ یاخته شود (۲). بخشی از محافظت گیاهان در برابر آسیب‌های اکسایشی ناشی از تنش خشکی، به واسطه فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی میسر می‌شود. سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گوایاکول پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و آنزیم‌های دیگر مسیر آسکوربات-گلوتاتیون[۲]، آنزیم‌های اصلی درگیر در پالایش گونه‌های اکسیژن فعال و کنترل کننده میزان آن‌ها در بخش‌های مختلف یاخته هستند (۲۰، ۲۸). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، رادیکال سوپراکسید را به پراکسیدهیدروژن تبدیل می‌کند و آنزیم‌های کاتالاز، گوایاکول پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز با تبدیل مولکول پراکسیدهیدروژن به مولکول آب، عمل پالایش این گونه اکسیژن فعال را انجام می‌دهند (۲۰). البته در شرایط تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی می‌تواند با افزایش یا کاهش همراه باشد و یا حتی بدون تغییر باقی بماند. شیوه پاسخ‌گویی به عواملی مانند نوع گونه و حتی رقم گیاهی، وضعیت سوخت‌وساز و مرحله فنولوژیکی آن، شدت و مدت دوران تنش و نوع آنزیم مورد بحث بستگی دارد (۲۰، ۳۲، ۴۲).

ارزیابی شدت فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در این پژوهش نشان داد که در شرایط تنش، افزایش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد در پایه های نارنج، لیموی آب و رانگپورلایم اتفاق افتاد (به ترتیب حدود ۱/۸۹، ۱/۷۳ و ۱/۸۰ برابر) و این روند افزایشی تا پایان دوره بهبودیابی برقرار بود (به ترتیب حدود ۲/۳۱، ۱/۱۲ و ۱/۱۱ برابر). در مورد ولکامریانا نیز افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در شرایط تنش مشاهده شد (حدود ۲/۶۳ برابر) و میزان افزایش نسبت به پایه‌های دیگر بیشتر بود، اما در پایان دوره آزمایش، تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تنش دیده و شاهد وجود نداشت (شکل ۳).

بررسی نتیجه‌های مربوط به فعالیت آنزیم کاتالاز گیاهان آزمایشی نشان داد که در شرایط تنش و در پایه‌های لیموی آب و رانگپورلایم، افزایش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهان شاهد اتفاق افتاد (به ترتیب حدود ۱/۱۱ و ۱/۱۸ برابر) و این روند تا پایان دوره بهبودیابی برقرار بود (به ترتیب حدود ۱/۶۴ و ۲/۵۵ برابر). فعالیت این آنزیم در پایه‌های تنش دیده نارنج در روزهای پایان دوره تنش و پایان دوره بهبودیابی به ترتیب حدود ۰/۷۹ و ۳/۱۴ برابر گیاهان شاهد بود (به ترتیب روند کاهشی و افزایشی) که تفاوت‌های مذکور از نظر آماری معنی‌دار بودند. فعالیت آنزیم کاتالاز در پایه‌های ولکامریانا نیز زیر تأثیر تنش افزایش معنی‌داری به میزان حدود ۶/۳۴ برابر (بیش از سایر پایه‌ها) داشت و در پایان دوره آزمایش به حدود ۰/۹۵ برابر شاهد رسید که تفاوتی معنی‌دار بود (شکل ۳).

۱- Reactive oxygen species (ROS)

۲- Ascorbate-glutathione pathway

ارزیابی‌ها نشان داد که زیر تأثیر تنش، شدت فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز در پایه‌های تنش دیده نارنج و لیموی آب به حدود ۰/۸۶ و ۰/۷۰ برابر گیاهان شاهد کاهش یافت که البته پس از آبیاری دوباره، به ترتیب با افزایش حدود ۱/۴۲ و ۱/۴۶ برابری نسبت به گیاهان شاهد همراه بود و تمام تفاوت‌های موجود بین گیاهان تیمار شده و شاهد در هر دو زمان معنی‌دار بود. فعالیت آنزیمی پایه‌های تنش دیده رانگپورلایم نیز حدود ۰/۹۵ برابر گیاهان شاهد بود که تفاوت مذکور معنی‌دار بود و پس از انجام آبیاری دوباره، بازیابی کامل به وقوع پیوست. پایه‌های تنش دیده ولکامریانا نیز در هر دو زمان انجام ارزیابی‌ها فعالیت آنزیمی بیش‌تری نسبت به شاهد داشتند (به ترتیب حدود ۱/۱۹ و ۱/۲۱ برابر) که تفاوت‌های موجود از نظر آماری معنی‌دار بودند (شکل ۳).

روند کاهشی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تنش‌دیده نارنج، ولکامریانا و رانگپورلایم (به ترتیب حدود ۰/۶۸، ۰/۸۱ و ۰/۹۱ برابر گیاهان شاهد) تنها در مورد نارنج معنی‌دار بود. به دنبال آبیاری دوباره، افزایش معنی‌دار در فعالیت این آنزیم در پایه های ولکامریانا و رانگپورلایم (به ترتیب حدود ۱/۶۲ و ۱/۵۶ برابر گیاهان شاهد) مشاهده شد، اما فعالیت آنزیمی گیاهان تنش دیده نارنج همچنان حدود ۰/۶۳ برابر گیاهان شاهد و به صورت معنی‌داری کمتر بود. نتیجه‌ها نشان دادند که پایه‌های تنش دیده لیموی آب در هر دو زمان انجام ارزیابی‌ها نسبت به شاهد افزایشی جزئی در فعالیت این آنزیم داشتند (شکل ۳).

آنچه از بررسی نتیجه‌های ارزیابی‌های آنزیمی استنباط شد این بود که به طور کلی وضعیت فعالیت‌های آنزیمی دفاعی در شرایط تنش در مورد پایه‌های ولکامریانا نسبت به سایر گیاهان آزمایشی بهتر بود و به جز کاهش مشاهده شده در مورد آنزیم آسکوربات پراکسیداز، فعالیت سایر آنزیم‌های مورد مطالعه این پایه در شرایط تنش افزایش یافت (شکل ۳). همان طور که اشاره شد در تائید این موضوع می‌توان به روند کاهشی میزان مالون‌دی‌آلدهاید و پراکسید هیدروژن برگی (شکل ۲) و حفظ کارآیی کوانتومی سیستم نوری ۲ (شکل ۱) در این پایه در شرایط تنش اشاره کرد. افزایش چشمگیر مشاهده شده در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گوایاکول پراکسیداز نشان‌دهنده قدرت بالای سد دفاعی آنزیمی در مقابل تنش بود، زیرا آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مسئول خنثی‌سازی رادیکال خطرناک سوپراکسید و تبدیل آن به مولکول کم خطرتر پراکسید هیدروژن است و به دنبال آن آنزیم‌های کاتالاز و گوایاکول پراکسیداز تجزیه‌کننده این مولکول هستند (۲۰). آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز مشابه با کاتالاز و گوایاکول پراکسیداز وظیفه پالایش پراکسید هیدروژن را دارد (۲۰)، اما کاهش غیر معنی‌دار فعالیت این آنزیم در شرایط تنش به احتمال می‌تواند بیانگر عدم نقش آفرینی عمده این آنزیم در سازوکارهای پاداکسایشی گونه ولکامریانا باشد. به صورت مشابه، Gholami و همکاران (۱۶) در پژوهش خود روی قلمه‌های ریشه‌دار شده انجیر گزارش کردند که با اعمال تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم‌های 'دیم دهدز' و 'سبز استهبان' تغییر نکرد ولی در رقم‌های 'سیاه' و 'شاه‌انجیر' به شدت کاهش یافت. بنابراین، چنین نتیجه گرفتند که آنزیم مذکور وظیفه پاداکسایشی عمده‌ای در سیستم دفاعی انجیر ندارد.

ارزیابی‌های مربوط به پایان دوره آبیاری دوباره بیانگر افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گوایاکول پراکسیداز و کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در پایه ولکامریانا بودند (شکل ۳). کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌تواند مؤید وجود وضعیت فیزیولوژیک طبیعی در شرایط آبیاری دوباره باشد که با آنچه از بررسی شاخص‌های ارزیابی شده دیگر (شکل ۱ و ۲) مشاهده شد، همخوانی دارد و گیاهان تنش دیده ولکامریانا در پایان آزمایش شرایطی مشابه با گیاهان شاهد داشتند. افزایش فعالیت آنزیم‌های گوایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز گیاهان تنش دیده در پایان دوره بهبودیابی نیز می‌تواند بیان‌گر فعال شدن پاسخ‌های دفاعی زیر تأثیر آبیاری دوباره باشد و به نوعی مؤید این مطلب است که در شرایط عدم وجود تنش شدید، آنزیم آسکوربات پراکسیداز می‌تواند بخشی از قدرت دفاعی یاخته را برعهده داشته باشد. به صورت مشابه، Xu و همکاران (۴۸) افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز را در گیاهان تنش‌دیده Poa pratensis رقم 'میدنایت'[۱] در پاسخ به انجام آبیاری دوباره گزارش کردند و آن را مسئول وقوع بهبودیابی از شرایط تنش در رقم مذکور دانستند. غلامی (۱۵) نیز افزایش سطح فعالیت آنزیم گوایاکول‌پراکسیداز را در پاسخ به آبیاری دوباره، به تحریک وقوع خوگیری به شرایط خشکی شدیدتر و یا سایر تنش‌ها در قلمه‌های تنش دیده انجیر مربوط دانستند.

۱- Midnight

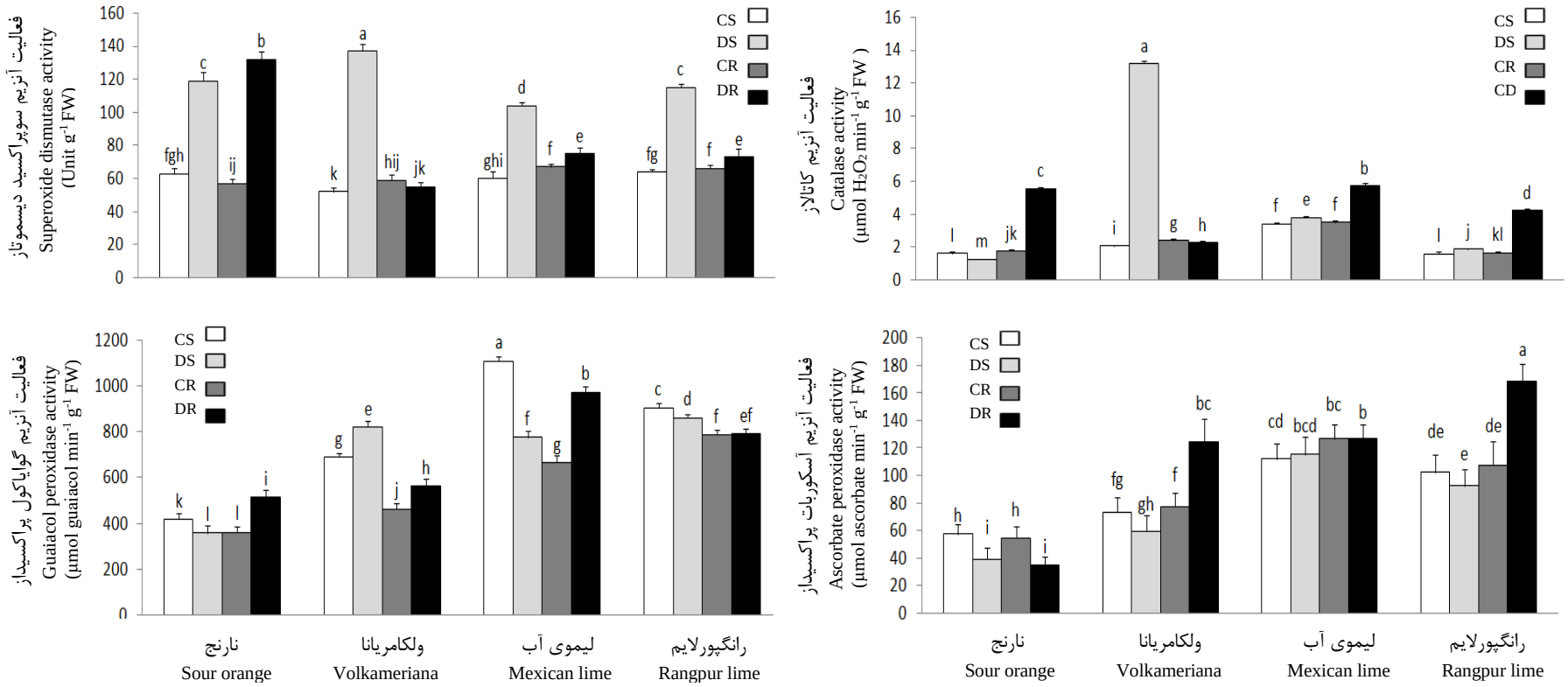

Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX) and ascorbate peroxidase (APX) activity in leaves of citrus seedlings under water stress and after rewatering. CS: control plant at the end of stress period, DS: drought treated plant at the end of stress period, CR: control plant after rewatering period, DR: drought treated plant after rewatering period. Data are means of 4 replicates ± SD. Bars with the same letter are not significantly different using LSD test at $P \leq 0.05$.

شکل ۳- فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گوایاکول پراکسیداز (GPX) و آسکوربات پراکسیداز (APX) برگ‌های دانهال‌های مرکبات در شرایط تنش خشکی و پس از انجام آبیاری دوباره. CS: گیاه شاهد در پایان دوره تنش، DS: گیاه زیر تنش در پایان دوره تنش، CR: گیاه شاهد پس از دوره آبیاری دوباره، DR: گیاه زیر تنش پس از دوره آبیاری دوباره. داده‌ها میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار هستند. بر اساس آزمون کمینه اختلاف معنی‌دار، ستون‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

افزایش معنی‌دار فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در پایه‌های تنش دیده نارنج (شکل ۳) به همراه تغییرهای مشاهده شده در ویژگی‌های ارزیابی شده دیگر (که پیش‌تر بیان شدند) (شکل ۱ و ۲)، حاکی از وقوع آسیب شدید ناشی از تنش خشکی به گیاهان این گونه بود. همان طور که نتیجه‌ها نشان می‌دهند فعالیت سایر آنزیم‌های دفاعی نیز با کاهش معنی‌دار مواجه شدند (شکل ۳) و این بیان‌گر ناکارآمدی سیستم دفاعی آنزیمی در گیاهان تنش دیده نارنج در شرایط این آزمایش بود. پراکسید هیدروژن در پی‌اچ فیزیولوژیک یاخته‌ها به فرم خنثی وجود دارد و می‌تواند به آسانی از درون غشاءهای زیستی عبور کند. بنابراین، افزایش بیش از حد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، به مفهوم عدم وجود همسویی در افزایش فعالیت این آنزیم و آنزیم‌های دیگر مسئول تجزیه پراکسید هیدروژن (گوایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز)، می‌تواند آشکارا خطری جدی برای یاخته تلقی شود و سبب تولید انواع گونه‌های دیگر اکسیژن فعال و خسارت جبران ناپذیر اکسایشی به اجزای یاخته شود (۶). به احتمال، مدت در نظر گرفته شده برای اعمال تنش به شیوه قطع کامل آبیاری، بیش از حد توان این گونه بوده است. افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گوایاکول پراکسیداز در شرایط آبیاری دوباره (شکل ۳)، بیان‌گر تلاش سیستم آنزیمی برای رفع آثار مخرب تنش وارد شده است، اما نتیجه‌های مربوط به سایر ویژگی‌های ارزیابی شده (شکل ۱ و ۲)، مؤید ناکارآمدی این تلاش و برگشت ناپذیر بودن صدمات وارد شده در شرایط این آزمایش بودند. به صورت مشابه، Xu و همکاران (۴۸) تاکید نمودند که با ورود آب به درون یاخته‌ها پس از آبگیری دوباره، نسبت به زمان وقوع تنش خشکی، نیاز به سازوکار ترمیمی کارآمدتری جهت بازیابی ثبات و یکپارچگی ساختاری غشاءهای زیستی وجود دارد، به عنوان نمونه نیاز به افزایش موثر فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی وجود دارد تا بتوانند محافظت بهتری را برای اجزای مختلف یاخته در مقابل آسیب پراکسید هیدروژن ایجاد کنند و در نهایت بهبودیابی کامل سوخت و ساز گیاه ممکن شود. عدم بازیابی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز پس از آبیاری دوباره و وجود تفاوت معنی‌دار با گیاهان شاهد (شکل ۳) نیز می‌تواند دال بر نبود نقش آفرینی حیاتی این آنزیم در فعالیت‌های دفاعی گونه نارنج باشد که در مورد ولکامریانا در شرایط تنش شدید نیز چنین استنباطی وجود داشت.

مقادیر مطلق عددی و روند تغییرات فعالیت‌های آنزیمی در شرایط این آزمایش (شکل ۳) نشان می‌دهند که پایه‌های تنش دیده لیموی آب و رانگپورلایم از توان دفاعی آنزیمی قابل قبولی برخوردار بودند و در نهایت، با توجه به نتیجه‌های صفات ارزیابی شده دیگر (شکل ۱ و ۲)، توانا به بازیابی وضعیت فیزیولوژیک طبیعی خود در شرایط رفع تنش پس از آبیاری دوباره بودند. با وجود کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز در گیاهان تنش دیده از این حقیقت نباید غافل شد که دامنه مطلق عددی فعالیت این آنزیم در این دو پایه بیش از پایه‌های نارنج و ولکامریانا بود (شکل ۳)، به این مفهوم که به صورت ذاتی میزان بیان و یا فعالیت این آنزیم در این پایه‌ها زیاد بود و احتمال بهره‌مندی سیستم دفاعی آنزیمی آن‌ها از این موضوع وجود دارد. ضمن این که در پایان دوره آبیاری دوباره، میزان فعالیت این آنزیم در این پایه‌ها افزایش یافت که تفاوت موجود در مورد لیموی آب معنی‌دار بود (شکل ۳). روند افزایشی جزئی شدت فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در هر دو زمان ارزیابی در گیاهان تنش دیده لیموی آب می‌تواند دال بر بی اهمیت بودن نقش این آنزیم در بحث دفاع آنزیمی گونه مذکور در شرایط تنش باشد. البته با توجه به بالا بودن دامنه مطلق عددی فعالیت این آنزیم در گیاهان شاهد می توان این احتمال را در نظر گرفت که به نوعی آنزیم مذکور نقش مثبت خود را در این گونه گیاهی ایفا کرده است و سیستم دفاعی گیاه از اثرهای آن بهره‌مند شده است. در مورد گیاهان تنش دیده رانگپورلایم نیز کاهش جزئی فعالیت این آنزیم مشاهده شد که با افزایش معنی‌دار در وضعیت بهبودیابی همراه بود (شکل ۳). بالا بودن دامنه مطلق عددی فعالیت آنزیمی در این گونه گیاهی همراه با افزایش معنی‌دار و چشمگیر آن در پاسخ به آبیاری دوباره ممکن است مؤید نقش مهم این آنزیم در تعدیل اثرهای منفی تنش و کسب بهبودی پس از آبیاری دوباره باشد. به صورت مشابه، Xu و همکاران (۴۸) گزارش کردند که در شرایط تنش خشکی، با وجود عدم تغییر معنی‌دار فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز در رقم‌های متحمل و حساس به تنش خشکی نوعی چمن، فعالیت این آنزیم در گیاهان شاهد رقم متحمل نسبت به رقم حساس بیش‌تر بود و آن را با پتانسیل بالاتر آن در پالایش پراکسید هیدروژن مرتبط دانستند.

به نظر می‌رسد افزون بر مقدار مطلق عددی شدت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مقادیر نسبت فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده پراکسید هیدروژن به فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز شاخصی مهم و حیاتی در ارزیابی دقیق پتانسیل تحمل تنش خشکی در گونه‌ها و رقم‌های مختلف است. به عنوان نمونه، Bhatt و همکاران (۶) با انجام پژوهشی روی ۵ رقم از گونه ارزن با

گستره پراکنش جغرافیایی متفاوت، برای اولین بار براساس نتیجه‌های به دست آمده اعلام کردند که شاخص نسبت فعالیت آسکوربات پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز شاخصی مهم و کاربردی برای تشخیص رقم‌های متحمل ارزن است.

مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر سطوح فاکتورها (جدول ۲) نشان داد که بیش‌ترین مقادیر نسبت فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گوایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب در برگ‌های لیموی آب و ولکامریانا؛ لیموی آب؛ و لیموی آب و رانگپورلایم وجود داشت. همچنین، در پایان دوره اعمال تنش خشکی نسبت به انتهای دوره آبیاری دوباره، مقادیر اندازه‌گیری شده نسبت فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز کم‌تر و نسبت فعالیت گوایاکول پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز بیش‌تر بود. گیاهان زیر تنش نسبت به شاهد، نسبت فعالیت آنزیم کاتالاز به سوپراکسید دیسموتاز بیش‌تر و نسبت فعالیت آنزیم‌های گوایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز کم‌تری داشتند. پس از اعمال تنش خشکی، به جز نارنج، در تمام پایه‌ها افزایش معنی‌دار مقدار مطلق فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۳)، اما از دید تغییر در نسبت فعالیت آنزیم کاتالاز به سوپراکسید دیسموتاز، تنها پایه ولکامریانا با افزایش معنی‌دار و مابقی پایه‌ها با کاهشی معنی‌دار در این شاخص مواجه شدند. نسبت یادشده در پایه‌های تنش دیده ولکامریانا، لیموی آب، رانگپورلایم و نارنج به ترتیب ۰/۰۹۶، ۰/۰۳۷، ۰/۰۱۶ و ۰/۰۱۱ برابر بود که تفاوت بین دو پایه ولکامریانا و لیموی آب با هم و با دو پایه دیگر معنی‌دار بود (شکل ۴). در این زمان، بیش‌ترین مقادیر نسبت فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز در پایه‌های زیر تنش به ترتیب با نسبت ۷/۴۸۲ و ۷/۴۵۲ برابر مربوط به رانگپورلایم و لیموی آب بود و تفاوت آن‌ها با ولکامریانا و نارنج معنی‌دار بود. با وجود این حقیقت که مقدار مطلق عددی فعالیت گوایاکول پراکسیداز در برگ رانگپورلایم به صورت معنی‌داری بیش‌تر از لیموی آب بود، اما از نظر نسبت فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز تفاوتی بین آن‌ها وجود نداشت (شکل ۴). افزون‌بر این که از نظر مقدار مطلق عددی، لیموی آب و رانگپورلایم زیر تنش به ترتیب بیش‌ترین مقدار مطلق فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در انتهای دوره تنش به خود اختصاص دادند (شکل ۳)، از نظر آماری بیش‌ترین نسبت فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز به میزان ۱/۱۰۷ برابر مربوط به لیموی آب بود و پس از آن پایه رانگپورلایم با نسبت ۰/۸۰۴ برابر در رتبه بعدی و ولکامریانا و نارنج نیز در رتبه آخر قرار داشتند (شکل ۴). بنابراین، پس از اعمال تنش خشکی، از نظر آماری بیش‌ترین مقادیر نسبت فعالیت آنزیم‌های گوایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز در پایه‌های تنش دیده لیموی آب و رانگپورلایم مشاهده شد (شکل ۴) و این خود می‌تواند مؤید کارآ بودن سازوکار پاداکسایشی آنزیمی این پایه‌ها در شرایط تنش و اهمیت نقش آنزیم‌های گوایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به عنوان شالوده این سازوکار باشد.

پس از آبیاری دوباره پایه‌های زیر تنش، مقدار مطلق فعالیت کاتالاز در برگ نارنج به صورت معنی‌داری بیش‌تر از ولکامریانا و رانگپورلایم بود (شکل ۳)، اما نسبت فعالیت آنزیمی کاتالاز به سوپراکسید دیسموتاز در نارنج مشابه با ولکامریانا و به صورت معنی‌داری کم‌تر از رانگپورلایم بود (شکل ۴). به عبارت دیگر، از نظر آماری، بیش‌ترین نسبت فعالیت آنزیمی کاتالاز به سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان زیر تنش به ترتیب متعلق به لیموی آب (۰/۰۷۷ برابر) و رانگپورلایم (۰/۰۵۸ برابر) بود و دو پایه نارنج و ولکامریانا (هر دو با نسبت ۰/۰۴۲ برابر) در رتبه بعدی قرار داشتند. البته، این نسبت به صورت معنی‌داری در مورد همه پایه‌های زیر تنش، غیر از ولکامریانا، نسبت به شاهد و نیز مقادیر اندازه‌گیری شده پس از اعمال تنش بیش‌تر بود (شکل ۴). افزون بر این، در این زمان بیش‌ترین نسبت فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان زیر تنش متعلق به لیموی آب (۱۲/۳۰۰ برابر) بود و در رتبه بعدی دو پایه رانگپورلایم (۱۰/۸۵۳ برابر) و ولکامریانا (۱۰/۲۵۱ برابر) و در نهایت نارنج (۳/۸۹۶ برابر) در رتبه آخر قرار داشت. مقادیر مربوط به لیموی آب و ولکامریانا نسبت به شاهد و مقادیر اندازه‌گیری شده پس از اعمال تنش بیش‌تر بود. در مورد رانگپورلایم و نارنج زیر تنش، با وجود افزایش نسبت فعالیت آنزیمی در پایان دوره آبیاری دوباره نسبت به پایان دوره تنش، مقادیر اندازه‌گیری شده نسبت به شاهد کم‌تر بودند (شکل ۴). در پایان آزمایش، بیش‌ترین مقادیر نسبت فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز متعلق به رانگپورلایم و ولکامریانا زیر تنش بود (به ترتیب ۲/۳۰۵ و ۲/۲۷۴ برابر) که هم نسبت به شاهد و هم مقادیر اندازه‌گیری شده پس از اعمال تنش خشکی به صورت معنی‌داری بیش‌تر بودند. پس از آن‌ها، لیموی آب (با نسبت ۱/۶۹۶ برابر) و در نهایت نارنج (با نسبت ۰/۲۶۲ برابر) در رتبه‌های بعدی قرار داشتند با این

تفاوت که نسبت فعالیت آنزیمی لیموی آب زیر تنش نسبت به شاهد بی‌تغییر، اما نسبت به پایان دوره تنش به صورت معنی‌داری بیش‌تر بود؛ در حالی که این نسبت در مورد نارنج با آن‌چه پس از اعمال تنش ثبت شد، تفاوتی نداشت (شکل ۴).

جدول ۲- اثر فاکتورهای آزمایشی بر نسبت‌های فعالیت آنزیمی ارزیابی شده در برگ.

Table 2. Effect of experimental factors on the enzymatic activity ratios evaluated in leaves.

	نسبت فعالیت آنزیم کاتالاز به سوپراکسید دیسموتاز Catalase to superoxide dismutase activity ratio	نسبت فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز Guaiacol peroxidase to superoxide dismutase activity	نسبت فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز Ascorbate peroxidase to superoxide dismutase activity
پایه Rootstock			
نارنج Souer orange	0.027 c	4.970 d	0.615 c
ولکامریانا Volkameriana	0.547 a	9.345 c	1.360 b
لیموی آب Mexican lime	0.557 a	12.230 a	1.642 a
رانگپورلایم Rangpur lime	0.310 b	11.092 b	1.584 a
زمان نمونه‌گیری Sampling time			
پایان دوره تنش خشکی End of drought stress period	0.038 b	9.563 a	1.061 b
پایان دوره آبیاری دوباره End of rewatering period	0.046 a	9.256 b	1.540 a
تنش خشکی Drought stress			
شاهد Control	0.037 b	11.077 a	1.450 a
زیر تنش Under stress	0.047 a	7.742 b	1.151 b

For each experimental factor and evaluated index, means followed by the same letter are not significantly different by LSD test at $p \leq 0.05$.

بر اساس آزمون کمینه اختلاف معنی‌دار، برای هر فاکتور آزمایشی و شاخص ارزیابی شده، میانگین‌های دارای حرف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

با وجود این که پس از آبیاری دوباره مقدار مطلق عددی فعالیت آنزیم گوایاکول پراکسیداز در برگ پایه زیر تنش ولکامریانا به صورت معنی‌داری کم‌تر از رانگپورلایم بود و نیز مقدار مطلق عددی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ولکامریانا مشابه با لیموی آب و کم‌تر از رانگپورلایم بود (شکل ۳)، اما از دید نسبت‌های فعالیت دو آنزیم نامبرده به فعالیت سوپراکسید دیسموتاز تفاوتی بین ولکامریانا با رانگپورلایم وجود نداشت و حتی نسبت فعالیت آسکوربات پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز در ولکامریانا به صورت معنی‌داری بیش‌تر از لیموی آب بود (شکل ۴).

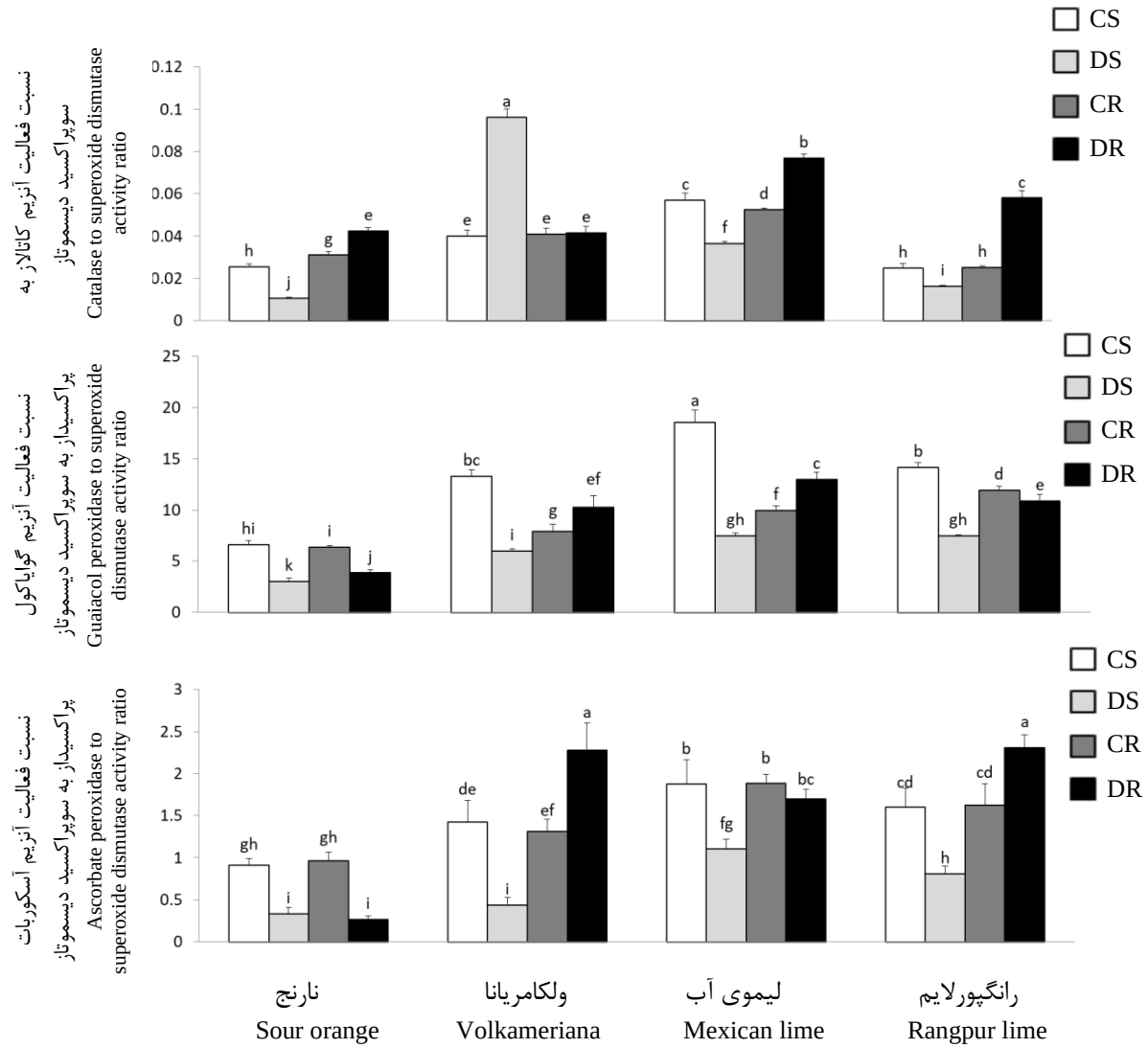

Fig. 4. The ratio of catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX) and ascorbate peroxidase (APX) to superoxide dismutase (SOD) activity in leaves of citrus seedlings under water stress and after rewatering. CS: control plant at the end of stress period, DS: drought treated plant at the end of stress period, CR: control plant after rewatering period, DR: drought treated plant after rewatering period. Data are means of 4 replicates ± SD. Bars with the same letter are not significantly different using LSD test at $P \leq 0.05$.

شکل ۴- نسبت فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، گوایاکول پراکسیداز (GPX) و آسکوربات پراکسیداز (APX) به فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) برگ‌های دانهال‌های مرکبات در شرایط تنش خشکی و پس از انجام آبیاری دوباره. CS: گیاه شاهد در پایان دوره تنش، DS: گیاه زیر تنش در پایان دوره تنش، CR: گیاه شاهد پس از دوره آبیاری دوباره، DR: گیاه زیر تنش پس از دوره آبیاری دوباره. داده‌ها میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار هستند. بر اساس آزمون کمینه اختلاف معنی‌دار، ستون‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

افزایش معنی‌دار در نسبت فعالیت آنزیم کاتالاز به سوپراکسید دیسموتاز پس از آبیاری دوباره پایه‌های زیر تنش لیموی آب و رانگپورلایم نسبت به پایان دوره تنش خشکی و شاهد و افزایش متناظر در نسبت فعالیت آنزیم‌های گوایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به سوپراکسید دیسموتاز در پایه‌های رانگپورلایم، لیموی آب و ولکامریانا نسبت به انتهای مرحله تنش و حتی در اغلب موارد نسبت به شاهد، می‌تواند مؤید نقش موثر سیستم پاداکسایشی آنزیمی در وقوع بهبودیابی از آسیب‌های ناشی

از تنش در پایه‌های لیموی آب و رانگپورلایم و نیز کسب توان خوگیری به شرایط تنش‌های احتمالی پیش‌رو در پایه‌های تنش دیده ولکامریانا باشد. به عبارت دیگر، با توجه به این که ارزیابی شاخص‌های گوناگون غیر آنزیمی دال بر عدم وقوع آسیب‌های معنی‌دار ناشی از تنش در پایه‌های تنش دیده ولکامریانا هستند، روند افزایشی نسبت فعالیت‌های آنزیمی می‌تواند به این مفهوم باشد که زیر تأثیر انجام آبیاری دوباره، توان بالاتر محافظتی جهت ایمنی بیش‌تر در صورت رویایی با تنش‌های جدید کسب شده است. محتمل است بخشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های مذکور پس از آبیاری دوباره، به فعال‌سازی بیان ژن‌های مرتبط با ساخت این آنزیم‌ها مرتبط باشد که نیاز به بررسی‌های بیش‌تر مولکولی دارد.

نتیجه‌گیری

همان‌گونه که بیان شد، در نتیجه‌های مربوط به پژوهش‌های پیشین به وجود توانایی تحمل تنش خشکی در پایه‌های رانگپورلایم و ولکامریانا اشاره شده است. یافته‌های پژوهش حاضر نیز مؤید توان بالای تحمل تنش خشکی در این پایه‌ها بود،؛ به گونه‌ای که آسیب‌های وارد شده به پایه رانگپورلایم برگشت‌پذیر بودند و این پایه پس از تیمار آبیاری دوباره توانا به بهبودیابی و برگشت به وضعیت طبیعی فیزیولوژیک خود بود. افزون بر این، در مواجهه با تیمار خشکی آسیب جدی و معنی‌داری به پایه‌های ولکامریانا وارد نشد و در ضمن، پس از انجام آبیاری دوباره توان خوگیری به شرایط تنش‌زا در آن‌ها ایجاد شد که می‌تواند جهت رویارویی احتمالی با شرایط دشوار در آینده آن را مصون نماید. لیموی آب نیز پایه‌ای رایج در جنوب ایران است که البته در سایر نقاط دنیا کاربردی با این هدف ندارد و نتیجه‌های پژوهش حاضر مؤید تشابه زیاد الگوی پاسخ‌گویی این پایه و پایه رانگپورلایم در شرایط این آزمایش بود. از سوی دیگر، پایه‌های نارنج توانا به ارائه پاسخ‌های دفاعی لازم نبودند و حتی پس از آبیاری دوباره وضعیت طبیعی خود را بازیابی ننمودند. بنابراین، به نظر می‌رسد از منظر اهداف تعریف‌شده برای این پژوهش، پایه‌های ولکامریانا و رانگپورلایم پایه‌هایی ارزشمند محسوب می‌شوند و افزون بر این، پاسخ‌گویی مناسب پایه لیموی آب به شرایط تنش خشکی به‌عنوان امتیازی مثبت برای انتخاب این پایه در ترکیب‌های پیوندی می‌باشد.

منابع

References

1. Adouli, B., S. Raheb and B. Golein. 2005. Citrus cultivars and rootstocks. Promotional Media Unit, Ministry of Jihad Agriculture, Mazandaran Branch. 13 p. (In Persian)
2. Ahmad, P., G. Nabi, C.A. Jeleel and S. Umar. 2011. Free radical production, oxidative damage and antioxidant defense mechanisms in plants under abiotic stress. In: Ahmad, P. and S. Umar (Eds.). Oxidative stress: role of antioxidants in plants. Studium Press Pvt. Ltd, New Delhi, India. pp: 19 - 53.
3. Ahmadi, K., H.R. Ebadzadeh, F. Hatami, R. Hosseinpour and H. Abdeshah. 2019. Agricultural statistics: horticultural products. Tehran Press, Ministry of Jihad Agriculture. 3: 159 p. (In Persian)
4. Anjum, S.A., L.C. Wang, M. Farooq, M. Hussain, L.L. Xue and C.M. Zou. 2011. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. J. Agron. Crop Sci. 197: 177–185.
5. Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44: 276–287.
6. Bhatt, D., M. Negi, P. Sharma, S.C. Saxena, A.K. Dobriyal and S. Arora. 2011. Responses to drought induced oxidative stress in five finger millet varieties differing in their geographical distribution. Physiol. Mol. Biol. Plants. 17: 347–353.
7. Bonhomme, L., R. Monclus, D. Vincent, S. Carpin, S. Claverol, A.-M. Lomenech, V. Labas, C. Plomion, F. Brignolas and D. Morabito. 2009. Genetic variation and drought response in two *Populus*× *euramericana* genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants. Phytochem. 70: 988–1002.
8. Campos, P.S., V. nia Quartin, J. chicho Ramalho and M.A. Nunes. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. J. Plant Physiol. 160: 283–292.
9. Cattivelli, L., F. Rizza, F.-W. Badeck, E. Mazzucotelli, A.M. Mastrangelo, E. Francia, C. Mare, A. Tondelli and A.M. Stanca. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. Field Crops Res. 105: 1–14.
10. Chance, B. and A.C. Maehly. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol. 2: 764–775.
11. Chen, S., G. Lin, J. Huang and G.D. Jenerette. 2009. Dependence of carbon sequestration on the differential responses of ecosystem photosynthesis and respiration to rain pulses in a semiarid steppe. Glob. Chang. Biol. 15: 2450–2461.

12. Dhindsa, R.S., P. Plumb-Dhindsa and T.A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Exp. Bot. 32: 93–101.
13. Elsheery, N.I. and K.F. Cao. 2008. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. Acta Physiol. Plant. 30: 769–777.
14. Georgiou, A., and C. Gregoriou. 1999. Growth, yield and fruit quality of 'Shamouti' orange on fourteen rootstocks in Cyprus. Sci. Hort. 80: 113–121.
15. Gholami, M. 2012. Evaluation of drought resistance in fig (*ficus carica* L.) using physiological indices and proteomics analysis. Ph.D. Thesis, Shiraz University. 120 p. (In Persian)
16. Gholami, M., M. Rahemi, B. Kholdebarin and S. Rastegar. 2012. Biochemical responses in leaves of four fig cultivars subjected to water stress and recovery. Sci. Hort. 148: 109–117.
17. Gimeno, V., L. Díaz-López, S. Simón-Grao, V. Martínez, J.J. Martínez-Nicolás and F. García-Sánchez. 2014. Foliar potassium nitrate application improves the tolerance of *Citrus macrophylla* L. seedlings to drought conditions. Plant Physiol. Biochem. 83: 308–315.
18. Heath, R.L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189–198.
19. Huang, B. and D.M. Eissenstat. 2000. Linking hydraulic conductivity to anatomy in plants that vary in specific root length. J. Am. Soc. Hort. Sci. 125: 260–264.
20. Imahori, Y. 2014. Role of ascorbat peroxidase in postharvest treatments of horticultural crops. In: Ahmad P. (Ed.). Oxidative damages to plants. Elsevier Inc. Academic Press, Elsevier, USA. pp. 425-451.
21. Irigoyen, J.J., D.W. Einerich and M. Sánchez-Díaz. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiol. Plant. 84: 55–60.
22. Jones, H.G. 2012. How do rootstocks control shoot water relations? New Phytol. 194: 301–303.
23. Kouchaki, A. and A. Alizadeh. 1995. Crop production in dry regions, Vol 1. Astan Quds Razavi. 260 p. (In Persian)
24. Kramer, P.J. 1969. Plant and Soil Water Relationship: a Modern Synthesis. McGraw Hill, NY, USA. 25 p.
25. Kramer, P.J. 1983. Plant and soil water relationships. Academic Press, NY, USA. 347 p.
26. Lawlor, D.W. and G. Cornic. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant Cell Environ. 25: 275–294.
27. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzym. 148: 350–382.
28. Liu, C., Y. Liu, K. Guo, D. Fan, G. Li, Y. Zheng, L. Yu and R. Yang. 2011. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. Environ. Exp. Bot. 71: 174–183.
29. Maxwell, K. and G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. J. Exp. Bot. 51: 659–668.
30. Medina, C.L., E.C. Machado and J.M. Pinto. 1998. Photosynthesis of Valencia orange tree grafted on four rootstocks and submitted to water deficit. Bragantia (Brazil). 57: 1–14.
31. Morgan, J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35: 299–319.
32. Munné-Bosch, S. and J. Peñuelas. 2004. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. Plant Sci. 166: 1105–1110.
33. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant cell Physiol. 22: 867–880.
34. Ohashi, Y., N. Nakayama, H. Saneoka, and K. Fujita. 2006. Effects of drought stress on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and stem diameter of soybean plants. Biol. Plant. 50: 138–141.
35. Ozden, M., U. Demirel and A. Kahraman. 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H_2O_2. Sci. Hort. 119: 163–168.
36. Pompeu Junior, J. 2005. Porta-enxertos. In: Mattos Junior, D., J.D. De Negri, R.M. Pio and J. Pompeu Junior (Eds.). Citrus. Centro Apta Citros Sylvio Moreira, IAC, Cordeirópolis. pp. 61–104.
37. Richards, L.A. 1949. Methods of measuring soil moisture tension. Soil Sci. 68: 95.
38. Rieger, M. 1995. Offsetting effects of reduced root hydraulic conductivity and osmotic adjustment following drought. Tree Physiol. 15: 379–385.
39. Sairam, R.K., P.S. Deshmukh and D.S. Shukla. 1997. Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. J. Agron. Crop Sci. 178: 171–178.
40. Sharma, B.D., D.K. Hore and S.G. Gupta. 2004. Genetic resources of Citrus of north-eastern India and their potential use. Genet. Resour. Crop Evol. 51: 411–418.
41. Singh, H.P., D.R. Batish, R.K. Kohli and K. Arora. 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. Plant Growth Regul. 53: 65–73.

42. Šircelj, H., M. Tausz, D. Grill and F. Batič. 2005. Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. J. Plant Physiol. 162: 1308–1318.
43. Syvertsen, J.P. 1981. Hydraulic conductivity of four commercial citrus rootstocks. J. Am. Soc. Hort. Sci. 106: 378–381.
44. Syvertsen, J.P. and J.H. Graham. 1985. Hydraulic conductivity of roots, mineral nutrition, and leaf gas exchange of citrus rootstocks. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110: 865–869.
45. Thakur, A. 2003. Use of easy and less expensive methodology to rapidly screen fruit crops for drought tolerance, in: VII International Symposium on Temperate Zone Fruits in the Tropics and Subtropics 662. pp. 231–235.
46. Vasconcellos, L.A.B.C. and W.S. Castle. 1994. Trunk xylem anatomy of mature healthy and blighted grapefruit trees on several rootstocks. J. Am. Soc. Hort. Sci. 119: 185–194.
47. Verslues, P.E., M. Agarwal, S. Katiyar-Agarwal, J. Zhu and J. Zhu. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant J. 45: 523–539.
48. Xu, L., L. Han and B. Huang. 2011. Antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves of Kentucky bluegrass in response to drought and post-drought recovery. J. Am. Soc. Hort. Sci. 136: 247–255.
49. Xu, Z., G. Zhou and H. Shimizu. 2010. Plant responses to drought and rewatering. Plant Signal Behav. 5: 649–654.

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 22 (3): 349-370 (2021)
Research article

Physiological and Biochemical Responses of Citrus Seedling Rootstocks to Drought Stress and After Rewatering

P. Assar*, A. Shekafandeh and L. Taghipour[1]

Responding mechanisms to water stress were evaluated for 8-month-old seedling rootstocks of Mexican lime, sour orange, volkameriana and rangpur lime in greenhouse conditions. Watering regime was withholding water for 14 days and then rewatering for 3 days at field capacity. Physiological and biochemical indices were evaluated in seedlings leaves at a minimum of two times (end of drought stress and rewatering periods). According to the results, drought led to a significant reduction in the water potential and relative water content of all rootstocks compared to controls, but all differences disappeared after rewatering. Evaluation of the maximum quantum yield of photosystem 2, malondialdehyde content and ion leakage showed that the photosynthetic apparatus of rootstocks, except for volkameriana, was oxidatively damaged due to photoinhibition, but only sour orange had no ability to recover its normal physiological condition after rewatering. According to data analysis, the decreased chlorophyll content of Mexican lime and rangpur lime leaves under stress was likely to be part of the mechanisms responsible for alleviating photoinhibition-related oxidative damage to the photosynthetic apparatus. Under stresss, the chlorophyll content of volkameriana and sour orange leaves was increased and decreased, respectively; which was irreversible for sour orange. Enzymatic antioxidant efficiency of volkameriana, Mexican lime and rangpur lime seedlings under water stress was appropriate and improved by rewatering resulting in acclimation to stress conditions. In conclusion, volkameriana rootstock had the best performance in stress tolerance compared to other evaluated rootstocks. Mexican lime and Rangpur lime had similar physiological and biochemical reactions to water stress and rewatering. The sour orange rootstock had no ability to show appropriate reactions to stress or to recover its normal condition after rewatering.

Keywords: Mexican lime, Drought stress, Rangpur lime, Enzymatic activity, Chlorophyll fluorescence, Volkameriana.

1. Former Ph.D. Student at Shiraz University and Assistant Professor of Horticultural Science, Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Jahrom University, PO Box: 74135-111, Jahrom, Associate Professor of Horticultural Science, Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, PO Box: 71441-65186, Shiraz, and Assistant Professor of Horticultural Science, Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Jahrom University, PO Box: 74135-111, Jahrom, Iran, respectively.

* Corresponding author, Email: (Pedramassar@gmail.com, Pedramassar@jahromu.ac.ir).