The Effect of Foliar Application of Nitric Oxide in Alleviating of Salt Stress in Bidaneh Sefid Grapevine Cultivar

Monir Ebrahimi[1], Rouholah Karimi[1*], Masoomeh Amerian[2]
[1.] Department of Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, Malayer University, Iran
[2.] Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agriculture Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran

Abstract
Salinity is one of the environmental stresses with negatively impact on growth and development process which can leads in oxidative stress induction in plants. Nitric oxide is a relatively stable gas radical and at low concentrations, prevents the production of active oxygen species. The phytochemical changes were investigated in response to application of nitric oxide (0 and 100 µM) in Bidaneh Sefid grapevine plants under different concentrations of sodium chloride (0, 25, 50 and 100 mM). The experiment was done in a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications in greenhouse conditions. According to the results, Nitric oxide application increased the chlorophyll, proline, total soluble sugar, total phenol, total flavonoid, soluble protein concentration and likewise significantly increased the activity of antioxidant enzymes of grapevine leaves. Nitric oxide increased the tolerance of grapevine plants under salinity stress conditions with effect on compatible osmolytes, antioxidant enzymes, potassium and magnesium. Consequently, 100 µM of nitric oxide is recommended for increasing salinity stress tolerance (up to100 mM of NaCl).

Keywords: Antioxidant enzymes, Grapes, Compatible solutions, Nutrients, *Vitis vinifera*

* Corresponding Author: rouholahkarimi@gmail.com

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال یازدهم، شمارهٔ سی و نهم، بهار ۱۳۹۸، صفحهٔ ۶۴-۵۹
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۲۶
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۷/۱۲/۱۰ و ۱۳۹۷/۱۲/۲۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۱۲/۲۷

اثر کاربرد برگی اکسیدنیتریک بر تعدیل تنش شوری در انگور رقم بی‌دانهٔ سفید

منیر ابراهیمی[۱]، روح‌الله کریمی[۱*]، معصومه عامریان[۲]
[۱] گروه مهندسی فضای سبز، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران
[۲] گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

چکیده
شوری یکی از تنش‌های محیطی است که با تأثیر منفی بر فرایند رشدونمو سبب القای تنش اکسایشی در گیاهان می‌شود. اکسیدنیتریک رادیکال گازی نسبتاً پایداری است که در غلظت‌های کم از تولید رادیکال‌های واکنش‌پذیر اکسیژن جلوگیری می کند. پژوهش حاضر با هدف بررسی تغییرات فتوشیمیایی ایجادشده در پاسخ به کاربرد برگی اکسیدنیتریک (صفر و ۱۰۰ میکرومولار) در بوته‌های انگور رقم بی‌دانهٔ سفید در معرض غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم) شوری در شرایط گلخانه به‌شکل آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج نشان دادند کاربرد اکسیدنیتریک به افزایش غلظت کلروفیل، پرولین، قند محلول کل، فنول کل، فلاونوئید کل، پروتئین‌های محلول، منجر و سبب افزایش معنادار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. اکسیدنیتریک با تأثیر بر اسمولیت‌های سازگار، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان پتاسیم و منیزیم تحمل بوته‌های انگور را نسبت به شرایط تنش شوری افزایش داد. باتوجه‌به نتایج، غلظت ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک برای افزایش تحمل به تنش شوری (تا غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم) پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، محلول‌های سازگار، عناصر غذایی، *Vitis vinifera*

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: rouholahkarimi@gmail.com، شمارهٔ تماس: ۰۸۱۳۲۳۵۵۳۸۰

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

شوری یکی از تنش‌های محیطی مهم است که با آسیب به غشاهای زیستی و برهم‌زدن سازوکار طبیعی سلول سبب کاهش رشد و عملکرد و درنهایت مرگ تدریجی گیاه می‌شود (Sairam and Tyagi, 2004). آثار تنش شوری در گیاه به غلظت نمک، مدت زمان قرارگیری در معرض تنش شوری، ژنوتیپ گیاه و سایر عوامل محیطی بستگی دارند (Roy *et al*., 2014). یکی از پیامدهای مضر تنش شوری، تجمع یون‌های سدیم و کلر در بافت گیاهان قرارگرفته در معرض خاک دارای غلظت زیاد کلریدسدیم است (Hu and Schmidhalter, 2005). ورود این یون‌ها به سلول باعث برهم‌خوردن تعادل عناصر، تجمع زیاد یون سدیم و در پی آن، اختلالات فیزیولوژیکی درخور توجه می‌شود. در این شرایط، معمولاً تنش اکسایشی به‌علت تغییر موازنه بین نور دریافت‌شده و کارایی جذب نور در برگ طی فرایند فتوسنتز رخ می‌دهد و با افزایش نشت الکترولیت‌ها، تشکیل گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن ازجمله سوپراکسید (O^{-2})، پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^-) و اکسیژن منفرد (O^-) همراه است (Foyer and Noctor, 2003). تنش شوری با افزایش گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در سلول‌های گیاه سبب ایجاد تنش اکسایشی در گیاه می‌شود و با افزایش فشار اسمزی محلول خاک، تعرق، فتوسنتز و جذب عناصر غذایی توسط گیاه را مختل می‌کند (Negrao *et al*., 2017). گیاهان به‌منظور غلبه بر تنش شوری و کاهش آسیب‌های ناشی از گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن به سامانه‌های محافظت‌کنندهٔ آنزیمی ازجمله سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، گایاکول‌پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز و متابولیت‌های غیرآنزیمی نظیر آسکوربیک‌اسید، ترکیبات فنولی و گلوتاتیون مجهز شده‌اند (Minazadeh *et al*., 2018).

استفاده از ترکیباتی که باعث هومئوستازی متابولیسم سلول و پایداری غشاهای زیستی در شرایط تنش می‌شوند، یکی از روش‌های مدیریت گیاهانِ در معرض تنش شوری است (Minazadeh *et al*., 2018).

اکسیدنیتریک رادیکال نسبتاً پایداریست که ابتدا به‌عنوان آلوده‌کنندهٔ محیط شایان توجه قرار گرفت؛ هرچند بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند به‌شکل مولکول در پدیدهٔ انتقال پیام در گیاهان و در فرایندهای مختلف فیزیولوژیک، پاتوفیزیولوژیک و نموی مانند جوانه‌زنی بذر، بسته‌شدن روزنه، پاسخ به عوامل بیماری‌زا و نمو ریشه دخالت می‌کند (Duan *et al*., 2007). اکسیدنیتریک به‌عنوان واسطه در عمل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و متابولیسم گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن شرکت می‌کند و در بسیاری از مطالعه‌ها نشان داده شده است در انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دخالت دارد (Del Rio *et al*., 2004). مقدار زیاد اکسیدنیتریک با اکسیژن ترکیب می‌شود و رادیکال پراکسی‌نیتریت را تولید می‌کند؛ بنابراین، اعتقاد بر اینست که اکسیدنیتریک نقش دوگانه

(سمی یا حفاظتی) دارد و این نقش به غلظت آن در گیاه، نوع بافت، سن گیاه و نوع تنش واردشده به گیاه بستگی دارد (Beligni and Lamattina, 1999; Del Rio *et al*., 2004). در برخی گیاهان، کاربرد خارجی اکسیدنیتریک باعث کاهش خسارت ناشی از برخی تنش‌ها مانند فلزات سنگین، علف‌کش‌ها، سرما، اشعه ماورابنفش و تنش شوری می‌شود (Arasimowicz and Floryszak–wieczorek, 2007).

انگور (*Vitis vinifera* L.) از مهم‌ترین محصولات باغی در دنیا و ایران است که به‌علت داشتن فراورده‌های جانبی متعدد در بیش از ۹۰ کشور دنیا کشت می‌شود؛ این سطح کشت وسیع باعث روبه‌روشدن درختچه‌های انگور با تنش‌های محیطی مختلف ازجمله تنش شوری شده است. کاربرد بی‌رویهٔ کودهای شیمیایی، برهم‌خوردن ساختمان خاک، گرمای هوا و کم‌آبی ازجمله دلایل افزایش غلظت نمک‌ها در آب و خاک به شمار می‌آیند؛ بنابراین، افزایش تحمل شوری ارقام انگور کشت‌شده (دست‌کم از طریق کاربرد ترکیبات محافظت‌کننده‌های بیرونی) به‌منظور داشتن تولید پایدار بیش‌ازپیش ضروری به نظر می‌رسد. پژوهشی دربارهٔ تأثیر تیمارهای اکسیدنیتریک در گیاه انگور قرارگرفته در معرض تنش شوری انجام نشده است؛ ازاین‌رو، هدف بررسی حاضر مطالعهٔ سازوکارهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اثر اکسیدنیتریک در تخفیف تنش شوری بود که روی بوته‌های انگور رقم بی‌دانهٔ سفید در شرایط گلخانه ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به‌شکل آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایهٔ کاملاً تصادفی اجرا شد. تنش شوری در چهار سطح (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم) و اکسیدنیتریک در دو سطح (صفر و ۱۰۰ میکرومولار) در سه تکرار اعمال شد. پس‌از تهیهٔ قلمه‌های یک‌سالهٔ انگور در اواسط فصل زمستان (۲۴ بهمن ۱۳۹۵) از باغ تحقیقاتی شمارهٔ ۱ پژوهشکدهٔ انگور و کشمش دانشگاه ملایر، قلمه‌ها به گلخانهٔ آموزشی- تحقیقاتی دانشگاه منتقل شدند. پس‌از ضدعفونی‌کردن قلمه‌ها با بنومیل (۱/۵ درصد وزنی)، قلمه‌ها به‌منظور تسهیل‌کردن ریشه‌زایی با هورمون ایندول ۳- بوتیریک‌اسید (IBA) ۱۰۰۰ میلی‌گرم‌برلیتر به‌مدت ۵ ثانیه تیمار شدند. قلمه‌ها پس‌از ریشه‌دارشدن (در ماسهٔ مرطوب) به گلدان‌های ۱۰ لیتری با ترکیب کوکوپیت و پرلیت (۱:۱) منتقل شدند. پس‌از رسیدن گیاهان به مرحلهٔ ۱۰ برگی، تیمارهای شوری همراه با آب آبیاری اعمال و گلدان‌ها دو بار در هفته با محلول غذایی هوگلند حاوی غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم) شوری آبیاری شدند؛ هم‌زمان با اعمال تیمار شوری، تیمار اکسیدنیتریک (در دو سطح صفر و ۱۰۰ میکرومولار سدیم‌نیتروپروساید به‌عنوان ترکیب رهاکنندهٔ اکسیدنیتریک) به‌شکل محلول‌پاشی برگی طی نخستین هفته از اعمال تنش شوری و در دو مرحله به فاصلهٔ ۳ روز انجام شد. پس‌از گذشت شش هفته از آغاز تیمار شوری، نمونه‌های برگی برداشت (Minazadeh *et al*., 2018) و برای سنجش شاخص‌های فیزیولوژیکی به آزمایشگاه تحقیقاتی علوم باغبانی دانشگاه ملایر منتقل شدند.

به‌منظور اندازه‌گیری غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی ازجمله کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید، ۰/۱۲۵ گرم بافت برگ تازه با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده شد تا به‌شکل توده‌ای یکنواخت درآمد؛ این عمل در نور کم و محیط خنک انجام شد. عصارهٔ حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ (مدل R 320 Universal، شرکت Hettich، آلمان) شد؛ سپس محلول رویی برداشته و جذب نوری آن در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر (حداکثر جذب نوری کلروفیل a)، ۶۴۵ نانومتر (حداکثر جذب نوری کلروفیل b) و ۴۷۰ نانومتر (حداکثر جذب نوری کاروتنوئید) با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Spekol 2000، شرکت Analytic Jena، آلمان) و با استفاده از استون ۸۰ درصد (شاهد) خوانده شد. غلظت هریک از رنگیزه‌ها در عصاره بر حسب میلی‌گرم‌درلیتر محاسبه شد (Lichtenthaler, 1987):

رابطهٔ ۱ $Chl_a\ (mg/L)=(12.7\times A_{663})-(2.69\times A_{645})$

رابطهٔ ۲ $Chl_b\ (mg/L)=(25.8\times A_{645})-(4.68\times A_{663})$

رابطهٔ ۳ $Chl_{total}\ (mg/L)=(20.21\times A_{645})+(8.02\times A_{663})$

رابطهٔ ۴ $Car\ (mg/L)=[(1000\times A_{470}-2.27\times Chl_a-81.4Chl_b)/227]$

به‌منظور استخراج پرولین، ابتدا ۰/۵ گرم از بافت منجمدشدهٔ برگ با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد در هاون چینی ساییده و بخش بالایی محلول جدا شد. عمل استخراج یک بار دیگر با افزودن ۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوبات قبلی تکرار شد. عصارهٔ استخراج شده به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد. برای اندازه‌گیری پرولین هر نمونه، ۱ میلی‌لیتر عصاره با ۹ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و به آن، ۵ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین (شامل ۰/۱۲۵ گرم نین‌هیدرین+۲ میلی‌لیتر فسفریک‌اسید ۶ مولار+۳ میلی‌لیتر استیک‌اسید گلایسیال) به همراه ۵ میلی‌لیتر استیک‌اسید گلایسیال اضافه شد و پس‌از تکان دادن جزئی، نمونه به‌مدت ۴۵ دقیقه درون حمام بخار (مدل WNB14، شرکت Memmert، آلمان) با دمای ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. پس‌از خنک‌کردن نمونه‌ها در آب یخ، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر نمونه اضافه و کاملاً تکان داده شد تا پرولین وارد فاز تولوئن شود. پس‌از نیم ساعت، میزان جذب فاز تولوئن هر نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۵ نانومتر تعیین شد (Bates *et al.*, 1973). غلظت پرولین بر اساس منحنی استاندارد پرولین خالص تعیین و بر حسب میکرومول‌درگرم وزن تر برگ بیان شد.

استخراج قندهای محلول مشابه با استخراج پرولین انجام شد. به‌منظور اندازه‌گیری قندهای محلول، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصارهٔ الکلی به‌دست‌آمده با ۳ میلی‌لیتر آنترون تازه‌تهیه‌شده (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون+۱۰۰ میلی‌لیتر سولفوریک‌اسید ۷۲ درصد) مخلوط شد. برای شروع واکنش رنگ‌گیری، لوله‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبگرم ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس‌از سردشدن لوله‌ها، میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده

شد (Irigoyen *et al*., 1992). غلظت قندهای محلول بر اساس منحنی استاندارد گلوکز تعیین و بر حسب میلی‌گرم‌درگرم وزن تر بیان شد.

به‌منظور سنجش محتوای پروتئین‌های محلول، ۰/۵گرم بافت تازهٔ برگ با ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (تریس با غلظت ۱ میلی مولار و اسیدیتهٔ ۷) درون هاون چینی کاملاً له شد و این مخلوط به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفوژ شد؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول شفاف رویی با ۵ میلی‌لیتر معرف بیورد [(۱۰ درصد استیک‌اسید گلایسیال+۲۵ درصد اتانول+۶۵ درصد آب مقطر+۰/۱ درصد (حجم/وزن) محلول کوماسی بریلیانت بلوجی ۲۵۰)] مخلوط و جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1979). غلظت پروتئین‌های محلول با استفاده از منحنی استاندارد تهیه‌شده بر اساس غلظت‌های مختلف آلبومین گاوی بر حسب میلی‌گرم‌درگرم وزن تر محاسبه شد.

به‌منظور اندازه‌گیری محتوای فنول کل موجود در برگ‌ها، ابتدا ۰/۵ گرم نمونهٔ تازهٔ برگ به‌طور کامل در ۴ میلی‌لیتر اتانول کوبیده شد تا محلولی همگن حاصل شد و پس‌از ۲۰ دقیقه سانتریفوژ در ۹۵۰۰ دوردردقیقه، محلول شفاف رویی جدا شد. میزان ۳۰۰ میکرولیتر عصاره با ۱۲۰۰ میکرولیتر کربنات‌سدیم ۷ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر فولین ۱۰ درصد مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در محل تاریک قرار داده شد. پس‌از طی‌شدن مدت زمان یادشده، میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده و میزان فنول با استفاده از نمودار استاندارد گالیک‌اسید بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید بر وزن تر تعیین شد (Velioglu, *et al*., 1998).

به‌منظور سنجش میزان فلاونوئید کل از روش رنگ‌سنجی کلریدآلومینیوم استفاده شد (Chang *et al*., 2002)؛ در این روش، ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد درون لوله‌های آزمایش ریخته شد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم ۱ مولار به لوله‌ها اضافه و با محتویات آنها مخلوط شد، سپس ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه شد و در مرحلهٔ آخر، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره متانولی برگ به مخلوط یادشده اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفتند و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. مقدار فلاونوئید کل برای هرکدام از عصاره‌ها بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر محاسبه شد.

به‌منظور اندازه‌گیری محتوای آب نسبی برگ، ابتدا قطعه‌های برگ به شعاع ۱ سانتی‌متر تهیه و وزن تر آنها تعیین شد. پس‌از قرارگیری قطعه‌های برگ درون آب مقطر (۲۴ ساعت در یخچال)، وزن آماس برگ‌ها تعیین شد. به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک، قطعه‌های برگ به‌مدت ۲۴ ساعت در آون (مدل ۳۵ لیتری هوشمند، شرکت شیماز، ایران) با دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک و سپس وزن شدند. محتوای آب نسبی بر حسب درصد از رابطهٔ ۵ به دست آمد (Ritchie *et al*., 1990):

رابطهٔ ۵ ۱۰۰ × (وزن خشک – وزن آماس) / (وزن خشک – وزن تر)= محتوای آب نسبی (درصد)

به‌منظور اندازه‌گیری نشت‌یونی، نمونه‌های برگ (به‌اندازهٔ دایره‌ای با شعاع ۱ سانتی‌متر) در قوطی‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور و به‌مدت ۲۰ ساعت روی دستگاه شیکر (مدل KS260 digital، شرکت IKA، آلمان) با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. پس‌از این مدت، هدایت الکتریکی محلول حاوی نمونه‌ها با دستگاه هدایت‌سنج (مدل Cond 720، شرکت WTW، آلمان) خوانده شد (هدایت الکتریکی اولیه). قوطی‌های حاوی قطعه‌های برگ به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد اتوکلاو (مدل ۷۵ لیتری، شرکت ریحان طب، ایران) شدند؛ پس از سردشدن تدریجی، هدایت الکتریکی آنها دوباره خوانده (هدایت الکتریکی ثانویه) و درنهایت، درصد نشت‌یونی از رابطهٔ۶ محاسبه شد (Sairam and Tyagi, 2004).

رابطهٔ ۶

۱۰۰× (هدایت الکتریکی ثانویه / هدایت الکتریکی اولیه) = درصد نشت‌یونی

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ابتدا عصارهٔ آنزیمی تهیه شد؛ به‌این‌ترتیب که ابتدا بافت منجمدشدهٔ برگ در حضور ازت مایع در هاون چینی آسیاب شد و مقدار ۰/۱ گرم از آن به تیوب پلاستیکی حاوی ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه و هم زده شد. نمونه از صافی عبور داده شد و عصارهٔ تهیه‌شده به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دوردردقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محلول شفاف رویی به‌آرامی جدا شد؛ محلول حاصل برای اندازه‌گیری فعالیت هریک از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به شرح زیر استفاده شد:

به‌منظور تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، ابتدا مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصارهٔ گیاهی با ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیتهٔ ۷) و ۲ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌ترا استیک‌اسید آمیخته و واکنش آنزیم کاتالاز با اضافه‌کردن ۵ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۳۰ درصد به این مخلوط آغاز شد. تغییرات جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت ۱ دقیقه ثبت شد. هر واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز، مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب کاهش ۱ میکرومول پراکسیدهیدروژن در دقیقه می‌شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد در میلی‌گرم پروتئین برگ بیان شد (Bergmeyer, 1970).

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز، ابتدا مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصارهٔ گیاهی با ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج حاوی فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیتهٔ ۷) و ۲ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید آمیخته و واکنش آنزیم گایاکول‌پراکسیداز با اضافه‌کردن ۵ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۳۰ درصد و مقدار ۵ میکرولیتر مادهٔ گایاکول به این مخلوط آغاز شد. ثبت تغییرات جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۶۵ نانومتر که بیان‌کنندهٔ میزان تخریب و کاهش غلظت پراکسیدهیدروژن است به‌مدت ۱ دقیقه انجام شد. هر واحد از فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز، مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب کاهش ۱ میکرومول پراکسیدهیدروژن در هر دقیقه می‌شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد در میلی‌گرم

پروتئین برگ بیان شد (Herzog and Fahimi, 1973).

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز، ابتدا مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصارهٔ گیاهی با ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج حاوی فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیتهٔ ۷)، ۲ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید، پلی‌وینیل‌پیرولیدین-۴۰ ۱ درصد (وزن به حجم)، تریتون-۱۰۰ ۰/۱ (حجم به حجم) و آسکوربات ۱ میلی‌مولار آمیخته شد. واکنش آنزیم کاتالاز با اضافه‌کردن ۴/۵ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۳۰ درصد به مخلوط یادشده آغاز شد. تغییرات جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر که بیان‌کنندهٔ میزان اکسیداسیون و کاهش غلظت آسکوربات است به‌مدت ۱ دقیقه ثبت شد. هر واحد فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز، مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب اکسیده‌شدن ۱ میکرومول آسکوربات در هر دقیقه می‌شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد در میلی‌گرم پروتئین برگ بیان شد (Nakano and Asada, 1981).

به‌منظور استخراج و اندازه‌گیری غلظت عناصر، نمونه‌های برگی سالم از برگ‌های میانی شاخه‌ها جمع‌آوری و در آزمایشگاه با آب مقطر شستشو شدند. نمونه‌های برگ به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۵ درجهٔ سانتی‌گراد خشک و سپس آسیاب شدند. پس‌از تهیهٔ عصاره به روش هضم تر با استفاده از نیتریک‌اسید غلیظ (۶۵ درصد)، غلظت عناصر پتاسیم و سدیم به روش نشر شعله‌ای و با دستگاه فلیم فتومتر (مدل 405 G، شرکت Crouse، آلمان) و غلظت عناصر منیزیم و کلسیم با دستگاه جذب اتمی (مدل AANALYST70، شرکت Perkin Elmer، آمریکا) اندازه‌گیری شد. غلظت یون نیترات با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Spekol 2000، شرکت Analytic Jena، آلمان) و با استفاده از ۰/۵ گرم پودر مخلوطی شامل ۳۷ گرم سیتریک‌اسید، ۵ گرم سولفات‌منگنز مونوهیدرات، ۲ گرم سولفانیل‌آمید، ۱ گرم ان-۱- نفتیل اتیل دی آمین دی هیدروکلراید و ۱ گرم پودر روی به‌عنوان شناساگر که به عصاره اضافه شد، اندازه‌گیری شد (Abdel-Shafey *et al.*, 1994). به‌منظور اندازه‌گیری کلر، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی پودرشده درون لولهٔ فالکون ریخته شد و عصاره‌گیری پس‌از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک‌اسید ۰/۵ مولار و قراردهی آن به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک‌کن انجام شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از عصاره برای خواندن کلر طبق روش رنگ‌سنجی در طول موج ۴۸۰ نانومتر با دستگاه اپوچ (مدل USA، LMS-1003) استفاده شد (Munns *et al.*, 2010).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخهٔ ۹/۱ انجام و برای مقایسهٔ میانگین داده‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($P\leq0.01$) استفاده شد. پیش‌از انجام تجزیه‌وتحلیل آماری، آزمون نرمالیته برای همهٔ داده‌ها انجام شد.

نتایج و بحث

اثر شوری و اکسیدنیتریک بر رنگیزه‌های برگ انگور: در هر دو سطح اکسیدنیتریک، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید با افزایش غلظت کلریدسدیم کاهش یافت (جدول ۱). نتایج نشان دادند تنش شوری باعث کاهش غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل برگ

انگور می‌شود؛ به‌طوری‌که این اثر به غلظت وابسته است و غلظت این رنگیزهٔ فتوسنتزی در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به حداقل می‌رسد (جدول ۱). با افزایش شوری، از میزان کلروفیل کل نیز کاسته شد و شیب کاهش آن در تیمار صفر میکرومولار اکسیدنیتریک بیشتر از ۱۰۰ میکرومولار بود (جدول ۱)؛ این یافته با گزارش‌های پیشین دربارهٔ اثر شوری بر محتوای کلروفیل انگور مطابقت دارد (Ahmed *et al*., 2015; Doulati Baneh, 2016; Azizi *et al*., 2017). کاهش کلروفیل در شرایط تنش شوری از تخریب کلروپلاست، تغییر نسبت لیپید به پروتئین، افزایش فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز و روبیسکو ناشی می‌شود. اثر سمیت برخی یون‌ها در شرایط تنش شوری مانع فعالیت آنزیمی و سنتز کلروفیل در سلول می‌شود (Cuin and Shabala, 2007)؛ به عبارتی، اختلال ضمنی در جذب عناصر دخیل در ساختار کلروفیل مانند منیزیم و آهن یکی از دلایل کاهش کلروفیل در برگ بوته‌های در معرض تنش شوری است (Munns and Tester, 2008) که این نقصان با کاربرد خارجی اکسیدنیتریک رفع می‌شود. در مطالعهٔ حاضر، کاربرد اکسیدنیتریک باعث پایداری بیشتر کلروفیل در برگ بوته‌های انگور در معرض تنش شوری شد که گویای نقش این ترکیب در راه‌اندازی مسیرهای متابولیکی است و نشان می‌دهد این ترکیب با تأثیر بر سیستم فتوسنتزی گیاه موجب تداوم فعالیت فیزیولوژیکی کلروفیل و پایداری گیاه می‌شود (García López-Carrión *et al*., 2008).

جدول ۱- مقایسهٔ میانگین اثر ترکیبی تیمارهای شوری و اکسیدنیتریک بر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید برگ انگور بی‌دانهٔ سفید

اکسیدنیتریک	شوری	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
		میلی‌گرم‌برگرم وزن تر			
۰	۰	۱/۶۱۸^{a}	۰/۶۳۶^{a}	۲/۵۵۱^{a}	۰/۹۵۳^{b}
۰	۲۵	۱/۵۱۶^{b}	۰/۶۳۰^{a}	۲/۴۱۳^{b}	۰/۷۸۰^{cd}
۰	۵۰	۱/۴۲۶^{c}	۰/۵۵۵^{b}	۲/۲۵۰^{c}	۰/۶۹۰^{d}
۰	۱۰۰	۱/۱۵۶^{d}	۰/۴۴۶^{d}	۱/۸۰۵^{e}	۰/۵۶۰^{f}
۱۰۰	۰	۱/۷۰۸^{a}	۰/۶۴۶^{a}	۲/۵۹۱^{a}	۱/۰۳۱^{a}
۱۰۰	۲۵	۱/۵۶۶^{b}	۰/۶۴۰^{a}	۲/۵۱۳^{b}	۰/۸۱۰^{c}
۱۰۰	۵۰	۱/۴۷۷^{c}	۰/۵۷۵^{b}	۲/۳۵۰^{c}	۰/۷۲۳^{d}
۱۰۰	۱۰۰	۱/۲۵۶^{d}	۰/۴۹۶^{c}	۲/۰۷۵^{d}	۰/۶۱۱^{e}

*حرف‌های یکسان عدم اختلاف معنادار در سطح احتمال $P<0.05$ را نشان می‌دهند.

بیشترین میزان کاروتنوئید (۱/۰۳۱ میلی‌گرم‌برگرم وزن تر) در برگ انگور بی‌دانهٔ سفید تیمارشده با صفر میکرومولار اکسیدنیتریک بدون تنش شوری مشاهده شد (جدول ۱). میزان این ترکیب با افزایش شوری کاهش یافت و در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم بدون تیمار

اکسیدنیتریک به کمترین مقدار خود (۰/۵۶۰ میلی‌گرم‌برگرم وزن تر) رسید که گویای اثر منفی و معنادار سدیم بر این ترکیب است. کاروتنوئیدها یکی از رنگیزه‌های فتوسنتزی‌اند که میزان آنها تحت‌تأثیر تنش شوری به‌شدت و به‌طور معنادار کاهش می‌یابد (Parida and Das, 2005; Alavi Matin *et al*., 2016). مقایسهٔ دو سطح تیمار اکسیدنیتریک نشان داد این ماده بر میزان کاروتنوئید اثر معناداری دارد و موجب افزایش این ترکیب در همهٔ سطوح شوری می‌شود (جدول ۱). بیشترین اثر اکسیدنیتریک بر میزان کاروتنوئید (افزایش ۲۱ درصدی) در شوری ۲۵ میلی‌مولار کلریدسدیم (۰/۸۱۰ میلی‌گرم‌برگرم وزن‌تر) مشاهده شد؛ نقش تعدیل‌کنندگی اکسیدنیتریک با افزایش شوری کم‌رنگ‌تر شد و در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم، مقدار کاروتنوئید به کمترین مقدار خود (۰/۶۱۱ میلی‌گرم‌برگرم وزن تر) رسید.

اثر شوری و اکسیدنیتریک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی برگ انگور

پرولین: نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (جدول ۲) نشان دادند در سطح صفر میکرومولار اکسیدنیتریک، میزان پرولین برگ با افزایش غلظت کلریدسدیم افزایش می‌یابد و در سطح ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک، میزان پرولین برگ با افزایش غلظت نمک تا ۵۰ میکرومولار افزایش می‌یابد و در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم کاهش نشان می‌دهد. بیشترین میزان پرولین برگ (۲۲/۹۰ میکرومول‌برگرم وزن تر) در تیمار صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و کمترین میزان پرولین برگ (۱۰/۶۱ میکرومول‌برگرم وزن تر) در تیمار صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شد (البته اختلاف معناداری با مقدار پرولین برگ بوته‌های تیمارشده با ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک در ترکیب با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم نداشت) (جدول ۲). پژوهش‌ها نشان می‌دهند اعمال تنش شوری در توت‌فرنگی (Turhan and Eris, 2004)، انگور (Fozouni *et al*., 2012; Doulati Baneh *et al*., 2013) و گوجه‌فرنگی (Zarei *et al*., 2018) نیز محتوای پرولین را در برگ نهال‌ها افزایش می‌دهد که تأییدی بر نتایج مطالعهٔ حاضر است. افزایش غلظت پرولین ممکن است به‌علت وجود پیش‌مادهٔ مشترک با کلروفیل (گلوتامین) باشد؛ درنتیجه، طی شرایط تنش و به‌علت ساخت پرولین برای تعدیل اثر اسمزی شوری، میزان کلروفیل کمتری ساخته می‌شود (Fozouni *et al*., 2012). مشاهده شده است کاربرد برگی اکسیدنیتریک در دانهال‌های برنج در معرض تنش شوری باعث افزایش معنادار غلظت پرولین برگ دانهال‌ها می‌شود که با افزایش رونویسی ژن کلیدی بیوسنتز پرولین یعنی دلتا پیرولین ۵ کربوکسیلات سنتاز همراه است (Uchida *et al*., 2002). پرولین داخل سلول که طی تنش انباشته شده است، امکان تحمل به تنش را فراهم می‌کند و به‌شکل نیتروژن آلی طی دوران بهبود از تنش ذخیره می‌شود (Strizhov *et al*., 1997;Fozouni *et al*., 2012).

جدول ۲- مقایسهٔ میانگین اثر ترکیبی تیمارهای شوری و اکسیدنیتریک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی برگ انگور بی‌دانهٔ سفید

اکسیدنیتریک	شوری	پرولین	قند محلول کل	پروتئین محلول کل	فنل کل	فلاونوئید
		میکرومول‌برگرم وزن تر	میلی‌گرم‌برگرم وزن تر	میلی‌گرم‌برگرم وزن تر	میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن تر	میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر
۰	۰	۱۰/۶۱^{e}	۱۷/۳۶^{c}	۳/۱۳^{c}	۱۶/۲۵^{g}	۰/۶۳^{c}
۰	۲۵	۱۵/۵۳^{d}	۱۷/۹۱^{c}	۳/۹۶^{b}	۱۹/۱۷^{e}	۰/۶۱^{c}
۰	۵۰	۱۸/۰۰^{c}	۲۰/۶۲^{bc}	۳/۴۶^{bc}	۲۳/۱۴^{d}	۱/۲۹^{b}
	۱۰۰	۲۱/۳۰^{b}	۲۴/۶۱^{ab}	۲/۲۳^{d}	۲۵/۱۰^{c}	۱/۱۴^{b}
۱۰۰	۰	۱۱/۲۳^{e}	۱۸/۴۱^{c}	۳/۹۶^{b}	۱۷/۶۵^{f}	۰/۵۲^{d}
۱۰۰	۲۵	۱۶/۰۳^{d}	۲۲/۶۶^{abc}	۵/۲۰^{a}	۲۲/۷۳^{d}	۱/۱۱^{b}
۱۰۰	۵۰	۲۰/۶۰^{b}	۲۵/۷۰^{ab}	۵/۱۰^{a}	۲۶/۹۲^{b}	۱/۱۳^{b}
۱۰۰	۱۰۰	۲۲/۹۰^{a}	۲۸/۱۴^{a}	۵/۱۶^{a}	۲۸/۷۱^{a}	۱/۵۳^{a}

*حرف‌های یکسان عدم اختلاف معنادار در سطح احتمال $P<0.05$ را نشان می‌دهند.

قند محلول کل: نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (جدول ۲) نشان دادند در سطح صفر میکرومولار اکسیدنیتریک، میزان قند محلول کل برگ با افزایش غلظت نمک افزایش می‌یابد؛ از سویی در سطح ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک، میزان قند محلول کل برگ با افزایش غلظت نمک تا سطح ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به بیشترین مقدار (۲۸/۱۴ میلی‌گرم‌برگرم وزن تر) می‌رسد (جدول ۲). در بررسی تحمل شوری چهار رقم انگور یاقوتی، عسگری، رشه و سرقوله مشخص شده است تجمع قندهای محلول در برگ با افزایش شوری افزایش می‌یابد و رابطهٔ مستقیمی بین تحمل شوری و میزان تجمع قند محلول کل مشاهده می‌شود (Doulati Baneh *et al.*, 2013). همچنین در بررسی تغییرات عناصر غذایی، ویژگی‌های رشدی و فیزیولوژیکی چند رقم و دورگهٔ بین‌گونه‌ای انگور مشاهده شده است میزان رشد، وزن خشک ریشه و ساقه و محتوای نسبی آب با افزایش تنش شوری ناشی از کلریدسدیم کاهش ولی میزان پرولین و قندهای محلول افزایش می‌یابد (Doulati Baneh, 2016). بیوسنتز و تجمع محلول‌های سازگاری ازجمله قندها یکی از واکنش‌های تنظیمی مهم گیاهان در پاسخ به تنش شوری است (Gupta and Huang, 2014). به‌این‌ترتیب که گیاه محلول‌های سازگار ازجمله قندهای محلول را در واکوئل و سیتوپلاسم انباشته می‌کند تا با حفاظت و تعدیل اسمزی بتواند ادامهٔ جذب آب، ذخیرهٔ کربن و نیتروژن و پالایندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن را انجام دهد؛ اما این امر با افزایش شوری و آثار تخریبی آن متوقف و گیاه متحمل آسیب‌های جبران‌ناپذیر می‌شود (Sivritepe and Eriş, 1999; Parida and Das, 2005).

پروتئین محلول کل: نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (جدول ۲) نشان دادند در سطح صفر میکرومولار اکسیدنیتریک، میزان پروتئین برگ با افزایش غلظت نمک تا سطح ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم افزایش و در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم کاهش می‌یابد. کمترین میزان پروتئین برگ (۲/۲۳ میلی‌گرم‌برگرم وزن تر) در تیمار صفر میکرومولار

اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شد. در سطح ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک، میزان پروتئین برگ با افزایش غلظت نمک افزایش یافت؛ هرچند تفاوت معناداری بین سطوح بالای نمک ازنظر میزان پروتئین برگ وجود نداشت. محتوای پروتئین‌های محلول یکی از شاخص‌های مهم نشان‌دهندهٔ وضعیت فیزیولوژیکی در سلول‌های گیاهی است. در مطالعهٔ حاضر، محتوای پروتئین‌های محلول پس‌از اعمال تنش شوری افزایش یافت؛ این افزایش یکی از معمول‌ترین تغییرات بیوشیمیایی است که باعث محافظت گیاه در برابر آسیب‌های کشندهٔ آب‌کشیدگی می‌شود (Koç *et al*., 2010). پروتئین محلول همانند پرولین ازجمله محلول‌های سازگاریست و از عوامل ارتقای مقاومت گیاه در برابر تنش شوری محسوب می‌شود؛ بنابراین با افزایش شوری، گیاه از طریق تولید پروتئین محلول تا حدی بر شرایط تنش فائق می‌آید. محتوای پروتئین‌های محلول برگ در انگورهای تیمارشده با اکسیدنیتریک ۱۰۰ میکرومولار به همراه سطوح شوری ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار (بدون اختلاف معنادار باهم) در مقایسه با بوته‌های محلول‌پاشی‌شده با اکسیدنیتریک ۱۰۰ میکرومولار بدون شوری به‌طور معناداری افزایش داشت (جدول ۲). در مطالعهٔ Uchida و همکاران (۲۰۰۲) روی دانهال‌های برنج، کاربرد اکسیدنیتریک باعث بیان بیشتر ژن پروتئین‌های مرتبط با تنش ازجمله پروتئین‌های شوک حرارتی شد. در مطالعهٔ یادشده، سازگاری به تنش شوری با تولید کمتر پراکسیدهیدروژن درون‌زاد در دانهال‌های تیمارشده با اکسیدنیتریک همراه بود که تأییدی بر یافته‌های مطالعهٔ حاضر است.

فنول کل: نتایج نشان دادند (جدول ۲) میزان فنول کل برگ با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح صفر و ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک افزایش می‌یابد. بیشترین (۲۸/۷۱ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن تر) و کمترین (۱۶/۲۵ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن تر) میزان فنول کل به‌ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و شاهد (صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم) مشاهده شد. کاربرد برگی اکسیدنیتریک ۱۰۰ میکرومولار به‌طور چشمگیری محتوای فنول کل را در انگورهای تیمارشده افزایش داد؛ به‌طوری‌که میزان فنول کل در مقایسه با انگورهای تیمارنشده (صفر میکرومولار اکسیدنیتریک) حدود ۴۰ درصد افزایش داشت (جدول ۲).

در مطالعهٔ حاضر، کاربرد اکسیدنیتریک به تجمع فنول کل بیشتر در شرایط تنش شوری نسبت به انگورهای تیمارنشده منجر شد. افزایش ترکیبات فنولی در این انگورها نوعی سازوکار سازگاریست که برای غلبه بر تنش اکسایشی ناشی از شوری عمل می‌کند. کاربرد برگی اکسیدنیتریک در انگور، تحمل به تنش سرما را از طریق افزایش ترکیبات فنولی افزایش می‌دهد (Siddiqui *et al*., 2010) که گویای دخالت این ماده در مسیرهای ساخت ترکیبات فنولی به‌ویژه در گیاهان در معرض تنش است. در پژوهش Peng و Zhou (۲۰۰۹) نیز ترکیبات فنولی موجب

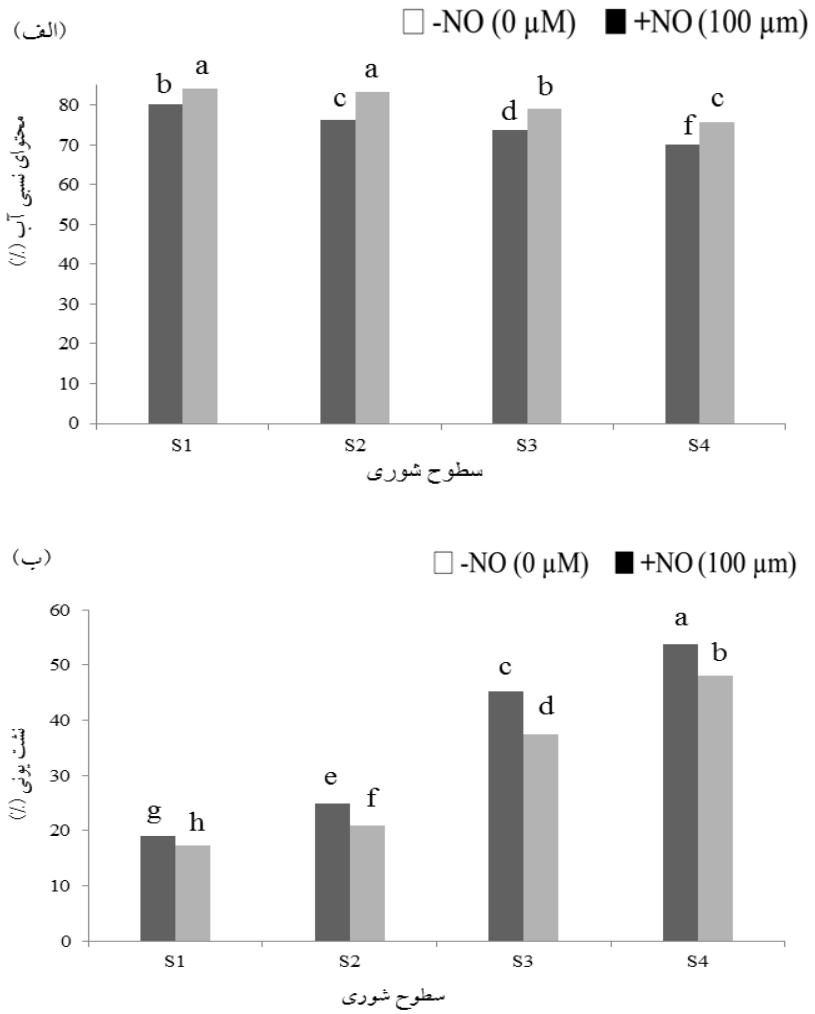
افزایش توانایی گیاه سویا در جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد طی شرایط تنش شدند.

فلاونوئید کل: نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (جدول ۲) نشان دادند با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح اکسیدنیتریک، میزان فلاونوئید از نظم خاصی پیروی نمی‌کند و بیشترین میزان فلاونوئید برگ (۱/۵۳ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) در تیمار ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و کمترین میزان فلاونوئید (۰/۵۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) در تیمار ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده می‌شود. اهمیت فلاونوئیدها به‌علت نقشی است که در سیستم‌های دفاع غیرآنزیمی دارند (Apel and Hirt, 2004). عوامل محیطی تأثیر بسزایی در فعالیت فلاونوئیدها دارند و هنگامی که گیاه وجود تنش را احساس کند، سیستم دفاعی گیاه ازجمله فلاونوئیدها برای مقابله با تنش فعال می‌شوند و افزایش می‌یابند (Munns and Tester, 2008).

محتوای نسبی آب: نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (شکل ۱، الف) نشان دادند محتوای نسبی آب برگ با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح اکسیدنیتریک کاهش می‌یابد و کمترین محتوای نسبی آب (۶۹/۹۸ درصد) در تیمار ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و بیشترین محتوای نسبی آب (۸۳/۹۹ درصد) در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم و ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۲۵ میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده می‌شود. نتایج حاضر با پژوهش‌های انجام‌شده در زمینهٔ انگور (Azizi *et al*., 2017) و پسته (Ranjbar *et al*., 2017) در شرایط تنش شوری مطابقت دارند؛ البته محتوای نسبی آب در تاک‌های تیمارشده با اکسیدنیتریک در سطح بالاتری حفظ می‌شود. شوری موجب کاهش پتانسیل آب بستر کشت می‌شود، میزان جذب آب توسط ریشه‌های انگور را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و درنهایت موجب کاهش محتوای نسبی آب می‌شود. یکی از نقش‌های احتمالی اکسیدنیتریک، القای بسته‌شدن روزنه‌هاست که با کنترل آبسیزیک‌اسید انجام می‌شود (Neill *et al*., 2003)؛ بسته‌شدن روزنه‌هاباعث حفظ محتوای آب بیشتر در شرایط تنش شوری می‌شود.

نشت یونی: نتایج نشان دادند (شکل ۱، ب) میزان نشت یونی برگ با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح اکسیدنیتریک افزایش می‌یابد و بیشترین میزان نشت یونی برگ (۵۳/۸۰ درصد) در تیمار صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و کمترین میزان نشت یونی برگ (۱۷/۲۵ درصد) در تیمار ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده می‌شود. پژوهش‌ها نشان می‌دهند در بوته‌های توت‌فرنگی (Turhan and Eris, 2004) و انگور (Ahmed *et al*., 2015; Bybordi, 2012) نیز نشت یونی با افزایش شوری افزایش می‌یابد. افزایش نشت یونی طی تنش شوری از تنش اکسایشی ناشی و به ایجاد تغییرات در نفوذپذیری انتخابی غشاهای زیستی، نشت مواد از غشا و تغییر فعالیت آنزیم‌های متصل به غشا منجر می‌شود؛ بنابراین، اندازه‌گیری نشت یونی شاخصی از اندازه‌گیری میزان آسیب اکسایشی واردشده به غشا

و سلول است (Campos *et al*., 2003; Karimi, 2017). شکل ۱، ب نشان می‌دهد با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح اکسیدنیتریک، میزان نشت یونی برگ افزایش می‌یابد. بیشترین میزان نشت یونی برگ در تیمار صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و کمترین میزان نشت یونی برگ در تیمار ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شد (شکل ۱، ب). هم‌راستا با مطالعهٔ حاضر، پژوهش‌ها نشان می‌دهند کاربرد سدیم‌نیتروپروساید (دهندهٔ اکسیدنیتریک) به کاهش نشت یونی برگ در گیاه جو (Li *et al*., 2008) و خردل (Khan *et al*., 2012) طی تنش شوری منجر می‌شود. افزایش پایداری غشا و ممانعت از تنش اکسایشی ناشی از نمک بر غشا علت کاهش نشت یونی با مصرف اکسیدنیتریک است. ظرفیت گیاهان برای حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکی از سازوکارهای مهم گیاهان برای پایداری غشا، حفظ فعالیت فیزیولوژیکی آن و درنتیجه دوام در شرایط شوری است (Khan *et al*., 2012).



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف (صفر و ۱۰۰ میکرومولار) اکسیدنیتریک بر محتوای نسبی آب (الف) و نشت یونی (ب) برگ انگور بی‌دانهٔ سفید در شرایط تنش شوری (S_1. کلریدسدیم صفر میلی‌مولار، S_2. کلریدسدیم ۲۵ میلی‌مولار، S_3. کلریدسدیم ۵۰ میلی‌مولار، S_4. کلریدسدیم ۱۰۰ میلی‌مولار). میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک در هر نمودار اختلاف معناداری (در سطح ۵ دصد) باهم ندارند.

اثر شوری و اکسیدنیتریک بر میزان برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

کاتالاز: نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (جدول ۳) نشان دادند در سطح صفر میکرومولار اکسید نیتریک، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ با افزایش غلظت نمک تا ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم افزایش می‌یابد و در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم کاهش نشان می‌دهد. در سطح ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک مشاهده شد میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش غلظت نمک افزایش می‌یابد. بیشترین (۸/۳۶ واحد در میلی‌گرم پروتئین) و کمترین (۲/۱۲ واحد در میلی‌گرم پروتئین) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به‌ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و تیمار شاهد (صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم) مشاهده شد.

گایاکول‌پراکسیداز: نتایج نشان دادند (جدول ۳) میزان فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز برگ با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح اکسیدنیتریک افزایش می‌یابد و بیشترین (۱۵/۲۳ واحد در میلی‌گرم پروتئین) و کمترین (۴/۳۱ واحد در میلی‌گرم پروتئین) میزان فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز به‌ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و تیمار شاهد (صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم) مشاهده می‌شود. این واکنش، پاسخ انطباقی و تنظیم محافظتی گیاه را در برابر تنش شوری نشان می‌دهد. فعالیت اندک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان‌دهندهٔ شرایط طبیعی محیط برای رشد گیاه است؛ بنابراین افزایش آنها در این جهت است که به‌شکل اسمولیت سازگاری و آنزیم ضدرادیکال‌های آزاد اکسیژن، ضمن محافظت از ماکرومولکول‌ها و غشاهای سلول، آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن را که در اثر ازدیاد یون سدیم به وجود آمده‌اند خنثی کنند (Gupta and Huang, 2014). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سازوکار حفاظت‌کنندهٔ دستگاه فتوسنتزی در رویارویی با تنش اکسایشی است (Bornman *et al*., 1997).

آسکوربات‌پراکسیداز: نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (جدول ۳) نشان دادند در سطح صفر میکرومولار اکسیدنیتریک، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز برگ با افزایش غلظت نمک تا سطح ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم افزایش و در سطح ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم کاهش می‌یابد. همنین مشاهده شد در سطح ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ با افزایش غلظت نمک افزایش می‌یابد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز برگ (۱۸/۳۷ واحد در میلی‌گرم پروتئین) در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز برگ (۵/۳۹ واحد در میلی‌گرم پروتئین) در تیمار شاهد (صفر

میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم) مشاهده شد. درحقیقت، روند تغییرات آسکوربات‌پراکسیداز با تیمارهای شوری و اکسیدنیتریک بسیار شبیه کاتالاز است؛ زیرا این ترکیب همانند کاتالاز یکی از آنتی‌اکسیدان‌های اصلی و مهم گیاهی محسوب می‌شود. این ترکیب نقش سیستم جاروب‌کنندهٔ رادیکال‌های آزاد را دارد و سلول‌های گیاهی آن را در شرایط تنش برای حفاظت در برابر آسیب‌های اکسیداتیو تولید می‌کنند.

نتایج پژوهش حاضر نشان دادند اکسیدنیتریک فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول‌پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز را در انگورهای در معرض تنش شوری به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد. در پژوهش Uchida و همکاران (۲۰۰۲) کاربرد اکسیدنیتریک در دانهال‌های برنج در معرض تنش شوری به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی منجر شد و این افزایش با کاهش تولید نشانگرهای تخریب غشا ازجمله تولید مالون‌دآلدئید، پراکسیداکسیژن و درنهایت نشت یونی کمتر همراه بود؛ یافته‌های یادشده با نتایج مطالعهٔ حاضر همخوانی دارند. تغییرات متابولیکی ایجادشده در اثر اکسیدنیتریک به تغییر سطوح رادیکال‌های آزاد اکسیژن منجر می‌شود و این تغییرات زمینه‌ساز القای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی است (Tanou *et al*., 2009). به نظر می‌رسد اکسیدنیتریک و گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن به‌ویژه پراکسیدهیدروژن در سیستم پیام‌رسانی سلولی دخالت دارند و به‌شکل پیام‌رسان ثانویه باعث القای دفاع آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش می‌شوند (Zheng *et al*., 2009).

پژوهش‌ها نشان می‌دهند کاربرد خارجی اکسیدنیتریک در جو (Li *et al*., 2008) و برنج (Uchida *et al*., 2002) باعث کاهش تولید پراکسیداکسیژن می‌شود که با نتایج مطالعهٔ حاضر مطابقت دارد. تجمع گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن در غشاها و ایجاد پراکسیداسیون لیپیدهای غشا یکی از آثار سوء تنش شوری است و همان‌طور که در نتایج مطالعهٔ حاضر مشخص شد میزان پراکسیدهیدروژن در بوته‌های انگور در معرض تنش شوری افزایش می‌یابد. در مطالعهٔ Abdelgawad و همکاران (۲۰۱۶) اعمال تیمار شوری از صفر تا ۱۴۰ میلی‌مولار کلریدسدیم ضمن ایجاد تنش اکسایشی در دانهال‌های ذرت به افزایش تدریجی غلظت پراکسیدهیدروژن در برگ گیاهان در معرض تنش منجر شد. فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ازجمله پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز یکی از نقش‌های مهم اکسیدنیتریک است (Uchida *et al*., 2002) که در مطالعهٔ حاضر اثبات شد. یافته‌ها نشان می‌دهند تجمع سدیم در بافت‌های گیاهان در معرض تنش شوری به افزایش شاخص‌های تنش اکسایشی ازجمله نشت یونی، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن منجر می‌شود (Abdelgawad *et al*., 2016) که با نتایج مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد.

جدول ۳- مقایسهٔ میانگین اثر ترکیبی تیمارهای شوری و اکسیدنیتریک بر میزان برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برگ انگور بی‌دانهٔ سفید

اکسیدنیتریک Nitric oxide	شوری	کاتالاز	گایاکول‌پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز
		واحد در میلی‌گرم پروتئین		
۰	۰	۲/۱۲^{f}	۴/۳۱^{g}	۵/۳۹^{f}
۰	۲۵	۳/۱۸^{e}	۸/۹۶^{e}	۹/۶۷^{de}
۰	۵۰	۴/۰۷^{d}	۱۱/۵۷^{d}	۱۲/۰۲^{c}
۰	۱۰۰	۳/۲۰^{e}	۱۲/۴۵^{c}	۱۰/۵۱^{d}
۱۰۰	۰	۳/۸۶^{d}	۶/۷۲^{f}	۸/۶۷^{e}
۱۰۰	۲۵	۵/۹۰^{c}	۸/۷۴^{e}	۱۵/۹۰^{b}
۱۰۰	۵۰	۷/۵۹^{b}	۱۴/۰۷^{b}	۱۸/۳۷^{a}
۱۰۰	۱۰۰	۸/۳۶^{a}	۱۵/۲۳^{a}	۱۸/۷۳^{a}

* حرف‌های یکسان عدم اختلاف معنادار در سطح احتمال $P<0.05$ را نشان می‌دهند.

محتوای عناصر غذایی در برگ: نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (جدول ۴) نشان دادند با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح اکسیدنیتریک، میزان نیترات برگ کاهش می‌یابد. بیشترین میزان نیترات برگ (۰/۰۶۹ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمار ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۲۵ میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شد (اختلاف معناداری با غلظت ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم نداشت) و کمترین میزان نیترات (۰/۰۳۶ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمار صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم دیده شد. نتایج نشان دادند شوری موجب کاهش غلظت نیترات برگ انگور بی‌دانهٔ سفید می‌شود و کمترین غلظت نیترات (۰/۰۳۶ و ۰/۰۴۵ درصد به‌ترتیب برای صفر و ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک) به شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم مربوط است (جدول ۴). علت این امر به رقابت یون کلر با نیترات موجود در محلول خاک برای جذب توسط ریشهٔ گیاه نسبت داده می‌شود؛ به‌این‌ترتیب که با افزایش شوری و غلظت یون کلر، گیاه برای جذب نیترات با مشکل روبه‌رو می‌شود و قادر نیست این یون را به میزان کافی و بهینه از خاک جذب کند. گسترش ریشه‌ها نیز با افزایش شوری کاهش می‌یابد و بنابراین، از میزان جذب آب و به‌تبع آن، جذب عناصر غذایی به‌ویژه عناصر پرمصرف به‌شدت کاسته می‌شود (Grattana and Grieve, 1999). در تاک‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف کلریدسدیم، غلظت نیترات برگ روند کاهشی نشان داد؛ ولی با کاربرد اکسیدنیتریک، غلظت این یون تا تیمار ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم افزایش و سپس در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم کاهش یافت و به حد غلظت نیترات برگ در تاک‌های تیمارشده با اکسیدنیتریک بدون تنش شوری رسید.

جدول ۴- مقایسهٔ میانگین اثر ترکیبی تیمارهای شوری و اکسیدنیتریک بر غلظت عناصر غذایی برگ انگور بی‌دانهٔ سفید

اکسیدنیتریک	شوری	نیترات	کلسیم	منیزیم	پتاسیم	سدیم	کلر
		(میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)					
۰	۰	۰/۰۵۰^{c}	۱/۸۴۰^{a}	۱/۹۴۳^{a}	۲/۱۰۲^{a}	۰/۵۴۰^{e}	۱/۱۴۰^{g}
۰	۲۵	۰/۰۴۸^{c}	۱/۵۵۰^{c}	۱/۴۷۳^{d}	۱/۸۱۳^{c}	۰/۶۳۶^{d}	۱/۳۴۳^{e}
۰	۵۰	۰/۰۴۷^{c}	۱/۳۵۳^{d}	۱/۱۵۶^{f}	۱/۵۴۳^{e}	۰/۷۱۳^{c}	۱/۶۱۳^{b}
۰	۱۰۰	۰/۰۳۶^{g}	۰/۹۶۶^{e}	۰/۹۷۰^{g}	۱/۳۰۶^{f}	۰/۹۱۰^{a}	۱/۹۰۲^{a}
۱۰۰	۰	۰/۰۶۶^{b}	۱/۸۵۶^{a}	۱/۸۷۰^{b}	۲/۰۴۵^{a}	۰/۳۸۳^{f}	۱/۱۴۵^{g}
۱۰۰	۲۵	۰/۰۷۲^{a}	۱/۷۴۳^{b}	۱/۸۱۰^{c}	۱/۹۲۰^{b}	۰/۴۶۶^{e}	۱/۲۲۰^{f}
۱۰۰	۵۰	۰/۰۶۹^{a}	۱/۵۰۳^{c}	۱/۴۲۶^{d}	۱/۶۷۰^{d}	۰/۶۰۶^{cd}	۱/۴۷۰^{d}
۱۰۰	۱۰۰	۰/۰۶۵^{b}	۱/۳۷۶^{d}	۱/۳۶۰^{e}	۱/۵۱۰^{e}	۰/۷۶۰^{b}	۱/۵۴۳^{c}

* حرف‌های یکسان عدم اختلاف معنادار در سطح احتمال $P<0.05$ را نشان می‌دهند.

نتایج نشان دادند (جدول ۴) میزان کلسیم برگ با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح اکسیدنیتریک کاهش می‌یابد. بیشترین میزان کلسیم برگ (۱/۸ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمارهای صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم و ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم و کمترین میزان کلسیم برگ (۰/۹۶۶ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمار صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شد (جدول ۴). در توت‌فرنگی نیز غلظت کلسیم اندام هوایی با افزایش شوری کاهش می‌یابد (Turhan and Eris, 2004). کمترین غلظت کلسیم موجود در برگ (۰/۹۶ درصد) به شوری ۱۰۰ میلی‌مولار و اکسیدنیتریک صفر میکرومولار مربوط بود؛ این در حالیست که در همین سطح شوری و تیمار ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک، غلظت کلسیم برابر ۱/۳۲ درصد بود و افزایش ۲۷ درصدی داشت.

نتایج (جدول ۴) نشان دادند روند تغییرات غلظت منیزیم در پاسخ به اکسیدنیتریک بسیار شبیه کلسیم است؛ به‌این‌ترتیب که با افزایش سطح شوری از صفر به ۱۰۰ میلی‌مولار- هم در بوته‌های تیمارشده با اکسیدنیتریک ۱۰۰ میکرومولار و هم در بوته‌های تیمارنشده با این تنظیم‌کنندهٔ رشد- غلظت منیزیم برگ روند کاهشی نشان می‌دهد؛ با این تفاوت که در بوته‌هایی که تیمار اکسیدنیتریک ۱۰۰ میکرومولار را دریافت کرده بودند، غلظت این عنصر در سطح بالاتری بود (جدول ۴). بیشترین (۱/۹۴ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) و کمترین (۰/۹۷۰ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) میزان منیزیم به‌ترتیب در تیمارهای صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم و صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شد. در شوری‌های زیاد به‌ویژه غلظت زیاد یون سدیم و متعادل‌نبودن غلظت عناصر در خاک، جایگاه‌های اتصال به‌علت تشابه حامل‌های جذب منیزیم و سدیم در ریشه عمدتاً توسط سدیم اشغال می‌شوند و درنتیجه، منیزیم کمتری به داخل سلول‌های ریشه انتقال می‌یابد (Yildirim *et al.*, 2009). این موضوع ممکن است با افزایش توان تحمل گیاهان تیمارشده

با اکسیدنیتریک در شرایط تنش شوری نیز مرتبط باشد که ضمن افزایش پتانسیل اسمزی بافت‌های گیاه از طریق تجمع بیشتر محلول‌های سازگاری در این شرایط تا حدی به بهبود جذب آب و عناصر غذایی ازجمله نیترات، منیزیم و دیگر عناصر منجر می‌شود (Cakmak, 2005;Gupta and Huang, 2014).

نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (جدول ۴) نشان دادند میزان پتاسیم برگ با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح اکسیدنیتریک کاهش می‌یابد. بیشترین میزان پتاسیم برگ (۲/۱ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمارهای صفر و ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم و کمترین میزان پتاسیم برگ (۱/۳ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمارهای صفر و ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شد. غلظت پتاسیم برگ طی تنش شوری روند کاهشی داشت و با افزایش غلظت کلریدسدیم تا ۱۰۰ میلی‌مولار به حداقل رسید (جدول ۴). محتوای یون پتاسیم در بافت‌های گیاهی بیان‌کنندهٔ وجود کاتیون مهمی است که یکی از اجزای مهم تنظیم اسمزی سلول‌ها و حفظ آماس سلولی به شمار می‌رود (Mengel, 2007). پتاسیم یکی از مهم‌ترین عناصری است که در تعادل آنیون و کاتیون درون سلول نقش دارد؛ همچنین این عنصر اثر معناداری بر جذب سایر عناصر توسط ریشه دارد و به رفع آثار سوء بی‌تعادلی برخی عناصر غذایی در خاک کمک می‌کند (Karimi, 2017).

نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (جدول ۴) نشان دادند میزان سدیم برگ با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح اکسیدنیتریک افزایش می‌یابد؛ هرچند تفاوت معناداری بین سطوح پایین نمک ازنظر میزان سدیم برگ مشاهده نمی‌شود. بیشترین میزان سدیم برگ (۰/۹۱ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمار صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و کمترین میزان سدیم برگ (۰/۳۸۳ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر و ۲۵ میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شد. همان‌طور که انتظار می‌رود با افزایش سطح شوری از صفر به ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم، غلظت سدیم برگ روند افزایشی نشان می‌دهد و در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به حداکثر می‌رسد (جدول ۴). محتمل است اکسیدنیتریک با تأثیر بر جذب یون پتاسیم، جذب سدیم را کاهش دهد؛ بنابراین، کاربرد اکسید نیتریک تا حدی می‌تواند از غلظت زیاد و سمیت یون سدیم بکاهد. بهبود وضعیت جذب عناصر ماکرو و کاهش جذب سدیم در اثر کاربرد اکسیدنیتریک در کاهو نیز مشاهده شده است (García López-Carrión *et al*., 2008) که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد.

نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها (جدول ۴) نشان دادند با افزایش غلظت نمک در هر دو سطح اکسیدنیتریک، میزان کلر برگ افزایش می‌یابد. بیشترین میزان کلر (۱/۹۰ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمار صفر میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و کمترین میزان کلر (۱/۱۴ میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک) در تیمارهای صفر و ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک همراه با صفر میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج، اکسیدنیتریک میزان تحمل بوته‌های انگور در معرض تنش شوری را با تأثیر بر محلول‌های سازگاری، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، میزان پتاسیم و منیزیم افزایش می‌دهد؛ درنتیجه، سطح ۱۰۰ میکرومولار اکسیدنیتریک برای افزایش تحمل به تنش شوری (۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم) انگور رقم بی‌دانهٔ سفید پیشنهاد می‌شود.

References

AbdElgawad, H., Zinta, G., Hegab, M. M., Pandey, R., Asard, H. and Abuelsoud, W. (2016) High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in Maize seedlings organs. Frontiers in Plant Science 7: 276.

Abdel-Shafey, H. I., Hegemann, W. and Teiner, A. (1994) Digestion with concentrated HNO_3 and H_2O_2. Environment Management and Health 5: 21-24.

Ahmed, F. F., Abdel Aal, A. M. K. A., Mervat, A. and Ahmed, S. E. A. (2015) Tolerance of some Grapevine cultivars to salinity and calcium carbonate in the soil. Stem Cell 6: 45-64.

Alavi Matin, S. M., Rahnama, A. and Meskarbashi, M. (2016) Effect of potassium supply on the activity of some antioxidant enzymes of two durum Wheat cultivars under salt stress. Journal of Plant Productions (Scientific Journal of Agriculture) 38(4): 1-12.

Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.

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

Azizi, H., Hassani, A., Rasouli Sadaghiani, M. H., Abbaspour, N. and Doulati Baneh, H. (2017) Effect of foliar application of potassium silicate and zinc sulphate on some physiological parameters of two grapevine cultivars under salt stress conditions ranian. Journal of Horticultural Science 47: 797-810 (in Persian).

Bates, L., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 13: 39-250.

Beligni, M. V. and Lamattina, L. (1999) Is nitric oxide toxic or protective? Trends in Plant Sciences 4: 299-300.

Bergmeyer, H. U. (1970) Methods of enzymatic analysis. Akademie Verlag, Berlin.

Bornman, J. F., Reuber, S., Cen, Y. P. and Weissenböck, G. (1997) Ultraviolet radiation as a stress factor and the role of protective pigments. In: Plants and UV-B: Responses to environmental change (Ed. Lumsden, J.) 157-168. Cambridge University Press, Cambridge.

Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Bybordi, A. (2012) Study effect of salinity on some physiological and morphological properties of two grape cultivars. Life Science Journal 9: 1092-1101.

Cakmak, I. (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 168: 521-530.

Campos, P. S., Quartin, V., Ramalho, J. C. and Nunes, M. A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. Plants. Plant Physiology 160: 283-292.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food Drug Analysis 10: 178-182.

Cuin, T. A. and Shabala, S. (2007) Compatible solutes reduce ROS induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. Plant, Cell and Environment 30: 875-885.

Del Rio, L. A., Corpas, F. J. and Barroso, J. B. (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. Phytochemistry 65(7): 783-792.

Doulati Baneh, H., Attari, H., Hassani, A., and Abdollahi, R. (2013) Salinity effects on the physiological parameters and oxidative enzymatic activities of four Iranian grapevines (*Vitis vinifera* L.) cultivar. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 5: 1022.

Doulati Baneh, H. (2016) Salinity effects on plant tissue nutritional status as well as growth and physiological factors in some cultivars and interspecies hybrids of grape. Iranian Journal of Horticultural Science 47: 33-44 (in Persian).

Duan, P., Ding, F., Wang, F. and Wang, B. S. (2007) Priming of seeds with nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP) alleviates the inhibition on Wheat seed germination by salt stress. Europe PMC 33(3): 224-250.

Fozouni, M., Abbaspour, N. and Doulati Baneh, H. (2012) Short term response of Grapevine grown hydroponically to salinity: Mineral composition and growth parameters. Vitis 51, 95-101.

Foyer, C. H. and Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. Physiologia Plantarum 119: 355-364.

García López-Carrión, A. I., Castellano, R., Rosales, M. A., Ruiz, J. M. and Romero, L. (2008) Role of nitric oxide under saline stress: implications on proline metabolism. Biologia Plantarum 52: 587-591.

Grattana, S. R. and Grieve, C. M. (1999) Salinity- mineral nutrient relations in horticultural crop. Scientia Horticulturae 78: 127-157.

Gupta, B. and Huang, B. (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. International Journal of Genomics 20: 596-701.

Herzog, V. and Fahimi, H. D. (1973) Determination of the activity of peroxidase. Analytical Biochemistry 55: 554-562.

Hu, Y. and Schmidhalter, U. (2005) Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 168: 541-549.

Irigoyen, J. J., Emerich, D. W. and Sanchez-Diaz, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. Physiologia Plantarum 84: 55-60.

Karimi, R. (2017) Potassium-induced freezing tolerance is associated with endogenous abscisic acid, polyamines and soluble sugars changes in grapevine. Scientia Horticulturae 215: 184-194.

Khan, M. N., Siddiqui, M. H., Mohammad, F. and Naeem, M. (2012) Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. Nitric Oxide 27(4): 210-218.

Koç, E., İşlek, C., and Üstün, A. S. (2010) Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. Gazi University Journal of Science 23: 1-6.

Li, Q., Niud, H., Yind, J., Wanga, M., Shaob, H., Dengd, D., Chend, X., Rend, J. and, Li, Y. (2008) Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 65: 220-225.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymology 148: 350-382.

Mengel, K. (2007) Potassium. In: Handbook of plant nutrition (Eds. Barker, A. V. and Pilbeam, D. J.) 91-120. CRC Press, NewYork.

Minazadeh, R., Karimi, R. and Mohamad Parast, B. (2018) The effect of foliar nutrition of potassium sulfate on morpho-physiological indices of Grapevine under salinity stress. Iranian Journal of Plant Biology 10: 83-106 (in Persian).

Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology 59: 651-681.

Munns, R., Wallace, P. A., Teakle, N. L. and Colmer, T. D. (2010) Measuring soluble ion concentrations (Na^+, K^+, Cl^-) in salt-treated plants. In: Plant stress tolerance, methods in molecular biology (Ed. Sunkar, R.) 371-382. Humana Press, New York.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

Negrao, S., Schmockel, S. M. and Tester, M. (2017) Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. Annals of Botany 119(1): 1-11.

Neill, S. J., Desikan, R. and Hancock, J. T. (2003) Nitric oxide signaling in plants. New Phytologist 159.

Parida, A. K. and Das, A. B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60: 324-349.

Peng, Q. and Zhou, Q. (2009.) Antioxidant capacity of flavonoid in Soybean seedlings under the joint actions of rare earth element La (III) and ultraviolet-B stress. Biological Trace Element Research 127: 69-80.

Ranjbar, M., Esmaeilizadeh, M., Karimi, H. R. and Shamshiri, M. H. (2017) Study of foliar application effect of silicon and potassium elements on some biochemical and ecophysiological traits of *Pistachio seedlings* cv. Badami E-Riz Zarand Kerman under salinity stress. Iranian Journal of Horticultural Science 47: 739-752 (in Persian).

Ritchie, S. W., Nguyen, H. T. and Holaday, A. S. (1990) Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Science 30: 105-111.

Roy, S. J., Negrao, S. and Tester, M. (2014) Salt resistant crop plants. Current Opinion in Biotechnology 26: 115-124.

Sairam, R. K. and Tyagi, A. (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science 86: 407-421.

Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H. and Basalah, M. O. (2010) Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. Protoplasma 248: 447-455

Sivritepe, N. and Eriş, A. (1999) Determination of salt tolerance in some grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) under in vitro conditions. Turkish Journal of Biology 23: 473-486.

Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C. and Szabados, L. (1997) Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. Plant Journal 12: 557-569.

Tanou, Georgia, Athanassios Molassiotis. and Grigorios Diamantidis. (2009) Hydrogen peroxide-and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. Journal of Plant Physiology 166(17): 1904-1913.

Turhan, E. and Eris, A. (2004) Effects of sodium chloride applications and different growth media on ionic composition in Strawberry plant. Journal

of Plant Nutrition and Soil Science 27: 1653-1665.

Uchida, A., Andre, T. J., Takashi, H., Teruhiro, T. and Tetsuko T. (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in Rice. Plant Science 163(3): 515-523.

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. Journal of Agriculture and Food Chemistry 46:4113-4117.

Yildirim, E., Karlidag, H. and Turan, M. (2009) Mitigation of salt stress in Strawberry by foliar K, Ca and Mg nutrient supply. Plant, Soil and Environment 55: 213-221.

Zarei, L., Koushesh, M., Vafaee, Y. and Javadi, T. (2018) Effect of gamma-amino-butyric acid foliar application on physiological characters of Tomato (cv. Namib) under salinity stress. Journal of Plant Productions (Scientific Journal of Agriculture) 41(1): 15-28 (in Persian).

Zheng, Ch., Dong, J., Fulai, L., Tingbo, D., Weicheng, L., Qi, J. and Weixing, C. (2009) Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. Environmental and Experimental Botany 67(1): 222-227.