

## بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L) Moench) به تنش دمای پایین

سمانه اسلی صنم<sup>۱</sup>، محسن زواره<sup>۲\*</sup>، همت‌اله پیردشتی<sup>۳</sup>، فاطمه سفیدکن<sup>۳</sup> و قربانعلی نعمت‌زاده<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، <sup>۲</sup>گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، <sup>۳</sup>گروه فیتوشیمی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مرتع کشور و <sup>۴</sup>گروه اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۱/۲۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۹۳/۰۹/۱۸)

### چکیده:

با هدف بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه دارویی سرخارگل به تنش دمای پایین، پژوهشی به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۹۲ اجرا شد. گیاهچه‌های پنج ماهه سرخارگل به مدت شش ساعت در سه سطح دمایی ۲۳ (شاهد)، ۴ و ۴- درجه سانتیگراد قرار داده شدند و سپس مقدار نشت یونی (EL) و مالوندی‌آلدهید (MDA)، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیدیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربیات پراکسیداز (APX) و پلی فنول اکسیداز (PPO)، اکسیداسیون پروتئین برگ‌ها، میزان فنل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) و نیز، متغیرهای فلورسانس کلروفیل از جمله  $F_v/F_m'$ ،  $NPQ$  و  $qP$  اندازه‌گیری شدند. نتایج آزمایش افزایش معنی‌دار مقدار EL و MDA را در برگ‌های سرخارگل به دنبال داشته است به طوری که بیشترین مقدار EL (۵۵/۷ درصد) و MDA (۱۲/۳ نانومول بر گرم بافت تازه)، در دمای ۴- درجه سانتیگراد به دست آمد. در این مطالعه، بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT و APX در گیاهچه‌های ثبت شد که تحت تنش سرما (۴ درجه سانتیگراد) قرار داشتند. فعالیت دو آنزیم POD و PPO با کاهش دما به ۴- درجه سانتیگراد کاهش یافت. بیشترین مقدار پروتئین هم، در شرایط سرما محاسبه شد که نسبت به تیمار شاهد ۶۵/۵ درصد افزایش داشت. تنش دمای پایین، مقدار فنل و فلاونوئید کل سرخارگل‌ها را کاهش داد. بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۰/۹۳ درصد) در تیمار شاهد به دست آمد. در این آزمایش، اختلاف معنی‌داری در بین متغیرهای فلورسانس در شرایط تاریک مشاهده نشد با این حال، مقدار  $F_v/F_m'$  و  $NPQ$  با افزایش تنش کاهش یافت و بیشترین مقدار  $qP$  هم، در دمای ۴- درجه سانتیگراد ثبت شد. به طور کلی، می‌توان ابراز عقیده کرد که گیاه سرخارگل تحمل نسبی به تنش دمای پایین تا ۴- درجه سانتیگراد دارد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سرما، فلورسانس کلروفیل، نشت یونی.

### مقدمه:

بیوشیمیایی سلول‌ها را به طور متفاوتی تحت تأثیر قرار دهد (Prasil *et al.*, 2007). میزان دوام گیاهان در چنین دمایی، بستگی به ظرفیت و توانایی آنها به خوگیری به سرما، مرحله‌ی نمو، نوع اندام، کمینه یا بیشینه دمای دریافت‌کرده و طول دوره آن دما دارد (Janska *et al.*, 2010).

گیاهان دارای دامنه‌های دمایی مشخصی برای رشد و نمو بهینه می‌باشند که در خارج از آن، تولید و پراکنش آنها محدود می‌شود. در همین زمینه، دمای پایین به عنوان یک عامل تنش‌زا در محیط پیرامون گیاهان می‌تواند سرعت فرآیندهای

چندساله از خانواده گل‌ستاره (Asteraceae) و از خاستگاه شمال آمریکا است (Mrozikiewicz *et al.*, 2010). فرآورده‌های این گیاه دارویی که از ریشه و اندام‌های هوایی آن به دست می‌آید جزو ششمین گیاه دارویی پرفروش در ایالات متحده در سال ۲۰۱۰ شناخته شده است (Blumenthal *et al.*, 2011) که برای درمان عفونت‌های مزمن دستگاه تنفسی و ادراری، عفونت‌های ویروسی، افزایش سیستم ایمنی، دفاعی و سوختگی به کار رفته است (Tsai *et al.*, 2012).

گیاهان دارویی همانند سایر گیاهان زراعی، تحت تأثیر مجموعه‌ای از ویژگی‌های ژنتیکی، بوم‌شناختی، فیزیولوژیک و محیطی هستند؛ لذا، می‌توان تعداد زیادی از این گیاهان را با بررسی شرایط رشد و نیازهای بوم شناختی آنها به صورت زراعی درآورد (Letchamo *et al.*, 2002). با توجه به دامنه سازگاری سرخارگل به شرایط مختلف آب و هوایی و خاکی (Sabra *et al.*, 2012)، کشت گسترده این گونه دارویی مهم در سراسر جهان بهویژه ایران افزایش یافته است. با این حال، تنها در چند پژوهش به بررسی رفتار این گیاه دارویی با ارزش در شرایط سخت و تشکیل محیطی پرداخته شده است (Sabra *et al.*, 2012). در این پژوهش‌ها، کاهش عملکرد سرخارگل در شرایط شور تأیید شده است (Sabra *et al.*, 2012)؛ ولی، اطلاعات بسیار محدودی مبنی بر پاسخ گیاه سرخارگل به دمای پایین وجود دارد. از طرفی، استقرار بهتر گیاه و زندگانی گیاهچه‌ها در خاک (Gutierrez Boem *et al.*, 1996) تولید زیست‌توده و میزان فنول‌های کافثول بیشتر در تاریخ‌های کشت بهاره و پاییزه (Chen *et al.*, 2008) تحت شرایط دمایی و مرحله‌ی نمو گیاه می‌تواند بسیار متفاوت باشد. بر همین اساس و با توجه به این که تاکنون بررسی واکنش گیاه دارویی سرخارگل به دمای پایین در کشور تعیین نگردیده است و اطلاعاتی در مورد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه سرخارگل و تغییرات بیوشیمیایی آن در شرایط تنش سرما وجود ندارد؛ پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تنش دمای پایین در مرحله رشد گیاهچه سرخارگل طراحی و اجرا شد.

تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در کلروپلاست و میتوکندری گیاهان تحت تنش‌های سرما و یخ‌بندان از مهم‌ترین اثرات نامطلوب این تنش‌ها است که می‌تواند اختلال در متابولیسم سلول از طریق پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، اکسیدهشدن پروتئین‌ها، خسارت به اسیدهای نوکلئیک و در نهایت مرگ سلول‌ها را در پی داشته باشد (Jackson *et al.*, 2009). گیاهان برای کاهش این اثرات نامطلوب و کنترل سطح ROS‌ها جهت محافظت سلول‌ها، مکانیزم‌های حفاظتی مختلفی از جمله سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنژیمی دارند که در سطوح مختلف تنش مؤثر است (Shi *et al.*, 2007). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسیدیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) از برجسته‌ترین مکانیزم‌های حفاظتی جهت حذف ROS‌ها هستند که رادیکال‌های آزاد سوپراکسید ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) را به پراکسید هیدروژن ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) و در نهایت پراکسید هیدروژن را به اکسیژن و آب تبدیل می‌کنند (Tanou *et al.*, 2009). همچنین، سطح بالای فعالیت آنزیم PPO می‌تواند سطوح اکسیژن آزاد در دسترس برای تولید ROS‌ها را در مدت تنش کاهش دهد، از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنژیمی هم، می‌توان به اسید آسکوربیک، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی اشاره کرد که نقش مؤثر آنها در تحمل به تنش‌ها تأکید شده است (Jackson *et al.*, 2009).

اختلال در تولید کلروفیل و آسیب به کلروپلاست نیز، از دیگر آسیب‌های گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تحت تنش دمای پایین است. مطالعات نشان داده است که کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II به صورت نسبت  $F_v/F_m$  (نسبت فلورسانس متغیر به فلورسانس بیشینه)، تحت تأثیر تنش سرما و یخ‌بندان قرار می‌گیرد (Ma, 1995). لذا، اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل یکی از شیوه‌هایی است که به طور گسترده برای تعیین وضعیت فیزیولوژیک گیاه، تحمل آن به تنش‌های محیطی و میزان آسیب وارده به دستگاه فتوستتری مورد استفاده قرار می‌گیرد (سلطانی، ۱۳۸۲).

سرخارگل (Echinacea purpurea) یکی از گیاهان دارویی

پس از ۲۴ ساعت، نمونه برداری از برگ‌های کاملاً توسعه یافته جهت تعیین شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیابی انجام گرفت. پس از اندازه گیری‌های فلورسانس کلروفیل و نشت یونی (Electrolyte leakage) (EL)، برگ‌های یکنواخت و کاملاً توسعه یافته گیاهچه‌های سرخارگل در هر تیمار جمع‌آوری و به سرعت در نیتروژن مایع قرار گرفتند. سپس نمونه‌های جمع‌آوری شده جهت اندازه گیری شاخص‌های بیوشیمیابی در فریزر -۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. شاخص‌های بیوشیمیابی شامل پراکسیداسیون لبید (MDA)، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسیدیسموتاز (CAT)، کاتالاز (POD)، پراکسیداز (SOD) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) و پلی فنول اکسیداز (PPO) و همچنین، مقدار پروتئین کل، فنل و فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) بود.

**اندازه گیری فلورسانس کلروفیل:** جهت بررسی اثرات نتش سرما بر دستگاه فتوستتری، مقدار فلورسانس کلروفیل گیاهان شاهد و گیاهان تحت نتش با استفاده از دستگاه فلوروومتر (PAM 2500-Walz, Germany) اندازه گیری شد. اندازه گیری گیاهان در دمای ۴ درجه سلسیوس پس از ۲۴ ساعت از بازیابی آنها از نتش، انجام شد. برای این منظور، جوانترین برگ کاملاً توسعه یافته سرخارگل‌ها به مدت ۲۰ دقیقه جهت سازگاری به تاریکی به وسیله گیره‌های مخصوص برگ-2030 (Walz) از تابش نور محافظت شدند. سپس با اعمال نور قرمز اشباع (۸۰۰۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) به مدت یک ثانیه، فلورسانس به سرعت از حالت پایه ( $F_0$ ) به مقدار بیشینه ( $F_m$ ) ثبت می‌شود. در این شرایط، اولین پذیرنده الکترون (PSII) کاملاً احیا شده و مراکز واکنش فتوسیستم دو (QA) بسته شده است (Baker and Rosenqvist, 2004). بدین ترتیب پارامترهای فلورسانس کمینه ( $F_0$ ، فلورسانس بیشینه ( $F_m$ ) و فلورسانس متغیر ( $F_v$ ) براساس دستورالعمل دستگاه در شرایط سازگاری با تاریکی اندازه گیری شدند. با اندازه گیری این پارامترها، بیشینه بازده کوانتمی PSII ( $F_v/F_m$ ) در شرایط سازگاری به تاریکی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Genty

## مواد و روش‌ها:

این مطالعه در جهت بررسی پاسخ‌های بیوشیمیابی و فیزیولوژیک گیاهچه‌های سرخارگل به تنش دمای پایین، به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه فیزیولوژی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در زمستان سال ۱۳۹۲ اجرا شد. تیمار آزمایشی، شامل سطوح دمایی ۲۳ (شاهد)، ۴ و ۴ درجه سانتیگراد بود.

پیش از آغاز آزمایش، بذرهای سرخارگل پس از گندздایی با هیپوکلریت سدیم در ژرمنیتور با دمای ۲۶±۱ درجه سانتیگراد برای ۱۲ روز جوانه‌دار شدند. پس از تندش بذرها، تعداد پنج بذر جوانه‌زده در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۲ سانتی‌متر در بستر آمیخته با ماسه، ورمی کولايت و خاک مزرعه (نسبت حجمی ۱:۱:۲) در اوایل شهریور ماه کاشته شدند و این گلدان‌ها برای تطابق با سرما در طول پاییز و اوایل زمستان، در شرایط طبیعی تا مرحله سه تا چهار برگی کامل نگهداری شدند. یک هفته پس از انتقال بذور جوانه‌زده و اطمینان از استقرار آنها، تعداد گیاهچه‌ها به سه عدد در هر گلدان کاهش یافت. پس از گذراندن دوره خوسمرمایی (Cold acclimation) گیاهچه‌های پنج ماهه سرخارگل در اوایل سپتامبر (SPG30000) شرکت نور تیمارهای دمایی به اتفاق رشد (4 درصد منتقل شدن و دستگاه برای دوره‌های سرمایی برنامه‌ریزی شد. برای دمای شاهد نیز، سه گلدان در اتفاق رشد با دمای ۲۳ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۴۵ درصد قرار داده شد. به منظور اعمال تیمارهای دمایی، گیاهان در معرض دماهای ۴ و ۴ درجه سانتیگراد به مدت شش ساعت قرار گرفتند. دمای اتفاق رشد در شروع آزمایش ۴ درجه سانتیگراد بود که پس از تیمار دمایی ۴ درجه، کاهش دما جهت رسیدن به تیمار دمایی ۴-۴ درجه سلسیوس به تدریج و ۱/۵ درجه در ساعت بود. پس از اعمال تیمار دمایی زیر صفر (۴- درجه سلسیوس)، گیاهان از اتفاق رشد خارج شده و به منظور کاهش سرعت ذوب گیاهان، به محیطی با دمای ۴ درجه سانتیگراد منتقل شدند و

سلیسیوس سانتریفیوژ شد. سپس، به یک میلی لیتر از محلول رویی، پنج میلی لیتر محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد تیوباریتوريک اسید (TBA) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و بلا فاصله در یخ، سرد شد. سپس نمونه‌ها مجدداً در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ماده قرمز رنگ مالوندی آلدهید-تیوباریبیوتريک اسید (MDA-TBA) تولید شده، در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Analytic Jena-SPEKOL 1300) اندازه گیری شد و جذب سایر رنگی های اختصاصی نیز، در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. تعیین غلظت مالوندی آلدهید از ضریب خاموشی معادل  $mM^{-1} cm^{-1}$ ، بر حسب نانومول بر گرم بافت تازه با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد.

$$\text{MDA}_{\text{غاطت}} = \frac{(A_{632} - A_{600})}{155} \times 1000 \quad \text{رابطه (3)}$$

استخراج عصاره جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها: ۰/۵ گرم بافت تازه برگ با کمک نیتروژن مایع در هاون چینی آسیاب شد و پس از آن به بافت آسیاب شده، یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مolar حاوی  $0/5$  EDTA پلی‌وینیل پلی‌پیرولیدون (Polyvinylpolypyrrolidone) (PVPP) دو درصد اضافه و در دمای چهار درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه در  $14000$  rpm سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های POD، SOD، CAT و APX و همچنین، محتوای پروتئین کل با استفاده از دستگاه اسیکتر و فتو متر مورد استفاده قرار گرفت.

**فعالیت آنزیم SOD:** سنجش فعالیت آنزیم SOD با استفاده از روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) اندازه‌گیری شد. محلول واکنش آنزیمی شامل ۹۳۵ میکرولیتر با فرسفتات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۱/۰ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و نیتروبلو-ترازولیوم (NBT) (Nitroblue-tetrazolium) ۷۵ میکرومولار و ۱۵ میکرولیتر ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده بود. پس از آماده‌سازی نمونه‌های کتل (شاهد) و بلانک، به منظور اندازه‌گیری

:*et al.*, 1989

$$Fv/Fm = (Fm - Fo)/Fm \quad \text{رابطه (1)}$$

در شرایط سازگاری به روشنایی هم، بلافاصله پیش از اعمال پالس اشباع نور در حضور نور فعال فتوستتری، عملکرد فلورسانس کلروفیل کاهش می‌یابد و به سطح پایه می‌رسد که فلورسانس پایدار نامیده می‌شود ( $F_t$ ). تفاوت بین  $F_m'$  (بیشینه فلورسانس از کلروفیل در شرایط روشنایی) و  $F_t$  منعکس کننده بخش فتوشیمیایی خاموشی فلورسانس (qP) است که حالت اکسیداسیون اولین پذیرنده الکترون PSII (QA) را در هنگامی که مراکز واکنش PSII باز هستند اندازه‌گیری می‌کند (سلطانی، ۱۳۸۲). تفاوت بین  $F_m'$  با  $F_t$  نیز، نشان‌دهنده بخش غیر فتوشیمیایی خاموشی فلورسانس کلروفیل (NPQ) است (سلطانی، ۱۳۸۲).

ارزیابی نشت یونی: جهت تعیین EL، پنج دیسک از برگ‌های کاملاً توسعه یافته به قطر یک سانتی‌متر و سه نمونه در هر تکرار نمونه برداری و در لوله‌های آزمایشگاهی قرار داده شد. و سپس ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دی‌یونیزه به آنها اضافه شد. لوله‌ها با فویل بسته شده و در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها شیک شده و میزان هدایت الکتریکی اولیه محیط ( $EC_1$ ) با استفاده از دستگاه EC سنج (Milwaukee Mi 306) اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند و هدایت الکتریکی ثانویه ( $EC_2$ ) آن‌ها پس از خنکشدن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. در نهایت مقدار EL

:Lutts *et al.*, 1995) محاسبه شد (۲ رابطه استفاده از

رابطه (۲) سنجش مقدار پراکسیداسیون لبیدهای غشا: برای سنجش پراکسیداسیون لبیدهای غشا، غلظت مالون دی آلدید به عنوان محصول پراکسیده شدن اسیدهای چرب غشاها به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه گیری شد. به طور خلاصه، در ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ با نیتروژن مایع آسیاب و به آن پنج میلی لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) یک درصد اضافه شد. عصاره به دست آمده به مدت ۲۰ دققه با دستگاه سانتی بفموژ

**فعالیت آنزیم APX:** برای سنجش فعالیت آنزیم APX از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) استفاده شد: مخلوط واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۷۷۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مolar، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مolar، ۱۰۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید پنج میلی‌مolar و ۱۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ۰/۱ میلی‌مolar بود. سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرات جذب بر زمان (OD/min) در طول موج ۲۹۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت گردید. یک واحد آنزیمی معادل تجزیه یک میکرومول آسکوربیات در مدت زمان یک دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد است (Nakano and Asada, 1981).

فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی آسکوربات پراکسیداز  $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه و در نهایت بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه بیان شد.

**فعالیت آنزیم PPO:** سنجش فعالیت آنزیم PPO با استفاده از روش Shatta و EI-Shamei (۱۹۹۹) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد: ۴۹۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۵ مولار و ۴۹۰ میکرولیتر پیروکاتکول ۰/۰۲ مولار به ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. پس از بهم‌زندن مخلوط واکنش، تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر در مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتوometر خوانده شد. فعالیت این آنزیم با استفاده از قانون بیر لامبرت و ضریب خاموشی آنزیم PPO با پیش‌ماده پیروکاتکول ( $1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد.

**سنجش غلظت پروتئین کل:** سنجش غلظت پروتئین کل محلول با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

**ارزیابی فنل کل:** ارزیابی فنل کل با روش Folin-Ciocalteu انجام گرفت (برگرفته از Meyers *et al.*, 2003). در این روش عصاره متابولی استخراج شده را با ۱۲۵ میکرولیتر معرف فولین (۱۰ درصد) مخلوط کرده و پس از پنج دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هفت درصد بیکربنات سدیم به آن اضافه شد. مقدار جذب مخلوط واکنش، پس از ۱۲۰ دقیقه نگهداری در شرایط بدون نور در طول موج

فعالیت آنزیمی، نمونه بلانک به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و نمونه‌های شاهد و عصاره آنزیمی، به مدت ۱۵ دقیقه در شیکر با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دارای دو عدد لامپ فلورسنت ۲۰ وات با ۱۰۰ دور در دقیقه شیک شدند. سپس مقدار جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتوometر خوانده شد. یک واحد SOD به مقدار آنزیمی گفته می‌شود که سبب مهار ۵۰ درصد NBT به فورمازان (Formazan) شود. در نهایت، فعالیت آنزیمی SOD با استفاده از رابطه ۴ محاسبه و بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه بیان شد.

رابطه (۴)

$$\text{SOD} = \frac{100 - \left[ \frac{(\text{OD Control} - \text{OD Sample})}{\text{OD Control}} \times 100 \right]}{50}$$

**فعالیت آنزیم POD:** برای سنجش فعالیت آنزیم POD از روش In و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد: ۴۹۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ۲۲۵ میلی‌مolar و ۴۹۰ میکرولیتر محلول گایاکول ۴۵ میلی‌مolar با هم مخلوط و به آن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتوometر خوانده شد. در محلول بلانک به جای عصاره آنزیمی، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مolar استفاده شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی گایاکول پراکسیداز معادل  $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه و در نهایت بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه بیان شد.

**فعالیت آنزیم CAT:** برای سنجش فعالیت آنزیم CAT از روش Luck (۱۹۷۴) با اندکی تغییرات استفاده شد: ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۹۸۰ میکرولیتر از بافر فسفات حاوی پراکسید هیدروژن دو میلی‌مolar مخلوط و تغییرات جذب آنها در طول موج ۲۴۰ نانومتر از راه اندازه‌گیری تجزیه پراکسید هیدروژن توسط اسپکتروفتوometر به صورت تغییرات جذب بر زمان (OD/min) ثبت شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی کاتالاز  $4/39 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه و در نهایت بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه بیان شد.

بر مقدار نشت یونی (EL) نشان داد (جدول ۱). بر مبنای میانگین‌های بهدست آمده از داده‌های بین تیمارها، بیشترین مقدار EL (۵۵/۷ درصد) در تیمار دمایی ۴- درجه سانتیگراد و کمترین مقدار آن (۲۸/۳ درصد) در تیمار شاهد (عدم تنش) بهدست آمد (شکل ۱). نتایج آزمایش گویای آن است که در هر دو دما میزان خسارت به غشای سلولی به عنوان اولین مکان خسارت در اثر سرما به طور معنی‌داری تحت تأثیر دما قرار گرفت. با این حال، با کاهش دما مقدار EL افزایش پیدا کرد که این افزایش، ۴۹/۲ درصد در دمای زیر صفر (۴- درجه سانتیگراد) بود (شکل ۱). مقادیر بالای EL نشان دهنده عدم توانایی غشا در حفظ ترکیبات درون سلولی، اختلال در فعالیت و انسجام غشاها سلولی و خروج بیشتر الکتروولیتها از غشا می‌باشد (Hana *et al.*, 2004).

مطالعات نشان می‌دهد که اسیدهای چرب غیراشباع موجود در غشای سلولی در سیالیت غشا بسیار مهم می‌باشند. دمای پایین سبب تغییر سیالیت غشا این اسیدهای چرب از حالت نیمه مایع به حالت کریستالی می‌شود (Mahajan and Tuteja, 2005) و بدنبال آن، فعالیت غشا مختل شده و مقدار EL افزایش می‌یابد. cardona و همکاران (۲۰۰۷) در گیاه پاسپالوم و Liang و همکاران (۲۰۰۸) در گندم مشاهده کردند که با افزایش شدت سرما، نشت الکتروولیتها از بافت‌های گیاهی افزایش یافته است.

با توجه به نتایج بهدست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها، تنش دمای پایین سبب افزایش معنی‌دار محتوای MDA به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا در گیاهچه‌های سرخارگل شده است (جدول ۱). بر مبنای نتایج بهدست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها، تنش دمای پایین سبب افزایش در اکسیداسیون لیپیدهای غشا سلول و محتوای مالوندی‌آلدهید در برگ سرخارگل شد به طوری‌که، بیشترین مقدار MDA (۱۲/۳ نانومول بر گرم بافت تازه) در دمای ۴- درجه سانتیگراد بهدست آمد که نسبت به دمای شاهد ۵۰/۷ درصد افزایش داشت (جدول ۲). کمترین میزان MDA (۶/۰۶ نانومول بر گرم بافت تازه) نیز، در تیمار شاهد بهدست آمد (جدول ۲). در بررسی روابط رگرسیونی مشاهده شد که بین

۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. مقدار فنل کل از روی منحنی استاندارد گالیک اسید بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه بیان شد.

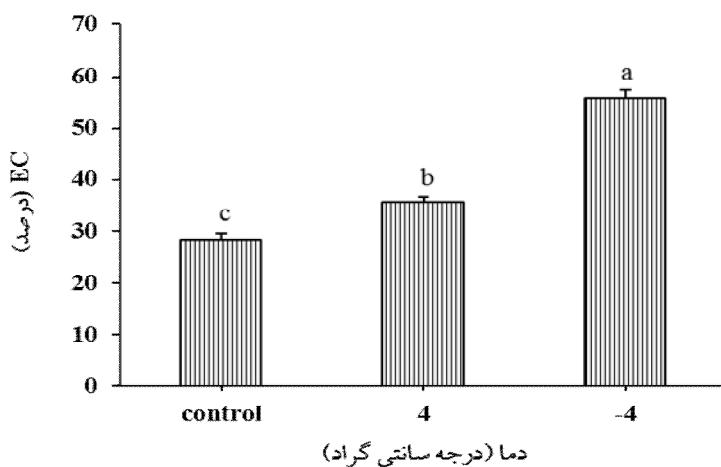
**ارزیابی فلاونوئید کل:** مقدار فلاونوئید کل با روش کالریمتری آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شد (Du *et al.*, 2009). ابتدا به ۱۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده به ترتیب ۱۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۳۰ درصد، ۱۵۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۰/۵ میلی‌مولاو و ۱۵۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۰/۳ میلی‌مولاو اضافه و بلافاصله بهم زده شد. پس از گذشت پنج دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم یک میلی‌مولاو اضافه شد. پس از ۱۰-۱۵ دقیقه، میزان جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۰۶ نانومتر ثبت شد. سپس مقدار فلاونوئید کل از روی منحنی استاندارد کاتچین بر حسب میلی‌گرم کاتچین در گرم بافت تازه بیان شد.

**ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی:** ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه، از طریق خاصیت خشی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری تعیین شد (Brand-Williams *et al.*, 1995). برای این منظور، به ۲۰۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده نمونه‌ها، ۸۰۰ میکرولیتر محلول DPPH اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از رابطه ۵ محاسبه شد.

رابطه (۵)  $\%DPPH_{sc} = (A_{cont} - A_{samp}) / A_{cont} \times 100$  برای تجزیه آماری داده‌های بهدست آمده، از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها، با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام و  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها در نظر گرفته شد. نمودارها و آزمون رگرسیون و همبستگی، با نرم‌افزار SigmaPlot نسخه ۱۲ رسم و تعیین شدند.

## نتایج و بحث:

تجزیه واریانس داده‌ها، تأثیر بسیار معنی‌دار تنش دمای پایین را



شکل ۱- اثر تنش دمای پایین بر درصد نشت یونی (EL) برگ سرخارگل. مقادیر، میانگین  $\pm$  SE (خطای معیار) است. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون (حداقل تفاوت معنی‌دار) است.

وجود داشته باشد. نتایج جدول تجزیه واریانس در مورد اثر تیمار دمای پایین بر فعالیت آنزیم SOD در برگ گیاهچه‌های سرخارگل هم معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین فعالیت این آنزیم ( $123/8$  میکرومول برگرم بافت تازه) در تیمار دمایی  $4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد به دست آمد (جدول ۲). کمترین فعالیت آن ( $28/3$  میکرومول برگرم بافت تازه) نیز، در تیمار دمایی  $-4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد مشاهده شد که  $78/9$  درصد نسبت به تیمار سرما ( $4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد) کاهش داشت (جدول ۲). بر پایه نتایج حاصل از بررسی آزمون همبستگی و روابط رگرسیونی، رابطه‌ی خطی منفی و معنی‌داری در بین مقدار EL و فعالیت آنزیم SOD مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که به ازای هر واحد افزایش نشت یونی، فعالیت آنزیم SOD  $0/29$  واحد کاهش داشت (داده‌ها نشان نشده‌اند).

تنش سرما موجب افزایش تولید آنیون‌های مخرب از جمله آنیون‌های سوپراکسید در میتوکندری سلول و خسارت اکسیداتیو می‌شود. در چنین شرایطی، فعالیت آنزیم SOD به عنوان یک آنزیم از بین برنده یون سوپراکسید افزایش می‌یابد (Mittova *et al.*, 2004). این افزایش فعالیت، احتمالاً می‌تواند سمیت‌زدایی یون سوپراکسید را افزایش داده و با تبدیل یون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی سبب کاهش آسیب‌های اکسیداتیو حاصله از آن شود. در توافق با

مقدار MDA و EL برگ‌های در معرض تنش دمای پایین، رابطه‌ی خطی و مثبتی ( $r=0/84^{**}$ ;  $R^2=0/71^{**}$ ) وجود دارد (شکل ۲)، به طوری‌که با افزایش هر واحد EL، میزان MDA واحد در بین تیمارهای دمایی افزایش نشان داد (شکل ۲). در آزمایش حاضر، پراکسیداسیون غشای سلول‌های برگ تحت تنش دمای پایین ( $4^{\circ}\text{C}$  و  $-4^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد) در مقایسه با شاهد (بدون تنش) به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۲). علت این افزایش را می‌توان از طرفی ناشی از تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن و از طرف دیگر کافی نبودن قدرت دفاعی آنتی‌اکسیدانی از جمله آنزیمی و غیرآنزیمی برای حذف این رادیکال‌ها دانست (Allen and Ort, 2001). این رادیکال‌های آزاد بسیار واکنش‌گر بوده و به علت میل ترکیبی زیادی که با لیپیدها دارند با خارج کردن  $\text{H}^+$  از فسفولیپیدها، موجب تشکیل رادیکال فعال اسید چرب می‌شوند. رادیکال‌هایی که در حضور اکسیژن با تولید پراکسید اسید چرب می‌توانند سبب تخریب چربی‌ها و تخریب غشای سلولی شوند (Saleh *et al.*, 2008). در این راستا، Li *et al.*, 2007 در گیاهچه‌های ماش و Liang و همکاران (۲۰۰۸) در ژنوتیپ‌های گندم به افزایش میزان MDA تحت تنش دمای پایین اشاره کردند و بیان داشتند که رابطه مستقیمی بین مکانیسم آنتی‌اکسیدانی کاراتر و تأخیر در شروع انباشت MDA می‌تواند

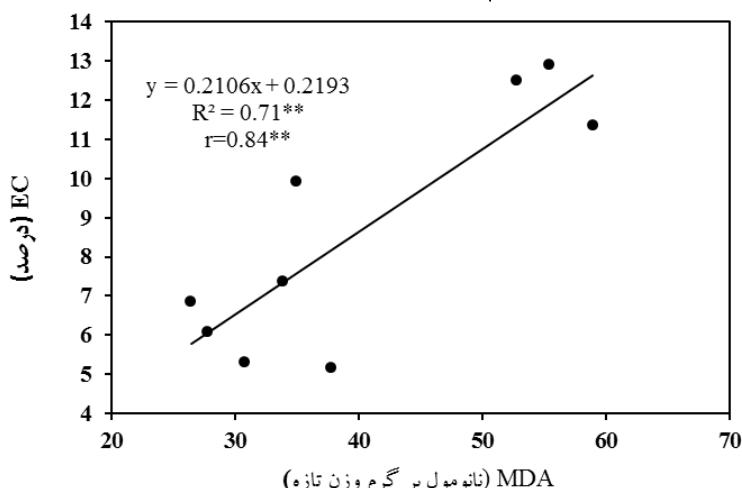
جدول ۱- نتایج تحریره و ارائه شنیدن مدلی برای برآورد نتایج آزمون های آنچه اکسپلوری و پرسنلی روانگی های پیوشریلی در بروک سرعتگل

\* و \*\* = بترتیب معنی دارای مطلع احتمال پنج و یک مرصد. EL: شدت یونی، MDA: ملرندی آبدید SOD آنزیم سوپر اکسید دی‌سروتاز، POD آنزیم پروکیاز، CAT: آنزیم کاتلز، APX: آنزیم آکسی‌جی‌پاکتیک

جدول ۲- اثر تنش دمای پایین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی ویژگی‌های بیوشیمیابی در برگ سرخارگل

تیمار دمایی (درجه سانتیگراد)				پارامتر
-۴	۴	شاهد	واحد	
۱۲/۳±۰/۴۶۵ <sup>a</sup>	۷/۴۸±۱/۳۸ <sup>a</sup>	۶/۰۶±۰/۴۴۷ <sup>b</sup>	نانونول بر گرم بافت تازه	MDA
۲۸/۳±۳/۸ <sup>c</sup>	۱۳۳/۸±۱۷/۴ <sup>a</sup>	۹۶/۴±۶/۵ <sup>b</sup>	میکرونول بر گرم بافت تازه	SOD
۲۵/۵±۳/۲۸ <sup>c</sup>	۴۰/۷±۱/۲۱ <sup>b</sup>	۷۱/۲±۵/۷۷ <sup>a</sup>	میکرونول بر گرم بافت تازه در دقیقه	POD
۳۸/۶/۳±۳۰/۱ <sup>b</sup>	۷۳۷/۴±۲۲/۳ <sup>a</sup>	۱۴۶/۳±۲۴/۶ <sup>c</sup>	میکرونول بر گرم بافت تازه در دقیقه	CAT
۲۳۲/۹±۲۶/۲ <sup>b</sup>	۵۰۰/۶±۵۷/۷ <sup>a</sup>	۸۲/۷±۸/۴ <sup>c</sup>	میکرونول بر گرم بافت تازه در دقیقه	APX
۰/۳۷۸±۰/۰۸۴ <sup>c</sup>	۰/۶۸±۰/۰۲۱ <sup>b</sup>	۱/۰۱±۰/۱۱۴ <sup>a</sup>	میکرونول بر گرم بافت تازه در دقیقه	PPO
۱۲۵/۹±۲۲/۲ <sup>b</sup>	۲۱۶/۵±۲۳/۰ <sup>a</sup>	۷۴/۷±۵/۳۸ <sup>b</sup>	میلی گرم بر گرم بافت تازه	PRO
۱۶/۱±۰/۰۱۳ <sup>c</sup>	۱۶۷/۷±۰/۱۲۸ <sup>b</sup>	۱۷/۸±۰/۱۵۷ <sup>a</sup>	میلی گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه	PHO
۹/۰۹±۰/۰۵۱ <sup>c</sup>	۱۰/۸±۰/۰۷۴ <sup>b</sup>	۱۲/۳±۰/۱۲۳ <sup>a</sup>	میلی گرم کاتچین در گرم بافت تازه	PHL
۰/۸۳±۰/۰۰۹ <sup>b</sup>	۰/۹۳±۰/۰۰۳ <sup>a</sup>	۰/۹۳±۰/۰۰۳ <sup>a</sup>	درصد	DPPH

: مالون دی‌آلدهید، SOD: آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، POD: آنزیم پراکسیداز، CAT: آنزیم کاتالاز، APX: آنزیم آسکوربیات پراکسیداز، PPO: آنزیم پلی فنول اکسیداز، PRO: پروتئین، PHO: فنول، PHL: فلاونوئید، DPPH: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE است. حروف یکسان در هر ردیف بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون (حداقل تفاوت معنی‌دار) است.



شکل ۲- رابطه بین درصد نشت یونی (EL) با مالون دی‌آلدهید (MDA) برگ سرخارگل

فعالیت آنزیم SOD همبستگی معنی‌داری با تحمل به یخ‌زدگی نشان نداد.

بر پایه نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس، تأثیر تیمار دمای پایین بر فعالیت آنزیم POD در گیاه سرخارگل بسیار معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با کاهش دما میزان فعالیت آنزیم POD نیز، کاهش یافت. بیشینه فعالیت آنزیم POD ۷۱/۲ میکرونول بر گرم بافت تازه در دقیقه) مربوط به گیاهچه‌های تیمار شده در دمای شاهد به دست آمد (جدول ۲). کمترین فعالیت این آنزیم هم، ۲۵/۵

این نتایج، بسیاری از پژوهش‌ها افزایش فعالیت آنزیم SOD را در کاهش تنش اکسیداتیو در شرایط سرما نشان دادند؛ Ortega و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که تحت تنش سرما فعالیت آنزیم‌های متفاوت جاروکننده ROS از جمله سوپر اکسید دیسموتاز افزایش می‌یابد. Jing-Hua و همکاران (۲۰۰۸) در هندوانه و Saltveit (۲۰۰۲) در ذرت نیز، به نتایج مشابهی دست یافتند. همچنین، کاهش فعالیت آنزیم SOD در دمای یخ‌زدگی با یافته‌های McKersie و همکاران (۱۹۹۹) موافق است؛ آنها گزارش کردند که تحت تنش یخ‌زدگی

همبستگی نشان داد که فعالیت آنزیم CAT با درصد نشت یونی معنی دار نبود ( $r=0.13^{ns}$ ).

آنزیم کاتالاز یک آنزیم پاکسازی کننده پراکسید هیدروژن است که در نتیجه افزایش فعالیت آن، میزان پراکسید هیدروژن در گیاه کاهش می‌یابد. در مطالعات به نقش آنزیم کاتالاز در حذف پراکسید هیدروژن تحت تنش اکسیداتیو ناشی از سرما تأکید شده است (Cansev *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2008) یافته‌های این آزمایش مشابه با نتایج Wang و همکاران (۲۰۰۹) و Cansev و همکاران (۲۰۰۸) بود که افزایش فعالیت آنزیم CAT را با کاهش دما گزارش کردند. Hee Lee (۲۰۰۰) نیز، بیان کردند که افزایش میزان پراکسید هیدروژن ناشی از تنش سرما در برگ‌های خیار از طریق افزایش فعالیت ترکیبی کاتالاز و آسکوربیات پراکسیداز، کاهش خواهد یافت.

بر مبنای نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، تنش دمای پایین در گیاهچه‌های سرخارگل موجب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم APX شده است. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم APX در شرایط تنش نسبت به شاهد (عدم تنش) افزایش داشت که میزان فعالیت آن به مانند آنزیم CAT در دمای بالای صفر (۴ درجه سانتیگراد) بیشتر از دمای ۴- درجه سانتیگراد بود (جدول ۲). آنزیم APX در دمای ۴۵۰۰/۶ درجه سانتیگراد به بیشینه فعالیت خود به میزان ۸۲/۷ میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه رسید و با کاهش دما به ۴- درجه سانتیگراد، فعالیت آن ۵۳/۵ درصد کاهش یافت (جدول ۲). کمترین فعالیت این آنزیم نیز، مربوط به شرایط بدون تنش با ۱۱/۰ میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه بود (جدول ۲). بررسی روابط همبستگی نشان داد که بین فعالیت آنزیم APX و میزان نشت یونی گیاهچه‌های سرخارگل، همبستگی وجود ندارد ( $r=0.11^{ns}$ ).

در چرخه آسکوربیات-گلوتاتیون، آنزیم APX با مصرف آسکوربیات به عنوان دهنده الکترون، مقدار پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهد (Shi *et al.*, 2007). در این مطالعه فعالیت آنزیم APX در برگ سرخارگل‌ها تحت تنش دمای پایین، روند تقریباً مشابهی با فعالیت آنزیم CAT داشت (جدول ۲). در مطالعات انجام شده تحت تنش سرما، فعالیت ایزوآنزیم های

میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه مربوط به تیمار دمایی ۴- درجه سانتیگراد بود که در مقایسه با تیمار شاهد، ۶۴/۲ درصد کاهش داشت (جدول ۲). بر پایه نتایج آزمون همبستگی و روابط رگرسیونی، رابطه‌ی خطی منفی و بالایی ( $R=-0.86^{**}$ ;  $t=-0.74^{**}$ ) در بین درصد نشت یونی و فعالیت آنزیم POD مشاهده شد که بیانگر این است با افزایش خسارت تنش سرما به غشای سلولی، فعالیت آنزیم POD کاهش یافت (داده‌ها نشان داده‌اند). پراکسیدازها مسئول حذف مقادیر اضافی پراکسید هیدروژن می‌باشند (Kopyra and Gwozdz, 2003). در شرایط تنش، آنزیم SOD با تبدیل آبیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن، از یکسو موجب حذف این آبیون شده و از سوی دیگر با القای آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربیات‌پراکسیداز، سمیت پراکسید هیدروژن را در سلول کاهش می‌دهد (Kopyra and Gwozdz, 2003). با این وجود کاهش فعالیت آنزیم POD در این مطالعه، نشان می‌دهد که فعالیت دو آنزیم کاتالاز و آسکوربیات‌پراکسیداز در مقایسه با آنزیم POD احتمالاً نقش مؤثرتری در تجزیه پراکسید هیدروژن و کاهش خسارت اکسیداسیونی در شرایط تنش دمای پایین داشته‌اند (جدول ۲). در توافق با این نتایج، بسیاری از پژوهش‌ها به کاهش فعالیت آنزیم POD تحت تنش سرما در گیاهان مختلف اشاره کردند (Saleh *et al.*, 2007; Jing-Hua *et al.*, 2008; Yong *et al.*, 2003).

در این مطالعه فعالیت آنزیم CAT هم، تحت تأثیر تیمار دمایی قرار گرفت (جدول ۱). در این تیمارها، بیشینه فعالیت آنزیم CAT با ۷۳۷/۴ میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه در سرخارگل‌هایی به دست آمد که تحت تنش دمایی ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفته بودند (جدول ۲). کمترین فعالیت این آنزیم، ۱۴۶/۳ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه مربوط به شرایط بدون تنش (تیمار شاهد) بود که نسبت به تنش دمایی ۴ درجه سانتیگراد با بیشینه فعالیت آنزیمی، ۸۰/۲ درصد کاهش، محاسبه شد (جدول ۲). با این حال، فعالیت این آنزیم در دمای ۴- درجه سانتیگراد همانند آنزیم SOD کاهش نشان داد. با این حال، فعالیت آنزیم CAT به میزان ۶۲/۱ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش و ۴۷/۶ درصد نسبت به تیمار سرمایی ۴ درجه سانتیگراد کاهش داشت (جدول ۲). نتایج آزمون

نهال‌های کلزا اشاره شد که در تشابه با نتایج این مطالعه، کاهش فعالیت آنزیم PPO در شرایط سرما مشاهده شد (Sosa *et al.*, 2002; Sonald and Laima, 1999).

در این آزمایش مقدار پروتئین برگ‌ها هم، تحت تأثیر معنی‌دار تیمار دمای‌های پایین قرار گرفت (جدول ۱). بر پایه میانگین داده‌ها، تنش دمای پایین توانست مقدار پروتئین برگ سرخارگل را نسبت به شرایط بدون تنش (تیمار شاهد) افزایش دهد (جدول ۲). بیشترین افزایش مربوط به تنش دمای ۴ درجه سانتیگراد بود که میزان آن  $216/5$  میلی‌گرم بر گرم بافت تازه (درجه) نسبت به شاهد ( $74/7$  میلی‌گرم بر گرم بافت تازه) حدود  $65/5$  درصد افزایش داشت (جدول ۲). با این وجود، میزان پروتئین در تنش دمایی زیر صفر (۴- درجه سانتیگراد)،  $125/9$  میلی‌گرم بر گرم بافت تازه بدست آمد که در مقایسه با دمای شاهد  $40/7$  درصد افزایش داشت ولی نسبت به دمای ۴ درجه سانتیگراد،  $41/8$  درصد کاهش نشان داد (جدول ۲). بررسی روابط همبستگی نشان داد که بین محتوای پروتئین و درصد نشت یونی گیاهچه‌های سرخارگل، همبستگی معنی‌داری وجود ندارد ( $r=0.4^{ns}$ ).

افزایش میزان پروتئین تحت تنش دمای ۴ درجه سانتیگراد نسبت به شاهد (جدول ۲)، احتمالاً می‌تواند به علت افزایش در سنتز پروتئین‌های ویژه (پروتئین شوک حرارتی و دهیدرین)، افزایش فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز و گلوتامین سنتتاز و فعال شدن آنزیم‌های درگیر در سنتز پروتئین‌ها باشد (Sharma and Dietz, 2009). مشابه با نتایج آزمایش حاضر، افزایش میزان پروتئین تحت تنش سرما در پژوهش‌های Ortega و همکاران (۲۰۰۹) در درخت زیتون و Hee Lee و همکاران (۲۰۰۰) در برگ‌های خیار مشاهده شد. Cansev و همکاران (۲۰۰۸) نیز، اظهار داشتند که تنش سرما موجب افزایش میزان پروتئین و افزایش بیان mRNA آنزیم‌های مختلف حذف کننده ROS‌ها در میتوکندری و کلروپلاست می‌شود. با این وجود، کاهش مقدار پروتئین تحت دمای ۴- درجه سانتیگراد می‌تواند ناشی از کاهش در سنتز پروتئین، تسریع پروتولیز و واسرشت شدن پروتئین‌ها، اکسیداسیون اسیدهای آمینه به گروه‌های کربونیل، افزایش نیترات، آمونیوم و اسیدهای آمینه آزاد و تجزیه آنزیم‌های

APX در گیاه برنج مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن گویای افزایش فعالیت این ایزوآنزیم‌ها در برنج‌های سازش‌یافته به سرما بود (Yong *et al.*, 2003). همچنین در گیاهان اسفناج (Ruth, 2002)، هلو و آرابیدوپسیس (Yordanova and Popova, 2007) اشاره شده است که موافق با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. APX ترکیبات فنلی توسط آنزیم POD و PPO اکسید می‌شوند (Sosa *et al.*, 2002). در این آزمایش، فعالیت آنزیم PPO تحت تأثیر معنی‌دار تنش دمای پایین قرار گرفت و کاهش یافت (جدول ۱ و ۲). فعالیت این آنزیم رفتاری مشابه با فعالیت آنزیم POD داشت به طوری که با کاهش دما به ۴- درجه سانتیگراد فعالیت این آنزیم هم، روند کاهشی را ثبت کرد (جدول ۲). با این وجود، بیشینه فعالیت آن در تیمار شاهد (عدم تنش) بود که نسبت به دمای ۴- درجه سانتیگراد با کمترین فعالیت آنزیمی ( $0.378$  میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه)،  $62/6$  درصد افزایش داشت (جدول ۲). میزان فعالیت این آنزیم در تیمار دمای ۴ درجه سانتیگراد،  $0.281$  میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه ثبت و محاسبه شد (جدول ۲). همچنین، با بررسی فعالیت آنزیم PPO و مقدار نشت یونی گیاهچه‌های سرخارگل تحت تنش دمای پایین، ملاحظه شد که همبستگی معکوس و بسیار معنی‌داری بین فعالیت PPO و درصد نشت غشا وجود دارد ( $r=0.85^{**}$ ).

آنژیم PPO، موجب تبدیل ترکیبات منوفل به دی‌فنل و یا تبدیل دی‌فنل به کینون می‌گردد (Hayrullah and Tuncer, 2003)؛ لذا، احتمالاً کاهش فعالیت این آنزیم (جدول ۲)، در جهت جلوگیری از کاهش فنل‌های اسیدی می‌باشد. گزارش شده است که ترکیبات فنلی با دادن الکترون به آنزیم‌های تیپ پراکسیداز و سم‌زدایی آب اکسیژنه تولید شده، می‌توانند در سلول به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کنند (Hayrullah and Tuncer, 2003). در این راستا، بررسی نتایج Ortega و همکاران (۲۰۰۹) نشان می‌دهد که اگر تنش سرما زیاد باشد، سطوح بالای فعالیت PPO می‌تواند به پرهیز از خسارت اکسیداتیو جدی ایجاد شده به وسیله تنش یخ‌زدگی کمک کند. در بررسی یافته‌های پژوهش‌گران، به اثر کاهش دما بر گیاه هندوانه، گوجه‌فرنگی و

نسبت به شرایط بدون تنش نشان دادند که این کاهش برای دمای ۴ و ۴- درجه سلیوس به ترتیب ۱۲/۲ و ۲۶/۱ درصد بود (جدول ۲). نتایج حاصل از ضرایب همبستگی در شرایط این آزمایش بیانگر این واقعیت است که همبستگی معکوس و بسیار معنی‌داری در بین میزان فلاونوئید و درصد نشت یونی وجود دارد ( $R^2=0.96^{**}$ ).

فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان هستند که در تنش‌های محیطی با افزایش فعالیت آنزیم PAL (Myung-Min *et al.*, 2009) تولید آنها افزایش می‌یابد (Razali *et al.*, 2008; Vogt, 2010). خسارت بیشتر ساختار غشا (افزایش MDA و APX) و افزایش فعالیت سه آنزیم SOD، CAT و ROS در طی تنش سرما، نشان‌دهنده تولید ROS و افزایش خسارت اکسیداتیو در دو تیمار دمای پایین می‌باشد. با این وجود، کاهش میزان فنل‌ها و فلاونوئیدها در این دمایاها ممکن است ناشی از اکسیداسیون آنها توسط ROS‌ها (Razali *et al.*, 2008) باشد. اثر تیمارهای دمای کم بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیار معنی‌دار بود (جدول ۱). با کاهش میزان دما نسبت به دمای شاهد (بدون تنش)، کاهش فعالیت جاروکنندگی رادیکال آزاد DPPH دیده شد (جدول ۲). بیشترین درصد بازدارندگی DPPH به میزان ۰/۹۳ درصد در تیمار شاهد به دست آمد. با این وجود، کمینه درصد بازدارندگی (۰/۸۳ درصد) در کمترین دما (۴- درجه سانتیگراد) ثبت شد که نسبت به تیمار شاهد (شرایط بدون تنش) با بیشترین درصد بازدارندگی، ۱۰/۷ درصد کاهش نشان داد (جدول ۲). مطالعه پایداری غشا بر اساس روش هدایت الکترونیکی نشان داد که رابطه خطی بسیار بالایی بین میزان نشت یونی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه وجود دارد ( $R^2=0.94^{**}$ ). این رابطه نشان‌دهنده کارایی این روش در ارزیابی مقاومت به سرما است (شکل ۳).

در آزمون حذف رادیکال‌های آزاد با استفاده از روش DPPH، رادیکال‌های DPPH با آنتی‌اکسیدان‌ها یا دیگر

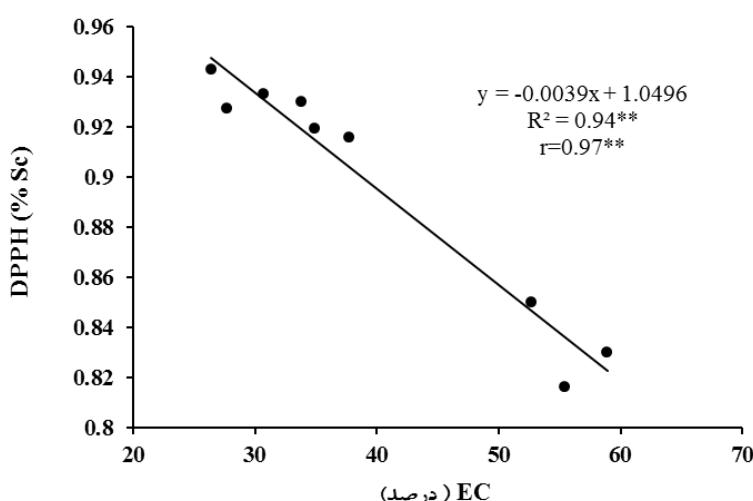
درگیر در سنتز پروتئین‌ها باشد (Sharma and Dietz, 2009) در این آزمایش با افزایش شدت تنش به دمای ۴- درجه سانتیگراد، میزان فنل به عنوان آنتی‌اکسیدان کاهش معنی‌داری نشان داد (جدول ۱ و ۳). این ترکیب آنتی‌اکسیدانی بیشترین میزان کاهش (۱۶/۱ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه) را در دمای ۴- درجه سانتیگراد نشان داد که نسبت به تیمار شاهد با بیشینه میزان فنل (۱۷/۸ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه)، ۹/۵ درصد کاهش داشت (جدول ۲). در نتایج آزمون رگرسیون خطی و همبستگی بین درصد نشت یونی و فنل کل برگ سرخارگل مشاهده شد که با افزایش نشت یونی، فنل کل در گیاهچه‌های سرخارگل کاهش یافت. نتایج، رابطه خطی بسیار بالایی ( $R^2=0.89^{**}$ ;  $t=0.74^{**}$ ) در بین درصد نشت الکتروولیتها و فنل کل نشان دادند (داده‌ها نشان نشده‌اند). فنل‌های گیاهی متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی هستند که در شرایط مطلوب محیطی از مسیر شیکمیک اسید و از متابولیسم فنیل پروپانوئید سنتز می‌شوند ولی تنش‌های محیطی مختلف، مقدار آنها را در سلول‌ها تغییر می‌دهند (Vogt, 2010). مکانیسم عمومی ترکیبات فنلی در جهت فعالیت آنتی‌اکسیدانی، حذف رادیکال‌های آزاد لبید و جلوگیری از تجزیه هیدروپروکسیدازها به رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Razali *et al.*, 2008). در واقع، کاهش میزان فنل کل در آزمایش حاضر را می‌توان، به افزایش تولید ROS و خسارت اکسیداتیو در سرخارگل‌های تحت تنش سرما اشاره نمود که موجب افزایش میزان MDA و پروتئین و فعالیت بیشتر آنزیم‌های SOD، CAT و POD با کاهش گستره دمایی شد (جدول ۲).

علاوه بر فنل‌ها، فلاونوئیدها هم توانایی بالایی در بازدارندگی رادیکال‌های DPPH و سوپراکسید دارند (Vogt, 2010). در این آزمایش روند تغییر فلاونوئیدها مشابه با تغییرات فنل بوده است (جدول ۲). بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر تیمار دمایی بر میزان فلاونوئید کل هم، معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین مقدار فلاونوئید کل (۱۲/۳ میلی‌گرم کاتچین در گرم بافت تازه) مربوط به تیمار شاهد (عدم تنش) بود (جدول ۲). با کاهش دما به ۴- درجه سانتیگراد، فلاونوئیدها به مانند ترکیبات فنلی روند کاهشی را

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تنفس دمای پایین بر ویژگی‌های فلورسانس کلروفیل در برگ سرخارگل سازگارشده با روشنایی

میانگین مربعات									منابع تغییرات
ETR	NPQ	qP	Q <sub>PSII</sub>	F <sub>v</sub> '/F <sub>m</sub> '	F <sub>o</sub> '	F <sub>m</sub> '	F <sub>t</sub>	درجه آزادی	
۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۲۵**	۰/۰۰۴*	۰/۰۰۰۸*	۰/۰۰۰۲**	۰/۰۰۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۷۴*	۰/۰۰۶ <sup>ns</sup>	۲	تیمار دمایی
۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۱۲	۰/۰۰۵	۶	اشتباه آزمایشی
۱/۴۸	۵/۳۸	۱/۷۶	۱/۷۵	۱/۶۶	۲/۵۶	۲/۸۸	۷/۰۱	-	ضریب نسبی پراکندگی

=ns= عدم تفاوت معنی دار، \* و \*\* به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد، F<sub>v</sub>: (فلورسانس پایدار)، F<sub>m</sub>: (فلورسانس بیشینه در روشنایی)، F<sub>o</sub>: (فلورسانس کمینه در روشنایی)، F<sub>v</sub>'/F<sub>m</sub>' : (بیشینه کارایی کوانتم مرآکز واکنش باز PSII)، Q<sub>PSII</sub>: (عملکرد کوانتم انتقال الکترون PSII تحت شرایط روشنایی)، Q<sub>p</sub>: (ضریب خاموشی فتوشیمیابی)، NPQ: (خاموشی غیر فتوشیمیابی)، ETR: (سرعت انتقال الکترون خطی)



شکل ۳- رابطه بین نشت یونی (EL) با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) برگ سرخارگل

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شده باشد که در پژوهش Tavarini و همکاران (۲۰۰۸) به آن اشاره شده است.

اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل یک روش سریع برای شناسایی و تعیین تحمل گیاه به تنفس‌های محیطی شناخته شده است. Maxwell و Johnson (۲۰۰۰) فلورسانس کلروفیل را روش سودمند جهت تشخیص زودهنگام و اندازه‌گیری کمی تخریب سلولی ایجاد شده توسط دمای پایین معرفی کردند. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که متغیرهای فلورسانس کلروفیل در برگ سازگارشده با تاریکی (F<sub>m</sub>, F<sub>o</sub> و F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) اختلاف معنی‌داری در بین سطوح دمایی نداشتند و همگی در یک گروه آماری قرار گرفته‌اند (جدول ۴). نتایج تجزیه واریانس متغیرهای فلورسانس کلروفیل در شرایط روشنایی نشان می‌دهد که تیمار دمای پایین بر مقدار F<sub>o</sub> (کمینه

گونه‌های رادیکالی که دهنده‌ی هیدروژن هستند، واکنش داده و به شکل احیا شده در می‌آیند و بدین ترتیب، میزان جذب در طول موج ۵۱۷-۵۱۵ نانومتر کاهش می‌یابد (Demirci *et al.*, 2007). در بررسی یافته‌های این آزمایش مبنی بر حذف رادیکال‌های آزاد با استفاده از روش DPPH، کاهش فعالیت جاروکنندگی رادیکال DPPH با کاهش دما نسبت به شاهد (بدون تنفس) دیده شد (جدول ۲). با توجه به رابطه خطی و مثبت بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل ( $R^2 = 0.66^{**}$ ؛ داده‌ها نشان داده نشده‌اند)، پایین‌بودن اثرات آنتی‌اکسیدانی در گیاهچه‌های سرخارگل می‌تواند احتمالاً به دلیل کاهش مقدار فنل و فلاونوئید کل در دمای‌های مورد آزمایش (۴ و ۴- درجه سانتیگراد) باشد (جدول ۲). از طرفی، ممکن است عدم تعادل بین تولید ROS‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش

بیش از ۵٪ PSII و خسارت به دستگاه فتوستتری ممانعت به عمل می‌آورد که در شرایط تنش مانند نور زیاد، خشکی و سرما مقدار آن افزایش می‌یابد (Anonymous, 1993). در این مطالعه، NPQ افزایش معنی‌داری را با روند کاهش دما به ۴-۰ درجه سانتیگراد نشان داد (جدول ۳ و ۵). بیشترین مقدار آن ۰/۸۵۳ در دمای ۴-۰ درجه سانتیگراد ثبت شد که نسبت به دمای شاهد، حدود ۱۶ درصد افزایش داشت (جدول ۵).

کاهش میزان انرژی بهدام افتداده در اثر غیرفعال شدن مراکز واکنش PSII تحت تنش سرما، می‌تواند میزان اتلاف انرژی Joao به صورت گرمایش را افزایش دهد (Strasser *et al.*, 2004) و همکاران (۲۰۰۶) هم، در بررسی اثر همزمان دو تنش تابش زیاد و خشکی شدید بر گیاه آفتابگردان، به افزایش ۴۰ درصدی ضریب خاموشی غیر فتوشیمیایی اشاره کردند و آن را نشان‌دهنده افزایش پراکنش گرمایی PSII دانستند. افزایش NPQ در سرخارگلهای تحت تنش در این آزمایش، می‌تواند تأیید‌کننده این امر باشد (جدول ۵).

کارایی کمی مراکز واکنش PSII در شرایط روشنایی، با  $Q_{PSII}$  در شرایط روشنایی، باز اندازه‌گیری می‌شود. به عبارتی دیگر،  $Q_{PSII}$  بخشی از نور جذب شده به‌وسیله PSII و یا میزان انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترون PSII را سنجش می‌کند که در بخش فتوشیمیایی گیاهان سازگارشده به روشنایی استفاده شده است. مقدار این عملکرد کوانتموی تقریباً بین ۰/۲۵ تا ۱/۱ درصد وابسته به شرایط فتوستتری می‌باشد (Anonymous, 1993). در این مطالعه، اثر تیمار دمایی بر  $Q_{PSII}$  در سطح آماری پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). مقدار  $Q_{PSII}$  از ۰/۷۱۶ در تیمار سرمازدگی (۴ درجه سانتیگراد) تا ۰/۷۴۷ در شرایط عدم تنش (تیمار شاهد) متغیر بود (جدول ۵). تأثیر منفی سرما بر مراکز واکنش فعلی PSII (آسیب پروتئین D<sub>I</sub>) و کاهش میزان انرژی به دام افتداده در مرکز واکنش PSII، کندشدن سرعت جایگزینی این پروتئین به مرکز واکنش PSII و کاهش کارایی کمپلکس تجزیه آب (Strasser *et al.*, 2004)، می‌تواند احتمالاً بیانگر دلیل کاهش  $Q_{PSII}$  در تنش سرما باشد.

بیشینه کارایی کوانتمویی مراکز واکنش باز PSII در شرایط

فلورسانس در شرایط روشنایی) بی‌تأثیر بود (جدول ۳)، ولی اثر معنی‌داری بر روی مقدار  $F'_m/F_m'$  (بیشینه کارایی کوانتمویی مراکز واکنش باز PSII در شرایط روشنایی) داشت (جدول ۴). مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که با کاهش دما به زیر صفر (۴- درجه سانتیگراد)،  $F'_m$  کاهش نشان داد به طوری که بیشترین مقدار آن در تیمار شاهد (عدم تنش)، ۳/۹۶ به دست آمد (جدول ۵).

تنش دمای پایین از تجزیه مولکول آب و یا اکسیداسیون نوری در PSII ممانعت می‌کند و موجب کاهش فلوورسانس کلروفیل می‌شود (Maxwell and Johnson, 2000). با توجه به این امر، افزایش تنش سرما به ۴- درجه سانتیگراد سبب کاهش مقدار بیشینه فلوورسانس از کلروفیل در برگ‌های سرخارگل شد (جدول ۵). نتایج مطالعه انجام شده در این زمینه (Herzogand Olszewski, 1998)، یافته‌های به دست آمده در این مطالعه را تأیید می‌کند. از طرفی گزارش شده است که دمای پایین موجب خسارت به تیلاکوئیدها می‌شود لذا، نمی‌تواند بر مقدار F' تأثیری داشته باشد (Anonymous, 1993). بر این اساس عدم تأثیر دمای پایین بر مقدار F'، تفاوت غیرمعنی‌دار مقدار F' را در این آزمایش، توجیه می‌کند (جدول ۳).

نتایج مربوط به میزان ضریب خاموشی فتوشیمیایی فلوورسانس کلروفیل (qP) نشان داد که با کاهش دما به زیر صفر (۴- درجه سانتیگراد)، مقدار qP به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۳ و ۵). بیشینه این ضریب (۰/۱۹) در تیمار دمایی ۴- درجه سانتیگراد به دست آمد که نسبت به شاهد با کمترین مقدار، ۵/۹ درصد افزایش داشت (جدول ۵). نتایج حاصل از آزمون همبستگی و رگرسیون خطی بیانگر این واقعیت است که همبستگی مثبت و معنی‌داری در بین میزان qP و درصد نشت یونی وجود دارد ( $r=-0.88^{***}$ ؛ داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

خاموشی غیر فتوشیمیایی (NPQ) به اتلاف گرمایی انرژی برانگیخته در رنگیزهای کمکی PSII و سطوح مراکز واکنش مربوط می‌شود که عملکرد فلوورسانس را در سراسر برگ کاهش می‌دهد (سلطانی، ۱۳۸۲). پارامتر NPQ از

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تنش دمای پایین بر ویژگی‌های فلورسانس کلروفیل در برگ سرخارگل سازگارشده با تاریکی

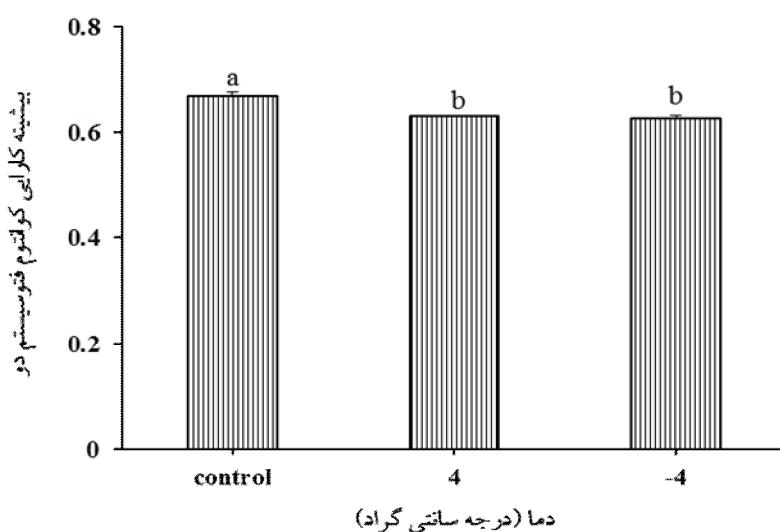
میانگین مربعات					منابع تغییرات
$F_v/F_m$	$F_v$	$F_m$	$F_o$	درجه آزادی	
۰/۰۰۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۹۴ <sup>ns</sup>	۲	تیمار دمایی
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۱۱	۰/۰۰۸	۶	اشتباه آزمایشی
۱/۴۴	۱/۳۵	۱/۵۴	۵/۶۷	-	ضریب نسبی پراکنده‌گی

= عدم تفاوت معنی دار.  $F_o$ : (فلورسانس کمینه)،  $F_m$ : (فلورسانس بیشینه)،  $F_v$ : (فلورسانس متغیر)،  $F_v/F_m$ : (کارآئی فتوشیمیابی فتوسیستم II).

جدول ۵- اثر تنش دمای پایین بر برخی از ویژگی‌های فلورسانس کلروفیل در برگ سرخارگل

پارامترهای مربوط به برگ سازگار شده با روشنایی					تیمار دمایی (درجه سانتیگراد)
$Q_{PSII}$	NPQ	qP	$F_m'$		شاهد
۰/۷۴۷±۰/۰۱۱ <sup>a</sup>	۰/۷۱۶±۰/۰۱۶ <sup>b</sup>	۱/۱۲±۰/۰۱۵ <sup>b</sup>	۳/۹۶±۰/۰۷۲ <sup>a</sup>		
۰/۷۱۶±۰/۰۱ <sup>b</sup>	۰/۸۸۸±۰/۰۱۵ <sup>a</sup>	۱/۱۴±۰/۰۱۱ <sup>b</sup>	۳/۶۶±۰/۰۳ <sup>b</sup>		۴
۰/۷۴۵±۰/۰۰۶ <sup>a</sup>	۰/۸۵۳±۰/۰۳۸ <sup>a</sup>	۱/۱۹±۰/۰۱۳ <sup>a</sup>	۳/۷۲±۰/۰۷۵ <sup>b</sup>		-۴

مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm SE$  (خطای معیار) است. حروف یکسان در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون (حداقل تفاوت معنی دار) است.  $F_m'$ : (فلورسانس بیشینه در شرایط روشنایی)، Qp: (ضریب خاموشی فتوشیمیابی)، NPQ: (خاموشی غیر فتوشیمیابی)،  $Q_{PSII}$ : (عملکرد کوانتم انتقال الکترون PSII تحت شرایط روشنایی).



شکل ۴- اثر تنش دمای پایین بر ( $F_v'/F_m'$ ) در برگ سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm SE$  (خطای معیار) است. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون (حداقل تفاوت معنی دار) است.

کاهش  $F_v'/F_m'$  شده است. بیشترین مقدار این شاخص ۰/۶۶۹ در تیمار شاهد به دست آمد. کاهش دما توانست مقدار  $F_v'/F_m'$  را به ۰/۶۲۷ در تیمار دمایی ۴- درجه سانتیگراد کاهش دهد که با دمای ۴ درجه سانتیگراد در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل ۴). کاهش  $F_v'/F_m'$  در شرایط سرما در پژوهش حاضر

روشنایی به صورت  $F_v'/F_m'$  تعریف شده است. پس از افزایش اتفاق ارزی به صورت گرما (خاموشی غیر فتوشیمیابی)،  $F_v'/F_m'$  هم کاهش می‌یابد. تیمار سرما به طور معنی داری در میزان  $F_v'/F_m'$  مؤثر بود (جدول ۳). مقایسه روند تغییرات شاخص  $F_v'/F_m'$  در شکل ۴ نشان می‌دهد که تیمار سرما سبب

سانتیگراد، فعالیت این آنزیم‌ها به همراه پروتئین کاهش یافت. به طور کلی، با توجه به یافته‌های به دست آمده و مشاهدات ظاهری در چند روز پس از تنفس می‌توان نتیجه گرفت که گیاه دارویی سرخارگل به تنفس دمای پایین تحمل نسبی دارد.

#### تشکر و قدردانی:

بدین‌وسیله از حمایت و مساعدت مالی پژوهشکده زنگنه و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، جهت اجرای این پژوهش سپاس‌گزاری می‌شود.

می‌تواند از طرفی به علت تخرب و غیر فعال‌سازی پروتئین D<sub>1</sub> مراکر واکنش PSII تحت تنفس سرما و از طرف دیگر، آشفتگی در کلروپلاست و پدیده بازداری نوری باشد. بازداری نوری از فرآیندهای بسیار چشمگیر در دمای پایین گزارش شده که خسارت آن اغلب برگشت‌ناپذیر می‌باشد (Strasser et al., 2004).

#### نتیجه‌گیری کلی:

در این آزمایش با کاهش دما تا ۴ درجه سانتیگراد، فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای پروتئین در مقایسه با شاهد افزایش یافته‌ند. سپس با کاهش بیشتر دما تا -۴ درجه

#### منابع:

- Agriculture 44: 497-507.
- Demirci, B., Kosar, M., Demirci, F., Dinc, M. and Baser, K. H. C. (2007) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. Food Chemistry 105: 1512-1525.
- Du, G., Li, M., Ma, F. and Liang, D. (2009) Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in *Actinidia* fruits. Food Chemistry 113: 557-562.
- Genty, B., Briantais, J. M. Baker, N. R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta 99: 87-92.
- Giannopolitis, C. and Ries, S. (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plant. Plant Physiology 59: 309-314.
- Gutirrez Boem, F. H., Lavado, R. S. Porcelli, C. A. (1996) Note on the effect of winter and spring waterlogging on growth, chemical composition and yield of rapeseed. Field Crops Research 47: 175-179.
- Hana, B. and Bischofa, J. C. (2004) Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. Cryobiology 48: 8-21.
- Hayrullah, Y. and Tuncer, T. (2003) Polyphenol oxidase Activity during rooting in cutting of grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. Turkish Journal of Botany 27: 495-498.
- Heath, L. R. and Packer L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.
- Hee Lee, D. and Bum Lee, C. (2000) Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. Plant Science 159: 75-85
- Herzog, H. and Olszewski, A. (1998) A rapid method for measuring freezing resistance in crop plants.
- سلطانی, ا. (۱۳۸۲) فلورسانس کلروفیل و کاربرد آن. انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- Allen, D. J. and Ort, D. R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends In Plant Science 6: 36-41.
- Anonymous, (1993) An introduction to fluorescence measurements with the plant efficiency analyzer (PEA). Hansatech Instruments Ltd., England.
- Baker, N. R. and Rosenqvist, E. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany 55: 1607-1621.
- Blumenthal, M., Lindstrom, A., Lynch, M. E. and Rea, P. (2011) Herb sales continue growth up 3.3% in 2010. Herbal Gram 90: 64-67.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant capacity. Food Science and Technology 28: 25-30.
- Cansev, A. and Gulen HandEris, A. (2008) Cold-hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin-like proteins. Journal of Agricultural Sciences 147: 51-61.
- Cardona, C. A., Duncan, R. R. Lindstrom, O. (2007) Low temperature tolerance assessment in paspalum. Crop Science 37: 1283-1291.
- Chen, C. L., Zhang, S. C. Sung, J. M. (2008) Biomass and caffeol phenols production of *Echinacea purpurea* grown in Taiwan. Journal of Experimental

- Ma, B. L., Morison, M. J. and Videng, H. D. (1995) Leaf greenness and photosynthetic rates in soybean. *Crop Science* 35: 1411-1414.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.
- Maxwell, K. and Johnson, G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence - A practical guide. *Experimental Botany* 51: 659-668.
- McKersie, B. D., Bowley, S. R. and Jones, K. S. (1999) Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology* 119: 839-847.
- Meyers, K. J., Watkins, C. B., Pritts, M. P. and Hai-Liu, R. (2003) Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Agricultural and Food Chemistry* 51: 6887-6892.
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M. and Volokita, M. (2004) Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany* 55: 1105-1113.
- Mrozikiewicz, P. M., Bogacz, A., Karasiewicz, M., Mikolajczak, P. L., Ozarowski, M., Seremak-Mrozikiewicz, A., Czerny, B., Bobkiewicz-Kozlowska, T. and Grzeskowiak, E. (2010) The effect of standardized *Echinacea purpurea* extract on rat cytochrome P450 expression level. *Phytomedicine* 17: 830-833.
- Myung-Min, H., Trick, H. N. and Rajasheka, E. B. (2009) Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology* 166: 180-191.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Ortega, F. and Peragon, J. (2009) The response of phenylalanine ammonialyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). *Journal of the Science of Food Agriculture* 89: 1565-1573.
- Prasil, I. T., Prasilova, P. and Marik, P. (2007) Comparative study of direct and indirect evaluation of frost tolerance in barley. *Field Crops Research* 102: 1-8.
- Razali, N., Razab, R., Mat Junit, S. and Abdulaziz, A. (2008) Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chemistry* 111: 38-44.
- Rutch, G. (2002) Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *American Society of Plant Biologists* 17: 1-20.
- Sabra, A., Daayf, F. and Renault, S. (2012) Differential physiological and biochemical responses of three *Echinacea* species to salinity stress. *Scientia Horticulturae* 135: 23-31.
- Journal of Agronomy and Crop Science 181: 71-79.
- In, B. C., Motomura, S., Inamoto, K., Doi, M. and Mori, G. (2007) Multivariate analysis of realation between preharvest environmental factors, postharvest morphological and physiological factors and vase life of cut Asomi Red Roses. *Japanese Society for Horticultural Science* 76: 66-72.
- Jackson, M. B., Ishizawa, K. and Ito, O. (2009) Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. *Annals of Botany* 103: 137-42.
- Janska, A., Marsik, P., Zelenkova, S. and Ovesna, J. (2010) Cold stress and acclimation what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology* 12: 395-405.
- Jing-Hua, Y., Gao, Y., Li, Y. M., Qi, X. H. and Zhang, M. F. (2008) Salicylic acid-induced enhancement of cold tolerance through activation of antioxidative capacity in watermelon. *Scientia Horticulturae* 118: 200-205.
- Joao-Correia, M., Leonor-Osorio, M., Osorio, J., Barrote, I., Martins, M. and David, M. M. (2006) Influence of transient shade periods on the effect of drought on photosynthesis, carbohydrate accumulation and lipid peroxidation in sunflower leaves. *Environmental and Experimental Botany* 58: 75-84.
- Kang, H. M. and Saltveit, M. E. (2002) Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum* 115: 571-576.
- Kopyra, M. and Gwozdz, E. A. (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 1011-1017.
- Letchamo, W., Polydeonny, L. V., Gladisheva, N. O. and Arnason, T. J. (2002) Factors affecting *Echinacea* quality. In: Trends in new crops and new uses (eds. Janick J, Whipkey A.).Pp. 514. ASHS Press: Alexandria VA.
- Li, Q. Y., Niu, H. B., Yin, J., Wang, M. B., Shao, H. B., Deng, D. Z., Chen, X. X., Ren, J. P. and Li, Y. C. (2008) Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 56: 220-225.
- Liang, Y., Zhu, J., Li, Z., Chu, G., Ding, Y., Zhang, J. and Sun, W. (2008) Role of silicon in enhancing resistance to freezing stress in two contrasting winter wheat cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 64: 286-294.
- Luck, H. (1974) In: *Methods in Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer, H.) p 885. Academic Press. New York.
- Lutts, S., Kinet, J. M. and Bouharmont, J. (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany* 46: 1843-1852.

- death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental and Experimental Botany* 65: 270-281.
- Tavarini, S., DeglInnocenti, E., Remorini, D. and Massai, R. (2008) Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chemistry* 107: 282-288.
- Tsai, Y. L., Chiou, S. Y., Chan, K. C. and Sung, J. M. (2012) Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts. *LWT-Food Science and Technology* 46: 169-176.
- Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3: 2-20.
- Wang, W. B., Kim, Y. H., Lee, H. S., Yong Kim, K., Deng, X. and Kwak, S. (2009) Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 47: 570-577.
- Yong, I. K., Jisan, S., Nilda, R. B. and Jaock, G. (2003) Crop physiology & Metabolism ntioxidative enzymes Offer protection from Chilling damage in rice plants .*Crop Science* 43: 2109-2117
- Yordanova, R. and Popova, L. (2007) Effect of exogenous treatment with salicylic acid on photosynthetic activity and antioxidant capacity of chilled wheat plants. *Plant Physiology* 33: 155-177.
- Saleh, A. A. H. (2007) Amelioration of chilling injuries in mung bean seedlings by paclobutrazol, abscisic acid and hydrogen peroxide. *American Journal of Plant Physiology* 2: 318-332.
- Sharma, S. S. and Dietz, K. J. (2009) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science* 14: 43-50.
- Shatta, A. and El-Shamei, Z. (1999) Differentiation of eggplant (*Solanum melongena* L.) polyphenoloxidase, laccase and peroxidase using selective substrates and inhibitors. *Advanced Food Science* 21: 79-83
- Shi, Q., Fei, D., Wng, X. and Wei, M. (2007) Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 542-550.
- Sonald, S. F. and Laima, S. K. (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1: 1-5.
- Sosa, M. R., Juan, M. R. and Luis, R. (2002) Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* 160: 315-321
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M. and Srivastava, A. (2004) Analysis of the fluorescence transient. In: *Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis* (eds. Papageorgiou, G. C. and Govindjee, C.) Pp. 321-362. Rotterdam.
- Tanou, G., Molassiotis, A. and Diamantidis, G. (2009) Induction of reactive oxygen species and necrotic