



## گرماسنجی تصویری اشعه مادون قرمز، روش جدید برای مطالعه هسته یخ و جمعیت پاتوژن ها در گیاهان

ساغر کتابچی

گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز

### چکیده

صدمات ناشی از یخ زدگی می توانند یک مشکل جدی برای گیاهان باشند. دانستن چگونگی یخ زدگی و گسترش آن در درون گیاه می توانستند برای بهبود برنامه مدیریتی و یا اصلاح ارقام کمک مفیدی باشند. تاکنون گسترش صدمات ناشی از یخ زدگی در زمان واقعی خود و در درون گیاه بدون بهره گیری از تکنولوژی بخوی مطالعه نشده بود. منشاء و گسترش یخ زدگی در گیاهان ناشناخته می باشد بنابراین هر اطلاعاتی در این خصوص می تواند برای برنامه های مدیریتی و تولید ارقام مقاوم موثر باشد. استفاده از بررسی تفاوت دمایی یکی از روشهای کاربردی برای ردیابی فرآیند یخ زدگی در گیاه می باشد در این روش یک ردیف ترموکوپل بدین منظور به بافت گیاهی متصل می شود. از تصاویر ناشی از حرارت مادون قرمز برای مشاهده هسته یخ و میزان یخ و جمعیت باکتریهای مولد هسته یخ در بافتهای متفاوت و همچنین اندازه گیری آنها استفاده زیادی شده است. این مطالعه نشان می دهد که حرارت سنجی مادون قرمز یکی از بهترین روشها برای مطالعه هسته یخ و جمعیت پاتوژنها در گیاهان می باشد.

واژه های کلیدی: حرارت سنجی مادون قرمز، هسته یخ، یخ زدگی

### مقدمه

خدمات ناشی از سرما زدگی تنها بعد از تشکیل یخ در درون بافت قابل بررسی و مشاهده می باشد. اطلاعات در خصوص باکتری های مولد هسته یخ، میزان جمعیت آن ها و نقش آن ها در یخ زدگی گیاهان و همچنین چگونگی مکانیسم گیاه در برابر تنش سرما زدگی در مدیریت کنترل آنها نقش بسزایی دارد. (4) گیاهان با مکانیسم مقاومتی فزون سردی<sup>1</sup> قادرند دماهای زیر  $0^{\circ}C$  را تحمل نمایند و دچار یخ زدگی نشوند. به همین دلیل گیاهان می توانند در زمستان دماهای پایین  $0^{\circ}C$  را تحمل نمایند و در شروع فصل رویش مجدداً فعالیت خود را آغاز نمایند. دمای فزون سرد در گیاهان با توجه به گونه گیاهی متفاوت می باشد. عوامل هسته یخ نیز می توانند دمای فزون سرد را تغییر دهند بفرص گیاهی که در شرایط طبیعی دمای فزون سرد آن  $8^{\circ}C$  - بوده است با حضور عوامل هسته یخ به  $1^{\circ}C$  - می رسد. (2) ردیابی و بررسی عوامل هسته یخ در گیاهان برای بررسی چگونگی فزون سردی در گیاهان می تواند موثر باشد. هر چند با تشکیل یخ در درون گیاهان و یا بررسی قطرات یخ در درون قسمت های کوچکی از بافت گیاهی، می توان تا حدودی این فرایند را ارزیابی نمود (3 و 7) ولی این روش، بافت گیاهی را تخریب می نماید و همچنین نمی تواند اطلاعات دقیقی از هسته یخ در همان محل را به ما بدهد. همچنین تشکیل ذرات یخ در

<sup>1</sup> - Super cooling



گیاهان ممکن است موقتی باشد و یا در زمان های بخصوصی از سال تشکیل شود. فزون سردی در گیاهان نیز به شکل، موقعیت و ساختمان سلولی بستگی دارد. (10)

بنابراین بررسی یخ زدگی و روند گسترش یخ در درون بافت گیاهی روش مشکلی می باشد. آب وقتی از فاز مایع وارد جامد می شود از خود حرارت آزاد می نماید. تحقیقات نشان می دهند که تشکیل یخ در گیاهان را می توان با اندازه گیری حرارت ناشی از آزاد شدن، ردیابی نمود. دستگاه IR گرماسنجی تصویری<sup>1</sup> روش جدید و مستقیم در شرایط کنترل شده برای مشاهده هسته یخ (از شروع یخ در گیاه) و ذرات و جمعیت پاتوژن در گیاه که باعث ایجاد حرارت می شوند، می باشد. این دستگاه تصاویری با رنگ های آبی و بنفش و قرمز و قهوه ای ایجاد می نماید که محل یخ زدگی بصورت یک نقطه روشن دیده می شود. شروع یخ زدگی و گسترش آنرا در گیاهان مختلف و همچنین قسمت های مختلف گیاهان مانند برگ، ساقه، جوانه و حتی روزنه ها را نشان می دهد. این اطلاعات می تواند برای برنامه مدیریتی سرمازدگی گیاهان و محصولات مختلف مفید باشد.

### مواد و روش ها

**تهیه عوامل هسته یخ:** سوسپانسیونی از ترکیباتی که باعث یخ زدگی می شود چه عوامل شیمیایی و چه عوامل بیولوژیک تهیه شود. به عنوان مثال باکتری *Pseudomonas syringae* که قبلاً به عنوان یک عامل هسته یخ بیولوژیک شناخته شده است (7) به مدت 48-96 ساعت روی محیط کشت king's B در 20°C کشت داده و با یک خلال دندان استریل در آب مقطر استریل حل شود.

**تصویر گر IR:** تصویر گر IR تغییرات دما و یخ زدگی را بوسیله یک اشعه سنج تصویری با یک ردیاب HgCdTe (8-12 long wave nm) که نتایج را می تواند روی صفحه مانیتور بصورت تصویر نشان دهد، مشخص می نماید. این دستگاه در همان زمان در موقعیت اصلی خود گیاه، تصاویر مادون قرمز را ذخیره و یا ضبط نماید. و برای این منظور ترموکوبلهایی به بافت گیاهی متصل می شود تا حرارت ناشی از یخ زدگی که بصورت مادون قرمز متصاعد می شود را به تصویر بکشد، تصاویر دیجیتالی ذخیره شده می تواند چندین بار بازنگری و یا توسط نرم افزارهایی پردازش شوند.

برای این منظور از سوسپانسیون عوامل هسته یخ مانند سوسپانسیون باکتری *P.syringae* که به مقدار 50 µl-0/5 به گیاه تلقیح کرده، در آن محل ترموکوبلها را قرار می دهد و روی 5°C تنظیم می نماید تا حرارت های ایجاد شده تا 5°C مشخص نماید. سپس گیاه را در انکوباتور یخچال دار که حداقل دمای آن 5°C- باشد قرار می دهند زیرا این دما برای یخ زدن هر قطره ای کافی می باشد. این آزمون پس از 20 دقیقه با شروع یخ زدگی شروع می شود و تا 2 ساعت ادامه پیدا می کند البته یخ زدگی برای ساقه و برگ کمتر و برای میوه بیشتر می باشد.

### نتایج و بحث:

در بررسی های انجام شده با این روش که روی برگ های گیاهان مختلف انجام شد نشان می دهد که روزنه ها محلی برای شروع و گسترش یخ زدگی می باشند که کوتیکول سطح برگ مانعی برای نفوذ ذرات یخ می باشد (شکل 1) در شروع یخ زدگی چندین روزنه باز می باشند. پس از تلقیح باکتری های هسته یخ به سطح زیرین برگ (شکل 1 A) در آن محل مستقر می شوند. پس از آن یخ زدگی در برگ گسترش می یابد و به ساقه ای که برگ ها

<sup>1</sup> -IR Viedo thermography



به آن متصل شده انتقال می یابد. (شکل C 1) و گستردگی یخ زدگی در همان ساقه تا آخر و پس از آن به برگ های متصل به آن منتقل می شود. (شکل D 1) که این در گیاهان مختلف نتایج مشابه داشته است (12). در آزمونی که در روی برگ گندم و برگ لوبیا انجام شد (شکل 2) وقتی که سوسپانسیون باکتری را به سطح زیرین برگ تلقیح نمودند یخ زدگی در همان سطح زیرین گسترش پیدا نمود و این به دلیل حضور بیشتر روزنه ها در سطح زیرین برگ بود زیرا این آزمون وقتی بر روی سطح رویی برگ انجام شد امکان پذیر نبود و یا با مشکل روبرو گشت. (4 و 6) و همچنین در آزمایشی که روی گیاه گندم انجام شد یخ زدگی در سطح زیر اپیدرم و در حفرات زیر روزنه اتفاق افتاد. نکته قابل توجه این می باشد که یخ زدگی در اطراف رگبرگ ها دیده نشد (8) بنابراین در برگ ها یخ زدگی در گیاه هم از نواحی زیر اپیدرم و هم از حفرات زیر روزنه انجام می شود و در سطح برگ یخ زدگی از جایی که ذرات باکتریایی وارد گیاه می شوند آغاز می گردد. (5) در آزمونی که روی ساقه نهال گلایی انجام شد نکته ای که توجه محققان را جلب نمود. وجود ذرات هسته یخ ذاتی در ساقه می باشد. زیرا دمای یخ زدگی ساقه با دمای تشکیل هسته یخ باکتری های مولد هسته یخ متفاوت بود. (11) و در ساقه حتی بدون تلقیح باکتری های مولد هسته یخ و یخ زدگی دیده شد که نشانگر وجود عوامل هسته یخ ذاتی در ساقه می باشد. همانطور که در دیگر آزمون ها دیده شد در ساقه گسترش یخ زدگی در نزدیکی آوندها در زیر پوست می باشد و اگر نهال دارای شکوفه و یا جوانه باشد پس از تلقیح باکتری به ساقه، یخ زدگی سرعت به جوانه ها گسترش می یابد. (شکل 3) که این احتمالاً پس از تلقیح باکتری ها به علت افزایش قند و اسید آمینه در جوانه ها بسوی آن ها حرکت کرده و حضور بیشتر آن ها در جوانه ها باعث شروع گسترش یخ زدگی در جوانه ها می باشد. (11)

در آزمون هایی که روی میوه ها انجام شد دیده شد که تحمل فزون سردی میوه ها برای مدت طولانی تا  $6^{\circ}\text{C}$  و  $^{\circ}\text{C}$  -7 می باشد و بعد از آن عوامل هسته های یخ از سطح میوه به داخل میوه رفته و باعث یخ زدن درون میوه ها می شوند. تغییرات فیزیولوژی که در طی رسیدن میوه ها ایجاد می شود می تواند با محدود کردن مهاجرت عوامل هسته یخ به درون میوه باعث افزایش مدت زمان فزون سردی میوه ها بشود. (11) که این مسئله در دیگر آزمون هایی توسط دیگر محققین انجام شده به اثبات رسیده است. (2) نواحی کالیکس میوه ها تنها قسمتی است شروت به یخ زدن می کند و لایه مومی که سطح نکتاریا را می پوشاند ممکن است به عنوان یک سد برای نفوذ یخ ها عمل نماید بنابراین از حرکت هسته های یخ جلوگیری می کند. نتایج این تحقیقات نشان می دهد که برای مطالعه هسته های یخ و جمعیت باکتریایی در گیاهان دستگاه گرماسنج تصویری IR توانایی بالایی دارد. می تواند در کلیه قسمت های گیاه مانند برگ، ساقه، میوه و حتی بافت های چوبی شروع یخ زدگی نحوه گسترش آن در طی تنش یخ زدگی و سرمازدگی نشان دهد. همچنین می تواند نواحی که بیشتر در این تنشها آسیب می بینند را مشخص نماید. و یا نواحی که مدت بیشتری می توانند در شرایط فزون سردی باقی بمانند را نشان دهد که دانستن این عوامل در برنامه مدیریتی گیاهان و تولید و کاشت ارقام مقاوم در برابر تنش سرمازدگی و یخ زدگی می تواند مفید باشد.

## منابع

1-Abdallah, A. Y. and palta, J. P. 2002. Changes in the freezing stress resistance of the cranberry leaf, flower bud, and fruit during growth and development. Acta Hort. 241 : 273 – 276.



- 2-Andrew, P.k. Proebesting, Jr. E.L. and Gross, D.C. 1986. Ice nucleation and super cooling in freeze – sensitive peach and sweet cherry tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111: 232-236
- 3-Ashwort, Y. N . 1982. Properties of peach flower buds wich facilitate super cooling. Plant Physiol . 70: 1475-1479
- 4-Ashworth, E. N ., Willard , T.J. and Malone , S. R. 1992. The relation ship between vascular differentiation and distribution of ice within for sythia flower buds. Plant cell Environ. 15: 607-612
- 5-Caccardi, T.L. Heath, R. L. and Ting, I. P. 1995. Low. Temperature exotherm measurement using infrared theromography. Hort Science 30:140-142
- 6-Le Grice , P., Fuller, M. P. and Cambell, A. 1993. An inverstigation of the potential use of thermal imaging technology in the study of frost damage to sensitive crops. Proc 6<sup>th</sup> intl. conf . Biol. Ice. Nucleation univ. Wyoming. Laramie.
- 7-Lindow, S.E., Arny, D.C. and upper. C.D. 1982. Bactrial ice nucleation: A factor in frost injury to plants. Plant Physiol. 70: 1084-1089
- 8-Pearce, R. S. and Ashworth, E, N. 1992. cell shape and localization of ice leave of over wintering wheat during frost stress in the field. Planta. 188:324-331.
- 9-Price, W.S, Hiroyuki, I., Arata, Y. and Ishilawa, M. 1997. visualization of freezing behavious in flower and tissues of cold-hardly *Rhododendron Japonicum* by uncleat magnetic resonance micro imaging. Austral. J. Plant Phsiol. 24: 599-605
- 10-Qurmmme, H. A. Su, W, A. veto, L. J. 1995. Anatomical features facilitating super cooling of the flower within the dormant peach bud. Amer. Soc, Hort. Sci. 120: 814-822
- 11-wisniewski, M., Lindow, S. E. and Ashworth, E. N. 1997. observations of ice nucleation and propagation in plant using in frarecl video thermography. Plant . Physiol. 113: 327-334
- 12-Wormaster, B. A. A. and Palta. J. P. 1999. Ice undection and propagation in Cranberry uprights and fruit using inferared video thermography. J. Amer . Soc. Hort. Sci. 124: 619-625

## **Infrared Video Thermography: New Method for Studying Ice Nucleation and Propagation in Plants**

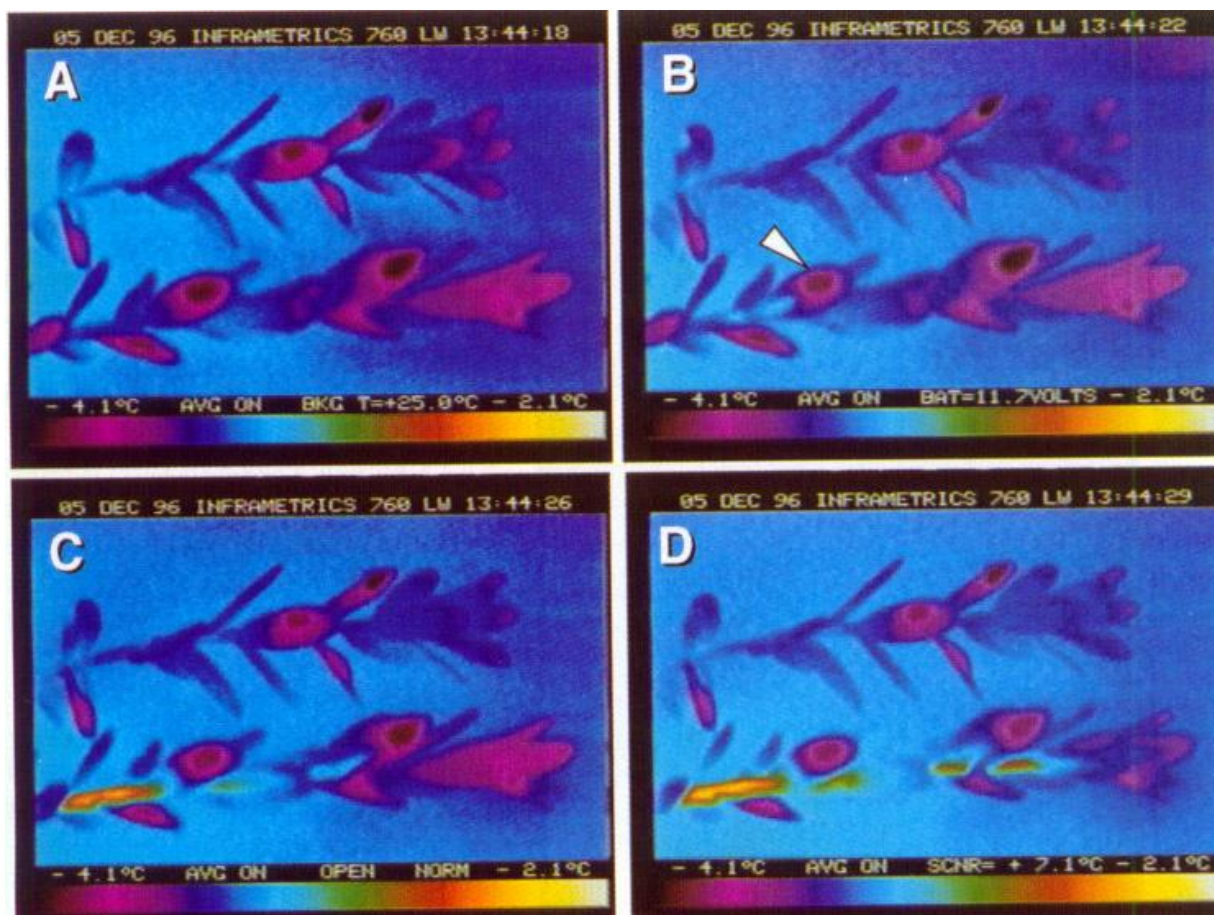
**Saghar Ketabchi**

**Department Plant Protection, Shiraz Islamic Azad University**

### **Abstract**

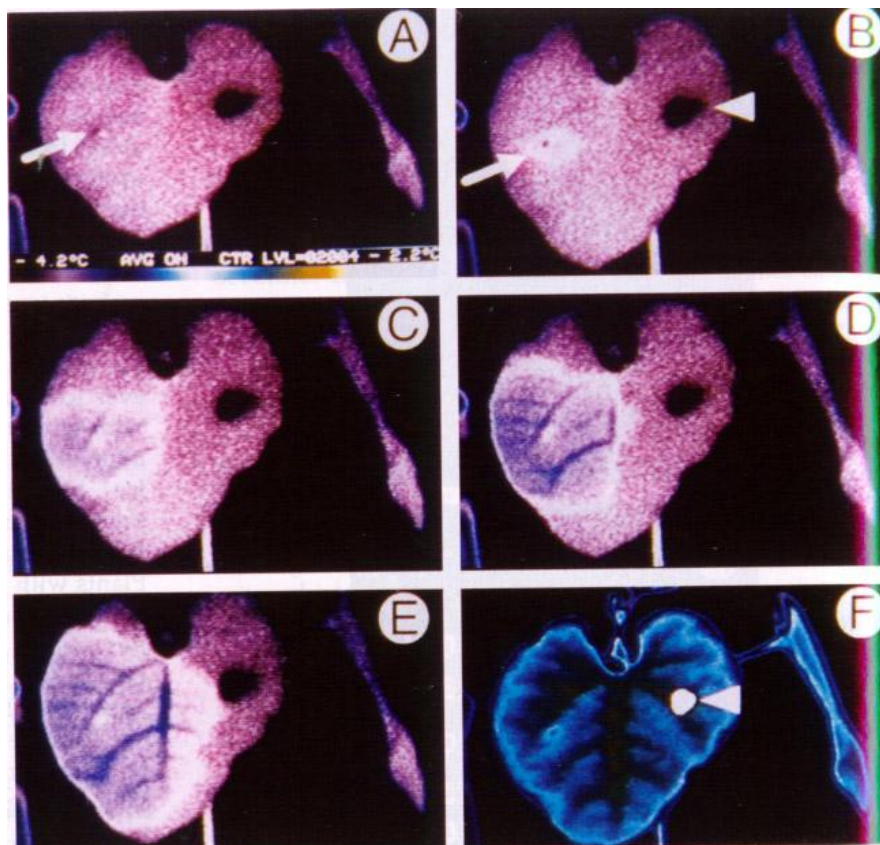
Freezing injury can be a significant problem in plants. Understanding how freezing develops and ramifies throughout the plant could assist in the development of improved management or screening processes for cultivar improvement. The development of freezing injury is not well understood due partly to lack of technology to view freezing origin and progression of whole plants in real time. The origin and progression of freezing in plants is unknown and the information could be useful for developing improved management practices or cold-tolerant cultivars. Differential thermal analysis is the most widely utilized method for tracking freezing processes in plants and employs an array of thermocouples attached to plant tissues. Thermal imaging has recently been used to observe ice nucleation and rates of propagation of ice in different tissues were also easily measured by thermal imaging. This study demonstrates that IR Thermography is an excellent method for studying ice nucleation and propagation in plants.

**Key word: IR Thermography, ice nucleation, freezing**

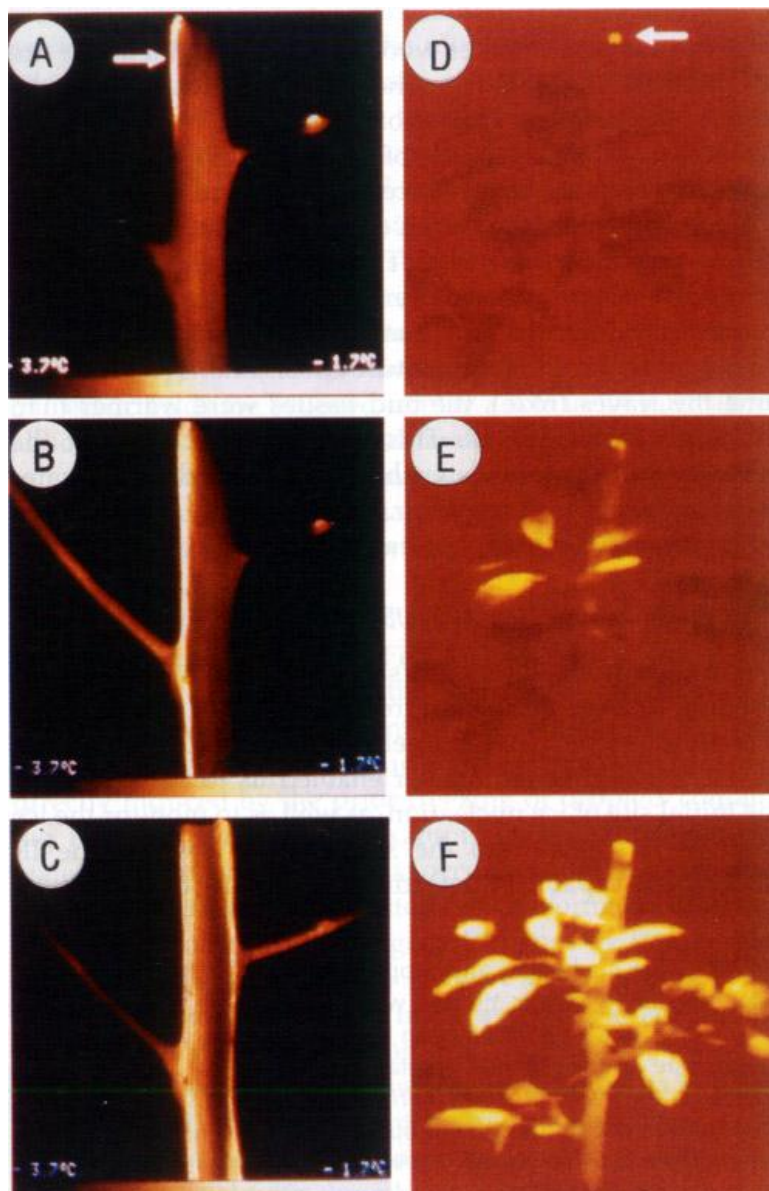


شکل 1- گسترش یخ زدگی از سطح برگ تا ساقه و دیگر برگهای جانبی. گیاه ردیف پایین با 3 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری مولد هسته یخ تلقیح شده است. هر دو گیاه در دمای بین 2- و 3- درجه سانتی گراد قرار داده شده اند. تصویر A: گسترش یخ زدگی در ساقه. تصویر B: شروع گسترش یخ زدگی در برگها (محل فلش). در تصویر C و D بروز یخ زدگی در گیاه ردیف پایین در حالیکه گیاه ردیف بالا کماکان همچنان در حالت فزون سردی می باشد. (Workmaster 1999).





شکل 2- تشکیل هسته یخ و گسترش آن پس از تلقیح به گیاه لوبیا با باکتری *P. syringae* که به میزان 0/5 میکرولیتر از *P. syringae* (تصویر A، فلش) در مقایسه قرار دادن با یک قطره آب دیونیزه (تصویر B، پیکان) روی سطح برگ لوبیا. در اینجا نیز گسترش و مقایسه سرعت یخ زدگی با دستگاه IR ویدئو ترموگراف مورد مطالعه قرار گرفته است و نقاط روشن نشانگر مناطق یخ زده می باشد (Wisniewski 1997).



شکل 3- سوسپانسیون *P. syringae* به میزان 0/5 میکرولیتر به نهال گلابی تلقیح و در دمای 1- درجه سانتیگراد قرار داده شده است تشکیل هسته یخ و گسترش دامنه یخ زدگی روی نهال گلابی در یک برش عرضی (A-C) و نهال دارای شکوفه (D-F). در بررسیهای فوق، که با دستگاه IR ویدئوترموگراف انجام شده است، مناطق یخ زده بصورت نقاط روشن تر قابل تشخیص می باشند که به تدریج تمام قسمتهای گیاه را در بر گرفته اند (Wisniewski 1997).