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

سمانه اسدی صنم[1]، محسن زواره[1*]، همت‌اله پیردشتی[2]، فاطمه سفیدکن[3] و قربانعلی نعمت‌زاده[4]

[1]گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، [2] گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، [3]گروه فیتوشیمی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور و [4]گروه اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۱/۲۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۹/۱۸)

چکیده:

با هدف بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه دارویی سرخارگل به تنش دمای پایین، پژوهشی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۹۲ اجرا شد. گیاهچه‌های پنج ماهه سرخارگل به‌مدت شش ساعت در سه سطح دمایی ۲۳ (شاهد)، ٤ و ٤- درجه سانتیگراد قرار داده شدند و سپس مقدار نشت یونی (EL) و مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات 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_m'، 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 به‌طوری‌که بیشترین مقدار EL (۵۵/۷ درصد) و MDA (۱۲/۳ نانومول بر گرم بافت تازه)، در دمای ٤- درجه سانتیگراد به‌دست آمد. در این مطالعه، بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و APX در گیاهچه‌هایی ثبت شد که تحت تنش سرما (٤ درجه سانتیگراد) قرار داشتند. فعالیت دو آنزیم POD و PPO با کاهش دما به ٤- درجه سانتیگراد کاهش یافت. بیشترین مقدار پروتئین هم، در شرایط سرما محاسبه شد که نسبت به تیمار شاهد ٦۵/۵ درصد افزایش داشت. تنش دمای پایین، مقدار فنل و فلاونوئید کل سرخارگل‌ها را کاهش داد. بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۰/۹۳ درصد) در تیمار شاهد به‌دست آمد. در این آزمایش، اختلاف معنی‌داری در بین متغیرهای فلورسانس در شرایط تاریکی مشاهده نشد با این‌حال، مقدار F_m' و F_v'/F_m' با افزایش تنش کاهش یافت و بیشترین مقدار NPQ و qP هم، در دمای ٤- درجه سانتیگراد ثبت شد. به‌طور کلی، می‌توان ابراز عقیده کرد که گیاه سرخارگل تحمل نسبی به تنش دمای پایین تا ٤- درجه سانتیگراد دارد.

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

مقدمه:

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 بیوشیمیایی سلول‌ها را به‌طور 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).

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: mzavareh@guilan.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

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 ازطریق 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 ROS ها جهت محافظت سلول‌ها، مکانیزم‌های حفاظتی مختلفی از جمله سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی دارند که در سطوح مختلف تنش مؤثر است (Shi *et al*., 2007). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) از برجسته‌ترین مکانیزم‌های حفاظتی جهت حذف ROS ها هستند که رادیکال‌های آزاد سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) را به پراکسید هیدروژن (H_2O_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 (Ortega *et al*., 2009). از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی 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 به‌طور گسترده برای تعیین وضعیت فیزیولوژیک گیاه، تحمل آن به تنش‌های محیطی و میزان آسیب وارده به دستگاه فتوسنتزی مورد استفاده قرار می‌گیرد (سلطانی، ۱۳۸۲).

سرخارگل (*Echinacea purpurea*) یکی از گیاهان دارویی 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 به‌دست 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 به‌کار 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 به‌صورت 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 این‌حال، تنها در چند پژوهش به بررسی رفتار این گیاه دارویی با ارزش در شرایط سخت و تنش‌زای 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 زنده‌مانی گیاهچه‌ها در خاک (Gutirrez Boem *et al*., 1996)، تولید زیست‌توده و میزان فنول‌های کافئول 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 این‌که 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

مواد و روش‌ها:

این مطالعه در جهت بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاهچه‌های سرخارگل به تنش دمای پایین، به‌صورت 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)، ٤ و ٤- درجه سانتیگراد بود.

پیش از آغاز آزمایش، بذرهای سرخارگل پس از گندزدایی با هیپوکلریت سدیم در ژرمیناتور با دمای ۱±۲٦ 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 کولایت 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 خوسرمایی (Cold acclimation)، گیاهچه‌های پنج ماهه سرخارگل در اواخر دی ماه جهت اعمال تیمارهای دمایی به اتاقک رشد (SPG30000 شرکت نور صنعت) در شرایط تاریکی و رطوبت نسبی ٤٥ درصد منتقل شدند و دستگاه برای دوره‌های سرمایی برنامه‌ریزی شد. برای دمای شاهد نیز، سه گلدان در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ٤٥ درصد قرار داده شد. به منظور اعمال تیمارهای دمایی، گیاهان در معرض دماهای ٤ و ٤- درجه سانتیگراد به مدت شش ساعت قرار گرفتند. دمای اتاقک رشد در شروع آزمایش ٤ درجه سانتیگراد بود که پس از تیمار دمایی ٤ درجه، کاهش دما جهت رسیدن به تیمار دمایی ٤- درجه سلسیوس به‌تدریج و ۱/۵ درجه در ساعت بود. پس از اعمال تیمار دمایی زیر صفر (٤- درجه سلسیوس)، گیاهان از اتاقک رشد خارج شده و به منظور کاهش سرعت ذوب گیاهان، به محیطی با دمای ٤ درجه سانتیگراد منتقل شدند و پس از ۲٤ ساعت، نمونه‌برداری از برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته جهت تعیین شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی انجام گرفت. پس از اندازه‌گیری‌های فلورسانس کلروفیل و نشت یونی (Electrolyte leakage) (EL)، برگ‌های یکنواخت و کاملاً توسعه‌یافته گیاهچه‌های سرخارگل در هر تیمار جمع‌آوری و به‌سرعت در نیتروژن مایع قرار گرفتند. سپس نمونه‌های جمع‌آوری شده جهت اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. شاخص‌های بیوشیمیایی شامل پراکسیداسیون لیپید (MDA)، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات‌پراکسیداز (APX) و پلی فنول اکسیداز (PPO) و همچنین، مقدار پروتئین کل، فنل و فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) بود.

اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل: جهت بررسی اثرات تنش سرما بر دستگاه فتوسنتزی، مقدار فلورسانس کلروفیل گیاهان شاهد و گیاهان تحت تنش با استفاده از دستگاه فلورومتر (PAM 2500-Walz, Germany) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری گیاهان در دمای ٤- درجه سلسیوس پس از ۲٤ ساعت از بازیابی آنها از تنش، انجام شد. برای این‌منظور، جوان‌ترین برگ کاملاً توسعه‌یافته سرخارگل‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه جهت سازگاری به تاریکی به‌وسیله گیره‌های مخصوص برگ-2030-B, Walz) از تابش نور محافظت شدند. سپس با اعمال نور قرمز اشباع (۸۰۰۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) به‌مدت یک ثانیه، فلورسانس به‌سرعت از حالت پایه (F_o) به مقدار بیشینه (F_m) ثبت می‌شود. در این شرایط، اولین پذیرنده الکترون (QA) کاملاً احیا شده و مراکز واکنش فتوسیستم دو (PSII) بسته شده است (Baker and Rosenqvist, 2004). بدین‌ترتیب پارامترهای فلورسانس کمینه (F_o)، فلورسانس بیشینه (F_m) و فلورسانس متغیر (F_v) براساس دستورالعمل دستگاه در شرایط سازگاری با تاریکی اندازه‌گیری شدند. با اندازه‌گیری این پارامترها، بیشینه بازده کوانتومی PSII (F_v/F_m) در شرایط سازگاری به تاریکی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Genty

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

:(*et al.*, 1989

$$Fv/Fm = (Fm - Fo)/Fm$$ رابطه (۱)

در شرایط سازگاری به روشنایی هم، بلافاصله پیش از اعمال پالس اشباع نور در حضور نور فعال فتوسنتزی، 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 منعکس‌کننده بخش فتوشیمیایی خاموشی فلورسانس (qP) است که حالت اکسیداسیون اولین پذیرنده الکترون PSII (QA) را در هنگامی‌که مراکز واکنش PSII باز هستند اندازه‌گیری می‌کند (سلطانی، ۱۳۸۲). تفاوت بین F_m با F_m' نیز، نشان‌دهنده بخش غیر فتوشیمیایی خاموشی فلورسانس کلروفیل (NPQ) است (سلطانی، ۱۳۸۲).

ارزیابی نشت یونی: جهت تعیین EL، پنج دیسک از برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته به قطر یک سانتی‌متر و سه نمونه در هر تکرار نمونه‌برداری 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 ۲٤ 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 به‌مدت۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند و هدایت الکتریکی ثانویه (EC_2) آن‌ها پس از خنک‌شدن در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد. در نهایت مقدار EL با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد (Lutts *et al.*, 1995):

$$EL = (EC1/EC2) \times 100$$ رابطه (۲)

سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا: برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان محصول پراکسیده‌شدن اسیدهای چرب غشاها به‌روش Heath و Packer (۱۹٦۸) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، در ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ با نیتروژن مایع آسیاب و به آن پنج میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (TCA) یک درصد اضافه شد. عصاره به‌دست آمده به‌مدت ۲۰ دقیقه با دستگاه سانتریفیوژ (Ependorf 5417 R) در ۱٤۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سلیسیوس سانتریفیوژ شد. سپس، به یک میلی‌لیتر از محلول رویی، پنج میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و بلافاصله در یخ، سرد شد. سپس نمونه‌ها مجدداً در ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. ماده قرمز رنگ مالون‌دی‌آلدهید-تیوباربیوتریک‌اسید (MDA-TBA) تولیدشده، در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Analytic Jena-SPEKOL 1300) اندازه‌گیری شد و جذب سایر رنگیزه‌های اختصاصی نیز، در طول موج ٦۰۰ نانومتر خوانده شد. تعیین غلظت مالون‌دی‌آلدهید از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ mM^{-1} cm^{-1}، بر حسب نانومول بر گرم بافت تازه با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد.

$$\text{غلظت MDA} = \frac{(A532 - A600)}{155} \times 1000$$ رابطه (۳)

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 آسیاب‌شده، یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۵ مولار و پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون (Polyvinylpolypyrrolidone) (PVPP) دو درصد اضافه و در دمای چهار درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱٤۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های SOD، POD، CAT و APX و همچنین، محتوای پروتئین کل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم SOD: سنجش فعالیت آنزیم SOD با استفاده از روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافرفسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۱میلی‌مولار، متیونین۱۳ میلی‌مولار و نیتروبلو-تترازولیوم (Nitroblue-tetrazolium) (NBT) ۷۵ میکرومولار و ۱۵ میکرولیتر ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده بود. پس از آماده‌سازی نمونه‌های کنترل (شاهد) و بلانک، به منظور اندازه‌گیری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

فعالیت آنزیمی، نمونه بلانک به‌مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و نمونه‌های شاهد و عصاره آنزیمی، به‌مدت 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 ٥٦٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر 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 ٤ محاسبه و بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه بیان شد.

رابطه (٤)

$$\text{فعالیت آنزیم SOD (Unit/gFW)} = \frac{100 - [\frac{(\text{OD Control} - \text{OD Sampal})}{\text{OD Control}} \times 100]}{50}$$

فعالیت آنزیم POD: برای سنجش فعالیت آنزیم POD از روش In و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد: ٤٩٠ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ۲۲۵ میلی‌مولار و ٤٩٠ میکرولیتر محلول گایاکول ٤٥ میلی‌مولار با هم مخلوط و به آن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. تغییرات جذب در طول موج ٤٧٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در محلول بلانک به‌جای عصاره آنزیمی، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی گایاکول پراکسیداز معادل ٢٦/٦ $mM^{-1}cm^{-1}$ 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 (١٩٧٤) با اندکی تغییرات استفاده شد: ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۹۸۰ میکرولیتر از بافرفسفات حاوی پراکسید هیدروژن دو میلی‌مولار مخلوط و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ٢٤٠ نانومتر از راه اندازه‌گیری تجزیه پراکسید هیدروژن توسط اسپکتروفتومتر به صورت تغییرات جذب بر زمان (OD/min) ثبت شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی کاتالاز $mM^{-1}cm^{-1}$ ۳۹/٤ محاسبه و در نهایت بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه بیان شد.

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 میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید پنج میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ۰/۱ میلی‌مولار 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 آسکوربات 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 $mM^{-1}cm^{-1}$ ۲/۸ 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: ٤٩٠ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۵ مولار و ٤٩٠ میکرولیتر پیروکاتکول ۰/۰۲ مولار به ۲۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی اضافه شد. پس از بهم‌زدن مخلوط واکنش، تغییرات جذب در طول موج ٤٢٠ نانومتر در مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت این آنزیم با استفاده از قانون بیرلامبرت و ضریب خاموشی آنزیم PPO با پیش‌ماده پیروکاتکول ($١٤٠٠\ M^{-1}\ cm^{-1}$) 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 (١٩٧٦) 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 متانولی استخراج‌شده 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

۷٦٥ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار فنل کل از روی منحنی استاندارد گالیک اسید برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه بیان شد.

ارزیابی فلاونوئید کل: مقدار فلاونوئید کل با روش کالریمتری آلومینیوم‌کلراید اندازه‌گیری شد (Du *et al*., 2009). ابتدا به ۱۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده به ترتیب ۱۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۳۰ درصد، ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت‌سدیم ۰/۵ میلی‌مولار و ۱۵۰ میکرولیتر کلریدآلومینیوم ۰/۳ میلی‌مولار اضافه و بلافاصله به‌هم زده شد. پس از گذشت پنج دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم یک میلی‌مولار اضافه شد. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه، میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٥۰٦ نانومتر ثبت شد. سپس مقدار فلاونوئید کل از روی منحنی استاندارد کاتچین برحسب میلی‌گرم کاتچین در گرم بافت تازه بیان شد.

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه، از طریق خاصیت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد (Brand-Williams *et al*., 1995). برای این منظور، به ۲۰۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده نمونه‌ها، ۸۰۰ میکرولیتر محلول DPPH اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به‌صورت 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<$۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها در نظر گرفته شد. نمودارها و آزمون رگرسیون و همبستگی، با نرم‌افزار SigmaPlot نسخه ۱۲ رسم و تعیین شدند.

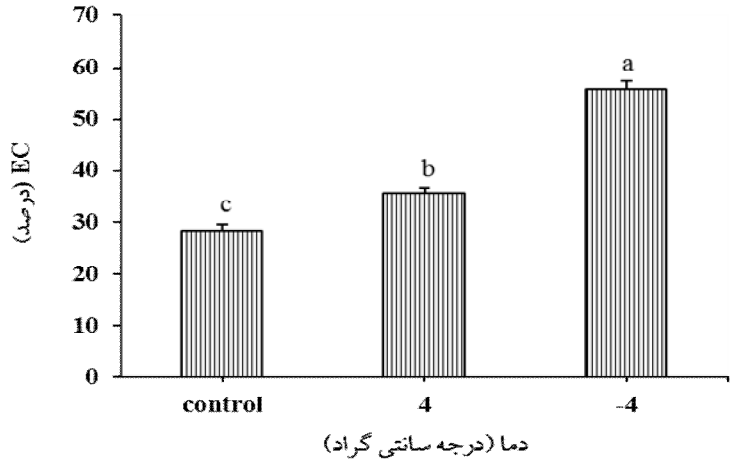
نتایج و بحث:

تجزیه واریانس داده‌ها، تأثیر بسیار معنی‌دار تنش دمای پایین را 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 ٤- 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 به‌عنوان اولین مکان خسارت در اثر سرما به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دما قرار گرفت. با این‌حال، با کاهش دما مقدار EL افزایش پیدا کرد که این افزایش، ٤۹/۲ درصد در دمای زیر صفر (٤- درجه سانتیگراد) بود (شکل ۱). مقادیر بالای EL نشان‌دهنده عدم توانایی غشا در حفظ ترکیبات درون سلولی، اختلال در فعالیت و انسجام غشاهای سلولی و خروج بیشتر الکترولیت‌ها 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 غشای این اسیدهای چرب از حالت نیمه مایع به حالت کریستالی می‌شود (Mahajan and Tuteja, 2005) و به‌دنبال آن، فعالیت غشا مختل‌شده 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 الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی افزایش یافته است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها، تنش دمای پایین سبب افزایش معنی‌دار محتوای MDA به‌عنوان 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 غشای سلول و محتوای مالون‌دی‌آلدهید در برگ سرخارگل شد به‌طوری‌که، بیشترین مقدار MDA (۱۲/۳ نانومول بر گرم بافت تازه) در دمای ٤- درجه سانتیگراد به‌دست آمد که نسبت به دمای شاهد ۵۰/۷ درصد افزایش داشت (جدول ۲). کمترین میزان MDA (٦/۰٦ نانومول بر گرم بافت تازه) نیز، در تیمار شاهد به‌دست آمد (جدول ۲). در بررسی روابط رگرسیونی مشاهده شد که بین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]



شکل ۱- اثر تنش دمای پایین بر درصد نشت یونی (EL) برگ سرخارگل. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ± SE (خطای معیار) است. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون (حداقل تفاوت معنی‌دار) است.

مقدار MDA و EL برگ‌های در معرض تنش دمای پایین، رابطه‌ی خطی و مثبتی (R^2=۰/۷۱** ؛ r=۰/۸٤**) وجود دارد (شکل ۲)؛ به طوری‌که با افزایش هر واحد EL، میزان MDA ۰/۲۱ واحد در بین تیمارهای دمایی افزایش نشان داد (شکل ۲). در آزمایش حاضر، پراکسیداسیون غشای سلول‌های برگ تحت تنش دمای پایین (٤ و ٤- درجه سانتیگراد) در مقایسه با شاهد (بدون تنش) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۲). علت این افزایش را می‌توان از طرفی ناشی از تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن و از طرف دیگر کافی‌نبودن قدرت دفاعی آنتی‌اکسیدانی از جمله آنزیمی و غیرآنزیمی برای حذف این رادیکال‌ها دانست (Allen and Ort, 2001). این رادیکال‌های آزاد بسیار واکنش‌گر بوده و به‌علت میل ترکیبی زیادی که با لیپیدها دارند با خارج‌کردن 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 (Li *et al*., 2008). در این راستا، Saleh (۲۰۰۷) 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 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 (۱۳۳/۸ میکرومول برگرم بافت تازه) در تیمار دمایی ٤ درجه سانتیگراد به‌دست آمد (جدول ۲). کمترین فعالیت آن (۲۸/۳ میکرومول برگرم بافت تازه) نیز، در تیمار دمایی ٤- درجه سانتیگراد مشاهده شد که ۷۸/۹ درصد نسبت به تیمار سرما (٤ 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 (R^2=۰/٦۳* ؛ r=-۰/۷۹*) مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که به ازای هر واحد افزایش نشت یونی، فعالیت آنزیم SOD، ۰/۲۹ واحد کاهش داشت (داده‌ها نشان داده 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 به‌عنوان یک آنزیم از بین‌برنده 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8] [Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

جدول ١ -نتایج تجزیه واریانس تأثیر تنش دمای پایین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی در برگ سرخارگل

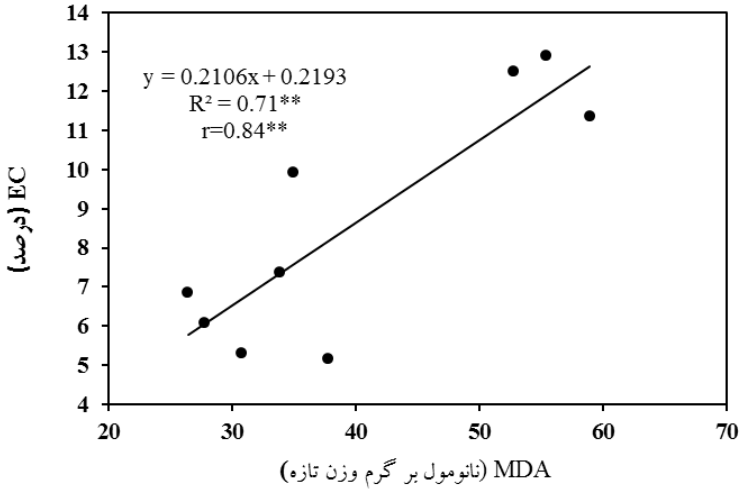
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات									
		EL	MDA	SOD	POD	CAT	APX	PPO	PRO	PHO	PHL	DPPH
تیمار دمایی	٢	٦٠٥/٣**	٣١/٦**	٨٥٧٢٥٢/٤**	١٦٢٦/٤**	٢٦٥١٩٠/٦**	١٣٤٥٣٧٠٩/١**	٠/٣٠٤**	١٥٤٧٢/٨**	٢/١١**	٧/٣٩**	٠/٠٠٩**
اشتباه آزمایشی	٦	٦/١٩	٢/٣٢	٧١٦٤/٩	٤٥/٦	٢٠٥٨/٥	٤١١١٦٦/٩	٠/٠١٤	١٠٥٥/٣	٠/٠٤١	٠/٠٢٣	٠/٠٠٠١
ضریب نسبی پراکندگی	–	٦/٢٥	١٤/٧	٩/٨	١٤/٧	١٠/٨	١٤/٣	١٢/٣	٩/٨	١/٢١	١/٤٢	١/١٢

* و **= به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد. EL: نشت یونی، MDA: مالون‌دی‌آلدهید، SOD: آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، POD: آنزیم پراکسیداز، CAT: آنزیم کاتالاز، APX: آنزیم آسکوربات پراکسیداز، PPO: آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، PRO: پروتئین، PHO: فنول، PHL: فلاونوئید، DPPH: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

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

پارامتر	واحد	تیمار دمایی (درجه سانتیگراد)		
		شاهد	٤	-٤
MDA	نانومول بر گرم بافت تازه	٦/٠٦±٠/٤٤٧^{b}	٧/٤٨±١/٣٨^{a}	١٢/٣±٠/٤٦٥^{a}
SOD	میکرومول بر گرم بافت تازه	٩٦/٤±٦/٥^{b}	١٣٣/٨±١٧/٤^{a}	٢٨/٣±٣/٨^{c}
POD	میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه	٧١/٢±٥/٧٧^{a}	٤٠/٧±١/٢١^{b}	٢٥/٥±٣/٢٨^{c}
CAT	میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه	١٤٦/٣±٢٤/٦^{c}	٧٣٧/٤±٢٣/٣^{a}	٣٨٦/٣±٣٠/١^{b}
APX	میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه	٨٢/٧±٨/٤^{c}	٥٠٠/٦±٥٧/٧^{a}	٢٣٢/٩±٢٦/٢^{b}
PPO	میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه	١/٠١±٠/١١٤^{a}	٠/٦٨±٠/٠٢١^{b}	٠/٣٧٨±٠/٠٨٤^{c}
PRO	میلی‌گرم بر گرم بافت تازه	٧٤/٧±٥/٣٨^{b}	٢١٦/٥±٢٣/٠١^{a}	١٢٥/٩±٢٢/٢^{b}
PHO	میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه	١٧/٨±٠/١٥٧^{a}	١٦/٧±٠/١٢٨^{b}	١٦/١±٠/٠١٣^{c}
PHL	میلی‌گرم کاتچین در گرم بافت تازه	١٢/٣±٠/١٢٣^{a}	١٠/٨±٠/٠٧٤^{b}	٩/٠٩±٠/٠٥١^{c}
DPPH	درصد	٠/٩٣±٠/٠٠٣^{a}	٠/٩٢±٠/٠٠٣^{a}	٠/٨٣±٠/٠٠٩^{b}

MDA: مالون‌دی‌آلدهید، SOD: آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، POD: آنزیم پراکسیداز، CAT: آنزیم کاتالاز، APX: آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز، PPO: آنزیم پلی فنول اکسیداز، PRO: پروتئین، PHO: فنول، PHL: فلاونوئید، DPPH: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) 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 مالون‌دی‌آلدهید (MDA) برگ سرخارگل**

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

بر پایه نتایج به‌دست 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 میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه) مربوط به گیاهچه‌های تیمار شده در دمای شاهد به‌دست آمد (جدول ۲). کمترین فعالیت این آنزیم هم، ۲۵/۵

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه مربوط به تیمار دمایی ٤- درجه سانتیگراد بود که در مقایسه با تیمار شاهد، ٦٤/۲ درصد کاهش داشت (جدول ۲). بر پایه نتایج آزمون همبستگی و روابط رگرسیونی، رابطه‌ی خطی منفی و بالایی ($r=-۰/۸٦^{**}$؛ $R^{۲}=۰/۷٤^{**}$) 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 داده نشده‌اند).

پراکسیدازها مسئول حذف مقادیر اضافی پراکسید هیدروژن می‌باشند (Kopyra and Gwozdz, 2003). در شرایط تنش، آنزیم SOD با تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن، از یک‌سو موجب حذف این آنیون شده و از سوی دیگر با القای آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز، سمیت پراکسید هیدروژن را در سلول کاهش می‌دهد (Kopyra and Gwozdz, 2003). با این‌وجود کاهش فعالیت آنزیم POD در این مطالعه، نشان می‌دهد که فعالیت دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز 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 ۷۳۷/٤ میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه در سرخارگل‌هایی به‌دست آمد که تحت تنش دمایی ٤ درجه سانتیگراد قرار گرفته بودند (جدول ۲). کمترین فعالیت این آنزیم، ۱٤٦/۳ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه مربوط به شرایط بدون تنش (تیمار شاهد) بود که نسبت به تنش دمایی ٤ درجه سانتیگراد با بیشینه فعالیت آنزیمی، ۸۰/۲ درصد کاهش، محاسبه شد (جدول ۲). با این‌حال، فعالیت این آنزیم در دمای ٤- درجه سانتیگراد همانند آنزیم SOD کاهش نشان داد. با این‌حال، فعالیت آنزیم CAT به میزان ٦۲/۱ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش و ٤۷/٦ درصد نسبت به تیمار سرمایی ٤ درجه سانتیگراد کاهش داشت (جدول ۲). نتایج آزمون همبستگی نشان داد که فعالیت آنزیم CAT با درصد نشت یونی معنی‌دار نبود ($r=۰/۱۳^{ns}$).

آنزیم کاتالاز یک آنزیم پاکسازی‌کننده 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 آسکوربات پراکسیداز، کاهش خواهد یافت.

بر مبنای نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، تنش دمای پایین در گیاهچه‌های سرخارگل موجب افزایش معنی‌دار 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 (٤ درجه سانتیگراد) بیشتر از دمای ٤- درجه سانتیگراد بود (جدول ۲). آنزیم APX در دمای ٤ درجه سانتیگراد به بیشینه فعالیت خود به میزان ۵۰۰/٦ میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه رسید و با کاهش دما به ٤- درجه سانتیگراد، فعالیت آن ۵۳/۵ درصد کاهش یافت (جدول ۲). کمترین فعالیت این آنزیم نیز، مربوط به شرایط بدون تنش با ۸۲/۷ 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 ($r=۰/۱۱^{ns}$).

در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون، آنزیم APX با مصرف آسکوربات به‌عنوان 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

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 آرابیدوبسیس (Ruth, 2002) و گندم (Yordanova and Popova, 2007) نیز، به افزایش معنی‌دار فعالیت APX اشاره شده است که موافق با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد.

ترکیبات فنلی توسط آنزیم PPO و POD 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 به‌طوری‌که با کاهش دما به ٤- درجه سانتیگراد فعالیت این آنزیم هم، روند کاهشی را ثبت کرد (جدول ۲). با این‌وجود، بیشینه فعالیت آن در تیمار شاهد (عدم تنش) بود که نسبت به دمای ٤- درجه سانتیگراد با کمترین فعالیت آنزیمی (۰/۳۷۸ میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه)، ٦۲/٦ درصد افزایش داشت (جدول ۲). میزان فعالیت این آنزیم در تیمار دمایی ٤ درجه سانتیگراد، ۰/٦۸۱ میکرومول برگرم 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 ($r=۰/۸۵^{**}$).

آنزیم PPO، موجب تبدیل ترکیبات منوفنل 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 تولیدشده، می‌توانند در سلول به‌عنوان 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 ایجادشده به‌وسیله تنش یخزدگی کمک کند. در بررسی یافته‌های پژوهش‌گران، به اثر کاهش دما بر گیاه هندوانه، گوجه‌فرنگی و 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 دماهای 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 دمایی ٤ درجه سانتیگراد بود که میزان آن (۲۱٦/۵ میلی‌گرم بر گرم بافت تازه) نسبت به شاهد (۷٤/۷ میلی‌گرم بر گرم بافت تازه) حدود ٦۵/۵ درصد افزایش داشت (جدول ۲). با این وجود، میزان پروتئین در تنش دمایی زیر صفر (٤- درجه سانتیگراد)، ۱۲۵/۹ میلی‌گرم بر گرم بافت تازه به‌دست آمد که در مقایسه با دمای شاهد ٤۰/۷ درصد افزایش داشت ولی نسبت به دمای ٤ درجه سانتیگراد، ٤۱/۸ 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 ($r=۰/۰٤^{ns}$).

افزایش میزان پروتئین تحت تنش دمایی ٤ درجه سانتیگراد نسبت به شاهد (جدول ۲)، احتمالاً می‌تواند به‌علت افزایش در سنتز پروتئین‌های ویژه (پروتئین شوک حرارتی و دهیدرین)، افزایش فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز و گلوتامین سنتتاز و فعال‌شدن آنزیم‌های درگیر در سنتز پروتئین‌ها باشد (Sharma and Dietz, 2009). مشابه با نتایج آزمایش حاضر، افزایش میزان پروتئین تحت تنش سرما در پژوهش‌های Ortegra 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 ROS ها در میتوکندری و کلروپلاست می‌شود. با این‌وجود، کاهش مقدار پروتئین تحت دمای ٤- درجه سانتیگراد می‌تواند ناشی از کاهش در سنتز پروتئین، تسریع پروتئولیز و واسرشت شدن پروتئین‌ها، اکسیداسیون اسیدهای آمینه به گروه‌های کربونیل، افزایش نیترات، آمونیوم و اسیدهای آمینه آزاد و تجزیه آنزیم‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

درگیر در سنتز پروتئین‌ها باشد (Sharma and Dietz, 2009).

در این آزمایش با افزایش شدت تنش به دمای ٤- درجه سانتیگراد، میزان فنل به‌عنوان آنتی‌اکسیدان کاهش معنی‌داری نشان داد (جدول ۱ و ۳). این ترکیب آنتی‌اکسیدانی بیشترین میزان کاهش (۱٦/۱ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه) را در دمای ٤- 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، رابطه‌ی خطی بسیار بالایی (R^2=۰/۷٤** ؛ r=۰/۸۹**) در بین درصد نشت الکترولیت‌ها و فنل کل نشان دادند (داده‌ها نشان داده 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). مکانسیم عمومی ترکیبات فنلی در جهت فعالیت آنتی‌اکسیدانی، حذف رادیکال‌های آزاد لیپید 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، POD و CAT 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 ٤- درجه سانتیگراد، فلاونوئیدها به‌مانند ترکیبات فنلی روند کاهشی را نسبت به شرایط بدون تنش نشان دادند که این کاهش برای دمای ٤ و ٤- درجه سلیوس به‌ترتیب ۱۲/۲ و ۲٦/۱ 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=-۰/۹٦**).

فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان هستند که در تنش های محیطی با افزایش فعالیت آنزیمPAL تولید آن‌ها افزایش می‌یابد (Myung-Min *et al*., 2009). مطالعات انجام شده نقش اکوفیزیولوژی این ترکیبات را به‌عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و همچنین، یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی نشان می‌دهد (Razali *et al*., 2008; Vogt, 2010). خسارت بیشتر ساختار غشا (افزایش MDA و نشت یونی) و افزایش فعالیت سه آنزیم SOD، CAT و APX در طی تنش سرما، نشان‌دهنده تولید ROS و افزایش خسارت اکسیداتیو در دو تیمار دمای پایین می‌باشد. با این‌وجود، کاهش میزان فنل‌ها و فلاونوئیدها در این دماها ممکن است ناشی از اکسیداسیون آن‌ها توسط ROS ها (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 به‌دست آمد. با این‌وجود، کمینه درصد بازدارندگی (۰/۸۳ درصد) در کمترین دما (٤- 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 الکتریکی نشان داد که رابطه‌ی خطی بسیار بالایی بین میزان نشت یونی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه وجود دارد (R^2=۰/۹٤**). 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

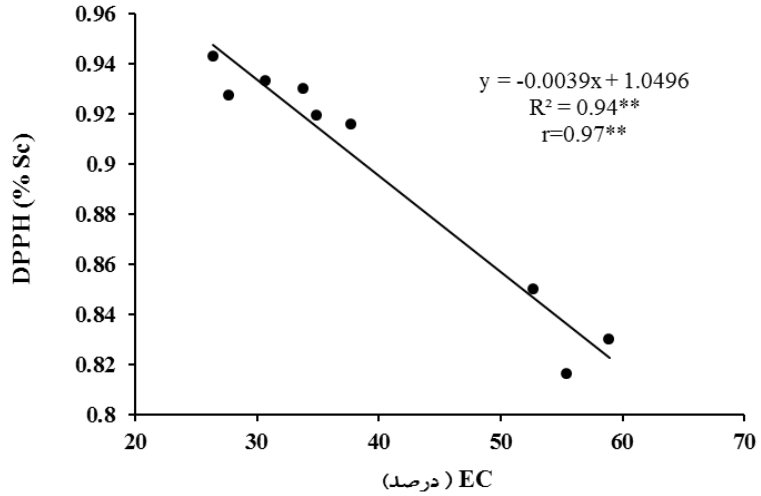
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		F_t	F_m'	F_o'	F_v'/F_m'	Q_{PSII}	qP	NPQ	ETR
تیمار دمایی	۲	۰/۰۰۶^{ns}	۰/۰۷٤*	۰/۰۰۹^{ns}	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۰۸*	۰/۰۰٤*	۰/۰۲۵**	۰/۰۰۲^{ns}
اشتباه آزمایشی	٦	۰/۰۰۵	۰/۰۱۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰٤	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲
ضریب نسبی پراکندگی	–	۷/۰۱	۲/۸۸	۲/۵٦	۱/٦٦	۱/۷۵	۱/۷٦	۵/۳۸	۱/٤۸

ns= عدم تفاوت معنی‌دار، * و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد. F_t: (فلورسانس پایدار)، F_m': (فلورسانس بیشینه در روشنایی)، F_o': (فلورسانس کمینه در روشنایی)، F_v'/F_m': (بیشینه کارایی کوانتومی مراکز واکنش باز PSII)، Q_{PSII}: (عملکرد کوانتوم انتقال الکترون PSII تحت شرایط روشنایی)، Qp: (ضریب خاموشی فتوشیمیایی)، NPQ: (خاموشی غیر فتوشیمیایی)، ETR: (سرعت انتقال الکترون خطی)



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

گونه‌های رادیکالی که دهنده‌ی هیدروژن هستند، واکنش داده و به شکل احیاشده در می‌آیند و بدین‌ترتیب، 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 تنش) دیده شد (جدول ۲). با توجه به رابطه‌ی خطی و مثبت بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل (R^2=۰/٦٦** ؛ داده‌ها نشان داده نشده‌اند)، پایین‌بودن اثرات آنتی‌اکسیدانی در گیاهچه‌های سرخارگل می‌تواند احتمالاً به‌دلیل کاهش مقدار فنل و فلاونوئید کل در دماهای مورد آزمایش (٤ و ٤- درجه سانتیگراد) باشد (جدول ۲). ازطرفی، ممکن است عدم تعادل بین تولید ROS ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی 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 تنش‌های 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_o، F_m، F_v و F_v/F_m) اختلاف معنی‌داری در بین سطوح دمایی نداشتند و همگی در یک گروه آماری قرار گرفته‌اند (جدول ٤). نتایج تجزیه واریانس متغیرهای فلورسانس کلروفیل در شرایط روشنایی نشان می‌دهد که تیمار دمای پایین بر مقدار F_o' (کمینه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

فلورسانس در شرایط روشنایی) بی‌تأثیر بود (جدول ۳)، ولی اثر معنی‌داری بر روی مقدار F_m' و F_v'/F_m' (بیشینه کارایی کوانتومی مراکز واکنش بازPSII در شرایط روشنایی) داشت (جدول ٤). مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که با کاهش دما به زیر صفر (٤- درجه سانتیگراد)، F_m' کاهش نشان داد به‌طوری‌که بیشترین مقدار آن در تیمار شاهد (عدم تنش)، ۳/۹٦ به‌دست آمد (جدول ۵).

تنش دمای پایین از تجزیه مولکول آب و یا اکسیداسیون نوری در PSII ممانعت می‌کند و موجب کاهش فلورسانس کلروفیل می‌شود (Maxwell and Johnson, 2000). با توجه به این امر، افزایش تنش سرما به ٤- درجه سانتیگراد سبب کاهش مقدار بیشینه فلورسانس از کلروفیل در برگ‌های سرخارگل شد (جدول ۵). نتایج مطالعه انجام‌شده در این زمینه (Herzogand Olszewski, 1998)، یافته‌های به‌دست 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'_o تاثیری داشته باشد (Anonymous, 1993). بر این‌اساس عدم تأثیر دمای پایین بر مقدار F'_o، تفاوت غیرمعنی‌دار مقدار F'_o را در این آزمایش، توجیه می‌کند (جدول ۳).

نتایج مربوط به میزان ضریب خاموشی فتوشیمیایی فلورسانس کلروفیل (qP) نشان داد که با کاهش دما به زیر صفر (٤- درجه سانتیگراد)، مقدار qP به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۳ و ۵). بیشینه این ضریب (۱/۱۹) در تیمار دمایی ٤- درجه سانتیگراد به‌دست 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 ($r=-۰/۸۸^{**}$)؛ داده‌ها نشان داده نشده‌اند.

خاموشی غیر فتوشیمیایی (NPQ) به اتلاف گرمایی انرژی برانگیخته در رنگیزه‌های کمکی PSII و سطوح مراکز واکنش مربوط می‌شود که عملکرد فلورسانس را در سراسر برگ کاهش می‌دهد (سلطانی، ۱۳۸۲). پارامتر NPQ از بیش‌انگیختگی PSII و خسارت به دستگاه فتوسنتزی ممانعت به‌عمل 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 ٤- درجه سانتیگراد نشان داد (جدول ۳ و ۵). بیشترین مقدار آن ۰/۸۵۳ در دمای ٤- درجه سانتیگراد ثبت شد که نسبت به دمای شاهد، حدود ۱٦ درصد افزایش داشت (جدول ۵).

کاهش میزان انرژی به‌دام افتاده در اثر غیرفعال شدن مراکز واکنش PSII تحت تنش سرما، می‌تواند میزان اتلاف انرژی به‌صورت گرما را افزایش دهد (Strasser *et al*., 2004). Joao و همکاران (۲۰۰٦) هم، در بررسی اثر همزمان دو تنش تابش زیاد و خشکی شدید بر گیاه آفتابگردان، به افزایش ٤۰ 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} اندازه‌گیری می‌شود. به عبارتی دیگر، Q_{PSII} بخشی از نور جذب‌شده 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 کوانتومی تقریباً بین ۲/۵ تا ۱۱ درصد وابسته به شرایط فتوسنتز 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 ۰/۷۱٦ در تیمار سرمازدگی (٤ درجه سانتیگراد) تا ۰/۷٤۷ در شرایط عدم تنش (تیمار شاهد) متغیر بود (جدول ۵). تأثیر منفی سرما بر مراکز واکنش فعال PSII (آسیب پروتیین D_1 و کاهش میزان انرژی به دام افتاده 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 کوانتومی مراکز واکنش باز PSII در شرایط

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تنش دمای پایین بر ویژگی‌های فلورسانس کلروفیل در برگ سرخارگل سازگارشده با تاریکی

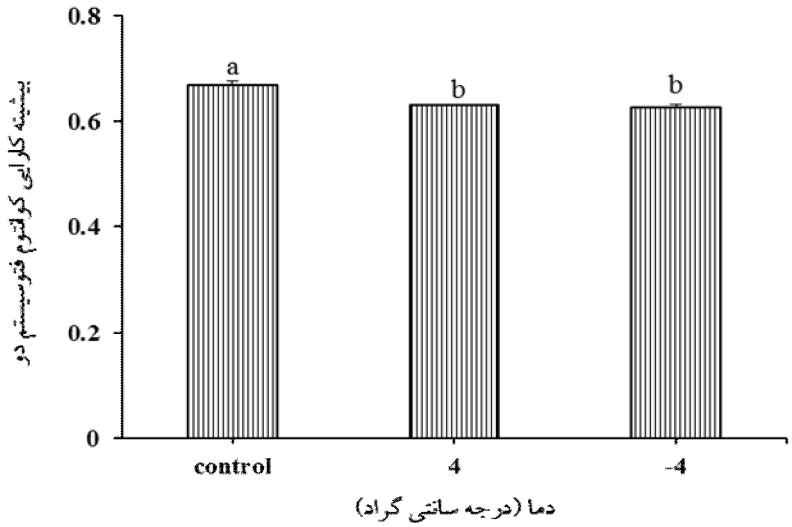
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		F_o	F_m	F_v	F_v/F_m
تیمار دمایی	۲	۰/۰۱۹٤^{ns}	۰/۰۱۲^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۰۳^{ns}
اشتباه آزمایشی	٦	۰/۰۰۸	۰/۰۱۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۱
ضریب نسبی پراکندگی	-	۵/٦۷	۱/٥٤	۱/۳۵	۱/٤٤

ns= عدم تفاوت معنی‌دار. F_o: (فلورسانس کمینه)، F_m: (فلورسانس بیشینه)، F_v: (فلورسانس متغیر)، F_v/F_m: (کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II).

جدول ٥- اثر تنش دمای پایین بر برخی از ویژگی‌های فلورسانس کلروفیل در برگ سرخارگل

تیمار دمایی (درجه سانتیگراد)	پارامترهای مربوط به برگ سازگار شده با روشنایی			
	F_m'	qP	NPQ	Q_{PSII}
شاهد	۳/۹٦±۰/۰۷۲^{a}	۱/۱۲±۰/۰۱٥^{b}	۰/۷۱٦±۰/۰۱٦^{b}	۰/۷٤۷±۰/۰۱۱^{a}
٤	۳/٦٦±۰/۰۳^{b}	۱/۱٤±۰/۰۱۱^{b}	۰/۸۸۸±۰/۰۱٥^{a}	۰/۷۱٦±۰/۰۱^{b}
-٤	۳/۷۲±۰/۰۷٥^{b}	۱/۱۹±۰/۰۱۳^{a}	۰/۸٥۳±۰/۰۳۸^{a}	۰/۷٤٥±۰/۰۰٦^{a}

مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است. حروف یکسان در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون (حداقل تفاوت معنی‌دار) است. F_m' (فلورسانس بیشینه در شرایط روشنایی)، Qp (ضریب خاموشی فتوشیمیایی)، NPQ (خاموشی غیر فتوشیمیایی)، Q_{PSII} (عملکرد کوانتوم انتقال الکترون PSII تحت شرایط روشنایی).



شکل ٤- اثر تنش دمای پایین بر ('Fv'/Fm) در برگ سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای معیار) است. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون (حداقل تفاوت معنی‌دار) است.

روشنایی به صورت F_v'/F_m' تعریف شده است. پس از افزایش اتلاف انرژی به صورت گرما (خاموشی غیر فتوشیمیایی)، F_v'/F_m' هم کاهش می‌یابد. تیمار سرما به‌طور معنی‌داری در میزان F_v'/F_m' مؤثر بود (جدول ۳). مقایسه روند تغییرات شاخص F_v'/F_m' در شکل ٤ نشان می‌دهد که تیمار سرما سبب کاهش F_v'/F_m' شده است. بیشترین مقدار این شاخص ۰/٦٦۹، در تیمار شاهد به‌دست آمد. کاهش دما توانست مقدار F_v'/F_m' را به ۰/٦۲۷ در تیمار دمایی ٤- درجه سانتیگراد کاهش دهد که با دمای ٤ درجه سانتیگراد در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل ٤). کاهش F_v'/F_m' در شرایط سرما در پژوهش حاضر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

می تواند ازطرفی به علت تخریب و غیر فعال‌سازی پروتئین D_1 مراکز واکنش PSII تحت تنش 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 ٤ درجه سانتیگراد، فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای پروتئین در مقایسه با شاهد افزایش یافتند. سپس با کاهش بیشتر دما تا ٤- درجه سانتیگراد، فعالیت این آنزیم‌ها به همراه پروتئین کاهش یافت. به‌طور کلی، با توجه به یافته‌های به‌دست آمده و مشاهدات ظاهری در چند روز پس از تنش می‌توان نتیجه گرفت که گیاه دارویی سرخارگل به تنش دمای پایین تحمل نسبی دارد.

تشکر و قدردانی:

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

منابع:

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. Lindstorm, O. (2007) Low temperature tolerance assessment in paspalm. 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 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 effecte 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

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. Experimenta 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) Multivariente 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 activationof 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 NACI during development of rice varieties differing in salinity resistance. Journal of Experimental Botany 46: 1843– 1852.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]

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 biosyntesis. 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 ezyme 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 EI-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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.8.8]