

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، دانشکده 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 قابل تنظیم 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 متحمل بودن رقم کوئین الیزا به سرما را تأیید می‌کنند.

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

مقدمه

ژنتیک (کرمی و همکاران، ۱۳۹۷؛ Sonstebly 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

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

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

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., 2012; Rohloff et al., 2015). 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 پروتئین و همچنین تولید پروتئین‌های ضدیخ در سلول است (Moon et al., 1995; Hinch, 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 (پروتئین، 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 تنش 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 می‌زند. گیاهان قادرند آنها را توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی شامل آنتی‌اکسیدان‌های 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

کاهش جذب در اثر فعالیت APX با استفاده از اسپکتوفتومتر (کری ۱۰۰، واریان، امریکا) در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب اکسید شدن 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، ۴/۵۱ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد، ۳/۵۱ میکرولیتر گایاکول و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. افزایش شدت جذب نور به‌واسطه تشکیل تترآگایاکول در اثر فعالیت آنزیم GPX در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) با استفاده از روش Clarbone (۱۹۸۵) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۱۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیم و ۲۰ میکرولیتر از محلول ۳٪، H₂O₂ به ۱/۸۴ میلی‌لیتر محلول واکنش اضافه شد. ثبت تغییرات جذب نور نمونه در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه انجام شد. هر یک واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز به‌عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب کاهش یک میکرومول H₂O₂ 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 ریوفلاوین، 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 به مدت ۱۵ دقیقه زیر نور لامپ فلورسانس ۱۵ وات در فاصله ۳۰ سانتی‌متری قرار داده شدند. پس از این مدت جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. هر یک واحد فعالیت آنزیم SOD به‌عنوان مقداری از آنزیم یا پروتئین (برحسب میلی‌گرم) منظور گردید که در طول موج ذکر شده موجب ۵۰ درصد کاهش احیای

سینا و به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. بوته‌های دو رقم ذکر شده 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 ± 0.5 درجه سانتی‌گراد و با هدف تطابق با شرایط طبیعی و با در نظر گرفتن 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 به مدت 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 +۴ و -۶ 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 به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و از مایع رویی برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها استفاده شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11) براساس روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. برای این منظور، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۱/۸ میلی‌لیتر محلول واکنش اضافه شد و برای تعیین میزان فعالیت آنزیم APX مورد استفاده قرار گرفت.

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-، ۶- و ۹- درجه سانتی‌گراد و در رقم کوئین الیزا در دماهای ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲-، ۱۵- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد بودند. در هر رقم پس از اعمال تیمار، از برگ و طوقه هر بوته دیسک‌هایی به ترتیب به قطر یک سانتی‌متر و نیم سانتی‌متر تهیه و در قوطی ۶۰ میلی‌لیتری درب‌دار، حاوی ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور شد. سپس قوطی‌های حاوی نمونه به مدت ۲۴ 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 به مدت 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.

$$EL\% = (EC1 \times 100 / EC2)$$

محتوای نسبی آب (RWC) برگ: این صفت در دو سطح

دمایی شاهد (بوته‌های مستقر در گلخانه) و ۴+ 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 به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در داخل آب مقطر قرار گرفتند تا سلول‌ها به حالت تورژسانس درآیند و برای وزن تورژسانس (TW) توزین شدند. به دنبال آن، برگ‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و وزن خشک (DW) آنها نیز اندازه‌گیری شد و در نهایت RWC (برحسب درصد) از رابطه زیر به دست آمد.

$$RWC\% = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100$$

کربوهیدرات‌های محلول: غلظت کربوهیدرات‌های محلول

در دو سطح شاهد (بوته‌های مستقر در گلخانه) و ۴+ درجه سانتی‌گراد در بافت برگ و طوقه هر دو رقم انجام شد.

استخراج و اندازه‌گیری غلظت کربوهیدرات‌های محلول برگ به روش Dubois و همکاران (۱۹۵۶) صورت گرفت. به طور خلاصه، ۰/۳ گرم از بافت برگ تازه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ در هاون ساییده شده و درون لوله آزمایش ریخته شدند و به مدت ۲ دقیقه به شدت تکان داده شد. سپس قسمت بالایی محلول جدا شده و به رسوبات به جا مانده ۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه و مجدداً تکان داده شد. این عمل دو بار تکرار شد. عصاره استخراج‌شده با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش بالایی آن جدا شد. از عصاره الکلی ذکرشده، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر جدا و با ۳ میلی‌لیتر معرف آترو تاز تهبه‌شده 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 طول موج ۶۲۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت 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 ۴+ 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 به مدت ۲ دقیقه به شدت تکان داده شد و پس از تفکیک فازها، فاز مایع با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش بالایی آن جدا شد. به مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره فوق، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و به هم زده شد. سپس به هر نمونه مقدار ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در داخل بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از خنک‌کردن نمونه‌ها در آب یخ، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر نمونه اضافه و کاملاً تکان داده شد تا پرولین وارد فاز تولوئن گردد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه به حال سکون رها شدند و در نهایت میزان جذب در فاز بالایی نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵

استیک اسید (TCA) یک درصد هموزنه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. یک میلی‌لیتر از محلول رویی به دست آمده با ۴ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد حاوی (TCA) ۲۰ درصد مخلوط و در حمام آب‌جوش (۹۵ درجه سلسیوس) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس نمونه‌ها سریعاً سرد و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. برای حذف اثر ترکیبات مزاحم، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر (A₆₀₀) خوانده شد و از مقدار جذب آنها در طول موج ۵۳۲ نانومتر (A₅₃₂) کم شد. غلظت نهایی مالون دی‌آلدهید با استفاده از ضریب خاموشی $1155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه 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 +۴ و -۶ درجه سانتی‌گراد، در دمای -۶ درجه سانتی‌گراد سطح این آنزیم بالاتر بود. بالاترین سطح این آنزیم (۰/۷۶۲ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در بافت برگ رقم کوئین الیزا و در دمای -۶ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و پایین‌ترین مقدار آن (۰/۱۹۹ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در بافت طوقه رقم سلوا در دمای +۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۱a).

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 +۴ درجه سانتی‌گراد، در بافت برگ و طوقه هر دو رقم به روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. به این منظور مقدار ۰/۵ گرم بافت تازه برگ یا طوقه به همراه ۶/۲۵ میلی‌لیتر بافر استخراج مخلوط گردید و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه همراه بافر استخراج به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۰/۱ میلی‌لیتر از فاز رویی برداشته و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف بیورد اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت چند ثانیه تکان داده شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده و با مقایسه منحنی جذب آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد، غلظت پروتئین محلول محاسبه شد.

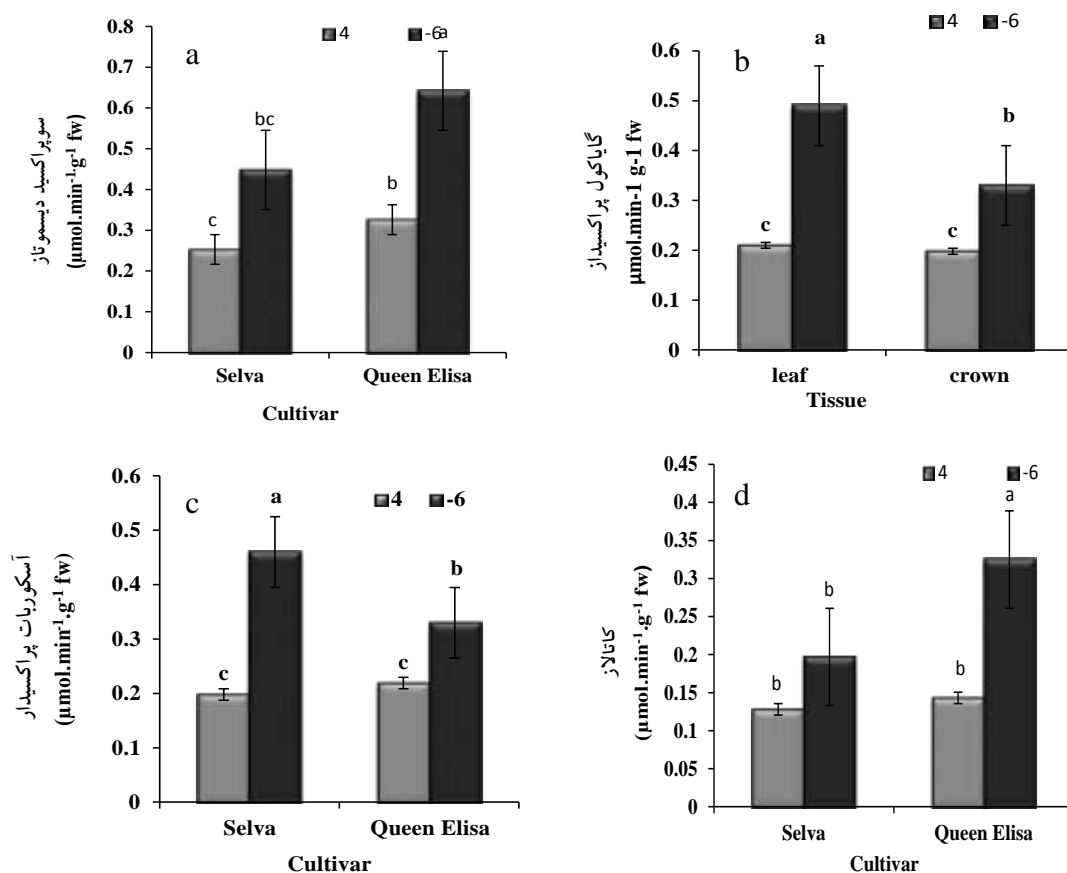
اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید: این صفت در دو سطح دمایی شاهد (بوته‌های مستقر در گلخانه) و +۴ درجه سانتی‌گراد، در بافت برگ و طوقه هر دو رقم مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت هیدروژن پراکسید براساس واکنش H_2O_2 با پتاسیم یدید (KI) و با روش Alexieva (۲۰۰۱) انجام شد. در این روش ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ و طوقه در تری‌کلرو استیک اسید یک درصد ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی ۵۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۲ میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی 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 برگ با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج تری‌کلرو

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

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		سوپراکسید دیسموتاز	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز
رقم	۱	۰/۰۸۱**	۰/۰۰۱۵**	۰/۰۱۸ ^{ns}
بافت	۱	۰/۱۱**	۰/۰۰۱**	۰/۰۴*
دما	۱	۰/۳۱۵**	۰/۰۰۳۸**	۰/۲۱**
رقم × بافت	۱	۰/۰۰۱۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۲*	۰/۰۰۰۰۴ ^{ns}
رقم × دما	۱	۰/۰۲۲*	۰/۰۰۰۶۷**	۰/۰۲۳*
بافت × دما	۱	۰/۰۱۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۱۶*	۰/۰۲۲*
رقم × بافت × دما	۱	۰/۰۰۹ ^{ns}	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۳۶ ^{ns}
خطا	۱۶	۰/۰۰۴۱	۰/۰۰۰۰۲۸	۰/۰۰۰۴۹
ضرب تدریج تغییرات (درصد)	-	۱۴/۷۷	۱۸/۵۰۳	۲۳/۳۶
کاتالاز				۱۸/۷۷

ns، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم اثر معنی دار، معنی دار در سطح پنج درصد و معنی دار 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 توت فرنگی رقم سلوا و کوئین الیزا. در هر شکل، حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

حمله اکسیژن‌های فعال عمل می‌کند. این آنزیم نقش مرکزی در مکانیسم دفاعی ارگانسیم‌ها 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 در نتیجه 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 دمایی 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 سنبلر نتایج نشان داد با شروع تیمار سرما (+6 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 در نتیجه حذف کاراتر هیدروژن پراکسید باشد. Tasgin و همکاران (۲۰۰۶) دریافته‌اند که در گندم نیز تیمار سرما موجب افزایش فعالیت پراکسیدازها می‌شود. مطالعات انجام‌شده روی پنج کلون گلاپول Bettaieb و همکاران (۲۰۰۷) و یک رقم کلزای مقاوم به سرما Fahimirad

اثر تیمارهای دمایی، رقم و نوع بافت و همچنین اثر متقابل رقم و دما بر فعالیت آنزیم گایاگول 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 گایاگول پراکسیداز در رقم سلوا بیشتر از کوئین الیزا، در بافت برگ بیشتر از طوقه و در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد بیشتر از ۴+ درجه سانتی‌گراد است. بالاترین سطح این آنزیم (۰/۰۷۱ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در بافت برگ رقم سلوا در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد و کمترین مقدار (۰/۰۱۳ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در بافت طوقه رقم کوئین الیزا و در دمای ۴+ 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 ۶- درجه سانتی‌گراد است و کمترین میزان آن (۰/۱۸۲ میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در بافت طوقه کوئین الیزا و در دمای ۴+ 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 در نتیجه 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

(۲/۲۴ 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 (۶۸/۴۴ 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 به شدت افزایش یافت (جدول ۴).

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 در نتیجه افزایش نشت یونی می‌گردد (Campos et al., 2003). در پژوهشی روی نهال‌های زیتون، تنش یخ‌زدگی موجب تسریع تخریب غشا و در نتیجه، افزایش نشت یونی شد (Azzarello et al., 2009). نشت یونی کمتر در ارقام متحمل می‌تواند به دلیل 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 ۶۰ 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 میدی و ترکش اصفهانی، ۱۳۸۳).

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 همکاران (۲۰۱۱) و جو Radyuk و همکاران (۲۰۱۰) هم نشان می‌دهد که بین فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی 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، ۱۳۹۴). پاسخ دانه‌های نوعی از غلات (Buckwheat) به سرمای چهار درجه سانتی‌گراد نشان داد که تحت تأثیر این تنش میزان آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب ۳۳ و ۲۲ 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

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	درجه آزادی	میانگین مربعات
بافت	۱	۰/۰۱۸ ^{ns}	۱	۲۴۸/۸*
دما	۳	۰/۲۹۶**	۶	۲۱۴۸/۰۱**
بافت × دما	۳	۰/۰۱۱ ^{ns}	۶	۲۲۱/۰۷**
خطا	۳۲	۰/۰۰۸	۵۶	۳۵/۸۱
ضریب تغییرات (درصد)	-	۶/۳۹	-	۱۶/۵۴

^{ns}، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم اثر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح 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	-۶
برگ	۱۴/۹۹ ^d	۲۸/۷۸ ^{bc}	۳۱/۲۸ ^{bc}
طوقه	۱۵/۰۹ ^d	۲۲/۶۵ ^{cd}	۲۶/۲۶ ^c

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

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تنش سرما بر تغییرات میزان نشت یونی بافت‌های رقم کوئین الیزا تحت تأثیر هفت تیمار دمایی مختلف

بافت مورد بررسی	تیمار دمایی					
	شاهد	-۳	-۶	-۹	-۱۲	-۱۵
برگ	۱۶/۴۹ ^g	۳۰/۸۴ ^e	۳۲/۵۰۸ ^{de}	۴۰/۱۷ ^{cd}	۴۰/۲۹ ^{cd}	۵۲/۶ ^b
طوقه	۱۸/۲۹ ^g	۲۰/۴۵ ^{fg}	۲۷/۴۸ ^{ef}	۲۸/۴۶ ^e	۳۱/۰۶۹ ^e	۴۵/۷۸ ^{bc}

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

مول بر گرم وزن تر) مربوط به بافت طوقه رقم سلوا در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد است در حالی‌که کمترین میانگین (۰/۰۶۹ میکرومول بر گرم وزن تر) مربوط به بافت برگ رقم کوئین 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

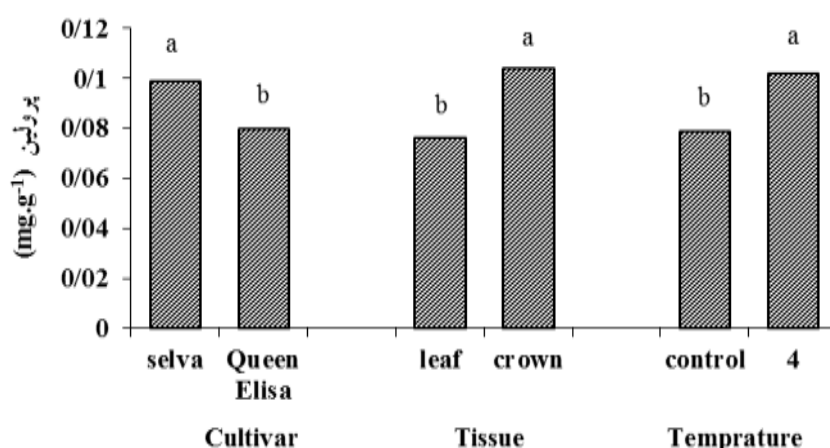
نتایج حاصل از تجزیه واریانس ویژگی‌های پرولین، پروتئین کل، هیدروژن پراکسید، مالون دی‌آلدئید و کربوهیدرات در جدول ۵ گزارش شده است.

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 (۰/۱۴۸ میکرو

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

میانگین مربعات					درجه	منابع تغییر
کربوهیدرات	مالون دی آلدئید	هیدروژن پراکسید	پروتئین کل	پرولین	آزادی	
۶۲/۷*	۰/۰۴۴**	۲۵۵۹/۵**	۰/۰۰۲ ^{ns}	۰/۰۰۱۶*	۱	رقم
۵۶/۶۸*	۰/۰۹۳**	۴۰۳۱۱/۶۸**	۰/۰۰۰۴ ^{ns}	۰/۰۰۳**	۱	بافت
۶۰۸/۳۱**	۰/۰۴۱**	۶۸۳۸۴/۳۴**	۳/۹۶۵**	۰/۰۰۲۵*	۱	دما
۰/۲۲۲ ^{ns}	۰/۰۲۳*	۵۲۶۵/۲۵**	۰/۰۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۹۸ ^{ns}	۱	رقم × بافت
۲/۷۱ ^{ns}	۰/۰۰۵۸ ^{ns}	۳۹۲۴/۷**	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۸۱ ^{ns}	۱	رقم × دما
۷/۸۵ ^{ns}	۰/۰۶۲**	۴۴۴۵/۳۹**	۰/۰۰۹*	۰/۰۰۰۷ ^{ns}	۱	بافت × دما
۳/۰۲۳ ^{ns}	۰/۰۲۴*	۳۷۵۸/۶۶**	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۹ ^{ns}	۱	رقم × بافت × دما
۱۹/۱۴	۰/۰۰۲۸	۲۲۵/۵۵	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۳	۱۶	خطا
۱۲/۴۹	۱۵/۰۹	۱۴/۴۴	۴/۳۱	۱۹/۹۵	-	ضریب تغییرات (درصد)

ns، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم اثر معنی دار، معنی دار در سطح پنج درصد و معنی دار در سطح یک درصد



شکل ۲- اثر تنش سرما بر میزان پرولین در ارقام، بافت‌ها و دماهای مختلف. در هر شکل، حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

طی پژوهش کرمی (۱۳۹۵) که به منظور ارزیابی مقاومت به سرمای چندین رقم توت فرنگی 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

چندین مکانیسم مانند پاک کردن رادیکال‌های هیدروکسیل، جلوگیری از دنا توره شدن 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).

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 تجمع 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 می‌گردد. 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.

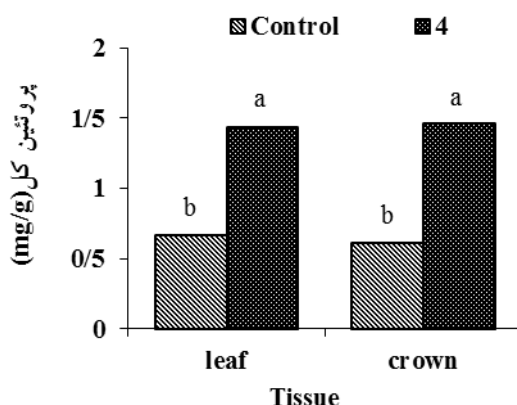
پروتئین: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان می‌دهد که تیمار اعمال‌شده روی رقم و بافت تأثیر معنی‌داری نداشته اما تفاوت بین دماها قابل توجه و معنی‌دار است و تمامی برهمکنش‌ها به جز اثر متقابل بافت و دما فاقد اختلاف معنی‌دار بودند. بیشترین مقدار پروتئین (۱/۴۷ میلی‌گرم بر گرم) در طوقه رقم سلوا و در ۴ درجه سانتی‌گراد و کمترین مقدار

آن (۰/۵۹ میلی‌گرم 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 سازگارشدهن 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 پروتئومیک 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)،



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

مقدارشان افزایش یافته است (جدول ۶).

یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاهان تحت شرایط تنش‌ها از جمله تنش دمای پایین، خشکی و شوری اتفاق می‌افتد، تولید گونه‌های 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 اکسیژن‌های فعال بسیار واکنش‌گر بوده و در صورت عدم وجود برخی سازوکارهای محافظت‌کننده می‌توانند باعث از بین بردن 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 به علت ثبات بیشتر و نیمه عمر طولانی‌تر بهترین موقعیت را به عنوان 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 (۲۰۰۶)، بر روی دو رقم گندم تحت تنش سرما انجام دادند و اعلام کردند تنش سرما موجب افزایش ۴۰٪ هیدروژن پراکسید در گندم زمستانه شد در حالی که این مقادیر در گندم بهاره حتی تا ۱۰۰٪ هم رسید و Valizadeh-Kamran و همکاران (۲۰۱۷) که ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

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 ۱۴ ساعت در اواخر شهریور و افت میانگین دمای روزانه به زیر ۱۰ درجه سانتی‌گراد در اوایل مهرماه بود. Kosakivska و همکاران (۲۰۰۸) تنش ۴ درجه سانتی‌گراد، را به مدت 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 (۱۳۹۱) که بر روی 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، ۱۳۹۴).

هیدروژن پراکسید: میزان هیدروژن پراکسید به طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، بافت و دما قرار گرفت و تمامی برهمکنش‌ها نیز معنی‌دار شدند (جدول ۵). بالاترین میزان هیدروژن پراکسید ($267/05$ میکرومول بر گرم وزن تر) در بافت برگ رقم کوئین الیزا در ۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و حداقل سطح ($15/53$ 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

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر تنش سرما بر هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدئید در دو بافت مختلف از دو رقم توت‌فرنگی

تیما	هیدروژن پراکسید (میکرومول بر گرم وزن تر)	مالون دی‌آلدئید (میکرومول بر گرم)
سلوا	شاهد	۰/۱۷۹ ^c
	+۴	۰/۲۴۷ ^c
	شاهد	۰/۲۰۲ ^c
	+۴	۰/۶۲۳ ^a
کوبین الیزا	شاهد	۰/۲۳۶ ^c
	+۴	۰/۵۰۷ ^a
	شاهد	۰/۲۶۲ ^c
	+۴	۰/۶۱۲ ^a

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

اکسیداتیو است، به‌عنوان یک مارکر زیستی مناسب برای اکسیداسیون لیپیدها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Soleimanzadeh et al., 2010). غلظت آن در محدوده نانومولار است و فرایندهای شدید پراکسیداسیون لیپید از قبیل تخریب و تبدیل غشا در نتیجه تنش اکسیداتیو یا تغییرات مورفولوژیکی باعث افزایش در غلظت آن می‌شود (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 دی‌آلدئید 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,

چند ژنوتیپ جو را تحت تنش سرما بررسی کردند و دریافتند که با کاهش دما از ۲۰ تا ۴- 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 دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع بافت و دما قرار گرفت اما اثر متقابل این فاکتورها معنی‌دار نشد (جدول ۵). با کاهش دما مقدار مالون دی‌آلدئید افزایش یافته که این افزایش در بافت طوقه مشهودتر است اما بین ارقام تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بالاترین میزان مالون دی‌آلدئید (۰/۶۲۳ میکرومول بر گرم) در بافت طوقه رقم سلوا در ۴ 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 ۶).

یکی از واکنش‌هایی که در شرایط تنش و در حضور اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پراکسیداسیون چربی‌های غشایی است و این می‌تواند منجر به پارگی غشا سلولی در گیاهان شود (Hernandez et al., 2000). مالون دی‌آلدئید که محصول تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع هیدروپروکسیداز و پراکسیداسیون لیپیدها تحت تأثیر تنش‌های

2004). مطالعات Valizadeh-Kamran و همکاران (۲۰۱۷) که بروی چند ژنوتیپ جو انجام شده نشان می‌دهد که با کاهش دما در بازه ۲۰ تا ۴- درجه سانتی‌گراد مقدار مالون دی‌آلدئید افزایش یافته و در ۴- 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 ۴+ می‌توان مشاهده کرد و کمترین مقدار (۲۰/۱۸ میلی‌گرم بر گرم) را در برگ سلوا در تیمار شاهد دیده شد (شکل ۴).

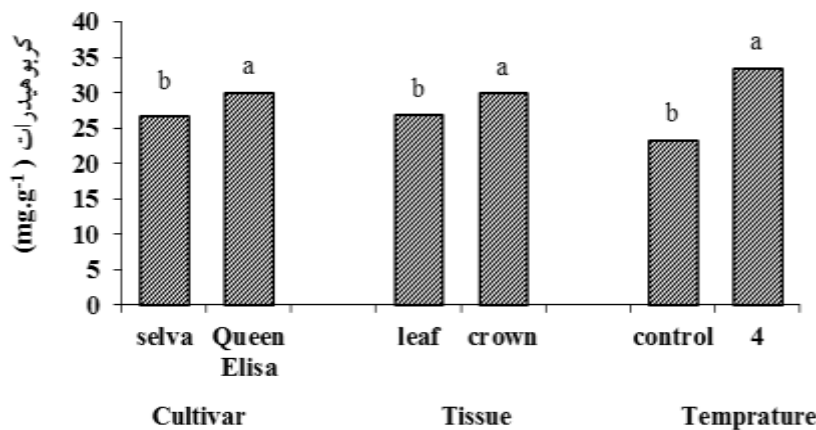
یکی از مهم‌ترین مشخصات گیاهان در شرایط تنش، افزایش تجمع کربوهیدرات‌ها است، زیرا آنها رابطه مستقیمی با فرایندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، انتقال و تنفس دارند. کربوهیدرات‌ها با بالابردن غلظت درون سلولی، مانع یخ‌زدن آن در اثر سرما می‌شوند. همچنین آنها از غشای پلاسمایی و پروتئین‌ها در برابر خسارت‌های تنش 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 (۲۰۱۶) 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

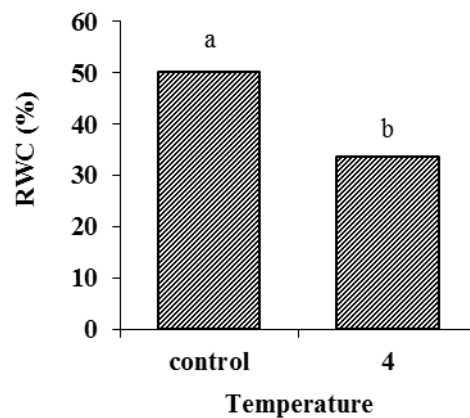
کربوهیدرات‌های محلول در مقایسه با میزان پرولین جوانه، شاخص بهتری برای ارزیابی تحمل به سرما در ارقام مورد آزمایش بودند. Nayyar و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی که روی گیاه نخود تحت تنش سرما انجام دادند اعلام نمودند میزان کربوهیدرات‌ها تحت تنش سرما افزایش یافت و در پایان تنش، کل کربوهیدرات‌های محلول در گیاهچه‌های سازگار نشده به سرما، ۱۰۳ میلی‌گرم بر گرم در مقایسه با ۱۹۷ میلی‌گرم بر گرم در گیاهچه‌های سازگار شده 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 می‌تواند از شاخصه‌های یک رقم مقاوم باشند (Linden et al., 2000). همچنین نتایج آزمایش ما با نتایج Kerepesi و همکاران (۲۰۰۴)، در گندم، Griffith و Yaish (۲۰۰۴) و Ershadi و همکاران (۲۰۱۶)، 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



شکل ۴- اثر تنش سرما بر میزان کربوهیدرات در ارقام، بافت‌ها و دماهای مختلف. در هر گروه، حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.



شکل ۵- اثر دما بر محتوی نسبی آب در دو رقم توت‌فرنگی سلوا و کوئین الیزا. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف 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 کوئین الیزا در دو دمای مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات RWC
رقم	۱	۳۳/۱۸ ^{ns}
دما	۱	۱۷۶۵/۴ ^{**}
رقم × دما	۱	۳/۹۸ ^{ns}
خطا	۳۰	۳۱/۴۹
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۳/۳۱

ns و ** به ترتیب نشان‌دهنده عدم اثر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح یک درصد

فتوستنز و آسیمیلایون دی‌اکسید کربن کاهش پیدا کند. اگر چه پایین بودن محتوی آب نسبی برگ در دماهای پایین در ارقام مقاوم می‌تواند ناشی از شکستن مولکول‌های درشت مانند

پایان دوره تنش بتوانند محتوی نسبی آب برگ بالاتری را حفظ کنند به لحاظ مقاومت به تنش نیز برتر خواهند بود. کاهش محتوی آب برگ باعث می‌شود که هدایت روزنه‌ای،

همان‌طور که پیش‌بینی می‌شد در طی تنش افزایش داشتند. سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز آنزیم‌های مقاومت به تنش‌اند و در نتیجه 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.

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 دی‌آلدئید 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

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. (۱۳۹۴) اثر سرما روی تخریب اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در برگ چای شمال ایران. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۲: ۲۹۲-۱۳۳.
- کریمی، 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 ۴۹: ۹۱-۷۹.
- کریمی، 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. (۱۳۹۴) 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 مبینی، 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: ۵۲۴-۵۱۴.
- 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.

- 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., Balakhniz, 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 of *Coffea* 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., Sonstebly, 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. *Ijst* 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 Sevilla, 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.

- 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., Sonstebly, 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 esculentum* 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 $\Delta 12$ -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.

- 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 'Honeye' 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.
- Sonstebj, 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 Pesarakli, 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 barley 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 H₂O₂ and antioxidant system of strawberry leaves. *Agricultural Journal* 3: 286-291.

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

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