



بررسی تأثیر نمک‌های مختلف و اثرات متقابل آنها بر غلظت املاح معدنی و آلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های یونجه

*ایمان نعمتی^۱، سمیه قلی‌زاده^۱ و فواد مرادی^۲

^۱مری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرمشهر، استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۶/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۰۳

چکیده

به منظور بررسی تأثیر نمک‌های کلرید سدیم، کلرید پتاسیم و کلرید کلسیم بر غلظت املاح معدنی و آلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ریشه و اندام هوایی یونجه (رقم بغدادی)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از تیمارهای NaCl (۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار)، KCl (۰ و ۴۰ میلی‌مولار) و CaCl₂ (۰ و ۲۰ میلی‌مولار) با چهار تکرار در سال ۱۳۸۹ در گلخانه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرمشهر اجرا گردید. نتایج نشان داد که اعمال تیمار NaCl موجب کاهش جذب K^+ ، Ca^{2+} و Mg^{2+} در ریشه و اندام هوایی شد. کاربرد KCl و CaCl₂ نیز موجب افزایش معنی‌دار وزن ریشه گیاهچه‌ها گردید. همچنین تأثیر KCl بر غلظت یون Na^+ در ریشه و اندام هوایی معنی‌دار شد. رابطه منفی معنی‌داری نیز بین Ca^{2+} با غلظت Na^+ مشاهده گردید. کاربرد KCl و CaCl₂ موجب افزایش غلظت یون Cl^- در ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌ها شد. اعمال تنش با نمک‌های مختلف موجب افزایش معنی‌دار غلظت کلروفیل a در اندام هوایی گیاهچه‌ها شد. تنش NaCl موجب افزایش غلظت کلروفیل b نیز شد در حالیکه غلظت رنگدانه‌های کاروتنوئیدی کاهش یافت. پروتئین‌های محلول، فعالیت آنزیم‌های پرکسیداز و آسکوبات‌پرکسیداز در اثر اعمال تنش NaCl افزایش معنی‌دار نشان داد.

واژه‌های کلیدی: املاح معدنی، آسکوبات‌پرکسیداز، پرکسیداز، کلرید پتاسیم، کلرید سدیم، کلرید کلسیم، یونجه

*مسئول مکاتبه: iman_nemati2000@yahoo.com

مقدمه

نمک موجود در محلول خاک یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده عملکرد گیاهان زراعی، به خصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک دنیا است. آمار ارائه شده توسط سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد (FAO)^۱ در سال ۲۰۰۵، نشان می‌دهد که بیش از ۸۰۰ میلیون هکتار از زمین‌های دنیا شور هستند، که از این مقدار ۳۹۷ میلیون هکتار اراضی تحت تاثیر شوری و ۴۳۴ میلیون هکتار، اراضی قلیایی می‌باشد. انباشته شدن مواد محلول در پاسخ به تنش ناشی از نمک، در حقیقت واکنشی است که در قبال تنش آب ناشی از اختلاف موجود در پتانسیل‌های آب گیاه و محلول خاک بروز می‌کند. در چنین شرایطی اغلب غلظت آنیون‌ها (Cl^- ، NO_3^- و SO_4^{2-}) و کاتیون‌ها (Na^+ ، K^+ ، Ca^{2+} و Mg^{2+}) در سلول افزایش یافته و با منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی سلول میزان شیب پتانسیل اسمزی به طرف برگ افزایش یافته و سبب جذب آب می‌گردد و در نهایت حالت تورژسانس سلول حفظ می‌گردد (چیزمن، ۱۹۸۸). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تنش شوری در یونجه سبب کاهش رشد اندام هوایی به میزان بیشتری نسبت به ریشه می‌شود (کانت و همکاران، ۱۹۹۴). مزنی و همکاران (۱۹۹۹) و راجر (۱۹۹۸) کاهش وزن ریشه و اندام هوایی یونجه را در اثر شوری گزارش کردند. میزان تحمل به شوری در گیاهان مختلف بطور مستقیم با میزان کنترل تجمع سدیم، کلر یا هر دو یون در ارتباط است (مونس، ۲۰۰۵). سمیت یون سدیم و سازوکارهای انتقال این یون و همچنین یون پتاسیم در گیاهان مختلف تحت تنش شوری، بطور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (تستر و داونپورت، ۲۰۰۳؛ آپسه و بلوموالد، ۲۰۰۷) ولی علی‌رغم سمیت بالای یون کلر در اغلب گیاهان، ارتباط بین تجمع آن با تحمل به شوری کمتر بررسی شده است (تیکله و تیرمن، ۲۰۱۰). تستر و داونپورت (۲۰۰۳) اعلام کردند که گیاهان برای مقابله با اثرات شوری، یون‌های سمی را در برگ‌های پیرتر ذخیره کرده و از تجمع آنها در برگ‌های جوان جلوگیری می‌کنند. تأثیر یون‌های K^+ و Ca^{2+} بر گیاه در شرایط تنش شوری، معمولاً با افزودن $CaCl_2$ (ارشی و همکاران، ۲۰۱۰؛ اتحادنیا و همکاران، ۲۰۱۰) و KCl (جعفری و همکاران، ۲۰۰۹) به محیط ریشه گیاه مطالعه می‌شود. ماسر و همکاران (۲۰۰۲) اعلام کردند که احتمالاً افزایش غلظت یون K^+ در محیط ریشه، اثر منفی ناشی از سدیم را خنثی می‌کند. همزمان با تغییر غلظت املاح معدنی در گیاه، در اثر بروز تنش شوری، غلظت املاح آلی نظیر

قندهای محلول، پروتئین‌های محلول و برخی اسیدهای آمینه نیز در اندام‌های مختلف گیاه تغییر می‌کند (نعمتی و همکاران، ۲۰۱۱). برخی از پروتئین‌هایی که در اثر تنش شوری در گیاه تجمع می‌یابند، ممکن است برای تنظیم اسمزی گیاه تحت تنش، مورد استفاده قرار گیرند (پریک‌سینگلا و گراور، ۱۹۹۷). برخی از مطالعات قبلی افزایش میزان پروتئین‌های محلول را در ارقام متحمل جو، آفتابگردان و برنج نشان داده است (اشرف و هریس، ۲۰۰۴) در حالی که گزارش‌های دیگر، از کاهش غلظت پروتئین‌های محلول در برنج، باقلا و تاج خروس حکایت دارد (پروایز و ساتیاواتی، ۲۰۰۸). اشرف و فاطیما (۱۹۹۵) نیز اعلام کردند تحت تنش شوری، بین ارقام متحمل و حساس به شوری آفتابگردان، از نظر غلظت پروتئین‌های محلول تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مختلف با میزان تحمل به شوری در گیاهان همبستگی دارد (دمیرال و ترکان، ۲۰۰۵). بطور کلی گیاهان متحمل به شوری، توانایی بیشتری برای محافظت در برابر تنش با استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را دارند (سکمن و همکاران، ۲۰۰۷). وانگ و همکاران (۲۰۰۹) اعلام کردند که تنش NaCl موجب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پروکسیداز در اندام هوایی گیاهچه‌های یونجه شد ولی تغییری در فعالیت آنزیم پرکسیداز مشاهده نشد. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پروکسیداز در اندام هوایی گندم (منگزو و ناواریلزو، ۱۹۹۹) و برگ‌های برنج (لی و همکاران، ۲۰۰۱) گزارش شد در حالی که گوست و همکاران (۱۹۹۴) کاهش فعالیت این آنزیم را در گیاه پنبه تحت تنش شوری گزارش دادند. مطالعات قبلی ارتباط بین کاهش پرکسیداسیون چربی‌ها با افزایش فعالیت آسکوربات‌پروکسیداز در چغندر قند (بور و همکاران، ۲۰۰۳) و برنج (دمیرال و ترکان، ۲۰۰۵) را نشان می‌دهد. فعالیت آنزیم پرکسیداز نیز معمولاً در گیاهان متحمل به تنش شوری بیش از گیاهان حساس است (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹). پرکسیداسیون چربی‌ها معمولاً از طریق اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) برآورد می‌گردد. پرکسیداسیون چربی‌ها در اثر فعالیت رادیکال‌های آزاد، هم‌به‌عنوان یک واکنش به تنش و هم‌به‌عنوان یک برآورد از خسارت تنش محسوب می‌گردد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹). وانگ و همکاران (۲۰۰۹) افزایش غلظت MDA را در اندام هوایی گیاهچه‌های یونجه تحت تنش شوری، گزارش دادند و اعلام کردند که بین کاهش غلظت MDA و افزایش تحمل به شوری در یونجه همبستگی مستقیم وجود دارد.

با توجه به اینکه یونجه بغدادی در شرایط مطلوب از عملکرد بسیار بالایی برخوردار است و نظر به اینکه طی دو دهه اخیر مشکل شوری در مناطق گرم جنوب، که محل اصلی کشت این رقم

پرمحصول است، به‌طور چشمگیری افزایش یافته است، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر شوری بر این گیاه و رابطه آن با تجمع آنیون‌ها و کاتیون‌های مختلف در اندام‌های هوایی و ریشه گیاه، تجمع املاح آلی مهم دخیل در تحمل تنش NaCl، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز و آسکوربات-پراکسیداز و همچنین تاثیر افزایش پتاسیم و کلسیم خاک در کاهش اثرات منفی نمک و تغییرات بوجود آمده در غلظت املاح نامبرده، اجرا شده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۸۹ در شرایط گلخانه، در دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرمشهر انجام شد. در این بررسی رقم یونجه بغدادی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تحت شرایط تنش NaCl (صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار)، KCl (صفر و ۴۰ میلی‌مولار) و $CaCl_2$ (صفر و ۲۰ میلی‌مولار)، با چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که غلظت‌های بکار برده شده در این پژوهش بر اساس مطالعات اولیه انتخاب شده‌اند. در مرحله اول بذور مورد استفاده ضد عفونی و جوانه‌دار شدند، سپس جوانه‌های یک هفته‌ای به گلخانه منتقل شده و در گلدان‌های مستطیل شکل ۲۵ لیتری حاوی پرلیت کشت شدند. محیط غذایی گیاهچه‌ها هوگلند تغییر یافته بود که هر روز در ساعت ۱۰ صبح در اختیار گیاهچه‌ها قرار می‌گرفت. در طی دوره اجرای آزمایش دما در محدوده ۲۰ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد، شدت نور طبیعی و طول روز ۱۶ ساعت حفظ شد. پس از رشد گیاهچه‌ها (۲۵ روز پس از کاشت)، تیمارهای مورد نظر اعمال گردید. اختصاص تیمارها به مخازن به صورت تصادفی و از طریق اضافه کردن نمک‌ها به محلول غذایی انجام شد. ۱۵ روز پس از آغاز اعمال تیمار شوری، برداشت همه گیاهچه‌ها در یک مرحله صورت گرفت و وزن خشک ریشه و اندام هوایی اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی اثر تنش شوری بر میزان ماده خشک اندام هوایی و ریشه در زمان برداشت، از هر طرف ۲ بوته انتخاب و کف‌بر شدند، سپس جهت بررسی میزان وزن خشک، ابتدا با آب مقطر شسته شده و درون پاکت خشک‌کن قرار داده شد و در آن با دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد به مدت سه روز خشک گردید. نمونه‌های خشک شده با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شده و در نهایت وزن خشک اندام هوایی محاسبه گردید. اندازه‌گیری غلظت کاتیون‌های Na^+ ، K^+ ، Ca^{2+} ، Mg^{2+} و آنیون‌های Cl^- ، NO_3^- و SO_4^{2-} در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها بصورت جداگانه صورت گرفت. برآورد غلظت املاح آلی شامل پروتئین‌های محلول، مالون‌دی‌آلدئید

(MDA)، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسکوربات‌پروکسیداز و پروکسیداز، غلظت کلروفیل a، b و کلروفیل کل و غلظت کاروتنوئیدها نیز در اندام هوایی نمونه‌های مورد مطالعه انجام شد. جهت اندازه‌گیری غلظت املاح آلی، نمونه‌ها پس از انجماد سریع با نیتروژن مایع، در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب به پودر ریزی تبدیل شدند تا جهت انجام مرحله هضم آماده شوند. برای هضم نمونه‌ها، از روش هضم مرطوب استفاده شد. در این روش از اسید سولفوریک ۹۶ درصد، آب اکسیژنه ۳۰ درصد، پودر اسید سالیسیک، و مخلوط اسید استفاده گردید (امامی، ۱۹۹۶). جذب کاتیون‌های پتاسیم و سدیم با استفاده از دستگاه نشر شعله‌ای^۱ مدل Corning-410 خوانده شد. به منظور سنجش غلظت کاتیون‌های کلسیم، منیزیم از دستگاه جذب اتمی مدل^۲ Perkin Elmer 3110 استفاده شد. برای هضم نمونه‌های گیاهی به منظور اندازه‌گیری کلر نمونه گیاهی خشک و آسیاب شده را با افزودن آب مقطر به مدت ۲۵ دقیقه بر روی دستگاه تکان دهنده^۳ قرار داده و پس از این زمان، نمونه‌ها دو بار فیلتر گردید و جهت قرائت میزان کلر آماده شدند. برآورد غلظت یون کلر با دستگاه یون‌متر Methrom-Switzerland و با استفاده از سنسور مخصوص کلر انجام شد. برای هضم نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری غلظت نیترات و سولفات، ۰/۴ گرم از نمونه‌های پودر شده به مدت دو ساعت در آب مقطر در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه تکان‌دهنده مخلوط شده و سپس نمونه‌ها دو بار توسط کاغذ صافی فیلتر شدند. غلظت این یون‌ها با استفاده از دستگاه Ion Chromatogram (Methrom 850) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل گیاهچه‌ها، با استفاده از روش آرنون (۱۹۹۴) با استفاده از استون انجام شد و اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) از روش آزمون TBA و ضریب خاموشی ۱۵۵ میلی‌مولار بر سانتی‌متر صورت گرفت (چاپارزاده و همکاران، ۲۰۰۴). غلظت پروتئین‌های محلول کل با استفاده از بافر استخراج تریس و معرف بیورد، برآورد شد (بردفورد، ۱۹۷۶). استخراج آنزیمی توسط اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) صورت گرفت و فعالیت آنزیم آسکوربات‌پروکسیداز بر اساس میزان اکسیداسیون آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با ضریب خاموشی ۲/۸ میلی‌مولار بر سانتی‌متر از روش یاماگوچی و همکاران (۱۹۹۵) برآورد شد.

1- Flame photometer

2- Atomic absorption

3- Shaker

برآورد فعالیت آنزیم پرکسیداز نیز با ردیابی میزان شکل‌گیری تترایاکول استفاده از ضریب خاموشی ۲۶/۶ میلی‌مولار بر سانتی‌متر صورت گرفت. (سرینیواس و همکاران، ۱۹۹۹).
تجزیه واریانس داده‌ها و محاسبه خطای استاندارد با استفاده از نرم‌افزار SAS (Ver. 6.12) و ضرایب همبستگی پیرسون با نرم‌افزار SPSS (Ver. 15) محاسبه گردید.

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که اعمال تیمار NaCl تاثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی نداشت ولی در تیمارهایی که غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl بکار برده شد، وزن ریشه گیاهچه‌ها بیش از اندام هوایی بود (جدول ۱). همچنین نسبت اندام هوایی به ریشه در شرایط تنش NaCl، نسبت به شرایط عدم تنش کاهش معنی‌داری داشت. کاربرد KCl در محیط اطراف ریشه موجب شد که وزن ریشه گیاهچه‌ها در حدود ۲۵/۵۳ درصد افزایش یابد. تیمار گیاهچه‌ها با CaCl₂ نیز بر وزن خشک اندام هوایی گیاهچه‌ها تأثیر معنی‌داری نشان نداد در حالیکه موجب افزایش ۱۶/۰۶ درصدی وزن ریشه گیاهچه‌های مورد مطالعه شد. مونس (۲۰۰۲) اعلام کرد که تحمل به شوری در گیاهان بر اساس مقایسه میزان ماده خشک تولید شده در شرایط شوری در برابر شرایط کنترل برآورد می‌شود. تحت تنش شوری به دلیل افزایش هزینه انرژی و کاهش میزان فتوسنتز و کارایی جذب کربن میزان رشد گیاهان کاهش می‌یابد (مونس، ۲۰۰۵). هاسگاوا و همکاران (۲۰۰۰) و وانگ و همکاران (۲۰۱۱) کاهش وزن خشک یونجه را در اثر تنش شوری گزارش دادند.

جدول ۱- میانگین وزن خشک اندام هوایی و ریشه و نسبت اندام هوایی به ریشه گیاهچه‌های یونجه تحت غلظت‌های متفاوت نمک‌های مختلف (میانگین ۴ تکرار ± خطای استاندارد).

	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	NaCl
غلظت نمک									
(میلی‌مولار)	۴۰	۴۰	۰	۰	۴۰	۴۰	۰	۰	KCl
	۲۰	۰	۲۰	۰	۲۰	۰	۲۰	۰	CaCl ₂
اندام هوایی (گرم)	۰/۳۸±۰/۰۲	۰/۴۸±۰/۰۲	۰/۴۸±۰/۰۲	۰/۴۲±۰/۰۲	۰/۶۰±۰/۰۳	۰/۴۲±۰/۰۲	۰/۴۸±۰/۰۲	۰/۷۴±۰/۰۴	
ریشه (گرم)	۰/۶۳±۰/۰۳	۰/۷۶±۰/۰۴	۰/۵۸±۰/۰۳	۰/۵۵±۰/۰۳	۰/۸۸±۰/۰۴	۰/۳۷±۰/۰۲	۰/۴۰±۰/۰۲	۰/۵۷±۰/۰۳	
نسبت اندام‌هوائی‌به‌ریشه	۰/۶۰±۰/۰۳	۰/۶۴±۰/۰۳	۰/۸۳±۰/۰۴	۰/۷۶±۰/۰۴	۰/۶۸±۰/۰۳	۱/۱۴±۰/۰۶	۱/۱۹±۰/۰۶	۱/۳۰±۰/۰۶	

همانطور که در جدول (۲) نشان داده شده است، غلظت یون سدیم در اندام هوایی گیاه در اثر افزایش غلظت NaCl استفاده شده، بطور معنی‌داری افزایش یافت. افزایش غلظت یون سدیم در اندام هوایی گیاهچه‌های برنج تحت تنش NaCl توسط نعمتی و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش شده است.

در ریشه گیاه نیز کاربرد نمک‌های KCl و $CaCl_2$ سبب کاهش معنی‌دار غلظت یون سدیم نسبت به شرایط عدم استفاده از این نمک‌ها گردید. به نظر می‌رسد که در اثر اعمال تنش $NaCl$ ، گیاهچه‌های مورد مطالعه بخش بسیاری از سدیم جذب شده را به اندام هوایی انتقال داده و باعث می‌شود تجمع یون سدیم در ریشه مشاهده نشود (جدول ۲). الهنداوی و همکاران (۲۰۰۵) یکی از شاخص‌های فیزیولوژیک تحمل گیاه به تنش‌های شوری را، تجمع پایین یون‌های سمی نظیر سدیم و کلر در اندام هوایی گزارش کردند در حالیکه اشرف (۲۰۰۴) اعلام کرد که گیاهان شیرین‌زی^۱ هم سازوکار دفع یون‌ها^۲ و هم سازوکار تجمع یون‌ها^۳ را می‌توانند برای مقابله با تنش شوری در پیش گیرند. افزایش حجم واکوئل سلول، تحت تنش شوری در برخی از ارقام برنج توسط قلی‌زاده و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شده است. با توجه به اینکه تجمع اکثر یون‌ها در اثر اعمال تیمار نمک‌های مختلف، افزایش معنی‌دار نشان داد، ممکن است این سازوکار از سوی گیاه برای تحمل تنش $NaCl$ باشد. از آنجا که تجمع یون‌های مختلف و ذخیره آنها در سلول مستلزم صرف انرژی می‌باشد، ممکن است کاهش مشاهده شده در وزن کل گیاهچه‌ها، ناشی از صرف همین انرژی باشد (نعمتی و همکاران، ۲۰۰۸).

همانطور که در جدول‌های (۳ و ۴) نشان داده شده است، اثرات ساده $NaCl$ و KCl و اثر متقابل بین آنها بر غلظت یون سدیم در اندام هوایی و ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. جدول (۵) رابطه منفی و معنی‌داری را بین غلظت سدیم با تجمع یون کلسیم نشان می‌دهد. در حالی که تجمع یون سدیم رابطه مثبت و معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) با تجمع یون‌های منیزیم، کلر و سولفات داشت.

پلیت (۲۰۰۵) گزارش داد که افزایش غلظت کلسیم در محیط ریشه، موجب کاهش جذب سدیم در گیاه می‌گردد. نتایج این آزمایش نشان داد که افزودن $CaCl_2$ به محیط ریشه، تأثیر معنی‌داری بر تجمع یون سدیم در ریشه و اندام هوایی آنها نداشت، در حالی که افزایش KCl ، موجب کاهش معنی‌دار غلظت یون سدیم در اندام هوایی (۱۷/۹۷ درصد) و در ریشه (۶۸/۱۷ درصد) گیاهچه‌های مورد مطالعه شد (جدول ۲). گیاهان مسیر ورودی ویژه‌ای برای ورود سدیم ندارند و سدیم از محل ورود پتاسیم، وارد گیاه می‌شود (تستر و داوِنپورت، ۲۰۰۳)، بنابراین سدیم برای جذب توسط گیاه با

-
- 1- Glycophyte
 - 2- Salt exclusion
 - 3- Salt inclusion

پتاسیم در رقابت است و ممکن است دلیل کاهش غلظت سدیم در زمان اعمال تیمار پتاسیم، همین موضوع باشد. نتایج مشابهی نیز توسط فلاورز و حاجی باقری (۲۰۰۱) گزارش شده است.

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که، تجمع یون پتاسیم در اندام هوایی بیش از ریشه گیاهچه‌ها بود (جدول ۲). غلظت پتاسیم در تیمارهای اعمال نمک KCl، بیش از تیمارهای عدم کاربرد این نمک بود. میانگین غلظت یون پتاسیم در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها در تیمارهای اعمال نمک NaCl، نسبت به تیمارهایی که NaCl اعمال نشد به ترتیب ۱۰/۵۶ و ۳۹/۲۵ درصد کاهش نشان داد (جدول ۲). کاهش مشاهده شده در غلظت یون پتاسیم در اثر اعمال تیمار NaCl، ممکن است به دلیل رقابت یون‌های سدیم به پتاسیم برای ورود به گیاه باشد.

جدول‌های ۳ و ۴ نشان می‌دهد که هم در ریشه و هم در اندام هوایی گیاهچه‌های مورد مطالعه، اثرات NaCl، KCl و اثر متقابل بین آنها و اثر متقابل بین NaCl و CaCl₂ بر غلظت یون پتاسیم معنی‌دار بود. افزودن CaCl₂ به محیط ریشه، تأثیری بر غلظت یون پتاسیم گیاهچه‌ها نداشت (جدول ۳ و ۴)؛ در حالی که با افزودن KCl، غلظت یون پتاسیم نسبت به شرایط عدم کاربرد KCl در اندام هوایی (۲/۲۷ برابر) و در ریشه (۲/۶۳ برابر) بود (جدول ۲). افزایش مشاهده شده در غلظت یون پتاسیم به دلیل افزایش غلظت پتاسیم در محیط اطراف ریشه گیاهچه‌ها بود. کاهش جذب پتاسیم توسط گیاه در اثر تنش شوری، توسط فلاورز و حاجی باقری (۲۰۰۱) و کاردن و همکاران (۲۰۰۳) گزارش شده است در حالیکه زو و همکاران (۲۰۰۱) اعلام کردند برخی از گیاهان توانایی حفظ مقادیر بالای پتاسیم در اندام هوایی خود را در شرایط تنش شوری، دارند. همان‌طوری که در جدول ۵ نشان داده شده است، غلظت یون پتاسیم با یون کلسیم، رابطه منفی و معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) و با غلظت یون کلر، رابطه مثبت و معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) داشت. نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که با کاربرد NaCl در محیط ریشه گیاهچه‌های مورد مطالعه، نسبت سدیم به پتاسیم به طور معنی‌داری افزایش یافت و افزایش مشاهده شده در اندام هوایی بطور معنی‌داری بیش از ریشه بود. در شرایط نرمال (تیمار ۱) نسبت سدیم به پتاسیم در ریشه بیش از اندام هوایی بود ولی با افزودن نمک‌های معدنی مختلف به محیط ریشه گیاهچه‌ها، در اکثر تیمارها، نسبت سدیم به پتاسیم ریشه بالاتر از اندام هوایی بود. نسبت سدیم به پتاسیم به عنوان یکی از صفات کلیدی در تعیین میزان تحمل شوری در گیاهان مختلف از جمله برنج (اسلم و همکاران، ۲۰۰۳)، معرفی شده است.

غلظت یون کلسیم در تمام تیمارها در اندام هوایی بیش از ریشه بود. نتایج این آزمایش نشان داد که با افزودن نمک NaCl به محیط ریشه گیاهچه‌ها، میانگین غلظت یون کلسیم در اندام هوایی افزایش یافت (۱/۵۸ برابر شد) ولی در ریشه کاهش معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال مشاهده شد (۰/۵۶ برابر شد) (جدول ۲). الهنداوی و همکاران (۲۰۰۵) افزایش غلظت یون کلسیم، تحت شرایط تنش NaCl را یکی از شاخص‌های تحمل گیاه به شوری اعلام کردند. آنها گزارش دادند که گیاهان حساس به شوری، توانایی کمتری برای جذب کلسیم، تحت تنش شوری دارند. لاسردا و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیقی بر روی ارقام مختلف سورگوم، کاهش جذب کلسیم در ارقام حساس به شوری را در شرایط تنش، گزارش دادند. نعمتی و همکاران (۲۰۰۸) نیز کاهش غلظت یون کلسیم را در اثر اعمال نمک NaCl، در گیاهچه‌های برنج گزارش کردند. همانطور که در جدول ضرایب همبستگی (جدول ۵) نشان داده شده است، غلظت یون کلسیم با تمام یون‌های اندازه‌گیری شده رابطه منفی و معنی‌دار در سطح ۱ درصد داشت. غلظت یون منیزیم در ریشه گیاهچه‌های مورد مطالعه در تمامی تیمارها، بطور معنی‌داری بیش از اندام هوایی بود، بطوری که میانگین غلظت یون منیزیم در ریشه در حدود ۲/۹۲ برابر اندام هوایی بود (جدول ۲). هیچکدام از تیمارها بر غلظت یون منیزیم در اندام هوایی تأثیر معنی‌داری نداشتند (جدول ۳)، در حالی که در ریشه گیاهچه‌های مورد مطالعه، تمامی اثرات ساده و اثر متقابل بین NaCl و KCl و همچنین اثر متقابل سه‌گانه بین تیمارها، تأثیر معنی‌دار بر غلظت یون منیزیم داشت (جدول ۴). اعمال تیمار NaCl موجب کاهش ۱۸ درصد در غلظت یون منیزیم در اندام هوایی و ۱۵/۴۹ درصد در ریشه شد (جدول ۲). با توجه به جدول ۵، مشاهده می‌گردد که غلظت یون منیزیم با سدیم، کلر و سولفات رابطه معنی‌دار مثبت و با کلسیم، رابطه منفی معنی‌دار داشت. نتایج نشان داد که افزودن KCl تأثیری بر غلظت یون منیزیم در ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌ها نداشت. در حالی که افزودن $CaCl_2$ موجب افزایش غلظت یون منیزیم در اندام هوایی به میزان ۱/۱۶ برابر شد ولی بر غلظت منیزیم در ریشه تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۲). گزارش‌های مختلفی در رابطه با تغییرات یون منیزیم در گیاه در اثر اعمال تنش شوری وجود دارد که حاکی از کاهش (بورسیر و همکاران، ۱۹۸۷) و یا عدم تغییر غلظت این یون در اثر اعمال تیمار NaCl می‌باشد.

یکی از اثرات تنش شوری، اختلال در جذب عناصر غذایی مختلف می‌باشد و در صورت وجود یون سدیم در محیط، افزایش غلظت این یون در گیاه مشاهده می‌گردد. در این حالت برای حفظ پتانسیل الکتروشیمیایی غشای سلول، آنیون‌ها نیز باید توسط سلول جذب گردند. مهمترین آنیون‌هایی

که در اثر اعمال تیمار شوری تغییر غلظت می‌دهند عبارتند از آنیون‌های نیترات، سولفات و کلر (چیزمن، ۱۹۸۸). بطور کلی غلظت یون نیترات در شرایط تنش و نرمال در اندام هوایی رقم مورد مطالعه، بطور معنی‌داری بیشتر از ریشه بود (۱/۱۴ برابر). علت این موضوع ممکن است تجمع نیترات در برگ‌های گیاهچه‌ها، بدلیل تبخیر و تعرق باشد. همچنین ریشه محل جذب و انتقال مواد است در حالی که محل اصلی انجام فرآیندهای فیزیولوژیک در برگ است. نتایج این آزمایش نشان داد که افزودن KCl تأثیری بر غلظت یون نیترات در گیاهچه‌های مورد مطالعه نداشت (جدول ۲). افزودن نمک NaCl نیز تأثیری بر غلظت آنیون نیترات در اندام هوایی گیاهچه‌ها نشان نداد در حالی که در ریشه گیاهچه‌های مورد مطالعه، غلظت یون نیترات نسبت به تیمارهای عدم کاربرد NaCl، ۴۴/۴۳ درصد افزایش نشان داد (جدول ۲). افزودن $CaCl_2$ نیز تأثیر معنی‌داری بر غلظت آنیون نیترات در گیاهچه‌های مورد بررسی نداشت ولی موجب افزایش ۱۰/۷۶ درصدی غلظت نیترات در اندام هوایی شد (جدول ۲).

اندازه‌گیری غلظت آنیون سولفات نشان داد که تجمع این یون در اندام هوایی گیاهچه‌ها بیش از ریشه بود (جدول ۲). جدول ضرایب همبستگی (جدول ۵) نشان می‌دهد که غلظت سولفات رابطه مثبت و معنی‌دار با سدیم، کلر و منیزیم و رابطه منفی و معنی‌دار با کاتیون کلسیم داشت. غلظت سولفات در اندام هوایی بطور معنی‌داری بالاتر از ریشه بود و تجمع آن تقریباً ۱/۲۹ برابر ریشه بود. افزایش NaCl نیز تأثیر معنی‌داری بر تجمع آنیون سولفات در اندام هوایی گیاهچه‌ها داشت بطوریکه تحت شرایط اعمال تیمار NaCl، غلظت آنیون سولفات در اندام هوایی نسبت به شرایط عدم کاربرد NaCl، ۲۱/۱۳ درصد افزایش نشان داد. اعمال تیمار KCl موجب کاهش غلظت یون سولفات در اندام هوایی (۹/۶۷ درصد) و ریشه (۱۱ درصد) شد. همچنین کاربرد نمک $CaCl_2$ در محیط اطراف ریشه موجب تغییر معنی‌داری در غلظت آنیون سولفات در ریشه گیاهچه‌های مورد مطالعه نشد ولی غلظت آن در اندام هوایی بطور معنی‌داری (۲۴/۵۱ درصد) کاهش یافت (جدول ۲).

جدول ۳- تجزیه واریانس غلظت آبیون‌ها و کاتیون‌ها در اندام هوایی گیاهچه‌های مورد مطالعه.

میانگین مربعات							درجه	منابع تغییرات
سدیم	پتاسیم	کلسیم	منیزیم	کلر	نیترات	سولفات	آزادی	
۳۶۴۹۹۰/۱۰۰ ^{ns}	۲۳۵۰۱۷۱/۶۰ ^{ns}	۲۷۴۴۳۵۰/۱۰۰ ^x	۵۳۹۶۷۸۲ ^{ns}	۲۰۶۰۵۷۲۰/۱۰۰ ^{ns}	۲۸۱۴/۷۵ ^{ns}	۱۲۱/۵۲ ^{ns}	۱	NaCl
۹۷۱۲۴۸۷ ^{ns}	۱۱۵۰۰۵۵۶/۱۰۰ ^{ns}	۲۰۷۷۴۶/۵۰ ^{ns}	۴۵۰۳۸/۱ ^{ns}	۱۴۰۴۳۵۲/۱۰۰ ^{ns}	۳۳۸۵/۳۳ ^{ns}	۳۴/۴۰ ^{ns}	۱	KCl
۵۲۸۳۱۷۴ ^{ns}	۳۱۵۹۵/۳۲ ^{ns}	۴۳۶۷۲/۶۸ ^{ns}	۳۱۸۴/۲۲ ^{ns}	۱۲۳۵۲۹۶/۱۰۰ ^{ns}	۳۳۲۶۰/۰۷ ^x	۲۵۹/۶۹ ^{ns}	۱	CaCl2
۴۸۱۷۴/۷۳ ^{ns}	۱۰۸۷۶۹۴/۱۰۰ ^{ns}	۶۵۷۳۴۶/۱۰۰ ^{ns}	۴۹/۷۲ ^{ns}	۱۲۶۰۴۳۰/۱۰۰ ^{ns}	۱۵۹۴۰/۰۵ ^{ns}	۲۳۱/۲۳ ^{ns}	۱	NaCl × KCl
۶۹۸۶۵۰ ^{ns}	۸۵۲۴۷۴۳/۶۰ ^{ns}	۳۸۱۵۷۷/۶۰ ^{ns}	۷۲۸/۹۵ ^{ns}	۶۹۸۹۷۲/۴۷ ^{ns}	۱۲۹۳۶۰/۰۰ ^{ns}	۳۳۶۷/۴ ^{ns}	۱	NaCl × CaCl2
۷۰۷/۱۶ ^{ns}	۹۷۷/۵۹ ^{ns}	۲۶۱۹۳۷/۸۰ ^{ns}	۱۴۶۵/۱۶ ^{ns}	۱۳۸۰۰۶/۴۰ ^{ns}	۱۰۷۵۵۹/۹۰ ^{ns}	۱۱۹/۲۷ ^{ns}	۱	KCl × CaCl2
۳۷۱/۳۴ ^{ns}	۴۳۷۰/۸۹ ^{ns}	۵۸۱۶۷۵/۵۰ ^{ns}	۵۸۹/۲۵ ^{ns}	۱۰۱۴۴۹۷/۷۰ ^{ns}	۱۴۰۲۶۷/۲۰ ^{ns}	۱۴/۰۱ ^{ns}	۱	NaCl × KCl × CaCl2
۱۹۰۸۸۶ ^{ns}	۱۳۳۵۹۶۷۳	۵۸۸۱۰/۸۰	۱۴۴۸/۳۱	۷۷۱۸۳۸/۱۶	۴۷۸۹/۵۴	۹/۷۱	۲۴	خطا
۷/۸۳	۷/۵۲	۹/۳۵	۱۴/۱۹	۱۶/۵۸	۱۰/۹۵	۱۵/۲۹	-	ضریب تغییرات

ns و ** بدرتیب معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد، ns غیر معنی‌دار

جدول ۴- تجزیه واریانس غلظت آنیون‌ها و کاتیون‌ها در ریشه گیاهچه‌های مورد مطالعه.

سدیم	پتاسیم	کلسیم	منیزیم	کلر	نیترات	سولفات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۷۶۲۲۱/۶۹ ^{NS}	۱۸۰۲۸۴۳۶/۲۰ ^{NS}	۵۲۷۳۳۱/۱۲ ^{NS}	۳۳۳۱۸۸۷ ^{NS}	۲۰۵۴۱۹۸/۹۰ ^{NS}	۳۳۱۲۱۳/۱۴ ^{NS}	۴/۶۸ ^{NS}	۱	NaCl
۵۸۲۲۷/۴۸ ^{NS}	۶۱۱۹۰۱۴۴/۵۰ ^{NS}	۷۵۹۲۶/۲۲ ^{NS}	۱۲۵۹۲/۴۴ ^{NS}	۵۷۰۴۱۰۷/۸۷ ^{NS}	۹۱۱۱/۱۵ ^{NS}	۲۶/۸۲ ^{NS}	۱	KCl
۷/۰۵ ^{NS}	۱۴۲۱۴۹/۸۸ ^{NS}	۵۵۶۱/۶۹ ^{NS}	۸۴۵۰/۳۳ ^{NS}	۱۱۴۰۷۷۴/۹۲ ^{NS}	۹۴/۶۰ ^{NS}	۵/۳۴ ^{NS}	۱	CaCl2
۸۴۶۵۵/۳ ^{NS}	۱۵۷۱۸۳۷۷/۸۰ ^{NS}	۴۸۹۸۴۴/۵۹ ^{NS}	۱۵۱۸۷/۱۹ ^{NS}	۶۷۳۲۵۶۰/۸۰ ^{NS}	۳۷۱۴/۳۵ ^{NS}	۳/۴۴ ^{NS}	۱	NaCl × KCl
۲۸۲۷/۸۹ ^{NS}	۱۸۹۰۱۷۵/۵۵ ^{NS}	۶۰۷۰۷/۸۳ ^{NS}	۲۳۶۴/۴۸ ^{NS}	۱۲۲۸۷۰۰/۵۶ ^{NS}	۵۱۶۸۲/۸۳ ^{NS}	۱۸/۴۲ ^{NS}	۱	NaCl × CaCl2
۵۷۰۸/۴۶ ^{NS}	۴۱۳۹۶/۴۳ ^{NS}	۲۱۹۲۰۹/۸۳ ^{NS}	۳۲۲۶/۶۵ ^{NS}	۱۴۷۶۵۸/۹۳ ^{NS}	۶۴۳۶۴/۸۱ ^{NS}	۳۳/۰۸ ^{NS}	۱	KCl × CaCl2
۲۰۵۱/۲۰ ^{NS}	۱۲۱۳۱۹۵/۱۷ ^{NS}	۲۲۸۱۱/۲۸ ^{NS}	۴۶۲۸/۵۲ ^{NS}	۱۴۴۹۰۲/۲۸ ^{NS}	۷۰۲۸/۳۳ ^{NS}	۰/۱۴ ^{NS}	۱	NaCl × KCl × CaCl2
۱۵۸۲/۰۳	۴۲۰۲۱۵/۱۹	۱۴۲۲۷/۴۷	۱۴۲۷/۶۳	۲۲۷۸۳/۳۱	۲۸۲۲/۸۶	۳/۸۴	۲۴	خطا
۱۸۸۷۵	۲۰/۹۸	۹/۹۵	۲۵/۸۷	۵/۹۴	۹/۸	۱۲/۷	-	ضریب تغییرات

NS: غیر معنی‌دار
* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد، NS: غیر معنی‌دار

نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که کاربرد نمک‌های مختلف در محیط ریشه گیاهچه‌های یونجه مورد مطالعه، موجب افزایش معنی‌دار غلظت یون کلر در اندام هوایی شد، در حالی که غلظت یون کلر در ریشه گیاهچه‌ها، تحت تیمارهای مختلف تغییر چندانی نشان نداد. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، افزایش NaCl به محیط ریشه گیاهچه‌ها موجب افزایش غلظت یون کلر در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها شد. افزایش مشاهده شده در میانگین غلظت یون کلر تحت تیمارهای مختلف در اندام هوایی ۳/۳۶ و در ریشه ۱/۸۹ برابر بود. لاسردا و همکاران (۲۰۰۳) اعلام کردند که تجمع آنیون کلر در شرایط تنش NaCl در گیاهان حساس به شوری بیش از گیاهان متحمل بود. نعمتی و همکاران (۲۰۱۱) نیز افزایش غلظت یون کلر را در زمان اعمال تیمار NaCl گزارش دادند. نتایج این آزمایش نشان داد که با افزودن نمک‌های KCl و CaCl₂، غلظت یون کلر در اندام‌های گیاهچه‌های مورد مطالعه افزایش معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). افزودن KCl به محیط ریشه، موجب افزایش غلظت یون کلر در اندام هوایی (۱/۳۲ برابر) و ریشه (۱/۳۸ برابر) شد. همچنین با افزودن CaCl₂ به محیط ریشه نیز غلظت یون کلر در اندام هوایی (۳۰/۵۶ درصد) و ریشه (۱۵/۷۲ درصد) نسبت به عدم کاربرد CaCl₂ افزایش یافت. افزایش مشاهده شده در غلظت یون کلر ممکن است ناشی از افزایش غلظت کلر در محیط ریشه گیاه باشد. تستر و داونپورت (۲۰۰۳) اعلام کردند که سمیت NaCl در گیاهان زراعی بیشتر مربوط به یون سدیم می‌باشد تا کلر. جدول (۵) نشان می‌دهد که غلظت یون کلر با یون‌های کلسیم، نیترات و سولفات رابطه منفی و معنی‌دار داشت. پلیت (۲۰۰۵) اعلام کرد که افزایش غلظت کلسیم در محیط از طریق بستن کانال‌های کاتیونی بطور غیرمستقیم بر جذب کلر نیز تاثیرگذار می‌باشد.

جدول ۵- ضرایب همبستگی پیرسون بین آنیون‌ها و کاتیون‌های اندازه‌گیری شده.

سولفات	نیترات	کلر	منیزیم	کلسیم	پتاسیم	سدیم	
۰/۴۷ ^{xx}	۰/۲۱ ^{ns}	۰/۷۵ ^{xx}	۰/۵۵ ^{xx}	-۰/۷ ^{xx}	۰/۱۴ ^{ns}	۱	سدیم
۰/۰۱ ^{ns}	-۰/۰۶ ^{ns}	۰/۳۹ ^{xx}	۰/۱ ^{ns}	-۰/۲۶ ^x	۱		پتاسیم
-۰/۴۱ ^{xx}	-۰/۳ ^x	-۰/۴۷ ^{xx}	-۰/۵۲ ^{xx}	۱			کلسیم
۰/۵۱ ^{xx}	۰/۰۹ ^{ns}	۰/۳ ^x	۱				منیزیم
۰/۲۶ ^x	۰/۳ ^x	۱					کلر
-۰/۱۱ ^{ns}	۱						نیترات
۱							سولفات

xx و x به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد، ns: غیر معنی‌دار

اعمال تنش شوری موجب تغییر غلظت املاح آلی مختلف درون بافت‌های گیاه می‌گردد که این تغییرات در گیاهان مختلف و حتی در گونه‌های مختلف یک رقم نیز متفاوت از سایر ارقام است. با توجه به گزارش‌های مختلف، حتی سطح اعمال تنش شوری نیز ممکن است موجب بروز پاسخ‌های مختلف گیاه به تنش شود.

اعمال تیمار با هر سه نوع نمک موجب افزایش معنی‌دار غلظت کلروفیل a در اندام هوایی گیاهچه‌های مورد مطالعه گردید ولی کاربرد نمک‌های NaCl و CaCl₂ تأثیر معنی‌داری بر غلظت کلروفیل b نداشت (جدول ۷). تیمار KCl موجب افزایش نسبت کلروفیل a به b به میزان ۲/۲۷ برابر شرایط عدم کاربرد این نمک شد. افزایش غلظت کلروفیل کل در اثر اعمال تنش شوری قبلاً نیز توسط سینگ و دبی (۱۹۹۵) اعلام شده بود. نتایج نشان داد که اعمال تیمار با نمک‌های KCl و CaCl₂ موجب افزایش معنی‌دار نسبت کلروفیل a به کلروفیل b شد. غلظت کل کلروفیل‌های اندام هوایی گیاهچه‌های مورد مطالعه، در شرایط اعمال تیمار با KCl و CaCl₂ افزایش معنی‌داری (به ترتیب ۱/۱۷ و ۱/۲۲ برابر) نسبت به شرایط عدم کاربرد این نمک‌ها، نشان داد (جدول ۶). افزایش غلظت کلروفیل ممکن است علامتی از تحمل گیاه به سطح تنش اعمال شده باشد. چنانچه قبلاً نیز اعلام شده است که در تنش‌های ملایم شوری، غلظت کلروفیل افزایش و در تنش‌های شدید، کاهش می‌یابد. تجزیه واریانس نتایج نشان داد که تمامی اثرات ساده و متقابل بین تیمارهای مختلف بر صفات غلظت کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئیدها، معنی‌دار بود (جدول ۷). غلظت رنگدانه‌های کاروتنوئیدی نیز در اثر اعمال تنش NaCl کاهش معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال نشان داد. نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تمامی اثرات ساده و متقابل بر غلظت پروتئین‌های کل، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و مالون دی‌آلدهید (MDA) از نظر آماری معنی‌دار است (جدول ۷). پراکسیداسیون چربی‌ها معمولاً از طریق اندازه‌گیری غلظت MDA برآورد می‌گردد.

همبستگی بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مختلف با میزان تحمل به شوری گیاهان قبلاً اعلام شده است (بور و همکاران، ۲۰۰۳ و دمیرال و ترکان، ۲۰۰۵). بر اساس گزارش سکمن و همکاران (۲۰۰۷) گیاهان متحمل به شوری توانایی بیشتری برای تحمل شوری با استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را دارند. اعمال تنش NaCl موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شد. اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم نشان داد که میانگین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمارهای اعمال KCl و CaCl₂، به ترتیب ۷۵ و ۷۶ درصد نسبت به تیمارهای عدم اعمال این نمک‌ها افزایش

داشت (جدول ۶). بر اساس گزارش ونگ و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اثر اعمال تنش NaCl در گیاهچه‌های یونجه افزایش یافت. تنش شوری موجب افزایش فعالیت این آنزیم در اندام هوایی گندم (منگزو و ناواریلزو، ۱۹۹۹)، گوجه فرنگی (رودریگوز-روزالز و همکاران، ۱۹۹۹) و برگ‌های برنج (لی و همکاران، ۲۰۰۱) و کاهش آن در برگ‌های پنبه (گوست و همکاران، ۱۹۹۴) می‌شود. نتایج بدست آمده از آزمایش حاضر نشان داد که اعمال تیمار با نمک NaCl موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام هوایی گیاهچه‌های یونجه شد. تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده، تأثیر معنی‌دار تمامی اثرات ساده را بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد (جدول ۷). براساس گزارش ونگ و همکاران (۲۰۰۹) میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با تحمل به شوری گیاه، همبستگی مستقیم دارد. بور و همکاران (۲۰۰۳) نیز رابطه مستقیم بین کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها با افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز گزارش داد.

تنش NaCl تأثیر معنی‌داری بر غلظت پروتئین‌های محلول کل داشت (جدول ۷). بیشترین غلظت پروتئین‌های محلول کل در تیمار کاربرد نمک NaCl بدون اعمال سایر نمک‌ها مشاهده شد. این موضوع ممکن است ناشی از شدت تنش در این تیمار باشد و تجمع پروتئین‌های محلول در واقع به منظور تنظیم اسمزی اندام هوایی گیاهچه‌ها تجمع یافته باشد.

در شرایط تنش شوری، بدلیل کاهش پتانسیل اسمزی محلول غذایی اطراف ریشه، گیاه برای جذب آب دچار مشکل خواهد شد. از این رو با تجمع مواد محلول مختلف از جمله پروتئین‌های محلول، پتانسیل آب درون بافت گیاه کاهش یافته و جذب آب از طریق ریشه ادامه خواهد یافت. ولی در شرایط کاربرد KCl و $CaCl_2$ همزمان با NaCl غلظت پروتئین‌های محلول کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار NaCl نشان داد (جدول ۶). ممکن است که این موضوع ناشی از کاهش شدت تنش NaCl، در اثر کاربرد نمک‌های پتاسیم و کلسیم در محیط ریشه باشد، زیرا تجمع پروتئین‌های محلول در بافت‌های گیاه، به عنوان یک پاسخ به تنش خشکی ناشی از شوری معرفی شده است. گزارش‌های مختلف نشان داد که در اثر اعمال تنش شوری، در ارقام متحمل جو، برنج و آفتابگردان، غلظت پروتئین‌های محلول افزایش (اشرف و هریس، ۲۰۰۴) و در باقلا و تاج‌خروس کاهش (پروایز و ساتیاواتی، ۲۰۰۸) داشت. اشرف و فاطیما (۱۹۹۵) نیز اعلام کردند که تحت تنش شوری، بین غلظت پروتئین‌های محلول ارقام متحمل و حساس گیاه آفتابگردان، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

جدول ۶- میانگین غلظت املاح آلی اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های مورد مطالعه تحت تیمارهای مختلف (میانگین \pm تکرار \pm خطای استاندارد).

a	کلروفیل	b	کلروفیل	مجموع کل	کلروفیلها	کاروتنوئیدها	آلدئید - مالون‌دی - پروتئین‌های محلول	آسکوربات	پروکسیداز	CaCl ₂ (میلی مولار)	KCl (میلی مولار)	NaCl (میلی مولار)
۲۴/۸۴±۰/۰۸	۴/۶۶±۰/۷۴	۵۴/۸۲±۰/۰۲	۱/۷۹±۰/۰۲	۳/۸۹±۰/۰۶	۱۳۴/۹۵±۲/۵۲	۳/۸۹±۰/۱۴	۳/۸۹±۰/۱۴	۳/۸۹±۰/۱۴	۳/۸۹±۰/۱۴	۰	۰	۰
۲۰/۵۷±۰/۷۱	۳/۸۶±۰/۱۱	۴۱/۹۹±۰/۰۸	۷/۸۹±۰/۰۲	۲/۸۲±۰/۰۵	۱۰۳/۹۸±۱/۹۴	۱۷/۶۶±۰/۶۶	۱۷/۶۶±۰/۶۶	۱۷/۶۶±۰/۶۶	۱۷/۶۶±۰/۶۶	۲۰	۲۰	۲۰
۲۵/۰۵±۰/۷۱	۵/۵۶±۰/۰۵	۵۷/۰۳±۰/۰۷	۰/۰۰±۰/۰۰	۱/۴۷±۰/۰۱	۱۲۵/۶۹±۲/۳۵	۳/۸۹±۰/۱۴	۳/۸۹±۰/۱۴	۳/۸۹±۰/۱۴	۳/۸۹±۰/۱۴	۰	۴۰	۰
۳۵/۰۳±۰/۱۱	۳/۵۶±۰/۱۱	۶۵/۱۳±۰/۰۶	۳/۲۱±۰/۰۶	۵/۴۲±۰/۰۷	۱۷/۱۲±۱/۳۷	۸/۸۳±۰/۳۳	۸/۸۳±۰/۳۳	۸/۸۳±۰/۳۳	۸/۸۳±۰/۳۳	۲۰	۲۰	۱۰۰
۰/۸۱±۰/۸۳	۵/۰۳±۰/۰۵	۵۷/۰۳±۰/۰۷	۰/۰۰±۰/۰۰	۱/۰۷±۰/۰۰	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۰	۰	۰
۳۱/۸۳±۰/۰۳	۸/۰۳±۰/۰۵	۵۷/۰۳±۰/۰۷	۳/۰/۰۳±۰/۰۱	۵/۰/۰۳±۰/۰۱	۶۵/۱۳±۱/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۰	۲۰	۴۰
۱۳/۰۳±۰/۰۱	۵/۰/۰۳±۰/۰۱	۵۷/۰۳±۰/۰۷	۵/۰/۰۳±۰/۰۱	۳/۰/۰۳±۰/۰۱	۶۵/۱۳±۱/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۱/۰/۰۹±۰/۳۷	۲۰	۲۰	۲۰

جدول ۷- تجزیه واریانس غلظت املاح آلی گیاهچه‌های مورد مطالعه

برکسیداز	میانگین مربعات					درجه آزادی	منبع تغییرات				
	برکسیداز	آسکوربات برکسیداز	پروتئین	مالون دی‌آلدهید	توریتوید			کل کلروفیل	کلروفیل a	کلروفیل b	
۳۳/۱۳ ^{xx}	۳۷۴۰ ^x	۲۱۰۳۸ ^{xx}	۱/۴۰ ^{xx}	۴/۴۹ ^{xx}	۱۶۳۷ ^{ns}	۱	NaCl	۶۱/۹۷ ^{xx}	۰/۳۷ ^x	۲۵	خطا
۹/۰۹ ^{xx}	۴۲۶۶ ^{xx}	۱۴۰۱۰۸۳ ^{xx}	۹/۴۴ ^{xx}	۰/۱۸ ^{xx}	۶۰۸۷۸ ^{xx}	۱	KCl	۶۴/۵۶ ^{xx}	۴۷/۱۳ ^{xx}	۲۴	ضریب تغییرات
۱۱/۸۶ ^{xx}	۴۷۲۰ ^{xx}	۹۱۳۰/۸۶ ^{xx}	۳/۳۶ ^{xx}	۳/۵۰ ^{xx}	۳۷۱۶ ^x	۱	NaCl×KCl	۱۴/۹۳ ^x	۶/۵۴ ^{xx}		
۱۵/۱۰ ^{xx}	۶۰/۰۹ ^{xx}	۱۶۹۲۹/۸۰ ^{xx}	۳۲/۵۱ ^{xx}	۸/۶۴ ^{xx}	۹۷۸/۱۱ ^{xx}	۱	CaCl2	۱۹۹/۳۷ ^{xx}	۰/۳۲ ^x		
۰/۹۲ ^{ns}	۳۳/۱۸ ^x	۲۱۰۸/۸۲ ^{xx}	۰/۸۷ ^{xx}	۱/۱۱ ^{xx}	۳۸۲/۸۲ ^{xx}	۱	NaCl×CaCl2	۱۰/۴۸ ^{xx}	۰/۳۸ ^x		
۱/۸۳ ^{ns}	۲۵۶۴۶ ^{xx}	۸۳۲۷/۰۳ ^{xx}	۹/۳۷ ^{xx}	۰/۲۲ ^{xx}	۱۴۱۸۸۸ ^{xx}	۱	KCl×CaCl2	۵۹۴/۲۷ ^{xx}	۰/۹۷ ^{xx}		
۰/۳۷ ^{ns}	۲۷۱/۲۸ ^{xx}	۷۷۱۹/۶۴ ^{xx}	۱۱/۰۵ ^{xx}	۱۵/۰۰ ^{xx}	۱۵۵۷۰/۴۲ ^{xx}	۱	NaCl×KCl×CaCl2	۲۹۲۲/۸۸ ^{xx}	۷/۵۴ ^{xx}		
۰/۸۱	۵/۳۳	۲۰/۴۵	۰/۰۱	۰/۰۰	۵/۰۱	۲۴		۲/۵۹	۰/۰۵		
۱۹/۹۱	۲۱/۱۴	۴	۴/۱۶	۵/۰۸	۴/۱۰	-		۶/۱۳	۶/۷۲		

xx و x به ترتیب معنی دار در سطح ۱ و ۵ درصد، ns: غیر معنی دار

این آزمایش نشان داد که در گیاهچه‌های مورد مطالعه، سازوکار دفع نمک، کمتر مشاهده شد و گیاهچه‌ها قادر به جلوگیری از تجمع نمک در اندام هوایی خود نبودند و بخش زیادی از سدیم جذب شده به اندام هوایی گیاهچه‌ها انتقال یافت. با توجه به اینکه کاهش وزن اندام هوایی در اثر اعمال NaCl در گیاهچه‌ها مشاهده نشد، از این رو می‌توان اظهار نمود که ممکن است گیاه از سازوکار تجمع نمک برای تحمل تنش شوری استفاده می‌کند. همچنین، کاربرد نمک‌های KCl در محیط ریشه موجب کاهش تجمع یون سمی سدیم در گیاه گردید و موجب افزایش وزن خشک ریشه گیاهچه‌های مورد مطالعه شد. یک رابطه منفی بین غلظت کلسیم با سدیم مشاهده شد. در پایان نیز لازم به ذکر است که برای درک بهتر سازوکارهای این گیاه ارزشمند در برابر تنش شوری و شناخت روابط بین املاح مختلف در اندام‌های گیاه، انجام آزمایشات تکمیلی با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر، با استفاده از تیمارهای مختلف و در سطوح متفاوت، ضروری می‌باشد.

منابع

- Apse, M.P., and Blumwald, E. 2007. Na⁺ transport in plants. FEBS Letters. 581: 2247-2254.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24:1-15.
- Arshi, A., Ahmad, A., Aref, I.M., and Iqbal, M. 2010. Effect of calcium against salinity-induced inhibition in growth, ion accumulation and proline contents in *Cichorium intybus* L. J. Environ. Biol. 31: 939-943.
- Ashraf, M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. Flora. 199: 361-376.
- Ashraf, M., and Fatima, H. 1995. Responses of some salt tolerant and salt sensitive lines of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Acta Physiol. Plant. 17: 61-71.
- Ashraf, M., and Harris, P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science. 166: 3-16.
- Aslam, A., Muhammad, N., Qureshi, R.H., Ahmad, Z., Navaz, S., and Akhtar, J. 2003. Calcium and salt tolerance of rice. Commun. Soil Sci. Plant. 34: 3013-3031.
- Bor, M., Ozdemir, F., and Turkan, I. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and wild beet (*Beta maritima* L.) Plant Sci. 164: 77-84.
- Boursier, P., Lynch, J., Lauchli, A., and Epstein, E. 1987. Chloride partitioning in leaves of salt stressed sorghum, maize, wheat and barley. Aust. J. Plant Physiol. 14: 463-473.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
- Carden, D.E, Walker, D.J., Flowers, T.J., and Miller, A.J. 2003. Signal cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiol.* 131: 676-683.
- Chaparzadeh, N., Amico, M.L.D., Khavarinejad, R.A., Izzo, R., Navari-Izzo, F. 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 695-701.
- Cheeseman, J.M. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol.* 87:547-550.
- Demiral, T., and Turkan, I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 53: 247-257.
- El-Hendawy, S.E., Hu, Y., and Schmidhalter, U. 2005. Growth, ion content, gas exchange, and water relation of wheat genotypes differing in salt tolerances. *Aust. J. Agric. Research.* 56: 123-134.
- Emami, A. 1996. Methods for Plant Analysis. Technical issue No. 182. Soil and water research Institute. 125p.
- Etehadnia, M., Schoenau, J., Waterer, D., and Karen, T. 2010. The effect of CaCl₂ and NaCl salt acclimation in stress tolerance and its potential role in ABA and scion/rootstock-mediated salt stress potential. *Plant Stress.* 1: 72-81.
- Flowers, T.J., and Hajibagheri, M.A. 2001. Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing salt tolerance. *Plant Soil.* 231: 1-9.
- Jafari, M.H.S., Kafi, M., and Astaraei, A. 2009. Interactive effects of NaCl induced salinity, calcium and potassium on physiomorphological traits of sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Pakistan J. Bot.* 41: 3053-3063.
- Gholizadeh, S., Moradi, F., and Nemati, I. 2009. Study of changes in vacuolar volume in meristemic cells at root tip of rice (*Oryza sativa* L.) under saline conditions. *Iran. J. Agron. Sci.* 11: 353-366.
- Gosset, D.R., Millhollon, E.P., and Lucas, M.C. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci.* 34: 706-714.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 51:463-499.
- Kant, M.G., Silverbusch, M., Lips, S.H. 1994. Physiological studies on salinity and nitrogen interaction in alfalfa. I. Biomass production and root development. *J. Plant Nutr.* 17:657-668.

- Lacerda, C.F., Cambraia, J., Cano, M., Ruiz, H.A., and Prisko, J.T. 2003. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotype under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 49: 107-120.
- Lee, D.H., Kim, Y.S., and Lee, C.B. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Plant physiol.* 158: 737-745.
- Maser, P., Gierth, M., and Schroeder, I.J. 2002. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plant. *Plant Soil.* 247: 43-54.
- Meidner, H. 1984. *Class Experiment in Plant Physiology.* Georg & Allen Union. London
- Meneguzzu, S. and Navarilzzo, I. 1999. Antioxidant responses of shoots and roots of an efficient chloroplast antioxidant system in the-salt tolerant wild tomato species (*Lycopersicon penellii*) but not in the cultivated species. *Physiol. Planta.* 115: 393-400.
- Mezni, M., Bizid, E., and Hamza, M. 1999. Effet de la salinite des eaux dirrigation sur la survie et la croissance de trios cultivars de la Luzerne preenne. *Fourrages.* 158:169-178.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25:239-250.
- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167: 645-663.
- Nemati, I., Moradi, F., Esmaeili, M.A., Gholizadeh, S. 2009. Effect of salinity stress on water status, osmotic adjustment, and sodium and potassium compartmentations and distributions in seedlings of two rice genotypes. *Iran. J. Agron. Sci.* 10(2): 146-164.
- Nemati, I., Moradi, F., and Gholizadeh, S., Esmaeili, M.A., and Bihamta, M.R. 2011. The effect of salinity stress on ions and soluble sugars distribution in leaves, leafsheaths and roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil Environ.* 57: 26-33.
- Pareek-Singla, S.L., and Grover, A. 1997. Salt responsive proteins/genes in crop plants. In: Jaiwal, P.K., Singh, R.P., and Gulati, A. (eds.): *Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plants.* Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.
- Parvaiz, A., and Satyawati, S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants- a review. *Plant, Soil and Environment.* 54: 89-99.
- Plieth, C. 2005. Calcium: Just another regulator in the machinery of life? *Ann. Bot.* 96: 1-8.
- Rudriguez-Rosalez, M.P., KerKeb, L., Bueno, P., and Donaire, J.P. 1999. Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.) calli. *Plant Sci.* 143: 143-150.

- Roger, M.E. 1998. Salinity effects on irrigated Lucerne. In proceeding of the 9th Australian Agronomy Conference. Wagga wagga.
- Sekmen, A.H., Turkan, I., Takio, S. 2007. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt tolerant *Plantago maritima* and salt sensitive *Plantago media*. *Physiologia Planta*. 131: 399- 411.
- Singh, A.K., and Dubey, R.S. 1995. Changes in chrophyll a and b contents and activities of photosystem I and II in rice seedlings induced by NaCl. *Photosynthetica*. 31: 489-499.
- Srinivas, N.D., Rashmi, K.R., and Raghavarao, K.S.M.S. 1999. Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration. *Process Biochem*. 35, 43-48.
- Teakle, N., and Tyerman, S.D. 2010. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell and Environment*. 33(4): 566-589.
- Tester, M., and Dovenport, R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot*. 91:503-527.
- Wang, W.B., Kim, Y.H., Lee, H.S., Kim, K.Y., Deng, X.P., and Kwak, S.S. 2009. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiol. Biochem*. 47: 570-577.
- Wang, X., Zhenwu, W., Liu, D., and Zhao, G. 2011. Effect of NaCl and silicon on activities of antioxdative enzymes in roots, shoots and leaves of alfalfa. *African J. Biotech*. 10: 545-549.
- Yamaguchi, K., Mori, H., and Nishimura, M. 1995. A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol*. 36: 1157-1162.
- Zhu, J.S., Kinet, J.M., and Lutts, S. 2001. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) F-3 populations selected for salt resistance. I. Physiological behavior during vegetative growth. *Euphytica*. 121: 251-263.



Study of different salts effect and their interaction on concentration of organic and inorganic solutes and antioxidant enzymes activity in alfalfa seedlings

***I. Nemati¹, S. Gholizadeh¹ and F. Moradi²**

¹Lecturer of Islamic Azad University of Khoramshahr branch, ²Assistant Prof.,
Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran

Received: 2011-09-12 ; Accepted: 2012-06-23

Abstract

In order to investigate the effect of sodium chloride, potassium chloride and calcium chloride on organic and inorganic solutes and antioxidant enzymes activity in root and shoot of Alfalfa (Baghdaadi cultivar), a factorial experiment base on CRD was conducted using NaCl (0, 100 mmol), KCl (0, 40 mmol) and CaCl₂ (0 and 20 mmol) with four replications in greenhouse of Islamic Azad University (Khorramshahr branch) at 2010. Results showed that NaCl reduced K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ concentration in shoot and root. Applied of KCl and CaCl₂ led to significant increasing of root weight. Also effect of KCl on Na⁺ concentration in root and shoot was significant. A negative and significant correlation was seen between Na⁺ and Ca²⁺. KCl and CaCl₂ increased in Cl⁻ concentration in root and shoot. NaCl caused to raise the chlorophyll *b* content while carotenoids concentration was decreased. Soluble proteins, peroxidase and ascorbat peroxidase activities were increased under NaCl stress.

Keywords: Alfalfa; Ascorbate peroxidase; CaCl₂; Inorganic solutes; KCl; NaCl; Organic and peroxidase

*Corresponding author; Email: iman_nemati2000@yahoo.com

