

مقایسه تحمل به تنش شوری دو رقم گلابی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای^۱

Comparison of Salinity Stress Tolerance of Two Pear Cultivars under *In Vitro* Conditions

حمید مالمیر، علی سلیمانی*، اعظم نیکزاد، وحید بیگدلو، فرهنگ رضوی و علی عمارلو^۲

چکیده

در این پژوهش، تحمل به تنش شوری ریزنمونه‌های شاخساره دو رقم گلابی هروسوئیت و بارتلت، در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای آزمایش شد. تیمار شوری در سه سطح صفر (شاهد)، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در محیط کشت پرآوری جامد (QL)، روی ریزنمونه‌های شاخساره گلابی اعمال شد. پس از شش هفته، نتیجه‌ها نشان داد که شوری، باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک، طول شاخساره و شمار برگ شاخساره‌ها در هر دو رقم گلابی شد، اما این روند کاهش در رقم بارتلت شدیدتر بود. بیش‌ترین شاخص آسیب شوری در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به‌ترتیب با ۱/۴۱ و ۱/۷۲ برای رقم‌های هروسوئیت و بارتلت مشاهده شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با افزایش شوری افزایش یافت. بیش‌ترین فعالیت آنزیم پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در رقم هروسوئیت و در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار نمک مشاهده شد. رقم هروسوئیت در مقایسه با رقم بارتلت، از نظر مقدار پرولین و حفظ نسبت بالای پتاسیم به سدیم در بافت شاخساره در موقعیت برتری قرار داشت. ریزنمونه‌های دو رقم گلابی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای در مورد بیشتر شاخص‌های ارزیابی شده، نمایش متفاوتی از مقدار تحمل به تنش شوری کلرید سدیم نشان دادند و رقم هروسوئیت تحمل بالاتری، داشت. واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پتاسیم، پراکسیداز، پرولین، تنش، محیط کشت.

مقدمه

شوری خاک همراه با تغییرهای اقلیمی به‌طور پی‌درپی در بخش‌های زیادی از کره زمین رو به افزایش است (۱۹). این شرایط شور با افزایش کشت متراکم درختان و استفاده از آب آبیاری نامناسب شدید شده است (۱۶). شوری با کاهش پتانسیل اسمزی و آب قابل دسترس و تجمع یون‌های سدیم و کلر، باعث برهم زدن تعادل ماده‌های معدنی و آسیب‌های یاخته‌ای و مولکولی در گیاه می‌شود. از این‌رو، تحمل به تنش‌های نازیوا مانند شوری یکی از هدف‌های به‌نژادی مهم در برنامه‌های توسعه ژنتیکی و به‌نژادی درختان میوه است (۲). یکی از بزرگ‌ترین آسیب‌های تنش شوری، تخریب لیپیدهای غشایی است. اسیدهای چرب غیراشباع حساس‌ترین بخش غشا به واکنش‌های اکسایش در اثر تنش شوری هستند. تنش شوری باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود. فعالیت این گونه‌های فعال، باعث تخریب لیپیدها و آسیب به مولکول‌های پروتئینی و ساختار نوکلئیک اسیدهای یاخته می‌شود (۱۰). گیاهان برای رویارویی با اثرهای زیان‌آور تنش شوری و اثرهای گونه‌های فعال اکسیژنی ناشی از آن، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۲۶

۱- تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱۶

۲- به‌ترتیب دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار سابق گروه علوم باغبانی و استادیار پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان.

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (asoleimani@znu.ac.ir).

مانند آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهند (۱۷، ۲۳). همچنین به‌منظور تنظیم و کاهش پتانسیل اسمزی یاخته‌ها، ماده‌های محلول درون‌یاخته‌ای مانند پرولین را افزایش می‌دهند (۱۳، ۱۴).

در سال‌های گذشته استفاده از فن کشت درون‌شیشه‌ای برای هدف‌های به‌زادی و غربال‌گری گونه‌های مختلف درختان میوه از جمله سیب (۳۱)، گلابی (۳۲)، پسته (۷) و نارنج (۲۹) استفاده شده است. تحمل به تنش‌های نازیوا در ریزنمونه‌های درختان میوه در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای به‌دلیل امکان تکرار آزمایش پی‌درپی در یک سال، کاهش هزینه‌ها و نیز کنترل به‌نسبت دقیق عامل‌های محیطی توانسته است در ارزیابی آغازین مقدار تحمل و همچنین غربال‌گری این نمونه‌ها در برابر تنش‌های مختلف، استفاده شود (۲۸، ۲۹). اعمال تنش شوری روی پایه M4 سیب در شرایط درون‌شیشه‌ای نشان داد وزن تر، شمار شاخه و طول شاخه کاهش و مقدار پرولین بافت برگ با افزایش سطح‌های مختلف شوری افزایش یافت (۳۱). با اعمال تنش شوری توسط کلرید سدیم در شش سطح شوری در شرایط درون‌شیشه‌ای روی نارنج مشخص شد که با افزایش سطح‌های تنش، طول شاخه، شمار برگ، شمار شاخه، وزن خشک، مقدار پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم بافت برگ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (۲۹).

گلابی از تیره وردسانان^۱ و حساس به شوری است و گیاهان کشت شده به‌طور طولانی، در شرایط غلظت پایین شوری نیز آسیب می‌بینند (۲۰). بررسی‌هایی درباره اثر تنش شوری ناشی از کلرید سدیم در رقم‌ها و پایه‌های مختلف گلابی در شرایط درون‌شیشه‌ای (۳۲) و شرایط باغی (۱۸) انجام گرفته است. اما با توجه به بررسی منابع علمی صورت گرفته، گزارشی از اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای گلابی و نیز تفاوت احتمالی موجود در مقدار تحمل به تنش دو رقم مورد بررسی در این آزمایش، وجود ندارد. همپوشانی بین گیاه کامل و ریزنمونه‌های کشت بافتی حاصل از آن‌ها در پاسخ به تنش‌های نازیوا وجود دارد. برای نمونه در مورد گیاه سیب‌زمینی تشابه زیادی بین پاسخ گیاه کامل و ریزنمونه‌های کشت بافتی (ریزنمونه‌های ریشه) آن در پاسخ به تنش شوری گزارش شده است (۲۶). بر این اساس، هدف از این پژوهش مقایسه تحمل به تنش شوری ناشی از کلرید سدیم ریزنمونه‌های دو رقم گلابی هروسوئیت^۲ و بارتلت^۳، بر اساس شاخص‌های مهم مرفوفیزیولوژیک و زیست‌شیمیایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ماده‌های گیاهی و شرایط کشت

ریزنمونه‌های شاخساره گلابی رقم‌های هروسوئیت و بارتلت از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تولید نهال و بذر کرج تهیه و به‌منظور پرآوری و رسیدن به شمار مورد نیاز جهت انجام تیمارهای آزمایشی، چندین مرحله در محیط کشت جامد QL^۴ زیرکشت شدند. اجزای کشت شامل محیط کشت پایه QL عنصرهای پرمصرف و کم‌مصرف، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول، ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر تیامین، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، ۶/۵ گرم در لیتر آگار، ۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین (BA) و یک میلی‌گرم بر لیتر تنظیم‌کننده رشد گیاهی نفتالین استیک اسید (NAA) بود. تیمارهای مختلف شوری از راه افزودن غلظت‌های مختلف کلرید سدیم و سپس تنظیم pH روی ۵/۷ به‌دست آمد. ظرف‌های محیط کشت، داخل اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. ریزنمونه‌ها به طول تقریبی ۲ سانتی‌متر پس از کشت در شرایط گندزدایی شده در اتاقک رشد با دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس به مدت ۴۲ روز قرار گرفتند.

اندازه‌گیری ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک

در پایان دوره تنش، ریزنمونه‌های شاخساره‌ها از ظرف‌های کشت، خارج و شاخص‌های ریخت‌شناسی و رشدی گوناگون از جمله تعداد گره، شاخص آسیب شوری (SII)^۱، طول شاخساره، وزن تر و خشک شاخساره اندازه‌گیری شدند. برای تعیین شاخص SII از نشانه‌های ظاهری آسیب (i) در ریزنمونه‌ها با مقیاس‌بندی و رابطه زیر استفاده شد: ریزنمونه‌های بدون آسیب (امتیاز ۱)، قهوه‌ای شدن نوک شاخه و کناره برگ‌ها (امتیاز ۲)، نکروز شدن کل برگ و بخشی از ساقه (امتیاز ۳) و مرگ کامل ریزنمونه (امتیاز ۴).

$$SII = \sum (n_i \times i) / N$$

که در این رابطه، n شمار ریزنمونه‌های امتیاز داده شده، i نشانه‌های ظاهری آسیب و N شمار کل ریزنمونه‌ها در هر غلظت کلرید سدیم می‌باشد (۹). طول شاخساره با استفاده از کولیس به سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. وزن خشک پس از قرار گرفتن نمونه‌های گیاهی در دمای ۷۰ درجه سلسیوس در آون به مدت ۴۸ ساعت و سپس وزن آن با استفاده از ترازوی حساس به‌دست آمد.

اندازه‌گیری پرولین و مقدار سدیم و پتاسیم بافت برگ

استخراج پرولین به روش بیتز و همکاران (۳) با استفاده از بافت تر نمونه‌های برگ و معرف ناین‌هیدرین انجام شد. مقدار ۰/۱ گرم از برگ تازه در کنار نیتروژن مایع پودر و با چهار میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ آمیخته شد. آمیخته به‌دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۵۰ تکان داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ و در پایان، مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر یادداشت شد. مقدار پرولین موجود در نمونه‌ها به‌صورت میلی‌گرم بر وزن تر محاسبه شد. به‌منظور اندازه‌گیری عنصرهای غذایی سدیم و پتاسیم، پس از پایان دوره تیمار، برگ‌ها پس از شستشو، به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سلسیوس خشک شدند. نمونه‌های برگ با استفاده از آسیاب برقی به‌طور کامل پودر و پس از تهیه خاکستر از نمونه‌های گیاهی، عصاره‌گیری با استفاده از کلریدریک اسید ۲ نرمال انجام و غلظت سدیم و پتاسیم عصاره با دستگاه نورسنج شعله‌ای (فلیم‌فتومتر) اندازه‌گیری و به‌صورت میلی‌گرم بر وزن خشک بیان شد (۱).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای استخراج عصاره آنزیمی، در آغاز یک گرم از نمونه برگ تازه در نیتروژن مایع به‌طور کامل پودر و سپس ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج فسفات به آن اضافه شد. آمیخته‌ای که به‌خوبی همگن شده بود، به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۴ هزار دور در دمای ۴ درجه سلسیوس، سانتریفیوژ و سپس فاز بالایی عصاره برای خواندن مقدار فعالیت آنزیم‌ها جدا شد. مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش چانس و مهلی (۶) و مقدار جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با فاصله‌های زمانی ۳۰ ثانیه و به مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز محلول واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱۰۰ میکرولیتر NBT ۱/۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرو لیتر EDTA ۰/۱ مولار دارای سدیم‌سیانید ۰/۳ میلی مولار و ۲۶۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۰۶۷ مولار (pH ۷/۸) بود. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش بیچامپ و فریدوویچ (۴) و مقدار جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر تعیین و بر حسب واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. پروتئین کل به روش برادفورد (۵) اندازه‌گیری شد. مقدار ۰/۲ گرم بافت برگ در هاون چینی با دو میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ میلی‌مولار همگن و سانتریفیوژ شد. محلول استاندارد با استفاده از سرم آلومین گاوی تهیه و مقدار جذب آن به همراه نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

طرح آزمایش و تجزیه آماری

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل (3×2) در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای هر تکرار یک عدد شیشه‌مربای ۲۵۰ میلی‌لیتری دارای شش عدد ریزنمونه شاخساره در نظر گرفته شد. تیمار شوری در سه سطح صفر، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و تیمار رقم در دو سطح مقایسه شدند. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۳ و اکاوی شدند. مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Sigma plot نسخه ۱۲ انجام شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک

نتیجه‌های این پژوهش نشان داد با افزایش سطح‌های شوری، شاخص آسیب شوری در هر دو رقم افزایش یافت و نشانه‌های ظاهری آسیب به شکل کم‌سبزیگی و بافت‌مردگی در نوک شاخساره‌ها مشاهده شد (شکل ۱). براساس مقایسه میانگین‌ها، بیش‌ترین شاخص آسیب شوری در رقم‌های هروسوئیت و بارتلت در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به ترتیب برابر با ۱/۴۱ و ۱/۷۲ مشاهده شد (جدول ۱). تجمع نمک در محیط رشد گیاه با افزایش مقدار آنزیم کلروفیل‌از منجر به تخریب کلروفیل و افزایش زردی و پیری برگ‌ها می‌شود (۳۰). همچنین افزایش مقدار بافت‌مردگی و در برگ‌ها با غلظت بالای عنصرهای سدیم و کلر در سیتوپلاسم برگ‌ها مرتبط است (۲۵). نتیجه‌های مشابهی در ارتباط با افزایش نشانه‌های ظاهری آسیب و کاهش مقدار کلروفیل برگ‌ها در شرایط تنش شوری درون‌شیشه‌ای در ریزنمونه‌های گیلاس (۹) و پسته (۷) گزارش شده است.



Fig. 1. Effect of salinity stress at 0 (control, A), 80 (B) and 120 mM (C) NaCl on the growth of pear shootlets of Bartlett (the top row of image) and Harrow Sweet (the bottom row of image) on QL medium for six weeks. Dash arrows show whole shoot necrosis in Bartlett and partial chlorosis and necrosis in Harrow Sweet, respectively.

شکل ۱- اثر تنش شوری ناشی از کلرید سدیم صفر (شاهد، الف) ۸۰ (ب) و ۱۲۰ میلی‌مولار (پ) بر رشد ریزنمونه‌های شاخساره گلابی رقم بارتلت (ردیف بالا از تصویر) و رقم هروسوئیت (ردیف پایین از تصویر) به مدت شش هفته در محیط کشت بافت QL. علامت فلش خط کامل و خط‌چین به ترتیب نشان‌دهنده بافت‌مردگی شاخساره در رقم بارتلت و بافت‌مردگی جزئی برگ و کم‌سبزیگی ساقه در رقم هروسوئیت می‌باشد.

طول شاخساره و شمار برگ در ریزنمونه‌ها به‌طور معنی‌داری زیر اثر محیط کشت تیمار شده با کلرید سدیم قرار گرفت. بیش‌ترین کاهش طول شاخساره برای رقم بارتلت در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم مشاهده شد. شمار برگ به‌طور معنی‌داری با افزایش سطح‌های شوری در هر دو رقم کاهش یافت، به‌طوری که کمترین شمار برگ برای هر دو رقم در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱- اثر تنش شوری بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک ریزنمونه‌های شاخساره دو رقم گلابی در محیط کشت QL.

Table 1. Salinity stress effect on morpho-physiological traits in shootlets of two pear cultivars on QL medium.

رقم Cultivar	کلرید سدیم NaCl (mM)	شاخص آسیب شوری Salinity injury index	شمار برگ Leaf No.	وزن خشک DW (g)	وزن تر FW (g)	طول شاخساره Shoot length (cm)
هرسوئیت	0	1.00±0.01 ^{c†}	44.00±2.01 ^{ab}	0.23±0.00 ^a	1.50±0.00 ^a	5.42±0.08 ^a
Harrow	80	1.22±0.09 ^c	38.00±1.42 ^{cb}	0.18±0.00 ^b	1.32±0.01 ^a	4.00±0.11 ^b
Sweet	120	1.41±0.04 ^b	24.00±1.16 ^d	0.15±0.00 ^{bc}	1.30±0.00 ^b	3.90±0.07 ^b
بارتلت	0	1.00±0.01 ^c	45.66±2.03 ^a	0.22±0.00 ^a	1.40±0.00 ^a	5.40±0.09 ^a
Bartlett	80	1.33±0.05 ^{b c}	32.66±1.16 ^c	0.13±0.00 ^c	1.10±0.00 ^b	3.90±0.04 ^b
	120	1.72±0.04 ^a	22.66±1.21 ^d	0.10±0.00 ^d	0.70±0.00 ^c	2.90±0.07 ^c

†In each column means followed by the same letters are not significantly difference at $P < 0.05$ based on Duncan's multiple range test.

†در هر ستون میانگین‌های با حرف‌های مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

در پژوهش‌های گوناگون، اعمال تنش شوری روی درختان میوه در شرایط درون‌شیشه‌ای و یا باغی، باعث کاهش ویژگی‌های رشدی مانند شمار برگ، شمار شاخه، طول شاخه و عملکرد در گیاهان گوناگون شده است که با نتیجه‌های این پژوهش همسو است (۱۶، ۲۹). تنش شوری با کاهش پتانسیل اسمزی آب باعث کاهش مقدار جذب آب، بسته شدن روزنه‌ها و در پایان، باعث کاهش فتوسنتز می‌شود. همچنین تجمع سدیم و کلر در بافت‌ها باعث کاهش تقسیم یاخته‌ای، فتوسنتز و در نهایت باعث کاهش رشد بافت‌ها می‌شود (۱۵، ۲۴).

تنش شوری باعث کاهش وزن تر و خشک شاخساره در هر دو رقم نسبت به شاهد شد. نتیجه‌های حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد وزن تر و خشک در رقم هروسوئیت همواره بالاتر از رقم بارتلت بود که این موضوع نشان می‌دهد رقم هروسوئیت مقدار رشد و پرآوری بیش‌تری در مقایسه با بارتلت دارد (جدول ۱). اعمال تنش‌های نازیوا همانند شوری منجر به کاهش فعالیت‌های فتوسنتزی از راه کاهش آماس یاخته‌ای و بسته شدن روزنه‌ها و از این راه باعث کاهش تقسیم یاخته‌ای و رشد گیاه می‌شود. همسو با این نتیجه‌ها، کاهش وزن تر و خشک گیاهی در شرایط تنش‌های مختلف نازیوا از جمله خشکی و شوری در گیاهان دیگر از جمله گلابی (۲۱) و پسته (۷) گزارش شده است.

اثر شوری بر مقدار پرولین برگ‌های رقم‌های مورد مطالعه نشان داد که در همه سطح‌های شوری، مقدار پرولین رقم هروسوئیت بیش‌تر از رقم بارتلت بود و بر اساس این شاخص نیز می‌توان به تحمل بالای رقم هروسوئیت در مقایسه با رقم بارتلت اشاره کرد. افزایش مقدار پرولین ریزنمونه‌های هروسوئیت در تیمارهای ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار به‌ترتیب برابر ۸۹/۶۵ و ۱۳۹/۴۱٪ در مقایسه با شاهد بود. به‌طور مشابه، این افزایش برای رقم بارتلت در تیمارهای ۸۰ و ۱۲۰ مولار به‌ترتیب برابر با ۶۵/۷۲ و ۱۱۴/۳۴٪ در مقایسه با شاهد بود (شکل ۲- الف). در بین ماده‌های محلول سازگار^۱ که در طول تنش افزایش می‌یابند، به احتمال، پرولین رایج‌ترین تنظیم‌کننده

اسمزی به شمار می‌آید. هر چند در طول تنش در بخش‌های گوناگون جمع می‌شود، اما بیش‌ترین مقدار آن در برگ‌ها تولید می‌شود (۱۴). پرولین به عنوان یک ماده حل‌شونده سازگار باعث پاک‌سازی اکسیژن‌های فعال، حفظ پایداری پروتئین‌ها و یاخته‌ها از تنش اکسایشی ناشی از تنش می‌شود، هم‌چنین نقش کلیدی در تنظیم پتانسیل آبی، حفظ دیواره یاخته‌ای و مقاومت به شوری دارد (۱۴، ۳۳). همسو با نتیجه‌های این پژوهش، حاجی‌بلند و همکاران (۱۱) تجمع پرولین در بافت برگ‌های بالغ و تجمع پرولین و قندهای محلول را در برگ‌های جوان گیاه پسته در پاسخ به تنش شوری گزارش کرده‌اند. هم‌چنین افزایش مقدار پرولین و کاهش نسبت پتاسیم به سدیم در برگ گیاه انار در پاسخ به افزایش شوری آب آبیاری گزارش شده است (۱۳). با افزایش شوری مقدار سدیم و پتاسیم به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ زیر اثر قرار گرفتند. مقدار پتاسیم شاخساره در هر دو رقم به‌صورت معنی‌داری کاهش نشان داد (شکل ۲-ب). افزایش مقدار کلرید سدیم در محیط کشت باعث افزایش مقدار سدیم در شاخساره‌های هر دو رقم گل‌ابی شد، به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار آن در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار در هر دو رقم مشاهده شد. اما افزایش مقدار سدیم در شاخساره رقم بارتلت در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار ۲۳/۱۱٪ بیش‌تر از رقم هروسوئیت بود (شکل ۲-پ). نسبت پتاسیم به سدیم با افزایش سدیم برگ‌ها به‌طور معنی‌داری در هر دو رقم کاهش یافت (شکل ۲-ت). سدیم عنصری زیان‌آور و پتاسیم عنصر ضروری و مفید برای رشد و توسعه گیاه است. تنش شوری با افزایش مقدار سدیم و کلر بافت‌ها، باعث بر هم زدن تعادل عنصرهای غذایی، تخریب غشای یاخته‌ای، کاهش تقسیم و نمو یاخته‌ای و کاهش عنصرهای ضروری از جمله پتاسیم می‌شود (۱۵). تحمل به شوری در درختان میوه مرتبط با توانایی آن‌ها در محدود کردن تجمع یون‌های کلر و سدیم و بنابراین شاخص مهمی در ارزیابی و انتخاب گیاهان متحمل به شوری است (۸). بر این اساس گل‌ابی رقم هروسوئیت با داشتن توانایی مطلوب‌تر نسبت به رقم بارتلت در حفظ نسبت پتاسیم به سدیم بافت برگ، نسبت به تنش شوری متحمل‌تر می‌باشد. نتیجه‌های اعمال تنش شوری با شش سطح روی شاخساره‌های نارنج در شرایط درون‌شیشه‌ای نشان داد، با افزایش سطح‌های شوری مقدار سدیم افزایش یافت و باعث کاهش معنی‌دار مقدار پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم بافت برگ شد (۲۹).

افزون بر اثر مستقیم شوری بر گیاهان، یکی دیگر از اثرهای شوری انگیزش تنش اکسایشی و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن، سوپراکسید و هیدروکسیل است که باعث پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و آسیب به نوکلئیک اسیدها می‌شود (۲۳). افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تنش‌های مختلف نازیوا از جمله خشکی (۳۴)، شوری (۱۲) و تنش اکسایشی (۲۲) در گیاهان گوناگون گزارش شده است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با افزایش سطح‌های شوری به‌طور معنی‌داری در شاخساره‌های هر دو رقم گل‌ابی افزایش یافت. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با افزایش سطح‌های شوری در هر دو رقم گل‌ابی افزایش یافت، اما مقدار افزایش در رقم هروسوئیت بیشتر از رقم بارتلت بود، به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار فعالیت آنزیم (۱۲۴/۶۶) واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین در تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار و در رقم هروسوئیت مشاهده شد (شکل ۳-الف). بیش‌ترین مقدار آنزیم پراکسیداز نیز (۷۵) واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در رقم هروسوئیت به‌دست آمد (شکل ۳-ب).

همسو با نتیجه‌های این پژوهش، افزایش مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در پاسخ به تنش شوری ناشی از کلرید سدیم در آزمایش گلخانه‌ای روی دانه‌های گل‌ابی گزارش شده است (۲۷). همانند بودن گیاه کامل و ریزنمونه کشت بافتی آن در پاسخ به تنش شوری پیش از این گزارش شده است (۲۶). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز به‌ترتیب کاتالیز کننده رادیکال‌های آزاد O_2^- و پراکسید هیدروژن تولید شده در تنش اکسایشی ناشی از تنش‌های نازیوا هستند و از این راه، آسیب بافتی این‌گونه رادیکال‌های آزاد اکسیژنی را به کمینه می‌رسانند (۱۰).

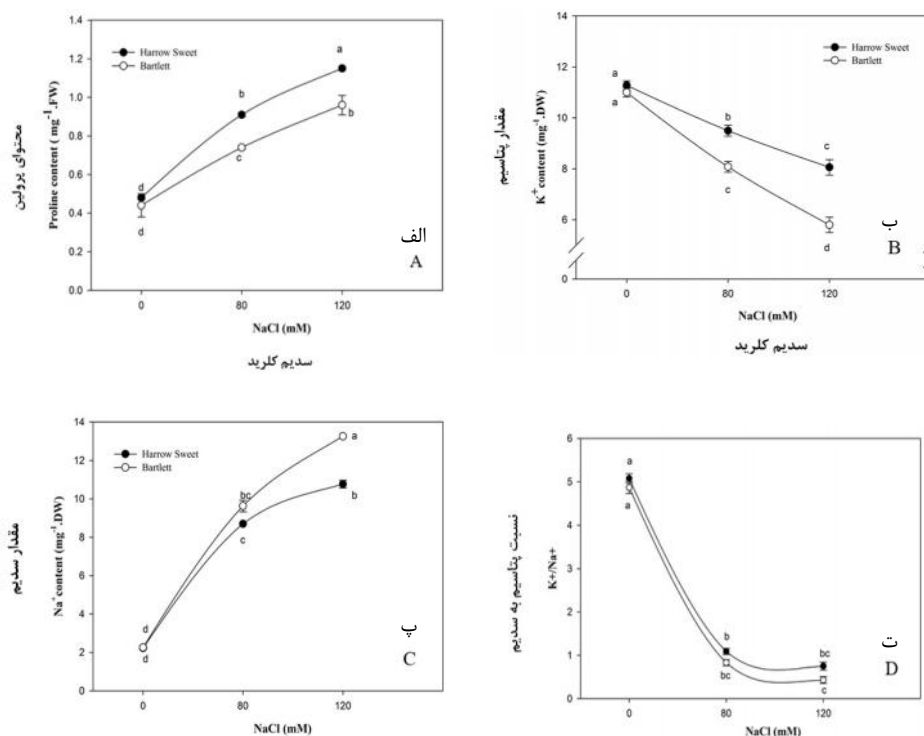


Fig. 2. Salinity stress effect on proline (A), potassium (B), sodium content in shoots (C) and potassium to sodium ratio (D) in two pear cultivars Harrow Sweet and Bartlett shootlets on QL medium. Means followed by the same letters are not significantly difference at $P < 0.05$ based on Duncan's multiple range test.

شکل ۲- اثر تنش شوری بر شاخص‌های مقدار پرولین (الف)، مقدار پتاسیم (ب)، مقدار سدیم (پ) و نسبت پتاسیم به سدیم (ت) در ریزنمونه‌های شاخساره دو رقم گلابی هری سوئیت و بارتلت در محیط کشت بافت QL. میانگین‌های با حرف‌های مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

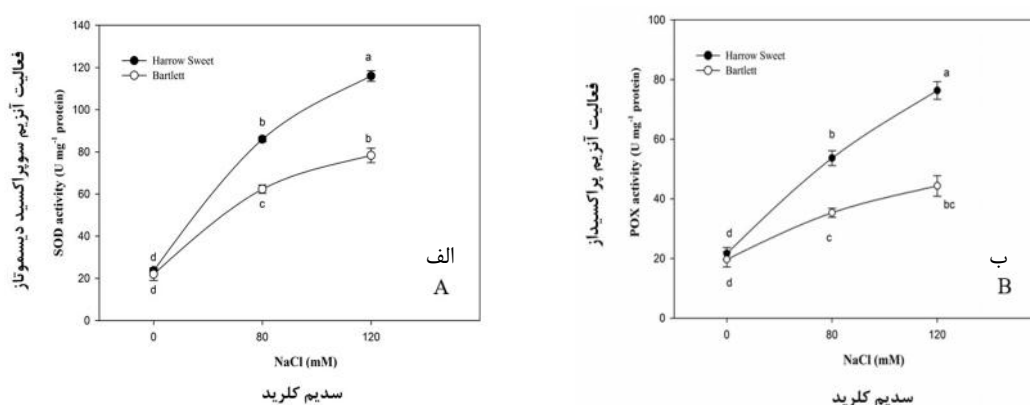


Fig. 3. Salinity stress effect on superoxide dismutase (A) and peroxidase (B) enzymes activity in shoots of two pear cultivars Harrow Sweet and Bartlett shootlets on QL medium. Means followed by the same letters are not significantly difference at $P < 0.05$ based on Duncan's multiple range test.

شکل ۳- اثر تنش شوری بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (الف) و پراکسیداز (ب) در ریزنمونه‌های شاخساره دو رقم گلابی هری سوئیت و بارتلت در محیط کشت بافت QL. میانگین‌های با حرف‌های مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، نمایش متفاوتی از مقدار تحمل به تنش شوری کلریدسديم در ریزنمونه‌های شاخساره دو رقم گلابی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای در مورد بیشتر شاخص‌های ارزیابی شده مشاهده شد. به‌طور کلی، تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار شاخص‌های رشدی در هر دو رقم گلابی شد، اما این روند کاهشی در رقم بارتلت شدیدتر بود. رقم هروسوئیت در مقایسه با رقم بارتلت، از نظر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مقدار پرولین و مقدار پتاسیم، در موقعیت برتری قرار داشت و بنابراین نسبت به تنش شوری محتمل‌تر به‌نظر می‌رسد.

References

منابع

۱. امامی، ع. ۱۳۷۵. روش‌های تجزیه گیاه. نشریه فنی موسسه تحقیقات آب و خاک. انتشارات سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، جلد اول، شماره ۹۸۲، ۱۲۸ ص.
2. Andreu, P., A. Arbeloa, P. Lorente and A.J. Marin. 2011. Early detection of salt stress tolerance of *Prunus* rootstocks by excised root culture. HortScience, 46: 80-85.
3. Bates, L.S., R.P. Waldern and I.D. Teare. 1993. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil. 39: 205-207.
4. Beachamp, C. and F. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: cadmium assay and an assay applicable to acryl amide gels. Anal. Biochem. 44: 276-27.
5. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annu. Rev. Biochem. 72: 248-254.
6. Chance, B. and A. Maehly. 1955. Assay of catalase and peroxidase. Method. Enzymol. 2: 764-817.
7. Chelli-Chaabouni, A., A.B. Mosbah, M. Maalej, K. Gargouri, R. Gargouri-Bouزيد and N. Drira. 2010. In vitro salinity tolerance of two pistachio rootstocks: *Pistacia vera* L. and *P. atlantica* Desf. Environ. Exp. Bot. 69: 302-312.
8. Cuin, T. A., S.A. Betts, A. Chalmandrier and S. Shabala. 2008. A root's ability to retain K^+ correlates with salt tolerance in wheat. J. Exp. Bot. 59: 2697-2706.
9. Erturk, U., N. Sivritepe, C. Yerlikaya, M. Bor, F. Ozdemir and I. Turkan. 2007. Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*. Biol. Plant. 51: 597-600.
10. Gill, S.S. and N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48: 909-930.
11. Hajiboland, R., F. Norouzi and C. Poschenrieder. 2014. Growth, physiological, biochemical and ionic responses of pistachio seedlings to mild and high salinity. Trees, 28: 1065-1078.
12. Keutgen, A.J. and E. Pawelzik. 2008. Quality and nutritional value of strawberry under long term salt stress. Food Chem. 107: 1413-1420.
13. Khayyat, M., A. Tehranifar, G.H. Davarynejad and M.H. Sayyari-Zahan. 2014. Vegetative growth, compatible solute accumulation, ion partitioning and chlorophyll fluorescence of 'Malas-e-Saveh' and 'Shishe-Kab' pomegranates in response to salinity stress. Photosynthetica, 52: 301-312.

14. Krasensky, J. and C. Jonak. 2012. Drought, salt, and temperature stress induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* 63: 1593-1608.
15. Mahajan, S. and N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 139-158.
16. Mehdi-Tounsi, H., A. Chelli-Chaabouni, D. Mahjoub-Boujnah and M. Boukhris. 2017. Long-term field response of pistachio to irrigation water salinity. *Agr. Water Manag.* 185: 1-12.
17. Molassiotis, A.N., T. Sotiropoulos, G. Tanou, G. Kofidis, G. Diamantidis and I. Therios. 2006. Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biol. Plant.* 50: 331-338.
18. Musacchi, S., M. Quartieri and M. Tagliavini. 2006. Pear (*Pyrus communis*) and quince (*Cydonia oblonga*) roots exhibit different ability to prevent sodium and chloride uptake when irrigated with saline water. *Eur. J. Agron.* 24: 268-275.
19. Nikolskii-Gavrilov, I., C. Landeros-Sanchez, O.L. Palacios-Velez and J.M. Hernandez-Perez. 2015. Impact of climate change on salinity and drainage of irrigated lands in Mexico. *J. Agr. Sci.* 7: 197-204.
20. Okubo, M. and T. Sakuratani. 2000. Effects of sodium chloride on survival and stem elongation of two Asian pear rootstock seedlings. *Sci. Hort.* 85: 85-90.
21. Okubo, M., Y. Furukawa and T. Sakuratani. 2000. Growth, flowering and leaf properties of pear cultivars grafted on two Asian pear rootstock seedlings under NaCl irrigation. *Sci Hort.* 85: 91-101.
22. 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 H₂O₂. *Sci. Hort.* 119: 163-168.
23. Parida, A.K. and A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60: 324-349.
24. Parihar, P., S. Singh, R. Singh, V.P. Singh and S.M. Prasad. 2014. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 4056-4075.
25. Picchioni, G.A. and C.J. Graham. 2001. Salinity, growth and ion uptake selectivity of container-growth *Crataegus opaca*. *Sci. Hort.* 90: 151-166.
26. Prakash, S. N. and M. Widholm. 1993. Comparison of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 273-280.
27. Qiang-Sheng, W.U. and Z.O.U. Ying-Ning. 2009. Adaptive responses of birch-leaved pear (*Pyrus betulaeifolia*) seedlings to salinity stress. *Not. Bot. Hort. Agrobi.* 37: 133-138.
28. Rai, M.K., R.K. Kalia, R. Singh, M.P. Gangola and A.K. Dhawan. 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection- An overview of the recent progress. *Environ. Exp. Bot.* 71: 89-98.
29. Shiyab, M.S., R.A. Shibli and M.M. Mohammad. 2003. Influence of sodium chloride salt stress on growth and nutrient acquisition of sour orange *in vitro*. *J. Plant Nutr.* 26: 985-996.

30. Singh, S.K., H.C. Sharma, A.M. Goswami, S.P. Datta and S.P. Sing. 2000. *In vitro* growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride. Biol. Plant. 43: 283-286.
31. Sotiropoulos, T.E. 2007. Effect of NaCl and CaCl₂ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M4 cultured in vitro. Biol. Plant. 51: 177-180.
32. Sotiropoulos, T.E., S. Fotopoulos, K.N. Dimassi and V. Tsirakoglou. 2006. Response of the pear rootstock to boron and salinity *in vitro*. Biol. Plant. 50: 779-781.
33. Szabados, L. and A. Savoure. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. Trends Plant Sci. 15: 89-97.
34. Wang, S., D. Liang, C. Li, Y. Hao, F. Ma and H. Shu. 2012. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. Plant Physiol. Biochem. 51: 81-89.

Comparison of Salinity Stress Tolerance of Two Pear Cultivars Harrow Sweet and Bartlett under *In Vitro* Conditions

H. Malmir, A. Soleimani*, A. Nikzad, V. Bigdeloo, F. Razavi and A. Ammarelou¹

In the current work the salinity stress tolerance of shootlets of two pear cultivars Harrow Sweet and Bartlett was studied and compared under *in vitro* culture condition. Salinity stress was imposed into the QL medium using different concentration of NaCl (0 as control, 80 and 120 mM) for six weeks. Shoot length, fresh and dry weight as well as leaf numbers of the shootlets were negatively affected by salinity stress. However, these effects were more pronounced in shootlets of Bartlett than Harrow Sweet. The highest salinity injury index (SII) was observed at 120 mM NaCl in the value of 1.41 and 1.72 units in cultivars Harrow Sweet and Bartlett, respectively. The activities of both tested antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) enzymes were increased by salinity treatments. These activities at 120 mM NaCl were higher in Harrow Sweet than other ones. In terms of maintaining high proline and K^+/Na^+ contents in the leaf tissue, Harrow Sweet showed more favorable situation in comparison with Bartlett cv. Differential tolerance to the salinity stress, with the high amount in 'Harrow Sweet', was displayed in two pear cultivars based on the majority of evaluated criteria.

Key Words: Antioxidant, Potassium, Peroxidase, Proline, Stress, Culture medium.

1. Former M.Sc. Student, Associate and Assistance Professors, Former Assistance Professor, Horticultural Department, Assistance Professor, Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran, respectively.

* Corresponding author, Email: (asoleimani@znu.ac.ir).