

بررسی برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی مرتبط با سرمازدگی در ارقام بادام با زمان گلدهی متفاوت

سید صادق موسوی^{۱*}، بهروز شیران^۱، علی ایمانی^۲، سعداله هوشمند^۱ و اسماعیل ابراهیمی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۳۰)

چکیده

زود گلدهی در ژنوتیپ‌های بومی و سرمازدگی و در نتیجه آن کاهش شدید تولید، از مشکلات عمده تولیدکنندگان بادام در اغلب سال‌ها است. لذا درک صحیح از ویژگی‌های ایجاد مقاومت جهت دستیابی به ارقام مقاوم به سرما با عملکرد بالا و بازارپسندی خوب از اهداف عمده به‌نژادی بادام بشمار می‌رود. در این پژوهش طی یک بررسی مزرعه‌ای از بین ۴۰ ژنوتیپ، چهار ژنوتیپ متفاوت از نظر زمان گلدهی و مقاومت به سرما، شامل دیرگل حساس (Sh12)، میان گل تا دیرگل مقاوم (H)، زود گل مقاوم (G19) و میان گل حساس (D99) انتخاب شد و برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی مرتبط با سرمازدگی در نمونه‌های تهیه شده در مرحله شکوفایی کامل، در شرایط کنترل شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد ژنوتیپ زود گل G19 و ژنوتیپ میان گل D99 به ترتیب دارای کمترین و بیشترین میزان سرمازدگی بودند. در اغلب موارد میزان قندهای محلول و هم‌چنین مقدار عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم در ژنوتیپ‌های مقاوم به‌طور معنی‌داری بیش از ژنوتیپ‌های حساس بود. هم‌بستگی بین میزان سرمازدگی با قندهای محلول، میزان عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم منفی و معنی‌دار بود که می‌تواند بیانگر نقش این ویژگی‌ها در تحمل به سرما باشد. درحالی‌که این هم‌بستگی با شاخص نشت یونی مثبت و معنی‌دار بود. در نمودار بای‌پلات میزان قندهای محلول، مقدار عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم با ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما و نیز میزان سرمازدگی و نشت یونی با ژنوتیپ‌های حساس به سرما در یک راستا بودند. تجزیه خوشه‌ای بر مبنای این ویژگی‌ها به درستی ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم را در گروه‌های جداگانه قرار داد. لذا ضمن این‌که می‌توان از این ویژگی‌ها در شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم استفاده نمود، بهره‌گیری از ژنوتیپ‌های H و G19 در اصلاح ژنتیکی تحمل به سرما و ایجاد ارقام جدید در بادام قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی: بادام، سرمازدگی، شاخص‌های تحمل به سرما، قندهای محلول

۱. گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

۳. گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sadeghmosavifard@gmail.com

مقدمه

بادام (*Prunus dulcis* Mill.) به‌عنوان یک محصول مهم خشکباری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. خاصیت انباری بسیار بالا، سهولت نگهداری و حمل و نقل، ضایعات کم و قابلیت بالای صادرات و ظرفیت کشت بادام در کشور سبب شده، سیاست افزایش سطح زیر کشت آن در طول برنامه‌های توسعه جزء اصلی‌ترین اهداف زیر بخش باغبانی قرار گیرد. (۱۰) از نظر تولید بادام، کشور ایران از زمان‌های گذشته یکی از تولید کنندگان عمده این محصول در جهان بوده و طبق گزارش فائو در سال ۲۰۱۰ ایران رتبه سوم تولید بادام را پس از کشورهای آمریکا و اسپانیا به خود اختصاص داده است (۱۴). ولی طبیعت زود گل بودن آن باعث می‌شود که اغلب از سرمای بهاره آسیب ببینند، در نتیجه گستره تولید بادام به مناطق با زمستان‌های نسبتاً ملایم محدود می‌شود. عامل محدود کننده کشت بادام، نیاز سرمایی پایین جوانه‌های این درخت می‌باشد که باعث زود گل دهی جوانه‌ها می‌شود و در نتیجه جوانه‌های گل و شکوفه‌ها در اواخر زمستان و اوایل بهار از سرمازدگی بهاره آسیب می‌بینند. البته میزان آسیب ناشی از یخبندان، به مرحله نمو گل و نوع رقم بستگی دارد (۲ و ۲۹).

گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که در میان تنش‌های زنده و غیر زنده، درجه حرارت پایین اثرات محدودکننده‌ای روی سیستم گیاهی دارد (۱ و ۱۹). این اثر به‌طور معمول از طریق کاهش فتوسنتز، جذب آب و مواد مغذی و در نهایت کاهش تولید محصول بروز می‌نماید (۵، ۷ و ۹). سرما اجزای سیستم فتوسنتز را از طریق کاهش هدایت روزنه‌ای، تغییر کمپلکس رنگ دانه و کاهش کارایی فتوشیمیایی، تغییر در خصوصیات بیوفیزیکی چربی‌های تیلاکوئید و محدودیت سیستم انتقال الکترون را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به دنبال آن کاهش فعالیت آنزیمی و متابولیسم کربوهیدرات‌ها را در پی خواهد داشت (۱ و ۷). علاوه بر آن سرما توازن بین انرژی جذب شده و استفاده آن توسط متابولیت‌های مقصد را به هم زده و در نتیجه فعالیت‌های آنزیمی بیشتر از فرایندهای فتوفیزیکی و

فتوشیمیایی که در جذب و انتقال انرژی نقش دارند را کاهش می‌دهد (۷). سرمازدگی روی غشای پلاسمایی اثرات سوء می‌گذارد و باعث افزایش نشت ترکیبات شیره سلولی نظیر پتاسیم، اسیدهای آمینه، قندهای محلول و در مجموع الکترولیت‌های مختلف به خارج از سلول می‌شود. گزارش‌ها حاکی از آن است که نشت شیره سلولی در مدت مقاوم‌سازی کاهش می‌یابد که نشانگر افزایش مقاومت به سرماست (۳) و اثر دمای پایین بر همگروه‌های صنوبر توسط رنایوت و همکاران (۲۸) از طریق مطالعه میزان قندهای محلول (ساکارز، فروکتوز و گلوکز) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد افزایش میزان قندهای محلول از مکانیسم‌های مقاومت به سرما می‌باشد. هم‌چنین در آزمایش دیگری میزان تغییرات متابولیکی *Sorbus domestica* L. در شرایط درون شیشه‌ای (*In vitro*) و تحت تنش سرما مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که سطوح فروکتوز، گلیسرول، آنتی‌اکسیدانت‌ها (اسکوربات) و هیدروژن پروکسیداز همراه با فرآیند سازگاری (*Acclimation*) و مقاومت به سرما افزایش پیدا می‌کند (۱۲). تغییر در ترکیب اسیدهای چرب غشاء، تغییرات متابولیکی و تغییر در مقادیر پروتئین، فعالیت‌های آنزیمی و نشت الکترولیت‌های بین سلولی و آمینواسیدها جزء صدمات تنش یخ‌زدگی ذکر شده است (۱۱). با توجه به اهمیت تنش سرمازدگی و اهمیت تولید ارقام مقاوم به سرما هدف از این مطالعه اندازه‌گیری این فاکتورها به عنوان معیار مناسبی جهت تعیین میزان خسارت وارده و انتخاب ارقام مقاوم به سرماست.

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌برداری

این پژوهش در دو بخش باغی و آزمایشگاهی طی سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ در مؤسسه نهال و بذر کرج صورت گرفت. بررسی‌های باغی جهت تعیین ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به سرما، در باغ تحقیقاتی این مؤسسه صورت پذیرفت. در این راستا پارامترهای مرتبط با آسیب‌های سرمازدگی در مراحل

دمای یخ زدگی به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری می‌شد و سپس دما در هر ساعت به مقدار ۲ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یافت تا به ۷ درجه سانتی‌گراد می‌رسید. در مرحله تمام گل (شکوفایی کامل) تحت تأثیر سرمای طبیعی ۳/۵- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. میزان آسیب سرما ۲۴ ساعت بعد از تیمار دمایی مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان آسیب سرما (قهوه‌ای شدن بافت مادگی) هر گلی مبنای آسیب سرما در نظر گرفته شد (۲۹).

اندازه‌گیری عناصر

برای تعیین مقدار عناصر موجود در برگ، پس از شستن و خشک کردن در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت و آماده‌سازی، هضم نمونه‌ها به روش اکسیداسیون تر (Wet Oxidation) با استفاده از اسید سولفوریک ۹۶ درصد، اسید سالیسیلیک، آب اکسیژنه و سلنیم انجام گرفت (۶). مقدار ۳/۰ گرم از نمونه گیاه توزین و پس از انتقال به لوله هضم به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط اسیدها به نمونه‌ها اضافه و به‌دقت تکان داده شد تا تمام ذرات خیس گردند. بعد از ۲ ساعت، لوله‌های هضم روی اجاق، در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. پس از سپری شدن این مدت، لوله‌ها را از روی اجاق برداشته و بعد از خنک شدن سه بار و هر بار ۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه اضافه، و بعد از هر بار افزودن آب اکسیژنه لوله با دقت به هم زده شد تا واکنش با آب اکسیژنه کامل شود. لوله‌ها را مجدداً روی اجاق قرار داده و دمای آن تا ۳۳۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد. پایان عمل هضم موقعی بود که رنگ عصاره بیرنگ یا زرد کم رنگ شد (این عمل ۲ ساعت به طول انجامید).

لوله‌ها را از روی اجاق برداشته و بعد از خنک شدن ۴۸/۳ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و پس از هم‌زدن صاف شد. اندازه‌گیری نیتروژن با روش کج‌لدال و اندازه‌گیری پتاسیم با روش شعله‌سنجی و با دستگاه فلیم فتومتر (Flame Photo Meter) و فسفر به روش رنگ‌سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۸۸۰ صورت گرفت.

مختلف گل‌دهی همچون قهوه‌ای شدن مادگی گل روی ۴۰ ژنوتیپ انجام و بر مبنای این نتایج ژنوتیپ دیرگل حساس (Sh12)، میان گل تا دیر گل مقاوم (H)، زود گل مقاوم (G19) و میان گل حساس (D99) انتخاب شدند. لازم به ذکر است تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی روی پایه GF677 پیوند شده‌اند و عمر آنها در زمان نمونه‌گیری پنج سال بود و در طی این چند سال کلیه عملیات‌های زراعی و باغی به صورت یکسان و مناسب روی این ژنوتیپ‌ها اعمال شد به نحوی که حتی‌الامکان ژنوتیپ‌ها دچار تنش دیگری نشوند و تأثیر تنش سرما را بتوان به گونه مناسب بررسی نمود.

در بخش آزمایشگاهی، اثر سرمازدگی و برخی از پارامترهای فیزیولوژی و مقدار برخی از عناصر پر مصرف در چهار ژنوتیپ بادام انتخابی فوق‌الذکر صورت پذیرفت. در این راستا از هر ژنوتیپ ۳ درخت، به عنوان ۳ تکرار، انتخاب و نمونه‌گیری در مرحله شکوفایی کامل (تمام گل) صورت گرفت. بدین منظور از قسمت میانی درختان تعداد ۶ شاخه مشابه تهیه شد. طول شاخه‌های تهیه شده ۲۵-۲۰ سانتی‌متر بود و هم‌چنین از نظر اندازه قطر و تعداد جوانه یکسان بودند. نمونه‌های تهیه شده بلافاصله در داخل ظروف مخصوص سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید.

نحوه اعمال تنش سرما و ارزیابی میزان خسارت سرمازدگی
پس از نمونه‌گیری، شاخه‌ها به اتاقک رشد مدل (432 L;ASLA Paratos Cientificos, Madrid Spain) منتقل گردید. اتاقک رشد دارای قابلیت برنامه‌ریزی بود به طوری که دامنه دمایی درونی آن از ۲۰+ تا ۳۰- درجه سانتی‌گراد متغیر بود و پنج پروب ترموپار (Thermopar probes) به دیتا لاگزر (Datalogger(LI-100;LI-COR, Inc., Lincoln, Neb)) در نزدیکی نمونه‌ها متصل بود. درجه حرارت در اتاقک رشد روی ۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری می‌شد و سپس در هر ساعت به اندازه ۲ درجه سانتی‌گراد کاهش پیدا می‌کرد تا به درجه مورد نظر می‌رسید. نمونه‌های مورد نظر در

تعیین میزان کل قندهای محلول

قندهای محلول به روش هاسمن و همکاران (۱۲) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره الکلی (۵/۵ گرم از نمونه گل + ۱۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪) با ۳ میلی‌لیتر آنترون تازه تهیه شده [۱۵۰ میلی‌گرم آنترون + ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲٪ w/w (وزنی: وزنی)] به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه روی حمام آب جوش قرار داده شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر (UNICAM UN/VIS Spectrometer) قرائت گردید. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استاندارد گلوکز رسم و میزان قندهای محلول نمونه‌ها بر اساس میلی‌گرم در هر گرم وزن تر جوانه محاسبه شد.

اندازه‌گیری نشت یونی

برای اندازه‌گیری نشت یونی از روش بارانکو و رویز (۴) استفاده شد. برای انجام آزمایش ابتدا از نمونه‌های گل در شرایط تنش، حدود ۵/۵ گرم از هر نمونه برداشته و داخل لوله‌های آزمایش ریخته و حدود ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت با دور rpm ۱۲۰ در شرایط نوری و دمای اتاق (۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد) شیکر شدند. هدایت الکتریکی اولیه (Ec) هر محلول با استفاده از یک هدایت‌متر اندازه‌گیری شد تا مقدار یون‌های آزاد شده در هر تنش مستقیماً به دست آید. لوله‌های آزمایش سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند تا بافت‌ها به طور کامل کشته شوند. بعد از ۲ ساعت شیکر کردن با دور rpm ۲۰۰ در شرایط نوری هدایت الکتریکی مجدداً اندازه‌گیری شد (Ec اتوکلاو شده) تا بازتابی از کل یون‌ها به دست آید. هدایت الکتریکی نسبی در هر شرایط تنش از طریق فرمول زیر محاسبه می‌شود.

$$\text{نسبت هدایت الکتریکی اولیه} = \frac{\text{هدایت الکتریکی اولیه}}{\text{هدایت الکتریکی نهایی}} \times 100$$

نتایج حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه قرار

گرفت و مقایسات میانگین‌ها به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار فیشر (Fisher's LSD) مورد مقایسه قرار گرفتند. به منظور انجام تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها از نرم افزار SAS 9.0 و برای تجزیه هم‌بستگی، تجزیه مؤلفه‌های اصلی، نمودار بای‌پلات و تجزیه خوشه‌ای از نرم افزارهای آماری STATISTICA 8.0 و Minitab 16 استفاده شد.

محل برش و تعیین تعداد خوشه‌ها براساس روش MANOVA انجام گردید و محلی که بیشترین مقدار F را نشان داد به عنوان محل برش تعیین شد (۳۱).

نتایج و بحث

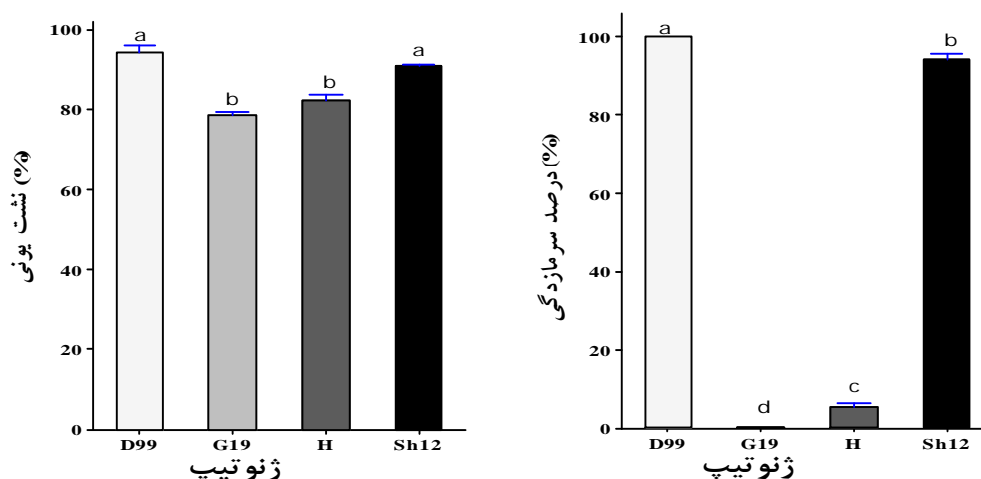
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر کلیه صفات مورد بررسی اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.01$) وجود دارد که نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها از نظر صفات مورد نظر است.

در بین ژنوتیپ‌ها ژنوتیپ D99 بیشترین میزان سرمازدگی (۱۰۰ درصد) و ژنوتیپ G19 کمترین میزان سرمازدگی (صفر درصد) را داشت. مقایسه میانگین میزان سرمازدگی نیز (شکل ۱) نشان داد که بین تمامی ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد با این وجود ژنوتیپ‌های G19 و H دچار کمترین آسیب سرمازدگی و دو ژنوتیپ Sh12 و D99 بیشترین آسیب سرمازدگی را داشتند. تفاوت ۴ ژنوتیپ بادام (D99, H, G19) و Sh12) در مقابل آسیب سرمایی در مراحل یکسان فنولوژیکی می‌تواند به تفاوت در چندین فاکتور از جمله ساختاری، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مربوط باشد. در این پژوهش تفاوت بالایی بین ژنوتیپ‌های مختلف در مقاومت به سرمای بهاری در مراحل یکسان فنولوژیکی مشاهده شده است. این نتایج ممکن است این حقیقت را توضیح دهد که بسیاری از فاکتورها ممکن است روی مقاومت گل یا جوانه به سرمازدگی مؤثر باشد که هنوز ناشناخته هستند یا کنترل شان مشکل است. هم‌چنین نتایج آزمایشات مزرعه‌ای که از سرمای طبیعی حادث شده بود نیز نشان داد که شدت آسیب به شدت تحت تأثیر رقم

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی در آزمایشگاه

منابع تغییرات	درجه آزادی	سرمازدگی (درصد)	نشت یونی (درصد)	قندهای محلول (میلی گرم در هر گرم وزن تر جوانه)	نیترژن (درصد)	فسفر (درصد)	پتاسیم (درصد)
ژنوتیپ	۳	۸۹۶۰/۵۱**	۱۶۱/۳۴**	۲۶۶/۹۷**	۰/۶۸۲**	۰/۰۱۰۹**	۰/۷۱۲**
خطا	۸	۱/۶۷	۴/۲۰	۲/۱۶۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۳۲
CV%		۲/۵۸	۲/۳۷	۵/۲۱	۲/۴۲	۳/۹۹	۱/۲۰

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد است.



شکل ۱. مقایسه میانگین صفات درصد نشت یونی (Ion leakage) و درصد سرمازدگی (Freezing injury) در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

از نظر میزان نشت یونی بین ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌دار (جدول ۱) وجود داشت با این وجود مقایسه میانگین این ویژگی (شکل ۱) نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مقاوم (G19 و H) و حساس (D99 و Sh12) اختلاف معنی‌دار وجود ندارد. در بین ژنوتیپ‌ها، ژنوتیپ D99 بیشترین درصد نشت یونی (۷۸/۵۸) و ژنوتیپ G19 کمترین درصد نشت یونی (۲۸/۹۴) را داشت. مقایسه نتایج حاصل از میزان سرمازدگی و درصد نشت یونی نشان داد که بین این دو ویژگی ارتباط مثبتی وجود دارد به گونه‌ای که ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما که دچار خسارت سرمازدگی کمتری شده بودند دارای درصد نشت یونی کمتری بودند. مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از

قرار می‌گیرد به طوری که ارقام G19 و H مقاومت بیشتری نسبت به ارقام D99 و Sh12 دارند.

مرحله فنولوژیکی می‌تواند در رابطه با آسیب‌سرمایی اهمیت زیادی داشته باشد. درختان در مرحله گلدهی و ریزش گلبرگ بیشتر تحت تأثیر دماهای پایین قرار گرفته و حساس‌تر می‌باشند (۲۶). طبق نتایج گزارش میراندا و همکاران (۲۱)، گونه‌های جنس پرونوس از جمله بادام قبل از گلدهی به سرما مقاوم هستند اما در مرحله تمام‌گل و مراحل بعدی نسبت به مراحل قبل از گلدهی (مرحله خواب عمیق جوانه گل) حساس به سرما هستند، ولی در شرایط یکسان فنولوژیکی نوع ژنوتیپ تعیین‌کننده است (۱۹).

نظر شاخص نشت یونی نشان داد (شکل ۱) که بین این ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد و ارقام بادام از آن گروه از گیاهانی هستند که میزان نشت الکترولیتی گل‌هایشان در پاسخ به تنش یخ زدگی افزایش می‌یابد. بنابراین از این طریق می‌توان میزان حساسیت و یا مقاومت ارقام را به یخ زدگی ارزیابی نمود به عبارت دیگر می‌توان این صفت را به‌عنوان یک شاخص جهت شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم از حساس استفاده کرد.

ایمانی و همکاران (۱۵) با مطالعه روی ۶۰ ژنوتیپ بادام دریافتند که بین میزان نشت یونی و میزان خسارت حاصل از سرمازدگی ارتباط وجود دارد و ارقامی که دارای نشت یونی پایین‌تری هستند به تنش سرما مقاوم‌تر می‌باشند. هم‌چنین مطالعات نشان‌دهنده این است که مقدار نشت الکترولیت‌ها با شدت آسیب وارده بر سلول‌های گیاهی متناسب است با این حال، در چنین شرایطی سلول‌های مرده تمام محتوی خود را تخلیه می‌کنند. اگر تراکم سلول‌های آسیب دیده در بافت‌های مورد آزمایش، در پاسخ به تنش یخ زدگی تغییر کند، یعنی برخی از سلول‌ها از بین بروند و برخی دیگر زنده بمانند، در نتیجه، مقدار الکترولیت‌های نشتی نیز متناسب با تعداد این سلول‌ها تغییر خواهد کرد. بنابراین نتایج حاصل از این روش می‌تواند به نوع بافت، شدت تنش یخ زدگی و جنس و گونه بستگی داشته باشد (۴ و ۱۷).

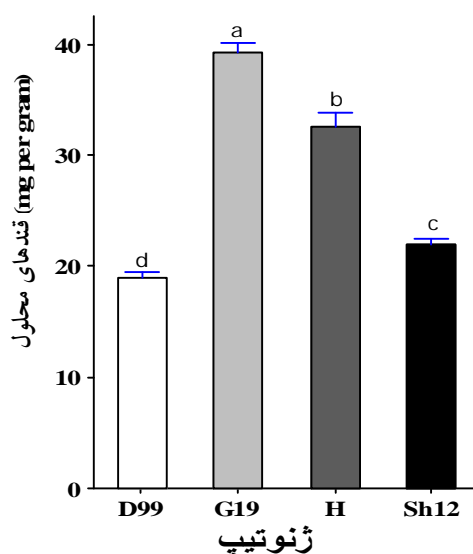
بررسی‌ها نشان داده است که میزان تحمل به سرما در بین واریته‌ها و ارقام زراعی گونه‌های مختلف متفاوت است و مقدار نشت الکترولیتی آنها در پاسخ به تنش یخ‌زدگی یکسان نیست (۱۶ و ۱۸). معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین نشت الکترولیتی ژنوتیپ‌ها در این پژوهش نیز به این دلیل است. یاماداد و همکاران (۳۴) و یوسفی (۳۳) با بررسی نتایج آزمایشات خود، به این نتیجه رسیده‌اند که نشت الکترولیتی از بافت‌های تحت تنش یخ‌زدگی، در برخی از گیاهان دیده می‌شود. آنها هم‌چنین عنوان نموده‌اند که پدیده نشت الکترولیتی، یک صفت عمومی برای اکثر گونه‌های حساس به یخ‌زدگی هست.

با توجه به نتایج به‌دست آمده و به استناد به این‌که مطالعات مربوط به نشت یونی به عنوان شاخص فیزیولوژیکی مهم و معتبر در گزینش ارقام مقاوم به سرما در گیاهان، توسط سایر پژوهشگران گزارش شده است (۸، ۳۳ و ۳۴) می‌توان بیان نمود که ارقام G19 و H مقاومت بیشتری نسبت به ارقام D99 و Sh12 دارند.

از نظر میزان قندهای محلول بین ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌دار (جدول ۱) وجود داشت. مقایسه میانگین این ویژگی (شکل ۲) نشان داد که بین تمامی ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در بین ژنوتیپ‌ها، ژنوتیپ G19 بیشترین میزان قندهای محلول (۳۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر جوانه) و ژنوتیپ D99 کمترین میزان قندهای محلول (۱۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر جوانه) را داشت.

اختلاف معنی‌دار از نظر میزان قندهای محلول نشان‌دهنده آن است که ارقام مختلف از نظر میزان قندهای محلول متفاوتند. از طرفی بین میزان سرمازدگی و میزان قندهای محلول در بین ارقام ارتباطی وجود داشت به طوری که رقمی که دارای بیشترین میزان قندهای محلول بود بیشترین میزان مقاومت به سرما را داشت. گیاه با از دست دادن تدریجی آب، غلظت مواد درونی را از جمله میزان قندهای محلول را افزایش می‌دهد و به این ترتیب از آسیب حاصل از تنش سرمازدگی و یخ‌زدگی می‌کاهد (۱۳ و ۳۲). هانتی و همکاران (۱۳) در مطالعه‌ای روی تغییرات قندهای محلول در اسپوره‌های ارقام انتخابی گلابی در جریان خواب نتیجه‌گیری نمودند که میزان قندهای محلول در جوانه‌های ارقام حساس کمتر از ارقام متحمل به سرما بوده است. تجمع ساکارز در سلول پس از قرار گرفتن در معرض درجه حرارت‌های پایین می‌تواند مهم‌ترین واکنش در فرایند سازگاری به سرما در بیان ژن‌های عامل مقاومت به سرما باشد.

از نظر عناصر ازت، فسفر و پتاسیم بین ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین این عناصر (شکل ۳) نشان داد که بین تمامی ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد. ژنوتیپ G19 که ژنوتیپی مقاوم به سرما بود بیشترین میزان عناصر را داشت و ژنوتیپ D99 که ژنوتیپی

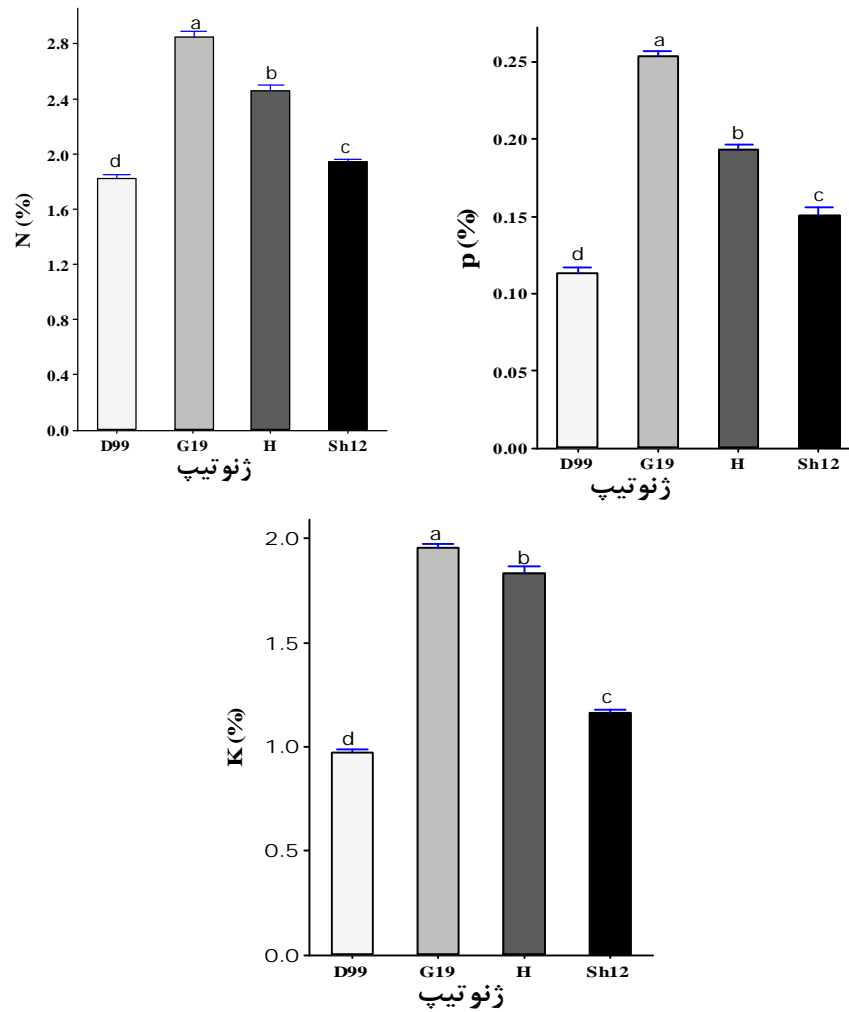


شکل ۲. مقایسه میانگین قندهای محلول (میلی‌گرم در گرم وزن تر جوانه) در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

مطالعات ناچی و همکاران (۲۴) در رابطه با تأثیر سرمازدگی روی وضعیت عناصر ماکروی برگ هشت رقم سیب در شرق مجارستان نشان داد میزان سرمازدگی به طور معنی‌داری تحت تأثیر جذب عناصر و فرایند ذخیره‌ای آنها قرار می‌گیرد. بنابراین نشان داده شده است که مدیریت تغذیه درختان میوه در کنترل سرمازدگی در فصول سرمازدگی خیلی مهم است (۲۴، ۲۵ و ۳۰).

از شاخص‌های متعددی برای انتخاب ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش سرما استفاده می‌شود. برای تعیین بهترین شاخص تحمل، ضریب هم‌بستگی بین این شاخص‌ها و میزان خسارت سرمازدگی در شرایط تنش محاسبه شد (جدول ۲). همان‌طور که در جدول ضرایب هم‌بستگی دیده می‌شود درصد سرمازدگی با شاخص‌های قندهای محلول و هم‌چنین عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم ارتباط منفی و معنی‌دار و با شاخص‌های نشت یونی ارتباط مثبت و معنی‌داری دارد لذا شاخص‌های قندهای محلول و عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم را می‌توان به عنوان شاخص‌های مثبت در جهت انتخاب ارقام مقاوم به سرما در نظر گرفت. نتایج حاصل از این گزارش با نتایج هانتی و همکاران (۱۳) در رابطه با مقاومت ارقام انتخابی سیب به آسیب

حساس بود کمترین میزان این عناصر را داشت. این آزمایش نشان داد که ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم از نظر عناصر ماکرو متفاوت بوده و لذا می‌توان بین وضعیت عناصر در گیاه و میزان خسارت ارتباطی در نظر گرفت به گونه‌ای که ارقام با میزان عناصر بالا احتمالاً مقاومت بیشتری نسبت به سرما دارند. در سال‌های اخیر نوسان عملکرد بادام یکی از مشکلات عمده تولید این محصول در کشور بوده است (۱۰). این نوسانات در اغلب موارد از تغییرات شرایط اقلیمی و بویژه سرمازدگی در فصل بهار ناشی می‌شود (۳۰). مقاومت به سرمازدگی در گیاهان عمدتاً با وضعیت تغذیه آنها ارتباط دارد (۲۴). از طرف دیگر درصد آسیب ناشی از تنش سرما بر مبنای آزمایش نشت یونی نیز مشخص نموده است که عمده‌ترین عنصر آزاد شده در سلول‌های صدمه دیده پتاسیم، یکی از عنصر غذایی، می‌باشد (۲۰). نتایج بررسی حاضر نیز نشان داد بین ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری از نظر میزان پتاسیم وجود دارد (شکل ۳) به گونه‌ای که ژنوتیپ‌های G19 و H که مقاوم به سرما هستند از نظر میزان پتاسیم دارای مقدار بیشتری بوده و ژنوتیپ‌های D99 و Sh12 که حساس بوده‌اند از نظر مقدار این عنصر در رتبه پایین‌تری قرار گرفته‌اند.



شکل ۳. مقایسه میانگین عناصر فسفر، پتاسیم و نیتروژن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

جدول ۲. ضرایب همبستگی پیرسون بین صفات مورد مطالعه

نیتروژن	پتاسیم	فسفر	قندهای محلول	درصد سرمازدگی	درصد نشث یونی	
						درصد نشث یونی
				۱	۰/۹۴	درصد سرمازدگی
			۱	-۰/۹۵	-۰/۹۷	قندهای محلول
		۱	۰/۹۷	-۰/۹	-۰/۹۴	فسفر
	۱	۰/۹۴	۰/۹۷	-۰/۹۹	-۰/۹۶	پتاسیم
۱	۰/۹۶	۰/۹۸	۰/۹۸	-۰/۹۵	-۰/۹۴	نیتروژن

همه ضرایب همبستگی در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنی‌دار می‌باشند.

جدول ۳. مقادیر ویژه و بردار ویژه ۶ شاخص مرتبط با تحمل به سرما برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

PC6	PC5	PC4	PC3	PC2	PC1*	
۰/۱۸۶	۰/۲۱	۰/۵۳۲	-۰/۲۶۷	۰/۶۳۶	-۰/۴۰۳	درصد سرمازدگی
۰/۴۱۵	-۰/۶۶۹	۰/۲۳۷	۰/۳۹	۰/۰۴۷	-۰/۴۱۲	درصد نشت یونی
۰/۷۰۱	-۰/۴۵۲	۰/۲۰۴	۰/۲۶۶	۰/۱۴۶	۰/۴۱۲	قندهای محلول
۰/۳۳۹	-۰/۳۱۱	-۰/۳۶۲	-۰/۳۲۴	۰/۶۲۵	۰/۴۰۳	فسفر (درصد)
۰/۲۷۵	-۰/۱۳۹	۰/۶۴۵	-۰/۴۵۱	-۰/۳۴۳	۰/۴۰۹	پتاسیم (درصد)
۰/۳۳۱	۰/۴۳۴	۰/۲۶۸	۰/۶۳۱	۰/۲۵۴	۰/۴۱	نیترژن (درصد)
۰	۰	۰	۰/۰۱۶۳	۰/۱۱۷	۵/۸۶۷	مقدار ویژه
۰	۰	۰	۰/۰۰۳۰	۰/۰۱۹	۰/۹۷۸	سهم هر مؤلفه
۱	۱	۱	۱	۰/۹۹۷	۰/۹۷۸	سهم تجمعی

PC1*: ضرایب مؤلفه اول

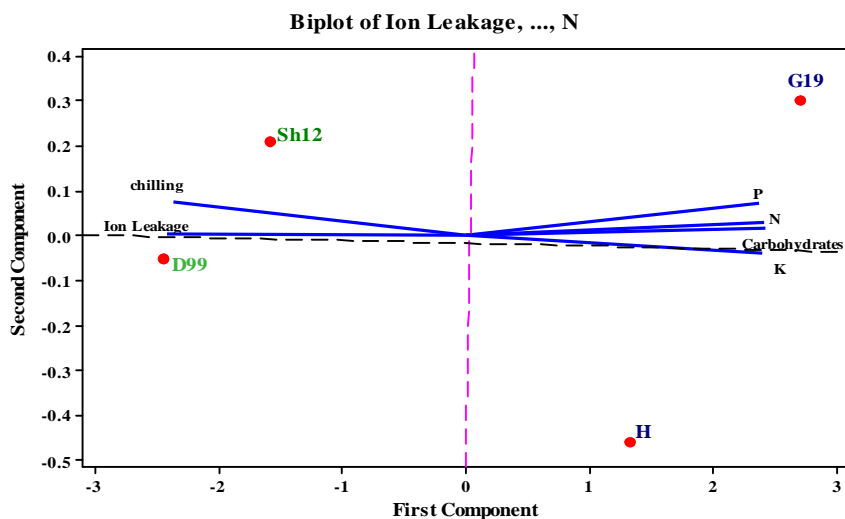
هم‌چنین هم‌بستگی منفی با دو شاخص نشت یونی و درصد سرمازدگی است. با توجه به این که پائین بودن میزان این شاخص‌ها مطلوب است، لذا اگر مقدار مؤلفه اول را در نظر بگیریم، ژنوتیپ‌هایی برگزیده می‌شوند که در شرایط تنش سرما دارای تحمل بالاتر نسبت به سرما هستند و هم‌چنین درصد سرمازدگی پائین‌تری نیز دارند. به عبارت دیگر این مؤلفه قادر به جداسازی ژنوتیپ‌های متحمل به سرما از ژنوتیپ‌های حساس به سرماست. بنابراین می‌توان آن را به عنوان مؤلفه تحمل به تنش سرما در نظر گرفت.

دومین مؤلفه‌های اصلی ۱/۹ درصد از تغییرات کل داده‌ها را توجیه می‌کند. این مؤلفه با وجود این‌که با عنصر پتاسیم هم‌بستگی منفی دارد ولی هم‌بستگی این مؤلفه با درصد سرمازدگی بالاست (۰/۶۳۶). لذا این مؤلفه نیز به ما کمک می‌نماید که ژنوتیپ‌هایی را انتخاب نمائیم که در مواجهه با تنش سرما دچار آسیب دیدگی کمتری شوند. بنابراین با بالا در نظر گرفتن آن، می‌توان ژنوتیپ‌هایی را انتخاب نمود که متحمل به تنش سرما باشند.

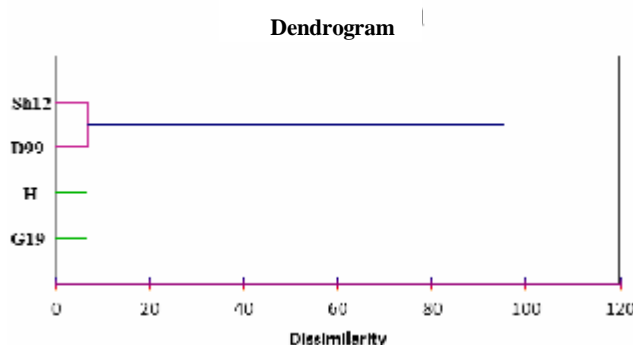
همان‌گونه که در شکل ۴ دیده می‌شود ژنوتیپ‌های D99

سرمازدگی در خصوص وضعیت تغذیه آنها مطابقت دارد. علاوه بر موارد فوق می‌توان از آنالیز چند متغیره نیز جهت شناسایی شاخص‌های مرتبط با تحمل به سرما و هم‌چنین شناسایی ارقام مقاوم به انواع تنش بهره‌گرفت (۲۲ و ۲۳). یکی از پرکاربردترین روش‌های چند متغیره، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (Principal Components Analysis) می‌باشد لذا پس از تجزیه به مؤلفه‌ها، بای‌پلات مربوطه بر مبنای دو مؤلفه اول و دوم که ۹۹/۷ درصد از تغییرات موجود بین داده‌ها را توجیه می‌کند، رسم گردید (شکل ۳) و در فضای بای‌پلات ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مشخصی قرار گرفتند که مرتبط با تحمل آنها به تنش سرما می‌باشد. در این نمودار در صورتی که بین بردارهای رسم شده زاویه کمتر از ۹۰ درجه باشد به این معنی است که بین شاخص‌ها هم‌بستگی مثبت وجود دارد و اگر زاویه بیشتر از ۹۰ درجه باشد، نشان‌دهنده وجود هم‌بستگی منفی بین آنهاست (۲۳ و ۲۷).

جدول ۳ نشان داد که ۹۷/۸ درصد از تغییرات کل داده‌ها مربوط به اولین مؤلفه است که دارای هم‌بستگی مثبت با شاخص‌های قندهای محلول، عناصر نیترژن، فسفر و پتاسیم و



شکل ۴. نمودار چند متغیره بای پلات بر اساس دو مؤلفه اول و دوم



شکل ۵. دندروگرام حاصل از صفات فیزیولوژیکی مرتبط با سرما با روش UPGMA

گروه دیگر قرار گرفته‌اند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نیز نتایج حاصل از روش‌های قبل را مورد تأیید قرار داد. نتایج این مطالعه مشخص نمود که دو ژنوتیپ G19 و H، ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش سرما بوده و با توجه به این‌که ژنوتیپ H دیرگل نیز می‌باشد، ژنوتیپی امیدبخش بوده و می‌توان از این ژنوتیپ در جهت ایجاد ارقام مقاوم به سرما بهره گرفت زیرا اکثر روش‌های ایجاد شده جهت مقابله با سرما از جمله نصب بخاری، استفاده از پنکه‌های بزرگ و ... سودمند واقع نشده و در اکثر مواقع خسارت‌های زیاد ایجاد شده و به نظر می‌رسد در این زمینه تنها راه مقابله با سرما تولید ارقام مقاوم به سرماست.

Sh12 با توجه به مقدار مؤلفه ۱ و ۲ به عنوان ژنوتیپ‌های حساس به سرما مشخص می‌شوند. همچنین این دو ژنوتیپ نزدیک شاخص نشت یونی که شاخصی منفی است قرار می‌گیرند از طرفی این مطلب برای دو ژنوتیپ دیگر (G19 و H) برعکس بوده و آنها به سمت شاخص‌های مثبت متمایل (قندهای محلول و عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم) هستند. ژنوتیپ‌ها را با توجه به شاخص‌های مورد استفاده و با استفاده از روش UPGMA گروه‌بندی شدند و دندروگرام مربوطه رسم شد (شکل ۵). همان‌طور که دیده می‌شود ژنوتیپ‌های حساس در یک گروه و ژنوتیپ‌های مقاوم در

جهت انجام این تحقیق با توجه به طولانی بودن آزمایش کمال
تشکر و قدردانی را داریم.

در پایان از مساعدت و همکاری مؤسسه نهال و بذر کرج

منابع مورد استفاده

1. Adams, W.W. III., B. Demmig-Adams, T. N. Rosenstiel, A. K. Brightwell and V. Ebbert. 2002. Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants. *Plant Biology* 4: 545-557.
2. Alonso, J. M., M. T. Espiau and R. Socias i Company. 2010. Increase in the chill and heat requirements for blooming of the new almond cultivars. *Options Méditerranéennes (Series A)* 94: 65-69.
3. Bakht J., A. Bano, M. Shafi, P. Dominy. 2013. Effect of abscisic acid applications on cold tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *European Journal of Agronomy* 4: 10-21.
4. Barranco, D. and N. Ruiz. 2005. Frost Tolerance of Eight Olive Cultivars. *Hortscience* 40 (3): 558-560.
5. Chinnusamy, V., J. Zhu and J-K. Zhu. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* 12: 444-51.
6. Emami, A. 1996. Methods of Plant Analysis. Technical bulletin 982. Soil and Water Research Institute, Agricultural Education Pub., Karaj, Iran. (In Farsi).
7. Ensminger, I., F. Busch and N. P. A. Huner. 2006. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 126: 28-44.
8. Feng, X-M. Q. Zhao, L-L. Zhao, Y. Qiao, X-B. Xie, H-F. Li, Y-X. Yao, C-X. You and Y-J. Hao. 2012. The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene MdC1bHLH1 encodes an ICE-like protein in apple. *BMC Plant Biology* 12-22.
9. Fortunato, A. S., F. C. Lidon, P. Batista-Santos, A. E. Leitao, I. P. Pais, A. I. Ribeiro and J. C. Ramalho. 2010. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of Coffea sp. Under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. *Journal of Plant Physiology* 167: 33-342.
10. Ghasemi, A., H. Izadi and V. Masomifar. 2010. Planting and Training of Almond. Publications Training and Agricultural Extension, Tehran. (In Farsi).
11. Gusta, L. V., M. Wisniewski, N. T. Nesbitt and K. T. Tanino. 2003. Factors to consider in artificial freeze tests. *Acta Horticulturae* 618:493-507.
12. Hausman, J. F., D. Reisen and D. Evers. 2003. Chilling stress and physiological changes in Sorbus domestica grown in vitro: Anti oxidative systems and carbohydrate adjustment. *Acta Horticulturae* 618: 245-252.
13. Honty, K., E. Sardi, E. Stefanovits-Banyai and M. Toth. 2008. Frost induced changes in enzyme activities and carbohydrate content in spurs of some pear cultivars during the dormancy. *International Journal Horticultural Science* 14: 41-44.
14. <http://faostat.fao.org>.
15. Imani, A., K. barzegar and S. Piripireivatlou. 2011. Relationship between Frost Injury and Ion Leakage as an Indicator of Cold Hardiness in 60 Almond Selections. *International Journal of Nuts and Related Sciences* 2(1): 22-26.
16. Izadi-Darbandi, E., A. Nezami, A. Abbasian and M. Heydari. 2013. Investigation of wild oat (*Avena lodoviciana* L.) genotypes freezing tolerance using of electrolyte leakage index. *Environmental Stresses in Crop Sciencis* 6(2): 100-120. (In Farsi).
17. Levitt, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Strees. 2nd ed., Academic Press., London.
18. Linden, L. 2002. Measuring cold hardiness in woody plants. PhD. Thesis, Helsinki University, Helsinki, Finland.
19. Micke W.C. (ed). 1996. Almond production manual. University of California. Division of Agriculture and Natural Resour. *Agricultural Science Publications* 3364pp.
20. Mir Mohamady Maibody, S. A. M. 2003. The Physiological and Breeding Aspect, Cold and Freezing Stress in Crops. Golbon Pub., Isfahan, Iran. (In Farsi).
21. Miranda, C., L.G. Santesteban and J. B. Royo. 2005. Variability in the relationship between frost temperature and injury level for some cultivated prunus species. *HortScience* 4(2): 357-361.
22. Monajem, S., Mohammadi, V. and Ahmadi, A. 2011. Evaluation of drought tolerance in some rapeseed Cultivars based on stress evaluation indices. *Electronic Journal of Crop Product* 4 (1): 151-169. (In Farsi).
23. Mosavei, S. S., S. Houshmand, SH. Mohammadi and M. Khodambashi. 2010. Chromosomal localization of the genes controlling quantitative traits of drought resistance in wheat using substitution lines. *Electronic Journal of Crop Product* 3(2): 97-114. (In Farsi).
24. Nagy, P. T., J. Katai, J. Nyeki and Z. Szabo. 2008. Effect of frost on leaf macronutrient Status of eight apple cultivas

- in integrated apple orchard in Eastern Hungary. *International Journal Horticultural Science* 14(1-2):37-40
25. Nagyné Demeter, D., J. Nyéki, M. Soltész and Z. Szabó. 2010. Examination of the apricot variety use and the factors affecting variety use in the Gönc production area. *International Journal of Horticultural Science* 16(3): 111-113.
26. Pakkish, Z., M. Rahemi and B. Panahi. 2011. Low Temperature Resistance of Developing Flower Buds of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Cultivars. *Journal Biology Environ Science* 5(15): 153-157.
27. Rabiee, K. 2004. Multivariate analysis and drought tolerance indices in potato cultivars. MSc. Thesis, Shahrekord University. Shahrekord, Iran. (In Farsi).
28. Renaut, J., S. Lutts and J. F. Hausman. 2004. Chill effects on poplar metabolism. *Acta Horticulturae* 630: 536-541.
29. Rodrigo, J. 2000. Spring frost in deciduous fruit trees Morphological damage and flower hardiness. *Scientia Horticulturae* 85: 155-173.
30. Rodrigo, J. and M. Herrero. 2002. Effects of pre-blossom temperature on flower development and fruit set in apricot. *Scientia Horticulturae* 92: 125-135.
31. Sorkheh, K., B. Shiran, T. M. Gradziel, B. K. Epperson, P. Martinez-Gomez and E. Asadi. 2007. Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationship with agronomic traits. *Euphytica* 156: 327-344.
32. Turhan, E. and S. Ergin. 2012. Soluble sugars and sucrose-metabolizing enzymes related to cold acclimation of sweet cherry cultivars grafted on different rootstocks. The Scientific World Article ID 979682, 7 pages. doi:10.1100/2012/979682.
33. Usofi, M. 2008. Freezing effect on electrolyte leakage of 10 cultivated and wild almond species in Isfahan province. *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 12(45): 1-9. (In Farsi).
34. Yamada, T. K., K. Koruda, Y. Jitsuyama, K. Takezawa, K. Arakawa and S. Fujikawa. 2002. Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. *Planta* 215:770-778.