

## تأثیر اسید سالیسیلیک و کلسیم بر مقاومت به سرمازدگی دانه‌های پسته رقم کله‌قوچی

وحید مظفری<sup>۱</sup>، فاطمه یزدان‌پناه<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۷)

### چکیده

برای بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک و کلسیم بر مقاومت به سرمازدگی دانه‌های پسته، یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه انجام شد. تیمارها شامل اسید سالیسیلیک (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار)، کلسیم (صفر، ۳ و ۶ در هزار) و دما (صفر، ۲- و ۴- درجه سلسیوس) بودند. نتایج نشان داد که با کاهش دما به ۴- درجه سلسیوس، درصد نشت یونی برگ افزایش یافت، لیکن با مصرف توامان اسید سالیسیلیک (۱/۵ میلی‌مولار) و کلسیم (۶ در هزار) این شاخص مهم سرمازدگی، با کاهش ۴۷ درصدی نسبت به شاهد در همین دما، مواجه گردید. همچنین با کاهش دما (از صفر به ۴- درجه سلسیوس)، ترکیبات فنلی و قندهای محلول به ترتیب ۴۴ و ۳۱ درصد و غلظت پرولین بیش از دو برابر نسبت به دانه‌های شاهد افزایش یافت، اما با مصرف توامان بالاترین غلظت‌های اسید سالیسیلیک و کلسیم این پارامترهای القاء مقاومت به ترتیب با افزایش ۴۴، ۳۱ و ۱۰۰ درصدی مواجه گردیدند. نتایج این آزمایش همچنین نشان داد که با کاهش دما، شاخص کلروفیل فلورسانس، کلروفیل کل، کاروتنوئیدها، محتوای پروتئین‌های محلول و نشاسته کاهش یافت، ولی با مصرف توامان ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و تیمار ۶ در هزار کلسیم، مقدار این پارامترها نسبت به شاهد افزایش یافت. به طوری که مقدار کلروفیل کل، کاروتنوئیدها، پروتئین و نشاسته به ترتیب ۸۷، ۴۹، ۲۵ و ۹۹ درصد نسبت به شاهد در دمای ۴- درجه سلسیوس افزایش و دانه‌های پسته را در مقابل تنش سرمایی محافظت نمود. براساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، در شرایط تنش سرمایی، مصرف توامان اسید سالیسیلیک و کلسیم، از طریق بهبود پارامترهای فتوسنتزی و افزایش تنظیم‌کننده‌های اسمزی، اثرات مخرب سرمازدگی دانه‌های پسته را کاهش دادند.

**واژه‌های کلیدی:** ترکیبات فنلی، قندهای محلول، کاروتنوئید، کلروفیل، نشاسته

مظفری و، یزدان‌پناه ف. ۱۳۹۸. تأثیر اسید سالیسیلیک و کلسیم بر مقاومت به سرمازدگی دانه‌های پسته رقم کله‌قوچی. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۷، شماره ۴. صفحه: ۶۱-۴۷.

۱- دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان (مکاتبه کننده)  
 ۲- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان  
 \*پست الکترونیک: [vmozafary@yahoo.com](mailto:vmozafary@yahoo.com)

## مقدمه

پسته (*Pistacia vera* L.) یکی از گونه‌های مهم جنس *Pistacia* است. این جنس متعلق به تیره *Anacardiaceae* و راسته *Sapindales* است. *P. vera* تنها گونه مهم از نظر اقتصادی در جنس *Pistacia* است. یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده انتشار و بقای گونه‌های گیاهی، میزان مقاومت آن‌ها در مقابل تنش‌های محیطی می‌باشد. سالانه خسارات زیادی در بخش کشاورزی و باغبانی به سبب فرار گرفتن گیاهان در شرایط محیطی نامطلوب رخ می‌دهد (Mangrich, 2000). بسیاری از گیاهان و محصولات گیاهی به‌ویژه آنهایی که منشاء گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دارند، در نتیجه فرار گرفتن در معرض دماهای پایین (معمولاً ۱ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد) دچار آسیب‌های فیزیولوژیک می‌شوند که سرمازدگی نامیده می‌شود (Jackman *et al.*, 1988). پسته درختی خزان‌دار است و ظهور برگ در آن تقریباً همزمان با گلدهی است که در این مرحله گیاه در برابر سرمای بهاره حساس است. همچنین این محصول در مرحله گلدهی که معمولاً اواخر اسفند تا اوایل اردیبهشت رخ می‌دهد دچار سرمازدگی شده و خسارت فراوانی از سرمای بهاره می‌بیند. پدیده سرمازدگی زمانی اتفاق می‌افتد که دمای هوا بسته به نوع محصول به دمای آستانه پایین آن گیاه برسد که این دما برای پسته ۴ درجه سلسیوس و کمتر از آن می‌باشد (Taiz & Zeiger, 2002). از آنجایی که دما یکی از عوامل مهمی است که بر سیالیت، پایداری و انعطاف‌پذیری غشاء اثرگذار است، لذا از غشاء به‌عنوان حسگر اولیه زیستی تنش سرما نام برده شده است. یکی از مهم‌ترین اثرات سرما، تأثیر آن بر ساختار غشای سلولی، نفوذپذیری غشاء و افزایش خروج یون‌ها از سلول می‌باشد. نشت یون‌ها از دیواره سلول مربوط به فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی است که تنش سرما سبب افزایش میزان فعالیت این آنزیم‌ها می‌گردد. در گیاهان حساس به سرما، به‌علت نفوذپذیری بالای غشای سلولی، میزان نشت یون‌ها و هدایت الکتریکی بالاست (Mahajan & Tureja, 2005). پژوهشگران گزارش کرده‌اند که تنش سرما به غشاء سیتوپلاسمی آسیب رسانده و در صورت ادامه انجماد، غشاء پاره شده و متعاقب آن مواد سلولی به خارج از سلول نشت می‌نماید

(Vemmos *et al.*, 1994). بنابراین ایجاد روش‌هایی به‌منظور افزایش مقاومت به سرما در گیاهان و محصولات باغی ضروری می‌باشد. از جمله این روش‌ها کاربرد مواد شیمیایی است. سالیسیلات‌ها از جمله مواد شیمیایی هستند که در سال‌های اخیر برای کاهش سرمازدگی از آنها استفاده شده است (Ding *et al.*, 2002). از نظر ویژگی‌های فیزیکی این ماده به‌راحتی در سراسر گیاه انتقال می‌یابد و به‌عنوان یک پیام مولکولی درونی برای ایجاد مقاومت در گیاهان تحت شرایط تنش بکار گرفته می‌شود (Gunes *et al.*, 2007). گیاهان پروتئین‌هایی در برابر واکنش با تنش‌های زنده و غیرزنده تولید می‌کنند. این پروتئین‌ها در اثر القای هورمون‌های گیاهی نظیر آبسزیک اسید و اسید سالیسیلیک به‌وجود می‌آیند (Chen *et al.*, 2007). مشخص گردید که اسید سالیسیلیک، مقاومت به سرمازدگی را در گیاهان جوان ذرت در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار هنگامی که به‌صورت هیدروپونیک به‌کار برده شد را افزایش داد (Mora-Herrera *et al.*, 2005). کاربرد کلسیم نیز در بسیاری از میوه‌ها، باعث بهبود شاخص‌های انبارداری آنها می‌شود. همین‌طور کلسیم باعث کاهش سرعت پیر شدن، رسیدگی، ایجاد تحمل به پاتوژن‌ها و کاهش حساسیت به سرمازدگی در میوه‌ها و سبزی‌های مختلف به‌وسیله به تاخیر انداختن پیری دیواره سلولی، نگهداری و ثبات غشا و طولانی کردن ظرفیت غشا در انتقال سیگنال‌های سلولی می‌شود (Brown *et al.*, 1995). با توجه به اهمیت اقتصادی پسته در ایران و پدیده سرمازدگی که تولید این محصول را سالانه با مشکل مواجه می‌سازد، استفاده از راه‌کارهایی به‌منظور کاهش و یا به حداقل رساندن اثرات سوء ناشی از سرمازدگی، زمینه را برای افزایش محصول فراهم می‌نماید. بنابراین هدف این پژوهش بررسی محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و عنصر غذایی کلسیم در کاهش اثرات سرمازدگی پسته می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

جهت بررسی اثر اسید سالیسیلیک، کلسیم و تیمار سرما و همچنین برهمکنش آن‌ها بر دانه‌های پسته رقم کله‌قوچی در محیط گلخانه، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار در دانشگاه

خنک شده سپس با سرعت انجماد ۵ درجه سلسیوس در ساعت تا دمای ذکر شده ادامه یافت. نمونه‌ها در هر دما به مدت ۳ ساعت نگهداری شدند. سپس تعدادی برگ از هر بوته جدا و به آزمایشگاه منتقل شد. به منظور اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی، ۰.۱ گرم از نمونه برگ تازه تهیه و پس از آماده‌سازی نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت شد (Isfendiyaroglu & Zeker, 2002). برای استخراج پرولین از روش پاکوئین و لچاسر (Paquin & Lechasseur, 1979)، نشت یونی نیز از روش سایرام و سریواستا (Sairam & Srivastava, 2002)، رنگیزه‌های فتوسنتزی به روش آرنون (Arnon, 1949)، فلورسانس کلروفیل با دستگاه (Hansatech LTD Pocket PEA)، قندهای محلول از روش ایریگون و همکاران (UK, Irigoyen *et al.*, 1992)، نشاسته از روش سن و همکاران (Sene *et al.*, 1997) و پروتئین به روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده گردید.

ولی عصر (عج) رفسنجان انجام شد. تیمارها شامل اسید سالیسیلیک (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار)، کلسیم (صفر، ۳ و ۶ در هزار) و دما (صفر، ۲- و ۴-) بودند. بذره‌های مورد نظر از موسسه تحقیقات پسته کشور تهیه گردید. ۸۱ عدد گلدان یک کیلوگرمی تهیه و از خاکی که از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری از یکی از باغ‌های استان کرمان تهیه شده بود پر و در هر گلدان سه بذر کشت داده شد. بعضی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. آبیاری گلدان‌ها به وسیله آب مقطر تا رسیدن به ظرفیت مزرعه همراه با توزین مرتب آنها صورت گرفت. اعمال تیمارها بدین صورت بود که دانه‌های پسته زمانی که در مرحله ۶ تا ۸ برگی رسیدند، در دو نوبت با فاصله ۳ روز با سالیسیلیک اسید و کلسیم محلول پاشی شدند (برای تیمار شاهد از آب استفاده شد). سپس سه روز پس از محلول پاشی دوم دانه‌ها جهت سرمادهی داخل اتاقک رشد قرار گرفتند. بدین منظور ابتدا با آب مقطر اسپری و سپس داخل دستگاه قرار گرفتند. دمای اتاقک رشد با سرعت انجماد ۱۰ درجه سلسیوس در ساعت تا ۲ درجه

جدول ۱- برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

Table 1. Some physical and chemical characteristics of the soil used in studied

Soil characteristics	Unit	Content
pH		7.54
EC	dS m <sup>-1</sup>	1.4
Clay		6
Silt	%	8
Sand		96
Soil texture		Sandy
Field capacity	%W	21
Calcium carbonate equivalent	%	15.83
Olsen phosphorus		12.23
1 M NH <sub>4</sub> OAc-extractable K	mg kg <sup>-1</sup>	171
DTPA-extractable of Cu		0.86
DTPA-extractable of Zn		0.18
DTPA-extractable of Fe	µg g <sup>-1</sup> soil	1.12
DTPA-extractable of Mn		1.22

سلسیوس، درصد نشت یونی در تیمارهایی که اسید سالیسیلیک و کلسیم دریافت نکرده بودند با افزایش روبرو شد. این در حالی است که مصرف ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به تنهایی، موجب کاهش درصد نشت یونی برگ گردید، به طوری که این کاهش نسبت به شاهد

## نتایج و بحث

### نشت یونی

همان‌طور که در جدول مقایسه میانگین‌ها مشاهده می‌شود (جدول ۲)، با کاهش دما از صفر به ۴- درجه

سالیسیلیک و کلسیم موجب کاهش نشت یونی از غشا در پایان تیمار سرمادهی شد. دلیل آن را می‌توان چنین بیان کرد که احتمالاً تیمارهای اعمال شده ضمن افزایش فعالیت آن‌تی اکسیدان‌ها، سبب کاهش سمیت رادیکال‌های آزاد می‌شود.

(۴۹/۱۹) در دمای ۲- و ۴- درجه سلسیوس به‌ترتیب به ۱۲ و ۳۰ درصد رسید. با این حال بیشترین کاهش نشت یونی با مصرف توامان اسید سالیسیلیک (۱/۵ میلی-مولار) و کلسیم (۶ در هزار) اتفاق افتاد به‌گونه‌ای که این کاهش در دمای صفر، ۲- و ۴- درجه سلسیوس به‌ترتیب ۳۷، ۲۸ و ۴۷ درصد نسبت به شاهد بود. نتایج پژوهش حاضر همچنین نشان داد که تیمارهای اسید

جدول ۲- مقایسه میانگین برهمکنش اسید سالیسیلیک و غلظت‌های مختلف کلسیم بر درصد نشت یونی برگ دانه‌های پسته رقم کله‌قوچی در شرایط تنش سرمایی

Table 2. Mean comparison of the interaction of salicylic acid and different calcium concentrations on leaf ion leakage percentage of pistachio seedlings of Kaleghuchi cultivar in cold stress condition

Salicylic Acid (mM)	Calcium (g l <sup>-1</sup> )	Cold stress (°C)		
		0	-2	-4
0	0	49.1 <sup>efg</sup>	52.3 <sup>def</sup>	75.0 <sup>a</sup>
	3	49.5 <sup>efg</sup>	52.4 <sup>def</sup>	59.3 <sup>bc</sup>
	6	42.9 <sup>hijk</sup>	52.5 <sup>de</sup>	64.2 <sup>b</sup>
0.75	0	47.2 <sup>ghi</sup>	49.4 <sup>efg</sup>	59.3 <sup>bc</sup>
	3	36.6 <sup>lm</sup>	55.2 <sup>cd</sup>	61.1 <sup>b</sup>
	6	34.5 <sup>mn</sup>	46.2 <sup>ghi</sup>	89.2 <sup>bc</sup>
1.5	0	42.5 <sup>hijk</sup>	46.0 <sup>ghi</sup>	52.7 <sup>de</sup>
	3	39.8 <sup>jkl</sup>	41.7 <sup>ijkl</sup>	44.8 <sup>ghij</sup>
	6	30.9 <sup>n</sup>	37.5 <sup>klm</sup>	39.9 <sup>jkl</sup>

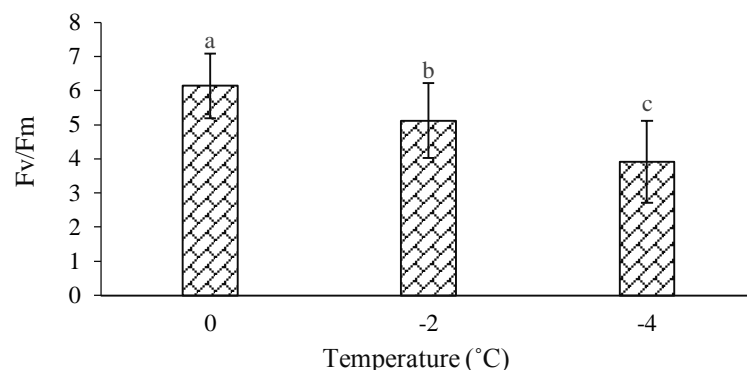
میانگین‌های دارای حروف لاتین مشترک در هر ردیف یا ستون در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with same letters in each row or column are not significantly different at level of 5% according to Duncan test.

#### شاخص کلروفیل فلورسانس (Fv/Fm) و PI

همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با کاهش دما شاخص کلروفیل فلورسانس کاهش می‌یابد. به‌طوری‌که در دمای ۴- درجه سلسیوس شاخص Fv/Fm نسبت به شاهد ۳۶ درصد کاهش یافت.

همچنین کلسیم نیز موجب حفاظت غشا پلاسمایی در مقابل آسیب‌های ناشی از تنش‌های مختلف می‌شود (Rodrigo-Moreno *et al.*, 2013). نتایج به‌دست آمده از این پژوهش با نتایج تاجور و همکاران (Tadjvar *et al.*, 2011) بر نارتگی پیچ مطابقت دارد.



شکل ۱- اثر دما بر شاخص کلروفیل فلورسانس دانه‌های پسته رقم کله‌قوچی

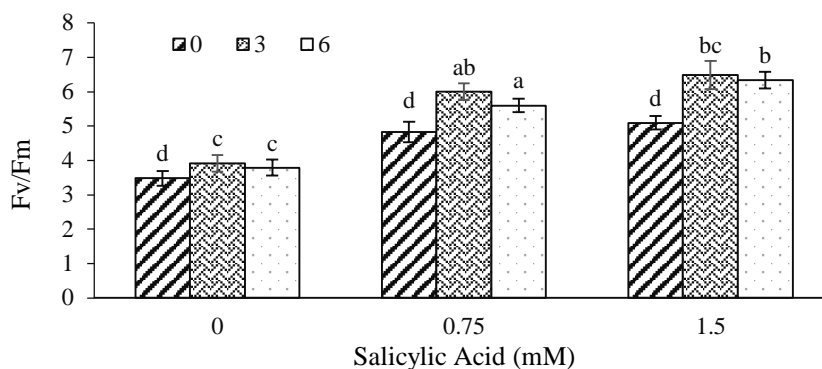
Figure 1. The effect of temperature on chlorophyll fluorescence index of pistachio seedlings of Kaleghuchi cultivar

در میزان شاخص کلروفیل فلورسانس به‌وجود آمد و سبب افزایش این شاخص نسبت به دانه‌های شاهد

لیکن همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود با مصرف توامان اسید سالیسیلیک و کلسیم، تاثیر مثبتی

درصد نسبت به شاهد افزایش حاصل نمود.

گردید. به طوری که با محلول پاشی توامان ۱/۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک و ۳ در هزار کلسیم، این شاخص ۸۶



شکل ۲- برهمکنش اسید سالیسیلیک و کلسیم بر شاخص کلروفیل فلورسانس دانتهال‌های پسته رقم کله‌قوچی

Figure 2. Interaction of salicylic acid and calcium on chlorophyll fluorescence index of pistachio seedlings of Kaleghuchi cultivar

کارایی فتوسنتز نسبت به شاهد گردید. به گونه‌ای که با مصرف ۳ و ۶ کیلوگرم کلسیم در هزار لیتر آب، کارایی فتوسنتز به ترتیب با افزایش ۸۱ و ۴۸ درصدی مواجه شد. با این وجود، بیشترین افزایش در شاخص کارایی فتوسنتز با مصرف توامان اسید سالیسیلیک (۱.۵ میلی مولار) و کلسیم (۳ در هزار) حاصل گردید که این افزایش در دمای صفر، ۲- و ۴- به ترتیب برابر با ۳۲، ۸۷ و ۲۵۱ درصد بود.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به شاخص کارایی فتوسنتز (PI) نیز نشان داد که تأثیر تیمارهای اسید سالیسیلیک، کلسیم و دما و همچنین برهمکنش آن‌ها بر شاخص کارایی فتوسنتز معنی‌دار است. همان‌طور که در جدول مقایسه میانگین‌ها مشاهده می‌شود (جدول ۳)، در شرایطی که اسید سالیسیلیک و کلسیم مصرف نگردید، با کاهش دما کارایی فتوسنتز کاهش یافت، با این حال، محلول پاشی کلسیم به تنهایی موجب افزایش

جدول ۳- مقایسه میانگین برهمکنش اسید سالیسیلیک و کلسیم بر شاخص کارایی فتوسنتز برگ پسته در شرایط تنش سرمایی  
Table 3. Mean comparison of the interaction of salicylic acid and calcium on the efficiency index of pistachio leaf photosynthesis in cold stress conditions

Salicylic acid (mM)	Calcium (g l <sup>-1</sup> )	Cold stress (° C)		
		0	-2	-4
0	0	5.3 defg	3.4 hij	1.7 k
	3	4.2 ghi	4.3 ghi	3.1 ij
	6	4.7 efgh	4.0 ghi	2.5 jk
0.75	0	5.9 cdef	4.7 fgh	3.8 hij
	3	6.6 abcd	7.4 ab	3.09 hi
	6	7.0 abc	5.9 cdef	4.0 ghi
1.5	0	6.6 acdb	4.0 ghi	4.6 fgh
	3	7.0 abc	6.3 bcd	6.0 cde
	6	7.2 a	5.9 cdef	5.3 defg

میانگین‌های دارای حروف لاتین مشترک در هر ردیف یا ستون در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with same letters in each row or column are not significantly different at level of 5% according to Duncan test.

فتوسیستم II می‌تواند نشان‌دهنده میزان آسیب وارده به سیستم فتوسنتزی و توانایی گیاهان در مقاومت به انواع تنش‌های محیطی باشد (Maxwel & Johnson, 2000). این مقدار تحت شرایط عادی برای یک برگ سالم گیاه ۰/۸ یا ۸۰ درصد گزارش شده است که با هر

شاخص فلورسانس کلروفیل یا نسبت  $F_v/F_m$  که نشان‌دهنده بازده فتوسنتز می‌باشد، تحت تأثیر شرایط تنش یخ‌زدگی و سرمایی قرار می‌گیرند و مقدار آن در گیاهان حساس به سرما کاهش می‌یابد. فلورسانس کلروفیل به‌عنوان شاخص تعیین میزان کارایی

گزارش کردند، در اکالیپتوس تحت شرایط تنش سرمایی، ارقام مقاوم دارای نسبت  $F_v/F_m$  بیشتری نسبت به ارقام حساس بودند و کم‌ترین میزان نسبت  $F_v/F_m$  در دمای  $-10$  درجه سلسیوس مشاهده شد، به‌گونه‌ای که با کاهش دما، این نسبت کاهش یافت.

#### کلروفیل کل

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد (جدول ۴)، در شرایط عدم مصرف اسید سالیسیلیک و کلسیم با کاهش دما از صفر به  $-4$  درجه سلسیوس، میزان کلروفیل کل به‌میزان ۲۴ درصد کاهش یافت. در حالی‌که با مصرف  $0.75$  و  $1/5$  میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و بدون مصرف کلسیم، این کاهش از ۲۴ درصد که عنوان شد به ترتیب به ۱۶ و ۱۰ درصد رسید. با این حال، بیشترین افزایش کلروفیل کل نسبت به شاهد در همان سطح دمایی، با مصرف توامان اسید سالیسیلیک ( $1/5$  میلی‌مولار) و کلسیم (۶ در هزار) حاصل شد به‌گونه‌ای که این افزایش در دمای صفر،  $-2$  و  $-4$  درجه سلسیوس به ترتیب برابر با ۵۲، ۴۴ و ۷۳ درصد بود.

تنشی که به گیاه وارد می‌شود به سمت صفر میل می‌کند. گزارش شده است که ارقام متحمل به تنش  $F_v/F_m$  بالاتری نسبت به ارقام حساس دارند (Liu *et al.*, 2002). شاخص کارایی دستگاه فتوسنتز (PI) نشان‌دهنده وضعیت فیزیولوژیکی جاری گیاه و همچنین صدمه و یا سازگاری دستگاه فتوسنتزی در مقابله با تغییر شرایط محیطی است (Strasser *et al.*, 2000). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سرما موجب کاهش نسبت  $F_v/F_m$  و شاخص PI شد. کاهش مشاهده شده در کارایی عملکرد فتوسیستم II، اشاره به کم شدن سرعت انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی دارد و کاهش پذیرنده‌های الکترون ممکن است موجب افزایش احتمالی تولید گونه‌های رادیکال آزاد شود که این رادیکال‌های آزاد به اجزای فتوسیستم II آسیب وارد می‌کند. مجدی و همکاران (Majdi *et al.*, 2007) گزارش کردند که کاهش دمای محیط موجب کاهش کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم در ارقام حساس و مقاوم به سرمای گندم شد، ولی میزان این کاهش در ارقام مقاوم به‌صورت معنی‌داری کم‌تر از ارقام حساس بود. لاهیجیان و همکاران (Lahijanjan *et al.*, 2012)

جدول ۴- مقایسه میانگین برهمکنش اثر اسید سالیسیلیک و غلظت‌های مختلف کلسیم بر مقدار کلروفیل کل (میلی‌گرم در گرم وزن تر) برگ پسته در شرایط تنش سرمایی

Table 4. Mean comparison of interaction of salicylic acid and different concentrations of calcium on total chlorophyll content ( $\text{mg g}^{-1}$  fw) of pistachio leaf in cold stress conditions

Salicylic acid (mM)	Calcium ( $\text{g l}^{-1}$ )	Cold stress ( $^{\circ}\text{C}$ )		
		0	-2	-4
0	0	1.6 <sup>no</sup>	1.6 <sup>op</sup>	1.2 <sup>q</sup>
	3	1.8 <sup>jk</sup>	1.7 <sup>lm</sup>	1.5 <sup>p</sup>
	6	1.9 <sup>fg</sup>	1.9 <sup>hi</sup>	1.8 <sup>jkl</sup>
0.75	0	1.8 <sup>ij</sup>	1.6 <sup>n</sup>	1.5 <sup>p</sup>
	3	1.9 <sup>fg</sup>	1.8 <sup>jkl</sup>	1.7 <sup>mn</sup>
	6	2.2 <sup>c</sup>	2.1 <sup>e</sup>	2.0 <sup>f</sup>
1.5	0	1.9 <sup>g</sup>	1.9 <sup>gh</sup>	1.7 <sup>lk</sup>
	3	2.2 <sup>d</sup>	2.1 <sup>e</sup>	2.0 <sup>f</sup>
	6	2.5 <sup>a</sup>	2.3 <sup>b</sup>	2.2 <sup>de</sup>

میانگین‌های دارای حروف لاتین مشترک در هر ردیف یا ستون در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with same letters in each row or column are not significantly different at level of 5% according to Duncan test.

قرار می‌گیرد (Colom & Vazzana, 2001). یکی از مهمترین دلایل کاهش کلروفیل گیاهان تحت تنش‌های محیطی، تخریب آن‌ها توسط گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. علت اصلی تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن وجود عدم تعادل بین جذب نور و انجام فتوسنتز بیان

یکی از فاکتورهای مهم در حفظ ظرفیت فتوسنتزی میزان کلروفیل در گیاهان می‌باشد. سنتز کلروفیل یکی از فرآیندهای حساس به تغییرات دمایی می‌باشد و به‌عنوان یک روش کمی برای اندازه‌گیری میزان حساسیت گونه‌های مختلف به سرمازدگی مورد استفاده

موجب بهبود محتوای کاروتنوئیدها شدند. به نظر می‌رسد که کاهش رنگیزه‌های کاروتنوئیدی گیاه تحت شرایط تنش سرما، به دلیل اکسیده شدن این رنگدانه توسط گونه فعال اکسیژن بوده که از این راه کلروفیل a را از آسیب ناشی از مولکول‌های اکسیژن یکتایی محافظت می‌کند. به خوبی مشخص شده است که کاروتنوئیدها توانایی آن را دارند که سیستم مهار کننده نوری دستگاه فتوسنتزی را از آسیب مولکول‌های اکسیژن منفرد محافظت نماید. بدین صورت که از طریق ترکیب شدن با رادیکال‌های اکسیژن به صورت برگشت‌پذیر و تشکیل چرخه زانتوفیل‌ها، از تخریب کلروفیل جلوگیری می‌کند. نتایج این پژوهش با نتایج تاجور و همکاران (Tadjvar *et al.*, 2011) بر روی نارنگی مطابقت دارد. به عبارتی اسید سالیسیلیک با افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به واسطه موادی از جمله کاروتنوئیدها، باعث کاهش مقدار  $H_2O_2$  و پراکسیداسیون لیپیدها و حفاظت بیشتر از غشاهای سلولی می‌شود.

#### پرولین

نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد (جدول ۶) که کاهش دما موجب افزایش پرولین در تیمارهایی که کلسیم و اسید سالیسیلیک دریافت نکرده بودند، گردید. کاربرد ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به تنهایی در دمای ۴- درجه سلسیوس موجب افزایش پرولین به میزان ۵۴ درصد نسبت به شاهد در همان سطح دمایی شد. همچنین کاربرد کلسیم به تنهایی نیز سبب افزایش پرولین گردید. با این حال بیشترین افزایش محتوای پرولین با مصرف توامان بالاترین غلظت تیمارهای اسید سالیسیلیک و کلسیم حاصل شد. به گونه‌ای که بیشترین افزایش پرولین در دمای ۴- درجه سلسیوس بیشتر از ۲ برابر نسبت به شاهد در همین دما اتفاق افتاد.

پرولین یکی از اسیدهای آمینه فعال می‌باشد که در گیاهان تحت تنش به مقدار زیادی افزایش می‌یابد و موجب استحکام غشا تحت تنش سرما می‌شود. رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش افزایش می‌یابند و موجب اختلال در انتقال الکترون در بافت‌های گیاهی و در نهایت موجب تخریب و فروپاشی غشاها در شرایط تنش می‌شوند (Hassibi *et al.*, 2007). اسید آمینه پرولین نقش آنتی‌اکسیدانی داشته و در از بین بردن رادیکال‌

شده است. با وجود چنین شرایطی، کاهش دما در حضور نور خطر اکسیداسیون نوری را به علت عدم توان استفاده از نور افزایش می‌دهد. نتایج این پژوهش نشان داد که سرما موجب کاهش کلروفیل a، b و کلروفیل کل شد. احتمالاً تنش‌های سرما و یخ‌زدگی موجب اختلال در سنتز کلروفیل شده و به ساختار کلروپلاست آسیب رسانده است. محققین دریافته‌اند که اسید سالیسیلیک با تحریک سنتز کلروفیل منجر به افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهان تیمار شده، می‌شود (Gharib, 2007).

#### کاروتنوئیدها

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد (جدول ۵)، در تیمار شاهد با کاهش دما از صفر به ۴- درجه سلسیوس، میزان کاروتنوئیدها با کاهش ۵۱ درصدی مواجه گردید. احتمالاً کاهش کاروتنوئیدها به علت اکسید شدن این رنگدانه‌ها توسط رادیکال فعال اکسیژن بوده که از این طریق می‌تواند کلروفیل a را از گزند مولکول‌های اکسیژن محافظت کند. حال مصرف ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به تنهایی این کاهش را به ۲۱ درصد رساند. از طرفی با مصرف توامان این دو تیمار (۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و ۶ در هزار کلسیم)، میزان کاروتنوئیدها در دمای صفر درجه سلسیوس نسبت به شاهد با افزایش ۴۹ درصدی مواجه شد و هنگامی که دما به ۴- درجه سلسیوس رسید فقط ۹ درصد از میزان کاروتنوئیدها با کاهش روبرو شد. در حالی که همان گونه که ذکر گردید هنگامی که هیچ تیماری مصرف نشد، این کاهش ۵۱ درصد بود. کاروتنوئیدها به عنوان حامی رنگیزه‌های فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی شناخته شده‌اند که انرژی نورانی را مهار می‌کنند. رنگیزه‌های فتوسنتزی به عنوان یکی از مهم‌ترین فاکتورهای درونی، در برخی موارد قادر به ایجاد محدودیت در سنتز فتوسنتز به شمار می‌روند (Bertamini *et al.*, 2007). کاروتنوئیدها شامل بتاکاراتن، گزانتوفیل و لیکوپن هستند. نقش آنتی‌اکسیدانی کاروتنوئیدها در رابطه با مهار رادیکال‌های آزاد تولید شده در شرایط تنش می‌باشد (Abduljaleel *et al.*, 2009). نتایج این پژوهش نشان داد، کاهش دما موجب کاهش کاروتنوئیدها گردید، اما کاربرد تیمارهای اسید سالیسیلیک و کلسیم در شرایط تنش سرما،

فلفل دلمه‌ای در شرایط تنش سرمایی، تیمار اسید سالیسیلیک سبب افزایش میزان پرولین برگ نسبت به شاهد گردید. همچنین پژوهشگران گزارش کردند تیمار اسید سالیسیلیک منجر به افزایش پرولین برگ نسبت به شاهد تحت شرایط تنش سرما شد (Ershadi & Taheri, 2013).

های آزاد نقش دارد و به‌همین دلیل می‌تواند موجب محافظت از پروتئین‌ها و غشاها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو شود (Zhang *et al.*, 2000). اسید سالیسیلیک با تولید ABA، گیاه را نسبت به تنش سازگار و به سنز پروتئین‌های تنش وادار می‌کند (Shakirova *et al.*, 2003). مرادمند و همکاران (Moradmand *et al.*, 2015) گزارش کردند که در گیاه

جدول ۵- مقایسه میانگین برهمکنش اسید سالیسیلیک و غلظت‌های مختلف کلسیم بر مقدار کاروتنوئید (میلی گرم در گرم وزن تر) برگ پسته در شرایط تنش سرمایی

Table 5. Mean comparison of the interactions of salicylic acid and different concentrations of calcium on the carotenoid content ( $\text{mg g}^{-1}$  fw) of pistachio leaf in cold stress conditions

Salicylic acid (mM)	Calcium ( $\text{g l}^{-1}$ )	Cold stress ( $^{\circ}\text{C}$ )		
		0	-2	-4
0	0	0.4 <sup>i</sup>	0.4 <sup>j</sup>	0.2 <sup>l</sup>
	3	0.4 <sup>i</sup>	0.4 <sup>i</sup>	0.3 <sup>k</sup>
	6	0.6 <sup>ab</sup>	0.5 <sup>fg</sup>	0.4 <sup>i</sup>
0.75	0	0.6 <sup>abc</sup>	0.5 <sup>ef</sup>	0.4 <sup>hi</sup>
	3	0.6 <sup>b</sup>	0.5 <sup>cde</sup>	0.5 <sup>gh</sup>
	6	0.6 <sup>ab</sup>	0.6 <sup>abc</sup>	0.5 <sup>ef</sup>
1.5	0	0.6 <sup>a</sup>	0.5 <sup>de</sup>	0.5 <sup>g</sup>
	3	0.6 <sup>a</sup>	0.6 <sup>ab</sup>	0.5 <sup>de</sup>
	6	0.6 <sup>a</sup>	0.6 <sup>ab</sup>	0.6 <sup>bcd</sup>

جدول ۶- مقایسه میانگین برهمکنش اسید سالیسیلیک و غلظت‌هایی مختلف کلسیم بر مقدار پرولین (میکروگرم بر گرم وزن تر) برگ پسته در شرایط تنش سرمایی

Table 6. Mean comparison of the interaction of salicylic acid and different concentrations of calcium on proline content ( $\mu\text{g g}^{-1}$  fw) of pistachio leaf in cold stress conditions

Salicylic acid (mM)	Calcium ( $\text{g l}^{-1}$ )	Cold stress ( $^{\circ}\text{C}$ )		
		0	-2	-4
0	0	2.4 <sup>p</sup>	3.0 <sup>op</sup>	3.2 <sup>no</sup>
	3	3.2 <sup>no</sup>	3.4 <sup>l-o</sup>	4.0 <sup>h-m</sup>
	6	3.7 <sup>k-o</sup>	4.1 <sup>h-m</sup>	5.5 <sup>d-i</sup>
0.75	0	3.4 <sup>mno</sup>	4.3 <sup>e-k</sup>	4.1 <sup>h-l</sup>
	3	3.8 <sup>i-n</sup>	4.2 <sup>g-k</sup>	4.7 <sup>d-h</sup>
	6	4.3 <sup>f-k</sup>	4.9 <sup>d-g</sup>	5.8 <sup>bc</sup>
1.5	0	3.7 <sup>j-n</sup>	4.4 <sup>e-j</sup>	5.0 <sup>def</sup>
	3	4.5 <sup>d-h</sup>	4.9 <sup>d-g</sup>	5.2 <sup>cd</sup>
	6	5.1 <sup>de</sup>	6.5 <sup>b</sup>	8.5 <sup>a</sup>

میانگین‌های دارای حروف لاتین مشترک در هر ردیف یا ستون در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with same letters in each row or column are not significantly different at level of 5% according to Duncan test.

افزایش میزان ترکیبات فنلی گردید، به‌گونه‌ای که این افزایش در دمای ۲- و ۴- درجه سلسیوس به‌ترتیب به ۱۴ و ۴۲ درصد رسید. با این حال مصرف توامان اسید سالیسیلیک (۱,۵ میلی‌مولار) و کلسیم (۶ در هزار) افزایش چشم‌گیری نسبت به کاربرد اسید سالیسیلیک به‌تنهایی در میزان ترکیبات فنل نداشت و این افزایش در دمای صفر، ۲- و ۴- درجه سلسیوس به‌ترتیب برابر با

## فنل کل

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاهش دما موجب افزایش محتوای ترکیبات فنلی شد. به‌طوری‌که بیشترین میزان فنل کل در دمای ۴- به‌دست آمد که با دماهای صفر و ۲- درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری داشت. این در حالی است که مصرف ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به‌تنهایی، موجب



خسارات جدی به گیاه می‌شود (Imlay & Linn., 1988). کاهش دما سبب افزایش تجمع ترکیبات فنلی در گیاه می‌شود و می‌تواند به‌عنوان نوعی سازوکار برای سازگاری و غلبه بر تنش اکسیداتیو ناشی از دمای پایین عمل کند (Balasundram *et al.*, 2007).

۱۷، ۱۴ و ۲۱ درصد بود (جدول ۷). یکی از راه‌های مقابله با تنش اکسیداتیو، تجمع ترکیبات فنلی می‌باشد (Schaller & Kieber, 2002). برای سازگار شدن با سرما، ترکیبات فنلی در گیاهان تجمع می‌یابد که این ترکیبات با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ارتباط دارد. گونه‌های فعال اکسیژن سمی بوده و منجر به وارد شدن

جدول ۷- مقایسه میانگین برهمکنش اسید سالیسیلیک و غلظت‌هایی مختلف کلسیم بر مقدار فنل کل (میکروگرم بر گرم وزن تر) برگ پسته در شرایط تنش سرمایی

Table 7. Mean comparison of the interaction of salicylic acid and different concentrations of calcium on total phenol content ( $\mu\text{g g}^{-1}$  fw) of pistachio leaf in cold stress conditions

Salicylic acid (mM)	Calcium ( $\text{g l}^{-1}$ )	Cold stress ( $^{\circ}\text{C}$ )		
		0	-2	-4
0	0	42.5 <sup>h-k</sup>	46.0 <sup>g-i</sup>	52.7 <sup>de</sup>
	3	39.8 <sup>jkl</sup>	41.7 <sup>i-l</sup>	44.8 <sup>g-j</sup>
	6	30.9 <sup>n</sup>	37.8 <sup>klm</sup>	39.3 <sup>jkl</sup>
0.75	0	47.2 <sup>rgh</sup>	49.4 <sup>efg</sup>	59.3 <sup>bc</sup>
	3	36.6 <sup>lm</sup>	55.2 <sup>cd</sup>	61.1 <sup>b</sup>
	6	34.5 <sup>mn</sup>	46.2 <sup>ghi</sup>	59.2 <sup>bc</sup>
1.5	0	49.1 <sup>efg</sup>	52.3 <sup>def</sup>	75.0 <sup>a</sup>
	3	49.5 <sup>efg</sup>	52.4 <sup>def</sup>	59.3 <sup>bc</sup>
	6	49.9 <sup>h-k</sup>	52.5 <sup>de</sup>	64.0 <sup>b</sup>

میانگین‌های دارای حروف لاتین مشترک در هر ردیف یا ستون در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with same letters in each row or column are not significantly different at level of 5% according to Duncan test

این مواد اسمولیت نام دارند. قندهای محلول که جزء این مواد محسوب می‌شوند قابلیت انحلال بسیار بالایی دارند و در غلظت‌های بالا برای سلول سمیت ایجاد نمی‌کنند (Ashraf & Foolad, 2007). افزایش یافتن قند-های محلول موجب افزایش سازگاری درختان به سرمای پاییز و زمستان می‌شود. افزایش در میزان قندهای محلول با افزایش مقاومت به تنش سرما در ارتباط است و مقدار قندها، گیاه را در برابر درجه حرارت کم تحت تاثیر قرار می‌دهد (Ranney *et al.*, 1991). قندها موجب افزایش پایداری پروتئین‌ها و غشا می‌شوند و با ایجاد پیوندهای هیدروژنی از تخریب پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند (Ashraf & Foolad, 2007). هورمون اسید سالیسیلیک، موجب تجمع قندها در گیاهان می‌شود که این افزایش قندها و شیب اسمزی ایجاد شده منجر به مقاوم شدن گیاه در برابر از دست دادن آب، افزایش محتوای آب برگ و سرعت بخشیدن به رشد گیاهان در شرایط تنش می‌شود. همچنین تجمع قندها که در اثر سازگاری به تنش تولید می‌شوند، موجب پایداری و حفاظت غشاء در مقابل خسارت انجماد می‌شود (Afshari *et al.*, 2014). بروز تحمل به تنش با تغییر در

#### قندهای محلول

همان‌طور که در جدول مقایسه میانگین‌ها مشاهده می‌شود (جدول ۸)، با کاهش دما از صفر به ۴- درجه سلسیوس میزان قندهای محلول از ۹۹/۱۶ به ۱۵۲/۸۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر رسید. این در حالی است که مصرف ۳ در هزار کلسیم به‌تنهایی موجب افزایش قندهای محلول به‌میزان ۳۹ درصد نسبت به شاهد شد. همچنین کاربرد اسید سالیسیلیک نیز به‌تنهایی موجب افزایش قندهای محلول نسبت به شاهد گردید. همچنین با مصرف ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به-تنهایی میزان قندهای محلول در دمای صفر درجه سلسیوس به‌ترتیب ۴۲ و ۴۸ درصد افزایش یافتند. با این حال بیشترین افزایش قندهای محلول با مصرف توامان اسید سالیسیلیک (۱/۵ میلی‌مولار) و کلسیم (۶ در هزار) حاصل گردید به‌گونه‌ای که این افزایش در دمای صفر، ۲- و ۴- درجه سلسیوس به‌ترتیب ۷۸، ۵۶ و ۳۱ درصد بود.

گیاه برای حفظ تورژانس سلول در شرایط تنش موادی می‌سازد که باعث منفی‌تر شدن پتانسیل آبی درون سلول می‌شود و تورژانس سلول را حفظ می‌کند که

یابد. در ضمن تیمار اسید سالیسیلیک بروز علائم سرمازدگی را کاهش می‌دهد ( Kafi & Mahdavi, 2002).

مواد اسمزی درون سلول همراه است که تیمار با اسید سالیسیلیک با تحریک کردن هیدرولیز قندهای نامحلول نقش اسمزی را برای سلول ایفا می‌کند. بنابراین با افزایش قندهای محلول تحمل به سرما نیز باید افزایش

جدول ۸- مقایسه میانگین برهمکنش اثر اسید سالیسیلیک و غلظت‌هایی مختلف کلسیم بر مقدار قندهای محلول (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) برگ پسته در شرایط تنش سرمایی

Table 8. Mean comparison of the interaction of salicylic acid and different concentrations of calcium on the soluble sugars content (mg/g fw) of pistachio leaf in cold stress conditions

Salicylic Acid (mM)	Calcium (g l <sup>-1</sup> )	Cold Stress (°C)		
		0	-2	-4
0	0	99.1 <sup>q</sup>	120.0 <sup>p</sup>	152.8 <sup>g-l</sup>
	3	137.4 <sup>no</sup>	148.7 <sup>j-m</sup>	157.0 <sup>g-k</sup>
	6	6134.6 <sup>o</sup>	145.8 <sup>lmno</sup>	150.2 <sup>i-m</sup>
0.75	0	141.0 <sup>mno</sup>	149.8 <sup>i-m</sup>	158.4 <sup>e-j</sup>
	3	148.1 <sup>j-n</sup>	151.8 <sup>h-m</sup>	163.6 <sup>efg</sup>
	6	148.6 <sup>e-i</sup>	167.0 <sup>def</sup>	193.0 <sup>ab</sup>
1.5	0	146.4 <sup>klmn</sup>	157.7 <sup>g-l</sup>	161.8 <sup>efgh</sup>
	3	154.6 <sup>g-l</sup>	163.7 <sup>efg</sup>	169.3 <sup>de</sup>
	6	176.5 <sup>cd</sup>	187.0 <sup>bc</sup>	201.0 <sup>a</sup>

میانگین‌های دارای حروف لاتین مشترک در هر ردیف یا ستون در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with same letters in each row or column are not significantly different at level of 5% according to Duncan test.

طی مرحله سازگاری به سرما تغییرات عمده‌ای در مقدار و همچنین الگوی تولید پروتئین‌های غشا پدید می‌آید که این تغییرات به‌علت واکنش سریع گیاه به دمای کم می‌باشد. این تغییرات شامل تولید پروتئین‌های ترمیم‌کننده غشا، پروتئین‌های مرتبط با تنش‌های اسمزی و پروتئین‌های با وظیفه نامشخص می‌باشد (Uemura *et al.*, 2006). تنش سرمایی منجر به شکسته شدن زنجیره انتقال الکترون و تولید اکسیژن فعال می‌شود. رادیکال‌های اکسیژن تولید شده در اثر تنش به‌علت میل ترکیبی زیاد، منجر به تخریب غشا، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های سلول می‌شوند (Peltzer *et al.*, 2002). کاهش در تولید یا افزایش تجزیه پروتئین‌ها و یا هر دو در شرایط تنش سرما را می‌توان به افزایش یا کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت داد. اسید سالیسیلیک نقش موثری در تنظیم پروتئین‌های آپوپلاستی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با مقاومت به تنش سرمایی دارد (Tasgin *et al.*, 2003).

#### پروتئین‌های محلول

همان‌طور که در جدول مقایسه میانگین‌ها مشاهده می‌شود (جدول ۹)، کمترین مقدار پروتئین‌های محلول در تیمار شاهد که هیچ تیماری دریافت نکرده بودند مشاهده گردید و این مقدار در دمای ۲- درجه سلسیوس با کمترین حالت روبرو شد. لیکن با مصرف ۳ در هزار کلسیم اگرچه در دمای صفر درجه سلسیوس، ۲۱ درصد به پروتئین‌های محلول اضافه شد ولی هنگامی که دما به ۲- درجه سلسیوس رسید، این افزایش به ۴۸ درصد رسید و با کاهش بیشتر دما، افزایش پروتئین مشابه دمای صفر درجه سلسیوس بود. لیکن مصرف ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به‌تنهایی در دمای ۲- درجه سلسیوس مقدار افزایش پروتئین‌های محلول را نسبت به شاهد در همان سطح دمایی ۱۲۵ درصد افزایش داد. با این حال بیشترین مقدار پروتئین‌های محلول با مصرف توامان بالاترین مقدار اسید سالیسیلیک و کلسیم در دمای صفر درجه سلسیوس به‌دست آمد

جدول ۹- مقایسه میانگین برهمکنش اثر اسید سالیسیلیک و غلظت‌هایی مختلف کلسیم بر مقدار پروتئین‌های محلول (میلی گرم بر گرم وزن تر) برگ پسته در شرایط تنش سرمایی

Table 9. Mean comparison of the interaction of salicylic acid and different concentrations of calcium on the soluble proteins content (mg g<sup>-1</sup> fw) in pistachio leaf in cold stress conditions

Salicylic acid (mM)	Calcium (g l <sup>-1</sup> )	Cold stress (° C)		
		0	-2	-4
0	0	0.087 <sup>i</sup>	0.071 <sup>k</sup>	0.084 <sup>j</sup>
	3	0.105 <sup>efgh</sup>	0.105 <sup>efgh</sup>	0.101 <sup>efgh</sup>
	6	0.109 <sup>efgh</sup>	0.109 <sup>efg</sup>	0.109 <sup>efg</sup>
0.75	0	0.102 <sup>efgh</sup>	0.100 <sup>efgh</sup>	0.097 <sup>hi</sup>
	3	0.106 <sup>efgh</sup>	0.104 <sup>efgh</sup>	0.106 <sup>efgh</sup>
	6	0.177 <sup>a</sup>	0.131 <sup>c</sup>	0.112 <sup>de</sup>
1.5	0	0.121 <sup>cd</sup>	0.160 <sup>b</sup>	0.130 <sup>efgh</sup>
	3	0.165 <sup>b</sup>	0.108 <sup>efg</sup>	0.099 <sup>gh</sup>
	6	0.180 <sup>a</sup>	0.106 <sup>efgh</sup>	0.105 <sup>efgh</sup>

میانگین‌های دارای حروف لاتین مشترک در هر ردیف یا ستون در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with same letters in each row or column are not significantly different at level of 5% according to Duncan test.

نشاسته، کربوهیدراتی ذخیره‌ای و غیرمحلول می‌باشد و تقریباً در تمام گیاهان یافت می‌شود. غلظت نشاسته در طی مقاوم شدن به سرما کاهش می‌یابد. کاهش نشاسته در شرایط سرما ممکن است به دلیل تبدیل شدن نشاسته به قندهای محلول برای مقابله با تنش سرما باشد. همچنین ممکن است به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌هایی نظیر نشاسته فسفوریلاز باشد که منجر به تبدیل شدن نشاسته به قندهای محلول می‌شود. کاهش نشاسته به حداقل و افزایش قندهای محلول به حداکثر، موجب افزایش مقاومت درختان به تنش سرما می‌شود (Ameglio *et al.*, 2006). در پژوهش حاضر، با کاهش دما از صفر به -۴ درجه سلسیوس، محتوای پروتئین محلول روند کاهشی داشته است. می‌توان کاهش سنتز و یا افزایش تخریب پروتئین‌ها در گیاهان تحت تنش سرما را مرتبط با افزایش یا کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی دانست. در پژوهش حاضر دانه‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک، محتوای پروتئین بیش‌تری را نسبت به دانه‌های شاهد تجربه کردند، که این امر احتمالاً به‌خاطر تأثیر اسید سالیسیلیک بر محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی نظیر کلروفیل کل و کارتنوئیدها باشد که منجر به حفظ فعالیت فتوسنتزی در شرایط سرما می‌گردد و همچنین منجر به تولید قند نیز می‌شود و در آخر نشاسته کمتر تجزیه می‌شود و نسبت به تیمار شاهد افزایش می‌یابد.

پوررجبی‌نژاد (Pourrajabi Nejad *et al.*, 2013) گزارش کرد، محتوای پروتئین‌های کل با کاهش دما، کاهش یافت. به‌گونه‌ای که بیشترین مقدار در دمای ۴ درجه سلسیوس و کمترین مقدار آن در دمای -۴ درجه سلسیوس مشاهده شد. ارشادی و طاهری (Ershadi & Taheri, 2013) گزارش کردند تیمار سالیسیلیک اسید منجر به کاهش پروتئین‌های محلول درخت انگور تحت تنش سرمایی شد.

#### نشاسته

همان‌گونه که در جدول ۱۰ مشاهده می‌شود، با کاهش دما از صفر به -۴ درجه سلسیوس، مقدار نشاسته برگ با کاهش روبرو شد، لیکن مصرف ۶ در هزار کلسیم به تنهایی و در دمای صفر درجه سلسیوس، باعث افزایش ۶۹ درصدی نشاسته گردید (از ۷۶/۴ به ۱۲۹/۰ میلی-گرم بر گرم وزن خشک برگ) که این با مصرف ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک به‌تنهایی نیز تقریباً یکسان است (۶۳ درصد). با این حال در دمای صفر درجه سلسیوس با مصرف بالاترین سطوح اسید سالیسیلیک و کلسیم غلظت نشاسته برگ نسبت به شاهد به بیش از دو برابر رسید و این در حالی بود که در دمای ۲- و ۴- درجه سلسیوس نسبت به شاهد در همین دماها میزان نشاسته برگ با مصرف توأمان بالاترین تیمارهای ذکر شده به ۷۳ و ۹۹ درصد رسید.

جدول ۱۰- مقایسه میانگین برهمکنش اثر اسید سالیسیلیک و غلظت‌هایی مختلف کلسیم بر مقدار نشاسته (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) برگ پسته در شرایط تنش سرمایی

Table 10. Mean comparison of the interaction of salicylic acid and different concentrations of calcium on starch content (mg g<sup>-1</sup> dw) of pistachio leaf in cold stress conditions

Salicylic acid (mM)	Calcium (g l <sup>-1</sup> )	Cold stress (° C)		
		0	-2	-4
0	0	76.4 <sup>ijk</sup>	73.1 <sup>k</sup>	58.7 <sup>m</sup>
	3	86.4 <sup>gh</sup>	75.2 <sup>jk</sup>	66.7 <sup>l</sup>
	6	129.0 <sup>bc</sup>	107.7 <sup>e</sup>	83.0 <sup>h</sup>
0.75	0	91.9 <sup>fg</sup>	82.7 <sup>hi</sup>	71.3 <sup>kl</sup>
	3	92.7 <sup>fg</sup>	81.4 <sup>hij</sup>	72.0 <sup>kl</sup>
	6	154.1 <sup>a</sup>	127.6 <sup>c</sup>	111.1 <sup>de</sup>
1.5	0	124.2 <sup>c</sup>	112.4 <sup>de</sup>	97.3 <sup>f</sup>
	3	134.9 <sup>b</sup>	124.4 <sup>c</sup>	109.8 <sup>e</sup>
	6	155.7 <sup>a</sup>	126.7 <sup>c</sup>	117.1 <sup>d</sup>

سرما باعث افزایش میزان تنظیم کننده‌های اسمزی نظیر پرولین، قندهای محلول و ترکیبات فنل شد که مصرف توامان اسید سالیسیلیک و کلسیم منجر به افزایش این پارامترها نسبت به شاهد گردید. همچنین در این پژوهش شاخص‌های کلروفیل فلورسانس، کلروفیل a، کلروفیل کل، پروتئین و نشاسته نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند که تنش سرما باعث کاهش معنی‌دار آن‌ها شد. لیکن کاربرد توامان اسید سالیسیلیک و کلسیم سبب افزایش پارامترهای ذکر شده نسبت به تیمار شاهد گردید.

### نتیجه‌گیری کلی

نشت یونی برگ یکی از فاکتورهای مهمی است که نشان‌دهنده میزان تحمل گیاه به سرما می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد، تنش سرما موجب افزایش معنی‌دار نشت یونی گردید که کاربرد اسید سالیسیلیک و کلسیم سبب کاهش نشت یونی نسبت به دانه‌های شاهد شد. در شرایط تنش سرما یکی از معیارهای مقاومت در گیاه، تولید تنظیم کننده‌های اسمزی به‌شمار می‌رود که این تنظیم کننده‌های اسمزی در شرایط سرما در ایجاد مقاومت و تنظیم اسمزی گیاه دخالت دارند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تنش

### References

- Abdul- Jalil C., Manivannan P., Wahid A., Farooq M., Jasim H., Juburi A., Somasundaram A., and Panneersel-Vam, R. 2009. Drought stress in plant: A review on morphological characteristics and pigments composition. *Journal of Agricultural Biology*, 11: 100-105.
- Afshari H., Zahedi R., Parvaneh T., and Zadehbagheri M. 2014. Effect of salicylic acid on the proline, soluble sugars and ion leakage in two apricot cultivars under cold stress. *Journal of Agriculture*, 16(1): 127-138. (In Persian)
- Ameglio T., Alves G., Decurteix M., Bonhome M., Guiliot A., Sake S., Brunel N., Petel G., Regcau R., Cochard H., Julien J.L.J., and Lacoite A. 2006. Winter biology in walnut tree: Freezing tolerance by cold acclimation and embolism repair. *Acta Horticulturae*, 241-250.
- Arnon D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
- Ashraf M., and Foolad M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 206-216.
- Balasundram N., Sundram K., and Samman S. 2007. Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.
- Bertamini M., Zulini K., Muthuchelian K., and Nedunchezian N. 2007. Low-night temperature effects on photosynthetic performance on two grapevine genotypes. *Plant Biology*, 51: 381-385.

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248- 254.
- Brown G., Wilson S., Boucher W., Graham B., and McGlasson B. 1995. Effect of copper-calcium sprays on fruit cracking in sweet cherry (*Prunus avium*). *Horticultural Science*, 62: 75-80.
- Chen J., Zhu C., LI L., Sun Z., and Pan X. 2007. Effects of exogenous salicylic acid on growth and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. *Journal of Environmental Sciences*, 1: 44-49.
- Colom M.R., and Vazzana C. 2001. Drought stress effects on three cultivars of *Eragrostis curvula*: photosynthesis and water relations. *Plant Growth Regulation*, 34: 195-202.
- Ding C.K., Wang C.Y., Gross K.C., and Smith D.L. 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.
- Ershadi A., and Taheri S. 2013. Effect of salicylic acid on spring frost tolerance of grape cultivar 'Bidaneh Sefid'. *Agricultural Crop Management (Journal of Agriculture)*, 15(2): 135-146. (In Persian)
- Gharib A.L. 2007. Effect of Salicylic Acid on the Growth, Metabolic Activities and Oil Content of Basil and Marjoram. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2: 294-301.
- Gunes A., Inal A., Alpaslan M., Eraslan F., Bagci EG., and Cicek G.N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, 164(6):728-36.
- Hassibi P., Moradi F., and Nabipour M. 2007. Screening of rice genotypes for low temperature stress-using chlorophyll fluorescence. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 9: 14-31. (In Persian)
- Imlay J.A., and Linn S. 1998. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, 169: 2967-2976.
- Irigoyen J.J., Emerich D.W., and Diaz-Srganchie M. 1992. Water stress-induced change in concentrations of proline and total soluble sugars in inoculated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84: 67-72.
- Isfendiyaroglu M., and Zeker E. 2002. The relation between phenolic compound and seed dormancy in *Pistacia* spp. In: AKB. E. (Ed.). 11 *Grema Serr Pistachios and Almond. Chieres Optins Mediterraneenes*, pp. 232-277.
- Jackman R.L., Yada R.Y., Marangoni A., Parkin K.L., and Stanley D.W. 1988. Chilling Injury. A review of quality aspects. *Journal of Food Quality*, 11: 253-278.
- Kafi M., and Mahdavi Damghani A. 2002. Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plant (Translated). Published by Ferdowsi University Mashhad. Mashhad, 472p. (In Persian)
- Lahijanian S., Mobli M., Baninasab, B., and Etemadi N. 2012. Evaluation of Cold Tolerance in Some Eucalyptus Genotypes measuring Chlorophyll Fluorescence. The first national conference on plant stress (non-biotic), 10 and 11 November, Isfahan University of Technology. pp. 1021-1026. (In Persian)
- Liu X., and Huang B. 2002. Cytokinin effects on creeping bentgrass response to heat stress. *Crop Science*, 42: 466-472.
- Mahajan S., and Tutejan N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158.
- Majdi M., Karimzade, G., and Mahfoozi S. 2007. Effects of low temperature and exogenous calcium on the quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm) and relative content of chlorophyll in cold susceptible and tolerant wheat cultivars. *Journal of Research and Development in Agriculture and Horticulture*, 77: 175- 181. (In Persian)
- Mangrich M.E. 2000. Effects of abiotic shocks on the induction of chilling tolerance in seedling. PhD.Thesis, Graduate Division. California State University. 115p.
- Maxwell K., and Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51:659-668.

- Moradmand Y., Mobli M., and Ramin A.A. 2015. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on increasing cold tolerance of bell pepper (cv. Emily) seedlings. *Journal of Crop Production and Processing, Isfahan University of Technology*, 5 (16) :123-133. (In Persian)
- Mora-Herrera M.E., Lopez-Delgado H., Castillo-Morales A., and Foyer C. H. 2005. Salicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. *Journal of Plant Physiology*, 125: 430-440.
- Paquin R., and Lechasseur P. 1979. Observation sur une method dosage I proline libre dans les extraits de plants. *Canada Journal of Botany*, 57: 1851-1854.
- Peltzer D., Dreyer E., and Polle A. 2002. Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 141-150.
- Pourrajabi Nejad M.R. 2013. Effects of BA and water stress in winter on nut qualitative and quantitative traits and spring frost hardening of pistachio cv. Kaleh-Ghoochi. Horticultural Department, Agricultural College, Vali-E-Asr University, Rafsanjan, Iran. 145p. (In Persian)
- Ranney T.G., Bassuk N.L., and Whitlow T.H. 1991. Osmotic adjustment and solute constituents in leaves and roots of water-stressed cherry (*Prunus*) trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116: 684-688.
- Rodrigo-Moreno A., Andres-Colas N., Poschenrieder C., Gunse B., Penarrubia L., and Shabala S. 2013. Calcium- and potassium-permeable plasma membrane transporters are activated by copper in Arabidopsis root tips: linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. *Plant, Cell and Environment*, 36(4): 844-855.
- Sairam R.K., and Srivastava G.C. 2002. Changes in antioxidant activity in subcellular fraction of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*, 162: 897-904.
- Schaller G.E., and Kieber J.J. 2002. In: The Arabidopsis Book, eds. Somerville, C. R. and Meyerowitz, E. M. (American Society of Plant Biologists, Rockville, MD), pp. 1-17.
- Sene M., Thevenot C., and Prioul J.L. 1997. Simultaneous spectrophotometric determination of amylose and amylopectin in starch from maize kernel by multi-wavelength analysis. *Journal on Cereal Science*, 26: 211-221.
- Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova, R.A., and Fatkhutdinova D.R. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedling induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science*, 164: 317-322.
- Strasser R.J., Srivastava A., and Tsimilli-Michael M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M., Pathre U. and Mohanty P. (Ed.). Probing photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation, Tylor and Francis, New York, pp. 445-483.
- Tadjvar Y., Fotouhi Ghazvini R., Hamidoghli Y., and Sajedi R.H. 2011. Physiological and biochemical responses of page mandarin on citrange rootstock to low temperature stress. *Iranian Journal of Plant Biology*, 3(9): 1- 12. (In Persian)
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. (2<sup>nd</sup> Ed.). Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. USA, 764p.
- Tasgin E., Atici O., and Nalbantoglu B. 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, 41: 231-236.
- Uemura M., Tominaga Y., Nakagawara C., Shigematsu S., Minami A., and Kawamura, Y. 2006. Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum*, 126: 81-89.
- Vemmos S.N. 1994. Net Photosynthesis, stomatal conductance, chlorophyll content and specific leaf of pistachio tress (cv. Aegenes) as influenced by fruiting. *Journal of Horticultural Science*, 69:775-782.
- Zhang J., Kluera N., Wang Z., Ray W., Ho T., and Nguyen H. 2000. Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 36: 108-114.

## Effect of Salicylic Acid and Calcium on Chilling Resistance of Pistachios Seedlings, cv. Kaleghochi

Vahid Mozafari<sup>1\*</sup>, Fatemeh Yazdanpanah<sup>2</sup>

(Received: September 2018

Accepted: November 2018)

### Abstract

In order to investigate the effects of salicylic acid and calcium on resistance chilling of pistachio seedlings, cv. Kale-Quchi, a factorial greenhouse experiment was carried out in a completely randomized design with three replications. Treatments consisted of were salicylic acid (0, 0.75 and 1.5 mM), calcium (0, 3 and 6 per thousand) and temperature (0, -2 and -4 °C). The results showed that, leaf electrolyte leakage percentage increased with decreasing temperature to -4 °C, but combined application of salicylic acid (1.5 mM) and calcium (6 per thousand) decreased this important indicator of chilling by 47 percent compared to control in this temperature. Also, with decreasing temperature (from 0 to -4 °C), the phenolic compounds, and soluble sugars and proline concentration increased 44 and, 31 and 100 percent respectively and proline concentration more than two folds increased compared to control seedlings. Also, the results of this experiment showed that the chlorophyll fluorescence index, total chlorophyll, carotenoids, soluble proteins and starch content decreased with decreasing temperature, but with combined application of 1.5 mM salicylic acid and treatment of calcium (6 per thousand) calcium, the amount of these parameters increased these parameters compared to control. So that the content of total chlorophyll, carotenoids, protein and starch increased compared to control at 4 °C by 87, 49, 25 and 99 percent, respectively compared to control and protected pistachio seedlings against chilling. Based on the results of this study, in chilling conditions, the combined application of salicylic acid and calcium, by improving the photosynthetic parameters and increasing osmotic regulators, decreased detrimental effects of chilling of pistachio seedlings. in chilling conditions.

**Keywords:** Carotenoids, Chlorophyll, Phenolic compounds, Starch, Soluble sugars,

Mozafari V., Yazdanpanah F. 2019. Effect of salicylic acid and calcium on chilling resistance of pistachios seedlings, cv. Kaleghochi. *Applied Soil Research*. 7(4): 47-61.

1. Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran

2. Former M.Sc. Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran

\* Corresponding Author Email: [vmozafary@yahoo.com](mailto:vmozafary@yahoo.com)