فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد بیستم/ شمارهٔ اول/ صفحات ۲۰۹-۱۹۳/ بهار و تابستان ۹۹
DOI: 10.22084/ppt.2020.19704.1938

تحمل به تنش یخبندان ژنوتیپ‌های مرکبات تحت دو دمای زیر انجماد

Frost Stress Tolerance in Citrus Genotypes under Two Subfreezing Temperatures

ابوذر ابوذری[۱]، محمود سلوکی[۲]، بهروز گلعین[۳]*، براتعلی فاخری[۴] و عاطفه صبوری[۵]

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۲۰

چکیده

اکثر گیاهان خانواده مرکبات درختانی حساس به یخبندان می‌باشند که وقوع اجتناب‌ناپذیر یخبندان‌های دوره‌ای، خسارات وسیعی بر عملکرد آن‌ها به‌جا می‌گذارد. به‌منظور مقایسه ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات در واکنش به دو سطح تنش سرمایی (۳°C- و ۶°C-)، تعداد ۷۶ ژنوتیپ طبیعی ناشناخته و ۳۴ ژنوتیپ شناخته‌شده در آزمایش اسپلیت‌پلات در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار در پژوهشکده تحقیقات مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری رامسر مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس برای هشت صفت مرتبط با تحمل به سرما نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین افراد جمعیت مورد مطالعه وجود داشت. بیش‌ترین مقدار صفت نشت‌یونی (۵۵/۸۴ درصد)، آب گزیدگی (۲/۷۰) و پراکسیداسیون لیپیدها (۲/۱۲ میکروگرم در گرم وزن‌تر برگ) در دمای ۶°C- برآورد گردید. بر اساس تجزیه خوشه‌ای و هم‌گروهی ژنوتیپ‌ها، میزان قرابت ژنوتیپ‌های مجموعه موردمطالعه از جنبه صفات مرتبط با تحمل تنش سرما مشخص شد. بالاترین همبستگی مثبت معنی‌دار در سطح یک درصد، بین دو صفت نشت‌یونی و آب‌گزیدگی برگ مشاهده شد (r =۰/۹۷). در بین بیوتیپ‌های ناشناخته، فقط نمونه‌های G32 و G71 ارزشی نزدیک به ژنوتیپ‌های متحمل شناخته شده نشان دادند. همچنین ژنوتیپ‌های پونسیروس، سیترومله، نارنج اف‌تایپ، نارنج معمولی و ارقام نارنگی اونشو و اکیتسو که انحراف از میانگین کل استانداردشده منفی قابل توجه برای صفات نشت‌یونی (۱/۳۶۷-)، آب‌گزیدگی برگ (۱/۴۲۳-) و پراکسیداسیون لیپیدها (۰/۶۸۴-)، داشتند، واجد انحراف از میانگین کل استاندارد شده مثبت برای سایر صفات مطلوب (محتوای پرولین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، کربوهیدرات‌های کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) بودند، لذا این ژنوتیپ‌ها جهت استفاده در برنامه‌های به‌نژادی تحمل به سرما می‌توانند بسیار ارزشمند باشند.

واژه‌های کلیدی: مرکبات، تحمل به سرما، تنش سرما، صفات فیزیولوژیک، ژنوتیپ‌های ناشناخته

۱، ۲ و ۴. به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استادان، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳. دانشیار، پژوهشکده تحقیقات مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری رامسر، رامسر، ایران
۵. استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
*: نویسنده مسئول Email: b.golein@areo.ir

مقدمه

در ایران کشت انواع مرکبات در بیش از ۱۱ استان رایج است و بر اساس آمار منتشره فائو در سال ۲۰۱۶، ایران در بین ۱۲۵ کشور تولیدکننده مرکبات، دارای جایگاه هشتم بوده و سالانه میزان تولیدی معادل۳/۵ میلیون تن را دارا می‌باشد (سالنامه کشاورزی فائو، 2016). با توجه به این‌که مرکبات گیاهی همیشه سبز و نیمه گرمسیری است لذا تنش دمای پایین همواره یکی از عوامل محدودکننده کشت و تولید این گیاهان بشمار می آید (*اندو*[1] و همکاران، 2017؛ *ویسنته*[2] و همکاران، 2013). در ایران نیز وقوع اجتناب‌ناپذیر یخبندان‌های دوره‌ای و تنش سرما بالأخص در سال‌های اخیر (۱۳۸۶، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۵) خسارات و محدودیت‌های وسیعی بر عملکرد و گسترش منطقه کشت مرکبات به‌ویژه در استان‌های شمال کشور بالاخص گلستان و مازندران به‌جا گذاشته است. مطالعه تنش یخبندان در مرکبات موضوع پژوهش‌های متعددی بوده است (*تاجور*[3] و همکاران، 2011؛ *قزوینی*[4] و همکاران، 2008). پیش از این گزارش شد که بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش تحمل به سرما در میوه نارنگی همبستگی وجود دارد (*سالا*[5] و همکاران، 2000). هم‌چنین در مطالعه اثر تنش سرما بر مرکبات گزارش گردید که در مکزیکن لایم به میزان چهار تا هفت برابر نسبت به ارقام مقاوم شاهد، بر میزان نشت یونی افزوده شده است (*فتوحی*[6] و همکاران، 2008). مجموعه ژرم‌پلاسم مرکبات پژوهشکده تحقیقات مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری رامسر یکی از مهم‌ترین منابع ژرم‌پلاسم مرکبات در ایران می‌باشد. بخش زیادی از نمونه‌های این مجموعه را ژنوتیپ‌هایی طبیعی تشکیل می‌دهند که پاسخ‌های متفاوتی به تنش‌های سرمایی نشان داده اند. ازآنجاکه همواره امکان یافتن ژنوتیپ‌هایی با ارزش به‌نژادی بالا در بین ژنوتیپ‌های طبیعی ناشناخته وجود دارد، لذا پژوهش حاضر به‌منظور تعیین پتانسیل ژنومی این مجموعه با تأکید بر برآورد روابط خویشاوندی بین ژنوتیپ‌های این کلکسیون با استفاده از برآیند هشت صفت مرتبط با تحمل یخبندان و نیز ارزیابی صفات مختلف فیزیولوزیکی به تنش یخبندان در ژنوتیپ‌های مختلف مرکبات، طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی موردبررسی، تعداد ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات مشتمل بر ۷۶ ژنوتیپ طبیعی ناشناخته و ۳۴ ژنوتیپ از ارقام رایج مرکبات (جدول ۱) از ذخایر ژرم‌پلاسم پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری انتخاب شدند. این آزمایش به‌صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار همراه با ارزیابی هشت صفت مرتبط به تنش سرما انجام شد. در این طرح، تنش دمای پایین در دو سطح $-3^{\circ}C$ و $-6^{\circ}C$ به‌عنوان فاکتور اصلی و ۱۱۰ ژنوتیپ به‌عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شدند. بدین‌منظور در نیمه دوم دی‌ماه زمستان ۱۳۹۵ از ۱۰۸ ژنوتیپ مرکبات (جدول ۱) به همراه دو رقم شاهد متحمل پونسیروس (G103) و حساس به دمای پایین مکزیکن لایم (G109)، شاخه‌های یک‌ساله دارای برگ و به طول ۳۰ سانتی‌متر تهیه گردید. شاخه‌های انتخابی درون دستگاه فریزر ترموگرادیان (مدل Lin Tek ساخت آلمان) تحت تیمار دمایی موردنظر قرار گرفتند. کاهش دمای دستگاه یک درجه سلسیوس در هر ساعت تنظیم گردید که پس از رسیدن به هر تیمار دمایی، نمونه‌ها به‌مدت ۸ ساعت در دماهای ذکرشده نگهداری و سپس برای اندازه‌گیری صفات مورد تحقیق استفاده شدند. از هر شاخه، ۱۵ نمونه برگی برای ارزیابی صفات تهیه گردید. صفت نشت‌یونی (EL) بر اساس روش *مولا*[7] و همکاران (2006) ارزیابی شد. صفت آب گزیدگی برگ (WS) بر اساس روش پیشنهادی *وونگشری*[8] و همکاران (2009) محاسبه گردید. برای سنجش سایر صفات از نمونه برگ تثبیت‌شده در ازت مایع استفاده گردید. تعیین محتوای پرولین[9] (PC) بر اساس روش پیشنهادی *باتز*[10] و همکاران (1973) انجام شد.

تعیین غلظت مالون‌دآلدئید[11] (MDA) (به‌عنوان معیاری برای پراکسیداسیون لیپیدها) با استفاده از تیوباربیوتریک اسید[12] (TBA) در حضور تری‌کلرواستیک اسید[13] (TCA) انجام شد. در کمپلکس رنگی حاصل (MDA-TBA)، میزان جذب مالون‌دآلدئید به‌عنوان محصول دوم واکنش پراکسیداسیون لیپیدها در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر ثبت شد(*سیبوزا* و *برتلینگ*[14]، 2013). در این پژوهش جهت ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی[15] (AC) از روش مبتنی بر سنجش ۱ و ۱- دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید. اساس این روش بر مبنای

1. Endo
2. Vicente
3. Tajvar
4. Ghazvini
5. Sala
6. Fotouhi
7. Mollá
8. Wongsheree
9. Proline content (PC)
10. Bates
11. Malondialdehyde (MDA)
12. Thiobarbituric Acid (TBA)
13. Trichloroacetic Acid (TCA)
14. Siboza and Bertling
15. Antioxidant Capacity (AC)

احیای رادیکال آزاد DPPH به‌وسیله آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره نمونه در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد موجود در محیط و تبدیل آن به DPPH2[1] می‌باشد که میزان آن در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد (*علام*[2] و همکاران، 2013؛ *پریویسی*[3] و همکاران، 2013). اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول کل[4] (TC) بر طبق روش فنل- سولفوریک اسید انجام شد (*دوبویس*[5] و همکاران، 1956). درنهایت میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز[6] (SOD) و آسکوربات پراکسیداز[7] (APX) به‌ترتیب بر اساس روش پیشنهادی *وو*[8] و همکاران (2006) و *ریواس*[9] و همکاران (2008) برآورد شد. پس از آزمون برقراری مفروضات نرمال بودن توزیع خطاهای آزمایشی و یکنواختی واریانس خطاهای آزمایشی، تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS Ver.9.3 انجام شد. پس از مقایسه نتایج حاصل از روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای و ضرایب تشابه مختلف برای هریک از دماها به کمک نرم‌افزار SPSS Ver.25، در نهایت روش دورترین همسایه‌ها بر مبنای مربع فاصله اقلیدسی به‌دلیل ارائه دندروگرام مناسب (بدون زنجیره‌ای شدن)، همبستگی کوفنتیک بالاتر و به‌خصوص گروه بندی مناسب و مطابق با صفات مورفولوژیک و اطلاعات موجود از ارقام شاهد، انتخاب شد. از همین نرم‌افزار برای انجام تجزیه تابع تشخیص[10] به روش رگرسیون گام‌به‌گام به‌منظور تعیین صحت نقطه برش نمودار درختی و محاسبه همبستگی بین صفات بر اساس ضریب همبستگی پیرسون، استفاده گردید. برای تعیین میزان تأثیر هریک از صفات در تفکیک گروه‌ها و تمایز خوشه‌ها، میانگین هر صفت و انحراف از میانگین کل همان صفت، محاسبه شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس در قالب آزمایش اسپلیت‌پلات برای هشت صفت موردبررسی در جدول ۲ ارائه شده است. بر این اساس، اثر تیمار ژنوتیپ از جنبه تمامی صفات موردمطالعه معنی‌دار بوده که نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین افراد جمعیت مورد ارزیابی است. معنی‌دار بودن اثرات متقابل ژنوتیپ × دما در سطح یک درصد ($P\leq0.01$) برای تمامی صفات مورد ارزیابی به‌جزء APX، نشان‌دهنده وجود تنوع بالا در بین ژنوتیپ‌ها از جنبه پاسخ به دماهای مختلف تنش بود. لذا از جنبه آماری مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها باید پس از انجام برش دهی در هر دما به‌صورت جداگانه صورت پذیرد. لذا منطبق بر فرض اولیه پژوهش، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در هر دما به‌طور مجزا انجام شد.

گروه‌بندی و ارزیابی ژنوتیپ‌ها در تنش ۳°C-

نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از روش دورترین همسایه و ماتریس فاصله بر اساس مربع فاصله اقلیدسی در شکل ۱ نشان داده شده است. برای تعیین بهترین نقطه برش نمودار درختی از تجزیه تابع تشخیص استفاده شد. از بین دو مکان برش که به‌ترتیب ۶ و ۹ گروه ایجاد می نمودند آماره لاندا ویلک به‌ترتیب ۰/۳۲۱ و ۰/۵۳۲ به دست آمد که هر دو در سطح یک درصد معنی‌دار بود. از بین این دو، حالتی که شش گروه ایجاد می‌کرد و از لاندای ویلک کم‌تری برخوردار بود انتخاب شد. با این تقسیم‌بندی بیش‌ترین تعداد ژنوتیپ‌ها به‌ترتیب در دو گروه اول و دوم دسته‌بندی شدند و در ادامه با درنظر گرفتن ماهیت ژنوتیپ‌ها و به‌منظور حصول نتایج دقیق و ارزیابی جزئی‌تر از خصوصیات ارقام و ژنوتیپ‌های هر خوشه، گروه اول و دوم به دو زیرگروه متمایز تفکیک شدند. با این تقسیم‌بندی، زیرگروه ۱-۱ با ۳۸ عضو برای سه صفت شاخص تخریب دارای ارزش کم‌تر از میانگین و در نتیجه انحراف منفی داشتند. بر اساس نتایج مندرج در جدول ۴ ملاحظه می‌شود که بسیاری از ژنوتیپ‌های شاهد نارنگی و پرتقال به‌همراه ۲۲ ژنوتیپ طبیعی ناشناخته در این زیرگروه دسته‌بندی شدند.

در این زیرگروه با مقایسه میزان انحراف از میانگین کل استانداردشده صفات مختلف می‌توان دریافت که نقطه قوت این گروه مربوط به صفات EL، WS و LP است که دارای انحراف استاندارد منفی و کم‌تر از میانگین کل می‌باشند. از سویی، دیگر برای سایر صفات به‌جزء APX دارای ارزشی بالاتر از میانگین کل بود که می‌تواند به‌نوعی بر تحمل نسبتاً خوب اعضای این گروه در برابر افزایش میزان تنش به ۳°C- دلالت داشته باشد. هیچ‌یک از ۱۳ ژنوتیپ موجود در زیرگروه ۱-۲ با نمونه‌های شاهد مورداستفاده، از جنبه صفات و دمای تنش ۳°C- قرابت نشان ندادند. در این زیرگروه نیز منفی بودن ارزش انحراف از میانگین کل استاندارد شده برای صفات مرتبط با تخریب سلولی، بیانگر تحمل نسبتاً خوب اعضای این گروه در مواجه با تنش ۳°C- می‌باشد. در زیرگروه ۲-۱ رقم شاهد گریپ‌فروت (G91) به‌همراه ۱۱ ژنوتیپ ناشناخته گروه‌بندی

1. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazine
2. Alam
3. Prevc
4. Total Soluble Carbohydrates (TC)
5. Dubois
6. Superoxide Dismutase Activity (SOD)
7. Ascorbate Peroxidase Activity (APX)
8. Wu
9. Rivas
10. Discriminant Function Analysis

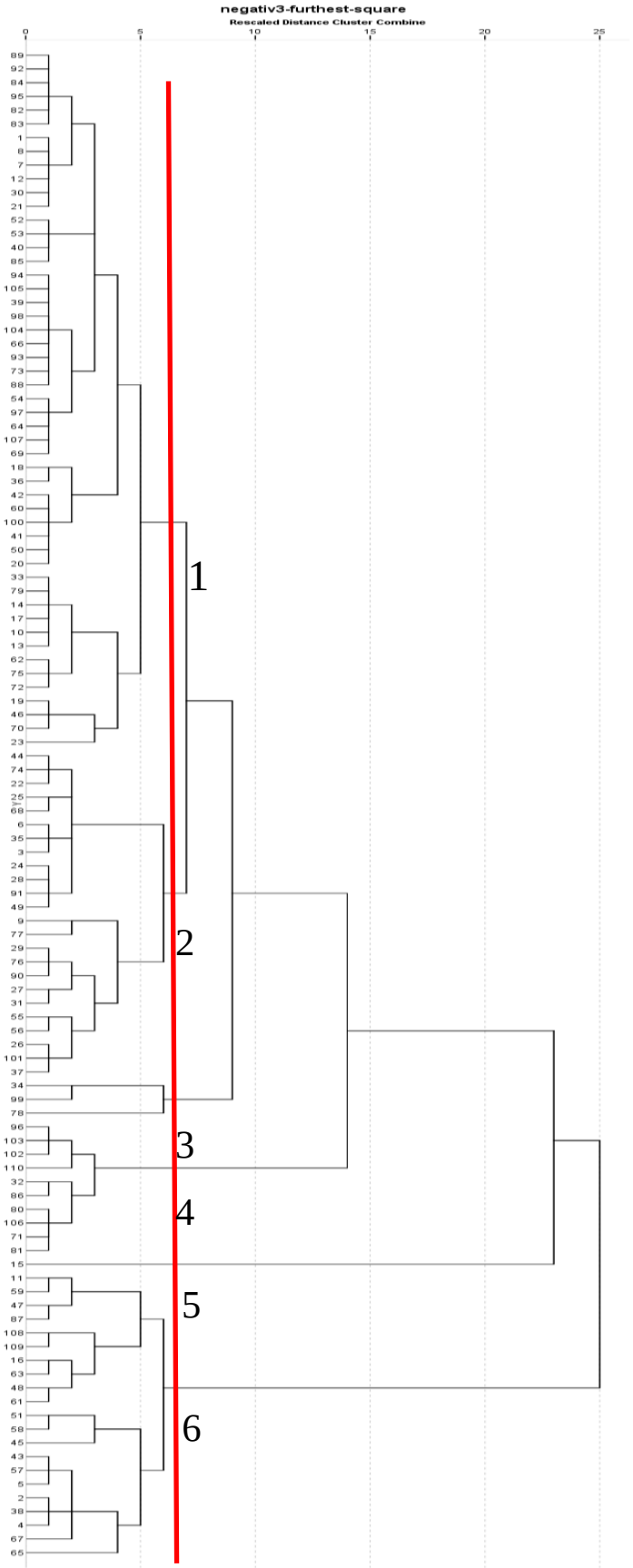
شدند. این زیرگروه برای صفات EL، PC، AC، TC، SOD و APX دارای ارزشی کم‌تر از میانگین کل بود و برای WS و LP ارزشی بیش‌تر از میانگین کل برای آن‌ها برآورد شد. در مقابل در زیرگروه ۲-۲، انحراف از میانگین کل استانداردشده برای سه صفت EL، WS و LP منفی بود که بیانگر کارآیی بهتر این زیرگروه نسبت به زیرگروه ۲-۱ می‌باشد. از سویی دیگر مقادیر مثبت انحراف از میانگین استاندارد شده برای دیگر صفات به‌جز APX، به‌عنوان نقطه قوت و امتیاز مثبت اعضای این مجموعه به‌شمار می‌آید.

در گروه سوم، رقم والنسیا (G99) و پوملو (G78) به‌همراه ژنوتیپ ناشناخته G34 دسته‌بندی شدند. هرچند در این گروه واکنش گیاه در افزایش PC و آنزیم‌های SOD و APX قابل‌توجه بود ولی محاسبه مقادیر مثبت انحراف از میانگین برای سه صفت شاخص تخریب سلولی می‌تواند بیانگر حساسیت اعضای این گروه و عملکرد ضعیف آن‌ها در مواجه با افزایش شدت تنش به ۳°C- باشد. می‌توان گفت که باوجود انحراف مثبت عوامل القاءکننده مقاومت، تأخیر در بروز این عوامل سبب می‌گردد تا آسیب‌های برگشت‌ناپذیر تخریب غشای سلولی موجب مرگ سلول شوند. ژنوتیپ‌های رایج متحمل به سرما یعنی پونسیروس (G103)، سیترومیلو که یکی از هیبریدهای پونسیروس می‌باشد (G106)، نارنگی اونشو (G96)، نارنگی اکیتسو (G102) که به‌واسطه رابطه والدی با اونشو، رقمی متحمل به سرما است، نارنج اف‌تایپ (G110) و نارنج معمولی (G86) به همراه کلئوپاترا (G80)، دنسی (G81) و ژنوتیپ‌های ناشناخته طبیعی G71 و G32 در گروه چهارم دسته‌بندی شدند. این گروه فقط با داشتن ده عضو برای صفات مرتبط با شدت خسارت سلولی ارزش‌های به‌نژادی بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها کسب نمود و دارای انحراف منفی از میانگین کل استاندارد شده برای صفات نشت یونی، آب گزیدگی برگ و پراکسیداسیون لیپیدها (به‌ترتیب ۰/۸۷۲، ۱/۰۴۱- و ۰/۸۹۷-) بود. هم‌چنین انحراف مثبت بالایی برای دیگر صفات القاءکننده تحمل به سرما در این گروه به ثبت رسید، به‌گونه‌ای‌که در مقایسه با دیگر گروه‌ها، دارای مقادیر بیش‌تری از میانگین کل برای صفات PC، AC و TC بود؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت این گروه شامل متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها نسبت به تنش در دمای ۳°C- بوده است. می‌توان این‌گونه استدلال نمود که نتایج حاصل از هم‌گروهی این ژنوتیپ‌ها در گروه متحمل به تنش یخبندان تا حدود زیادی متأثر از اشتراک بخش‌هایی از ریخته ژنتیکی به‌علت داشتن والد یا والدین مشترک می‌باشد. خوشه پنجم فقط شامل ژنوتیپ G15 بود. این ژنوتیپ از جنبه شاخص‌های میزان خسارت در حد مطلوبی قرار داشت لیکن برای صفت WS مقدار انحراف از میانگین کل استانداردشده، ناچیز بوده که نشان‌دهنده نزدیکی ارزش این صفت به میانگین کل می‌باشد. علاوه‌بر آن این ژنوتیپ هرچند برای صفات القاء تحمل نظیر PC، TC و آنزیم APX دارای مقادیر بیش‌تر از میانگین بود، لیکن برای دو صفت AC و SOD ارزش کم‌تری نسبت به سایر ژنوتیپ‌های مقاوم نشان داد. باتوجه به نتایج جدول ۴ می‌توان ملاحظه نمود که حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها در گروه ششم دسته‌بندی شدند. وجود ژنوتیپ‌های شاهد حساس مکزیکن‌لایم (G109) و دیگر ژنوتیپ‌های لیموشیرین (G87) و پرشین‌لایم (G108)، بیانگر حساسیت ژنوتیپ‌های ناشناخته هم‌گروه نسبت به تنش سرمایی می‌باشد (*فزوینی* و همکاران، 2008).

گروه‌بندی و ارزیابی ژنوتیپ‌ها در تنش ۶°C-

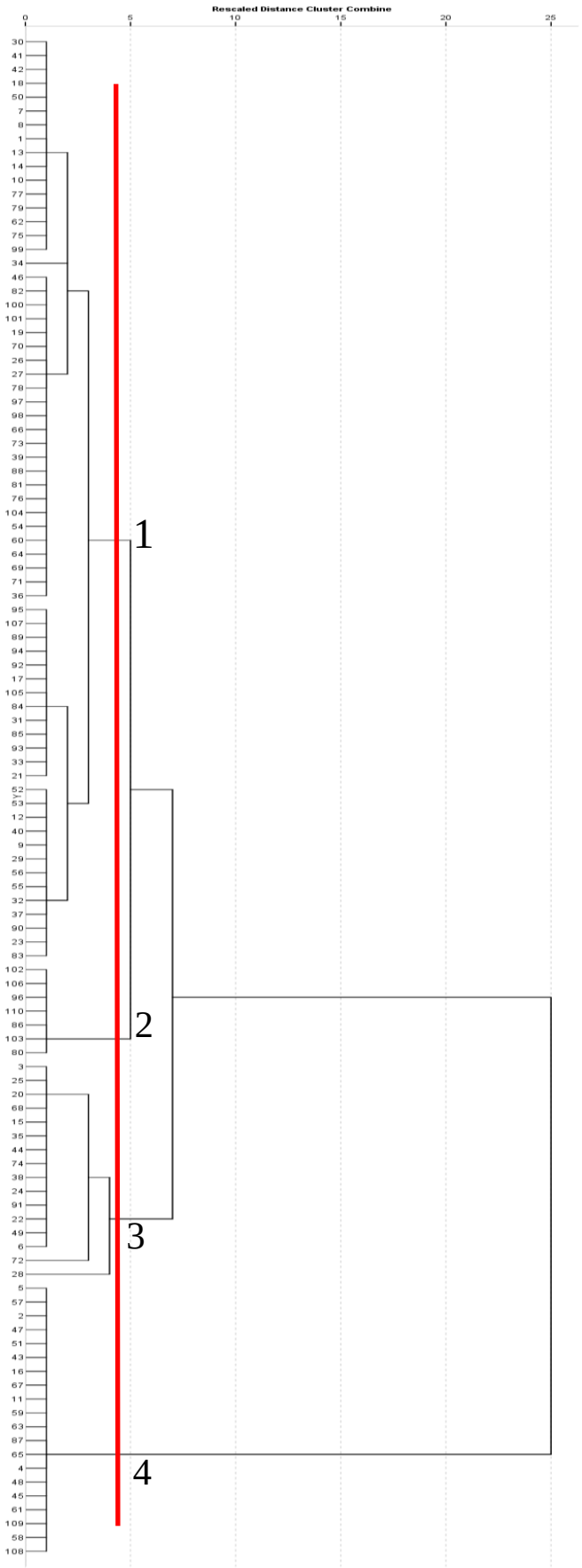
نتایج تجزیه خوشه‌ای ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات در شرایط تنش دمایی ۶°C- به‌صورت نمودار درختی در شکل ۲ آورده شده است. باتوجه به مقدار آماره لاندای ویلک نقطه برش با ایجاد چهار گروه، در سطح معنی‌دار یک درصد انتخاب گردید ($P<0.01$). می‌توان گفت با افزایش شدت تنش به ۶°C- خسارت شدید به ساختار سلولی و عدم‌امکان بروز ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های فعال در القای تحمل به تنش سبب شد تا تنوع کم‌تری از جنبه مقاومت و تحمل در بین اکثر ژنوتیپ‌ها مشاهده‌شده و گروه‌بندی نمونه‌ها صرفاً در چهار گروه خلاصه گردد. با این خوشه‌بندی گروه اول با ۶۷ عضو به‌عنوان بزرگ‌ترین گروه، برای بررسی دقیق‌تر مشخصات ژنوتیپ‌ها به دو زیرگروه تقسیم شد. نتایج حاصل از جدول ۵ نشان داد که در زیرگروه ۱-۱ با ۴۱ عضو، گونه‌های اصلی مرکبات یعنی سیترون (G76)، پوملو (G78) و ارقام نارنگی و پرتقال (G88, G80, G81, G97, G98, G99, G100, G101, G104) به‌همراه ۲۹ ژنوتیپ طبیعی ناشناخته که اکثراً ازنظر شکل ظاهری به پرتقال شباهت داشتند (جدول تکمیلی ۱)، برای سه صفت شاخص تخریب، دارای انحراف از میانگین کل استانداردشده منفی بودند.

زیرگروه ۱-۲ با ۲۶ عضو در مقایسه با زیرگروه اول هرچند از جنبه شاخص‌های تخریب سلولی از مطلوبیت بیش‌تری برخوردار بود و انحراف منفی بیش‌تری از میانگین کل برای آن به ثبت رسید. با دقت در جدول ۵ ملاحظه می‌شود که رقم سیاورز ۱ (G82) و سیاورز ۲ (G94) باوجود شباهت مورفولوژی زیاد و گروه‌بندی در یک گروه، ولی در دو زیرگروه جداگانه قرار گرفتند (جدول تکمیلی ۱).



شکل ۱: نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات بر اساس هشت صفت مرتبط با تحمل سرما تحت دمای تنش ۳°C-. شماره ارقام در جدول ۱ آورده شده است

Fig. 1: Dendrogram for cluster analysis for 110 citrus genotypes based on eight traits related to cold tolerance under stress temperature of -3°C. The number of accessions is shown in Table 1



شکل ۲: نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات بر اساس هشت صفت مرتبط با تحمل سرما تحت دمای تنش ۶°C-. شماره ارقام در جدول ۱ آورده شده است

Fig. 2: Dendrogram for cluster analysis for 110 citrus genotypes based on eight traits related to cold tolerance under stress temperature of -6°C. The number of accessions is shown in Table 1

جدول ۱: مواد گیاهی مورداستفاده در این پژوهش

Table 1: Plant materials used in the present study

نام عمومی Common name		نام علمی Scientific name	کد نمونه Accessioncode	نام عمومی Common name		نام علمی Scientific name	کد نمونه Accessioncode
Thomson navel orange	تامسون ناول	*C. sinensis* (L.) Osbeck	G93	Unknown	نامشخص	*Citrus* spp	G1-G75
Siavaraz 2	سیاورز ۲	*C. sinensis* (L.) Osbeck	G94	Citron	سیترون	*C. medica* (L.) Osbeck	G76
Moallemkoh	معلم‌کوه	*C. sinensis* (L.) Osbeck	G95	Eureka lemon	لمون اروکا	*C. limon* (L.) Burm. f.	G77
Satsuma mandarin	اونشو	*C. unshiu* Marcovitch	G96	Pummelo	پوملو	*C. grandis* (L.) Osbeck	G78
Page mandarin	پیج	Minneola tangelo × *C. clementina*	G97	Unknown	نامشخص	*Citrus* spp	G79
Khorram	خرم	*C. reticulata* × *C. sinensis*	G98	Cleopatra	کلئوپاترا	*C. reshni* Tanaka	G80
Valencia orange	والنسیا	*C. sinensis* (L.) Osbeck.	G99	Dancy mandarin	دنسی	*C. reticulata* Blanco	G81
Jahangir	جهانگیر	*C. reticulata* × *C. sinensis*	G100	Siavaraz 1	سیاورز ۱	*C. sinensis* (L.) Osbeck	G82
Noshin	نوشین	*C. reticulata* × *C. sinensis*	G101	Chinotto	نارنج خوشه‌ای	*C. myrtifolia* (L.) Rafinesque	G83
Okitsu	اکیتسو	*C. unshiu* Marcovitch	G102	Sanguine	سانگین	*C. sinensis* (L.) Osbeck	G84
Trifoliate orange	نارنج سه برگ	*Poncirus trifoliate* (L.) Rafinesque	G103	Shelmahaleh	شل‌محله	*C. reticulate* Blanco	G85
Shahin	شاهین	*C. reticulata* × *C. sinensis*	G104	Sour orange	نارنج	*C. aurantium* L.	G86
Marisol clementine	ماریسول	*C. clementina* Tanaka	G105	Sweet lime	لیموشیرین	*C. limettioides* Tanaka	G87
Citrumelo	سیترواملو	*C. paradisi* × *P. trifoliata*	G106	Clementine	کلمانتین	*C. reticulata* Blanco	G88
Yashar	یاشار	*(C. paradisi* × *C. reticulata)* × *C. changsha*	G107	Sanguinella	سانگینلا	*C. sinensis* (L.) Osbeck	G89
Persian lime	پرشین‌لایم	*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka	G108	Duncan grapefruit	گریپ‌فروت	*C. paradise* Macfadyen	G90
Mexican lime	مکزیکن‌لایم	*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle	G109	Marsh grapefruit	گریپ‌فروت	*C. paradise* Macfadyen	G91
Off type sour orange	نارنج اف‌تایپ	*C. aurantium* L.	G110	Gross sanguine	گروس‌سانگین	*C. sinensis* (L.) Osbeck	G92

جدول ۲: تجزیه واریانس هشت صفت مرتبط با تحمل به تنش یخبندان بر اساس طرح اسپلیت پلات در قالب طرح کاملاً تصادفی

Table 2: Analysis of variance for eight traits related to cold tolerance based on split-plot design as CRD

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares							
		EL (%)	WS (rank)	PC (mg/g leaf fresh weight)	LP (µg/g leaf fresh weight)	AC (%)	TC (mg/ g leaf fresh weight)	SOD (enzymatic unit/ g fresh leaf)	APX (enzymatic unit/ g fresh leaf)
دما Temperature	1	207087.29**	110.17**	991.80**	70.638**	956.722**	2570.54**	7744.267**	80.033**
اشتباه اصلی (A) Main-plot error (A)	4	8.25	0.025	26.3398	0.637	47.50	55.87	31.821	3.971
ژنوتیپ Genotype	109	845.09**	3.125**	114.793**	1.803**	296.58**	42.244**	14.069**	0.055**
اثر متقابل دما × ژنوتیپ Temperature × Genotype	109	152.09**	0.154**	1.525**	0.074**	1.209**	1.968**	7.799**	0.007ns
اشتباه فرعی (B) Sub-plot error (B)	436	0.175	0.008	0.021	0.002	0.011	0.024	2.438	0.014
درصد ضریب تغییرات Coefficient of Variation (%)		1.09	4.05	0.69	2.84	0.24	3.7	2.66	2.76

**: معنی‌دار در سطح یک درصد (P≤0.01). ns: عدم معنی‌دار. نشت یونی (EL)، آب‌گزیدگی برگ (WS)، پراکسیداسیون لیپیدها (LP)، محتوای پرولین (PC)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (AC)، کربوهیدرات‌های کل (TC)، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

**: Significant at 0.01 level (P≤0.01). ns: Non- significant. Electrolyte leakage (EL), Water soaking (WS), Proline content (PC), Lipid peroxidation (LP), Antioxidant capacity (AC), Total Carbohydrates (TC), Superoxide dismutase activity (SOD), Ascorbate peroxidase activity (APX)

جدول ۳: آماره‌های تنوع فنوتیپی. میانگین (Mean)، انحراف معیار (SE)، ضریب تنوع (CV٪)، ارزش حداقل (Max)، ارزش حداکثر (Max)، میانگین گروه مقاوم (MTG) و میانگین گروه حساس (MSG) (بر اساس آب‌گزیدگی برگ)

Table 3: Phenotypic diversity statistics. Mean values, Standard error (SE), Coefficient of variation (CV %), Minimum value (Min), Maximum value (Max), Mean of tolerant group (MTG) and Mean of susceptible group (MSG) (based on leaf water soaking)

دما Temperature	-3°C						-6°C					
صفت Trait	Mean ± SE	درصد ضریب تنوع CV (٪)	حداقل Min	حداکثر Max	متوسط گروه مقاوم MTG	متوسط گروه حساس MSG	Mean ± SE	درصد ضریب تنوع CV (٪)	حداقل Min	حداکثر Max	متوسط گروه مقاوم MTG	متوسط گروه حساس MSG
نشت یونی (درصد) Electrolyte leakage (%)	20.41±8.17	40.0	9.93	46.15	15.96	26.16	55.84±16.29	29.2	25.82	93.22	45.45	71.42
آب‌گزیدگی برگ (رتبه) Water soaking	1.88±0.65	34.6	1.00	4.16	1.39	2.51	2.70±0.81	30.0	1.06	4.94	2.17	3.49
محتوای پرولین (میلی‌گرم در گرم وزن‌تر برگ) Proline content (mg/g FW leaf)	25.39±4.38	17.2	14.66	33.15	27.35	22.87	22.94±4.42	19.3	11.35	30.40	24.91	19.99
پراکسیداسیون لیپیدها (میکروگرم در گرم وزن‌تر برگ) Lipid peroxidation (µg/g FW leaf)	2.12±0.58	27.3	1.40	3.51	1.76	2.60	1.47±0.53	36.1	1.05	2.85	1.19	1.88
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (درصد) Antioxidant capacity (%)	47.35±7.11	15	36.87	70.40	50.91	42.75	44.94±6.97	15.5	34.90	67.44	48.17	40.09
کربوهیدرات‌های کل (میلی‌گرم در گرم وزن‌تر برگ) Total Carbohydrates (mg/g FW leaf)	43.86±2.84	6.5	37.74	49.24	45.26	42.07	39.92±2.76	6.9	33.97	45.74	41.13	38.09
فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ) Superoxide dismutase activity (enzymatic unit/ g FW leaf)	62.11±1.38	2.2	52.59	65.29	62.18	62.02	55.26±2.32	4.2	42.11	69.95	55.42	55.02
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ) Ascorbate peroxidase activity (enzymatic unit/ g FW leaf)	4.64±0.10	2.2	4.37	4.97	4.66	4.60	3.94±0.09	2.3	3.64	4.27	3.97	3.90

جدول ۴: اعضای گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای در دمای ۳°C- همراه با میانگین و انحراف از میانگین کل استاندارد شده هر گروه. شماره ارقام در جدول ۱ آورده شده است

Table 4: The members of cluster analysis at -3°C with the mean and deviation from the standardized mean of each group. The number of accessions is shown in Table 1

APX (enzymatic unit/ g fresh leaf)	SOD (enzymatic unit/ g fresh leaf)	TC (mg/ g leaf fresh weight)	AC (%)	LP (µg/ g leaf fresh weight)	PC (mg/g leaf fresh weight)	WS (rank)	EL (%)	صفت Trait*	اعضای گروه Members of cluster	تعداد عضو Number of Accessions	شماره زیرگروه Sub-group number	شماره گروه Group number
4.66	62.02	44.63	49.99	1.80	28.46	1.52	16.00	میانگین گروه Group mean	1,7,8,12,18,20,21,30,36,39,40 40,41,42,50,52,53,54,60,64,66 69,73,82,83,84,85,88,89,92,93 94,95,97,98,100,104,105,107	38	1-1	1
4.64	62.11	43.86	47.35	2.12	25.39	1.88	20.41	میانگین کل Total mean				
0.292	-0.063	0.269	0.372	-0.543	0.702	-0.541	-0.538	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				
4.69	62.38	45.30	43.25	1.87	25.45	1.76	17.76	میانگین گروه Group mean	10,13,14,17,19,23,33,46,62,70 72,75,79	13	2-1	
4.64	62.11	43.86	47.35	2.12	25.39	1.88	20.41	میانگین کل Total mean				
0.520	0.199	0.505	-0.575	-0.418	0.013	-0.18	-.0323	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				
4.57	61.66	40.82	43.19	2.15	20.12	2.16	19.55	میانگین گروه Group mean	3,6,22,24,25,28,35,44,49,68 74,91	12	1-2	2
4.64	62.11	43.86	47.35	2.12	25.39	1.88	20.41	میانگین کل Total mean				
-0.606	-0.326	-1.065	-0.583	0.050	-1.202	0.434	-0.104	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				
4.55	62.81	45.49	49.12	1.85	25.78	1.54	18.86	میانگین گروه Group mean	9,26,27,29,31,37,55,56,76 77,90,101	12	2-2	
4.64	62.11	43.86	47.35	2.12	25.39	1.88	20.41	میانگین کل Total mean				
-0.759	0.506	0.572	0.249	-0.452	0.089	-0.509	-0.188	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				
4.85	63.08	43.82	45.87	2.18	25.80	2.43	27.21	میانگین گروه Group mean	34,78,99	3		3
4.64	62.11	43.86	47.35	2.12	25.39	1.88	20.41	میانگین کل Total mean				
2.021	0.700	-0.013	-0.207	0.098	0.094	0.837	0.831	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				

*: نشت یونی (EL)، آب‌گزیدگی برگ (WS)، پراکسیداسیون لیپیدها (LP)، محتوای پرولین (PC)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (AC)، کربوهیدرات‌های کل (TC)، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

*: Electrolyte leakage (EL), Water soaking (WS), Proline content (PC), Lipid peroxidation (LP), Antioxidant capacity (AC), Total Carbohydrates (TC), Superoxide dismutase activity (SOD), Ascorbate peroxidase activity (APX)

ادامه جدول ۴: اعضای گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای در دمای ۳°C- همراه با میانگین و انحراف از میانگین کل استاندارد شده هر گروه. شماره ارقام در جدول ۱ آورده شده است

Table 4 continued: The members of cluster analysis at -3 °C with the mean and deviation from the standardized mean of each group. The number of accessions is shown in Table 1

APX (enzymatic unit/ g fresh leaf)	SOD (enzymatic unit/ g fresh leaf)	TC (mg/ g leaf fresh weight)	AC (%)	LP (µg/ g leaf fresh weight)	PC (mg/g leaf fresh weight)	WS (rank)	EL (%)	صفت Trait*	اعضای گروه Members of cluster	تعداد عضو Number of Accessions	شماره زیرگروه Sub-group number	شماره گروه Group number
								میانگین گروه Group mean	32,71,80,81,76,96,102 103,106,110	10		4
4.72	63.01	47.52	62.15	1.59	29.47	1.19	13.27					
4.64	62.11	43.86	47.35	2.12	25.39	1.88	20.41	میانگین کل Total mean				
0.805	0.655	1.286	2.081	-0.897	0.931	-1.041	-0.872	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				
								میانگین گروه Group mean	15	1		5
4.68	60.58	44.39	43.41	1.94	26.31	1.86	16.29					
4.64	62.11	43.86	47.35	2.12	25.39	1.88	20.41	میانگین کل Total mean				
0.482	-1.105	0.185	-0.552	-0.312	0.210	-0.020	-0.503	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				
								میانگین گروه Group mean	2,4,5,11,16,38,43,45,47,48 51,57,58,59,61,63,65,67,87 108,109	21		6
4.55	61.84	40.62	39.79	3.23	20.53	2.87	34.010					
4.64	62.11	43.86	47.35	2.12	25.39	1.88	20.41	میانگین کل Total mean				
-0.764	-0.195	-1.137	-1.062	1.900	-1.110	1.510	1.662	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				

*: نشت یونی (EL)، آب‌گزیدگی برگ (WS)، پراکسیداسیون لیپیدها (LP)، محتوای پرولین (PC)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (AC)، کربوهیدرات‌های کل (TC)، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

*: Electrolyte leakage (EL), Water soaking (WS), Proline content (PC), Lipid peroxidation (LP), Antioxidant capacity (AC), Total Carbohydrates (TC), Superoxide dismutase activity (SOD), Ascorbate peroxidase activity (APX)

جدول ۵: اعضای گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای در دمای ۶°C- همراه با میانگین و انحراف از میانگین کل استاندارد شده هر گروه. شماره ارقام در جدول ۱ آورده شده است

Table 5: The members of cluster analysis at -6 °C with the mean and deviation from the standardized mean of each group. The number of accessions is shown in Table 1

APX (enzymatic unit/ g fresh leaf)	SOD (enzymatic unit/ g fresh leaf)	TC (mg/ g leaf fresh weight)	AC (%)	LP (µg/ g leaf fresh weight)	PC (mg/g leaf fresh weight)	WS (rank)	EL (%)	صفت Trait*	اعضای گروه Members of cluster	تعداد عضو Number of Accessions	شماره زیرگروه Sub-group number	شماره گروه Group number
4.01	55.69	40.71	46.34	1.25	24.45	2.34	48.70	میانگین گروه Group mean	1,7,8,10,13,14,18,19,26 27,30,34,36,39,41,42,46 50,54,60,62,64,66,69,70 71,73,75,76,77,78,79,81 82,88,97,98,99,100,101 104	41	1-1	1
3.94	55.26	39.92	44.94	1.47	22.94	2.70	55.84	میانگین کل Total mean				
0.738	0.187	0.287	0.204	-0.396	0.343	-0.436	-0.437	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				
3.86	54.86	41.34	46.64	1.20	25.48	2.37	48.18	میانگین گروه Group mean	9,12,17,21,23,29,31,32,33 37,40,52,53,55,56,83,84,85 89,90,92,93,94,95,105,107	26	2-1	
3.94	55.26	39.92	44.94	1.47	22.94	2.70	55.84	میانگین کل Total mean				
-0.753	-0.169	0.516	0.244	-0.500	0.573	-0.394	-0.469	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				
4.03	56.72	43.49	61.52	1.10	28.35	1.53	33.55	میانگین گروه Group mean	80,86,96,102,103,106,110	7		2
3.94	55.26	39.92	44.94	1.47	22.94	2.70	55.84	میانگین کل Total mean				
1.033	0.628	1.294	2.376	-0.684	1.223	-1.432	-1.367	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				
3.89	54.89	37.20	40.78	1.28	18.72	2.88	59.05	میانگین گروه Group mean	3,6,15,20,22,24,25,28,35 38,44,49,68,72,74,91	16		3
3.94	55.26	39.92	44.94	1.47	22.94	2.70	55.84	میانگین کل Total mean				
-0.511	-0.158	-0.980	-0.594	-0.348	-0.953	0.233	0.197	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				
3.89	54.66	37.35	37.31	2.52	18.00	4.09	85.63	میانگین گروه Group mean	2,4,5,11,16,43,45,47,48,51 57,58,59,61,63,65,67,87, 108,109	20		4
3.94	55.26	39.92	44.94	1.47	22.94	2.70	55.84	میانگین کل Total mean				
-0.48	-0.25	-0.92	-1.09	1.98	-1.11	1.72	1.82	انحراف از میانگین استانداردشده Deviation from the standardized mean				

*: نشت یونی (EL)، آب‌گزیدگی برگ (WS)، پراکسیداسیون لیپیدها (LP)، محتوای پرولین (PC)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (AC)، کربوهیدرات‌های کل (TC)، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز(APX)

*: Electrolyte leakage (EL), Water soaking (WS), Proline content (PC), Lipid peroxidation (LP), Antioxidant capacity (AC), Total Carbohydrates (TC), Superoxide dismutase activity (SOD), Ascorbate peroxidase activity (APX)

جدول ۶: ضرایب همبستگی بین هشت صفت مرتبط با تنش یخبندان در دو دمای $-3^{o}C$ (پایین قطر جدول) و $-6^{o}C$ (بالای قطر جدول)

Table 6: Correlations coefficients between eight traits related to cold tolerance in -3 C° (bottom of Table diameter) and -6 C° (above of Table diameter)

APX (enzymatic unit/ g fresh leaf)	SOD (enzymatic unit/ g fresh leaf)	TC (mg/ g leaf fresh weight)	AC (%)	LP (µg/ g leaf fresh weight)	PC (mg/g leaf fresh weight)	WS (rank)	EL (%)	صفت Trait
0.288	0.175	-0.624**	-0.723**	0.877**	-0.646**	0.976**	1	نشت یونی (درصد) Electrolyte leakage (%)
0.281	0.171	-0.611**	-0.722**	0.830**	-0.629**	1	0.767**	آب‌گزیدگی برگ (رتبه) Water soaking
0.271**	0.014	0.517**	0.522**	0.541*	1	0.032	0.025	محتوای پرولین (میلی‌گرم در گرم وزن‌تر برگ) Proline content (mg/g FW leaf)
-0.165	-0.107	-0.474**	-0.571**	1	0.625**	0.885**	0.868**	پراکسیداسیون لیپیدها (میکروگرم در گرم وزن‌تر برگ) Lipid peroxidation (µg/g FW leaf)
0.326**	0.188*	0.556**	1	0.659**	0.498**	-0.48	-0.293	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (درصد) Antioxidant capacity (%)
0.023	0.047	1	0.636**	-0.684	0.571**	-0.661**	-0.576*	کربوهیدرات‌های کل (میلی‌گرم در گرم وزن‌تر برگ) Total Carbohydrates (mg/g FW leaf)
0.267**	1	0.155	0.201*	0.136	0.092	-0.107	0.048	فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ) Superoxide dismutase activity (enzymatic unit/ g FW leaf)
1	0.25	0.387*	0.398**	0.386*	0.327	-0.328	0.323	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ) Ascorbate peroxidase activity (enzymatic unit/ g FW leaf)

**: معنی‌دار در سطح یک درصد ($P\leq0.01$). *: معنی‌دار در سطح پنج درصد ($P\leq0.05$). نشت یونی (EL)، آب‌گزیدگی برگ (WS)، پراکسیداسیون لیپیدها (LP)، محتوای پرولین (PC)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (AC)، کربوهیدرات‌های کل (TC)، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

**: Significant at 0.01 level ($P\leq0.01$). Significant at 0.05 level ($P\leq0.05$). Electrolyte leakage (EL), Water soaking (WS), Proline content (PC), Lipid peroxidation (LP), Antioxidant capacity (AC), Total Carbohydrates (TC), Superoxide dismutase activity (SOD), Ascorbate peroxidase activity (APX)

می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت‌های ژنتیکی علی‌رغم شباهت ظاهری عامل مهمی در ایجاد تنوع و بروز پاسخ‌های متفاوت در بین ژنوتیپ‌های مختلف است. ازآنجاکه نشانگرهای مورفولوژی و بیوشیمیایی متأثر از محیط می‌باشند (*موهان*[1] و همکاران، 1997)، لذا مشاهده الگوهای متفاوت گروه‌بندی در دماهای مختلف تنش دور از انتظار نیست. به همین دلیل استفاده از هردو نشانگر مولکولی و فیزیولوژیکی در تشخیص بهتر تنوع و قرابت ژنتیکی بین اکوتیپ‌های مختلف هرگونه ضروری می‌باشد (*فریول*[2] و همکاران، 2003). از جنبه ژنوتیپ‌های متحمل به سرما، گروه دوم در تمامی شاخص‌ها دارای عملکرد بهتری نسبت به سایر گروه‌ها بود. در این گروه صرفاً حضور هفت ژنوتیپ شاهد پونسیروس (G103) سیترواملو (G106)، نارنج معمولی (G86)، نارنج اف‌تایپ (G110)، نارنگی‌های اونشو (G96)، اکیتسو (G102) و کلئوپاترا (G80) بیانگر این مطلب بود که در بین ژنوتیپ‌های ناشناخته طبیعی، ژنوتیپی که در حداکثر دمای تنش مورد آزمون بتواند تحمل خوبی از خود نشان دهد شناسایی نگردید.

ژنوتیپ‌های قرارگرفته در گروه اول از لحاظ شاخص‌های تخریب سلولی از عملکرد نسبتاً مناسبی برخوردار بوده‌اند. به عبارتی نتایج این پژوهش در تائید مطالعات پیشین (*نسوم*[3]، 2014؛ *ایکدا*[4] و همکاران، 1980؛ *اینوای*[5]، 1989) نشان داد که اعضای گروه دوم دارای مناسب‌ترین عملکرد برای برنامه‌های بهنژادی مرتبط با تنش سرما می‌باشند. در این پژوهش نیز تولید کمتر مالون‌دآلدئید برای پونسیروس (G103) و سایر ژنوتیپ‌های هم‌گروه با آن، نتایج پژوهش‌های پیشین در خصوص تحمل‌پذیری این ژنوتیپ به یخبندان را تائید می‌کند. گروه سوم با ۱۶ عضو فقط دارای یک ژنوتیپ شاهد بود (G91). در بین ژنوتیپ‌های ناشناخته، دو بیوتیپ G22 وG24 شباهت مورفولوژی بالایی با گریپ‌فروت (G91) داشتند (جدول تکمیلی ۱). در این گروه به‌غیراز LP که دارای انحراف از میانگین کل استانداردشده منفی و امتیازی مطلوب بود، از لحاظ سایر صفات دارای ارزش مناسبی از جنبه تحمل به سرما نبودند. به‌گونه‌ای که برای تمام صفات مرتبط با القاء مقاومت، دارای میانگینی کم تر از میانگین کل بود و برای EL و WS نیز مقادیر بیش‌تر از میانگین ثبت گردید. در یک جمع‌بندی می‌توان گفت که این گروه، ژنوتیپ‌های نسبتاً ضعیفی را از لحاظ سازگاری و تحمل به تنش سرما شامل می‌شود. در این دما، گروه چهارم با ۲۰ عضو برای هر هشت صفت دارای ارزش کم‌تر از سایر گروه‌ها بود. بر این اساس اعضای این گروه، برای شاخص‌های تخریب سلولی، مقادیر انحراف از میانگین کل استانداردشده مثبت و برای صفات القاء تحمل به تنش دارای انحراف استانداردشده منفی بودند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که حساس‌ترین ارقام و بیوتیپ‌های طبیعی در این گروه شناسایی و دسته‌بندی شدند.

ارزیابی گروه‌بندی بر اساس آب گزیدگی برگ

صفت آب‌گزیدگی یکی از صفاتی است که باتوجه به بروز آثار تخریب به رنگ سبز تیره در پشت برگ می‌تواند به‌عنوان یک معیار مهم در ارزیابی ژنوتیپ‌ها از جنبه تحمل و حساسیت به یخبندان مورداستفاده قرار گیرد. در هر دو دمای موردبررسی وقتی ژنوتیپ‌های موردمطالعه بر اساس میزان آب‌گزیدگی برگ به دو گروه حساس و مقاوم گروه‌بندی گردید (جدول ۳) مشاهده شد که گروه مقاوم دارای تراوش یونی کم‌تر و از طرف دیگر میزان پرولین در آن‌ها بیش‌تر بود. به نظر می‌رسد که افزایش میزان پرولین باعث پایداری غشاء از طریق جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید شده است (*اشرف*[6] و همکاران،)2007. در این آزمایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها در ژنوتیپ‌های مقاوم کم‌تر از ژنوتیپ‌های حساس بود. این کاهش پراکسیداسیون باعث ثبات نسبی غشای سلولی شده و تراوش یونی را کاهش خواهد داد. البته غلظت کربوهیدرات‌های محلول در هر دو دما در ارقام مقاوم اندکی بیش‌تر از ارقام حساس بود، که در مقاومت به تنش موردبررسی می‌تواند مؤثر باشد (*وانگ*[7]، 1990). نکته قابل‌توجه دیگر، میزان کل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ‌های مقاوم است که بیش‌تر از ژنوتیپ‌های حساس بود (جدول ۳). این در حالی است که بین گروه حساس و مقاوم از لحاظ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موردمطالعه (سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز) تفاوتی مشاهده نشد. چنین استنباط می‌گردد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر در ارقام مقاوم می‌تواند مربوط به آنزیم‌هایی باشد که در این تحقیق بررسی نشده‌اند.

بررسی همبستگی بین صفات

بررسی جدول همبستگی (جدول ۶) مؤید نکات فوق است. بر این اساس بالاترین همبستگی مثبت معنی‌دار در سطح یک درصد، بین دو صفت نشت‌یونی و آب‌گزیدگی برگ مشاهده شد (r =۰/۹۷). علاوه‌بر آن همبستگی بین نشت‌یونی و

1. Mohan
2. Ferriol
3. Nesom
4. Ikeda
5. Inoue
6. Ashraf
7. Wang

پراکسیداسیون لیپیدها نیز در هر دو دما، مثبت و معنی‌دار بود. می‌توان گفت که رادیکال‌های آزاد در سلول موجب آسیب رساندن به لیپیدها و اسیدهای چرب غشای سلولی شده و با تسریع روند پراکسیداسیون لیپیدها و شکل‌گیری مالون‌دآلدئید، تخریب فیزیولوژیک غشای سلولی را ایجاد می‌کنند. لذا تخریب بیش‌تر غشاء منجر به افزایش تراوش محتویات سلولی به فضای بین سلولی می‌گردد. هم‌چنین رابطه منفی بالایی بین کربوهیدرات‌های کل و پرولین با دو صفت نشت‌یونی و آب گزیدگی برگ مشاهده شد که بیانگر این است با کاهش غلظت پرولین و کربوهیدرات‌ها، خسارت تنش یخبندان به غشای سلولی افزایش می‌یابد. این موضوع نقش این ترکیبات را در پایداری غشاء سلولی در گیاهان موردبررسی نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش شدت تنش سرمایی از ۳°C- به ۶°C- به‌دلیل تأثیر بیش‌تر فرایندهای فیزیکی تنش، مقادیر صفات EL، WS و LP افزایش یافت. درحالی‌که دیگر صفات مهارکننده تنش اکسیداتیو (PC، AC، TC، SOD و APX) به‌دلیل ماهیت فیزیولوژیک و کاهش فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه، همراه با کاهش شدید دما، روند کاهشی نشان دادند. هم‌چنین ماهیت و روند پاسخ بیوتیپ‌های طبیعی ناشناخته براساس قرابت و هم‌گروه بودن با ژنوتیپ‌های شاهد برآورد گردید. همبستگی مثبت معنی‌دار در سطح یک درصد، بین صفت نشت‌یونی و آب‌گزیدگی برگ مشاهده شد. هم‌چنین رابطه منفی بالایی بین کربوهیدرات‌های کل و پرولین با دو صفت نشت‌یونی و آب‌گزیدگی برگ ثبت گردید که بیانگر نقش مؤثر ترکیبات سازگارساز در کاهش خسارت تنش یخبندان است. در این پژوهش در دمای ۳°C- دامنه گسترده‌تری از درجه تحمل به تنش در بین ژنوتیپ‌های موردمطالعه مشاهده شد و در دمای ۶°C- بیشتر ژنوتیپ‌ها واکنش مشابهی در پاسخ به تنش نشان دادند. قرابت و هم‌گروه بودن نمونه‌های پونسیروس (G103)، سیترومِلو (G106)، نارنج اف‌تایپ (G110)، نارنج معمولی (G86) و ارقام نارنگی اونشو (G96) و اکیتسو (G102) در هر دو دمای تنش، نشان داد که این ژنوتیپ‌ها از ارزش انتخابی مناسبی جهت استفاده در برنامه‌های به‌نژادی تحمل به سرما تا دمای ۶°C- برخوردار هستند. علاوه بر آن، دو بیوتیپ طبیعی ناشناخته G32 و G71 تا دمای ۳°C- دارای عملکرد تحمل مناسبی به تنش یخبندان بودند. نتایج این آزمایش در شناسایی ارقام متحمل به‌عنوان پایه مادری و هم‌چنین انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب به‌منظور اصلاح ژنوتیپ های تجاری موجود از جنبه صفات مرتبط با تحمل به یخبندان می‌تواند مورداستفاده قرار گیرد.

منابع

Ashraf M, Foolad MR. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 59: 206-16.

Alam, M. N., Bristi, N. J. and Rafiquzzaman, M. 2013. Review on *in vivo* and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, 21 (2): 143-152.

Bates, L., Waldren, R. and Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39 (1): 205-207.

Campos-de Quiroz, H. and Ortega-Klose, F. 2001. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. Euphytica, 122 (1): 61-67.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28 (3): 350-356.

Endo, T., Shimada, T., Nakata, Y., Fujii, H., Matsumoto, H., Nakajima, N., Ikoma, Y. and Omura, M. 2017. Abscisic acid affects expression of citrus FT homologs upon floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). Tree Physiology, 38 (5): 755-771.

Ferriol, M., Pico, B. and Nuez, F. 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 107 (2): 271-282.

Fotouhi Ghazvini, R. F., Baghbanha, M. R., Hatamzadeh, A. and Heidari, M. 2008. Effect of water stress on freezing tolerance of mexican lime (*Citrus aurantifolia* L.) seedlings. Horticulture Environment and Biotechnology, 49 (5): 276-280.

Ikeda, I., Kobayashi, S. and Nakatani, M. 1980. Differences in cold resistance of various citrus varieties and seedlings based on the data obtained from winter injury in 1977. Bulletin of the Fruit Tree Research Station, E, Akitsu 5 (3): 49-65.

Inoue, H. 1989. Effects of soil drought and temperature on flower bud differentiation of satsuma mandarin. Journal of han, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T., Yano, M., Bhatia, C. and Sasaki, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Molecular Breeding, 3 (2): 87-103.

Mollá ,S., Villar-Salvador, P., García-Fayos, P. and Rubira, J. L. P. 2006. Physiological and transplanting performance of Quercus ilex L.(holm oak) seedlings grown in nurseries with different winter conditions. Forest Ecology and Management, 237 (1-3): 218-226.

Nesom, G. 2014. *Citrus trifoliata* (Rutaceae): review of biology and distribution in the USA. Phytoneuron, 46: 1-14.

Prevc, T., Šegatin, N., Ulrih, N. P. and Cigić, B. 2013. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. Talanta, 109: 13-19.

Rivas, F., Fornes, F. and Agustí, M. 2008. Girdling induces oxidative damage and triggers enzymatic and non-enzymatic antioxidative defences in *Citrus* leaves. Environmental and Experimental Botany, 64 (3): 256-263.

Sala, J.M. and M.T. Lafuente. 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. Postharv. Bio. Technol. 20: 81-89.

Siboza, X. and Bertling, I. 2013. The effects of methyl jasmonate and salicylic acid on suppressing the production of reactive oxygen species and increasing chilling tolerance in 'Eureka'lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. F.]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 88 (3): 269-276.

Tajvar, Y., Ghazvini, R. F., Hamidoghli, Y. and Sajedi, R. H. 2011. Antioxidant changes of Thomson navel orange (*Citrus sinensis*) on three rootstocks under low temperature stress. Horticulture, Environment and Biotechnology, 52 (6): 576-580.

Vicente, A. R., Manganaris, G. A., Minas, I. S., Goulas, V. and Lafuente, M. T. 2013. Cell wall modifications and ethylene-induced tolerance to non-chilling peel pitting in citrus fruit. Plant Science, 210: 46-52.

Wang, C. Y. 1990. Chilling injury of horticultural crops. CRC Press.

Wongsheree, T., Ketsa, S. and van Doorn, W. G. 2009. The relationship between chilling injury and membrane damage in lemon basil (*Ocimum× citriodourum*) leaves. Postharvest Biology and Technology, 51 (1): 91-96.

Wu, Q. S., Zou, Y. N. and Xia, R. X. 2006. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. European Journal of Soil Biology, 42 (3): 166-172.

فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد بیستم/ شمارهٔ اول/ صفحات ۲۰۹-۱۹۳/ بهار و تابستان ۹۹

Evaluation of Frost Stress Tolerance in Citrus Genotypes under Two Subfreezing Temperatures

Abouzari[1], A., Solouki[2], M., Golein[3*], B., Fakheri[4], B. A. and Sabouri[5], A.

Abstract

Most of the plants in the citrus family are sensitive to cold stress. Therefore, the inevitable occurrence of periodic frost causes extensive damage to their functions. With the purpose of comparing 110 citrus genotypes' reaction to the two levels of cold stress (-3°C and -6°C), 76 unknown natural genotypes and 34 known genotypes from Ramsar citrus and sub-tropical fruits research institute were studied based on the split-plot design with three replications. The results of variance analysis for the eight traits related to cold tolerance showed that there was a significant difference between the examined accessions. According to cluster analysis, the genotypes in each temperature demonstrated a relatively different grouping pattern after the employment of Euclidean distance squares and the furthest neighbors' method. The highest amount of electrolyte leakage (55.84%), leaf water soaking (2.70) and lipid peroxidation (2.12 µg/g leaf fresh weight) were estimated at -6°C and recorded at -3°C for other traits. The relationship between the studied panels was determined by considering the common group and the traits in question. G32 and G71 genotypes were merely found to be close to the tolerant genotypes. Regarding the negative deviation from the standardized mean for electrolyte leakage (-1.367), leaf water soaking (-1.423) and lipid peroxidation (-0.684), along with the positive values of other traits (proline content, antioxidant capacity, total soluble carbohydrates and antioxidant enzymes), genotypes Poncirus, Citrumelo, off type sour orange, Sour orange, Satsuma mandarin, and Okitsu are of great usage value in cold tolerance breeding programs.

Keywords: Citrus, Cold stress, Cold tolerance, Physiological treats, Unknown genotypes

1, 2 and 4. PhD Student and Professors, Respectively, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

3. Associate Professor, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Ramsar, Iran

5. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

*: Corresponding author Email: b.golein@areo.ir