اثرات تنش خشکی روی ویژگی های بیوشیمیایی بادام در شرایط درون شیشه ای

اصغر صفرزاده قویدلان[۱] ، علی ایمانی[۲] ، حامد ترکمن[۳]*، مریم عباسی[٤]

[۱]دانشجوی کار شناسی ارشد دانشگاه پیام نور تهران

[۲]دانشیار پژوهشکده میوه های معتدله و سرد سیری مؤسسه تحقیقات باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ،تهران،ایران

[۳]دانشجوی دکتری تخصصی دانشگاه نازلو، ارومیه، آذربایجان غربی، ایران

[۴] کارشناس ارشد موسسه آموزش عالی مهرگان محلات، محلات، مرکزی، ایران

نوسنده مسئول : حامد ترکمن torkman1990@gmail.com

چکیده

در این تحقیق اثرات مختلف بر ویژگی های بیوشیمیایی بر اثر تنش خشکی روی نمونه های بادام که در شرایط درون شیشه ای کشت شده اند مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه هایی از ۵ رقم تجاری سفید، سهند، 4-12-k، G(6-8) و G(35-8) تحت ۴ سطح مختلف پلی اتیلن گلیکول شامل ۰، ۲، ۴ و ۶ درصد که به ترتیب معادل ۰، ۰/۱۴-، ۰/۳۶- و ۰/۶۶- بار پتانسیل آب می شود به عنوان سطوح مختلف تنش خشکی به مدت ۴ هفته قرار داده شدند. در پایان دوره تنش ویژگی های بیوشیمیایی از جمله پرولین، کربوهیدرات، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید اندازه گیری شد. نتایج آزمایشات نشان داد تنش خشکی در ارقام حساس باعث افزایش بیشتر میزان پرولین می شودکه بیشترین میزان پرولین در تیمارهای ۶ درصد پلی اتیلن گلیکول در رقم سفید (۱۶۵,۱۸۶) بود و مقدار کلروفیل ها در برگ ارقام متحمل در حد بالاتری حفظ گردیده است. غلظت کربوهیدرات محلول گیاهان شاهد کمتر از گیاهان تحت تنش بود.

کلمات کلیدی: بادام ، کشت بافت، پلی اتیلن گلیکول، تنش خشکی، بیوشیمیایی

مقدمه

کشور ایران از مهمترین تولید کنندگان بادام در جهان است واز نظر سطح زیر کشت با ۴۱۲۶۱ هکتار پس از کشور های اسپانیا وامریکا در رتبه سوم واز تولید با ۸۷۰۰۰ تن پس از امریکا ، استرالیا ، اسپانیا، سوریه وایتالیا در رتبه پنجم جهان قرار دارد (Anonymous, 2016). شناسایی ژرم پلاسمهای گیاهی متحمل به شرایط کم آبی ازاهمیت زیادی برخوردار بوده ویکی ازاهداف تحقیقات علمی برای بسیاری از محصولات گیاهی است.ژرم پلاسم های بومی ووحشی ذخیره ژنتیکی ارزشمندی برای خصوصیات فیزیولوژیکی مهمی چون تحمل به خشکی هستند که می توانند مورد شناسایی قرار گرفته و در برنامه های اصلاحی استفاده شوند (Sorkheh *et al.*, 2012).روش های سنتی به نژادی برای انتخاب گیاهان متحمل به خشکی، فرآیندی وقتگیر وپیچیده است. با توجه به تناسبی که بین واکنش سلول ، اندام وکل گیاه نسبت به تنش ها وجود دارد از روش کشت درون شیشه ای برای دست یابی به گیاهان متحمل به خشکی استفاده می شود. از طریق روش های درون شیشه ای می توان تعداد گیاه بیشتری را در زمان کوتاه تر و فضای محدودتر بررسی کرد. با توجه به ثابت بودن محیط کشت مورد استفاده ، شرایط محیطی کنترل شده و اعمال یکنواخت تنش در همه گیاهچه ها می توان اثر سایر عوامل محیطی به جز عامل مورد مطالعه را به طور کامل حذف نمود (اکبرپور وایمانی،۱۳۹۴).با توجه به این که ایران یکی از خاستگاه های اصلی و دارای یکی از غنی ترین ژرم پلاسم های بادام بوده و از لحاظ سطح زیر کشت و تولید این محصول از رتبه بالایی در جهان برخوردار است ، این تحقیق بر آن است تا با استفاده از تکنیک کشت بافت پنج رقم از ارقام مهم تجاری بادام های ایرانی وخارجی را براساس خصوصیات مهم بیوشیمایی مرتبط با تحمل خشکی بررسی نماید و مناسب ترین رقم را از این نظر معرفی نماید تا از آنها در توسعه باغات بادام کشور و برنامه های اصلاحی آینده استفاده لازم به عمل آید.

مواد و روش‌ها

مراحل اجرای این آزمایش در اردیبهشت ماه ۹۶ آغاز گردید و پیش از نمونه برداری، محیط کشت مورد نیاز در آزمایشگاه تهیه شد، برای تهیه ریز نمونه مناسب، شاخه های جوان و ترد رشد کرده در سال جاری از ۵ رقم و ژنوتیپ شامل سفید، سهند، 4-12-k، G(6-8) و

(G(35-8 ۱۰ساله موجود در کلکسیون ایستگاه تحقیقاتی پژوهشکده میوه‌های معتدله وسردسیری کرج وابسته به موسسه تحقیقات باغبانی کشوردر اوایل بهار تهیه شد. آزمایش ها در آزمایشگاه کشت بافت در پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری کرج وابسته به موسسه تحقیقات باغبانی انجام گرفت. در این مطالعه بعد از ضدعفونی ریزنمونه‌ها مراحل استقرار، پرآوری و اعمال تنش تحت شرایط کشت درون شیشه‌ای مورد بررسی قرارگرفت. این تحقیق به صورت یک آزمایش فاکتوریل شامل دو فاکتور در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول ارقام و ژنوتیپ های بادام در ۵ سطح و فاکتور دوم تنش خشکی در ۴ سطح بوده که بر اساس پتانسیل اسمزی محلول غذایی (Ψ_S) بر حسب مگاپاسکال تعیین شد. هر واحد آزمایشی شامل ۲ دانهال بوده تیمارها ۴ سطح مختلف ماده اسموتیک پلی اتیلن گلیکول با جرم مولکولی ۶۰۰۰ با غلظت : ۰ ، ۲، ۴ و ۶ درصد که به ترتیب معادل ۰، ۰/۱۴، ۰/۳۶ و ۰/۶۶ بار پتانسیل آب بوده، شامل بود. مقادیر مورد نیاز PEGبرای برقراری پتانسیل های اسمزی مورد نظر بر اساس دستورالعمل (Michel and Kaufmann 1973) به کمک رابطه ذیل تعیین گردید:

$$\Psi_S = -(1.18 \times 10^{-2})\, C - (1.18 \times 10^{-4})\, C^2 + (2.67 \times 10^{-4})\, CT + (8.39 \times 10^{-7})\, C^2T$$

در رابطه فوق، Ψ_S، C و T به ترتیب پتانسیل اسمزی (بر حسب بار)، غلظت PEG-6000 (گرم در لیتر آب) و درجه حرارت محیط (درجه سانتی گراد) می باشند.

ریزنمونه ها در 3 تکرار برای هر تیمار و به ازای هر ۵ رقم در محیط حاوی PEG کشت شد و به مدت ۴ هفته در این محیط باقی مانده تا تاثیر محیط تنش زا به طور کامل روی آنها نمایان شد و در این زمان بررسی های مورد نظر روی خصوصیات بیوشیمیایی آنها آغاز شد.

نتایج وبحث

با توجه به جدول ۱ ملاحظه می شـــود که اثر رقم بر روی شـــاخص های ویژگی های بیوشـــیمایی در ریزنمونه ها از قبیل پرولین، کربوهیدرات ، کلروفیلa، کلروفیلb ،کارتنوئید و کلروفیل کل ریزنمونه در سطح ۱ درصد معنی دار بوده است. به عبارت دیگر اختلاف معنی داری بین ارقام م شاهده نمی شود. همچنین اثرات تیمار نیز بر روی شاخص های ویژگی های بیو شیمایی ر شدی در سطح ۱ درصـــد معنی دار بوده اســـت.اثر متقابل رقم وتیمار بر روی شـــاخص های ویژگی های بیوشـــیمایی در ریزنمونه ها از قبیل پرولین، کربوهیدرات، کلروفیلa، کلروفیلb ،کارتنوئید و کلروفیل کل ریزنمونه در سطح ۱ در صد معنی دار بوده ا ست (جدول ۱).پرولین تحت شرایط تنش اثرات بیولوژیکی متعددی را نشان میدهد که در اعمال خفاظتی و تعدیل اسمزی می یابند. علاوه بر نقش تنظیم اسمزی، پرولین به عنوان یک محافظ در برابر تنش عمل میکند. از طرف دیگر مشخص می شود در چنین شرایطی تجمع مقادیر بالای پرولین حاکی از شدت تن شی ا ست که گیاه تجربه نموده و دچار آ سیب شده ا ست(Taylor, 1996). نتایج حا صل از اندازه گیری میزان قندهای محلول برگ در جدول تجزیه واریانس نشان داد غلظت کربوهیدرات محلول برگ به طور معنی داری تحت تأثیر ژنوتیپ (رقم) و تیمارهای تنش خشـــکی قرار گرفته اســـت(جدول۱). در پایان دوره تنش، ارقام مختلف بادام تفاوت معنی داری با یکدیگر نشـــان دادند(جدول۱). درپاسخ های اسمزی گیاهان، تجمع کربوهیدرات ازعواملی است که قادر است از اختلالات در غشای سلولی جلوگیری کند. دربیشتر موارد خشکی بر سوخت و ساز قندهای محلول اثر می گذارد و مقدار آنرا افزایش می دهد(Anjum *et al.*,2011). رنگدانه های فتوسـنتز به طور قابل توجهی تحت اسـترس اسـمزی کاهش یافت وکمترین محتوای کلروفیل در برگ های B-124، Sepid ، Mamaei و Ferragnèsدر تیمار۷٪ PEGیافت شد. نسبت کلروفیل به کاروتنوئیدها در کاهش ا سترس ا سمزی به طور معنی داری کاهش نشـــان داد وارقام B-124، Sepid ، Mamaei و Ferragnèsکمترین نســـبت کلروفیل به نســـبت کاروتنوئیدها را در تیمار۷٪ PEGداشتند(Karimi *et al.*,2013).

جدول ۱ نتایج تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری ویژگی های بیوشیمیایی ریزنمونه ها

منبع تغییرات	درجه آزادی	پرولین	کارتنوئید	aکلروفیل	bکلروفیل	کلروفیل کل	کربوهیدرات

ژنوتیپ	4	1045.07**	0.0756**	0.1031**	0.0437**	0.1609**	0.0007**
پلی اتیلن گلیلکول	3	3978.62**	0.0263**	4.2937**	0.2814**	6.5818**	0.0133**
تکرار	2	2.74ns	0.0002ns	0.0031**	0.0015**	0.0091**	0.0002**
ژنوتیپ *پلی اتیان گلیکول	12	11.17**	0.0014**	0.2299**	0.0519**	0.3752**	0.0015**
خطا	38	1.3	0.00007	0.00011	0.00009	0.0003	0.00002
کل	59						

n.s: غیر معنی دار *: معنی دار در سطح ۵٪ **: معنی دار در سطح ۱٪

نتایج میانگین تاثیر تنش خشکی ناشی از پلی اتیلن کلیکول بر خصوصیات بیوشیمیایی در ارقام بادام

نتایج حاصل از اندازه گیری میزان پرولین آزاد موجود در برگ ریز نمونه ها نشان داد که از نظر میزان پرولین تفاوت معنی داری بین تیمارهای تنش ا سمزی مختلف وجود دارد. همچنین تفاوت میزان پرولین در ارقام مختلف نیز معنی دار بوده ا ست. در پژوهش حا ضر مقادیر بیشتری پرولین از برگ ارقام حساس به د ست آمد. همان طور که در جدول (۲) قابل م شاهده ا ست بیشترین میزان پرولین در تیمارهای ۶ در صد پلی اتیلن گلیکول در رقم سفید (۱۶۵,۱۸۶) با بی شترین میزان و پس از آن در رقم سهند (۱۶۱,۰۲۳) بد ست آمد درحالی که در تیمارهای شاهد پلی اتیلن گلیکول در رقم های G(6-8)، (۱۰۳,۵۷) و G(35-8)، (۱۰۵,۷۹) کمترین تجمع پرولین صورت گرفته ا ست. این مطلب ن شان می دهد در تنش های خ شکی بلند مدت و در شرایطی که رطوبت محیطی بالا ا ست، احتمالا غلظت پرولین در برگ ارقام بادام نمی تواند به تحمل به خ شکی آنها کمک نماید. از طرف دیگر م شخص می شود در چنین شرایطی تجمع مقادیر بالای پرولین حاکی از شدت تنشی است که گیاه تجربه نموده و دچار آسیب شده است . نتایج (Karimi et al ۲۰۱۲) و (اکبرپورو ایمانی ۱۳۹۴) نشان داد بیشترین میزان پرولین در تیمارهای ۶ درصد پلی اتیلن گلیکول در رقم شاهرود ۱۲ با بیشترین میزان و پس از آن در رقم شاهرود ۲۱ بد ست آمد در حالی که با افزایش شدت تنش ا سمزی در ارقام مقاوم سوپرنوا و تونو سرعت تجمع پرولین کمتر از سایر ارقام بوده است. این مطلب نشان می دهد در تنش های خشکی بلند مدت و در شرایطی که رطوبت محیطی بالا است، احتمالا غلظت پرولین در برگ ارقام بادام نمی تواند به تحمل به خشکی آن ها کمک نماید. با افزایش تنش میزان تجمع پرولین زیاد تر می شود مطابقت دارد. درپژوهش حا ضر مقدار کلروفیل ها در برگ ارقام متحمل در حد بالاتری حفظ گردیده ا ست. همان طور که درجدول (۲) قابل مشاهده است، در کلروفیل a در تیمارPEG6(%)رقمG(35-8) و K12-4 به ترتیب (۱,۱۷)و(۱,۳۷) کمترین و در کلروفیل b در تیمارPEG6(%)رقمK12-4وG(35-8) به ترتیب (۰,۲۴)و(۰,۴۱) کمترین و درکلروفیل کل پلی اتلین ۶درصد رقمG(35-8) ، (۱,۴۳) کمترین و در کارتنوئید در تیمار PEG6(%)رقمK12-4 وسفید به ترتیب (۰,۰۱۶)و(۰,۰۱۸) کمترین میزان کاهش کلروفیل را داشته اند در حالی که در کلروفیلa در تیمار PEG0(%) رقم سهندوK12-4به ترتیب (۲,۹۲۴)و(۲,۸۳۷) بیشترین و درکلروفیلbدر تیمارPEG0(%) رقمK12-4 وسهند به ترتیب (۰,۶۸۰)و(۰,۶۴۹) بیشترین و درکلروفیل کل شاهد رقم سهندوK12-4به ترتیب (۳,۵۷۳) و(۳,۵۱۸)بیشترین و در کارتنوئید در تیمارPEG0(%)رقمG(6-8)و G(35-8)به ترتیب (۰,۱۲۵)و(۰,۱۱۸) بیشترین میزان کلروفیل را دا شته ا ست.در پژوهش (اکبرپور وایمانی ۱۳۹۴)مقدار کلروفیل ها در برگ ارقام متحمل در حد بالاتری حفظ گردیده است، رقم سوپرنوا و پس از آن رقم تونو کمترین میزان کاهش کلروفیل را داشته اند در حالی که ارقام حساس شاهرود ۱۲ و پس از آن شاهرود ۲۱ بیشتر از سایر ارقام دچار کاهش میزان رنگدانه کلروفیل شده اند. همچنین رقم سهند از این نظر عملکرد متوسطی داشته است. کاهش مقدار کلروفیل میتواند به دلیل افزایش فعالیت کلروفیلاز و یا کاهش فعالیت سنتاز باشد. (Guerfel et al 2009) اظهار داشتند که کاهشی که در میزان کلروفیل برگ گیاهان تحت تنش خ شکی م شاهده می شود یک علامت م شخ صه تنش اک سیداتیوا ست. همچنین(Smirnoff 1993)ن شان داد که کاهش محتوای رنگیزه ها، چه در اثر کاهش سرعت سنتز و چه در نتیجه تجزیه سریع تر آنها یکی از علائم آ شکار تنش اک سیداتیو القاء شده تو سط تنش خ شکی می با شد. نتایج حا صل از اندازه گیری میزان قندهای محلول برگ در جدول (۲) ن شان داد غلظت کربوهیدرات محلول

برگ به طور معنی داری تحت تأثیر ژنوتیپ (رقم) وتیمارهای تنش خشـــکی قرار گرفته اســـت. درپایان دوره تنش، ارقام مختلف بادام تفاوت معنی داری با یکدیگر نشـان دادند. حداکثر غلظت کربوهیدرات مربوط به رقم سـفید بود. حداقل غلظت کربوهیدراتهای محلول مربوط به رقم G(6-8) درتیمار شاهد بود که با سایر تیمارهای شاهد ارقام دیگر تفاوت آماری نشان داد (جدول ۲). درهمه ارقام مورد بررسی ، غلظت کربوهیدرات محلول گیاهان شاهد کمتر از گیاهان تحت تنش بود ولی سهند غظلت سطوح ۲ در صد بیشتر از شاهد بوده و با افزایش سـطح تنش ،کربوهیدرات محلول برگ نیز افزایش یافت. همانطورکه جدول (۲) نشـان می دهند ، در همه ارقام مورد بررسـی، روند افزایشـی درغلظت کربوهیدرات های محلول برگ تحت تأثیر تنش خشـکی مشـاهده می شـود. در دو رقم K12-4 و سهند، با افزایش شدت تنش، غلظت کربوهیدرات محلول به طور مرتب افزایش یافت و درتیمار ۶ درصد پلی اتیلن گلیکول به بالاترین حد خود ر سید. درحالی که در ارقام سفید بیشترین غلظت کربوهیدرات محلول مربوط به تیمار ۴ در صد بود و باافزایش بیشتر شدت تنش،از غلظت کربوهیدرات محلول برگ کاسـته شـد. (جدول۲) وهمچنین نتایج (اکبرپور وایمانی۱۳۹۴)نشـان می دهند، در همه ارقام مورد بررسی، روند افزایشی در غلظت کربوهیدراتهای محلول برگ تحت تأثیر تنش خشکی مشاهده میشود.

جدول ۲ میانگین تاثیر تنش خشکی ناشی از پلی اتیلن کلیکول بر خصوصیات بیوشیمیایی در ارقام بادام

ژنوتیپ×پلی اتیلن گلیکول	کارتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیلb	کلروفیل a	کربوهیدرات	پرولین
Sefid6	0.018j	1.632m	0.212ij	1.42l	1.762a	165.186a
Sefid4	0.032ghi	2.436h	0.499e	1.938g	1.777a	144.37d
Sefid2	0.053bcd	3.247b	0.589c	2.658c	1.656c	134.378f
Sefid0	0.114a	2.485gh	0.55d	1.935g	1.714b	125.497g
Sahand6	0.042defg	1.833l	0.188j	1.645i	1.71b	161.023b
Sahand4	0.023ij	1.622m	0.199j	1.423kl	1.639cd	141.595de
Sahand2	0.036fghi	2.505g	0.266h	2.239e	1.581fgh	131.325f
Sahand0	0.061bc	3.573a	0.649b	2.924a	1.602ef	122.999g
K12-46	0.016j	1.609m	0.24hi	1.37m	1.6f	153.529c
K12-44	0.067b	2.302i	0.633b	1.669i	1.555hij	139.374e
K12-42	0.042defg	2.588f	0.329g	2.259e	1.529jkl	124.942g
K12-40	0.048cdef	3.518a	0.68a	2.838b	1.512l	114.672i
G(35-8)6	0.026hij	1.43n	0.252h	1.178n	1.628de	143.815d
G(35-8)4	0.041defg	1.974k	0.41f	1.564j	1.589fg	123.554g
G(35-8)2	0.038efgh	2.464gh	0.338g	2.126f	1.568ghi	118.835h
G(35-8)0	0.118a	2.978d	0.519e	2.46d	1.546ij	105.791j
G(6-8)6	0.022ij	1.796l	0.341g	1.455k	1.581fgh	141.04de
G(6-8)4	0.028ghij	2.047j	0.246h	1.801h	1.54jk	124.942g
G(6-8)2	0.051cde	2.866e	0.601c	2.265e	1.516kl	117.17hi
G(6-8)0	0.125a	3.162c	0.508e	2.654c	1.477m	103.57j

منابع

۱- اکبر پور، احسان و ایمانی، علی،۱۳۹۴،بررسی برخی خصوصیات فیزیولوژیک ۵ رقم بادام تحت تنش خشکی در شرایط درون شیشه،نهمین کنگره علوم باغبانی ایران،اهواز،،https://civilica.com/doc/724883

2- Anonymous 2016. FAO STAT on the World Wide Web :http: // www .Fao. stat. org / stat / almond

3- Sorkheh, K., Shiran, B., Khodambshi, M., Rouhi, V. and Ercisli, S. (2012). *In vitro* assay of native Iranian almond species (*Prunus* L. spp.) for drought tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(3):395-404.

4- Michel, B.E. and Kaufmann, M.R. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, 51:914-916.

5- Taylor CB 1996. Proline and water deficit: Ups, Ins, and Outs. *Plant Cell* 8: 1221-1224.

6- Anjum SA, Xie XY, Wang LC, Saleem MF,Man C and Lei W (2011) Morphological, physiological and biochemical of plants todrought stress. African Journal of Agriculture Research . 6: 2026-2032

7- Karimi s, A. Yadollahi , K. Arzani ,.2013,. Responses of Almond Genotypes to Osmotic Stress Induced In Vitro., Journal of Nuts .,4(4):1-7,2013

8- Karimi S,Yadollahi A, Moghadam R N, Imani A , Arzani K.(2012). In vitro Screening of Almond (Prunus dulcis (Mill.)) Genotypes for Drought Tolerance . J. BIOL. ENVIRON. SCI, 2012, 6(18), 263-270.

9- Guerfel, M., Baccouri, O., Boujnah, D., Chaibi, W. and Zarrouk, M. (2009). Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119:257-263.

10- Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125:27-58.

Effects of drought stress on the biochemical properties of almonds in the glass environment

Asghar Safarzadeh Ghavidlan [1], Ali Imani [2], Hamed Torkaman [3] *, Maryam Abbasi [4]
[1] M.Sc. student of Payame Noor University of Tehran
[2] Associate Professor of Mild and Cold Fruit Research Institute, Horticultural Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran
[3] PhD students of Nazloo University, Urmia, West Azerbaijan, Iran
[4] Master of Higher Education Institute, Mehregan Mahallat, Mahallat, Markazi, Iran
Corresponding Author: Hamed Torkaman torkman1990@gmail.com

Abstract
In this study, different effects on biochemical properties due to drought stress on almond samples grown in vitro were investigated. Samples of 5 commercial cultivars Sefid, Sahand, k-12-4, (6-8) G and (35-8) G under 4 different levels of polyethylene glycol including 0, 2, 4 and 6%, respectively, equivalent to 0 , -0.14, -0.36 and -0.66 water potential loads were placed as different levels of drought stress for 4 weeks. At the end of the stress period, biochemical properties including proline, carbohydrate, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids were measured. The results showed that drought stress in susceptible cultivars caused a further increase in proline content. The highest proline content was in 6% polyethylene glycol treatments in white cultivar (165.186) and the amount of chlorophyll in the leaves of tolerant cultivars was maintained at a higher level. The concentration of soluble carbohydrates in control plants was lower than plants under stress.
Keywords: Almond, Tissue culture, Polyethylene glycol, Drought stress, Biochemical