بررسی اثرات کاهش دما بر شاخص‌های نشت یونی، پرولین و پراکسیداسیون لیپیدها در چهار رقم مرکبات زینتی

سیده مرضیه حسینی ولشکلایی[1*]، یحیی تاجور[2]، مسعود آزادبخت[3]

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه فضای سبز موسسه آموزش عالی سنا، ساری

[2] استادیار موسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران

[3] استادیار گروه فضای سبز موسسه آموزش عالی سنا، ساری

*نویسنده مسئول: sepid.hosseini@yahoo.com

چکیده

تنش دمای پایین یکی از عوامل محیطی محدودکننده رشد و تولید گیاهان به‌ویژه ارقام زینتی مرکبات می‌باشد. به همین منظور پژوهش حاضر با اعمال تیمارهای دمای پایین با چهار سطح (۳، صفر، ۳- و ۶- درجه‌سانتی‌گراد) روی چهار رقم مرکبات زینتی (انگشت بودا، کالاموندین، کامکوات، لایم کوات) بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری کشور واقع در شهر رامسر در سال ۱۳۹۴ به اجرا درآمد. نتایج پژوهش نشان داد که تنش دمای پایین و نوع رقم بر شاخص‌های نشت یونی، پرولین و پراکسیداسیون لیپیدها معنی‌دار بود. در حالیکه برهمکنش دما و رقم تنها بر شاخص نشت یونی معنی‌دار شد. بیشترین مقدار نشت یونی در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد و در رقم انگشت بودا مشاهده شد. همچنین حداکثر محتوای پرولین و پراکسیداسیون لیپیدها به‌ترتیب در دماهای ۳- و ۶- درجه سانتی‌گراد حاصل شد. در بین این چهار رقم، انگشت بودا کمترین و کامکوآت بیشترین تحمل‌پذیری به شرایط تنش سرمایی را نشان دادند. بنابراین استفاده از انگشت بودا در فضای سبز شهری می‌تواند با مدیریت صحیح در جهت افزایش تحمل‌پذیری به تنش دمای پایین ممکن گردد.

کلمات کلیدی: ارقام متحمل، تحمل‌پذیری، دمای پایین، فضای سبز شهری

مقدمه

مرکبات یکی از مهم‌ترین محصولات باغی از خانواده *Rutaceae* و زیر خانواده *Aurantioideae* می‌باشد و منشأ آن را مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر جنوب‌شرقی آسیا دانسته‌اند. مرکبات به‌عنوان یک گیاه همیشه‌سبز با رایحه مطبوع در زمان شکوفه‌دهی، یکی از پرکاربردترین گیاهان مورد استفاده در فضای سبز شهری است. یکی از ارقام مرکبات، کامکوات[1] است که دارای تاج کم حجم بوده و می‌تواند درطراحی فضای سبز به‌کار برده شود. انگشت بودا[2] نیز به‌صورت درختچه‌ای کوچک با تاج باز بوده و در مرحله بلوغ، میوه آن به‌شکل انگشت‌های انسان رشد می‌نماید که جلوه خاصی به‌این درختچه می‌دهد. کالاموندین[3] رقم دیگری از مرکبات است که بصورت درختچه بوده و هیبریدی از نارنگی و کامکوات با میوه کوچک می‌باشد (Los et al., 2013). لایم‌کوات[4] رقم دیگری‌است که حاصل تلاقی لایم و کامکوات است و به‌صورت درختچه زینتی در زیباسازی تراس و فضای سبز کاربرد دارد. ایران، کشوری با سابقه وقوع یخبندان‌های متعدد می‌باشد و از جمله یخبندان‌های ثبت شده می‌توان به یخبندان سال‌های (۱۳۴۲، ۱۳۴۷، ۱۳۵۴، ۱۳۸۶و۱۳۹۲ هجری شمسی)

[1] *Fortunella* spp. Swing
[2] *Citrus medica* var.Sarcodactylis
[3] *Citrus madurensis*
[4] Key lime × F.margarita

IrHC2019

اشاره کرد که در اثر آن، بسیاری از درختان و درختچه‌های زینتی کشور به‌خصوص استان‌های شمالی خسارت دیدند. بنابراین یکی از موارد مهم در انتخاب ارقام مناسب برای منظرسازی، شناخت میزان مقاومت آنها نسبت به تنش دمای پایین، خصوصاً شرایط یخبندان است. تنش سرما به‌عنوان یکی از مهمترین تنش‌های محیطی غیر زنده و محدود کننده رشد، بهره‌وری و توزیع جغرافیایی گیاهان، به‌ویژه ارقام زینتی مرکبات را تحت تاثیر قرار می‌دهد و در نهایت باعث کاهش عملکرد گیاهان و حتی مرگ آنها می‌شود. توانایی تحمل‌پذیری گونه‌های مختلف گیاهی و میزان آسیب دیدگی آنها در برابر تنش سرما در بین گونه‌ها و ارقام مختلف گیاهی متفاوت می‌باشد. تنش سرما بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان تاثیر می‌گذارد. به طوریکه با کاهش دما سیالیت غشاء سلولی کاهش یافته و فسفولیپیدها تجزیه می‌گردند و در نتیجه نشت یونی در بافت‌های گیاه رخ می‌دهد (Mahajan and Tuteja, 2005). پرولین نیز به‌عنوان یک اسمولیت، با تاثیرگذاری بر وضعیت اسمزی سلول در حفظ کربن و نیتروژن گیاه در شرایط تنش تاثیر گذاشته و افزایش این اسیدآمینه در شرایط تنش سرمایی موجب کاهش اثرات مخرب ترکیبات فعال اکسیژن می‌گردد. در خصوص تاثیر پرولین بر بهبود سازگاری گیاهان به تنش‌های محیطی و پدیده اکسیداتیو می‌توان به افزایش مقاومت انگور (Ozden et al., 2009) در شرایط تنش سرمایی اشاره کرد. یکی از واکنش‌هایی که در حضور انواع رادیکال‌های فعال اکسیژن سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که باعث تولید آلدئیدهایی مانند مالون دآلدئید (MDA) می‌شوند. افزایش تولید مالون دآلدئید به‌واسطه افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در گیاهچه هلو تایید شده است (Leng and Qi, 2003). با توجه به بروز دوره‌ای تنش یخبندان در کشور و خسارات سنگین به تولیدکنندگان مرکبات پژوهش حاضر به منظور بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشمیایی درختچه‌های زینتی مرکبات در شرایط تنش سرمایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار روی ۴ رقم زینتی مرکبات انگشت بودا (*Citrus medica* var.Sarcodactylis)، کالاموندین (*Citrus madurensis*)، کومکوات (*Fortunella* spp. Swing)، لایم کوات (Key lime×F.margarita) برای استفاده در فضای سبز شهری استفاده شد. این نمونه ها ازگلخانه شرکت باغداری فجرساری فراهم گردید. فاکتورهای مورد مطالعه در پژوهش شامل تنش سرمایی با چهار سطح (۳، ۰، ۳- و ۶- درجه سانتی‌گراد) و چهار رقم مرکبات زینتی شامل (کامکوات، انگشت بودا، کالاموندین، لایم‌کوات) بودند که در پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری کشور (رامسر) در سال ۱۳۹۴ به اجرا در آمد. ابتدا نهال‌های چهار ساله در داخل گلدان‌های ۱۰ کیلویی قرار داده شدند. قبل از شروع تیمارهای دمایی به‌منظور سازگاری ترکیبات گیاهی به‌کاهش دما، نهال‌ها به‌درون انکوباتوری با رطوبت نسبی ۵±۶۵٪ و شدت نور ۱۵۰۰۰ لوکس (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) منتقل شدند. به‌منظور ارزیابی صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاه در شرایط تنش سرمایی، نمونه‌برداری‌های برگی از گیاه آغاز شد. جهت ارزیابی پایداری غشای سلولی (نشت یونی)، بلافاصله بعد از اعمال تیمار دمایی، ۰/۵ گرم برگ برش داده شده، به‌درون لوله‌های حاوی ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر منتقل گردید. این نمونه‌ها به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر شدند و مقدار هدایت‌الکتریکی اولیه محلول (EC_1)، با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو و پس از سرد شدن، هدایت‌الکتریکی ثانویه (EC_2) قرائت گردید. مقدار نشت یونی بر اساس درصد محاسبه گردید. برای تعیین غلظت پرولین برگ نیز نمونه‌های برگی با ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک‌اسید ۱۰ درصد شیکر گردید. سپس این مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس عصاره حاصله با معرف نین‌هیدرین و اسید استیک مخلوط گردید و بعد از قرارگیری درحمام آب‌گرم، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به‌مخلوط نمونه اضافه شد که بعد از تکان شدید دوفاز جداگانه شکل گرفت. سپس جذب فاز رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل ND-1000) قرائت شد (Bares et al., 1973). برای محاسبه میزان مالون‌دی‌آلدئید، ابتدا ۰/۱ گرم از نمونه‌های برگی با دو میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک‌اسید پنج درصد مخلوط و به‌شدت تکان داده‌شد. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ و فاز رویی آن جدا گردید. در ادامه یک میلی‌لیتر از عصاره واکنش با چهار میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد تری‌باربیوتوریک اسید مخلوط و محلول واکنش به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب‌گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سردشدن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ جذب در طول‌موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت و برحسب میلی‌مول بر گرم وزن تر برگ، محاسبه گردید (Nayyar

IrHC2019

et al., 2005). برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ و تجزیه آماری با نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال آماری ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

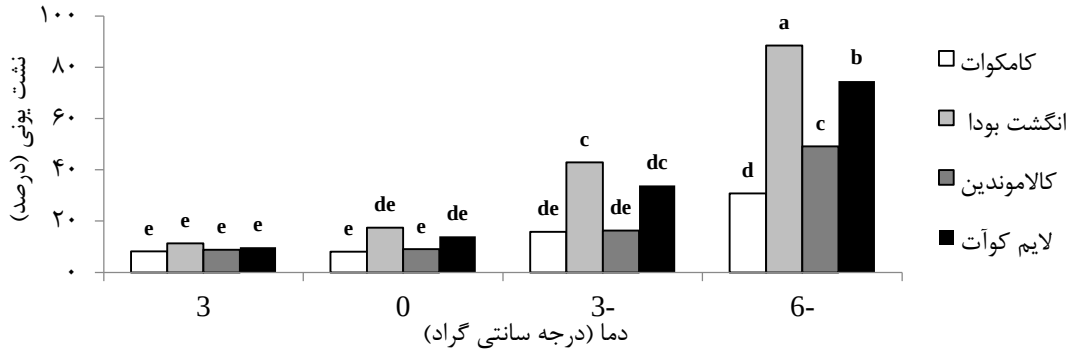
نشت یونی

جدول تجزیه واریانس اثر تنش دمای پایین و رقم بر شاخص نشت یونی نشان داد که عامل ساده رقم، دما و برهمکنش این دو بر این صفت در سطح ۱ درصد تاثیر معنی داری داشت (جدول ۱). با توجه به شکل ۱، مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در تمام تیمارهای دمایی، رقم انگشت بودا بیشترین میزان نشت یونی را نسبت به سه رقم دیگر نشان داد. بیشترین مقدار نشت یونی در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد در انگشت بودا با میانگین ۸۸/۴۶ درصد مشاهده شد. در حالیکه در تیمار ۳ درجه سانتی‌گراد، در هیچکدام از رقم‌ها تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. در توجیه نتایج بدست آمده می‌توان اینگونه بیان کرد که در حقیقت تنش سرمایی با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب کاهش سیالیت و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌شود که در کنار آسیب‌های مکانیکی ناشی از کریستال‌های یخ می‌تواند در تخریب غشاء سلول و افزایش نشت یونی سلول‌ها نیز تاثیر گذار باشد. افزایش نشت یونی در نهال‌های قهوه (Campos *et al.*, 2003) تحت تنش دمای پایین تایید کننده نتایج پژوهش حاضر می‌باشد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در شرایط دمای پایین روی چهار رقم مرکبات زینتی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین‌مربعات		
		نشت یونی	پرولین	پراکسیداسیون لیپیدها
دما	۳	۱۲۰۷/۵۱**	۱۶۴/۶۶**	۲/۳۶*
رقم	۳	۶۱۲۷/۲۳**	۵۰۴/۱۶**	۱۹/۴۱**
دما × رقم	۹	۳۴۶/۰۷**	۱۳/۱۱ns	۱/۰۲ns
خطاء	۳۲	۴۵/۳۴	۱۰/۲۳	۰/۰۴۱
ضریب‌تغییرات (٪)		۲۴/۹۶	۱۹/۹۹	۱۴/۸۱

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد و عدم معنی‌داری



شکل ۱- اثر سطوح مختلف دما بر شاخص نشت یونی برگ کامکوآت، انگشت بودا، کالاموندین و لایم‌کوآت.

IrHC2019

محتوای پرولین

طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، بین چهار رقم مرکبات زینتی، از نظر مقدار پرولین تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد مشاهده شد. کمترین مقدار پرولین (۱۲/۵۷ میلی‌گرم برگرم وزن تر برگ) در انگشت بودا و بیشترین مقدار آن (۲۰/۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) در رقم کامکوات گزارش گردید (جدول ۲). اثر سطوح مختلف دما بر میزان تجمع پرولین نیز در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌دار نشان داد (جدول ۲) . نتایج مقایسه میانگین اثر دما بر میزان تجمع پرولین، نشان داد که کمترین مقدار پرولین در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد و بیشترین مقدار آن در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. با توجه به نتایج جدول ۱، بر همکنش نوع رقم و دما تاثیری بر میزان تجمع پرولین نداشت. بررسی‌ها نشان داد که در شرایط تنش، موادی با وزن مولکولی کم به نام ترکیبات سازگار در سلول تجمع می‌یابند که پرولین یکی از انواع آنها می‌باشد. سنتز این ترکیبات در شرایط دمای پایین به مقدار زیادی افزایش می‌یابد. بنابراین پرولین در سلول‌های تحت تنش، نقش آنتی‌اکسیدانی دارد و رادیکال‌های آزاد (Reactive Oxygen Species; ROS) موجود در سلول را کاهش می‌دهد (An and Penna, 2013). پژوهش روی پایه نارنج در شرایط تنش دمای پایین نشان داد که افزایش محتوای پرولین در این شرایط در جهت تنظیم اسمزی بوده تا با کاهش پتانسیل آب برگ گیاه و تورژسانس سلولی، بقای گیاه را تضمین کند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Rafie rad et al., 2017).

پراکسیداسیون لیپیدها (مالون د آلدئید)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر ساده دما و رقم بر پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی به ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد تفاوت معنی‌دار نشان داد. اما برهمکنش دما و رقم بر این شاخص معنی‌دار نشد. با توجه به جدول مقایسه میانگین اثر رقم بر شاخص پراکسیداسیون لیپید (جدول ۲)، بیشترین و کمترین میزان غلظت مالون دآلدئید به ترتیب در انگشت بودا با میانگین ۱/۵۵ و کالاموندین با میانگین ۰/۹۶ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ مشاهده شد. در بررسی اثر دما بر پراکسیداسیون لیپیدها (جدول ۳) مشاهده شد که بیشترین مقدار در تیمار دمایی ۶- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که نسبت به دمای ۳ درجه سانتی‌گراد حدود ۶۰ درصد افزایش داشت (جدول ۳). در شرایط دمای پایین، رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید می‌گردند. این رادیکال‌ها می‌توانند واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها که منجر به افزایش تولید مالون د آلدئید می‌شود را تسریع کرده و در نتیجه موجب افزایش پدیده‌های آب گزیدگی و نشت یونی در سلول و در نهایت منجر به مرگ بافت گیاهی گردند (Azzarello et al., 2009). افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در شرایط تنش سرمایی روی نارنگی پیچ تایید کننده نتایج پژوهش حاضر می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر رقم بر صفات پرولین و پراکسیداسیون لیپید

رقم	صفات	
	پرولین (mgr/grFW)	پراکسیداسیون‌لیپید (µgr/grFW)
کامکوات	۱۸/۰۳^{a}	۱/۱۷^{ab}
انگشت بودا	۱۲/۵۷^{b}	۱/۵۵^{a}
کالاموندین	۲۰/۱۸^{a}	۰/۹۶^{b}
لایم کوآت	۱۳/۲^{b}	۱/۲۲^{ab}

* میانگین‌هایی که درهر ستون با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشند.

IrHC2019

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر دما بر صفات پرولین، پراکسیداسیون لیپیدها

دما (درجه سانتی‌گراد)	صفات	
	پرولین (mgr/grFW)	پراکسیداسیون لیپیدها (µgr/grFW)
۳	۸/۵۱^{c}	۰/۷۴^{c}
۰	۱۲/۷۴^{b}	۰/۸۶^{c}
-۳	۲۲/۲۸^{a}	۱/۳۵^{b}
-۶	۲۰/۴۲^{a}	۱/۹۲^{a}

*میانگین‌هایی که درهر ستون با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که در شاخص‌های مورد بررسی، اثرات تنش دمای پایین از دمای ۳ و صفر درجه سانتی‌گراد آغاز شد. با کاهش دما تا ۶- درجه‌سانتی‌گراد مقدار نشت یونی، پرولین و پراکسیداسیون لیپیدها افزایش یافت. اگرچه که میزان تغییرات این شاخص‌ها در چهار رقم مرکبات زینتی متفاوت بود. بیشترین مقدار نشت یونی و پراکسیداسیون لیپیدها و همچنین کمترین مقدار پرولین در انگشت بودا مشاهده شد. در حالیکه در بین ارقام مورد مطالعه، کامکوآت کمترین میزان نشت یونی و پراکسیداسیون لیپیدها و بیشترین مقدار پرولین را دارا بود. بنابراین با توجه به این سازو کارهای تحمل‌پذیری به شرایط تنش دمای پایین، انگشت بودا نسبت به سه رقم دیگر حساسیت بیشتری به دمای پایین داشته و باید در مواقع استفاده در فضای سبز با مدیریت بیشتر جهت افزایش تحمل‌پذیری به شرایط تنش مورد استفاده قرار بگیرد.

منابع

An, R. and Penna, S. 2013. Molecular evolution of plant *P5CS* gene involved in proline biosynthesis. Molecular Biology Reports, 40:6429–35.

Azzarello, E., S. Mugnai and C. Pandolfi. 2009. Comparing image (fractal analysis) and electrochemical (impedance spectroscopy and electrolyte leakage) techniques for the assessment of the freezing tolerance in olive. Trees, 23: 159-167.

Bates, LS., Waldren, R.P. and Tears, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for wate stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.

Compose, P.S., Quartin, V., Ramalho, J.C. and Nunes, M.A. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea sp.* Journal of Plant Physiology, 160: 283-292.

Leng, P. and J.X. Qi. 2003. Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress. Scince of Horticultural Amsterdam, 97: 27-39.

Los, D.A., Mironov, K.S. and Allakhverdiev, S.I. 2013. Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. Photosynthesis Research, 116:489–509.

Mahajan, S. and N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Arch. Biochem. Biophys, 444:139–158

Nayyar, H., Bains, TS. and Kumar, S. 2005. Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Environmental and Experimental Botany, 54: 275–285.

Ozden, M., U. Demirel and A. Kahraman. 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H2O2. Scince of Horticultural Amsterdam, 119: 163–168.

Rafie rad, Z., Dordipour, E. and Tajvar, Y. 2017. Evaluation of low temperature tolerance indices in seedling of *Citrus Aurantium* under potassium nitrate nutrition. Iranian Journal of Plant Physiology, 7 (2): 2007- 015.

IrHC2019

Effect of low temperature on ionic leakage, proline and lipid peroxidation in four ornamental citrus cultivars

Seyedeh Marziyeh Hosseini Valashkolee[*δ1], Yahya Tajvar[2], Masoud Azadbakht[3]

M.Sc. Graduated, Department of Landscape, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran

2. Assistant Professor, Horticultural Science Research Institute, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ramsar, Iran

3. Assistant Professor, Department of Landscape, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran

Abstract

Low-temperature stress is one of the environmental factors limiting the growth and production of plants, especially ornamental varieties of citrus. For this purpose, the present study was conducted by low temperature treatments with four levels (3, 0, 3 and 6 °C) on four ornamental citrus cultivars (Kumquat, Fingered citron, Calamondin, and Limequat) as a factorial in a completely randomized design with three replication in the Citrus and Subtropical Fruits Research Center of Ramsar in 2015. The results of this study showed that low temperature and variety had a significant effect on ion leakage, proline, and lipids peroxidation. While the interaction of temperature and variety was significant only on Ionic leakage index. The highest ionic leakage was observed at -6 ° C and in Fingered citron. Also, the maximum proline content and lipid peroxidation were obtained at 3 - 6 ° C, respectively. Among these four cultivars, Fingered citron and Kumquat showed the highest tolerance to cold stress conditions. Therefore, the use of Fingered citron in urban green space can be used with proper management to increase tolerance to low-temperature stress.

***Keywords*:** Tolerant cultivars, Tolerance, Low temperature, Urban landscape

[*] Corresponding author, Email: sepideh.hosseni91@yahoo.com

IrHC2019