تأثیر تنش یخ زدگی بر شاخص‌های مورفوفیزیولوژیکی و فلورسانس کلروفیل گیاه دارویی نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) در مرحله گیاهچه‌ای

مجید دشتی[1*]، محمد کافی[2]، حسین توکلی[1]، مهدی میرزا[3] و احمد نظامی[2]

[1] مشهد، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

[2] مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[3] تهران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۵

چکیده

به‌منظور ارزیابی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) در شرایط تنش یخ‌زدگی، یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در شرایط کنترل شده اجرا شد. گیاهان در مرحله گیاهچه‌ای در معرض دماهای یخ‌زدگی (صفر، ۲- ، ۴- ، ۶- ، ۸- ، ۱۰- ، ۱۲- ، ۱۴- ، ۱۶-، ۱۸- ، ۲۰- و ۲۲- درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. شاخص‌های مورفولوژیکی، درصد نشت الکترولیتها و بقاء پس از سه هفته و پارامترهای فلورسانس کلروفیل در پنج سطح بازیابی (۰، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از تنش) اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد با کاهش دما، درصد نشت الکترولیت‌ها افزایش یافته و در دمای ^{o}C ۲۲- به حداکثر رسید. درصد بقاء گیاهان تا ^{o}C ۱۴- تغییری نکرد، اما در ^{o}C ۲۲- تمام گیاهان از بین رفتند. دمای ۵۰٪ کشندگی بر اساس بقا و نشت به‌ترتیب به میزان ۱۶/۵- و ۱۱/۸- درجه سانتیگراد و دمای کاهنده ۵۰ درصد وزن خشک به میزان ۱۶/۵- درجه سانتیگراد تعیین شد. کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II (F'_v/F'_m) تا دمای ^{o}C ۶- تحت تأثیر قرار نگرفت، اما با کاهش دما به ^{o}C ۲۲-، به میزان ۷۰٪ نسبت به دمای صفر درجه سانتیگراد کاهش یافت. کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II، ۲۴ ساعت پس از بازیابی به میزان ۴۰٪ در مقایسه با شاهدکاهش یافت، اما با ادامه بازیابی تا ۷۲ ساعت افزایش نشان داد. درصد نشت الکترولیت‌ها همبستگی منفی با درصد بقا (r=-۰/۸۲***) و کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II (r= -۰/۹۵***) داشت.

واژه‌های کلیدی: نوروزک، تنش سرما، فلورسانس کلروفیل، نشت الکترولیت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۵۱۵۴۶۵۲ پست الکترونیکی: Majiddashti46@gmail.com

مقدمه

دمای پایین در مناطق خشک و معتدله یکی از تنش‌های مهم غیر زیستی و محدودکننده عملکرد گیاهان زراعی در کشت پاییزه می‌باشد، بنابراین تحمل گیاهان به تنش سرما یکی از عوامل ضروری جهت بقاء زمستانه و رشد و تولید مناسب آنها ذکر شده است (۷). توانایی تحمل به تنش یخ‌زدگی، ویژگی مهم گیاهانی است که دوره زمستان را در شرایط سخت با دماهای زیر صفر سپری می‌کنند (۲۴). بروز خسارت و یا مرگ گیاه در دماهای پایین به دلیل اختلال در فعالیت پروتئین ها، یخ زدن آب بین سلولی و حرکت آب از پروتوپلاسم به فضای بین سلولی و یا تشکیل کریستالهای یخ در داخل پروتوپلاسم انجام می‌شود (۵). در آزمایشهای بررسی تحمل به سرما در شرایط مزرعه، محققان بقای گیاهان در مزرعه پس از زمستان را به عنوان معیار ارزیابی تحمل گیاهان به شرایط سخت زمستان

مورد تأکید قرار داده اند (۱۸). به دلیل تنوع مکانی و زمانی وقوع سرما در شرایط مزرعه، ارزیابی گیاهان در این شرایط مشکلات خاصی از جمله عدم یکنواختی دما و در نتیجه خطا در به‌گزینی را دربر خواهد داشت (۱۱). از این رو محققان غالبا از روش آزمون یخ زدگی در شرایط کنترل شده استفاده می کنند. نتایج بدست آمده از آزمایش های انجام شده در گیاهان ذرت و باقلا به روش مذکور همبستگی خوبی با بقاء گیاه در مزرعه نشان دادند (۱۸،۱۱). با وجود این ارزیابی بقا در شرایط کنترل شده نیز تخریبی، پرهزینه و زمانبر بوده و به ویژه در زمانی که مقدار کمی بذر در دسترس است، انجام این آزمون امکان پذیر نمی باشد. بنابراین محققان شناسایی برخی شاخص های فیزیولوژیک متحمل به سرما در گیاهان را مورد تأکید قرار داده اند (۲۰،۱۰).

شاخص های متعددی برای ارزیابی سریع و مؤثر گیاهان در مواجهه با تنش یخ زدگی بررسی شده است، ازجمله این شاخص ها، نشت الکترولیت ها بوده که بر اساس خسارتهای ناشی از یخ‌زدگی بر غشاء سلول اندازه‌گیری می‌شود. این روش نسبتاً سریع و ارزان بوده و تخمین خوبی از مقاومت گیاه به تنش یخ‌زدگی و میزان خسارت را به غشاء سلولی ارائه می‌دهد (۴،۱۲).

زینالی یادگار و همکاران (۲) نشان دادند پیش سرما در دانه رستهای سویا، منجر به افزایش توان مقاومت آنها در برابر دمای ۴ درجه سانتیگراد شد. نظامی و همکاران (۷) با مطالعه نشت الکترولیت‌ها به‌عنوان شاخصی از خسارت یخ‌زدگی در کلزا بیان کردند که کاهش دما سبب افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها در کلیه ارقام مورد بررسی شد. برخی محققان نیز دمایی را که سبب ۵۰ درصد نشت الکترولیت می‌شود به عنوان دمای ۵۰ درصد کشندگی (LT_{50el}) (Electrolyte Leakage Lethal Temperature 50) پیشنهاد کردند (۱۵، ۲۵).

اندازه‌گیری پارامترهای فلورسانس کلروفیل روش مناسب و غیرتخریبی برای مقایسه بین گونه‌های گیاهی از نظر تحمل به تنش‌های محیطی است. مجدی و همکاران (۳) نشان دادند که کاهش دمای محیط باعث کاهش کارآئی فتوشیمیایی فتوسیستم در ارقام حساس و متحمل به سرمای گندم شد، ولی میزان این کاهش در ارقام متحمل بصورت معنی داری کمتر از ارقام حساس بود. از بین پارامترهای فلورسانس کلروفیل، سرعت انتقال الکترونها در فتوسیستم II، پس از اعمال شوک یخ زدگی و در طی دوره بازیابی، می تواند بعنوان شاخصی مناسب در شناسایی و ارزیابی ارقام متحمل به سرمای جو مورد استفاده قرارگیرد (۱۳).

گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) از جمله گیاهان دارویی با ارزش و چند ساله خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که به دلیل بهره برداری بی رویه در معرض خطر انقراض است (۱۷). رویشگاه‌های این گونه منحصراً در مراتع بیابانی کشور با اقلیم خشک تا نیمه خشک سرد در استانهای خراسان رضوی و سمنان و نیز بخشهایی از کشور افغانستان می باشد (۲۳). وقوع یخبندان در رویشگاه های فوق و مشاهده گیاهان چند ساله نوروزک با حداقل خسارت در مواجهه با دماهای یخ زدگی، بیانگر تحمل نسبتاً بالای این گیاه به این تنش می باشد. با وجود این تاکنون گزارشی مبنی بر آستانه تحمل به یخ زدگی این گیاه به ویژه در مرحله گیاهچه ای منتشر نشده است. لذا این آزمایش با هدف بررسی میزان تحمل به سرمای نوروزک و نیز تعیین روابط همبستگی بین صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی تحت شرایط تنش یخ‌زدگی در مرحله گیاهچه‌ای انجام شد.

مواد و روشها

این تحقیق در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۰ انجام شد. بذور رسیده نوروزک در نیمه دوم اردیبهشت ۱۳۹۰ از دو رویشگاه واقع در منطقه هلالی

بجستان ("۳۴ '۲۹ °۳۴ شمالی و "۳۰ '۰۷ °۵۸ شرقی) و سبزوار ("۳۸ '۰۰ °۳۶ شمالی و "۱۷ '۴۲ °۵۷ شرقی) جمع آوری شدند. در اوایل شهریورماه ۱۳۹۰ بذور هر دو اکوتیپ پس از ضدعفونی با قارچ‌کش کربندازیم ۶۰٪ به میزان ۱/۵ در ۱۰۰۰ ، به تعداد ۲۵ عدد در ظروف پتری ۹۰ میلی متری بین دو لایه کاغذ صافی واتمن شماره یک و درجه حرارت مطلوب ۱± ۱۵ درجه سانتیگراد کشت شدند. پس از جوانه زنی، شش گیاهچه سالم با طول ریشه حداکثر ۱۰ تا ۱۵ میلی متر، در داخل گلدانهای پلاستیکی با ارتفاع ۱۵ و قطر دهانه ۱۲ سانتیمتر با ترکیب یکسانی از ماسه، خاک مزرعه و خاک‌برگ نشا شدند. پس از استقرار گیاهان، تعداد سه بوته در هر گلدان نگهداری و سایر بوته ها حذف شدند. برای هر تکرار دو گلدان در نظر گرفته شد. به منظور اعمال خوسرمایی (Acclimation) گیاهچه ها تا مرحله شش تا هشت برگی در شرایط طبیعی نگهداری شدند. گلدانها ۲۴ ساعت قبل از اعمال دماهای یخ زدگی، آبیاری شدند و بعد در اوایل دی ماه ۱۳۹۰ برای اعمال تیمارهای دمایی به فریزر ترموگرادیان منتقل شده و در معرض ۱۲ دمای یخ زدگی (صفر، ۲- ، ۴- ، ۶- ، ۸- ، ۱۰- ، ۱۲- ، ۱۴- ، ۱۶- ، ۱۸-، ۲۰- و ۲۲- درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند.

در آغاز آزمایش دمای فریزر پنج درجه سانتیگراد بود و پس از قرار دادن نمونه ها، درجه حرارت در هر ساعت به میزان دو درجه سانتیگراد کاهش می یافت. به منظور القاء هستکهای یخ، در دمای ۳- درجه سانتیگراد از محلول حاوی باکتریهای القاء کننده هستک های یخ (INAB) (Ice Nucleation Active Bacteria) استفاده شد (۱۹). برای این منظور سطح برگ گیاهان با لایه نازکی از این محلول اسپری شد. به منظور ایجاد تعادل دمای محیط آزمایش، گیاهان در هر تیمار یخ زدگی به مدت یک ساعت نگهداری شدند و در پایان این مدت و به منظور کاهش سرعت ذوب، نمونه ها به اتاقک رشد با دمای ۱ ±۵ درجه سانتیگراد و تشعشع ۳۰۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه برای مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. بوته ها پس از طی این مدت به شاسی سرد منتقل شدند.

به منظور بررسی درصد نشت الکترولیت ها، جوانترین برگ کاملا توسعه یافته (۵ برگ از هر گلدان) جدا شده و به ظروف شیشه ای حاوی ۷۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر شده منتقل شدند .نمونه ها سپس به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه بر روی شیکر قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (مدل Jenway) ساخت انگلستان اندازه گیری شد (E_1). به منظور اندازه گیری میزان کل نشت الکترولیت ها پس از مرگ سلولها، نمونه ها در اتوکلاو با فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع (PSI) معادل ۱/۰۳ بار و دمای تقریبی ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفته و هدایت الکتریکی نمونه ها دوباره ثبت شد (E_2). درصد نشت الکترولیت ها برای هر تیمار با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد. فلورسانس کلروفیل توسط دستگاه فلورومتر (OS1-F1 chlorophyll Flurometer) و در پنج زمان بازیابی پس از اعمال تنش یخ زدگی [صفر(شاهد)، ۶ ، ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت] اندازه گیری شد. کلیه اندازه‌گیری‌ها روی جوانترین برگ کاملا توسعه یافته (با فاصله از رگبرگ میانی) انجام شد. پارامترهای اندازه گیری شده توسط دستگاه شامل: F'_0 (فلورسانس اولیه برگ خو گرفته به روشنایی)، F'_m (بیشینه فلورسانس برگ خوگرفته به نور)، F'_v (فلورسانس متغیر) و F'_v/F'_m (کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II) بودند.

پس از گذشت ۲۱ روز از انتقال گلدانها به شاسی سرد، درصد بقاء و بازیابی گیاهچه ها با شمارش تعداد بوته های زنده از رابطه ۲ اندازه گیری شد. علاوه بر این در پایان آزمایش صفات مرتبط با رشد از جمله سطح و وزن خشک برگ، طول و وزن خشک ریشه ها و نیز قطر طوقه مورد بررسی قرار گرفت. درجه حرارت کشنده برای ۵۰

درصد نمونه ها بر اساس نشت الکترولیتها (LT_{50el}) بر اساس رسم منحنی های میانگین درصد نشت برگ در مقابل دماهای یخ زدگی بر اساس رابطه ۳ تعیین شد (۹).

رابطه ۱ : درصد نشت الکترولیت ها = $(E_1/E_2)x100$

رابطه ۲

درصد بقا =

[(تعداد گیاهان قبل از تیمار)/ (تعداد گیاهان زنده پس ازتیمار) x۱۰۰]

رابطه ۳ : $El_p= El_1+ [(El_m-El_1) /(1+e^{-B(T-Tm)}]$

در رابطه ۳، El_p (مقدار برآورد شده نشت الکترولیتها) ، El_1 (حد پایین نشت الکترولیتها)، El_m (حد بالای نشت الکترولیتها)، e (۲/۷۱۴) ، B (سرعت افزایش شیب منحنی) ، T (مقدار مطلق تیمار حرارتی) و T_m (نقطه عطف منحنی =LT_{50el}) می باشد. بنا به تعریف، نقطه عطف ، نقطه بین حد بالا و پایین منحنی و یا نقطه تلاقی خط مماس با منحنی است (۲۷). درجه حرارت کشنده برای ۵۰٪ نمونه ها بر اساس درصد بقاء (Survival Lethal Temperature 50) (LT_{50su}) و نیز دمای کاهنده ۵۰٪ وزن خشک (Reduced Dry Matter Temperature 50) ($RDMT_{50}$) با استفاده از رسم نمودار درصد بقاء و وزن خشک اندام های هوایی هر اکوتیپ در مقابل دماهای یخ زدگی تعیین شد.

این مطالعه بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در مورد صفات مرتبط با درصد و نسبت پس از تبدیل داده ها اقدام به تجزیه واریانس شد. تجزیه آماری داده ها با استفاده از نرم افزار 9.1SAS و SlideWrite 2.0 انجام شد و میانگین داده ها با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح آماری ۰/۰۵ مقایسه شدند.

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیکی و درصد نشت و بقا: نتایج این تحقیق نشان دادند که بین اکوتیپ های مورد مطالعه تفاوت معنی داری در کلیه صفات بررسی شده وجود نداشت، لذا ارزیابی تحمل به سرما با میانگین دو اکوتیپ (۶ تکرار) انجام شد. دماهای یخ زدگی تأثیر معنی داری ($P\leq$ ۰/۰۰۱) بر میزان نشت الکترولیت های گیاه نوروزک داشتند. میزان نشت الکترولیتها تا دمای ۲- درجه سانتیگراد تحت تأثیر قرار نگرفت اما با کاهش بیشتر دما، میانگین درصد نشت الکترولیت ها به طور معنی داری ($P\leq$۰/۰۵) افزایش یافته و در دمای ^{o}C ۲۲- به حداکثر ۸۳ درصد رسید (جدول ۱). تأثیر تنش سرما بر میزان نشت الکترولیتها، بستگی به میزان تحمل به یخ زدگی ارقام مختلف گیاهی، متفاوت است. لذا به نظر می رسد شیب منحنی درصد نشت الکترولیتها در مقابل دمای یخ زدگی، در ارقام متحمل به سرما کمتر از ارقام حساس بوده و می تواند بعنوان یکی از نشانه های مقاومت به سرما در نظر گرفته شود (۱۲،۸). یوگنیا و همکاران (۱۴) نیز با ارزیابی میزان مقاومت گیاه *Trifolium hirtum* به تنش یخ زدگی نشان دادند که با کاهش دما از ۶- به ۱۴- درجه سانتی گراد، میزان نشت الکترولیت ها افزایش یافت. نظامی و همکاران (۷) در بررسی اثر تنش یخ زدگی بر نشت الکترولیت های ده رقم کلزا گزارش کردند که با کاهش دما به کمتر از ۴- درجه سانتیگراد درصد نشت الکترولیت ها به طور معنی داری افزایش می یابد. بر اساس نتایج این تحقیق دمای ۱۱/۸- درجه سانتیگراد به عنوان دمای کشنده ۵۰ درصد نمونه-های گیاهی بر اساس نشت الکترولیتها (LT_{50el}) تعیین شد (شکل ۱). در بررسی انجام شده بر روی هفت رقم چغندرقند پاییزه نیز LT_{50el} آنها بین ۱۰/۶- تا ۱۲- درجه سانتیگراد گزارش شده است(۶).

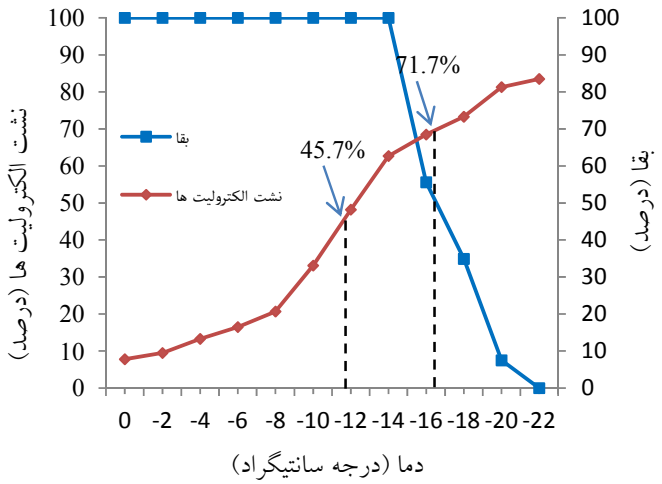
میانگین درصد بقای گیاهان تا دمای ۱۴- درجه سانتیگراد تحت تأثیر قرار نگرفت اما با کاهش بیشتر دما، درصد بقا با شیب تندی کاهش یافت و در دمای ۲۲- درجه سانتیگراد به صفر رسید (شکل ۱، جدول ۱). مطالعه اثر دماهای یخ-زدگی بر درصد بقاء گیاهان رازیانه نیز نشان داد که با کاهش دما به ۱۲- درجه سانتی‌گراد، تنها ۱۵ درصد گیاهان

زنده ماندند (۲۲). بر اساس نتایج حاصل LT_{50su} گیاه نوروزک معادل ۱۶/۵- درجه سانتیگراد و میزان نشت الکترولیتها در دماهای کشندگی نشت و بقا به ترتیب به میزان ۴۵/۷ و ۷۱/۷ درصد شد(شکل ۱).

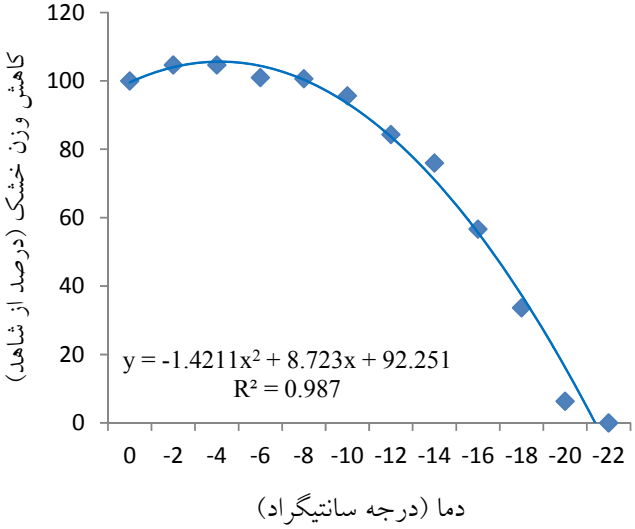
جدول ۱- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی و شاخص‌های درصد نشت و بقا در گیاه نوروزک

تیمار		سطح برگ (سانتیمتر مربع)	وزن خشک برگ (میلی‌گرم /گیاه)	وزن خشک ریشه (میلی‌گرم /گیاه)	قطر طوقه (میلیمتر)	طول ریشه (میلیمتر)	میانگین درصد	میانگین درصد بقاء
دما (درجه سانتیگراد)	صفر	۱۶/۵^{ab}	۱۵۹/۳^{a}	۷۶/۳^{a}	۴/۲^{ab}	۲۳/۲^{a}	۷/۸^{j}	۱۰۰^{a}
	-۲	۱۷/۲^{a}	۱۶۶/۰^{a}	۷۸/۷^{a}	۴/۳^{ab}	۲۳/۲^{a}	۹/۵^{j}	۱۰۰^{a}
	-۴	۱۷/۴^{a}	۱۶۷/۷^{a}	۷۷/۰^{a}	۴/۵^{a}	۲۲/۷^{a}	۱۳/۳^{i}	۱۰۰^{a}
	-۶	۱۶/۶^{ab}	۱۵۹/۷^{a}	۷۹/۳^{a}	۴/۴^{ab}	۲۲/۳^{a}	۱۶/۵^{h}	۱۰۰^{a}
	-۸	۱۶/۴^{ab}	۱۵۹/۳^{a}	۷۶/۳^{a}	۴/۳^{ab}	۲۲/۶^{a}	۲۰/۷^{g}	۱۰۰^{a}
	-۱۰	۱۵/۱^{b}	۱۵۱/۳^{ab}	۷۶/۷^{a}	۴/۰^{abc}	۲۱/۹^{a}	۳۳/۱^{f}	۱۰۰^{a}
	-۱۲	۱۲/۹^{c}	۱۳۳/۳^{bc}	۷۷/۰^{a}	۳/۹^{abc}	۲۲/۰^{a}	۴۸/۲^{e}	۱۰۰^{a}
	-۱۴	۱۱/۶^{c}	۱۲۰/۷^{c}	۷۴/۷^{a}	۳/۸^{abc}	۲۲/۰^{a}	۶۲/۷^{d}	۱۰۰^{a}
	-۱۶	۸/۱^{d}	۹۰/۳^{d}	۷۰/۳^{a}	۳/۷^{bc}	۲۱/۳^{a}	۶۸/۵^{c}	۵۵/۶^{b}
	-۱۸	۴/۶^{e}	۵۳/۷^{e}	۶۷/۷^{a}	۳/۴^{c}	۲۱/۸^{a}	۷۳/۳^{b}	۳۴/۹^{c}
	-۲۰	۰/۹^{f}	۹/۷^{f}	۱۹/۰^{b}	۰/۷^{d}	۶/۷^{b}	۸۱/۳^{a}	۷/۵^{d}
	-۲۲	۰^{f}	۰^{f}	۰^{c}	۰^{e}	۰^{c}	۸۳/۵^{a}	۰^{e}

در هر ستون میانگین‌های دارای یک حرف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۱- تغییرات درصد نشت الکترولیتها و بقا در دماهای یخزدگی در گیاه نوروزک (فلش‌ها بیانگر میزان نشت در LT_{50el} و LT_{50su} هستند)



شکل ۲- تغییرات وزن خشک برگ (درصد از گیاهان شاهد) در دماهای یخزدگی در گیاه نوروزک

نتایج حاصل از صفات مورفولوژیکی مورد مطالعه پس از ۲۱ روز دوره بازیابی نشان دادند که سطح و وزن خشک برگ ها تا دمای ۸- درجه سانتیگراد و پارامترهای مرتبط با ریشه تا ۱۶- درجه سانتیگراد تحت تأثیر قرار نگرفتند اما کاهش بیشتر دما باعث شد تا این صفات با شیب ملایمی کاهش یابند (جدول ۱). به طوری که وزن خشک برگ ها در دمای ۱۸- و ۲۰- درجه سانتیگراد به ترتیب به میزان ۶۶ و ۹۴ درصد در مقایسه با دمای صفر درجه سانتیگراد کاهش یافت. در مطالعه اثر دماهای یخ زدگی بر وزن خشک گیاهان رازیانه نیز مشاهده شد که با کم شدن دما، وزن خشک گیاه کاهش یافت، به طوری که در دمای ۱۲- درجه سانتیگراد وزن گیاهان معادل ۱۴ درصد وزن خشک گیاهان شاهد بود (۲۲). نتایج نشان داد بین درصد بقاء با کلیه صفات مورفولوژیکی همبستگی مثبت و معنی داری ($P\leq$۰/۰۰۱) وجود دارد، به طوری که بالاترین همبستگی بین درصد بقاء با وزن خشک برگ ($r=$۰/۹۸***) مشاهده شد (جدول ۴). همبستگی بین وزن خشک برگ و تیمارهای دمایی حاکی از افزایش نسبی وزن خشک برگ تا دمای ۶- تا ۸- درجه سانتی گراد بعد از دوره بازیابی بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود (شکل۲). در این بررسی، دمای کاهنده ۵۰ درصد وزن خشک ($RDMT_{50}$) گیاهان نوروزک حدود ۱۶/۵- درجه سانتی گراد تعیین شد. نتایج همچنین نشان داد که بین درصد نشت الکترولیتها با درصد بقا همبستگی منفی و معنی‌داری ($r=$ -۰/۸۲***) وجود داشت. علاوه بر این رابطه همبستگی بین این شاخص با کلیه صفات مورفولوژیکی در مرحله بازیابی منفی و معنی دار ($P\leq$۰/۰۰۱) بود (جدول۴). نتایج مشابهی از این نوع همبستگی در تریتیکاله (۲۱) و چغندرقند پاییزه (۶) گزارش شده است.

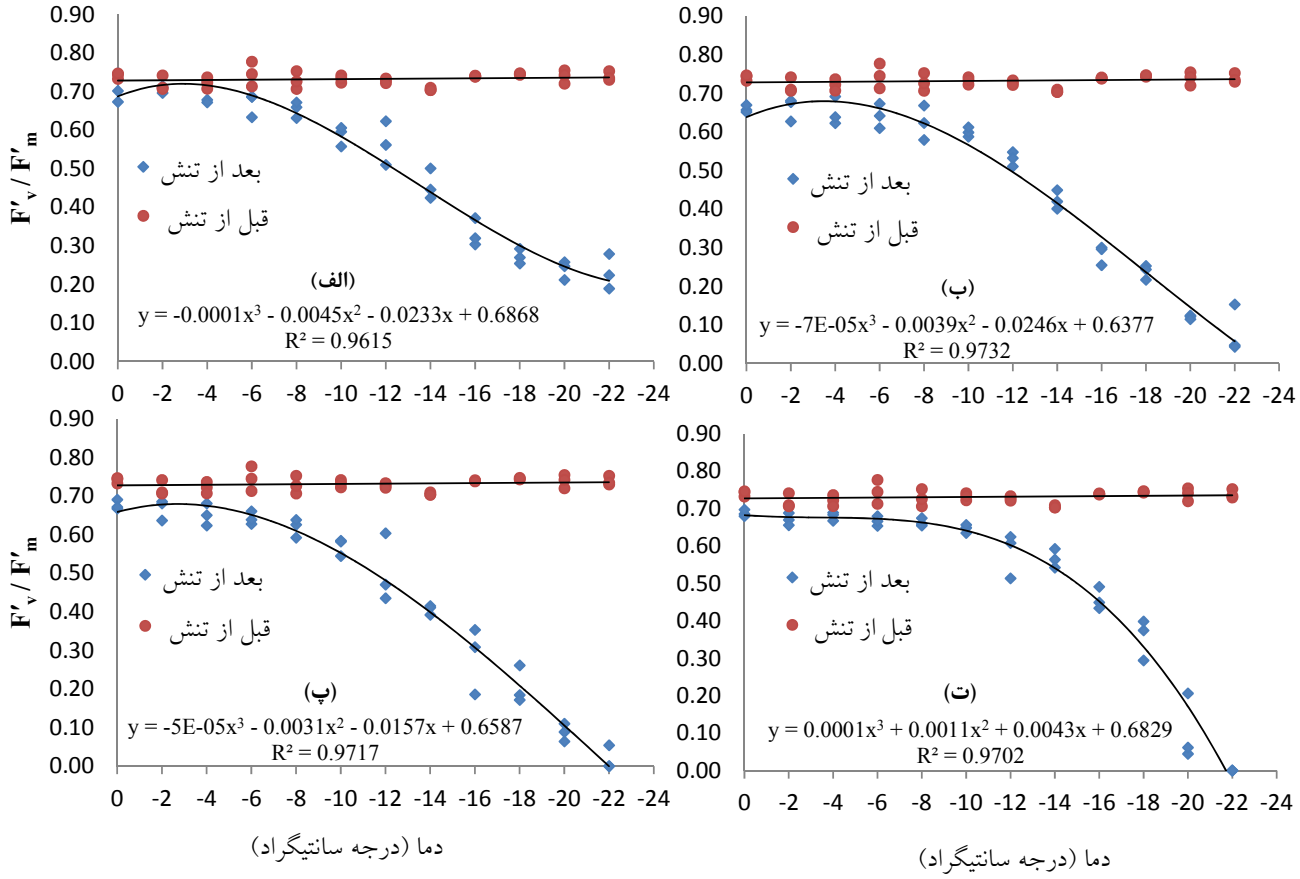
پارامترهای فلورسانس کلروفیل: بررسی نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی و متقابل تیمارهای اعمال شده تأثیر معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۰۱) بر کلیه فاکتور های مربوط به فلورسانس کلروفیل داشتند (جدول ۲). روند تغییرات شاخص F'_v/F'_m در دماهای مختلف یخ زدگی بیانگر این واقعیت است که این شاخص تا دمای ۶- درجه سانتیگراد تحت تأثیر قرار نگرفته اما با کاهش تدریجی دما به ۲۲- درجه سانتیگراد، به میزان ۷۰٪ در مقایسه با دمای صفر درجه سانتیگراد کاهش یافت. نتایج حاکی از عدم اختلاف معنی دار فلورسانس حداقل (F'_0) تا دمای ۱۴- درجه سانتیگراد بود (جدول ۳). در بررسی روند کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II تحت تأثیر دماهای زیر صفر مشاهده شد که مقادیر این کارآیی شش ساعت پس از اعمال تنش (۰/۵۰۹) به میزان ۳۰ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول ۳ و شکل ۳ الف) ولی با گذشت زمان و طی دوره‌های ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تنش یخ‌زدگی این کاهش شدیدتر شد (شکل ۳ ب، پ و ت). به طوری که ۲۴ ساعت بعد از تنش یخ زدگی این شاخص در دمای ۲۲- درجه سانتیگراد تقریباً به صفر رسید. احتمال می‌رود دلیل تأثیر کمتر دماهای پایین در زمان شش ساعت پس از اعمال تنش یخ‌زدگی، ذوب نشدن کامل یخ تشکیل شده در گیاه تا این زمان بوده است ولی پس از گذشت ۱۲ ساعت از اعمال تنش و با ذوب شدن تدریجی یخ های تشکیل شده در گیاه اثرات تخریبی دماهای پایین آشکار شد.

نتایج بررسی تحمل ارقام گندم پاییزه به سرما نشان داد که کاهش دمای محیط باعث کاهش کارآیی فتوسیستم II در ارقام حساس و متحمل شد، ولی میزان این کاهش در ارقام متحمل بصورت معنی داری کمتر از ارقام حساس بود (۳). بررسی میانگین داده‌های کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II در دوره های بازیابی نشان داد، که اعمال تیمارهای یخ‌زدگی اثرات متفاوتی بر این صفت داشت. به طوری که در طی ۲۴ ساعت اول پس از اعمال تیمار، این شاخص به میزان ۴۰ درصد نسبت به قبل از اعمال تنش کاهش یافت ولی پس از آن و با شروع بازیابی گیاه تا ۷۲ ساعت پس از تنش، مقدار F'_v/F'_m افزایش نشان داد (جدول ۳). دای و همکاران (۱۳) نیز نشان دادند گیاه جو توان بازیابی کارآیی

فتوشیمیایی فتوسیستم II در طی ۷۲ ساعت پس از تنش یخ زدگی را داشته ولی مقادیر این پارامتر به دلیل خسارت وارده به مراکز واکنش فتوسنتزی کاملاً به مقادیر قبل از تنش نرسید. جلیلیان و همکاران (۱) نیز کاهش شاخص های حداکثر فلورسانس کلروفیل (F_m) و کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II در ارقام بهاره چغندرقند را دلیل افزایش شدت خسارت یخ زدگی در گیاهان ذکر کردند.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس و میانگین مربعات شاخص‌های فلورسانس کلروفیل در سطوح مختلف تنش یخ‌زدگی و دوره بازیابی در گیاه نوروزک

منابع تغییرات	درجه آزادی	فلورسانس اولیه (F'_0)	بیشینه فلورسانس (F'_m)	فلورسانس متغیر (F'_v)	کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (F'_v/F'_m)
دما (A)	۱۱	۱۰۴۱۴***	۳۰۸۷۳۵***	۲۳۲۱۵۶***	۰/۴۵۹***
دوره بازیابی(B)	۴	۲۷۶۸***	۴۹۱۰۶۱***	۴۸۵۵۱۸***	۰/۴۸۸***
A×B	۴۴	۲۱۶۱***	۲۳۹۸۸***	۱۶۷۷۸***	۰/۰۳۵***
اشتباه آزمایشی	۱۲۰	۱۷۹	۱۲۷۴	۱۰۰۷	۰/۰۰۱۱
ضریب تغییرات (CV)		۷/۴	۷/۵۷	۱۰/۸۸	۶/۲۹
ضریب تبیین (r^2)		۰/۹۱	۰/۹۷۶	۰/۹۷۷	۰/۹۸۴

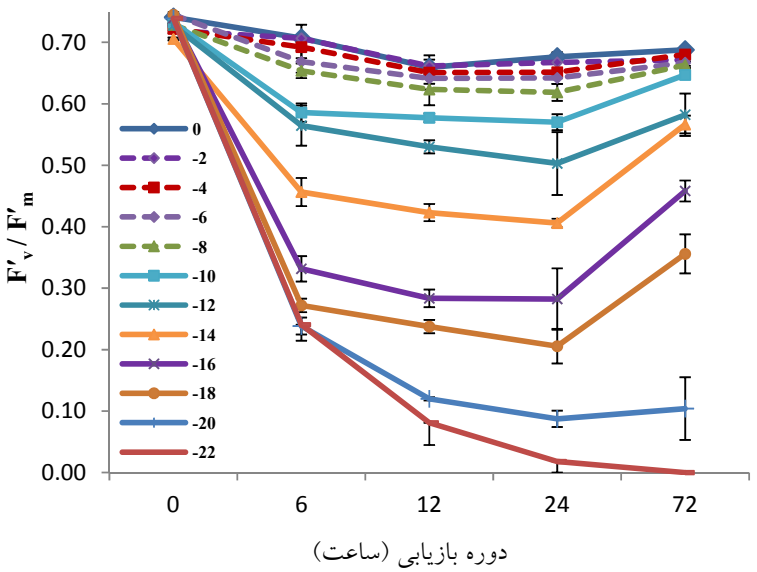


شکل ۳- روند تغییرات F'_v/F'_m در دماهای یخ‌زدگی طی دوره‌های بازیابی ۶ (الف)، ۱۲ (ب)، ۲۴ (پ) و ۷۲ (ت) ساعت در گیاه نوروزک

جدول ۳- مقایسه میانگین پارامترهای فلورسانس کلروفیل در سطوح مختلف تنش یخ‌زدگی و دوره بازیابی در گیاه نوروزک

	تیمار	F'_o	$F'm$	F'_v	F'_v/F'_m
دما (درجه سانتیگراد)	۰	۱۹۴^{a}	۶۳۸^{a}	۴۴۵^{a}	۰/۶۹۴^{a}
	-۲	۱۹۱^{a}	۶۱۰^{b}	۴۲۰^{b}	۰/۶۸۵^{a}
	-۴	۱۸۹^{a}	۵۹۸^{bc}	۴۰۹^{b}	۰/۶۷۹^{ab}
	-۶	۱۹۲^{a}	۵۹۲^{bc}	۴۰۳^{bc}	۰/۶۷۳^{ab}
	-۸	۱۹۳^{a}	۵۷۵^{c}	۳۸۳^{c}	۰/۶۵۷^{b}
	-۱۰	۱۹۶^{a}	۵۳۹^{d}	۳۴۳^{d}	۰/۶۲۷^{c}
	-۱۲	۱۹۴^{a}	۴۸۶^{e}	۲۹۲^{e}	۰/۵۸۱^{d}
	-۱۴	۱۹۲^{a}	۴۲۰^{f}	۲۲۹^{f}	۰/۵۱۲^{e}
	-۱۶	۱۷۷^{b}	۳۵۵^{g}	۱۷۸^{g}	۰/۴۱۹^{f}
	-۱۸	۱۷۴^{bc}	۳۳۰^{g}	۱۵۶^{g}	۰/۳۶۳^{g}
	-۲۰	۱۶۵^{c}	۲۹۰^{h}	۱۲۵^{h}	۰/۲۵۸^{h}
	-۲۲	۱۰۲^{d}	۲۱۹^{i}	۱۱۷^{h}	۰/۲۱۴^{i}
دوره بازیابی (ساعت)	شاهد (قبل از تنش)	۱۸۰^{b}	۶۷۶^{a}	۴۹۶^{a}	۰/۷۳۲^{a}
	۶	۱۹۰^{a}	۴۴۹^{b}	۲۵۹^{b}	۰/۵۰۹^{b}
	۱۲	۱۸۶^{ab}	۴۱۲^{d}	۲۲۵^{c}	۰/۴۵۹^{c}
	۲۴	۱۷۳^{c}	۳۸۷^{e}	۲۱۴^{c}	۰/۴۴۴^{c}
	۷۲	۱۷۰^{c}	۴۳۲^{c}	۲۶۳^{b}	۰/۵۰۷^{b}

در هر ستون میانگین‌های دارای یک حرف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۴- تغییرات کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II طی دوره‌های بازیابی و دماهای مختلف یخ‌زدگی در گیاه نوروزک

نتایج همچنین نشان دادند که پارامترهای وابسته به فلورسانس کلروفیل و بویژه کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II دارای همبستگی مثبت و معنی دار با درصد بقا (۰/۹۶***=r) و منفی و معنی دار با درصد نشت (۰/۹۵***-=r) بودند (جدول ۴). نتایج حاصل از تأثیر دماهای پایین در سه رقم گندم و در کل زمان های اندازه گیری نشان داد که کاهش راندمان کوانتومی فتوسیستم II در رقم بهاره کوهدشت بیشتر از ارقام پاییزه سرداری و نورستار بود (۳). استراتوس و همکاران (۲۶) نیز استفاده از فلورسانس کلروفیل را به عنوان یک شاخص مطلوب در گزینش و مقایسه ژنوتیپ های متحمل به سرمای سویا گزارش کردند.

جدول ۴- ضرایب همبستگی بین سطح و وزن خشک برگ، وزن و طول ریشه، قطر طوقه، درصد بقا، درصد نشت الکترولیتها و پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه نوروزک

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱- سطح برگ	-									
۲- وزن خشک برگ	۰/۹۹***	-								
۳- وزن ریشه	۰/۸۴***	۰/۸۸***	-							
۴- طول ریشه	۰/۸۱***	۰/۸۵***	۰/۹۹***	-						
۵- قطر طوقه	۰/۸۹***	۰/۹۲***	۰/۹۹***	۰/۹۸***	-					
۶-درصد نشت الکترولیتها	-۰/۹۴***	-۰/۹۲***	-۰/۶۹***	-۰/۶۶***	-۰/۷۶***	-				
درصد بقاء	۰/۹۶***	۰/۹۸***	۰/۸۹***	۰/۸۵***	۰/۹۲***	-۰/۸۲***	-			
۸- کمینه فلورسانس (F'_o)	۰/۷۴***	۰/۷۷***	۰/۸۶***	۰/۸۵***	۰/۸۳***	-۰/۶۱***	۰/۷۸***	-		
۹- بیشینه فلورسانس (F'_m)	۰/۹۷***	۰/۹۶***	۰/۷۸***	۰/۷۵***	۰/۸۴***	-۰/۹۸***	۰/۹۱***	۰/۷۴***	-	
۱۰- فلورسانس متغییر(F'_v)	۰/۹۶***	۰/۹۴***	۰/۷۱***	۰/۶۸***	۰/۷۸***	-۰/۹۹***	۰/۸۷***	۰/۶۴***	۰/۹۹***	-
۱۱- F'_v/F'_m	۰/۹۹***	۰/۹۹***	۰/۸۵***	۰/۸۱***	۰/۸۹***	-۰/۹۵***	۰/۹۶***	۰/۷۵***	۰/۹۸***	۰/۹۷***

بررسی روند تغییرات میانگین داده‌های حاصل از اثر متقابل دما و دوره بازیابی نشان داد، تیمارهای دمایی اعمال شده تا دمای ۸- درجه سانتیگراد تغییر محسوسی در کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II ایجاد نکردند، ولی کاهش محسوس در این شاخص از دمای ۱۰- درجه سانتیگراد آغاز شد و این کاهش تا ۲۴ ساعت دوره بازیابی بصورت نزولی بود و پس از آن در دماهای بالاتر از ۱۸- درجه سانتیگراد روند افزایشی داشت (شکل ۴). مطالعه این صفت در دوره های مختلف خوسرمایی در گیاه گندم نیز نشان داد که اختلاف بین دوره های مختلف خوسرمایی از دماهای زیر ۸- درجه سانتیگراد پدیدار شده است (۱۶).

نتیجه‌گیری کلی

تأثیر تنش یخ زدگی بر صفات مورد مطالعه بر اساس شدت تنش متفاوت بود. درصد نشت الکترولیت ها تا دمای ۲°C- درجه سانتیگراد تحت تأثیر قرار نگرفت، ولی پس از آن بتدریج افزایش یافت و در دمای ۲۲°C- به حداکثر رسید. درصد بقای گیاهان با کاهش دما به کمتر از ۱۴°C- با شیب تندی کاهش یافت و در ۲۲°C- کلیه گیاهان از بین رفتند. کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II نیز در دمای ۲۲°C- به میزان ۷۰ درصد در مقایسه با دمای صفر درجه کاهش یافت. گیاه نوروزک توان بازیابی کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II در طی ۷۲ ساعت پس از تنش یخ زدگی را داشته، ولی مقادیر این پارامتر به دلیل خسارت وارده به مراکز واکنش فتوسنتزی کاملاً به مقادیر قبل از تنش نرسید. سطح و وزن خشک برگ ها تا دمای ۸- درجه سانتیگراد و پارامترهای مرتبط با ریشه تا ۱۶- درجه سانتیگراد تحت تأثیر قرار نگرفتند، اما کاهش بیشتر دما

منجر شد تا این صفات با شیب ملایمی کاهش یابند. با وجود تحمل نسبی گیاه نوروزک به دماهای یخ زدگی در شرایط کنترل شده، تحقیقات بیشتر در خصوص ارزیابی تحمل به یخزدگی این گیاه در شرایط طبیعی و تعیین همبستگی صفات مورد مطالعه در مزرعه در مقایسه با شرایط کنترل شده ضروریست.

منابع

۱- جلیلیان، ع.، د. مظاهری، ر. توکل افشاری، م. عبدالهیان، ح. رحیمیان مشهدی، و ع. احمدی. ۱۳۷۸. اثرخسارت یخزدگی در مرحله گیاهچه ارقام مختلف چغندرقند. مجله علوم زراعی ایران، ۴: ۴۱۵-۴۰۰.

۲- زینالی یادگار، ل.، حیدری، ر. و کاراپتیان، ژیرارير. ۱۳۸۹. اثر پیش سرما بر میزان تنفس و مقادیر پرولین و رنگیزه های فتوسنتزی در دانه رستهای گیاه سویا (*Glycine max* L. cv. L17). مجله زیست شناسی ایران. ۲۳ (۳): ۴۱۷-۴۰۹.

۳- مجدی، م.، ق. کریم زاده، و س. محفوظی. ۱۳۸۶ . اثر دمای پایین و کلسیم خارجی بر راندمان کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) و میزان کلروفیل در ارقام گندم حساس و متحمل به سرما. پژوهش و سازندگی، ۷۷: ۱۸۱-۱۷۵.

۴- میرزایی اصل، الف. ، ب. یزدی صمدی، ع. زالی و ی. صادقیان مطهر. ۱۳۸۱. بررسی مقاومت گندم به سرما با روشهای آزمایشگاهی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۶ (۱): ۱۸۶-۱۷۷.

۵- نصیری محلاتی، م. ، ع. کوچکی، پ. رضوانی مقدم ، و ع. بهشتی. ۱۳۸۶ . اگرواکولوژی. (ترجمه). انتشارات دانشگاه مشهد.

۶- نظامی، الف.، ح. خزاعی، م. دشتی، م. مهرآبادی، الف. عیشی‌رضایی و م. احمدی. ۱۳۹۲. ارزیابی شاخص‌های مورفوفیزیولوژیک ارقام چغندر قند پاییزه تحت شرایط تنش یخزدگی در مرحله گیاهچه‌ای. مجله چغندر قند. ۲۹(۱): ۳۱-۱۵.

۷- نظامی، الف.، الف. برزویی، م. جهانی، م. عزیزی و ع. شریف. ۱۳۸۶. نشت الکترولیت‌ها به عنوان شاخصی از خسارت یخزدگی در کلزا. مجله پژوهش‌های زراعی ایران. ۵: ۱۷۵-۱۶۷.

۸- نظامی، الف.، ع. باقری.، ح. رحیمیان.، م. کافی.، و م. نصیری محلاتی. ۱۳۸۵. ارزیابی تحمل به یخ زدگی ژنوتیپ‌های نخود (*Cicerarietinum*) در شرایط کنترول شده. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۴: ۲۶۸-۲۵۷.

9- Anderson, J. A., Kenna, M.P., Taliaferro, C.M. 1988. Cold hardiness of 'midiron' and'Tifgreen'Bermudagrass. Hortscience. 23:748-750.

10- Baker, N.R., Rosenquist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany. 55: 1607-1621.

11- Blum, A. 1988. Plant Breeding for Environmental Stress. CRC Press.

12- Cardona, C.A., Duncan, R.R. and Lindstorm, O. 1997. Low temperature tolerance assessment in Paspalum. Crop Science. 37:1283-1291.

13- Dai, F., Zhou, M. andZhang, G. 2007. The change of chlorophyll fluorescence parameters in winter barley during recovery after freezing shock and as affected by cold acclimation and irradiance. Plant Physiology and Biochemistry. 45:915-921.

14- Eugenia, M., Nunes, S. and Ray Smith, G. 2003. Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. Crop Science 43: 1349-1357.

15- Gusta, L.V., Fowler, D.B. and Tyler. N.J. 1982. Factors influencing hardening and survival in winter wheat. In: P.H. Li, and A. Sakai (ed.). Plant cold hardiness and freezing stress. Vol. II. Academic Press, New York. pp. 23-40.

16- Hasselt, P.R.V. 1996. Chlorophyll fluorescence as a parameter for hardiness in winter wheat: A comparison with other hardiness parameters. Phyton. 36(1) 45-56.

17- Jalili, A. and Jamzad, Z. 1999. Red Data Book of Iran .Research Institute of Forest and Rangeland. No. 215.

18- Kościelniak, L. and Biesaga-Kościelniak, J. 2006. Photosynthesis and non-photochemical excitation quenching components of chlorophyll excitation in maize and field bean during chilling at different photon flux density. Photosynthetica . 44: 174-180.

19- Lindow, S.E., Arny, D.C.and Upper, C.D. 1982. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. PlantPhysiology 70: 1084-1089.

20- Maxwell, K. and Johnson, G. N. 2000; Review article: Chlorophyll fluorescence- A practical guide. Journal of Experimental Botany. 51: 659–668.

21- Nezami, A., Soleimani, M.R., Ziaee, M., Ghodsi, M. and BannayanAval, M. 2010. Evaluation of freezing tolerance of hexaploidTriticale genotypes under controlled conditions. NotulaeScientiaBiologicae. 2:114-120.

22- RashedMohassel, M.H., Nezami, A., Bagheri, A., Haj Mohammadnia, K., and Bannayan, M. 2009. Evaluation of freezing tolerance of two fennel ecotypes under controlled conditions. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 15(1): 131-140.

23- Rechinger, K. H. 1982. Flora Iranica, No. 150: AkademischeDruk-U. VerlagsustaltGratz. Page 439.

24- Sasaki, H., Ichimura. K., Okada, K. and Oda, M. 1988. Freezing tolerance and soluble sugar contents affected by water stress during cold-acclimation and de-acclimation in cabbage seedlings. ScientiaHorticulturae. 1998; 76: 161-169.

25- Shashikumar, K. and Nus, J.L. 1993. Cultivar and winter cover effects on bermudagrass cold acclimation and crown moisture content. Crop Science. 1993; 33: 813-817.

26- Strauss, A.J., Kruger, G.H.J., Strasser, R.J., Heerden, P.D.R. 2006. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. Environment and Experimental Botany. 56: 147-157.

27- Zhu, G.H., Liu, Z.Q. 1987. Determination of median Lethal temperature using the logistical function. P.292-298. In P.H. Li (ed.). Plant cold hardiness. Alan R. Liss. Inc., New York

Effects of freezing stress on Morpho-physiological indices and chlorophyll fluorescence of *Salvia leriifolia* Benth. seedlings

Dashti M.[1], Kafi M.[2], Tavakkoli H.[1], Mirza M.[3] and Nezami A.[2]

[1] Khorasan-e-Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Mashhad, I.R. of Iran

[2] Agronomy Dept., Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

[3] Rangeland and Forestry Research Institute, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

An experiment was carried to evaluatethe physiological and morphological traits and Photochemical efficiency of photosystem IIof *Salvia leriifolia*under freezing stress in controlled condition as a factorial experiment based on completelyrandomized design with three replications in Ferdowsi University of Mashhad. The plants exposed to twelve freezing temperatures (0, -2, -4, -6, -8,-10, -12, -14, -16, -18, -20 and -22˚C)in seedling stage.Leaf area and dry weight, root length and dry weight, Electrolyte Leakage (EL), survival percentage after three weeks and chlorophyll fluorescence parameters in recovery periods (0, 6, 12, 24 and 72 hr. after stress) were studied. Results showed that effect of freezing temperatures on all traits were significant ($P \leq 0.001$). EL increased significantly with decreasing temperature and reached to maximum 83% at -20˚C. Although plant survival percentage did not affect until -14˚C, all seedlings were died in -22^{0}C. Lethal temperature based on survival (LT_{50su}) and electrolyte leakage (LT_{50el}) were -17.0 and -11.8. Results also indicated that Reduced Dry Matter Temperature 50% ($RDMT_{50}$) was -16.5 °C.Photochemical efficiency of photosystemII(F'_v/F'_m) was not affected up to -6˚C, but it decreased by 70% with decreasing temperature to -22˚C. F'_v/F'_mdecreased by 40% during 24 hours after recovery compared to control, but it increased when recovery continued to 72 hr. Results also indicated that EL had negative correlation with survival percent(r= -0.82***) and F'_v/F'_m(-0.95***).

Key words: *Salvia leriifolia*, cold stress, chlorophyll fluorescence, electrolyte leakage