مقاله پژوهشی

بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دو رقم توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa* Duch.) به تنش سرما

شادی محمدی نژاد، منصور غلامی* و حسن ساری‌خانی

گروه علوم باغبانی، دانسکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۰۱/۲۰)

چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی اهمیت برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با مکانیسم‌های سازگاری به سرما و میزان تأثیرگذاری آنها در تحمل به سرمای زمستانه ارقام و تعیین شاخص‌های مناسب و کارآمد برای شناسایی ارقام توت‌فرنگی متحمل و حساس به سرما صورت گرفت. بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تحت چندین تیمار سرمایی مختلف روی بافت‌های دو رقم توت‌فرنگی سلوا و کوئین الیزا انجام شد. گیاهچه‌های تهیه‌شده از ساقه رونده، سال جاری پس از کشت در گلدان تا اواخر آبان در محیط آزاد نگهداری شدند تا کم‌کم به دمای کم سازگار شوند. پس از سازگاری گیاهان، تیمارهای دمایی با استفاده از سردخانه آزمایشگاهی قابل‌تنظیم اعمال شد. نمونه‌ها به مدت سه ساعت در تیمار نهایی سرما نگه‌داری شده و سپس از دستگاه خارج شدند و برای اندازه‌گیری ویژگی‌های مختلف به آزمایشگاه منتقل شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد سطوح آنزیم‌های اکسیداتیو شامل سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، تغییرات بافت و دما قرار گرفته است. همچنین مشخص شد که با کاهش دما میزان نشت یونی، پرولین، پروتئین، پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون چربی‌های غشا و کربوهیدرات افزایش یافته و این مقادیر عموماً در رقم کوئین الیزا بیشتر از سلوا بودند. افزایش سطح این فاکتورها در روند کاهش دما در بافت طوقه مشهودتر بود. محتوای نسبی آب هم با کاهش دما کاهش یافته که در کل این نتایج متحمل‌بودن رقم کوئین الیزا به سرما را تأیید می‌کنند.

کلمات کلیدی:آنزیم‌های اکسیداتیو، پراکسیداسیون چربی غشا، تنش سرما، سلوا و کوئین الیزا

مقدمه

توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa* Duch) یکی از مهم‌ترین میوه‌های ریز دنیا به شمار می‌رود که به‌عنوان یک گیاه چندساله در مناطق معتدله دنیا کشت می‌شود (Hancock, 1991). زنده‌مانی بوته توت‌فرنگی در فصل زمستان عامل مهمی برای تولید آن در مناطق معتدله سرد است که این موضوع علاوه بر ژنتیک (کرمی و همکاران، ۱۳۹۷؛ Sonsteby and Heide, 2011)، تحت تأثیر پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه (Davik *et al.*, 2013) و همچنین عوامل محیطی مانند حداقل دمای زمستانه و بارش و پایداری برف (کرمی، ۱۳۹۵؛ Nestby *et al.*, 2000) قرار می‌گیرد. مقاومت به سرما در توت‌فرنگی نیز یک ویژگی متغیر است و مستلزم این است که حداقل طوقه از آسیب‌های

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mgholami@basu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

ناشی از انجماد در امان مانده و در بهار قابلیت رشد مجدد داشته باشد (Koehler *et al*., 2012).

حساسیت به سرما در گیاهان، علاوه بر میزان تحمل به سرما با میزان سازگاری به سرما (cold acclimation) ارتباط دارد (Davik *et al*., 2013; Yang *et al*., 2015). در این بین، بیان ژن‌های خاص (Koehler *et al*., 2012)، پاسخ‌های فیزیولوژیکی (Gunes *et al*., 2016)، و تجمع ترکیبات سازگار (Yang *et al*., 2015; Gunes *et al*., 2016) می‌توانند سازگاری را در گیاهان ایجاد نمایند. گیاهان در مواجهه با وقوع سرمای تدریجی و کاهش دما و همچنین کاهش طول روز، از حالت حساس به سرما به حالت مقاوم به سرما عبور پیدا می‌کنند که سبب بقای گیاهان در شرایط معتدله سرد می‌گردد (Yang *et al*., 2015; Rohloff *et al*., 2012). در فرآیند سازگاری به سرما، زمان و سرعت توسعه سازگاری، حفظ آن، زمان و سرعت از دست‌دادن سازگاری و توانایی بازسازی عوامل در سازگاری مجدد، همگی در میزان مقاومت نهایی به سرما و بقای گیاه دخالت دارند (کرمی، ۱۳۹۵). سازگاری به سرما شامل تغییرات پیچیده بیوشیمیایی و سلولی مانند تغییر در ترکیبات غشای سلولی، تجمع قندهای محلول و پرولین و همچنین تولید پروتئین‌های ضدیخ در سلول است (Moon *et al*., 1995; Hincha, 2002; Moffatt *et al*., 2006).

پاسخ به تنش ابتدا در سطح مولکولی رخ می‌دهد و بعد تغییراتی را در مسیرهای بیوشیمیایی و فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان تحت تنش ایجاد می‌کند (Bartwal *et al*., 2013). پروتئین‌های تثبیت‌کننده غشا و تنظیم‌کننده‌های اسمزی (پرولین، کربوهیدرات‌ها و غیره) و آنتی‌اکسیدانت‌ها از جمله موادی هستند که چند ساعت پس از دریافت پیام سرما فعال می‌شوند. فعالیت این عوامل باعث ایجاد مکانیسم‌های تحمل علیه خسارت‌های ناشی از تنش می‌شود و به‌عنوان مکانیسم‌های دفاعی در گیاه معرفی می‌شوند (Mahajan and Tuteja, 2005). نقش اسمولیت‌ها (Aslamarz *et al*., 2011)، دهیدرین و الکل دهیدروژناز (Davik *et al*., 2013)، کربوهیدرات‌های محلول (Ouyang *et al*., 2019)، آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (Vacca *et al*., 2004) و تغییر در ویژگی‌های غشای پلاسمایی سلول (Maali-Amiri *et al*., 2007) در مقاومت به تنش سرما در گزارش‌های متعددی آمده است. در ننش سرما همانند سایر تنش‌های محیطی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن از جمله سوپراکسید (O_2^-) افزایش می‌یابد (Zhang *et al*., 2008) که آسیب‌های جدی به سلول می‌زنند. گیاهان قادرند آنها را توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی شامل آنتی‌اکسیدانی‌های آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ردیابی کرده و از بین ببرند (Vacca *et al*., 2004). اگر چه پژوهش‌های متعددی در ارتباط با مقاومت به سرمای توت‌فرنگی انجام شده است اما در این بین پژوهش‌های اندکی روی تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در حین تیمارهای سرمایی وجود دارد. با توجه به گسترش کشت مزرعه‌ای توت‌فرنگی در مناطق معتدله کشور و آسیب‌های فراوان سرمازدگی زمستانه، یافتن راه‌هایی برای کاهش سرمازدگی ضروری است. با این هدف یافتن پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی رقم‌های توت‌فرنگی در مواجهه با سرما مرحله نخست است که می‌تواند برخی از دلایل مقاومت متفاوت ارقام مختلف توت‌فرنگی را به سرما مشخص نماید. بنابراین بررسی نحوه تغییرات فیزیولوژیکی مختلف در اثر سرما در ارقام حساس و متحمل می‌تواند در شناسایی مکانیسم‌های تحمل به سرما مفید واقع شود.

پژوهش حاضر با هدف بررسی مکانیسم‌های احتمالی سازگاری به سرما و میزان تأثیرگذاری آنها در تحمل به سرمای زمستانه در دو رقم توت‌فرنگی سلوا (به‌عنوان یک رقم حساس به سرما) و کوئین الیزا (به‌عنوان یک رقم مقاوم سرما) و دستیابی به شاخص‌های قابل اتکا برای تشخیص ارقام توت‌فرنگی متحمل و حساس به سرما انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌منظور ارزیابی میزان تحمل به سرمای زمستانه دو رقم توت‌فرنگی سلوا و کوئین الیزا تحت شرایط سرمای کنترل‌شده، در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه بوعلی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

سینا و به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. بوته‌های دو رقم ذکرشده توت‌فرنگی از رشد ساقه‌های رونده تابستانه بوته‌های مادری تهیه شده و در پاییز از گیاهان مادری جدا شده و به گلدان‌های چهار لیتری حاوی مخلوطی با نسبت مساوی از خاک باغچه، کود دامی پوسیده و ماسه منتقل شدند.

اعمال تیمارهای دمایی مطابق روش کرمی (۱۳۹۵) با استفاده از سردخانه آزمایشگاهی با قابلیت برنامه‌ریزی و تنظیم دمایی با دقت ۰/۵± درجه سانتی‌گراد و با هدف تطابق با شرایط طبیعی و با در نظرگرفتن فرآیند خوگیری بوته‌ها به سرما و با توجه به نوع صفت مورد ارزیابی به شرح زیر اعمال شد. در هر مرحله گلدان‌های مربوط به هر آزمایش در اتاقک سردخانه قرار گرفته و دما به‌طور تدریجی با سرعت یک درجه سانتی‌گراد در ساعت تا رسیدن به دمای موردنظر کاهش یافت، پس از باقی‌ماندن نمونه‌ها به‌مدت سه ساعت در تیمار دمایی موردنظر، روند افزایش دما با همان سرعت یک درجه سانتی‌گراد در ساعت انجام شد. سپس نمونه‌ها برای انجام آزمایش به آزمایشگاه انتقال یافتند. تیمارهای دمایی با توجه به آستانه تحمل سرمای هر دو رقم که در آزمایشی جداگانه بررسی شده بود انتخاب شدند.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: برای ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، در دو دمای ٤+ و ٦- درجه سانتی‌گراد در بافت‌های برگ و طوقه هر دو رقم عصاره آنزیمی تهیه شد. بدین منظور، ۰/۱ گرم بافت برگ یا طوقه را در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم با pH=۷ پودر شد. عصاره حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و از مایع رویی برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها استفاده شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11) براساس روشNakano و Asada (۱۹۸۱) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. برای این منظور، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی به ۱/۸ میلی‌لیتر محلول واکنش اضافه شد و برای تعیین میزان فعالیت آنزیم APX مورد استفاده قرار گرفت. کاهش جذب در اثر فعالیت APX با استفاده از اسپکتوفتومتر (کری ۱۰۰، واریان، امریکا) در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب اکسیده‌شدن یک میکرومول آسکوربات در هر دقیقه می‌شود.

جهت تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX, EC 1.11.1.7) از روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) با کمی تغییر استفاده شد. برای این منظور، محلول واکنش شامل ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=۷، ٤/٥١ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد، ۳/٥١ میکرولیتر گایاکول و ٥٠ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. افزایش شدت جذب نور به‌واسطه تشکیل تتراگایاکول در اثر فعالیت آنزیم GPX در طول‌موج ٤٧٠ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) با استفاده از روش Clarbone (۱۹۸۵) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ١٤٠ میکرولیتر عصاره آنزیم و ۲۰ میکرولیتر از محلول ۳٪ H_2O_2 به ١/٨٤ میلی‌لیتر محلول واکنش اضافه شد. ثبت تغییرات جذب نور نمونه در طول‌موج ٢٤٠ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه انجام شد. هر یک واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز به‌عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب کاهش یک میکرومول H_2O_2 در هر دقیقه می‌شود.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1) با استفاده از روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۲ میکرولیتر ریبوفلاوین، ۱۳ میکرولیتر متیونین، ۰/۱ میلی‌گرم EDTA، ۷۰ میکروگرم NBT در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷/۵ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود. نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه زیر نور لامپ فلورسانس ۱۵ وات در فاصله ۳۰ سانتی‌متری قرار داده شدند. پس از این مدت جذب آنها در طول‌موج ٥٦٠ نانومتر خوانده شد. هر یک واحد فعالیت آنریم SOD به‌عنوان مقداری از آنزیم یا پروتئین (برحسب میلی‌گرم) منظور گردید که در طول‌موج ذکرشده موجب ٥٠ درصد کاهش احیای

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

فتوشیمیایی نیتروبلو تترازولیوم در مقایسه با نمونه شاهد می‌گردد.

اندازه‌گیری شاخص پایداری غشا سلولی (نشت یونی): نشت یونی در بافت برگ یا طوقه، پس از اعمال تیمارهای سرمایی و مطابق روش Linden و همکاران (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد. تیمارهای دمایی در رقم سلوا در دماهای ۳-، ٦- و ۹- درجه سانتی‌گراد و در رقم کوئین الیزا در دماهای ۳- ، ٦-، ۹-، ۱۲-، ۱۵- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد بودند. در هر رقم پس از اعمال تیمار، از برگ و طوقه هر بوته دیسک‌هایی به‌ترتیب به قطر یک سانتی‌متر و نیم سانتی‌متر تهیه و در قوطی ٦۰ میلی‌لیتری دربدار، حاوی ٤۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر غوطه‌ور شد. سپس قوطی‌های حاوی نمونه به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شدند و پس از آن نشت یونی اولیه (EC1) با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج (مدل CC-501)، اندازه‌گیری شد. سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شده و نشت یونی ثانویه (EC2) اندازه‌گیری شد. سپس براساس رابطه زیر ، درصد نشت یونی (EL) محاسبه گردید.

$$EL\% = (EC1\times100/EC2$$

محتوای نسبی آب (RWC) برگ: این صفت در دو سطح دمایی شاهد (بوته‌های مستقر در گلخانه) و ٤+ درجه سانتی‌گراد طبق روش Ritchie و همکاران (۱۹۹۰) ارزیابی شد. ابتدا قطعاتی از برگ انتخاب و وزن تر (FW) آنها تعیین گردید. سپس قطعات برگ به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در داخل آب‌مقطر قرار گرفتند تا سلول‌ها به حالت تورژسانس درآیند و برای وزن تورژسانس (TW) توزین شدند. به‌دنبال آن، برگ‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢٤ ساعت خشک شده و وزن خشک (DW) آنها نیز اندازه‌گیری شد و درنهایت RWC (برحسب درصد) از رابطه زیر به‌دست آمد.

$$RWC\ \% = (FW-DW)/(TW-DW) \times100$$

کربوهیدرات‌های محلول: غلظت کربوهیدرات‌های محلول در دو سطح شاهد (بوته‌های مستقر در گلخانه) و ٤+ درجه سانتی‌گراد در بافت برگ و طوقه هر دو رقم انجام شد. استخراج و اندازه‌گیری غلظت کربوهیدرات‌های محلول برگ به روش Dubois و همکاران (۱۹٥٦) صورت گرفت. به‌طور خلاصه، ۰/۳ گرم از بافت برگ تازه با ٥ میلی‌لیتر اتانول ۹٥٪ در هاون ساییده شده و درون لوله آزمایش ریخته شدند و به‌مدت ۲ دقیقه به‌شدت تکان داده شد. سپس قسمت بالایی محلول جدا شده و به رسوبات به جا مانده ٥ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه و مجدداً تکان داده شد. این عمل دو بار تکرار شد. عصاره استخراج‌شده با سرعت ۳٥۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش بالایی آن جدا شد. از عصاره الکلی ذکرشده، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر جدا و با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون تازه تهیه‌شده مخلوط گردید این محلول ۱۰ دقیقه در داخل بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خنک‌شدن نمونه‌ها، میزان جذب نمونه‌ها در طول‌موج ٦٢٥ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. درنهایت مقدار کربوهیدرات‌های محلول در مقایسه با منحنی جذب استاندارد گلوکز، برحسب میلی‌گرم بر گرم محاسبه شد.

پرولین: این صفت در دو سطح دمایی شاهد (بوته‌های مستقر در گلخانه) و ٤+ درجه سانتی‌گراد، در بافت برگ و طوقه هر دو رقم به روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) مورد ارزیابی شد. ابتدا ۰/۳ گرم از بافت برگ تازه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ (وزن به حجم) در هاون ساییده و درون لوله آزمایش ریخته شد. سپس به‌مدت ۲ دقیقه به‌شدت تکان داده شد و پس از تفکیک فازها، فاز مایع با سرعت ۳٥۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش بالایی آن جدا شد. به مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره فوق، ۱۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر اضافه و به‌هم زده شد. سپس به هر نمونه مقدار ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به‌مدت ٤٥ دقیقه در داخل بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از خنک‌کردن نمونه‌ها در آب یخ، ٤ میلی‌لیتر تولوئن به هر نمونه اضافه و کاملاً تکان داده شد تا پرولین وارد فاز تولوئن گردد. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه به حال سکون رها شدند و درنهایت میزان جذب در فاز بالایی نمونه‌ها در طول‌موج ٥١٥

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

نانومتر تعیین گردید. با مقایسه میزان جذب نمونه‌ها با میزان جذب استاندارد پرولین، مقدار پرولین آزاد برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

پروتئین محلول: این صفت در دو سطح دمایی شاهد (بوته‌های مستقر در گلخانه) و ٤+ درجه سانتی‌گراد، در بافت برگ و طوقه هر دو رقم به روش Bradford (۱۹۷٦) اندازه‌گیری شد. به این منظور مقدار ۰/۵ گرم بافت تازه برگ یا طوقه به‌همراه ٦/۲۵ میلی‌لیتر بافر استخراج مخلوط گردید و به‌مدت ۲٤ ساعت در یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه همراه بافر استخراج به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ٦۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۰/۱ میلی‌لیتر از فاز رویی برداشته و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف بیورد اضافه شد. مخلوط به‌دست آمده به‌مدت چند ثانیه تکان داده شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و با مقایسه منحنی جذب آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد، غلظت پروتئین محلول محاسبه شد.

اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید: این صفت در دو سطح دمایی شاهد (بوته‌های مستقر در گلخانه) و ٤+ درجه سانتی‌گراد، در بافت برگ و طوقه هر دو رقم مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت هیدروژن پراکسید براساس واکنش H_2O_2 با پتاسیم یدید (KI) و با روش Alexieva (۲۰۰۱) انجام شد. در این روش ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ و طوقه در تری‌کلرو استیک اسید یک درصد ساییده شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژگردید. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی ۵۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰میلی‌مولار (pH=۷) و ۲ میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از محنی استاندارد، میزان هیدروژن پراکسید برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

پراکسیداسیون چربی‌های غشا: غلظت مالون دی‌آلدهید در برگ به روش Stewart و Boyley (۱۹۸۰) تعیین شد. ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه برگی با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج تری‌کلرو استیک اسید (TCA) یک درصد هموژنه شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. یک میلی‌لیتر از محلول رویی به‌دست آمده با ٤ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد حاوی (TCA) ۲۰ درصد مخلوط و در حمام آب‌جوش (۹۵ درجه سلسیوس) به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس نمونه‌ها سریعاً سرد و مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. برای حذف اثر ترکیبات مزاحم، جذب نمونه‌ها در طول‌موج ٦۰۰ نانومتر (A٦۰۰) خوانده شد و از مقدار جذب آنها در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر (A532) کم شد. غلظت نهایی مالون دی‌آلدهید با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۱۱۵۵محاسبه و برحسب میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد.

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه 9.4) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی اثر تیمارهای دمایی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت برگ و طوقه دو رقم سلوا و کوئین الیزا نشان داد که اثر تیمارهای دمایی، رقم و نوع بافت بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح یک درصد معنی‌دار شد. در حالی‌که اثر متقابل رقم و دما نیز در سطح پنج درصد معنی‌دار شد، سایر اثرات متقابل دوگانه و برهمکنش سه گانه بین رقم، بافت و دما معنی‌دار نشد (جدول ۱). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز طی اعمال تنش در رقم کوئین الیزا بیشتر از سلوا بود. همچنین در بافت برگ بیشتر از طوقه و در مقایسه بین دماهای ٤+ و ٦- درجه سانتی‌گراد، در دمای ٦- درجه سانتی‌گراد سطح این آنزیم بالاتر بود. بالاترین سطح این آنزیم (۰/۷٦۲ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در بافت برگ رقم کوئین الیزا و در دمای ٦- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و پایین‌ترین مقدار آن (۰/۱۹۹ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در بافت طوقه رقم سلوا در دمای ٤+ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۱a).

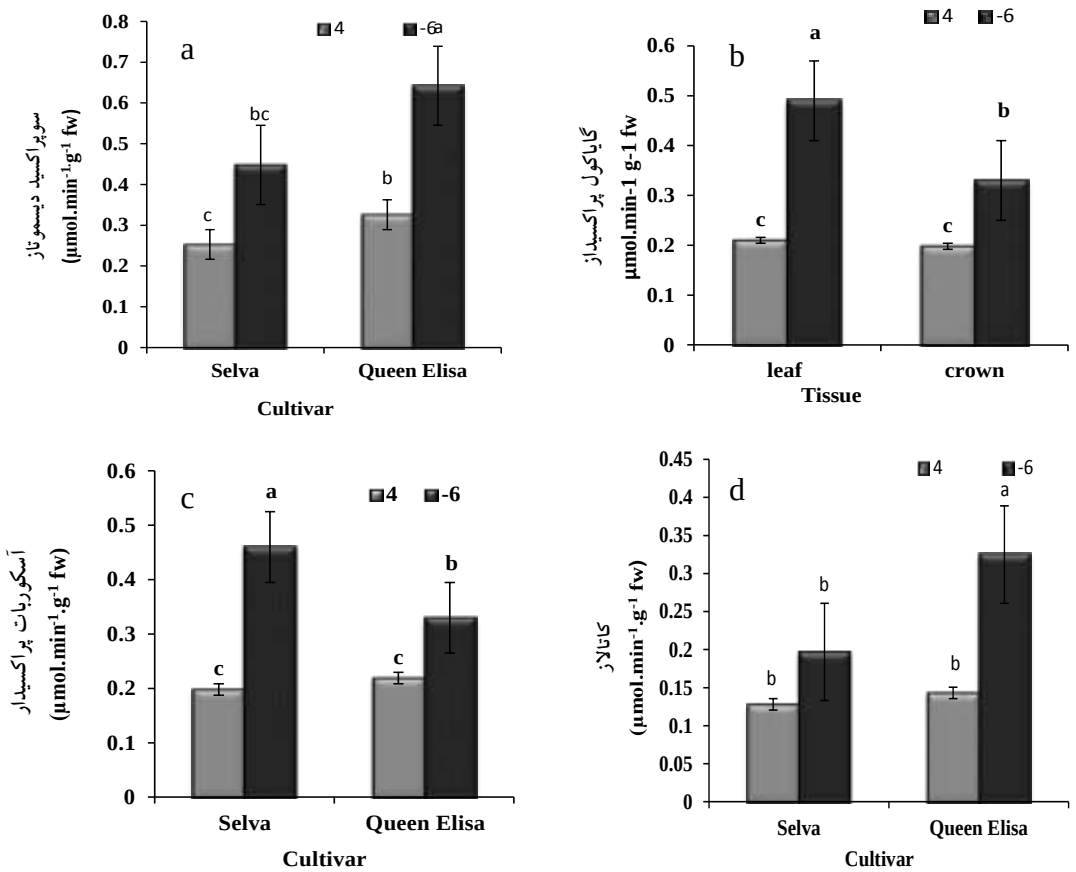
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تنش سرما بر فعالیت چهار آنزیم اکسیداتیو در دو بافت مختلف از توت‌فرنگی رقم سلوا و کوئین الیزا

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		سوپراکسید دیسموتاز	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز
رقم	۱	۰/۰۸۲**	۰/۰۰۱۵**	۰/۰۱۸ns	۰/۰۲۷**
بافت	۱	۰/۱۱**	۰/۰۰۱**	۰/۰٤*	۰/۰۳٤**
دما	۱	۰/۳۱۵**	۰/۰۰۳۸**	۰/۲۱**	۰/۰۷٦**
رقم × بافت	۱	۰/۰۰۱۱ns	۰/۰۰۰۲*	۰/۰۰۰۰٤ns	۰/۰۰۰٦ns
رقم × دما	۱	۰/۰۲۲*	۰/۰۰۰٦۷**	۰/۰۲۳*	۰/۰۱۷**
بافت × دما	۱	۰/۰۱۱ns	۰/۰۰۰۱٦*	۰/۰۲۲*	۰/۰۰۲۵ns
رقم × بافت × دما	۱	۰/۰۰۹ns	۰/۰۰۰۱ns	۰/۰۰۰۳٦ns	۰/۰۰۰۵ns
خطا	۱٦	۰/۰۰٤۱	۰/۰۰۰۰۲۸	۰/۰۰٤۹	۰/۰۰۱٤
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱٤/۷۷	۱۸/۵۰۳	۲۳/۳٦	۱۸/۷۷

ns، * و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم‌اثر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد و معنی‌دار در سطح یک درصد



شکل ۱- اثر تنش سرما بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (a)، گایاکول پراکسیداز (b)، آسکوربات پراکسیداز (c) و کاتالاز (d) در دو بافت مختلف از توت‌فرنگی رقم سلوا و کوئین الیزا. در هر شکل، حروف مشابه نشان‌دهنده عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

اثر تیمارهای دمایی، رقم و نوع بافت و همچنین اثر متقابل رقم و دما بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در سطح یک درصد معنی‌دار شد. اثرات متقابل دوگانه رقم و بافت و بافت و دما در سطح پنج درصد معنی‌دار شد و اثر متقابل سه‌گانه معنی‌دار نشد (جدول ۱). براساس مقایسه میانگین‌ها، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در رقم سلوا بیشتر از کوئین الیزا، در بافت برگ بیشتر از طوقه و در دمای ٦- درجه سانتی‌گراد بیشتر از ٤+ درجه سانتی‌گراد است. بالاترین سطح این آنزیم (۰/۰۷۱ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر)در بافت برگ رقم سلوا در دمای ٦- درجه سانتی‌گراد و کمترین مقدار (۰/۰۱۰۳ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در بافت طوقه رقم کوئین الیزا و در دمای ٤+ دیده شد (شکل ۱b).

آسکوربات پراکسیداز در سلوا سطح بالاتری نسبت به کوئین الیزا دارد و در بافت برگ بیشتر از طوقه دیده می‌شود، همچنین با کاهش دما سطح این آنزیم افزایش می‌یابد (جدول ۱). بیشترین سطح فعالیت آنزیم (۰/۵۳۲ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در بافت برگ رقم سلوا در ٦- درجه سانتی‌گراد است و کمترین میزان آن (۰/۱۸۲ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در بافت طوقه کوئین الیزا و در دمای ٤+ درجه سانتی‌گراد بود. همان‌طور که از نتایج برآورد می‌شود سطوح آنزیم‌های اکسیداتیو طی کاهش دما افزایش یافته است (شکل ۱c).

مقدار کاتالاز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر فاکتورهای رقم، بافت و دما قرار گرفته است و تنها اثر متقابل معنی‌دار، برهمکنش بین رقم و دما است (جدول ۱). مقدار این آنزیم در رقم کوئین الیزا بیشتر از سلوا است و با کاهش دما روند افزایشی دارد و مانند سایر آنزیم‌ها در بافت برگ بیشتر مشاهده شد (شکل ۱d).

احتمالاً بافت طوقه به‌دلیل مقاومت ذاتی بیشتر، ارتباط نزدیکتر با خاک و درنتیجه تعادل دمایی بیشتر نسبت به برگ، نیاز کمتری به تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارد به همین دلیل است که کمترین سطوح آنزیمی در طوقه مشاهده شدند.

سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان اولین سد دفاعی در مقابل حمله اکسیژن های فعال عمل می‌کند. این آنزیم نقش مرکزی در مکانیسم دفاعی ارگانیسم‌ها در برابر گونه‌های اکسیژن فعال دارد که در طی تنش‌های محیطی تولید می‌شود و جلوگیری از خسارات ناشی از تنش اکسیداتیو را به عهده دارد (Bennicelli *et al.*, 1999). سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز آنزیم‌های مقاومت به تنش‌اند و درنتیجه سطوح آنها در ارقام مقاوم بالاتر است، در مقابل آسکوربات پراکسیداز و گایاگول پراکسیداز آنزیم‌های پاسخ به تنش هستند و در ارقام حساس سطح بالاتری دارند، که با یافته‌های ما در این پژوهش مطابقت دارد.

نتایج آزمایشی در زمینه ارزیابی تغییر آنزیم‌های ضداکسایشی در دو رقم توت‌فرنگی تحت شرایط دمای پایین، نشان داد فعالیت آنزیم SOD در شروع تیمار سرما سریعاً افزایش یافت و به حداکثر میزان خود رسید (Luo *et al.*, 2011). در آزمایشی روی گیاه سینرر نتایج نشان داد با شروع تیمار سرما (٦+ درجه سانتی‌گراد) فعالیت SOD در برگ‌ها افزایش یافته اما با طولانی‌شدن مدت سرما کاهش یافته و به سطح ثابتی رسیده است (Ge-xiang, 2004).

پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تحمل گیاه به تنش‌های غیرزنده مانند تنش سرما همبستگی وجود دارد و گیاهانی که دارای سطوح بالاتری از آنتی‌اکسیدانت‌ها هستند، مقاومت بیشتری را به آسیب‌های اکسیداتیو نشان می‌دهند (Guo *et al.*, 2006).

نتایج آزمایش‌های مختلف هم نشان می‌دهد که با کاهش دما فعالیت آنزیم پراکسیداز به منظور جلوگیری از آسیب‌های وارده به گیاه ناشی از تنش سرما و تولید هیدروژن پراکسید افزایش می‌یابد (Yong *et al.*, 2005). یکی از دلایل تحمل بیشتر رقم کوئین الیزا می‌تواند، فعالیت بیشتر آنزیم‌های سوپراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز نسبت به رقم حساس‌تر سلوا و درنتیجه حذف کاراتر هیدروژن پراکسید باشد. Tasgin و همکاران (۲۰۰٦) دریافتند که در گندم نیز تیمار سرما موجب افزایش فعالیت پراکسیدازها می‌شود. مطالعات انجام‌شده روی پنج کلون گلایول Bettaieb و همکاران (۲۰۰۷) و یک رقم کلزای مقاوم به سرما Fahimirad

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

و همکاران (۲۰۱۳) در مقایسه با شاهد غیرمقاوم نشان‌دهنده فعالیت بیشتر آنزیم کاتالاز در هنگام بروز تنش سرما بود. همچنین در یک رقم یونجه مقاوم به سرما فعالیت آنزیمی بیشتر از رقم حساس بود. مطالعات مختلف روی نخود ونایی و همکاران (۱۳۹۱)، گندم Baek و Skinner (۲۰۰۳) و Javadian (۲۰۱۰)، توت‌فرنگی Luo و همکارن (۲۰۱۱) و جو Radyuk و همکارن (۲۰۱۰) هم نشان می‌دهد که بین فعالیت آنزیم‌های ضداکسایشی با تحمل گیاه به تنش سرما همبستگی مثبت وجود دارد. نتایج تحقیقات در زمینه مرکبات نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تنها در ارقام مقاوم به سرمای این دسته افزایش نشان داده است (Gilmour and Thomashow, 1991).

در پژوهشی در زمینه مقاومت به سرمای چای مشخص شد که سه آنزیم مهم آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در اثر کاهش دما فعالیت خود را با هدف خنثی‌کردن و به حداقل رساندن آسیب‌های اکسیداتیو افزایش می‌دهند (سریری و همکاران، ۱۳۹٤). پاسخ دانهال‌های نوعی از غلات (Buckwheat) به سرمای چهار درجه سانتی‌گراد نشان داد که تحت تأثیر این تنش میزان آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به‌ترتیب ۳۳ و۲۲ درصد نسبت به شاهد افزایش یافته است (Lucic *et al*., 2009). Yong و همکاران (۲۰۰۹) طی بررسی پاسخ‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی توت‌فرنگی تیوناکا (Toyonaka) در واکنش به تیمار سرما، دریافتند که فعالیت این آنزیم‌ها طی کاهش دما افزایش می‌یابد که نتایج پژوهش حاضر با آن مطابقت دارد.

نشت یونی: نتایج تجزیه واریانس میزان نشت یونی در رقم سلوا نشان داد که اثر دما بر میزان نشت یونی در سطح یک درصد معنی‌دار است اما اثر نوع بافت و همچنین برهمکنش نوع بافت و دما معنی‌دار نشد. در مقابل در رقم کوئین الیزا اثر بافت در سطح یک درصد و اثر تیمارهای دمایی و برهمکنش نوع بافت و تیمار دمایی در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). براساس جدول مقایسه میانگین (جدول ۳) میزان نشت یونی با کاهش دما افزایش یافت و بالاترین میزان نشت (٤۲/۲ درصد) را بافت طوقه این رقم در دمای ۹- درجه سانتی‌گراد داشت که تفاوت معنی‌داری با بافت برگ در این دما مشاهده نشد.

در رقم کوئین الیزا، همان‌طور که پیش‌بینی می‌شد طی کاهش دما نیز همواره میزان نشت یونی هم در برگ و هم در طوقه افزایش یافت و به بالاترین میزان خود در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد رسید. حداکثر نشت یونی در بافت طوقه و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد (٦۸/٤٤ درصد) بود که تفاوت معنی‌دار با میزان نشت برگ در همین دما دارد. در این رقم میزان نشت یونی برگ از دمای ۳- تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد بیشتر از طوقه بوده که با توجه به حساسیت بیشتر بافت برگ به سرما این روند طبیعی است، اما با رسیدن به دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد به یکباره میزان نشت طوقه به‌شدت افزایش یافت (جدول ٤).

غشاهای سلولی اولین نواحی هستند که تحت تأثیر آسیب‌های یخ‌زدگی قرار می‌گیرند. تنش دمای پایین باعث کاهش سیالیت غشا شده که در کنار پراکسیداسیون لیپیدها موجب تخریب غشا و درنتیجه افزایش نشت یونی می‌گردد (Campos *et al*., 2003). در پژوهشی روی نهال‌های زیتون، تنش یخ‌زدگی موجب تسریع تخریب غشا و درنتیجه، افزایش نشت یونی شد (Azzarello *et al*., 2009). نشت یونی کمتر در ارقام متحمل می‌تواند به‌دلیل پایداری بیشتر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی غشای پلاسمایی باشد. درجه آسیب به بافت با خسارت وارده به غشای پلاسمایی سلول‌های مزوفیل همبستگی دارد (Turner *et al*., 1993). مطالعات (Imani *et al*., 2011) روی مقاومت به سرمای ٦۰ رقم و ژنوتیپ بادام نشان داد که شدت آسیب یخ‌زدگی به ژنوتیپ گیاه بستگی دارد و ژنوتیپ‌هایی که مقاومت بیشتری دارند قطعاً نشت یونی کمتری خواهند داشت. بیشترین آسیب ناشی از تنش یخ‌زدگی درون سلولی است. گیاهان متحمل به یخ‌زدگی، می‌توانند یخ‌زدگی برون سلولی را بدون پذیرش خسارت تحمل کنند، اما قادر به تحمل یخ‌زدگی درون سلولی نیستند (میرمحمدی میبدی و ترکش اصفهانی، ۱۳۸۳).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تنش سرما بر میزان نشت یونی بافت‌های توت‌فرنگی رقم‌های سلوا و کوئین الیزا تحت تأثیر دماهای مختلف

تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات نشت یونی در رقم سلوا	درجه آزادی	میانگین مربعات نشت یونی در رقم کوئین الیزا
بافت	۱	۰/۰۱۸^{ns}	۱	۲٤۸/۸*
دما	۳	۰/۲۹٦**	٦	۲۱٤۸/۰۱**
بافت × دما	۳	۰/۰۱۱^{ns}	٦	۲۲۱/۰۷**
خطا	۳۲	۰/۰۰۸	٥٦	۳٥/۸۱
ضریب تغییرات (درصد)	-	٦/۳۹		۱٦/٥٤

^{ns}، * و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم‌اثر معنی‌دار، معنی‌دار درسطح پنج درصد و معنی‌دار در سطح یک درصد

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر تنش سرما بر تغییر میزان نشت یونی بافت‌های رقم سلوا تحت تأثیر چهار دمای مختلف

بافت مورد بررسی	دما (درجه سانتی‌گراد)			
	شاهد	-۳	-٦	-۹
برگ	۱٤/۹۹^{d}	۲۸/۷۸^{bc}	۳۱/۲۸^{bc}	۳۸/۳۷^{ab}
طوقه	۱٥/۰۹^{d}	۲۲/٦٥^{cd}	۲٦/۲٦^{c}	٤۲/۲^{a}

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر تنش سرما بر تغییرات میزان نشت یونی بافت‌های رقم کویین الیزا تحت تأثیر هفت تیمار دمایی مختلف

بافت مورد بررسی	تیمار دمایی						
	شاهد	-۳	-٦	-۹	-۱۲	-۱٥	-۱۸
برگ	۱٦/٤۹^{g}	۳۰/۸٤^{e}	۳۲/٥۰۸^{de}	٤۰/۱۷^{cd}	٤۰/۲۹^{cd}	٥۲/٦^{b}	٥۳/٤٥^{b}
طوقه	۱۸/۲۹^{g}	۲۰/٤٥^{fg}	۲۷/٤۸^{ef}	۲۸/٤٦^{e}	۳۱/۰٦۹^{e}	٤٥/۷۸^{bc}	٦۸/٤٤^{a}

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ویژگی‌های پرولین، پروتئین کل، هیدروژن پراکسید، مالون دی‌آلدهید و کربوهیدرات در جدول ۵ گزارش شده است.

پرولین: نتایج حاضر طی اعمال تنش روی هر دو رقم نشان می‌دهد که بین این هر دو رقم، بافت طوقه و برگ و همچنین دماهای اعمال‌شده تفاوت معنی‌دار است. اما بین هیچ یک از برهمکنش‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۵). طبق جدول مقایسه میانگین‌ها رقم سلوا پرولین بیشتری نسبت به کوئین الیزا تولید کرده است، همچنین بافت طوقه به مقدار قابل توجهی پرولین دارد. بالاترین میزان پرولین (۰/۱٤۸میکرو مول بر گرم وزن تر) مربوط به بافت طوقه رقم سلوا در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد است در حالی‌که کمترین میانگین (۰/۰٦۹ میکرومول بر گرم وزن تر) مربوط به بافت برگ رقم کویین الیزا در نمونه شاهد است (شکل ۲).

یک تنظیم‌کننده اسمزی اصلی است که در واکنش به تنش‌های محیطی در گونه‌های مختلف گیاهی تجمع می‌یابد. این ترکیب اثرات مثبتی بر پایداری غشا و آنزیم‌ها داشته و در سازگاری و تعدیل تنظیمات اسمزی در گیاهان تحت تنش نقش دارد (Ashraf and Foolad, 2007). افزایش پرولین در گیاهان، هنگام تنش یک نوع مکانیسم دفاعی است. پرولین با

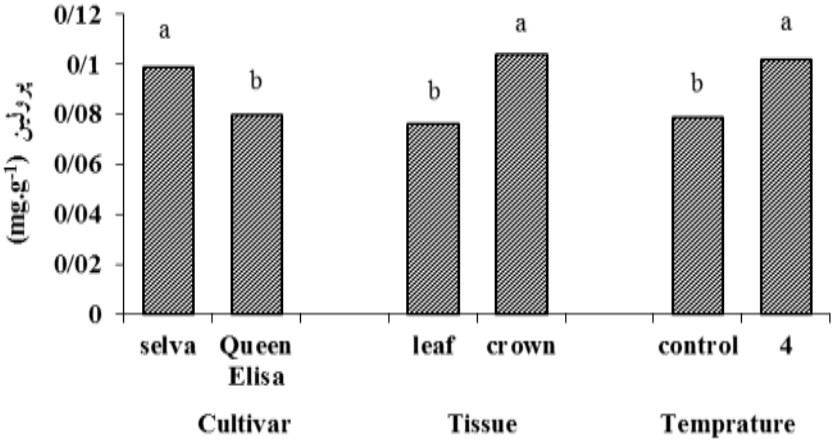
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تنش سرما بر تغییرات پرولین، پروتئین کل، هیدروژن پراکسید، مالون دی‌آلدهید و قندهای محلول در دو بافت مختلف از دو رقم توت‌فرنگی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		پرولین	پروتئین کل	هیدروژن پراکسید	مالون دی‌آلدهید	کربوهیدرات
رقم	۱	۰/۰۰۱۶*	۰/۰۰۲ns	۲۵۵۹/۵**	۰/۰۴۴**	۶۲/۷*
بافت	۱	۰/۰۰۳**	۰/۰۰۰۴ns	۴۰۳۱۱/۶۸**	۰/۰۹۳**	۵۶/۶۸*
دما	۱	۰/۰۰۲۵*	۳/۹۶۵**	۶۸۳۸۴/۳۴**	۰/۴۱**	۶۰۸/۳۱**
رقم × بافت	۱	۰/۰۰۰۹۸ns	۰/۰۰۰۳ns	۵۲۶۵/۲۵**	۰/۰۲۳*	۰/۲۲۲ns
رقم × دما	۱	۰/۰۰۰۸۱ns	۰/۰۰۱ns	۳۹۲۴/۷**	۰/۰۰۵۸ns	۲/۷۱ns
بافت × دما	۱	۰/۰۰۰۷ns	۰/۰۰۹*	۴۴۴۵/۳۹**	۰/۰۶۲**	۷/۸۵ns
رقم × بافت × دما	۱	۰/۰۰۰۹ns	۰/۰۰۱ns	۳۷۵۸/۶۶**	۰/۰۲۴*	۳/۰۲۳ns
خطا	۱۶	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۲	۲۲۵/۵۵	۰/۰۰۲۸	۱۹/۱۴
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۹/۹۵	۴/۳۱	۱۴/۴۴	۱۵/۰۹	۱۲/۴۹

ns، * و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم‌اثر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد و معنی‌دار در سطح یک درصد



شکل ۲- اثر تنش سرما بر میزان پرولین در ارقام، بافت‌ها و دماهای مختلف. در هر شکل، حروف مشابه نشان‌دهنده عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

چندین مکانیسم مانند پاک‌کردن رادیکال‌های هیدروکسیل، جلوگیری از دناتوره‌شدن آنزیم‌ها و حفظ سنتز پروتئین، تحمل گیاه را در برابر تنش بالا می‌برد (Kuznetsov and Shevyakova, 1997). تولید این ترکیب موقعی زیاد است که تنش سرما همراه با کاهش محتوای آبی باشد و تنش خشکی ایجاد شود و در هنگام تولید یخ در بافت‌های گیاه در دماهای زیر صفر که تنش خشکی شدید می‌شود، تولید آن به مقدار زیاد افزایش می‌یابد (Seppanen, 2000).

طی پژوهش کرمی (۱۳۹۵) که به منظور ارزیابی مقاومت به سرمای چندین رقم توت‌فرنگی صورت گرفت، مشخص شد که در روند کاهش دما ارقام حساس سریع‌تر از ارقام مقاوم سطح پرولین خود را افزایش می‌دهند که با نتایج تحقیقات ما مطابقت داشت. همچنین مشخص شد که با وجود روند تغییرات یکسان هر دو بافت، حساسیت طوقه به کاهش دما بیشتر از برگ بوده و غلظت پرولین در این بافت سریع‌تر افزایش یافته که این مطلب بالابودن سطح پرولین طوقه نسبت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

به برگ را در پژوهش حاضر توجیه می‌کند.

علیرغم بررسی‌های فراوانی که دلالت بر رابطه مثبت بین تجمع پرولین با تحمل تنش در گیاهان وجود دارد، بعضی عقیده دارند که افزایش غلظت پرولین، حاصل شرایط تنش است نه واکنش سازگاری به تنش. برخی مطالعات نشان می‌دهد که پرولین در گیاهان حساس به سرما، مقاومت را القا می‌کند و در برابر سرماهای شدید کارایی کمتری دارد (Ghasemi Soluklui *et al*., 2014). از آنجا که همه گیاهان قادر به تولید طبیعی و تجمیع پرولین در واکنش به تنش نیستند، تحقیقات گسترده‌ای در زمینه مصرف خارجی آن و یا انتقال ژن‌های تولیدکننده پرولین به گیاهان انجام شده است (Ashraf and Foolad, 2007).

در تعدادی از گیاهان غلظت پرولین تحت شرایط تنش سرما تا ۱۰۰ برابر شرایط نرمال افزایش می‌یابد (Matysik *et al*., 2002). Ashraf و Foolad (۲۰۰۷)، اظهار داشتند وجود غلظت‌های بالایی از پرولین و یا بتائین در گیاه برنج باعث افزایش مقاومت به تنش سرما از طریق افزایش میزان ایمنی در برابر عواقب نامطلوب بیولوژیکی ناشی از تنش سرما می¬گردد. Aslamarz و همکاران (۲۰۱۱) در طی مقایسه سه روش تعیین سازگاری به سرما، عنوان کردند که بین افزایش غلظت پرولین در ساقه‌های گردو با مقاومت به دمای پایین همبستگی وجود دارد. همچنین در طی آنالیز مقایسه‌ای سازگاری و عدم‌سازگاری به سرمای طبیعی دو رقم ماگنولیا توسط Yang و همکاران (۲۰۱۵) مشخص شد که در روند کاهش دما طی زمستان در هر دو رقم سطح پرولین افزایش یافته، اما این افزایش در رقم مقاوم‌تر *Magnolia denudata* بیشتر بوده است.

پروتئین: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان می‌دهد که تیمار اعمال‌شده روی رقم و بافت تأثیر معنی‌داری نداشته اما تفاوت بین دماها قابل توجه و معنی‌دار است و تمامی برهمکنش‌ها به جز اثر متقابل بافت و دما فاقد اختلاف معنی‌دار بودند. بیشترین مقدار پروتئین (۱/۴۷ میلی‌گرم بر گرم) در طوقه رقم سلوا و در ٤ درجه سانتی‌گراد و کمترین مقدار آن (۰/۵۹میلی‌گرم بر گرم) در طوقه کوئین الیزای شاهد مشاهده شد (شکل ۳). مقدار پروتئین در رقم حساس سلوا همان‌طور که انتظار می‌رفت بیشتر بود که با نتایج کرمی (۱۳۹۵) که دریافته بود تغییرات سطح پروتئین در ارقام حساس توت‌فرنگی سریع‌تر و بیشتر است مطابقت داشت. ارقام مقاوم احتمالاً چون کمتر تحت تأثیر کاهش دما قرار می‌گیرند پس به نسبت تغییرات کمتری هم نشان می‌دهند.

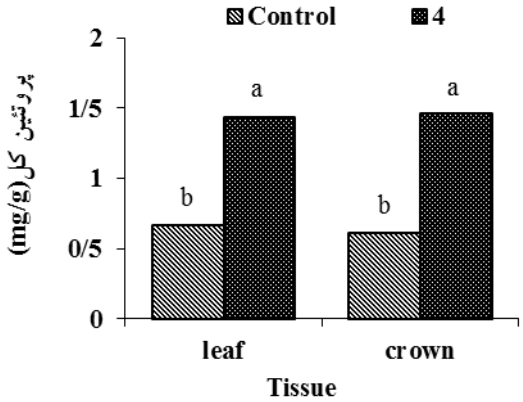
علاوه بر چربی‌های غشا، پروتئین‌ها نیز نقش مهمی در ثبات و پایداری غشا بازی می‌کنند. تجزیه پروتئومیک آخرین تکنولوژی بکار گرفته برای مطالعه تغییراتی است که در جریان سازگارشدن به سرما و یخ‌زدگی در غشای پلاسمایی اتفاق می‌افتد (Uemura *et al*., 2006). تغییرپذیری پروتئین‌ها یک قسمت ضروری از پاسخ به تنش‌های محیطی در گیاهانی است که به‌خوبی به شرایط محیطی سازگار شده‌اند (Vierstra, 1993). فرم‌های مختلف اکسیژن در حمله به پروتئین‌ها، واکنش برگشت‌ناپذیری انجام می‌دهند، مانند اکسیدشدن آهن سولفور به‌وسیله سوپراکسید که ساختمان آنزیم را تخریب می‌کند (Davies, 1987).

در آزمایشی به‌منظور دستیابی به درک صحیحی از اساس مولکولی مقاومت به سرمای زمستانه، طوقه‌های چند رقم توت‌فرنگی که از نظر تحمل یخ‌زدگی با یکدیگر متفاوت بودند، مورد مقایسه قرار گرفتند و متحمل‌ترین رقم به سرما،"جونسوک (Jonsok) و کم تحمل‌ترین رقم،" فرایدا (Frida) مورد مطالعه پروتئومیک قرار گرفتند که براساس تجزیه آماری پروتئومیکس کمی، ۱۳۵ پروتئین که میزان بیان آنها در بافت‌های طوقه دو رقم تحت تیمارهای سرما اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند، شناسایی شدند (Koehler *et al*., 2012).

Rohloff و همکاران (۲۰۱۲)، نمونه‌های طوقه دو رقم توت‌فرنگی "پلکا" و "هانوی" را در شرایط طبیعی مزرعه، در چند مرحله طی یک دوره ۱۵ هفته‌ای از اوایل مهر تا اوایل دی‌ماه به‌وسیله دستگاه qGC MS مورد تجزیه قرار دادند. نتایج نشان داد همراه با افزایش قابل توجه مونوساکارید (فروکتوز)،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]



شکل ۳- اثر تنش سرما بر میزان پروتئین کل بافت برگ و طوقه در دماهای مختلف. در هر شکل، حروف مشابه نشان‌دهنده عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

تغییراتی هم در اسیدهای آمینه (گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید و آسپارژین) رخ داده است. تغییرات متابولیکی اصلی در هر دو رقم همزمان با کاهش طول روز به زیر ١٤ ساعت در اواخر شهریور و افت میانگین دمای روزانه به زیر ١٠ درجه سانتی‌گراد در اوایل مهرماه بود. Kosakivska و همکاران (٢٠٠٨) تنش ٤ درجه سانتی‌گراد، را به‌مدت سه روز روی فلفل بررسی کردند، نتایج آنها نشان داد که سرما موجب افزایش پروتئین محلول کل در برگ گیاه می‌شود. همچنین پژوهش افشار محمدیان و همکاران (١٣٩١) که بروی دو رقم زیتون انجام شده بود نشان داد که میزان پروتئین کل در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بوده است. طی بررسی پاسخ به سرما چند رقم انگور مشخص شد که در روند کاهش دما در تمامی ارقام سطح پروتئین کل افزایش یافته است (کریمی علویجه و همکاران، ١٣٩٤).

هیدروژن پراکسید: میزان هیدروژن پراکسید به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، بافت و دما قرار گرفت و تمامی برهمکنش‌ها نیز معنی‌دار شدند (جدول ٥). بالاترین میزان هیدروژن پراکسید (٢٦٧/٠٥ میکرومول بر گرم وزن تر) در بافت برگ رقم کوئین الیزا در ٤ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و حداقل سطح (١٥/٥٣ میکرومول بر گرم وزن تر) آن در بافت طوقه همین رقم در نمونه شاهد بود، و رقم کوئین الیزا نسبت به سلوا هیدروژن پراکسید بیشتری تولید کرده، همچنین سطح این ماده در بافت برگ بیشتر از طوقه بوده و با کاهش دما نیز مقدارش افزایش یافته است (جدول ٦).

یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاهان تحت شرایط تنش¬ها از جمله تنش دمای پایین، خشکی و شوری اتفاق می‌افتد، تولید گونه¬های انفعالی اکسیژن مانند سوپراکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) در کلروپلاست و میتوکندری‌ها است (Bakalova *et al.*, 2004). این اکسیژن¬های فعال بسیار واکنش¬گر بوده و در صورت عدم‌وجود برخی سازوکارهای محافظت‌کننده می‌توانند باعث از بین‌بردن متابولیسم طبیعی گیاه از طریق خسارت اکسیداتیوی به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شوند (Allen and Ort, 2001).

مقدار تولید گونه‌های فعال اکسیژن بسته به نوع گونه، مدت تنش، سن گیاه و مهم‌تر از همه شدت تنش است (Navari-Izzo *et al.*, 1998). در میان گونه‌های فعال اکسیژن، هیدروژن پراکسید به‌علت ثبات بیشتر و نیمه عمر طولانی‌تر بهترین موقعیت را به‌عنوان سیگنال مولکولی دارد و مقدار آن در معرض تنش محیطی تغییر می‌کند (Si *et al.*, 2017). نتایج حاصل از برخی پژوهش‌ها از جمله آزمایشی که Apostolova و همکاران (٢٠٠٦)، بر روی دو رقم گندم تحت تنش سرما انجام دادند و اعلام کردند تنش سرما موجب افزایش ٤٠٪ هیدروژن پراکسید در گندم زمستانه شد در حالی‌که این مقادیر در گندم بهاره حتی تا ١٠٠٪ هم رسید و Valizadeh-Kamran و همکاران (٢٠١٧) که ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

جدول ٦- مقایسه میانگین اثر تنش سرما بر هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدهید در دو بافت مختلف از دو رقم توت‌فرنگی

تیمار			هیدروژن پراکسید (میکرومول بر گرم وزن تر)	مالون دی‌آلدهید (میکرومول بر گرم)
سلوا	برگ	شاهد	۷۷/۰۳^{d}	۰/۱۷۹^{c}
		+٤	۱٦۲/۹۷^{b}	۰/۲٤۷^{c}
	طوقه	شاهد	۲۵/٤۲^{e}	۰/۲۰۲^{c}
		+٤	۱۰٦/۸۵^{c}	۰/٦۲۳^{a}
کویین الیزا	برگ	شاهد	۷٦/۷۸^{d}	۰/۲۳٦^{c}
		+٤	۲٦۷/۰۵^{a}	۰/۵۰۷^{a}
	طوقه	شاهد	۱۵/۵۳^{e}	۰/۲٦۲^{c}
		+٤	۹۸/۰۸^{cd}	۰/٦۱۲^{a}

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

چند ژنوتیپ جو را تحت تنش سرما بررسی کردند و دریافتند که با کاهش دما از ۲۰ تا ٤- درجه سانتی‌گراد در تمامی ژنوتیپ‌ها اعم از حساس و مقاوم مقدار هیدروژن پراکسید افزایش یافته است، با نتایج پژوهش ما مطابقت دارد.

پراکسیداسیون چربی‌های غشا: میزان مالون دی‌آلدهید به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع بافت و دما قرار گرفت اما اثر متقابل این فاکتورها معنی‌دار نشد (جدول ۵). با کاهش دما مقدار مالون دی‌آلدهید افزایش یافته که این افزایش در بافت طوقه مشهودتر است اما بین ارقام تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بالاترین میزان مالون دی‌آلدهید (۰/٦۲۳ میکرومول بر گرم) در بافت طوقه رقم سلوا در ٤ درجه سانتی‌گراد دیده شد اگر چه با بافت طوقه رقم کوئین الیزا در همین دما اختلاف معنی‌داری نداشت. ارقام حساس احتمالاً طوقه حساس‌تری دارند بنابراین انتظار می‌رود که با کاهش دما این بافت تغییرات بیشتری نسبت به برگ نشان دهد (جدول ٦).

یکی از واکنش¬هایی که در شرایط تنش و در حضور اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا می¬کند، پراکسیداسیون چربی¬های غشایی است و این می¬تواند منجر به پارگی غشا سلولی در گیاهان شود (Hernandez *et al.*, 2000). مالون دی‌آلدهید که محصول تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع هیدروپروکسیداز و پراکسیداسیون لیپیدها تحت تأثیر تنش‌های اکسیداتیو است، به‌عنوان یک مارکر زیستی مناسب برای اکسیداسیون لیپیدها مورد استفاده قرار می¬گیرد (Soleimanzadeh *et al.*, 2010). غلظت آن در محدوده نانومولار است و فرایندهای شدید پراکسیداسیون لیپید از قبیل تخریب و تبدیل غشا درنتیجه تنش اکسیداتیو یا تغییرات مورفولوژیکی باعث افزایش در غلظت آن می¬شود (Yan *et al.*, 1996).

کرمی (۱۳۹۵) طی بررسی مقاومت هفت رقم توت‌فرنگی به دماهای پایین تحت شرایط کنترل‌شده مشاهده کردند که با کاهش دما میزان این ماده افزایش یافته و مقدار آن در رقم‌های مقاومی مثل کوئین الیزا و کراسنی برگ و کردستان نسبت به ارقام حساس بسیار کمتر است و همچنین میزان مالون دی‌آلدهید در بافت طوقه این ارقام هم نسبت به برگ کمتر است اگر چه سطح آن در هر دو بافت در روند کاهش دما افزایش می‌یابد. این نتایج با نتایج ما مطابقت داشت.

در آزمایشی روی دو رقم توت‌فرنگی، تنش دمای پایین در مدت زمان‌های مختلف منجر به افزایش مالون دی‌آلدئید در هر دو رقم شد (Yong *et al.*, 2008). در آزمایشی روی گیاه سینرر نتایج نشان داد در دماهای پایین‌تر، فعالیت SOD در برگ‌ها کاهش یافت. در حالی‌که مقدار مالون دی‌آلدئید و قندهای محلول به‌طور پیوسته افزایش نشان داد (Ge-xiang,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

2004). مطالعات Valizadeh-Kamran و همکاران (۲۰۱۷) که بروی چند ژنوتیپ جو انجام شده نشان می‌دهد که با کاهش دما در بازه ۲۰ تا ٤- درجه سانتی‌گراد مقدار مالون دی‌آلدهید افزایش یافته و در ٤- درجه سانتی‌گراد بالاترین میزان را داشته همچنین مقدار آن در ژنوتیپ‌های حساس بیشتر از ژنوتیپ‌های مقاوم جو بوده است.

میزان کربوهیدرات‌های محلول: نتایج حاصل از این بخش نشان می‌دهد که مقدار کربوهیدرات به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، بافت و دما قرار گرفته است. مقدار کربوهیدرات با کاهش دما افزایش یافته، همچنین در بافت طوقه بیشتر از برگ است (جدول ۵). بالابودن سطح کربوهیدرات در طوقه ارقام توت‌فرنگی دلالت بر حساسیت بیشتر طوقه به سرما و نقش کربوهیدرات‌های محلول در مکانیسم‌های درگیر در تحمل دمای پایین دارد. بالاترین سطح کربوهیدرات (۳۷/۲۷ میلی‌گرم بر گرم) را در بافت طوقه کوئین الیزا و در ٤+ می‌توان مشاهده کرد و کمترین مقدار (۲۰/۱۸ میلی‌گرم بر گرم) را در برگ سلوا در تیمار شاهد دیده شد (شکل ٤).

یکی از مهم‌ترین مشخصات گیاهان در شرایط تنش، افزایش تجمع کربوهیدرات‌ها است، زیرا آنها رابطه مستقیمی با فرایندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، انتقال و تنفس دارند. کربوهیدرات‌ها با بالابردن غلظت درون سلولی، مانع یخ‌زدن آن در اثر سرما می‌شوند. همچنین آنها از غشای پلاسمایی و پروتئین‌ها در برابر خسارت‌های تنش سرمایی محافظت می‌کنند (Kerepesi and Galiba, 2000). آنچه که تا کنون شناخته شده است این است که گیاهان طی زمستان سطوح بالاتری از کربوهیدرات‌های محلول مانند ساکارز، گلوکز، فروکتوز، استاکیوز، رافینوز و مانیتول را انباشته می‌کنند (Kaplan, 2007).

Ershadi و همکاران (۲۰۱٦) تغییرات کربوهیدرات‌های محلول در ۱۲ رقم انگور را در شرایط طبیعی مزرعه طی ماه‌های آذر تا فروردین مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد بین تغییرات سطوح کربوهیدرات با تغییر دمای LT50 در جوانه‌ها رابطه بسیار قوی وجود دارد. براساس این نتایج کربوهیدرات‌های محلول در مقایسه با میزان پرولین جوانه، شاخص بهتری برای ارزیابی تحمل به سرما در ارقام مورد آزمایش بودند. Nayyar و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی که روی گیاه نخود تحت تنش سرما انجام دادند اعلام نمودند میزان کربوهیدرات‌ها تحت تنش سرما افزایش یافت و در پایان تنش، کل کربوهیدرات‌های محلول در گیاهچه‌های سازگار نشده به سرما، ۱۰۳ میلی‌گرم بر گرم در مقایسه با ۱۹۷ میلی‌گرم بر گرم در گیاهچه‌های سازگارشده به سرما شده بود.

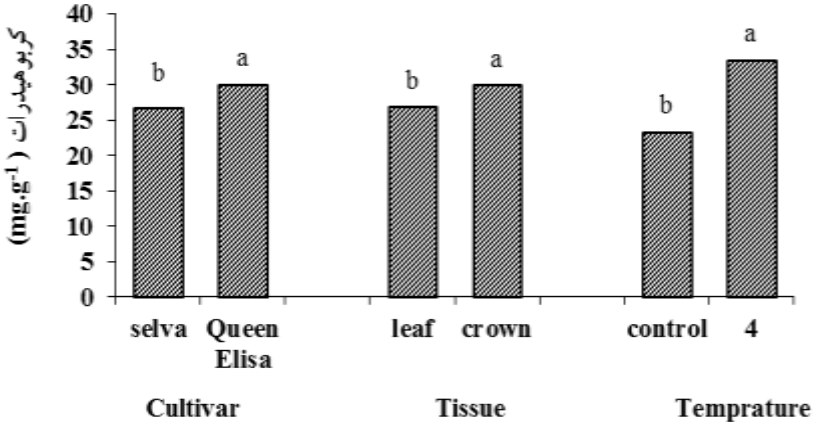
در آزمایشی تغییرات فصلی کربوهیدرات‌ها و ارتباط آنها با مقاومت به سرمای زمستانه ارقام تمشک مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج آزمایش سطوح بالای ساکارز، مقدار کل کربوهیدرات‌های محلول و نسبت بالای ساکارز به گلوکز و فروکتوز در شاخه‌ها و جوانه‌ها می‌توانند از شاخصه‌های یک رقم مقاوم باشند (Linden *et al.*, 2000). همچنین نتایج آزمایش ما با نتایج Kerepesi و همکاران (۲۰۰٤)، در گندم، Griffith و Yaish (۲۰۰٤) و Ershadi و همکاران (۲۰۱٦)، در انگور، مبنی بر ارتباط معنی‌دار غلظت کربوهیدرات‌های محلول با تحمل سرما و همچنین سطوح بالاتر کربوهیدرات‌های محلول در ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس، مطابقت دارد.

محتوای نسبی آب: طبق جدول تجزیه واریانس تنها تیمار دمایی تأثیر معنی‌داری بر محتوای نسبی آب داشته است که طی کاهش دما محتوای نسبی آب در هر دو رقم هم کاهش یافته که این امر در راستای ایجاد مقاومت به سرما صورت گرفته است (جدول ۷). در این شرایط کمترین محتوای نسبی آب مربوط به رقم سلوا در چهار درجه سانتی‌گراد است (شکل ۵).

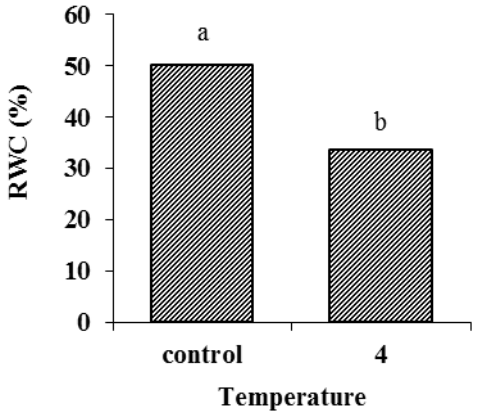
در آزمایشی عوامل دخیل در فرآیند سازگاری به سرما و نقش آنها در القای تحمل به یخ‌زدگی در بوته‌های توت‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت (Rajashekar and Panda, 2014). نتایج نشان داد که تنش آب قسمتی از فرآیند سازگاری به سرما و برای القای تحمل کامل به یخ‌زدگی در توت‌فرنگی ضروری است. آنچه مسلم است بین پتانسیل آب گیاه و محتوای نسبی آب برگ همبستگی مثبت و بالایی وجود دارد و گیاهانی که در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]



شکل ٤- اثر تنش سرما بر میزان کربوهیدرات در ارقام، بافت‌ها و دماهای مختلف. در هر گروه، حروف مشابه نشان‌دهنده عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.



شکل ٥- اثر دما بر محتوی نسبی آب در دو رقم توت‌فرنگی سلوا و کوئین الیزا. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم‌اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

جدول ۷- تجزیه واریانس اثر تنش سرما بر تغییرات میزان RWC دو رقم سلوا و کویین الیزا در دو دمای مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات RWC
رقم	۱	۳۳/۱۸$^{n.s}$
دما	۱	۱۷٦٥/٤**
رقم × دما	۱	۳/۹۸$^{n.s}$
خطا	۳۰	۳۱/٤۹
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۳/۳۱

ns، و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم‌اثر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح یک درصد

پایان دوره تنش بتوانند محتوای نسبی آب برگ بالاتری را حفظ کنند به لحاظ مقاومت به تنش نیز برتر خواهند بود. کاهش محتوای آب برگ باعث می‌شود که هدایت روزنه‌ای، فتوسنتز و آسیمیلاسیون دی‌اکسید کربن کاهش پیدا کند. اگر چه پایین‌بودن محتوی آب نسبی برگ در دماهای پایین در ارقام مقاوم می‌تواند ناشی از شکستن مولکول‌های درشت مانند

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

پلی‌ساکاریدها و تولید قندهای ساده‌تر باشد که منجر به افزایش پتانسیل اسمزی و کاهش محتوی آب نسبی می‌گردد (Joshi *et al.*, 2007).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که همواره با کاهش دما مقادیر پرولین، پروتئین کل، هیدروژن پراکسید، مالون دی‌آلدهید و کربوهیدرات افزایش یافته و عموماً سطح آنها در بافت طوقه بیشتر از برگ بوده است. پروتئین کل و کربوهیدرات، جز صفات سازگاری به تنش سرما محسوب می‌گردند و در کاهش خسارت سرما و یخ‌زدگی بافت‌های گیاهی نقش دارند و همان‌طور که پیش‌بینی می‌شد در طی تنش افزایش داشتند. سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز آنزیم‌های مقاومت به تنش‌اند و درنتیجه سطوح آنها در رقم متحمل بیشتر است، در مقابل آسکوربات پراکسیداز و گایاگول پراکسیداز آنزیم‌های پاسخ به تنش هستند و در رقم حساس، سطح بالاتری دارند. رقم متحمل سریع‌تر به کاهش دما پاسخ می‌دهند و با حذف سریع‌تر گونه‌های فعال اکسیژن منجر به کاهش آسیب‌های ناشی از تنش می‌شوند، و از آنجایی‌که برگ بیشتر و سریع‌تر از طوقه تحت تأثیر تغییر دما قرار می‌گیرد به‌نظر می‌رسد بالابودن سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برگ، امری طبیعی باشد.

منابع

افشار محمدیان، م.، رضایی، ش. و رمضانی ملک رودی، م.(۱۳۹۱) بررسی مقاومت دو رقم زیتون به تنش سرما. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۱: ۱۱-۱.

سریری، د.، رئوفی ماسوله، ع. و بخشی خانیکی، غ. ر. (۱۳۹٤) اثر سرما روی تخریب اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در برگ چای شمال ایران. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۲: ۲۹۲-۱۳۳.

کرمی، ف.، غلامی، م.، ارشادی، ا. و سی و سه مرده، ع. (۱۳۹۷) ارزیابی تحمل سرمای زمستانی و برآورد دمای بحرانی (LT50) در ۲۱ نژادگان توت‌فرنگی. علوم باغبانی ایران ٤۹: ۹۱-۷۹.

کرمی، ف. (۱۳۹۵) غربال‌گری برخی ارقام توت‌فرنگی در پاسخ به دماهای پایین براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی. پایان‌نامه دکتری، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

کریمی علویجه، م.، عبادی، ع.، موسوی، س. ا. و سلامی، س. ع. (۱۳۹٤) بررسی تغییرات آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و پروتئین کل در پاسخ به تنش سرما در برخی ارقام انگور. نشریه علوم باغبانی ۲۹: ۱۱۰-۱۰۳.

میرمحمدی میبدی، ع. م. و ترکش اصفهانی، س. (۱۳۸۳) مدیریت تنش‌های سرما و یخ‌زدگی گیاهان زراعی و باغی. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان، اصفهان.

ونایی، س.، سی و سه مرده، ع. و حیدری، غ. ر. (۱۳۹۱) اثرات تنش سرما در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی صفات فیزیولوژیکی در نخود (*Cicer arietinum*). پژوهش‌های زراعی ایران ۹: ٥۲٤-٥۱٤.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell and Environment 24: 1337-1344.

Allen, D. J. and Ort, D. R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends in Plant Science 6: 36-42.

Apostolova, P. and Yaneva, I. (2006) Antioxidative defence in winter wheat plants during early cold acclimation. Plant Physiology 101-108.

Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.

Aslamarz, A. A., Vahdati, K., Hassani, D., Rahemi, M., Mohammadi, N. and Leslie, C. (2011) Cold hardiness and its relationship with proline content in Persian walnut. Journal of Agronomy and Crop Science 76: 84-90.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

Azzarello, E. S., Pandolfi, C., Masi, E. Marone, E. and Mancuso, S. (2009) Comparing image (fractal analysis) and electrochemical (impedance spectroscopy and electrolyte leakage) techniques for the assessment of the freezing tolerance in olive. Trees 23: 159-167.

Baek, K. H. and Skinner, D. Z. (2003) Alternation of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of nearisogenic wheat lines. Plant Science 165: 1221-1227.

Bakalova, S., Nikolova, A. and Nedeva, D. (2004) Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. Journal of Plant Physiology 30: 64-77.

Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K. and Arora, S. (2013) Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. Journal of Plant Growth Regulation 32: 216-232.

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

Bennicelli, R., Stepniewskal, Z., Balakhninaz, T., Stepniewski, W. and Zuchowskil, J. (1999) Effect of soil re-oxidation on wheat (*Triticum aestivum* L.) defense system. International Agrophysics 13: 309-314.

Bettaieb, T., Mahmoud, M., Ruiz de Galarreta, J. I. and Du Jardin, P. (2007) Relation between the low temperature stress and catalase activity in gladiolus somaclones (*Gladiolus grandiflorus* Hort.). Scientia Horticulturae 113: 49-5.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Campos, P. S., nia Quartin, V., Chicho Ramalho, J. and Nunes, M. A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves ofCoffea sp. plants. Journal of Plant Physiology 160: 283-292.

Chance, B. and Maehly A. C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. In: Methods in Enzymology. (eds. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.) Pp. 764-775. Academic Press, New York.

Clarbone, A. (1985) Catalase Activity, Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. CRC Press, Florida, Boca Raton.

Davik, J., Koehler, G., From, B., Torp, T., Rohloff, J., Eidem, P., Wilson, R. C., Sonsteby, A., Randall, S. K. and Alsheikh, M. (2013) Dehydrin, alcohol dehydrogenase, and central metabolite levels are associated with cold tolerance in diploid strawberry (*Fragaria* spp.). Planta 237**:** 265-277.

Davies, K. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. Journal of Biological Chemistry 262: 9895-9901.

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: 350-356.

Ershadi, A., Karimi, R. and Mahdei, K. N. (2016) Freezing tolerance and its relationship with soluble carbohydrates, proline and water content in 12 grapevine cultivars. Acta Physiologiae Plantarum 38: 1-10.

Fahimirad, Sh., Ghasem Karimzadeh, Gh. and Ghanati, F. (2013) Cold-induced changes of antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. Journal of Plant Physiology and Breeding 3: 1-11.

Ge-xiang, Z. (2004) Effect of low-temperature stress on physiological reaction of cineraria. Journal of Nanjing Forestry University 5: 023.

Ghasemi Soluklui, A. A., Ershadi, A. and Fallahi, E. (2014) Paclobutrazol-induced biochemical changes in pomegranate (*Punica granatum* L.) cv. 'Malas saveh' under freezing stress. Ijhst 1: 181-190.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

Gilmour, S. J. and Thomashow, M. F. (1991) Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 17: 1233-1240.

Griffith, M. and Yaish, M. W. (2004) Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities. Trends in Plant Science 9: 399-405.

Gunes, A., Turan, M., Kitir, N., Mesut Cimrin, K., Yildirim, E. and Ercisli, S. (2016) Effects of bio-bor fertilizer applications on fruit yield, antioxidant enzyme activity and freeze injury of strawberry. Erwerbs-Obstbau 58: 177-184.

Guo, X., Zou, W., Lu, S. and Zhong, Q. (2006) Differential responses of anti-oxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology and Biochemistry 44: 828-836.

Hancock, J., Maas, J., Shanks, C., Breen, P. and Luby, J. (1991) Strawberries (fragaria) genetic resources of temperate. Fruit and Nut Crops 290: 491-548.

Hernandez, J., Jimenez, A., Mullineaux, P. and Sevilia, F. (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. Plant, Cell and Environment 23: 853-862.

Hincha, D. K. (2002) Cryoprotectin: A plant lipid–transfer protein homologue that stabilizes membranes during freezing. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 357: 909-916.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

Imani, A., Barzegar, K. and Piripireivatlou, S. (2011) Relationship between frost injury and ion leakage as an indicator of cold hardiness in 60 almond selections. International Journal of Nuts and Related Sciences 2: 22-26.

Javadian, N., Karimzadeh, G., Mahfoozi, S. and Ghanati, F. (2010) Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. Russian Journal of Plant Physiology 57: 540-547.

Joshi, S. C., Chandra, S. and Palni, L. M. S. (2007) Differences in photosynthetic characteristics and accumulation of osmoprotectants in saplings of evergreen plants grown inside and outside a glasshouse during the winter season. Photosynthetica 45: 594-600.

Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D. Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R. and Guy, C. L. (2007) Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. The Plant Journal 50: 967-981.

Kerepesi, I. and Galiba, G. (2000) Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Science 40: 482-487.

Kerepesi, I., Banyai-Stefanovits, E. and Galiba, G. (2004) Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. Journal of Plant Physiology 161: 131-133.

Koehler, G., Wilson, R. C., Goodpaster, J. V., Sonsteby, A., Lai, X., Witzmann, F. A., You, J. S., Rohloff, J., Randall, S. K. and Alsheikh, M. (2012) Proteomic study of low-temperature responses in strawberry cultivars (*Fragaria ananassa*) that differ in cold tolerance. Plant Physiology 159: 1787-1805.

Kosakivska Klymchuk, D., Negretzky, V., Bluma, D. and Ustinova, A. (2008) Stress proteins and ultrastructural characteristics of leaf cells of plants with different types of ecological strategies. Plant Physiology 34: 405-418.

Kuznetsov, V. V. and Shevyakova, N. I. (1997) Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. Physiologia Plantarum 100: 320-326.

Linden, L., Palonen, P. and Hytonen, T. (2000) Evaluation of three methods to assess winter-hardiness of strawberry genotypes. Acta Horticulturae 567: 325-328.

Linden, L., Seppanen, M., Vainola, A. and Palonen, P. (1999) Cold hardiness research on agricultural and horticultural crops in Finland. Agricultural and Food Science 8: 459-477.

Lucic, B., Jovanovic, Z., Radovic, S. and Maksimovic, V. (2009) Cold-induced response of buckwheat (*Fagopyrum esculemtum* moench) seedlings. Archives of Biological Sciences 61: 3-4.

Luo, Y., Tang, H. and Zhang, Y. (2011) Production of reactive oxygen species and antioxidant metabolism about strawberry leaves to low temperature. Journal of Agricultural Science 3: 89-96.

Maali-Amiri, R., Goldenkova-Pavlova, I., Yur'Eva, N., Pchelkin, V., Tsydendambaev, V., Vereshchagin, A., Deryabin, A., Trunova, T., Los, D. and Nosov, A. (2007) Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the Δ12-desaturase gene from cyanobacterium. Russian Journal of Plant Physiology 54: 600-606.

Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics 444: 139-158.

Matysik, J., Bhalu, B. and Mohanty, P. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science 82: 525-532.

Moffatt, B., Ewart, V. and Eastman, A. (2006) Cold comfort: Plant antifreeze proteins. Physiologia Plantarum 126: 5-16.

Moon, B. Y., Higashi, S., Gombos, Z. and Murata, N. (1995) Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 92: 6219-6223.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22: 867-880.

Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Pinzino, C., Vecchia, F. D. and Sgherri, C. L. (1998) Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper. Physiologia Plantarum 104: 630-638.

Nestby, R., Bjorgum, R., Nes, A., Wikdahl, T. and Hageberg, B. (2000) Winter cover affecting freezing injury in strawberries in a coastal and continental climate. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 75: 119-125.

Nayyar, H., Bains, T. and Kumar, S. (2005) Chilling stressed chickpea seedlings: Effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Environmental and Experimental Botany 54: 275-285.

Ouyang, L., Leus, L. and van Labeke, M. (2019) Three-year screening for cold hardiness of garden roses. Scientia Horticulturae 245: 12-18.

Radyuk, M. S., Domanskaya, I. N., Shcherbakov, R. A. and Shalygo, N. V. (2010) Effect of low above-zero temperature on the content of low-molecular antioxidants and activities of antioxidant enzymes in green barley leaves. Russian Journal of Plant Physiology 56: 175-180.

Rajashekar, C. B. and Panda, M. (2014) Water stress is a component of cold acclimation process essential for inducing full freezing tolerance in strawberry. Scientia Horticulturae 174: 54-59.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

Ritchie, S. W., Nguyen, H. T. and Holaday, A. S. (1990) Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Science 30: 105-111.

Rohloff, J., Eidem, P., Davik, J. and Alsheikh, M. (2012) Metabolic cold acclimation of 'Polka' and 'Honeoye' strawberries under natural field conditions. Acta Horticulturae 1049: 463-466.

Seppanen, M. M. (2000) Characterization of freezing tolerance in *Solanum commersonii* (Dun.) with special reference to the relationship between freezing and oxidative stress. PhD Thesis, University of Helsinki.

Si, T., Wang, X., Wu, L., Zhao, C., Zhang, L., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., Zhu, J. K. and Jiang, D. (2017) Nitric oxide and hydrogen peroxide mediate wounding-induced freezing tolerance through modifications in photosystem and antioxidant system in wheat. Frontiers in Plant Science 8: 1284.

Soleimanzadeh, H., Habibi, D., Ardakani, M., Paknejad, F. and Rejali, F. (2010) Effect of potassium levels on antioxidant enzymes and malondialdehyde content under drought stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). American Journal of Agricultural and Biological Sciences 5: 56-61.

Sonsteby, A. and Heide, O. M. (2011) Environmental regulation of dormancy and frost hardiness in Norwegian populations of wood strawberry (*Fragaria vesca* L.). The European Journal of Plant Science and Biotechnology 5: 42-48.

Stewart, R. R. C. and Bewley, J. D. (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiology 65: 245-248.

Tasgin, E., Atici, O., Nalbantoglu, B. and Popova, L. P. (2006) Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. Phytochemistry 67: 710-715.

Turner, J., Tanino, K. and Stushnoff, C. (1993) Evaluation of low temperature hardiness of strawberry plants under field and controlled conditions. Canadian Journal of Plant Science 73: 1123-1125.

Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A. and Kawamura, Y. (2006) Responses of the plasma membrane to low temperatures. Physiologia Plantarum 126: 81-89.

Vacca, R. A., de Pinto, M. C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E. and De Gara, L. (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. Plant Physiology 134: 1100-1112.

Valizadeh-Kamran, R., Toorchi, M., Mogadam, M., Mohammadi, H. and Pessarakli, M. (2017) Effects of freeze and cold stress on certain physiological and biochemical traits in sensitive and tolerant barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. Journal of Plant Nutrition 41: 102-111.

Vierstra, R. D. (1993) Protein degradation in plants. Annual Review of Plant Biology 44: 385-410.

Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S. and Wang, Z. (1996) Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. Plant and Soil 179: 261-268.

Yang, Y., Jia, Z., Chen, F., Sang, Z. and Ma, L. (2015) Comparative analysis of natural cold acclimation and deacclimation of two *Magnolia* species with different winter hardiness. Acta Physiologiae Plantarum 37: 129.

Yong Kim, Sh., Lim, M. R., Park, Y., Kim, Y., Won, S. O., Choi, K. G. and Yun, S. J. (2005) Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barely roots under saline stress. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 38: 218-224.

Yong, Z., Hao-Ru, T. and Ya, L. (2008) Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. World Journal of Agricultural Sciences 4: 458-62.

Yong, Z., Hao-Ru, T. and Ya, L. (2009) Responses of antioxidant enzymes and compounds in strawberry (*Fragaria ananassa*'Toyonaka') to cold stress. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 37: 383-390.

Zhang, Y., Luo, Y. Tang, H. R., Hou, Y. X., Jiang, H. and Chen, Q. (2008) Chilling acclimation induced changes in the distribution of H_2O_2 and antioxidant system of strawberry leaves. Agricultural Journal 3: 286-291.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

Investigation of physiological and biochemical responses of two strawberry cultivars (*Fragaria ananassa* Duch) to cold stress

Shadi mohamadi nezhad, Mansour gholami*, Hassan sarikhani

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamadan
(Received: 24/12/2019, Accepted: 08/04/2020)

Abstract

The aim of this study was to investigate the importance of some physiological and biochemical properties related to cold adaptation mechanisms.We intended to adapt proper and efficient indices to identify winter cold tolerance and susceptibility in two strawberry cultivars. Different physiological and biochemical traits were studied under different cold treatments on the leaf and crown tissues of two strawberry cultivars of Selva and Queen Elisa. Plants prepared from new runners after being planted in pots and grown until late November. Potted plants were kept in out door condition to gradually adapt to low temperature. After plants adaptation, cold treatments were artificially applied with laboratory refrigerator. The samples were kept under the final cold treatment for three hours and then removed from the apparatus and transferred to the laboratory for measurement of different traits. Factorial experiment was conducted in a completely randomized design. The results showed that the levels of oxidative enzymes including superoxide dismutase, guaiacol peroxidase and catalase were significantly affected by cultivar, texture and temperature changes. Also, with decrease in temperature, the ion leakage rate, proline, protein, hydrogen peroxide, membrane lipid and carbohydrate peroxidation increased and these values were generally higher in Queen Elisa cultivar than in Selva. Increasing levels of these factors were more evident in the process of lowering temperature in the crown tissue. The leaf relative water content also decreased with decreasing temperature, which overall confirmed the tolerance to cold in Queen Elisa cultivar.

Keywords: Oxidative enzymes, Membrane lipid peroxidation, Cold stress, Selva and Queen Elisa

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]

Corresponding author, Email: mgholami@basu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.25.2]