

اثر سالیسیلیک اسید بر تحمل تنش یخ‌زدگی دان نهال‌های لیمو آب شیراز^۱ (*Citrus aurantifolia* L.) EFFECT OF SALICYLIC ACID ON FREEZING TOLERANCE OF MEXICAN LIME SEEDLINGS (*CITRUS AURANTIFOLIA* L.)

محمد رضا باغبانها، رضا فتوحی قزوینی، عبدالله حاتم زاده و مختار حیدری^۲

چکیده

لیمو آب^۳ یکی از حساس‌ترین گونه‌های مرکبات در برابر یخبندان است. در این پژوهش به منظور بررسی تاثیر سالیسیلیک اسید در افزایش تحمل به یخبندان، دان‌نهال‌های لیمو آب در مرحله ۷-۹ برگی در دو نوبت صبح و عصر با محلول صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید به مدت سه روز در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد محلول پاشی شدند. پس از تیمار سالیسیلیک اسید، دان‌نهال‌ها با دماهای ۲-، ۴-، ۶- و ۸- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت رو به رو شدند. تغییرهای میزان کلروفیل، قندهای محلول، میزان نشت الکترولیت‌ها، پرولین و فلورسانس کلروفیل، به عنوان معیارهای ارزیابی یخ‌زدگی در دان‌نهال‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در اثر تنش یخ‌زدگی، میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش و میزان کلروفیل، کارایی فتوشیمیایی^۴ (Fv/Fm) و سرعت انتقال الکترون^۵ (ETR) کاهش معنی‌داری یافت. در بین تیمارهای سالیسیلیک اسید، کاربرد غلظت ۰/۵ میلی مولار توانست به‌طور موثر میزان قندهای محلول را افزایش و میزان نشت الکترولیت‌ها را کاهش دهد و غلظت ۱ میلی مولار باعث افزایش معنی‌دار شاخص‌های Fv/Fm و ETR گردید. کاربرد سالیسیلیک اسید در افزایش میزان کلروفیل و پرولین معنی‌دار نشد. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید می‌تواند تحمل دان‌نهال‌های لیمو آب را دستکم تا ۲ درجه سانتی‌گراد به یخبندان افزایش دهد. **واژه‌های کلیدی:** تحمل یخ‌زدگی، تنش، سالیسیلیک اسید، لیمو آب.

مقدمه

رخداد یخبندان هر چند سال یکبار در ایران و بسیاری از کشورهای مرکبات خیز، آسیب‌های سنگین به باغ‌های مرکبات وارد می‌کند. در ایجاد تحمل یخبندان عوامل زیادی تاثیر دارند که برخی از آن‌ها ژنتیکی و بعضی جنبه فیزیولوژیک دارند (۲). شاخص‌های مهمی از قبیل میزان نشت الکترولیت‌ها، اختلال در تولید کلروفیل، کاهش میزان فلورسانس کلروفیل و میزان کربوهیدرات‌ها در بررسی میزان حساسیت یا مقاومت به تنش یخ‌زدگی مورد بررسی قرار می‌گیرند (۱، ۴).

تاریخ پذیرش: ۸۶/۸/۲

۱- تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۵

۲- به ترتیب دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، رشت و استادیار علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، اهواز. جمهوری اسلامی ایران.

۳- *Citrus aurantifolia* L. ۴- Photochemical efficiency ۵- Electron transfer rate

گزارش شده است سالیسیلیک اسید که یک ترکیب فنلی است به طور طبیعی در گیاهان تولید می‌شود (۲۵). مطالعات متعددی نقش سالیسیلیک اسید را به عنوان یک ملکول پیام رسان مهم در پاسخ‌های گیاه به تنش‌های متعدد زیستی و غیر زیستی را تایید کرده است (۱۲، ۲۲). ایجاد تحمل انواع تنش در گیاهان از راه تیمار با سالیسیلیک اسید و مشتقات آن در کشاورزی، باغبانی و جنگلداری امکان‌پذیر می‌باشد (۲۷). نتایج تعدادی از پژوهش‌ها نشان داده است که سالیسیلیک اسید در برابر آسیب‌های سرمای در گیاهان مختلف از جمله ذرت (۱۷)، موز (۱۸)، لوبیا و گوجه‌فرنگی (۲۷) نقش حفاظتی دارد. جاندا و همکاران^۱ (۱۷) گزارش کرده‌اند که افزودن سالیسیلیک اسید به محلول رشد آبکشت نهال‌های ذرت، با تحریک تولید عوامل آنتی‌اکسیدان، باعث افزایش تحمل به سرما گردیده است. همچنین گزارش شده است که کاربرد استیل سالیسیلیک اسید (آسپیرین) و سالیسیلیک اسید می‌تواند تحمل به تنش‌های گرمایی، سرمای و خشکی را در لوبیا و گوجه‌فرنگی تحریک نماید (۲۷). تنش‌های سرما و یخ‌زدگی سبب اختلال در تولید کلروفیل می‌شوند و به کلروپلاست آسیب وارد می‌کنند. با کاهش دما کل فرآیند کلروفیل سازی متوقف می‌شود. چون تولید کلروفیل یکی از فرآیندهای حساس وابسته به دما می‌باشد، با اندازه‌گیری آن در غربالگری ارقام و گونه‌ها از نظر حساسیت یا مقاومت به سرما و یخ‌زدگی استفاده می‌شود (۴). بروز تحمل به تنش با تغییر در مواد اسمز زای درون یاخته همراه است که تیمار با سالیسیلیک اسید با تحریک هیدرولیز قندهای نامحلول یا پروتئین‌ها نقش تنظیم‌اسمزی را برای یاخته ایفا می‌نماید (۳). تشدید تنش سرما و یخ‌زدگی می‌تواند اختلال در غشاهای یاخته‌ای و به دنبال آن نشت یون‌های مختلفی مانند پتاسیم و موادی چون اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها از یاخته را به دنبال داشته باشد (۱، ۴). از طرفی گزارش شده تجمع ملکول‌های با وزن ملکولی پایین مانند سوکروز و پرولین به تثبیت غشا اندامک‌ها در برابر پسابیدگی^۲ ناشی از یخ‌زدگی کمک می‌کنند (۳۱). نسبت Fv/Fm فلورسانس کلروفیل که نشان دهنده بازده فوتوسنتز است در شرایط تنش سرمای و یخبندان تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۸). ETR بیان‌کننده سرعت انتقال الکترون در سیستم نوری II است (۱۴). در گیاهان حساس به تنش کاهش دما، مقادیر این دو شاخص کاهش یافته است (۵). هدف از این پژوهش بررسی تاثیر مصرف غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید در چگونگی واکنش دان‌نهال‌های لیمو آب نسبت به تنش یخ‌زدگی است که با ارزیابی تغییر میزان کلروفیل، قندهای محلول، نشت الکترولیت‌ها، پرولین و فلورسانس کلروفیل در دماهای مختلف انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این آزمایش در گلخانه آموزشی - پژوهشی و آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. با تهیه مقدار کافی میوه لیمو آب شیراز از بازار تره بار رشت، مراحل استخراج بذرها از میوه‌ها صورت گرفت. پس از گندزدایی بذور توسط محلول وایتکس ۱۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه، کاشت بذرها داخل سینی‌های نشاء و در بستر آمیخته ماسه و ورمی‌کولایت (نسبت حجمی ۲ : ۱) که از پیش گندزدایی شده بودند صورت گرفت. پس از تندش بذرها، تعداد ۵ دان‌نهال یکنواخت (۳-۲ برگی) در هر گلدان کاشته شد. یک هفته پس از انتقال دان‌نهال‌ها و اطمینان از استقرار آن‌ها، تعداد دان‌نهال‌ها به سه عدد در هر گلدان کاهش یافت و تغذیه با محلول

نیم غلظت^۱ اپستین^۲ (۱۳) آغاز گردید. در ماه اول محلول نیم غلظت مصرف شد و از ماه دوم تغذیه به وسیله محلول کامل ادامه یافت. از زمان کاشت دان نهال‌ها در گلدان به مدت ۳ ماه (رسیدن دان نهال‌ها به مرحله ۷-۹ برگی)، تغذیه و آبیاری گلدان‌ها به صورت یکنواخت صورت گرفت. به علت کمبود نور در منطقه آزمایش، تکمیل نور لازم برای رشد گیاهان با لامپ‌های ۴۰ وات فلورسنت و ۲۰۰ وات تنگستن تامین شد. کمترین دما در شب و بیشترین دما در روز به ترتیب ۱۷ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد بود و میزان شدت نور با کمک نور مصنوعی روی ۲۰۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه^۳ تنظیم شد.

تیمارهای سالیسیلیک اسید و سرما

تیمار سالیسیلیک اسید (C₇H₆O₃) با وزن ملکولی ۱۳۸/۱ گرم، ساخت کارخانه مرک^۴ آلمان) شامل غلظت‌های صفر، ۱/۵، ۲ و ۵ میلی مولار بود. برای تهیه محلول‌ها، سالیسیلیک اسید در آب مقطر حل شد و سپس pH محلول توسط KOH یک نرمال روی ۵/۵ ± ۰/۲ تنظیم گردید. در طی سه روز سازگاری دان نهال‌ها به سرما در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، محلول پاشی دان نهال‌ها با سالیسیلیک اسید در غلظت‌های تعیین شده انجام شد. محلول پاشی دو بار (۸ صبح و ۲ بعد از ظهر) در مجموع ۶ بار تا زمان آبیچک^۵ صورت گرفت. همچنین برای اطمینان از اثر گذاری سالیسیلیک اسید در روز اول و آخر دوره سازگاری، به‌بستر هر گلدان میزان ۲۰ میلی لیتر از هر تیمار افزوده شد.

برای تیمار تنش یخ‌زدگی از انکوباتور مدل کاتو^۶ با قابلیت تنظیم دما و زمان در دوره‌های متناوب استفاده گردید. گلدان‌ها درون انکوباتور قرار داده شد و دستگاه برای دوره‌های سرمایی برنامه ریزی شد. تیمارهای سرمایی شامل ۲-، ۴-، ۶- و ۸- درجه سانتی‌گراد بود که دان نهال‌های پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید در دمای تعیین شده به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شدند. دمای دستگاه در ۷ ساعت از دمای آزمایشگاه به ۱۰ درجه سانتی‌گراد رسید و برای ۷۲ ساعت در این دما نگهداری شد. سپس در مدت ۶ ساعت دما از ۱۰ درجه سانتی‌گراد به ۲- درجه سانتی‌گراد رسید. مدت نگهداری دان نهال‌ها در هر تیمار سرمایی ۱۲ ساعت بود و کاهش دما از هر تیمار روی یک ساعت تنظیم شد. نمونه‌ها پس از هر تیمار و تحمل دماهای پیشین از انکوباتور خارج شده و به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور دیگری با دمای ۲ درجه سانتی‌گراد و شرایط روشنایی قرار گرفت. سپس دان نهال‌ها به دمای آزمایشگاه منتقل شده و نمونه برداری‌ها برای اندازه‌گیری ویژگی‌های مورد نظر آغاز شد.

اندازه‌گیری شاخص‌ها

میزان کلروفیل برگ گیاهان تحت تیمار در دو مرحله پیش و پس از سرمادهی اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری کلروفیل توسط دستگاه کلروفیل سنج (مدل مینولتا^۷ SPAD-502) انجام شد، همچنین، پس از سرمادهی تعداد ۱۵ نمونه برگ از گلدان‌های مختلف به صورت تصادفی نمونه‌گیری شد و کلروفیل این نمونه‌ها توسط حلال دی متیل فورمامید^۸ استخراج شده و میزان جذب نور در دو طول موج ۶۴۷ (A₆₄₇) و ۶۶۴/۵ (A_{664.5})

۱- Half strength -۲ Epstein -۳ μmol. m⁻² s⁻¹ -۴ Merck -۵ Run off -۶ Test Chamber-Kato

۷- Minolta -۸ N,N-Dimethylformamide

نانومتر خوانده شد. سپس میزان کل کلروفیل با استفاده از روش اینسکیپ و بلوم^۱ و رابطه $8/0.8 \times A_{664.5}$ + $17/9 \times A_{647}$ (میزان کلروفیل کل (mg l⁻¹)) محاسبه گردید (۱۶).

بعد از محاسبه میزان کلروفیل ۱۵ نمونه موردنظر با استفاده از اعداد به دست آمده از آن و مقادیر خوانده شده کلروفیل همان ۱۵ نمونه توسط دستگاه کلروفیل سنج، رگرسیون گرفته شده و نمودار استاندارد خطی ترسیم گردید. سپس با استفاده از این نمودار، میزان کلروفیل تمامی نمونه‌ها (پیش و پس از تیمار سرما)، توسط نرم افزار اکسل تخمین زده شد. میزان کلروفیل تمامی نمونه‌ها به میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه^۲ تبدیل گردید.

برای اندازه گیری کربوهیدرات‌ها تهیه عصاره از نمونه‌ها طبق روش مارتینز و همکاران^۳ (۲۳). با اندکی تغییر صورت گرفت، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم وزن تر برگ از هر تکرار داخل لوله آزمایش قرار داده شد و مقدار ۵ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ گرم به آن افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. با تکرار همین مراحل، حجم نهایی توسط اتانول ۸۰٪ به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. از این عصاره برای اندازه‌گیری میزان قندهای محلول استفاده شد. در این آزمایش اندازه‌گیری میزان قندهای محلول بر اساس روش دوبویس و همکاران^۴ (۱۱) انجام شد. تعیین میزان نشت الکترولیت‌ها^۵ در برگ بر اساس روش لاتس و همکاران^۶ (۲۱) و میزان پرولین نمونه‌ها با روش بیتز و همکاران^۷ (۷) اندازه‌گیری شد. میزان فلورسانس کلروفیل تمام نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلورسانس متر^۸ (مدل PAM-2000) به دست آمد. در مرحله روشنایی سرعت انتقال الکترون (ETR) و در مرحله تاریکی میزان بازده فتوشیمیایی فتوسنتز (Fv/Fm) محاسبه شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با دو فاکتور که فاکتور اول شامل تیمار سالیسیلیک اسید (غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی مولار) و فاکتور دوم شامل تیمار یخ‌زدگی (شامل دماهای ۲-، ۴-، ۶- و ۸- درجه سانتی‌گراد) با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTATC و ازون LSD در سطح ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

میزان کلروفیل

بر اساس جدول تجزیه واریانس کاربرد تمامی تیمارهای سالیسیلیک اسید تأثیری در میزان کلروفیل برگ نداشت، ولی اثر سرما و برهمکنش سالیسیلیک اسید با سرما بر میزان کلروفیل معنی دار بود. با کاهش دما میزان کلروفیل کاهش یافت به طوری که بیشترین میزان کلروفیل در سطح اول سرما (۲- درجه سانتی‌گراد) و به میزان ۱/۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود (جدول ۱). با مقایسه برهمکنش سالیسیلیک اسید و سرما بر میزان کلروفیل پس از تیمار سرما (شکل ۱)، دیده شد که بیشترین میزان کلروفیل در غلظت‌های صفر و ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد وجود داشت. مقایسه میانگین‌های میزان کلروفیل در مراحل پیش و پس از سرما نشان داد که در تمام موارد میزان کلروفیل پس از سرمادهی کاهش یافت، یعنی به عبارت دیگر سرما باعث کاهش کلروفیل شده است (جدول ۲).

۱- Inskeep and Bloom -۲ mg g⁻¹FW -۲ Martinez et al. -۳ Dubois et al. -۴ (EL) Electrolyte leakage -۵
۶- Lutts et al. -۷ Bates et al. -۸ Portable chlorophyll Fluorometer PAM-2000

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های میزان کلروفیل، قندهای محلول، نشت الکترولیت‌ها، Fv/Fm و ETR در تیمارهای یخزدگی.
Table 1. Mean comparisons of chlorophyll content, soluble sugars, EL, Fv/Fm and ETR in freezing treatments.

سرعت انتقال الکترون ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	کارایی فتوشیمیایی Fv/Fm	نشت الکترولیت‌ها (درصد) EL (%)	قندهای محلول Soluble sugars ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$)	کلروفیل chlorophyll ($\text{mg. g}^{-1}\text{FW}$)	دما های یخزدگی (درجه سانتیگراد) Freezing temperature ($^{\circ}\text{C}$)
2.71 a	0.560 a	39.36 b	3.98 ab	1.23 a [†]	-2
0.30 b	0.002 b	91.48 a	3.50 b	0.88 b	-4
0.05 b	0.002 b	92.98 a	4.43 a	0.84 b	-6
0.00 b	0.002 b	92.37 a	4.02 ab	0.84 b	-8

[†] Mean in each column followed by similar letters are not significantly different at 5% level using LSD.

[†] در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک، بدون تفاوت آماری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشند.

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان کلروفیل و قندهای محلول ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$) قبل و بعد از سرما در گیاه لیمو آب.
Table 2. Mean comparison of chlorophyll content and soluble sugars ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}^{-1}$) before and after freezing in lime plant.

قندهای محلول Soluble sugars		میزان کلروفیل Chlorophyll content		تیمار سالیسیلیک اسید (میلی مولار) Salicylic acid treatments (mM)
Ac	Bc	Ac [†]	Bc [†]	
2.02 a	2.13 a	0.94 b	1.39 a ^{††}	0
0.11 ns		0.45**		Bc-Ac
5.46 a	4.20 b	0.93 b	1.39 a	0.5
-1.26**		0.46**		Bc-Ac
3.28 a	1.39 b	0.98 b	1.35 a	1
-1.89*		0.37**		Bc-Ac
5.18 a	1.34 b	0.94 b	1.35 a	2
-3.84*		0.41**		Bc-Ac

[†] Before freezing (BC) and After freezing (AC).

^{††} Means in each column followed by similar letters are not significantly different at 5% level using LSD.

* and **: Significant different at 5% and 1% level, respectively.

[†] میانگین کلروفیل یا قندهای محلول پیش از سرما و Ac میانگین کلروفیل یا قندهای محلول پس از سرما. * و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱٪.

^{††} در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک، بدون تفاوت آماری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشند.

در شرایط تنش یخبندان، اختلال در تولید کلروفیل و آسیب‌های وارده بر کنش کلروپلاست ناشی از دمای پایین است که با کاهش دما، کل فرآیند کلروفیل سازی متوقف می‌شود (۴). در این آزمایش نیز با کاهش دما به علت کاهش ساخت یا افزایش تخریب کلروفیل، میزان کلروفیل کاهش یافت. ساخت کلروفیل یکی از فرآیندهای حساس وابسته به دما محسوب می‌شود و به همین جهت برای غربال سازی ارقام و گونه‌ها در رابطه با حساسیت یا مقاومت به سرما استفاده می‌شود (۳). در رویارویی با تنش‌های دیگر مثل خشکی و شوری کاربرد سالیسیلیک اسید توانسته است در حفظ کلروفیل مؤثر باشد و سرعت فتوسنتز را افزایش دهد (۱۲، ۲۹) و یا خسارت به کلروفیل a و کارتنوئیدها را کاهش دهد (۳۰). در حالی که در این بررسی در گیاه لیمو و در شرایط یخبندان سالیسیلیک اسید نتوانست میزان کلروفیل را حفظ نماید. به‌طور مشابه گزارش شده که در تنش اکسیداسیونی دانه‌های جو، سالیسیلیک اسید باعث کاهش سطح کلروفیل گردید (۶).

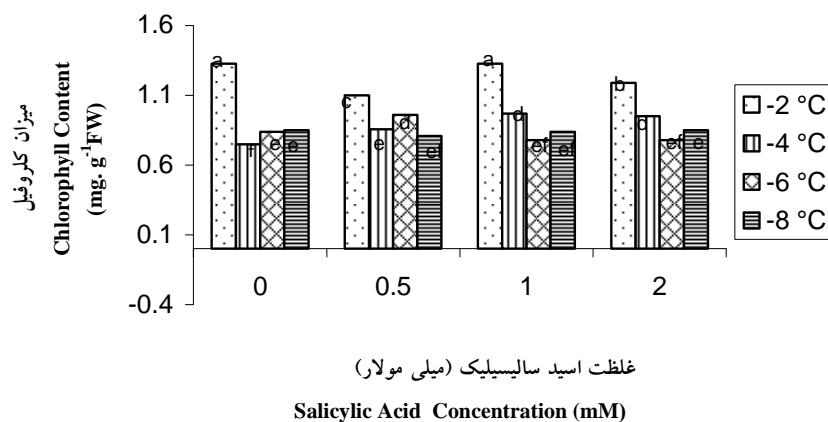


Fig. 1. Interaction of salicylic acid treatments and freezing on chlorophyll content of lime leaves. Bars with the similar letters are not significantly different at 5% level using LSD.

شکل ۱- برهمکنش اثرهای تیمارهای سالیسیلیک اسید و سرما بر میزان کلروفیل برگ نهال‌های لیمو آب. ستون‌ها دارای حروف مشابه، تفاوت آماری در سطح ۵٪ آزمون LSD ندارند.

قندهای محلول

برای شکل ۲ در مرحله پیش از یخبندان بیشترین میزان قندهای محلول در غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید دیده شد که به‌طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود. مقادیر قندهای محلول در اثر تیمار سالیسیلیک اسید، سرما و برهمکنش آن‌ها معنی دار بود.

بیشترین میزان قندهای محلول در رویارویی با یخبندان در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید دیده شد (جدول ۳) که با میزان قندهای محلول در سایر تیمارهای سالیسیلیک اسید تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ آزمون LSD داشت. در حالی که مقدار قندهای محلول در تیمار شاهد (بدون کاربرد سالیسیلیک اسید) به‌طور معنی داری کمتر از سایر تیمارهای سالیسیلیک اسید بود. در مورد اثر سرما بر میزان قندهای محلول، روند ویژه‌ای در مورد افزایش یا کاهش قندها با افزایش سرما دیده نشد. میزان قندهای محلول در گیاهان تیمار

شده با دمای ۶- درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی داری بیشتر از دمای ۴- درجه سانتی‌گراد بود ولی بین سایر تیمارها تفاوت معنی داری وجود داشت (جدول ۱).

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های قندهای محلول، نشت الکترولیت‌ها، پرولین، Fv/Fm و ETR در تیمارهای سالیسیلیک اسید.

Table 3. Mean comparison of soluble sugars, EL, proline, Fv/Fm and ETR in salicylic acid treatments.

سرعت انتقال الکترون (میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه) ETR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	کارایی فتوشیمیایی Fv/Fm	پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر) Proline ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$)	نشت الکترولیت‌ها (درصد) EL (%)	قندهای محلول (میلی گرم بر گرم وزن تر) Soluble sugars ($\text{mg g}^{-1} \text{FW}$)	سالیسیلیک اسید (میلی مولار) Salicylic acid (mM)
0.00 c	0.140 b	1046.89 c	74.77 b	2.02 c [†]	0
0.52 b	0.106 c	1268.97 a	76.16 b	5.46 a	0.5
2.23 a	0.193 a	1141.16b c	78.57 b	3.28 b	1
0.30b c	0.124 bc	1197.37 ab	86.69 a	5.18 a	2

† Mean in each column followed by similar letters are not significantly different at 5% level using LSD.

† در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک، بدون تفاوت آماری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشند.

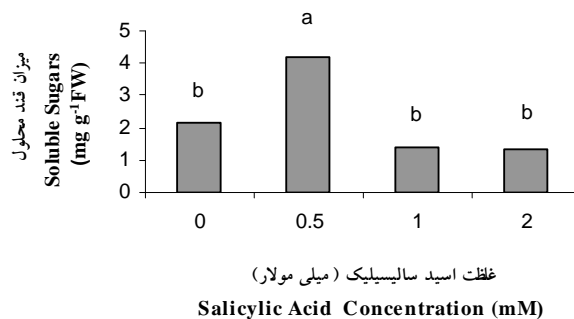


Fig. 2. Comparison of soluble sugars of lime seedlings in salicylic acid treatments before freezing. Bars with the similar letters are not significantly different at 5% level using LSD.

شکل ۲- مقایسه میزان قندهای محلول دان‌نهال‌های لیمو آب در تیمارهای سالیسیلیک اسید در مرحله پیش از سرما. ستون‌های دارای حروف مشترک، بدون تفاوت آماری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشند.

بررسی برهمکنش تیمار سرما و سالیسیلیک اسید (شکل ۳) نشان داد که بیشترین میزان قندهای محلول پس از کاربرد غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید و سرمای ۴- درجه سانتی‌گراد وجود داشت که به‌طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود. مقایسه میانگین غلظت قندهای محلول تیمارهای سالیسیلیک اسید در مراحل پیش و پس از یخبندان نشان داد کاهش دما به‌طور معنی داری موجب افزایش قندهای محلول در برگ‌های گیاه لیمو آب گردید (جدول ۲).

التایب^۱ (۱۲) گزارش داد که در گیاه جو تحت تنش شوری، تیمار با سالیسیلیک اسید باعث کاهش معنی دار میزان قندهای محلول در اندام‌های هوایی و افزایش آن در ریشه ها گردید. در گیاه ذرت نیز در شرایط تنش شوری، کاربرد سالیسیلیک اسید میزان قندهای محلول را کاهش داد (۱۹). بر خلاف نتایج این پژوهشگران، در این آزمایش با کاربرد سالیسیلیک اسید میزان قندهای محلول در مراحل پیش و پس از یخبندان افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان قندهای محلول در غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید و در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد دیده شد (شکل ۳). تیمار سالیسیلیک اسید ممکن است هیدرولیز قندهای نامحلول یا پروتئین‌ها را تحریک کند و باعث ایجاد یک منبع اسمزی شود که در تنظیم اسمزی مهم است (۳). در این بررسی نیز در تنش یخزدگی لیمو آب، احتمال دارد سالیسیلیک اسید با تجزیه قندهای نامحلول باعث افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول شده باشد و یا کاربرد سالیسیلیک اسید در گیاهان یک‌ساله و یا چندساله و در شرایط تنش‌های شوری و یخزدگی در تغییر کربوهیدرات‌ها تاثیرات متفاوتی داشته باشد.

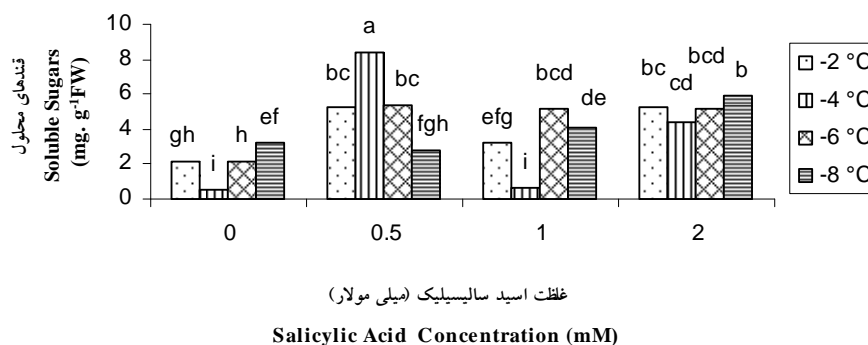


Fig. 3. Interaction of salicylic acid treatments and freezing on soluble sugars of lime leaves. Bars with the similar letters are not significantly different at 5% level using LSD.

شکل ۳- برهمکنش اثرهای تیمارهای سالیسیلیک اسید و سرما بر میزان قندهای محلول برگ لیمو آب. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک، بدون تفاوت آماری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشند.

میزان نشت الکترولیت‌ها

سالیسیلیک اسید، سرما و برهمکنش آن‌ها بر میزان نشت الکترولیت‌های بافت گیاهی تاثیر معنی داری داشت. در بین تیمارهای سالیسیلیک اسید، بیشترین میزان نشت الکترولیت‌ها با ۸۶/۶۹٪ در غلظت ۲ میلی مولار مشاهده شد که تفاوت معنی داری با سایر غلظت‌های سالیسیلیک اسید داشت بین سایر غلظت‌های سالیسیلیک اسید تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول ۳). این نتایج نشان می‌دهند که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید موجب افزایش نشت الکترولیتی گردیده است. همچنین کاهش دما موجب افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها در برگ شد به طوری که میزان نشت الکترولیتی در برگ‌های لیمو آب که در دماهای ۴-، ۶- و ۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند، به‌طور معنی داری بیشتر از تیمار ۲- درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۱).

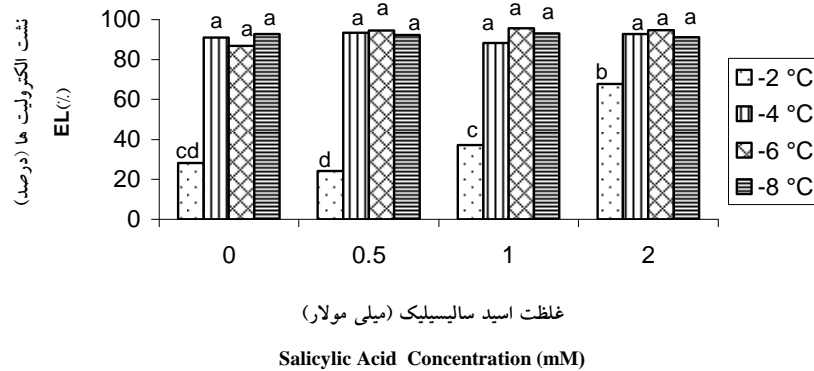


Fig. 4. Interaction of salicylic acid treatments and freezing on electrolyte leakage (EL) of lime leaves. Bars with the similar letters are not significantly different at 5% level using LSD.

شکل ۴- برهمکنش اثرهای تیمارهای سالیسیلیک اسید و سرما بر درصد نشت الکترولیت‌های برگ نهال‌های لیمو آب در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک، بدون تفاوت آماری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشند.

بررسی نتایج برهمکنش تیمار سالیسیلیک اسید و سرما بر شاخص میزان نشت الکترولیت‌ها در شکل ۴ نشان داده شده است. کمترین نشت الکترولیت‌ها در تیمار ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید و در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد وجود داشت که با میزان نشت الکترولیت‌ها در تیمار بدون کاربرد سالیسیلیک اسید در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی دار نداشت. پس از آن کمترین میزان نشت الکترولیتی در برگ‌های لیمو آب در تیمارهای ۱ و ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد وجود داشت. بین سایر تیمارها تفاوت معنی داری وجود نداشت.

مصرف سالیسیلیک اسید در برابر تنش‌های سرما (۱۷)، اکسیداتیو (۲۴) و شوری (۱۲) موجب کاهش نشت الکترولیت‌ها در برخی گیاهان شده است. گزارش شده که سالیسیلیک اسید در غلظت‌های بالا می‌تواند باعث آسیب به گیاه شود (۱۷)، در این بررسی نیز سالیسیلیک اسید در پایین‌ترین سطح مصرف میزان نشت الکترولیت‌ها را کاهش داد، در صورتی که در غلظت‌های بالاتر نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت.

پرولین

برابر نتایج تجزیه واریانس اثر سالیسیلیک اسید بر میزان پرولین برگ دان نهال‌های لیمو آب معنی دار بود ولی اثر سرما و نیز برهمکنش سالیسیلیک اسید و سرما در تغییرهای پرولین معنی دار نبود. مقایسه میزان پرولین در رابطه با تیمارهای سالیسیلیک اسید نشان داد که بیشترین میزان پرولین پس از کاربرد غلظت ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید وجود داشت که با تاثیر کاربرد غلظت ۲ میلی مولار سالیسیلیک اسید اختلاف معنی دار نداشت (جدول ۳)، میزان پرولین در تیمار ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید با شاهد تفاوت معنی داری نداشت. گزارش‌های متعددی وجود دارد که گیاه با رویارویی تنش برای ایجاد مقاومت سطح پرولین را افزایش می‌دهد (۹، ۱۲ و ۲۶). کلاسن^۱ (۲۰۰۵) گزارش کرد که پرولین ملاکی معتبر در ارزیابی درجه تاثیر تنش محیطی در گیاه است (۱۰). افزون بر این، تجمع ملکول‌های با وزن ملکولی پایین مانند سوکروز و پرولین به تثبیت غشاء اندامک‌ها در برابر پسابیدگی ناشی از یخ‌زدگی کمک می‌کنند (۳۱). در این پژوهش در تنش یخ‌زدگی لیمو آب میزان پرولین افزایش معنی دار نداشت در حالی که سکاردی و تینگ^۲ گزارش کردند که پرولین در واکنش به دماهای یخ‌زدگی در هوهوبا افزایش یافت (۹). در این آزمایش در اثر تیمار دان نهال‌های لیمو آب با سالیسیلیک اسید (غلظت ۰/۵ میلی مولار) میزان اسید آمینه پرولین افزایش یافت (جدول ۳). به‌طور مشابهی گزارش شده است سالیسیلیک اسید تجمع پرولین در نهال‌های گندم تحت تنش شوری را افزایش داد (۲۸). نتایج این پژوهش با سایر گزارش‌ها همسویی دارد.

فلورسانس کلروفیل

تیمار سالیسیلیک اسید، سرما و نیز برهمکنش سالیسیلیک اسید با سرما در میزان Fv/Fm و ETR به‌طور معنی داری موثر بود. با مقایسه میانگین‌های شاخص‌های Fv/Fm و ETR در جدول ۲ دیده می‌شود که بیشترین این شاخص‌ها به‌ترتیب با مقادیر ۰/۱۹۳ و ۲/۲۳ (میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) در غلظت ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید به دست آمد. با دیدن جدول ۳ مشخص می‌شود که با کاهش دما به زیر از ۲- درجه سانتی‌گراد شاخص‌های فلورسانس کلروفیل در برگ‌های لیمو آب کاهش یافت، ولی بین تیمارهای ۴-، ۶- و ۸- درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی داری وجود نداشت و بیشترین این شاخص‌ها در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد دیده می‌شود (جدول ۱). نتایج مربوط به مقایسه میانگین‌های شاخص‌های فلورسانس کلروفیل در بررسی برهمکنش تیمار سالیسیلیک اسید با سرما در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. حداکثر مقادیر Fv/Fm و ETR در غلظت ۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید و سرمای ۲- درجه سانتی‌گراد دیده می‌شود. کاهش شدید Fv/Fm و ETR از دمای ۲- به دماهای پایین‌تر نشان می‌دهد که حد مقاومت این گیاه به سرما تا حدود ۲- درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

کاهش بازده فتوسنتز (Fv/Fm) توسط چندین پژوهشگر در تنش‌های مختلف گزارش شده است (۵، ۱۵، ۲۰). در این بررسی به‌علت تنش یخ‌زدگی مقادیر Fv/Fm و ETR کاهش یافت. مشابه با این نتایج، در گیاه چغندر قند در شرایط تنش سرما کاهش معنی داری در نرخ فتوسنتزی، سرعت انتقال الکترون (ETR) و میزان بازده کوآنتومی سیستم فتوسنتزی II (Fv/Fm) گزارش شده است (۵). گزارش‌های مشابهی در رویارویی با تنش

سرما (۲۰) و تنش شوری (۱۵) نیز ارایه شده است. افزایش نسبت F_v/F_m در اثر کاربرد سالیسیلیک اسید در گیاهان لیمو آب در تنش یخزدگی در این آزمایش با نتایج جاندا و همکاران^۱ (۱۷) در مورد گیاه ذرت در شرایط تنش سرمایی همسویی دارد. افزون بر این گزارش شده است که سرعت انتقال الکترون (ETR) با کاربرد سالیسیلیک اسید در تنش شوری گوجه فرنگی نیز افزایش می‌یابد (۳۰) که با نتایج این بررسی با مصرف سالیسیلیک اسید در برابر تنش یخزدگی گیاه لیمو آب یکسان است.

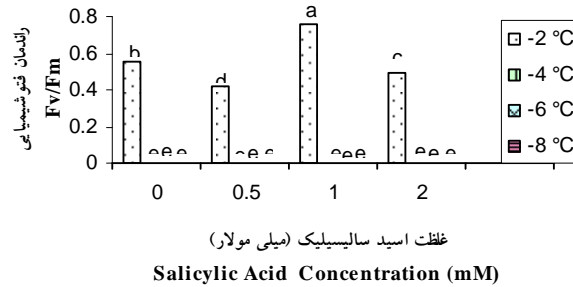


Fig. 5. Interaction of salicylic acid treatments and freezing on efficiency of photosystem II (F_v/F_m) of lime leaves. Bars with the similar letters are not significantly different at 5% level using LSD.

شکل ۵- برهمکنش اثرهای تیمارهای سالیسیلیک اسید و سرما بر بازده فتوشیمیایی فتوسنتز (F_v/F_m) لیمو آب. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک، بدون تفاوت آماری در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشند.

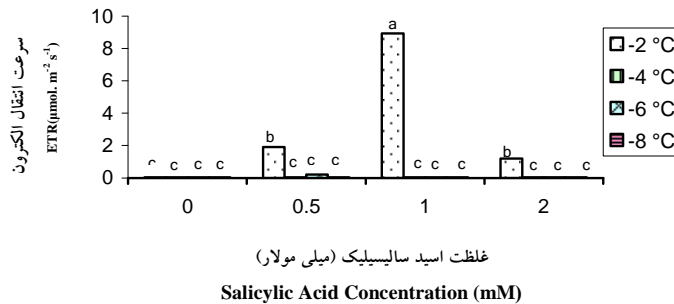


Fig. 6. Interaction of salicylic acid treatments and freezing on ETR of lime leaves. Bars with the similar letters are not significantly different at 5% level using LSD.

شکل ۶- برهمکنش اثرهای تیمارهای سالیسیلیک اسید و سرما بر سرعت انتقال الکترون (ETR) برگ لیمو آب. ستون‌هایی که دارای حروف مشابه هستند تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ آزمون LSD ندارند.

نتیجه گیری

در این بررسی شاخص‌های میزان قندهای محلول و فلورسانس کلروفیل به میزان بیشتر و میزان پرولین و نشت الکترولیت‌ها به میزان کمتری تحت تاثیر سالیسیلیک اسید قرار گرفتند. از سویی کاهش دما به زیر ۲- درجه سانتی‌گراد نشان داد که برخی شاخص‌ها مثل میزان کلروفیل، Fv/Fm و ETR کاهش بیشتری یافتند، هرچند مقدار قندهای محلول افزایش محدودی داشتند. به نظر می‌رسد دان نهال‌ها دماهای تا ۲- درجه سانتی‌گراد را بدون آسیب از سرما تحمل نمایند. افزون بر این تیمار ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید از نظر قندهای محلول و تیمار ۱ میلی مولار از نظر پارامترهای فتوسنتزی در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد، شرایط فیزیولوژیکی مطلوب تری برای ادامه زندگی دان نهال‌ها فراهم نمود.

REFERENCES

منابع

- ۱- پارسائیان، م. ۱۳۸۲. تاثیر اندوفایت‌ها در بروز مقاومت به سرما در دو گونه فستوکا. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان. ۱۱۹ ص.
- ۲- فتوحی قزوینی، ر. و م. ج. فتاحی مقدم. ۱۳۸۵. پرورش مرکبات در ایران، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه گیلان، ۱۵۰ ص.
- ۳- کافی، م. و ع. مهدوی دامغانی. ۱۳۸۱. مکانیسم مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی (ترجمه)، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۷۲ ص.
- ۴- میر محمدی میبیدی، ع. م.، ۱۳۸۳. جنبه‌های فیزیولوژیک و به نژادی تنش‌های سرما و یخ‌زدگی گیاهان زراعی، انتشارات گلبن اصفهان، ۳۲۴ ص.
5. Ambrosio, N.D., C. Arena and A.V. De Santo. 2006. Temperature response of photosynthesis, excitation energy dissipation and alternative electron sinks to carbon assimilation in *Beta vulgaris* L. Environ. Exp. Bot. 55:248-257.
6. Ananieva, E.A., V.S. Alexieva and L.P. Popova. 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. J. Plant Physiol. 159: 685-693.
7. Bates, L.S., R.P. Waldren and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39:205-207.
8. Chow, W.S. 1994. Photoprotection and photoinhibitory damage. In: E.E. Bittar. And J. Barber. (eds.), Advances in Molecular and Cell Biology, Vol. 10, Molecular Processes in Photosynthesis. JAI Press, Greenwich, UK. 151-196.
9. Ceccardi, T.L., and I.P. Ting. 1996. Effect of temperature and water stresses on gas exchange, fluorescence kinetics and solute levels of jojoba. Indust. Crops Prod. 5:279-290.
10. Claussen, W. 2005. Proline as measure of stress in tomato plants. Plant Sci. 168:241-248.
11. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
12. El-Tayeb, M.A. 2005. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. Plant Growth Regul. 45:215-224.

13. Epstein, E. and A. Bloom. 2004. Mineral Nutrition of Plants: Principle and Perspectives. Second edition. Academic Press, New York, U.S.A.
14. Flexas, J., J.M. Escalona and H. Medrano. 1999. Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant Cell Environ.* 22:39-48.
15. Hasan, R., M. Kawasaki, M. Taniguchi and H. Miyake. 2006. Salinity stress induces granal development in bundle sheath chloroplasts of maize, an NADP-Malic Enzyme-Type C4 Plant. *Plant Product. Sci.* 9:256-265.
16. Inskeep, W.P. and P.R. Bloom. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone. *Plant Physiol.* 77:483-485.
17. Janda, T., G. Szalai, I. Tari and E. Paldi. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208:175-180.
18. Kang, G.Z., G.H. Zhu, X.X. Peng, G.C. Sun and Z.X. Wang. 2004. Isolation of salicylic acid-induction-expressed genes in chilling-stressed banana seedlings leaves using mRNA differential display. *Plant Physiol. Mol. Biol.* 30:225-228.
19. Khodary, S.E.A. 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. *Int. J. Agri. Biol.* 6:5-8.
20. Li, X.G., W. Duan, Q.W. Meng, Q. Zou and S.J. Zhao. 2004. The function of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco during chilling stress under low irradiance. *Plant Cell Physiol.* 45:103-108.
21. Lutts, S., J.M. Kinet and J. Bouharmont. 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice varieties differing in salinity resistance. *J. Exp. Bot.* 46:1843-1852.
22. Malamy, J., J.P. Carr, D.F. Klessig and I. Raskin. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002-1004.
23. Martinez, J., S. Lutts, A. Schanck, M. Bajji and J. Kinet. 2004. Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L? *J. Plant Physiol.* 161:1041-1051.
24. Popova, L., E. Ananieva, V. Hristova, K. Christov, K. Georgieva, V. Alexieva and Zh. Stoinova. 2003. Salicylic acid and methyl jasmonate-induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. *Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue (Proc. Euro. Work. on Environ. Stress Sustain. Agr. 7-12 Sept. 2002 Varna, Bulgaria)*, 133-152.
25. Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:439-463.
26. Sakhabutdinova, A.R., D.R. Fatkhutdinova, M.V. Bezrukova. and F.M. Shakirova 2003. Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on Wheat plants. *Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue (Proceedings of the European Workshop on Environmental Stress and Sustainable Agriculture, 07-12 Sept. 2002 Varna, Bulgaria)* 314-319.
27. Senaratna, T., D. Touchell, E. Bunn and K. Dixon. 2000. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.* 30:157-161.
28. Shakirova, F.M., A.R. Sakhabutdinova, M.V. Bezrukova, R.A. Fatkhutdinova and D.R. Fatkhutdinova. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* 164:317-322.
29. Singh, B. and K. Usha. 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regul.* 39:137-141.
30. Tari, I., J. Csiszar, G. Szalai, F. Horvath, A. Pecsaradi, G. Kiss, A. Szepesi, M. Szabo and L. Erdei. 2002. Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. *Acta Biol. Szegediensis* 46:55-56.

31. Yelenosky, G. and C.L. Guy. 1989. Freezing tolerance of citrus, spinach, and petunia leaf tissue. Osmotic adjustment and sensitivity to freeze induced cellular dehydration. *Plant Physiol.* 89:444-451.