

Study of some morpho-physiological and biochemical characteristics of Volkameriana and sour orange rootstocks under saline and alkaline stress conditions

Abstract

Citrus are one of the most economical fruits in the world, that mostly belonging to the genus Citrus and the family Rutaceae. One of the limiting factors for citrus production is salinity and alkalinity stresses. Salinity-alkaline stresses are one of the most important abiotic stresses that affect all vital and metabolic activities of the plant. One of the methods for increasing tolerance to stress conditions is to use appropriate rootstocks. Therefore, to investigate the resistance of two citrus rootstocks, sour orange and Volkameriana, to stress conditions, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with 4 replication in the greenhouse of the Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz. In this experiment, the effect of four concentrations of 0, 30, 60, and 90 mM sodium chloride and two pH levels (6.5 and 8.2) was investigated on some morpho-physiological and biochemical characteristics of two citrus rootstocks, sour orange and Volkameriana,. The results showed that in both sour orange and Volkameriana rootstocks, increasing salinity concentration significantly reduced shoot fresh and dry weight, root dry weight, photosynthesis, transpiration and relative water content at both pH level, which was greater at pH 8.2 than at pH 6.5. The lowest shoot fresh weight (89 g) and root dry weight (15.88 g) were obtained in Volkameriana Rootstock with pH 8.2 and 90 mM sodium chloride. pH 8.2 with 90 mM NaCl reduced photosynthesis by 51.83% in sour orange and by 57.5% in Volkameriana rootstock compared to the control. Also, stress conditions significantly reduced chlorophyll content and increased ion leakage, proline and carbohydrates. The reduction in chlorophyll content was 29.29% in sour orange and 45.12% in Volkameriana. The highest proline content (23.02 $\mu\text{mol/g}$ fresh weight) was obtained in the sour orange rootstock with pH 8.2 and 60 mM NaCl and the highest carbohydrate content (29.89 mg/g f.w) was obtained in the Volkameriana Rootstock with pH 8.2 and 30 mM sodium chloride. In general, the sour orange rootstock with increased proline content, photosynthetic pigments, and gas exchange.had higher tolerance to salinity and alkalinity stress conditions and had more morphological characteristics than Volkameriana.

Keywords: Alkalinity, Carbohydrates, Photosynthesis, Salinity and Volkameriana

Introduction:

Citrus are one of the most economically fruits in the world, mostly belonging to the genus Citrus and the family Rutaceae. They are mainly trees or shrubs adapted to tropical and subtropical regions. The trend of citrus production is continuously increasing, so citrus with high production is the most widespread tree fruit crop in the world, which can be limited by abiotic stresses. Salinity is one of the major abiotic stresses that significantly affects plant growth and yield. The continuous

increase in salinity in agricultural lands due to poor cultivation practices and climate change has global devastating effects, and approximately 50% of arable land will be lost by the middle of the 21st century. Another limiting factor for plant growth and development is alkaline stress, which directly affects the absorption of mineral elements due to high pH and disrupts ionic homeostasis. Alkaline stress is one of the most important abiotic stresses that has been increasing in recent years, especially in areas with calcareous waters. High pH can lead to reduced seed germination, destruction of root cell structure, changes in nutrient availability, especially iron, and consequently leads to a significant reduction in plant growth and yield. Simultaneous salinity and alkalinity stress affect root acidification and iron absorption due to their negative effects on the activity of enzymes involved in iron absorption or siderophore production in plants. The response of citrus trees to stress conditions depends on several factors such as irrigation system, soil, climate and rootstock type. Rootstock selection is a very important decision that is made based on the climatic and soil conditions of the region.

Material and Methods

This experiment included investigating the tolerance of two citrus rootstocks, including Sour orange and Volkameriana, to salinity and alkaline soils. For this purpose, one-year-old seedlings of these rootstocks were obtained from a commercial nursery in Dezful in 2019 and transferred to the greenhouse of the Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, and then cultivated in 7-liter pots (containing a sand substrate). Hoagland nutrient solution was used to nourish and better establish the seedlings. After establishing the seedlings in the new conditions in June, they were subjected to salinity (sodium chloride) and alkali stress conditions. Salinity stress included concentrations of 0, 30, 60, and 90 mM sodium chloride. (To prevent osmotic shock to the plant, salinity treatment was gradually added in three stages). Alkaline stress was applied by increasing the pH of the nutrient solution using sodium carbonate from 6.5 to 8.2. Stress was continued until the plants showed signs of stress. This experiment was a factorial experiment in a completely randomized design with 4 replications. During and at the end of the experiment, traits such as fresh and dry weight of shoots, fresh and dry weight of roots, photosynthesis, transpiration, ion leakage, relative water content, chlorophyll, carotenoids, proline, and carbohydrates were measured.

Result and Discussion

According to the results obtained in sour orange and Volkameriana Rootstocks, increasing salinity concentration caused a decrease in morphological characteristics including fresh and dry weight of shoots and fresh and dry weight of roots at both pH, which was greater at pH 8.2 than pH 6.5. The lowest fresh weight of shoots (89 gr) was obtained in volkameriana with pH 8.2 and 90 mM NaCl, and the highest fresh weight of shoots (180.50 g) was observed in sour orange with pH 6.5 and 0 mM NaCl. Volkameriana rootstock with 90 mM NaCl and pH 8.2 had The lowest dry weight

of root (15.88 g), which was a decrease of 48.88% compared to the control of this rootstock. In sour orange and Volkamariana salinity and alkalinity stress significantly reduced the rate of photosynthesis, which was directly related to the increase in stress intensity and reached its lowest level at pH 8.2 with 90 mM NaCl, which caused a 51.83% reduction in sour orange and 57.5% reduction in Volkameriana compared to the control. Salt-alkali stress increased the amount of ion leakage, proline, and carbohydrate in both sour orange and Volkameriana rootstocks. The highest amount of ion leakage (42.57%) was obtained in Volkameriana rootstock at 90 mM NaCl with pH 8.2, which was an increase of 74.03% compared to sour orange with pH 6.5 and 0 mM salinity. The highest amount of proline (23.02 $\mu\text{mol/g f.w}$) was observed in sour orange with pH 8.2 and 60 mM NaCl and Volkameriana, pH 8.2 and 30 mM NaCl had the highest amount of carbohydrate (29.89 mg/g f.w). Stress conditions, cause a decrease in photosynthetic pigments and gas exchange due to reduced absorption of nutrients, including magnesium, and increased chlorophyllase activity, which ultimately reduces the fresh and dry weight of plant. Also, to increase tolerance to stress conditions, the amount of osmolytes increases. The accumulation of nitrogen-compatible salts, including proline, plays a role in osmotic regulation, protecting cellular macromolecules against salinity damage, nitrogen storage, and free radical inhibition. It increases the activity of sucrose phosphate synthetase, which increases the amount of soluble sugars.

بررسی برخی خصوصیات مورفو-فیزیولوژیک و بیوشیمیایی پایه‌های ولکامریانا و نارنج تحت شرایط تنش شوری و قلیایی

چکیده

مرکبات از اقتصادی‌ترین میوه‌ها در جهان هستند که اکثراً متعلق به جنس Citrus و خانواده Rutaceae هستند. یکی از عوامل محدود کننده تولید مرکبات تنش‌های شوری و قلیایی هستند تنش شوری-قلیایی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی هستند که تمام فعالیت‌هایی حیاتی و متابولیکی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. یکی از روش‌های افزایش تحمل نسبت به شرایط تنش استفاده از پایه مناسب می‌باشد لذا جهت بررسی مقاومت دو پایه نارنج و ولکامریانا نسبت به

شرایط تنش آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. در این آزمایش اثر چهار غلظت ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی مولار سدیم کلراید و دو سطح pH (۵/۶ و ۸/۲) بر برخی خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی دو پایه نارنج و ولکامریانا بررسی گردید. نتایج نشان داد که در هر دو رقم نارنج و ولکامریانا افزایش غلظت شوری موجب کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، فتوسنتز، تعرق و محتوای نسبی آب در هر دو pH گردید که این کاهش در pH ۸/۲ نسبت به pH ۵/۶ بیشتر بود. کمترین وزن تر اندام هوایی (۸۹ گرم) و وزن خشک ریشه (۱۵/۸۸ گرم) در رقم ولکامریانا با pH ۸/۲ و ۹۰ میلی مولار سدیم کلراید به دست آمد. pH ۸/۲ با شوری ۹۰ میلی مولار میزان فتوسنتز را در نارنج ۵۱/۸۳ درصد و در رقم ولکامریانا ۵۷/۵ درصد نسبت به شاهد کاهش داد. همچنین شرایط تنش موجب کاهش معنی‌دار میزان کلروفیل و افزایش نشت یونی، پرولین و کربوهیدرات گردید کاهش میزان کلروفیل در پایه نارنج ۲۹/۲۹ درصد و در پایه ولکامریانا ۴۵/۱۲ درصد بود. بیشترین میزان پرولین (۲۳/۰۲ میکرومول بر گرم وزن تر) در پایه نارنج با pH ۸/۲ و شوری ۶۰ میلی مولار و بیشترین میزان کربوهیدرات (۲۹/۸۹ میلی گرم بر گرم وزن تر) در پایه ولکامریانا با pH ۸/۲ و شوری ۳۰ میلی مولار سدیم کلراید به دست آمد. به طور کلی پایه نارنج نسبت به ولکامریانا با افزایش میزان پرولین، رنگیزه‌های فتوسنتزی و تبادلات گازی دارای تحمل بالاتری نسبت به شرایط تنش شوری و قلیایی بود و خصوصیات مورفولوژیک بیشتری داشت.

کلمات کلیدی: شوری، فتوسنتز، قلیایی، کربوهیدرات و ولکامریانا

مقدمه

مرکبات از اقتصادی‌ترین میوه‌ها در جهان هستند که از ۱۶۰ جنس و بیش از ۱۶۰۰ گونه تشکیل شده‌اند که اکثراً متعلق به جنس Citrus و خانواده Rutaceae هستند. اساساً شامل درختان یا بوته‌های سازگار با مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری هستند (Talón *et al.*, 2020). رشد و تولید این محصولات می‌تواند تحت تأثیر تنش‌های زنده و غیرزنده قرار بگیرد. قرار گرفتن درختان مرکبات در معرض تنش غیرزیستی از جمله شوری، نسبت سدیم به کلسیم و پتاسیم را افزایش داده و در نتیجه جذب آب از خاک توسط ریشه گیاه مختل شده و رشد آن کاهش می‌یابد. چندین فرآیند فیزیولوژیکی در گیاهان می‌تواند تحت تأثیر تنش شوری، مانند مکانیسم اکسیداتیو و سمیت یونی قرار گیرند (Danaeifar *et al.*, 2024). شوری همزمان با شرایط قلیایی به علت اینکه اثرات منفی در فعالیت آنزیم‌هایی که در جذب آهن درگیرند یا تولید سیدروفور در گیاهان دارند اسیدی شدن ریشه و جذب آهن را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Boukari *et al.*, 2019).

پیشینه پژوهش

مرکبات در سراسر جهان، به پنج گروه با اهمیت اقتصادی تقسیم می‌شوند: پرتقال شیرین (*C. sinensis* L. Osbeck)، نارنگی (C. *reticulata* Blanco و *C. unshiu* Marc)، گریپ فروت (*C. paradisi* Macfadyen)، لیمو (*C. limon* L. Burmann f) و لیموترش (*C. aurantifolia* Christm. Swingle). گونه‌های دیگر مانند پوملو، سیترون، فورچونا و سایر گونه‌ها اهمیت تجاری کمتری دارند، اگرچه بدیهی است که آنها در مکان‌های تولید منافع اقتصادی را دارند. روند گسترش مرکبات به طور مداوم در حال افزایش است لذا مرکبات با تولید بالا گسترده‌ترین محصول میوه درختی در جهان است (Zhong and Nicolosi, 2020). که این تولید می‌تواند توسط تنش‌های غیرزنده محدود گردد. شوری یکی از عمده‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که به طور قابل توجهی بر رشد و عملکرد گیاه تأثیر می‌گذارد (Danaeifar et al., 2023). افزایش مستمر شوری در زمین‌های زراعی به دلیل شیوه‌های ضعیف کشت و تغییرات آب و هوایی اثرات مخرب جهانی دارد و به صورت تقریبی حدود ۵۰ درصد از زمین‌های قابل کشت تا اواسط قرن بیست و یکم از بین می‌رود (Kumar et al., 2021) علاوه بر این زمانی که هدایت الکتریکی حدود ۴ دسی‌زیمنس بر سانتی‌متر و فشار اسمزی حدود منفی ۰/۲ مگا پاسکال باشد تنش شوری ایجاد می‌شود و منجر به کاهش عملکرد می‌گردد. شوری به علت دخالت یون سدیم منجر به کلروز و نکروزه شدن می‌گردد. اثرات مضر شوری به میزان زیادی به شرایط اقلیمی، شرایط خاکی، شدت نور و گونه‌های گیاهی بستگی دارد (Acosta-Motos et al., 2017). عامل محدودکننده دیگری برای رشد و نمو گیاهان تنش قلیایی است که به دلیل pH بالا مستقیماً بر جذب عناصر معدنی تأثیر می‌گذارد و هموستازی یونی را مختل می‌کند (Liu et al., 2015). تنش قلیایی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده است که در سال‌های اخیر به خصوص در مناطقی که آب‌های آهکی دارند در حال افزایش است و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Alvarez et al., 2018). pH بالا می‌تواند منجر به کاهش جوانه‌زنی بذر، تخریب ساختار سلول ریشه، تغییر در دسترس بودن مواد مغذی به ویژه آهن شود و در نتیجه منجر به کاهش قابل توجه رشد و عملکرد گیاهان گردد (Abdel Latef and Tran, 2016). آهن چهارمین عنصر فراوان پسته زمین و ریزمغذی ضروری برای گیاهان است. آهن به عنوان کوفاکتور برای چندین آنزیم درگیر در فرایندهای متابولیک حیاتی مانند فتوسنتز و تنفس، نقش مهمی ایفا می‌کند. علاوه بر این در متابولیسم نیتروژن و گوگرد سهیم و برای سنتز کلروفیل نیاز است (Gattullo et al., 2018). اگرچه آهن در بیشتر خاک‌های کشاورزی فراوان است و میانگین غلظت آهن ۲۰ تا ۴۰ گرم در کیلوگرم می‌باشد. با این حال تقریباً غیر قابل دسترس برای گیاهان است (Gattullo et al., 2018). بیشتر آهن خاک به صورت فریک (Fe^{3+}) است و توسط گیاه جذب نمی‌شود. میزان آهن مؤثر در خاک به ویژه خاک‌های قلیایی خیلی پایین است. بنابراین کمبود آهن در گیاهان یک مشکل جدی است (Liu et al., 2017). شبیه به بسیاری از گیاهان دیگر این تنش‌ها رشد درختان مرکبات را کاهش و منجر به اختلالات فیزیولوژیک می‌شوند. پاسخ درختان مرکبات به شرایط تنشی به چندین فاکتور از قبیل سیستم آبیاری، خاک، اقلیم و نوع پایه بستگی دارد (Mohamad, 2016). انتخاب پایه تصمیم بسیار

مهمی است که بر اساس شرایط اقلیمی و خاکی منطقه صورت می‌گیرد. اگر چه هر رقمی از مرکبات می‌تواند به عنوان پایه استفاده شود ولی برخی پایه‌ها بر اساس شرایط ویژه نسبت به دیگر پایه‌ها مناسب‌ترند (Cimen and Yesiloglu, 2016). پایه‌های مرکبات توانایی متفاوتی در جذب آهن در خاک‌های آهنکی دارند. یکی از پایه‌هایی که می‌تواند نسبت به کمبود آهن در خاک‌های قلیایی توانایی بالایی داشته باشد ولکامریانا است (Incesu et al., 2015). لذا هدف از این مطالعه ارزیابی برخی خصوصیات موفو-فیزیولوژیک و بیوشیمیایی پایه‌های ولکامریانا و نارنج تحت شرایط تنش شوری و قلیایی است.

روش‌شناسی پژوهش

این آزمایش شامل بررسی میزان تحمل ۲ پایه مرکبات شامل نارنج و ولکامریانا به شرایط شوری و خاک‌های قلیایی بود. به این منظور نهال‌های یکساله این پایه‌ها در آذر ماه ۱۳۹۸ از نهالستان تجاری در دزفول تهیه و به گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند و سپس در گلدان‌های ۷ لیتری (حاوی بستر ماسه) کشت شدند. از محلول غذایی هوگلند جهت تغذیه و استقرار بهتر نهال‌ها استفاده شد. نهال‌ها پس از استقرار به شرایط جدید در خرداد ماه تحت شرایط تنش شوری (سدیم کلرید) و قلیایی قرار گرفتند. تنش شوری شامل غلظت‌های ۰، ۳۰، ۶۰، و ۹۰ میلی‌مولار سدیم کلرید بود. (برای جلوگیری از وارد شدن شوک اسمزی به گیاه، تیمار شوری طی سه مرحله و به صورت تدریجی اضافه شد، بدین صورت که آبیاری اول ۳۰ میلی‌مولار، آبیاری دوم ۶۰ میلی‌مولار و آبیاری سوم ۹۰ میلی‌مولار بود و تا پایان مراحل رشد گیاهان این آبیاری با محلول سدیم کلرید ادامه داشت). اعمال تنش قلیایی به صورت افزایش pH محلول غذایی با استفاده از سدیم کربنات از ۶/۵ به ۸/۲ بود. اعمال تنش تا زمان بروز علائم تنش در گیاهان ادامه یافت. در طی مراحل آزمایش از محلول غذایی هوگلند جهت تغذیه استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل ۴×۲×۲ با ۱۶ تیمار در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در ۴ تکرار شامل دو پایه (نارنج و ولکامریانا)، دوسطح pH (۶/۵ و ۸/۲) و چهار سطح شوری (۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار) انجام گرفت. هر تکرار شامل دوگلدان و هر گلدان حاوی یک نهال بود. در طول و پایان آزمایش (۳ ماه پس از اعمال تیمار) گیاهان از گلدان خارج و فاکتورهای ذکر شده در زیر اندازه‌گیری شدند.

وزن تر و خشک اندام هوایی

در پایان آزمایش پس از جدا کردن اندام هوایی از ریشه، وزن تر اندام هوایی با استفاده از ترازوی دیجیتال و وزن خشک اندام هوایی پس از قرار دادن نمونه‌ها در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد.

وزن تر و خشک ریشه

پس از پایان آزمایش و جدا کردن ریشه از اندام هوایی ابتدا خاک اطراف ریشه با آب شستشو شد و پس از گرفتن آب اضافی، وزن تر ریشه‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال و وزن خشک ریشه‌ها پس از قرار دادن نمونه‌ها در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد.

پارامترهای فتوسنتزی

اندازه‌گیری پارامترهای فتوسنتزی توسط دستگاه Lci (Lci Console model, UK) انجام گرفت. این اندازه‌گیری بر روی برگ گره‌های ۳ تا ۶ از بالای گیاه و در حالت اتصال برگ به گیاه در شرایط نوری کامل انجام شد. هر برگ به مدت حداقل ۲۰ ثانیه درون اتاقک اندازه‌گیری قرار گرفت تا گازها توسط تهویه کوچک داخل اتاقک به خوبی مخلوط شود و به اصطلاح هوای پایدار و یکنواختی را برای فتوسنتز ایجاد کند و از طریق لوله‌های متصل به حسگرهای دی اکسید کربن فرایند سنجش صفات فتوسنتزی انجام شود. اندازه‌گیری در شرایط آفتابی و نور کامل خورشید بین ساعات ۸-۱۰ صبح انجام شد.

نشت یونی

پایداری غشای سلولی با اندازه‌گیری نشت الکترولیت (به عنوان معیاری از آسیب به سلول) بر اساس Lutts *et al.* (1966) اندازه‌گیری شد. تعداد مساوی دیسک از برگ‌ها در هر تکرار پس از شستشو با آب دو بار تقطیر جهت حذف آلودگی‌های احتمالی، درون لوله‌های آزمایش دارای ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل منتقل شد و جهت آماده‌سازی برای اندازه‌گیری EC1 نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه روی شیکر قرار داده شد. میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها با دستگاه EC سنج دیجیتالی (RS232-8301AZ model, USA) قرائت شد. در مرحله بعد، لوله‌های آزمایش دارای نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفت که پس از خنک شدن لوله‌ها دوباره هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (EC2) و در نهایت درصد نشت یونی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$EC (\%) = (EC1/EC2) * 100$$

محتوای نسبی آب

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ، قطعه‌های کوچک از قسمت‌های سالم برگ (۵/۰ گرم) جدا و با کمک ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) توزین شد. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها به پتری دیش‌های دارای آب مقطر منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط (۲۳ درجه سلسیوس) و در تاریکی قرار داده شد. پس از خارج کردن آن‌ها از آب مقطر، جهت حذف رطوبت اضافی، نمونه‌های برگ در بین دو لایه کاغذ صافی قرار گرفت و سپس وزن آماس آن‌ها اندازه‌گیری شد. پس از آن، قطعه‌های برگ به مدت ۴۸ ساعت به آون ۷۰ درجه سلسیوس منتقل و وزن خشک آن‌ها با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) تعیین شد. سپس با استفاده از رابطه زیر محتوای نسبی آب برگ محاسبه شد (Smart and Bingham, 1974).

$$(\%) = \left(\frac{\text{وزن برگ خشک} - \text{وزن برگ تازه}}{\text{وزن برگ خشک} - \text{وزن برگ آماس}} \right) \times 100$$

میزان کلروفیل کل و کاروتنوئید کل برگ

برای اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید از روش (Lichtenthaler 1987) استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های فریز شده در نیتروژن مایع وزن شدند و در هاون با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد همگن و به فالكون منتقل و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۶۳/۶، ۶۴۶/۶ و ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل (model 7315, Jenway, UK) قرائت شد. برای محاسبه غلظت کلروفیل a, b و کاروتنوئید کل بر حسب میکروگرم بر میلی‌گرم (میلی‌گرم بر گرم) از روابط (Porra 2002) که در زیر نوشته شده است، استفاده شد.

$$[\text{chl a}] = 12.25 \text{ E663.6} - 2.55 \text{ E646.6}$$

$$[\text{chl b}] = 20.31 \text{ E646.6} - 4.91 \text{ E663.6}$$

$$\text{Total Chl} = 17.76 \text{ E646.6} + 7.34 \text{ E663.6}$$

که در آن E663.6 میزان جذب در طول موج ۶۶۳/۶ نانومتر و E646.6 میزان جذب در طول موج ۶۴۶/۶ نانومتر است. میزان کاروتنوئید طبق رابطه زیر محاسبه گردید.

$$\text{Cx+c} = (1000 \times \text{A470} - 1.90 \text{ Chla} - 63.14 \text{ Chlb}) / 214$$

که در آن A470 میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر است. برای تبدیل میلی‌گرم بر لیتر به میلی‌گرم بر گرم از رابطه زیر استفاده شد.

$$\text{Chl}\left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right) = \left(\frac{\text{Chl}\left(\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right) \times 0.01(\text{l})}{\text{weight (g)}}\right)$$

استخراج عصاره برای اندازه‌گیری پرولین آزاد و قندهای محلول کل برای اندازه‌گیری میزان پرولین و قندهای محلول کل ۰/۵ گرم نمونه برگ منجمد شده، با ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد در هاون چینی عصاره‌گیری شد. قسمت روشن‌تر عصاره‌ی بدست آمده جمع‌آوری شد و عملیات استخراج بر روی رسوبات برگ باقی مانده، طی دو مرحله شستشو و هر مرحله با ۵ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد ادامه یافت. عصاره‌های الکلی جمع‌آوری شده، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و تا زمان تعیین مقادیر پرولین آزاد و قندهای محلول کل، داخل لوله‌های آزمایش درپوش‌دار، در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Irigoyen et al., 1992).

پرولین

به منظور استخراج پرولین ابتدا ۲ میلی لیتر از عصاره الکلی در فالكون ۱۵ میلی لیتر ریخته شد و به آن، ۲ میلی لیتر نین‌هیدرین اسید و ۲ میلی لیتر استیک اسید خالص اضافه شد. سپس محلول حاصل ابتدا به مدت یک ساعت در حمام آب جوش و پس از آن در ظرف آب یخ قرار گرفت. پس از خنک شدن، ۴ میلی لیتر تولوئن به هر لوله آزمایش اضافه شد و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه با ورتکس کاملاً بهم زده شد. این کار باعث جدا شدن فازهای آلی و معدنی از یکدیگر و تشکیل ماده رنگی در فاز بالایی که دارای تولوئن است، می‌شود. بلافاصله جذب اسپکتروفتومتری فاز فوقانی نمونه‌ها، در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید (Bates et al., 1973).

میزان کل قندهای محلول

برای اندازه‌گیری قندهای محلول کل از روش (Irigoyen et al., 1992) استفاده شد. بدین صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی تهیه شده، در لوله‌های آزمایش درپوش‌دار ۱۵ میلی لیتر ریخته شد و ۳ میلی لیتر معرف آنترون تازه آماده شده، به آن اضافه گردید. سپس لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند. پس از خنک شدن لوله‌های آزمایش، جذب نمونه‌ها و استانداردها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج مرئی فرانفش خوانده شد.

اندازه‌گیری نشاسته

اندازه‌گیری نشاسته به روش (Marshall 1986) انجام گرفت. برای این کار فالكن‌های حاوی تفاله‌های باقی مانده از اندازه‌گیری پرولین و کربوهیدرات را در هوای آزاد قرار گرفتند تا الکل آن کاملاً خارج شود و مواد باقی مانده خشک شود (۱ تا ۲ روز). از این بقایا برای اندازه‌گیری نشاسته استفاده شد (پیش از این مرحله فالكن‌های ۱۵ میلی‌لیتری و آنترون آماده در یخچال نگهداری شد تا کاملاً سرد

شوند). سپس به بقایای مواد که کاملاً در ته فالکن‌ها خشک شده‌اند، ۵ میلی لیتر هیدروکلریک اسید ۱/۱ درصد اضافه شد. برای بهتر حل شدن نمونه‌ها در اسید، فالکن‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. عصاره‌ها را از صافی عبور داده و از عصاره‌های صاف شده ۱ میلی‌لیتر برداشته و به ۵ میلی‌لیتر آنترون آماده شده اضافه شد. بلافاصله فالکن‌ها در ظرف مملو از یخ قرار داده شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سلسیوس منتقل و دوباره در ظرف یخ قرار داده شد. جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید.

یافته‌های پژوهش

براساس نتایج به دست آمده از جدول ۱ وزن تر اندام هوایی تحت تأثیر اثرات سه گانه رقم در تنش قلیایی در تنش شوری قرار گرفت. در هر دو رقم نارنج و ولکامریانا افزایش غلظت شوری موجب کاهش وزن تر اندام هوایی در هر دو pH گردید که این کاهش در pH ۸/۲ نسبت به pH ۶/۵ بیشتر بود. کمترین وزن تر اندام هوایی (۸۹ گرم) در رقم ولکامریانا با pH ۸/۲ و ۹۰ میلی مولار سدیم کلرید به دست آمد و بیشترین وزن تر اندام هوایی (۱۸۰/۵۰ گرم) در رقم نارنج با pH ۶/۵ و صفر میلی مولار سدیم کلرید به دست آمد. در پایه نارنج و ولکامریانا افزایش غلظت شوری موجب کاهش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی در هر دو pH گردید که این کاهش در pH ۸/۲ نسبت به ۶/۵ به مراتب افزایش یافت و کمترین وزن خشک اندام هوایی در بین دو پایه در پایه ولکامریانا با pH ۸/۲ و شوری ۶۰ میلی مولار به دست آمد که نسبت به اغلب تیمارها کاهش معنی‌داری داشت. وزن تر ریشه همچنین تحت تأثیر شرایط تنش قرار گرفت و با افزایش شدت تنش شوری و قلیایی وزن تر ریشه کاهش یافت به طوری که در بالاترین سطح pH و شوری در پایه ولکامریانا کمترین میزان وزن تر ریشه به دست آمد اما نسبت به بقیه تیمارها این کاهش معنی‌دار نگردید. مطابق با یافته‌های حاصل از جدول اثرات سه‌گانه پایه در تنش قلیایی در تنش شوری وزن خشک ریشه در پایه نارنج با افزایش غلظت شوری در هر دو سطح pH در اغلب موارد به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت و غلظت ۶۰ میلی مولار سدیم کلراید در pH ۸/۲ دارای کمترین وزن خشک ریشه (۱۷/۴۵ گرم) بود که کاهش ۳۷/۵ درصدی نسبت به شاهد داشت. در پایه ولکامریانا در pH ۶/۵ افزایش غلظت شوری در غلظت ۶۰ و ۹۰ میلی مولار سدیم کلراید و در pH ۸/۲ در همه موارد وزن خشک ریشه را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش دادند. در پایه ولکامریانا شوری ۹۰ میلی مولار سدیم کلراید در pH ۸/۲ دارای کمترین وزن خشک ریشه (۱۵/۸۸ گرم) بود که کاهش ۴۸/۸۸ درصدی نسبت به شاهد این پایه داشت.

جدول ۱: اندازه‌گیری خصوصیات مورفولوژیک دو پایه نارنج و ولکامریانا تحت شرایط تنش شوری و قلیایی

پایه	pH	شوری (مولار)	وزن تر اندام هوایی (گرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
نارنج	۶/۵	۰	۱۸۰/۵۰a	۸۲/۵۰a	۶۸/۰۰a	۲۷/۹۲ab
	۳۰	۳۰	۱۳۷/۰۰bcd	۶۸/۷۸bc	۵۴/۵۰a	۱۹/۸۱def
	۶۰	۶۰	۱۴۴/۷۵b	۶۹/۸۰bc	۶۳/۵۰a	۲۱/۴۳cdef
	۹۰	۹۰	۱۲۱/۲۵bcdef	۶۷/۱۷bc	۵۲/۲۵a	۱۷/۷۴ef
	۸/۲	۰	۱۲۳/۰۰bcdef	۶۵/۱۴bc	۶۸/۲۵a	۲۵/۴۴abcd
	۳۰	۳۰	۱۴۱/۵۰bc	۷۲/۲۸b	۶۴/۵۰a	۲۳/۲۰bcde
	۶۰	۶۰	۱۳۵/۰۰bcde	۶۲/۱۸c	۵۰/۲۵a	۱۷/۴۵ef
ولکامریانا	۶/۵	۰	۱۰۴/۲۵cdef	۴۸/۹۱de	۵۴/۲۵a	۲۱/۹۷bcdef
	۳۰	۳۰	۱۴۷/۵۰b	۶۸/۲۶bc	۵۶/۷۵a	۳۱/۰۷a
	۶۰	۶۰	۱۱۹/۷۵bcdef	۵۱/۸۰d	۴۴/۲۵a	۲۶/۲۸abc
	۹۰	۹۰	۹۸/۷۵ef	۴۶/۱۳def	۳۴/۰۰a	۱۶/۱۹f
	۸/۲	۰	۱۰۰/۲۵def	۴۱/۹۱efg	۳۷/۲۵a	۱۷/۶۲ef
	۳۰	۳۰	۱۲۰/۲۵bcdef	۴۳/۱۳def	۳۸/۰۲a	۱۷/۶۸ef
	۶۰	۶۰	۱۲۳/۵۰bcdef	۳۸/۸۷fgh	۳۴/۳۰a	۱۸/۹۰ef
	۹۰	۹۰	۱۲۱/۵۰bcdef	۳۰/۴۰h	۳۳/۵۵a	۱۷/۴۱ef
			۸۹/۰۰f	۲۲/۷۹gh	۲۹/۴۰a	۱۵/۸۸f

برای هر صفت میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک براساس آزمون چند دامنه دانکن اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) ندارند.

For each parameter, the averages with at least one same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

نتایج به دست آمده از جدول مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که در رقم نارنج و ولکامریانا در هر دو سطح pH افزایش غلظت شوری میزان فتوسنتز را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد که این کاهش در سطح دوم pH بیشتر می‌باشد و در pH ۸/۲ با شوری ۹۰ میلی مولار سدیم کلرید به کمترین میزان رسید که در نارنج موجب کاهش ۵۱/۸۳ درصد و در رقم ولکامریانا موجب کاهش ۵۷/۵ درصدی نسبت به شاهد گردید. میزان تعرق تحت تأثیر اثرات سه گانه پایه در تنش قلیایی در تنش شوری قرار گرفت و در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا و هر دو سطح pH افزایش غلظت شوری در اغلب موارد موجب کاهش معنی‌دار میزان تعرق گردید. به طوری که میزان تعرق در پایه نارنج با pH ۸/۲ و شوری ۶۰ میلی مولار به کمترین میزان (۰/۳۸ میلی‌مول بر متر مربع بر ثانیه) رسید و موجب کاهش ۴۴/۱۱ درصدی نسبت به نارنج با pH ۶/۵ و شوری صفر گردید. بیشترین میزان تعرق (۰/۷۰ میلی‌مول بر متر مربع بر ثانیه) در پایه ولکامریانا با pH ۶/۵ و شوری صفر میلی‌مولار به دست آمد که این افزایش نسبت به شرایط مشابه در نارنج معنی‌دار نگردید. میزان نشت یونی تحت تأثیر اثرات متقابل پایه در تنش قلیایی در تنش شوری قرار گرفت به طوری که در پایه نارنج افزایش غلظت شوری در pH ۶/۵ موجب افزایش نشت یونی گردید که این افزایش معنی‌دار نبود اما در pH ۸/۲ افزایش غلظت سدیم کلراید در تمامی موارد نشت یونی را به طور معنی‌داری افزایش داد. در پایه ولکامریانا افزایش غلظت شوری در هر دو سطح pH موجب افزایش معنی‌دار نشت یونی نسبت به شاهد گردید. بیشترین میزان نشت یونی (۴۲/۵۷ درصد) در پایه ولکامریانا در غلظت ۹۰ میلی مولار سدیم کلراید با pH ۸/۲ به دست آمد که افزایش ۷۴/۰۳ درصدی نسبت به نارنج با pH ۶/۵ و شوری صفر میلی‌مولار داشت. در هر دو رقم نارنج و ولکامریانا افزایش غلظت شوری میزان محتوای نسبی آب را در هر دو pH به طور معنی‌داری کاهش داد که این کاهش در pH ۸/۲ در اغلب موارد نسبت به pH ۶/۵ بیشتر بود. در رقم نارنج کاهش محتوای نسبی آب در شوری ۳۰ نسبت به شوری صفر معنی‌دار نگردید. رقم ولکامریانا با pH ۶/۵ و شوری صفر میلی مولار سدیم کلرید دارای بیشترین (۷۱/۵۱ درصد) و رقم نارنج با pH ۶/۵ و شوری ۹۰

میلی مولار دارای کمترین میزان محتوای نسبی آب (۴۹/۸۷ درصد) بود. میزان کاهش محتوای نسبی آب در رقم نارنج ۳۸/۳۸ درصد و در رقم ولکامریانا ۱۶/۲۲ درصد بود.

جدول ۲: اندازه گیری خصوصیات فیزیولوژیک دو پایه نارنج و ولکامریانا تحت شرایط تنش شوری و قلیایی

پایه	pH	شوری (میلی مولار)	فتوستنز (میکرومول بر مترمربع بر ثانیه)	تغرق (میلی مول بر متر مربع بر ثانیه)	نشست یونی (%)	محتوای نسبی آب (درصد)
نارنج	۶/۵	۰	۱۰/۹۰a	۰/۶۸ab	۲۴/۴۶g	۶۶/۸۴a
		۳۰	۹/۳۰bc	۰/۶۱de	۲۴/۵۰g	۶۴/۳۹bc
		۶۰	۸/۵۰bcde	۰/۴۵i	۲۵/۵۶g	۵۹/۹۴ef
		۹۰	۸/۲۵cdef	۰/۳۹j	۲۵/۹۴g	۴۹/۸۷i
	۸/۲	۰	۷/۵۰defgh	۰/۵۲gh	۲۸/۰۷f	۵۵/۳۱g
		۳۰	۷/۰۰efghi	۰/۴۲i	۲۸/۷۲f	۵۴/۶۵gh
		۶۰	۷/۰۰efghi	۰/۳۸j	۴۰/۳۸b	۵۸/۲۲f
		۹۰	۵/۲۵jk	۰/۵۵fg	۳۰/۹۹e	۵۲/۴۶h
ولکامریانا	۶/۵	۰	۱۰/۰۰ab	۰/۷۰a	۲۹/۰۲f	۷۱/۵۱a
		۳۰	۹/۰۰bcd	۰/۶۱de	۳۳/۸۸cd	۶۵/۰۱bc
		۶۰	۸/۰۰cdefg	۰/۶۴cd	۳۲/۶۶de	۶۰/۴۹ef
		۹۰	۶/۵۰ghij	۰/۶۸ab	۳۵/۳۹c	۶۱/۵۸de
	۸/۲	۰	۶/۷۵fghij	۰/۴۹h	۳۵/۷۸c	۶۳/۳۰cd
		۳۰	۵/۷۵ij	۰/۵۸ef	۳۹/۸۶b	۵۹/۹۱ef
		۶۰	۶/۰۰hij	۰/۶۵bc	۳۴/۰۱cd	۶۱/۵۸de
		۹۰	۴/۲۵k	۰/۴۴i	۴۲/۵۷a	۶۵/۳۴bc

برای هر صفت میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک براساس آزمون چند دامنه دانکن اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) ندارند.

For each parameter, the averages with at least one same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

مقایسه میانگین حاصل از اثرات سه‌گانه (جدول ۳) نشان داد که میزان کلروفیل تحت تأثیر اثرات متقابل پایه در تنش قلیایی در شوری قرار گرفت. میزان کلروفیل تحت تنش شوری و قلیایی در هر دو پایه به طور معنی‌داری کاهش یافت که این کاهش در پایه ولکامریانا نسبت به نارنج و $pH 8/2$ نسبت به $pH 6/5$ بیشتر بود. بیشترین میزان کلروفیل ($1/98$ میلی گرم بر گرم وزن تر) در پایه نارنج با $pH 6/5$ و شوری صفر میلی مولار و کمترین میزان کلروفیل ($1/07$ میلی گرم بر گرم وزن تر) در پایه ولکامریانا با $pH 8/2$ و شوری 90 میلی مولار به دست آمد. کاهش میزان کلروفیل در پایه نارنج $29/29$ درصد و در پایه ولکامریانا $45/12$ درصد بود. میزان پرولین تحت تأثیر اثرات متقابل پایه در تنش قلیایی در تنش شوری قرار گرفت و افزایش شدت تنش شوری در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا میزان پرولین را در هر دو سطح pH به طور معنی‌داری افزایش داد. این افزایش در پایه نارنج نسبت به ولکامریانا بیشتر بود. بیشترین میزان پرولین ($23/02$ میکرومول بر گرم وزن تر) در پایه نارنج با $pH 8/2$ و شوری 60 میلی مولار به دست آمد که نسبت به شرایط مشابه با شوری صفر افزایش $55/01$ درصدی داشت. پایه ولکامریانا در $pH 6/5$ با شوری صفر میلی مولار دارای کمترین میزان پرولین ($9/88$) بود. در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا افزایش غلظت سدیم کلرید میزان کربوهیدرات را در هر دو سطح pH افزایش داد که این افزایش در $pH 8/2$ نسبت به $pH 6/5$ و پایه ولکامریانا نسبت به نارنج بیشتر بود و در اغلب موارد معنی‌دار گردید پایه ولکامریانا در $pH 8/2$ با شوری 30 میلی مولار سدیم کلرید دارای بیشترین ($29/89$ میلی گرم بر گرم وزن تر) و پایه نارنج در $pH 6/5$ با شوری 60 میلی مولار سدیم کلرید دارای کمترین میزان کربوهیدرات ($18/17$ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود. در پایه نارنج شوری 60 میلی مولار در $pH 8/2$ دارای بیشترین میزان این اسمولیت بود که افزایش $33/72$ درصدی نسبت به شاهد داشت و در پایه ولکامریانا شوری 30 میلی مولار در $pH 8/2$ بیشترین میزان کربوهیدرات را داشت که افزایش $49/67$ درصدی نسبت به $pH 6/5$ و شوری صفر در این پایه داشت. میزان نشاسته در پایه نارنج با افزایش غلظت شوری در هر دو سطح pH نسبت به شاهد افزایش یافت که این افزایش تنها در $pH 6/5$ با غلظت 90 میلی مولار سدیم کلرید معنی‌دار گردید که دارای بیشترین میزان نشاسته بود و افزایش $21/03$ درصدی نسبت به شاهد داشت. در پایه ولکامریانا افزایش غلظت شوری در $pH 6/5$ در همه موارد و در $pH 8/2$ در غلظت‌های 60 و 90 میلی مولار سدیم کلرید میزان نشاسته را کاهش داد که این کاهش در غلظت 60 میلی مولار با $pH 8/2$ معنی‌دار گردید.

جدول ۳: اندازه‌گیری برخی خصوصیات بیوشیمیایی دو پایه نارنج و ولکامریانا تحت شرایط تنش شوری و قلیایی

پایه	pH	شوری (میلی-مولار)	کلروفیل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر)	پرولین (میکرومول گرم بر گرم وزن تر)	کربوهیدرات (میلی گرم بر گرم وزن تر)	نشاسته (میلی گرم بر گرم وزن تر)
نارنج	6/5	0	1/98a	0/11a	11/10j	18/77h	12/41bcd
		30	1/87c	0/10a	13/76fg	21/51f	13/84ab
		60	1/83d	0/11a	14/78ef	18/17h	13/63abc
		90	1/63f	0/04a	17/78d	22/28f	15/02a
	8/2	0	1/55g	0/03a	14/85ef	22/71ef	13/23bcd
		30	1/54g	0/03a	19/07c	23/73de	12/77bcd
		60	1/48h	0/03a	23/02a	25/10c	12/09cde
		90	1/40j	0/02a	21/18b	24/50cd	13/06bcd

برای هر صفت میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک براساس آزمون چند دامنه دانکن اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) ندارند.

For each parameter, the averages with at least one same letter are not significantly differentns according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

بحث

براساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر تنش شوری و قلیایی خصوصیات مورفولوژیک از جمله وزن تر و خشک اندام هوایی و وزن تر و خشک ریشه را کاهش دادند. اثر تنش شوری-قلیایی بر پارامترهای مورفولوژیک بسته به پایه مرکبات و سطح تنش متفاوت بود. شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که باعث کاهش رشد گیاه می‌گردد. کاهش وزن تر و خشک گیاه را می‌توان با کاهش توانایی فتوسنتز تحت تنش توضیح داد. این نتایج با نتایج گزارش شده توسط Safdar *et al.* (2019) مطابقت دارد که اظهار داشت شوری یکی از قدیمی‌ترین و قوی‌ترین چالش‌های محیطی است که رشد گیاه را کاهش می‌دهد و در نهایت مرگ گیاه می‌گردد. تنش‌های محیطی بسته به شدت تنش و گونه‌های گیاهی میزان فتوسنتز را کاهش می‌دهند و در نهایت از رشد گیاه جلوگیری می‌کنند (Muhammad *et al.* 2021). همچنین کاهش وزن گیاه در شرایط تنش را به دلیل اختلال در میزان فتوسنتز گزارش کردند. فتوسنتز مکانیسم اساسی در گیاهان برای به دست آوردن مواد و انرژی است. بیش از ۹۰ درصد ماده خشک در گیاهان به طور مستقیم از فتوسنتز حاصل می‌شود. با این حال، یکی از فرآیندهای حساس به تنش، به ویژه تنش شوری نیز می‌باشد که کاهش آن موجب کاهش وزن خشک گیاه می‌گردد (Kaiwen *et al.*, 2020). وزن خشک کمتر گیاهان در شرایط شوری را می‌توان به کاهش پتانسیل اسمزی خاک و عدم تعادل تغذیه‌ای نسبت داد. چندین مطالعه نشان داد که تنش شوری موجب جذب مواد مغذی و دسترسی به آب گیاه، عدم تعادل اسمزی خاک-گیاه، تنش اکسیداتیو و در نهایت کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه می‌گردد (Zarei and Paymaneh, 2014; Safdar *et al.*, 2019). نتایج مشابهی توسط Ibrahim *et al.* (2018) یافت شد که تحت شرایط تنش رشد و در نتیجه وزن تر و خشک گیاه کاهش یافت. کاهش رشد گیاه و در نتیجه کاهش وزن تر و خشک گیاه تحت تنش شوری، قلیایی و تنش همزمان شوری و قلیایی توسط Paz *et al.* (2012) گزارش گردید. تنش شوری - قلیایی جذب آب توسط ریشه را کاهش و در نتیجه وزن تر و خشک Leymus chinensis را کاهش دادند (Lin *et al.*, 2017). همچنین کاهش ارتفاع بوته، تعداد شاخه، تعداد برگ، وزن تر و خشک گیاه تحت شرایط تنش به دلیل کاهش تقسیم سلولی، طولیل شدن سلول و سمیت یونی است (Hassan and Ali., 2014; Danaeifar *et al.*, 2024). سیستم ریشه گیاه بخشی است که مستقیماً در معرض تنش شوری و قلیایی قرار دارد و همچنین یکی از قسمت‌هایی است که به تنش شوری و قلیایی حساس است. آسیب سیستم ریشه گیاه مستقیماً منجر به محدود شدن آب و جذب مواد مغذی گیاه می‌شود. (Kaiwen *et al.*, 2020).

علاوه بر عوامل مورفولوژیک، تنش‌های غیرزیستی پارامترهای فیزیولوژیک را تحت تأثیر قرار دادند با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه‌ی حاضر تبادلات گازی تحت‌تأثیر تیمارهای مختلف پایه، شوری و قلیایی قرار گرفتند، به طوری که افزایش شدت شوری و تنش قلیایی باعث کاهش معنی‌دار تبادلات گازی شد. یکی از واکنش‌های اولیه گیاهان به شرایط تنش، کاهش سطح برگ است که باعث کاهش تبادلات گازی از جمله فتوستنز می‌گردد (Golbashy *et al.*, 2010). غلظت بیش از حد نمک بر سنتز رنگدانه فتوستنزی تأثیر می‌گذارد یا تجزیه آنها را تسریع می‌کند. در چنین حالتی، جذب و استفاده از انرژی نور در مرکز واکنش PSI و PSII کاهش و انتقال الکترون مسدود می‌شود، که توانایی جذب کربن را محدود می‌کند. PSI و PSII به تنش شوری حساس هستند. تنش شوری اغلب منجر به کاهش فعالیت PSI و PSII می‌شود (Kaiwen *et al.*, 2020). یکی از پاسخ‌های اولیه گیاهان به تنش، بسته شدن روزنه است که تبادل گاز بین اتمسفر و برگ را محدود می‌کند (Mafakheri *et al.*, 2010; Golbashy *et al.*, 2010; Shahid *et al.*, 2019). بیان کرد که تنش شوری میزان تبادلات گازی را در پایه‌های مرکبات کاهش داد. کاهش تبادلات گازی می‌تواند ناشی از تجمع سدیم کلراید در برگ باشد که فعالیت آنزیم‌ها را تغییر می‌دهند (Tabatabaei, 2006). به طور کلی، فتوستنز یک شاخص مهم برای حساسیت فیزیولوژیک به تنش غیرزیستی است که در محیط‌های شوری-قلیایی به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. از سوی دیگر، تنش همزمان شوری و قلیایی می‌تواند اثرات بیوشیمیایی و فتوشیمیایی بر فتوستنز داشته باشد (Lin *et al.*, 2017). در گیاهانی مانند یونجه و گندم، کاهش فتوستنز به دلیل تخریب رنگدانه‌های فتوستنزی (کلروفیل و کاروتنوئید) مشاهده شده است (Muhammad *et al.*, 2021). تنش شوری باعث افزایش نشت الکترولیت می‌شود. نشتی که بر نفوذپذیری غشاء تأثیر می‌گذارد (Hassan and Ali., 2014). در شرایط تنش غشای سلولی آسیب می‌بیند و تولید گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش می‌دهد که نشت الکترولیت را افزایش می‌دهد و محتوای نسبی آب کاهش می‌یابد (Soltabayeva *et al.*, 2021). با توجه به نتایج پژوهش حاضر مقدار کلروفیل تحت شرایط تنش کاهش یافت که کاهش این رنگیزه فتوستنزی تحت تنش می‌تواند به دلایل متعددی از جمله ۱- تشکیل آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند کلروفیل‌از که مسئول تجزیه کلروفیل است، ۲- آسیب به دستگاه فتوستنز ۳- سرکوب آنزیم‌های خاصی که وظیفه سنتز رنگدانه‌های فتوستنزی را بر عهده دارند ۴- کاهش جذب مواد معدنی از جمله منیزیم که باعث سنتز کلروفیل می‌شود ۵- کاهش حجم منافذ کلروپلاست‌ها و بازسازی گونه‌های فعال اکسیژن ۶- آسیب به غشاهای (Hassan and Ali., 2014). تنش شوری باعث عدم تعادل در تغذیه می‌شود که موجب افزایش جذب سدیم و کاهش جذب پتاسیم، منیزیم و سایر عناصر دخیل در سنتز کلروفیل می‌گردد. تنش همچنین باعث از بین رفتن آنزیم‌های خاصی می‌شود که مسئول سنتز رنگدانه‌های فتوستنزی هستند و در نهایت باعث کاهش میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها می‌گردد (Zarei and Paymaneh, 2014; Guo *et al.*, 2015). همچنین گزارش کرد که کاهش میزان کلروفیل ناشی از تنش به دلیل کاهش سطح منیزیم، مهار سنتز کلروفیل و افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با تخریب کلروفیل است. در شرایط تنش شوری و قلیایی، محتوای کلروفیل کاهش یافت که موجب کاهش میزان فتوستنز گردید (Ye *et al.*, 2019). مطابق با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر افزایش شدت تنش شوری و قلیایی میزان پرولین را افزایش داد که این نتایج به نتایج حاصل از مطالعات (Esmaeili and Danaeifar., 2022) مطابقت دارد که گزارش کردند تنش‌های محیطی منجر به تجمع پرولین در گیاهان می‌شود که به افزایش تحمل گیاهان از طریق تنظیم اسمزی، تورژسانس سلولی و یکپارچگی غشاهای کمک می‌کند تا از نشت الکترولیت جلوگیری کند و با قرار دادن غلظت ROS در محدوده نرمال، آسیب اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. یکی از واکنش‌های گیاهان تحت تنش افزایش محتوای پرولین است. افزایش سطح پرولین به دلیل تنش به خوبی شناخته شده است. پرولین دارای عملکرد تنظیم اسمزی در گیاهان است. پرولین ممکن است در سازگاری با تنش درون سلولی نقش داشته باشد. تجمع املاح سازگار با نیتروژن، از جمله پرولین، در تنظیم اسمزی، محافظت از ماکرومولکول‌های سلولی در برابر آسیب شوری، ذخیره نیتروژن و مهار رادیکال‌های آزاد نقش دارد (Hassan and Ali., 2014). گیاهان می‌توانند تحمل خود را در برابر تنش شوری-

قلیایی از طریق مسیرهای بیوشیمیایی مختلف، مانند تولید متابولیت‌های اسمزی افزایش دهند. پرولین می‌تواند ساختارهای درون سلولی را تثبیت کند و رادیکال‌های آزاد را از بین ببرد (Ye et al., 2019). براساس نتایج به دست آمده شرایط تنش میزان کربوهیدرات را در اغلب موارد افزایش و میزان نشاسته را کاهش داد. این نتایج با نتایج (Moallemi, et al., (2022 مطابقت دارد که گزارش کردند تحت شرایط تنش قندهای محلول افزایش پیدا می‌کنند که این افزایش برای تنظیم پتانسیل اسمزی، حفظ متابولیسم، افزایش انرژی و تحمل بیشتر نسبت به شرایط تنش مفید می‌باشد. همچنین تنش شوری باعث افزایش فعالیت ساکارز فسفات سنتتاز می‌شود که میزان قندهای محلول را افزایش می‌دهد (Hassan and Ali., 2014).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

به طور کلی نتایج نشان داد که تنش‌های مرکب شوری و قلیایی در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا خصوصیات مورفولوژیکی، تبادلات گازی، محتوای نسبی آب و رنگیزه‌های فتوسنتزی را به طور معنی‌داری کاهش دادند که این کاهش در pH ۸/۲ نسبت به pH ۶/۵ و پایه ولکامریانا نسبت به پایه نارنج بیشتر بود. همچنین براساس نتایج میزان نشت یونی، پرولین و کربوهیدرات به طور معنی‌داری افزایش یافت. پایه نارنج نسبت به پایه ولکامریانا با افزایش میزان اسمولیت‌ها تحت شرایط تنش مقاومت بیشتری داشت.

منابع

- Abdel Latef, A. A. & Tran, L. S. P. (2016). Impacts of priming with silicon on the growth and tolerance of maize plants to alkaline stress. *Frontiers in Plant Science*, (7), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00243>
- Acosta-Motos, J., Ortuño, M., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. & Hernandez, J. (2017). Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy*, (7), 1- 18. [Doi: 10.3390/agronomy 7010018](https://doi.org/10.3390/agronomy7010018)
- Alvarez-Acosta, C., Marrero-Dominguez, A., Gallo-Llobet, L. & Gonzalez-Rodriguez, A. M. (2018). PHysiological response of selected avocados (*Persea americana*) subjected to NaCl and NaHCO₃ stress. *Scientia Horticulturae*, (237), 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.010>
- Bates, L. S., Waldaren, R. P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, (39), 205-208. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Boukari, N., Jelali, N., Renaud, J. B., Youssef, R. B., Abdelly, C. & Hannoufa, A. (2019). Salicylic acid seed priming improves tolerance to salinity, iron deficiency and their combined effect in two ecotypes of Alfalfa. *Environmental and Experimental Botany*, (167), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103820>

Cimen, B. & Yesiloglu, T. (2016). Rootstock breeding for abiotic stress tolerance in citrus. In Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives. *IntechOpen*, (23), 527-562. DOI: [10.5772/62047](https://doi.org/10.5772/62047)

Danaeifar, A., Khaleghi, E., Zivdar, S., & Mehdikhanlou, K. (2023). Physiological, biochemical, and gene expression of Sour Orange (*Citrus aurantium* L.) to Iron (II)-Arginine Chelate under salinity, alkalinity, and salt-alkali combined stresses. *Scientia Horticulturae*, (8), 319-346. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112146>

Danaeifar, A., Khaleghi, E., Zivdar, S. & Mehdikhanlou, K. (2024). Effects of NaCl and Alkaline pH Stress on Some Morphophysiological and Biochemical Parameters of Two Citrus Rootstocks. *Journal of Agricultural Science and Technology*, (8), 371-385. DOI: [10.22034/JAST.26.2.371](https://doi.org/10.22034/JAST.26.2.371)

Esmaili, S., & Danaeifar, A. (2022). Improved growth indices and tolerance of myrtle (*Myrtus communis* L.) to water-deficit stress by alleviating antioxidants and compatible osmolytes using a superabsorbent polymer. *Flower and Ornamental Plants*, (1), 163-172.

DOI: [10.61186/flowerjournal.7.1.163](https://doi.org/10.61186/flowerjournal.7.1.163)

Gattullo, C. E., Youry, P. I. I., Allegretta, I., Medici, L., Cesco, S., Mimmo, T. & Terzano, R. (2018). Iron mobilization and mineralogical alterations induced by iron-deficient cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) in a calcareous soil. *PedospHere*, (28), 59-69. DOI: [10.1016/s1002-0160\(15\)60104-7](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(15)60104-7)

Golbashy, M., Ebrahimi, M., Khorasani, S. K. & Choukan, R. (2010). Evaluation of drought tolerance of some corn (*Zea mays* L.) hybrids in Iran. *African Journal of Agricultural Research*, (5), 2714-2719. <http://doi:10.4236/academicjournals.org/AJAR>

Guo, R., Yang, Z., Li, F., Yan, C., Zhong, X., Liu, Q. & Zhao, L. (2015). Comparative metabolic responses and adaptive strategies of wheat (*Triticum aestivum*) to salt and alkali stress. *BMC plant biological*. (15), 1-13. DOI [10.1186/s12870-015-0546-x](https://doi.org/10.1186/s12870-015-0546-x)

Hassan, F. & Ali, E. (2014). Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme activity and some other physiological parameters in jojoba [*Simmondsia chinensis* (link) schneider] plant. *Australian Journal of Crop Science*, (8), 1615-1624. <https://doi.org/10.3390/su132313199>

Ibrahim, D. S., Eissa, A. M., Attala, A. Z. M., Sabbah, S. M. & Khalil, H. A. (2018). Alleviation of salinity stress by exogenous plant growth regulators in three citrus rootstocks. *Journal Agriculture Research*. (7), 437-455. <https://doi.org/10.1201/9781351075756-8>

Incesu, M., Yesilo, T., Cimen, B. & Yilmaz, B. (2015). Influences of different iron levels on plant growth and pPhotosynthesis of W. Murcott mandarin grafted on two rootstocks under high pH conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, (39), 838-844. <https://doi.org/10.3906/tar-1501-25>

Irigoyen, J. J., Einerich, D. W. & SánchezDíaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *physiologia plantarum*, (84), 55-60. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x>

- Kaiwen, G., Zisong, X., Yuze, H., Qi, S., Yue, W., Yanhui, C., Jiechen, W., Wei, L. & Huihui, Z. (2020). Effects of salt concentration, pH, and their interaction on plant growth, nutrient uptake, and photochemistry of alfalfa (*Medicago sativa*) leaves. *Plant Signaling and Behavior*, (15), 1-10. : <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1832373>
- Kumar, S., Li, G., Yang, J., Huang, X., Ji, Q., Liu, Z. & Hou, H. (2021). Effect of salt stress on growth, physiological parameters, and ionic concentration of water dropwort (*Oenanthe javanica*) cultivars. *Frontiers in plant science*, (12), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.660409>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology*, (148), 350-382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A. F., Bahramnejad, B., Struik, P. C. & Sohrabi, Y. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, (4), 580-585. <https://doi.org/10.3390/agronomy13122963>
- Lin, J., Wang, Y., Sun, S., Mu, C. & Yan, X. (2017). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth, photosynthesis and photosynthetic pigments of *Leymus chinensis* seedlings under salt-alkali stress and nitrogen deposition. *Science of the Total Environment*, (576), 234-241. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.091>
- Liu, N., Gong, B., Jin, Z., Wang, X., Wei, M., Yang, F. & Shi, Q. (2015). Sodic alkaline stress mitigation by exogenous melatonin in tomato needs nitric oxide as a downstream signal. *Journal of Plant Physiology*, (186), 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.012>
- Liu, D., Yang, Q., Ge, K., Hu, X., Qi, G., Du, B. & Ding, Y. (2017). Promotion of iron nutrition and growth on peanut by *Paenibacillus illinoisensis* and *Bacillus* sp. strains in calcareous soil. *Brazilian journal of microbiology*, (48), 656-670. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.006>
- Lutts, S., Kinet, J. M. & Bouhrammon, J. (1996). Na-Cl induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa*) cultivars difference in salinity resistance. *Annals of Botany*. (78), 389-398. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0134>
- Marshall, J. D. 1986. Drought and shade interact to cause fine-root mortality in Douglas-fir seedlings. *Plant and Soil*, (91), 51-60. <https://doi.org/10.3390/su132313199>
- Moallemi, N., Khaleghi, E. & Danaeifar, A. (2022). "Investigating the effect of using three types of superabsorbent polymers on NPK absorption under drought stress conditions." *Agricultural Engineering* (45), 153-166. <http://doi:10.22055/AGEN.2022.41572.1642>
- Mohamed, R. A. A. (2016). Some Physiological Studies on Salinity Tolerance for Some Citrus Rootstocks. [Doi: 10.20608/EJOH.2023.218924.1258](https://doi.org/10.20608/EJOH.2023.218924.1258)
- Muhammad, I., Shalmani, A., Ali, M., Yang, Q. H., Ahmad, H. & Li, F. B. (2021). Mechanisms regulating the dynamics of photosynthesis under abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, (11), 1-25. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.615942>
- Paz, R. C., Rocco, R. A., Reinoso, H., Menéndez, A. B., Pieckenstein, F. L. & Ruiz, O. A. (2012). Comparative study of alkaline, saline, and mixed saline-alkaline stresses with regard to their effects on growth, nutrient accumulation, and root morphology of *Lotus tenuis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, (31), 448-459. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9254-4>

- Porra, R. J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, (73), 149-156.
- Safdar, H., Amin, A., Shafiq, Y., Ali, A., Yasin, R., Shoukat, A. & Sarwar, M. I. (2019). A review: Impact of salinity on plant growth. *Nature Science*, (17), 34-40. <https://doi.org/10.7537/marsnsj170119.06>
- Shahid, M. A., Balal, R. M., Khan, N., Simón-Grao, S., Alfosea-Simón, M., Cámara-Zapata, J. M. & Garcia-Sanchez, F. (2019). Rootstocks influence the salt tolerance of Kinnow mandarin trees by altering the antioxidant defense system, osmolyte concentration, and toxic ion accumulation. *Scientia Horticulturae*, (250), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.028>
- Smart, R. E. & Bingham, G. E. (1974). Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*, (53), 258–260. <https://doi.org/10.1104/pp.53.2.258>
- Soltabayeva, A., Ongaltay, A., Omondi, J. O. & Srivastava, S. (2021). Morphological, Physiological and Molecular Markers for Salt-Stressed Plants. *Plants*, (10), 1-18. <https://doi.org/10.3390/plants10020243>
- Tabatabaei, S. J. (2006). Effects of salinity and N on the growth, photosynthesis and N status of olive (*Olea europaea* L.) trees. *Scientia horticulturae*, (108), 432-438. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.02.016>
- Talón, M., Wu, G. A., Gmitter, F. G. & Rokhsar, D. S. (2020). The origin of citrus. In *The genus citrus*. Woodhead Publishing. 9-31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00002-4>
- Ye, L., Zhao, X., Bao, E., Cao, K. & Zou, Z. (2019). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on watermelon growth, elemental uptake, antioxidant, and photosystem II activities and stress-response gene expressions under salinity-alkalinity stresses. *Frontiers in Plant Science*. (10), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00863>
- Zarei, M. & Paymaneh, Z. (2014). Effect of salinity and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and some physiological parameters of Citrus jambheri. *Archives of Agronomy and Soil Science*, (60), 993-1004. <https://doi.org/10.1080/03650340.2013.853289>
- Zhong, G. & Nicolosi, E. (2020). Citrus origin, diffusion, and economic importance. In *The Citrus Genome*. Springer Cham. 5-21. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15308-3_2