

تأثیر گلیسرول و سالیسیلیک اسید بر تحمل به تنش یخ‌زدگی گل اطلسی ایرانی (*Petunia hybrida* L.)

حسن بیات^{۱*} و مرتضی علیرضایی نقندر^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۷)

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی تأثیر گلیسرول و سالیسیلیک اسید بر تحمل به تنش یخ‌زدگی گیاه اطلسی ایرانی بود. بدین منظور، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تحت شرایط کنترل شده انجام شد. فاکتور اول شامل دما (صفر و ۴- درجه سانتی‌گراد) و فاکتور دوم محلول‌پاشی با ترکیبات ضد تنش (۲۴ ساعت قبل از تیمار سرمایی) شامل شاهد (آب مقطر)، سالیسیلیک اسید (۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، گلیسرول (۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد) و تیمارهای ترکیبی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید+ گلیسرول (۰/۲۵ و ۰/۵ درصد، ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید+ گلیسرول (۰/۲۵ درصد، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید+ گلیسرول (۰/۲۵ درصد و محلول تجاری ضد سرما با غلظت چهار درصد بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در شرایط تنش یخ‌زدگی، محلول‌پاشی گیاهان با سالیسیلیک اسید و گلیسرول باعث کاهش درصد تخریب ظاهری و نشت الکترولیت و افزایش میزان پرولین، کربوهیدرات کل، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گیاهان شاهد شد. درصد تخریب گیاهان تیمار شده با ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید+ ۰/۵ درصد گلیسرول در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد ۳/۳۳ درصد بود، در حالی که درصد تخریب گیاهان شاهد و تیمار شده با ترکیب تجاری ضد سرما به ترتیب ۵۷/۶۱ و ۲۲/۸۸ درصد بود. بیشترین میزان پرولین از تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید+ ۰/۲۵ درصد گلیسرول و دمای ۴- درجه سانتی‌گراد حاصل شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از گلیسرول و سالیسیلیک اسید باعث کاهش خسارت‌های ناشی از یخ‌زدگی از طریق بهبود شاخص‌های فیزیولوژیکی در گیاه اطلسی شد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، تخریب ظاهری، فریزر ترموگرادیان، محلول‌پاشی برگ‌گی

۱. استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

۲. دانش‌آموخته دکتری، گروه تولیدات گیاهی، مجتمع آموزش عالی شیروان، شیروان، ایران

*: مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: hassanbayat@birjand.ac.ir

مقدمه

اطلسی (*Petunia spp.*) گیاهی یک‌ساله، گل‌دار و زینتی متعلق به خانواده سولاناسه (Solanaceae) است. این گیاه بومی آمریکای جنوبی (مکزیک و آرژانتین) است که دارای ارقام گلدانی و ارقام مناسب برای کاشت در فضای سبز است. نوع بومی آن در ایران که به اطلسی ایرانی (*Petunia hybrida* L.) معروف است از عطر دل‌پذیری برخوردار است. این گیاه مناسب کشت در فصول گرم سال است و به‌طور وسیعی در سطح فضای سبز کشت می‌شود و از مهم‌ترین گیاهان فصلی به‌شمار می‌آید (۱۳).

سالانه تعداد زیادی گل فصلی بهاره (حساس به سرما) در سطح شهر مشهد کشت می‌شود و با توجه به اینکه خطر بروز سرمازدگی بهاره هر سال وجود دارد، انتخاب راهکاری که بتواند خسارت ناشی از سرما و یخبندان را کاهش دهد و از طرفی کیفیت ظاهری گل‌ها را نیز در سطح شهر حفظ کند امری ضروری به نظر می‌رسد. یکی از این راهکارها استفاده از ترکیبات کاهش‌دهنده اثرات مخرب تنش سرما روی گیاهان است که قبل از بروز سرما به‌صورت محلول‌پاشی استفاده می‌شود و می‌تواند خسارات ناشی از سرمازدگی را در این گیاهان به‌شدت کاهش دهد و از تحمیل هزینه‌های واکاری این گیاهان جلوگیری کند. یکی از این مواد تخفیف‌دهنده تنش، سالیسیلیک اسید است. سالیسیلیک اسید یکی از مولکول‌های سیگنال‌دهنده مهم است که باعث عکس‌العمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شود. این ماده همانند یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی نقش مهمی را در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی در گیاه ایفا می‌کند (۲۸). سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک هورمون گیاهی نیز تلقی می‌شود که اثرات گوناگونی بر تحمل به تنش‌های غیر زیستی و نیز کنترل رشد و نمو گیاه دارد (۶ و ۳۴). در طی سال‌های اخیر، به دلیل نقش سالیسیلیک اسید در کاهش اثرات مخرب تنش‌های غیر زیستی مثل سرمازدگی، دمای بالا، خشکی، شوری و اشعه ماورای بنفش توجه زیادی شده است. استفاده از سالیسیلیک اسید در گیاهان گوجه‌فرنگی و لوبیا میزان مقاومت به تنش‌هایی همچون گرما، خشکی و سرما را افزایش می‌دهد (۳۰). علاوه بر این مطالعات

زیادی نشان داده است که سالیسیلیک اسید باعث افزایش مقاومت به سرمازدگی در ذرت (۱۸)، گوجه‌فرنگی (۱۱)، گندم (۳۳)، زردآلو (۱۴)، انار (۲۹)، هلو (۸)، آنتوریوم (۲۷)، نخود (۲۰)، لیمو (۳۱) و کلزا (۲۳) شده است. مواد محافظ یخ‌زدگی (Cryoprotectant) ترکیباتی هستند که برای محافظت بافت‌های زیستی در برابر خسارت یخ‌زدگی استفاده می‌شوند. این ترکیبات از طریق افزایش غلظت سلول و اتصال به مولکول‌های آب باعث کاهش آب موجود در سلول شده و مانع یخ‌زدگی بافت‌ها می‌شوند (۲۵). گلیسرول یا گلیسرین یکی از مواد محافظ یخ‌زدگی است که ترکیبی پلیمری ساده، مایع، بی‌رنگ، بی‌بو و چسبناک است. این ترکیب از سه گروه هیدروکسیل تشکیل شده که به‌آسانی در آب حل می‌شود. گلیسرول ترکیبی غیر سمی، خوراکی، تجزیه‌پذیر و دوست‌دار محیط زیست است. این ماده ترکیبی غیر یونی است که پیوندهای هیدروژنی قوی با مولکول‌های آب تشکیل می‌دهد و با پیوندهای هیدروژنی مولکول‌های آب رقابت می‌کند. این پیوندها مانع تشکیل شبکه‌های بلورهای یخ می‌شوند (۳۵). از مواد محافظ یخ‌زدگی مانند گلیسرین و اتیلن گلیکول (۱) و دی‌ام‌اس‌او (DMSO) (۱۰) به‌صورت محلول‌پاشی روی گیاه برای محافظت از یخ‌زدگی استفاده شده است.

تنش یخ‌زدگی باعث صدمه به غشای سلول و به‌دنبال آن نشت یون‌های مختلف می‌شود (۲۹). در شرایط تنش یخ‌زدگی، مولکول‌هایی با وزن مولکولی پایین مانند قندهای محلول و پرولین در گیاه تجمع پیدا کرده که به تثبیت غشای سلولی و اندامک‌ها در پسا‌ییدگی ناشی از یخ‌زدگی کمک می‌کنند (۳). محتوای پرولین در بسیاری از گیاهان در واکنش به تنش‌های محیطی مانند سرما افزایش می‌یابد و از طریق پاک‌سازی ترکیبات با اکسیژن فعال (ROS) سبب استحکام غشا می‌شود (۲ و ۳). تنش یخ‌زدگی تولید ترکیبات ROS را در گیاه تحریک می‌کند که می‌تواند به پرتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه بزند. گیاهان برای پاک‌سازی و سمیت‌زدایی این ترکیبات از سطح سلول، از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی استفاده می‌کنند. این

لیتر)، گلیسرول (۱/۰، ۲۵/۰، ۵/۰ و ۱ درصد) و تیمارهای ترکیبی ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + گلیسرول ۲۵/۰ درصد، ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + گلیسرول ۵/۰ درصد، ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + گلیسرول ۲۵/۰ درصد و محلول تجاری ضد یخ کراپاید (Cropaid Co, England) با غلظت چهار درصد بود. در مشخصات کراپاید ذکر شده است که این محصول از مواد معدنی و باکتری‌های تیوباسیلوس تشکیل شده است. محلول پاشی گیاهان به نحوی انجام شد که سطح گیاه به طور کامل خیس شد (حدود ۲۰۰ میلی لیتر برای هر گلدان). ۲۴ ساعت پس از محلول پاشی با تیمارهای مختلف، گلدان‌ها برای اعمال تیمارهای یخ‌زدگی در داخل دستگاه فریزر ترموگرادیان قرار گرفتند. نحوه اعمال تیمارهای یخ‌زدگی به این صورت بود که دمای دستگاه از ۱۰ درجه سانتی گراد اولیه به صورت نزولی (دو درجه سانتی گراد کاهش در هر ساعت) کاهش پیدا کرد و به مدت سه ساعت در تیمارهای دمایی مدنظر (صفر و ۴- درجه سانتی گراد) قرار گرفتند. سپس برای جلوگیری از ذوب شدن سریع یخ، دما به تدریج تا ۱۰ درجه سانتی گراد (افزایش دو درجه سانتی گراد در هر ساعت) افزایش پیدا کرد (۲۶) و اندازه‌گیری صفات، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار یخ‌زدگی انجام شد.

درصد تخریب ظاهری

درصد تخریب ظاهری با توجه به علائمی مانند پژمردگی، نکروزه شدن و سیاه شدن برگ‌ها و گل‌های گیاه بررسی شد (۱۵).

نشت یونی

برای تعیین پایداری غشای سلول‌های برگ‌ها از شاخص نشت یونی استفاده شد. در این روش ابتدا قطعات برگ‌ها با اندازه دو سانتی متر تهیه شد. این قطعات پس از شستشو همراه با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر در لوله‌های آزمایش قرار گرفتند. سپس لوله‌های آزمایش به مدت ۱۷ تا ۱۸ ساعت به وسیله شیکر

آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند ترکیبات ROS را حذف، خنثی و یا پاک کنند و به کاهش پراکسیداسیون چربی و حفظ پایداری غشای سلولی کمک کنند (۲۷).

تأثیر سالیسیلیک اسید و ترکیبات محافظ یخ‌زدگی در کاهش اثرات تنش یخ‌زدگی در برخی از محصولات توسط پژوهشگران گزارش شده است ولی تاکنون پژوهش جامعی که اثر این ترکیبات را به صورت مستقل و در ترکیب با یکدیگر روی گل اطلسی بررسی کند، مشاهده نشده است. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سالیسیلیک اسید و گلیسرول بر تحمل به تنش یخ‌زدگی گل اطلسی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارها

این آزمایش در گلخانه پژوهشاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در بهار سال ۱۳۹۲ انجام شد. بذر گل‌های اطلسی ایرانی در داخل سینی‌های حاوی کوکوپیت و پیت کشت شدند. پس از اینکه گیاهچه‌ها به مرحله ۵ تا ۶ برگگی رسیدند به داخل گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۱۲ سانتی متر منتقل شدند. بستر کاشت مورد استفاده ترکیبی از یک قسمت خاک لوم، یک قسمت خاکبرگ و یک قسمت ماسه بود. خاک مورد استفاده از نوع لومی شنی با اسیدیته ۷/۲ بود. گیاهان در داخل گلخانه‌ای با درجه حرارت روز به شب ۲۴ به ۱۸ درجه سانتی گراد، شدت نور $85 \text{ mmol/m}^2/\text{s}$ و رطوبت نسبی ۶۵ درصد پرورش یافتند. آبیاری گلدان‌ها نیز به صورت یک روز در میان انجام شد.

پس از ۴۵ روز از انتقال گیاهان به داخل گلدان و قبل از اعمال تنش یخ‌زدگی، تیمارهای محلول پاشی روی گل‌های اطلسی ایرانی انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل دما (صفر و ۴- درجه سانتی گراد) و فاکتور دوم محلول پاشی با ترکیبات ضد تنش (۲۴ ساعت قبل از تیمار سرمایی) شامل شاهد (آب مقطر)، سالیسیلیک اسید (۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در

نانومتر انجام گرفت. به منظور تهیه محلول استاندارد در این آزمایش از گلوکز خالص استفاده شد (۹).

فنل کل

مقدار فنل کل با استفاده از روش سینگلتنون و رسی (۳۲) تعیین شد. بدین منظور ۵۰۰ میلی گرم از نمونه‌ها پس از توزین به وسیله ۲۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد، طی دو مرحله هم‌وزن‌نایز و عصاره‌گیری شد. سپس عصاره‌ها به مدت پنج دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین سیکالتو اضافه شد. پس از گذشت پنج دقیقه، دو میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به محلول اضافه شد. در نهایت پس از ۳۰ دقیقه جذب نور در ۷۶۵ نانومتر انجام شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری ظرفیت تخریب رادیکال‌های فعال از روش (۷) استفاده شد. ۱۰۰ میلی گرم ماده برگی تازه را در نیتروژن مایع هم‌وزن‌نایز کرده و عصاره‌گیری با اتانول ۹۶ درصد انجام شد. برای جداسازی مواد جامد نامحلول به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ با ۳۵۰۰ دور انجام شد. مقدار مناسبی از محلول شفاف بالایی را با ۸۰۰ میکرولیتر از محلول نیم میلی مولار دی‌پی‌ایچ (DPPH) مخلوط و میزان جذب پس از ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. ظرفیت تخریب رادیکال‌های فعال با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$(۱) = \text{تخریب رادیکال‌های فعال} (\%)$$

$$\frac{\text{جذب نمونه شاهد} - \text{جذب نمونه مورد ارزیابی}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

تجزیه آماری

داده‌های به دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار JMP ۸ مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD و در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

(۱۶۰ دور در دقیقه) تکان داده شدند. در این مرحله مقدار هدایت الکتریکی نمونه‌های آزمایش (E۱) به وسیله دستگاه EC متر مدل JENWAY اندازه‌گیری شد. سپس لوله‌های آزمایش به منظور کشته شدن سلول‌های برگ‌گی به اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انتقال داده شدند. بدین طریق اندازه‌گیری هدایت الکتریکی در این مرحله (E۲) نیز پس از سرد شدن محتویات داخل لوله‌های آزمایش انجام گرفت. در نهایت مقادیر نشت یون‌ها از طریق رابطه زیر محاسبه شد (۲۱).

$$EL = (E1/E2) \times 100 \quad (۱)$$

پرولین

۰/۱ گرم برگ تازه را در هاون چینی همراه با ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳/۳ درصد ابتدا به خوبی سائیده و در مرحله بعد دو میلی لیتر از معرف ناین هیدرین (۱/۲۵ گرم ناین هیدرین + ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک شش مولار + ۳۰ میلی لیتر اسید استیک خالص) و دو میلی لیتر اسید استیک گلاسیال (خالص) به هریک از لوله‌های محتوی عصاره و یا استاندارد افزوده شد. لوله‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم (بن ماری) در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس به منظور خنک شدن به داخل مخلوط آب و یخ منتقل شدند. در این مرحله و در زیر هود شش میلی لیتر تولوئن به هریک از لوله‌های آزمایش افزوده و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه به شدت تکان داده شدند. در نهایت میزان جذب نور در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Jenway Model ۶۳۰۵, Germany) قرائت شد (۵).

قندهای کل محلول

برای اندازه‌گیری قندهای محلول، ۵۰۰ میلی گرم نمونه برگ‌گی توزین شد. سپس طی دو مرحله توسط ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد استخراج عصاره صورت پذیرفت. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس سه میلی لیتر معرف آنترون به نمونه‌ها اضافه شد. در نهایت پس از اعمال ۱۰ دقیقه دمای آب جوش، میزان جذب نور در ۶۳۰

نتایج و بحث

درصد تخریب ظاهری و نشت یونی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اثرات ساده محلول پاشی با ترکیبات ضد تنش، دما و برهم‌کنش آنها بر درصد تخریب گیاهان اطلسی معنی‌دار بود (جدول ۱). میانگین درصد تخریب ظاهری در دمای صفر و ۴- درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۵/۳۰ و ۲۰/۰۴ درصد بود (جدول ۲). در بین تیمارهای محلول پاشی، کمترین درصد تخریب در تیمار ترکیبی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۵ درصد گلیسرول مشاهده شد (جدول ۱). در شرایط تنش سرمایی، گیاهان تیمار شده با ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۵ درصد گلیسرول در دمای صفر درجه سانتی‌گراد کاملاً سالم بودند و درصد تخریب آنها صفر بود و با کاهش دما به ۴- درجه سانتی‌گراد درصد تخریب به ۳/۳۳ درصد افزایش یافت که بسیار اندک بود (جدول ۲). همچنین بیشترین درصد تخریب (۵۷/۶۱ درصد) در گیاهان شاهد و دمای ۴- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول ۲). اثرهای دما، ترکیب‌های ضد تنش و برهم‌کنش آنها بر نشت یونی برگ گیاهان اطلسی معنی‌دار بود (جدول ۱). با افزایش دما از صفر به ۴- درجه سانتی‌گراد، میزان نشت یونی از ۲۲/۳۹ به ۳۵/۳۴ درصد افزایش یافت (جدول ۱). کمترین (۱۶/۶۸ درصد) و بیشترین (۵۸/۱۱ درصد) نشت یونی به ترتیب از تیمارهای ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۵ درصد گلیسرول و شاهد به دست آمد. (جدول ۱). تحت شرایط تنش یخ‌زدگی، کمترین درصد نشت یونی در دماهای صفر و ۴- درجه سانتی‌گراد از تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۵ درصد گلیسرول حاصل شد (جدول ۲). همچنین در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد، میزان نشت یونی در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۵ درصد گلیسرول در مقایسه با تیمار شاهد و ترکیب تجاری ضد سرما به ترتیب ۷۵ و ۵۶ درصد کمتر بود (جدول ۲). به دلیل اینکه تنش یخ‌زدگی سبب اختلال در غشای سلول و به دنبال آن نشت یونی از سلول‌ها می‌شود، لذا اندازه‌گیری میزان نشت از بافت‌های تحت تنش، معیار قابل قبولی برای مقاومت

به تنش یخ‌زدگی است (۲۶). موسوی و همکاران (۲۴) گزارش کردند که اعمال تیمار یخ‌زدگی بر گیاه مینا چمنی باعث افزایش درصد نشت یونی سلول‌ها شد. ارزیابی میزان مقاومت گیاه رازیانه به تنش یخ‌زدگی از طریق اندازه‌گیری میزان نشت یون‌ها نیز نشان داد که با کاهش دمای یخ‌زدگی، درصد نشت یونی در اندام‌های مختلف به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و ریشه و برگ به ترتیب بیشترین و کمترین درصد نشت یونی را داشتند (۲۶). سالیسیلیک اسید از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، گیاه را از صدمات حاصل از واکنش‌های اکسیداتیو حفظ می‌کند (۲۳). علاوه بر این آلبرت و همکاران (۱) گزارش کردند که گلیسرول خسارت سرمازدگی در گل‌های سیب را کاهش می‌دهد. همچنین موراتیل و همکاران (۲۵) گزارش کردند که کاربرد گلیسرول خسارت یخ‌زدگی در گیاه گوجه‌فرنگی را کاهش داد که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت داشت. گلیسرول ترکیبی غیر یونی است که پیوندهای هیدروژنی قوی با مولکول‌های آب تشکیل می‌دهد که با پیوندهای هیدروژنی مولکول‌های آب رقابت می‌کند. این پیوندها مانع تشکیل شبکه‌های بلورهای یخ می‌شوند. این ترکیب همچنین از طریق افزایش غلظت سلول مانع یخ‌زدگی بافت‌ها می‌شود. همچنین این ترکیب از طریق اتصال به آب باعث کاهش آب موجود در سلول شده و میزان یخ‌زدگی را کاهش می‌دهد (۳۵).

قندهای محلول کل

نتایج نشان داد که اثرات دما و محلول پاشی با ترکیبات ضد تنش و اثر متقابل آنها بر میزان قندهای محلول معنی‌دار بود (جدول ۱). با کاهش دما از صفر به ۴- درجه سانتی‌گراد، میزان قندهای محلول کل افزایش یافت به طوری که مقدار آن از ۰/۳۹۳ به ۰/۴۴۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسید. همه ترکیبات ضد تنش میزان قندهای محلول را نسبت به شاهد افزایش دادند به طوری که بیشترین میزان قندهای محلول از تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۵ درصد گلیسرول حاصل شد که به ترتیب ۲/۳ برابر و ۶۴ درصد بیشتر از تیمارهای شاهد و

جدول ۱. تأثیر دماهای یخزدگی و ترکیبات ضد تنش بر درصد تخریب و صفات فیزیولوژیکی مورد بررسی اطلسی ایرانی

پرویلین	فنل کل	قندهای کل محلول	نشست یونی	فعالیت آنتی اکسیدانی	درصد تخریب	تیما
($\mu\text{mol/g FW}$)	(mg/g FW)			(%)		
						دماهای یخزدگی (درجه سانتی گراد)
۲/۳۰۹ ^b	۰/۲۰۹ ^b	۰/۳۹۳ ^b	۲۲/۳۹ ^b	۵۳/۲۴۱ ^a	۵/۳۰ ^b	۰
۲/۸۷۱ ^a	۰/۲۵۱ ^a	۰/۴۴۳ ^a	۳۵/۳۴ ^a	۵۴/۸۳۶ ^a	۲۰/۰۴ ^a	-۴
						تیما ضد تنش
۱/۳۵ ^f	۰/۱۹۶ ^{c-e}	۰/۳۲۵ ^{cd}	۳۳/۲۹ ^c	۵۲/۵۶ ^d	۱۶/۶۶ ^c	۱
۳/۹۷ ^c	۰/۲۷۷ ^{a-c}	۰/۵۵۱ ^{ab}	۲۲/۵۵ ^e	۵۶/۳۰ ^{b-d}	۵/۸۳ ^f	۲
۴/۱۱ ^c	۰/۲۸۷ ^{ab}	۰/۵۶۸ ^{ab}	۱۹/۳۴ ^f	۵۸/۴۶ ^{b-d}	۳/۳۳ ^{gh}	۳
۰/۳۵ ^g	۰/۱۷۴ ^{d-f}	۰/۲۹۳ ^{cd}	۴۱/۰۷ ^b	۳۹/۵۱ ^e	۳۲/۵۰ ^b	۴
۱/۳۰ ^f	۰/۱۴۲ ^{ef}	۰/۳۵۱ ^{cd}	۳۰/۴۱ ^d	۵۲/۵۶ ^d	۱۴/۵۰ ^d	۵
۲/۳۸ ^d	۰/۲۴۲ ^{b-d}	۰/۳۶۹ ^{bc}	۲۳/۲۲ ^e	۵۴/۶۶ ^{cd}	۹/۵۸ ^e	۶
۵/۳۳ ^a	۰/۳۴۲ ^a	۰/۵۶۱ ^{ab}	۱۷/۳۷ ^g	۶۵/۸۷ ^a	۲/۴۱ ^{hi}	۷
۴/۵۴ ^b	۰/۳۲۰ ^{ab}	۰/۵۹۵ ^{ab}	۱۶/۶۸ ^g	۶۱/۸۶ ^{ab}	۱/۶۶ ⁱ	۸
۳/۹۵ ^c	۰/۲۵۸ ^{a-d}	۰/۴۴۶ ^{a-c}	۲۰/۶۵ ^f	۶۰/۴۰ ^{a-c}	۳/۷۵ ^g	۹
۱/۹۴ ^e	۰/۱۹۵ ^{c-e}	۰/۳۶۱ ^{cd}	۳۴/۸۶ ^c	۵۴/۱۹ ^{cd}	۱۶/۶۶ ^c	۱۰
۰/۳۲ ^g	۰/۱۰۱ ^f	۰/۱۸۱ ^d	۵۸/۱۱ ^a	۳۸/۰۰ ^e	۴۰/۰۴ ^a	۱۱
**	*	*	**	ns	**	دما
**	**	**	**	**	**	تیما ضد تنش
*	*	**	**	**	**	دما x تیما ضد تنش

۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد گلیسرول؛ ۵ و ۶ به ترتیب ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید؛ ۷: ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۲۵ درصد گلیسرول؛ ۸: ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۵ درصد گلیسرول؛ ۹: ۲۰۰ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۲۵ درصد گلیسرول؛ ۱۰: محلول تجاری یک درصد و ۱۱: شاهد. ns. * و ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح پنج و یک درصد. میانگین هایی که در یک ستون و برای هر عامل، حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد با هم تفاوت معنی داری ندارند.

سانتی گراد حاصل شد (جدول ۲). باغبان ها و همکاران (۴) گزارش کردند که در گیاه لیمو میزان قندهای محلول پس از تیمار سرمایی افزایش یافت. سالیسیلیک اسید

محلول تجاری ضد سرما بود (جدول ۲). در شرایط یخزدگی، بیشترین میزان قندهای محلول از تیمار ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۵ درصد گلیسرول در دمای -۴ درجه

جدول ۲. تأثیر برهم‌کنش دماهای یخ‌زدگی و تیمارهای ضد تنش بر درصد تخریب و صفات فیزیولوژیکی اطلسی ایرانی

تیمار ضد تنش	دماهای یخ‌زدگی (درجه سانتی‌گراد)	درصد تخریب	نشت یونی	فعالیت آنتی‌اکسیدانی	قندهای محلول کل	فنل کل	پروترین
	(درجه سانتی‌گراد)	(درصد)	(درصد)	(درصد)	(mg/g FW)	(μmol/g FW)	
۱	۰	۳/۳۱ ⁱ	۲۰/۳۳ ^{g-i}	۵۰/۸۱ ^{c-e}	۰/۳۱۶ ^{de}	۰/۱۸۶ ^{c-g}	۱/۴۹ ^{ij}
۲	-۴	۳۰/۰۰ ^c	۴۶/۲۴ ^c	۵۴/۳۰ ^{c-e}	۰/۳۳۴ ^{de}	۰/۲۰۷ ^{b-g}	۱/۲۲ ^{jk}
۳	۰	۱/۶۷ ^j	۱۶/۵۷ ^{j-l}	۵۳/۹۶ ^{c-e}	۰/۴۴۷ ^{b-d}	۰/۲۵۰ ^{b-d}	۳/۶۲ ^c
۴	-۴	۱۰/۰۰ ^g	۲۸/۵۴ ^f	۵۸/۶۴ ^{b-d}	۰/۶۵۴ ^b	۰/۳۰۴ ^{a-c}	۴/۳۲ ^c
۵	۰	۱/۶ ^j	۱۸/۴۴ ^{i-k}	۵۸/۲۷ ^{b-d}	۰/۴۸۳ ^{a-d}	۰/۲۷۰ ^{a-d}	۳/۹۱ ^{c-e}
۶	-۴	۵/۰۷ ^h	۲۰/۲۵ ^{g-i}	۵۸/۶۵ ^{b-d}	۰/۶۵۲ ^b	۰/۳۰۲ ^{a-c}	۴/۳۷ ^c
۷	۰	۱۰/۰۰ ^g	۲۷/۳۱ ^f	۴۵/۳۹ ^e	۰/۲۸۵ ^{de}	۰/۱۲۳ ^{c-g}	۰/۲۲ ^l
۸	-۴	۴۰/۰۰ ^b	۵۴/۸۴ ^b	۳۳/۶۳ ^f	۰/۳۰۲ ^{de}	۰/۲۲۴ ^{b-f}	۰/۴۷ ^l
۹	۰	۳/۳۳ ⁱ	۲۲/۳۷ ^g	۵۰/۸۱ ^{c-e}	۰/۳۴۵ ^{de}	۰/۱۱۲ ^{c-g}	۰/۹۳ ^k
۱۰	-۴	۲۵/۶۷ ^d	۳۸/۴۶ ^e	۵۴/۳۰ ^{c-e}	۰/۳۵۶ ^{de}	۰/۱۷۲ ^{d-g}	۱/۶۶ ^{hi}
۱۱	۰	۱/۶ ^j	۱۷/۹۷ ^{i-k}	۵۲/۲۰ ^{c-e}	۰/۳۵۹ ^{de}	۰/۲۰۸ ^{b-g}	۲/۱۸ ^{fg}
۱۲	-۴	۱۷/۵۰ ^f	۲۸/۴۸ ^f	۵۷/۱۲ ^{b-d}	۰/۳۸۰ ^{de}	۰/۲۷۷ ^{a-d}	۲/۵۸ ^f
۱۳	۰	۱/۴۷ ^{jk}	۱۸/۹۱ ^{i-j}	۵۹/۱۰ ^{bc}	۰/۶۴۷ ^{a-c}	۰/۳۰۸ ^{ab}	۵/۰۴ ^b
۱۴	-۴	۳/۳۳ ⁱ	۱۵/۸۳ ^{kl}	۷۲/۶۴ ^a	۰/۴۷۴ ^{a-d}	۰/۳۷۶ ^a	۵/۶۲ ^a
۱۵	۰	۰/۰۰ ^k	۱۴/۹۸ ^l	۵۸/۷۰ ^{b-d}	۰/۴۵۵ ^{a-d}	۰/۳۲۰ ^{ab}	۴/۲۲ ^{cd}
۱۶	-۴	۳/۳۳ ⁱ	۱۸/۴۰ ^{i-k}	۶۵/۰۳ ^{ab}	۰/۷۳۵ ^a	۰/۳۲۱ ^{ab}	۴/۸۶ ^b
۱۷	۰	۲/۵۲ ^{ij}	۲۱/۶۷ ^{gh}	۵۵/۶۸ ^{b-d}	۰/۴۷۶ ^{a-d}	۰/۲۳۱ ^{b-e}	۳/۸۷ ^{de}
۱۸	-۴	۵/۰۳ ^h	۱۹/۶۴ ^{hi}	۶۵/۱۲ ^{ab}	۰/۴۱۷ ^{b-e}	۰/۲۸۵ ^{a-d}	۴/۰۳ ^{c-e}
۱۹	۰	۱۰/۴۵ ^g	۲۷/۶۳ ^f	۵۱/۴۴ ^{c-e}	۰/۳۳۵ ^{de}	۰/۱۸۶ ^{c-g}	۱/۸۰ ^{g-i}
۲۰	-۴	۲۲/۸۸ ^e	۴۲/۱۰ ^d	۵۶/۹۵ ^{b-d}	۰/۳۸۶ ^{c-e}	۰/۲۰۴ ^{b-g}	۲/۰۸ ^{gh}
۲۱	۰	۲۲/۳۹ ^e	۴۰/۱۹ ^{de}	۴۹/۲۴ ^{de}	۰/۱۸۰ ^e	۰/۱۱۰ ^{fg}	۰/۲۷ ^l
۲۲	-۴	۵۷/۶۱ ^a	۷۶/۰۴ ^a	۲۶/۷۶ ^f	۰/۱۸۲ ^c	۰/۰۹۱ ^g	۰/۳۸ ^l

۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد گلیسرول؛ ۵ و ۶ به ترتیب ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید؛ ۷: ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۲۵ درصد گلیسرول؛ ۸: ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۵ درصد گلیسرول؛ ۹: ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۲۵ درصد گلیسرول؛ ۱۰: محلول تجاری ۱ درصد و ۱۱: شاهد. میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد باهم تفاوت معنی‌داری ندارند.

ایجاد پیوند هیدروژنی با دنباله‌های قطبی پلی‌پپتیدها و گروه‌های فسفولیپیدی از تخریب پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند (۳). همچنین گزارش شده است که گلیسرول باعث افزایش میزان سالیسیلیک اسید درونی گیاه می‌شود (۱۶) که به نظر می‌رسد گلیسرول از طریق افزایش سالیسیلیک اسید باعث افزایش میزان قندهای محلول در گیاه می‌شود.

سبب تحریک تجزیه قندهای نامحلول یا پروتئین‌ها می‌شود و با ایجاد منبع اسمزی سبب کاهش خسارت یخ‌زدگی می‌شود. قندها در کاهش دمای انجماد آب سلولی، تأمین انرژی قابل دسترس و محافظت از ساختمان و نحوه عمل پروتئین‌ها در ایجاد مقاومت به سرما نقش عمده‌ای دارند (۱۷). همچنین قندهای محلول باعث ثبات پروتئین‌ها و غشاهای می‌شوند و با

فنل کل

اثرات دما و ترکیبات ضد تنش و اثر متقابل آنها بر میزان فنل کل معنی‌دار بود (جدول ۱). کاهش دما از صفر به ۴- درجه سانتی‌گراد باعث افزایش فنل کل شد (جدول ۱). همه ترکیبات ضد تنش میزان فنل کل را افزایش دادند به طوری که کمترین و بیشترین میزان فنل کل به ترتیب از تیمارهای شاهد و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۲۵ درصد گلیسرول به دست آمد (جدول ۱). در شرایط تنش یخ‌زدگی، کمترین و بیشترین میزان فنل کل به ترتیب از تیمارهای شاهد و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۲۵ درصد گلیسرول و دمای ۴- درجه سانتی‌گراد حاصل شد (جدول ۲). یکی از مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان تحت شرایط تنش یخ‌زدگی، افزایش میزان ترکیبات فنلی است، چرا که این ترکیبات سرشار از گروه CO - هستند که به عنوان پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد به وجود آمده در اثر تنش یخ‌زدگی عمل کرده و در نتیجه سبب ثبات غشای سلول و مانع از پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند (۱۲).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اثر دما بر درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ گیاهان اطلسی معنی‌دار نشد ولی اثرات محلول‌پاشی با ترکیبات ضد تنش و اثر متقابل آنها معنی‌دار بود (جدول ۱). همه ترکیبات ضد تنش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نسبت به شاهد افزایش دادند. کاربرد تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۲۵ درصد گلیسرول میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به ترتیب ۲/۳۸ برابر و ۷۵ درصد در مقایسه با تیمار شاهد و محلول تجاری ضد سرما افزایش داد (جدول ۱). کمترین (۲۶/۷۶ درصد) و بیشترین (۷۲/۶۴ درصد) فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دماهای یخ‌زدگی به ترتیب از تیمارهای شاهد و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۲۵ درصد گلیسرول در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد به دست آمد (جدول ۲). افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت شرایط تنش یخ‌زدگی توسط سایر پژوهشگران گزارش شده است (۲۳ و ۳۱). افزایش فعالیت

آنتی‌اکسیدانی در اثر تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، یکی از مکانیسم‌های دفاعی بر علیه تنش‌های مختلف است. هنگامی که گیاهان در معرض تنش یخ‌زدگی قرار می‌گیرند سطوح رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و به دنبال آن بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها برای حذف این ترکیبات بیشتر شده و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بهبود می‌یابد که باعث افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش یخ‌زدگی می‌شود (۱۹). گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان می‌دهند سالیسیلیک اسید باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود و از این طریق باعث کاهش خسارت یخ‌زدگی می‌شود (۲۳ و ۳۱).

پرولین

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اثرات دما، ترکیبات ضد تنش و اثر متقابل آنها بر میزان پرولین برگ‌های گیاهان اطلسی معنی‌دار بود (جدول ۱). میزان پرولین با کاهش دما از صفر به ۴- درجه سانتی‌گراد، ۲۴ درصد افزایش یافت (جدول ۱). میزان پرولین با کاربرد ترکیبات ضد تنش در مقایسه با شاهد افزایش یافت به طوری که تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۲۵ درصد گلیسرول میزان پرولین را به ترتیب ۱۵/۶ و ۱/۷ برابر نسبت به گیاهان شاهد و تیمار شده با محلول تجاری ضد سرما افزایش داد (جدول ۱). در شرایط یخ‌زدگی، بیشترین میزان پرولین از تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۰/۲۵ درصد گلیسرول و دمای ۴- درجه سانتی‌گراد حاصل شد (جدول ۲). محتوای پرولین در بسیاری از گیاهان در واکنش به تنش‌های محیطی مانند سرما افزایش می‌یابد (۲ و ۳). پرولین در شرایط تنش سبب تنظیم پتانسیل اسمزی، پایداری ساختارهای سلولی از جمله غشاهای سلولی و پروتئین‌ها از طریق پاک‌سازی ترکیبات ROS و خنثی کردن پتانسیل اکسیداسیون احیای سلولی می‌شود (۳). تجمع پرولین تحت شرایط تنش به علت فعال‌سازی آنزیم‌های بیوسنتزی پرولین، کاهش اکسیداسیون و کاهش استفاده از پرولین در سنتز پروتئین‌هاست (۲۲).

نتیجه گیری

گلیسرین تأثیر بیشتری در تخفیف اثرات مخرب تنش یخ‌زدگی در گیاه اطلسی داشته است. در بین تیمارهای مورد استفاده، تیمار ترکیبی سالیسیلیک اسید و گلیسرول (۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید + ۵/۵ درصد گلیسرول) در ۲۴ ساعت قبل از سرما بیشترین تأثیر را در کاهش اثرات مخرب سرمازدگی داشت که قابل توصیه است.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان اظهار کرد که استفاده از گلیسرول، سالیسیلیک اسید و تیمارهای ترکیبی گلیسرول و سالیسیلیک اسید، میزان خسارت یخ‌زدگی در گیاه اطلسی را از طریق بهبود شاخص‌های ظاهری و فیزیولوژیکی کاهش داد. نتایج نشان داد که کاربرد تیمار ترکیبی سالیسیلیک اسید و گلیسرول در مقایسه با کاربرد سالیسیلیک اسید و

منابع مورد استفاده

- Albrecht, E., M. Schimitz-Eibenger, M. Brauckmann, W. Rademacher and G. Noga. 2004. Use of prohexa-dione-calcium, vitamin E, and glycerine for the reduction of frost injury in apple (*Malus domestica*) flowers and leaves. *European Journal of Horticultural Science* 69: 59-65.
- Apostolova, P., R. Yordanova and L. Popova. 2008. Response of antioxidative defense system to low temperature stress in two wheat cultivar. *General and Applied Plant Physiology* 34: 281-294.
- Ashraf, M. and M. R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206-216.
- Baghbanha, M., R. Fotuhi Ghazvini, A. Hatamzadeh and M. Heidari. 2007. Effect of salicylic acid on freezing tolerance of Mexican lime seedling (*Citrus aurantifolia* L.). *Journal of Horticultural Science and Technology* 8: 185-198. (In Farsi).
- Bates, L. S., R. P. Waldern and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39(1): 205-207.
- Bergmann, H. L., V. Maachelett and B. Gerbel. 1994. Increase of stress resistance in crop plants by using phenolic compounds. *Acta Horticulture* 381: 390-395.
- Burits, M. and F. Bucar. 2000. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. *Phytotherapy Research* 14: 323-328.
- Cao, S., Z. Hu, Y. Zheng and B. Lu. 2010. Synergistic effect of heat treatment and salicylic acid on alleviating internal browning in cold-stored peach fruit. *Postharvest Biology and Technology* 58: 93-97.
- Carrol, H. V., R. W. Longley and J. H. Roe. 1956. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *Journal of Biological Chemistry* 220(2): 583-593.
- Dhawan, A. K., A. Hooda and R. K. Goyal. 1986. Effect of Low temperature, short days, water stress and Dimethyl Sulphoxide on frost tolerance of Brassies. Juncea, Coss and Czen Var. Prakash. *Annals of Botany* 58: 267-271.
- Ding, C. K., C. Y. Wang, K. C. Gross and D. L. Smith. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214: 895-901.
- Dixon, R. A. and N. L. Paiva. 1995. Stress-induced phenyl-propanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Dole, J. M. and H. F. Wilkins. 2005. Floriculture: Principles and Species. Upper Saddle River, Prentice Hall.
- Guo, S. H., Q. Yang, X. L. Yang, Y. F. Liu, J. C. Qi and Y. M. Bi. 2007. Effects of salicylic acid on cold resistance during flowering period and fruit sitting rate in apricot. *Nonwood Forest Research* 25: 24-27.
- Jalilian, A., D. Mzaheri, R. Tavakkol Afshari, M. Abdollahian-Noghabi, H. Rahimian and A. Ahmadi. 2009. Effect of freezing damage at seedling stage in different sugar beet cultivars. *Iranian Journal of Crop Science* 10: 400-415. (In Farsi).
- Kachroo, A., L. Lapchyk, H. Fukushige, D. Hildebrand, D. Klessig and P. Kachroo. 2003. Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid- and jasmonic acid-mediated defense pathways in the Arabidopsis ssi2 mutant. *Plant Cell* 15: 2952-2965.
- Kafi, M. and A. Mahdavi Damghani, 2002. Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants. Ferdowsi University of Mashhad Press, Mashhad. (In Farsi).
- Kang, G., G. Li and T. Guo. 2014. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 2287-2297.
- Kang, H. M. and M. E. Saltveit. 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum* 115: 571-576.

20. Kazemi-Shahandashti, S. S., R. Maali-Amiri, H. Zeinali, M. Khazaei, A. Talei and S. S. Ramezanpour. 2014. Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *Journal of Plant Physiology* 171: 1106–1116.
21. Lutts, S., J. M. Kinet and J. Bouharmont. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany* 8: 389-398.
22. Maggio, A., S. Miyazaki, P. Veronese, T. Fujita, J. I. Ibeas, B. Damsz, M. L. Narasimhan, P. M. Hasegawa, R. J. Joly and R. A. Bressan. 2002. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal* 31(6): 699-712.
23. Mellouk, Z., I. Benammar and Y. Hernandez. 2016. Effects of foliar application with salicylic acid on the biochemical parameters and redox status in two canola plant varieties exposed to cold stress. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research* 8: 77-87.
24. Moosavi, M. J., S. Nezami, E. Izadi Darbandi, A. Nezami, M. Yousefsani and F. Keykha Akhar. 2011. Evaluation of freezing tolerance of English daisy (*Bellis perennis*) under Controlled Conditions. *Journal of Water and Soil* 25: 380-388. (In Farsi).
25. Moratiel, R., J. M. Durán and R. L. Snyder. 2011. Freezing resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) using potential cryoprotectors. *European Journal of Horticultural Science* 76(1): 12–17.
26. Nezami, A., A. Azizi, A. Siah Merguie and A. A. Mohammad Abadi. 2010. Effect of freezing stress on electrolyte leakage in fennel (*Foeniculum vulgare*). *Iranian Journal of Field Crops Research* 8: 587-593. (In Farsi).
27. Promyoua, S., S. Ketsab and W. G. Van Doorn. 2012. Salicylic acid alleviates chilling injury in anthurium (*Anthurium andraeanum* L.) flowers. *Postharvest Biology and Technology* 64: 104-110.
28. Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 439-463.
29. Sayyari, M., M. Babalar, S. Kalantari, M. Serrano and D. Valero. 2009. Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biology and Technology* 53: 152-154.
30. Senaratna, T., D. Touchell, E. Bunn and K. Dixon. 2000. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation* 30: 157-161.
31. Sibozza, X. I., I. Bertling and A. O. Odindo. 2014. Salicylic acid and methyl jasmonate improve chilling tolerance in cold-stored lemon fruit (*Citrus limon*). *Journal of Plant Physiology* 171: 1722–1731.
32. Singleton, V. R., R. Orthifer and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
33. Tasgin, E., O. Atici and B. Nalbantoglu. 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation* 41: 231-236.
34. Van Breusegem, F., E. Vraneva and J. F. Dat. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405-414.
35. Volk, G. M., J. L. Harris and K. E. Rotindo. 2006. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology* 52: 305–308.

Effects of Glycerol and Salicylic Acid on Freezing Tolerance of Iranian *Petunia (Petunia hybrida L.)*

H. Bayat^{1*} and M. Alirezaie Noghondar²

(Received: February 14-2017; Accepted: January 27-2019)

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of glycerol (GL) and salicylic acid (SA) on freezing tolerance of Iranian *Petunia (Petunia hybrida)*. For this purpose, a factorial experiment based on completely randomized design with three replications was conducted under controlled conditions. The first factor was temperature (0 and -4 °C) and the second factor was spraying with anti-stress compounds (24 hours prior to freezing) consisting of control (distilled water), salicylic acid (75 and 150 mg per liter), glycerol (0.1, 0.25, 0.5 and 1 percent) and the combined treatment of 150 mg/l SA+ 0.25% GL, 150 mg/l SA+ 0.5% GL, 200 mg/l SA+ 0.25% GL and anti-frost trade agent with concentration of 4 percent. The results of this study showed that under freezing stress conditions, SA and GL reduced the percentage of visual damage and electrolyte leakage and increased concentration of proline, and total carbohydrates, total phenols and antioxidant activity as compared to control plants. The percentage of visual damage in plants treated with 150 mg/l of SA + 0.5% GL at -4 °C was 3.33%, while the percentage of visual damage of control plants and those treated with anti-frost trade agent were 57.61 and 22.88 percent, respectively. The highest proline concentration was obtained from application of 150 mg/l of SA + 0.25% GL at -4 °C temperature. The results of this study showed that the use of SA and GL reduced the freezing-induced damage in Iranian *Petunia* through the improvement of physiological indices.

Keywords: Proline, Visual damage, Thermogradient freezer, Foliar spray

1. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

2. Graduated PhD., Department of Plant Production, Higher Educational Institute of Shirvan, Shirvan, Iran.

*: Corresponding Author, Email: hassanbayat@birjand.ac.ir