Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 2, Summer 2019 (409-420)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.250683.1383

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۸ (ص ۴۲۰-۴۰۹)

ارزیابی تغییر برخی ترکیبات حاصل از تنش خشکی در ژنوتیپ‌های طبیعی مرکبات

رضا فیفائی*، جواد فتاحی مقدم و حسین طاهری
استادیار، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۲۷)

چکیده

مرکبات اغلب در معرض خشکی‌های دوره‌ای هستند. به‌همین منظور، اثر تنش خشکی بر میزان برخی ترکیبات در دانهال‌های نوسلار ۸ ژنوتیپ ناشناخته مرکبات شامل ۴-۲، ۲-۵، ۲-۱۲، ۵-۱۰، ۱-۱۰، ۱-۲، بکرایی و لیموآستارایی به‌همراه دو پایه متحمل پونسیروس (*Poncirus trifoliate* Raf.) و حساس رافلمون (*Citrus jambhiri* Lush.) مطالعه شد. این پژوهش، به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در بستر کوکوپیت و ماسه (۱:۱) تحت شرایط گلخانه‌ای انجام شد. فاکتورها شامل ژنوتیپ‌های مرکبات و سطوح آبیاری بودند. نتایج نشان داد در شرایط تنش، پونسیروس با ۲۹۸/۴ میکرومول بر گرم وزن خشک برگ، بیش‌ترین تجمع پرولین را داشت و بیش‌ترین میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهید در رافلمون با ۳۵۶/۹ نانومول بر گرم وزن خشک برگ و کم‌ترین در پونسیروس با ۱۳۴/۴ میکرومول بر گرم وزن خشک مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش، بیش‌ترین میزان قند محلول در ژنوتیپ ۲-۵ با ۹۷/۳۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و کم‌ترین نیز در رافلمون با ۵۱/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ گزارش شد. در شرایط تنش، رافلمون کم‌ترین میزان کلروفیل کل را داشت. ژنوتیپ ۲-۵ با ۹/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، بیش‌ترین و ژنوتیپ لیمو آستارایی با ۴/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، کم‌ترین میزان کاروتنویید کل را داشتند. بیش‌ترین مقدار کلسیم در شرایط تنش در پونسیروس با ۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و کم‌ترین در رافلمون با ۳۲/۶۳ دیده شد. بر این اساس، پونسیروس و ژنوتیپ ۲-۵ به‌عنوان متحمل در برابر خشکی و رافلمون و لیمو آستارایی بعنوان حساس معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: **پرولین، پونسیروس، رافلمون، قند محلول کل، مالون‌دی‌آلدهید.**

Evaluation of changes in some of produced compounds from drought stress in *Citrus* natural genotypes

Reza Fifaei*, Javad Fatahi Moghadam, Hossein Taheri
Assistant Professors, Horticultural Science Research Institute, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran
(Received: Jan. 20, 2018 - Accepted: Jun. 17, 2018)

ABSTRACT

Citrus often are encountered with periodic droughts. For this reason, nucellar seedlings of Poncirus (PT) (*Poncirus trifoliata* Raf.), Rough Lemon (RL) (*Citrus jambhiri* Lush.) and 8 *Citrus* unknown genotypes including of 2-4, 5-2, 12-2, 10-5, 10-1, 2-1, Bakraii and Astaraii lemon were planted in cocopeat and sand medium (1:1) under greenhouse conditions and were subjected to drought stress. This research, was conducted as factorial experiment based on completely randomized design with three replications. The factors were 10 *Citrus* genotypes and two level of irrigation. The results showed that PT with 298.4 µmol/gdw had maximum accumulation of proline in drought stress. Maximum and minimum accumulation of malondialdehyde (356.9 and 134.4 µmol/gdw, respectively) were observed in RF and PT rootstocks under drought stress. Also maximum of total soluble sugar quantities in 5-2 genotype with 97.37 mg/gdw and minimum in RL with 51.57 mg/gdw were reported under drought stress. RF had minimum of total chlorophyll content under drought stress. The most and least of total carotenoid content were seen respectively in genotype 5-2 with 9.4 mg/gdw and Astaraii lemon genotype with 4.4 mg/ g dw in drought stress conditions. Maximum of calcium content was observed in PT with 57 mg/gdw and minimum in RF with 32.63 mg/g dw. On the basis of the study, PT and 5-2 genotype were introduced as tolerant and RL and Astaraii lemon as susceptible to drought.

Keywords: Malondialdehyde, Poncirus, Rought lemon, Proline, Total soluble sugar.

* Corresponding author E-mail: rezafifaei@yahoo.com

مقدمه

مبدا اصلی مرکبات، نواحی نیمه‌گرمسیر و گرمسیر جنوب‌شرقی آسیا، جنوب چین و جزایر مالزی است (Nicolosi, 2007). مرکبات به دمای پایین و زهکشی ضعیف خاک حساسیت نشان داده و اغلب در مناطق گرم با خاک‌های دارای ظرفیت نگهداری آب کم پرورش می‌یابند و بالطبع در معرض خشکی‌های دوره‌ای قرار می‌گیرند (Fereres & Soriano, 2007).

کم‌آبی در بروز تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژی در گیاهان نقش مهمی دارد (Bajaj *et al*., 1999). بررسی پرولین در گونه‌های وحشی و اهلی خانواده روتاسه (Rutaceae) نشان داد میزان این ترکیب بین ۲۰ تا ۱۰۰ میکرومول بر گرم وزن خشک در نوسان بوده است (Nolte *et al*., 1997). در آزمایشی، غلظت پرولین در شرایط آبیاری مطلوب پایین‌ترین مقدار، و در ۲۰ درصد ظرفیت زراعی بالاترین مقدار را در پرتقال 'نیوهال' و نارنگی انشو 'یاماسیتاکا' داشت و این میزان در مقایسه با شاهد در پرتقال 'نیوهال' (*Citrus sinensis* cv. Newhall Osbec.) و نارنگی انشو 'یاماسیتاکا' (*Citrus unshiu* cv. Yamasitaka L.) به‌ترتیب ۱۳۲ و ۱۱۲ درصد افزایش نشان داد (Xie *et al*., 2012). این نتایج در پژوهش دیگری با مطالعه دو تیمار آبیاری کامل و ۱۵ روز بدون آبیاری روی 'کاریزو' سیترنج تاریخته که قابلیت بالایی در تولید و تجمع پرولین داشت نیز در مقایسه با شاهد مشاهده شد (Molinari *et al*., 2004). مطالعه 'سوئینگل' سیترومل تاریخته در مقایسه با شاهد غیرتاریخته، در شرایط تنش آبی نشان داد که غلظت پرولین در گیاهان تاریخته و غیرتاریخته افزایش یافته و به ۱۳۰-۱۲۰ میکرومول بر گرم وزن تازه رسید (de Campos *et al*., 2011). در مطالعه‌ای، تنش خشکی باعث افزایش پرولین در 'کاریزو' سیترنج و 'کلئوپاترا' ماندارین شد (Molinari *et al*., 2004).

بررسی تأثیر میکوریزا و تنش خشکی پیش‌رونده در نهال‌های پرتقال 'نیوهال' روی پایه پونسیروس نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدهید در برگ‌ها با افزایش شدت تنش، افزایش یافت (Wu & Zou, 2009). مطالعه تنش آبی در 'سوئینگل' سیترومل تاریخته در مقایسه با شاهد غیرتاریخته نشان داد که غلظت مالون‌دی‌آلدهید در شرایط آبیاری مناسب در گیاهان تاریخته و غیرتاریخته یکسان است ولی در تنش متوسط و شدید در تاریخته‌ها پایین‌تر است. در تنش متوسط، افزایش معنی‌داری در گیاهان تاریخته مشاهده نشد ولی در تنش شدید این افزایش معنی‌دار بود. در گیاهان غیرتاریخته نیز افزایش معنی‌داری در شرایط تنش متوسط و شدید در مقایسه با شاهد دیده شد (de Campos *et al*., 2011).

در شرایط کم‌آبی، پایه فورنر آلکائید ۵ در مقایسه با والدینش دارای آسیمیلات‌های بیش‌تری بود (Rodríguez-Gamir *et al*., 2010). در آزمایش دیگری، تفاوت معنی‌داری در شدت فتوسنتزی 'کاریزو' سیترنج تاریخته در شرایط آبیاری کامل با گیاهان شاهد غیرتاریخته مشاهده نشد؛ درحالی‌که در شرایط تنش آبی، گیاهان تاریخته دارای شدت فتوسنتزی بالاتری از گیاهان شاهد غیرتاریخته بودند (Molinari *et al*., 2004). مطالعه تنش خشکی ۹ روزه در 'کاریزو' سیترنج و 'کلئوپاترا' ماندارین نشان داد که قندهای محلول در برگ‌ها و ریشه‌های هر دو ژنوتیپ افزایش یافت (Garcıa-Sancheza *et al*., 2007). بررسی دانهال‌های دوساله پرتقال 'نیوهال' و نارنگی انشو 'یاماسیتاکا' نشان داد که تنش خشکی می‌تواند باعث تجمع قندها در هر دو رقم شود (Xie *et al*., 2013). همچنین افزایش معنی‌دار قندهای محلول، در برگ ۱۰ پایه مرکبات مورد آزمایش تحت رژیم‌های مختلف آبیاری دیده شد (Beniken *et al*., 2013).

مطالعه سه رقم پرتقال 'واشنگتن‌ناول'، 'خونی' و 'شموطی' روی پایه نارنج تحت تیمارهای مختلف آبیاری نشان داد که در شرایط آبیاری مطلوب (آبیاری در زمان تخلیه ۲۵ درصد آب قابل‌دسترس)، میزان کلروفیل در تمامی ارقام در سطح بالایی قرار داشت و تفاوتی مشاهده نشد. آبیاری در زمان تخلیه ۵۰ درصد آب قابل‌دسترس، تنها روی رقم خونی تأثیر داشت و باعث کاهش کلروفیل شد و آبیاری در زمان تخلیه ۷۵ درصد آب قابل‌دسترس نیز باعث کاهش معنی‌دار کلروفیل در 'واشنگتن‌ناول' و 'خونی' شد (Al-Absi, 2009). در مطالعه‌ای، میزان رنگیزه‌ها در گونه‌های

مختلف مرکبات تعیین شد که در لمون‌ها مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل کل به‌ترتیب ۰/۳۱۴، ۰/۰۶۶ و ۰/۳۸، در پرتقال‌ها ۰/۲۷۹، ۰/۱۳۳ و ۰/۱۴۲ و در تانجلوها ۰/۴۶۸، ۰/۳۵۵ و ۰/۸۲۳ بود (Khan *et al.*, 2007). درختان پرتقال 'والنسیا' گلدانی روی پایه رافلمون تحت تنش خشکی (قطع آبیاری) قرار گرفتند، در روز نهم علایم پژمردگی در تمامی نهال‌ها مشاهده شد. در روزهای دهم، یازدهم و پانزدهم میزان کلروفیل کل آنها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در این دوره آزمایشی، تنش تأثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل کل نداشت (Vu & Yelenosky, 1988).

بروز تنش خشکی باعث ایجاد تغییراتی در میزان عناصر معدنی نیز می‌گردد. در آزمایش انجام‌شده روی دو پایه 'کاریزو' سیترنج و 'کلئوپاترا' ماندارین شش‌ماهه در شرایط تنش خشکی، غلظت کلسیم برگ در هر دو پایه افزایش یافت که میزان این افزایش در نهال‌های 'کلئوپاترا' ماندارین بیش‌تر از 'کاریزو' سیترنج بود. غلظت پتاسیم برگ نیز تحت شرایط خشکی در هر دو پایه افزایش معنی‌داری نداشت؛ هرچند این افزایش در 'کلئوپاترا' ماندارین بیش‌تر بود. غلظت کلسیم و پتاسیم ریشه در 'کاریزو' سیترنج بیش‌تر از 'کلئوپاترا' ماندارین بود هرچند اختلاف معنی‌داری در اثر خشکی روی این پایه‌ها مشاهده نشد (Garcıa-Sanchez *et al.*, 2007). Cimo *et al.* (2013) با بررسی اثر تنش و حلقه‌برداری روی نهال‌های دوساله 'سوئینگل' سیتروملو و 'کلئوپاترا' ماندارین در شرایط گلخانه‌ای نتیجه گرفتند که در شاهد، میزان پتاسیم در 'کلئوپاترا' ماندارین کمتر از 'سوئینگل' سیتروملو و مقدار کلسیم بیش‌تر بود. با اعمال تنش، میزان پتاسیم در هر دو پایه کاهش یافت که در 'سیتروملو' این کاهش کمتر بود. میزان کلسیم نیز در 'کلئوپاترا' کاهش ولی در 'سیتروملو' افزایش یافت.

هدف از انجام پژوهش حاضر، مطالعه اثر ژنوتیپ‌ها و سطوح آبیاری بر میزان تجمع ترکیبات بیوشیمیایی مانند پرولین، قندهای محلول کل، مالون‌دی‌آلدهید، میزان رنگدانه‌های کلروفیل a، کلروفیلb، کلروفیل کل و کاروتنویید و میزان عناصر پتاسیم و کلسیم در ژنوتیپ‌های ناشناخته مرکبات به‌منظور دستیابی به منابع ژنتیکی متحمل به خشکی با استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه‌های پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری (رامسر) انجام شد. بذرهای ۸ ژنوتیپ ناشناخته مرکبات شامل ۴-۲، ۲-۵، ۲-۱۲، ۵-۱۰، ۱-۱۰، ۱-۲، بکرائی، لیموآستارائی به‌همراه دو پایه متحمل پونسیروس (*Poncirus trifoliate* Raf.) و حساس رافلمون (*Citrus jambhiri* Lush.) جمع‌آوری و پس از آماده‌سازی و ضدعفونی با قارچ‌کش کاپتان (به غلظت دو در هزار) در ترکیب استریل متشکل از پرلیت و ماسه اتوکلاو شده (به نسبت مساوی) کشت شدند. بعد از سبزشدن بذرها، دانهال‌های نوسلار تولیدی در مرحله دو تا سه برگی به گلدان‌های پلاستیکی دو و نیم لیتری محتوی ترکیب استریل کوکوپیت و ماسه به نسبت مساوی (اتوکلاو شده) منتقل و در گلخانه کنترل‌شده (با دمای ۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد در روز و ۲۰-۲۲ درجه در شب با رطوبت نسبی ۸۰-۸۵ درصد) قرار گرفتند. آبیاری در حد حفظ ظرفیت گلدانی و تغذیه با محلول هوگلند (هر هفت روز یکبار) انجام شد (Hoagland & Arnon, 1950).

تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و دو دانهال در هر واحد آزمایشی انجام شد. فاکتورها شامل ژنوتیپ‌های مختلف و تیمارهای آبیاری شامل آبیاری کامل (شاهد) و تنش شدید (قطع آبیاری) بودند. نمونه‌برداری، یک هفته قبل از پایان دوره بقا ژنوتیپ‌ها انجام شد (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010). دوره بقا در ژنوتیپ‌های ۴-۲، ۲-۵، ۲-۱۲، ۵-۱۰، ۱-۱۰، ۱-۲، بکرایی، لیموآستارایی، پونسیروس و رافلمون به‌ترتیب ۶۰، ۷۸، ۴۴، ۶۵، ۵۷، ۵۹، ۶۷، ۴۰، ۱۲۵ و ۳۸ روز بود.

رطوبت وزنی بستر محاسبه و با توجه به منحنی خصوصیات رطوبتی خاک، پتانسیل ماتریک بستر کشت به‌دست آمد که در تیمار شاهد ۰/۰۳- مگاپاسکال و در تیمار تنش شدید ۱/۵- مگاپاسکال بود. در تیمار تنش، درشروع آزمایش گلدان‌ها به‌طور

کامل آبیاری شدند و بعد از زهکشی کامل و خروج آب اضافی، سطح گلدان با کیسه پلاستیکی سیاه پوشیده و قسمت پایین ساقه جهت ممانعت از تبخیر و از دست‌دهی آب کاملا بسته شد (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2010). در این آزمایش، اعمال تنش روی دانهال‌های یکساله انجام شد و نمونه‌ها از برگ‌های میانی شاخه برداشت شدند.

جهت اندازه‌گیری پرولین برگ، به ۰/۵ گرم از برگ پودرشده در ازت مایع، ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۱۰ درصد اضافه نموده و به‌صورت یکنواخت درآورده و پس از ورتکس سانتریفیوژ شد. سپس، دو میلی‌لیتر از عصاره رویی با دو میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین اسید و دو میلی‌لیتر گلاسیال استیک‌اسید در یک لوله آزمایش و به‌مدت یک ساعت در حمام آب‌گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن، در یخ قرارگرفتند تا واکنش خاتمه یابد. سپس چهار میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط واکنش اضافه شده و به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه شدیدا ورتکس شدند. محلول قرمز رنگ روشناور برای قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت. از تولوئن به‌عنوان بلانک استفاده شد و استانداردهای پرولین تهیه و میزان پرولین محاسبه شد (Bates *et al.*, 1973).

مالون‌دی‌آلدهید (MDA) محصول نهایی اکسیدشدن اسیدهای چرب غیراشباع است که با تیوباربیتوریک اسید واکنش داده و تشکیل کمپلکس رنگی می‌دهد. به ۰/۲ گرم نمونه برگی پودرشده در ازت‌مایع، پنج میلی‌لیتر تری کلرو استیک‌اسید ۰/۱ درصد اضافه نموده و یک شب در محیط آزمایشگاه نگه داشته در روز بعد ورتکس شدید و سانتریفیوژ (۳ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور) کرده سپس یک میلی‌لیتر عصاره رویی را برداشته و چهار میلی‌لیتر تری کلرو استیک‌اسید ۲۰ درصد محتوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید اضافه نموده و ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس بلافاصله به یخ منتقل نموده و پس از سرد شدن، سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور) انجام گردید و در نهایت، شدت جذب این کمپلکس با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل ND-1000 ساخت آمریکا) و در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. برای حذف اثر ترکیبات مزاحم، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر از جذب نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر کسر و غلظت کمپلکس محاسبه شد (Heath & Packer, 1968).

برای اندازه‌گیری میزان کل قندهای محلول، به ۰/۰۵ گرم بافت ساییده‌شده برگ در ازت‌مایع، ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر اضافه کرده و پس از ورتکس، درون حمام آب‌گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۲۰ دقیقه (زمانی‌که محلول به‌جوش آمد) نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف شدند. از عصاره صاف‌شده نمونه‌ها، دو میلی‌لیتر برداشته و به آن دو میلی‌لیتر سولفات‌مس اضافه شد. هر یک از نمونه‌ها ۸ تا ۱۰ دقیقه درون حمام آب‌گرم با دمای ۱۰۰ درجه قرار گرفته و پس از آن، درون یخ سرد شدند. پس از سردشدن، دو یتر محلول اسید فسفومولیبدیک به نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها با آب دو بار تقطیر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل ND-1000 ساخت آمریکا)، شدت جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت قند نمونه‌ها محاسبه شد (Somogyi, 1952).

جهت اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کل و کاروتنویید، به ۰/۲ گرم نمونه برگی، ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد خنک اضافه کرده و سپس ورتکس و پس از آن به‌مدت پنج دقیقه در ۱۴۸۰۰ دور در دقیقه (با استفاده از دستگاه SIGMA 1-140 ساخت کشور آلمان) سانتریفیوژ شدند. پس از افزودن پنج میلی‌لیتر استون به محلول بالایی، با آب دوبار تقطیر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل ND-1000 ساخت آمریکا)، جذب در طول موج‌های ۴۸۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ قرائت گردید و میزان رنگدانه‌ها محاسبه شد (Arnon, 1949).

برای اندازه‌گیری پتاسیم از دستگاه فلیم‌فتومتر (Jenway مدل PFP7 ساخت کشور انگلستان) استفاده شد. محلول استاندارد پتاسیم با غلظت‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد. غلظت پتاسیم نمونه‌های برگ برحسب میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد و میزان پتاسیم با استفاده از فرمول مربوطه تعیین شد (Jones, 2001).

برای اندازه‌گیری کلسیم، مقدار ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ی تهیه‌شده را در ارلن‌مایر ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و به آن ۲۴ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد تا حجم کل محلول به ۲۵ میلی‌لیتر رسید. سپس ۱ میلی‌لیتر سود ۴ نرمال و ۰/۰۲ گرم پودر موروکسید اضافه شد تا رنگ محلول صورتی شود، آنگاه عمل تیتراسیون با EDTA ۰/۰۱ نرمال با استفاده از بورت دیجیتال (مدل Rudolf Brand) تا ظهور رنگ ارغوانی ادامه یافت. در نهایت مقدار یون‌های کلسیم با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه شد (Jones, 2001).

این پژوهش با ۲۰ تیمار، سه تکرار و دو دانهال در هر واحد آزمایشی جمعا در ۱۲۰ گلدان صورت گرفت. برای تجزیه آماری و آنالیز واریانس از نرم‌افزار SAS و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی ژنوتیپ، اثر اصلی سطوح آبیاری و اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان پرولین، مالون‌دی‌آلدهید، کل قند محلول و محتوی کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر محتوی کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنویید کل، میزان پتاسیم و کلسیم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری نیز بر میزان کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود ولی بر میزان کاروتنویید کل، میزان پتاسیم و کلسیم تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد (جدول ۲).

میزان پرولین برگ

مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان پرولین نشان داد که پونسیروس در شرایط تنش با ۲۹۸/۴ میکرومول بر گرم وزن خشک برگ بیش‌ترین و ژنوتیپ ۲-۵ شاهد با ۶۶/۸۴ میکرومول بر گرم وزن خشک برگ کم‌ترین میزان پرولین را داشتند. ژنوتیپ‌های ۱-۲، ۲-۱۲ در شرایط تنش بعد از پونسیروستنش، بیش‌ترین و ژنوتیپ ۱-۱۰ شاهد کم‌ترین میزان پرولین را بعد از ژنوتیپ ۲-۵ شاهد نشان دادند (جدول ۳).

تنش خشکی در تمامی ژنوتیپ‌ها باعث افزایش معنی‌دار میزان پرولین در مقایسه با شاهد شد. خشکی باعث شد تا میزان پرولین در ژنوتیپ‌های لیموآستارایی، پونسیروس، ۵-۱۰، رافلمون، ۲-۱۲، بکرایی، ۴-۲، ۱-۱۰، ۱-۲ و ۲-۵ افزایش یابد و در مقایسه با شاهد به‌ترتیب ۱/۷، ۱/۷۳، ۱/۸۹، ۱/۹۹، ۲/۲۹، ۲/۷، ۲/۷۲، ۲/۹۱، ۲/۹۲۵، ۳/۰۸ برابر شود؛ بنابراین بیش‌ترین افزایش ناشی از خشکی در ژنوتیپ ۲-۵ و کم‌ترین افزایش در ژنوتیپ لیمو آستارایی دیده شد (جدول ۳).

جدول ۱. تجزیه واریانس میزان پرولین، مالون‌دی‌آلدهید، قند کل محلول و کلروفیل a در ژنوتیپ‌های مرکبات

Table 1. ANOVA of proline, malondialdehyde, total soluble sugars and chlorophyll a content in *Citrus* genotypes

Source of Varience	df	Mean of Squares			
		Proline content	Malondialdehyde content	Total Soluble sugar	Ch.a
Genotype	9	3609.71**	35233.22**	3666.95**	5280.63**
Irrigation levels	1	834132.56**	191764.43**	34775.87**	6372.64**
Genotype × Irrigation levels	9	2039.49**	13333.5**	2726.41**	817.92**
Error	40	298.02	2952.79	116.4	279.77
CV%		10.63	28.58	16.12	14.12

**: Significant at 1% of probability level. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۲. تجزیه واریانس مقادیر کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنویید کل، پتاسیم و کلسیم در ژنوتیپ‌های مرکبات

Table 2. ANOVA of chlorophyll b, total chlorophyll, total carotenoid, K and Ca contents in *Citrus* genotypes

Source of Varience	df	Mean of Squares				
		Ch.b	Total Ch.	Total carotenoid	Potassium	Calcium
Genotype	9	8581.55**	21604.49	27.07**	30.49**	457.83**
Irrigation levels	1	4341.55**	21232.69**	0.002**	105.38*	1928.90**
Genotype × Irrigation levels	9	456.69**	1796.38**	4.62 ns	9.66 ns	151.89 ns
Error	40	214.57	703.06	1.92	7.56	0.026
CV%		22.23	14.38	22.3	16.54	10.53

در این تحقیق، در تمامی ژنوتیپ‌ها افزایش معنی‌دار پرولین در مقایسه با شاهد در اثر خشکی دیده شد. در شرایط تنش پونسیروس، بکرایی و ژنوتیپ ۱-۲ بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های ۲-۵ و ۵-۱۰ کم‌ترین میزان تجمع پرولین را داشتند. بنابراین پونسیروس با مقدار ۲۹۸/۴ میکرومول بر گرم وزن خشک، به‌دلیل تجمع بیش‌تر پرولین و تنظیم اسمزی بهتر در شرایط تنش، در برابر خشکی متحمل است (جدول ۳).

در مطالعات سایر محققین نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد. Xie *et al.* (2012) با بررسی تنش کم‌آبی در پرتقال 'نیوهال' و نارنگی انشو 'یاماسیتاکا' مشاهده نمودند که در پرتقال 'نیوهال' میزان پرولین بین ۴۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر گرم وزن تازه به‌ترتیب از شاهد به ۷ درصد رطوبت خاک افزایش یافت؛ در حالی‌که این مقدار در نارنگی انشو ۷۱۵ تا ۱۲۳۰ میکروگرم بر گرم وزن تازه بود. در واقع با افزایش تنش، میزان پرولین نیز افزایش یافت. در آزمایش دیگری Xie *et al.* (2013) مشاهده نمودند که غلظت پرولین در شرایط آبیاری مطلوب، پایین‌ترین مقدار و در ۲۰ درصد ظرفیت زراعی، بالاترین مقدار را در هر دو رقم داشت و این میزان در مقایسه با شاهد در پرتقال 'نیوهال' و نارنگی انشو 'یاماسیتاکا' به‌ترتیب ۱۳۲ و ۱۱۲ درصد افزایش نشان داد. Garcıa-Sanchez *et al.* (2007) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند و میزان پرولین تحت شرایط خشکی در هر دو پایه افزایش یافت؛ هر چند میزان این افزایش در دانهال‌های 'کلئوپاترا' ماندارین بیش‌تر از 'کاریزو' سیترنج بود. افزایش پرولین ناشی از کم‌آبی در تحقیقات Molinari *et al.* (2004) با مطالعه دو تیمار رطوبتی روی کاریزو سیترنج تراریخته نیز در مقایسه با شاهد مشاهده شد. همچنین Beniken *et al.* (2013) افزایش میزان پرولین برگ همه پایه‌های مرکبات مورد آزمایش را با افزایش تنش خشکی گزارش کردند. مطالعات de Campos *et al.* (2011) در 'سوئینگل' سیترومِلو تراریخته در مقایسه با شاهد غیرتراریخته در شرایط تنش آبی نشان داد که غلظت پرولین در گیاهان تراریخته و غیرتراریخته افزایش یافته و به ۱۳۰-۱۲۰ میکرومول بر گرم وزن تازه رسید.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطح آبیاری بر برخی ترکیبات بیوشیمیایی در ژنوتیپ‌های مرکبات

Table 3. Mean comparisons of interaction between genotypes and irrigation levels on some biochemical compounds in *Citrus* genotypes

Genotype	Irrigation	Proline (µmol/g dw)	Malondialdehyde (nmol/g dw)	Total soluble sugars (mg/g dw)	Ch.a (mg/g dw)
2-4	Control	90.89 $^{n-q}$	168 $^{g-p}$	75.07 $^{h-k}$	115 $^{f-q}$
2-4	Stress	247.5 $^{b-f}$	154.3 $^{i-p}$	103.3 ^{cde}	100.6 $^{k-s}$
5-2	Control	66.84 $^{q-u}$	102.8 ^{nop}	62.81 $^{j-n}$	137.3 $^{c-i}$
5-2	Stress	206 $^{g-k}$	273.8 $^{b-g}$	97.37 ^{def}	87.05 $^{p-s}$
12-2	Control	109 $^{m-p}$	110.7 ^{nop}	82.09 $^{f-j}$	129.1 $^{e-l}$
12-2	Stress	249.5 $^{b-e}$	288 $^{b-f}$	90.32 $^{d-h}$	109.3 $^{i-r}$
Poncirus	Control	172.6 ^{l}	142.3 $^{k-p}$	80.46 $^{f-k}$	101.6 $^{k-s}$
Poncirus	Stress	298.4 ^{a}	134.4 $^{l-p}$	64.49 $^{i-n}$	87.11 $^{p-s}$
Rough lemon	Control	113.3 ^{mno}	63.67 ^{p}	105 ^{cde}	113.7 $^{g-r}$
Rough lemon	Stress	225.6 $^{d-h}$	356.9 ^{abc}	51.57 ^{mno}	93.08 $^{n-s}$
Bakraii	Control	93.48 $^{n-q}$	297.6 $^{b-e}$	119.9 ^{bc}	166.4 ^{bc}
Bakraii	Stress	252.5 $^{b-e}$	258.1 $^{c-i}$	134 ^{b}	151.8 ^{cde}
Astaraii Lemon	Control	126.9 ^{m}	148.6 $^{j-p}$	21.99 ^{rst}	99.32 $^{k-s}$
Astaraii Lemon	Stress	215.5 $^{f-j}$	111.2 ^{nop}	64.79 $^{i-n}$	94.33 $^{m-s}$
10-5	Control	110.4 $^{m-p}$	158.1 $^{i-p}$	47.78 $^{m-p}$	71.21 st
10-5	Stress	209.1 $^{g-k}$	163.2 $^{h-p}$	77.62 f-k	105.6 $^{i-r}$
10-1	Control	77.3 $^{p-t}$	104.5 ^{nop}	34.32 o-r	124.3 $^{e-n}$
10-1	Stress	224.8 $^{d-h}$	125.1 $^{l-p}$	108.1 cd	143.7 $^{c-h}$
2-1	Control	95.44 $^{m-q}$	63.67 ^{p}	68.77 i-m	124 $^{e-n}$
2-1	Stress	279.2 ^{ab}	64.72 ^{p}	59.51 k-n	121 $^{e-o}$

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد ندارند.

Means with similar letters in each column didn't have significant difference at 1% level.

میزان پراکسیداسیون لیپیدها

مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهید نشان داد که ژنوتیپ بکرایی شاهد با ۲۹۷/۶ نانومول بر گرم وزن خشک برگ بیش‌ترین و راف‌لمون شاهد و ژنوتیپ ۱-۲ در وضعیت شاهد و تنش به‌ترتیب با ۶۳/۶۷، ۶۳/۶۷ و ۶۴/۷۲ نانومول بر گرم وزن خشک برگ کم‌ترین میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهید را داشتند. راف‌لمون در شرایط تنش، بعد از ژنوتیپ بکرایی شاهد بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های ۲-۵، ۲-۱۲ و ۱-۱۰ در شرایط شاهد و لیموآستارایی، پونسیروس و ۱-۱۰ در وضعیت تنش، کم‌ترین میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهید را بعد از ژنوتیپ‌های فوق‌الذکر نشان دادند (جدول ۳).

تنش خشکی در ژنوتیپ‌های ۲-۵، ۲-۱۲ و راف‌لمون باعث افزایش معنی‌دار میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهید در مقایسه با شاهد شد. خشکی باعث شد تا میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهید در ژنوتیپ‌های ۲-۱۲، ۲-۵ و راف‌لمون افزایش یابد و در مقایسه با شاهد به‌ترتیب ۲/۶، ۲/۶۶ و ۵/۶۱ برابر شود. بیش‌ترین افزایش ناشی از خشکی در راف‌لمون و کم‌ترین افزایش در ژنوتیپ ۲-۱۲ دیده شد (جدول ۳).

در این پژوهش، در تعدادی از ژنوتیپ‌ها افزایش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدهید در مقایسه با شاهد در اثر خشکی دیده شد. در شرایط تنش، راف‌لمون و ژنوتیپ ۲-۱۲ بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های ۱-۲، لیموآستارایی، ۱-۱۰ و پونسیروس کم‌ترین میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهید را داشتند؛ بنابراین راف‌لمون و ژنوتیپ ۲-۱۲ به‌ترتیب با ۳۵۶/۹ و ۲۸۸ نانومول بر گرم وزن خشک برگ تجمع مالون‌دی‌آلدهید به‌دلیل تخریب بیش‌تر در شرایط تنش، حساس در برابر خشکی و پونسیروس نیز با ۱۳۴/۴ نانومول بر گرم وزن خشک برگ تجمع مالون‌دی‌آلدهید، متحمل به خشکی هستند (جدول ۳).

در مطالعات سایر محققین نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد. Wu & Zou (2009) با بررسی تأثیر میکوریزا و تنش خشکی پیش‌رونده در نهال‌های پرتقال 'نیوهال' روی پایه پونسیروس، نشان دادند که میزان مالون‌دی‌آلدهید در برگ‌ها با افزایش شدت تنش افزایش یافت. مطالعات de Campos *et al.* (2011) نیز در 'سوییتنگل' سیترومِلو تراریخته در مقایسه با شاهد غیرتراریخته در شرایط تنش آبی نشان داد که غلظت مالون‌دی‌آلدهید در شرایط آبیاری مناسب در گیاهان تراریخته و غیرتراریخته یکسان است ولی در تنش متوسط و شدید در تراریخته‌ها پایین‌تر است. در تنش متوسط افزایش معنی‌داری در گیاهان تراریخته مشاهده نشد ولی در تنش شدید، این افزایش معنی‌دار بود. در گیاهان غیرتراریخته نیز افزایش معنی‌داری در شرایط تنش متوسط و شدید در مقایسه با شاهد دیده شد. Wang *et al.* (2011) با بررسی دو پایه حساس و مقاوم سیب به تنش خشکی، مشاهده نمودند که میزان مالون‌دی‌آلدهید در پایه حساس افزایش بیش‌تری یافت.

میزان قندهای محلول در برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی ژنوتیپ و اثر اصلی سطوح آبیاری بر میزان قند محلول در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری نیز بر قند محلول در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان قند محلول نشان داد که ژنوتیپ بکرایی تنش با ۱۳۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ بیش‌ترین و ژنوتیپ لیموآستارایی شاهد با ۲۱/۹۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ کم‌ترین میزان قند محلول را داشتند. ژنوتیپ‌های بکرایی شاهد، ۱-۱۰ و راف‌لمون بعد از ژنوتیپ بکرایی تنش بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های ۱-۱۰، ۵-۱۰ شاهد و راف‌لمون تنش، کم‌ترین میزان قند محلول را بعد از ژنوتیپ لیمو آستارایی شاهد نشان دادند (جدول ۳).

تنش خشکی در ۴ ژنوتیپ باعث افزایش معنی‌دار و تنها در یک ژنوتیپ سبب کاهش معنی‌دار قند محلول در مقایسه با شاهد شد. خشکی باعث شد تا میزان قند محلول در ژنوتیپ‌های ۲-۵، ۵-۱۰، لیمو آستارایی و ۱-۱۰ افزایش یابد و در مقایسه با شاهد به‌ترتیب ۱/۵۵، ۱/۶۲، ۲/۹۵ و ۳/۱۵ برابر

و در راف‌لمون کاهش یافته و ۰/۵ برابر شود؛ بنابراین بیش‌ترین افزایش ناشی از خشکی در ژنوتیپ ۱-۱۰ و کم‌ترین افزایش در ژنوتیپ ۲-۵ دیده شد (جدول ۳).

در شرایط تنش، ژنوتیپ‌های بکرائی، ۱-۱۰، ۴-۲ و ۲-۵ بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های راف‌لمون، ۱-۲، پونسیروس و لیموآستارایی کم‌ترین میزان قند محلول را داشتند؛ بنابراین ژنوتیپ ۲-۵ با ۹۷/۳۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ قند محلول، به‌دلیل تنظیم اسمزی بهتر متحمل و ژنوتیپ‌های راف‌لمون و لیموآستارایی نیز به‌ترتیب با ۵۱/۵۷، ۶۴/۷۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ قند محلول، به‌دلیل تنظیم اسمزی ضعیف‌تر در شرایط تنش، حساس به خشکی هستند (جدول ۳).

در این تحقیق، در تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها افزایش معنی‌دار قندهای محلول در مقایسه با شاهد در اثر خشکی دیده شد. در مطالعات سایر محققین نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد. Xie *et al.* (2012) با بررسی دانهال‌های دو ساله پرتقال 'نیوهال' و نارنگی انشو 'یاماسیتاکا' نشان دادند که تنش خشکی می‌تواند باعث تجمع قند در هر دو رقم شود. Rodriguez-Gamir *et al.* (2010) گزارش کردند که در شرایط کم‌آبی، پایه فورنر آلکائید ۵ در مقایسه با والدینش دارای آسیمیلات‌های بیش‌تری است. García-Sanchez *et al.* (2007) با مطالعه تنش خشکی ۹ روزه در 'کاریزو' سیترنج و 'کلئوپاترا' ماندارین مشاهده کردند که قندهای محلول در برگ‌ها و ریشه‌های هر دو ژنوتیپ افزایش یافت. Molinari *et al.* (2004) نیز به نتایج مشابهی در 'کاریزو' سیترنج تاریخته دست یافتند. Beniken *et al.* (2013) افزایش معنی‌دار قندهای محلول در برگ ۱۰ پایه مرکبات مورد آزمایش تحت رژیم‌های مختلف آبیاری را گزارش کردند. Wu *et al.* (2009) با بررسی تنش آبی و قارچ میکوریزا روی دانهال‌های نارنگی نشان دادند که میزان قندهای محلول برگ در گیاهان تحت تنش، افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نداشت ولی تمامی گونه‌های میکوریزا در افزایش قندهای محلول مؤثر بودند.

Jimenez *et al.* (2013) با مطالعه تنش آبی پیش‌رونده در پایان ۱۶ و ۲۶ روز نشان دادند اثر متقابل خشکی و ژنوتیپ بر میزان قندهای محلول برگ پایه‌های پرونوس معنی‌دار نبود؛ هرچند میزان آنها در بافت‌های برگ و ریشه به‌خصوص در شرایط تنش شدید افزایش یافت.

میزان کلروفیل a

مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان کلروفیل a نشان داد که ژنوتیپ بکرایی شاهد با ۱۶۶/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، بیش‌ترین و ژنوتیپ ۵-۱۰ شاهد با ۷۱/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، کم‌ترین میزان کلروفیل a را داشتند. ژنوتیپ بکرایی تنش بعد از بکرایی شاهد، بیش‌ترین و ژنوتیپ ۲-۵ و پونسیروس تنش کم‌ترین میزان کلروفیل a را بعد از ژنوتیپ ۵-۱۰ شاهد نشان دادند (جدول ۳).

تنش خشکی در ژنوتیپ ۲-۵ باعث کاهش معنی‌دار کلروفیل a در مقایسه با شاهد (به‌میزان ۰/۶۳ برابر) شد (جدول ۳).

در شرایط تنش، ژنوتیپ‌های بکرایی و ۱-۱۰ بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های ۲-۵، پونسیروس، راف‌لمون و لیموآستارایی کم‌ترین میزان کلروفیل a را داشتند؛ ولی مقادیر در حدی بالا یا پایین نبود که بتوان تحمل و یا حساسیت ژنوتیپ‌ها را با آن مرتبط دانست (جدول ۳).

میزان کلروفیل b

مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان کلروفیل b نشان داد که ژنوتیپ بکرایی شاهد با ۱۰۴/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ بیش‌ترین و پونسیروس در وضعیت تنش با ۴۴/۵۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، کم‌ترین میزان کلروفیل b را داشتند. ژنوتیپ‌های ۲-۵، ۴-۲ و ۲-۱۲ شاهد بعد از ژنوتیپ بکرایی شاهد، بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های ۵-۱۰ شاهد و ۱-۱۰ تنش، کم‌ترین میزان کلروفیل b را بعد از پونسیروس تنش نشان دادند (جدول ۴).

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطح آبیاری بر برخی ترکیبات بیوشیمیایی در ژنوتیپ‌های مرکبات

Table 2. Mean comparisons of interaction between genotypes and irrigation levels on some biochemical compounds in *Citrus* genotypes

Genotype	Irrigation	Ch.b (mg/g dw)	Total Ch. (mg/g dw)	Carotenoid (mg/g dw)	Potassium (mg/g dw)	Calcium (mg/g dw)
2-4	Control	87.71 c-g	202.7 f-m	8.01 b-l	12.4 ghi	39.63 a-h
2-4	Stress	66.4 f-k	167 j-t	6.83 e-p	15.91 c-h	48.3 a-h
5-2	Control	93.3 c-f	230.6 e-i	9.85 a-d	16.31 c-g	36.87 a-h
5-2	Stress	66.65 f-k	153.7 m-t	9.4 a-e	14.04 e-i	36.83 a-h
12-2	Control	82.38 d-h	211.5 f-k	11.34 a	12.79 f-i	34.7 a-h
12-2	Stress	69.91 f-k	179.2 i-r	9.71 a-d	15.92 c-h	35.07 a-h
Poncirus	Control	67.8 f-k	169.4 j-s	4.38 o-v	18.18 b-f	35.13 a-h
Poncirus	Stress	44.58 k-q	131.7 p-u	5.83 h-s	17.32 b-g	57 ab
Rough lemon	Control	61.88 g-l	175.6 j-r	6.05 g-s	16.85 c-g	32.5 a-i
Rough lemon	Stress	48.8 j-o	141.9 n-u	5.89 h-s	17.79 b-g	32.63 a-h
Bakraii	Control	104.3 cde	270.7 cde	8.34 b-i	14.98 d-i	23.17 e-i
Bakraii	Stress	79.89 d-i	231.7 e-h	6.65 f-q	18.33 b-f	23.2 ghi
Astaraii Lemon	Control	84.47 d-h	183.8 g-p	5.4 k-t	14.28 d-i	28.37 b-i
Astaraii Lemon	Stress	88.63 c-g	183 g-p	4.4 o-v	17.79 b-g	61.63 a
10-5	Control	47.86 j-p	119.1 s-v	4.3 p-v	17.32 b-g	31.2 a-h
10-5	Stress	64.77 f-k	170.3 j-s	2 v	17.94 b-g	31.8 b-i
10-1	Control	52.57 i-n	176.9 j-r	5.07 m-u	14.59 d-i	25 d-i
10-1	Stress	49.04 j-o	192.7 g-n	5.22 m-t	16.85 c-g	27.03 c-i
2-1	Control	51.36 i-n	175.4 j-r	3.7 r-v	9.75 i	51.2 a-d
2-1	Stress	58.18 h-m	179.2 i-r	2.4 uv	10.77 hi	53.97 a-d

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد نداشتند.

Means with similar letters in each column didn't have significant difference at 1 % level.

میزان کلروفیل کل

مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان کلروفیل کل نشان داد که ژنوتیپ بکرایی شاهد با ۲۷۰/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ بیش‌ترین و ژنوتیپ ۵-۱۰ شاهد با ۱۱۹/۱میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، کم‌ترین میزان کلروفیل کل را داشتند. ژنوتیپ‌های بکرایی تنش، ۲-۵ و ۲-۱۲ شاهد بعد از ژنوتیپ بکرایی شاهد بیش‌ترین و پونسیروس و رافلمون در وضعیت تنش، کم‌ترین میزان کلروفیل کل را بعد از ژنوتیپ ۵-۱۰ شاهد نشان دادند (جدول۴).

تنش خشکی در ژنوتیپ ۲-۵ باعث کاهش معنی‌دار کلروفیل کل در مقایسه با شاهد (۰/۶۶ برابر) شد (جدول ۴).

در شرایط تنش، ژنوتیپ بکرایی بیش‌ترین و پونسیروس و رافلمون کم‌ترین میزان کلروفیل کل را داشتند؛ بنابراین شاید بتوان گفت رافلمون به‌دلیل کلروفیل کل کمتر، حساس به خشکی است (جدول ۴).

میزان کاروتنویید کل

مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان کاروتنویید کل نشان داد که ژنوتیپ ۲-۱۲ شاهد با ۱۱/۳۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، بیش‌ترین و ژنوتیپ ۵-۱۰ تنش با ۲/۰۰۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ کم‌ترین میزان کاروتنویید کل را داشتند. ژنوتیپ‌های ۲-۱۲ تنش، ۲-۵ شاهد و تنش بعد از ژنوتیپ ۲-۱۲ شاهد، بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های ۱-۲ تنش و شاهد، کم‌ترین میزان کاروتنویید کل را بعد از ژنوتیپ ۵-۱۰ تنش نشان دادند (جدول ۴).

در شرایط تنش، ژنوتیپ‌های ۲-۱۲ و ۲-۵ بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های ۵-۱۰، ۱-۲ و لیمو آستارایی، کم‌ترین میزان کاروتنویید کل را داشتند؛ بنابراین ژنوتیپ ۲-۵ با ۹/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ کاروتنویید کل، به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تر و بهتر در شرایط تنش، متحمل در برابر خشکی و ژنوتیپ لیمو آستارایی نیز با ۴/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ کاروتنویید کل، حساس به خشکی هستند (جدول ۴).

در این پژوهش، در تعدادی از ژنوتیپ‌ها کاهش رنگدانه‌های کلروفیل و افزایش کاروتنویید کل در مقایسه با شاهد در اثر خشکی دیده شد. در مطالعات سایر پژوهشگران نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد. Al-Absi (2009) با بررسی تیمارهای مختلف آبیاری

در پرتقال 'واشنگتن‌ناول'، 'خونی' و 'شاموتی' روی پایه نارنج نشان داد که آبیاری در ۷۵ درصد رطوبت قابل‌دسترس باعث کاهش معنی‌دار رنگدانه کلروفیل در 'واشنگتن‌ناول' و 'خونی' شد. Beniken *et al.* (2013) کاهش کلروفیل همه پایه‌ها را در اثر افزایش تنش خشکی گزارش نمود. Vu & Yelenosky (1988) با مطالعه میزان کلروفیل کل در درختان پرتقال 'والنسیا' گلدانی روی پایه رافلمون تحت تنش خشکی (قطع آبیاری) مشاهده نمودند که طی دوره آزمایش ۱۲ روزه، تنش تأثیر معنی‌داری نداشت هر چند مقداری کاهش دیده شد. Haghighatnia *et al.* (2011) پس از بررسی دانهال‌های ولکامریانا نتیجه گرفتند که خشکی، کاهش معنی‌داری در میزان کلروفیل ایجاد نمود.

Jimenez *et al.* (2013) در هلوی رقم کاترینا روی چهار پایه در شرایط گلخانه‌ای و همچنین Gholami *et al.* (2012) در چهار رقم انجیر به نتایج مشابهی در کاهش میزان کلروفیل دست یافتند. میزان کاروتنویید نیز فقط در رقم انجیر دیم، در پایان دوره خشکی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت.

میزان پتاسیم برگ

مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان پتاسیم نشان داد که ژنوتیپ ۱-۲ در وضعیت شاهد با ۹/۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ کم‌ترین میزان پتاسیم و ژنوتیپ‌های ۱-۲ تنش، ۴-۲ و ۲-۱۲ شاهد نیز کم‌ترین میزان پتاسیم را بعد از ژنوتیپ ۱-۲ شاهد نشان دادند. در شرایط تنش، ژنوتیپ‌های ۱-۲ و ۲-۵ کم‌ترین میزان پتاسیم را داشتند (جدول ۴).

میزان کلسیم برگ

مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح آبیاری بر میزان کلسیم نشان داد که ژنوتیپ لیمو آستارایی در وضعیت تنش با ۶۱/۶۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ بیش‌ترین و ژنوتیپ بکرایی شاهد با ۲۳/۱۷ کم‌ترین میزان کلسیم را داشتند. ژنوتیپ‌های پونسیروس، ۱-۲ تنش و ۱-۲ شاهد بعد از ژنوتیپ لیمو آستارایی تنش، بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های بکرایی تنش و ۱-۱۰ شاهد کم‌ترین میزان کلسیم را بعد از ژنوتیپ بکرایی شاهد نشان دادند. خشکی باعث شد تا میزان کلسیم در ژنوتیپ لیمو آستارایی افزایش یابد و در مقایسه با شاهد ۲/۱۷ برابر شود و در واقع کم‌ترین افزایش معنی‌دار در ژنوتیپ لیمو آستارایی دیده شد. در شرایط تنش، ژنوتیپ‌های لیمو آستارایی، پونسیروس و ۱-۲ بیش‌ترین و ژنوتیپ‌های بکرایی، ۱-۱۰، ۵-۱۰ و رافلمون، کم‌ترین میزان کلسیم را داشتند؛ بنابراین پونسیروس با ۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ کلسیم، کاندیدای تحمل و رافلمون با ۳۲/۶۳ کاندیدای حساسیت در برابر خشکی هستند (جدول ۴).

نتایج حاصل از این تحقیق در خصوص عناصر معدنی، با مطالعات سایر محققان مطابقت داشت. Garcıa-Sanchez *et al.* (2007) با بررسی دو پایه 'کاریزو' سیترنج و 'کلئوپاترا' ماندارین تحت تنش خشکی (قطع آبیاری به مدت نه روز) نتیجه گرفتند که خشکی باعث افزایش غلظت کلسیم برگ در هر دو پایه شد ولی بر غلظت پتاسیم تأثیری نداشت. Cimo *et al.* (2013) نیز در 'سوئینگل' سیترومل و 'کلئوپاترا' ماندارین مشاهده نمودند که با اعمال تنش، میزان پتاسیم در هر دو پایه و میزان کلسیم در 'کلئوپاترا' کاهش ولی در 'سیترومل' افزایش یافت. Haghighatnia *et al.* (2011) با بررسی دو گونه قارچ میکوریزا در ولکامریانا نتیجه گرفتند که میزان پتاسیم با افزایش شدت تنش، کاهش معنی‌داری داشت و در تنش شدید به کمترین مقدار رسید، ولی مقدار کلسیم در شاهد و تنش ملایم تغییری نداشت و در تنش شدید افزایش معنی‌داری یافت.

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه نشان داد که در اغلب پایه‌های مورد بررسی، میزان پرولین و قندهای محلول در اثر تنش خشکی افزایش یافت؛ هر چند که میزان تغییر در پایه‌های مختلف، متفاوت بود. در این پژوهش، در شرایط تنش، پونسیروس با ۲۹۸/۴ میکرومول بر گرم وزن خشک برگ بیش‌ترین تجمع پرولین را داشت. بیش‌ترین میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهید در رافلمون با

۳۵۶/۹ نانومول بر گرم وزن خشک برگ و کمترین در پونسیروس با ۱۳۴/۴ نانومول بر گرم وزن خشک در شرایط تنش مشاهده شد. همچنین در شرایط تنش، بیش‌ترین میزان قند محلول در ژنوتیپ ۲-۵ با ۹۷/۳۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ و کمترین نیز در راف‌لمون با ۵۱/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ گزارش شد. در شرایط تنش، راف‌لمون کم‌ترین میزان کلروفیل a و کل را داشت. ژنوتیپ ۲-۵ با ۹/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، بیش‌ترین و ژنوتیپ لیمو آستارایی با ۴/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، کم‌ترین میزان کاروتنویید کل را داشتند. پونسیروس با ۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ، بیش‌ترین مقدار کلسیم و راف‌لمون با ۳۲/۶۳ کم‌ترین را دارا بودند.

پونسیروس به‌دلیل تجمع کمتر مالون‌دی‌آلدهید و در نتیجه پراکسیداسیون کمتر لیپیدها، تجمع بیش‌تر پرولین، میزان کلسیم بیش‌تر و همچنین ژنوتیپ شماره ۲-۵ به‌دلیل تجمع بیش‌تر قند محلول کل و حفظ بهتر کاروتنویید کل در برابر خشکی متحمل هستند. راف‌لمون نیز به‌دلیل تجمع بیش‌تر مالون‌دی‌آلدهید و در نتیجه پراکسیداسیون بیش‌تر لیپیدها، حفظ پایین‌تر کلروفیل a و کلروفیل کل، تجمع کمتر قند محلول کل و میزان کمتر کلسیم و لیمو آستارایی به‌دلیل کاروتنویید کل پایین‌تر حساس به خشکی معرفی شدند.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی پایان‌یافته پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، وابسته به سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی با شماره فروست ۵۱۹۴۰ مورخ ۹۶/۰۴/۱۰ است که از حمایت مالی آن مجموعه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Al-Absi, Kh. M. (2009). Gas exchange, chlorophyll and growth response of three orange genotypes (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) to abscisic acid under progressive water deficit. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 5 (4), 421-433.
2. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
3. Bajaj, S., Jayaprakash, T., Li-Frei, L., Ho, T. H. D., & Wu, R. (1999). Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Molecular Breeding*, 5, 493-503.
4. Bates, L. S., Waldron, R. P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-208.
5. Beniken, L., Omari, F. E., Dahan, R., Van Damme, P., Benkirane, R. & Benyahia, H. (2013). Screening of ten citrus rootstocks to drought stress. In: *1st International Plant Breeding congress*, 19.
6. Cimo, G., Lo Bianco, R., Gonzalez, P., Bandaranayake, W., Etxeberria, E. & Syvertsen, J. P. (2013). carbohydrate and nutritional responses to stem girdling and drought stress with respect to understanding symptoms of huanglongbing in *Citrus*. *HortScience*, 48(7), 920-928.
7. de Campos, M. K. F., de Carvalho, K., de Souza, F. S., Marur, C. J., Pereira, L. F. P., Filho, J. C. B. & Vieira, L. G. E. (2011). Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle' citrumelo plants over-accumulating proline. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 242-250.
8. Fereres, E. & Soriano, M. A. (2007). Deficit irrigation for reducing agricultural water use. *Experimental Botany*, 58, 147-159.
9. Garcıa-Sancheza, F., Syvertsena, J. P., Gimenoc, V., Botlab, P. & Perez-Perezb, J. G. (2007). Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. *Physiologia Plantarum*, 130, 532-42.
10. Gholami, M., Rahemi, M., Kholdebarin, B. & Rastegar, S. (2012). Biochemical responses in leaves of four fig cultivars subjected to water stress and recovery. *Scientia Horticulturae*, 148, 109-117.
11. Haghighatnia, H., Nadian, H. A. & Rejali, F. (2011). Effects of mycorrhizal colonization of growth, nutrients uptake and some other characteristics of *Citrus Volkameriana* rootstock under drought stress. *World Applied Science Journal*, 13(5), 1077-1084.
12. Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
13. Hoagland, D. & Arnon, D. (1950). The water-culture method for growing plants without soil, Circular 347, University of California Agricultural Experiment Station, Berkley, 39p.

14. Jimenez, S., Dridi, J., Gutierrez, D., Moret, D., Irigoyen, J. J., Moreno, M. A. & Gogorcena, Y. (2013). Physiological, bioche mical and molecular responses in four *Prunus* rootstocks submitted to drought stress. *Tree Physiology*, 1-15.
15. Jones, J. (2001). *Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis*. CRC Press, Boca Raton. Pp. 384.
16. Khan, M. A., Idrees, M. & Shahab, D. (2007). Chlorophyll content in some Citrus species. *Vejetos*, 20 (2), 7-8.
17. Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Filho, J. C. B., Kobayashi, A. K., Pileggi, M., Leite Junior, R. P., Pereira, L. F. P. & Vieira, L. G. E. (2004). Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock 'Carrizo' citrange (*Citrus sinensis* Osb. X *Poncirus trifoliata* Raf.) overproducing proline. *Plant Science*, 167, 1375-1381.
18. Nicolosi, E. (2007). Origin and taxonomy. In: Khan, I. A. (ed.) *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. *CABI*, 370.
19. Nolte, K. D., Hanson, A. D. & Gage, A. D. (1997). Proline accumulation and methylation to proline betaine in *Citrus:* implication for genetic engineering of stress resistance. *American Society Horticultural Science*, 122 (1), 8-13.
20. Rodríguez-Gamir, J., Primo-Millo, E., Forner, J. B. & Forner-Giner, M. A. (2010). *Citrus* rootstock responses to water stress. *Scientia Horticulturae*, 126, 95-102.
21. Somogyi, M. (1952). Note on sugar determination. *Journal of Biology and Chemistry*, 195, 19-23.
22. Vu, J. C. V. & Yelenosky, G. (1988). Water deficit and associated changes in some photosynthetic parameters in leaves of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). *Plant Physiology*, 88, 375-378.
23. Wang, S., Liang, D., Li, C., Hao, Y., Ma, F. & Shu, H. (2011). Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought tolerant and drought sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 81-89.
24. Wu, Q. S. & Zou, Y. N. (2009). Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed *Citrus*. *Plant Soil Environment*, 55 (10), 436-442.
25. 25- Xie, Sh., Cao, Sh., Liu, Q., Xiong, X. & Lu, X. (2013). Effect of water deficit stress on isotope ^{15}N uptake and nitrogen metabolism of 'Newhall' orange and 'Yamasitaka' mandarin seedling. *Journal of Life Sciences*, 7(11), 1170-1178.
26. Xie, S. X., Lu, X.P., Ni, Q. & Zhao, X. L. (2012). The effect of water stress on ABA, and physiological characteristic of Citrus. *XII International Citrus Congress*, pp 138-145.