Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 2, Summer 2020 (413-428)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.269570.1539

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۹ (ص ۴۲۸-۴۱۳)

بررسی اثر چند رقم انگور بومی به‌عنوان پایه پیوندی و تریاکانتانول بر فیزیولوژی پیوندک انگور بیدانه سفید (*Vitis vinifera* L.) تحت تنش خشکی

وهب اسدی[۱]، موسی رسولی[۲*]، منصور غلامی[۳] و معصومه ملکی[٤]
۱. دانشجوی دکتری، پژوهشکده ملی انگور و کشمش، دانشگاه ملایر
۲. دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر
۳. استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی، همدان
٤. استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه ملایر
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸)

چکیده

استفاده از پایه‌های انگور متحمل به تنش خشکی و کاربرد روش‌های به باغی مانند استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد می‌تواند برای دستیابی به روش‌های مقابله با کم‌آبی مؤثر باشد. به همین منظور پژوهشی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۷ در شرایط گلخانه‌ای جهت بررسی اثر تنظیم‌کننده رشد تریاکانتانول بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی نهال‌های انگور بیدانه سفید پیوند شده روی دو رقم بومی در شرایط خشکی انجام شد. تیمارها پایه در دو سطح (خوشناو، سرخک قوچان و نهال رقم بیدانه سفید (خودریشه))، تنش خشکی در سه سطح پتانسیل آب خاک در محدوده ۰/۲- (شاهد)، ۰/۷- و ۱/۵- مگاپاسکال و سه غلظت تنظیم‌کننده تریاکانتانول (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) بودند. صفات اندازه‌گیری شده نسبت وزن خشک به سطح برگ (LMA)، میزان پایداری غشای سلولی (MSI)، کلروفیل کل، پرولین، گلایسین بتائین، محتوای نسبی آب برگ، فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) بودند. براساس نتایج حاصل از این پژوهش تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار LMA (۲۵ درصد)، MSI (۵ درصد)، کلروفیل (۲۰ درصد) و RWC (۵ درصد) گردید و تیمارهای تریاکانتانول منجر به افزایش معنی‌دار LMA (۲۰ درصد)، MSI (٤/۳ درصد)، کلروفیل (١٤ درصد)، RWC (۲/۵ درصد)، گلایسین بتائین (۲۷ درصد)، پرولین (۲۲ درصد) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (۲۳ درصد) و پراکسیداز (۸ درصد) گردید. نهال‌های پیوندی با پایه خوشناو نسبت به شاهد نتایج بهتری را نشان داد و با اضافه شدن تیمار های تریاکانتانول نیز صفات مناسب برای تحمل تنش خشکی بهبود یافتند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، انگور، پرولین، گلایسین بتائین، نهال پیوندی.

Effect of some cultivars of native grapevine as rootstocks and triachenetanol on the physiology of ‘Bidaneh Sefid’ grapevine scion (*Vitis vinifera* L.), under drought stress

Wahab Asadi[1], Mousa Rasouli[2*], Mansour Gholami[3] and Masoumeh Maleki[4]
1. Ph. D. Candidate, Iranian Research Institute in Grape and Raisin, Malayer University, Malayer, Iran
2. Associate Professor, Facutly of Agirculture, Malayer University, Malayer, Iran
3. Professor, Facutly of Agirculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
4. Assistant Professor, Faculty of Science, Malayer University, Malayer, Iran
(Received: Nov. 14, 2018- Accepted: Mar. 09, 2019)

ABSTRACT

Use of drought tolerant grapevine rootstocks and application of garden management practices, such as the use of plant growth regulators, can be effective in achieving drought control methods. For this purpose, a factorial experiment based on a completely randomized design was conducted with three replications in greenhouse conditions in 2018 in order to study the effect of triacontanol on the physiological characteristics of grafted plantlet of grapevine on two native rootstocks of Iran under drought conditions. The treatments consisted of two rootstocks (Khoshnav, Sorkhak Ghouchan) and Bidaneh sefid (no grafting), three levels of drought stress including soil water potential of -0.2 (control), -0.7 and -1.5 MPa, and three concentrations of triacontanol (0, 50 and 100 µM). The measured traits included ratio dry weight to leaf area (LMA), membrane cell stability (MSI), total chlorophyll, proline, glycinebetaine, relative water content (RWC), catalase (CAT) and peroxidase (POX) activity. Based on the results, drought stress reduced LMA (25%), MSI (5%), chlorophyll (20%) and RWC (5%) and triacontanol treatments increased LMA (20%), MSI (4.5%), chlorophyll (14%), RWC (2.5%), glycinebetaine (27%), proline (22%), and antioxidant activity of catalase (23%) and peroxidase (8%). plantlet with Khoshnav rootstock showed better results than the control plantlet, and triacontanol improves drought tolerance in plantlets.

Keywords: Antioxidant enzymes, grafted seedling, grape, glysinebetaine, proline.

* Corresponding author E-mail: mousarasouli@gmail.com

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera* L.) در سال ۱۳۹۵ با تولید حدود ۳/۲ میلیون تن محصول در سال پس از سیب رتبه دوم تولید و با داشتن ۲۷۸۳۰۰ هکتار سطح بارور پس از پسته رتبه دوم سطح کشت را در ایران به خود اختصاص داده است (Ahmadi *et al*., 2016). این محصول اهمیت زیادی در اقتصاد کشاورزی کشور دارد به گونه‌ای که در سال ۲۰۱۶ حدود ۸۸/۵ میلیون تن فقط محصول کشمش ارزآوری حدود ۱۴۲ میلیون دلار به همراه داشته است (Ahmadi *et al*., 2016; FAO, 2017).

از مهم‌ترین نیازهای کشت و تولید هر محصول آب می‌باشد که واکنش‌های حیاتی گیاه مانند فتوسنتز، تنفس، زنجیره انتقال الکترون، انجام تعرق و خنک کردن اندام گیاه تحت تأثیر آن قرار دارد. ویژگی‌های مهم آب با ظرفیت گرمایی ویژه، عناصر تشکیل‌دهنده مولکول آب، گرمای نهان تبخیر و نیروی کششی بین مولکول‌های آب باعث اثرگذاری این ماده حیاتی در متابولیسم گیاه گردیده است (Taiz & Zeiger, 2006). به‌طورکلی تنش‌های محیطی از مهم‌ترین محدودیت‌های کشت و تولید محصول انگور در کشور می‌باشد و اساسی‌ترین مشکل امروز تاکستان‌های دنیا و ایران درگیری با خطر خشک‌سالی و تنش خشکی است زیرا تنش خشکی به‌طور معنی‌داری بر عملکرد فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی انگور اثر می‌گذارد (Conesa *et al*., 2016; Koundouras *et al*., 2008). تنش کم‌آبی، رشد رویشی، سطح برگ (Lovisolo *et al*., 2010)، رنگیزه های فتوسنتزی مانند کلروفیل‌ها (Yordanov *et al*., 2000)، رشد ریشه (Bianchi *et al*., 2018)، سرعت تعرق (Alsina *et al*., 2011)، میزان پتانسیل آب بافت، فتوسنتز (Koundouras *et al*., 2008) را کاهش داده و منجر به بسته شدن روزنه ها، تشکیل مالون دی آلدئید و افزایش سیالیت غشای سلولی، افزایش رادیکال‌های گلوتاتیون و آلفاتکوفرولو تجمع ترکیباتی مانند پرولین، مانیتول، آبسایزیک اسید، گلایسین بتائین و غیره می‌گردد (Esteban *et al*., 2001; Asadi *et al*., 2017; Kantar *et al*., 2011).

گونه‌های گیاهی در برخورد با تغییر پتانسیل آب خاک رفتارهای فیزیولوژیکی مختلفی را نشان می‌دهند و در انگور نیز روش‌های مختلفی برای مقابله با اثرات تنش خشکی وجود دارند که می‌تواند به عملکرد و بقای گیاه طی کمبود شدید آب کمک کند (Scharwies & yerman, 2016). از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقابله انگور با تنش خشکی تولید ترکیبات اسمولیت و سازگار برای تنظیم پتانسیل آب در سلول و محافظت اسمزی از آن می‌باشد. این ترکیبات با حفظ جذب آب به سلول و ایجاد تورم سلولی منجر به ادامه فرآیندهای ضروری و مهم گیاه مانند رشد سلولی، حرکت روزنه‌ای، فتوسنتز و تعرق می‌گردد (Conesa *et al*., 2016; Kennedy, 2008). ازجمله این ترکیبات سازگار می‌توان به قندها، الکل‌های قندی، گلایسین بتائین و آمینواسیدهای آزاد مانند پرولین اشاره کرد. همچنین از طرفی با کمک گرفتن از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز از فعالیت‌های اکسایشی رادیکال‌های آزاد ممانعت به‌عمل می‌آورند و پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی را کاهش می‌دهند (Chaves *et al*., 2004; Asadi *et al*., 2017; Kantar *et al*., 2011).

یکی از روش‌های به‌روز و مهم در مقابله با اثرات مخرب تنش‌های محیطی استفاده از روش پیوند روی پایه‌های متحمل به این تنش‌ها می‌باشد (Jacobs, 2010). پایه‌ها توانایی سازگار کردن انگور به محدودیت‌های مختلف محیطی (سرما، گرما، خشکی و...) و خاکی (شوری، آهکی، زهکشی نامناسب و ...) را دارند. این پژوهش‌ها علاوه بر این‌که می‌تواند ارقام تجاری مناسب برای کشت در مناطق کم‌آب را معرفی کند، ارقام و ژنوتیپ‌های موجود در ایران که دارای استعدادهای ژنتیکی مطلوب از نظر تحمل به شرایط نامساعد هستند را نیز به‌عنوان پایه برای ارقام پر مصرف مشخص می‌کنند (Yıldırım *et al*., 2018). باوجود بروز خشکسالی‌های متعدد در سال‌های اخیر و شرایط تغییر در اقلیم مناطق به‌نظر می‌رسد یکی از راه‌های مؤثر برای مقابله با اثرات ناشی از کمبود آب استفاده از روش‌های به باغی مانند استفاده از رقم‌های

بومی متحمل به خشکی و پیوند رقم‌های تجاری با تحمل کمتر روی آن ها می‌باشد (Bianchi *et al*., 2018). لذا اصلاح و انتخاب رقم‌های متحمل‌تر به شرایط خشکی باوجود پتانسیل بالای تنوع رقم‌ها در مناطق ایران باید موردتوجه قرار گیرد. در این زمینه درگذشته مطالعاتی نیز صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به معرفی رقم‌های چفته و خلیلی (Asadi *et al*., 2017)، رقم‌های انگور سیاه قزوین و ملایی (Rasuli & Golmohamadi, 2003)، گزنی (Rezaee *et al*., 2007)، خوشناو (Azizi *et al*., 2009; Ghaderi *et al*., 2010)، رشه، سرخک قوچان، سیاه زرقان و قلاتی شیراز (Hadadinejad *et al*., 2013) اشاره کرد.

برخی از محققان به‌منظور استفاده از مکانیسم تولید ترکیبات اسمولیت و افزایش تجمع این ترکیبات تنظیم‌کننده اسمزی برای افزایش تحمل انگور به تنش خشکی، استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد و ترکیبات آلی دیگر را توصیه می‌کنند (Okuma *et al*., 2000). در این مورد می‌توان به استفاده از سالسیلیک اسید و اتفن (Ricardo, 1997)، پرولین (Ozden *et al*., 2009) و گلایسین بتائین (Yang and Lu, 2005) در مقابله با تنش خشکی در انگور اشاره کرد. ترکیب تریاکانتانول (Triacontanol) یک تنظیم‌کننده رشدی از خانواده الکل‌های آلیفاتیک زنجیره‌ای به طول ۳۰ کربن می‌باشد که در موم کوتیکول بسیاری از گیاهان وجود دارد (Verma *et al*., 2011). این ترکیب اولین بار توسط Ries *et al*. (1977) از عصاره برگ یونجه جداسازی شد و پس از خالص‌سازی و کاربرد خارجی آن، محققان متوجه اثرات تقویت‌کننده رشد، تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش جذب آب این ترکیب شدند. این ترکیبات بر اساس مطالعات منجر به افزایش جذب آب و مواد معدنی و نیز افزایش شدت فتوسنتز (Chen *et al*., 2003)، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (Naeen *et al*., 2011)، افزایش ترکیبات آلی در برگ (Kumaravelu *et al*., 2000)، افزایش سطح مؤثر برگ، فعالیت آنزیم روبیسکو، تحریک فتوسنتز در شرایط تنش (Muthuchelian *et al*., 1995) می‌گردد.

با توجه به شرایط بحرانی کمبود آب در کشور و شرایط الگوهای بارشی نامنظم باوجود تغییرات شدید اقلیمی تنها راه برای مقابله با تنش خشکی استفاده از روش‌های به باغی مانند کاربرد نهال‌های پیوندی با پایه‌های متحمل به خشکی و تعدیل اثرات تنش خشکی بر عملکرد انگور با استفاده از کاربرد خارجی ترکیبات و تنظیم‌کننده‌های رشد مناسب و ایمن می‌باشد. هدف از این پژوهش یافتن راهکارهای مناسب برای افزایش تحمل نهال های انگور به خشکی با استفاده از دو رقم انگور متحمل به تنش خشکی به‌عنوان پایه و همچنین کاربرد تنظیم‌کننده رشد تریاکانتانول برای بهبود صفات این نهال ها در شرایط تنش خشکی بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش با ۲۷ تیمار از جمله دو رقم به‌عنوان پایه (خوشناو، سرخک قوچان) و رقم بیدانه سفید خود ریشه (شاهد)، سه غلظت تریاکانتانول (صفر (شاهد)، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و سه پتانسیل آب خاک (۰/۲- (شاهد)، ۰/۷- (تنش متوسط)، ۱/۵- (تنش شدید) مگاپاسکال) در ۳ تکرار به صورت آزمون فاکتوریل (فاکتور A پایه، فاکتور B تریاکانتانول (Tria) و فاکتور C سطوح تنش خشکی) در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه تحقیقاتی (با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵±۶۵ و شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی) دانشگاه ملایر (استان همدان، شهرستان ملایر) با طول۴۸ درجه و ۵۱ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۱۹ دقیقه در سال ۱۳۹۷ اجرا گردید. قلمه‌های ارقام مورد مطالعه با قطر ۲-۱/۵ سانتی‌متر و طول ۳۵-۲۵ سانتی‌متر در زمستان سال ۱۳۹۴ از کلکسیون ملی انگور ایران واقع در ایستگاه تحقیقات انگور وابسته به وزارت جهاد کشاورزی شهرستان تاکستان در استان قزوین جمع‌آوری گردید. قلمه‌ها در شاسی گرم در گلخانه ریشه‌دار و به گلدان‌های پلاستیکی منتقل شدند. پس از ۲۰ روز یعنی در اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۵ قلمه‌های ریشه‌دارشده به گلدان‌های ۲۶ لیتری با خاک لومی رسی منتقل شد. قلمه‌های ریشه‌دار در

شرایط یکسان آبیاری و تغذیه شدند. در دی‌ماه ۱۳۹۵ پیوندک‌های تهیه‌شده انگور رقم بیدانه سفید از کلکسیون ایستگاه تحقیقات انگور وابسته به وزارت جهاد کشاورزی شهرستان ملایر، با استفاده از قیچی پیوندزنی امگا (ساخت کشور تایوان) روی پایه‌های خوشناو، سرخک قوچان پیوند شدند. جوانه‌های پایین تر از محل پیوند باید حذف شوند تا پس از فعالیت ریشه در جذب آب و مواد غذایی فقط جوانه پیوندک قادر به رشد باشد. محل پیوند با پارافیلم به خوبی پوشانده شد تا هم پیوندک محکم روی پایه قرار گیرد و هم از خشک‌شدن محل پیوند جلوگیری گردد. برای مرطوب ماندن و بهبود کالوس زایی در محل پیوند اطراف طوقه قلمه تا محل پیوند خاک اره و پرلت قرار داده شد و این منطقه روزانه آبیاری گردید. همچنین روی گلدان‌ها با پلاستیک‌های بی‌رنگ پوشانده شد تا رطوبت پیوندک و محل پیوند نیز حفظ شود. پس از ۱۵ تا ۲۰ روز تقریباً همه پیوندک‌ها شروع به رشد کردند.

به‌منظور تهیه محلول استوک تریاکانتانول ابتدا ۰/۰۰۴۲ گرم تریاکانتانول (شرکت مرک آلمان) را در ۲/۶ میلی‌لیتر کلروفورم حل کرده و سپس ۴ قطره تویین ۲۰ به آن اضافه شد و پس از یکنواختی با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تهیه غلظت‌های مدنظر در پژوهش، ۵ (۵۰Tria میکرومولار) و ۱۰ (Tria ۱۰۰ میکرومولار) میلی‌لیتر از محلول استوک با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید (Naeen *et al.*, 2011). از اواسط اردیبهشت‌ماه تا ۱۰ خرداد به‌مدت سه هفته سه بار نهال‌ها با محلول تریاکانتانول محلول‌پاشی و سپس وارد مرحله اعمال تنش خشکی شدند.

از ۱۰ خردادماه سال ۱۳۹۶ و از ابتدای مرحله ۶-۵ برگی تنش‌های خشکی اعمال گردید و با رسیدن پتانسیل آب خاک به ۰/۲-، ۰/۷- و ۱/۵- مگاپاسکال نمونه‌برداری صورت گرفت. بر اساس پژوهش‌های صورت گرفته، به‌منظور دقت اندازه‌گیری و اعمال صحیح تنش خشکی، کلیه مراحل آزمایش شامل اعمال تنش و اندازه‌گیری‌ها، از ۱۵ خردادماه تا ۱۵ تیرماه به‌طور مشابه سه بار انجام گرفت (Ghaderi *et al.*, 2010; Talaei *et al.*, 2012). برای اعمال تنش خشکی ابتدا از گلدان‌ها در مقادیر مختلف آب، نمونه خاک تهیه شد و با دستگاه صفحه فشاری مکش آن محاسبه شد. سپس براساس مطالعات صورت گرفته در زمینه اعمال تنش خشکی، این میزان مکش را با نتایج یک رطوبت سنج مانند تانسیومتر (Model: PMS-714 شرکت Lutron، کشور تایوان) مقایسه گردید. براساس این مقایسه منحنی رطوبتی رسم گردید و با استفاده از تانسیومتر دیجیتالی رطوبت خاک در عمق ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متری اندازه‌گیری شده و سپس با کمک منحنی رطوبتی به‌دست‌آمده، میزان پتانسیل آب خاک محاسبه شد. صفات فیزیولوژیکی نیز در زمان رسیدن پتانسیل آب خاک به سطح خشکی مورد انتظار که با دستگاه تانسیومتر تعیین گردید، اندازه‌گیری شدند (Talaei *et al.*, 2012).

اندازه‌گیری صفات

نسبت وزن خشک برگ به سطح برگ (LMA)

برای اندازه‌گیری نسبت وزن خشک برگ به سطح برگ (LMA) از روش گالمز استفاده شد. از هر تیمار شش برگ بالغ و سالم از یک سوم انتهایی شاخه انتخاب شد. ابتدا توسط دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (مدل OT)، سطح برگ‌ها اندازه‌گیری و سپس برگ‌ها در ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. برای به‌دست‌آوردن این شاخص وزن خشک برگ به سطح برگ تقسیم می‌شود (Galmes *et al.*, 2007).

پایداری غشای سلولی (MSI)

برای اندازه‌گیری پایداری غشای سلولی از رابطه (۱) استفاده شد که در آن C_1 نشان‌دهنده EC مخلوط حاوی قطعات برگ و آب مقطر است که به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم حرارت داده‌شده است. C_2 نشان‌دهنده EC مخلوط حاوی برگ و آب مقطر در حمام آب ۱۰۰ درجه می‌باشد که به‌مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شده است (Sivritepe *et al.*, 2008).

$$MSI = \left[1 - \frac{C_1}{C_2}\right] \times 100 \qquad (۱)$$

سبزینه (کلروفیل)

به‌منظور اندازه‌گیری سبزینه گیاه، ابتدا عصاره حاوی کلروفیل برگ استخراج یافت و سپس میزان جذب نور توسط عصاره استخراج‌شده با دستگاه طیف سنج نوری (اسپکتروفتومتر) (مدل UV-12000 شرکت جنیوس کشور چین) در طول‌موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر تعیین گردید. در نهایت محتوای سبزینه برگ گیاه از طریق رابطه‌های ۲ و ۳ به دست آمد. در این رابطه‌ها V حجم و W وزن تر نمونه استخراج‌شده می‌باشد (Lichtenthaler & Buschmann, 2001).

$$\text{کلروفیل a} = \left(11.24\,(OD\ 662) - 2.04\,(OD\ 645)\right) \times \left(\frac{V}{(1000 \times W)}\right) \quad (۲)$$

$$\text{کلروفیل b} = \left(20.13\,(OD\ 645) - 4.19\,(OD\ 662)\right) \times \left(\frac{V}{(1000 \times W)}\right) \quad (۳)$$

محتوای آب نسبی برگ (RWC)

برای اندازه‌گیری محتوای آب نسبی برگ، از رابطه (۴) استفاده شد (Sheng *et al*., 2010).

$$\text{RWC} = \frac{\text{وزن خشک دیسک های برگی} - \text{وزن تر دیسک های برگی}}{\text{وزن خشک دیسک های برگی} - \text{وزن آماس دیسک های برگی}} \times 100 \quad (۴)$$

پرولین

برای اندازه‌گیری میزان پرولین از روش Bates *et al*. (1975) استفاده گردید که در آن برای استخراج پرولین از اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد و ناین هیدرین نیز به‌عنوان ماده معرف آن مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت مقدار جذب فاز بالایی عصاره استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری کاتالاز، ۰/۱ گرم برگ در هاون چینی سردشده با ازت مایع خرد گردید و عصاره تهیه شد، نمونه‌ها به داخل ویال‌های دو میلی‌لیتری منتقل شده و یک میلی‌لیتر بافر فسفات به آن‌ها اضافه گردید. سپس ویال‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار (دل TDL-4 شرکت جنیوس کشور چین) ۴درجه سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. مقدار ۵۰ میکرولیتر عصاره به بافر واکنش مخصوص اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز که شامل سه میلی‌لیتر بافر فسفات و ۴/۵ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن بود، اضافه گردید و در طول موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت سه دقیقه میزان جذب مشاهده شد (Mehri *et al*., 2014). در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز میزان جذب در طی سه دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار تتراگویاکول (Tetra-guaiacol) تشکیل‌شده با کمک ضریب خاموشی محاسبه شد (ε=26.6 mM^{-1} cm^{1}). بر این اساس فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز به‌صورت میکرومول تتراگویاکول تشکیل‌شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین (µ mol/mine/ mg protein) بیان گردید (Hemeda & Kelin, 1990).

گلایسین بتائین

برای اندازه‌گیری میزان گلایسین بتائین به ۰/۵ گرم برگ خشک ۲۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر اضافه شد و پس از تکان دادن با شیکر به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس نمونه از کاغذ صافی عبور داده شد و یک میلی‌لیتر از عصاره گیاهی با یک میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۲ نرمال مخلوط شده و در حمام آب یخ قرار گرفت. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر محلول یدین-یدید پتاسیم به مخلوط واکنش اضافه گردید و محلول به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه برای ۱۵ دقیقه در دمای صفر درجه و سرعت ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. فاز بالایی محلول با میکروپیپت جداشده و مقدار ۹ میلی‌لیتر ۱ و ۲-دی کلرواتان به آن اضافه گردید و به‌مدت یک دقیقه به شدت تکان داده شد و بعد از ۲/۵ ساعت میزان جذب در طول موج ۳۶۵ نانومتر قرائت گردید. برای تهیه نمونه استاندارد از غلظت‌های ۷ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گلایسین بتائین استفاده گردید (Grieve & Grattan, 1983).

تجزیه آماری

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه

۹/۴ انجام و مقایسه میانگین آن‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج و یک درصد صورت گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ استفاده گردید.

نتایج و بحث

براساس نتایج نوع پایه به‌جز کلروفیل کل، پایداری غشای سلولی و محتوای آب نسبی برگ در بقیه صفات اثر معنی‌دار داشت و اثر تریاکانتانول و میزان تنش خشکی در مورد همه صفات معنی‌دار شد. اثر متقابل نوع پایه و غلظت‌های تریاکانتانول بر همه صفات معنی‌دار شد، به‌طوری‌که اکثر صفات در سطح یک درصد معنی‌دار بودند و فقط فعالیت آنزیم پراکسیداز و محتوای آب نسبی برگ در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱).

نسبت وزن خشک به سطح برگ

اثر مستقل نوع پایه، اثر تریاکانتانول و سطوح تنش خشکی و نیز اثر متقابل این فاکتورها بر صفت LMA معنی‌دار بود (جدول ۱).

در مورد اثر متقابل این فاکتورها بر صفت LMA نتایج پژوهش نشان می‌دهد که با افزایش سطوح تنش خشکی میزان این صفت در نهال‌های بیدانه سفید خود ریشه، کاهش بیشتری نسبت به نهال‌های پیوندی با پایه خوشناو و سرخک قوچان داشت.

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر پایه، تریاکانتانول و تنش خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیکی انگور رقم بیدانه سفید

Table 1. Results of variance analysis effect of rootstock, triacontanol and drought stress on some physiology traits on ‘Bidaneh sefid’ grapevine

Source of variation	Df	Means of Squares							
		Leaf mass area	Total chlorophyll	Membrane stability index	Relative water content	Glysinebetaine	Proline	Catalase	Peroxidase
Rootstock(A)	2	7.94*	0.262^{ns}	25397 ^{ns}	17.72^{ns}	2.56*	36.6**	6.004**	96.6*
Tria (B)	2	0.26**	0.197**	322.8**	127.25**	10.17**	82.71**	16.701**	271.006**
Drought (C)	2	0.01**	0.101*	20.08**	54.49**	14.62**	67.22**	9.62**	164.55*
A×B	4	0.07 **	0.219**	50.85**	9.74*	0.94**	6.004**	1.31**	5.63*
A×C	4	0.005**	0.503^{ns}	15.98**	6.02*	1.47**	5.69**	1.01**	11.903*
B×C	4	0.001**	0.086**	11.3**	5.66**	1.69**	8.153**	0.484**	2.42*
A×B×C	8	0.001**	0.006**	11.6**	5.93**	1.001**	3.11**	0.007**	4.609*
Error	54	0.002	0.002	9.7	3.77	0.48	0.809	0.416	184.12
CV (%)	-	4.6	7.15	12.12	9.3	13.52	14.26	12.83	16.35

*، ** و :ns به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

*, **, ns: significantly differences at 5% and 1% of probability levels and non-significantly difference, respectively.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر پایه، تریاکانتانول و تنش خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیکی انگور رقم بیدانه سفید

Table 2. Mean comparisons effect of rootstock, triacontanol and drought stress on some physiology traits on ‘Bidaneh sefid’ grapevine

Treatment	Leaf mass area (mg/cm^2)	Total chlorophyll ($mg\ g^{-1}$ F. W.)	Membrane stability index (%)	Relative water content (%)	Glysinebetaine (µM/ g F. W.)	Proline (µM/g F. W)	Catalase (Unit/ gr F. W.)	Peroxidase (µM/mine/mg proteine)
Rootstock								
Bidaneh Sefid	1.94 b*	1.48 ab	76.73 ab	87.96 ab	0.98 c	9.57 c	5.68 b	586.98 b
Sorkhak Ghouchan	1.91 b	1.58 a	76.32 ab	88.46 a	1.11 b	10.52 b	5.82 b	593.73 b
Khoshnav	2.23 a	1.61 a	77.21 a	88.67 a	1.34 a	11.35 a	6.83 a	615.87 a
Triacontanol								
0 (µM)	1.8 c	1.53 c	74.92 c	86.93 b	0.96 b	9.18 c	5.29 b	574.55 c
50 (µM)	2.02 b	1.64 b	76.17 b	88.06 ab	1.15 ab	10.52 b	6.16 ab	597.57 b
100 (µM)	2.24 a	1.76 a	77.17 a	89.11 a	1.31 a	11.73 a	6.89 a	624.45 a
Drought								
-0.2	2.33 a*	1.6 a	77.58 a	89.32 a	0.93 b	8.61 c	4.9 c	561.001 c
-0.7	2.003 b	1.56 ab	76.2 b	87.35 b	1.19 ab	10.73 b	6.22 b	599.35 b
-1.2	1.74 c	1.3 b	74.48 c	85.07 c	1.3 a	12.09 a	7.23 a	636.23 a

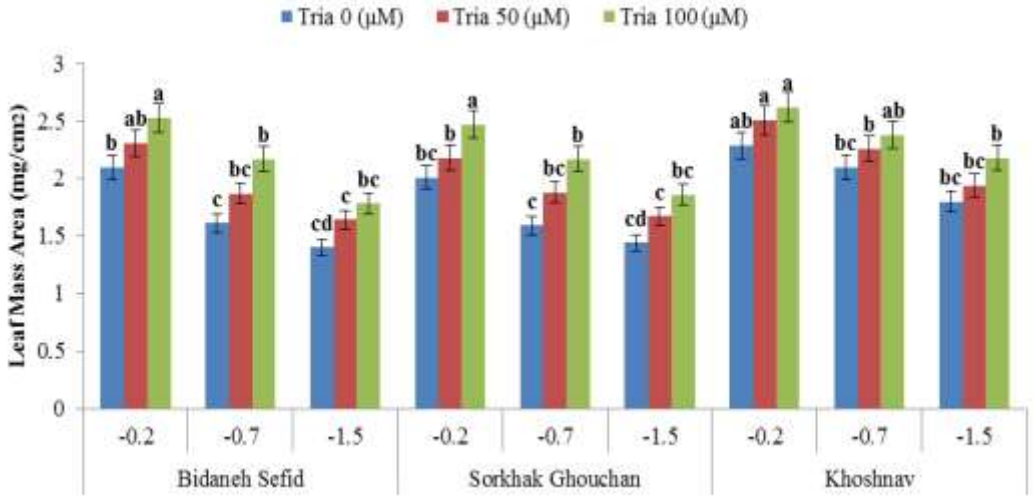
* حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده نبود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

* Means within a column followed by the same letter are not significant at the level of 5%.

در شرایط تنش خشکی شدید (۱/۵- مگاپاسکال) بیشترین میزان LMA مربوط به نهال‌های پیوندی با پایه خوشناو (۲/۱۸ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع) تیمار شده با تریکانتانول ۱۰۰ میکرومولار بود. همچنین براساس نتایج بدست آمده با افزایش غلظت تریاکانتانول میزان LMA در هر سطح از تنش خشکی و هر کدام از نهال‌های پیوندی و غیر پیوندی ۱۹/۶۷ درصد افزایش‌یافته است (شکل ۱). صفت LMA از شاخص‌های تحمل گیاهان به تنش خشکی می‌باشد و بر این اساس ارقامی که در این صفت طی تنش خشکی تغییرات کمتری را نشان دهند کارایی فتوسنتز بیشتری داشته و احتمالاً نسبت به تنش خشکی متحمل می‌باشند (Kennedy, 2008). در شرایط تنش خشکی گیاه برای مقابله با کم‌آبی و حفظ حداقل آب جذب‌شده، میزان رشد رویشی و تولید بیومس را کاهش می‌دهد. همچنین گیاه با کاهش توسعه بخش هوایی در شرایط تنش خشکی باعث می‌شود سطح تبخیر و تعرق گیاه نسبت به منطقه جذب یعنی ریشه کاهش یابد و گیاه امکان عبور از تنش را پیدا کند. از این‌رو صفت LMA نیز به‌طور طبیعی افت می‌کند (Anjum, 2011; Yıldırım *et al*., 2018). در این مطالعه میزان LMA در نهال‌های پیوند شده روی پایه خوشناو بهتر از سایر نهال‌ها بود. این موضوع می‌تواند به دلیل توانایی پایه این نهال‌ها در جذب آب و مواد معدنی باشد، زیرا بر اساس مطالعات صورت گرفته خوشناو از ارقام بومی است که به دلیل ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی نسبت به تنش خشکی متحمل‌تر می‌باشد (Ghaderi *et al.*, 2010). در مورد اثر تنظیم‌کننده تریاکانتانول در بهبود LMA در نهال‌های تیمار شده با این ترکیب گزارش شده است که این ترکیب در استفاده تنها و یا به همراه ترکیبات دیگر مانند اسید جیبرلیک باعث افزایش جذب آب و مواد غذایی و همچنین بهبود ترکیبات غذایی و معدنی در برگ شده است که میزان LMA را بهبود می‌بخشد. (Singh *et al.*, 2011). تریاکانتانول باعث افزایش سطح جذب آب و مواد غذایی در ریشه و نیز افزایش میزان فتوسنتز در شرایط تنش‌ها می‌گردد که مانع از کاهش شدید LMA در اثر تنش خشکی می‌شود (Chen *et al*., 2005; Perveen *et al*., 2014).

میزان کلروفیل

براساس نتایج تجزیه واریانس داده ها اثر پایه بر محتوای کلروفیل معنی‌دار نشد، ولی اثر تریاکانتانول و سطوح تنش خشکی بر این صفت معنی‌دار گردید و اثرات متقابل این فاکتورها نیز در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۱).



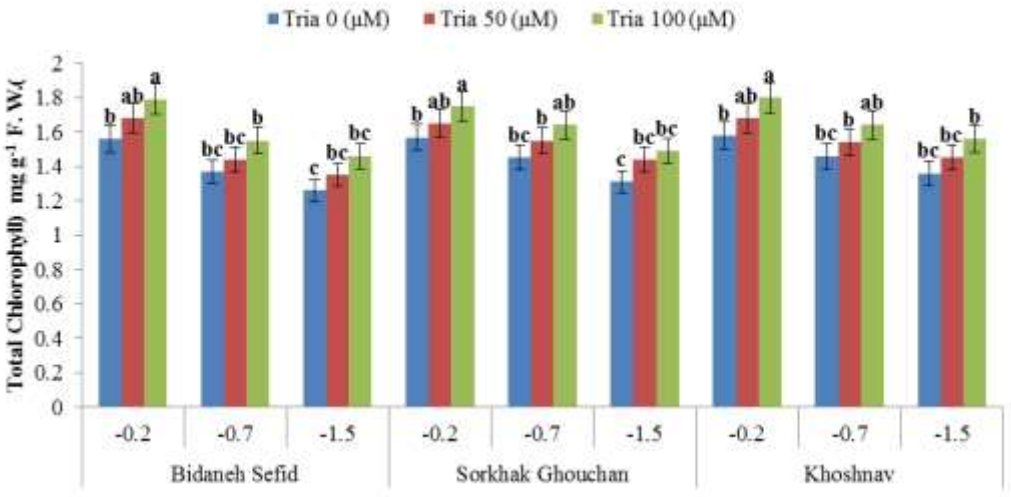
شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل پایه، تریاکانتانول و تنش خشکی بر نسبت وزن خشک برگ بر سطح برگ (LMA) انگور رقم بیدانه سفید

Figure 1. Mean comparison interaction effect of rootstock, triacontanol and drought stress on dry weight to leaf area ratio (LMA) on 'Bidaneh Sefid' grapevine

میزان کلروفیل در غلظت ۱۰۰ میکرومولار ترکیب تریاکانتانول نسبت به شاهد ۱۴ درصد افزایش داشت. ازنظر اثر سطوح تنش خشکی نیز با اعمال تنش خشکی میزان کلروفیل به طور معنی‌داری تا ۲۰ درصد کاهش یافت (جدول ۲). بر اساس نمودار اثر متقابل فاکتورهای مختلف، میزان کلروفیل به جز در نهال‌های با پایه رقم خوشناو، با افزایش تنش خشکی به طور معنی‌داری کاهش یافت. در تیمار بدون تنش خشکی (۰/۲- مگاپاسکال) با افزایش کاربرد ترکیب تریاکانتانول میزان کلروفیل به طور معنی‌داری در همه ارقام افزایش تا ۱۳ درصدی نشان داد ولی در سایر سطوح تنش این میزان افزایش کلروفیل در غلظت‌های مختلف تریاکانتانول معنی‌دار نبود. در شرایط تنش خشکی شدید بیشترین میزان کلروفیل در نهال‌های پیوندی با پایه رقم خوشناو (۱/۵۶ میلی‌گرم در گرم وزن‌تر) نسبت به نهال‌های غیر پیوندی خود ریشه بیدانه سفید (۱/۴۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر) حاصل شد که البته دارای اختلاف معنی‌دار با هم نبودند (شکل ۲). تنش خشکی باعث آسیب به کلروپلاست و از بین رفتن کلروفیل‌ها می‌گردد و نیز فعالیت آنزیم گلوتامات لیگاز کم و تولید کلروفیل مختل می‌شود که در نتیجه آن گلوتامین موجود در سلول بیشتر به پرولین تبدیل می‌گردد (Jacobs, 2010). بیشتر بودن کلروفیل در نهال‌های پیوندی بر پایه رقم خوشناو نشان‌دهنده توانایی این پایه در جذب بهتر رطوبت خاک در شرایط تنش و ممانعت از آسیب کلروپلاست می‌باشد. بر اساس مطالعات صورت گرفته رقم خوشناو در شرایط تنش خشکی تحمل بیشتری نسبت به ارقام شاهد نشان داده است (Azizi *et al*., 2009). در اثر بروز تنش خشکی به غشای تیلاکوئیدی آسیب وارد می‌گردد و منجر به از بین رفتن کلروفیل‌ها می‌گردد. از آنجایی‌که تریاکانتانول باعث ممانعت از آسیب به غشای سلول و اندامک های سلولی می‌گردد، رنگیزه‌های فتوسنتزی با شدت کمتری کاهش می‌یابند (Verma *et al*., 2011). تریاکانتانول باعث افزایش جذب آب و ماد غذایی (نیتروژن، فسفر، پتاسیم و کلسیم) می‌شود و همین امر تولید کلروفیل‌ها را تعدیل کرده و مانع افت شدید میزان آن می‌گردد. تریاکانتانول همچنین با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از تخریب اندام فتوسنتزی مانند کلروفیل‌ها توسط رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند (Perveen *et al*., 2014).

پایداری غشای سلولی

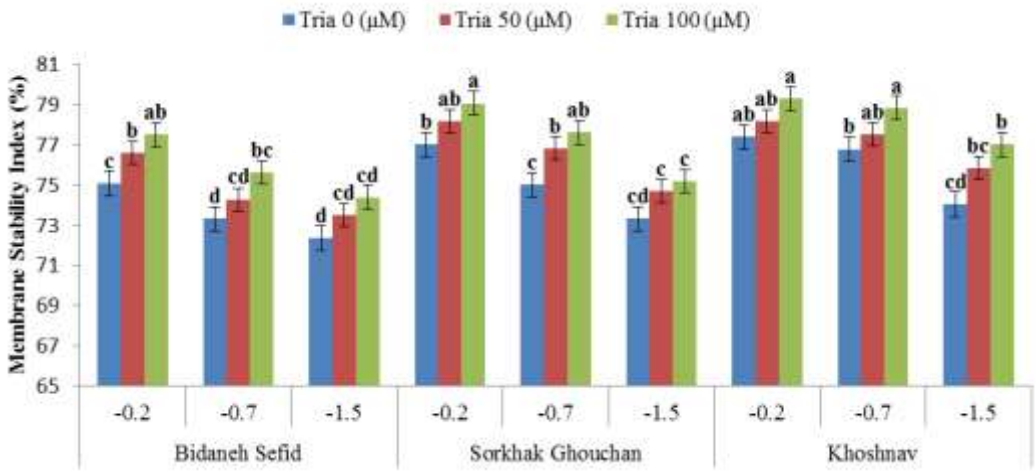
در این صفت نوع پایه منجر به تفاوت معنی‌دار نگردید، ولی سایر فاکتورهای تریاکانتانول و سطوح تنش خشکی اثر مستقل معنی‌دار بر پایداری غشای سلولی نشان دادند. اثرات متقابل این فاکتورها نیز همگی در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۱).



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل پایه، تریاکانتانول و تنش خشکی بر محتوای کلروفیل برگ انگور رقم بیدانه سفید

Figure 2. Mean comparison interaction effect of rootstock, triacontanol and drought stress on total chlorophyll on 'Bidaneh Sefid' grapevine

نهال‌های با پایه خوشناو بیشترین پایداری غشای سلولی را داشتند که البته با نهال‌های شاهد و پیوندی با پایه سرخک قوچان تفاوت معنی‌دار نشان نداد. با کاربرد تنظیم‌کننده تریاکانتانول از غلظت‌های ابتدایی (۵۰ میکرومولار) افزایش معنی‌دار پایداری غشای سلولی مشاهده گردید و در غلظت ۱۰۰ میکرمولار به بیشترین میزان (۷۷/۱۷ درصد) رسید به‌طوری‌که بین پایداری غشای سلولی در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیز اختلاف معنی‌دار ایجاد شد. در مورد سطوح تنش خشکی نیز با افزایش تنش خشکی میزان پایداری غشای سلولی به‌طورکلی کاهش (۵ درصد) یافت. (جدول ۲). بر اساس نتایج اثر متقابل فاکتورهای تیماری مختلف این پژوهش، با اعمال سطوح تنش خشکی میزان پایداری غشای سلولی به‌طور معنی‌دار در همه نهال‌های پیوندی و غیر پیوندی کاهش یافت ولی شدت کاهش در نهال‌های غیر پیوندی خود ریشه بیدانه سفید بیش از سایر ارقام بود. با کاربرد تنظیم‌کننده تریاکانتانول میزان پایداری غشای سلولی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به‌طوری‌که در تیمار بدون تنش میزان MSI در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در نهال‌های با پایه سرخک (۷۹/۰۷ درصد) و خوشناو (۷۹/۲۹ درصد) به بیشترین مقدار خود رسید. در سطح تنش شدید خشکی (۱/۵- مگاپاسکال) حتی با وجود استفاده از تریاکانتانول نیز میزان پایداری غشای سلولی افزایش معنی‌دار نداشت، به‌جز در نهال‌های با پایه خوشناو که در این شرایط افزایش معنی‌داری (۴/۳ درصد) نشان داد (شکل ۳). در اثر تنش خشکی مانند بسیاری از تنش‌های دیگر نشت یونی از مهم‌ترین اختلالات ایجادشده در گیاه می‌باشد که به دنبال کاهش پایداری غشای سلولی حادث می‌شود. تعیین میزان نشت یونی و یا اندازه‌گیری پایداری غشای سلولی می‌تواند پژوهشگران را در تعیین توانایی تحمل یک گیاه به تنش خشکی یاری کند (Ghaderi *et al.*, 2010). در این مطالعه نهال‌های پیوندی روی پایه خوشناو و سرخک قوچان پایداری غشای سلولی بهتری نسبت به نهال‌های غیر پیوندی شاهد نشان دادند که می‌تواند تعیین‌کننده توانایی تحمل آن نهال‌ها باشد. نهال‌هایی که پایداری غشای سلولی بیشتری دارند از غیرفعال شدن پروتئین‌های غشا و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا ممانعت می‌کنند (Bota *et al.*, 2004). تریاکانتانول باعث مقاومت غشای سلولی به‌وسیله تنظیم ترکیبات لیپیدی غشا می‌گردد (Perveen *et al.*, 2014). از مهم‌ترین عکس‌العمل‌های ترکیب تریاکانتانول ممانعت از پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلول می‌باشد که منجر به بهبود پایداری غشا در شرایط تنش می‌گردد. همچنین تریاکانتانول با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و پراکسیداز باعث فعال‌شدن بهتر مکانیسم دفاعی اکسیداتیو گیاه می‌گردد (Perveen *et al.*, 2014; Sabir *et al.*, 2011).



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل پایه، تریاکانتانول و تنش خشکی بر پایداری غشای سلولی (MSI) انگور رقم بیدانه سفید

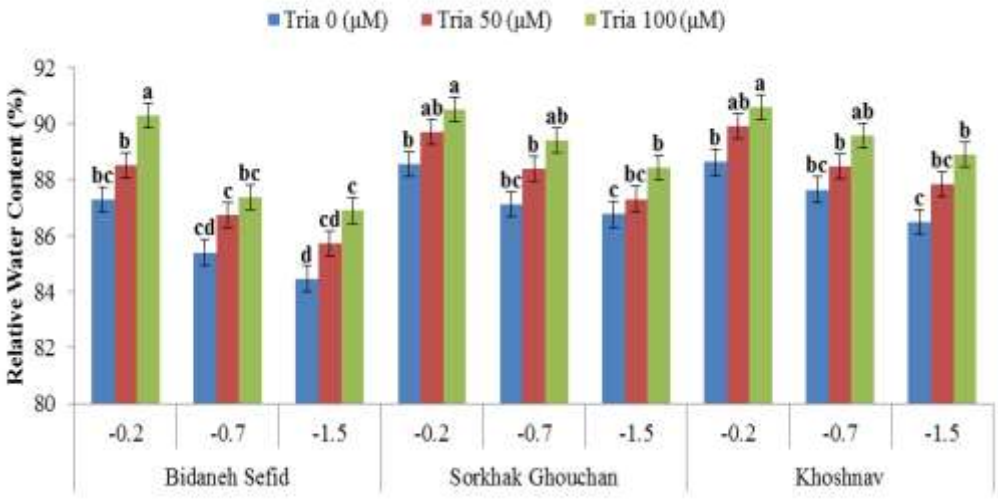
Figure 3. Mean comparison interaction effect of rootstock, triacontanol and drought stress on Membrane Stability Index (MSI) on 'Bidaneh Sefid' grapevine

محتوای آب نسبی برگ (RWC)

براساس آنالیز تجزیه واریانس، فاکتورهای ترکیب تریاکانتانول و سطوح تنش خشکی باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار این صفت شدند و اثرات متقابل همه فاکتورها معنی‌دار شد (جدول ۱). بر اساس نتایج حاصل از اثرات متقابل می‌توان مشاهده کرد که با اعمال تنش خشکی، میزان محتوای نسبی آب برگ کاهش معنی‌دار یافت. در شرایط تنش شدید خشکی نهال‌های پیوندی روی پایه خوشناو و سرخک RWC بیشتری نسبت به نهال‌های خود ریشه بیدانه سفید داشتند که نشان‌دهنده توانایی این پایه‌ها در تحمل به خشکی می‌باشد. همچنین با استفاده از ترکیب تریاکانتانول به‌جز در تنش خشکی متوسط در سایر سطوح تنش خشکی میزان محتوای آب نسبی برگ افزایش نشان داد (شکل ۴). یکی از صفات مهم برای تعیین میزان تحمل به تنش خشکی اندازه‌گیری میزان محتوای آب نسبی برگ می‌باشد که درنهایت قابلیت جذب بهتر آب و بهبود هدایت روزنه‌ای توسط گیاه را نشان می‌دهد (Jalili marandi *et al.*, 2011). پژوهشگران دلیل بهبود جذب آب در نهال‌های پیوندی را توسعه بهتر ریشه و توانایی جذب بهتر آب بیان نموده‌اند (Jacobs, 2010; Carbonneau, 1985; Yıldırım *et al.*, 2018). تریاکانتانول در گیاهان تحت تنش‌های محیطی منجر به افزایش RWC می‌گردد زیرا از مهم‌ترین اثرات ترکیب تریاکانتانول افزایش جذب آب و مواد معدنی در شرایط تنش و غیر تنش می‌باشد. همین عامل باعث می‌گردد که کاهش محتوای آب نسبی برگ در نهال‌هایی که تحت تیمار تریاکانتانول قرارگرفته‌اند تعدیل گردد (Chen *et al.*, 2003). همچنین تریاکانتانول تأثیر مستقیم در افزایش رشد ریشه در شرایط تنش دارد که با این کار اندام جذب‌کننده آب افزایش‌یافته و میزان جذب آب بهبود می‌یابد (Ertani *et al.*, 2013).

گلایسین بتائین

تغییرات میزان این ترکیب از نظر اثرات مستقل و متقابل فاکتورهای تیماری نوع پایه، غلظت‌های مختلف تریاکانتانول و سطوح تنش خشکی معنی‌دار گردید (جدول ۱). بیشترین میزان گلایسین بتائین در نهال‌های پیوندی با پایه خوشناو (۱/۳۴ میکرومول در گرم وزن تر) و کمترین میزان آن در نهال‌های غیر پیوندی خود ریشه بیدانه سفید (۰/۹۸ میکرومول در گرم وزن تر) ثبت گردید. غلظت‌های مختلف تریاکانتانول نیز باعث افزایش ۲۶/۷ درصدی این ترکیب شد و با اعمال تنش خشکی نیز میزان گلایسین بتائین افزایش معنی‌دار نشان داد (جدول ۲). با اعمال تنش خشکی میزان گلایسین بتائین در همه نهال‌های پیوندی و غیر پیوندی افزایش معنی‌دار یافت.



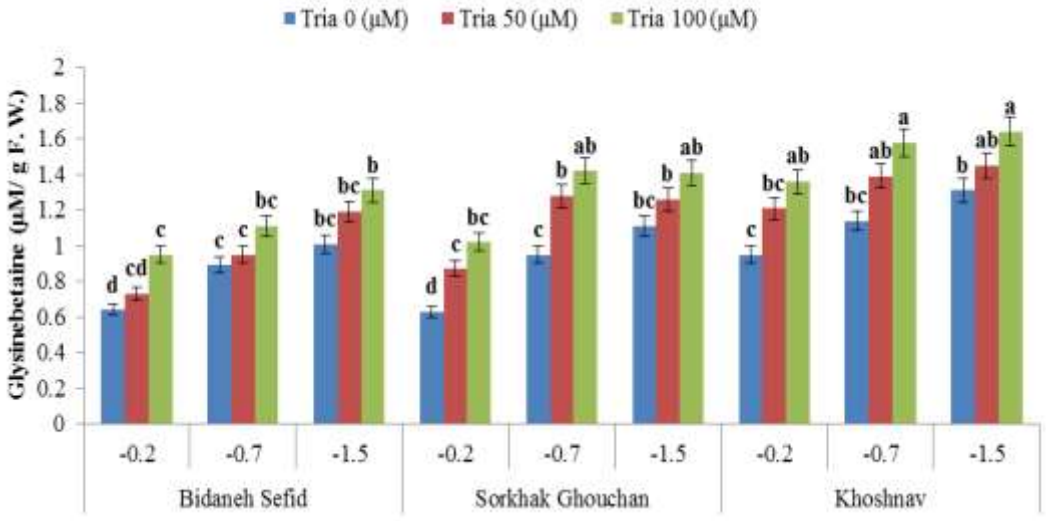
شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل پایه، تریاکانتانول و تنش خشکی بر محتوای آب نسبی برگ (RWC) انگور رقم بیدانه سفید

Figure 4. Mean comparison interaction effect of rootstock, triacontanol and drought stress on relative water content (RWC) on 'Bidaneh Sefid' grapevine

در نهال غیرپیوندی خود ریشه بیدانه سفید تریاکانتانول باعث افزایش گلایسین بتائین گردید. بر این اساس بیشترین گلایسین بتائین در شرایط تنش خشکی شدید و در نهال‌های پیوندی با پایه خوشناو (۱/۶۴ میکرومول در گرم وزن تر) در غلظت ۱۰۰ میکرومولار تریاکانتانول مشاهده شد که با نهال‌های شاهد خود ریشه تفاوت معنی‌دار داشت (شکل ۵). در شرایط تنش خشکی میزان ترکیبات آلی سازگار مانند بتائین ها افزایش می‌یابد و گلایسین بتائین به‌عنوان یک ترکیب آمونیومی چهارگانه مهم‌ترین بتائین سازگار در گیاهان محسوب می‌شود که در شرایط تنش افزایش می یابد (Yang & Lu, 2005). این ترکیب باعث محافظت از غشای تیلاکوئیدی و محافظت از اندام فتوسنتزی و همچنین بهبود پتانسیل آب در سلول‌های گیاهی می‌گردد. در شرایط تنش خشکی گلایسین بتائین در نهال‌های با پایه خوشناو بیشتر از سایر نهال‌ها افزایش یافت و این امر نشان‌دهنده تحمل بیشتر این ترکیب پایه و پیوندک در برابر خشکی می‌باشد. تنظیم‌کننده تریاکانتانول نیز باعث افزایش تولید این ترکیب آلی در نهال‌ها گردید که این امر به دلیل اثرگذاری این ترکیب بر جذب بهتر مواد غذایی و به‌ویژه عنصر نیتروژن و افزایش متابولیسم نیتروژن و تولید بیشتر بتائین ها در شرایط تنش‌های رطوبتی می‌باشد (Naeem *et al.*, 2012).

پرولین

این آمینواسید نیز مانند گلایسین بتائین از نظر اثر مستقل و متقابل فاکتورهای تیماری نوع پایه، غلظت‌های تریاکانتانول و سطوح تنش خشکی تغییرات معنی‌دار نشان داد (جدول ۱). میزان پرولین در نهال‌های پایه‌های مختلف متفاوت بودند به‌طوری‌که پیوندک روی پایه خوشناو بیشترین (۱۱/۳۵ میکرومول در گرم وزن تر) و نهال خود ریشه بیدانه سفید کمترین (۹/۵۷ میکرومول در گرم وزن تر) میزان پرولین را نشان دادند. تریکانتانول باعث افزایش معنی‌دار پرولین در نهال‌ها شد و از غلظت ۵۰ میکرومولار (۱۰/۵۲ میکرومول در گرم وزن تر) نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار را نشان داد، به طوری که در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار نسبت به شاهد باعث افزایش ۲۲ درصدی پرولین گردید. در این پژوهش افزایش ۲۹ درصدی در اثر اعمال سطوح تنش خشکی در میزان پرولین مشاهده شد (جدول ۲). با افزایش شدت تنش خشکی در همه نهال‌های پیوندی و غیر پیوندی به‌طور معنی‌داری میزان پرولین افزایش داشت ولی این افزایش در نهال‌های پیوندی و به‌خصوص نهال‌های با پایه خوشناو بیشتر از نهال‌های غیر پیوندی خود ریشه بیدانه سفید بود. تریاکانتانول نیز باعث افزایش معنی‌دار پرولین در همه نهال‌ها گردید.



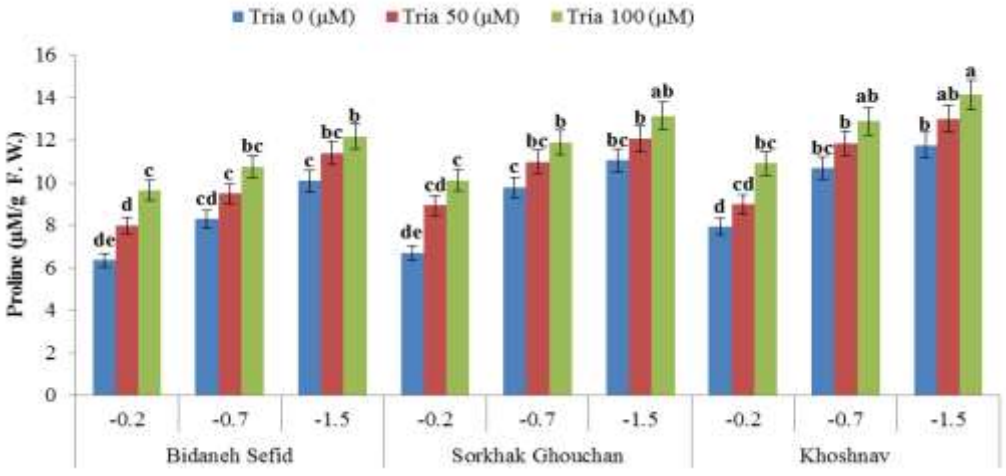
شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل پایه، تریاکانتانول و تنش خشکی بر گلایسین بتائین انگور رقم بیدانه سفید

Figure 5. Mean comparison interaction effect of rootstock, triacontanol and drought stress on glysinebetaine on 'Bidaneh Sefid' grapevine

براساس نتایج بیشترین میزان پرولین در پیوندک بیدانه سفید پیوند شده روی پایه خوشناو (۱۴/۱۳ میکرومول در گرم وزن تر) در تنش شدید خشکی با تیمار ۱۰۰ میکرومولار تریاکانتانول ثبت گردید که با نهال غیر پیوندی بیدانه سفید (۱۲/۱۹ میکرومول در گرم وزن تر) اختلاف معنی‌دار نشان داد (شکل ۶). تولید این آمینواسید آزاد در زمان تنش خشکی باعث تنظیم اسمزی، کاهش از دست رفتن آب، حفظ آماس سلول و محافظت از ترکیبات پروتئینی و سیستم غشایی سلول می‌گردد. پرولین در کلروپلاست تولید می‌شود، ولی در همه جای سلول وجود دارد و در برگ سریعاً در طی تنش خشکی تجمع می‌یابد (Kantar *et al.*, 2011). رقم‌ها و گیاهانی که تجمع بیشتری از این ترکیب را داشته باشند می‌توانند شرایط خشکی را بهتر تحمل کنند. در این مطالعه نهال‌های پیوندی با پایه خوشناو تجمع بیشتری از این اسیدآمینه را نشان دادند که می‌تواند نشان‌دهنده برتری این پایه در تحمل به خشکی باشد. تریاکانتانول نیز به‌خوبی باعث افزایش تولید اسیدهای آمینه می‌گردد (Muthuchelian *et al.*, 1997; Perveen *et al.*, 2014). این ترکیب علاوه بر این‌که جذب آب و مواد غذایی را در شرایط تنش بهبود می‌بخشد باعث افزایش متابولیسم نیتروژن می‌گردد و تولید اسیدهای آمینه را افزایش می‌دهد (Ertani *et al.*, 2013). در این پژوهش نیز با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده میزان پرولین افزایش یافت.

فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز

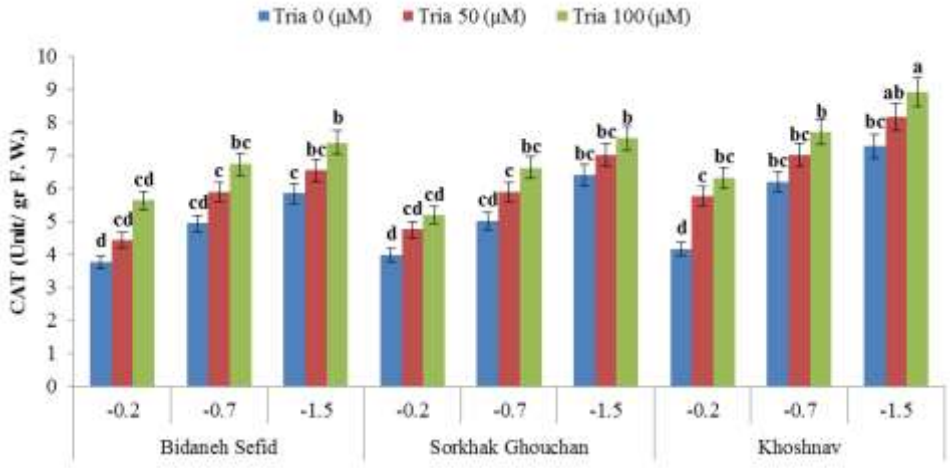
تغییرات فعالیت این دو آنزیم از نظر اثر مستقل و متقابل فاکتورهای تیماری نوع پایه، غلظت‌های تریاکانتانول و سطوح تنش خشکی معنی‌دار بودند. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در نهال‌های پیوند شده روی پایه خوشناو (آنزیم کاتالاز (۶/۸۳ واحد در گرم وزن تر) و آنزیم پراکسیداز (۶۱۵/۸۷ میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)) بیش از نهال‌های دیگر بود و نهال‌های پیوند شده روی پایه سرخک و نهال‌های غیر پیوندی خودریشه بیدانه سفید با هم تفاوت معنی‌دار نداشتند. تیمار تریاکانتانول میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را ۲۳ درصد و میزان فعالیت پراکسیداز را هشت درصد افزایش داد. همچنین با اعمال تیمارهای تنش خشکی در نهال‌های پیوندی و غیر پیوندی، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۳۲ درصد) و پراکسیداز (۱۱ درصد) به‌طور معنی‌دار افزایش نشان داد (جدول ۲). ازنظر اثر متقابل فاکتورهای مختلف بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بر اساس نتایج می‌توان مشاهده کرد که با افزایش تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به‌صورت معنی‌داری در همه نهال‌ها افزایش یافت.



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر متقابل پایه، تریاکانتانول و تنش خشکی بر پرولین انگور رقم بیدانه سفید

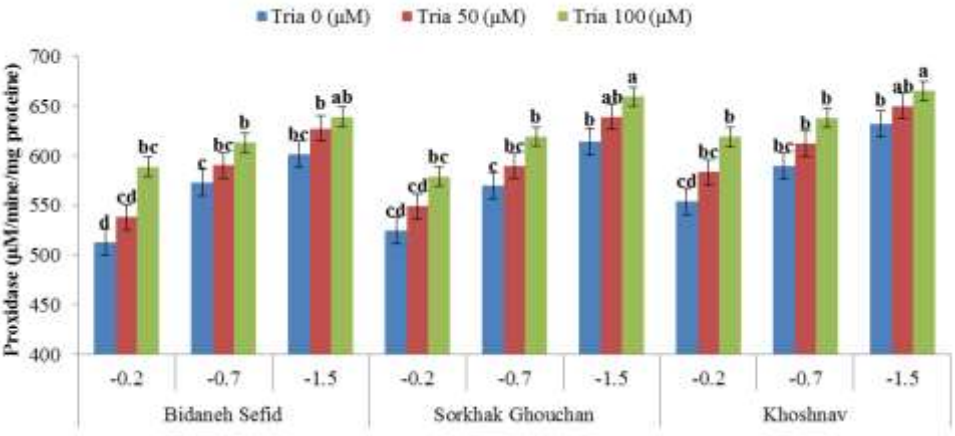
Figure 6. Mean comparison interaction effect of rootstock, triacontanol and drought stress on proline on ‘Bidaneh Sefid’ grapevine

تیمار تریاکانتانول نیز باعث افزایش معنی‌دار در اغلب نهال‌ها و سطوح تنش خشکی به‌جز سطح تنش متوسط خشکی (۰/۷- مگاپاسکال) گردید. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح تنش شدید در نهال پیوندی با پایه خوشناو (۸/۹۳ واحد در گرم وزن تر) در تیمار تریاکانتانول ۱۰۰ میکرومولار مشاهده گردید (شکل ۷). فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش شدت تنش خشکی افزایش ۱۱ درصدی معنی‌دار نشان داد و تیمارهای تریاکانتانول نیز باعث افزایش فعالیت این آنزیم به‌طور معنی‌دار شد. در سطح تنش شدید و تریاکانتانول ۱۰۰ میکرومولار میزان فعالیت این دو آنزیم در نهال‌های مختلف افزایش قابل ملاحظه ای داشتند، ولی بین آن‌ها تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (شکل ۸). با ادامه شرایط تنش خشکی، گیاه دچار تنش ثانویه‌ای به نام تنش اکسایشی می‌گردد که ناشی از رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد و باعث اختلال در فعالیت گیاه و تخریب غشای سلولی می‌شود (Gill & Tuteia, 2010). این عوامل مخرب به‌راحتی با آسیب به غشای سلولی وارد سلول شده و اندام‌های مهم سلول را از بین می‌برند و فرآیند فتوسنتز و تنفس مختل می‌گردد. ترکیبات آنتی‌اکسیدان آنزیم‌هایی مانند آنزیم کاتالاز و پراکسیداز از سدهای مقابله با این رادیکال‌ها می‌باشد که در شرایط تنش خشکی فعالیت این آنزیم‌ها افزایش می‌یابد (Yong *et al*., 2008).



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر متقابل پایه، تریاکانتانول و تنش خشکی بر کاتالاز انگور رقم بیدانه سفید

Figure 7. Mean comparison interaction effect of rootstock, triacontanol and drought stress on catalase on ‘Bidaneh Sefid’ grapevine



شکل ۸. مقایسه میانگین اثر متقابل پایه، تریاکانتانول و تنش خشکی بر پراکسیداز انگور رقم بیدانه سفید

Figure 8. Mean comparison interaction effect of rootstock, triacontanol and drought stress on proxidase on ‘Bidaneh Sefid’ grapevine

پس در رقم‌ها و نهال‌هایی که میزان فعالیت این آنزیم‌ها بیشتر باشد، توانایی تحمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی و تنش‌های ثانویه اکسیداتیو بیشتر خواهد بود. در این پژوهش نهال‌های پیوندی با پایه خوشناو نسبت به سایر نهال‌ها میزان فعالیت بیشتری از این دو آنزیم آنتی‌اکسیدانی نشان داد که دلیل بر توانایی بیشتر این ترکیب پایه و پیوندک در برابر تنش خشکی می‌باشد. تریاکانتانول باعث تحریک تولید فلاونوئیدها، متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گیاهان تحت شرایط تنش خشکی می‌گردد و باعث افزایش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز و مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌شود. از این رو است که این ترکیب به‌خوبی از پراکسیداسیون غشای سلولی محافظت می‌کند (Perveen *et al*., 2014).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اهمیت تأثیر پایه بر پیوندک در علم باغبانی به نظر می رسد که استفاده از پایه های متحمل به تنش خشکی برای پیوندک‌های ارقام تجاری انگور مانند رقم بیدانه سفید می‌تواند یک راه برون رفت از محدودیت کمبود آب برای تاک‌داران مناطق مختلف ایران باشد. براساس نتایج پژوهش حاضر، پایه خوشناو با افزایش نسبت وزن خشک برگ به سطح برگ، پایداری غشای سلولی، محتوای آب نسبی، پرولین و گلایسین بتائین بیشتر در شرایط تنش خشکی می تواند به‌عنوان یک پایه مناسب برای رقم بیدانه سفید معرفی گردد. استفاده از ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشد می‌تواند از دیگر راه‌های افزایش تحمل انگور به شرایط تنش خشکی باشد که در این پژوهش ترکیب تریاکانتانول در غلظت ۱۰۰ میکرومولار توانست با بهبود محتوای آب نسبی برگ، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پرولین و گلایسین بتائین باعث بهبود توانایی نهال برای مقابله با تنش خشکی گردد.

REFERENCES

1. Ahmadi, K., Gholizadeh, H., Ebadzadeh, H. R., Hatami, F., Hosseinpour, R., Kazemifard, R. & Abdoshah, H. (2016). *Agricultural Statistics 2015*, Volume 3, Publications Center of Information and Communication Technology in Ministry of Agriculture. Tehran. 253 pages.
2. Alsina, M.M., Smart, D.R., Bauerle, T., de Herralde, F., Biel, C., Stockert, C., Negron, C. & Save, R. (2011). Seasonal changes of whole root system conductance by a drought-tolerant grape root system. *Journal of Experimental Botany*, 62, 99-109.
3. Anjum, M. A. (2011). Effect of exogenously applied spermidine on growth and physiology of citrus rootstock Troyer citrange under saline conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(1), 43-53.
4. Asadi, W., Rasouli, M., Gholami, M. & Maleki, M. (2017). Study of some morphological and physiological traits of four varieties grapes (*Vitis vinifera* L.) under water stress. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48 (4), 977-990. (in Farsi)
5. Azizi, H., Jalilimarandi, R., Hasani, A. & Dolati bane, H. (2009). Effect of drought stress on some morphological and physiological characters of three grapevine cultivar. In: Proceedings of *6th Iranian Horticultural science Congress*. 12-15 July, University of Gilan, Rasht, Iran, pp 527.
6. Bates, L. S., Woldren, R. P. & Teare, I. D. (1975). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Journal of Plant and Soil*, 39, 205-207.
7. Bianchi, D., Grossi, D., Tincani, T. G., Di Lorenzo, G. S., Brancadoro, L. & ustioni, L. (2018). Multi-parameter characterization of water stress tolerance in *Vitis* hybrids for new rootstock selection. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 333-340.
8. Bota, J., Stasyk, O., Flexas, J. & Medrano, H. (2004). Effect of water stress on partitioning of 14C-labelled photosynthates in *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology*, 31(7), 697-708.
9. Carbonneau, A. (1985). The early selection of grapevine rootstocks for resistance to drought conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 195-198.
10. Chaves, M. M. & Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water-saving agriculture. *Experimental Botany*, 55, 2365-2384.
11. Chen, X. Yuan, H. Chen, R. Zhu, L. & He, G. (2003). Biochemical and photochemical changes in response to triacontanol in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation*, 40, 249-256.
12. Conesa, M. R., de la Rosa, J. M., Domingo, R., Ba˜non, S. & Pérez-Pastor, A. (2016). Changes induced by water stress on water relations, stomatal behaviour and morphology of table grapes (cv. Crimson Seedless) grown in pots. *Scientia Horticulturae*, 202, 9-16.

13. Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A. & Nardi, S. (2013). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant Soil*, 364, 145-158.
14. Esteban, M., Villanueva, M. & Lissarrague, J. (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 4, 490-420.
15. FAO. (2017). *FAOSTAT database results*. http://faostat.Fao.org.faostat. Servlet.
16. Galmes, J., Flexas, J., Save, R. & Medrano, H. (2007). Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. *Plant and Soil*, 290(1-2), 139-155.
17. Ghaderi, N., Talaei, A. R., Ebadi, A. & Lesani, H. (2010). *Study of some physiological characteristics in 'Sahani', 'Bidane-sefid' and 'Farkhii' grapes during drought stress and their subsequent recovery*. PhD Studies Dissertation, University of Tehran, Department of Horticulture. (in Farsi)
18. Gill, S. S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
19. Grieve, C. M. & Grattan, S. R. (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil*, 70, 303-307.
20. Hemeda, H. M. & Klein, B. P. (1990). Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts. *Journal of Food Science*, 55(1), 184-185.
21. Jacobs, S. D. (2010). Effect of rootstock and water stress on gas exchange, water relations, and water-use efficiency in petite sirah grapevines. PhD Dissertation. California State University, USA.
22. Jalili marandi, R., Hassani, A., Dolati baneh, H., Azizi, H. & Haji taghiloo, R. (2011). Effect of different levels of soil Moisture on the morphological and physiological characteristics of three grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 42, 31-40. (in Farsi)
23. Kantar, M., Lucas, S. J. & Budak, H. (2011). Drought Stress: molecular genetics and genomics approaches. *Advances in Botanical Research*, 57, 445-493.
24. Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 35(2), 107-120.
25. Koundouras, S., Tsialtas, I. T., Zioziou, E. & Nikolaou, N. (2008). Rootstock effects on the adaptive strategies of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet–Sauvignon) under contrasting water status: Leaf physiological and structural responses. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 128(1), 86-96.
26. Kumaravelu, G., Livingstone, V. D. & Ramanujam, M. (2000). Triacontanol-induced changes in the growth, photosynthetic pigments, cell metabolites, flowering and yield of green gram. *Biologia Plantarum*, 43, 287-290.
27. Lichtenthaler, H. K. & Buschmann, C. (2001). Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. *Food Analytical Chemistry Protocols*, F4.3.1-F4.3.8.
28. Lovisolo, C., Perrone, I., Carra, A., Ferrandino, A., Flexas, J., Medrano, H. & Schubert, A. (2010). Drought-induced changes in development and function of grapevine (*Vitis* spp.) organs and in their hydraulic and non-hydraulic interactions at the whole-plant level a physiological and molecular update. *Functional Plant Biology*, 37, 98-16.
29. Mehri, H. R., Ghobadi, S. B., Baninasab, Ehsanzadeh, P. & Gholami, M. (2014). Study of some physiological and morphological responses of four Iranian grape cultivars to drought stress in vitro. *Journal of Plant Process and Function*, 10(3), 115-125.
30. Muthuchelian, K., Murugan, C., Harigovindan, R., Nedunchezian, N. & Kulandaivelu, G. (1995). Effects of triacontanol in flooded Erythrina variegate seedlings, 1: Changes in growth, photosynthetic pigments and biomass productivity. *Photosynthetica*. (Czech Republic).
31. Muthuchelian, K., Murugan, C. R., Nedunchezian, N. & Kulandaivelu, G. (1997). Photosynthesis and growth of Erythrina variegate as affected by water stress and triacontanol. *Photosynthetica*, 33, 241-248.
32. Naeen, M., Khan, M. M. A., Idrees, M. & Aftab, T. (2011). Triacontanol-mediated regulation of growth and other physiological attributes active constituents and yield of *Menta arvensis* L. *Plant Growth Regulation*, 65, 195-206.
33. Okuma, E., Soeda, K., Tada, M. & Murata, Y. (2000). Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46, 257-263.
34. Ozden, M., Demirel, U. & Kahraman, A. (2009). Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H_2O_2. *Scientia Horticulturae*, 119, 163-168.
35. Perveen, S., Shahbaz, M. & Ashraf, M. (2014). Triacontanol induced changes in growth, yield, leaf water relations, antioxidative defense system and some key osmoprotectants in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline stress. *Turkish Journal of Bototany*, 38, 896-913.
36. Ricardo, da silva, J. (1997). Anthocyanins and proanthocyanidins in grepes and wines. Their primordial role in enology. *Proceedings of the First Symposium in ino Analytica Scientia*.

37. Ries, S. K., Wert, V., Sweeley, C. C. & Leavit, R. A. (1977). Triacontanol: a new naturally occurring plant growth regulator. *Science*, 195, 1339-1341.
38. Sabir, P., Ashraf, M. & Akram, N. (2011). Accession variation for salt tolerance in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) using leaf proline content and activities of some key antioxidant enzymes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197, 340-347.
39. Scharwies, J. D. & S. D. yerman. (2016). Comparison of isohydric and anisohydric *Vitis vinifera* L. cultivars reveals a fine balance between hydraulic resistances, driving forces and transpiration in ripening berries. *Functional Plant Biology*, 44(3), 324-338.
40. Sheng, C. X., Yong, P. L., Jin, H., Ya, J. G., Wen, G. M., Yun, Y. Z. & Shui, J. Z. (2010). Responses of Antioxidant enzymes to chilling stress in tobacco seedlings, *Agricultural Sciences in China*, 9(11), 1594-1601.
41. Sivritepe, N., Erturk, U., Yerlikaya, C., Turkan, I., Bor, M. & Ozdemir, F. (2008). Response of the cherry rootstock to water stress induced in vitro. *Biologia Plantarum*, 52(3), 573-576.
42. Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). Plant Physiology. Fourth edition. Publishers Sunderland, Massachusetts. 738 p.
43. Talaei, A. R., Ghaderi, N., Ebadi, A. & Lesani, H. (2012). Biochemical responses of grape cvs Sahani and Bidane-Sefid, subjected to progressive drought. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 42, 301-308. (in Farsi)
44. Verma, A., Malik, C. P., Gupta, V.K. & Bajaj, B.K. (2011). Effects of in vitro triacontanol on growth, antioxidant enzymes and photosynthetic characteristics in *Arachis hypogaea* L. *Brazillan Journal of Plant Physiology*, 23, 271-277.
45. Singh, M., Khan, M. M. A., Moinuddin & Naeem, M. (2011). Augmentation of nutraceuticals, productivityand qualityof ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through triacontanol application. *Plant Biosystem*, 146 (1), 106-113.
46. Yang, X. & Lu, C. (2005). Photosynthesis is improved by exogenous glycinebetaine in salt stressed maize plants. *Plant Physiology*, 124, 343-352.
47. Yıldırım, K., Yağcı, A. & Tunç, S. (2018). Responses of grapevine rootstocks to drought through altered root system architecture and root transcriptomic regulations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 127, 256-268.
48. Yong, Z., Hao-Ru, T. & Ya, L. (2008). Variation in antioxidant enzyme activities of two straw berry cultivars with short-term low temperature stress. *Agricultural Sciences*, 4(4), 456-462.
49. Yordanov, I., Velikova, V. & Tsonev, T. (2000). Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38(2), 171-186.