

اثر رقم، سرما و پاکلوبوترازول بر رشد، محتوای کلروفیل و جراثت غشای سلول در گیاهچه لوبیا

ریحانه عموآقایی* و الهام شریعت

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

پاکلوبوترازول از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از گروه تریازول‌ها است که می‌تواند گیاهان را از انواع تنش‌ها محافظت کند. پژوهش حاضر، برای بررسی اثر غلظت پاکلوبوترازول (۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) بر کاهش آسیب‌های ناشی از تنش سرما (دمای ۵ درجه سانتیگراد) روی گیاهچه‌های دو رقم لوبیا (لوبیا سفید رقم دانشکده و لوبیا قرمز رقم صیاد) اجرا شد. نتایج نشان داد که تنش سرما طول، وزن تر و خشک ریشه، بخش هوایی و میزان کلروفیل را کاهش و درصد نشت الکترولیتی از غشای سلول‌ها را افزایش داد. پاکلوبوترازول موجب کاهش طول، وزن تر و خشک بخش هوای گردید اما در شرایط تنش موجب افزایش وزن خشک ریشه‌ها شد. علاوه بر این، زمانی که گیاهان تیمار شده با پاکلوبوترازول در معرض تنش سرما قرار گرفتند، میزان نشت الکترولیتی کمتری نسبت به شاهد نشان دادند. تیمار گیاهچه‌ها با پاکلوبوترازول میزان کلروفیل را در شرایط تنش و غیرتنش افزایش داد. رقم لوبیا سفید نسبت به سرما حساس‌تر از لوبیا قرمز بود و اثر پاکلوبوترازول نیز در افزایش مقاومت به سرما در لوبیا سفید قوی‌تر از لوبیا قرمز بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که پاکلوبوترازول توانایی پاسخ گیاه به تنش سرما را بهبود می‌بخشد و این اثر به ویژه در ارقام حساس‌تر به سرما بیشتر مشهود است.

واژه‌های کلیدی: پاکلوبوترازول، تنش سرما، رشد، محتوای کلروفیل، لوبیا، نشت الکترولیتی

مقدمه

پس از غلات، حبوبات (باقلائیان) دومین منبع مهم غذایی بشر است. در بین حبوبات، لوبیا از نظر سطح زیرکشت و ارزش اقتصادی، مقام نخست را دارد (Hosseini, 2004). لوبیا منبع سرشار و ارزان از پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و مواد غذایی معدنی برای ۵۰۰

میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه است. خاستگاه اصلی لوبیا مناطق گرمسیری و آمریکای جنوبی است. لوبیا گیاهی بسیار حساس به سرما و یخبندان است و در بهار تا زمانی که درجه حرارت محیط به قدر کافی بالا نرود نمی‌توان به کشت آن مبادرت ورزید (Kooceki and Banayan Avval, 1989). درجه حرارت مناسب

لویبا نباید کمتر از ۱۰ درجه باشد. مهم ترین مناطق لویباکاری در ایران استان‌های چهارمحال و بختیاری، زنجان، فارس، لرستان و مرکزی هستند (Hosseini, 2004). در برخی از این مناطق مانند چهارمحال و بختیاری گاه سرمایه دیررس در اواخر اردیبهشت ماه مشکل مهمی در استقرار گیاهچه‌های لویبا محسوب می‌شود و به همین علت پژوهش حاضر به بررسی این مهم پرداخته است.

در گیاهان حساس به سرما مثل لویبا، قرار گرفتن در معرض دمای پایین اما بالاتر از دمای انجماد یعنی بین صفر تا ۵ درجه سانتیگراد گیاه را دچار اختلالات فیزیولوژیک ویژه نظیر کاهش سیالیت غشا می‌کند (Beck et al., 2004). از جمله نشانه‌های آسیب سرما، کاهش رشد و سرعت فتوسنتز، رنگ پریدگی، خشک شدن یا نکروزیس، افزایش حساسیت به بیماری‌ها، نشت یون‌ها از غشا سلولی، تغییر در تولید اتیلن و تنفس و افزایش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژنی است (Kuan-Hung et al., 2006; Beck et al., 2004; Tadjvar et al., 2011). درجه آسیب سرما مرحله نمو و شرایط رشد و مواد تغذیه‌ای در طول تنش سرما بر حسب گونه گیاهی متفاوت است. آسیب سرما، همچنین به شرایط محیطی نظیر: دما، نور و آب بستگی دارد. مشخص شده است که در گونه‌های حساس به سرما، تنش سرما به علت تخریب اکسیداتیو ناشی از تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن باعث آسیب بیشتر می‌شود (Sevillano et al., 2006; Kuan-Hung et al., 2006; Woronuk et al., 2010; al., 2009).

به طور کلی، سازوکارهای مقاوم شدن به سرما در گیاهان شامل: تغییر در لیپیدهای غشا به منظور افزایش

برای رشد و نمو لویبا حدود ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد است. در درجه حرارت‌های بالاتر از ۴۵ درجه سانتیگراد گیاه به بذر نمی‌نشیند و حرارت‌های پایین‌تر از ۱۵ درجه سانتیگراد نیز برای رشد و نمو آن مناسب نیست (Hosseini, 2004). Machado Neto و همکاران (۲۰۰۶) نیز در بررسی اثر دما بر جوانه زنی ارقام لویبا گزارش کردند که اغلب ارقام لویبا، نسبت به سرما حساس هستند و در تمام ارقام مطالعه شده جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در دمای زیر ۲۷ درجه سانتیگراد به تأخیر می‌افتد. اگر درجه حرارت در موقع کاشت لویبای پاكوتاه از ۱۲ درجه و در لویبای پاك بلند از ۱۴ درجه سانتیگراد کمتر باشد، رشد مناسبی حاصل نمی‌شود. لویبای سفید گیاهی حساس به سرما است و به فصل زراعی بدون یخبندان و هوای خشک نیاز دارد. لویبا سفید در مقایسه با انواع دیگر لویبا مقاومت کمتری نسبت به شرایط نامطلوب دارد (Kooeckeki and Banayan Avval, 1989). پژوهشگران متعدد در بررسی اثر دما بر جوانه زنی لویبا گزارش کردند که با وجود حساسیت لویبا نسبت به سرما، واکنش ارقام لویبا نسبت به دمای زیر حد بهینه تا حد زیادی تحت تأثیر ژنوتیپ آنها است به طوری که برخی ژنوتیپ‌ها نسبت به سرما متحمل‌تر از سایرین هستند (White and Montes, 1993; Hucl, 1993; Rodiño et al., 2007). سطح زیر کشت لویبا در ایران معادل ۱۱۰۲۴۸ هکتار و تولید ۲۲۵۷۲۰ تن است. بر اساس تحقیقات انجام شده در ایستگاه ملی تحقیقات لویبای خمین، زمان مناسب برای کاشت ۲۰ اردیبهشت تا ۱۵ خرداد ماه و بهترین زمان آن هفته نخست خرداد ماه است. در هر حال، درجه حرارت در زمان کاشت

هستند، تریازول‌ها بیان می‌شوند و بروز این توانایی را تسهیل می‌کنند (Kuan-Hung؛ Fletcher *et al.*, 2000)؛ (Fletcher *et al.*, 2006). تریازول‌ها بر مسیر سنتز ایزوپرنوئیدها اثر می‌گذارند و موجب ممانعت سنتز جیبرلین، کاهش اتیلن و افزایش سیتوکینین و آبسزیک اسید می‌شوند. مشتقات تریازول با ممانعت بیوسنتز جیبرلین توسط ممانعت از مراحل اکسیداسیون کائورن به کائورنال، سوبستراهایی برای بیوسنتز کاروتنوئید و آبسزیک اسید فراهم می‌کنند. به کرات ثابت شده است که القای افزایش تولید آبسزیک اسید، گیاهان را از تنش‌های محیطی مختلف محافظت می‌کند (Wilhelm *et al.*, 1987؛ Werbrouck and Debergh, 1996؛ Fletcher *et al.*, 2000). خاصیت ممانعت‌کنندگی رشد توسط تریازول‌ها از طریق به هم ریختن تمامیت غشا و عملکرد آن در نتیجه ذخیره متیل استرول‌ها است. استرول‌ها در تشکیل غشا جدید و تقسیم و طویل شدن سلول نقش دارند. بنابراین، وقتی سنتز استرول در پاسخ به تیمار پاکلوبوترازول ممانعت می‌شود، رشد ممانعت می‌شود. تریازول‌ها بیوسنتز استرول را تغییر می‌دهند و باعث کاهش کلسترول غشا می‌شوند که این تغییر باعث القا استحکام و سازگاری به سرما می‌شود (Fletcher and Hoftstra, 1988؛ Khan *et al.*, 2009). با توجه به شناخت چنین آثاری از پاکلوبوترازول و آثار سرما روی گیاهان این پژوهش در جهت بررسی اثر پاکلوبوترازول روی تعدیل آثار تنش سرما در گیاه لوبیا طراحی و به اجرا در آمده است.

مواد و روش‌ها

کاشت و تهیه نمونه: بذرهای دو رقم (لوبیا سفید

سیالیت غشا، افزایش پتانسیل غلبه بر تنش اکسیداتیو از طریق آنزیم‌های جاروب‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن، ذخیره آنتوسیانین و تغییر در مورفولوژی رشد است. سازوکارهای دیگر مقاوم شدن شامل ذخیره کربوهیدرات‌ها، پکتین و نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌های ضد یخ و دهیدرین در بافت‌های گیاهی و افزایش سنتز ترکیبات محافظت‌کننده در برابر انجماد با وزن مولکولی کم یا زیاد در سیتوپلاسم است (Welling and Beck *et al.*, 2004؛ Koh, 2002؛ Zamani؛ Sariri *et al.*, 2011؛ Palva, 2006؛ Bahramabadi *et al.*, 2013). برخی از پژوهشگران اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نظیر تریازول‌ها را در مقاومت به سرما گزارش کرده‌اند (Mahmut Sinan *et al.*, 2009). تریازول‌ها ترکیباتی هستند که به عنوان قارچ‌کش، ممانعت‌کننده سنتز ارگوسترول در قارچ و بیوسنتز فیتواسترول در گیاهان (Fletcher and Khan *et al.*, 2009؛ Hoftstra, 1988) تنظیم‌کننده رشد گیاه (ممانعت‌کننده سنتز جیبرلین) شناخته شده‌اند (Wilhelm *et al.*, 1987). تریازول‌هایی مانند پاکلوبوترازول، مانع رشد گیاه و طویل شدن، موجب افزایش مقادیر کلروفیل، بزرگ شدن کلروپلاست‌ها، ضخیم شدن بافت تر برگ، افزایش نسبت ریشه به ساقه، تولید آلکالوئیدها و افزایش متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌شوند (Fletcher *et al.*, 2000). همچنین، تریازول‌ها تغییرات هورمونی و اثر بیوشیمیایی نظیر رفع سمیت گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش پرولین و تقویت سیستم‌های آنتی‌اکسیداتی سلول‌ها را القا می‌نمایند و باعث مقاومت به تنش‌ها می‌شوند. در گیاهانی که دارای توانایی ذاتی در پاسخ به تنش‌ها

روش Arnon (۱۹۴۹) انجام شد. ۰/۱ گرم از بافت تازه پهنک برگ‌های جوان از قسمت میانی برگ دوم گیاه وزن شدند و با استون ۸۰ درصد در هاون چینی روی یخ دور از نور مستقیم ساییده شدند. مخلوط به دست آمده با کاغذ صافی درون بالن ژوژه صاف شد و حجم عصاره به دست آمده با استون ۸۰ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس، جذب محلول‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۷۰ و ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شدند. از استون ۸۰ درصد به عنوان محلول بلانک استفاده شد. میزان کلروفیل‌های a و b بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت گیاهی از رابطه‌های ۱ و ۲ محاسبه شد. $A = \text{جذب نوری}$ ، $V = \text{حجم نهایی عصاره}$ و $W = \text{وزن بافت (بر حسب گرم)}$.

رابطه ۱:

$$Chl.a = \frac{[(12/77 \times A663) - (2/69 \times A645)] \times V}{1000 \times W}$$

رابطه ۲:

$$Chl.b = \frac{[(22/9 \times A645) - (4/93 \times A663)] \times V}{1000 \times W}$$

سنجش میزان نشت الکترولیتی: سنجش میزان

نشت الکترولیتی غشا پلاسما با روش Dionsio-sese و Tobita (۱۹۹۸) انجام شد. از هر تکرار ۰/۱ گرم از بافت تر برگ شسته و در لوله آزمایش درپوش‌دار محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه قرار داده شد. این لوله‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. پس از ۳ ساعت هدایت الکتریکی آنها با استفاده از EC متر اندازه‌گیری شد. سپس شیشه‌های محتوی نمونه‌های برگ‌گی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده و پس از سرد شدن برای دومین مرتبه EC آنها اندازه‌گیری شد.

دانشکده و لوبیا قرمز صیاد) از مرکز تحقیقات کشاورزی شهر کرد تهیه شد. بذر ارقام لوبیا پس از ضدعفونی ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در پتری‌دیش‌های محتوی غلظت‌های پاکلوبوترازول ۰ و ۲۵ و ۵۰ (میلی‌گرم در لیتر) خیسانده و مطابق طرح آماری به گلدان‌های حاوی خاک (نسبت ۳ به ۱ خاک: شن و کود) منتقل شدند. گلدان‌های حاوی بذر به اتاق کشت منتقل و در معرض شدت نور ۱۲۰۰-۱۴۰۰ لوکس در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از دو هفته رشد (گیاهک‌های ۱۴ روزه) در اتاقک رشد، بخشی از گلدان‌ها در دمای ۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در معرض سرما قرار گرفتند و پس از اعمال تیمار سرما به تدریج به دماهای ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد (دو روز در هر دما) منتقل شدند. بخشی دیگر که به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند در تمام این مدت در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داشتند (Berova et al., 2002).

اندازه‌گیری رشد: برای اندازه‌گیری طول، وزن تر

و خشک بخش‌های هوایی و ریشه، گیاهچه‌های ۲۱ روزه از گلدان‌های خارج شدند. بخش‌های هوایی و ریشه، از منطقه طوقه جدا و پس از اندازه‌گیری طول و وزن تر در پاکت‌های کاغذی مجزا قرار گرفتند. سپس، در آون با دمای 5 ± 70 درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. در پایان، وزن خشک بخش‌های هوایی و ریشه گیاهچه‌های دو رقم لوبیا اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کلروفیل: اندازه‌گیری کلروفیل با

داد. در مقابل، تنش سرما و فقدان آن بر وزن خشک لوبیا قرمز اثری نداشت (شکل ۱). به طور کلی، رشد ساقه رقم لوبیا سفید حساسیت بیشتری به تنش سرما و پاکلوبوترازول نشان داد.

نتایج نشان داد که تیمار سرما در هر دو رقم لوبیا طول ساقه و وزن تر بخش هوایی را کاهش داد (شکل ۱) که میزان این کاهش در رقم لوبیا سفید بیش از رقم لوبیا قرمز بود. سرما وزن خشک لوبیا سفید را کاهش داد اما بر وزن خشک لوبیا قرمز اثری نداشت (شکل ۱). با اعمال پاکلوبوترازول در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) با تنش سرما و بدون آن، طول ساقه و وزن تر بخش هوایی هر دو رقم کاهش یافت. پاکلوبوترازول وزن خشک لوبیا سفید را در شرایط بدون تنش تغییر نداد اما تحت تنش سرما آن را کاهش داد. در مقابل، بر وزن خشک لوبیا قرمز در هر دو حالت اثری نداشت (شکل ۱). به طور کلی، رشد ساقه رقم لوبیا سفید حساسیت بیشتری به تنش سرما و پاکلوبوترازول نشان داد.

سرما شاخص‌های طول و وزن تر و خشک ریشه در رقم لوبیا سفید را کاهش داد (شکل ۲) اما اثر معنی‌داری بر همین شاخص‌ها در لوبیا قرمز نداشت. پاکلوبوترازول در شرایط عادی اثر معنی‌داری بر شاخص‌های ریشه در هر دو رقم نداشت در حالی که با اعمال پاکلوبوترازول در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) تحت تنش سرما این شاخص‌ها در لوبیا سفید افزایش یافت و در لوبیا قرمز بدون تغییر باقی ماند. به طور کلی، رشد ریشه رقم لوبیا سفید حساسیت بیشتری به تنش سرما و پاکلوبوترازول نشان داد.

درصد هدایت الکتریکی بیانگر میزان نشت الکتریکی مواد از غشا است که مطابق رابطه ۳ قابل محاسبه است. EC_1 و EC_2 هدایت الکتریکی (میکرو زیمنس) محلول‌ها به ترتیب قبل و پس از جوشیدن است.

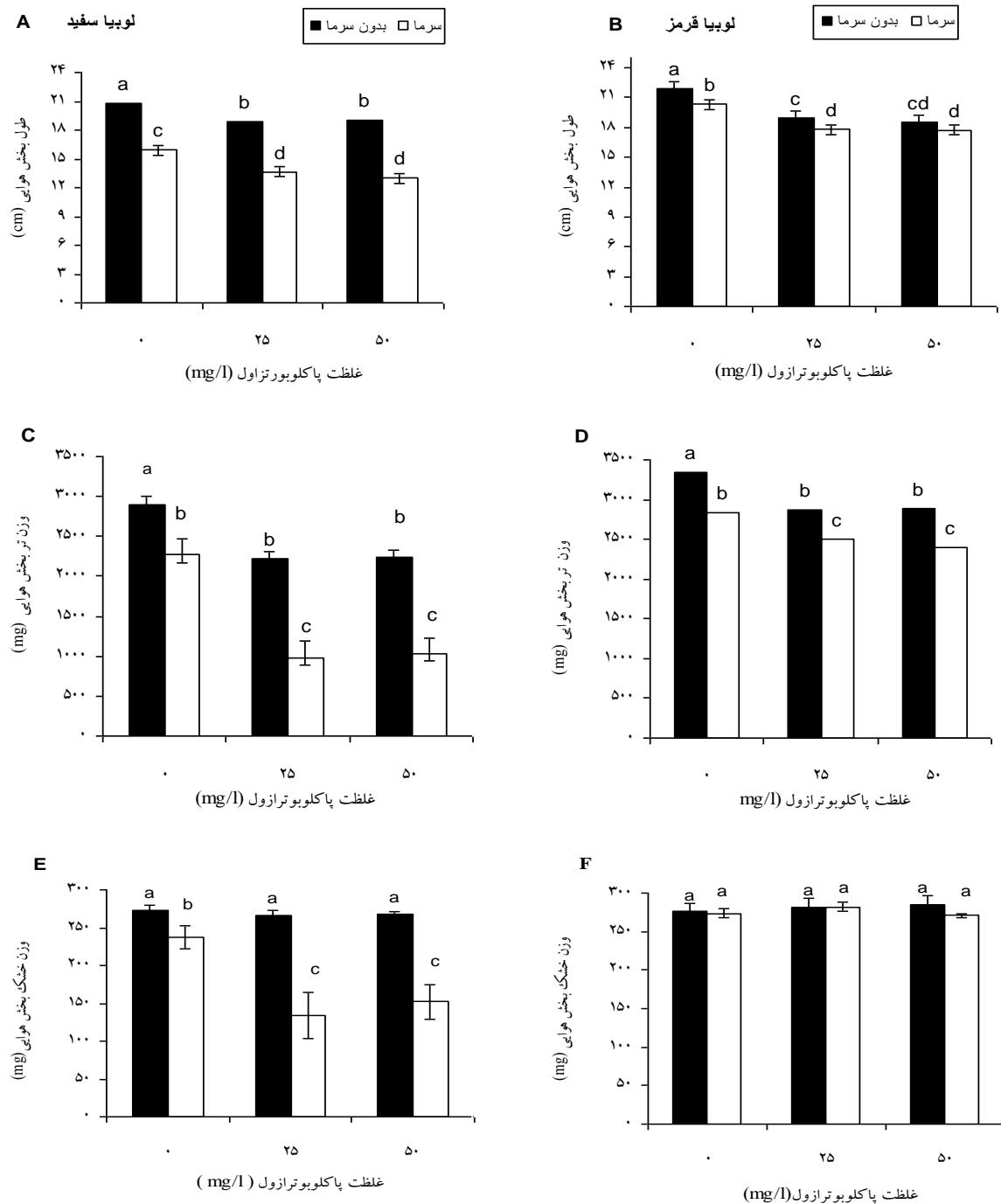
$$\text{رابطه ۳: } EC\% = (EC_1/EC_2) \times 100$$

تحلیل آماری: آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل بررسی شده شامل: رقم در دو سطح (لوبیا سفید دانشکده و لوبیا قرمز صیاد)، غلظت پاکلوبوترازول در سه سطح (۰ و ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر) و تنش سرما در دو سطح (شاهد و سرمادهی در ۵ درجه سانتیگراد) بود. غلظت‌های پاکلوبوترازول بر اساس گزارش‌های قبلی (Berova et al., 2002) روی سایر گیاهان انتخاب شدند. آنالیز واریانس داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن و در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ انجام شد.

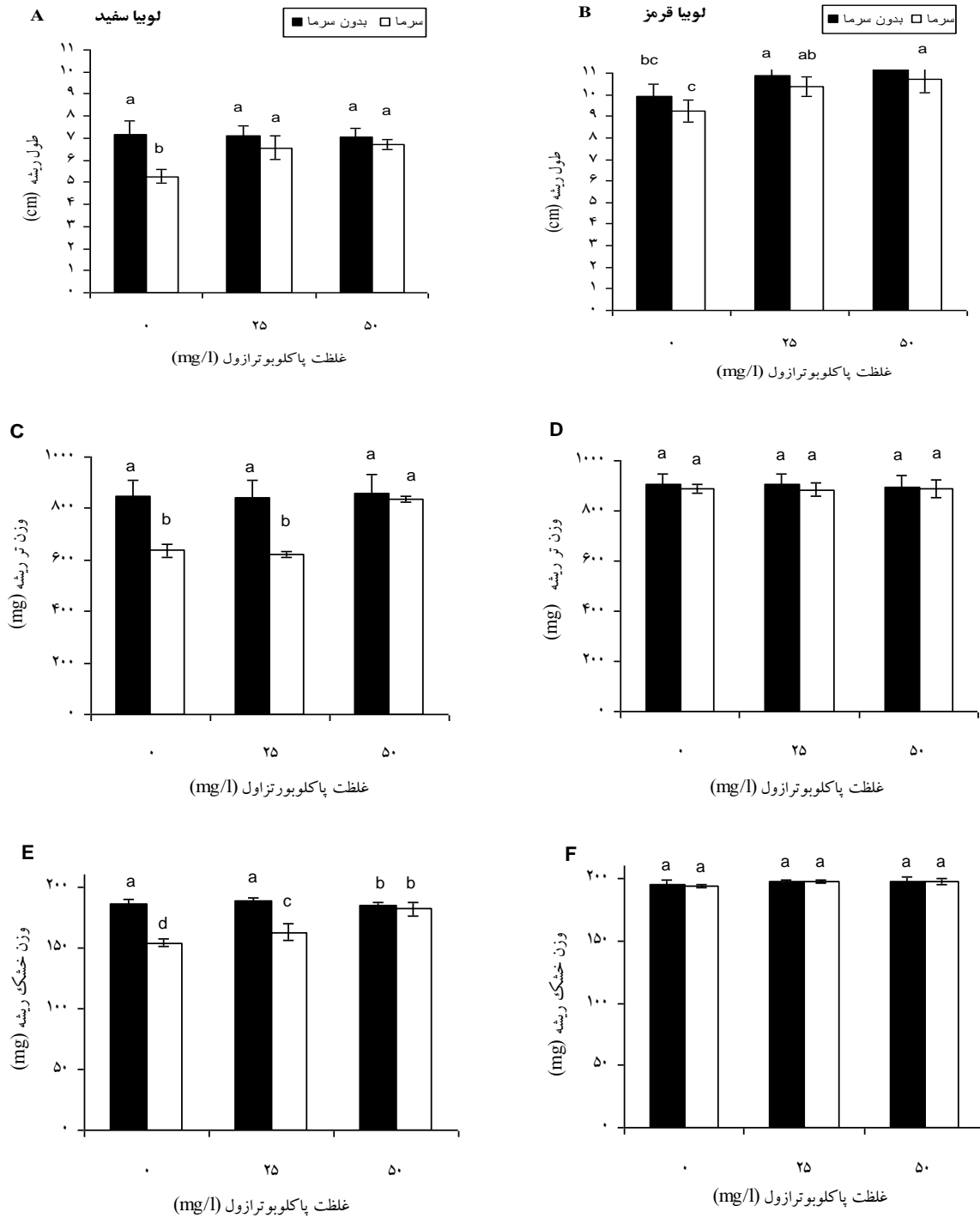
نتایج

نتایج نشان داد که تیمار سرما در هر دو رقم لوبیا سفید و قرمز، طول ساقه و وزن تر بخش هوایی را کاهش داد (شکل ۱) که میزان این کاهش در رقم لوبیا سفید بیش از رقم لوبیا قرمز بود. سرما وزن خشک لوبیا سفید را کاهش داد اما بر وزن خشک لوبیا قرمز اثری نداشت (شکل ۱).

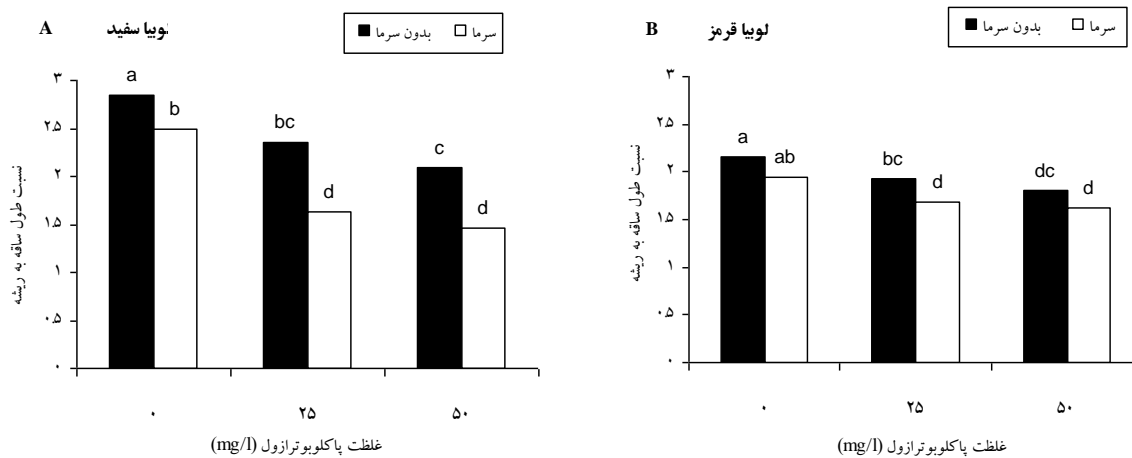
با اعمال پاکلوبوترازول در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) با تنش سرما و بدون آن طول ساقه و وزن تر بخش هوایی هر دو رقم کاهش یافت. پاکلوبوترازول وزن خشک لوبیا سفید را در شرایط بدون تنش تغییر نداد اما تحت تنش سرما آن را کاهش



شکل ۱- اثر متقابل پاکلوبوترازول و دما بر طول، وزن خشک و وزن تر بخش هوایی گیاهچه‌های لوبیا قرمز و سفید. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است.



شکل ۲- اثر متقابل پاکلوبوترازول و دما بر طول، وزن تر ریشه گیاهچه‌های لوبیا قرمز و سفید. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است.



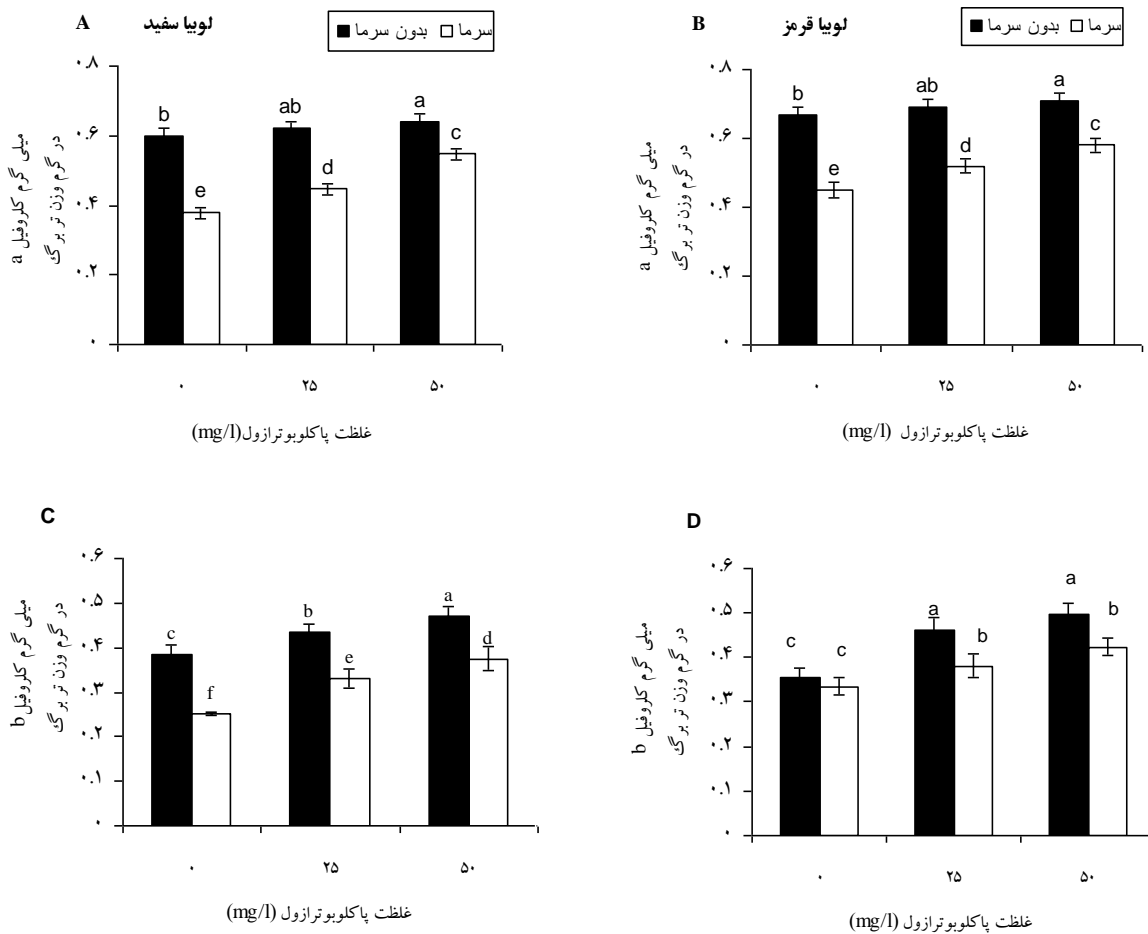
شکل ۳- اثر متقابل پاکلوبوترازول و دما بر نسبت طول ساقه به ریشه گیاهچه‌های لوبیا قرمز و سفید. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است.

شرایط شاهد بالا برد. اگرچه همواره مقادیر عددی کلروفیل‌های a و b در تمام تیمارها در رقم لوبیا قرمز بیشتر از لوبیا سفید بود اما درصد افزایش هر دو نوع کلروفیل در پاسخ به پاکلوبوترازول در رقم لوبیا سفید بیشتر از لوبیا قرمز بود (شکل ۴).

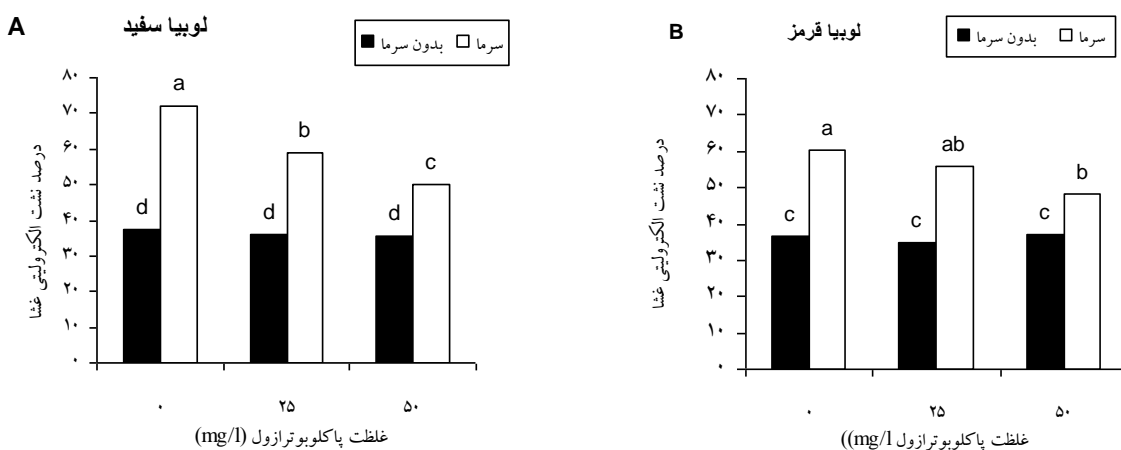
میزان نشت الکترولیتی از غشای سلول‌های هر دو رقم در شرایط عادی و بدون تنش سرما مشابه بود. اعمال تیمار سرما در رقم لوبیا سفید و قرمز به ترتیب حدود ۸۸ و ۶۱ درصد نشت الکترولیتی را افزایش داد. در شرایط بدون سرما پاکلوبوترازول اثر معنی‌داری روی میزان نشت الکترولیتی غشای هیچ یک از رقم‌های لوبیا نداشت اما در تنش سرما اعمال تیمارهای ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) پاکلوبوترازول نشت الکترولیتی را نسبت به شاهد سرما دیده کاهش داد. اما همچنان میانگین‌های این عامل بیشتر از تیمار بدون سرما بود (شکل ۵).

بررسی نسبت طول ساقه به ریشه نشان داد که سرما این نسبت را در لوبیا سفید کاهش داده اما در لوبیا قرمز تغییر نداده است. پاکلوبوترازول در هر دو رقم، نسبت طول ساقه به ریشه را کاهش داد (شکل ۳).

بررسی نتایج نشان داد که در هر دو رقم بالاترین مقدار کلروفیل‌های a و b در گیاهان تیمار شده با پاکلوبوترازول ۵۰ (میلی گرم در لیتر) در شرایط بدون سرما به دست آمده است. در رقم لوبیا سفید، تیمار ۵۰ (میلی گرم در لیتر) پاکلوبوترازول و در رقم لوبیا قرمز، تیمار ۲۵ (میلی گرم در لیتر) پاکلوبوترازول میزان کلروفیل a (شکل ۴) را نسبت به شاهد افزایش داد. سرما در هر دو رقم میزان کلروفیل a را در حد معنی‌داری کاهش داد. در رقم لوبیا سفید در حالت شاهد با اعمال سرما میزان کلروفیل b کاسته شد اما در رقم لوبیا قرمز تغییری نکرد. اعمال غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) پاکلوبوترازول میزان کلروفیل‌های a و b هر دو رقم را در هم در تنش سرما و هم در



شکل ۴- اثر متقابل پاکلوبوترازول و دما بر میزان کلروفیل های a و b در برگ‌های لوبیا قرمز و سفید. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است.



شکل ۵- اثر متقابل پاکلوبوترازول و دما بر درصد نشت الکترولیتی در دو رقم لوبیا. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است.

بحث

به طور کلی، با توجه به نتایج به دست آمده، تنش سرما کلیه شاخص‌های رشد ریشه و ساقه را در هر دو رقم لویا در مقایسه با گیاهان تنش ندیده در حد قابل توجهی کاهش داده است (شکل‌های ۱ و ۲). این نتیجه یادآوری می‌کند که لویا یک گیاه حساس به سرما است و این مورد توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Mahmut Machado-Neto *et al.*, 2006؛ Woronuk *et al.*, 2010؛ Sinan *et al.*, 2009). کاهش رشد گیاه به ویژه رشد طولی بخش هوایی را می‌توان نتیجه اثر منفی تنش سرما، کاهش فتوسنتز و در نتیجه کمبود کربوهیدرات‌ها برای رشد گیاه دانست. از سوی دیگر، می‌توان آن را یک پاسخ سازشی برای گیاه تلقی کرد. به این معنا که در این شرایط، گیاهان به جای آن که کربوهیدرات‌ها را بیشتر صرف رشد طولی سلول نمایند، به طور محلول در سلول‌ها ننگه می‌دارند تا نقطه انجماد پروتوپلاسم را پایین آورند و از آسیب یخ‌زدگی زودرس حفاظت کنند (Beck *et al.*, 2004). همچنین هرچه تاج پوشش گیاه کوتاه و فشرده باشد هوا در درون آن محبوس شده و گرم‌تر می‌ماند و آرام‌تر با هوای سرد محیط مبادله می‌شود.

تیمار گیاهان با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول در مقایسه با شاهد، هم در حالت تنش و هم بدون تنش شاخص‌های رشد بخش هوایی را کاهش داد اما کاربرد این ماده مقدار وزن تر و خشک و طول ریشه را افزایش داد (شکل‌های ۱ و ۲). Jafari و همکاران (۲۰۰۶) نیز مشابه این نتایج را برای نهال‌های گوجه‌فرنگی گزارش کردند. Abdul Jaleel و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که شاخص‌های

رشد در گیاه *Chatharanthus roseus* تحت تنش سرما کاهش می‌یابد اما تیمار تریازول این اثر را بهبود می‌دهد. آنان همچنین گزارش کردند که ترکیبات تریازول موجب کاهش ارتفاع گیاه و افزایش وزن تر و خشک ریشه شده است و علت آن را اثر تریازول بر مانعت از سنتز جیبرلین و افزایش سنتز سیتوکینین دانستند و معتقدند که افزایش رشد ریشه تحت تیمار این هورمون به علت افزایش سیتوکینین درونی گیاه است. Berova و همکاران (۲۰۰۲) نیز کاهش طول و وزن تر اندام هوایی و افزایش رشد ریشه در گیاهان گندم تیمار شده با پاکلوبوترازول را گزارش کردند که به افزایش نسبت ریشه به ساقه منجر شده است. نتایج بررسی حاضر نیز نشان داد که تیمار پاکلوبوترازول در شرایط تنش و غیرتنش باعث کاهش نسبت ساقه به ریشه شده است (شکل ۳) و تغییر این نسبت بیشتر نتیجه کاهش طول ساقه در نتیجه تیمار با پاکلوبوترازول بوده است. کاهش شاخص طول اندام هوایی توسط تیمار پاکلوبوترازول احتمالاً به علت کاهش میزان سنتز جیبرلین است (Wilhelm *et al.*, 1987).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان مشاهده نمود که مقدار میانگین کلروفیل‌های a و b تحت تنش سرما در رقم لویا سفید و قرمز نسبت به شاهد کاهش یافته است. این نتایج با یافته‌های Berova و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد. کاهش کلروفیل تحت تنش سرما در سویا (Yadegari *et al.*, 2007)، گوجه‌فرنگی (Jafari *et al.*, 2006) و در نارنگی (Tadjvar *et al.*, 2011) نیز گزارش شده است. کلروز برگ‌ها نشانه اولیه سرما است که به علت کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی پدید می‌آید. کاهش رنگیزه‌ها می‌تواند به علت تأثیر

گزارش کرده‌اند (Sariri et al., 2007؛ Yadegari et al., 2011؛ Tadjvar et al., 2011). با اعمال تیمارهای ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول نشت الکترولیتی به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۵). این نتایج با نتایج Baninasab (۲۰۰۹) روی دانه‌رست‌های هندوانه مطابقت دارد. Jafari و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش کردند که افشانه با پاکلوبوترازول میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشا نهال‌های گوجه فرنگی تحت تنش سرما را کاهش می‌دهد.

لیپیدها به عنوان اجزای اصلی غشاها از عوامل مهم حساسیت به دما در گیاهان هستند. به طوری که ارتباط مفیدی بین تحمل به دمای پایین با بیوسنتز و بازآرایی غشا در پاسخ به دما وجود دارد (Koh, 2002). تغییر در ترکیب و ساختار غشاهای زیستی، نخستین آسیب سرما محسوب می‌شود که روی نفوذپذیری غشا اثر می‌گذارد. این تغییرات شامل پراکسیداسیون لیپید، افزایش اسیدهای چرب اشباع، کاهش فسفولیپیدها و گالاکتولیپیدها و افزایش در نسبت استرول به فسفولیپید است. این تغییرات در ترکیب غشا با کاهش سیالیت غشا باعث کاهش عملکرد غشا و پروتئین‌های همراه آن می‌شود. از سوی دیگر، سرما موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژنی می‌شود که با حمله به غشا نشت یون‌ها و پراکسیداسیون لیپیدی غشا را افزایش می‌دهد (Sevillano et al., 2009). در مقابل، پاکلوبوترازول از این تغییرات جلوگیری می‌کند. ثابت شده است که تریازول‌ها بیوسنتز استرول را کاهش می‌دهند و باعث تغییر ترکیب کلسترول غشا می‌شوند که این تغییر باعث القا استحکام و سازگاری می‌شود (Fletcher and Hoftstra, 1988؛ Khan et al., 2009). همچنین

سرما در افزایش میزان پراکسیداسیون باشد. این تخریب می‌تواند در غشا کلروپلاست‌ها و تیلاکوئیدها رخ دهد و به کاهش میزان رنگیزه منتهی گردد (Tadjvar et al., 2011). نتایج نشان داد که اعمال غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ (میلی گرم در لیتر) پاکلوبوترازول به طور معنی داری میزان کلروفیل‌های a و b را افزایش داده است (شکل ۴). Berova و همکاران (۲۰۰۲) و Jafari و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش کردند که پاکلوبوترازول اثر منفی تنش سرما روی رنگیزه‌ها را به طور معنی داری کاهش داده است. Baninasab (۲۰۰۹) نیز گزارش کرده است که غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول به طور معنی داری مقدار کلروفیل در گیاهچه‌های هندوانه تحت تنش سرما را در مقایسه با شاهد افزایش داد. برخی محققان معتقدند پاکلوبوترازول موجب گسترش ریشه و در نتیجه ساخت بیشتر سیتوکینین و افزایش انتقال آن به اندام هوایی می‌شود که این امر به افزایش سنتز کلروفیل منجر می‌گردد. همچنین ممکن است تریازول‌ها از طریق تأثیر بر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها به طور مستقیم بر بیوسنتز کلروفیل‌های و کاروتنوئیدها تأثیر بگذارند (Werbrouck and Debergh, 1996؛ Fletcher et al., 2000). یکی از نشانه‌های آسیب ناشی از تنش سرما، نشت الکترولیتی از برگ‌های تیمار شده است. در بررسی نتایج پژوهش حاضر مشاهده شد که در شرایط تنش سرما رقم لوبیا قرمز نسبت به لوبیا سفید نشت الکترولیتی کمتری را داشته است. اگرچه تحت تنش سرما در هر دو رقم در مقایسه با شاهد (بدون تنش سرما) افزایش نشت الکترولیتی مشاهده شد (شکل ۵). محققان دیگر نیز افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و نشت الکترولیتی از غشاهای گیاهان سویا، نارنج و نارنگی

این تغییرات نتیجه تغییرات هورمونی است که توسط پاکلوبوترازول القا شده است. گزارش شده است که تریازول مقادیر آبسزیک اسید را افزایش می‌دهد و از این طریق مقاومت به سرما را افزایش می‌دهد (Tafazoli and Beyl, 1993).

همچنین تحقیق حاضر نشان داد که رقم لوییا سفید نسبت به سرما حساس‌تر از لوییا قرمز بود و اثر پاکلوبوترازول هم در افزایش مقاومت به سرما در لوییا سفید قوی‌تر از لوییا قرمز بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که پاکلوبوترازول توانایی پاسخ گیاه به تنش سرما را بهبود می‌بخشد و این اثر به ویژه در ارقام حساس‌تر به سرما بیشتر مشهود است و می‌توان از آن برای افزایش تحمل به تنش نسبت به سرما در ارقام حساس‌تر استفاده کرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد که پشتیبانی مالی این پژوهش را بر عهده داشتند صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

محققان گزارش کرده‌اند که تریازول‌ها با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژنی و حفاظت از غشا می‌شوند (Kuan-Hung *et al.*, 2006؛ Berova *et al.*, 2002). نشان داده شده است که در گیاه فلفل، تنش سرما باعث تغییرات غشایی از جمله کاهش لیپید غشا، افزایش نسبت استرول به فسفولیپید، افزایش اسیدهای چرب اشباع و القا تولید گونه‌های فعال اکسیژنی می‌شود. تیمار گیاهان فلفل با پاکلوبوترازول از این تغییرات جلوگیری می‌کند (Lurie *et al.*, 1994).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر، تنش سرما موجب افزایش نشت الکترولیتی غشا و کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی شده است که احتمالاً کاهش میزان فتوسنتز را به دنبال دارد و بدین صورت می‌تواند موجب کاهش رشد گیاه شود. در مقابل، پاکلوبوترازول با جلوگیری از تخریب اکسیداتیو غشا و نشت الکترولیتی از آن به پایداری سلول‌ها و غشاهای کلروپلاستی کمک کرد و با حفاظت و افزایش مقادیر کلروفیل از کاهش عملکرد فتوسنتزی تحت تنش سرما جلوگیری کرد و از این نظر آثار منفی سرما روی رشد گیاه را تعدیل کرد. احتمالاً

منابع

- Abdul Jaleel, C., Gopi, R. and Panneerselvam, R. (2008) Growth and photosynthetic pigments responses of two varieties of *Catharanthus roseus* to triadimefon treatment. *Comptes Rendus Biologies* 331: 272-277.
- Arnon, D. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts, 1, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15
- Baninasab, B. (2009) Amelioration of chilling stress by paclobutrazol in watermelon seedlings. *Scientia Horticulturae* 121(2): 144-148.
- Beck, E., Heim, R. and Hansen, J. (2004) Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *Biomedical and Life Science* 9: 449-459.
- Berova, M., Zlatev, Z. and Stoeva, N. (2002) Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 28: 75-84.

- Dionsio-sese, M. L. and Tobita, S. (1998) Antioxidant responses of rice seedling to salinity stress. *Plant Science* 135: 1-9.
- Fletcher, R. and Hofstra, G. (1988) Triazoles as potential plant protectants. In: *Sterol synthesis inhibitors in plant protection* (Eds. Berg, D. and Plempel, M.) 321-331. Ellis Horwood Ltd., Cambridge.
- Fletcher, R., Sankhla, N. and Davis, T. (2000) Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural Reviews* 24: 55-122.
- Hosseini, N. (2004) *Pulses in Iran*. Nashr Publisher, Tehran (in Persian).
- Hucl, P. (1993) Effects of temperature and moisture stress on the germination of diverse common bean genotypes. *Canadian Journal of Plant Science* 73: 697-702.
- Jafari, S. R., Manuchehri Kalantari, Kh. and Turkzadeh, M. (2006) The evaluation of paclobutrazol effects on increase cold hardiness in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* L.). *Iranian Journal of Biology* 19(3): 290-298 (in Persian).
- Khan, M. S. H., Wagatsuma, T., Akhter, A. and Taukraya, K. (2009) Sterol biosynthesis inhibition by paclobutrazol induced greater Aluminum sensitivity in Al-tolerant rice. *American Journal of Plant Physiology* 4(3): 89-99.
- Koh, I. B. (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review Plant Biology* 53: 225-245.
- Kooceki, A. and Banayan Avval, M. (1989) *Pulses cultivation*. Javid Publisher, Jahad Daneshgahi, Mashhad (in Persian).
- Kuan-Hung, L., Fu-Hsiang, P., Shih-Ying, H. and Hsiao-Feng, L. (2006) Pre-treating paclobutrazol enhanced chilling tolerance of sweet potato. *Journal of Plant Growth Regulation* 49: 249-262.
- Lurie, S., Ronen, R., Lipsker, Z. and Aloni, B. (1994) Effects of paclobutrazol and chilling temperatures on lipids, antioxidants and ATPase activity of plasma membrane isolated from green bell pepper fruits. *Physiologia Plantarum* 91: 593-598.
- Machado Neto, N. B. M., Prioli, M. R., Gatti, A. B. and Cardoso, V. J. M. (2006) Temperature effects on seed germination in races of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Scientiarum Agronomy* 28: 155-164.
- Mahmut Sinan, T., Rahmi, D. and Guleray, A. (2009) Determination of effects of some plant growth regulators (PGRs) on changes of some isoenzymes in bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv Terzibaba) at chilling temperatures: in gel enzyme assays. *Romanian Biotechnological Letters*. 14(6): 4858-4869.
- Rodiño, A. P., Lema, M., Pérez-Barbeito, M., Santalla, M. and De Ron, A. M. (2007) Assessment of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) germplasm for tolerance to low temperature during early seedling growth. *Euphytica* 155: 63-70.
- Sariri, R., Galvani, M., Fotouhi Ghazvini, R. and Jafarian, V. (2011) The effect of cold temperature stress on antifreeze protein production and lipid peroxidation in two citrus species. *Iranian Journal of Plant Biology* 3(7): 97-102.
- Sevillano, L. A. T., Sanchez-Ballesta, M. A., Romojaro, F. E. and Bflores, F. R. (2009) Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Post harvest technologies applied to reduce its impact. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 555-573.
- Tadjvar, Y., Fotouhi Ghazvini, R., Hamidoghli, Y. and Hassan Sajedi, R. (2011) Physiological and biochemical responses of page mandarin on citrange rootstock to low temperature stress. *Iranian*

- Journal of Plant Biology 3(9): 1-12.
- Tafazoli, E. and Beyl, C. (1993) Changes in endogenous abscisic acid and cold hardiness in *Actinidia* treated with triazole growth retardants. *Journal of Plant Growth Regulation* 12: 79-83.
- Welling, A. and Palva, E. T. (2006) Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiologia Plantarum* 127: 167-181.
- Werbrouck, S. P. O. and Debergh, P. C. (1996) Imidazole fungicides and paclobutrazol enhance cytokinin-induced adventitious shoot proliferation in Araceae. *Journal of Plant Growth Regulation* 15(2): 81-85.
- White, J. W. and Montes, C. (1993) The influence of temperature on seed germination in cultivars of common bean. *Journal of Experimental Botany* 44: 1795-1800.
- Wilhelm, R. A., Hansjoerg, F. R., Jan, E. G., Hubert, S. A. and Johannes, J. U. (1987) Tetcyclacis and triazole-type plant growth retardants: their influence on the biosynthesis of gibberellins and other metabolic processes. *Society of Chemical Industry* 21: 241-252.
- Woronuk, G., VijaJoshua-Otieno, P., Laberge, S., Vandenberg, B. and Bett, K. (2010) Transcriptomic analysis of chilling stress in *Phaseolus* spp. *Environmental and Experimental Botany* 69: 95-104.
- Yadegari, L. Z., Heidari, R. and Carapetian, J. (2007) The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MDA), total protein and pigments contents in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Journal of Biological Sciences* 7(8): 1436-1141.
- Zamani Bahramabadi, E., Rezanejad, F. and Sasan, H. (2013) Effects of cold and short day treatments on dehydrin gene expression in seedlings and regenerated shoots of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Iranian Journal of Plant Biology* 4(14): 35-48.

Effect of cultivar, cold and paclobutrazol on growth, chlorophyll content and cell membrane injury in *Phaseolus vulgaris* plantlet

Rayhaneh Amooaghaie * and Elham Shariat

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrkord, Iran

Abstract

The paclobutrazol is one of plant growth regulators from triazoles group that is able to protect plants against environmental stress conditions. This experiment was carried out to investigate paclobutrazol (0, 25 and 50 mg/L) effects on reduction of injuries caused by low temperature ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) stress in two cultivars of *Phaseolus vulgaris* [Daneshkadeh cv. (white bean) and Sayyad cv. (red bean)]. The results showed that low temperature stress, reduced fresh weight and dry matter and also reduced length of shoots and roots and leaf chlorophyll contents but increased electrolyte leakage percentage. Paclobutrazol treatment reduced fresh weight and dry matter and length of shoots but increased root dry weight and root development. Moreover, paclobutrazol-treated plants, when exposed to the cold stress condition, showed electrolyte leakage percentage less than control plants. Treatment of seedlings with paclobutrazol led to an increase in chlorophyll contents, either in stress or non stress conditions. White bean was more sensitive to cold than red bean and paclobutrazol affected white bean more than red bean. Therefore, it could be concluded that paclobutrazol treatment improved ability of plant responses to the cold stress and this effect was more remarkable in cold sensitive cultivars.

Key words: Paclobutrazol, Cold stress, Growth, Chlorophyll content, *Phaseolus vulgaris*, Electrolyte leakage