J. Crop Prod. Process. 2025, 15(3), 63-77; DOI: 10.47176/jcpp.15.3.38671

Journal of Crop Production and Processing

Journal homepage: https://jcpp.iut.ac.ir/

Original Article

Investigation of Salinity and Alkalinity Stress Effect on Some Antioxidant Enzymes Activities and Biochemical Characteristics in Volcameriana and Sour Orange Rootstocks

Abbas Danaeifar[1] *, Esmaeil Khaleghi[2], Shohreh Zivdar[1] and Khosro Mehdikhanlou[3]

1 and 2. Assistant Professor and Professor, Respectively, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3. Assistant Professor, Department of Plant Production Engineering and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Extended Abstract

Introduction: Citrus mostly belong to the Citrus genus and the Rutaceae family, which are among the most commercially important fruits in the world. Tropical and subtropical regions with arid and semi-arid climates are the main areas for citrus production. Citrus fruits are important and popular crops that contribute to the human diet. Despite these beneficial compounds, there are still factors that affect the quality and production of citrus fruits. Citrus production is affected by biotic and abiotic stresses such as salinity. Soil salinity is a major global issue that has negative effects on agricultural production. Iron deficiency and salinity are among the most important factors affecting plant growth and the occurrence of stresses that may occur in saline and alkaline soils. One of the methods of resistance to abiotic stresses is the selection of appropriate Rootstock. Therefore, the aim of this study was to evaluate the activity of some antioxidant enzymes and osmolytes in two rootstocks of sour orange and volcameriana in relation to combined salinity and alkalinity stress.

Materials and Methods: This experiment included investigating the tolerance of two citrus rootstocks, including Sour orange and Volkameriana, to salinity and alkaline soils. For this purpose, one-year-old seedlings of these rootstocks were obtained from a commercial nursery in Dezful in 2019 and transferred to the greenhouse of the Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, and then cultivated in 7-liter pots (containing a sand substrate). Hoagland nutrient solution was used to nourish and better establish the seedlings. After establishing the seedlings in the new conditions in June, they were subjected to salinity (sodium chloride) and alkali stress conditions. Salinity stress included concentrations of 0, 30, 60, and 90 mM sodium chloride. To prevent osmotic shock to the plants, the 90 mM salinity treatment was gradually applied in three steps. Alkaline stress was applied by increasing the pH of the nutrient solution from 6.5 to 8.2 using sodium carbonate. Salinity treatment was continued until the plants showed signs of stress. This experiment was a factorial experiment in a completely randomized design with 4 replications. At the end of the experiment, attributes such as phenol content, antioxidant capacity, hydrogen peroxide, malondialdehyde, and the activity of antioxidant enzymes such as peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase, and superoxidase dismutase were measured.

Results and Discussion: The results showed that increasing the intensity of salinity and alkalinity stress significantly increased the amount of hydrogen peroxide, malondialdehyde and antioxidant capacity in both sour orange and Volkameriana rootstocks, but the amount of phenol increased in sour orange rootstock and decreased in Volkameriana

Received: Feb. 01, 2025; Revised: May. 08, 2025; Accepted: May. 20, 2025; Published Online: Sep 03, 2025.
* Corresponding Author: a.danaei@scu.ac.ir

Journal of Crop Production and Processing

Journal homepage: https://jcpp.iut.ac.ir/

rootstock in most cases. The highest amount of malondialdehyde (54.63 mmol/g FW) was obtained in Volkameriana rootstock in the presence of 120 mM NaCl and pH 8.2. At pH 8.2 and in the presence of 90 mM NaCl, the antioxidant capacity increased by 5.01% in sour orange rootstock and by 3.26% in Volkameriana rootstock, compared to the control. Increasing the salinity intensity significantly increased the activity of antioxidant enzymes such as peroxidase, catalase, and superoxide dismutase in both sour orange and Volkameriana rootstocks, which was higher at pH 8.2 than pH 6.5. Among all treatments, the highest catalase activity (2.47 units/mg protein) was obtained in the sour orange rootstock exposed to pH 2.8 and 90 mM NaCl and the lowest catalase activity (0.70 units/mg protein) was observed in the Volkameriana rootstock grown in the presence of pH 6.5 and 30 mM NaCl. The salt-induced increase in the activity of the superoxide dismutase enzyme was 52.69% in the sour orange rootstock and 34.60% in the Volkameriana rootstock. The activity of antioxidant enzymes increased with increasing salinity levels compared to the control. Under environmental stresses, which often induce oxidative stress, plants produce reactive oxygen species (ROS), which are harmful to plant growth due to their destructive effects on intracellular components and plant metabolism, leading to oxidative damage to cells. The amount of ROS is regulated by the activity of enzymes. During stress, the activity of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase enzymes often increases. The activity of antioxidant enzymes can increase under saline and alkaline stress conditions and reduce the ROS.

Conclusion: In general, the results showed that the sour orange rootstock had greater tolerance to salt and alkali stress conditions than the Volkameriana rootstock, due mainly to possessing an increased antioxidant enzyme activity and phenol content.

Keywords: Catalase, Enzyme, Phenol, Salinity Stress, Sour orange,

How to Cite: Danaeifar A., Khaleghi E., Zivdar Sh., Mehdikhanlou Kh. Investigation of salinity and alkalinity stress effect on some antioxidant enzyme activities and biochemical characteristics in volcameriana and sour orange rootstocks. *J. Crop Prod. Process*. 2025, 15(3), 63-77. (*In Persian*). DOI: 10.47176/jcpp.15.3.38671.

Copyright © 2025 Isfahan University of Technology, Published by Isfahan University of Technology press. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی، ۱۴۰۴، دوره ۱۵، شماره ۳، صص. ۷۷-۶۳، DOI: 10.47176/jcpp.15.3.38671

نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی
صفحه خانگی نشریه: https://jcpp.iut.ac.ir/

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات تنش شوری و قلیایی بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات بیوشیمیایی در پایه‌های ولکامریانا و نارنج

عباس دانایی فر *[۱]، اسمعیل خالقی[۲]، شهره زیودار[۱] و خسرو مهدی خانلو[۳]

چکیده– مرکبات اکثراً متعلق به جنس Citrus و خانواده Rutaceae هستند که از تجاری‌ترین میوه‌ها در جهان به شمار می‌آید. مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری با اقلیم خشک و نیمه خشک از مناطق اصلی تولید مرکبات هستند. تولید مرکبات تحت تأثیر تنش‌های زنده و غیرزنده از قبیل شوری و قلیایی محدود می‌شوند. کمبود آهن و شوری از مهم‌ترین محدودیت‌های تأثیرگذار بر رشد گیاه و بروز تنش‌هایی است که ممکن است همزمان در خاک‌های شور و قلیایی رخ دهد. یکی از روش‌های مقاومت نسبت به تنش‌های غیرزنده انتخاب پایه مناسب است. لذا جهت بررسی مقاومت دو پایه نارنج و ولکامریانا نسبت به شرایط تنش آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. در این آزمایش اثر چهار غلظت ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار سدیم کلراید و دو سطح pH (۶/۵ و ۸/۲) بر برخی خصوصیات مورفو-فیزیولوژیک و بیوشیمیایی دو پایه نارنج و ولکامریانا بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش شدت تنش شوری و قلیایی میزان پراکسید هیدروژن، مالوندی آلدهید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را به طور معنی‌داری در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا افزایش داد اما میزان فنول در پایه نارنج افزایش و در پایه ولکامریانا در اغلب موارد کاهش یافت. بیشترین میزان مالوندی‌آلدهید (۵۴/۶ میلی‌مول بر گرم وزن‌تر) در پایه ولکامریانا با بالاترین غلظت شوری و ۸/۲ pH به‌دست آمد. در ۸/۲ pH و شوری ۹۰ میلی‌مولار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پایه نارنج ۵/۰۱ و در پایه ولکامریانا ۳/۲۶ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. افزایش غلظت شوری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسیداز دیسموتاز را به طور معنی‌داری در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا افزایش داد که این افزایش در ۸/۲ pH نسبت به ۶/۵ pH بیشتر بود. از میان همه تیمارها بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز (۲/۴۷ واحد در میلی‌گرم پروتئین)در پایه نارنج با ۸/۲ pH و شوری ۹۰ میلی‌مولار و کمترین فعالیت کاتالاز (۰/۷۰ واحد در میلی‌گرم پروتئین) در پایه ولکامریانا با ۶/۵ pH و شوری ۳۰ میلی‌مولار به‌دست آمد. میزان افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز در پایه نارنج ۵۲/۷ درصد و در پایه ولکامریانا ۳۴/۶ درصد نسبت به شاهد بود. به‌طور کلی نتایج نشان داد پایه نارنج با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان فنول تحمل بیشتری نسبت به پایه ولکامریانا در شرایط تنش شوری و قلیایی داشت.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، فاکتوریل، فنول، کاتالاز، مالوندی‌آلدهید.

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۱۳، بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۱۸، پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۳۰، اولین انتشار: ۱۴۰۴/۰۶/۱۲

۱ و ۲- به‌ترتیب استادیار و استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*: نویسنده مسئول، رایانامه: a.danaei@scu.ac.ir

حق انتشار این مستند، متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است. ۱۴۰۴ ©.

این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است:

Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

مقدمه

مرکبات اکثراً متعلق به جنس Citrus و خانواده Rutaceae هستند (٦) که از تجاری‌ترین میوه‌ها در جهان به شمار می‌آیند. مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری با اقلیم خشک و نیمه خشک از مناطق اصلی تولید مرکبات به شمار می‌آیند (٧ و ٣٣). مرکبات، در سرتاسر جهان در بیش از ١٤٠ کشور کشت می‌شوند و از محصولات مهم و محبوب جهانی هستند که به رژیم غذایی انسان کمک می‌کنند (٢١). با وجود ارزش غذایی مفید این میوه، هنوز عواملی وجود دارند که کیفیت و تولید میوه مرکبات را تحت تأثیر قرار می‌دهد (٦). تولید مرکبات تحت تأثیر تنش‌های زنده و غیرزنده از قبیل شوری قرار می‌گیرد (٦). شوری خاک یک مسئله‌ی مهم جهانی است که تأثیرهای منفی بر تولیدات کشاورزی دارد. به‌طور کلی، خاک‌های شور در مناطق خشک و نیمه خشک وجود دارند در این مناطق میزان بارندگی برای تأمین نیاز آبی محصولات زراعی و شستشوی نمک‌های معدنی اطراف ریشه گیاه کافی نیست (٣٤). شوری اساساً به‌وسیله سدیم کلراید ایجاد می‌شود و مقادیر بالای نمک اثرات منفی از جمله اختلال در تعادل یونی و اسمزی دارد که منجر به توقف رشد گیاه وحتی مرگ گیاه می‌شود (١). از دیگر تنش‌های غیرزنده که می‌تواند رشد درختان مرکبات را تحت تأثیر قرار دهد شرایط قلیایی است که سبب کمبود آهن در گونه‌های مرکبات می‌شود (٢٣). آهن از عناصری است که کمبود آن رشد و توسعه‌ی گیاه را محدود می‌کند زیرا حلالیت پایینی مخصوصاً در خاک‌های هوازی، خنثی و قلیایی دارد (٣٨). کمبود آهن و شوری از مهم‌ترین محدودیت‌های تأثیرگذار بر رشد گیاه و بروز تنش‌هایی است که ممکن است همزمان در خاک‌های شور و قلیایی رخ دهد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که اثرات کمبود آهن همراه با تنش شوری می‌تواند تشدید شود. تنش شوری و قلیایی علاوه بر جذب عناصر ماکرو جذب عناصر میکرو را هم کاهش می‌دهند (٤). ابراهیم و همکاران (١٦) اعلام کردند تنش شوری اثرات منفی بر سرعت رشد پایه‌های مرکبات، محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم کاتالاز داشت اما میزان پرولین و میزان سدیم و کلر برگ و ریشه را افزایش نداد. شهید و همکاران (٣٤) بیان کردند تحت شرایط تنش شوری میزان کلروفیل، وزن خشک، سرعت فتوسنتزی، غلظت دی‌اکسیدکربن داخلی و هدایت روزنه در پایه‌های حساس مرکبات نسبت به پایه‌های مقاوم کمتر و میزان گونه‌های فعال اکسیژن بیشتر بود. در پژوهشی مارتینز و همکاران (٢٤) با بررسی تنش قلیایی بیان کردند یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده در گیاهان است که موجب کلروز ناشی از کمبود آهن می‌شود و در تعداد زیادی از فرایندهای چرخه زندگی گیاه از قبیل فتوسنتز و تنفس، نقش دارد. یکی از راه‌های افزایش مقاومت مرکبات در شرایط تنش، استفاده از پایه‌هایی با تحمل‌های متفاوت در شرایط سخت است. چندین مطالعه تحقیقاتی نشان داده‌اند که پاسخ درختان مرکبات به تنش شوری- قلیایی می‌تواند به نوع پایه و برهم‌کنش بین ترکیب پایه و پیوندک بستگی داشته باشد (٨ و ٢٠). شناسایی و ارزیابی پایه‌های مرکبات متحمل به تنش می‌تواند در حل مشکلات مربوط به تنش کمک کند. بنابراین توسعه‌ی پایه‌هایی متحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده یکی از مهم‌ترین برنامه‌های اصلاحی پایه‌های مرکبات است که پایه‌های مختلف را برای شرایط مختلف انتخاب می‌کنند (٣١). یکی از پایه‌ها نارنج است که به‌دلیل داشتن سیستم ریشه‌ای عمیق نسبتاً مقاوم به خشکی هست و به‌طور گسترده در مناطق مدیترانه استفاده می‌شود (١٦). همچنین این پایه به‌طور ویژه سازگاری خوبی به خاک‌های با pH بالا را دارد (١٠). از دیگر پایه‌هایی که می‌تواند، تحمل به شرایط نامساعد محیطی را افزایش دهد پایه ولکامریانا است. دانهال‌های ولکامریانا به‌عنوان پایه مرکبات متحمل به شوری استفاده می‌شوند (١٦). یکی از پایه‌هایی که می‌تواند نسبت به کمبود آهن در خاک‌های قلیایی توانایی بالایی داشته باشد ولکامریانا است (١٧). لذا هدف از این مطالعه بررسی برخی فعالیت‌های آنزیمی در دوپایه نارنج و ولکامریانا نسبت به تیمار تنش شوری و قلیایی جهت ارزیابی میزان مقاومت این دو پایه نسبت تنش شوری و قلیایی باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش شامل بررسی میزان تحمل ۲ پایه مرکبات نارنج و ولکامریانا به شرایط شوری و خاک‌های قلیایی بود. به این منظور نهال‌های یکساله این پایه‌ها در آذر ماه ۱۳۹۸ از نهالستان تجاری تهیه و به گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند و سپس در گلدان‌های ۷ لیتری (حاوی بستر ماسه) کشت شدند (گیاهان در گلخانه با عرض جغرافیایی ۳۱.۳۰۵۹۲۹۶۸، طول جغرافیایی ۴۸.۶۵۸۲۸۶۵۰ و ارتفاع ۱۸ متر از سطح دریا با میانگین دمای روز ۳۵-۳۰ و شب ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد، ، رطوبت نسبی ۵۰ تا ۷۰ درصد و شدت نور ۷۵۰۰ لوکس رشد کردند). از محلول غذایی هوگلند جهت تغذیه و استقرار بهتر نهال‌ها استفاده شد. نهال‌ها پس از سازگاری به شرایط جدید در خرداد ماه تحت شرایط تنش شوری (سدیم کلراید) و قلیایی قرار گرفتند. تنش شوری شامل غلظت‌های ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار سدیم کلراید بود. (برای جلوگیری از وارد شدن شوک اسمزی به گیاه، تیمار شوری طی سه مرحله و به‌صورت تدریجی اضافه شد به این صورت که در ابتدا همه گیاهان (به غیر از شاهد) تحت شوری ۳۰ میلی‌مولار قرار گرفتند در مرحله بعد شوری ۳۰ و ۶۰ میلی‌مولار اعمال شد و در آخر شوری ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار اعمال شد). اعمال تنش قلیایی به‌صورت افزایش pH محلول غذایی با استفاده از سدیم کربنات از ۶/۵ به ۸/۲ بود. اعمال تنش تا زمان بروز علائم تنش (کلروزه شدن برگ‌ها) در پایه‌ها ادامه یافت. در طی مراحل آزمایش از محلول غذایی هوگلند جهت تغذیه استفاده شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۴×۲×۲ با ۱۶ تیمار در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در ۴ تکرار شامل دو پایه (نارنج و ولکامریانا)، دوسطح pH (۶/۵ و ۸/۲) و چهار سطح شوری (۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار) انجام گرفت. هر تکرار شامل دوگلدان و هر گلدان حاوی یک نهال بود. در پایان آزمایش (۳ ماه پس از اعمال تیمار) فاکتورهای بیوشیمیایی زیر اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری فنول کل

یک گرم از برگ‌ها در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد همگن و سپس به مدت ۲ ساعت شیک شد و پس از آن، نمونه‌ها با ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. عصاره الکلی به‌دست آمده برای اندازه‌گیری فنول و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل استفاده شد.

فنول کل طبق روش مک‌دونالد و همکاران (۲۶) اندازه‌گیری شد. برای اندازه گیری فنول کل، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره در فالکن ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و با ۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (۱ به ۱۰) رقیق سازی شد. از عصاره رقیق شده به میزان ۲۵۰ میکرولیتر برداشته و به آن ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ۱۰ درصد و ۲ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۱ مولار اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از آن میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد.

برای تهیه محلول‌های استاندارد مقدار ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیترگالیک‌اسید در متانول و آب مقطر به نسبت (۱ به ۱) تهیه شدند. پس از قرائت استاندارد و رسم خط و به دست آوردن معادله خط مقدار فنول کل محاسبه شد.

اندازه‌گیری عصاره آنتی اکسیدانی کل به روش DPPH

عصاره الکلی به‌دست آمده از قسمت اندازه‌گیری فنول برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل استفاده شد. محلول دی-فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) با غلظت ۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول تهیه شد. مخلوطی به نسبت ۱ به ۱ از محلول DPPH و عصاره تهیه شده از گیاه آماده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه در تاریکی قرار گرفتند. جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (model 7315, Jenway, UK) خوانده شد. درصد بازداری یا درصد از بین بردن رادیکال های آزاد اکسیژن که همان درصد کل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی است طبق فرمول زیر محاسبه شد (۳۶).

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{عدد جذب نمونه} - \text{عدد جذب شاهد}}{\text{عدد جذب شاهد}} * 100$$

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن

برای اندازه گیری پراکسید هیدروژن (H_2O_2) از روش لورتو و ولیکووا (۲۲) استفاده شد. یک گرم نمونه در هاون چینی با ازت مایع پودر و سپس ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱ درصد به آن اضافه شد. محتویات به فالکون ۱۵ میلی‌لیتر انتقال یافت. در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ انجام شد (تا پایان کار اطراف نمونه‌ها با فویل آلومینیومی پوشیده شد). ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی سانتریفیوژ شده را به درون فالکون یا میکروتیوب دیگر انتقال داده و ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) به آن اضافه شد. در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر محلول یدید پتاسیم یک مولار به هر نمونه اضافه شد و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (model 7315, Jenway, UK) قرائت شد.

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدهید (شاخص پراکسیداسیون لیپیدی)

غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) با استفاده از روش هیث و پارکر (١٤) اندازه‌گیری شد. در این روش مقدار ۰/۱ گرم برگ تازه بالغ با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد همگن شد و به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از آن، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر از محلولی که شامل TCA ۲۰ درصد و تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد است اضافه شد و درون حمام بن‌ماری در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و بلافاصله نمونه‌ها درون آب یخ قرار گرفتند تا واکنش متوقف شود. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند و میزان جذب آن‌ها در طول موج ۵۳۲ و ٦۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (model 7315, Jenway, UK) قرائت شد. با استفاده از فرمول زیر میزان مالون‌دی‌آلدهید برحسب میلی‌مول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

MDA=(A532-A600)*155/0.1

استخراج پروتئین محلول کل

۰/۵ گرم از برگ‌های تازه در نیتروژن مایع ساییده شد، پس از آن ۱۰۰ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدون (PVP) اضافه و مخلوط حاصل مجدداً ساییده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) و سدیم متابی‌سولفات یک میلی‌مولار) افزوده شد. پس از اینکه نمونه‌ها به خوبی ساییده شدند، عصاره گیاهی حاصل به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل و در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ رومیزی (K280R model, Centurion Scientific Ltd, UK) سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ کردن لایه شفاف بالایی جدا و عصاره حاصل در حجم‌های کوچکتر در میکروتیوپ ریخته شدند و پس از انجماد در نیتروژن مایع جهت تعیین میزان پروتئین محلول کل و سنجش‌های آنزیمی به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. همه مراحل تهیه عصاره آنزیمی در دمای ٤ درجه سلسیوس انجام گرفت (۵).

سنجش پروتئین محلول کل

برای اندازه‌گیری پروتئین محلول کل از روش بردفورد (۵) استفاده شد. جهت تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد. پس از تهیه منحنی استاندارد، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های عصاره آنزیمی نیز با یک میلی‌لیتر معرف بردفورد ۲۰ درصد مخلوط شد و پس از پنج دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (model 7315, Jenway, UK) خوانده شد. غلظت پروتئین محلول نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش همدا و کلین (۱۵) اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر از مخلوط واکنش شامل مواد شیمیایی ۸۱۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH٦/٦) ۵۰ میلی‌مولار ، ۹۰ میکرولیتر گایاکول ۱ درصد، ۹۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳ /۰ درصد و عصاره آنزیمی ۱۰ میکرولیتر بود (با توجه به اینکه کووت آزمایشگاه ۳ میلی‌لیتر بود همه این مواد ۳ برابر شدند). از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی به‌عنوان بلنک اسپکتروفتومتر استفاده شد. در اثر این عمل، گایاکول به تتراگایاکول تبدیل می‌شود. بیشینه جذب تتراگایاکول در طول موج ٤۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (model 7315, Jenway, UK) صورت گرفت.

فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش بیر و سیزر (۳) اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم(pH۷/۸) یک مولار ، ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن یک مولار، آب مقطر استریل۸۷۰ میکرولیتر، عصاره آنزیمی۱۰ میکرولیتر بود از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی به‌عنوان شاهد اسپکتروفتومتر استفاده شد. بیشینه جذب پراکسید هیدروژن در طول موج ۲٤۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (model 7315, Jenway, UK) صورت گرفت.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش ناکانو و آسادا (۲۷) اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی ۱۰۰میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH۷/۸) یک مولار، ۵۰ میکرولیتر آسکوربیت ۱۰ میلی‌مولار، ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار، آب مقطر استریل ۷۹۰ میکرولیتر و عصاره آنزیمی ۱۰ میکرولیتر بود از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی به‌عنوان شاهد اسپکتروفتومتر استفاده شد. از آنجائی‌که بیشینه جذب آسکوربیت در طول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (model 7315, Jenway, UK) صورت گرفت، با آغاز واکنش به‌وسیله آنزیم آسکوربات پراکسیداز میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر بتدریج کاهش می‌یابد.

سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از طریق اندازه گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری ماده شیمیایی نیتروبلوتترازولیوم کلراید (NBT) به روش دهیندسا و همکاران (۹) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم (pH=۷/۸) ۵۰ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، NBT ۷۵ میکرومولار و EDTA ۰/۱ میلی‌مولار بود به میزان ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۸۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش اضافه شد. در پایان به میزان ۱۰۰ میکرولیتر ریبوفلاوین به غلظت ۱۲ میکرومولار نیز به هر یک از واکنش‌ها اضافه شده و پس از به هم زدن مخلوط، لوله‌های شیشه‌ای در زیر یک لامپ فلورسنت ۱۵W به فاصله ۳۵ سانتیمتر منتقل شد. مدت زمان واکنش ۳۰ دقیقه بود. با خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در ٥٦۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (model 7315, Jenway, UK) خوانده شد. نور اتاق تاثیری بر شدت واکنش نداشت. از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی که دارای حداکثر شدت رنگ بود به‌عنوان شاهد و از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی نور ندیده به‌عنوان شاهد اسپکتروفتومتر استفاده شد.

نتایج و بحث

مطابق با نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس داده‌ها (جدول ۱) اثرات متقابل پایه در تنش قلیایی در تنش شوری بر روی میزان پراکسید هیدروژن، مالون‌دی‌آلدهید و سدیم در سطح احتمال ۱ درصد و بر روی میزان فنول، ظرفیت آنتی اکسیدانی و پتاسیم در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثرات متقابل (جدول ۲) نشان داد که میزان پراکسید

جدول ۱. جدول تجزیه واریانس برخی صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در دو پایه نارنج و ولکامریانا تحت تنش شوری و قلیایی

منبع تغییرات	درجه آزادی	هیدروژن پراکسید	مالون دی آلدهید	فنول کل	ظرفیت‌آنتی اکسیدانی	سدیم	پتاسیم
پایه	۱	۱۷۰۷**	۵۷۷**	۰/۳۲*	۸/۳۶**	۰/۰۰۰۹*	۰/۰۰۲*
تنش قلیایی	۱	۱۲۷۷۹**	۶۱۵**	۰/۱۰ns	۱۹/۳**	۰/۳۱۶**	۰/۱۵**
تنش شوری	۳	۴۳۷۰**	۳۱۵**	۰/۲۸*	۲۱/۵**	۰/۲۷۵**	۰/۰۶**
پایه*تنش قلیایی	۱	۶۸۸**	۴۸/۶**	۰/۰۱ns	۷/۹۶**	۰/۰۱۰**	۰/۰۰۱ns
پایه*تنش شوری	۳	۵۶۸**	۳۶/۹**	۰/۳۶**	۴/۵۷**	۰/۰۱۷**	۰/۰۰۳**
تنش قلیایی*تنش شوری	۳	۲۲۷ns	۹/۳۰*	۰/۰۹ns	۱/۳۵ns	۰/۰۱۷**	۰/۰۰۲*
پایه*تنش قلیایی* شوری	۳	۷۲۹**	۱۳۹**	۰/۲۴*	۲/۹۵*	۰/۰۰۷**	۰/۰۰۱*
خطا	۴۸	۸۸/۱	۲/۹۰	۰/۰۷	۱/۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۶
cv		۹/۰۸	۴/۲۸	۹/۳۹	۱/۰۹	۴/۴۶	۵/۴

ns: عدم معنی‌داری؛ *: معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد؛ **: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۲: جدول مقایسه میانگین تنش شوری و قلیایی بر روی میزان پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدهید، فنول کل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، پتاسیم و سدیم برگ در دو پایه نارنج و ولکامریانا

پایه	pH	شوری (میلی-مولار)	هیدروژن پراکسید (میکرومول بر لیتر)	مالون دی آلدهید (میلی مول بر گرم وزن تر)	فنول کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	ظرفیت آنتی اکسیدانی (درصد)	پتاسیم برگ (درصد)	سدیم برگ (درصد)
نارنج	۶/۵	۰	۷۱/۲h	۲۸/۶l	۲/۶۱e	۸۹/۷fg	۲/۱۲a	۰/۱۵j
		۳۰	۷۳/۳h	۳۶/۴ghi	۲/۷۲de	۹۲/۵bcd	۲/۰۷c	۰/۲۰i
		۶۰	۷۹/۳gh	۳۲/۵k	۳/۲۴abc	۹۳/۲abc	۲/۰۲d	۰/۳۸e
		۹۰	۹۹/۳ef	۴۰/۳ef	۳/۰۳abcde	۹۲/۴bcd	۱/۹۸ef	۰/۳۶f
	۸/۲	۰	۸۲/۶gh	۳۸/۳fg	۲/۹۰abcde	۹۰/۰efg	۲/۰۸bc	۰/۲۳h
		۳۰	۱۳۴/۶a	۳۴/۱ijk	۲/۸۰cde	۹۱/۳def	۱/۹۳gh	۰/۳۳g
		۶۰	۱۱۴/۳cd	۴۰/۳ef	۳/۲۴abc	۹۳/۹ab	۱/۹۳gh	۰/۴۹bc
		۹۰	۱۳۰/۴ab	۴۳/۱cd	۲/۸۸bcde	۹۴/۲a	۱/۸۹i	۰/۵۱b
ولکامریانا	۶/۵	۰	۶۸/۶h	۳۲/۹jk	۳/۲۶abc	۸۹/۳g	۲/۱۱ab	۰/۱۱k
		۳۰	۱۰۷cde	۳۵/۲ijk	۳/۰۵abcde	۹۰/۲efg	۲/۰۸bc	۰/۲۰i
		۶۰	۱۱۱cde	۴۴/۵cd	۳/۱۰abcd	۹۱/۵cde	۱/۹۹de	۰/۴۸c
		۹۰	۱۰۲def	۴۲/۲de	۲/۶۵de	۹۱/۱def	۱/۹۹de	۰/۲۲hi
	۸/۲	۰	۹۳/۶fg	۳۷/۲gh	۳/۳۵a	۹۲/۰cd	۱/۹۹de	۰/۲۱hi
		۳۰	۱۱۸bc	۴۹/۹b	۲/۸۰cde	۹۲/۲cd	۱/۹۵fg	۰/۴۳d
		۶۰	۱۳۷a	۴۴/۹c	۳/۰۶abcde	۹۲/۵bcd	۱/۹۱hi	۰/۵۴a
		۹۰	۱۲۸ab	۵۴/۶a	۳/۲۷ab	۹۲/۷bcd	۱/۸۸i	۰/۵۱b

برای هر صفت میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک براساس آزمون چند دامنه دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

هیدروژن تحت تأثیر اثرات متقابل پایه در تنش قلیایی در شوری قرار گرفت. بر اساس مقایسه میانگین اثرات سه‌گانه در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا با افزایش غلظت شوری میزان پراکسید هیدروژن در هر دو سطح pH افزایش یافت از میان همه تیمارها ولکامریانا در pH ٦/٥ و پایین‌ترین غلظت شوری دارای کمترین میزان پراکسید هیدروژن (٦٨/٦ میکرومول بر لیتر) و در ٨/٢ pHو شوری ٦٠ میلی‌مولار دارای بیشترین میزان پراکسیدهیدروژن (١٣٧ میکرومول بر لیتر) بود که افزایش ٤٧/٥ درصدی نسبت به شرایط مشابه در پایین‌ترین غلظت شوری داشت. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اثرات سه‌گانه نشان داد که افزایش شدت تنش شوری و قلیایی میزان مالون دی آلدهید را در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا افزایش می‌دهد. به‌طوری‌که کمترین میزان مالون دی-آلدهید (٢٨/٧ میلی‌مول بر گرم وزن تر) در پایه نارنج با pH ٦/٥ و شوری صفر میلی‌مولار به‌دست آمد و بیشترین میزان مالون‌دی-آلدهید (٥٤/٦ میلی‌مول بر گرم وزن‌تر) در پایه ولکامریانا با بالاترین غلظت شوری و pH ٨/٢ به‌دست آمد که افزایش ٩٠/٥ درصدی در میزان مالون نسبت به پایه نارنج بدون شرایط تنش (pH ٦/٥ و شوری صفر) داشت. در پایه نارنج افزایش غلظت شوری در هر دو سطح pH موجب افزایش میزان فنول شد که این افزایش در غلظت ٦٠ میلی‌مولار سدیم کلراید در هر دو سطح pH نسبت به شاهد معنی‌دار شد و میزان این افزایش ٢٤/١ درصد نسبت به شاهد بود. در پایه ولکامریانا افزایش سطوح شوری موجب کاهش میزان فنول در هر دو سطح pH شد که این کاهش در pH ٦/٥ در غلظت ٩٠ میلی‌مولار سدیم کلراید معنی‌دار شد. افزایش غلظت شوری موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در هر دو پایه شد که این افزایش در اغلب موارد معنی‌دار بود. پایه نارنج با pH٨/٢ و شوری ٩٠ میلی‌مولار سدیم کلراید دارای بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (٩٤/٣ درصد) بود و پایه ولکامریانا با pH ٦/٥ و شوری صفر دارای کمترین ظرفیت آنتی-اکسیدانی (٨٩/٣ درصد) بود. همچنین نتایج نشان داد که در ٨/٢ pH و شوری ٩٠ میلی‌مولار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پایه نارنج ٥/٠١ و در پایه ولکامریانا ٣/٢٦ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. میزان پتاسیم تحت تأثیر اثرات سه‌گانه قرار گرفت به-طوری‌که در پایه نارنج و ولکامریانا افزایش غلظت شوری میزان پتاسیم را در هر دو سطح pH به‌طور معنی‌داری کاهش داد. این کاهش در پایه ولکامریانا نسبت به نارنج و pH ٨/٢ نسبت به ٦/٥ pH بیشتر بود. در هر دو پایه کمترین میزان پتاسیم در pH ٨/٢ با شوری ٩٠ میلی‌مولار به دست آمد که میزان کاهش این عنصر در پایه نارنج ١٠/٨ درصد و در پایه ولکامریانا ١٠/٩ درصد بود. کمترین میزان پتاسیم (١/٨٨ درصد) در پایه ولکامریانا با pH ٨/٢ و شوری ٩٠ میلی‌مولار به‌دست آمد که کاهش ١١/٣ درصدی نسبت به پایه نارنج با pH ٦/٥ و شوری صفر داشت. در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا افزایش غلظت شوری میزان سدیم را در هر دو سطح pH به‌طور معنی‌داری افزایش داد که این افزایش در پایه ولکامریانا و شوری ٦٠ میلی‌مولار با pH ٨/٢ به بیشترین میزان (٠/٥٤ درصد) رسید که نسبت به بقیه تیمارها افزایش معنی‌داری داشت. کمترین میزان سدیم (٠/١١ درصد) در پایه ولکامریانا با pH ٦/٥ و شوری صفر میلی‌مولار به دست آمد (جدول ٢).

مطابق با نتایج به‌دست آمده از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ٣) فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز در سطح احتمال ١ درصد و میزان پروتئین و فعالیت آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز در سطح احتمال ٥ درصد تحت تأثیر اثرات سه گانه پایه در تنش قلیایی در تنش شوری معنی‌دار شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تأثیر اثرات سه‌گانه پایه در تنش قلیایی در تنش شوری (جدول ٤) قرار گرفت. در پایه نارنج در pH ٦/٥ تنش شوری فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش داد اما این افزایش معنی‌دار نشد و در pH ٨/٢ غلظت ٦٠ و ٩٠ میلی‌مولار سدیم کلراید افزایش معنی-داری در فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به pH ٦/٥ و شوری صفر داشت. در پایه ولکامریانا در pH ٦/٥ افزایش غلظت شوری به ٦٠ و در pH ٨/٢ شوری ٩٠ میلی‌مولار سدیم کلراید موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به pH ٦/٥ و شوری صفر شد. با این حال بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (١٩/١ واحد در میلی‌گرم پروتئین) در پایه ولکامریانا با pH ٦/٥ و شوری ٦٠ میلی‌مولار سدیم‌کلراید به‌دست آمد که

جدول۳. تجزیه واریانس آنزیم‌های اندازه‌گیری شده در دو پایه نارنج و ولکامریانا تحت تنش شوری و قلیایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین	POD	CAT	APX	SOD
پایه	۱	۰/۰۰۰۰۴^{ns}	۲۱/۳^{ns}	۰/۵۴**	۰/۸۳^{ns}	۱۵۴*
تنش قلیایی	۱	۰/۰۱۴**	۱۴۵**	۲/۳۶**	۴۰۴**	۵۵۸۵**
تنش شوری	۳	۰/۰۰۵**	۹۰/۱**	۲/۴۳**	۱۹۳	۱۴۲۰**
پایه*تنش قلیایی	۱	۰/۰۰۰۶**	۱۴/۷^{ns}	۰/۰۰۰۰۷^{ns}	۱۹/۳**	۲۵/۵^{ns}
پایه*تنش شوری	۳	۰/۰۰۰۷**	۳۳/۴*	۰/۵۳**	۱۲/۵**	۱۸۸**
تنش قلیایی*تنش شوری	۳	۰/۰۰۲**	۳۴/۷*	۱/۲۸**	۳۵/۶**	۲۶۰**
پایه*تنش قلیایی* شوری	۳	۰/۰۰۰۱*	۴۸/۹**	۰/۱۸**	۰/۵۷^{ns}	۱۱۳*
خطا	۴۸	۰/۰۰۰۰۴	۹/۸۸	۰/۰۰۹	۰/۳۵	۳۱/۳
cv		۸/۹۲	۲۸/۴	۶/۵۶	۳/۸۴	۵/۵۶

^{ns}: عدم معنی‌داری؛ *: معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد؛ **: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۴. جدول مقایسه میانگین تنش شوری و قلیایی بر روی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در دو پایه نارنج و ولکامریانا

پایه	pH	شوری (میلی‌مولار)	پروتئین	پراکسیداز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	کاتالاز(واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	آسکوربات پراکسیداز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	سوپراکسیداز دیسموتاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)
نارنج	۶/۵	۰	۰/۱۲۷^{a}	۷/۴۳^{de}	۱/۱۹^{ef}	۹/۸۳^{a}	۸۰/۸^{d}
		۳۰	۰/۰۹۲^{b}	۸/۶۹^{cde}	۰/۹۵^{g}	۱۳/۲^{a}	۸۷/۱^{cd}
		۶۰	۰/۰۷۲^{cde}	۸/۷۵^{cde}	۱/۱۰^{efg}	۱۱/۲^{a}	۱۱۰^{b}
		۹۰	۰/۰۷۹^{c}	۹/۰۵^{cde}	۲/۳۴^{a}	۱۵/۷^{a}	۹۰/۳^{c}
	۸/۲	۰	۰/۰۵۵^{ghi}	۱۰/۴^{cde}	۱/۰۸^{efg}	۱۱/۴^{a}	۹۱/۱^{c}
		۳۰	۰/۰۵۱^{hij}	۱۲/۲^{cd}	۱/۷۱^{cd}	۱۹/۲^{a}	۱۲۱^{a}
		۶۰	۰/۰۵۴^{ghi}	۱۳/۷^{bc}	۱/۸۵^{c}	۲۰/۶^{a}	۱۲۳^{a}
		۹۰	۰/۰۶۴^{efg}	۱۳/۳^{bc}	۲/۴۷^{a}	۲۳/۲^{a}	۱۱۲^{b}
ولکامریانا	۶/۵	۰	۰/۱۳۱^{a}	۵/۷۸^{e}	۱/۲۲^{e}	۱۰/۴^{a}	۸۶/۹^{cd}
		۳۰	۰/۱۰۱^{b}	۶/۹۹^{de}	۰/۷۰^{h}	۱۲/۷^{a}	۹۰/۲^{c}
		۶۰	۰/۰۴۳^{j}	۱۹/۱^{a}	۱/۱۷^{ef}	۱۴/۷^{a}	۹۱/۸^{c}
		۹۰	۰/۰۷۶^{cd}	۱۰/۴^{cde}	۱/۷۵^{cd}	۱۵/۶^{a}	۹۲/۰^{c}
	۸/۲	۰	۰/۰۸۰^{c}	۹/۹۹^{cde}	۱/۰۳^{fg}	۱۰/۹^{a}	۹۲/۴^{c}
		۳۰	۰/۰۶۰^{fgh}	۱۰/۸^{cde}	۲/۰۹^{b}	۱۶/۵^{a}	۱۱۰^{b}
		۶۰	۰/۰۴۸^{ij}	۱۱/۸^{cd}	۱/۶۵^{d}	۲۱/۵^{a}	۱۱۷^{ab}
		۹۰	۰/۰۶۸^{def}	۱۷/۹^{ab}	۱/۶۱^{d}	۲۰/۲^{a}	۱۱۰^{b}

برای هر صفت میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک براساس آزمون چند دامنه دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

نسبت به شرایط مشابه در pH ۸/۲ افزایش ٦۱/۰ درصدی داشت. در پایه نارنج در هر دو سطح pH افزایش غلظت شوری در برخی موارد فعالیت آنزیم کاتالاز را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. که این افزایش در بالاترین غلظت شوری در pH ۸/۲ نسبت به pH ٦/٥ ٥/٥٥ درصد بیشتر بود. در پایه ولکامریانا غلظت‌های شوری در اغلب موارد فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش دادند. در pH ٦/٥ تنش شوری در بالاترین غلظت افزایش ٤۳/٤ درصدی در میزان فعالیت این آنزیم نسبت به پایین‌ترین غلظت داشت. از میان همه تیمارها بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز (۲/٤۷ واحد در میلی‌گرم پروتئین) در پایه نارنج با pH ۸/۲ و شوری ۹۰ میلی‌مولار و کمترین فعالیت کاتالاز (۰/۷۰ میلی‌گرم بر گرم پروتئین) در پایه ولکامریانا با pH ٦/٥ و شوری ۳۰ میلی‌مولار به‌دست آمد. افزایش غلظت شوری در هر دو سطح pH فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز را در پایه نارنج افزایش داد که این افزایش در pH ٦/٥ در غلظت ٦۰ و ۹۰ میلی‌مولار سدیم کلراید و در pH ۸/۲ در همه غلظت‌های شوری نسبت به شاهد معنی‌دار شد. در پایه ولکامریانا در pH ٦/٥ افزایش شدت شوری فعالیت آنزیم سوپر اکسیداز دیسموتاز را افزایش داد که این افزایش معنی‌دار نشد اما در pH ۸/۲ همه غلظت‌های شوری فعالیت این آنزیم را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند. در بین همه تیمارها پایه نارنج در pH ۸/۲ و شوری ٦۰ میلی مولار سدیم کلراید دارای بیشترین فعالیت آنزیم (۱۲۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و در pH ٦/٥ و شوری صفر میلی‌مولار سدیم کلراید دارای کمترین فعالیت آنزیم (۸۰/۸ واحد بر میلی‌گرم پروتئین) بود. میزان افزایش فعالیت این آنزیم در پایه نارنج ٥۲/۷ درصد و در پایه ولکامریانا ۳٤/٦ درصد بود (جدول ٤).

بحث

مطابق با نتایج به‌دست آمده مقدار MDA و H_2O_2 در شرایط تنش قلیایی و شوری افزایش یافت. به‌طوری‌که با افزایش غلظت شوری و سطح pH این افزایش تشدید شد و در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا در pH ۸/۲ و شوری ۹۰ میلی‌مولار به بالاترین حد رسید. که این افزایش در پایه ولکامریانا نسبت به نارنج بیشتر بود. MDA محصول تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع است که تحت شرایط تنش به‌دلیل افزایش تولید ROSها افزایش می‌یابد. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج حاصل از مطالعات دانایی‌فر و همکاران (۷) مطابقت دارد که گزارش کردند شرایط تنش موجب کاهش یکپارچی غشاء و افزایش نشت الکترولیت می‌شود همچنین شرایط تنش موجب کاهش میزان فتوسنتز و افزایش تولید ROS می‌گردد که منجر به افزایش MDAدر گیاهان می‌شود. تحت شرایط تنش، غشای سلولی آسیب می‌بیند و مقدار MDA به‌دلیل تغییرات در ROS افزایش می‌یابد (۳٥). MDA محصول تجزیه اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاها است و برای ارزیابی شدت آسیب اکسیداتیو استفاده می‌شود (۳۹). محتوای MDA نشان دهنده میزان آسیب اکسیداتیو در غشای سلولی است که در شرایط تنش افزایش یافته است. این افزایش با پراکسیداسیون لیپیدی و اختلال در یکپارچگی غشای سلولی مرتبط است (۱۲). نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تنش قلیایی و شوری موجب افزایش میزان فنول و DPPH در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا شد که میزان فنول در پایه نارنج در غلظت ٦۰ میلی‌مولار و در پایه ولکامریانا در غلظت ۹۰ میلی‌مولار شوری به بیشترین میزان رسید. فنول از جمله ترکیبات ثانویه است که تحت شرایط تنش افزایش پیدا می‌کند و موجب کاهش ROSها و درنتیجه مقاومت به شرایط تنش می‌شود. این افزایش مربوط به ساختار ژنتیکی و محیط رشد گیاه است که می‌تواند تحت شرایط تنش در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی شرکت کند. همچنین این ترکیبات با دادن الکترون به آنزیم پراکسیداز باعث کاهش میزان H_2O_2 می‌شوند و درنتیجه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند (۳۰). این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعات رضازاده و همکاران (۲۹) همخوانی دارد که افزایش ترکیبات فنولی تحت تنش شوری را برای کاهش تنش اکسیداتیو گزارش کردند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی در جلوگیری از اثرات رادیکال‌های آزاد از ترکیبات مؤثر در مقاومت به تنش است. افزایش ترکیبات فنلی در گیاهان، یک واکنش رایج به شرایطی بوده که فتوسنتز به‌دلیل محدودیت‌های محیطی مختل

شده است. تولید ترکیبات فنلی یکی از استراتژی‌هایی است که توسط برخی از گونه‌های گیاهی در شرایط نامساعد محیطی برای جلوگیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش استفاده می‌شود و همچنین این ترکیبات قادر به تعدیل برخی از عملکردهای آنزیمی کلیدی در سلول‌ها هستند (۳۷).

بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر اعمال تیمارها قرار گرفت به‌طوری‌که تنش شوری و قلیایی موجب افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسیداز دیسموتاز در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا شد. این افزایش در فعالیت آنزیم‌ها ارتباط مستقیمی با شدت تنش شوری و قلیایی در پایه نارنج و ولکامریانا داشت و هر چقدر غلظت سدیم کلرید در هر دو سطح pH افزایش یابد فعالیت آنزیم‌ها با شدت بیشتری افزایش یافت که این افزایش در pH ۸/۲ نسبت به pH ٦/٥ بیشتر بود و این افزایش در پایه نارنج نسبت به ولکامریانا بیشتر بود. در شرایط تنش ROSها تولید می‌شوند که به‌دلیل اثرات مخربی که بر اجزای درون سلولی و متابولیسم گیاه دارند، برای رشد گیاه مضر هستند و منجر به آسیب اکسیداتیو به سلول‌ها می‌شوند و در نهایت باعث تخریب لیپیدهای غشا و افزایش نشت املاح از غشاء می‌شود (۱۳). تنش باعث عدم تعادل در ROSها می‌شود که به‌دلیل اختلال در زنجیره انتقال الکترون در طول توقف نور یا کاهش پتانسیل آب است. ROSها با تنش شوری به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابند. سطوح بالاتر ROS برای سلول‌ها سمی است و درصورت عدم کنترل منجر به آسیب سلولی و مرگ می‌شوند. علاوه بر این، ROSها به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی عمل می‌کنند که ممکن است رونویسی، پروتئین‌ها و متابولیت‌ها را تغییر دهند تا برخی مکانیسم‌های خاص را فعال کنند. مشخص است که مقدار ROS توسط فعالیت آنزیم‌ها تنظیم می‌شود. در طول تنش، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش می‌یابد (۳۵). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توانند در شرایط تنش شور و قلیایی افزایش می‌یابد و ROSها را کاهش می‌دهد و گیاه را متعادل کنند (۳۹). پروتئین‌ها و لیپیدها فراوان‌ترین اجزای غشا هستند. آنها در مقاومت سلول‌های گیاهی در برابر تنش‌های محیطی نقش دارند. نشت الکترولیت با افزایش سطح تنش افزایش می‌یابد و نشان می‌دهد که تنش منجر به اختلال در نفوذپذیری و پایداری غشای سلولی و همچنین پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود. تنش‌های غیرزیستی منجر به اختلال در رابطه بین لیپیدهای غشا و پروتئین می‌شود که باعث کاهش فعالیت آنزیمی می‌شوند (٤٠). علاوه بر این، تولید ROSها شامل اکسیژن منفرد، سوپراکسید، پراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل باعث تنش اکسیداتیو می‌شوند. پس از تولید ROS، سلول‌های گیاهی باید یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی از جمله آنتی‌اکسیدان آنزیمی را فعال کنند تا ROS را مهار کنند. بنابراین مکانیسم‌هایی که باعث کاهش ROS و افزایش سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌شوند، نقش مهمی در تحمل گیاه به تنش‌های محیطی دارند (۱۳). شرایط تنش فعالیت آنزیم POD را افزایش می‌دهد تا از اثرات سمی ROS و اکسیداسیون لیپید و پروتئین جلوگیری کند (۲ و ۲۵). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش دارند. تغییرات در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یک سیستم دفاعی در برابر تنش‌های غیرزیستی است (۱۲). یک همبستگی مثبت بین فعالیت CAT و شدت تنش شوری وجود دارد، که نشان می‌دهد که افزایش فعالیت آنزیم متناسب با غلظت NaCl است (۲۸). با این وجود، تولید طولانی مدت ROS تحت تنش ممکن است از ظرفیت دفاعی آنتی اکسیدانی فراتر رود و منجر به آسیب اکسیداتیو به نهال‌ها شود (٤١). در همین راستا، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند APX تحت تنش شوری توسط ژانگ و همکاران (٤١) گزارش شد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش شور و قلیایی، ROS را کاهش می‌دهند و تعادل را در گیاه ایجاد می‌کنند (۳۹). فعالیت SOD تحت شرایط تنش افزایش پیدا کرد. فعالیت SOD تحت شرایط تنش به‌دلیل نقش آن در تحمل به شوری افزایش یافت که تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به H_2O_2 را افزایش داد (۳۲). تنش به‌دلیل اختلال در زنجیره انتقال الکترون در طول توقف نور یا

کاهش پتانسیل آب، باعث عدم ROS می‌شود. ROS با تنش شوری به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابند. سطوح بالاتر ROS برای سلول‌ها سمی است و منجر به آسیب سلولی و مرگ می‌شوند. علاوه بر این، ROSها به‌عنوان یک مولکول سیگنالی عمل می‌کند که ممکن است رونویسی را تغییر دهند. به‌خوبی مشخص شده است که مقدار ROS با افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تنظیم می‌شوند (۳۵). نتایج مطالعه حاضر در مورد تأثیر تنش‌های محیطی بر فعالیت آنزیم با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. تنش‌های غیرزیستی بر پارامترهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مختلف گیاهان تأثیر معنی‌داری دارند. درنتیجه این تنش‌ها، فتوسنتز، زنجیره انتقال الکترون و مسیرهای کاهش کربن در درجه اول تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۱۸ و ۱۹) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم را مهار می‌کنند (۱۱).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که افزایش شدت تنش شوری و قلیایی میزان پراکسید هیدروژن، مالون‌دی‌آلدهید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسیداز دیسموتاز را به‌طور معنی‌داری در هر دو پایه نارنج و ولکامریانا افزایش داد اما میزان فنول در پایه نارنج افزایش و در پایه ولکامریانا در اغلب موارد کاهش یافت. بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدهید، پراکسید هیدروژن و پراکسیداز در پایه ولکامریانا مشاهده شد و بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیداز دیسموتاز در پایه نارنج به‌دست آمد. به‌طور کلی نتایج نشان داد پایه نارنج با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحمل بیشتری نسبت به پایه ولکامریانا در شرایط تنش شوری و قلیایی داشت.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به عمل می‌آورند.

منابع

1. Alvarez-Gerding, X., R. Cortés-Bullemore, C. Medina, J. L. Romero-Romero, C. Inostroza-Blancheteau, F. Aquea and P. Arce-Johnson. 2015. Improved salinity tolerance in carrizo citrange rootstock through overexpression of glyoxalase system genes. *BioMed Research International* 2015: 1-7.
2. Apel, K. and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
3. Beers, R. F. and I. W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry* 195: 133-140.
4. Boukari, N., N. Jelali, J. B. Renaud, R. B. Youssef, C. Abdelly and A. Hannoufa. 2019. Salicylic acid seed priming improves tolerance to salinity, iron deficiency and their combined effect in two ecotypes of Alfalfa. *Environmental and Experimental Botany* 167: 1-12.
5. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
6. Cimen, B. and T. Yesiloglu. 2016. Rootstock breeding for abiotic stress tolerance in citrus. In abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives. *IntechOpen* 23: 527-562.
7. Danaeifar, A., E. Khaleghi, S. Zivdar and K. Mehdikhanlou. 2023. Physiological, biochemical, and gene expression of Sour Orange (*Citrus aurantium* L.) to Iron (II)-Arginine Chelate under salinity, alkalinity, and salt–alkali combined stresses. *Scientia Horticulturae* 319: 112146.
8. Danaeifar, A., E. Khaleghi, S. Zivdar and K. Mehdikhanlou. 2024. Effects of NaCl and alkaline pH stress on some morphophysiological and biochemical parameters of two citrus rootstocks. *Journal of Agricultural Science and Technology* 36: 371-385.

9. Dhindsa, R. S., A. Plumb-Dhindsa and T. A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botan.* 32: 93-101.
10. El-Dengawy, E. F., S. M., Elkadi and M. H. El-gobba. 2015 Effect of biofertilization and salicyilic acid on the morphological characteristics of citrus-rootstock (*Citrus aurantium*) under salinity stress. *Journal of Agriculture Science* 10: 1-13.
11. Fang, S., X. Hou and X. Liang. 2021. Response mechanisms of plants under saline-alkali stress. *Plant Science* 12: 1-20.
12. Ghasemi, S., A. H. Khoshgoftarmanesh, M. Afyuni and H. Hadadzadeh. 2014. Iron (II)–amino acid chelates alleviate salt-stress induced oxidative damages on tomato grown in nutrient solution culture. *Scientia Horticulture* 165: 91-98.
13. Hassan, F. and E. Ali. 2014. Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme activity and some other physiological parameters in jojoba [*'Simmondsia chinensis*'(link) schneider] plant. *Australian Journal of Crop Science* 8: 1615-1624.
14. Heath, R. L. and L. Parker. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
15. Hemeda, H. M. and B. P. Klein. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Journal of Food Science* 55: 184-185.
16. Ibrahim, D. S., A. M. Eissa, A. Z. M. Attala, S. M. Sabbah and H. A. Khalil. 2018. Alleviation of salinity stress by exogenous plant growth regulators in three citrus rootstocks. *Journal Agriculture Research* 7: 437-455.
17. Incesu, M., T. Yesilo, B. Cimen and B. Yilmaz. 2015. Influences of different iron levels on plant growth and photosynthesis of *W. Murcott* mandarin grafted on two rootstocks under high pH conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39: 838-844.
18. Khalid, M. F., S. Hussain, M. A. Anjum, S. Ahmad, M. A. Ali, S. Ejaz and R. Morillon. R. 2020. Better salinity tolerance in tetraploid vs diploid volkamer lemon seedlings is associated with robust antioxidant and osmotic adjustment mechanisms. *Journal of Plant Physiology* 244: 1-37.
19. Khalid, M. F., R. Morillon, M. A. Anjum, S. Ejaz, M. J. Rao, S. Ahmad and S. Hussain. 2022. Volkamer lemon tetraploid rootstock transmits the salt tolerance when grafted with diploid kinnow mandarin by strong antioxidant defense mechanism and efficient osmotic adjustment. *Journal of Plant Growth Regulation* 41: 1125-1137.
20. Khoshbakht, D., M. R. Asghari and M. Haghighi. 2018. Effects of foliar applications of nitric oxide and spermidine on chlorophyll fluorescence, photosynthesis and antioxidant enzyme activities of citrus seedlings under salinity stress. *Photosynthetica* 56: 1313-1325.
21. Liu, Y., E. Heying and S. A. Tanumihardjo. 2012. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 530-545.
22. Loreto, F. and V. Velikova. 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127: 1781-1787.
23. Maldonado-Torres, R., M. E. Alvarez-Sánchez and J. D. Etchevers. 2013. Adaptation strategies of Mexican lemon rootstock in response to iron deficiency. *Terra Latinoamericana* 31: 23-34.
24. Martínez-Cuenca, M. R., A. Primo-Capella and M. A. Forner-Giner. 2017. Tolerance response mechanisms to iron deficiency stress in citrus plants. In stress signaling in plants: *Genomics and Proteomics Perspective* 2: 201-239.
25. M'barek, B. N., A. Raoudha and B. K. Leila. 2007. Relationship between peroxidase activity and salt tolerance during barley seed germination. *Journal of Agronomy* 6: 433-438.
26. McDonald, S., P. D. Prenzler, M. Antolovich and K. Robards. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* 73: 73-84.
27. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
28. Naliwajski, M. and M. Skłodowska. 2021. The relationship between the antioxidant system and proline metabolism in the leaves of cucumber plants acclimated to salt stress. *Cells* 10: 2-15.
29. Rezazadeh, A., A. Ghasemnezhad, M. Barani and T. Telmadarrehei. 2012. Effect of salinity on phenolic composition and antioxidant activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. *Journal of Medicinal Plant Research* 6: 245-252.
30. Sakihama, Y., M. F. Cohen, S. C. Grace and H. Yamasaki. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67-80.
31. Salwa, E. 2018. In vitro evaluation. and selection for salinity tolerance in some citrus rootstock seedlings. *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants* 10: 17-27.
32. Sarker, U. and S. Oba. 2020. The response of salinity stress-induced A. tricolor to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. *Frontiers in Plant Science* 11: 1-14.

33. Shafieizargar, A., Y. Awang, F. Ajamgard, A. S. Juraimi, R. Othman and A. K. Ahmadi. 2015. Assessing five citrus rootstocks for NaCl salinity tolerance using mineral concentrations, proline and relative water contents as indicators. *Asian Journal of Plant Sciences* 14: 20-26.
34. Shahid, M. A., R. M. Balal, N. Khan, S. Simón-Grao, M. Alfosea-Simón, J. M. Cámara-Zapata and F. Garcia-Sanchez. 2019. Rootstocks influence the salt tolerance of Kinnow mandarin trees by altering the antioxidant defense system, osmolyte concentration, and toxic ion accumulation. *Scientia Horticulturae* 250: 1-11.
35. Soltabayeva, A., A. Ongaltay, J. O. Omondi and S. Srivastava. 2021. Morphological, physiological and molecular markers for salt-stressed plants. *Plants* 10: 1-18.
36. Sun, T., Z. Xu, C. T. Wu, M. Janes and W. N. H. Prinyawiwatkul. 2007. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers *(Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science* 72: 98-102.
37. Talbi, S., J. A. Rojas, M. Sahrawy, M. Rodríguez-Serrano, K. E. Cárdenas, M. Debouba and L. M. Sandalio. 2020. Effect of drought on growth, photosynthesis and total antioxidant capacity of the saharan plant *Oudeneya africana*. *Environmental and Experimental Botany* 176, 104099.
38. Yao, L. X., Y. R. He, H. F. Fan, L. Z. Xu, T. G. Lei, X. P. Zou and S. C. Chen. 2017. Identification and expression analysis of multiple ferric chelate reductases in *Citrus junos*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 142: 419-424.
39. Ye, L., X. Zhao, E. Bao, K. Cao and Z. Zou. 2019. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on watermelon growth, elemental uptake, antioxidant, and photosystem II activities and stress-response gene expressions under salinity-alkalinity stresses. *Frontiers in Plant Science* 10: 1-12.
40. Zarei, M. and Z. Paymaneh. 2014. Effect of salinity and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and some physiological parameters of *Citrus jambheri*. *Archives of Agronomy and Soil Science* 60: 993-1004.
41. Zhang, M., Y. Fang, Y. Ji, Z. Jiang and L. Wang. 2013. Effects of salt stress on ion content, antioxidant enzymes and protein profile in different tissues of *Broussonetia papyrifera*. *South African Journal of Botany* 85: 1-9.
42. Zhang, H., X. L. Liu, R. X. Zhang, H. Y. Yuan, M. M. Wang, H. Y. Yang and Z. Liang. 2017. Root damage under alkaline stress is associated with reactive oxygen species accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science* 8: 1-12.