

## بررسی تأثیر تنش آبی شدید بر برخی ویژگی‌های دانه‌های مرکبات

رضا فیفائی<sup>۱</sup>، رضا فتوحی قزوینی<sup>۲\*</sup>، بهروز گلین<sup>۳</sup> و یوسف حمیداوغلی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی دکتری، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت و مربی بخش نهال و بذر مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی،

پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران

۲. استاد و دانشیار، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. دانشیار، بخش نهال و بذر، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱/۱۶)

### چکیده

با توجه به پرورش مرکبات در اقلیم‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری که اغلب در معرض خشکی قرار می‌گیرند پژوهشی برای بررسی پاسخ برخی از پایه‌های بذری مرکبات به خشکی، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار و دو دانه‌ال در هر واحد آزمایشی در شرایط گلخانه انجام شد. عامل اول شامل پنج پایه مختلف مرکبات و عامل دوم تیمارهای آبیاری شامل آبیاری بهینه (حفظ رطوبت بستر در حد ظرفیت گلدانی) و تنش شدید (قطع آبیاری به مدت شش هفته) بودند. نتایج نشان داد در شرایط تنش خشکی، ترکیب‌های بیوشیمیایی شامل پرولین، قند محلول، مالون‌دی‌آلدئید و کاروتنوئید در بیشتر پایه‌ها افزایش و میزان سبزینه (کلروفیل) a و b و کل کاهش یافت. همچنین در شرایط خشکی بیشترین تجمع پرولین در بکرایی، بیشترین میزان قند محلول در نارنج و کمترین میزان تجمع پرولین و قند محلول در پایه لیموترش مکزیکی (مکزیکن لایم) مشاهده شد. اثر متقابل تیمارهای آبیاری و پایه بر میزان تجمع مالون‌دی‌آلدئید معنی‌دار نشد. میزان کاهش سبزینه a، سبزینه b و کل در رافلمون بیشتر از دیگر پایه‌ها و میزان کاهش سبزینه a در نارنج و سبزینه b و کل در ماکروفیلا کمتر بود. همچنین میزان افزایش کاروتنوئید در نارنج بیشتر و در لیموترش مکزیکی کمتر بود. لذا می‌توان گفت نارنج با افزایش قندهای محلول و کاروتنوئید به خشکی واکنش نشان داده و تحمل بیشتری نسبت به دیگر پایه‌ها دارد.

**واژه‌های کلیدی:** پراکسیداسیون لیپید، پرولین، خشکی، رنگدانه‌ها، قند محلول.

### Effect of severe water stress on some characteristics in *Citrus* seedlings

Reza Fifaei<sup>1</sup>, Reza Fotouhi Ghazvini<sup>2\*</sup>, Behrooz Golein<sup>3</sup> and Yusef Hamidoghli<sup>2</sup>

1. Former Ph.D. Student, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht and Instructor of Department seed and plant, Horticultural Science Research Institute, *Citrus* and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran

2. Professor and Associate Professor, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Associate Professor, Horticultural Science Research Institute, *Citrus* and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran

(Received: Jan. 27, 2015 - Accepted: Apr. 5, 2015)

### ABSTRACT

As regards *Citrus* growing in sub-tropical and tropical regions that often expose drought, in order to investigation of some *Citrus* seedlings response to drought this research was done in factorial experiment based on randomized completely design with three replication under glasshouse conditions. First factor were five *Citrus* rootstocks and second factor included two treatment of irrigation (optimum irrigation and withholding irrigation for six weeks). The results showed that proline, soluble sugars, malondialdehyde and carotenoid in the majority of rootstock increased and total, b and a chlorophylls decreased in drought stress. Maximum accumulation of proline was observed in drought stress in Backraii rootstock, maximum accumulation of soluble sugars in Sour orange and minimum accumulation of proline and soluble sugars in Mexican lime. Interaction between rootstock and irrigation treatments was not significant. Decreasing amount of total chlorophyll, chlorophyll a and b in Rough lemon rootstock was more than other rootstocks and decreasing amount of chlorophyll a in Sour orange and total chlorophyll and chlorophyll b in Macrophylla was minimal. Furthermore, increasing amount of carotenoid in Sour orange was more than other rootstocks and in Mexican lime was least. Therefore, Sour orange rootstock because of increasement of soluble sugars and carotenoid was the most rootstock tolerant in drought.

**Keywords:** drought, lipid peroxidation, pigments, proline, total soluble sugars.

### مقدمه

مركبات از جمله مهم‌ترین محصولات باغبانی در جهان با فرآیند درازمدت و تدریجی تولید میوه بوده که بیشتر در معرض خشکی هوا و خاک قرار می‌گیرند. نیاز آبی درختان مرکبات بستگی به اقلیم، رقم و پایه داشته و این موضوع می‌تواند بر تولید میوه بسیار مؤثر باشد. به‌طور کلی، نیاز آبی درختان مرکبات بسته به گونه و رقم بین ۹۰۰-۱۲۰۰ میلی‌متر در سال است (Khan *et al.*, 2001). در شمال ایران به دلیل توزیع و پراکندگی نامناسب بارش در طول فصل با خشکی و اثرگذاری زیانبار آن روبه‌رو بوده ضمن اینکه کشت مرکبات در مناطق کوهپایه‌ای و دامنه‌های اراضی شمالی، ناگزیر با کمبود آب روبه‌رو خواهد شد. جنوب کشور که نزدیک به نصف سطح زیر کشت مرکبات را به خود اختصاص می‌دهد نیز با دوره‌های خشکی و کم‌آبی در طول فصل رشد روبه‌رو است که بر کمیت و کیفیت محصول، تأثیر زیادی می‌گذارد (Golein & Adouli, 2011).

خشکی، تغییر گسترده‌ای در ویژگی‌های فیزیولوژی و بیوشیمیایی گیاهان ایجاد می‌کند که آغاز آن با کاهش پتانسیل اسمزی در سطح یاخته‌ای همراه است (Fotouhi Ghazvini *et al.*, 2011). بسیاری از گیاهان با تجمع پرولین به تنش کم‌آبی پاسخ می‌دهند (Rhodes & Samaras, 1994). بررسی گونه‌های وحشی و اهلی متعلق به خانواده روتاسه نشان داد، میزان پرولین بین ۲۰ تا ۱۰۰ میکرومول بر گرم وزن خشک در نوسان است (Nolte *et al.*, 1997). نتایج بررسی تنش کم‌آبی در دانه‌های دو ساله پرتقال نیوهال و نارنگی انشو یاماسیتاکا نشان داد در پرتقال نیوهال میزان پرولین بین ۴۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر گرم وزن تازه به ترتیب از شاهد به ۷ درصد رطوبت خاک افزایش یافت درحالی‌که این میزان در نارنگی انشو ۷۱۵ تا ۱۲۳۰ میکروگرم بر گرم وزن تازه بود (Xie *et al.*, 2012). در بررسی، تنش خشکی باعث افزایش پرولین در برگ‌های کاریزوسیترنج و کلئوپاترا ماندارین شد (Garcia-Sancheza *et al.*, 2007). این نتایج در پژوهش دیگری با بررسی دو تیمار رطوبتی

(آبیاری کامل و پانزده روز بدون آبیاری) در کاریزوسیترنج تراریخته که قابلیت بالایی در تولید و تجمع پرولین و تنظیم اسمزی بهتر داشت نیز در مقایسه با شاهد مشاهده شد (Molinari *et al.*, 2004). بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی رقم هلوی کاترینا روی چهار پایه هلو در برابر تنش خشکی پیش‌رونده، نشان داد میزان پرولین در بافت‌های برگ و ریشه به‌ویژه در شرایط تنش شدید تغییر یافت که با کاهش پتانسیل اسمزی و افزایش در کارایی مصرف آب در ارتباط بود (Jimenez *et al.*, 2013). بررسی تنش خشکی روی پایه‌های پاکوتاه سیب در سه سطح تنش شامل شاهد، تنش ملایم و تنش شدید نشان داد میزان پرولین در اثر تنش خشکی افزایش یافت و پایه‌های مالینگ ۹، بذری و گامی الماسی بیشترین میزان را داشتند (Alizadeh *et al.*, 2011).

قندهای محلول از دیگر ترکیب‌هایی هستند که در اثر تنش خشکی در گیاهان تغییر یافته و می‌توانند به تنظیم اسمزی کمک کنند. بررسی دانه‌های دو ساله پرتقال نیوهال و نارنگی انشو یاماسیتاکا که تحت تنش کم‌آبی قرار گرفتند، نشان داد تنش خشکی می‌تواند باعث تجمع قند در هر دو رقم شود که در تنش ۷ درصد رطوبت خاک، به بیشینه می‌رسد (Xie *et al.*, 2012). در بررسی تحمل پایه فورنر آلکاید ۵ در مقایسه با والدینش نسبت به تنش خشکی مشخص شد، این پایه مواد ساخته‌شده نورساختی (فتوسنتزی) بیشتری دارد. همچنین پرتقال والنسیا روی این پایه نیز متحمل بوده و تنظیم اسمزی بهتری را انجام می‌دهد (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010). بررسی تنش خشکی نه روزه بدون آبیاری در پایه‌های شش ماهه کاریزوسیترنج و کلئوپاترا ماندارین نشان داد تنش خشکی باعث افزایش قندهای محلول در برگ‌ها و ریشه‌های هر دو ژنوتیپ شد. میزان تولید خالص مواد نورساختی در برگ‌های کاریزوسیترنج کاهش بیشتری داشت (Garcia-Sancheza *et al.*, 2007). تفاوت معنی‌داری در شدت نورساختی کاریزوسیترنج تراریخته در شرایط آبیاری کامل با گیاهان شاهد غیرتراریخته مشاهده نشد. درحالی‌که در شرایط تنش

خوشناو، ساهانی و بیدانه سفید نسبت به دیگران به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Ghaderi *et al.*, 2010). نتایج در بررسی دیگری با دو پایه سیب نشان داد در اثر تنش خشکی، میزان مالون‌دی‌آلدئید در پایه حساس افزایش بیشتری یافت (Wang *et al.*, 2011). در پژوهشی، میزان رنگیزه‌ها در گونه‌های مختلف مرکبات تعیین شد که در لمون‌ها میزان سبزینه (کلروفیل) a, b و سبزینه کل به ترتیب ۰/۳۱۴، ۰/۰۶۶ و ۰/۳۸، در پرتقال‌ها ۰/۲۷۹، ۰/۱۳۳ و ۰/۴۱۲ و در تانجلوها ۰/۴۶۸، ۰/۳۵۵ و ۰/۸۲۳ بود (Khan *et al.*, 2007). بررسی واکنش‌های برخی رقم‌های انگور در برابر دو سطح خشکی نشان داد تنش خشکی باعث کاهش میزان سبزینه برگ در رقم‌ها شد (Rabiei, 2004). در بررسی دیگری، کاهش میزان سبزینه a و b در دو رقم زیتون در اثر تنش خشکی دیده شد (Zarabi *et al.*, 2010; Yazdani *et al.*, 2007) و با نتایج به‌دست‌آمده از بررسی‌های ارجی روی پنج رقم زیتون همخوانی داشت که میزان سبزینه a, b, کل و کاروتنوئید در همه رقم‌های تحت تنش خشکی کاهش یافت. البته این میزان در گیاهان تحت تنش شدید خشکی بیشتر بود (Arji *et al.*, 2003). بررسی تأثیر سه سطح تنش خشکی روی ده ژنوتیپ گلابی نشان داد میزان سبزینه a, b و کل تحت تنش خشکی کاهش یافت که در ژنوتیپ‌های KS6 و KS9 در کمینه بودند (Javadi, 2003). در بررسی تنش خشکی روی پایه‌های پاکوتاه سیب در سه سطح تنش، میزان سبزینه برگ کاهش یافت (Alizadeh *et al.*, 2011). با تعیین وضعیت رشدی و میزان سبزینه در بیست دورگ (هیبرید) جدید و چهار پایه موجود انگور از نظر تحمل به خشکی مشخص شد پایه بورنر می‌تواند به‌عنوان یک منبع ژنتیکی مناسب برای اصلاح پایه‌های انگور استفاده شود (Pavlousek, 2011). هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر پایه و آبیاری بر میزان ترکیب‌های بیوشیمیایی مانند پرولین، قندهای محلول، مالون‌دی‌آلدئید و میزان رنگ‌دانه‌های سبزینه a, b, سبزینه کل و کاروتنوئید در پایه‌های مرکبات جنوب کشور است.

آبی، گیاهان تراریخته شدت نورساخت بالاتری از گیاهان شاهد غیرتراریخته داشتند (Molinari *et al.*, 2004). بررسی واکنش رقم‌های انگور نشان داد در شرایط تنش شدید خشکی، کربوهیدرات‌های محلول بیشتری در رقم‌ها تجمع یافتند (Ghaderi *et al.*, 2010; Rabiei, 2004). بررسی تأثیر تنش خشکی بر سه پایه دانه‌الی پسته نشان داد پایه بادامی مقاوم‌ترین پایه به تنش خشکی است چون تنظیم اسمزی بهتری را با تجمع قندهای محلول انجام می‌دهد (Rosban, 2009). بررسی واکنش‌های رقم‌های زیتون تحت تنش شدید خشکی نشان داد در همه رقم‌های تحت تنش خشکی میزان نشاسته کاهش و میزان ساکارز افزایش یافت (Zarabi *et al.*, 2010; Yazdani *et al.*, 2007; Arji *et al.*, 2003). از بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی رقم هلوی کاترینا نتیجه گرفتند میزان قندهای محلول در بافت‌های برگ و ریشه به‌ویژه در شرایط تنش شدید تغییر یافت که با کارایی مصرف آب در ارتباط بود (Jimenez *et al.*, 2013). بررسی تنش خشکی روی پایه‌های پاکوتاه سیب در سه سطح تنش نشان داد میزان قندهای محلول افزایش یافت و پایه‌های مالینگ ۹، بذری و گامی الماسی بیشترین میزان را داشتند (Alizadeh *et al.*, 2011).

از نتایج تنش اکسایشی، پراکسیداسیون لیپیدهاست. اسیدهای چرب غیراشباع حساس‌ترین بخش غشاء به اکسیدشدن و تخریب توسط تنش اکسایشی هستند. تجزیه این اسیدها توسط اکسیژن‌های فعال، تولید ترکیب‌هایی مانند مالون‌دی‌آلدئید کرده که برای یاخته ایجاد مسمومیت می‌کند. مالون‌دی‌آلدئید یک آلدئید فعال و ترکیبی الکترون‌دوست است که به‌طور معمول به شکل خالص دیده نمی‌شود (Nair *et al.*, 2008). تجمع مالون‌دی‌آلدئید، در شرایط تنش سبب افزایش نفوذپذیری غشاء پلاسمایی شده و نشت یونی افزایش می‌یابد (Reezi *et al.*, 2009). بررسی واکنش‌های بیوشیمیایی پنج رقم انگور در چهار سطح پتانسیل آب خاک نشان داد پایداری نسبی غشاء یاخته‌ای، با افزایش شدت تنش خشکی کاهش یافت. درصد پایداری نسبی در ۱/۵- مگاپاسکال در رقم‌های

## مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه‌های پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری کشور (رامسر) در سال‌های ۱۳۹۲-۹۳ انجام شد. بذرها (پایه‌های راف‌لمون (*Citrus jambhiri* Lush.)، بکرایبی (*Citrus sp.*)، نارنج (*Citrus aurantium* L.)، ماکروفیلا (*Citrus macrophylla* wester) و لیموترش مکزیکی (مکزیکن لایم) (*Citrus aurantifolia* (Christm.] Swingle)) در آذرماه ۱۳۹۲ گردآوری و پس از آماده‌سازی و ضدعفونی با قارچ‌کش کاپتان (به غلظت دو در هزار)، در ترکیب استریل (اتوکلاو شده) متشکل از پرلیت و ماسه (به نسبت مساوی) کشت شد. پس از سبز شدن بذرها، دانه‌های نوسلار (دانه‌های غیرجنسی که حاصل بافت خورش هستند) در مرحله سه تا چهار برگی به گلدان‌های پلاستیکی ۲/۵ لیتری محتوی ترکیب استریل (اتوکلاو شده) کوکوپیت و ماسه (به نسبت مساوی) منتقل و در گلخانه کنترل‌شده (با دمای ۲۶-۲۸ درجه سلسیوس در روز و ۲۰-۲۲ درجه در شب با رطوبت نسبی ۷۰-۸۰ درصد) قرار گرفتند. آبیاری در حد حفظ ظرفیت گلدانی و تغذیه مناسب انجام شد.

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار و دو دانه‌ال در هر واحد آزمایشی انجام شد. عامل اول شامل پنج پایه مختلف مرکبات و عامل دوم تیمارهای آبیاری شامل آبیاری کامل (شاهد) و تنش شدید (قطع آبیاری به مدت شش هفته) بودند. در تیمار تنش، در آغاز آزمایش گلدان‌ها به طور کامل آبیاری شدند و پس از زهکشی کامل و خروج آب اضافی با کیسه پلاستیکی سیاه پوشیده و قسمت پایین ساقه برای جلوگیری از تبخیر و از دست‌دهی آب به کلی بسته شد (Rodríguez-Gamir et al., 2010). توضیح اینکه در این آزمایش از دانه‌های شش ماهه استفاده شد. نمونه برداری از برگ‌های میانی ساقه در پایان هفته ششم انجام و برگ‌ها بی‌درنگ در نیتروژن مایع منجمد شدند.

میزان پرولین بافت برگ با روش بیتس اندازه‌گیری

شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره استخراج‌شده از ۰/۵ گرم پودر برگ با ۲ میلی‌لیتر از اسید ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر از گلاسیال استیک اسید در یک لوله آزمایش، مخلوط و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس‌از آن، لوله‌های آزمایش در یخ قرار گرفتند. سپس ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط واکنش اضافه شده و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به شدت تکان داده (ورتکس) شدند. محلول قرمز رنگ فاز رویی برای خواندن جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر با طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر) مدل ND-1000 استفاده شد. پس از رسم منحنی استاندارد پرولین، غلظت محاسبه و در نهایت، میزان پرولین محاسبه شد (Bates et al., 1973).

میزان قندهای محلول در بافت برگ با استفاده از روش سوموگی اندازه‌گیری شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره استخراجی از ۰/۵ گرم پودر برگی برداشته و به آن ۲ میلی‌لیتر سولفات مس اضافه شد. سپس به مدت هشت تا ده دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس، گرما داده و پس‌از آن درون یخ سرد قرار داده شدند. پس از سرد شدن ۲ میلی‌لیتر محلول اسید فسفومولیبدیک به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از طیف‌سنج نوری مدل ND-1000 شدت جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت قند نمونه‌ها محاسبه شد. پس از خواندن میزان جذب نمونه‌های استاندارد و رسم منحنی، غلظت قند نمونه‌های برگ از روی منحنی به دست‌آمده، تعیین شد (Somogyi, 1952).

سنجش مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از روش هیث و پکر انجام شد. به ۱ میلی‌لیتر از عصاره استخراج‌شده از ۰/۲ گرم پودر برگ، ۴ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد محتوی ۰/۵ درصد تیورباربیتوریک اسید، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت سی دقیقه درون حمام آب گرم و در دمای ۹۵ درجه سلسیوس گرما داده شد و پس‌از آن بی‌درنگ در یخ سرد شده و سپس دوباره به مدت ده دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. شدت جذب این محلول با

### نتایج و بحث

اثر متقابل تیمارهای آبیاری و پایه بر میزان تجمع مالون‌دی‌آلدئید معنی‌دار نشد ولی بر میزان پرولین و قند محلول در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). اثر متقابل تیمارهای آبیاری و پایه بر میزان سبزینه a، سبزینه b، سبزینه کل و کاروتنوئید در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲).

نتیجه این تحقیق نشان داد در تنش خشکی، میزان اسیدآمینئ پرولین در پایه‌ها افزایش یافت تنها در پایه‌های نارنج و لیموترش مکزیک قدری کاهش دیده شد. این کاهش را می‌توان ناشی از مصرف پرولین به‌عنوان یک منبع ذخیره نیتروژنی در شرایط تنش یا مصرف آن در ساخت (سنتز) پروتئین و یا کاهش تجزیه پروتئین در این پایه‌ها دانست ( Tamayo & Bonjoch, 2001). بیشترین میزان پرولین برگ در تیمار آبیاری بهینه در پایه نارنج به میزان ۳۵۲/۳۲ میکرومول بر گرم وزن خشک برگ و کمترین میزان آن در تیمار آبیاری بهینه در پایه بکرایی به میزان ۸۸/۰۵ میکرومول بر گرم وزن خشک برگ به دست آمد (جدول ۳).

استفاده از طیف‌سنج نوری مدل ND-1000 و در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. برای حذف اثر ترکیب‌های مزاحم، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر از جذب نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر کسر شد. غلظت کمپلکس با استفاده از فرمول محاسبه شد (Heath & Packer, 1968).

اندازه‌گیری سبزینه a، b و کاروتنوئید به روش آرنون انجام شد. به ۰٫۲ گرم پودر برگ، ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد خنک اضافه کرده و تکان داده و سپس به مدت پنج دقیقه در ۱۴۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از افزودن ۵ میلی‌لیتر استون به محلول رویی، با آب دو بار تقطیر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری مدل ND-1000 ساخت آمریکا، میزان جذب در طول موج‌های ۴۸۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ خوانده و میزان رنگدانه‌ها محاسبه شد (Arnon, 1949).

این پژوهش با ده تیمار، سه تکرار و دو دانه‌ال در هر واحد آزمایشی انجام شد. برای تحلیل آماری و تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد استفاده شد.

جدول ۱. تجزیه واریانس پرولین، قند محلول و مالون‌دآلدئید در پایه‌های مرکبات تحت تأثیر خشکی

Table 1. ANOVA of Proline, Soluble Sugar and Malondialdehyde in Citrus rootstocks exposed to drought

Source	Degree of Freedom	Mean of Squares		
		Proline	Soluble Sugar	Malondialdehyde
Rootstock	4	19968.26**	14999.42**	5899.71**
Irrigation	1	220.82.73**	20257.65**	135026.68**
Rootstock × Irrigation	4	27356.86**	13904.39**	576.1 <sup>ns</sup>
Error	20	98.5	8.07	223.05
CV%		4.2	2.6	9.2

\*\* و ns: Significant difference at 1% probability level and non significant difference. بدون اختلاف معنی‌دار.

جدول ۲. تجزیه واریانس سبزینه a، سبزینه b، سبزینه کل و کاروتنوئید در پایه‌های مرکبات تحت تأثیر خشکی

Table 2. ANOVA of Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll and Carotenoid in Citrus rootstocks exposed to drought

Source	Degree of Freedom	Mean of Squares			
		Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total Chlorophyll	Carotenoid
Rootstock	4	0.05**	0.022**	0.14**	0.002**
Irrigation	1	0.24**	0.92**	2.08**	0.056**
Rootstock × Irrigation	4	0.006**	0.009**	0.026**	0.003**
Error	20	0.0002	0.0002	0.0003	0.00005
CV%		3.5	4.1	2.6	7.7

\*\* Significant difference at 1% probability level.

\*\* اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

نارنگی انشو یاماسیتاکا تحت تنش کم‌آبی، مشخص

در بررسی دانه‌ال‌های دو ساله پرتقال نیوهال و

باعث افزایش پرولین در برگ‌های کاریزوسیترنج و کلئوپاترا ماندارین می‌شود ( Garcia-Sancheza *et al.*, 2007). همچنین بررسی دو تیمار رطوبتی روی کاریزوسیترنج تراریخته، قابلیت بالای آن را در تولید و تجمع پرولین و تنظیم اسمزی بهتر در مقایسه با شاهد نشان داد (Molinari *et al.*, 2004).

شد میزان پرولین در پرتقال نیوهال از ۴۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر گرم وزن تازه به ترتیب از شاهد به ۷ درصد رطوبت خاک افزایش یافت درحالی‌که تغییرپذیری در نارنگی انشو از ۷۱۵ تا ۱۲۳۰ میکروگرم بر گرم وزن تازه بود (Xie *et al.*, 2012). نتایج در بررسی دیگری نیز نشان داد تنش خشکی

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل عامل‌های آزمایشی بر پرولین، قند محلول، سبزینه a، سبزینه b، سبزینه کل و کاروتنوئید در پایه‌های مرکبات تحت خشکی

Table 3. Mean comparisons of interaction between factors on Proline, Soluble Sugar and Malondialdehyde, Chlorophyll a, Chlorophyll b, Total Chlorophyll and Carotenoid in *Citrus* rootstocks exposed to drought

Irrigation	Rootstock	Proline (µg/g dw)	Soluble sugar (mg/g dw)	Chl. a (mg/g dw)	Chl. b (mg/g dw)	Total Chl. (mg/g dw)	Carotenoid (mg/g dw)
Optimum Irrigation	Rough Lemon	177.93 <sup>e</sup>	184.38 <sup>b</sup>	0.36 <sup>d</sup>	0.31 <sup>d</sup>	0.75 <sup>d</sup>	0.023 <sup>e</sup>
	Backraii	88.05 <sup>g</sup>	66.75 <sup>e</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.64 <sup>a</sup>	1.29 <sup>a</sup>	0.05 <sup>d</sup>
	Sour Orange	352.32 <sup>a</sup>	86.5 <sup>d</sup>	0.39 <sup>cd</sup>	0.46 <sup>c</sup>	0.86 <sup>c</sup>	0.013 <sup>e</sup>
	Macrophylla	208.68 <sup>d</sup>	50.07 <sup>f</sup>	0.41 <sup>c</sup>	0.42 <sup>d</sup>	0.83 <sup>c</sup>	0.043 <sup>d</sup>
	Mexican Lime	219.92 <sup>d</sup>	24.44 <sup>h</sup>	0.54 <sup>b</sup>	0.5 <sup>b</sup>	1.04 <sup>b</sup>	0.097 <sup>c</sup>
Withholding Irrigation	Rough Lemon	260.44 <sup>c</sup>	90.42 <sup>d</sup>	0.2 <sup>f</sup>	0.1 <sup>g</sup>	0.3 <sup>h</sup>	0.103 <sup>c</sup>
	Backraii	343.6 <sup>a</sup>	157.47 <sup>c</sup>	0.39 <sup>cd</sup>	0.17 <sup>e</sup>	0.55 <sup>e</sup>	0.163 <sup>a</sup>
	Sour Orange	306.41 <sup>b</sup>	233.79 <sup>a</sup>	0.28 <sup>e</sup>	0.12 <sup>fg</sup>	0.4 <sup>g</sup>	0.147 <sup>a</sup>
	Macrophylla	279.61 <sup>c</sup>	158.6 <sup>c</sup>	0.29 <sup>e</sup>	0.13 <sup>fg</sup>	0.42 <sup>g</sup>	0.127 <sup>b</sup>
	Mexican Lime	128.15 <sup>f</sup>	31.72 <sup>g</sup>	0.31 <sup>e</sup>	0.15 <sup>ef</sup>	0.47 <sup>f</sup>	0.12 <sup>b</sup>

داد خشکی می‌تواند باعث تجمع قند در هر دو رقم شود که در تنش ۷ درصد رطوبت خاک به بیشینه می‌رسد (Xie *et al.*, 2012). در بررسی Maness (2010) تحمل پایه فورنر آلکائید ۵ در مقایسه با والدینش نسبت به تنش خشکی مشخص شد این پایه مواد ساخته‌شده نورساختی بیشتری دارد. همچنین پرتقال والنسیا روی این پایه نیز متحمل بوده و تنظیم اسمزی بهتری را انجام می‌دهد (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010). بررسی تنش خشکی نه روزه بدون آبیاری در پایه‌های شش ماهه کاریزوسیترنج و کلئوپاترا ماندارین نشان داد تنش خشکی باعث افزایش قندهای محلول در برگ‌ها و ریشه‌های هر دو پایه شد. میزان تولید خالص مواد نورساختی در برگ‌های کاریزوسیترنج کاهش بیشتری داشت (Garcia-Sancheza *et al.*, 2007). در بررسی دیگری در کاریزوسیترنج تراریخته، در شرایط آبیاری کامل، تفاوت معنی‌داری در میزان نورساختی آن‌ها با گیاهان شاهد غیرتراریخته مشاهده نشد درحالی‌که در شرایط تنش آبی (پانزده روز بدون آبیاری)، گیاهان تراریخته، شدت نورساختی بالاتری از گیاهان شاهد غیرتراریخته

تأثیر پایه‌های مختلف مرکبات، سطوح آبیاری و اثر متقابل آن‌ها بر میزان قندهای محلول در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد بیشترین میزان قندهای محلول برگ در تیمار قطع آبیاری در پایه نارنج به میزان ۲۳۳/۷۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و کمترین میزان آن در تیمار آبیاری بهینه در لیموترش مکزیکی به میزان ۲۴/۴۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ به دست آمد (جدول ۳). نتایج این پژوهش مبین افزایش قندهای محلول در اثر تنش خشکی در بیشتر پایه‌هاست که در آزمایش‌های چندی افزایش میزان قندهای محلول برگ در شرایط تنش خشکی در گیاهان مختلف گزارش شده است. در این تحقیق، تنها در رافلمون کاهش کل قندهای محلول در شرایط تنش خشکی دیده شد که می‌توان آن را مرتبط با رقابت میان فرایندهای مختلف فیزیولوژی و اندام‌های مصرف‌کننده بر سر منابع غذایی و مصرف بیشتر قندها در این پایه و کاهش در نورساخت خالص دانست. بررسی دانه‌های دو ساله پرتقال نیوهال و نارنگی انشو یاماسیتاکا در شرایط تنش کم‌آبی نشان

نشانگر زیستی برای پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء که در اثر تنش اکسایشی ایجاد می‌شود، به‌شمار می‌آید. محتوای افزایش یافته مالون‌دی‌آلدئید ممکن است به علت تخریب غشاء در نتیجه تنش اکسایشی القاشده به‌وسیله انواع اکسیژن‌های فعال باشد (Pryor & Stanley, 1975). در این تحقیق افزایش مالون‌دی‌آلدئید در شرایط تنش خشکی به‌دست‌آمده که با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد. بررسی واکنش‌های فیزیولوژی و بیوشیمیایی پنج رقم انگور در چهار سطح پتانسیل آب خاک نشان داد پایداری نسبی غشای یاخته‌ای، با افزایش شدت تنش خشکی کاهش یافت. درصد پایداری نسبی در ۱/۵- مگاپاسکال در رقم‌های خوشناو، ساهانی و بیدانه سفید نسبت به دیگران به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Ghaderi *et al.*, 2010). در بررسی، دو پایه حساس و مقاوم سیب به تنش خشکی بررسی شده و نتایج نشان داد در شرایط تنش خشکی میزان مالون‌دی‌آلدئید در پایه حساس افزایش بیشتری یافت (Wang *et al.*, 2011).

داشتند (Molinari *et al.*, 2004). به‌طور کلی، در شرایط تنش خشکی باوجود کاهش میزان تولید مواد نرساختی، محتوای قندهای محلول به دلیل تغییر شکل بیشتر نشاسته و یا دیگر شکل‌های ذخیره‌ای به قند، تجزیه پلی‌ساکاریدهای دیواره یاخته‌ای، تغییر در میزان انتقال قندها و یا مصرف کمتر کربوهیدرات‌ها توسط بافت‌ها افزایش می‌یابد (Maness, 2010).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد سطوح آبیاری و پایه اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان مالون‌دی‌آلدئید داشت. اثر متقابل آن‌ها بر صفت یادشده معنی‌دار نبود (جدول ۱). نتایج تأثیر ساده سطوح آبیاری نشان داد بیشترین تجمع مالون‌دی‌آلدئید در زمان قطع آبیاری دیده شد. همچنین نتایج تأثیر اصلی پایه‌ها نیز نشان داد بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید در پایه بکرایی و کمترین تجمع آن در پایه نارنج به‌دست آمد (جدول ۴). مالون‌دی‌آلدئید محصول تجزیه هیدروپراکسیدهای اسیدهای چرب غیراشباع است و اغلب به‌عنوان یک

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر اصلی پایه و سطح آبیاری بر تجمع مالون‌دی‌آلدئید تحت شرایط خشکی

Table 4. Mean comparisons of rootstock and irrigation main effect on Malondialdehyde exposed to drought

Biochemical character	Rootstock				Irrigation		
	Rough Lemon	Backraii	Sour Orange	Macrophylla	Mexican Lime	Optimum Irrigation	Withholding Irrigation
Malondialdehyde	170.63 <sup>b</sup>	206.58 <sup>a</sup>	119.48 <sup>d</sup>	157.83 <sup>c</sup>	155.22 <sup>c</sup>	94.86 <sup>b</sup>	229.04 <sup>a</sup>

نتایج تجزیه واریانس نشان داد، سطوح آبیاری و پایه‌ها اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان سبزینه b داشت. همچنین اثر متقابل آن‌ها نیز بر صفت یادشده در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). به‌طوری‌که بیشترین میزان سبزینه b در تیمار آبیاری بهینه در پایه بکرایی به میزان ۰/۶۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و کمترین میزان آن در تیمار قطع آبیاری در پایه رافلمون به میزان ۰/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ به دست آمد (جدول ۳). کاهش میزان سبزینه b در اثر تنش خشکی از نتایج این پژوهش است که با بررسی‌های دیگر محققان در مرکبات، انگور و زیتون همخوانی دارد (Arji *et al.*, 2003; Rabiei, 2004; Rosban, 2009; Fotouhi Ghazvini *et al.*, 2011; Alizadeh *et al.*, 2011).

تأثیر پایه‌های مختلف مرکبات، سطوح آبیاری و اثر متقابل آن‌ها بر میزان سبزینه a در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد، بیشترین میزان سبزینه a در تیمار آبیاری بهینه در پایه بکرایی به میزان ۰/۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و کمترین میزان آن در تیمار قطع آبیاری در پایه رافلمون به میزان ۰/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ به دست آمد (جدول ۳). کاهش میزان سبزینه a در شرایط تنش خشکی ناشی از تخریب این رنگ‌دانه است که با بررسی‌های دیگر محققان در مرکبات، انگور و زیتون همخوانی دارد (Arji *et al.*, 2003; Rabiei, 2004; Rosban, 2009; Fotouhi Ghazvini *et al.*, 2011; Alizadeh *et al.*, 2011).

مرکبات، انگور و زیتون همخوانی دارد (Arji et al., 2003; Rabiei, 2004; Fotouhi et al., 2011). کاروتنوئید به عنوان یک پاداکسنده (آنتی اکسیدان) غیر آنزیمی است که افزایش آن در شرایط تنش خشکی به دلیل رویارویی با رادیکال‌های آزاد قابل توجیه است.

#### نتیجه‌گیری کلی

بررسی‌ها نشان داد در مرکبات، میزان پرولین و قندهای محلول در شرایط خشکی افزایش یافت هرچند که در رقم‌های مختلف، متفاوت بود. در این پژوهش، در شرایط خشکی بیشترین افزایش پرولین در بکرایی و بیشترین افزایش قندهای محلول و کاروتنوئید در نارنج دیده شد. لذا نارنج با افزایش قندهای محلول و کاروتنوئید به تنش خشکی واکنش نشان می‌دهد. لذا با توجه به اینکه پایه نارنج تحمل بیشتری نسبت به خشکی از خود نشان داد پس به احتمال قندهای محلول و کاروتنوئیدها نقش مؤثرتری نسبت به دیگر ترکیب‌ها در تحمل به خشکی آن داشته باشند. در بکرایی نیز به رغم افزایش پرولین و کاروتنوئیدها، حساسیت نسبت به خشکی در مقایسه با دیگر پایه‌ها مشاهده شد که می‌توان گفت این ترکیب‌ها نقشی در تحمل این پایه ندارند. میزان سبزینه نیز در پایه رافلمون، کاهش بیشتری در مقایسه با دیگران در برابر خشکی از خود نشان داد.

تأثیر پایه‌های مختلف مرکبات، سطوح آبیاری و اثر متقابل آن‌ها بر میزان سبزینه کل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان داد بیشترین میزان سبزینه کل در تیمار آبیاری بهینه در پایه بکرایی به میزان ۱/۲۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و کمترین میزان آن در تیمار قطع آبیاری در پایه رافلمون به میزان ۰/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ به دست آمد (جدول ۳). کاهش میزان سبزینه کل در شرایط تنش خشکی از نتایج این پژوهش است که با بررسی‌های دیگر محققان در مرکبات، انگور و زیتون همخوانی دارد (Arji et al., 2003; Rabiei, 2004; Fotouhi et al., 2011).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد سطوح آبیاری و پایه‌ها اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان کاروتنوئید داشت. همچنین اثر متقابل آن‌ها نیز بر صفت یادشده در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). به طوری که بیشترین میزان کاروتنوئید از تیمار قطع آبیاری در پایه بکرایی به میزان ۰/۱۶۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و کمترین میزان آن از تیمار آبیاری بهینه در حد ظرفیت گلدانی با پایه نارنج به میزان ۰/۰۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ به دست آمد (جدول ۳). افزایش میزان کاروتنوئید در شرایط تنش خشکی از نتایج این پژوهش است که با بررسی‌های دیگر محققان در

#### REFERENCES

1. Alizadeh, A., Alizadeh, V., Nassery, L. & Eivazi, A. (2011). Effect of drought stress on apple dwarf rootstocks. *Technical Journal of Engineering and Applied Science*, 3, 86-94.
2. Arji, E., Arzani, K. & Ebrahimzadeh, H. (2003). Accumulation of proline and total soluble sugars in five cultivars *Olea europaea* L. exposed to drought stress. *Iran Biology Journal*, 16 (4). (in Farsi)
3. Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
4. Bates, L.S., Waldron, R.P. & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-208.
5. Fotouhi Ghazvini, R., Heidari, M. & Hashempour, A. (2011). *Physiology and molecular biology of stress tolerant in plants*. Jahade of Mashhad University Published, 360 p. (in Farsi)
6. Garcia-Sancheza, F., Syvertsen, J.P., Gimenez, V., Botlab, P. & Perez-Perez, J.G. (2007). Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. *Physiologia Plantarum*, 130, 532-542.
7. Ghaderi, N., Talaei, E., Ebadi, E. & Lesani, H. (2010). Effect of drought stress and renewable irrigation on some of the physiological characteristics in three *Vitis* cultivar included sahani, frokhi and white seedless. *Iran Horticultural Science Journal*. 41(2). (in Farsi)
8. Golein, B. & Adoli, B. (2011). *Citrus (Planting)*. Novin Pouya Press, 160 p. (in Farsi)
9. Heath, R.L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and



- stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives. Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
10. Javadi, T. (2003). *Effect of drought stress on physiological and biochemical characteristics in 9 genotype pyrus serotna Rehd.* Ph.D. thesis. University of Tarbiat Modarres.Iran.
  11. Jimenez, S., Dridi, J., Gutierrez, D., Moret, D., Jrigoyen, J.J., Moreno, M.A. & Gogorcena, Y. (2013). Physiological, biochemical and molecular responses in four prunus rootstocks submitted to drought stress. *Tree Physiology*, 33(10), 1061-75.
  12. Khan, M., Idrees, M. & Shahab, D. (2007). Chlorophyll content in some Citrus species. *Vejetos*, 20(2), 7-8.
  13. Kahn, T.L., Krueger, R.R., Gumpf, D.J., Roose, M.L., Arpaia, M.L., Batkin, T.A., Bash, J.A., Bier, O.J., Clegg, M.T. & Cockerham, S.T. (2001). *Citrus genetic resources in California: Analysis and recommendations for long-term conservation.* Report No. 22. University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Genetic Resources Conservation Program, Davis, CA, USA.
  14. Maness, N. (2010). Extraction and analysis of soluble carbohydrates. P: 341-370. In: Sunkar, R. (ed.) *Plant stress tolerance, methods and protocols.* Springer science & bussines media (Hummana press). pp: 386.
  15. Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Filho, J.C.B., Kobayashi, A.K., Pileggi, M., Leite Junior, R.P., Pereira, L.F.P. & Vieira, L.G.E. (2004). Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science*, 167, 1375-1381.
  16. Nair, V., O'neil, C.L. & Wang, P.G. (2008). "*Malondialdehyde*" *encyclopedia of reagents for organic synthesis.* John Wiley and Sons. New York.
  17. Nolte, K.D., Hanson, A.D. & Gage, A.D. (1997). Proline accumulation and methylation to proline betaine in Citrus: implication for genetic engineering of stress resistance. *Journal of American Society Horticultural Science*, 122(1), 8-13.
  18. Pavloušek, P. (2011). Evaluation of drought tolerance of new grapevine rootstock hybrids. *Journal of Environment Biology*, 32, 543-549.
  19. Pryor, W.A. & Stanley, J.P. (1975). A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids, nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *Organells*, 40 (24), 3615-3617.
  20. Rabiei, V. (2004). *Investigation of physiological and morphological responses some of Vitis cultivars to drought stress.* Ph.D. thesis. University of Tehran. (in Farsi)
  21. Reezi, S., Babalar, M. & Kalantari, S. (2009). Silicon alleviates salt stress, decreases malondialdehyde content and effects petal color of salt-stressed cut rose (*Rosa X hybrida* L.) 'Hot lady'. *African Journal Biotechnology*, 8(8), 1502-1508.
  22. Rhodes, D. & Samaras, Y. (1994). Genetic control of osmoregulation in plants. *Cellular and molecular physiology of cell volume regulation CRC press, Boca Raton, Fla.* 347-361.
  23. Rodríguez-Gamir, J., Primo-Millo, E., Forner, J.B. & Forner-Giner, M.A. (2010). Citrus rootstock responses to water stress. *Scientia Horticulturae*, 126, 95-102.
  24. Rosban, M.R. (2009). *Investigation of physiological mechanisms of drought tolerant in seedling rootstock of Pistacia.* Ph.D. thesis, University of Tarbiat Modarres. (in Farsi)
  25. Somogyi, M. (1952). Note on sugar determination. *Journal of Biological and Biochemistry*, 195, 19-23.
  26. Tamayo, P. R. & Bonjoch, N. P. (2001). Free proline quantification. P: 365-382. In: Reigosa Roger, M. J. (ed.). *Handbook of plant ecophysiology techniques.* Kluwer Acad. Pub. pp: 452.
  27. Wang, S., Liang, D., Li, C., Hao, Y., Ma, F. & Shu, H. (2011). Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought tolerant and drought sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 81-89.
  28. Xie, S.X., Lu, X.P., Ni, Q. & Zhao, X.L. (2012). The effect of water stress on ABA, JA and physiological characteristic of Citrus. *XII International Citrus Congress*, Pp. 138-145.
  29. Yazdani, N., Arzani, K. & Arji, E. (2007). Modulation of drought stress with Paclobutrazol application in two Olea cultivars (Blaidi and Meision). *Iran Agricultural Science Journal*, 38. (in Farsi)
  30. Zarabi, M., Talaei, M., Soleimani, E. & Haddad, R. (2010). The role of physiological and biochemical changes of six Olive cultivar exposed to drought stress. *Horticultural Science Journal*, 24 (2). (in Farsi)