فصلنامه علمی – پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
جلد ۲۴ شماره ۳، صفحه ۴۳۸-۴۲۸، (۱۳۹۵)

اثر سرمای دیررس شبانه بر اجزای فتوسیستم دو در سه کلن شالک (*Populus nigra* L.)

معصومه حسنوند [۱] و پیام فیاض [۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد جنگل‌داری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه جنگل‌داری، دانشکده کشاورزی و پژوهشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
پست الکترونیک: pfayyaz@yu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۱

چکیده

ارزیابی عملکرد فتوسیستم دو به‌عنوان پرانرژی‌ترین فتوسیستم که قادر به شکستن آب و تأمین الکترون مورد نیاز مرحله نوری فتوسنتز است، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. سرمای دیررس که به‌طور معمول در فصل رویش و در طول شب اتفاق می‌افتد، با آسیب رساندن به اندام‌های در حال رشد گیاه، موجب ضعف و حتی مرگ آنها می‌شود. در این پژوهش به‌منظور بررسی اثر سرمای دیررس شبانه بر اجزای عملکردی فتوسیستم دو و برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی مرتبط با آن، نهال‌های سه کلن شالک (*Populus nigra* L.) به‌مدت سه شب در معرض حداقل دماهای شبانه ۱۶، چهار، صفر و ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نهال‌ها به‌مدت ۱۴ روز در دمای بهینه به‌منظور بررسی توان احیا نگهداری شدند. داده‌ها با استفاده از مدل فاکتوریل با دو عامل کلن در سه سطح و حداقل دمای شبانه در چهار سطح به‌تفکیک برای مرحله تنش و احیا تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد که عملکرد ماکزیمم و مؤثر فتوسیستم دو تحت تأثیر کارایی کمپلکس تجزیه‌کننده آب و فعالیت مخزن پلاستوکوئینون در کلن‌های مختلف روند کاهشی متفاوتی را نشان داد، به‌نحوی‌که کلن ایرانی حساس‌تر از کلن‌های دیگر بود. این تفاوت در ارتباط با محتوای قند محلول، پرولین، کلروفیل و نرخ نشت الکترولیت‌ها از غشای سیتوپلاسمی بررسی شد. همچنین روند بهبودی کلن‌ها در دوره احیا مقایسه شد.

واژه‌های کلیدی: انجماد، سرما، فعالیت مخزن پلاستوکوئینون، فلوئورسانس کلروفیل، کمپلکس تجزیه‌کننده آب.

مقدمه

با گرم شدن زمین و افزایش طول دوره فیزیولوژیک رشد گیاهان، شدت و میزان آسیب‌های ناشی از سرمای دیررس بهاره و سرمای زودرس پاییزه افزایش می‌یابد (Man *et al.*, 2009). سرمای بهاره که به‌طور معمول کوتاه است و از چند ساعت تا سه روز به طول می‌انجامد (Sahragard, 2007)، مخرب‌تر از یخبندان‌های اوایل پاییز است (Estrella & Menzel, 2014). گیاهان، پایین‌ترین دماها را در طی شب تجربه می‌کنند و اگرچه خسارت سرمازدگی در تاریکی به شدت خسارت سرمازدگی در حضور نور نیست، اما قابل توجه و مهم است (Singh, 2003). وقوع تنش سرمای شبانه در آغاز فصل رشد می‌تواند عملکرد درختان را به میزان قابل توجهی کاهش دهد (Verwijst *et al.*, 1996). برای به حداقل رساندن چنین ضرر و زیانی انتخاب کلن مقاوم در برابر انجماد می‌تواند یک گزینه مهم باشد (Tsarouhas *et al.*, 2001).

گیاهان به کمک مسیرهای فیزیولوژیکی گسترده از سرما اجتناب و یا آن را تحمل می‌کنند. برای مثال در سپیدار

(*Populus alba*) ۱۶۲ ژن به‌طور بالقوه برای مقاومت به دمای پایین شناسایی شده‌اند که می‌تواند به افزایش مقاومت گیاه از طریق هریک از مکانیسم‌های فوق بیانجامد (Maestrini *et al*., 2009). مشکل اصلی که گیاهان چوبی در دمای زیر صفر با آن مواجه هستند، تشکیل بلورهای یخ است که می‌تواند موجب آسیب شدید به سلول‌های زنده و حتی مرگ گیاه شود. میزان مقاومت به سرما و یخزدگی در گونه‌ها و کولتیوارهای مختلف صنوبر بسته به مرحله رویشی متفاوت است، به‌نحوی‌که شاخه‌های خفته‌ی زمستانی *P. balsamifera* قادرند تا سرمای ۵۰ درجه زیر صفر را تحمل کنند (Hirsh *et al*., 1989). دمای محیط نیز نقش مؤثری در میزان مقاومت گونه‌ها در برابر تنش یخزدگی دارد، به‌نحوی‌که میزان مقاومت به یخبندان در سلول‌های کالوس پده (*P. euphratica*) رویش‌یافته در دمای دو درجه سانتی‌گراد نسبت به شاهد از طریق افزایش پرولین و پروتئین‌های محلول و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است (Chen & Chen, 2007).

در طی سازگاری با سرما تغییرات فیزیولوژیکی زیادی مانند افزایش سطح قندها (Galiba *et al*., 1997; Kerepesi *et al*., 2004)، پروتئین‌های محلول (Kazemi Shahandashti *et al*., 2013)، پرولین (Matysik *et al*., 2002; Yelenosky, 1979)، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، آنتی‌پورترها (Wang *et al*., 1996)، محتوی کلروفیل (Kudoh & Sonoike, 2002)، فلورسانس کلروفیل و تغییرات لیپیدی غشا (Zobayed *et al*., 2005) و ممانعت از فتوسنتز (Hällgren & Öquist, 1990) گزارش شده است که از واکنش‌های اولیه گیاه به دمای کم است. خسارت وارده به سیستم فتوسنتزی در حالتی که سرما همراه با شدت نور زیاد باشد، شدیدتر خواهد بود (Örlander, 1993). در دمای کم دستگاه فتوسنتزی بیشتر از نیاز واکنش‌های شیمیایی فوتون دریافت می‌کند، بنابراین انتقال الکترون از طریق فتوسیستم دو متوقف می‌شود. این توقف ناشی از کاهش فعالیت مکانیسم آزادکننده اکسیژن به‌واسطه شیب زیاد پروتون در سراسر تیلاکوئید و تخریب پروتئین D_1 مرکز واکنش است (Oliveira & Penuelas, 2000). این فرایندها درمجموع بازدارندگی نوری نامیده می‌شود و در ساعات اولیه قرارگیری در معرض سرمازدگی و نور متوسط رخ می‌دهد و در گیاهان مقاوم بعد از انتقال به شرایط گرم به‌سرعت قابل برگشت است (Glenn *et al*., 1999). برخی دیگر از تغییرات که منجر به کاهش عملکرد فتوسیستم دو می‌شوند، درنتیجه تغییرات فراساختاری هستند و آثار آنها پس از انتقال گیاه به دمای زیاد تا مدت‌ها باقی می‌ماند (van Heerden *et al*., 2003). با این حال مطالعات اندکی در مورد تأثیر سرمای دیررس بهاره بر دستگاه فتوسنتزی و زنجیره انتقال الکترون به‌خصوص در طی شب انجام شده است.

درختان صنوبر با تولید بیش از دو میلیون متر مکعب چوب در سال، نقش ارزنده‌ای در تأمین منابع سلولزی و کاهش فشار بر جنگل‌های طبیعی ایفا می‌کنند (Ghasemi *et al*., 2010). از میان گونه‌های مختلف صنوبر، چهار گونه پده، سپیدار، سفیدپلت (*P. caspica*) و شالک (*P. nigra* L.) از گونه‌های صنوبر بومی ایران هستند که در مناطق مختلف ایران گسترش طبیعی دارند (Sabeti, 1994). شالک یکی از متداول‌ترین گونه‌های صنوبر تندرشد بومی ایران است که کلن‌های مختلف آن در قالب زراعت چوب به‌طور وسیعی در مناطق مختلف کشت می‌شود (Sabeti, 1994). آسیب سرما و یخزدگی یکی از موانع اقتصادی مهم در کشت گونه‌های با دوره بهره‌برداری کوتاه برای کشورهایی است که در طول زمستان و مهم‌تر از آن در طول فصل رویش با آن مواجه می‌شوند (Christersson *et al*., 1983). از آنجایی‌که مناطق مختلف دارای تفاوت‌های اکولوژیکی متفاوتی به‌ویژه ازنظر تغییرات دمایی هستند، انتخاب کلن‌های مقاوم به سرما به‌خصوص در مراحل استقرار نهالی بسیار مهم است (Saeedi & Azadfar, 2011). با توجه به اهمیت درختان صنوبر و نقش کلیدی دستگاه فتوسنتزی در تولید چوب و تأثیرپذیری زیاد آن از دمای محیط، در این پژوهش تأثیر سرمای دیررس شبانه بر اجزای عملکردی مؤثر بر زنجیره انتقال الکترون در تعدادی از کلن‌های شالک به‌عنوان یکی از

گونه‌های صنوبر دارای پراکنش وسیع بررسی شد.

مواد و روش‌ها

منابع گیاهی، نحوه کاشت و اعمال تیمارها

به‌منظور انجام پژوهش پیش‌رو از سه کلن متمایز صنوبر شالک که ازنظر ریختاری تفاوت زیادی با هم داشتند، به نام‌های ایرانی (۷۲/۹)، بتولی (betulifolia ترکیه) و ایتالیایی (کلن ۵۶/۷۲) تهیه‌شده از مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، استفاده شد. شاخه‌های یک‌ساله کلن‌های مورد مطالعه در اسفندماه برداشت شدند و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تا زمان کاشت نگهداری شدند. در هنگام شروع آزمایش، ۲۰ قلمه به طول تقریبی ۲۵ سانتی‌متر و قطر تقریبی دو سانتی‌متر (به‌طور متوسط سه جوانه در قلمه) از شاخه‌ها تهیه و در آب قرار داده شدند. پس از متورم شدن جوانه‌ها، قلمه‌ها در گلدان‌های پلاستیکی به ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر (به‌طوری‌که حدود سه تا چهار سانتی‌متر از نوک قلمه‌ها بیرون از خاک قرار بگیرد)، کاشته شدند. خاک گلدان‌ها شامل خاک‌برگ، ماسه بادی و کود حیوانی به نسبت ۱:۱:۱ بود. قلمه‌ها تا مرحله سه تا چهار برگی در اتاقک رشد با فتوپریود ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی، دمای شب ۱۶ درجه سانتی‌گراد، دمای روز ۲۵ درجه سانتی‌گراد و میانگین رطوبت نسبی ۶۰ درصد نگهداری شدند. پس از ظهور برگ‌ها و رسیدن نهال‌ها به مرحله سه تا چهار برگی، گیاهان به‌تدریج براساس جدول ۱ در معرض سرمای شبانه قرار گرفتند.

جدول ۱- نحوه اعمال تیمار تنش سرما در کلن‌های شالک مورد مطالعه (فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)

نام تیمار	دمای روز (C°)	دمای شب (C°)		
		مرحله سازگاری (۴ روز)	مرحله تیمار سرما (۳ روز)	مرحله احیا (۱۴ روز)
شاهد	۲۵	۱۶	۱۶	۱۶
سرمای شبانه بدون انجماد	۲۵	افت دما از ۱۶ به ۴ (۴ درجه کاهش در شب)	۴	۱۶
انجماد شبانه ملایم	۲۵	افت دما از ۱۶ به ۴ (۴ درجه کاهش در شب)	۴ (صفر، ۳۰ دقیقه)	۱۶
انجماد شبانه شدید	۲۵	افت دما از ۱۶ به ۴ (۴ درجه کاهش در شب)	۴ (۲۰-، ۳۰ دقیقه)	۱۶

صفات مورد اندازه‌گیری

میزان نشر فلورسانس کلروفیل در برگ‌های فوقانی کاملاً توسعه‌یافته از کلیه نهال‌ها به‌وسیله دستگاه فلورومتر قابل حمل القاکننده پالس اشباع مدل ADC (Bioscientific، انگلستان) اندازه‌گیری شد. این اندازه‌گیری در پایان دوره تنش و همچنین پس از پایان مرحله احیا با دو طول مدت تابش پالس اشباع ۰/۴ و ۱/۶ ثانیه، یک بار در شب به‌منظور اندازه‌گیری کارایی اجزای مختلف فتوسیستم دو انجام شد. اجزای فتوسیستم دو شامل ماکزیمم عملکرد فتوسیستم دو (Fv/Fm در شب پس از ۱/۶ ثانیه پالس اشباع)، عملکرد مؤثر فتوسیستم دو (Fv/Fm در روز پس از ۱/۶ ثانیه پالس اشباع)، کارایی مخزن پلاستوکوئینون (Fv/Fm در شب پس از ۰/۴ ثانیه پالس اشباع) و فعالیت کمپلکس تجزیه‌کننده آب در سمت‌دهنده الکترون (Fv/ F0 در شب پس از ۱/۶ ثانیه پالس اشباع) بودند.

نرخ نشت الکترولیت‌ها در برگ با استفاده از دستگاه هدایت الکتریکی‌سنج (EC متر، مدل Inolab، آلمان) با محاسبه نسبت هدایت الکتریکی محلول برگ در دو زمان ۲۴ ساعت پس از غوطه‌ور کردن و یک ساعت پس از پختن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان شاخص آسیب غشایی محاسبه شد (Stuart, 1939). غلظت کلروفیل با استفاده از دستگاه SPAD - 502 در دو مرحله تیمار

سرمایی و احیا در حدود ساعت ۱۰ صبح از قسمت میانی پهنک جوان‌ترین برگ کاملاً توسعه‌یافته در شرایط سایه اندازه‌گیری شد. به‌منظور کاهش خطا برای هر تکرار، سه بار قرائت انجام شد و از میانگین آنها به‌عنوان اندازه‌گیری مربوط به هر تکرار استفاده شد. برای اندازه‌گیری غلظت پرولین و قندهای محلول کل، ابتدا عصاره الکلی از برگ‌ها تهیه شد و غلظت آنها با استفاده از روش طیف‌سنجی اندازه‌گیری شد، به‌طوری‌که غلظت اسید آمینه پرولین آزاد با استفاده از محلول نین‌هیدرین (Paquine & Lechasseur, 1979) و غلظت قندهای محلول کل با استفاده از محلول آنترون (Irigoyen *et al.*, 1992) به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش پیش‌رو به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی و در پنج تکرار انجام شد که در آن اثرات ساده سرمای شبانه حداقل، در چهار سطح (۱۶، چهار، صفر و ۲۰- درجه سانتی‌گراد)، و کلن در سه سطح (بتولی، ایرانی و ایتالیایی) به‌همراه اثرات متقابل دوگانه آنها بر صفات مختلف فیزیولوژیکی به‌کمک رویه مدل‌های خطی عمومی مورد آزمون قرار گرفت. در حالت معنی‌دار بودن اثرات تیمارها، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چندگانه دانکن انجام شد. کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار $SPSS_{21}$ انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای سرمای شبانه شامل حداقل دمای شبانه چهار، صفر و ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت نیم ساعت همراه با تیمار شاهد (شب ۱۶ درجه و روز ۲۵ درجه سانتی‌گراد) در سه کلن شالک ایتالیایی، بتولی و ایرانی بر صفات مختلف در جدول ۲ ارایه شده است. این نتایج حاکی از آن بود که اثرات ساده دما و کلن و نیز برهم‌کنش آنها بر کلیه صفات مورد اندازه‌گیری در مرحله اعمال تیمارهای سرمایی معنی‌دار شده است.

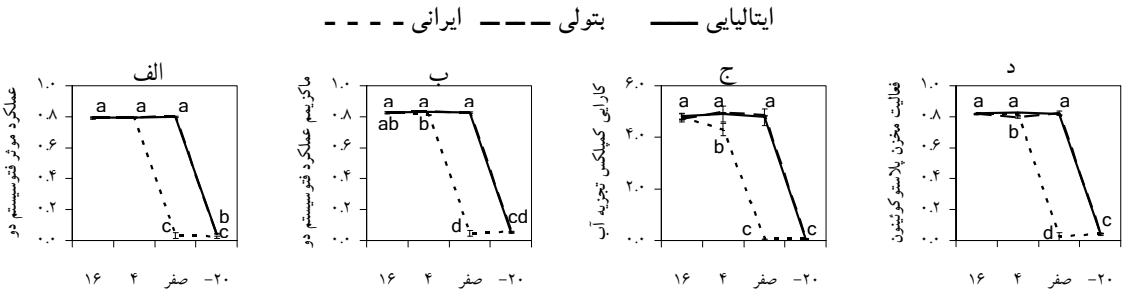
جدول ۲- مقادیر F به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس اثرات ساده دما و کلن به‌همراه اثرات متقابل دوگانه آنها بر پارامترهای مورد بررسی در مرحله تنش و احیا (درجه آزادی تیمارهای دما، کلن و اثر متقابل آنها به‌ترتیب ۳، ۲ و ۶ است)

صفت	مرحله تنش سرمایی			مرحله احیا		
	دما	کلن	دما × کلن	دما	کلن	دما × کلن
عملکرد مؤثر فتوسیستم دو	۲۶۲۷۵***	۳۶۲۷***	۳۳۵۳***	۴۲***	۳۶۱***	۱۰***
ماکزیمم عملکرد فتوسیستم دو	۱۶۸۰۲***	۲۳۲۱***	۲۱۵۶***	۱۳۵***	۳۲۶***	۲۳***
کارایی کمپلکس تجزیه‌کننده آب	۷۵۲***	۱۲۸***	۸۸***	۱۲۰***	۲۷۹***	۱۶***
فعالیت مخزن پلاستوکوئینون	۳۰۷۲۹***	۴۱۹۰***	۴۲۰۲***	۴۰***	۲۱۵***	۰/۸۸۸^{ns}
غلظت قندهای محلول کل	۶۰۷***	۲۴۶***	۶۱***	۱۱۵***	۶**	۳۸***
غلظت پرولین	۶۳۶***	۳۸۰***	۳۶***	۳۶***	۵*	۵**
نرخ نشت الکترولیت‌ها	۶۵۹***	۱۰۳***	۷۶***	۹۴۹***	۳۰۴۶***	۵۹***
غلظت کلروفیل	۳۲۸***	۱۵۷***	۱۵***	۳۶۳***	۹۷۴***	۵***

***معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹/۹ درصد؛ **معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹ درصد؛ *معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد؛ ^{ns} غیرمعنی‌دار

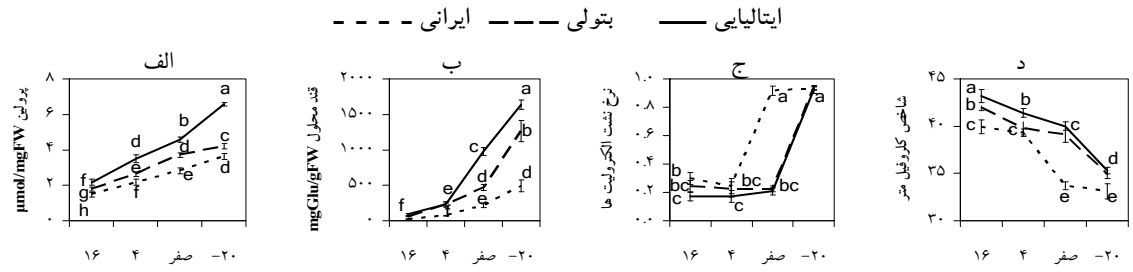
نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کاهش دمای شبانه به چهار درجه سانتی‌گراد، عملکرد مؤثر کلن‌ها را تحت تأثیر قرار نداد (شکل ۱- الف)، اما ماکزیمم عملکرد فتوسیستم دو (شکل ۱- ب) و کارایی کمپلکس تجزیه آب (شکل ۱- ج) در کلن ایرانی و فعالیت مخزن پلاستوکوئینون (شکل ۱- د) در کلن بتولی کاهش یافت. افت دمای شبانه به صفر درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه نیز تنها منجر به کاهش شدید در عملکرد کلیه اجزای فتوسیستم مورد بررسی در کلن

ایرانی شد، اما در دو کلن دیگر، عملکرد اجزای فتوسیستم دو ثابت ماند. همچنین در این دمای شبانه، نهال‌های کلن بتولی توانستند کاهشی که در سرعت اکسیداسیون مخزن پلاستوکوئینون آنها در دمای شبانه چهار درجه سانتی‌گراد ایجاد شده بود را جبران کنند. با افت دمای شبانه به ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه، عملکرد کلیه اجزای مورد مطالعه در فتوسیستم دو در تمام کلن‌ها کاهش یافت و به حداقل خود رسید (شکل ۱).



شکل ۱- اثر سرمای شبانه بر اجزای عملکردی فتوسیستم دو در کلن‌های شالک در مرحله تنش سرمایی

براساس مقایسه میانگین، با افت دمای شبانه، غلظت قندهای محلول کل و پرولین آزاد در کلن‌های شالک افزایش یافت، اما سرعت آن در کلن ایتالیایی بیشتر از بتولی و در بتولی نیز بیشتر از ایرانی بود. با کاهش دمای شبانه به چهار درجه سانتی‌گراد، هر سه کلن مورد مطالعه قادر به حفظ نرخ نشت الکترولیت‌ها از غشای سیتوپلاسمی برگ بودند. با قرار گرفتن نهال‌ها در دمای شبانه صفر درجه سانتی‌گراد به‌مدت نیم ساعت، نرخ نشت الکترولیت‌ها در بافت برگ کلن ایرانی به‌شدت افزایش یافت که با افت شدید شاخص کلروفیل همراه بود.درنهایت، نرخ نشت الکترولیت‌ها در نهال‌هایی که در معرض حداقل دمای شبانه ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت نیم ساعت قرار داشتند، افزایش یافت و به‌دنبال آن شاخص کلروفیل در تمام کلن‌ها کاهش یافت (شکل ۲).

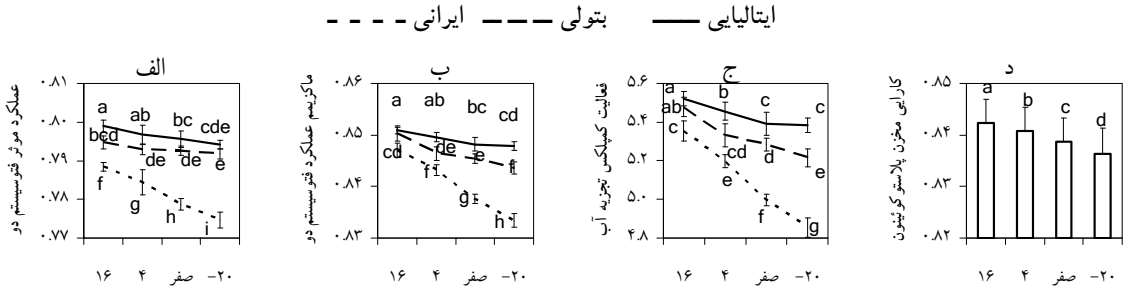


شکل ۲- اثر سرمای شبانه بر صفات فیزیولوژیک مختلف در برگ کلن‌های مختلف شالک در مرحله تنش سرمایی

نتایج تجزیه واریانس به‌منظور بررسی اثر ساده و متقابل دو عامل دما و کلن بر کلیه صفات مختلف مورد اندازه‌گیری در برگ نهال‌های شالک بعد از ۱۴ روز قرار گرفتن در شرایط احیا (دمای روز ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دمای شب ۱۶ درجه سانتی‌گراد) در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اثر ساده و متقابل دما و کلن بر صفات مورد بررسی معنی‌دار بود و تنها برهم‌کنش آنها بر فعالیت مخزن پلاستوکوئینون تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در

دوره احیا، تغییرات ماکزیمم عملکرد فتوسیستم دو در کلن ایرانی با شیب بیشتری نسبت به دو کلن دیگر اتفاق افتاد و میزان آن متناسب با شدت تنشی که تجربه کرده بودند، بود (شکل ۳- ب). در کلن‌های ایتالیایی و بتولی در معرض دمای چهار درجه سانتی‌گراد، عملکرد مؤثر فتوسیستم دو، دو هفته پس از رشد در شرایط احیا بازیابی شد، اما میزان آن در کلن ایرانی همچنان کمتر بود (شکل ۳- الف). کارایی کمپلکس تجزیه آب در سمت‌دهنده الکترون در تمام کلن‌ها پس از دوره احیا به نسبت افت دمای شبانه‌ای که با آن مواجه بودند، کاهش یافت، اما سرعت و مقدار تخریب کمپلکس تجزیه‌کننده آب در کلن ایرانی بیشتر از دو کلن دیگر بود (شکل ۳- ج).

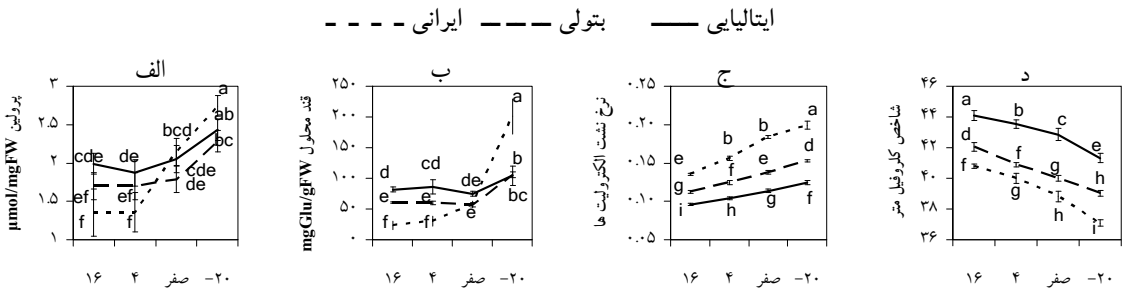
نتایج تجزیه واریانس به‌منظور بررسی اثر ساده و متقابل دو عامل دما و کلن بر سرعت پر شدن مخزن پلاستوکوئینون پس از احیا نشان داد که اثر ساده دما و کلن بر سرعت پر شدن مخزن پلاستوکوئینون معنی‌دار بود، اما اثر متقابلی بین آنها مشاهده نشد (جدول ۲) به‌نحوی‌که میزان آن در نهال‌های سرمادیده نسبت به شاهد متناسب با شدت سرمایی که در مرحله تنش داشتند، کاهش یافت (شکل ۳- د).



شکل ۳- اثر سرمای شبانه بر اجزای عملکردی فتوسیستم دو پس از ۱/۶ ثانیه پالس اشباع در کلن‌های شالک در مرحله احیا

غلظت قندهای محلول کل و پرولین در برگ هر سه کلن شالک پس از گذراندن دوره احیا (به‌مدت ۱۴ روز) نسبت به مرحله تنش کاهش یافت، اما این کاهش در همه کلن‌ها یکسان نبود (شکل ۴- الف و ۴- ب). به‌طوری‌که دو کلن بتولی و ایتالیایی تا حد زیادی سطح قندهای محلول کل و پرولین خود را کاهش دادند و به حالت کنترل نزدیک شدند. تنها در نهال‌هایی که سرمای شبانه ۲۰- درجه سانتی‌گراد را در دوره تنش تجربه کرده بودند، با وجود این‌که نسبت به زمان تنش غلظت قندهای محلول و پرولین خود را به مقدار قابل توجهی کاهش داده بودند، تاحدودی اختلاف با شاهد وجود داشت. در کلن ایرانی کاهش غلظت قندهای محلول کل و پرولین آزاد به‌اندازه دو کلن دیگر نبود و همچنان میزان قندهای محلول کل و پرولین آن زیاد بود.

نرخ نشت الکترولیت‌ها در تمام کلن‌ها و گروه‌های سرمادیده کمتر از ۰/۲ بود که حاکی از سلامت نسبی غشای سلولی در مرحله احیا در مقایسه با زمان تنش بود (شکل ۴- ج). کاهش در نرخ نشت الکترولیت‌ها در هر سه کلن به یک نسبت نبود، به‌گونه‌ای که کلن ایتالیایی همچنان کمترین نرخ نشت الکترولیت‌ها را در همه تیمارها داشت و میزان آن در دو کلن بتولی و ایرانی به‌ترتیب در سطح بالاتری بود (شکل ۴- ج). همچنین در کلن ایرانی، نهال‌های سرمادیده اختلاف قابل توجهی نسبت به تیمار شاهد داشتند و نتوانستند به اندازه دو کلن دیگر نرخ نشت الکترولیت‌های خود را کاهش دهند. پس از گذشت ۱۴ روز از استقرار نهال‌ها در شرایط احیا، شاخص کلروفیل در برگ‌های جدید توسعه‌یافته همچنان متناسب با تنش سرمای مرحله قبل نسبت به شاهد کاهش داشت، اما شدت این کاهش در کلن ایرانی بیشتر از دو کلن بتولی و ایتالیایی بود (شکل ۴- د).



شکل ۴- اثر سرمای شبانه بر صفات فیزیولوژیک مختلف در برگ کلن‌های مختلف شالک در مرحله احیا

بحث

با کاهش دمای شبانه به چهار درجه سانتی‌گراد، ماکزیمم عملکرد فتوسیستم دو در کلن ایرانی به‌دلیل اختلال در کارایی کمپلکس تجزیه‌کننده آب کاهش یافت، اما با افزایش دمای محیط در روز، به سطح شاهد بازگشت (شکل ۱- الف و ۱- ب) و تأثیری بر سلامت غشای سیتوپلاسمی نداشت (شکل ۲- ج). تنش سرما با تأثیر بر کمپلکس تجزیه آب باعث کاهش انتقال الکترون به فئوفایتین، QA، QB، مخزن پلاستوکوئینون و پذیرنده‌های نهایی و افزایش اتلاف حرارتی می‌شود (Paeizi & Shariati, 2012).

دو کلن بتولی و ایتالیایی در این دما قادر به حفظ عملکرد مؤثر و ماکزیمم فتوسیستم دو به‌صورت مستمر بودند (شکل ۱- الف و ۱- ب)، اما شاخص کلروفیل در هر دو کلن کاهش یافت (شکل ۲- د). در این شرایط فعالیت مخزن پلاستوکوئینون در کلن بتولی با کاهش همراه بود، اما میزان آن در کلن ایتالیایی محدود نشد. غلظت پرولین برگ در تمام کلن‌ها در این دما افزایش یافت، اما قندهای محلول تنها در کلن‌های ایتالیایی و بتولی افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد افزایش قندهای محلول و پرولین در دو کلن ایتالیایی و بتولی کمک مؤثری در افزایش تحمل به سرما کرده باشد. قندها با افزایش غلظت درون سلول، نقطه انجماد را کاهش می‌دهند (Galiba *et al.*, 1997) و باعث کاهش پسابیدگی سلول‌ها در مقابل تشکیل یخ‌های بین‌سلولی می‌شوند (Kerepesi *et al.*, 2004). تجمع پرولین نیز به دفع رادیکال‌های آزاد اکسیژن، حفظ آنزیم‌ها، تنظیم اسمزی سلول و حفظ حالت طبیعی غشا کمک می‌کند (Matysik *et al.*, 2002).

نتایج پژوهش پیش‌رو همچنین نشان داد که ادامه افت دمای شبانه و رسیدن به صفر درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه در سه شب متوالی، موجب تخریب دائمی فتوسیستم دو در کلن شالک ایرانی شد که با از دست رفتن کامل کارایی کمپلکس تجزیه‌کننده آب، فعالیت مخزن پلاستوکوتینون، انسجام غشای سیتوپلاسمی و تخریب شدید رنگدانه‌های کلروفیلی همراه بود (شکل ۱). افزایش قندهای محلول و پرولین (شکل ۲) کمک مؤثری به جلوگیری از افت عملکرد اجزای فتوسیستم دو و تخریب رنگدانه‌ها و غشای سیتوپلاسمی در کلن ایرانی نکرد، اما دو کلن بتولی و ایتالیایی همچنان قادر به حفظ عملکرد فتوسیستم دو در این شرایط دمایی بودند و نشانی از تخریب غشای سیتوپلاسمی در آنها مشاهده نشد و تنها غلظت کلروفیل نسبت به شاهد اندکی کاهش یافت. همچنین تجمع قندهای محلول و پرولین در رقم حساس به‌حدی نبود که موجب افزایش مقاومت شود. از جمله دلایل احتمالی آن می‌توان به غلظت کم پرولین قبل از تنش (Yelenosky, 1979) و اختلال در انتقال قندهای محلول (Wang *et al.*, 1996) اشاره نمود.

براساس نتایج به‌دست‌آمده، قرار گرفتن کلن‌ها در حداقل دمای شبانه ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه در سه شب متوالی، موجب تخریب کامل فتوسیستم دو در تمام کلن‌های مورد بررسی، کاهش غلظت رنگدانه‌های کلروفیل و انسجام غشای سیتوپلاسمی شد و افزایش قندهای محلول و

پرولین آزاد نیز کمکی به حفظ عملکرد اجزای فتوسیستم دو در این دما در هیچ‌یک از کلن‌ها نکرد (شکل ۱). ایجاد اختلال در واکنش‌های نوری و زنجیره انتقال الکترون می‌تواند با افزایش واکنش‌های فتواکسیداتیو در کلروپلاست و اکسیداسیون کاروتنوئیدها و پروتئین‌ها موجب افت راندمان کوانتومی فتوسیستم شود (Kudoh & Sonoike, 2002). همچنین از آنجایی‌که نشت الکترولیت‌ها با نسبت Fv/Fm همبستگی زیادی دارد، می‌توان تأثیر تنش سرما بر فتوسیستم دو و انتقال الکترون را به از بین رفتن انسجام غشای تیلاکوئید و نشت الکترولیت‌ها نسبت داد (Zobayed *et al.*, 2005).

دو هفته پس از پایان دوره سرما، تمام نهال‌ها رشد دوباره داشتند و اجزای عملکردی فتوسیستم دو، غلظت رنگدانه کلروفیل و انسجام غشای سیتوپلاسمی در تمام کلن‌ها بهبود یافت، اما به سطح شاهد نرسید (شکل‌های ۳ و ۴). میزان بهبود صفات مذکور در دو کلن ایتالیایی و بتولی بیشتر از کلن ایرانی بود. کاهش غلظت قندهای محلول و پرولین آزاد در برگ کلن‌های مورد مطالعه نیز روند مشابهی داشت. با وجود این، کاهش میزان پرولین در همه کلن‌ها یکسان نبود. در کلن ایتالیایی و بتولی میزان پرولین در هر چهار تیمار سرمایی تا حد زیادی به کنترل نزدیک شد. Kazemi Shahandashti و همکاران (۲۰۱۳) نیز الگوی مشابهی را در روند احیا گیاه نخود پس از تنش سرما مشاهده کردند. اثرات منفی دوره سرمای شبانه در کلن ایرانی ماندگاری بیشتری نسبت به کلن‌های دیگر داشت. آثار تنش سرما بر عملکرد فتوسنتزی گیاهان حساس پس از انتقال گیاه به دمای بهینه، بسته به شدت و طول دوره سرما تا مدت‌ها دیده می‌شود (van Heerden *et al.*, 2003). کارایی کمپلکس تجزیه آب پس از دوره بهبودی در نهال‌های آسیب‌دیده هر سه کلن تا حدودی زیاد شد، اما هنوز کارایی کمپلکس آب کمتر از کنترل بود. احیای کمپلکس تجزیه آب، با افزایش انتقال الکترون و کاهش اتلاف حرارتی موجب ترمیم عملکرد واکنش‌های نوری می‌شود (Glenn *et al.*, 1999).

آثار منفی تنش سرمای شبانه بر عملکرد ماکزیمم فتوسیستم دو، پس از دو هفته استقرار در دمای بهینه کاهش یافت اما روند بهبودی در کلن ایرانی کندتر از کلن‌های بتولی و ایتالیایی بود. از آنجایی‌که برگ‌هایی که در شرایط سرما توسعه یافته‌اند، تغییرات ساختمانی و فراساختاری غیر قابل برگشت یافته‌اند، بنابراین ممکن است اثرات منفی ناشی از سرما بر کارآمدی فتوسنتز و فتوسیستم دو تا مدت‌ها بعد از تنش با آنها باقی بماند (Taiz & Zeiger, 2002). در نهال‌های سرمادیده سه کلن مورد آزمایش نیز اگرچه پس از گذشت ۱۴ روز احیا و رشد در دمای زیاد، عملکرد فتوسیستم دو نسبت به زمان تنش تاحدودی بهبود یافت، اما هنوز با حالت کنترل فاصله داشت. این مسأله نشان داد که هنوز اثرات سوء کاهش دمای شبانه در آنها وجود داشته است.

به‌طور کلی نتایج پژوهش پیش‌رو نشان داد که کلن ایتالیایی دارای مکانیسم دفاعی بهتر و کارآمدتری نسبت به کلن ایرانی و بتولی برای مقابله با تنش سرمای شبانه بود که می‌تواند در کارهای اصلاحی مورد توجه قرار گیرد. همچنین شاخص‌های کارایی کمپلکس آب در سمت‌دهنده الکترون و ماکزیمم عملکرد فتوسیستم دو به‌همراه صفات بیوشیمیایی می‌توانند شاخص‌های مهم و دقیق‌تری برای ارزیابی میزان مقاومت کلن‌های صنوبر تحت تنش سرما در پژوهش پیش‌رو محسوب شوند.

سپاسگزاری

پژوهش پیش‌رو با حمایت مالی دانشگاه یاسوج انجام شد. همچنین از گروه تحقیقات صنوبر و گونه‌های سریع‌الرشد مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور برای در اختیار قرار دادن کلن‌های صنوبر قدردانی می‌شود.

References

- Chen, Y.Y. and Chen, Y.Z., 2007. Cold Acclimation-Induced changes in freezing resistance, the contents of soluble protein and proline and antioxidant enzyme activities in

condition in chickpea. Journal of Agricultural Biotechnology, 5(1): 145-157 (In Persian).
- Kerepesi, I., Bányai-Stefanovits, E. and Galiba, G., 2004. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. Journal of Plant Physiology, 161: 131-133.
- Kudoh, H. and Sonoike, K., 2002. Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature. Journal of Planta, 215: 541-548.
- Maestrini, P., Cavallini, A., Rizzo, M., Giordani, T., Bernardi, R., Durante, M. and Natali, L., 2009. Isolation and expression analysis of low temperature-induced genes in white poplar (*Populus alba*). Journal of Plant Physiology, 166(14): 1544-1556.
- Man, R., Kayahara, G.J., Dangand, Q.L. and Rice, J.A., 2009. A case of severe frost damage prior to bud break in young conifers in Northeastern Ontario: Consequence of climate change? Forestry Chronicle, 85(3): 453-462.
- Matysik, J., Alia- Bhalu, B. and Mohanty, P., 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Journal of Current Science, 82: 525-532.
- Oliveira, G. and Penuelas, J., 2000. Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L.) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L.) Mediterranean woody species. Journal of Acta Oecologica, 21(2): 97-107.
- Örlander, G., 1993. Shading reduces both visible and invisible frost damage to Norway spruce seedlings in the field. Forestry, 66(1): 27-36.
- Paeizi, M. and Shariati, M., 2012. Effect of cold stress on PSII efficiency of Dunaliella using chlorophyll a fluorescence kinetics. Journal of Cell & Tissue, 2(4): 395-405 (In Persian).
- Paquine, R. and Lechasseur, P., 1979. Observation sur une methode dosage la libre dans les de plantes. Journal of Botany, 57: 1851-1854.
- Sabeti, H., 1994. Forests, Trees and Shrubs of Iran. Second edition, Yazd University Press, Yazd, 810p (In Persian).
- Saeedi, Z. and Azadfar, D., 2011. Comparison *Populus euphratica* calli. Shandong Agricultural Sciences, 3: 46-49.
- Christersson, L., von Fircks, H. and Sennerby-Forsse, L. 1983. Frost Hardiness Development and Frost Injuries of the Genus Salix, A Literature Review. Published by Ontario Tree Improvement and Forest Biomass Institute, Ministry of Natural Resources, Maple, Ontario, Canada.
- Estrella, N. and Menzel, A., 2014. Experimental assessment on the frost sensitivity during leaf development of juvenile *Fagus sylvatica* L. Abstracts of European Geosciences Union General Assembly Conference. Austria, 27 April to 2 May. 2014: Vol. 16, pp: 13152.
- Galiba, G., Erepesi, I.K., Snape, J.W. and Sutka, J., 1997. Location of a gene regulating cold-induced carbohydrate production on chromosome 5 of wheat. Journal of Theoretical and Applied Genetics, 95: 265-270.
- Ghasemi, R., Asadi F. and Torabi, A., 2010. Evaluation of height and diameter growth of indigenous and exotic poplar clones in one growing season. Iranian Journal of Forest, 1(4): 333-343 (In Persian).
- Glenn, E.P., Brown, J.J. and Blumwald, E., 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. Journal of Plant Science, 18: 227-255.
- Hällgren, J.E. and Öquist, G. 1990. Adaptations to low temperatures: 265-293. In: Alscher, R.G. and Cumming, J.R., (Eds.). Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms. Wiley-Liss, New York.
- Hirsh, A., Bent, T. and Erbe, E., 1989. Localization and characterization of intracellular liquid-liquid phase separations in deeply frozen Populus using electron microscopy, dynamic mechanical analysis and differential scanning calorimetry. Thermochimica Acta, 155: 163-186.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. and Sanchez-Diaz, M., 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. Physiologia Plantarum, 84: 55-60.
- Kazemi Shahandashti, S.S., Maali Amiri, R., Zeinali, H., Ramezanpour, S.S., Mahdieh, M. and Tabatabaifar, S.A., 2013. Assessment of gene expression pattern of rubisco and some physiological characteristics under cold stress

among different clones of *Populus nigra* in aspect of cold resistance. Wood and Forest Science and Technology, 17(3): 99-111 (In Persian).

- Sahragard, N., 2007. Chilling (Freezing) and Ice-nucleating Bacteria in Plants. Published by Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, 116p (In Persian).
- Singh, D.P., 2003. Stress Physiology. New Age International Pvt Ltd Publishers, New Delhi, 184p.
- Taiz, L. and Zeiger, E., 2002. Plant Physiology, Published by Sinauer Associates, Sunderland, UK, 690p.
- Tsarouhas, V., Kenney, W.A. and Zsuffa, L., 2001. Variation in freezing resistance during different phenological stages in some Populus and Salix clones: Implications for clonal selection. Silvae Genetica, 50(2): 54-63.
- van Heerden, P.D.R., Krüger, G.H.J., Loveland, J.E., Parry, M.A.J. and Foyer, C.H., 2003. Dark chilling imposes metabolic restrictions on photosynthesis in soybean. Journal of Plant, Cell and Environment, 26(2): 323-337.
- Verwijst, T., Elowson, S.S., Li, X. and Leng, G., 1996. Production losses due to a summer frost in a *Salix viminalis* short-rotation forest in southern Sweden. Scandinavian Journal of Forest Research, 11: 104-110.
- Wang. Z., Quebedeuux, B. and Stutte, G.W., 1996. Partitioning of (14c) glucose into sorbitol and other carbohydrates in apple under water stress. Australian Journal of Plant Physiology, 23: 245-251.
- Yelenosky, G., 1979. Accumulation of free proline in citrus leaves during cold hardening of young trees in controlled temperature regimes. Journal of Plant Physiology, 64: 425-427.
- Zobayed, S., Afreen, F. and Kozai, T., 2005. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's Wort. Plant Physiology and Biochemistry, 43: 977-984.

Impacts of night late frost on photosystem II components of three black poplar (*Populus nigra* L.) clones

M. Hasanvand [1] and P. Fayyaz [2*]

1- M.Sc. Student Forestry, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

2*- Corresponding author, Assistant Prof., Department of Forestry, Faculty of Agriculture and Institute of Natural Resources and Environment, Yasouj University, Yasouj, Iran. Email: pfayyaz@yu.ac.ir

Received: 20.03.2015 Accepted: 11.01.2016

Abstract

It is of crucial importance to assess the performance of the photosystem II efficiency, as the most powerful system in light reactions of photosynthesis that is able to provide required electron of system by splitting water. Late frost occurred mostly in growing season and during night in early spring often results in weakness and even death of plants. Therefore, selecting tolerant varieties is one of the most efficient methods to deal with late frost. Due to high diversity and wide dispersal, poplars significantly contribute to the worldwide supply of cellulosic resources. In order to investigate the effect of night late frost on functional component of photosystem II and a number of related physiological traits, seedlings of three clones of black poplar (*Populus nigra* L.) were exposed to the minimum night temperature of 16, 4, 0 and –20 °C for three nights. To assess the revival potential, seedlings were further maintained in optimum temperature for 14 days. Data were analyzed using a factorial model with two factors of clone and minimum night temperature for each step of the stress and revival. Results revealed that maximum and quantum yield efficiency of photosystem II in different clones has different reduction patterns according to the efficiency of water splitting complex and plastoquinon pool (PQ). Thus, Iranian clone was concluded to be more sensitive than other clones. This difference was discussed in association with total soluble sugar, proline and chlorophyll concentration and electrolyte leakage rate of cytoplasmic membrane. In addition, the recovery process of the clones in revival period was discussed.

Keywords: Chilling, chlorophyll fluorescence, freezing, plastoquinon pool activity, water splitting complex.