

پاسخ‌های فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی تاک‌های تیمار شده با پتاسیم در شرایط تنش شوری

روح الله کریمی^{۱*}، بهروز محمدپرست^۲ و راضیه مینازاده^۲

^۱ گروه مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۵/۱۵)

چکیده

تغذیه تکمیلی با تأثیر بر سامانه‌های محافظت‌کننده آنزیمی و غیر آنزیمی قادر به تعدیل تنش اکسایشی القاشده توسط شوری می‌باشد. در این پژوهش برهمکنش شوری (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید) و کاربرد برگی پتاسیم (صفر و ۱/۵ درصد پتاسیم سولفات) بر شاخص‌های تخریب غشا، پاسخ‌های فیتوشیمیایی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و همچنین عناصر غذایی برگ بوته‌های یکساله انگور بیدانه سفید، به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. با افزایش شوری محتوای مالون دی‌آلدئید و هیدروژن پراکسید در برگ تاک‌های تحت تنش افزایش یافت. در حالیکه کاربرد پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد، محتوای این شاخص‌ها را به ترتیب ۲۰ و ۲۷ درصد کاهش داد. با افزایش شوری محتوای فنول کل و فلاونوئید کل برگ در تاک‌ها افزایش یافت، با این حال این افزایش در تاک‌های تیمار شده با پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد بیشتر بود. در تاک‌های تیمار شده با پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد محتوای پروتئین محلول حتی در غلظت‌های بالای سدیم کلرید روند افزایشی نشان داد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ تا شوری ۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید افزایش یافت با این حال تیمار پتاسیم ۱/۵ درصد تا شوری ۱۰۰ میلی‌مولار توانست فعالیت این آنزیم‌ها را افزایش داد. کاربرد پتاسیم هم موجب افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در همه سطوح شوری شد. همچنین، برهمکنش شوری و پتاسیم منجر به افزایش فعالیت آنزیم گاباکول پراکسیداز شد. غلظت آهن، روی و منگنز برگ در اثر برهمکنش شوری و پتاسیم افزایش یافت. در کل پتاسیم با تجمع پروتئین‌های محلول، فلاونوئید و فنول کل و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نهایت منجر به کاهش تنش اکسایشی القاشده توسط شوری در برگ تاک‌ها شده است.

کلمات کلیدی: انگور، تغذیه، ریزمغذی‌ها، فنول کل، کاتالاز

مقدمه

زمین‌های کشاورزی می‌شود. تجمع نمک در محیط ریشه باعث ایجاد یک فضای رقابتی در جذب کاتیون‌ها شده و پیشرفت این شرایط باعث ایجاد اختلال در جذب بهینه عناصر ضروری و تجمع بیش از حد برخی از عناصر در گیاه می‌شود (Kaya et

تنش شوری یکی از عوامل تأثیرگذار بر رشد، نمو و میزان عملکرد محصولات باغی و زراعی است که هر ساله منجر به تحمیل زیان‌های اقتصادی زیاد و همچنین غیرقابل کشت شدن

پتاسیم یکی از عناصر ضروری در گیاهان است که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از قبیل فتوسنتز، ساخت پروتئین، ساخت و انتقال قند، فعال‌سازی بیش از ۶۰ نوع آنزیم، تنظیم پتاسیل اسمزی و یونی، تنظیم باز و بسته‌شدن روزنه‌ها و تشکیل آوند آبکش نقش‌های کلیدی دارد (Cakmak, 2005; Marschner, 2012; Karimi, 2017). پتاسیم همچنین سبب بهبود تحمل به شرایط نامساعد و تنش‌زا شده و با افزایش سطح برگ و بالا بردن مقدار کلروفیل موجب افزایش ظرفیت فتوستتر و در نهایت عملکرد می‌شود (Cakmak, 2005). کاربرد خاکی یا برگی منابع کودی پتاس در ذرت (Abbasi *et al.*, 2012)، جو (Fayez and bazeid, 2014) و ارزن (Heidari and Jamshidi, 2011) باعث افزایش تحمل به شوری شده است. همچنین کاربرد برگی پتاسیم سولفات از طریق تجمع بیشتر ترکیبات فنولی، اسید آسبزیک و قندهای محلول در بافت‌های جوانه بوته‌های تیمار شده با این عنصر باعث کاهش اثرات سرما بر بوته‌های انگور شده است (Karimi *et al.*, 2016). به دلیل تشابه شعاع یونی و انرژی هیدراسیون سدیم و پتاسیم که دو عامل تعیین‌کننده چگونگی ورود این دو یون از طریق پروتئین‌های غشایی به درون سلول هستند و همچنین به علت روابط ترمودینامیکی مشابه، این یون‌ها می‌تواند بر روی جذب هم مؤثر باشند و معمولاً بین جذب سدیم و پتاسیم رقابت شدیدی وجود دارد (Kaya *et al.*, 2009). بنابراین، استفاده از کودهای پتاسیمی در شرایط تنش شوری بسیار ضروری می‌باشد. چرا که با افزایش شوری مقدار پتاسیم اندام‌های هوایی به شدت کاهش یافته و منجر به کاهش عملکرد در تاکستان می‌شود.

پتاسیم یکی از عناصر پرمصرف در تاکستان‌هاست که می‌تواند ضمن بهبود شاخص‌های کمی و کیفی میوه باعث القا تحمل به شوری در بوته‌های انگور شود (Karimi, 2017). از طرفی با توجه به حساسیت نسبتاً بالای بوته‌های انگور به تنش شوری (Maas and Hoffman, 1977)، استفاده از روش‌های مدیریتی از قبیل کاربرد پتاسیم می‌تواند در کاهش اثرات شوری

یکی از پیامدهای مضر تنش شوری تجمع یون‌های سدیم و کلر در بافت گیاهان در معرض خاک با غلظت بالای سدیم کلرید است (Hu and Schmidhalter, 2005). ورود این یون‌های به سلول‌ها باعث برهم‌زدن تعادل عناصر و تجمع زیاد یون سدیم و به دنبال آن سبب اختلال فیزیولوژیکی قابل توجهی می‌شود. در غلظت زیاد سدیم، جذب پتاسیم به شدت کاهش می‌یابد و سدیم می‌تواند از طریق کانال‌های پتاسیمی به سیتوپلاسم راه یابد و ایجاد مسمومیت کند (Kaya *et al.*, 2006; Kholova *et al.*, 2009). بنابراین حفظ تعادل Na^+/K^+ سلولی برای بقای گیاه در محیط‌های شور امری ضروری است. تحت شرایط تنش شوری، به دلیل تغییر در موازنه بین نور دریافت‌شده و کارایی جذب نور در برگ طی فرایند فتوسنتز، معمولاً تنش اکسایشی رخ می‌دهد که این پدیده با افزایش نشت الکترون‌ها، تشکیل گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن از قبیل سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^{\cdot}) و اکسیژن منفرد ($O^{\cdot-}$) همراه است (Foyer and Noctor, 2003). تجمع گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن برای سلول‌ها سمی و مخرب است زیرا باعث ایجاد صدمه به غشاهای سلولی، کلروپلاست، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شده و متابولیسم عادی سلول‌ها را مختل می‌کند (Mittler, 2002). به منظور غلبه بر تنش شوری و کاهش صدمات گونه‌های فعال اکسیژن، گیاهان مجهز به یکسری سامانه‌های محافظت‌کننده آنزیمی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و متابولیت‌های غیرآنزیمی از قبیل آسکوربیک اسید، ترکیبات فنولی و گلوکوتایون هستند (Jiang and Zhang, 2004). همچنین، گیاهان با تغییر در متابولیسم سلولی و به‌کارگیری مکانیسم‌های دفاعی مختلف از قبیل تجمع مواد محلول، انسجام دیواره سلولی و تولید پروتئین‌ها و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تولید ترکیبات فنولی (Karimi *et al.*, 2016) تحمل شوری را در بافت‌های خود افزایش می‌دهند. یکی از راه‌های کاهش اثرات تنش شوری استفاده از ترکیباتی است که قادر به تعدیل اثرات مخرب شوری هستند.

مؤثر باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر کاربرد برگ‌پتاسیم سولفات بر القا واکنش‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی و رفتار فیتوشیمیایی تاک‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نمک (سدیم کلرید) و اثرات آن بر پایداری غشا و تحمل شوری انجام شد. همچنین اثر پتاسیم بر غلظت برخی عناصر و ارتباط آنها به‌عنوان کوفاکتور برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و فعالیت آنها بحث شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارها: این پژوهش در سال ۱۳۹۵ به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار (دو گلدان در هر تکرار) در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ملایر اجرا شد. قلمه‌های یکساله انگور (*Vitis vinifera* L.) رقم بیدانه سفید در گلدان‌های ۶ لیتری (حاوی ماسه، خاک و کود دامی به نسبت مساوی) در گلخانه با دامنه دمایی ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰ درصد و طول روز تحت شرایط نوری اردیبهشت تا مردادماه (۱۲-۱۴ ساعت) قرار گرفتند. در طول دوره رشد نهال‌ها جهت تغذیه پایه از کود ۲۰-۲۰-۲۰ (NPK) با غلظت ۰/۵ گرم در لیتر به‌صورت هفتگی تا رسیدن به مرحله ۱۵ برگگی استفاده شد. دو ماه پس از کاشت تیمارهای تنش شوری به‌صورت هفتگی تا چهار هفته با غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید اعمال شد. از زمان اعمال تنش شوری پتاسیم سولفات (صفر، ۱/۵ درصد) طی دو مرحله در اولین روز هفته‌های اول و سوم تنش روی برگ محلول‌پاشی شد. آبیاری در ماه اول، هر چهار روز یک‌بار و در ماه‌های بعدی به‌دلیل افزایش شاخ و برگ و افزایش نیاز آبی گیاه، هر سه روز یک‌بار انجام شد. در انتهای هفته چهارم از برگ‌های بالایی کاملاً توسعه‌یافته تاک‌ها برای اندازه‌گیری شاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، هیدروژن پراکسید، فلاونوئید کل، فنول کل، پروتئین‌های محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) و عناصر غذایی استفاده شد. نمونه‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تا

زمان اندازه‌گیری (دو هفته بعد) در فریزر ۸۰- نگهداری شد. **پراکسیداسیون لیپیدهای غشا:** ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر محلول تری-کلرو استیک اسید ۲۰ درصد - حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید- آسیاب شده و عصاره به‌دست آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتی‌رفوژ شد. محلول رویی به‌مدت ۲۵ دقیقه در حمام آب‌گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شده و پس از کاهش فوری دمای آن با یخ خردشده، به‌مدت ۵ دقیقه با همان سرعت قبل سانتی‌رفوژ شد. برای حذف اثر ترکیبات مزاحم، جذب نمونه‌ها ابتدا در طول موج ۶۰۰ نانومتر (A_{۶۰۰}) خوانده شد و از مقدار جذب آنها در طول موج ۵۳۲ نانومتر (A_{۵۳۲}) کم شد. غلظت مالون دی‌آلدئید (شاخص آسیب بیوشیمیایی غشا) با استفاده از ضریب خاموشی $0.155 \mu \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ محاسبه و بر اساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد (Buege and Aust, 1978).

هیدروژن پراکسید: برای اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید ۰/۳ گرم از نمونه تازه برگ توزین و در ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک یک درصد هموزن گردید. سپس نمونه‌ها به لوله‌های سانتی‌رفیوژ منتقل و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی-گراد با ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتی‌رفیوژ شدند. پس از آن به ۰/۷۵ میلی‌لیتر محلول شناور، ۰/۷۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH معادل ۷ و ۱/۵ میلی‌لیتر پتاسیم یدید یک مولار اضافه شد. غلظت هیدروژن پراکسید نمونه‌ها به وسیله مقایسه جذب آنها در طول موج ۳۹۰ نانومتر و منحنی استاندارد آن در طیفی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومول بر میلی‌لیتر محاسبه شد (Velikova and Loreto, 2005).

فنول کل: برای اندازه‌گیری محتوای فنول کل موجود در برگ‌ها ابتدا نیم گرم نمونه تازه برگ را در ۴ میلی‌لیتر اتانول کاملاً کوبیده و محلول همگنی تهیه و پس از ۲۰ دقیقه سانتی‌رفیوژ در دور ۹۵۰۰ بردقیقه محلول شفاف رویی جدا گردید. میزان ۳۰۰ میکرولیتر عصاره با ۱۲۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد و نیم سی‌سی فولین ۱۰ درصد مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در محل تاریک قرار داده شد. پس از

پلاستیکی حاوی یک میلی لیتر بافر استخراج اضافه و به هم زده شد. پس از عبور از صافی عصاره تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای 4°C سانتریفیوژ و محلول شفاف بالایی به آرامی جدا گردید. از این محلول جهت اندازه گیری فعالیت هر یک از آنزیم های آنتی اکسیدان به شرح ذیل استفاده گردید:

کاتالاز: برای تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، ابتدا مقدار ۵۰ میکرو لیتر از عصاره گیاهی با ۳ میلی لیتر بافر استخراج که شامل سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH ۷) و حاوی ۲ میلی مولار اتیلن دی آمین تتر استیک اسید بود آمیخته شد. واکنش آنزیم کاتالاز با اضافه نمودن ۵ میکرو لیتر هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد به مخلوط فوق آغاز گردید. ثبت تغییرات جذب نور نمونه ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه انجام گردید. هر واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب کاهش یک میکرومول هیدروژن پراکسید در هر دقیقه می شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد در میلی گرم پروتئین برگ بیان شد (Bergmeyer, 1970).

گایاکول پراکسیداز: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ابتدا مقدار ۵۰ میکرو لیتر از عصاره گیاهی با ۳ میلی لیتر بافر استخراج که حاوی سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار (pH ۷) و ۲ میلی مولار اتیلن دی آمین تتر استیک اسید بود آمیخته شد. واکنش آنزیم گایاکول پراکسیداز با اضافه نمودن ۵ میکرو لیتر هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد و مقدار ۵ میکرو لیتر ماده گایاکول به مخلوط فوق آغاز گردید ثبت تغییرات جذب نور نمونه ها در طول موج ۴۶۵ نانومتر که بیانگر میزان تخریب و کاهش غلظت هیدروژن پراکسید است، به مدت یک دقیقه انجام گردید. هر واحد از فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که در هر دقیقه موجب کاهش یک میکرومول هیدروژن پراکسید در هر میلی لیتر می شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد در میلی گرم پروتئین برگ بیان شد (Herzog and Fahimi, 1973).

طی شدن مدت زمان لازم، میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه گیری شد و سپس با استفاده از نمودار استاندارد گالیک اسید، میزان فنول بر حسب میلی گرم گالیک اسید بر وزن تر به دست آمد (Velioğlu et al., 1998).

فلاونوئید کل: برای سنجش میزان فلاونوئید کل از روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید استفاده شد (Chang et al., 2002). در این روش ابتدا ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد در لوله آزمایش ریخته شد سپس ۰/۱ میلی لیتر پتاسیم استات یک مولار به لوله ها اضافه و با آن مخلوط گردید و سپس ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به لوله ها اضافه شد. در مرحله آخر ۰/۵ میلی لیتر از محلول عصاره متانولی برگ به مخلوط اضافه شد. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفتند و در نهایت جذب نمونه ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید. مقدار فلاونوئید کل برای هر کدام از عصاره ها به صورت میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن تر محاسبه شد.

پروتئین های محلول: نیم گرم بافت تازه برگ با ۵ میلی لیتر بافر استخراج (تریس با غلظت یک میلی مولار و pH ۷)، در هاون چینی کاملاً له شده و این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول شفاف بالایی با ۵ میلی لیتر معرف بیورد [(۱۰ درصد گلاسیال استیک اسید + ۲۵ درصد اتانول + ۶۵ درصد آب مقطر + ۰/۱ درصد (حجم/وزن) محلول کوماسی بریلیانت بلوجی ۲۵۰)] مخلوط و جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1979). با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت های مختلف آلبومین گاوی، غلظت پروتئین های محلول به صورت میلی گرم در گرم وزن تر محاسبه شد.

آنزیم های آنتی اکسیدان: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان ابتدا عصاره آنزیمی تهیه شد. برای این منظور ابتدا بافت منجمد شده برگ در حضور ازت مایع در هاون چینی آسیاب شد و مقدار ۰/۱ گرم آن به یک تیوب

حاصل از غلظت‌های مختلف برای هر یک از عناصر مورد نظر بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد.

تحلیل داده‌ها: تجزیه واریانس با نرم‌افزار آماری SAS ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد. نمودارها با برنامه اکسل (صفحه‌گسترده) ترسیم شد.

نتایج و بحث

پراکسیداسیون لیپیدهای غشا: اثر پتاسیم، شوری و اثر متقابل آنها بر غلظت مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص بیوشیمیایی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). تنش شوری باعث افزایش اکسیداسیون لیپیدهای غشا شد. بیشترین مقدار تولید مالون دی‌آلدئید افزایش در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار شوری مشاهده شد. تنش شوری در گوجه‌فرنگی (Koca et al., 2006) و توت‌فرنگی (Yildirim et al., 2009) ضمن افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و برهم‌زدن نفوذپذیری آن باعث نشت مواد محلول و خسارت به گیاه شد. در واقع تجمع سدیم در بافت‌های گیاهی در گیاهان در معرض تنش شوری منجر به افزایش شاخص‌های تنش اکسایشی از قبیل نشت‌یونی، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Abdelgawad et al., 2016) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. به‌طور متوسط کاربرد برگی پتاسیم سولفات باعث کاهش ۲۰ درصد غلظت مالون دی‌آلدئید در تاک‌های تیمار شده با پتاسیم ۱/۵ درصد در مقایسه با تاک‌های تیمار نشده در همین غلظت شوری شد (شکل ۱).

در مطالعه‌ای روی انگور کاربرد پتاسیم سولفات باعث افزایش تحمل سرمای جوانه‌ها شد که این افزایش در تحمل سرما با افزایش پایداری غشا و کاهش تولید مالون دی‌آلدئید مرتبط بود (Karimi, 2017). کاربرد نیترات پتاسیم در گیاهچه‌های جو تحت تنش اسمزی باعث کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید و کاهش نسبت سدیم به پتاسیم برگ شده است (Fayez and Bazaid, 2014). در مطالعه حاضر کاهش

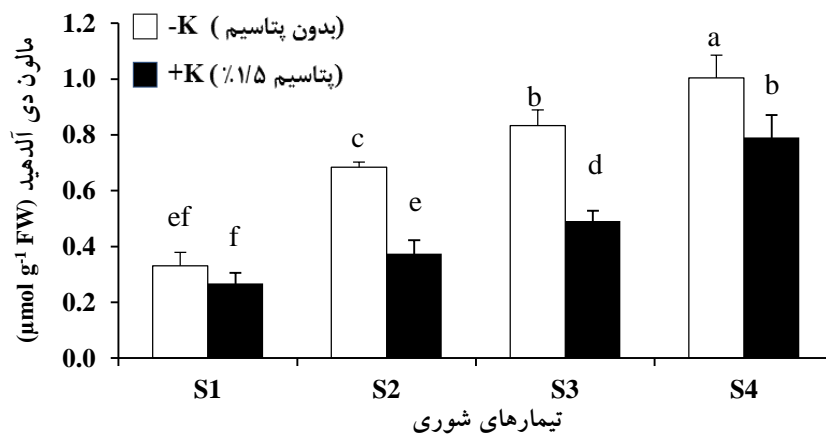
آسکوربات پراکسیداز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ابتدا مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج که حاوی سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH ۷)، ۲ میلی‌مولار اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید، پلی‌وینیل‌پیرولیدین-۴۰ (۱ درصد (وزن به حجم)، تریتون-۱۰۰ ۰/۱ (حجم به حجم) و آسکوربات یک میلی‌مولار بود، آمیخته شد. واکنش آنزیم کاتالاز با اضافه نمودن ۴/۵ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد به مخلوط فوق آغاز گردید. ثبت تغییرات جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر که بیانگر میزان اکسیداسیون و کاهش غلظت آسکوربات است، به‌مدت یک دقیقه انجام گردید. هر واحد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب اکسید شدن یک میکرومول آسکوربات در هر دقیقه می‌شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد در میلی‌گرم پروتئین برگ بیان شد (Nakano and Asada, 1981).

عناصر برگ: به‌منظور استخراج و اندازه‌گیری غلظت عناصر، از برگ‌های میانی شاخه‌ها، نمونه‌های برگی سالم جمع‌آوری و در آزمایشگاه با آب مقطر شستشو شد. نمونه‌ها در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۷۲ ساعت خشک و آسیاب شدند. سپس غلظت عناصر سدیم، پتاسیم، آهن، روی و منگنز به‌طور جداگانه و به شرح ذیل مورد ارزیابی قرار گرفت. تهیه عصاره به روش هضم تر انجام گردید (Abdel-Shafey et al., 1994). برای این منظور به یک گرم پودر گیاه ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک اسید غلیظ (۶۵ درصد) افزوده شد. نمونه‌ها به‌مدت دو ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار گرفت. سپس ۲/۶ میلی‌لیتر هیدروژن پراکسید ۲۰ درصد به آنها اضافه شد، پس از سرد شدن نمونه‌ها با کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شده و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. اندازه‌گیری پتاسیم و سدیم به روش نشر شعله‌ای با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر (مدل ۴۰۵ G ساخت آلمان) و اندازه‌گیری عناصر آهن، روی و منگنز با دستگاه جذب اتمی (مدل ۲۲۰ واریان) انجام گرفت. در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر کاربرد برگی پتاسیم سولفات بر شاخص‌های آسیب غشا و تجمع برخی متابولیت‌های ثانویه برگ انگور بیدانه سفید در تنش شوری

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		پراکسیداسیون لیپدهای غشا	هیدروژن پراکسید	فنول کل
پتاسیم	۱	۰/۴۸۰**	۱۵/۹۱**	۴۸/۱**
شوری	۳	۰/۵۷۷**	۵۷/۰۵**	۲۹/۳**
پتاسیم × شوری	۳	۰/۲۷*	۰/۵۶۱**	۱۰/۴**
خطا	۱۵	۰/۰۰۵	۰/۳۱۱	۲/۳۲
ضریب تغییرات	-	۱۱/۹	۱۴/۴	۳/۸
فلاونوئید کل				۰/۰۱۴
				۰/۵۰۳**
				۰/۰۱۷*
				۰/۰۰۶
				۹/۳

** و * به ترتیب بیانگر اثر معنی‌دار در سطوح آماری یک و پنج درصد هستند.



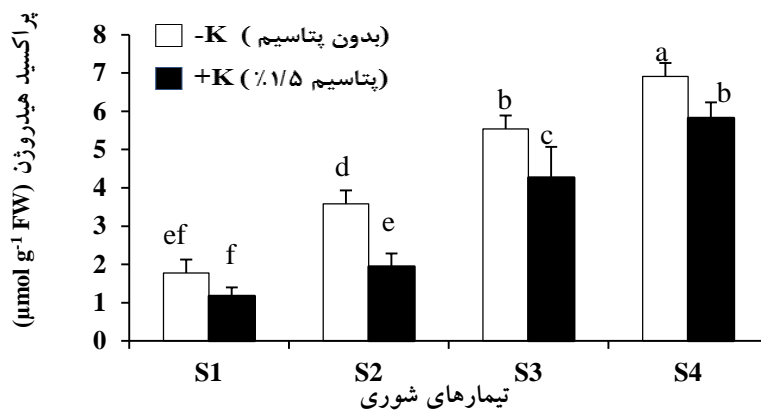
شکل ۱- اثر کاربرد برگی پتاسیم سولفات بر میزان پراکسیداسیون لیپدهای غشا برگ انگور بیدانه سفید در تنش شوری. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون براساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (در سطح ۵ درصد).
 $\text{NaCl} = \text{S}_1$ صفر میلی‌مولار، $\text{NaCl} = \text{S}_2$ ۲۵ میلی‌مولار، $\text{NaCl} = \text{S}_3$ ۵۰ میلی‌مولار، $\text{NaCl} = \text{S}_4$ ۱۰۰ میلی‌مولار

اثرات شوری در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱/۵ درصد پتاسیم سولفات با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش پراکسیداسیون لیپدها همراه بود. این نتیجه حاکی از نقش پتاسیم در تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش تنش اکسایشی از یک طرف و نیز توانایی این عنصر در افزایش تجمع اسمولیت‌های سازگاری از قبیل قندها و پرولین می‌باشد (Karimi et al., 2016). در واقع کاربرد برگی پتاسیم و افزایش غلظت پتاسیم درون برگ ضمن حفظ تنظیم اسمزی باعث افزایش پایداری غشا پلاسمایی و حفظ نفوذپذیری و تداوم عملکرد بهینه آن در راستای انتقال آب و املاح از غشا و انجام واکنش‌های بیوشیمیایی شده است.

اثرات شوری در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱/۵ درصد پتاسیم سولفات با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش پراکسیداسیون لیپدها همراه بود. این نتیجه حاکی از نقش پتاسیم در تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش تنش اکسایشی از یک طرف و نیز توانایی این عنصر در افزایش تجمع اسمولیت‌های سازگاری از قبیل قندها و پرولین می‌باشد (Karimi et al., 2016). در واقع کاربرد برگی پتاسیم و افزایش غلظت پتاسیم درون برگ ضمن حفظ تنظیم اسمزی باعث افزایش پایداری غشا پلاسمایی و حفظ نفوذپذیری و تداوم عملکرد بهینه آن در راستای انتقال آب و املاح از غشا و انجام واکنش‌های بیوشیمیایی شده است.

یکی از اثرات سوء تنش شوری تجمع گونه‌های فعال

هیدروژن پراکسید: اثر پتاسیم، شوری و اثر متقابل آنها بر غلظت هیدروژن پراکسید در سطح آماری یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). با افزایش سطح شوری غلظت هیدروژن پراکسید در برگ همه تاک‌های تحت تنش شوری روندی افزایشی نشان داد. غلظت هیدروژن پراکسید در برگ تاک‌های تیمار شده با پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد در مقایسه با عدم کاربرد پتاسیم سولفات به طور معنی‌داری کمتر بود (شکل ۲). به طوریکه غلظت هیدروژن پراکسید در تاک‌های تیمار نشده با سولفات پتاسیم به طور میانگین ۲۷ درصد بیشتر از تاک‌های تیمار شده با این کود بود (شکل ۲).



شکل ۲- اثر کاربرد برگ‌گی پتاسیم سولفات بر محتوای هیدروژن پراکسید برگ انگور بیدانه سفید در تنش شوری. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون براساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (در سطح ۵ درصد).
 S_۱ = NaCl صفر میلی‌مولار، S_۲ = NaCl ۲۵ میلی‌مولار، S_۳ = NaCl ۵۰ میلی‌مولار، S_۴ = NaCl ۱۰۰ میلی‌مولار

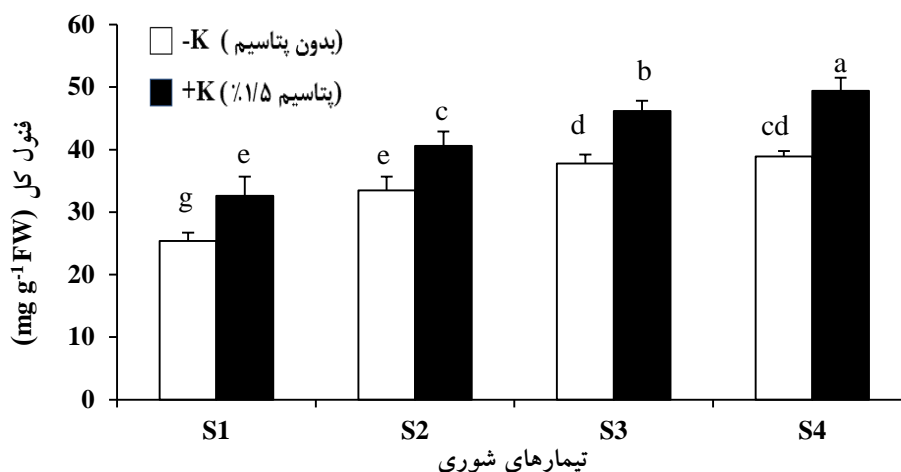
کلرید ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۳). کاربرد برگ‌گی پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد به‌طور معنی‌داری محتوای فنول کل را در تاک‌های تیمار شده افزایش داد و در مقایسه با عدم کاربرد برگ‌گی پتاسیم سولفات میزان فنول کل را حدود ۱۲ درصد افزایش داد (شکل ۳).

در مطالعه حاضر کاربرد پتاسیم سولفات منجر به تجمع فنول کل بیشتری نسبت به تاک‌های تیمار نشده تحت تنش شوری شد. افزایش ترکیبات فنولی در این تاک‌های ممکن است به‌عنوان یک مکانیسم سازگاری برای غلبه بر تنش اکسیداتیو ناشی از شوری عمل نماید. کاربرد برگ‌گی پتاسیم سولفات در تاک، تحمل به تنش سرما را از طریق افزایش ترکیبات فنولی افزایش داده است (Karimi, 2017) که حاکی از دخالت پتاسیم در مسیرهای ساخت ترکیبات فنولی به‌ویژه در گیاهان تحت تنش می‌باشد. در پژوهشی نیز ترکیبات فنولی موجب افزایش توانایی گیاه سویا در خنثی‌کردن رادیکال‌های آزاد تحت تنش شده است (Peng and Zhou, 2009).

فلاونوئید کل: اثر شوری ($P < 0.01$) و اثر متقابل شوری و پتاسیم ($P < 0.05$) بر محتوای فلاونوئید کل معنی‌دار بود (جدول ۱). با افزایش سطح شوری محتوای فلاونوئید کل در برگ همه تاک‌های تحت تنش روندی افزایشی نشان داد که با یافته‌های قبلی مطابقت دارد (Peng and Zhou, 2009).

اکسیژن در غشاها و ایجاد پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌باشد که همان‌طور که در نتایج این مطالعه مشخص شد در بوته‌های انگور تحت تنش شوری میزان پراکسید هیدروژن در تاک‌های تحت تنش شوری افزایش یافت. در مطالعه‌ای اعمال تیمار شوری از صفر تا ۱۴۰ میلی‌مولار ضمن ایجاد تنش اکسایشی در گیاهچه‌های ذرت منجر به افزایش تدریجی غلظت هیدروژن پراکسید در برگ گیاهان تحت تنش در مقایسه با گیاهچه‌های بدون اعمال تنش شوری شد (Abdelgawad et al., 2016). در مطالعه حاضر مقادیر کمتری هیدروژن پراکسید در برگ تاک‌های تیمار شده با پتاسیم سولفات مشاهده شد. یکی از نقش‌های مهم پتاسیم فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز است که در مطالعه حاضر اثبات شد. به‌طوریکه القاء فعالیت بیشتر این آنزیم‌ها در اثر کاربرد برگ‌گی پتاسیم منجر به تجمع کمتر گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل هیدروژن پراکسید و به‌دنبال آن پایداری بیشتر غشا شد (Cakmak, 2005).

فنول کل: اثر شوری، پتاسیم و اثر متقابل آنها بر محتوای فنول برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). با افزایش شوری میزان فنول کل در برگ تاک‌ها افزایش یافت به‌طوریکه این افزایش وابسته به غلظت نمک بوده و بیشترین محتوای فنول کل در تاک‌های تیمار شده با سدیم



شکل ۳- اثر کاربرد برگی پتاسیم سولفات بر محتوای فنول کل برگ انگور بیدانه سفید در تنش شوری. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون براساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (در سطح ۵ درصد).
 $\text{NaCl} = \text{S}_1$ صفر میلی‌مولار، $\text{NaCl} = \text{S}_2$ ۲۵ میلی‌مولار، $\text{NaCl} = \text{S}_3$ ۵۰ میلی‌مولار، $\text{NaCl} = \text{S}_4$ ۱۰۰ میلی‌مولار

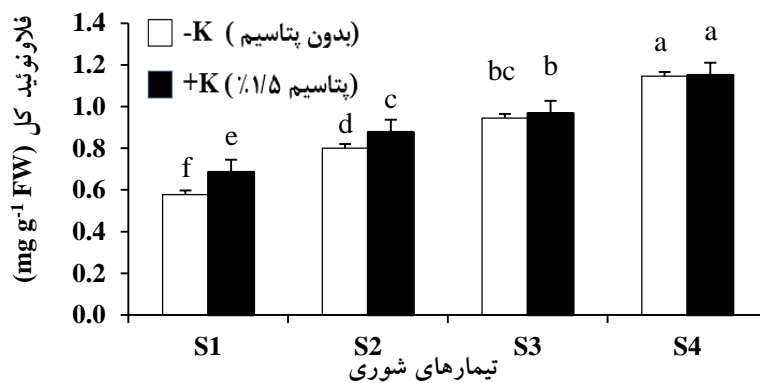
روند افزایشی (۶۷ درصد در شوری ۱۰۰ mM) نشان داد که حاکی از نقش ویژه و مثبت پتاسیم بر میزان تولید پروتئین در شرایط تنش شوری بود (شکل a - ۵).

محتوای پروتئین‌های محلول یکی از شاخص‌های مهم نشان‌دهنده وضعیت فیزیولوژیکی در سلول‌های گیاهی تحت تنش می‌باشد (قربانی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Karimi et al., 2016). در این مطالعه محتوای پروتئین‌های محلول بعد از اعمال تنش تا شوری ۲۵ میلی‌مولار افزایش و سپس تا شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کاهش یافت. در حالیکه در تاک‌های تیمار شده با پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد غلظت این پروتئین‌ها حتی تا شوری ۱۰۰ میلی‌مولار روند افزایشی داشت. این احتمال وجود دارد که پتاسیم به‌عنوان عنصر ضدتنش با تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش رادیکال‌های آزاد ضمن حفظ عملکرد پروتئین‌ها از ساختار آنها محافظت و از تجزیه آنها در این شرایط جلوگیری کند. زیرا تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث اکسیداسیون زنجیره‌های پلی‌پپتیدی آمینواسیدها می‌شود (Jiang and Zhang, 2004). پتاسیم در آخرین مرحله فرایند ساخت پروتئین شرکت دارد و آن را هدایت می‌کند. لذا در داخل گیاه وقتی میزان پتاسیم کم می‌شود، میزان پروتئین هم کاهش یافته و به‌جای آن غلظت آمیدها و اسیدهای آمینه

محتوای فلاونوئید کل در تاک‌های تیمار شده با پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد تا سطح شوری ۲۵ میلی‌مولار در مقایسه با تاک‌های تیمار نشده با این کود (پتاسیم سولفات صفر درصد) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ولی محتوای آن در سطح شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار بین تاک‌های تیمار شده با پتاسیم سولفات صفر و ۱/۵ درصد اختلاف معنی‌داری نشان نداد (شکل ۴).

فلاونوئیدها نقش‌های مهمی در سیستم دفاعی غیرآنزیمی گیاه ایفا می‌کنند (Munns and Tester, 2008). عوامل محیطی تأثیر به‌سزایی در فعالیت فلاونوئیدها دارند و به محض دریافت سیگنال‌های محیطی القاکننده تنش در گیاه، میزان تجمع فلاونوئیدها به‌عنوان بخشی از سیستم دفاعی غیرآنزیمی گیاه به منظور مقابله با این تنش‌ها افزایش می‌یابد (Munns and Tester, 2008).

پروتئین محلول: اثر شوری، پتاسیم و اثر متقابل آنها بر محتوای پروتئین محلول در سطح آماری یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). در تاک‌های تحت تنش شوری محتوای پروتئین محلول تا شوری ۲۵ میلی‌مولار روند افزایشی و پس از آن روند کاهشی نشان داد (شکل a - ۵). این در حالی است که در تاک‌های تیمار شده با پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد محتوای پروتئین محلول حتی در غلظت‌های بالای سدیم کلرید



شکل ۴- اثر کاربرد برگی غلظت‌های مختلف پتاسیم سولفات بر فلاونوئید برگ انگور بیدانه سفید در تنش شوری. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون براساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (در سطح ۵ درصد).
 S_1 NaCl = صفر میلی‌مولار، S_2 NaCl = ۲۵ میلی‌مولار، S_3 NaCl = ۵۰ میلی‌مولار، S_4 NaCl = ۱۰۰ میلی‌مولار

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر کاربرد برگی سولفات پتاسیم بر محتوای پروتئین محلول و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برگ انگور بیدانه سفید در تنش شوری

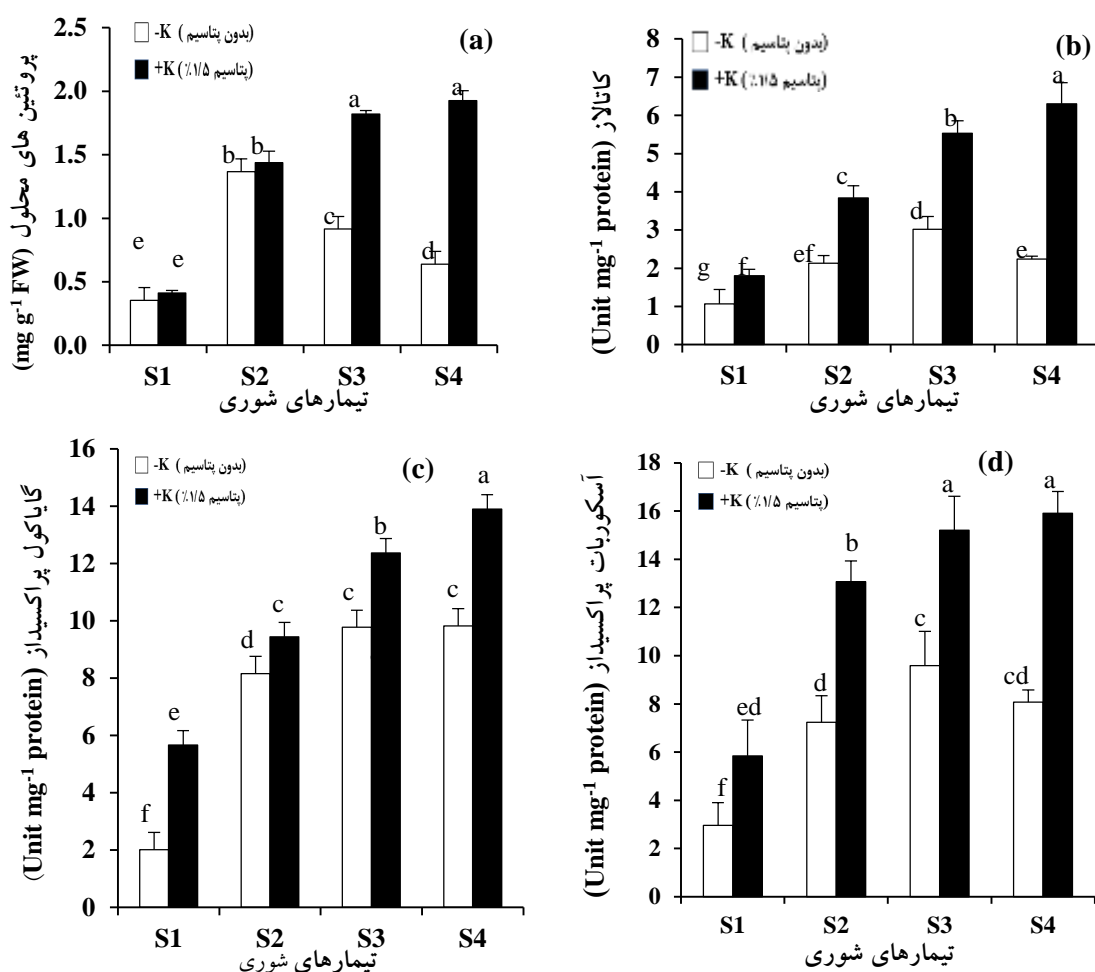
میانگین مربعات				درجه آزادی	منبع تغییرات
آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	پروتئین محلول		
۳۶۸/۶۳**	۶۱/۲۰**	۱۰۱/۳**	۴/۰۳۶**	۱	پتاسیم
۱۶۳/۲۲**	۲۱/۸۱**	۱۵۶/۳**	۲/۸۳۳**	۳	شوری
۱۲/۴۱**	۵/۹۰**	۴/۶۵**	۱/۱۴۸**	۳	پتاسیم × شوری
۱/۲۶	۰/۱۰۶	۱/۷۴	۰/۰۲۴	۱۵	خطا
۱۱/۵۶	۱۰/۰۷	۱۴/۸۴	۱۴/۱۴۷	-	ضریب تغییرات

** و * به ترتیب بیانگر اثر معنی‌دار در سطوح آماری یک و پنج درصد هستند.

(شکل b - ۵). در بین تمام تیمارها، کمترین میزان کاتالاز در تیمار شوری و پتاسیم صفر و بیشترین مقدار آن در شوری ۱۰۰ mM و پتاسیم ۱/۵ درصد بود (شکل b - ۵). همانطور که بیان شد، سازگاری گیاه به شوری توسط افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن صورت می‌گیرد. از جمله آنتی‌اکسیدان‌های مهم گیاهی که در این راستا نقش مهمی ایفا می‌کنند، کاتالاز است. بنابراین میزان آن با افزایش شوری بالا رفته و این اثر در تیمارهایی که از پتاسیم استفاده شده به دلیل نقش آن در تعدیل‌کنندگی شوری بسیار واضح‌تر است. گزارش‌ها حاکی از آن است که در انگور (میرباقری، ۱۳۹۶) و آفتابگردان (Soleimanzadeh *et al.*, 2010)

افزایش می‌یابد (Chakraborty *et al.*, 2016). حفظ نسبت مناسب پتاسیم به سدیم جهت داشتن آماس، تنظیم اسمزی سلول، باز و بسته‌شدن روزنه‌ها، بیوسنتز پروتئین و فتوسنتز ضروری است (Munns and Tester, 2008; Abbasi *et al.*, 2012).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: بررسی جدول ۲ نشان می‌دهد که اثر تیمارهای شوری، پتاسیم و بر همکنش آنها بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود. همراه با افزایش غلظت سدیم کلرید فعالیت آنزیم کاتالاز نیز افزایش نشان داد که این افزایش در برگ تاک‌های تیمار شده با پتاسیم ۱/۵ درصد در ترکیب با شوری ۱۰۰ mM به حداکثر مقدار خود رسید



شکل ۵- اثر کاربرد برگی پتاسیم سولفات بر غلظت پروتئین محلول (a) و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کاتالاز (b)، گایاکول پراکسیداز (c) و آسکوربات پراکسیداز (d) برگ انگور بیدانه سفید در تنش شوری. میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون براساس آزمون دانکن اختلاف معنی داری با هم ندارند (در سطح ۵ درصد).

S_۱ = NaCl صفر میلی مولار، S_۲ = NaCl ۲۵ میلی مولار، S_۳ = NaCl ۵۰ میلی مولار، S_۴ = NaCl ۱۰۰ میلی مولار

شرایط تنش شوری می باشد. فعالیت اندک آنزیم های آنتی اکسیدان نشان دهنده شرایط نرمال محیطی جهت رشد گیاه محسوب می شود. بنابراین افزایش آنها از این جهت بود که به عنوان اسمولیت سازگاری و آنزیم ضد رادیکال های آزاد اکسیژن، ضمن محافظت از ماکرومولکول ها و غشاهای سلول، آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد اکسیژن که در اثر ازدیاد یون سدیم به وجود آمده بود را خنثی کند (Gupta and Huang, 2014). پتاسیم بر بسیاری از جنبه های فیزیولوژی گیاهی از جمله فعالیت بیش از ۶۰ آنزیم شرکت دارد (Marschner, 2012).

نیز کاربرد پتاسیم موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است که هم راستا با نتایج مطالعه حاضر می باشد.

با افزایش غلظت سدیم کلرید، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برگ تا غلظت ۵۰ mM افزایش و در غلظت ۱۰۰ mM کاهش یافت. اگرچه به لحاظ آماری مقدار فعالیت این آنزیم در دو غلظت اخیر سدیم کلرید اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۲). کاربرد برگی پتاسیم سولفات توانست فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز را حتی تا غلظت ۱۰۰ mM به طور معنی داری افزایش دهد (شکل ۵ - c). این واکنش نشأت گرفته از پاسخ انطباقی و تنظیم محافظتی گیاه در برابر

ذرت شده است (Abbasi *et al.*, 2012). همچنین کاربرد پتاسیم هیومات منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در ریشه‌های زنجبیل شده است (Liang *et al.*, 2007). در آزمایشی دیگر کاربرد خارجی پتاسیم باعث راه اندازی سیستم آنتی‌اکسیدانی دانه‌های آفتابگردان تحت تنش خشکی (Soleimanzadeh *et al.*, 2010) و ارزن تحت تنش شوری (Heidari and Jamshidi, 2011) شده است که مطالعات فوق با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. احتمالاً تغییرات متابولیکی ایجادشده با پتاسیم منجر به تغییر در سطوح رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود که این تغییرات زمینه ساز القا سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌شود. در کنار این تغییرات، تجمع بیشتر پروتئین‌های محلول و ترکیبات فنولی به ترتیب با افزایش پایداری فعالیت برخی پروتئین‌ها و بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه منجر به کاهش تنش اکسایشی غشا و در نهایت افزایش توان تحملی نهال‌های انگور در مواجهه با تنش شوری شده است.

عناصر برگ: اثر شوری، پتاسیم و همچنین اثر متقابل آنها بر غلظت عناصر سدیم و پتاسیم در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). با افزایش سطح شوری از صفر به ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم برگ روند افزایشی نشان داد و در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید به حداکثر رسید (جدول ۴).

در بین تیمارها بیشترین غلظت سدیم برگ مربوط به تیمار سدیم کلرید ۱۰۰ میلی‌مولار بدون کاربرد پتاسیم سولفات بود. درحالی‌که کاربرد برگی پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد، موجب کاهش غلظت یون سدیم در گیاه گردید (جدول ۴). بنابراین می‌توان بیان کرد که کاربرد برگی پتاسیم سولفات تحت تنش شوری با افزایش غلظت یون پتاسیم در سلول‌های گیاهی و ایجاد تعادل بین نسبت سدیم به پتاسیم تا حدودی توانسته است از غلظت بالا و سمیت یون سدیم بکاهد. غلظت پتاسیم برگ تحت تنش شوری روند کاهشی نشان داد و با افزایش غلظت کلرید سدیم تا ۱۰۰ میلی‌مولار، غلظت یون پتاسیم به حداقل رسید (جدول ۴). با کاربرد برگی پتاسیم سولفات (۱/۵

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ در پاسخ به غلظت‌های مختلف سدیم کلرید افزایش یافت. اگرچه بین فعالیت این آنزیم در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). کاربرد برگی پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم مذکور در همه سطوح شوری به‌ویژه در دو سطح آخر شوری شد (شکل d - ۵). روند تغییرات آسکوربات پراکسیداز با تیمارهای شوری و پتاسیم، بسیار شبیه کاتالاز بود چرا که این آنزیم نیز همانند کاتالاز یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مهم گیاهی بوده که در شرایط تنش در سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو تولید می‌شود (Sharma *et al.*, 2012).

به‌همراه دیگر عناصر معدنی پتاسیم نقش مهمی در رابطه با میزان تحمل گیاهان تحت شرایط تنش شوری دارد (Marschner, 2012; Mengel, 2007). این عنصر نقش مهمی در حفظ آماس سلول، کنترل حرکت روزه‌ها و فعال‌سازی آنزیم‌ها دارد (Cherel, 2004). بنابراین تولید زیاد گونه‌های فعال اکسیژن در نتیجه تنش شوری منجر به آسیب به غشاشده و به‌دنبال آن نشت پتاسیم از سلول‌ها به خاطر فعال‌سازی کانال‌های تراوش پتاسیم به خارج اتفاق می‌افتد (Cuin and shabala, 2007). پتاسیم با فعال‌کردن مسیرهای بیوستز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله آسکوربات پراکسیداز و افزایش فعالیت آن به‌طور غیرمستقیم منجر به بی‌اثرکردن یا حذف گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل هیدروژن پراکسیداز از دستگاه فتوسنتزی می‌شود (Grattana and Grieve, 1999; Cakmak, 2005; Mengel, 2007).

در مطالعه حاضر فعالیت هر سه آنزیم در نهال‌های تحت تنش در مقایسه با نهال‌های بدون تنش بیشتر بود. تحت تنش شوری همراهی آنزیم‌های کاتالاز، گاباکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با هم نقش مهمی در بهبود کارایی فعالیت خنثی‌کنندگی گونه‌های فعال اکسیژن دارد (Gill and Tuteja, 2010). کاربرد برگی پتاسیم از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باعث تخفیف اثرات تنش شوری در

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر کاربرد برگی پتاسیم سولفات بر غلظت برخی عناصر برگ انگور بیدانه سفید در تنش شوری

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		سدیم	پتاسیم	آهن	روی
پتاسیم	۱	۰/۰۰۱ *	۶/۳۵ **	۳۹۱ **	۱۶/۳۳ **
شوری	۳	۰/۸۲۰ **	۱/۸۴ **	۱۱۳۵۶ **	۰/۵۵ **
شوری × پتاسیم	۳	۰/۰۵۸ **	۲/۳۲ **	۳۵۶۹ **	۱۵/۲۲ **
خطا	۱۵	۰/۰۰۰۲	۰/۰۱	۲۶۳	۱/۰۰
ضریب تغییرات	-	۲/۳۲	۳/۶۹	۱۱	۴/۰۹

** و * به ترتیب بیانگر اثر معنی دار در سطوح آماری یک و پنج درصد هستند.

جدول ۴- اثر کاربرد برگی پتاسیم سولفات بر غلظت برخی عناصر برگ انگور بیدانه سفید در تنش شوری

تیمارهای آزمایشی	پتاسیم	سدیم	پتاسیم	آهن	روی	منگنز
شوری	۰	۰/۳۵ ^f	۱/۹۶ ^d	۱۰۳/۰ ^e	۲۲/۰ ^e	۴۵/۳ ^a
۲۵	۰	۰/۵۹ ^d	۱/۸۱ ^d	۱۲۱/۲ ^d	۲۴/۰ ^e	۳۷/۳ ^d
۵۰	۰	۰/۸۷ ^b	۱/۴۴ ^e	۱۳۰/۷ ^d	۳۱/۳ ^c	۳۴/۷ ^c
۱۰۰	۰	۰/۹۳ ^a	۱/۱۴ ^f	۱۳۶/۷ ^c	۲۵/۲ ^d	۲۲/۱ ^d
۰	۱/۵	۰/۲۸ ^g	۲/۷۳ ^a	۱۲۶/۰ ^{cd}	۲۵/۴ ^d	۴۶/۷ ^a
۲۵	۱/۵	۰/۴۱ ^e	۲/۶۱ ^{ab}	۱۴۵/۷ ^b	۳۴/۷ ^c	۴۲/۰ ^b
۵۰	۱/۵	۰/۷۳ ^c	۲/۳۳ ^c	۱۶۰/۷ ^a	۵۵/۱ ^b	۳۸/۲ ^c
۱۰۰	۱/۵	۰/۸۱ ^b	۲/۰۵ ^d	۱۴۷/۳ ^b	۶۴/۱ ^a	۳۳/۳ ^c

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح آماری ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی داری با هم ندارند. DW: وزن خشک

درصد) و به دنبال آن افزایش غلظت این یون در شیره سلولی، غلظت پتاسیم برگ تاک‌ها افزایش یافت. بیشترین غلظت پتاسیم موجود در برگ، تحت شوری صفر میلی‌مولار و پتاسیم ۱/۵ درصد مشاهده شد. (جدول ۴).

محتوای یون پتاسیم در بافت‌های گیاهی بیانگر وجود کاتیونی مهم است که یکی از اجزا مهم در تنظیم اسمزی سلول‌ها و حفظ آماس سلولی به‌شمار می‌رود (Mengel, 2007). سدیم اگرچه ممکن است تا حدودی باعث نگهداری آماس سلولی شود ولی قادر به جایگزینی و راه‌اندازی وظایف فیزیولوژیکی مرتبط با پتاسیم از قبیل ساخت پروتئین‌ها و

فعال‌سازی آنزیم‌ها نیست (Grattan and Grieve, 1999). اثر شوری، پتاسیم و همچنین اثر متقابل آنها بر غلظت عناصر آهن، روی و منگنز در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). تیمار شوری باعث افزایش غلظت آهن برگ تاک‌ها شد و این افزایش وابسته به غلظت شوری بوده و در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید به حداکثر رسید (جدول ۴). هم راستا با نتایج مطالعه حاضر، اعمال تنش شوری در توت‌فرنگی (Yildirim et al., 2009) و گوجه‌فرنگی (Grattan and Grieve, 1999) باعث افزایش غلظت آهن در برگ گیاهان تحت تنش شده است. کاربرد برگی پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد

سولفات شد (جدول ۴). در واقع پتاسیم از طریق تنظیم اسمزی اثر معنی‌داری بر جذب و جابجایی سایر عناصر از جمله منگنز در گیاه دارد (Karimi, 2017).

در خاک‌های شور و قلیایی حلالیت ریزمغذی‌ها از قبیل آهن، روی و منگنز کم بوده و بسیاری از گیاهان رشد یافته در این خاک‌ها اغلب کمبود این عناصر را تجربه می‌کنند (Page et al., 1990). تفاوت در پاسخ گیاهان بستگی به نوع گیاه، سطح شوری، غلظت عناصر کم‌مصرف در بافت‌های گیاه دارد. در نتیجه ارتباط بین شوری و عناصر کم‌مصرف پیچیده بوده و شوری ممکن است باعث افزایش، کاهش و یا حتی عدم تأثیر بر غلظت ریزمغذی‌ها در بافت‌های گیاه شود (Grattan and Grieve, 1999). افزایش در غلظت آهن، روی و منگنز برگ در اثر برهمکنش شوری و پتاسیم با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مشاهده شده در این تیمارها ارتباط مستقیمی دارد. آهن نقش مهمی در حذف رادیکال‌های اکسیژن فعال دارد چرا که جز «هم» (Heme) آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز است که موجب تجزیه آب‌اکسیژنه به آب و اکسیژن می‌شود (Curie and Briat, 2003). از طرفی روی برای فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان خنثی‌کننده هیدروژن پراکسیداز از قبیل کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز لازم است و در گیاهان دچار کمبود روی معمولاً فعالیت این آنزیم‌ها کاهش می‌یابد (Cakmak, 2005). همچنین افزایش فعالیت کاتالاز و گاپاکول پراکسیداز در پاسخ به غلظت بالای منگنز در درخت سپیدار به عنوان گیاه چوبی گزارش شده است (Lei et al., 2007).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر کاربرد برگی پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد باعث ایجاد تعادل بین یون‌های پتاسیم با سدیم و نیز بهبود جذب برخی ریزمغذی‌های در برگ نهال‌های انگور بیدانه سفید تحت تنش شوری شد. تیمار پتاسیم سولفات ضمن تجمع پروتئین‌های محلول، فلاونوئید و فنول کل و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، منجر به کاهش تولید مالون

هم در تاک‌های بدون تنش شوری و هم در تاک‌های تحت تنش منجر به افزایش غلظت آهن برگ شد. بیشترین میزان آهن برگ در تیمار ۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و کاربرد برگی پتاسیم سولفات حاصل شد (جدول ۴). اثر مثبت منابع مختلف کود پتاسیم بر بهبود جذب آهن در انگور (Karimi, 2017) و توت‌فرنگی (Yildirim et al., 2009) گزارش شده است.

در مطالعه حاضر غلظت روی در برگ تاک‌های تحت تنش شوری تا غلظت ۵۰ میلی‌مولار روند افزایشی و سپس کاهش نشان داد (جدول ۴). افزایش غلظت روی در بافت برگ با افزایش تنش شوری در مرکبات (Ruiz et al., 1997) و گوجه‌فرنگی (Grattan and Grieve, 1999) نیز گزارش شده است که تأییدی بر یافته‌های مطالعه حاضر است. افزایش غلظت روی ممکن است با تغلیظ این عنصر در گیاه تحت شوری‌های بالا با توجه به کاهش جذب آب در ارتباط باشد. از طرفی کاربرد پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد باعث تقویت این روند افزایشی حتی تا غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم شد (جدول ۴) که حاکی از توانایی پتاسیم در تنظیم اسمزی و در نتیجه جذب و انتقال بهتر عنصر روی در شرایط تنش شوری است. اثر مثبت منابع مختلف کود پتاسیم بر بهبود جذب روی در انگور (Karimi, 2017) و توت‌فرنگی (Yildirim et al., 2009) گزارش شده است. زیرا این دو عنصر اثر هم‌افزایی بر روی هم داشته و جذب همدیگر را تشدید می‌کنند (Marschner, 2012).

غلظت منگنز برگ در پاسخ به تیمار شوری روند کاهش نشان داد. به این ترتیب که با افزایش شوری از میزان غلظت منگنز به‌ویژه در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید کاسته شد (جدول ۴). در بیشتر مطالعات انجام‌گرفته در محصولات باغی از قبیل توت‌فرنگی (Yildirim et al., 2009)، کدو و گوجه‌فرنگی (Grattan and Grieve, 1999) شوری باعث کاهش غلظت منگنز در ساقه و برگ شده است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. تحت تنش شوری کاربرد برگی پتاسیم سولفات ۱/۵ درصد باعث افزایش معنی‌دار غلظت منگنز برگ در مقایسه با تاک‌های بدون کاربرد برگی پتاسیم

آنتی‌اکسیدانی گیاه باعث تخفیف اثرات تنش شوری در انگور شود. اگر چه بررسی اثر پتاسیم و دیگر عناصر بر تغییرات غلظت ابسیزیک اسید و پلی‌آمین‌های درون‌زاد می‌تواند فهم ما در رابطه با نقش این ترکیب در پاسخ تاک‌ها به تنش شوری افزایش دهد.

دی‌آلدئید و هیدروژن پراکسید در برگ نهال‌های انگور تحت تنش شوری شد که از طریق کاهش صدمات اکسایشی وارده به غشا در اثر شوری، توان تحملی گیاه را در مواجهه با تنش شوری افزایش داد. لذا کاربرد برگی پتاسیم سولفات می‌تواند از طریق تقویت پاسخ‌های فیتوشیمیایی و نیز فعالیت

منابع

قربانی، آ.، کریمی، ر.، رسولی، م. و قبولی، م. (۱۳۹۵) تغییرات مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تاک در پاسخ به تنش شوری. سومین کنفرانس ملی انگور و کشمش، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران.

میرباقری، م. (۱۳۹۶) تأثیر تغذیه برگی کلات آهن و پتاسیم سولفات بر شاخص‌های کمی و کیفی انگور رقم بیدانه‌سفید. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه ملایر، ملایر، ایران.

- Abbasi, G. H., Akhtar, J., Haq, M. A. and Ahmad, N. (2012) Screening of maize hybrids for salt tolerance at seedling stage under hydroponic condition. *Soil and Environment* 31: 83-90.
- AbdElgawad, H., Zinta, G., Hegab, M. M., Pandey, R., Asard, H. and Abuelsoud, W. (2016) High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. *Frontiers in Plant Science* 7: 276.
- Abdel-Shafey, H. I., Hegemann, W. and Reiner, A. (1994) Digestion with concentrated HNO₃ and H₂O₂. *Environmental Management* 5: 21-24.
- Bergmeyer, N. (1970) *Methoden der Enzymatischen Analyse*. AkademieVerlag, Berlin.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochem* 72: 248-254.
- Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-310.
- Cakmak, I. (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168: 521-530.
- Chakraborty, K., Bhaduri, D., Meena, H. N. and Kalariya, K. (2016) External potassium (K⁺) application improves salinity tolerance by promoting Na⁺-exclusion, K⁺- accumulation and osmotic adjustment in contrasting peanut cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 103: 143-153.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis* 10: 178-182.
- Cherel, L. (2004) Regulation of K⁺ channel activities in plants: from physiological to molecular aspects. *Journal of Experimental Botany* 55: 337-351.
- Cuin, T. A. and Shabala, S. (2007) Compatible solutes reduce ROS induced potassium efflux in Arabidopsis roots. *Plant, Cell and Environment* 30: 875-85.
- Curie, C. and Briat, J. F. (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54: 183-206.
- Fayez, K. A. and Bazaid, S. A. (2014) Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 13: 45-55.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Grattana, S. R. and Grieve, C. M. (1999) Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* 78: 127-157.
- Gupta, B. and Huang, B. (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics* 2014: 18.
- Heidari, M. and Jamshidi, P. (2011) Effects of salinity and potassium application on antioxidant enzyme activities and physiological parameters in pearl millet. *Agricultural Sciences in China* 10: 228-237.
- Herzog, V. and Fahimi, H. D. (1973) Determination of the activity of peroxidase. *Analytical Biochemistry* 55: 554-562.
- Hu, Y. and Schmidhalter, U. (2005) Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168: 541-549.
- Jiang, M. K. and Zhang, J. (2004) Abscisic acid and antioxidant defense in plant cells. *Acta Botanica Sinica* 46: 1-9.
- Karimi, R. (2017) Potassium-induced freezing tolerance is associated with endogenous abscisic acid, polyamines and soluble sugars changes in grapevine. *Scientia Horticultura* 215: 184-194.

- Karimi, R., Ershadi, A., Rezaei Nejad, A. and Khanizadeh, S. (2016) Abscisic acid alleviates the deleterious effects of cold stress on 'Sultana' grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants by improving the anti-oxidant activity and photosynthetic capacity of leaves. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 91: 386-395.
- Kaya, C., Tuna, A. L., Ashraf, M. and Altunlu, H. (2006) Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environmental and Experimental Botany* 6: 397-403.
- Kholova, J., Sairam, R. K., Meena, R. C. and Srivastava, G. S. (2009) Response of maize genotypes to salinity stress in relation to osmolytes and metal ions contents, oxidative stress and antioxidant enzymes activity. *Biologia Plantarum* 53: 249-256.
- Koca, H., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2006) Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* L. and *pennellii*. *Biologia Plantarum* 50: 745-748.
- Lei, Y., Korpelainen, H. and Li, C. (2007) Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. *Chemosphere* 68: 686-694
- Liang, T. B., Wang, Z. L., Wang, R. J., Liu, L. L. and Shi, C. Y. (2007) Effect of potassium humate on ginger root growth and its active oxygen metabolism. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The journal of applied ecology* 18: 813-817.
- Maas, E. V. and Hoffman, G. J. (1977) Salt crop tolerance – Current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division* 103: 115-134.
- Marschner, P. (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. 3rd Ed. Academic Press, London.
- Mengel, K. (2007) Potassium. In: *Handbook of Plant Nutrition* (eds. Barker, A.V. and Pilbeam, D. J.) Pp. 91-120. CRC Press, USA.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Page, A. L., Chang, A. C. and Adriano, D. C. (1990) Deficiencies and toxicities of trace elements. *Agricultural Salinity Assessment and Management* 71: 138-160.
- Peng, Q. and Zhou, Q. (2009) Antioxidant capacity of flavonoid in soybean seedlings under the joint actions of rare earth element La (III) and ultraviolet-B stress. *Biological Trace Element Research* 127: 69-80
- Ruiz, D., Martinez, V. and Cerda, A. (1997) Citrus response to salinity: growth and nutrient uptake. *Tree Physiology* 17: 141-150.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. and Pessarakli, M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 26.
- Soleimanzadeh, H., Habibi, D. M., Ardakani, R., Paknejad, F. and Rejali, F. (2010) Response of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) to inoculation with *Azotobacter* under different nitrogen levels. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* 7: 265-268.
- Soleimanzadeh, H. D., Habibi, M. R., Ardakani, F., and Rejali, F. (2010) Effect of potassium levels on antioxidant enzymes and malondialdehyde content under drought stress in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 5: 56-61.
- Velikova, V. and Loreto, F. (2005) The relationship between isoprene emission and thermo tolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant, Cell and Environment* 28: 318-327.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 4113-4117.
- Yildirim, E., Karlidag, H. and Turan, M. (2009) Mitigation of salt stress in strawberry by foliar K, Ca and Mg nutrient supply. *Plant, Soil and Environment* 55: 213-221.

Phytochemical responses and antioxidant activity of potassium-treated grapevines (*Vitis vinifera* L.) in salinity stress condition

Rouhollah Karimi*, Behrooz Mohamad Parast and Raziye Minazadeh

¹Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Malayer University.

²Department of Biology, Faculty of Sciences, Malayer University.

(Received: 15/02/2018, Accepted: 06/08/2018)

Abstract

Supplemental nutrition through affecting both enzymatic and non-enzymatic protective systems can modulate the oxidative stress induced by salinity. In this study, the interaction effect of foliar application potassium (0 and 1.5% potassium sulfate; PS) and salinity (0, 25, 50 and 100 mM sodium chloride) on membrane degradation indices, phytochemical responses and antioxidant enzyme activities and also leaf nutrient elements of Bidaneh-Sefid grapevine were investigated as a factorial experiment based on a completely randomized design. By increasing salinity, hydrogen peroxide and malondialdehyde were increased in vines leaves under salinity stress. However, the application of PS at 1.5% decreased the concentration of these indices 20 and 26 percentage respectively. As the salinity increased, the phenolic and flavonoid content of the leaves increased in the vines, however, foliar application of PS at 1.5% increased their content at the higher level in PS-treated vines. Moreover, in PS- treated vine at 1.5% soluble proteins increased dramatically even in high NaCl levels. Catalase and ascorbate peroxides activity increased until 50 Mm salinity stress, while with PS at 1.5% treated vine, the activities of these enzymes increased until 100 Mm NaCl. Potassium application also increased these enzyme activities at all levels of salinity. Also, the interaction of salinity and PS increased guaiacol peroxidase activity. Iron, zinc and leaf manganese concentrations increased due to the interaction of salinity and potassium. Totally, PS through the accumulation of soluble proteins, flavonoids and phenol, as well as increasing the activity of antioxidant enzymes finally reduced the oxidative stress induced by salinity in the vine leaves.

Keywords: Catalase, Grape, Micronutrients, Nutrition, Total Phenol

Corresponding author, Email: Rouholahkarimi@gmail.com