پژوهش در میوه‌کاری
دوره اول، شماره دوم، زمستان ۱۳۹۵ (۹۵-۷۴)

اثرات نیتریک اکساید بر برخی از صفات فیزیولوژیک در سه گونه از مرکبات در شرایط کم آبی

الهام قلی‌وندان*[۱]، محمدرضا دادپور[۲]، علی موافقی[۳]، فریبرز زارع‌نهندی[۴]، داوود زارع‌حقی[۵] و مرتضی کوثری‌نسب[۶]

۱- دکتری میوه‌کاری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳- استاد گروه زیست گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
۴- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۵- استادیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۶- استادیار مرکز رشد بیوتکنولوژی حیّان، گروه زیست گیاهی دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۶)

چکیده

به منظور بررسی تاثیر نیتریک اکساید بر برخی صفات فیزیولوژیکی مرکبات تحت شرایط کم آبی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی بر روی ۳ گونه از مرکبات شامل: پونسیروس، سیترومِلو و سیترنج در ۳ سطح تنش خشکی (۳۰، ۶۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای)، ۳ سطح سدیم نیتروپروساید (آزادکننده‌ی نیتریک اکساید) (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) و در ۳ تکرار طراحی گردید. شاخص‌های فیزیولوژیکی از جمله کلروفیل فلورسنس، هدایت روزنه‌ای، پتانسیل آب برگ و محتوی نسبی آب برگ (RWC) اندازه‌گیری شد. شاخص‌های بیوشیمیایی از جمله فعّالیت آنتی‌اکسیدانی کل (DPPH)، فنل کل و مالون‌دی‌آلدئید مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش معنی‌داری در مقادیر پتانسیل آب برگ، هدایت روزنه‌ای، محتوی نسبی آب برگ (RWC) و *Fv/Fm* شده است. شاخص‌های بیوشیمیایی مثل DPPH، فنل کل و مالون‌دی آلدئید در اثر تنش خشکی افزایش معنی‌داری نشان دادند. کاربرد سدیم نیترو پروساید در این تحقیق نشان داد که این ماده نقش تعدیل‌کنندگی در تنش خشکی داشته و اثرات آن را کاهش داده است. نتایج نشان داد که غلظت ۱ میلی مولار این ماده تأثیر بیشتری در تعدیل اثرات تنش داشته است.

کلمات کلیدی: تنش خشکی، پونسیروس، سدیم نیتروپروساید، کلروفیل فلورسنس، *Fv/Fm*

* نویسنده مسئول: Email: e.gholivandan@gmail.com

مقدمه

مرکبات گروه بزرگی از میوه‌ها شامل انواع پرتقال، نارنگی، لیمو، گریپ‌فروت و پوملو است. جنس سیتروس، بیشتر گونه‌ها و ارقام تجاری مرکبات را شامل می‌گردد. بر اساس تقسیم‌بندی Swingle (۱۹۴۸) و بعدها توسط Swingle و Reece (۱۹۶۷) مرکبات جزء خانواده‌ی Rutaceae، زیر خانواده‌ی Aurantioideae، طایفه‌ی Citreae و جنس *Citrus* قرار گرفتند. در این گروه به غیر از جنس *Citrus*، ۵ جنس دیگر به نام‌های *Poncirus*، *Eremocitrus*، *Microcitrus*، *Fortunella* و *Clymenia* وجود دارد (دیویس و آلبریگو[1]، ۱۹۹۴). مرکبات جزء گیاهان همیشه سبز می‌باشند، لذا تأمین آب از اهمیت بسیار بالایی در پرورش این گیاه برخوردار است (دیویس و آلبریگو، ۱۹۹۴). تولید مرکبات در مناطق مختلف جهان و میزان بالای تولید آنها موجب شده است که این محصولات در جهان از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار باشند. بر اساس آمار ارائه شده‌ی سازمان خوار و بار و کشاورزی جهان (فائو) در سال ۲۰۱۲، ۵۶/۶ درصد از تولید، مربوط به این میوه و سهم انواع نارنگی، لیمو و گریپ فروت به ترتیب ۲۲/۶۷، ۱۲/۰۶ و ۳/۴۸ درصد بوده است. بر مبنای گزارش آمارنامه‌ی جهاد کشاورزی (۱۳۸۹) سطح کل زیر کشت مرکبات ایران حدود ۲۹۰ هزار هکتار است. تولید مرکبات کشور در این سال (۱۳۸۹) حدود ۴۰۲۴۶۵۴ تن بوده است.

امروزه با توجه به اینکه بیش از ۲۰ صفت مهم باغبانی در ارقام مرکبات می‌تواند تحت تأثیر پایه باشد، مسئله انتخاب پایه از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می‌باشد (فتوحی قزوینی و فتاحی مقدم، ۱۳۷۷). از جمله مشخصات یک پایه‌ی مطلوب برای مرکبات می‌توان به سازگاری با رقم پیوندک و قابلیت ایجاد درختی با طول عمر اقتصادی حداکثر، سازش مناسب با شرایط اقلیمی، داشتن مقاومت و یا تحمل به آفات و امراض مختلف و تأثیرگذاری مطلوب در وضعیت باردهی و کیفیت میوه‌های تولیدی اشاره کرد (گلعین و عدولی، ۱۳۹۰). پایه‌های زیادی در مرکبات وجود دارد ولی هیچ‌کدام پایه‌ی کاملی نیستند و انتخاب پایه بایستی بر اساس مهم‌ترین فاکتور محدودکننده‌ی منطقه‌ی موردنظر باشد. از مهمترین پایه‌های مرکبات می‌توان نارنج (*Citrus aurantium*)، پونسیروس (*Poncirus trifoliate*)، سیترومِلو (Citrumelo)، سیترنج‌ها (Citranges)، لیموی ولکامریانا (*Citrus volcameriana*)، کلئوپاترا ماندارین (*Citrus Reshni*)، راف لمون (*Citrus Jambhiri*)، پرتقال (*Citrus sinensis*)، و ماکروفیلا (*Citrus acrophylla*) را نام برد (دیویس و آلبریگو، ۱۹۹۴). کشور ایران به خاطر قرار گرفتن در کمربند خشک جغرافیایی و نوار بیابانی ۲۵ تا۴۰ درجه عرض شمالی، جزو مناطق کم باران جهان بشمار

1. Davies and Albrigo

می‌آید (یو ان ای پی، ۱۹۹۷[1]). از طرف دیگر طی چندین سال اخیر کاهش بارندگی‌ها و نزولات آسمانی این قضیه را جدی‌تر ساخته و مشکل کمبود آب را به یک معضل اجتماعی- اقتصادی- کشاورزی تبدیل کرده است. خشکی به عنوان یکی از عوامل اصلی محدودکننده تولید محصولات کشاورزی در سراسر جهان و ایران مطرح است (فاروق[2] و همکاران، ۲۰۱۲). گیاهان در طول زندگی خود به طور مداوم در معرض انواع تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند که رشد و نمو آنان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و مانع کارایی بهینه در آنان می‌شود (سوزوکی[3] و همکاران، ۲۰۱۴؛ فاروق و همکاران، ۲۰۱۲). تنش‌های غیرزیستی مهمی که گیاهان تحت تأثیر آنان قرار می‌گیرند بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (میتلر و بلوم والد[4]، ۲۰۱۰). این تنش‌ها شامل تنش کمبود آب، شوری، گرما، سرما، مواد غذایی، شدت بالای نور، ازن و تنش‌های غیر هوازی است (بیلی-سرس و ووسنک[5]، ۲۰۰۸؛ هیرل[6] و همکاران، ۲۰۰۷؛ آگاروال و گروور[7]، ۲۰۰۶). کمبود مستمر در بارش (خشکی هواشناسی) اگر همراه با نیاز بالای تبخیر و تعرّق باشد منجر به خشکی کشاورزی می‌شود (میشرا و چرکاور[8]، ۲۰۱۰).

گیاهان دستخوش چندین سازگاری مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در سطح زیرسلولی، سلولی و اندام می‌شوند تا بتوانند از عهده‌ی تنش کمبود آب برآیند. تحمل خشکی یک پدیده‌ی پیچیده‌ای است که با ضخیم شدن کوتیکول، تنظیم روزنه‌ای، سیستم ریشه‌ای، تعادل هورمونی، سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی، تنظیم اسمزی و حفظ محتوای آبی بافت همراه است (فاروق[9] و همکاران، ۲۰۰۹؛ کیانی[10] و همکاران، ۲۰۰۷). بسته شدن روزنه‌ها در پاسخ به کمبود آب سرعت فتوسنتز را کاهش می‌دهد. فعالیت زنجیره‌ی انتقال الکترون فتوسنتزی کاملاً به وجود CO_2 در گیاه و فتوسیستم ۲ وابسته است که اغلب همزمان با شرایط کمبود آب کاهش می‌یابد (لورتو[11] و همکاران، ۱۹۹۵). مشخص شده است که کاهش در سرعت فتوسنتز ابتدا به دلیل کمبود CO_2 است، چون به محض انتقال سریع برگ‌ها به محیط حاوی CO_2 نرمال، کارایی فتوسنتز به حد اولیه برمی‌گردد (میر و گنتی[12]، ۱۹۹۸). کاهش سطوح داخل سلولی CO_2 منجر به احیاء بیش از حد اجزاء داخل زنجیره انتقال الکترون می‌گردد و الکترون‌ها به اکسیژن موجود در فتوسیستم ۱ انتقال داده می‌شوند و باعث تنش اکسیداتیو می‌شود (ماهاجان و تونجا[13]، ۲۰۰۵) در نتیجه، کاهش ورود CO_2 با بسته شدن روزنه‌ها و

1. UNEP, 1997
2. Farooq
3. Suzuki
4. Mittler and Blumwald
5. Bailey-Serres and Voesenek
6. Hirel
7. Agarwal and Grover
8. Mishra and Cherkauer
9. Farooq
10. Kiani
11. Loreto
12. Meyer and Genty
13. Mahajan and Tuteja

اختلال در فعالیت آنزیم‌ها و صدمه به دستگاه‌های فتوسنتزی در تنش خشکی فتوسنتز را مهار می‌کند که باعث بیشتر شدن نشت الکترون‌ها به اکسیژن مولکولی گردیده و منجر تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS)، مثل: H_2O_2 (پراکسید هیدروژن)، O_2^- (سوپراکسید) و رادیکال OH (هیدروکسیل) و اکسیژن سینگلت ($^1O_2$) می‌شود (گیل و تونجا[1]، ۲۰۱۰؛ بلوخینا[2] و همکاران، ۲۰۰۳). این ROS ها بسیار واکنش‌پذیر بوده و متابولیسم طبیعی گیاه را از طریق صدمات اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و دیگر ماکرومولکول‌ها در نبود هیچ‌گوچه مکانیسم دفاعی تخریب می‌کنند (سالازار-پاررا[3]، ۲۰۱۲؛ گیل و تونجا، ۲۰۱۰). گیاهان ROS را از طریق سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی خود از بین می‌برند (حسین[4] و همکاران، ۲۰۰۸؛ میتلر[5]، ۲۰۰۲).

همانطور که ذکر شد از دیگر اثرات تنش اکسیداتیو، اکسیداسیون چربی‌ها است. لیپوکسی‌ژنازها دی‌اکسیژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع را کاتالیز می‌کنند که باعث تولید اسیدهای چرب هیدروپراکسی می‌شود که برای سلول‌ها بسیار سمّی هستند و بلافاصله به متابولیت‌هایی از قبیل مالون‌دی‌آلدئید (MDA) تبدیل می‌شوند (سوفو[6] و همکاران، ۲۰۰۴). گرچه تعیین MDA برای ارزیابی صدمات اکسیداتیو به غشای لیپیدی بطور وسیعی پذیرفته شده است ولی مشخص شده است که کربوهیدرات‌ها و حتی برخی اسیدهای آمینه نیز ممکن است تجزیه شوند و MDA را به عنوان یک محصول نهایی تولید کنند (هاجس[7] و همکاران، ۱۹۹۹). اثرات کلی پراکسیداسیون لیپیدها: کاهش سیّالیت غشاء، افزایش نشتی غشاء، صدمه به پروتئین‌های غشاء، غیر فعّال کردن گیرنده ها، آنزیم‌ها و کانال‌های یونی است (گیل و تونجا[8]، ۲۰۱۰).

روزنه‌ها هدایت انتشاری برگ را تنظیم می‌کنند و بنابراین از دست دادن آب و به دست آوردن CO_2 را تحت تأثیر قرار می‌دهند و در نتیجه بهره‌وری فتوسنتزی گیاه و کارایی مصرف آب به دینامیک هدایت روزنه‌ای وابسته است (پیلی تری و توری[9]، ۲۰۱۲). پاسخ روزنه‌ها به خشکی و به دنبال آن تغییر در هدایت روزنه‌ای با تغییراتی در رطوبت اتمسفر و یا تغییر در مقدار آب بستر ریشه در عرض چند دقیقه اتفاق می‌افتد (لاولور و تزارا[10]، ۲۰۰۹). اغلب یا حداقل بخشی از پاسخ‌های روزنه مربوط به خنثی‌کردن تغییرات تحمیلی در تعادل بین عرضه و تقاضای آب و تعرّق است. برای مثال کاهش رطوبت اتمسفری تعادل هیدرولیکی را به سمت تعرّق سوق می‌دهد که باعث کم شدن آب بافت‌ها می‌گردد (بوکلی[11]، ۲۰۰۵). تحت این شرایط گیاهان روزنه‌های خود را کاملاً می‌بندند

1. Gill and Tuteja
2. Blokhina
3. Salazar-Parra
4. Hussain
5. Mittler
6. Sofo
7. Hodges
8. Gill and Tuteja
9. Pillitteri and Torii
10. Lawlor and Tezara
11. Buckley

یا اصطلاحاً مقاومت روزنه‌ای خود را بالا می‌برند تا اتلاف آب به حداقل برسد و پتانسیل آب برگ بیش از حد کاهش پیدا نکند (دراک[1] و همکاران، ۲۰۱۳). مقدار نسبی آب برگ[2] و پتانسیل آب برگ[3] معیاری از وضعیت آبی گیاه را نشان می‌دهند که در آشکارسازی تنش کمبود آب در گیاهان مفیدند. مقدار نسبی آب برگ، شاخص بهتری از وضعیت آبی برگ می‌باشد. به علاوه چون روزنه‌ها موازنه‌ی جریان ورودی و خروجی را تنظیم می‌کنند بنابراین مقدار نسبی آب برگ به طور دقیق‌تری وضعیت روزنه‌ها را منعکس می‌کند (سینکلیر و لودلوو[4]، ۱۹۸۶). گزارشات متعددی بر وجود ارتباط مستقیم بین تنش خشکی و فاکتورهای ذکر شده در گیاهان کاریزو سیترنج و نارنگی کلئوپاترا (گارسیا-سانچز[5]، ۲۰۰۷)، پرتقال (سیو[6] و همکاران، ۱۹۹۵) و لیمو (روییز-سانچز[7]، ۱۹۹۷) وجود دارد.

به وسیله اندازه‌گیری عملکرد کلروفیل فلورسنس، می‌توان اطلاعاتی درمورد تغییرات کارایی فتوشیمیایی و اتلاف گرمایی بدست آورد. فلورسنس می‌تواند دیدگاه‌هایی درمورد توانایی گیاه در تحمل تنش‌های محیطی فراهم کند و نشان دهد که تنش‌ها تا چه حد به دستگاه‌های فتوسنتزی آسیب وارد کرده است. هر چقدر مقدار تنش وارد شده به گیاه بیشتر باشد مقدار صدمه به دستگاه‌های فتوسنتزی نیز بیشتر خواهد بود. آسیب دیدن دستگاه‌های فتوسنتزی کارایی فتوشیمیایی را کاهش می‌دهد و بالطبع کارایی کلروفیل فلورسنس افزایش خواهد یافت (مکس ول و جانسون[8]، ۲۰۰۰). سوفو[9] و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر تنش خشکی بر میزان *Fv/Fm* در دو رقم زیتون مورد بررسی قرار دادند. فیلیپو[10] (۲۰۱۱) نیز تاثیر خشکی بر فاکتور *Fv/Fm* را در مورد گیاه یونجه مورد بررسی قرار داد.

نیتریک اکسید یک رادیکال آزاد گازی با وزن مولکولی کم و قابل حل در آب و محلول‌های مایع است. این گاز در ابتدابه عنوان آلوده کننده‌ی محیطی به صورت نیتروژن اکسید شده NO و NO_2 (دی اکسید نیتروژن) بود و در سال‌های اخیر به عنوان مولکول علامت‌رسان اصلی مورد توجه بسیار قرار گرفته است (دورنر و کلسیگ[11]، ۱۹۹۹). بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که NO در انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دخالت دارد (دل‌ریو[12] و همکاران، ۲۰۰۴). NO می‌تواند به عنوان یک مولکول در پدیده‌ی ترارسانی علامت در گیاهان عمل کند و در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک، پاتوفیزیولوژیک و نموی مثل جوانه‌زنی دانه، بسته شدن روزنه، فعال کردن ژن‌های دخیل در پاسخ به

1. Drake
2. Relative Water Content
3. Leaf Water Potential
4. Sinclair and Ludlow
5. García-Sánchez
6. Save
7. Ruiz-Sánchez
8. Maxwell and Johnson
9. Sofo
10. Filippou
11. Durner and Klessig
12. del Rio

عوامل بیماری‌زا وتولید فیتوالکسین‌ها دخالت نماید (نیل[1] و همکاران، ۲۰۰۳؛ دورنر و کلسیگ[2]، ۱۹۹۹) یکی از سریعترین واکنش‌های NO در سیستم‌های بیولوژیکی ترکیب با ROS است تا از اثرات مخرب ROS بکاهد (بلیگنی و لاماتینا[3]، ۲۰۰۱). در بسیاری از مطالعات گزارش شده است که NO برون‌زا در گیاهان باعث کاهش خسارات ناشی از برخی تنش‌ها مثل خشکی، سرما، فلزات سنگین شوری و اشعه‌ی ماوراء بنفش و علف‌کش‌ها شده است (آراسیموویچ و فلوریزاک- ویچورک[4]، ۲۰۰۷). کاربرد خارجی سدیم نیتروپروساید (SNP) به عنوان آزادکننده‌ی NO در شرایط تنش کمبود آب، از دست دادن آب را کاهش داده و همچنین نشت یونی و سرعت تعرق را کم کرده و بسته شدن روزنه‌ها را القاء می‌کند، بنابراین مقاومت گیاه در برابر تنش کمبود آب را افزایش می‌دهد (گارسیا- ماتا و لاماتینا[5]، ۲۰۰۱).

هدف از اجرای پژوهش حاضر مطالعه اثر محلول پاشی سدیم نیتروپروساید بر برخی از فاکتورهای فیزیولوژیکی گیاهان پونسیروس، سیترنج و سیترملو تحت تنش خشکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش نهالهای یکساله مرکبات از ۳ گونه‌ی پونسیروس (*Poncirus. trifoliate*)، سوئینگل سیترومِلو (Swingle Citrumelo) و کاریزو سیترنج (Carrizo Citrange) از مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان بابل تهیه شد. نهال‌ها به گلخانه‌ی موجود در دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در خلعت‌پوشان منتقل گردید. سپس گلدان‌های پلاستیکی به حجم ۳۰ لیتری با نسبت‌های برابر پرلایت و پیت ماس پر گردید و نهال‌ها از کیسه‌های پلاستیکی کوچک به گلدانهای آماده‌شده انتقال داده شد. بعد از انتقال نهال‌ها به مدّت شش ماه به طور مرتب با محلول غذایی هوگلند آبیاری و کوددهی شدند تا نهال‌ها کاملاً استقرار یابند و آماده‌ی تیمار شوند.

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی انجام گرفت. تیمار رطوبتی در سه سطح ظرفیت مزرعه‌ای، ۶۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای و ۳۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای به عنوان فاکتور اول و محلول پاشی ماده‌ی SNP (Sodium Nitroprusside) در مقادیر صفر، ۰/۵ و ۱ میلی مولار به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد. تمامی تیمارها در ۳ تکرار انجام گرفت. جهت اعمال تیمارهای رطوبتی، قبل از شروع آزمایشات، رطوبت معادل ظرفیت مزرعه‌ای در گلدانها تعیین گردید. در مدت آزمایش متوسط رطوبت حجمی خاک در عمق ۲۰ سانتی‌متری توسط دستگاه TDR در سه نقطه از هر گلدان اندازه‌گیری و میانگین

1. Neill
2. Durner and Klessig
3. Beligni and Lamattina
4. Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek
5. García-Mata and Lamattina

آن‌ها محاسبه گردید و حجم آب لازم محاسبه و به گلدان‌های تیمار اضافه شد.

به منظور نگهداری رطوبت گلدان‌ها در حد ظرفیت مزرعه‌ای، ۶۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای و ۳۰٪ ظرفیت مزرعه‌ای، قرائت‌های رطوبت حجمی گلدان یک روز در میان تا پایان دوره‌ی آزمایش صورت گرفت و موقعی که مقدار رطوبت گلدان از مقادیر لازم کمتر شده بود، آبیاری به مقدار لازم صورت پذیرفت.

هدایت روزنه‌ای برگ توسط دستگاه Delta-T AP4 (Devices, Cambridge, UK) Porometer اندازه‌گیری شد. قبل از هر بار اندازه‌گیری هدایت روزنه‌ای، دستگاه با به کارگیری صفحه مخصوص مشبک و بر اساس دستور العمل توصیه شده توسط کارخانه سازنده، واسنجی گردید. هدایت روزنه‌ای بر روی سه برگ علامت‌گذاری شده در هر گلدان به طور هفتگی و به مدّت یک ماه بین ساعت ۱۲ الی ۱۴ اندازه‌گیری گردید.

پتانسیل آب برگ در آزمایشات گلخانه‌ای، یکبار و در انتهای آزمایش و بین ساعت ۱۲ الی ۱۴ بر روی سرشاخه‌ی هر درخت با استفاده از دستگاه محفظه‌ی فشار اندازه‌گیری گردید. برای تعیین محتوای نسبی آب برگ، در روز آخر اعمال تیمارها در گلخانه و بین ساعت ۱۴-۱۲ ظهر، یک برگ کامل و بالغ از بخش میانی هر نهال برای کاهش اثر سن گیاه انتخاب شد و سپس از بخش میانی برگ دو دیسک به قطر یک سانتی‌متر تهیه و بلافاصله وزن تر آنها اندازه‌گیری گردید. دیسک‌های وزن شده به مدت شش ساعت داخل آب مقطر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در یک محیط تاریک قرار داده شد. سپس آب سطح آنها به دقت خشک و وزن آنها در حالت تورم کامل بدست آمد. وزن خشک دیسک‌ها پس از قرار دادن آنها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و پس از خشک شدن کامل اندازه‌گیری شده و در نهایت محتوای نسبی آب برگ بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید.

$$RWC = \frac{\text{وزن خشک- وزن تر}}{\text{وزن خشک- وزن متورم}} \times 100$$

پارامترهای کلروفیل فلورسنس با استفاده از دستگاه کلروفیل فلورومتر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری این پارامترها بعد از یک ماه اعمال تیمار خشکی به انجام رسید. جهت اندازه‌گیری این پارامتر ابتدا از هر نهال، سه برگ بالغ کاملاً توسعه یافته از قسمت میانی شاخه انتخاب شد و اندازه‌گیری از آن برگ به عمل آمد. دستگاه بعد از محاسبات لازم مقادیر پارامترهای F0 (Minimum fluorescence)، Fm (Maximum fluorescence) و Fv/Fm(Maximum quantum efficiency of PSII Photochemistry) را می‌دهد.

روش ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی با رادیکال DPPH

مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه‌ی تر گیاهی (یا فریز شده در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد) داخل هاون چینی با ازت مایع کاملاً هضم شد. سپس دو میلی‌لیتر

متانول خالص روی آن ریخته شد و عصاره‌گیری گردید. عصاره‌ی حاصل با دور ۱۱۰۰۰ و به مدّت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید تا کاملاً شفاف شود. در سه زمان صفر، ۱۵ دقیقه، ۳۰ دقیقه و ۴۵ دقیقه در طول موج ۵۱۷ نانومتر عدد اسپکتروفتومتر قرائت گردید. با استفاده از فرمول زیر فعّالیت مهار رادیکال آزاد DPPH تعیین گردید (کانگ و سالتویت[1]، ۲۰۰۲):

$$\text{Inhibition\%} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید

مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه‌ی تر گیاهی در هاون ریخته شد و با یک میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد عصاره‌گیری شد و به مدّت ۲۰ دقیقه با دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس ۵۰۰ میلی‌لیتر از عصاره + ۱۵۰۰ میلی‌لیتر (TCA ۲۰٪ + TBA ۰/۵٪) روی هم ریخته شد و به مدّت نیم ساعت در بن‌ماری قرار داده شد فوراً به مدّت پنج دقیقه داخل یخ خرد شده قرار داده شد تا واکنش متوقف شود، سپس آن‌ها را از داخل یخ خارج کرده و اجازه داده شد حدود ۱۰ دقیقه در دمای اتاق بماند و سپس در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. برای محاسبه غلظت مالون دی آلدئید نمونه‌ها از ضریب خاموشی معادل $1/55\times10^5\ M^{-1}\ Cm^{-1}$ (هیس و پکر[2]، ۱۹۶۸) استفاده شد و بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فنل به روش عصاره‌گیری با متانول اسیدی

محتوای فنل‌های محلول کل با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری شد. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه‌ی تر گیاهی با ازت مایع داخل هاون چینی کاملاً هضم شد، سپس دو میلی‌لیتر متانول اسیدی به آن اضافه شد و عصاره‌گیری گردید. از عصاره‌ی حاصل برای سنجش فنل‌های محلول استفاده شد و با اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۴۰ نانومتر قرائت گردید. برای محاسبه غلظت فنل‌های محلول از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده گردید و نتایج برحسب میلی گرم در گرم وزن تر ارائه شد (کرول[3] و همکاران، ۲۰۱۴).

نتایج و بحث

پتانسیل آب برگ

بر اساس نتایج به‌دست آمده (نمودار ۱) مشخص شد که در سطح رطوبتی شاهد هر ۳ سطح سدیم نیترو پروساید در ۳ گونه پونسیروس، سیترومله و سیترنج بیشترین مقدار پتانسیل آب برگ را نسبت به ۲ سطح رطوبتی دیگر به خود اختصاص دادند. اعمال تیمار رطوبتی بدون در نظر گرفتن تیمار سدیم نیترو پروساید باعث کاهش معنی‌داری در مقدار پتانسیل آب برگ هر ۳ گونه شد. در سطح رطوبتی ۳۰٪ شاهد سطح ۱ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید در گونه

1. Kang and Saltveit
2. Heath and packer
3. Król

سیترنج و سطح ۰/۵ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید در گونه سیترواملو بیشترین مقدار پتانسیل آب برگ را به خود اختصاص داد. در سطح رطوبتی ۶۰٪ شاهد گونه پونسیروس در هر ۳ سطح سدیم نیترو پروساید و گونه سیترنج در سطح ۱ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید بیشترین مقدار پتانسیل آب برگ را به خود اختصاص دادند. کمترین مقدار پتانسیل آب برگ نیز مربوط به گونه سیترواملو در هر ۳ سطح سدیم نیترو پروساید و گونه سیترنج در ۲ سطح صفر و ۰/۵ میلی مولار بود. همانطور که از نتایج مشاهده می‌شود تنها عاملی که گونه پونسیروس را تحت تأثیر قرار داده است تیمار رطوبتی می‌باشد به طوری که با کاهش رطوبت، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها دیده می‌شود. درحالیکه تیمار سدیم نیترو پروساید هیچ‌گونه تأثیری در کاهش یا افزیش پتانسیل آب برگ این گیاه نداشته است. در تیمار رطوبتی ۶۰٪ شاهد، سدیم نیترو پروساید تأثیری بر مقدار پتانسیل آب برگ دو گونه پونسیروس و سیترواملو نداشته ولی گونه سیترنج بیشترین مقدار پتانسیل آب برگ را در غلظت ۱ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید و کمترین مقدار را در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار نشان داده است.

هدایت روزنه‌ای

نتایج نشان داد (نمودار ۲) که تیمار رطوبتی شاهد بیشترین مقدار هدایت روزنه‌ای برگ را به خود اختصاص داده است و کمترین مقدار آن در تیمار رطوبتی ۶۰٪ شاهد مشاهده شد.

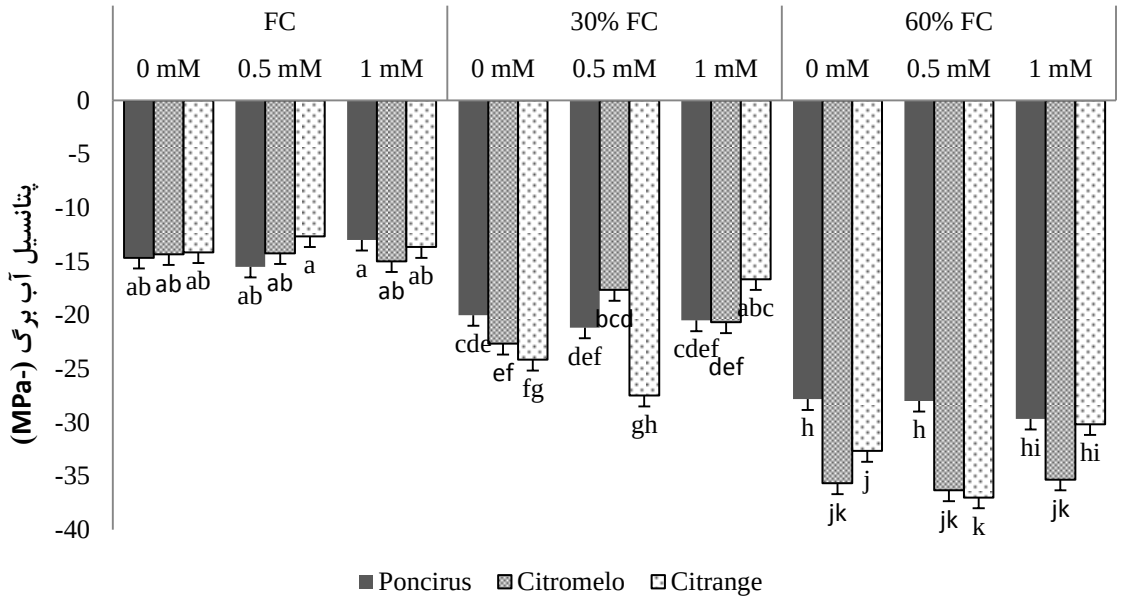
همانطور که از نتایج مشخص است (نمودار ۳) گونه پونسیروس بیشترین میزان هدایت روزنه‌ای را به خود اختصاص داده است. ۲ گونه سیترواملو و سیترنج با اختلاف معنی‌داری هدایت روزنه‌ای کمتری از پونسیروس داشتند.

محتوی نسبی آب برگ

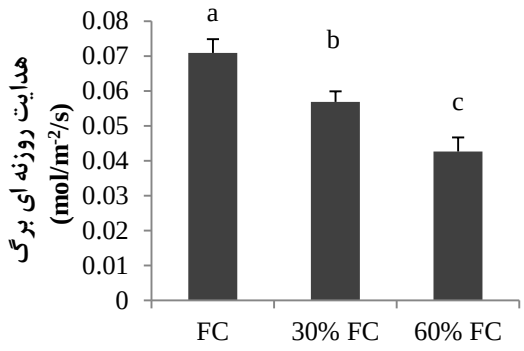
براساس نتایج حاصل آمده (نمودار ۴) مشخص شد که تیمار رطوبتی شاهد بیشترین مقدار هدایت روزنه‌ای برگ را به خود اختصاص داد. کمترین مقدار آن در تیمار رطوبتی ۶۰٪ شاهد مشاهده شد.

نتایج نشان داد (نمودار ۵) که تیمار ۱ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید بیشترین مقدار نسبی آب برگ را به خود اختصاص داده است. کمترین مقدار نسبی آب برگ مربوط به تیمارهای صفر و ۰/۵ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید بوده و اختلاف معنی‌داری با تیمار ۱ میلی‌مولار داشته است.

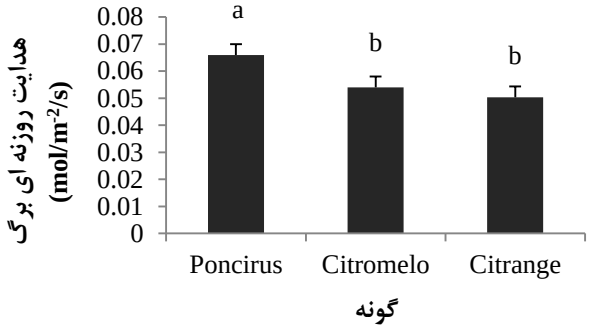
وضعیت آبی سلول‌های گیاهی اغلب برحسب پتانسیل آب برگ، محتوی نسبی آب برگ و هدایت روزنه‌ای توصیف می‌گردد. وجود تنش خشکی در محیط اطراف گیاه جذب آب توسط گیاه را دچار اختلال می‌کند. برای اینکه گیاه بتواند آب مورد نیاز خود را جذب کند نیازمند این است که یکسری



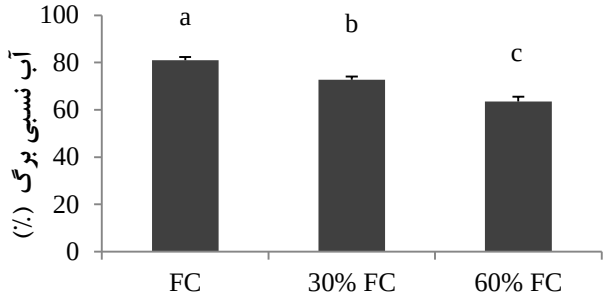
نمودار ۱- مقایسه میانگین پتانسیل آب برگ در سطوح مختلف رطوبتی در ۳ سطح سدیم نیترو پروساید



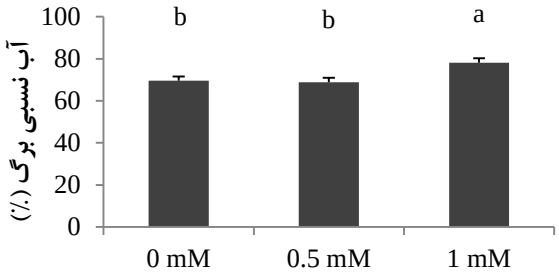
نمودار ۲- مقایسه میانگین هدایت روزنه‌ای برگ در سطوح مختلف رطوبتی



نمودار ۳- مقایسه میانگین هدایت روزنه‌ای برگ در ۳ گونه مرکبات



نمودار ۴- مقایسه میانگین مقدار نسبی آب برگ در سطوح مختلف رطوبتی



نمودار ۵- مقایسه میانگین مقدار نسبی آب برگ در سطوح مختلف سدیم نیترو پروساید

تغییرات در خود ایجاد کند تا بتواند از عهده کم آبی برآید. یکی از این تغییرات تنظیم اُسمزی می‌باشد، بدین معنی که گیاه یکسری مواد به نام اُسمولیت را بیوسنتز می‌کند که این مواد شامل قندها، پرولین، گلایسین بتائین و ... می‌باشد. این مواد هیچ گونه تأثیر تخریبی بر غشاها، آنزیم‌ها و دیگر ماکرومولکول‌ها حتی در غلظت‌های بالاتر ندارد و به‌نام سولیت‌های سازگار نیز نامیده می‌شوند (بری[1] ۲۰۰۱، کچین[2] و همکاران، ۲۰۰۶)، تولید این مواد در گیاه در معرض تنش خشکی، منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای در پتانسیل آب برگ آن‌ها می‌شود (مورگان و کندون[3]، ۱۹۸۶).

کاهش مقدار آب داخل بافت‌های گیاهی منجر به کم شدن محتوی نسبی آب برگ می‌شود که کاهش هدایت روزنه‌ای را در پی خواهد داشت (سینکلیر و لودلو[4]، ۱۹۸۶). راهکار دیگر گیاهان برای مقابله با تنش خشکی بسته نگه داشتن روزنه‌های خود است. کمبود آب باعث افزایش pH شیره‌ی سلولی می‌گردد و در نتیجه موجب تولید بیشتر اسید آبسایزیک در ریشه شده و انتقال آن به اندام هوایی می‌شود. اسید آبسایزیک نیز باعث تحریک خروج یون‌های K^+ از

1. Bray
2. Cechin
3. Morgan and Condon
4. Sinclair and Ludlow

سلول‌های محافظ روزنه شده و به دنبال آن کاهش فشار تورّمی و بسته شدن آن‌ها می‌شود که در نهایت باعث کم‌شدن هدایت روزنه‌ای می‌گردد (ویلکینسون و دیویس[1]، ۲۰۰۲). گارسیا- سانچز[2] و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که اعمال تنش خشکی بر درختان کاریزو سیترنج و نارنگی رقم کلئوپاترا باعث کاهش مقدار نسبی آب در هر دو گونه شده است که موافق با نتایج به دست آمده است. در آزمایشی بر روی پرتقال و تانگور مشخص کرده است که تنش خشکی به مدّت ۲۱ روز باعث کاهش هدایت روزنه‌ای می‌شود که موافق با نتایج به‌دست آمده است (سیو[3] و همکاران، ۱۹۹۵). کاربرد رژیم آبیاری PRD (Partial Root Drying) با مقادیر ۵۰٪ شاهد و ۱۰۰٪ شاهد بر روی یک طرف ریشه در مورد نهال‌های زیتون نشان دادکه این روش پتانسیل آب ساقه را بطور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش می‌دهد (سوفو و همکاران، ۲۰۰۹). روییز- سانچز[4] و همکاران (۱۹۹۷) اثر تنش خشکی بر روابط آبی برگ گیاهان لیمو را بررسی کردند و گزارش نمودند که با قطع آبیاری، کاهش تدریجی در مقادیر پتانسیل آب برگ مشاهده می‌شود. بطور کلی روابط آبی گیاه کاملاً تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد، با اینحال همانطور که از نتایج مشخص است کاربرد NO وضعیت آبی برگ را بهبود می‌بخشد. نیل[5] و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که کاربرد خارجی NO بسته شدن روزنه‌ها را القاء کرده و سلول‌ها را در مقابل صدمات اکسیداتیو حفظ می‌کند که موافق با نتایج این آزمایش است. تجمع NO برای بسته شدن روزنه‌ها که تحت تأثیر ABA هستند در گیاه *Vicia faba* ضروری گزارش شده است (آراسیمویچز و فلوریزاک- ویچورک[6]، ۲۰۰۷). گزارش شده است که تجمع مقادیر بالای پرولین گیاه را قادر می‌سازد تا تورژسانس و بنابراین پتانسیل آب خود را حفظ کند. کاربرد خارجی NO تجمع پرولین آزاد را در ryegrass تحت تنش سرما افزایش می‌دهد و باعث مقاومت آن به سرما می‌شود (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹). بسیاری از مطالعات قبلی وجود NO در سلسله گیاهی و دخالت آن در رشد و نمو و پاسخ‌های دفاعی را گزارش کرده‌اند. به نظر می‌رسد NO تأثیر مثبتی در کم کردن اثرات خشکی داشته باشد که نشان دهنده این است که ممکن است اثر NO در گیاهان بین باز یا بسته شدن روزنه‌ها بسته به غلظت آن و مرحله فیزیولوژیکی سلولهای نگهبان فرق می‌کند (نیل و همکاران، ۲۰۰۸). برای مثال گزارش شده که وقتی NO در غلظت‌های بالا بکار می‌رود باعث باز شدن روزنه‌ها می‌شود (ساکیهاما[7] و همکاران، ۲۰۰۳).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

1. Wilkinson and Davies
2. García-Sánchez
3. Savé
4. Ruiz-Sánchez
5. Neill
6. Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek
7. Sakihama

بر اساس نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین صفت فوق (نمودار ۶) مشخص شد که هر ۳ گونه با افزایش شدّت تنش خشکی فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را افزایش داده‌اند. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به تیمار رطوبتی ۶۰٪ شاهد در گونه سیترنج بوده و کمترین مقدار آن در تیمار رطوبتی شاهد و گونه سیترواملو دیده می‌شود. در کل، گونه سیترنج فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به ۲ گونه دیگر دارد.

فعّالیت جاروب‌گری رادیکال DPPH معیاری از فعّالیت آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی است. رادیکال DPPH با گرفتن هیدروژن از آنتی‌اکسیدان‌ها و تشکیل DPPH-H جاروب‌گری می‌شود (کرول[1] و همکاران، ۲۰۱۴). در بررسی دیگری مشاهده شد که تنش سرما بر روی گیاهچه‌های خیار باعث کاهش مقادیر فعّالیت DPPH شده است که با نتایج این آزمایش مطابقت ندارد (کانگ و سالتویت[2]، ۲۰۰۲).

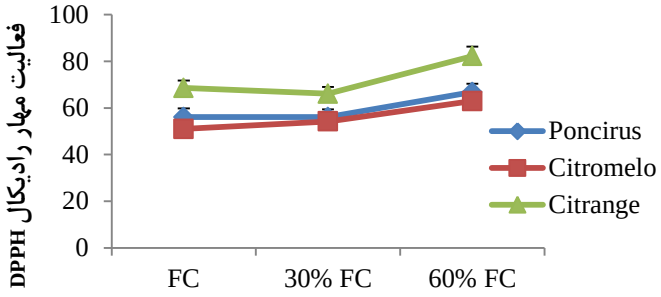
فنل کل

نتایج نشان داد (نمودار ۷) که در تیمار رطوبتی ۶۰٪ شاهد غلظت‌های صفر و ۰/۵ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید در گونه سیترنج بیشترین مقدار فنل را به خود اختصاص داده و در یک گروه قرار دارند که نشان دهنده این است که محتوی فنل‌های کل تحت شرایط تنش خشکی ۶۰٪ شاهد به تنهایی و تیمار ۰/۵ میلی‌مولار NO+ تنش خشکی ۶۰٪ شاهد تغییر معنی‌داری نداشت، اما در غلظت ۱ میلی‌مولار مقدار فنل تحت تنش خشکی ۶۰٪ شاهد کاهش نشان داد. همانطور که مقایسه میانگین صفت فوق نشان می‌دهد گونه سیترنج در تیمار رطوبتی ۶۰٪ شاهد و سدیم نیترو پروساید ۱ میلی‌مولار مقدار کمتری داشته و اختلاف معنی‌داری با گروه اول نشان می‌دهد. کمترین مقدار فنل کل نیز مربوط به تیمار رطوبتی شاهد و غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید در گونه سیترنج دیده می‌شود. همان‌طور که مشخص است بیشترین تغییرات فنل کل در گونه سیترنج دیده می‌شود، درحالیکه گونه پونسیروس و سیترواملو تحت تأثیر هیچ کدام از تیمارها قرار نگرفته‌اند، افزایش خشکی و سدیم نیترو پروساید هیچ تأثیری بر مقدار فنل این گونه‌ها نداشته است و اختلاف معنی‌داری از خود نشان نداده‌اند.

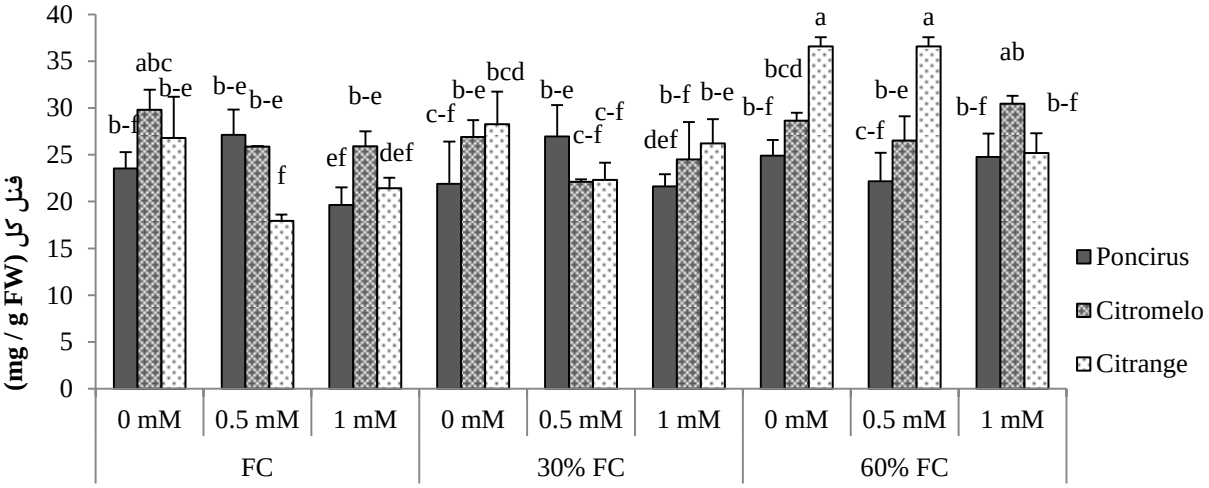
فنل‌ها یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مهم در مقابله با تنش‌های اکسیداتیو نقش مهمی ایفا می‌کنند (رایس-اوانس[3] و همکاران، ۱۹۹۷).

مطالعه اخیری بر روی تنش طولانی مدت خشکی در انگور انجام گرفته و مشخص شده است که مقدار فنل کل این گیاه کاهش یافته است (کرول[4] و همکاران، ۲۰۱۴)، محققان دیگری به نتایج متضادی رسیدند بطوری‌که مشاهده شده است اعمال تنش

1. Król
2. Kang and Saltveit
3. Rice-Evans
4. Król



نمودار ۶- مقایسه میانگین درصد مهار رادیکال DPPH در سطوح مختلف رطوبتی در ۳ گونه مرکبات



نمودار ۷- مقایسه میانگین فنل کل در سطوح مختلف رطوبتی در ۳ سطح سدیم نیترو پروساید در ۳ گونه مرکبات

خشکی و سرما برروی گیاه *Rehmannia glutinosa* باعث افزایش مقدار کل ترکیبات فنلی شده است (چانگ[1] و همکاران، ۲۰۰۶). علت یکسان نبودن نتایج می‌تواند در ارتباط با تفاوت در تنش‌های غیرزیستی مثل نوع تنش، شدت تنش، طول مدت آن و مرحله نموی گیاه و همچنین نوع ماده گیاهی (کل گیاه و یا بخشی از گیاه مثل ریشه یا برگ‌ها) باشد. گزارش شده است که ترکیبات فنلی با مبادله الکترون در حضور آنزیم‌های پراکسیداز و سم‌زدایی پراکسید هیدروژن تولید شده، می‌توانند در سلول به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کنند (ساکیهاما[2] و همکاران، ۲۰۰۲). در این آزمایش به نظر می‌رسد که تنش خشکی باعث افزایش مقدار فنل کل شده است. همچنین به نظر می‌رسد که ماده رهاکننده سدیم نیترو پروساید در تیمار رطوبتی ۶۰٪ شاهد در غلظت‌های پایین (۰/۵میلی‌مولار) تأثیری در تعدیل

1. Chung

2. Sakihama

تنش از خود نشان نداده است و نتوانسته مانع عملکرد ROS شود، ولی در غلظت ۱ میلی‌مولار کاهش معنی داری در مقادیر فنل گونه سیترنج داشته است که نشان دهنده‌ی اثر تعدیل‌کنندگی NO است و خسارات ناشی از رادیکال‌های اکسیژن را کاهش می‌دهد.

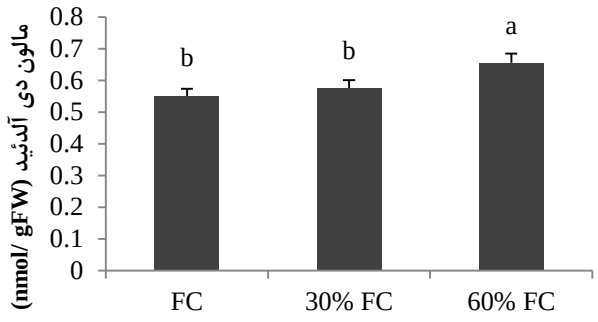
مالون دی آلدئید

نتایج نشان داد (نمودار ۸) که تیمار رطوبتی ۶۰٪ شاهد بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید را به خود اختصاص داده و در گروه مجزایی از دو تیمار رطوبتی دیگر قرار گرفته است. دو تیمار رطوبتی شاهد و ۳۰٪ شاهد اختلاف معنی‌داری با همدیگر نشان نداده و در یک گروه قرار گرفتند.

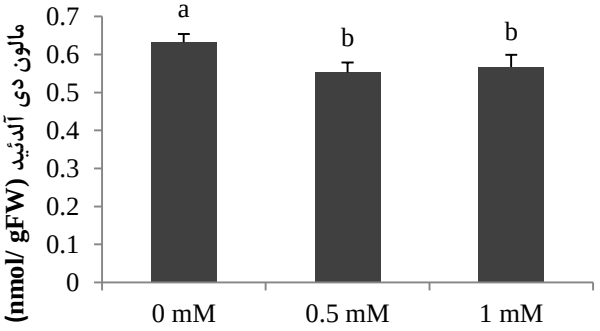
براساس نتایج به‌دست آمده مشخص شد (نمودار ۹) که تیمار صفر میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید بیشترین مقدار مالون دی آلدئید را دارد. کمترین مقدار نیز مربوط به غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید می‌باشد و با اختلاف معنی‌داری از شاهد هر ۲ در یک گروه قرار می‌گیرند.

براساس نتایج به‌دست آمده (نمودار ۱۰) مشخص شد که بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید مربوط به گونه پونسیروس می‌باشد. ۲ گونه سیترولو و سیترنج با اختلاف معنی‌داری کمتز از گونه پونسیروس می‌باشند. به عنوان یکی از شاخص‌های مهم در مورد تنش‌های اکسیداتیو افزایش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها است که منجر به افزایش مقدار MDA می‌شود. در تنش خشکی نفوذپذیری غشاء افزایش می‌یابد که به وسیله افزایش نشت الکترولیت‌ها و افزایش مقدار MDA نشان داده می‌شود (فاروق[1] و همکاران، ۲۰۰۹). آربونا[2] و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که اعمال تنش شوری به عنوان یک تنش اکسیداتیو در مورد گیاه کاریزو سیترنج میزان MDA را افزایش می‌دهد. غرقابی به عنوان یکی دیگر از تنش‌های اکسیداتیو مقدار MDA را در گیاهان کاریزوسیترنج و سیترولو افزایش داده است که موافق با نتایج این آزمایش است (آربونا و همکارن، ۲۰۰۸). کاربرد NO خارجی تحمل به شرایط تنش‌های غیرزیستی را افزایش می‌دهد که همراه با کاهش مقادیر MDA است (گراس[3] و همکاران، ۲۰۱۳). فاروق و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که کاربرد سدیم نیترو پروساید به عنوان آزادکننده NO در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به صورت محلول‌پاشی در گیاه برنج باعث کاهش معنی‌داری در مقدار MDA شده است. NO نقش مهمی در تحمل به خشکی در گیاه *Agropyron cristatum* دارد، بطوریکه در آزمایشی با اعمال تنش خشکی بر روی این گیاه و پیش تیمار با L-NAME و cPTIO به عنوان بازدارنده‌های سنتز NO مشخص شد که مقادیر MDA و و نشت الکترولیت بطور معنی‌داری افزایش

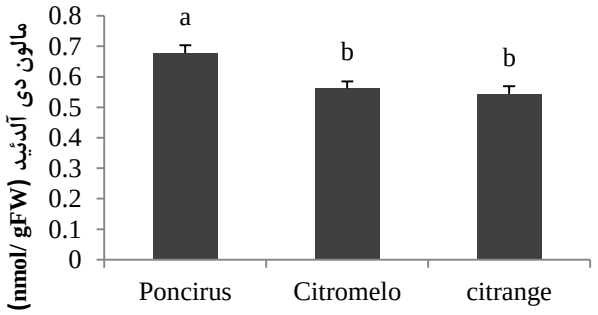
1. Farooq
2. Arbona
3. Gross



نمودار ۸- مقایسه میانگین مالون دی آلدئید در سطوح مختلف رطوبتی



نمودار ۹- مقایسه میانگین مالون‌دی‌آلدئید در سطوح مختلف سدیم نیترو پروساید



نمودار ۱۰- مقایسه میانگین مالون دی آلدئید در ۳ گونه مرکبات

یافت که موافق با نتایج آزمایشات حاضر است (شان[1] و همکاران، ۲۰۱۱).

اندازه‌گیری کلروفیل فلورسنس

براساس نتایج به‌دست آمده (نمودار۱۱) مشخص شده است که تیمار رطوبتی شاهدو ۳۰٪ شاهد بیشترین مقدار *Fv/Fm* را به خود اختصاص داده‌اند. کمترین مقدار *Fv/Fm* نیز در تیمار رطوبتی ۶۰٪

1. Shan

شاهد به دست آمد و با اختلاف معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر، در گروه مجزایی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که (نمودار ۱۱) تیمار ۱ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید بیشترین مقدار *Fv/Fm* را به خود اختصاص داده است. کمترین مقدار *Fv/Fm* مربوط به تیمارهای صفر و ۰/۵ میلی‌مولار سدیم نیترو پروساید بوده و اختلاف معنی‌داری با تیمار ۱ میلی مولار داشته و در گروه مجزایی قرار می‌گیرند.

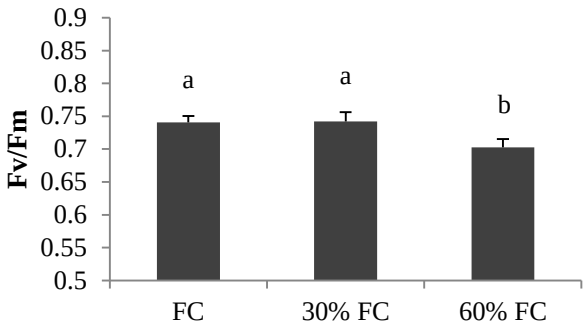
Fv/Fm نشان دهنده حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستمII است. این صفت پارامتر مهمی است زیرا وضعیت فیزیولوژیکی دستگاه‌های فتوسنتزی را نشان می‌دهد. تنش‌های محیطی که کارایی فتوسیستم II را تحت تأثیر قرار می‌دهند باعث کم شدن این نسبت می‌شود (کوچوا[1] و همکاران ۲۰۰۴؛ کراوس و ویس[2]، ۱۹۹۱). هر چقدر مقدار تنش وارد شده به گیاه بیشتر باشد مقدار صدمه به دستگاه‌های فتوسنتزی نیز بیشتر خواهد بود. آسیب دیدن دستگاه‌های فتوسنتزی کارایی فتوشیمیایی را کاهش می‌دهد و بالطبع کارایی کلروفیل فلورسنس افزایش خواهد یافت (مکس ول و جانسون[3]، ۲۰۰۰).

سوفو[4] و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر تنش خشکی را در دو رقم زیتون بر روی پارامترهای کلروفیل فلورسانس بررسی کرد و اشاره کرد که کمبود آب باعث کاهش پارامتر *Fv/Fm* می‌گردد که موافق با نتایجاین آزمایش است. نتایج مشابهی در مورد کاهش پارامتر *Fv/Fm* در مورد گیاهان یونجه در شرایط تنش خشکی گزارش شده است (فیلیپو[5] و همکاران، ۲۰۱۱). استفاده از تعدیل‌کننده‌های تنش مثل سدیم نیتروپروساید در کاهش اثرات تنش بسیار گزارش شده است بطوری‌که در تحقیقی در مورد تأثیر سدیم نیتروپروساید بر تعدیل تنش اسمزی در گیاه گندم مشخص شد که استفاده از این ماده به غلظت ۰/۲ میلی‌مولار باعث افزایش *Fv/Fm* شده است (لی[6] و همکاران، ۲۰۰۷).

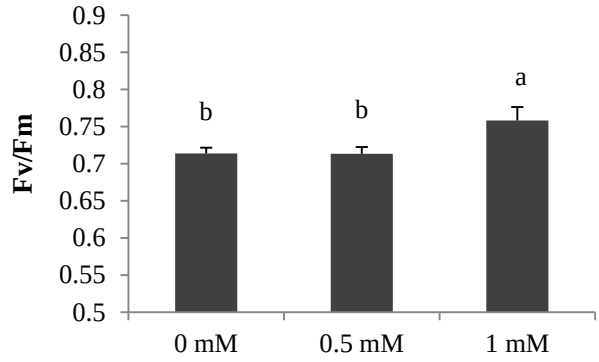
نتیجه‌گیری کلی

تنش خشکی تأثیر منفی بر فاکتورهای رشدی گیاهان داشته است. از جمله می توان به کاهش پتانسیل آب برگ، کاهش محتوی نسبی آب برگ، کاهش هدایت روزنه‌ای و همچنین کاهش *Fv/Fm* اشاره کرد. مقادیر فنل کل با افزایش شدت خشکی افزایش یافت. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار ماده مالون دی آلدئید نیز با اعمال تنش خشکی افزایش معنی‌داری داشتند. کاربرد سدیم نیتروپروساید توانسته تأثیر تعدیل‌کنندگی بر گیاهان تحت تنش خشکی داشته باشد و غلظت سدیم نیتروپروساید با تحمل گیاه به کمبود آب رابطه‌ی معنی‌داری نشان داد، به

1. Kocheva
2. Krause and Weis
3. Maxwell and Johnson
4. Sofo
5. Filippou
6. Lei



نمودار ۱۱- مقایسه میانگین Fv/Fm در سطوح مختلف رطوبتی



نمودار ۱۲- مقایسه میانگین Fv/Fm در سطوح مختلف سدیم نیترو پروساید

طوریکه با افزایش غلظت تحمل گیاهان به تنش بیشتر شد به‌طوریکه غلظت ۱ میلی‌مولار این ماده بیشترین تأثیر را داشت. گونه‌ها از نظر تحمل به شرایط تنش پاسخ‌های متفاوتی از خود نشان دادند، به‌طوریکه به نظر می‌رسد پونسیروس گونه مقاوم‌تری است.

منابع

گلعین، ب. و عدولی، ب. ۱۳۹۰. مرکبات (کاشت). انتشارات نوین پویا. ۱۶۰ صفحه.

فتوحی قزوینی، ر. و فتاحی مقدم، ج. ۱۳۷۷. پرورش مرکبات در ایران. انتشارات دانشگاه گیلان. ۳۷۰ صفحه.

Agarwal, S. and Grover, A. 2006. Molecular biology, biotechnology and genomics of flooding-associated low O_2 stress response in plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 25: 1-21.

Arasimowicz, M. and Floryszak-Wieczorek, J. 2007. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. Plant Science, 172: 876-887.

Arbona, V., Hossain, Z., Lopez-Climent, M.F., Perez-Clemente, R.M. and Gomez-Cadenas, A. 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. Physiologia Plantarum, 132: 452-466.

Bailey-Serres, J. and Voesenek, L.A. 2008. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. Annual Review of Plant Biology, 59: 313-339.

Beligni, M.V. and Lamattina, L. 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. Plant Cell Environment, 24: 267-278.

Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annual of Botany, 91: 179-194.

Bray, E.A. 2001. Plant response to water deficit stress. In eL S. John Wiley & Sons, Ltd.

Buckley, T.N. 2005.The control of stomata by water balance. New Phytologist Journal, 168: 275-292.

Cechin, I., Rossi, S.C., Oliveira, V.C. and Fumis, T.F. 2006. Photosynthetic responses and proline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit. Photosynthetica, 44: 143-146.

Chung, I.M., Kim, J.J., Lim, J.D., Yu, C.Y., Kim, S.H. and Hahn, S.J. 2006. Comparison of resveratrol, SOD activity, phenolic compounds and free amino acids in *Rehmannia glutinosa* under temperature and water stress. Environmental and Experimental Botany, 56: 44-53.

Davies, F.S. and Albrigo, L.G. 1994. *Citrus*. CAB International.

Del Rio, L.A., Corpas, F.J. and Barroso, J.B. 2004.Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. Phytochemistry, 65: 783-792.

Drake, P.L., Froend, R.H. and Franks, P.J. 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. Journal of Experimental Botany, 64: 495-505.

Durner, J. and Klessig, D.F. 1999.Nitric oxide as a signal in plants. Current Opinion *in* Plant Biology, 2: 369-374.

Farooq, M., Basra, S.M.A., Wahid, A. and Rehman, H. 2009. Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativ*a L.). Journal of Agronomy and Crop Science, 195: 254-261.

Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A. and. Siddique, K.H.M. 2012. Drought stress in plants: an overview. In Plant Responses to Drought Stress. R. Aroca, editor. Springer Berlin Heidelberg. 1-33

Filippou, P., Antoniou, C. and Fotopoulos, V. 2011.Effect of drought and re-watering on the cellular status and antioxidant response of *Medicago truncatula* plants. Plant signaling and behavior. 6: 270-277.

García-Mata, C. and Lamattina, L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. Plant physiology, 126(3):1196-1204.

García-Sánchez, F., Syvertsen, J.P., Gimeno, V., Botía, P. and 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.

Gill, S.S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930.

Gross, F., Durner, J. and Gaupels, F. 2013. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. Frontiers in plant science, 29(4): 419.

Heath, R.L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry *and* Biophysics, 125: 189-198.

Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B. and Gallais, A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. Journal of Experimental and Botany, 58: 2369-2387.

Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. and Prange, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207: 604-611.

Hussain, M., Malik, M.A., Farooq, M., Ashraf, M.Y. and Cheema, M.A. 2008. Improving drought tolerance by exogenous application of glycine betaine and salicylic acid in sunflower. Journal of Agronomy and Crop Science, 194: 193-199.

Kang, H.M. and Saltveit, M.E. 2002. Reduced chilling tolerance in elongating cucumber seedling radicles is related to their reduced antioxidant enzyme and DPPH-radical scavenging activity. Phsiologia Plantarum, 115: 244-250.

Kiani, S.P., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A., Nishinakamasu, V., Hopp, E., Gentzbittel, L., Paniego, N. and Sarrafi, A. 2007. Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. Plant Science, 172: 773-787.

Kocheva, K., Lambrev, P., Georgiev, G., Goltsev, V. and Karabaliev, M. 2004. Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress. Bioelectrochemistry, 63: 121-124.

Krause, G.H. and Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Physiology *and* Plant Molecular Biology, 42: 313-349.

Król, A., Amarowicz, R. and Weidner, S. 2014. Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. Acta Physiologiae Plantarum, 36: 1491-1499.

Lawlor, D.W. and Tezara, W. 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. Annals of Botany, 103: 561-579.

Lei, Y., Yin, C., Ren, J. and Li, C. 2007. Effect of osmotic stress and sodium nitro prusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. Biologia Plantarum, 51: 386-390.

Loreto, F., Tricoli, D. and Marco, G. 1995. On the relationship between electron transport rate and photosynthesis in Leaves of the C4 plant *sorghum bicolor* exposed to water stress, temperature changes and carbon metabolism inhibition. Functional Plant Biology, 22: 885-892.

Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of biochemistry and biophysics, 444: 139-158.

Maxwell, K. and Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence a practical guide. Journal of Experimental Botany, 51: 659-668.

Meyer, S. and Genty, B. 1998. Mapping intercellular CO_2 mole fraction (Ci) in *rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging. Significance Of Ci estimated from leaf gas exchange. Plant Physiology, 116: 947-957.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7: 405-410.

Morgan, J. and Condon, A. 1986. Water use, grain yield, and osmo-regulation in wheat. Functional Plant Biology, 13: 523-532.

Mishra, V. and Cherkauer, K.A. 2010. Retrospective droughts in the crop growing season: Implications to corn and soybean yield in the Midwestern United States. Agricultural and Forest Meteorology, 150: 1030-1045.

Mittler, R. and Blumwald, E. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. Annual Review of Plant Biology, 61: 443-462.

Neill, S.J., Desikan, R. and Hancock, J.T. 2003. Nitric oxide signalling in plants. New Phytologist, 159: 11-35.

Pillitteri, L.J. and Torii, K.U. 2012. Mechanisms of stomatal development. Annual Review of Plant Biology, 63: 591-614.

Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in plant science, 2: 152-159.

Ruiz-Sánchez, M.C., Domingo, R., Savé, R., Bie, l.C. and Torrecillas, A. 1997. Effects of water stress and re-watering on leaf water relations of lemon plants. Biologia Plantarum, 39: 623-631.

Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C. and Yamasaki, H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicology, 177: 67-80.

Sakihama, Y., Murakami, S. and Yamasaki, H. 2003. Involvement of nitric oxide in the mechanism for stomatal opening in *Vicia faba* leaves. Biologia Plantarum, 46: 117-119.

Salazar-Parra, C., Aguirreolea, J., Sánchez-Díaz, M., Irigoyen, J.J. and Morales, F. 2012. Climate change (elevated CO_2, elevated temperature and moderate drought) triggers the antioxidant enzymes' response of grapevine cv. Tempranillo, avoiding oxidative damage. Physiologia plantarum, 144: 99-110.

Savé, R., Biel, C., Domingo, R., Ruiz-Sánchez, M.C. and. Torrecillas, A. 1995. Some physiological and morphological characteristics of citrus plants for drought resistance. Plant Science, 110: 167-172.

Shan, C., He, F., Xu, G., Han, R. and Liang, Z. 2011. Nitric oxide is involved in the regulation of ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. Biologia Plantarum, 56: 187-191.

Sinclair, T. and Ludlow, M. 1986. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. Functional Plant Biology, 13: 329-341.

Sofo, A., Dichio, B., Montanaro, G. and Xiloyannis, C. 2009. Photosynthetic performance and light response of two olive cultivars under different water and light regimes. Photosynthetica, 47: 602-608.

Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. 2004. Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. Physiologia plantarum, 121: 58-65.

Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E. and Mittler, R. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. New Phytologist, 203: 32-43.

Wilkinson, S. and Davies, W.J. 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. Plant Cell Environment, 25: 195-210.

Effects of NO on some physiological characteristics in three species of citrus in water deficit condition

Elham Gholivandan[1]*, Mohamamd Reza Dadpour[2], Ali Movafeghi[3], Fariborz Zaaree Nahandi[4], Davoud Zare Haghi[5] and Morteza Kousari Nasab[6]

1. Ph.D. Pomology, Department of Horticultural Science, University of Tabriz, Iran
2. Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
3. Professor, Bialogy Department, Faculty Naturul Sciences, University of Tabriz, Iran
4. Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
5. Assistant Professor, Department of Soil Science, Agriculture Department, University of Tabriz, Iran
6. Assistant Professor, Haiian Biotechnology Center, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Iran

(Received: Dec. 23, 2016 - Accepted: Feb. 14, 2017)

Abstract

Most plants encounter with different environmental stresses during their life cycle. Water deficit is one of the stresses that negatively affect the growth and yield of many agricultural crops such as members of citrus family. Higher plants developed several physiological and biochemical adaptation systems that give them a chance to survive and let them to escape from water deficit stress. In this research the effect of Nitric Oxide, as a stress modulator, on citrus plants was investigated. A trial was conducted as factorial with randomized complete blocks design in three replications on three species of citrus including Poncirus, Swingle citrumelo and Carrizo citrange. There were also drought stress treatments in three levels (FC, 30% FC and 60% FC) and Sodium nitroprusside treatments, as a NO releasing compound, in three levels (0, 0.5 and 1 mM). Some physiological factors such as chlorophyll fluorescence, stomatal conductance, leaf water potential and leaf relative water content were measured. Also, some biochemical factors such as DPPH and the contents of phenols and malondialdehyde were investigated. The results showed that drought stress, decreased leaf water potential, stomatal conductance, relative water content and Fv/Fm significantly. Some biochemical factors such as DPPH, phenols and malondialdehyde activity increased during drought stress. Application of sodium nitroprusside, modulated the destructive effects of drought stress specially with the concentration of 1 mM.

Keywords: Drought stress, *Poncirus*, Sodium nitroprusside, Chlorophyll fluorescence, Fv/Fm.

* Corresponding author: Email: e.gholivandan@gmail.com