Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

ارزیابی پاسخ‌های بیوشیمیایی و مورفوفیزولوژیکی بنفشه (Viola× wittrockiana) به تنش خشکی و سرما

عطیه اورعی[1]، علی تهرانی فر[1*]، احمد نظامی[2] و محمود شور[1]

[1] گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[2] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۰۸/۰۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۲/۱۸)

چکیده

افزایش دما در فصول سرد به دلیل تغییرات اقلیمی، بر بقاء گیاهان زینتی در فضای سبز اثر منفی داشته است. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر مقاومت به سرماو ارزیابی تغییرات مورفوفیزیولوژیکی بر گیاه بنفشه (*Viola× wittrockiana*) اجرا شد.آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه سطح آبیاری (۸۰٪، ٦۰٪ و ٤۰٪ ظرفیت زراعی) و ده سطح دمایی (۲۰، صفر، ۳-، ٦-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸-، ۲۱- و ۲٤- سانتیگراد) در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹٤ انجام شد. بعد از تیمارهای آبیاری صفاتی نظیر کربوهیدارت، پرولین، میزان کلروفیل (a، b و کل)، کاروتنوئید و محتوای نسبی آب و پس از تیمارهای سرمایی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و میزان فنل کل و در پایان دوره رشد مجدد صفات مرفولوژیکی اندام هوایی و ریشه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در گیاهان تحت تنش خشکی شدید، میزان کربوهیدرات (۲/٦۷٪)، پرولین (۵۰/۵٪) به طور معنی‌داری افزایش و میزان کلروفیل کل (۱۳/٦٪) و محتوای نسبی آب (۲۳/۹٪) نسبت به شاهد کاهش یافت. اثرات متقابل تیمارهای آبیاری و دمایی به طور معنی‌داری فعالیت دو آنزیم را تحت تأثیر قرار دادند. بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در سطح آبیاری ٤۰٪ ظرفیت زراعی و دمای صفر درجه سانتیگراد (به‌ترتیب، ۱/۷۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین و ۲۰۷ میکرومول بر دقیقه بر پروتئین) مشاهده شد، اما با کاهش بیشتر دما از فعالیت این دو آنزیم کاسته شد. در سه سطح آبیاری میزان فنل کل از دمای ۲۰ تا صفر درجه سانتیگراد افزایش یافت و در دمای ۲٤- درجه سانتیگراد به حداقل میزان خود رسید. در مطالعه حاضر، اثر تنش خشکی بر تحمل به یخ‌زدگی در دماهای مختلف، در گیاه بنفشه متغیر بود. در بین پارامترهای مورد ارزیابی، تیمار ٦۰٪ ظرفیت زراعی در دمای صفر درجه سانتیگراد با افزایش فعالیت آنزیم‌ها و ترکیبات فنولی منجر به افزایش رشد رویشی و افزایش مقاومت به تنش یخ‌زدگی گیاهان گردید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش اکسیداتیو، خوسرمایی، مکانسیم‌های دفاعی

مقدمه

گیاه بنفشه یکی از مهم‌ترین گیاهان در صنعت گلکاری در فصول سرد می‌باشد .گیاهی چند ساله است که دما بر رشد و نمو آن مؤثر است (قاسمی قهساره و کافی، ۱۳۸۹). گیاهان اغلب در فصول سرد با کوتاه شدن طول روز و کاهش تدریجی دما، تحمل سرماهای سخت را به تناسب نوع و گونه

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: tehranifar@um.ac.ir

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

خود پیدا می‌کنند، اما امروزه به دلیل تغییرات اقلیمی در زمستان به موازات افزایش دما و آغاز رشد مجدد، حساسیت گیاه به دماهای پایین افزایش یافته است. تنش خشکی که به دلیل تغییرات اقلیمی در طول فصول سرد رخ می‌دهد یکی از مهم‌ترین تنش‌هایی به شمار می‌آید که رشد و عملکرد گیاهان زینتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Ramakrishna and Ravishankar, 2011).

شناخت روش‌هایی برای افزایش مقاومت گیاهان در طول فصول سرد از مهم‌ترین اولویت‌های صنعت کشاورزی به شمار می‌آید. توانایی گیاهان مختلف در تحمل به دمای پایین بسیار متفاوت است با این وجود برای تضمین بقاء گیاهان در شرایط زمستان وجود مکانیسم‌های سازگار کننده ضروری است و از جمله مهم‌ترین مکانیسم‌های شناخته شده در این خصوص می‌توان به خوسرمایی(Cold acclimation) اشاره داشت. ایجاد خوسرمایی در گیاه از طریق تجمع ترکیبات محافظت کننده نظیر کربوهیدارت‌ها، اسیدهای آمینه یا سایر اسمولیت‌ها سبب افزایش مقاومت گیاه به سرمای زمستانه می‌شود (Hoermiller *et al*., 2016).

گیاهان دارای مجموعه‌ای از سیستم‌های دفاعی متشکل از اجزای غیر آنزیمی (کاروتنوئید، ترکیبات فنولی و پرولین) و آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز) هستند (بارنده و کاوسی، ۱۳۹٤؛ Abdallah *et al*., 2017). گیاهان از طریق مکانیسم‌هایی مانند افزایش تجمع مواد در داخل سلول نظیر کربوهیدرات و پرولین سبب کاهش خسارت در برابر تنش‌های اکسیداتیو (یخ‌زدگی و خشکی) می‌گردند (Hoffman *et al*., 2011). از نقش‌های کربوهیدارت می‌توان به جلوگیری از تجمع هسته‌های یخ در داخل سلول (Lee *et al*., 2008) و همچنین افزایش مقاومت دیواره سلولی در برابر نشت مواد به خارج سلول در مقابله با تنش خشکی (Zhang *et al*., 2016) اشاره نمود. علاوه بر کربوهیدرات، پرولین نیز در سلول بهنگام تنش یخ‌زدگی (Zhang *et al*., 2011) و تنش خشکی (Gomes *et al*., 2010) افزایش می‌یابد تا اثرات منفی استرس را در گیاه کاهش دهد. پرولین یکی از اسید آمینه‌های فعال در پدیده تنظیم اسمزی می‌باشد که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش بسزایی دارد (Chegah *et al*., 2013). همچنین جلوگیری از تخریب ساختارهای سلولی، تثبیت پروتئین‌ها (Ashraf and Foolad, 2007)، تغییرات اسیدیته سیتوپلاسم (Hayat *et al*., 2012) از نقش‌های مهم این اسیدآمینه می‌باشد. پایداری کلروفیل شاخصی از مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی است و پایداری کلروفیل تحت شرایط تنش موجب تداوم فتوسنتز و متعاقباً تولید ماده خشک بیشتر در گیاه می‌شود، از طرفی تولید کلروفیل یکی از فرآیندهای حساس وابسته به دما و آب می‌باشد و اندازه‌گیری آن در غربال‌گری ارقام و گونه‌ها از نظر حساسیت با مقاومت خشکی استفاده می‌شود(Paolo *et al*., 2011).

در تنش‌های محیطی، گونه‌های فعال اکسیژن از طریق سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت آنزیمی در گیاهان مهار می‌گردند که از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase (SOD و آسکوربات پراکسیداز (Ascorbate peroxidase (APX اشاره نمود (Gill and Tuteja, 2010). ترکیبات غشاء نقش مهمی در حساسیت گیاهان به تنش‌های اکسیداتیو دارد به‌نحوی که این تنش‌ها موجب تغییر ترکیبات چربی‌های غشایی و کاهش نفوذپذیری انتخابی سلول‌ها می‌گردند. سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیمی است که در کاهش O_2^- نقش دارد و باعث تبدیل شدن آن به پراکسید هیدرژن (H_2O_2) می‌شود. میزان پراکسید هیدروژن توسط آنزیم‌های پراکسیداز در داخل سلول کنترل می‌گردد. آسکوربات پراکسیداز با استفاده از اسید آسکوربیک، پراکسید هیدرژن را به آب و مونو دی‌هیدرو آسکوربات تبدیل می‌کند و میل ترکیبی زیادی با پراکسید هیدرژن دارد (Tanou *et al*., 2009).

مادامی که گیاهان در معرض تنش خشکی و سرما قرار می‌گیرند فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش می‌یابد به‌نحویکه نتایج تحقیق، اثر دو تیمار آبیاری (۱۰۰٪ و ۳۰٪ ظرفیت زراعی) تحت دو شرایط نوری (نور کامل خورشید و ۱۵٪ نور خورشید) بر گیاه نوئل (*Picea*

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

asperata) نشان داد که تحت شرایط نوری بالا نسبت به نور کم، تنش خشکی سبب افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز گردیده‌است (Yang *et al*., 2007)، از طرفی Liu و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای نشان دادند که فعالیت این آنزیم در گیاهان جو تحت دمای ۱۰- درجه سانتیگراد در روز اول افزایش یافت و در روز سوم به حداکثر میزان خود (۳۲۳ واحد بر گرم در دقیقه) رسید. همچنین محققان در بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تحت شرایط تنش خشکی در گندم نشان دادند که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت شرایط تنش شدید ۲/۹ برابر شاهد گردید (Hosseini *et al*., 2017). Amiri و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که فعالیت این آنزیم در گیاه شمعدانی عطری (*Pelargonium graveolens*) در تنش ۵۰٪ ظرفیت زراعی به حداکثر میزان (۰/٤٤۷ میکرومول بر دقیقه بر گرم بافت تر) رسید.

فنول‌های گیاهی متابولیت‌های ثانویه 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). ترکیبات فنلی با احیای گونه‌های فعال اکسیژن از اکسیداسیون مولکول‌های زیستی حیاتی سلول پیشگیری کرده و منجر به تخفیف اثرات تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند (Fernandez Panchon *et al*., 2008).

علاوه بر سیستم‌های دفاعی گیاهان، بسیاری از محققین از تیمار تنش خشکی به عنوان عاملی برای افزایش مقاومت به یخ‌زدگی در طول زمستان نام برده‌اند. این تغییرات سلولی با تغییرات گیاهان در زمستان طی خوسرمایی همسو می‌باشد (Chinnusamy *et al*., 2004). در گیاه توت‌فرنگی محققین نشان دادند که استرس آبی و دمای کم دو کلید اساسی در سازگاری به دمای کم به شمار می‌آید. تیمار دمای پایین قبل از یخ‌زدگی سبب افزایش مقاومت گیاهان از ١٤ تا ۲۰- درجه سانتیگراد گردید در حالیکه در همین تیمار با حذف تیمار تنش آبی گیاهان تا ۵ درجه سانتیگراد مقاوم بودند که این نشان دهنده نقش تنش خشکی در سازگاری به دمای پایین می‌باشد (Rajashekar and Panda, 2014).

در آزمایشی Hoffman و همکاران (۲۰۱۲) اثر پیش تیمار خشکی در شرایط دمای پایین (۲ درجه سانتیگراد) و دمای ۲۰ درجه سانتیگراد را بر دو رقم Ryegrass مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که تیمار تنش خشکی سبب افزایش میزان کربوهیدرات، پرولین و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در یکی از ارقام گردید ولی میزان آن بسته به رقم، بافت و رژیم‌های دمایی متفاوت بود. در کلم قرارگیری دانهال‌ها در دمای ۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز سبب مقاومت به دمای پایین گردید. تنش آبی این مقاومت را در طی خوسرمایی افزایش داد و آبیاری دوباره سبب کاهش مقاومت گردید. همچنین قرارگیری گیاهان در دمای ۲۰ درجه سبب کاهش مقاومت به تیمار یخ‌زدگی شد و کاربرد پیش تیمار خشکی سبب جلوگیری از کاهش مقاومت به دمای پایین در گیاهان بدون خوسرمایی گردید (Sasaki *et al*., 1998).

اندازه‌گیری صفات رویشی پس از اعمال تنش سرما، به عنوان یک روش مناسب برای تخمین میزان خسارت سرما در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است. Thapa و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که سرما اثری منفی بر ارتفاع گیاهان یونجه (*Medicago Truncatula*) داشت و با کاهش دما از ارتفاع گیاهان کاسته شد. نظامی و همکاران (۱۳۹۳) نشان دادند که کاهش دما به ١٦- درجه سانتیگراد سبب کاهش ٤٨ درصدی تعداد ساقه فرعی در همیشه بهار (*Calendula officinalis*) گردید. یکی از اهداف مجریان فضای سبز توسعه سازگاری گیاهان به تنش‌های محیطی و افزایش کارایی مصرف آب می‌باشد. به همین دلیل توجه به اصولی اساسی به منظور افزایش راندمان تولید مورد توجه است. ریشه تأثیر مستقیمی بر میزان جذب آب، ماده غذایی و ماندگاری در طی فصول سرد دارد. نقش خصوصیات ریشه از قبیل حجم، قطر ریشه، عمق و پراکندگی ریشه در انتخاب رقم‌های مقاوم به خشکی به اثبات رسیده است (Zhu *et al*., 2010; Ge *et al*., 2012; Kondo *et al*., 2003). طول ریشه نیز به عنوان شاخصی برای توانایی گیاهان جهت جذب آب از لایه‌های عمیق‌تر خاک و نفوذپذیری بهتر

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

ریشه‌ها در خاک محسوب می‌شود (Kulkarni and Swati, 2009).

درگذشته، طی زمستان به علت کاهش تبخیر، تعرق و وجود بارندگی مناسب، گیاهان فضای سبز غالباً نیاز به آبیاری نداشته‌اند، اما با توجه به تغییرات اقلیمی، پراکنش بارندگی‌ها و مدت آن‌ها در زمستان تغییر نموده است و سرما به دوره‌های کوتاه مدتی تبدیل شده است. همچنین در برخی مناطق گرمای ناگهانی در طی زمستان سبب بروز تنش خشکی شده است و سپس پایین رفتن دما سبب آسیب به بخش فضای سبز می‌شود. اگر گیاهان در حضور تنش خشکی آبیاری نشود، ممکن است که بقاء گیاه در حضور گرما کاهش یابد و اگر آبیاری شود در اثر رشد مجدد و ایجاد هسته‌های یخ در خاک به محض کاهش دما از بین برود. بنابراین این آزمایش با هدف تأثیر تیمارهای آبیاری بر مقاومت به سرما و بررسی تغییرات فیزولوژیکی و موفولوژیکی بر گیاه بنفشه انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در پاییز ۱۳۹٤ به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. عوامل آزمایش شامل سه سطح آبیاری (۸۰٪، ٦۰٪ و ٤۰٪ ظرفیت زراعی) و ده سطح دمایی (۲۰، صفر، ۳-، ٦-، ۹-، ۱۲-، ۱۵-، ۱۸-، ۲۱-، ۲٤- درجه سانتیگراد) بودند. پس از تهیه بذور بنفشه (*Viola* × *wittrockiana* Iona Gold with Blotch) از شرکت تاکی (Takii) و کشت آنها در مرداد ماه در خزانه، گیاهان ۵ برگی در آبان ماه به گلدان‌هایی (ارتفاع ۱۸ و قطر ۸ سانتی‌متر) حاوی خاک مزرعه، ماسه و کود حیوانی پوسیده (۲:۱:۱ حجمی) در شرایط طبیعی منتقل شدند (دما و رطوبت نسبی حداقل و حداکثر تابستان، پاییز و زمستان سال آزمایش در شکل ۱ و ۲، بارندگی روزانه و تعداد ساعات آفتابی در شکل ۳ نشان داده شده‌است). به منظور کنترل دقیق میزان رطوبت خاک از روش وزنی استفاده شد. پیش از شروع آزمایش، چندین گلدان به طور کامل آبیاری شدند تا آب از تمامی خلل و فرج آن به طور کامل خارج گردید. سپس پلاستیکی روی گلدان‌ها کشیده شد تا تبخیر و تعرق حذف گردد. بعد از ۲٤ ساعت، هر دو ساعت یک بار گلدان‌ها وزن شدند تا زمانی که وزن گلدان‌ها در دو ساعت متوالی یکسان شد، سپس با استفاده از استوانه فلزی مخصوص نمونه‌گیری خاک نمونه‌ای تهیه شد و به آزمایشگاه منتقل گردید و وزن تر اندازه گیری شد و وزن خشک آن نیز پس از قرارگیری در آون ۱۰۵ درجه به مدت ۲٤ ساعت محاسبه گردید. میزان رطوبت وزنی برای وضعیت زراعی براساس معادله ۱ محاسبه شد:

$$FC=(A-B)/B\times100 \qquad \text{معادله (۱)}$$

در این معادله A: وزن خاک مرطوب پس از خروج آب ثقلی و B: وزن خاک خشک شده در دمای ۱۰۵ درجه به مدت ٤۸ ساعت می‌باشد. سپس تیمارهای آبیاری در ابتدای مرحله گلدهی با استفاده از روش وزنی (Campbell and Mulla, 1990) به مدت دو هفته اعمال گردید. از آنجا که در هر یک از گلدان‌ها، مقدار خاک از نظر کمی و کیفی یکسان بود و همچنین به دلیل اینکه درصد رطوبت وزنی خاک استفاده شده ۲٤٪ بود. لذا محاسبه وزن گلدان‌ها در هر یک از تیمارها به شرح زیر است:

الف) وضعیت ۸۰٪ FC

۸۰٪ (۲٤٪ ×۳۹٦۵) +٤۱۲۰ =٤۸۸۲ gr

ب) وضعیت ٦۰٪ FC

٦۰٪ (٪۲٤ ×۳۹٦۵) +٤۱۲۰ =٤٦۹۰ gr

ج) وضعیت ٤۰٪FC

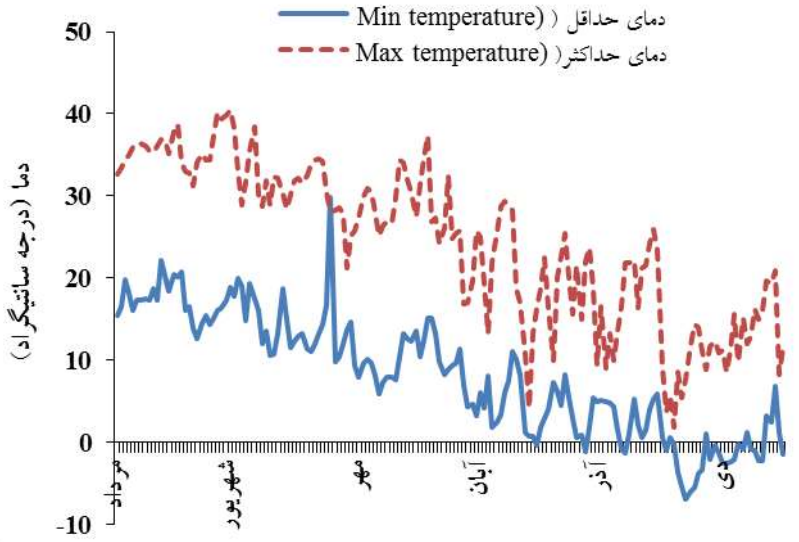
٤۰٪ (٪۲٤ ×۳۹٦۵) +٤۱۲۰ =٤۵۰۰ gr

در طول مدت آزمایش نیز روزانه گلدان‌ها وزن شدند و میزان کمبود آب در هر گلدان‌ها افزوده شد. با توجه به طول مدت دو هفته تنش، افزایش وزن تر گیاهان با استفاده از نمونه‌های گیاهی در گلدان‌های مجزا اندازه‌گیری گردید.

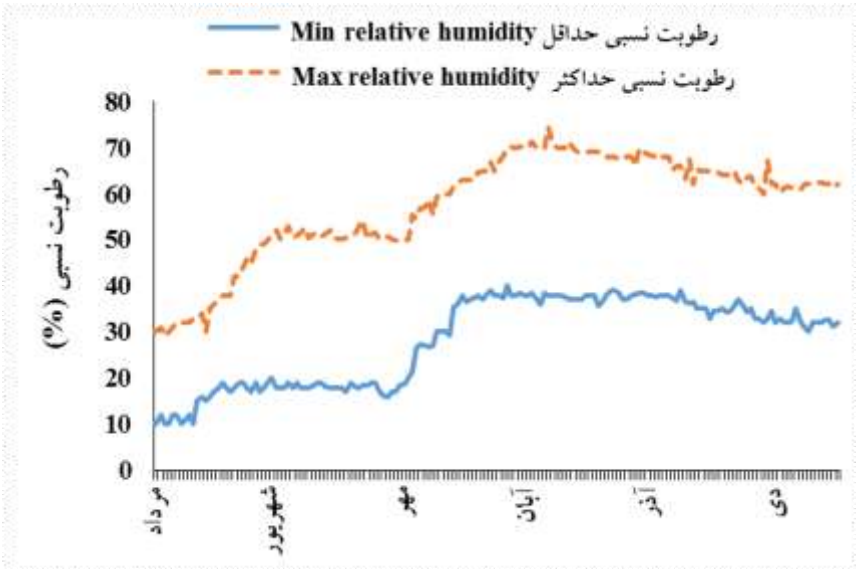
بعد از تیمارهای آبیاری میزان کربوهیدرات، پرولین، کلروفیل، کاروتنوئید محتوای نسبی آب با استفاده از روش‌های زیر اندازه گیری شدند.

سنجش کربوهیدرات: به ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر خشک نمونه‌ها ۲۵ میلی‌لیتر اتانول افزوده شد و توسط شیکر مخلوط

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021



شکل ۱- شرایط آب و هوایی تابستان، پاییز و زمستان ۱۳۹٤ در مشهد

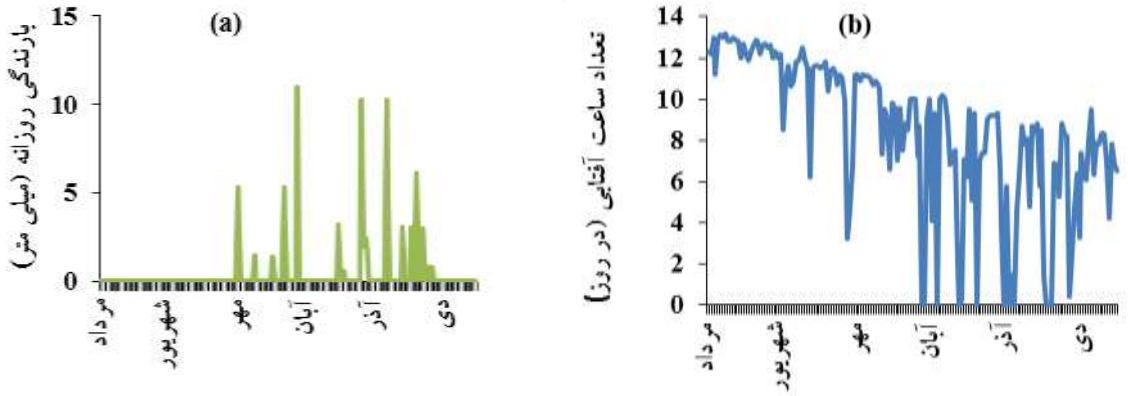


شکل ۲- درصد رطوبت نسبی تابستان، پاییز و زمستان ۱۳۹٤ در مشهد

گردید. پس از سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی جدا شده و با افزودن زغال فعال، بی‌رنگ گردید و توسط آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. به یک میلی‌لیتر از روشناوری محلول مذکور ۱۰ میلی‌لیتر محلول آنترون ۰/۱۵ درصد افزوده شد و درنهایت نمونه‌ها پس از حرارت در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به حمام یخ منتقل شدند. آنگاه میزان جذب نور نمونه‌ها، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۲۵ نانومتر خوانده و غلظت قند کل نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد (Ebell, 1969).

سنجش پرولین: میزان پرولین به روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. به نیم گرم از بافت برگ، ۵ میلی‌لیتر اتانول اضافه گردید. در نهایت ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره بدست آمده با سانتریفیوژ ٤۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021



شکل ۳- بارندگی روزانه (a) و تعداد ساعت آفتابی (b) در تابستان، پاییز و زمستان ۱۳۹٤ در مشهد

مایع بالائی جدا و به یخچال ٤ درجه سانتیگراد منتقل گردید. یک میلی‌لیتر از عصاره الکلی انتخاب و ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر به آن اضافه شد. سپس پنج میلی‌لیتر نین هیدرین به نمونه‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد پنج میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به هر نمونه اضافه شد و نمونه داخل حمام آب جوش به مدت ٤٥ دقیقه قرار داده شد و سپس در دمای محیط خنک شد. به هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به شدت تکان داده شد تا پرولین وارد فاز تولوئن گردید. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه به حال سکون قرار داده شدند و میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ٥١٥ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید. میزان پرولین آزاد نمونه‌ها بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد.

سنجش رنگدانه‌های فتوسنتزی: میزان کلروفیل به روش پیشنهادی Arnon (۱۹٤۹) و کاروتنوئید به روش Ranganna (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که ۰/۲ گرم برگ تر با استن سائیده شد. سپس حجم محلول شفاف رویی با استن به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسید. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دور ٤٠٠٠ سانتریفیوژ گردید و سپس جذب نوری محلول رویی جهت تعیین میزان کلروفیل و کاروتنوئید در طول موج‌های ٤٨٠، ٥١٠، ٦٤٥ و ٦٦٣ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر قرائت گردید. در نهایت میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، b و میزان کاروتنوئید برحسب میلی‌گرم در گرم بافت تر برگ از طریق معادله (۲) محاسبه شد:

معادله (۲)

Chlorophyll a (mg g^{-1} FW) = {12.7(A663) -2.69(A645)} ×V/W×1000

Chlorophyll b(mg g^{-1} FW) = {22.9(A645) -4.68(A663)} ×V/W×1000

Total chlorophyll (mg g^{-1} FW) = {20.2(A645) + 8.02 (A663)}×V/W×1000

Carotenoid (mg g^{-1} FW) = {7.6(A480) - 1.49(A510)} ×V/W×1000

A = میزان جذب بر حسب نانومتر در طول موج‌های مورد نظر، V = حجم نهایی عصاره و استون بر حسب میلی‌لیتر و W = وزن تر بافت برگ می‌باشد.

سنجش محتوای نسبی آب: با استفاده از روش Smart and Bingham (۱۹۷٤) اندازه‌گیری شد. از گیاهان دیسک‌هایی با قطر ۷ میلیمتر تهیه و با استفاده از ترازو توزین گردیدند (FW). سپس دیسک‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای اتاق در داخل آب مقطر غوطه‌ور گردیده و پس از آن وزن آماس آن‌ها اندازه‌گیری شد (TW). سپس نمونه‌ها را به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۷٥ درجه سانتیگراد در داخل آون حرارت داده و وزن خشک (DW)آن‌ها تعیین گردید. در نهایت محتوای نسبی آب برگ با استفاده از معادله (۳) محاسبه شد:

معادله (۳) RWC (%)=((FW-DW))/((TW-DW))×100

که در آن FW وزن تر برگ، DW وزن خشک برگ و TW وزن آماس برگ می‌باشد.

بعد از دو هفته تیمار آبیاری در دی ماه و اندازه‌گیری صفاتی که در بالا ذکر شد، گیاهان برای اعمال تیمارهای سرمایی به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. دمای فریزر در شروع آزمایش پنج درجه سانتیگراد بود که پس از قرار دادن

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

نمونه‌ها در آن دما با سرعت دو درجه سانتیگراد در ساعت کاهش یافت. جهت جلوگیری از پدیده فراسرما و ایجاد هستک یخ در گیاهان و اطمینان از اینکه مکانیزم از نوع تحمل است و نه اجتناب، در دمای ۲- درجه سانتیگراد اسپری INAB (Ice nucleation active bacteria) بر روی نمونه‌های مربوط به تیمارهای دمایی کمتر از صفر درجه سانتیگراد به نحوی انجام شد که سطح گیاه را قشری نازک از این محلول پوشاند. جهت ایجاد تعادل دردمای محیط و اطمینان از قرار گرفتن گیاهان در معرض دماهای مورد نظر، گیاهچه‌ها در هر تیمار دمایی به مدت یک ساعت نگهداری و سپس از فریزر خارج و به منظور جلوگیری از ذوب شدن سریع به اتاقک سرد با دمای ۲± ۵ منتقل و به مدت ۱۲ تا ۲٤ ساعت نگهداری شدند (Nezami *et al.*, 2010). بعد از اعمال تنش سرمایی، به منظور بررسی اثر تیمارهای خشکی و سرمایی بر گیاهان دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و فنل کل به روش زیر اندازه‌گیری گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: به نیم گرم برگ تازه آسیاب شده،۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۵۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل پلی پیرولیدون اضافه گردید و در دمای چهار درجه سانتیگراد به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس از محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. فعالیت سوپر اکسیددیسموتاز بر اساس روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) سنجیده شد. مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میلی‌مولار، ۱۵ میکرولیتر ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده بود. 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 شیک شدند. سپس مقدار جذب در طول موج ٥٦٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم بر اساس واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش Asada و Nakano (۱۹۸۱) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۷۷۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ۱۰۰میکرولیتر آسکوربات اسید پنج میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۰/۱ میلی‌مولار بود. میزان جذب مخلوط واکنش در طول موجب ۲۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. یک واحد آنزیمی معادل تجزیه یک میکرومول آسکوربات در مدت زمان یک دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد است. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی آسکوربات پراکسیداز $mM^{-1}cm^{-1}$ ۲/۸ محاسبه شد. فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

سنجش فنل کل: با استفاده از معرف فنل- سیکالتو مطابق با روش Singleton و Rossi (۱۹٦٥) اندازه‌گیری شد. به ۰/۱ از عصاره متانولی ٤ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر معرف فولین- سیکالتو اضافه شد. پس از ۳ دقیقه به محلول ۰/۳ میلی‌لیتر محلول بی‌کربنات سدیم اضافه شد و پس از ۱۲۰ دقیقه تاریکی، جذب در طول موج ۷٦٠ نانومتر قرائت شد.

جهت تعیین رشد مجدد، گلدان‌های حاوی نمونه‌های گیاهی به گلخانه با دمای ۱ ±۲۰ درجه سانتیگراد با شدت نور ۱۱۰۰۰ لوکس منتقل شده و پس از چهار هفته صفات رویشی نظیر ارتفاع گیاهان، تعداد گره، تعداد پنجه، تعداد گل، غنچه و قطر گل اندازه‌گیری گردید. صفات مربوط به ریشه (سطح ریشه، مجموع طول ریشه، میانگین قطر ریشه) با استفاده از دستگاه اسکن ریشه (مدل دلتا) اندازه‌گیری گردید. همچنین صفت بلندترین طول ریشه نیز ثبت شد.

محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزارهای MSTATC، Excel انجام شد و میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شدند.

نتایج و بحث

صفات بعد از اعمال آبیاری: آبیاری به طور معنی‌داری صفاتی

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

جدول ۱- اثر آبیاری بر میزان کربوهیدرات، پرولین، رنگدانه‌های فتوسنتزی و محتوای نسبی آب در گیاه بنفشه

تیمار آبیاری (FC)	کربوهیدرات ($mg^{-1}gDW$)	پرولین (μmol^{-1} FW)	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	محتوای نسبی آب (٪)
			($mg^{-1}gFW$)				
۸۰٪	۸۳/٤±۰/۲٦ ^{c}	۲/۰٦±۰/۰۳^{c}	۰/۷۵۲±۰/۰۲^{a}	۰/٤۲٦±۰/۰۱^{a}	۱/۱۸±۰/۰۳^{a}	۰/۱۷۳±۰/۰۱^{a}	۸٦/۱±۰/۹۱^{a}
٪٦۰	۸٤/۵±۰/۲۰^{b}	۲/۹٤±۰/۰۱^{b}	۰/۷٤۰±۰/۰۲^{a}	۰/٤۳۳±۰/۰۱^{a}	۱/۱۸±۰/۰۱^{a}	۰/۱۷۳±۰/۰۱^{a}	۸۱/۱±۰/٦۷^{b}
٪٤۰	۸۵/٦±۰/۱۱^{a}	۳/۱۰±۰/۰۲^{a}	۰/٦٦۳±۰/۰۳^{b}	۰/۳۵٦±۰/۰۲^{b}	۱/۰۲±۰/۰۲^{b}	۰/۱٦۹±۰/۰۱^{a}	٦۵/۵±۱/۲۷^{c}
سطح معنی‌داری	**	**	**	**	**	ns	**

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون و برای هر تیمار بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. ns و ** :به ترتیب غیرمعنی و معنی‌دار در سطح یک درصد. داده‌ها میانگین سه تکرار SE±است.

نظیر کربوهیدرات، پرولین، کلروفیل و محتوای نسبی آب برگ را تحت تاثیر قرار داد (جدول ۱). تنش خشکی به طور معنی‌داری باعث افزایش سطح کربوهیدرات در تنش شدید (٤۰٪ ظرفیت زراعی) به میزان ۲/٦۳ درصد نسبت به شاهد شد. Pingping و همکاران (۲۰۱۷) در تحقیقی نشان دادند که میزان کربوهیدرات (ساکارز و فروکتوز) در برگ‌های گیاه اختری (*Averrhova carambola*) تحت شرایط تنش خشکی نسبت به شاهد (به ترتیب، ٤۰ و ۱۵ درصد) افزایش یافت. همچنین در بررسی اثر تنش خشکی بر بلوط قرمز (*Quercus rubor*) نتایج نشان داد که میزان کربوهیدارت‌های گلوکز و فروکتوز ۵ برابر گیاهان شاهد بود.

با افزایش میزان تنش از ۸۰٪ به ٤۰٪ ظرفیت زراعی میزان پرولین ۵۰ درصد افزایش یافت. افزایش در محتوای پرولین تحت تنش خشکی در بسیاری از مطالعات گزارش شده‌است. به‌نحویکه Pinior و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که در گیاهان رز (*Rosa hybrid*) تحت تنش خشکی میزان پرولین سه برابر گیاهان شاهد گردید که این امر در آزمایش حاضر نشان دهنده همبستگی مثبت بین میزان پرولین و افزایش مقاومت در برابر تنش می‌باشد.

افزایش تنش از ۸۰٪ به ٤۰٪ ظرفیت زراعی سبب کاهش میزان کلروفیل a و b به میزان ۱۳ و ۱٦ درصد گردید. با توجه به مقایسه میانگین‌ها حداکثر سطح کلروفیل کل در تیمار ۸۰٪ ظرفیت زراعی با مقدار (۱/۱۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) و حداقل میزان آن در تیمار ٤۰٪ (۱/۰۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) حاصل شد. از طرفی آبیاری بر میزان کاروتنوئید تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱). این نتایج با نتایج ابراهیمی و همکاران (۱۳۹٦) که نشان دادند در تیمار ۲۰ ٪ نسبت به ۸۰ ٪ ظرفیت زراعی میزان کلروفیل a و b در گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) به ترتیب ۳۳ و ٤۲ درصد کاهش یافت، مطابقت دارد.

در پژوهش حاضر با میزان محتوای نسبی آب در سطوح ٦۰٪ و ٤۰٪ ظرفیت زراعی نسبت به ۸۰٪ ظرفیت زراعی به ترتیب ٦ و ۲٤ درصد کاهش یافت. محققان معتقد هستند که کاهش محتوای نسبی رطوبت برگ در اثر تنش کم آبی مربوط به بسته‌تر شدن روزنه‌ها می‌باشد و علت بسته‌تر شدن روزنه‌ها در اثر انتقال آبسیزیک اسید از ریشه به برگ‌ها می‌باشد (khan *et al.*, 2007)

صفات بعد از اعمال سرما: براساس نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل آبیاری و دما بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) بود. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در تیمار ۸۰٪ ظرفیت زراعی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از دمای ۲۰ تا صفر درجه سانتیگراد افزایش و سپس کاهش یافت و از دمای ۹- تا ۱۸- درجه سانتیگراد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در تیمارهای ٦۰٪ و٤۰٪ ظرفیت زراعی از دمای ۲۰ تا ۳- درجه سانتیگراد این شاخص افزایش یافت و سپس روندی نزولی مشاهده شد. همچنین در سه سطح آبیاری در دمای ۲٤- درجه سانتیگراد نسبت به شاهد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

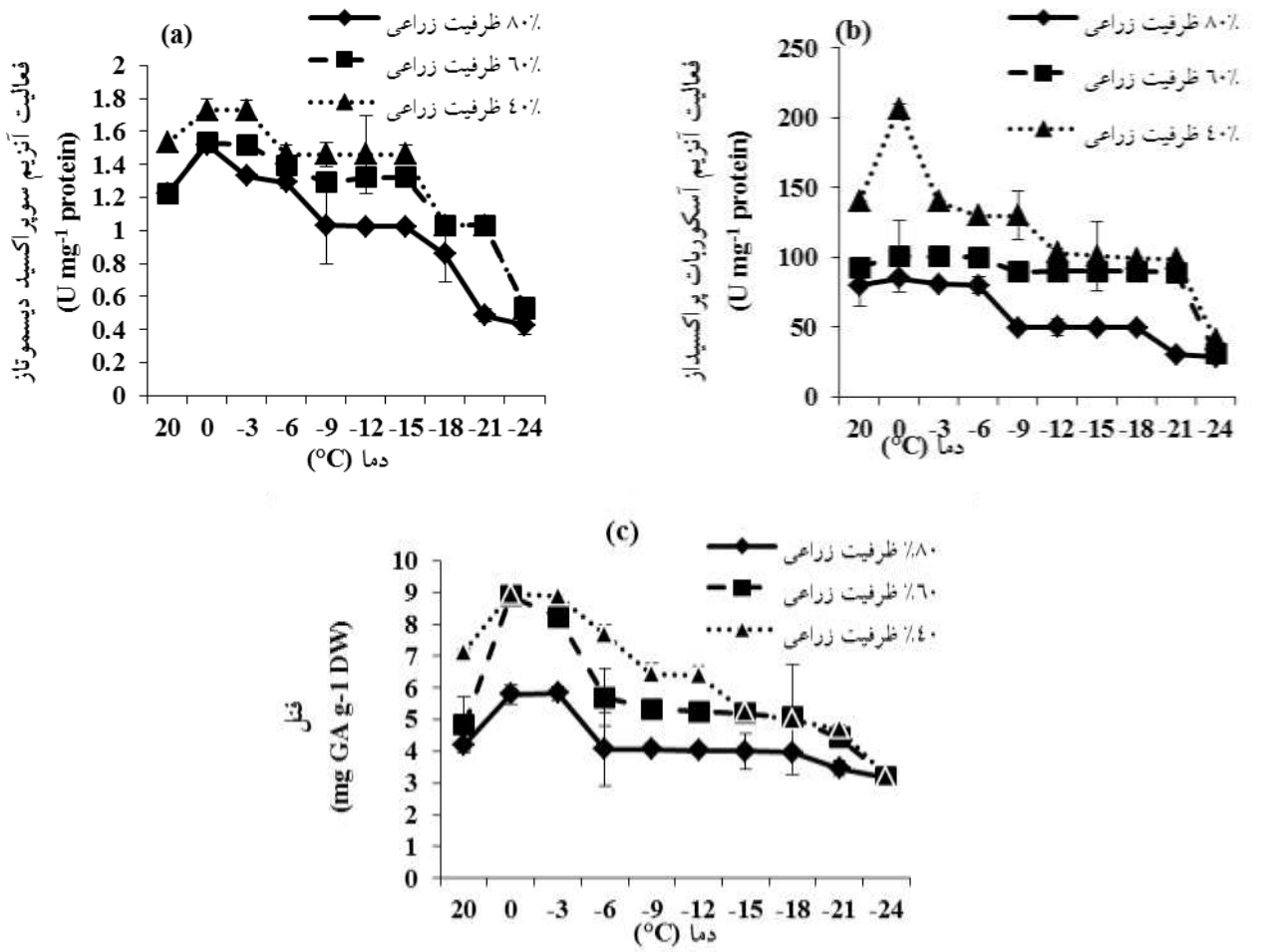
به ترتیب، ٦٥، ٥٦ و ٥٧ درصد کاهش یافت (شکل ٤-a). به اولین سیستم آنزیمی آنتی اکسیدانت در برابر فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش خشکی و سرما می‌توان به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اشاره نمود (Gill and Tuteja, 2010). Shiriga و همکاران (٢٠١٤) در تحقیقی بر دو نوع ژنوتیپ مقاوم و حساس به تنش خشکی گیاه ذرت نشان دادند که در شرایط تنش میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ارقام مقاوم بیشتر ۱/۳ درصد بود، از طرفی در گیاه جو (*Avena nuda*) تحت شرایط تنش سرمایی، افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در دمای ۱۰- درجه سانتیگراد چهار برابر گیاه شاهد بود (Liu *et al*., 2013). افزایش فعالیت سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانت از مهم‌ترین سازگاری‌های فیزیولوژیک گیاهان تحت تنش می‌باشد. بنابراین در آزمایش حاضر، افزایش فعالیت این آنزیم با افزایش تنش خشکی در تیمار ٦٠٪ ظرفیت زراعی نسبت به شاهد و دمای صفر نسبت به دمای ۲۰ درجه سانتیگراد حاکی از سازگاری مطلوب بنفشه با افزایش فعالیت این آنزیم در برابر تنش‌های محیطی می‌باشد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار ٤٠٪ نسبت به ٨٠٪ ظرفیت زراعی در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد ۷۵ درصد افزایش یافت. بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۲۰۷ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در گیاهان تحت آبیاری ٤٠٪ ظرفیت زراعی دمای صفر درجه سانتیگراد و کمترین میزان آن در هر سه سطح آبیاری در دمای ٢٤- درجه سانتیگراد مشاهده شد. در سطح آبیاری ٦٠٪ ظرفیت زراعی تا دمای ٢١- درجه سانتیگراد تفاوت معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم مشاهده نشد اما در دمای ٢٤- درجه سانتیگراد به حداقل میزان خود رسید. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دمای ٢٤- درجه سانتیگراد در سطوح ٨٠٪، ٦٠٪ و٤٠٪ ظرفیت زراعی نسبت به شاهد به ترتیب ٦٤،٢٣ و ٤٩ درصد افزایش یافت (شکل ٤-b). در شرایط تنش‌زا سطح آسکوربات پراکسیداز افزایش می‌یابد این آنزیم هیدرژن تولید شده را به مونودی هیدروآسکوربات و آب تبدیل می‌کند. از طرفی در این آزمایش، کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیداز با کاهش بیشتر دما تا ٢٤- درجه سانتیگراد نشان دهنده کاهش فعالیت در ژن‌های کد کننده این آنزیم بوده‌است (Bhattacharjee, 2005). مطالعات مختلف افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را تحت شرایط تنش خشکی نشان می‌دهد. طبق گزارش خالقی و همکاران (۱۳۹۵) فعالیت این آنزیم را در گیاهان توت آمریکایی (*Maclura pomifera*) تحت تنش شدید در هفته چهارم ۷/۲ برابر فعالیت این آنزیم در گیاهان شاهد بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان تحت تنش شدید آبیاری تا دمای ۹- درجه سانتیگراد از شاهد بیشتر بود که می‌توان از دلایل اصلی مقاومت گیاهان به تنش یخزدگی بر شمرد. همچنین بین فعالیت این دو آنزیم همبستگی مثبت و معنی‌داری (r=۰/۷٦**) مشاهده شد (جدول ۲).

براساس نتایج تجزیه واریانس میزان فنل کل به طور معنی‌داری (P≤۰/۰۵) تحت اثرات متقابل آبیاری و دما قرار گرفت. بیشترین میزان فنل (۸/۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) در تیمارهای ٦٠٪ و دمای صفر ،٤٠٪ ظرفیت زراعی و دماهای صفر و ۳- درجه سانتیگراد مشاهده و کمترین میزان آن (۳/۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) در سه سطح آبیاری در دمای ٢٤- درجه سانتیگراد ثبت گردید. فنل کل در سطح ٤٠٪ ظرفیت زراعی و دمای ۲۰ درجه سانتیگراد نسبت به شاهد ۷۰ درصد افزایش یافت، از طرفی در دمای ٢٤- درجه سانتیگراد بین سه سطح آبیاری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ٤-c). فنل‌ها از متابولیسم فنیل پروپانوئید تولید می‌گردند و بسیاری از مطالعات تجمع میزان فنیل پروپانوئید را در شرایط تنش خشکی و سرما، به منظور تنظیم در تولید برخی ترکیبات گزارش نموده‌اند به طوریکه Gharibi و همکاران (٢٠١٦) گزارش نمودند که میزان ترکیبات فنلی در گیاه بومادران (*Achillea millefolium*) در شرایط تنش خشکی ٥٠٪ ظرفیت زراعی نسبت به گیاهان شاهد ٤٠ درصد افزایش یافت. بنابراین افزایش میزان فنل کل در شرایط تنش خشکی با توجه به این موضوع امری بدیهی می‌باشد که مطابق با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. همچنین در مطالعه اسدی صنم

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021



شکل ٤- روند تغییرات فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتار و آسکوربات پراکسیداز و فنل کل پس از اعمال تیمارهای آبیاری و دمایی (داده‌ها میانگین سه تکرار ± SD است).

و همکاران (۱۳۹٤) نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم‌های SOD و APX (به‌ترتیب، ۱۳٤ و ۵۰۱ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه) در گیاهان سرخار گل (*Echinacea pupurea*) تحت دمای ٤ درجه سانتیگراد نسبت به دمای شاهد (۲۳ درجه سانتیگراد) به ثبت رسید از طرفی با کاهش دما میزان ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان کاهش معنی‌داری نمود به‌نحویکه کاهش دما از ٤ به ٤- درجه سانتیگراد میزان این شاخص ۹/۵ درصد کاهش یافت. در واقع کاهش میزان فنل در آزمایش حاضر را می‌توان به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و خسارت اکسیداتیو در گیاهان بنفشه تحت سرمای شدید مرتبط دانست.

صفات بعد از دوره رشد مجدد، صفات رشدی اندام هوایی: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اثر آبیاری و دما بر ارتفاع گیاه و تعداد گره معنی‌دار (P≤۰/۰۱) بود. در سطح آبیاری ۸۰٪ ظرفیت زراعی گیاهان در دو دمای ۲۱- و ۲٤- درجه سانتیگراد، و در دو سطح دیگر آبیاری (٦۰٪ و ٤۰٪ ظرفیت زراعی) گیاهان در ۲٤- درجه سانتیگراد از بین رفتند، بدین منظور صفات بعد از دوره رشد مجدد اندازه‌گیری نشد. در بررسی دو شاخص ارتفاع و تعداد گره، گیاهان در سه سطح آبیاری تا دمای صفر درجه سانتیگراد روندی صعودی و سپس روندی نزولی را طی نمودند. ارتفاع گیاه در تیمارهای ۸۰٪ و ٤۰٪ ظرفیت زراعی در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد نسبت به شاهد ۱۳ درصد کاهش یافت اما تیمار ٦۰٪ ظرفیت زراعی در این دما تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. همچنین در سه

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

سطح آبیاری بیشترین تعداد گره در دمای صفر درجه سانتیگراد حاصل گردید. تعداد گره در تیمار ٦٠٪ ظرفیت زراعی دردمای ٢١- درجه سانتیگراد نسبت به شاهد (٢٠ درجه سانتیگراد) به میزان ٢٤ درصد کاهش یافت (شکل ٥-a-b).

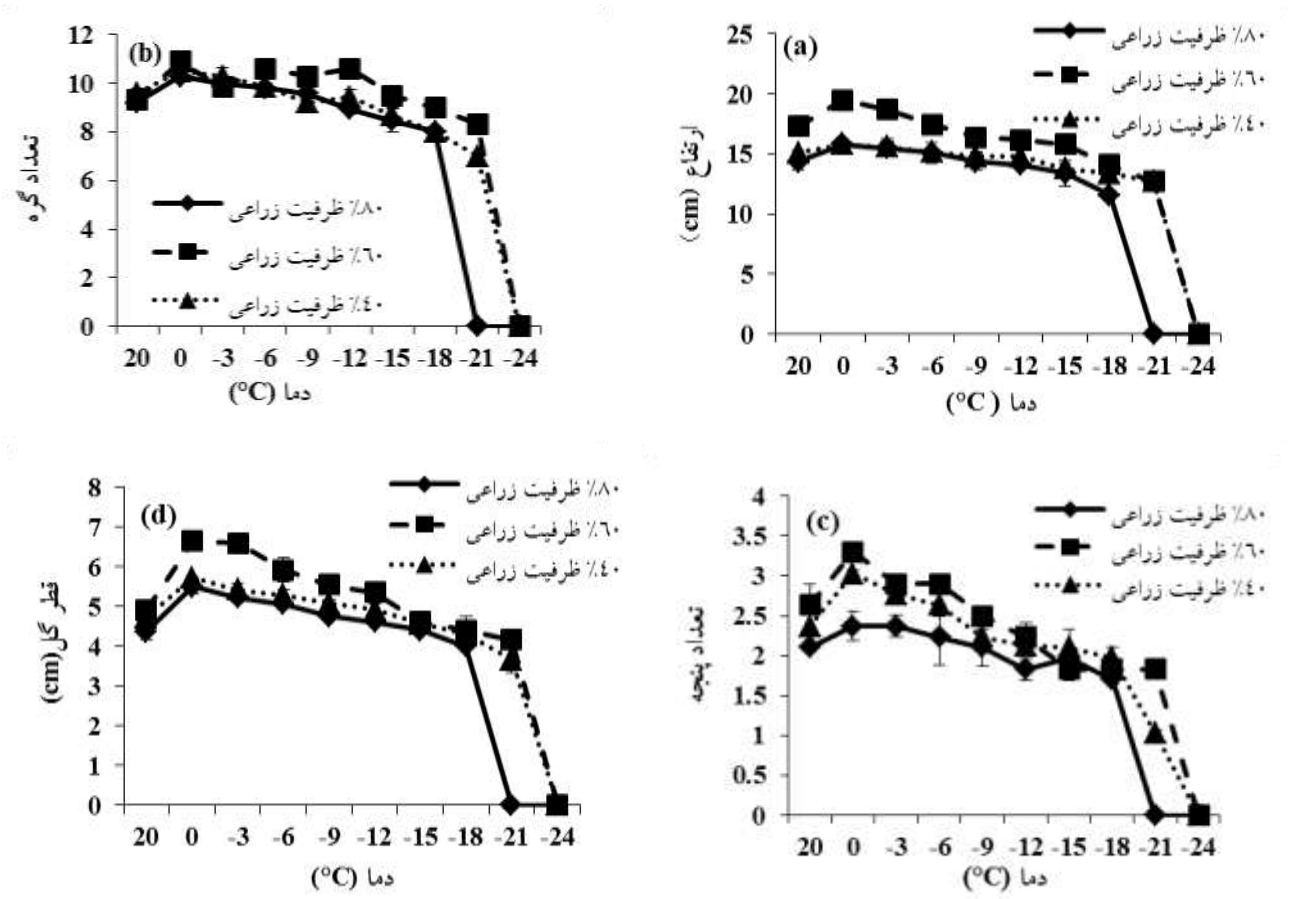
تعداد پنجه به طور معنی‌داری (P≤٠/٠١) تحت اثر متقابل آبیاری و دما قرار گرفت. به‌نحویکه بیشترین تعداد پنجه درسطح آبیاری ٦٠٪ ظرفیت زراعی و دمای صفر درجه سانتیگراد بدست آمد. کمینه این شاخص درآبیاری٤٠٪ ظرفیت زراعی و دمای ٢١- درجه سانتیگراد مشاهده شد به‌طوریکه نسبت به شاهد ٥١ درصد کاهش یافت. با کاهش دما از صفر به ١٨- درجه سانتیگراد در سه سطح آبیاری میزان پنجه روندی نزولی نشان داد اما در تیمار ٨٠٪ نسبت به تیمار ٦٠٪ ظرفیت زراعی روند نزولی بیشتر بود (شکل٥-c). مطالعات انجام شده توسط Rashed Mohassel و همکاران (٢٠٠٩) بر تأثیر تنش یخ‌زدگی بر گیاه رازیانه نشان داد که ارتفاع گیاهان رازیانه در دمای ١٢- درجه سانتیگراد ١٥ درصد کمتر از شاهد (صفر درجه سانتیگراد) بود، همچنین به لحاظ تعداد گره بین دو اکوتیپ گناباد و کرمان در دماهای ٣- و ٦- درجه سانتیگراد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما با افزایش شدت تنش (٩- درجه سانتیگراد) تعداد گره روی ساقه اصلی برای اکوتیپ گناباد ٦٨ درصد بیشتر از اکوتیپ کرمان بود. اثر دمای یخ‌زدگی بر تعداد گره گیاه قرنفل نیز معنی‌دار بود و با کاهش دما به کمتر از ١٦- درجه سانتیگراد صفت مذکور نسبت به شاهد ٢٢ درصد کاهش پیدا کرد (ایزدی دربندی، ١٣٩٠). سیاهمرگویی و همکاران (١٣٩٠) نیز با مطالعه اثر تنش یخ‌زدگی بر گیاه رازیانه دریافتند که با کاهش دما به کمتر از ٦- درجه سانتیگراد تعداد گره نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری یافت.

اثر متقابل تیمارهای آبیاری و دمایی بر قطر گل گیاهان بنفشه دارای اختلاف معنی‌داری (P≤٠/٠١) بود. در گیاهان تحت تیمار ٦٠٪ ظرفیت زراعی، در گستره دمایی صفر تا ٢١- درجه سانتیگراد نسبت به تیمارهای آبیاری اندازه گل‌ها بزرگ‌تر بود. همچنین در سه تیمار آبیاری در دمای ١٨- در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری از لحاظ قطر گل مشاهده نشد. از طرفی قطر گل گیاهان دمای ٢١- درجه سانتیگراد در تیمارهای ٦٠٪ و ٤٠٪ ظرفیت زراعی نسبت به دمای ٢٠ درجه سانتیگراد به ترتیب ١٥/٤ و ٢٢/٤ درصد کاهش یافت. در تیمار شاهد بین سه رژیم آبیاری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ٥-d). موسوی و همکاران (١٣٩٠) در مطالعه‌ای اثر دماهای یخ‌زدگی را بر قطر گل مینای چمنی مشاهده نمودند که بیشترین قطر گل در دمای ٢- درجه سانتیگراد (٣/٧ سانتیمتر) مشاهده گردید و کاهش بیشتر دما سبب کاهش این شاخص شد. در مطالعه حاضر اندازه گل‌ها با کاهش دما کاهش یافت. نتایج بررسی تعداد گل در طول چهار هفته دوره ریکاوری نشان داد که بیشترین تعداد اندام زایشی (گل، غنچه) در تیمار ٦٠٪ ظرفیت زراعی در دمای صفر درجه سانتیگراد حاصل شد از طرفی پیک گلدهی در تنش خشکی ٦٠٪و ٤٠٪ ظرفیت زراعی در هفته چهارم مشاهده شد (داده‌ها نمایش داده نشده است). از طرفی همبستگی مثبت و معنی‌داری بین فعالیت دو آنزیم و فنل کل با صفات رویشی اندام هوایی نظیر ارتفاع، تعداد گره، تعداد پنجه و قطر گل مشاهده شد (جدول ٢).

صفات رشدی ریشه: اثر متقابل آبیاری و دما بر صفاتی نظیر (سطح، مجموع طول، طول بلندترین، میانگین قطر و حجم ریشه) گیاه بنفشه معنی‌دار (P≤٠/٠١) بود. سطح ریشه در سه سطح آبیاری با کاهش دما از ٢٠ به صفر درجه سانتیگراد افزایش یافت ولی با کاهش بیشتر دما به ١٨- درجه سانتیگراد به ترتیب ٨٦، ٥٧ و ٦٣ درصد نسبت به دمای ٢٠ درجه سانتیگراد کاهش یافت. بیشترین مجموع طول ریشه در تیمارهای ٦٠٪ ظرفیت زراعی در دماهای صفر و ٣- درجه سانتیگراد (٢٢٥٤، ٢١٥٧ سانتیمتر) بدست آمد و کمترین میزان این شاخص به ترتیب در سطح ٦٠٪ ظرفیت زراعی و دمای ٢٤- درجه سانتیگراد (٢٧٩ سانتیمتر) مشاهده شد (شکل ٦-a-b).

با کاهش دما از ٢٠ به صفر درجه سانتیگراد طول بلندترین ریشه گیاهان افزایش یافت به‌نحویکه بیشترین میزان این شاخص (٢٣ سانتیمتر) در سطح آبیاری ٤٠٪ ظرفیت زراعی مشاهده گردید. با کاهش بیشتر دما به ٢١- درجه سانتیگراد طول بلندترین ریشه در تیمارهای ٦٠٪ و ٤٠٪ ظرفیت زراعی

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021



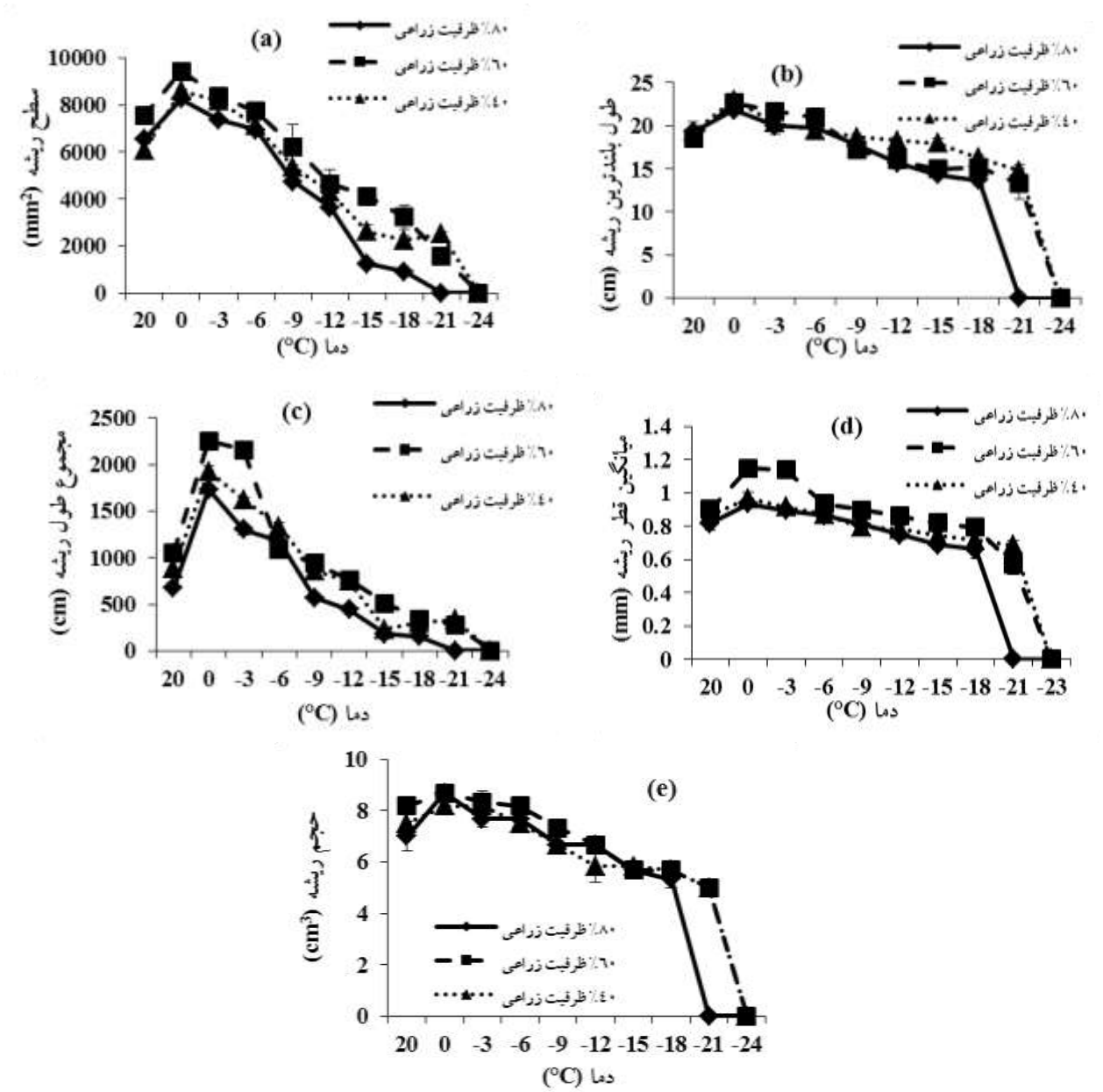
شکل ۵- اثر متقابل آبیاری × دما بر ارتفاع، تعداد گره، تعداد پنجه، قطر گل بنفشه در پایان دوره رشد مجدد (داده‌ها میانگین سه تکرار ± SDاست).

نسبت به شاهد ۳۱/۱ و ۲۳/۳ درصد کاهش یافت (شکل ٦-c). محققان دیگر نیز نتایج مشابهی را مبنی بر افزایش عمق ریشه بر اثر تنش خشکی و محدودیت آب گزارش نموده اند. کشاورزنیا و همکاران (۱۳۹۳) در مطالعه‌ای نشان دادند که عمق ریشه در رقم فجر ۳۰ جو تحت تیمار۲۰٪ آب در دسترس نسبت به شاهد ۱۵ درصد افزایش یافت. درصورتیکه رشد ریشه به واسطه خشکی خاک محدود شود، گیاه به تنظیم اسمزی و بیوسنتز یا جذب اسمولیت‌های سازگار مبادرت می‌ورزد. در صورت مواجهه گیاه با تنش خشکی، برای انتخاب ارقام مقام می‌توان انتخاب را براساس قابلیت افزایش عمق ریشه به اعماق خاک و جذب آب انجام داد (Tuberosa, 2012).

در بررسی صفت میانگین قطر ریشه مشاهده شد که بیشینه مقدار این شاخص در تیمار ٦٠٪ ظرفیت زراعی و دمای صفر درجه سانتیگراد (۱/۱۵ میلیمتر مربع) مشاهده شد و با کاهش دما از صفر درجه سانتیگراد این شاخص در سه سطوح مختلف آبیاری روندی نزولی را پیمودند. کمینه میانگین قطر ریشه در تیمار ٦٠٪ ظرفیت زراعی در دمای ۲۱- درجه سانتیگراد و ۸۰ ٪ ظرفیت زراعی در دماهای ۱۵- و ۱۸- درجه سانتیگراد (۰/٦٦٣، ۰/٦٨٩ و ۰/۷۱۷ میلیمتر مربع، به‌ترتیب) مشاهده گردید. میانگین قطر ریشه در تیمارهای ٦٠٪ و ٤٠٪ ظرفیت زراعی در دمای ۲۱- درجه سانتیگراد با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند (شکل ٦-d).

نتایج بررسی حجم ریشه گیاهان تحت سطوح مختلف آبیاری و دما نشان داد که در تیمار ۸۰٪ ظرفیت زراعی بیشترین حجم ریشه در دمای صفر درجه سانتیگراد مشاهده شد و کاهش دما به ۱۸- درجه سانتیگراد سبب کاهش ۲۳/۸ درصدی حجم ریشه شد. همچنین در تیمارهای ٦٠٪ و٤٠٪

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021



شکل ٦- اثر متقابل آبیاری × دما بر سطح ریشه، طول بلندترین ریشه، مجموع طول ریشه، میانگین قطر و حجم ریشه بنفشه در پایان دوره رشد مجدد (داده‌ها میانگین سه تکرار ± SD است).

ظرفیت زراعی کاهش دما به ۲۱- درجه سانتیگراد سبب کاهش ۳۸/۸ و ۳۳/۳ درصدی حجم ریشه نسبت به دمای ۲۰ درجه سانتیگراد شد (شکل ٦-e). در بررسی Merrill و همکاران (۲۰۰۲) بر اثر خشکی در سویا و لوبیا نتایج نشان داد که گیاهان بیشترین رشد ریشه را در سال‌های خشک و کم باران و کمترین رشد ریشه را در سال‌های پرباران دارند. از طرفی Turner (۱۹۸٦) گزارش کرد که تأثیر نامطلوب خشکی بر رشد گیاهانمی‌تواند با توسعه ریشه جبران شده و باعث افزایش جذب آب توسط گیاه شود. این فرایند با عمیق‌ترشدن ریشه‌ها، تغییر توزیع سیستم ریشه و یا تغییر اندازه آوندهای ریشه صورت می‌گیرد. همچنین بین فعالیت دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و ترکیبات فنولی رابطه مثبت و معنی‌داری با صفات ریشه مشاهده شد (جدول ۲). در آزمایش اخیر، کاهش صفات رویشی گیاهان بنفشه تحت تنش

جدول ۲- ضرایب همبستگی بین صفات مختلف گیاه بنفشه تحت تأثیر آبیاری و دما در شرایط کنترل شده

	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
۱-سوپراکسید دیسموتاز	۱											
۲-آسکوربات پراکسیداز	۰/۷٦**	۱										
۳-فنل	۰/۷٥**	۰/۷٦**	۱									
٤-ارتفاع	۰/۸۲**	۰/٦۰**	۰/٥۹**	۱								
٥-تعداد گره	۰/۸۳**	۰/٦۰**	۰/٥٥**	۰/۹۷**	۱							
٦-تعداد پنجه	۰/۸٥**	۰/٦٦**	۰/۷۱**	۰/۹۳**	۰/۹۱**	۱						
۷-قطر گل	۰/۸٥**	۰/٦۱**	۰/٦۳**	۰/۹۷**	۰/۹۷**	۰/۹۳**	۱					
۸-سطح ریشه	۰/۸۱**	۰/٦۳**	۰/۷۰**	۰/۷۸**	۰/۷٥**	۰/۸٤**	۰/۸۰**	۱				
۹-طول بلندترین ریشه	۰/۸۸**	۰/٦۷**	۰/٦٥**	۰/۹٥**	۰/۹٥**	۰/۹۳**	۰/۹٥**	۰/۸۳**	۱			
۱۰-مجموع طول ریشه	۰/۷۷**	۰/٦۲**	۰/۷۸**	۰/٦۸**	۰/٦٤**	۰/۷۷**	۰/۷۳**	۰/۹۲**	۰/۷٤**	۱		
۱۱-میانگین قطر	۰/۸٥**	۰/٦۱**	۰/٦۳**	۰/۹۷**	۰/۹٦**	۰/۹۳**	۰/۹۷**	۰/۸۳**	۰/۹٦**	۰/۷٥**	۱	
۱۲-حجم ریشه	۰/۸٦**	۰/٦۲**	۰/٦۲**	۰/۹٤**	۰/۹٥**	۰/۹۳**	۰/۹٥**	۰/۸۷**	۰/۹٦**	۰/۷٦**	۰/۹٦**	۱

**** نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.**

در اثر خسارت یخ‌زدگی بر گیاه و کاهش توانایی رشد مجدد آن می‌باشد که با نتایج عزیزی و همکاران (۱۳۸٦) مطابق می‌باشد. گیاهان در تنش خشکی با تجمع ترکیباتی نظیر آمینو اسیدها و پروتئین‌ها، ظرفیت خود را در مقابله با تنش یخ‌زدگی افزایش می‌دهند که به نظر می‌رسد گیاهان تحت تنش خشکی ٦۰٪ ظرفیت زراعی با افزایش موادی نظیر پرولین، کربوهیدارت مقاومت خود را در برابر تنش سرما نسبت به گیاهان شاهد افزایش داده‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

در آزمایش حاضر، کاربرد تیمارهای خشکی سبب افزایش میزان کربوهیدرات، پرولین و کاهش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و محتوای نسبی آب گردید همچنین با کاهش بیشتر دما از مقاومت گیاهان به تنش یخ‌زدگی کاسته شد. فعالیت دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و ترکیبات فنلی بعد از اعمال تیمارهای خشکی و سرما همبستگی مثبت و معنی‌داری با صفات مورفولوژی در انتهای دوره رشد مجدد داشتند. استفاده از سطح آبیاری ٦۰٪ ظرفیت زراعی منجر به بهبود رشد مجدد گیاهان با افزایش ارتفاع گیاهان، تعداد گره، پنجه و قطر گل بنفشه، و افزایش صفاتی مربوط به ریشه (سطح، مجموع طول ریشه، میانگین قطر و حجم ریشه) گردید. در بین سطوح مورد ارزیابی، تیمار ٦۰٪ ظرفیت زراعی در دمای صفر درجه سانتیگراد با افزایش فعالیت آنزیم‌ها و ترکیبات فنولی منجر به افزایش رشد رویشی و افزایش مقاومت به تنش یخ‌زدگی گیاهان گردید که نشان دهنده اثرات سینرژیک خشکی و دمای کم می‌باشد.

منابع

اسدی صنم، س.، زواره، م.، پیردشتی، ه. ا.، سفیدکن، ف. و نعمت زاده، ق. ع. (۱۳۹٤) بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) به تنش دمای پایین. فرآیند و کارکرد گیاهی ٤ : ۲۸-۱۱.

ابراهیمی، م.، زمانی، غ. و علیزاده، ز. (۱۳۹٦) مطالعه اثر تنش خشکی بر صفات فیزیولوژیک و عملکردی همیشه بهار (*Calendula officinalis*). دوماهنامه علمی و پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۳۳: ٥۰۸-٤۹۲.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

ایزدی دربندی، الف.، یوسف ثانی، م.، نظامی، الف.، جواد موسوی، م.، کیخاآخر. و نظامی، س. (۱۳۹۰) اثر تنش یخ‌زدگی بر گیاه قرنفل (*Dianthus barbatus*) در شرایط کنترل شده. مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی ٤: ۱۲۵-۱۱۷.

بارنده، ف. و کاوسی، ح. م. (۱۳۹٤) اثر کادمیوم بر تغییرات برخی اجزای سیستم دفاع آنتی اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاهچه‌های عدس. نشریه پژوهش‌های حبوبات ایران ۷: ۱۳۷-۱۲۵.

خالقی، ع.، نادری، ر.، بابالار، م. و سلامی، س. ع. (۱۳۹۵) ارزیابی کاربرد اسیدسالسیلیک و اسپرمیدین بر کاهش صدمات ناشی از تنش خشکی در نهال‌های یکساله توت آمریکایی. به زراعی کشاورزی ۱۸: ۲٤٤-۲۳۱.

سیاهمرگویی، ا.، عزیزی، گ.، نظامی، ا. و جهانی کندری، م. (۱۳۹۰) بررسی تحمل به یخ‌زدگی اکوتیپ‌های رازیانه رشد یافته در مزرعه، تحت شرایط کنترل شده. نشریه باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی) ۲۵: ۷۲-٦٤.

عزیزی، ه.، نظامی، الف.، نصیری محلاتی، م. و خزاعی، ح. ر. (۱۳۸٦) ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی ارقام گندم تحت شرایط کنترل شده. مجله پژوهش‌های زراعی ایران ۵: ۱۲۰-۱۰۹.

قاسمی قهساره، م. و کافی، م. (۱۳۸۹) گلکاری علمی و عملی جلد اول، ناشر مولف.

کشاورزنیا، ر.، شهبازی، م.، محمدی، و.ا.، حسینی سالکده، ق.، احمدی، ع. و محسنی فرد، ا. (۱۳۹۳) نقش ساختار ریشه و صفات فیزیولوژیک جو در پاسخ به تنش خشکی. علوم گیاهان زراعی ایران ٤۵: ۵٦۳-۵۵۳.

موسوی، م.ج.، نظامی س.، ایزدی دربندی ا.، نظامی ا.، یوسف ثانی م. و کیخاآخر، ف. (۱۳۹۰) مطالعه اثرات تنش یخ‌زدگی بر گیاه مینای چمنی (*Bellis perennis*) در شرایط کنترل شده. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع غذایی) ۲۵: ۳۸۸-۳۸۰.

نظامی، ا.، موسوی، م. ج.، نظامی،س.، ایزدی دربندی، ا.، یوسف ثانی، م. و کیخا آخر، ف. (۱۳۹۳) بررسی تحمل به یخ‌زدگی گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis*) در مرحله رشد رویشی و زایشی. نشریه علوم باغبانی ۲۸: ۳۷۸-۳٦۹.

Abdallah, M. B., Methenni, K., Nouairi, I., Zarrouk, M., and Youssef, N. B. (2017) Drought priming improves subsequent more severe drought in a drought sensitive cultivar of olive cv. Chetoui. Scientia Horticulturae 221: 43-52.

Amiri, R., Nikbakht, A., and Etemadi, N. (2015) Alleviation of drought stress on rose geranium (*Pelargonium graveolens*) in terms of antioxidant activity and secondary metabolites by mycorrhizal inoculation. Scientia Horticulturae 197: 373-380.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolation chloroplast phenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

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

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

Bhattacharjee, S. (2005) Reactive oxygen species and oxidative stress, senescence and signal transduction in plants. Current Science 89: 1113-1121.

Campbell, G. S., and Mulla, D. J. (1990) Measurement of soil water content and potential. In: Irrigation of Agricultural Crops (eds. Stewart, B. A. and Nielsen, D. R.) Pp 127-142. American Society of Agronomy, Madison, USA.

Gharibi, S., Tabatabaei, B. E. S., Saeidi, G., and Goli, S. A. H. (2016) Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidant activity of Achillea species. Applied Biochemistry and Biotechnology 178: 796-809.

Chegah, S., Chehrazi, M., and Albaji, M. (2013) Effects of drought stress on growth and development frankinia plant (*Frankinia leavis*). Bulgarian Journal of Agricultural Science 19: 659-665.

Chinnusamy, V., Schumaker, K., and Zhu, J. K. (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. Journal Experimental Botany 55: 225-236.

Ebell, L. F. (1969) Variation in total soluble sugars of conifer tissues with method of analysis. Phytochemistry 8: 227-233.

Ge, T., Sui, F., Bai, L., Tong, C., and Sun, N. (2012) Effects of water stress on growth, biomass partitioning, and water-use efficiency in summer maize (*Zea mays* L.) throughout the growth cycle. Acta Physiologiae Plantarum 34: 1043-1053.

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

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

Gill, S. S., and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Gomes, F. P., Oliva, M. A., Mielke, M. S., Almeida, A. A. F., and Aquino, L. A. (2010) Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. Scientia Horticulturae 126: 379-384.

Hayat, S. H., Hayat, Q., Alemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., and Ahmad, A. (2012) Role of proline under changing environments. Plant Signaling and Behavior 7: 1456-1466.

Hoermiller, I. I., Naegele, T., Agustin, H., Stutz, S., Weckwerth, W., and Heyer, R. G. (2016) Subcellular reprogramming of metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana.* Plant. Cell and Environment 40: 602-610.

Hoffman, L., DaCosta, M., Ebdon, J. S., and Zhao, J. (2012) Effects of drought preconditioning on freezing tolerance of perennial ryegrass. Environmental and Experimental Botany 79: 11-20.

Hosseini, F., Moghaddasi, M. R., and Dexter, A. R. (2017) Effect of the fungus *Piriformospora indica* on physiological characteristics and root morphology of wheat under combined drought and mechanical stresses. Plant Physiology and Biochemistry 118:107-120.

Khan, H. U., W. Link, T. Hocking, and Stoddard, F. (2007) Evaluation of physiological biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Kondo, M., Pablico, P. P., Aragones, D. V., Agbisit, R., Abe, J., Morita, S. and Courtois, B. (2003) Genotypic and environmental variations in root morphology in rice genotypes under upland field conditions. 6th Symposium of the International Society of Root Research, Nagoya, Japan.

Kulkarni, M., and Swati, P. (2009) Evaluating variability of root size system and its constitutive traits in hot pepper (*Capsicum annum* L.) under water stress. Scientia Horticulturae 120: 159-166.

Lee, G., Carrow, R. N., Duncan, R. R., Eiteman, M. A., and Rieger, M. W. (2008) Synthesis of organic osmolytes and salt tolerance mechanisms in *Paspalum vaginatum*. Environmental and Experimental Botany 63: 19-27.

Liu, W., Yu, K., He, T., Li, F., Zhang, D and Liu, J. (2013) the low temperature induced physiological responses of *Avena nuda* L., a cold-tolerant plant species. The Scientific World Journal 2013: 1-7.

Merrill, S. D., Tanaka, D. L., and Hanson, J. D. (2002) Root length growth of eight crop species in Haplustoll soils. Soil Science Society of America Journal 66: 913-923.

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

Nezami, A., Soleymani, M. R., Ziaee, M., Ghodsi, M., and Banayan Aval, M. (2010) Evaluation of freezing tolerance of hexaploid triticale genotypes under controlled conditions. Notulae Scientia Biologicae 2:114-120.

Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., and Garcia-Parrilla, M. C. (2008) Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 48:649-71.

Paolo, B., Pedron, L., Hietala, A. M., and Porta, N. L. (2011) Cold tolerance in cypress (*Cupressus sempervirens* L.): a physiological and molecular study. Tree Genetics and Genomes 7: 79-90.

Pinior, A., Grunewaldt-Stocker, G., Alten, H. V., and Strasser, R. J. (2005) Mycorrhizal impact on drought stress tolerance of rose plants probed by chlorophyll a fluorescence, proline content and visual scoring. Mycorrhiza 15: 596-605.

Pingping, W. U., Chubin, W. U., and Biyan, Z. (2017) Drought stress induces flowering and enhances carbohydrate accumulation in *Averrhoa Carambola.* Horticultural Plant Journal 3:60-66.

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

Ramakrishna, A., and Ravishankar, G. A. (2011) Plant signaling and behavior; influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signal and Behavior 6: 1720-1731.

Ranganna, S. (1997) Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products. 9nd Ed, Tata McGraw-Hill, New Delhi.

Rashed Mohassel, M. H., Nezami, A., Bagheri, A. R., Hajmohammadnia, K., and Bannayan, M. (2009) Evaluation of freezing tolerance of two fennel *(Foeniculum vulgar* L.) ecotypes under controlled conditions. Journal of Herbs Species and Medicinal Plants 15: 131-140.

Sasaki, H., Ichimura, K., Okada, K., and Oda, M. (1998) Freezing tolerance and soluble sugar contents affected by water stress during cold-acclimation and de-acclimation in cabbage seedlings. Scientia Horticulturae 76: 161-169.

Shiriga, K., Sharma, R., Kumar, K., Yadav, S. K., Hossain, F., and Thirunavukkarasu, N. (2014) Expression pattern of superoxide dismutase under drought stress in maize. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology 3: 11333-11337.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-58.

Smart, R. E., and Bingham, G. E. (1974) Rapid estimates of relative water content. Plant Physiology 53: 258-260.

Tanou, G., Molassiotis, A. and Diamantidis, G. (2009) Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. Environmental and Experimental Botany 65: 270-281.

Thapa, B., Arora, R., Knapp, A., Brummer, E. C. (2008) Applying freezing test to quantify cold acclimation in *Medicago truncatula*. Journal of the American Society for Horticultural Science 133: 684-686.

Tuberosa, R. (2012) Phenotyping for drought tolerance of crops the genomics era. Frontiers in Physiology Journal 3: 1-26.

Turner, N. C. (1986) Adaptation to water deficit: A changing perspective. Australian Journal of Plant Physiology 13: 175-190.

Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. Molecular Plant 3: 2-20.

Yang Y., Liu Q., Han C., Qiao Y. Z., Yao X. Q., and Yin H. J. (2007) Influence of water stress and low irradiance on morphological and physiological characteristics of *Picea asperata* seedlings. Photosynthetica 45: 613-619.

Zhang, Q., Song, X., and Bartles, D. (2016) Enzymes and metabolites in carbohydrate metabolism of desiccation tolerant plants. Proteomes 4:1-14.

Zhang, X., Wang, K., Ervin, E. H., Waltz, E. C., and Murphy, T. (2011) Metabolic changes during cold acclimation and deacclimation in five Bermudagrass varieties. I. Proline, total amino acid, protein, and dehydrin expression. Crop Science 51: 838-846.

Zhu, J., Brown, K. M., and Lynch, J. P. (2010) Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). Plant, Cell and Environment 33:740-749.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 7:48 IRDT on Wednesday April 21st 2021

Evaluation of biochemical and morphophysiological responses of *Viola× wittrockiana* to drought and cold stress

Atiyeh Oraee [1], Ali Tehranifar [1*], Ahmad Nezami [2], Mahmoud Shoor [1]

[1]Department of Horticultural Science and Landscape Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
[2]Department of Agronomy Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
(Received: 30/10/2017, Accepted: 08/05/2018)

Abstract:

Rising temperatures in cold seasons due to climate change negatively affect the survival of ornamental plants in the green space. The current study was performed to investigate the effects of drought stress on cold resistance and evaluation of morphophysiological changes on viola (*Viola× wittrockiana)*. The experiment was conducted as a factorial experiment based on a completely randomized design (CRD) with three irrigation levels (80%, 60% and 40% FC) and ten levels of temperature (20, 0, -3, -6, -9, -12, -15, -18, -21 and -24 °C). Proline, carbohydrate, chlorophyll (a, b and total), carotenoid concentrations and relative water content were investigated after irrigation treatments, the activity of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and total phenol were determined following temperature treatments and at the end of regrowth period, morphological traits were measured. The results showed that carbohydrate (2.67%) and proline (50.5%) increased whereas total chlorophyll (13.6%) and relative water content (23.9%) significantly decreased, when plants were under drought stress. The activity of two enzymes was significantly affected by interaction effects of irrigation and temperature treatments. Maximum activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase were observed in 40% FC level of irrigation water at 0 °C (respectively, 73.1 U^{-1}mg protein and 207 µmol min^{-1} $protein^{-1}$), but with decreasing temperature, the activity of these enzymes was declined. In all irrigation levels, the amounts of total phenols were increased from 20 to 0 °C and reached to minimum at -24 °C. In the current study, the effect of drought stress on freezing tolerance varied with temperature. Among the different parameters evaluated, 60% FC treatment at 0 °C most consistently induced increases in reproductive growth and increased freezing resistance of plants.

Keywords: Antioxidant enzymes, Oxidative stress, Cold acclimation, Defense mechanisms

Corresponding author, Email: tehranifar@um.ac.ir