القا مقاومت به سرما بر درختان بادام با استفاده از مواد شیمیایی در استان قزوین

گلبهار بابایی [۱]، شکراله حاجی وند [۲*]، رامین عزتی [۳]، محمد مهدی ضرابی [۴]
۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، تهران. ۲- استادیار پژوهشی و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، قزوین. ۴- استادیار دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین.
*نویسنده مسئول shokrollah2006@gmail.com

چکیده

به منظور بررسی اثر القا مقاومت به سرما بر آنزیم های آنتی اکسیدانت و برخی صفات کیفی و کمی در درختان بادام استان قزوین این پژوهش در قالب طرح آماری بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد، و هر پلات آزمایشی شامل سه اصله درخت بود. تیمارها شامل: تیوفر،کراپ اید۱ ، سالیسیلیک اسید ،bio bloom و شاهد بوده که در چهار زمان مختلف (بیش از به خواب رفتن گیاه ، زمان متورم شدن جوانه زنی جوانه ها ،آغاز زمان گلدهی ،هنگام تمام گل) بر روی درختان محلول پاشی شدند.آزمایشات نشان داد که تمام تیمارها میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز را نسبت به شاهد کاهش دادند ولی میزان گایاکول پراکسیداز را نسبت به شاهد افزایش دادند. درمورد آنزیم کاتالاز هم هیچ تغییر معنی داری بین تیمارها و نمونه شاهد مشاهده نشد .همچنین بیشترین میزان پرولین به ترتیب مربوط به تیمار کراپ اید و سالیسیلیک اسید بود و میزان بتایین هم در تمام نمونه ها نسبت به شاهد افزایش معنی داری داشت .نسبت مغز خالص به بادام با پوست چوبی در نمونه شاهد بیشتر ازسایر تیمارها بود . نسبت تعداد میوه به قطر خوشه در همه تیمارها نسبت به شاهد بیشتر بود.در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که تیمارهای ضد سرما هرکدام به نوبه خود باعث افزایش آنزیم های شاخص مقاومت شده و همچنین سبب افزایش خواص کمی در بادام هنگام سرما زدگی گردیدند.

واژگان کلیدی : سرمازدگی ،تنش، سالیسیلیک اسید، پرولین،آنزیم ها

مقدمه

بادام از محصولات عمده کشاورزی در قزوین می باشد که حجم زیادی از تولید این درختان در نتیجه سرمای دیر رس بهاره از بین می رود. در بیشتر مناطق، افزایش مقاومت به سرما مهمترین موضوع اصلاحی می باشد. بنابراین به منظور القاء مقاومت به سرما در درختان میوه این تحقیق در استان قزوین اجرا شد.تنش سرما باعث تجمع انواع اکسیژن فعال در سلول و آسیب رسیدن به لیپیدهای غشا ، پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک می شود(Noctor, and Foyer CH. 1998). و در این خصوص تولید گونه های اکسیژن فعال منجر به پراکسیداسیون لیپیدها (Chen et al.,2000)و از بین رفتن پروتئین(Jiang and Huang,2001)می گردد ، اما در برابر بروز چنین خسارتهایی ، گیاهان به منظور حفاظت در برابر گونه های فعال اکسیژن(ROS)، به دفاع آنتی اکسیدانتی مانند ترکیبات آنزیمهای پراکسیداز و کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز مجهز هستند.که در شرایط تنش گیاهان با تولید ROS در سلولهایشان موجب تحریک و افزایش فعالیت آنزیمهای اشاره شده می شود (Dat et al.,2009). رادیکالهای آزاد اکسیژن مثل سوپراکسید ، هیدروژن پراکسید و رادیکالهای هیدروکسیل در اثر سرما تجمع می یابند(Hasagawa P. M و همکاران). آنتی اکسیدانها با همکاری یکدیگر موجب فرونشانی سمیت رادیکالهای آزاد می شوند و سلولهای گیاهی را در مقابل آسیب دیدگی محافظت می کنند. یکی از این محرکهای زیستی سالیسیلیک اسید (SA) است .(Zhang X., Schimdt R) اکثر شواهد علمی پیشنهاد می کنند که SA نقش کلیدی در ایجاد مقاومت سازگانی و دفاعی دارد (Ehyedi A. J و همکاران)(Esashi Y و همکاران)(Yalpani N., Raskin I.1992). گزارش شده است که در فلفل ذرت و خیار (Kang H. M., Saltiveit M. E) و دانه رست های برنج (Kang H. M., Saltiveit M. E) که با محلولهای سالسیلیک اسید تیمار شده اند SA اثر معنی داری در تحمل به سرما در این گیاهان داشته است. سالیسیلیک اسید یک بازدارنده فعالیت آنزیم کاتالاز که یک آنزیم پاکسازی کننده پراکسید هیدروژن است ، بوده و در

[۱] Crop aid

نتیجه با کاهش فعالیت این آنزیم سبب افزایش این ماده در گیاه می شود .(Hausladen&Alscher.,1993). در گزارشی کاربرد اسید سالیسیلیک در هندوانه مقاومت به سرما را از طریق فعالسازی ظرفیت آنتی اکسیدانتی از جمله آنزیم های گوایاکول پراکسیداز ، آسکوربات پراکسیداز ، کاتالاز ، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز افزایش داد. (Hua–Jing et al.,2008).

پرولین پایدارترین اسید آمینه است که در برابر تنش های اکسیداتیو مقاومت کرده و کم ترین اثر بازدارندگی رابر رشد سلولها در بین تمام اسیدهای آمینه دارد (Kumur و همکاران). تحقیقات انجام شده بر روی زرد آلو و هلو نشان داد که میزان پرولین در فصل سرما از مهر تا اسفند افزایش می یابد(EL-Mansy& Wallker,1996;Lassheen &Chaplin,1971).طبق گزارشات تجمع اسید آمینه پرولین در ارقام پسته تحت تنش سرما افزایش یافت . تجمع این اسید آمینه در گیاهان چند ساله از پاییز تا اواسط زمستان یک رخداد طبیعی فیزیولوژیکی در متابولیسم ذخیره نیتروژن می باشد .(رضا منصوری ده شعیبی و همکاران ۱۳۹۰). در بررسی دو رقم کلزا گزارش کردند که در رقم مقاوم به شوری میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز بیشتر از رقم حساس بود (اشرف و علی ۲۰۰۸) . نتایج پژوهش در چغندر قند نشان می دهد که میزان بتائین تحت تاثیر تنش آبی افزایش می یابد. Brank J.A&Tuma (D.J1993). نتایج آزمایشات نشان می دهد که ارقام مختلف زیتون تحت تنش بیشترین میزان بتائین را دارند. (محمد مهدی ضرابی و همکاران۱۳۸۹).

در این مطالعه اثر مواد شیمیایی بر کاهش سرما زدگی در درختان بادام و نحوه تغییر فعالیت آنزیمهای APX,GPX,CAT و پرولین و بتایین بررسی شده است .

مواد و روش ها

به منظور اثر پیش تیمار مواد ضد سرما بر خواص کمی و کیفی درختان بادام در شرایط تنش سرما این پژوهش در قالب طرح آماری بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد، و هر پلات آزمایشی شامل سه اصله درخت بود. تیمارهای آزمایش شامل: ۱- تیوفر۲- کراپ ایدSA -۴ -۳- bio bloom-۵- شاهد بوده که در۴ زمان تعیین شده بر روی درختان محلول پاشی شدند.

به منظور ارزیابی فعالیت های آنزیمی ابتدا استخراج پروتئین صورت گرفت. اندازه گیری آنزیم پراکسیداز به روشUpadhyaya و همکاران صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل۳۰۰۰ µl بافر و ۴/۵۱ µl H2O2و ۳/۵۱ µl گوئیکول به عنوان الکترون دهنده و ۴۰ µl عصاره برای هر نمونه مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش در کیووت ریخته شد و در ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱۲۰ ثانیه با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد . سنجش آنزیم کاتالاز به روش Maehly & Chen استفاده شد به این منظور مخلوط واکنش شامل ۳۰۰۰ µl بافر و ۸/۵۱ µl H2O2 و۱۰µ عصاره برای هر نمونه به کیووت اضافه شد و در ۲۴۰ نانومتربه مدت ۱۲۰ ثانیه در اسپکتروفتومتر قرائت شد. تغییرات آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روشchen انجام شد. مخلوط شامل۱۹۰۰میکرولیتر بافر و ۳ میکرولیتر H2O2 و ۱۰۰ میکرولیترآسکوربات و ۴۰ میکرولیتر عصاره برای هر نمونه بود و در ۲۹۰ نانومتر به مدت ۱۲۰ ثانیه قرائت شد. برای اندازه گیری پرولین به روش پاکوئین و لچاژر۱۰۰میلی گرم برگ تازه را با استفاده از ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ سائیده و محلول یکنواخت تهیه و عصاره حاصل در۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد . به ۲میلی لیتر از محلول رویی ۲ میلی لیتر معرف ناین هیدرین و ۲میلی لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰درجه در بن ماری جوشانده شدند . لوله های محتوی مخلوط در حمام یخ سرد گردیده و به هر یک از نمونه ها۴ میلی لیتر تولوئن اضافه و تکان داده شد. پس از چند ثانیه دو فاز در لوله ها تشکیل می شود که از فاز بالایی برای اندازه گیری غلظت پرولین استفاده گردید جذب در طول موج۵۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر تعیین شده و با استفاده از محلول استاندارد پرولین خالص رسم گردید . سنجش بتائین به روش گریو انجام شد و مقدار جذب آن در ۳۶۵ نانومتر قرائت گردید.

نتایج و بحث

سنجش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان نشان داد که در مورد آنزیم کاتالاز تفاوت معنی داری بین تیمارهای مختلف و شاهد وجود ندارد و درمورد آنزیم GPX کمترین مقدار مربوط به نمونه شاهد بود که نشان دهنده این است که مواد ضد سرما باعث افزایش آنزیم گوایاکول پراکسیداز می شود .سنجش آنزیم APX نشان داد که بیشترین فعالیت آن مربوط به نمونه شاهد بود و تیمارها هیچ تاثیری در افزایش این آنزیم نداشتند . بررسی در گیاه ذرت هم نشان داده است که SA صدمه سرما را در این گیاه در غلظت ۰/۵ میلی مولار کاهش می دهد و موجب محافظت در مقابل تنش دماهای پایین می شود در این آزمایش نشان داده شده است که تیمار سالیسیلیک اسید هیچ تغییری در فعالیت آنزیمهای آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) نمی دهد ، ولی فعالیت کاتالاز را (CAT) را کاهش می دهد و فعالیت گایاکول پراکسیداز (GPX)و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) بعد از یک روز تیمار با سالیسیلیک اسید افزایش می یابد(Janda A و همکاران). بیشترین میزان پرولین مربوط به تیمار کروپ اید بود وکمترین مربوط به نمونه شاهد که نشان دهنده این است که مواد ضد سرما باعث افزایش پرولین در گیاه شده و مقاومت ایجاد می کنند.در مورد بتایین هم کمترین مقدار مربوط به نمونه شاهد بود(جدول۱). همچنین مشاهده شد که نمونه شاهد دارای پوسته چوبی ضعیفتری نسبت به تیمارهای ضد سرما دارد و وزن مغز در نمونه شاهد بیشتر بود و این هم نشان می دهد که مواد ضد سرما باعث افزایش مقاومت بافتهای چوبی و کاهش وزن مغز میوه می شوند.اندازه گیری نسبت تعداد میوه به قطر خوشه کمترین میزان را در نمونه شاهد نشان داد(جدول۲).

در تفسیر نتایج می توان گفت که مواد ضد سرما باعث افزایش مقاومت گیاه و افزایش آنتی اکسیدانها برای مقابله با سرما می شوند که این آنتی اکسیدانها $O2^-$ ایجاد شده در اثر تنش سرما را به$H2O2$ تبدیل می کنند و سپس آنرا به $H2O$ متابولیزه می کنند. وجود APX علاوه برنقش در متابولیزه کردن $H2O2$ جهت احیاء آسکوربات نیز ضروری به نظر می رسد.

جدول۱: مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی و اسیدهای آمینه تحت سرما زدگی و مصرف مواد ضد سرما

تیمار	میزان پرولین	میزان بتایین	فعالیت کاتالاز	فعالیت گویاکول پراکسیداز	فعالیت اسکوربات پراکسیداز
T1	۰/۰۶۳c	۱/۰۴۵c	۰/۰۵۴a	۰/۰۵۱a	۰/۰۹۲d
T2	۰/۱۱۵ a	۱/۶۳۴b	۰/۰۵۴a	۰/۰۲۴b	۰/۱۴۴c
T3	۰/۰۸۵b	۱/۰۷۷c	۰/۰۵۴a	۰/۰۲۴b	۰/۱۴۴c
T4	۰/۰۶۷c	۱/۹۲۰a	۰/۰۵۴a	۰/۰۱۷c	۰/۲۰۳b
T5	۰/۰۵۲d	۰/۵۴۱d	۰/۰۵۳a	۰/۰۱۰d	۰/۲۲۲a

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی داری ندارند.

T1:تیوفر،T2: کروپ اید، T3: سالیسیلیک اسید ،T4: Bio bloom ،T5: شاهد

جدول ۲:اثر مواد ضد سرما بر صفات اندازه گیری شده درختان بادام

تیمار	تعداد	پوسته سبز	بادام همراه با پوست چوبی	مغز خالص	پوسته چوبی	نسبت مغز به بادام با پوست چوبی	تعدادمیوه/قطرخوشه
T1	۱۰	۵۱/۰۱b	۲۱/۲۳c	۶/۷۵b	۱۴/۴۸c	۰/۳۱۵ b	۱۱/۶۱c
T2	۱۰	۷۰/۹۵ a	۴۳/۲۸ a	۱۱/۹۷a	۳۱/۳۱a	۰/۲۹۲c	۲۰/۸۰a
T3	۱۰	۴۹/۵۶b	۲۴/۵۳c	۷/۷۸b	۱۶/۷۴c	۰/۳۰۷b	۱۵/۵۱b
T4	۱۰	۷۰/۹۷a	۳۷/۸۸ b	۱۱/۰۵۳a	۲۶/۸۳b	۰/ ۳۱۷b	۱۵/۲۳b
T5	۱۰	۶۹/۸۳a	۲۶/۸۳c	۱۰/۲۹a	۱۶/۵۳c	۰/۴۰۲a	۶/۹0d

در هر صفت و گروه مقایسه شده، تیمارهای با حروف یکسان اختلاف معنی داری ندارند.

منابع

ضرابی،م.،طلایی،ع.،لسانی، ح.۱۳۸۷ .اثر تنش خشکی بر خصوصیات مرفوفیزیولوژیک و اناتومیک چندرقم زیتون.نشریه علوم باغبانی.

منصوری ده شعیبی،ر.،داوری نژاد،غ.،حکم آبادی،ح.،تهرانی فر،ع.۱۳۹۰ .ارزیابی تغییرات پرولین،پروتئین کلو قندهای محلول در طی مراحل فنولوزی جوانه گل ارقام پسته .نشریه علوم باغبانی.

Chen, P.W. and P.H. Li. 2002. Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize. Plant Cell Environ. 25:955-962.

Dat, J. F., Foyer, C. H. and Scott, I. M., 1998. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in Mustard seedlings. Plant Physiol. 118: 1455–1461.

Ehyedi A .J., Yalpani N , Silvenman P . and Raskin I(1992). signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pestes. Cell.70: 879-886.

Esashi Y., Wakabyashi S. , Tsukada Y. and sato H .S (1979). Possible involvement of ethylene –stimulated germination of Cocklebur seed . Plant Physiol.63:1039-1043.

hausladen, A and alscher R, G.(1993).Glutathione- active oxygen in plants .In:Alscher R.g. and Hess J.L.(eds),Antioxidants in Higher Plants CRC Press, Boca Raton, pp.12-15

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.

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.

kundu, P. B. and Paul, N. K.(1997).effect of water stress on chlorophyll , prolin and sugar accumulation in rape (Brassica compestris L.). Bangladesh Journal of Botany, 26:83-85

Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:439–463.

Rodrigo, J. 2000. Spring frost in deciduous fruit trees morphological damage and flower hardiness. Sci. Hort. 85:155-173.

Scandalias.J.G. 1993. Oxygen stress and superoxise dismutase. Plant Physiol.101:7-12.

Senaratan. 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.

Yalpani N., Raskin I(1993). Salicylic acid: A systemic signal in plant disease resistance. Trend Microbiol. 1:88-92.

Anti-Forest Induction in Almond Trees using Chemical Treatments in Qazvin Province

Gol-Bahar Babaie[1], Shokrollah Haji Vand[2], Ramin Ezzati[3], Mohamad Mehde Zarabi[4]

3 ,1 Faculty of Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

2 Department of Seed and Plant Improvement, Agriculture and Natural Resources Research Center of Qazvin, Shahid Beheshti BLV., Qazvin, Iran

4Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and technical, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Corresponding Authors: shokrollah2006@gmail.com

Abstract

The current research was conducted to evaluate the induction of antioxidant enzymes and resistance to forest on some quantitative and qualitative traits in almond trees in Qazvin province. The study design was a randomized complete block with three replications and each plot consisted of three trees. The treatments were Tiofer, Crop Aid, Salisilic Acid, Bio bloom and control which were applied in three different times. The results showed that APX significantly reduced in all of the treatments but GPX was increased compared to control in different treatments. There were no significantly differences in the treatments for CAT enzyme. The highest proline is related to crop aid and salicylic acid treatment, so betaine was significantly increased in all of the treatments compared to control. Shelled almonds ratio to almond skin was not significant between the treatments. However the treatments increased the forest tolerances in almond trees and fruit quality.

Keywords: Forest, Salisilic Acid, Proline, Enzyme, Stress