

## اثر محلول پاشی برگی پاکلوبوترازول بر تحمل به یخزدگی نهال های بادام رقم فرانیس<sup>۱</sup>

### Effect of Foliar Application of Paclobutrazol on Freezing Tolerance of Almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnes) Plants

ایوب دارابی حیدرآبادی، احمد ارشادی\*، علی اکبر قاسمی سلوکلوئی<sup>۲</sup>

#### چکیده

حفاظت از نهال های جوان در مقابل سرمازدگی از مسائل مهم در مدیریت نهالستان ها و باغ های تازه احداث شده است. هدف از این پژوهش بررسی اثر پاکلوبوترازول بر کاهش آسیب های ناشی از تنش سرمایی در نهال های یکساله پیوندی بادام رقم فرانیس بود. طرح مورد استفاده در این پژوهش بلوک های کامل تصادفی و تیمارها شامل ۵ غلظت صفر (شاهد)، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام کولتار (با غلظت ۲۵۰ گرم بر لیتر ماده موثره پاکلوبوترازول) بود که روی نهال های یکساله پیوندی بادام در شهریورماه محلول پاشی شد. نمونه برداری از بافت ساقه در سه مرحله زمانی ۲۰ آبان، ۲۰ دی و ۲۰ اسفند و از بافت جوانه در ۲۵ دی و ۲۵ اسفند انجام شد. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه تیمارهای سرمایی ۰، -۵، -۱۰، -۱۵، -۲۰ و -۲۵ درجه سلسیوس روی آنها اعمال شده و نقطه اگزوترم و نشت یونی بافت های ساقه و جوانه اندازه گیری شد. تیمار پاکلوبوترازول به خصوص در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر در هر سه مرحله ارزیابی باعث افزایش غلظت پرولین، کربوهیدرات های محلول، درصد ماده خشک و کاهش محتوای نسبی آب نسبت به شاهد و سایر تیمارهای پاکلوبوترازول گردید. در نهال های تیمار شده با پاکلوبوترازول ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر، نقطه اگزوترم اول در دی ماه (۷- درجه سلسیوس) به میزان چهار درجه سلسیوس کمتر از شاهد بود. تحمل به سرما در نهال های تیمار شده با غلظت ۵۰۰ پی پی ام پاکلوبوترازول بر اساس مقادیر LT<sub>50</sub> حدود ۵ درجه سلسیوس افزایش یافت. نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد پاکلوبوترازول می تواند در کاهش خسارت ناشی از یخبندان زمستانه در نهال های بادام موثر باشد.

**واژه های کلیدی:** اگزوترم، پرولین، کربوهیدرات های محلول، نشت یونی.

#### مقدمه

پتانسیل های بالای موجود در زیر بخش باغبانی به خصوص خشکبار، در زمینه تولید و ارزآوری، سیاست گذاران را بر آن داشته تا به توسعه سطح زیر کشت و بهبود عملکرد این محصولات توجه ویژه ای نشان دهند. در سال های اخیر در راستای سیاست های افزایش تولید و رشد صادرات غیر نفتی کشور، برنامه توسعه کشت بادام با توجه به ارزش غذایی و صادراتی آن، در سطح برنامه ریزی کشور مورد توجه قرار گرفته است. در اغلب مناطق ایران به ویژه استان های آذربایجان شرقی و غربی، خراسان، فارس، سمنان،

۱ - تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۰

۲- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران و استادیار گروه اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران. کرج، ایران.

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (Ershadi@basu.ac.ir).

یزد، چهارمحال و بختیاری و کرمان بادام کاری توسعه یافته است (۳۹). ایران با تولید ۵ درصد بادام جهان، بعد از کشورهای آمریکا، اسپانیا و ایتالیا رتبه چهارم را کسب کرده است و از لحاظ سطح زیرکشت با ۹ درصد سطح زیرکشت به ترتیب پس از کشورهای اسپانیا و آمریکا در رتبه سوم جهان قرار دارد (۱۲).

رقم فرانیس یکی از ارقام بادام دیرگل وارداتی است. این رقم از نظر باردهی پرمحصول بوده و کیفیت مغز بالایی دارد (۴۱). درختان بادام از لحاظ خاک و مواد غذایی درختی قانع است و در خاک‌های درجه ۳، ۴ و آهکی هم می‌تواند محصول اقتصادی تولید کند و همچنین از نظر سرمای زمستانه تا بیش از ۲۲- درجه سلسیوس تحمل می‌کنند (۳۹). اکثر درختان میوه مناطق معتدله در معرض یخبندان زمستانه یا سرمای بهاره قرار می‌گیرند و این امر موجب خسارت‌های شدید اقتصادی می‌شود. طبق گزارش بانک کشاورزی، خسارت سرما و یخبندان در سال ۱۳۸۶ در کلیه نقاط کشور بالغ بر چندین هزار میلیارد ریال بوده است و به آن زلزله سبز گفته‌اند. بر اساس آمار سازمان غذا و کشاورزی فائو، سالیانه ۵ الی ۱۵ درصد از تولیدات کشاورزی در اثر خسارات ناشی از سرمازدگی و یخبندان از بین می‌رود، این عدد برای برخی محصولات حساس باغی بخصوص بادام، پسته و زردآلو به بیش از ۵ الی ۱۰ درصد می‌رسد و میزان خسارت این عارضه در ایران ۳ تا ۵/۲ درصد گزارش شده است که ارزش ریالی بیش از ۵۰۰ میلیون دلار دارد (۴۹). با توجه به اهمیت موضوع مطالعات انجام گرفته در زمینه سرما و یخبندان در داخل کشور نسبت به سایر تنش‌های محیطی کمتر بوده و حجم دانش تولید شده در زمینه مقابله با یخ‌زدگی درختان میوه در مقایسه با محصولات زراعی نسبتاً اندک است. حفاظت از نهال‌های جوان در مقابل سرمازدگی از مسائل مدیریت نهالستان‌ها و باغ‌ها است و در چند سال اخیر برخی عوامل از جمله افزایش تراکم کاشت نهال در واحد سطح در نهالستان‌ها و تغذیه آخر فصل با کودهای نیتروژنی به منظور تسریع رشد نهال‌ها باعث تشدید سرمازدگی در خزانه و باغ‌های تازه احداث شده گردیده است.

استفاده از ارقام و پایه‌های مقاوم به سرما، اعمال روش‌های مدیریتی از جمله؛ عدم استفاده از کودهای نیتروژنی، عدم آبیاری و یا هرس دیر هنگام، استفاده از بخاری و یا پوشش‌های حفاظتی و مدیریت هسته یخ، از جمله روش‌های است که برای کاهش خسارت تنش سرمایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۲). یکی از راه‌کارهای مقابله با یخبندان زمستانه، کاربرد ترکیبات شیمیایی است. پاکلوبوترازول، اسید سالیسیلیک، مالیک هیدرازید، سوکسینیک اسید، سایکوسل و سایر مواد شیمیایی از راهکارهای مقابله با سرما و یخ‌زدگی در گیاهان محسوب می‌شود (۵۵).

پاکلوبوترازول به عنوان یکی از تنظیم کننده رشد با تغییرات در سطوح هورمون‌های مهم گیاهی از جمله جیبرلین‌ها، آبسزیک اسید و سیتوکینین‌ها باعث تاثیر بر میزان رشد گیاهی می‌شود (۱۰). مصرف پاکلوبوترازول در اثر عدم بیوسنتز جیبرلین باعث کاهش میزان رشد و همچنین محافظت گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی می‌باشد (۲۴). پاکلوبوترازول با روش‌های مختلفی از جمله کاربرد خاکی (اضافه کردن به بستر کاشت) و همچنین به صورت محلول‌پاشی بر روی گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد که در هر دو صورت استفاده شده نتایج مطلوبی حاصل شده است (۱۰ و ۲۴). امیرمردی و کرمانی (۲) گزارش کردند که پاکلوبوترازول باعث کاهش آسیب‌های غشایی، افزایش محتوای نسبی آب و افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل و کاروتنوئید تحت شرایط تنش می‌شود. همچنین مرادی و همکاران (۳۳) گزارش کردند که پاکلوبوترازول با استفاده از تاثیر بر میزان کربوهیدرات‌های محلول، آنزیم‌های پراکسیداز، پرولین و میزان رشد نهال‌های انار باعث افزایش مقاومت به یخ‌زدگی زمستانه می‌گردد و روش‌های مختلف مصرف آن تفاوتی با یکدیگر ندارند. علاوه‌براین، سانکر و همکاران (۴۵) مشاهده کردند که پاکلوبوترازول با افزایش میزان مواد آنتی اکسیدانی با وزن مولکولی پایین و همچنین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی باعث کاهش خسارت تنش سرمایی در گیاهان می‌شود.

در پژوهش‌های گذشته توسط Richardson و Quinlan (۴۰) گزارش دادند که کاربرد پاکلوبوترازول با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر پاکلوبوترازول درختان هسته‌دار محلول‌پاشی شده نسبت به تیمار شاهد دارای تحمل به سرمایی بالاتری بود. همچنین در مطالعه‌ای که Coleman و همکاران (۸) تاثیر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر رشد و تحمل به سرمای درختان جوان کاج انجام دادند مشخص شد که پاکلوبوترازول باعث کاهش سرعت رشد، طول و قطر شاخه‌ها، افزایش میزان کلروفیل و سرعت فتوسنتز می‌شود و

می‌تواند تحمل به سرمای را افزایش دهد. علاوه بر این، Ali Khan (۱) در مطالعه‌ای تاثیر بنزیل آدنین، اسید آسبزیک و پاکلوبوترازول بر افزایش تحمل به سرما در درختان گردوی آمریکایی را بررسی و گزارش داد که در تمام تیمارهای دمایی و زمانی، درختان تیمار شده با پاکلوبوترازول و اسید آسبزیک نسبت به تیمار بنزیل آدنین و شاهد به سرما مقاوم‌تر بودند.

پس از تنش یخ‌زدگی، اندازه‌گیری درصد نشت‌یونی بافت‌ها به عنوان یک شاخص مناسب جهت تخمین سلامت و تراوایی غشاء می‌باشد که توسط پژوهشگران مختلف جهت محاسبه مقاومت به سرمای گیاهان استفاده شده است (۲۵). در انگور (۲۶) و انار (۱۵) تنش سرما منجر به افزایش نشت‌یونی برگ و شاخه شده است که حاکی از صدمات وارده به غشاء یاخته‌ها در این شرایط است. همچنین هنگامی که آب بین یاخته‌ای و درون یاخته‌ای یخ می‌زند، از خود گرمایی آزاد می‌کند که این گرما در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از حسگرهای الکتریکی، قابل اندازه‌گیری است. زمانی که در بافت‌های گیاهی در حال یخ‌زدن افزایش دما رخ می‌دهد را نقطه اگزوترم می‌نامند (۱۲). تجزیه و تحلیل حرارتی افتراقی (Differential Thermal analysis) می‌تواند در مقایسه با سایر روش‌های مورد استفاده برای تعیین تحمل به یخبندان سودمند باشد، که از مهمترین مزیت‌های این روش می‌توان به افزایش تعداد گونه‌های آزمایش شده، انواع بافت‌ها و تاریخ‌های نمونه برداری، امکان آزمایش تحمل یخ‌زدگی در محل و همچنین تعیین واقع بینانه‌تر تاثیر شدت و مدت انجماد در آزمایش‌های مقاومت به یخ‌زدگی گیاهان مورد مطالعه اشاره کرد (۲۸). بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی تاثیر پاکلوبوترازول بر خسارت یخ‌زدگی و برخی فاکتورهای مرتبط با تحمل به تنش سرما در نهال‌های بادام رقم فرانسیس بود.

## مواد و روش‌ها

### موادگیاهی و محل انجام پژوهش

این پژوهش در سال ۱۳۹۹ در نهالستان پردیس واقع در شهرستان فامنین، استان همدان با موقعیت جغرافیایی ۳۵/۰۹ درجه شمالی، ۴۸/۹۷ درجه شرقی و ارتفاع از سطح دریا حدود ۱۶۴۶ متر با اقلیم سرد و خشک انجام شد. این پژوهش روی نهال‌های یکساله پیوندی بادام رقم فرانسیس پیوند شده روی پایه بادام تلخ انجام شد. بافت خاک نهالستان در عمق ۳۰-۰ سانتی متری لومی با ۱۸٪ آهک، شوری ۲/۰۸ دسی‌زیمنس بر متر، pH قلیایی (۷/۶۷) و با مقدار مواد الی ۰/۲۳ درصد بود. جهت کاهش تاثیر میزان رشد گیاه، از نهال‌هایی با قدرت رشد و اندازه یکنواخت استفاده شد و تمام مراقبت‌های معمول یک نهالستان تجاری، از جمله تغذیه، آبیاری و مبارزه با آفات و علف‌های هرز روی نهال‌ها انجام شد.

تیمارها هورمونی پاکلوبوترازول شامل پنج غلظت صفر، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده تجاری کولتار (حاوی ۲۵۰ گرم در لیتر ماده موثره پاکلوبوترازول) در چهار تکرار و در مجموع ۲۰ واحد آزمایشی بود که در هر واحد آزمایشی ۱۰ نهال یکساله بادام مورد استفاده قرار گرفت. در هفته اول شهریور ۱۳۹۹ نهال‌ها با غلظت‌های مختلف کولتارد در ساعات اولیه صبح (۸-۹ صبح) محلول‌پاشی شدند به گونه‌ای که برگ‌های گیاه کاملاً خیس شود. نمونه برداری برای بافت ساقه در سه مرحله زمانی ۲۰ آبان، ۲۰ دی و ۲۰ اسفندماه و برای بافت جوانه در دو مرحله زمانی ۲۵ دی و ۲۵ اسفندماه انجام گرفت. نمونه‌ها برای هر صفت از نهال‌های با رشد مشابه و از گره‌های یکسان انتخاب گردید. نمونه‌ها در پارچه مرطوب و پلاستیک پوشانده شدند و برای انجام آزمایش‌ها سریعاً به آزمایشگاه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا انتقال یافتند.

### نشت یونی ساقه و جوانه

میزان خسارت غشاء با استفاده از نشت یونی نسبی و براساس روش تئوتونیکا<sup>۱</sup> و همکاران (۵۲) برای هر دو بافت جوانه و ساقه بادام محاسبه شد. شاخه‌ها و جوانه‌ها ابتدا در آب مقطر شسته شدند تا هر گونه آلودگی از روی آن‌ها پاک شود، قطعات ساقه به طول یک سانتی متر تهیه شد و همچنین جوانه‌ها به طور کامل از شاخه جدا گردیده و به صورت مجزا داخل ظروف ۶۰ میلی

لیتری قرار گرفته و به دستگاه سرماساز (کیمیا رهاورد، ساخت ایران) منتقل شدند. پیش از اعمال تیمارهای سرمایی، نمونه‌های بافت ساقه و جوانه با چند قطره آب مرطوب شده و سپس در معرض دماهای ۰، ۵-، ۱۰-، ۱۵-، ۲۰- و ۲۵- درجه سلسیوس قرار گرفتند. در زمان شروع تیمارهای سرمایی دمای دستگاه سرماساز ۴ درجه سلسیوس و کاهش دما به میزان ۲ درجه سلسیوس در هر ساعت بود. پس از رسیدن به تیمار سرمایی مورد نظر، نمونه‌ها به مدت سه ساعت در هر تیمار سرمایی نگه داشته شدند. پس از اتمام هر تیمار سرمایی ظروف حاوی نمونه از دستگاه خارج شده، مقدار ۴۰ میلی لیتر آب مقطر به هر کدام از آن‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت روی شیکر قرار گرفتند. پس از آن نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت یک روز نگهداری شدند. سپس میزان نشت یونی توسط دستگاه ای‌سی‌متر (مدل Inolab 720، ساخت آلمان) اندازه‌گیری شد (EC1). در مرحله بعد ظروف حاوی نمونه و آب مقطر در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند و بعد از اینکه ویال‌ها در دمای آزمایشگاه خنک شدند مجدداً EC قرائت شد (EC2). میزان نشت یونی به صورت نسبت EC1/EC2 بر مبنای درصد بیان گردید. برای اندازه‌گیری نشت یونی نسبی جوانه‌ها، جوانه کامل همراه فلس را از روی شاخه برش زده و مشابه با ساقه، درصد نشت یونی جوانه اندازه‌گیری شد. محاسبه LT<sub>50</sub> از طریق برازش نمودار درصد نشت یونی در تیمارهای سرمایی مختلف و توسط برنامه اکسل انجام شد.

### نقطه اگزوترم ساقه

نتایج این روش بسیار متأثر از میزان رطوبت داخلی شاخه‌ها بوده و در صورت کاهش رطوبت نمونه‌ها ممکن است نقطه اگزوترم مشاهده نشود، بنابراین پس از تهیه نمونه‌ها باید بلافاصله آزمایش انجام شود. شاخه‌های یکساله در ماه‌های آبان، دی و اسفند از نهالستان جمع‌آوری و لای پارچه مرطوب پیچانده شدند و پس از قرار دادن در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند. برای هر واحد آزمایشی ۳ شاخه و هر کدام از شاخه‌ها به اندازه‌های  $1 \pm 10$  سانتیمتری بریده شدند. سپس حسگرهای دما در داخل این شاخه‌ها قرار گرفتند. شاخه‌ها و حسگرها در چند لایه پارچه نظیف مرطوب و سپس فویل آلومینیومی پیچانده شدند. نمونه‌ها داخل اتاقک سرماساز با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفته و دمای دستگاه به میزان ۲ درجه سلسیوس بر ساعت پایین آورده شد. این کار تا رسیدن به دمای ۳۰- درجه سلسیوس ادامه یافت. دمای بافت شاخه‌ها توسط حسگرها در هر پنج ثانیه ثبت شده و نمودار اگزوترم اول بر اساس این تغییرات دما با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم گردید (۲).

### پرولین ساقه

غلظت پرولین نمونه‌های ساقه به روش Bates و همکاران (۵) اندازه‌گیری شد. ابتدا ساقه‌های نهال‌های بادام در مجاورت نیتروژن مایع به طور کامل درون هاون چینی خرد شد. نیم گرم از بافت پودر شده جدا شده و ۱۰ میلی لیتر اسید سولفو سالیسیلیک ۳٪ به آن اضافه گردیده و کاملاً در هاون به هم زده شد. سپس مقدار ۲ میلی لیتر از عصاره داخل هاون برداشته و در لوله آزمایشی ۲۵ CC ریخته شد. به هر کدام از لوله‌های آزمایش در زیر هود لامینار، مقدار ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲ میلی لیتر محلول نین‌هیدرین (۱/۲۵ گرم نین‌هیدرین + ۳۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال + ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۶ مولار) اضافه شد و این لوله‌ها به مدت یک ساعت درون حمام بن‌ماری (در دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس) قرار داده شدند. سپس لوله‌ها خارج شده و به مدت ۵ دقیقه در داخل یخ قرار داده شدند تا کاملاً سرد شوند. ۴ میلی لیتر تولوئن به هر کدام از لوله‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه توسط ورتکس تکان داده شد تا دو فاز جداگانه تشکیل شود. نمونه‌برداری از فاز رویی انجام شده و قرائت نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu uv-1280، ساخت ژاپن) در طول موج ۵۱۵ نانومتر انجام گردید، غلظت نهایی پرولین در مقایسه با منحنی استاندارد پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد.

### کربوهیدرات‌های محلول ساقه

برای اندازه‌گیری غلظت کربوهیدرات‌های محلول از روش Pakone1 و همکاران (۳۵) استفاده شد. برای این منظور نیم گرم از بافت ساقه بادام را که قبلاً به‌وسیله نیتروژن مایع پودر شده بود در هاون چینی ریخته و پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۶٪ به آن اضافه گردید. قسمت بالایی محلول جدا شده و دوباره با افزودن پنج میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ به رسوبات قبلی (به جا مانده از مرحله اول) استخراج صورت گرفت. عصاره استخراج شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۲۰۰ g سانتریفیوژ شد. به‌منظور تعیین غلظت کربوهیدرات‌های محلول ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره را برداشته و به آن ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون (۱۵۰ میلی گرم آنترون + ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۷۲٪) تازه تهیه شده اضافه گردید. همه نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری قرار گرفته و پس از خنک شدن، قرائت نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر (Shimadzu uv-1280، ساخت ژاپن) انجام شد. غلظت نهایی کربوهیدرات‌های محلول در مقایسه با منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بیان شد.

### درصد ماده خشک ساقه

نمونه‌هایی از بافت ساقه به طول یک سانتی متر و به تعداد سه نمونه برای هر واحد آزمایشی تهیه شده و پس از توزین به آون با ۷۲ درجه سلسیوس منتقل شد. پس از سه روز نمونه‌ها از آون خارج شده و مجدداً توزین شدند. درصد ماده خشک نمونه‌ها براساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{وزن خشک} / \text{وزن تر}) = \text{درصد ماده خشک}$$

### Error! Bookmark not defined. محتوای نسبی آب ساقه

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب، در هر واحد آزمایشی ۴ نمونه ساقه با قطر ۵ میلی متر تهیه شد. نمونه‌ها پس از توزین در داخل بشر کوچک قرار گرفته و پس از غوطه‌ور شدن درون آب به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاهی قرار گرفتند. پس از این مدت نمونه‌ها از آب بیرون آورده شده و روی پارچه قرار گرفتند تا رطوبت خارجی آن‌ها گرفته شود و مجدداً توزین شدند. سپس نمونه‌ها درون آون با دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفته و دوباره توزین شدند. محتوای نسبی آب ساقه برحسب درصد و با استفاده از فرمول زیر به دست آمد.

$$100 \times (\text{وزن خشک نمونه} - \text{وزن تورژسانس نمونه}) / (\text{وزن خشک نمونه} - \text{وزن تر نمونه}) = \text{محتوای آب نسبی}$$

### واکاوی آماری داده‌ها

واکاوی آماری با استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار و به صورت مجزا برای هر یک از سه مرحله زمانی انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS ورژن ۹/۱ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال  $P \leq 0.05$  صورت گرفت. مقادیر  $LT_{50}$  از طریق رگرسیون خطی با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شد. همبستگی بین کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، محتوای نسبی آب، ماده خشک و نقطه اگزوترم با  $LT_{50}$  محاسبه شده به روش نشت یونی با استفاده از روش پیرسون تعیین شد.

## نتایج و بحث

### تحمل به سرمای ساقه

کاربرد پاکلوبوترازول اثر معنی داری بر دمای  $LT_{50}$  هر سه مرحله اندازه‌گیری داشت (جدول ۱). حداقل دمای  $LT_{50}$  در مراحل آبان و دی‌ماه بدون اختلاف معنی‌داری در تیمارهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پاکلوبوترازول به دست آمد. در طی اسفندماه تفاوت بین این دو تیمار محسوس تر شده و غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اثرات مثبت تری بر تحمل به سرما نشان داد. تیمار

۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر پاکلوبوترازول در آبان و اسفندماه اثرات بیشتری نسبت به ۱۲۵ میلی گرم بر لیتر در افزایش تحمل به سرما نشان داد. کمترین تحمل به سرما مربوط به تیمار شاهد بود که با ۱۲۵ میلی گرم بر لیتر مشابه بود. در دی ماه تفاوت دمای  $LT_{50}$  بین تیمار شاهد و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر پاکلوبوترازول ۵ درجه سلسیوس بود که نشان دهنده تاثیر بسیار مثبت پاکلوبوترازول در افزایش تحمل به سرمای بافت ساقه بادام می باشد. اثرات مثبت تیمار ۱۲۵ میلی گرم بر لیتر در کاهش دمای  $LT_{50}$  نسبت به شاهد در سه مرحله آبان، دی و اسفندماه کم و به ترتیب ۰/۴، ۱ و ۰/۳ درجه سلسیوس بود.

جدول ۱-مقایسه میانگین اثر پاکلوبوترازول بر مقادیر  $LT_{50}$  در ساقه بادام فرانیس طی سه مرحله آبان، دی و اسفندماه.  
Table 1. Effect of PBZ on stem  $LT_{50}$  in almond 'Ferragnes' during November, January and March.

| $LT_{50}$ (درجه سلسیوس)<br>$LT_{50}$ (°C) |               |                  |                                                       |
|-------------------------------------------|---------------|------------------|-------------------------------------------------------|
| اسفند<br>March                            | دی<br>January | آبان<br>November | پاکلوبوترازول (پی پی ام)<br>PBZ (mg L <sup>-1</sup> ) |
| -13.6 a                                   | -18.8 a       | -13.1 a          | 0                                                     |
| -13.9 a                                   | -19.8 b       | -13.5 a          | 125                                                   |
| -14.8 b                                   | -23.6 c       | -16.1 c          | 250                                                   |
| -18.2 c                                   | -23.8 c       | -17 c            | 500                                                   |
| -14.6 b                                   | -21.1 b       | -14 b            | 1000                                                  |

در هر ستون میانگین هایی با دست کم یک حرف مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی داری ندارند.

†In each column means followed by at least a same letter, are not significantly different at 5% probability level according to Duncan Multiple Range Test.

### تحمل به سرمای جوانه

در هر دو مرحله اندازه گیری کمترین دمای  $LT_{50}$  مربوط به غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر پاکلوبوترازول و بالاترین دمای  $LT_{50}$  در تیمار شاهد رخ داد، اختلاف بین این دو تیمار در دی ماه ۶/۱ و در اسفند ماه ۵/۲ درجه سلسیوس بود (جدول ۲). به طور کلی در مقایسه دمای  $LT_{50}$  دو بافت ساقه و جوانه (جدول ۱ و ۲)، جوانه ها بادام دمای  $LT_{50}$  بالاتری نسبت به شاخه ها داشتند. از طرفی سرعت از دست دادن تحمل به سرما از دی ماه به اسفندماه در بافت ساقه نسبت به جوانه در همه تیمارها بیشتر بود. مطالعات نشان داده است که غشاء یاخته اولین مکان صدمه دیده در اثر آسیب تنش است و تنش سرمایی باعث تغییر حالت غشاء از کریستال- مایع به جامد- ژل شده و با این تغییر فعالیت غشاء مختل می شود (۲۰). در همین راستا Yang و Jian (۵۵) اعلام کرد که با کاهش دما و افزایش شدت سرما درصد نشت یونی در بادام افزایش می یابد. بررسی نشت یونی پس از تنش سرمایی یکی از روش های آسان و بسیار مفید برای ارزیابی تحمل به سرما و تغییرات در تحمل به سرما طی فصل رکود می باشد (۱۵). در پژوهشی، Colombo (۹) گزارش دادند که کاربرد پاکلوبوترازول در درخت کاج، ۴ ماه پس از استفاده با کاهش میزان نشت یونی تحمل به سرما را در این درخت افزایش می دهد. همچنین Grish و Frank (۱۸) اعلام داشتند که محلول پاشی پاکلوبوترازول روی فاکتورهای مرتبط با تنش سرمایی در طول رژیم های دمایی مختلف در بلوبری موثر بوده و درصد نشت یونی را کاهش می دهد.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر پاکلوبوترازول بر مقادیر LT<sub>50</sub> در جوانه بادام فرانیس طی سه مرحله آبان، دی و اسفندماه.  
Table 2. Effect of PBZ on bud LT<sub>50</sub> in almond 'Ferragnes' during November, January and March.

| LT <sub>50</sub> (درجه سلسیوس)<br>LT <sub>50</sub> (°C) |                  |                                                               |
|---------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------|
| اسفندماه<br>March                                       | دی ماه<br>Janury | پاکلوبوترازول (میلی گرم بر لیتر)<br>PBZ (mg L <sup>-1</sup> ) |
| -10.9 a                                                 | -11.2 a          | 0                                                             |
| -10.7 a                                                 | -12.3 b          | 125                                                           |
| -12.3 b                                                 | -16.2 c          | 250                                                           |
| -16.1 c                                                 | -17.3 d          | 500                                                           |
| -10.8 a                                                 | -15.8 c          | 1000                                                          |

در هر ستون میانگین‌هایی با دست کم یک حرف مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

†In each column means followed by at least a same letter, are not significantly different at 5% probability level according to Duncan Multiple Range Test.

علاوه بر این، Coleman و همکاران (۸) بیان داشتند که تیمار مشترک پاکلوبوترازول، تید یازرون و فلورپری میدول درصد نشت یونی و خسارت ناشی از تنش سرما به بافت‌ها را در درخت سیب نسبت به تیمار شاهد کاهش می‌دهند. پاکلوبوترازول با جلوگیری از تخریب چربی‌های غشاء یاخته‌ای که در معرض سرما از بین می‌روند موجب حفاظت غشاء یاخته‌ای از خسارت ناشی از اکسیداسیون در هنگام سرمازدگی می‌گردد (۵۳). علی‌خان (۱) گزارش کرد که تیمارهای پاکلوبوترازول به صورت معنی‌داری باعث کاهش میزان نشت یونی در پکان می‌شود. همچنین قاسمی سلوکلوئی و همکاران (۱۶) گزارش کردند که کاربرد پاکلوبوترازول در انار باعث کاهش نشت یونی و همچنین افزایش تحمل به سرما به میزان ۳/۶°C در دی‌ماه و ۲/۳°C در اسفندماه، نسبت به تیمار شاهد شد، غلظت‌های بالای پاکلوبوترازول (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) بیشترین تاثیر را در افزایش تحمل به سرمای نهال‌های انار داشتند. باید توجه داشت که سرمازدگی جوانه‌ها اثرات مخربی بر ادامه رشد نهال‌ها در سال بعد داشته و باعث کاهش میزان رشد و همچنین در صورت سرمازدگی جوانه انتهایی باعث چندشاخه شدن نهال از ارتفاع نامناسب می‌شود. با توجه به مشاهدات مزرعه‌ای کاربرد پاکلوبوترازول در شهریور ماه به رکود زود هنگام درختان و خزان زودرس آن‌ها منجر می‌شود. نهال‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر پاکلوبوترازول حدود ۲۰ روز قبل از نهال‌های شاهد خزان کردند که این امر می‌تواند به کاهش ذخیره‌سازی مواد غذایی در بافت‌ها منجر شده و عملاً اثرات مثبت این تیمار را تا حدودی کاهش دهد. از طرفی غلظت‌های پایین تر پاکلوبوترازول ضمن توقف زود هنگام رشد باعث ذخیره سازی بهتر مواد غذایی در بافت ساقه و جوانه می‌شوند. زو و هایفو (۵۶) گزارش دادند که محلول پاشی درختان گردوی سیاه با غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر پاکلوبوترازول یا کاربرد خاکی این ماده به میزان ۳ گرم به ازای یک درخت، رشد رویشی را کاهش می‌دهد. همچنین Blanco (۶) نتیجه گرفت که تیمار نهال‌های یک‌ساله هلو و شلیل با پاکلوبوترازول باعث کاهش رشد رویشی شد.

#### نقطه اگزوترم ساقه

پاکلوبوترازول تاثیر معنی‌داری روی نقطه اگزوترم بافت ساقه در مرحله اول و دوم اندازه‌گیری داشت در حالیکه در مرحله سوم اندازه‌گیری تفاوت معنی‌داری بین کاربرد پاکلوبوترازول و شاهد مشاهده نشد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). در آبان‌ماه، کمترین دمای اگزوترم (۶- درجه سلسیوس) مربوط به تیمار ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر پاکلوبوترازول و بیشترین دمای اگزوترم (۵/۲- درجه

سلسیوس) در تیمار شاهد دیده شد. علاوه بر این، اختلاف نقطه اگزوترم بین نهال‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۲۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پاکلوبوترازول ۳/۵ درجه سلسیوس بود (شکل ۱). در دی ماه، دمای نقطه اگزوترم نسبت به مرحله اول کاهش یافته، به گونه‌ای که کمترین نقطه اگزوترم در این مرحله در دمای ۷- درجه سلسیوس و مربوط به تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و بالاترین نقطه اگزوترم مربوط به تیمار شاهد و در دمای ۳- درجه سلسیوس رخ داد. بین نقطه اگزوترم نهال‌های تیمار شده با غلظت ۱۲۵ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پاکلوبوترازول در این مرحله هیچ اختلافی وجود نداشته و نقطه اگزوترم هر دو در دمای ۴- درجه سلسیوس مشاهده شد (شکل ۲). تفاوت بین حداکثر و حداقل نقطه اگزوترم در اسفندماه یک درجه سلسیوس بود که نشان‌دهنده کاهش اثرات تیمار پاکلوبوترازول در اواخر فصل رکود نسبت به دو مرحله قبل بود (شکل ۳).

گرمای آزاد شده باعث افزایش دمای مقطعی بافت و ایجاد نقاط اگزوترم می‌شود (۲۸). بررسی تحمل به سرما در برخی از درختان مانند هیکوری (۱۴) و زیتون (۲۹) با استفاده از شناسایی نقاط اگزوترم انجام شده است و گزارش شده است که روش اگزوترم یکی از روش‌های دقیق ارزیابی یخزدگی درون یاخسته‌ای درختان میوه و در نتیجه مقایسه مقاومت به یخزدگی در بین ارقام مختلف درختان میوه می‌باشد.

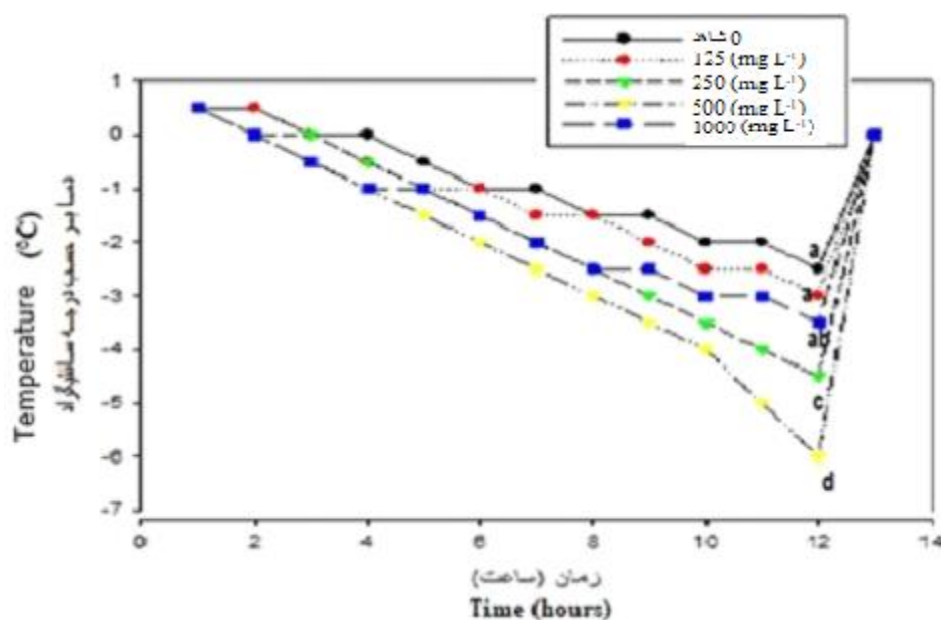


Fig. 1. Effect of different PBZ concentrations on exothermic point in stem of almond 'Ferragnes' in November.

شکل ۱- اثر کاربرد غلظت‌های مختلف پاکلوبوترازول بر نقطه اگزوترم در ساقه بادام فرانیس در آبان‌ماه.



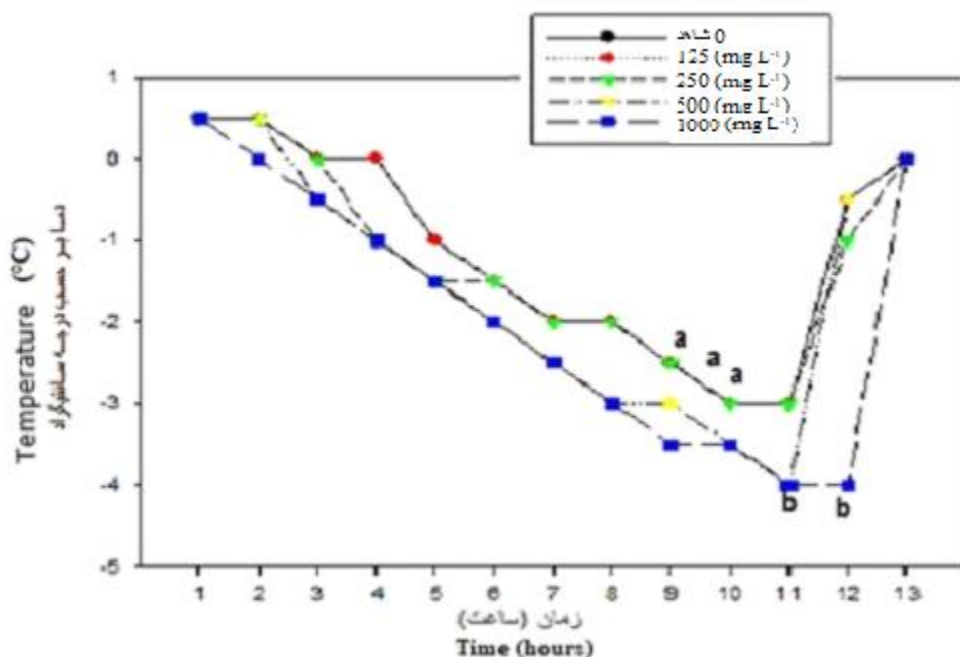


Fig. 2. Effect of different PBZ concentrations on exothermic point in stem of almond 'Ferragnes' in January.

شکل ۲- اثر کاربرد غلظت‌های مختلف پاكلوبوترازول بر نقطه اگزوترم در ساقه بادام فرانیس در دی‌ماه.

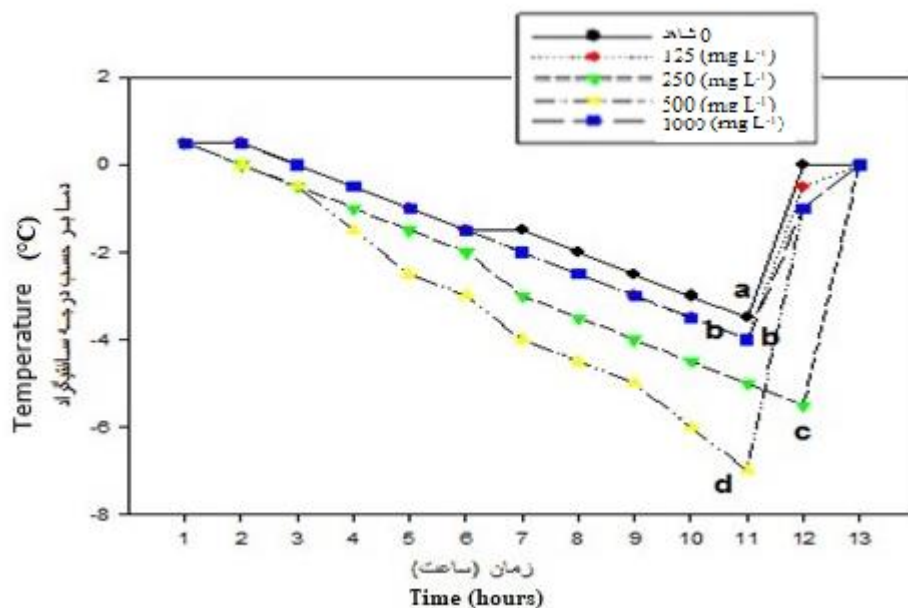


Fig. 3. Effect of different PBZ concentration on exothermic point in stem of almond 'Ferragnes' in March.

شکل ۳- اثر کاربرد غلظت‌های مختلف پاكلوبوترازول بر نقطه اگزوترم در ساقه بادام فرانیس در اسفندماه.

همچنین Andrews (۳) در بررسی روند تحمل به سرمای هلو و گیلان در طول پاییز، زمستان و بهار با استفاده از حسگرهای حرارتی (روش اگزوترم) دریافت که بیشترین میزان تحمل و کمترین نقطه تشکیل یخ در اواسط زمستان حاصل می‌شود که با نتایج به دست آمده در مطالعه ما مطابقت دارد.

## کربوهیدرات محلول ساقه

کاربرد پاکلوبوترازول در هر سه مرحله اندازه‌گیری اثر معنی‌داری بر غلظت کربوهیدرات‌های محلول بافت ساقه داشت. بالاترین غلظت کربوهیدرات‌های محلول ساقه در آبان‌ماه ( $79 \text{ mg/g DW}$ ) و دی‌ماه ( $92 \text{ mg/g DW}$ ) با کاربرد پاکلوبوترازول با غلظت  $500$  میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد اما پس از محلول‌پاشی  $1000$  میلی‌گرم بر لیتر پاکلوبوترازول، غلظت کربوهیدرات‌های محلول ساقه در آبان‌ماه ( $52 \text{ mg/g DW}$ )، دی‌ماه ( $68 \text{ mg/g DW}$ ) و اسفندماه ( $46 \text{ mg/g DW}$ ) نسبت به تیمارهای  $500$  و  $250$  میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت. در اندازه‌گیری‌های دی و اسفندماه تیمارهای  $250$  و  $500$  میلی‌گرم بر لیتر پاکلوبوترازول اثرات مشابهی بر افزایش غلظت کربوهیدرات‌های محلول ساقه داشتند البته در اسفندماه تاثیر تیمار پاکلوبوترازول در مقایسه با دو مرحله قبل کاهش یافت. محلول‌پاشی با پاکلوبوترازول با غلظت  $125$  میلی‌گرم بر لیتر تاثیر محسوسی بر افزایش کربوهیدرات محلول شاخه نداشت و در هیچ‌یک از سه مرحله تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت (شکل ۴). افزایش تحمل به سرما در گیاهان مختلف با تجمع ترکیباتی مانند کربوهیدرات حاصل می‌گردد ( $36, 48$ ). در پژوهشی، Grospecth و همکاران ( $19$ ) گزارش دادند که کاربرد ترکیب شیمیایی پاکلوبوترازول در طول دوره سرما باعث افزایش مقدار کربوهیدرات در گیاهچه‌های سیب زمینی می‌گردد.

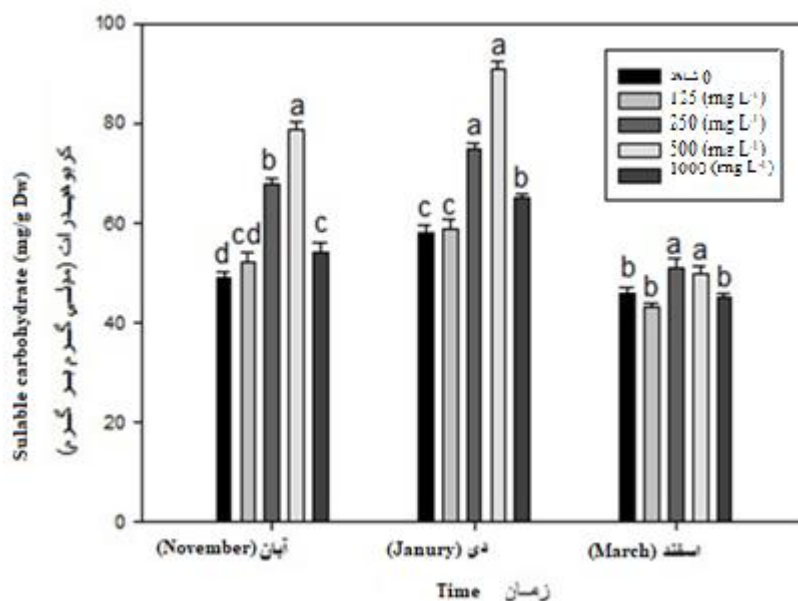


Fig. 4. Effect of different PBZ concentrations on soluble carbohydrate content in stems of almond 'Ferragnes' during three sampling dates. In each stage means followed by at least a same letter, are not significantly different at 5% probability level according to Duncan Multiple Range Test.

شکل ۴- اثر کاربرد غلظت‌های مختلف پاکلوبوترازول بر غلظت کربوهیدرات‌های محلول ساقه بادام فرانیس در طی سه مرحله نمونه‌گیری. در هر مرحله میانگین‌های با دست‌کم یک حرف مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

همچنین Paull ( $37$ ) گزارش داد که کاربرد پاکلوبوترازول محتوی کربوهیدرات را در فلفل افزایش می‌دهد. افزون‌براین، Coleman و همکاران ( $7$ ) گزارش دادند که در درختان سیب تیمار شده با پاکلوبوترازول غلظت کربوهیدرات‌های محلول نسبت به درختان شاهد بیشتر شده و در نتیجه تحمل به سرما نیز بیشتر می‌شود. در همین راستا Wang و همکاران ( $53$ ) گزارش داد که تیمار درختان  $6$  تا  $8$  ساله سیب با پاکلوبوترازول موجب افزایش کربوهیدرات‌های محلول در بافت ساقه در دوره خواب می‌گردد. قابل ذکر است که Tafazoli و Beyl ( $50$ ) در بررسی اثرات کاربرد پاکلوبوترازول و یونی‌کونازولروی تحمل به سرما در کیوی به این

نتیجه رسیدند که ترکیبات تریازولی با افزایش قندهای مونوساکارید مثل آرابینوز، دیساکارید مثل ساکارز و پلی‌ساکارید مثل استاکیوز، میزان تحمل به سرما را در کیوی افزایش می‌دهند. بنابراین، مکانیسم مقاومت به یخ‌زدگی در نتیجه افزایش کربوهیدرات کل بیشتر به این علت است که با افزایش قندها در پروتوپلاسم، تعادل ترمودینامیکی بین یخ خارج یاخته و آب داخل یاخته به صورت مناسب‌تری برقرار می‌گردد (۲۲). در این مطالعه نیز تیمار پاكلوبوترازول توانسته بود باعث افزایش غلظت کربوهیدرات‌های محلول و تحمل به سرما در ساقه بادام به‌ویژه در غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر گردد در حالیکه تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پاكلوبوترازول موجب خزان زودرس نهال‌ها شد که همین مانع از تجمع کافی کربوهیدرات‌ها در ساقه‌ها شده و به تبع آن اثرات مثبت کمتری نسبت به غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر داشت.

### پرولین ساقه

با افزایش غلظت پاكلوبوترازول تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر غلظت اسید آمینه پرولین در هر سه مرحله روند صعودی داشت اما غلظت پرولین در دی و اسفند ماه در ساقه‌های بادام تیمار شده با ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پاكلوبوترازول نسبت به تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب ۳۸ و ۴۹ درصد کاهش یافت. بین تیمارهای شاهد و ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر و همچنین ۲۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پاكلوبوترازول اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۵). غلظت اسید آمینه پرولین در مرحله دوم نسبت به سایر مراحل افزایش چشمگیری داشت و بالاترین غلظت پرولین (۸/۲ میکرومول بر گرم وزن تر) در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پاكلوبوترازول دیده شد در حالی‌که کمترین غلظت پرولین (۳/۴ میکرومول بر گرم وزن تر) در تیمار شاهد بود. همچنین غلظت پرولین در مرحله سوم کاهش نسبی داشت. به‌طور کلی کاربرد پاكلوبوترازول باعث افزایش مقدار پرولین ساقه شد که این می‌تواند در افزایش تحمل به سرما موثر باشد.

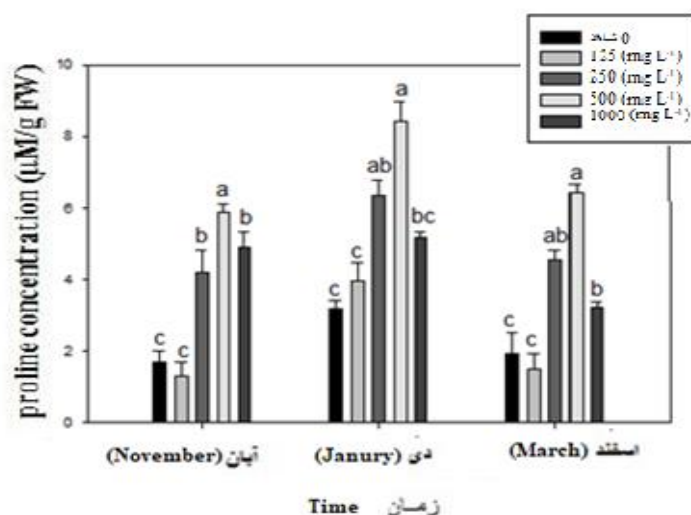


Fig. 5. Effect of different PBZ concentrations on proline content in stem of almond 'Ferragnes' during three stages. In each sampling dataes followed by at least a same letter, are not significantly different at 5% probability level according to Duncan Multiple Range Test.

شکل ۵- اثر کاربرد غلظت‌های مختلف پاكلوبوترازول بر غلظت پرولین ساقه بادام فرانسیس در طی سه مرحله نمونه‌گیری. در هر مرحله میانگین‌هایی دستکم یک حرف مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

به عقیده برخی از پژوهشگران تجمع پرولین در اثر تنش اسمزی در اکثر گونه‌های گیاهی با تحمل به تنش رابطه داشته و غلظت آن در گیاهان مقاوم به تنش بالاتر از گیاهان حساس می‌باشد (۴). میزان ترکیباتی مانند پرولین و انواع کربوهیدرات‌ها

ارتباط مستقیمی با تحمل به سرما در گیاهان دارد. مطالعات فراوانی در دست است که رابطه مستقیم بین غلظت پرولین تجمع یافته در داخل بافت‌های گیاهی و میزان تحمل به تنش سرما در گیاهان مختلف را تایید کردند (۴۳). در پژوهش‌های پیشین نشان توسط Hare و Cress (۲۱) بیان شد که در زمان رکود غلظت قند و پرولین در گیاهان افزایش می‌یابد. آنها اظهار داشتند که پرولین از اسیدی شدن غشاء یاخته‌ای جلوگیری کرده و تنش یاخته‌ای را کاهش می‌دهد. همچنین Saleh (۴۴) گزارش دادند که تیمار پاکلوبوترازول در شرایط تنش سرما نشت یونی لوبیا را کاهش داده و غلظت کربوهیدرات‌ها و پرولین را افزایش می‌دهد. همچنین قاسمی سلوکلویی و همکاران (۱۶) گزارش داد که بالاترین میزان پرولین ( $6/8 \mu\text{M g}^{-1}\text{FW}$ ) در اسفندماه وجود داشت که با نتایج ما مطابقت ندارد و اعلام کردند که بیشترین غلظت پرولین در آبان‌ماه ( $4 \mu\text{M g}^{-1}\text{FW}$ )، مربوط به تیمار ۱۲۵ میلی گرم بر لیتر و در دی‌ماه ( $3 \mu\text{M g}^{-1}\text{FW}$ ) و اسفندماه ( $6/8 \mu\text{M g}^{-1}\text{FW}$ ) مربوط به تیمار ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر پاکلوبوترازول مشاهده شد.

### محتوای نسبی آب ساقه

اثر تیمار پاکلوبوترازول بر محتوای نسبی آب در هر سه مرحله آزمایشی معنی‌دار بود (شکل ۶). حداکثر محتوای نسبی آب در آبان‌ماه (۹۳٪)، دی‌ماه (۸۷٪) و اسفندماه (۸۰٪) در تیمار شاهد مشاهده شد. در آبان‌ماه حداقل محتوای نسبی آب (۶۲٪) با تیمار ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر پاکلوبوترازول به دست آمد و بین سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در دی و اسفندماه بین غلظت‌های مختلف پاکلوبوترازول تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد اگرچه به‌طور کلی کاربرد پاکلوبوترازول محتوای نسبی آب را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد (شکل ۶).

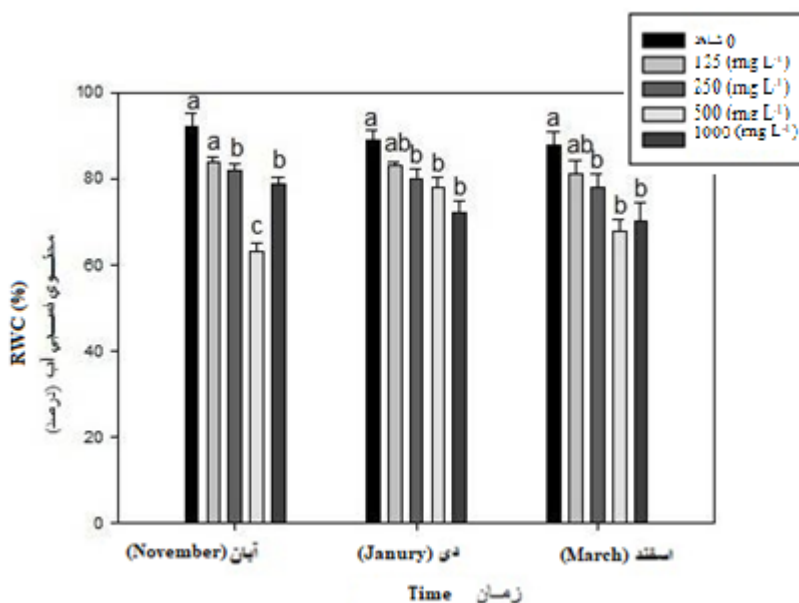


Fig. 6. Effect of different PBZ concentrations on stem RWC of almond 'Ferragnes' during three sampling dates. In each stage means followed by at least a same letter, are not significantly different at 5% probability level according to Duncan Multiple Range Test.

شکل ۶- اثر کاربرد غلظت‌های مختلف پاکلوبوترازول بر محتوای نسبی آب ساقه بادام فرانسیس در طی سه نمونه‌گیری. در هر مرحله میانگین‌های با دست‌کم یک حرف مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

درختان میوه برای رشد و نمو احتیاج زیادی به آب دارند ولی اگر در طی زمستان آب موجود در جوانه‌ها و اسکلت درخت از یک حد معین تجاوز کند باعث حساسیت به یخزدگی و مرگ گیاه می‌شود و آب موجود در جوانه‌های دارای رکود واقعی کمتر از سایر جوانه‌ها می‌باشد (۱۳). در همین راستا Rosa و Rallo (۴۳) گزارش دادند که در طی دوره رکود، کاهش محتوای آب یاخته‌ای

باعث تحمل به تنش سرما در درختان زیتون می‌گردد. علاوه بر این، Pakkish و Rahemi (۳۴) در مطالعه‌ای که روی ارزیابی تحمل به سرما در پسته داشتند بیان کردند که هراندازه آب میان بافتی کمتر باشد میزان تحمل جوانه‌ها به سرما افزایش می‌یابد. در پژوهشی دیگر، Faust (۱۲) تحمل کمتر هلو به تنش سرمایی نسبت به سیب را به سطح بالای آب میان بافتی آن مرتبط دانست. همچنین، Meiering و همکاران (۳۰) غلظت پایین آب میان بافتی را عامل جلوگیری از یخزدگی در انگور دانستند. علاوه بر این، Khoshkhui و همکاران (۲۷) علت پایدار بودن برخی از گیاهان در برابر سرما در مقایسه با گیاهان حساس را دارا بودن آب کمتر و قند بیشتر درون یاخته‌ها می‌دانند.

#### ماده خشک ساقه

بیشترین درصد ماده خشک ساقه در آبان (۵۸٪)، دی (۶۸٪) و اسفند (۵۹٪) در نهال‌های تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پاكلوبوترازول مشاهده شد. نهال‌های تیمار شده با ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر پاكلوبوترازول نیز دارای درصد ماده خشک بیشتری در بافت ساقه خود در مقایسه با سایر غلظت‌های پاكلوبوترازول و شاهد بودند در حالیکه کمترین درصد ماده خشک در تیمار شاهد (آبان‌ماه = ۵۶٪، دی‌ماه = ۶۰٪، اسفندماه = ۵۳٪) و نهال‌های تیمار شده با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر پاكلوبوترازول (آبان‌ماه = ۵۷٪، دی‌ماه = ۶۳٪، اسفندماه = ۵۳٪) دیده شد (شکل ۷). نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین درصد ماده خشک در دی ماه وجود داشت. یک رابطه منفی بین محتوای آب نسبی بافت‌ها و درصد ماده خشک آن‌ها مشاهده شد (جدول ۳). درصد ماده خشک بالاتر و محتوای نسبی آب کمتر مشاهده شده در نهال‌های تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پاكلوبوترازول در مقایسه با سایر تیمارها و شاهد را می‌توان به عنوان یکی از عوامل اصلی در افزایش تحمل به سرما در نهال‌های تیمار شده با این غلظت دانست.

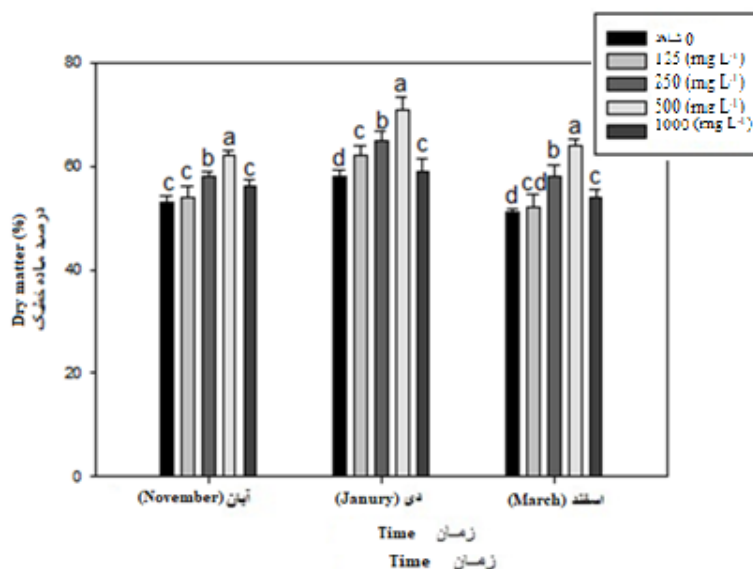


Fig. 7. Effect of different PBZ concentrations on stem dry matter of almond 'Ferragnes' during three sampling dates. In each stage means followed by at least a same letter, are not significantly different at 5% probability level according to Duncan Multiple Range Test.

شکل ۷- اثر کاربرد غلظت‌های مختلف پاكلوبوترازول بر درصد ماده خشک ساقه بادام فرانسیس در طی سه مرحله نمونه‌گیری. در هر مرحله میانگین‌های با دست‌کم یک حرف مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. در پژوهشی، Giovinazzo (۱۷) بیان داشت که کاربرد پاكلوبوترازول در شرایط تنش سرمایی میزان ماده خشک را در نهال گوجه فرنگی نسبت به تیمار شاهد به میزان ۶٪ افزایش می‌دهد. همچنین Setia (۴۷) اعلام کرد که تیمار پاكلوبوترازول میزان ماده

خشک را در ریشه شلغم افزایش می‌دهد اما جعفری و همکاران (۲۳) کاهش میزان ماده خشک را در نشاء گوجه فرنگی تحت تاثیر تیمار پاکلوبوترازول گزارش کردند.

### ضرایب همبستگی

به منظور بررسی رابطه بین میزان خسارت سرمازدگی با صفات اندازه‌گیری شده، همبستگی بین دمای  $LT_{50}$  ساقه محاسبه شده به روش نشت یونی با کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، درصد ماده خشک، محتوای نسبی آب و نقطه اگزوترم محاسبه شد. در آبان و دی‌ماه همبستگی منفی در سطح ۱٪ بین دمای  $LT_{50}$  ساقه با میزان پرولین ساقه و کربوهیدرات‌های محلول مشاهده شد که نشان می‌دهد که با ورود گیاهان به مرحله رکود مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سازگاری از جمله افزایش کربوهیدرات‌های محلول و پرولین در گیاهان توسعه می‌یابد که به آن‌ها توان تحمل شرایط یخبندان زمستانه را می‌دهد و باعث کاهش دمای بحرانی مرگ گیاهان می‌شوند. همچنین بین دمای  $LT_{50}$  و درصد ماده خشک همبستگی منفی در سطح ۵٪ در آبان و در سطح ۱٪ در دی مشاهده شد (جدول ۳). در تحقیقی Palonen و همکاران (۳۶) اظهار داشتند که رابطه مستقیمی بین میزان کربوهیدرات‌های محلول و مقادیر  $LT_{50}$  در زمان رکود در گیاهان وجود دارد که نشان‌دهنده تاثیر کربوهیدرات‌ها در تحمل به دماهای پایین است. بین دمای  $LT_{50}$  ساقه با محتوای نسبی آب در آبان و دی‌ماه همبستگی مثبتی در سطح ۱٪ وجود داشت. هر چه ساقه آب میان بافتی کمتری داشت، در دمای کمتری به نقطه  $LT_{50}$  رسید. همچنین در آبان و دی‌ماه نقطه اگزوترم اول که بیانگر دمای یخ زدن آب بین یاخته‌ای است در سطح ۱٪ همبستگی مثبتی با  $LT_{50}$  داشت (جدول ۳). همچنین Mills و همکاران (۳۱) گزارش داد که بین نقطه اگزوترم و مرگ بافت‌های شاخه و جوانه درختان میوه خزان دار همبستگی بالایی وجود دارد. البته برخی از پژوهشگران مانند Ali Khan (۱) رابطه چندان بین  $LT_{50}$  و اگزوترم اول پیدا نکردند. افزون براین، Ghasemi Soluklui و همکاران (۱۶) گزارش کردند که در تمام مراحل ارزیابی (آبان، دی و اسفند) همبستگی معنی‌داری بین تحمل به سرما و غلظت پرولین در انار مشاهده شد، بالاترین همبستگی بین پرولین و تحمل به سرما در دی‌ماه مشاهده شد. در اسفندماه بین دمای  $LT_{50}$  و کربوهیدرات‌های محلول، محتوای نسبی آب، درصد ماده خشک و نقطه اگزوترم همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد که عمدتاً به کاهش در مقادیر این شاخص‌ها در گیاهان تیمار شده با پاکلوبوترازول در انتهای فصل رکود مرتبط می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳- همبستگی بین کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، درصد ماده خشک، محتوای نسبی آب و دمای اگزوترم با میزان  $LT_{50}$  ارزیابی شده بر اساس نشت یونی در ساقه بادام فرانسیس طی سه مرحله نمونه‌گیری.

Table 3. Correlation coefficients between soluble carbohydrates, proline, dry matter, RWC and exothermic points in stems of almond 'Ferragnes' with  $LT_{50}$  values, estimated based on electrolyte leakage during tree sampling dates.

| اسفند $LT_{50}$<br>March | دی $LT_{50}$<br>January | آبان $LT_{50}$<br>November |                                           |
|--------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|
| -0.38 ns                 | -0.88**                 | -0.89 **                   | کربوهیدرات محلول<br>Soluble carbohydrates |
| -0.89 **                 | -0.89**                 | 0.90 **                    | پرولین<br>Proline                         |
| -0.33 ns                 | -0.74**                 | -0.47 *                    | ماده خشک<br>Dry matter                    |
| 0.38 ns                  | 0.64 **                 | 0.71 *                     | محتوای آب نسبی<br>RWC                     |
| 0.40 ns                  | 0.88 **                 | 0.89**                     | اگزوترم<br>Exotherm                       |

ns, \*, \*\*: به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ و ۱٪

ns, \*, \*\*: non significant, significant at  $P \leq 0.05$  or  $0.01$ , respectively.

## نتیجه گیری

پاکلوبوترازول تاثیر معنی‌داری بر افزایش تحمل به سرمای نهال‌های بادام فرانسیس به ویژه در شروع رکود و رکود عمیق داشت. به نظر می‌رسد که این اثرات مثبت در ارتباط با تاثیرات این ترکیب بر افزایش کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، درصد ماده خشک و کاهش محتوای نسبی آب باشد. دمای نقطه اغزوترم اول شاخه‌ها که همزمان با یخ‌زدن آب بین یاخته‌ای است در اثر کاربرد پاکلوبوترازول کاهش چشمگیری یافت. با رسیدن به اواخر دوره رکود تاثیر پاکلوبوترازول بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مرتبط با تحمل به سرما کاهش یافت. بیشترین غلظت کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، درصد ماده خشک و کمترین محتوای نسبی آب و نشت یونی به ترتیب در محلول‌پاشی پاکلوبوترازول با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و سپس ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد که می‌توانند در پژوهش‌های تکمیلی برای افزایش تحمل به سرمای در نهال‌های بادام مورد بررسی بیشتر قرار گیرند.

## References

## منابع

1. Ali Khan, L. 1998. Effects of Growth Regulators on Cold Hardiness of Pecan (*Carya illinoensis*) (Wangen.) at Various Temperatures. Univ. of Mississippi, Mississippi, Ph.D. Diss.
2. Amir Moradi, Sh., and M. Kermani. 2018. Effect of paclobutrazol on some morphological and physiological characteristics of forage maize in drought stress. J. Crop Physiol. 10 (39), 41-60.
3. Andrews, P.K. 1983. Differential thermal analysis and freezing injury of deacclimating peach and sweet cherry reproductive organs. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108: 755-759.
4. Ashraf, M., and M.R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot. 59:206-216.
5. Ashworth, E.N., G.A. Davis., and J.A. Anderson, 1985. Factors affecting ice nucleation in Plant tissu. Plant Physiol. 79:1033-1037.
6. Bates, L.S., R.P. Waldren., and I.D. Teare. 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies. Plant Soil. 39: 205-207.
7. Blanco, A. 1988. Control of shoot growth of peach and nectarine trees with paclobutrazol. J. Hort. Sci. 63(2): 201-207.
8. Coleman, M.D., T.M. Hinckley., G. Mc Naughton., and B.A. Smit. 1992a. Root cold hardiness and native distribution of subalpine conifers. Can. J. Res. 22:932-938.
9. Coleman, W.K., E.N. Estabrooks, M. O'Hara, J. Embleton., and R.R. King. 1992b. Seasonal changes in cold hardiness, sucrose and sorbitol in apple trees treated with plant growth regulators. HortScience, 67:429-435.
10. Colombo, S.J. 1994. Timing of cold temperature exposure affects root and shoot frost hardiness of apple seedling. Scand. J. Res. 9:52-59.
11. Desta, B., and G. Amare. 2021. Paclobutrazol as a plant growth regulator. Chem. Biol. Technol. Agr. 8: 1.
12. FAO. 2020. FAO STAT agricultural statistics database. Retrived from [http:// WWW.fao.org](http://WWW.fao.org).
13. Faust, M. 1987. Phisiology of temprate zone fruit trees. John Wiley and Sons New York: pp:338.
14. Fletcher, R.A., A. Gilley, N. Sankhla, and T.D. Davis. 2000. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. Hort. Rev. 24:55-137.
15. George, M. F., and M. J. Burke. 1977. Cold hardiness and deep supercooling in xylem of shagbark hickory. Plant Physiol. 59:319-325.
16. Ghasemi Soloklui, A.A., A. Ershadi, and E. Fallahi. 2012. Evaluation of cold hardiness in seven Iranian commercial pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. HortScience, 47:1821-1825.
17. Ghasemi Soluklui, A. A., A. Ershadi., Z. E. Tabatabaee., and E. Fallahi. 2014. Paclobutrazol-induced biochemical changes in pomegranate (*Punica granatum* L.) cv. 'Malas Saveh' under freezing stress. Int. J. Hort. Sci. Technol. 1(2): 181-190.
18. Giovinazzo, V. 2000. Paclobutrazol response with processing tomato in France. Acta Hort. 542:460-469.
19. Grish, K., and B.M. Frank. 1998. Effect of ABA and paclobutrazol on cold hardiness of blueberries. HortScience, 4:601-602.
20. GrosPICth, M., M. Lipavaskaand., and J. Optra. 1999. Effect of paclobutrazol on solubulesugers starch content of de nova regeneration potato stem explants. HortScience, 18:187-195.
21. Gusta, L., N.J. Tyler., and T.H. H. Chen. 1982. Deep undercooling in woody taxa growing north of the -40°C isotherm. Plant Physiol. 72: 122-128.
22. Hare, P.D., and W.A. Cress. 2004. Implication of stress induced proline accumulation in plant. Afr. J. Biotechnol. 9(7): 1008-1015.
23. Hong, S., E. Sucoff., O. Lee-stedelmann. 1980. Effect of freezing deep supercooled water on the viability of ray cells. Botanicall Gaz. 141:464-468.
24. Jafari, R., Kh. Manouchehri Kalantari., And Turkzadeh, M. 2007. The effect of paclobutrazol on increasing cold resistance in tomato seedlings. J. Biol. 11 (3): 299-290.
25. Kafi, M., Borzooei, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoomi, A. and Nabati, J. 2009. Physiology of Environmental Stress in Plants. Publications of Mashhad University Jihad Publications. 501 pages. (In Persian).
26. Karimi, R. 2014. Evaluation of the effect of nutrition and abscisic acid on cold resistance of grapes. Doctoral dissertation, Bu Ali Sina University of Hamadan, Iran. (In Persian).

26. Karimi, R., A. Ershadi, A. Rezaeinezhad. and S.Khanizadeh. 2016. Absciscic acid alleviates the deleterious effects of cold stress on 'Sultana' grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants by improving the anti-oxidant activity and photosynthetic capacity of leaves. J. Hort. Sci. Biotechnol. 91: 386-395.
27. Khoshkhui, M., Rohani., And A. Tafzali. 2007. Principles of Horticulture. Shiraz University Press. 566 pages. (In Persian).
28. Malyshev A.V., I. Beil and J. Kreyling. 2020. Differential Thermal Analysis: A Fast Alternative to Frost Tolerance Measurements. Methods Mol Biol. 2156:23-31.
29. Mancuso, F. 2000. Differential thermal analysis super cooling and cell viability in organs of olea. Adv. Hort Sci. 14:23-27.
30. Meiering, A.G., J.H. Paroschy., and A. Neff. 1980. Mechanical freezing injury Grapevine trunks. Amer. J. Enol. Viti. 81-89.
31. Mills, L.J., C. Fregusen., and M. Keller. 2006. Cold hardiness evaluation of grape buds and cane tissue. Am j. Enol. Vitic. 57:194-200.
32. Mir Mohammadi M, S. Ali and Torkesh, S. 2005. Physiological and breeding aspects of cold stress and freezing of crops. Jihad University Press, Isfahan Industrial Branch. 324 pages. (In Persian).
33. Moradi S., B. Baninasab., M.Gholami. and C.Ghobadi. 2017. Paclobutrazol application enhances antioxidant enzyme activities in pomegranate plants affected by cold stress. J. Hort. Sci. Biotechnol. 92(1): 65-71.
34. Pakkish, z., and M. Rahemi. 2009. Evaluation of cold hardiness physical and biochemical changes, during endodormancy of pistachio cultivar. Hort. Sci. 15:153-159.
35. Pakone1, T., E. Laine., K. Havas., P. Lhdesma., and P. Ki. 1991. How do seasonal changes in carbohydrate concentrations in tissues of the blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) reflect carbon resource allocation patterns? Acta Oecol. 12: 249-259.
36. Palonen, P., D. Buszard., and D. Donnelly. 2000. Changes in carbohydrates and freezin. during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. Plant Physiol. 110:393-401.
37. Paull, R.E. 1981. Temperature induced leakage from chilling sensitive and chilling plant. Plant Physio. 68:149-153.
38. Probsting, E.L., and H.H. Mills. 1985. Cold resistance in peach, apricot, and cherry as influenced by soil applied paclobutrazol. Hort. Sci. 20: 88-90.
39. Qasemi, A., H. Izadi Najafabadi and. Masoumi Far. 2009. Almond cultivation. First Edition. Agricultural Education and Extension Publications. 318 pages. (In Persian).
40. Quinlan, J.D., and Richardson, A.D. 1982. Effect of the growth retardant PP333 on the growth of plumes and Cherrie. Hort. Sci. 99:464-466.
41. Rahnemon R., and J. Dejampour. 2020. Familiarity with the characteristics and climatic needs of late flowering almond cultivars (tolerant of late spring cold). Publication of education (Institute of Agricultural Education and Extension). (In Persian).
42. Ramin, A. A. 2009. Improving germination performance and chilling tolerance in cucumber with paclobutrazol. J. Veg. Sci. 15:173-184.
43. Rosa, R. D., and L. Rallo., 2000. Olive flora bud growth and starch content during winter rest and spring bud-break. HortScience, 35(7):1223-1227.
44. Saleh, A. A. 2007. Amelioration of chilling injuries in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings by paclobutrazol, absciscic acid and hydrogen peroxide. Am. J. Plant Physiol. 2(6): 318-332
45. Sanker, B., C.A.Jaleel, and P. Manivannan. 2007. Effect of paclobutrazole on water stress amelioration through antioxidant and free radical scavenging enzymes in (*Arachis hypogaea* L.). Colloids Surf. B. 60, 229-235.
46. Sasaki, T. 1996. Studies on germination ability under low temperature condition of rice varieties. Kamikawa Agr.. 24:1-90.
47. Setia, R.C., Curnet., and N. Setia. 1995. Influence of paclobutrazol on growth and yield of Brassica Carnita. Plant Growth Regul. 16:121-127.
48. Shao, H.B., B. Li, B.C. Wang, K.E. Tang., and Y.I. Liang. 2008. A study on differentially expressed gene screening of chrysanthemum plants under sound stress. CR. Biol. 331:329-333.
49. Sharifi, E., M. Ghorbani Javid and F. Talebi. 2015. Investigation of breeding routes for frost resistance in crops and orchards approach toward a green economy. Quarterly J. Agr. Engin. Nat. Res. 47 (Spring). (In Persian).
50. Tafazoli, E., and C. Beyl. 1993. Changes in endogenous absciscic acid and cold hardiness in *Actinidia* treated with triazole growth retardants. Plant Growth Regul. 12:79-83.
51. Tehranifar, A., M. Kazemi, and M. Justice. 1998. Almond cultivation. Publications University of Mashhad. 31 pages. (In Persian).
52. Teutonica, R. A., J.P. Palta., and T. C. Osborn. 1993. In vitro freezing tolerance in relation to winter survival of rapeseed cultivars. Crop Sci. 33:103-107.
53. Wang, S.Y., G.L. Steffens., and M. Faust. 1986. Effect of paclobutrazol on acclimation of carbohydrates in apple wood. HortScience, 22:276-278.
54. Wanner, L.A., and O. Junttila. 1999. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 120:391-399.
55. Yang, x., and J. B. Jian. 2010. Study on cold hardiness testing of ginkgo biloba by electrical conductivity. J. Shan Agr. Sci. 3:94-98.
56. Zhu, W. and X. Haifu. 2004. Effect of mixtazol and paclobutrazol on photosynthesis and yield of rape. J. Plant Growth Regul. 14:37-40.



## Effect of Foliar Application of Paclobutrazol on Freezing Tolerance of Almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnes) Plants

A. Darabi Hydar Abadi, A. Ershadi\*, A.A. Ghasemi-Soloklui<sup>1</sup>

Protecting young seedlings from frost damage is an important issue for newly established orchards and nurseries. Paclobutrazol (PBZ) is a plant growth inhibitor that can alleviate some damage caused by environmental stresses. In this study, the effect of PBZ on cold tolerance of almond (*Prunus dulcis*) saplings of cultivar 'Ferragnes' was investigated. The research was conducted in a randomized complete block design, and treatment consisted of five concentrations of 0 (control), 125, 250, 500 and 1000 mg/l of Cultar (containing 250 grams per liter of PBZ) sprayed on one-year-old almond saplings in September. Stem and bud samples were collected on November 11, March 10, and January 10; and January 15 and March 15, respectively. Stem and bud samples were subjected to low temperatures (0, -5, -10, -15, -20, and -25 degrees Celsius), then exothermic point and electrolyte leakage were evaluated. Application of PBZ, especially at concentration of 500 mg/l, increased free proline, soluble carbohydrates and dry matter, but decreased relative water content and electrolyte leakage. In January, the first exothermic point was on average 4 °C lower in the samples treated with 500 mg/l PBZ than in the control. Considering LT<sub>50</sub> temperatures, saplings treated with 500 mg/l PBZ showed 5 °C higher winter hardiness than control plants. The results indicate that PBZ effectively reduces winter frost-induced damage to almond saplings.

**Keywords:** Exothermic point, Proline, Soluble carbohydrates, Electrolyte leakage.

1. Graduated M.Sc. Student and Associate Professor of Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran and Assistant Professor of Department of Plant Breeding, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran, Karaj, Iran, respectively.

\* Corresponding Author, Email: (Ershadi@basu.ac.ir)