



به‌زرعی کشاورزی

دوره ۱۹ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۶
صفحه‌های ۹۹۴-۹۷۹

بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برخی ارقام زینتی مرکبات تحت تنش دمای پایین

سیده مرضیه حسینی‌ولشکلایی^۱، یحیی تاجور^۲، مسعود آزادبخت^۳، زینب رفیعی‌راد^{۴*}

۱. کارشناسی‌ارشد، گروه فضای سبز، مؤسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران
۲. استادیار، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، سازمان، تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران
۳. استادیار، گروه فضای سبز، مؤسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران
۴. دانشجوی دکتری، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۰۲

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۰۸

چکیده

تنش دمای پایین یکی از مهمترین تنش‌های محیطی غیرزنده است که رشد و عملکرد گیاهان زینتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به منظور بررسی برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی چهار رقم مرکبات زینتی مورد استفاده در فضای سبز شهری در شرایط تنش دمای پایین، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری کشور (رامسر) در سال ۱۳۹۴ اجرا شد. تیمارها شامل دما در چهار سطح (۳، ۰، ۳- و ۶- درجه سانتی‌گراد) و چهار رقم مرکبات زینتی شامل (کامکوات، انگشت بودا، کالاموندین و لایم‌کوات) بودند. نتایج نشان داد که با کاهش دما میزان نشت یونی، آب‌گزیدگی، محتوای پرولین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپیدها و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌طور معناداری افزایش یافتند، در صورتی‌که مقدار کلروفیل a و کل کاهش یافت. بر این اساس کمترین میزان آب‌گزیدگی برگ (۲۰/۹۲ درصد) و نشت یونی (۳۰/۸۱ درصد) که شاخص‌های تخریبی هستند، در کامکوات مشاهده شد. همچنین، مقدار کلروفیل کل (۲/۲۱ میلی‌گرم برگ‌گرم وزن تر برگ)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۶۰/۶۱ درصد) و میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (۲۶/۵۳ واحد آنزیمی برگ‌گرم وزن تر برگ) که از صفات تحمل‌پذیری محسوب می‌شوند، در این رقم مشهودتر بود. به‌طورکلی، کامکوات از طریق افزایش برخی شاخص‌ها مانند پرولین، قندهای محلول، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز قادر به تحمل تنش یخبندان تا دمای ۳- درجه سانتی‌گراد است.

کلیدواژه‌ها: پرولین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فضای سبز، کلروفیل، نشت یونی.

۱. مقدمه

دما از جمله مهمترین فاکتورهای محیطی محدودکننده تنوع و پراکنش جغرافیایی گیاهان است [۴۴]. ایران، کشوری با سابقه وقوع یخبندانهای متعدد است و از جمله یخبندانهای ثبت شده می توان به یخبندان سالهای (۱۳۴۲، ۱۳۴۷، ۱۳۵۴، ۱۳۸۶، ۱۳۹۲ و ۱۳۹۵ هجری شمسی) اشاره کرد که در اثر آن، بسیاری از درختان و درختچه های زینتی کشور به ویژه استان های شمالی خسارت دیدند [۲]. بنابراین، یکی از موارد مهم در انتخاب ارقام مناسب برای منظرسازی، شناخت میزان مقاومت آنها نسبت به تنش دمای پایین، به ویژه شرایط یخبندان است که جزء مهم ترین چالش های مدیریت نگهداری مواد گیاهی در فضای سبز محسوب می شود.

تنش دمای پایین یکی از مهمترین تنش های زیستی غیرزنده و محدودکننده رشد و بهره وری گیاهان است که باعث کاهش عملکرد و در نهایت مرگ آنها می شود [۲۰]. فتوسنتز جزء نخستین فرآیندهایی است که در گیاهان عالی تحت تأثیر دمای پایین قرار می گیرد. در تنش دمای پایین به علت عدم تعادل بین نور دریافتی و فتوسنتز، احتمال وقوع تنش اکسیداتیو وجود دارد که ناشی از افزایش تولید رادیکال های فعال اکسیژن است [۹]. به طوری که با کاهش دما به علت تخریب رنگیزه های فتوسنتزی (رنگدانه های کلروفیل) و افزایش تولید کاروتنوئیدها به ویژه در غشاء تیلاکوئیدی، علائم مختلفی مانند پژمردگی، کلروز یا همان زردی برگ ها و نکروز (مرگ بافت) در گیاهان مشاهده می شود [۱۳ و ۴۴]. بر این اساس، کاهش میزان رنگدانه های کلروفیل در بلوط سبز [۴۲] و زیتون [۱۱] و به دنبال آن بروز عارضه کلروز (زردی برگ ها) در درختان پرتقال والنسیا [۳۷] و لیمو [۱] تحت تنش دمای پایین گزارش شد.

یکی از واکنش هایی که در حضور گونه های فعال اکسیژن سرعت تخریب بیشتری پیدا می کند، پراکسیداسیون

مرکبات از خانواده Rutaceae و زیرخانواده Aurantioideae است. به استثنای نارنج سه برگ، بقیه ارقام مرکبات گیاهانی همیشه سبز با رایحه مطبوع در زمان شکوفه دهی هستند. به همین دلیل برخی از ارقام آنها به عنوان پرکاربردترین گیاهان در فضای سبز استفاده می شود [۳۳]. یکی از مهمترین اصول در منظرسازی، تنوع گیاهی است که درباره کاربرد مرکبات در فضای سبز این اصل رعایت نشده است. یکی از دلایل این امر را می توان عدم معرفی سایر ارقام این خانواده برای منظرسازی بیان کرد. این درحالی است که برخی ارقام موجود در این خانواده دارای قابلیت کاربرد در منظرسازی هستند که به برخی از این موارد می توان اشاره کرد [۲].

یکی از ارقام مرکبات، کامکوات^۱ است که شامل گونه های متعددی است و زمان گلدهی این درختچه ها برخلاف اغلب ارقام مرکبات در اوایل تابستان است. از مشخصات دیگر این رقم، حجم کم تاج آنها بوده (بدون نیاز به هرس مکرر) که می تواند در طراحی باغ و فضای سبز به کار گرفته شود [۲]. انگشت بودا^۲ به صورت درختچه ای کوچک با تاج باز بوده و در مرحله بلوغ، میوه آن به شکل انگشت های انسان رشد می کند که جلوه خاصی به این درختچه می دهد و از جنبه زینتی آن را بسیار حائز توجه کرده است. کلاموندین^۳ یکی دیگر از ارقام مرکبات است که به صورت درختچه بوده و دورگی از نارنگی و کامکوات با میوه کوچک است و عموماً برای اهداف زینتی مطرح می شود [۲۷]. لایم کوات^۴ رقم دیگری است که حاصل تلاقی کی لایم و کامکوات است و برخی ارقام آنها به صورت درختچه زینتی در زیباسازی پاسیو، تراس و فضای سبز کاربرد دارند [۲].

1. *Fortunella* spp. Swing
2. *Citrus medica* var. *Sarcodactylis*
3. *Citrus madurensis*
4. Key lime × *F. margarita*

به زراعی کشاورزی

نتیجه تنظیم فشار اسمزی، تحمل‌پذیری گیاهان نسبت تنش دمای پایین، افزایش می‌یابد [۱۹].

برخی از گیاهان سازگار و متحمل به تنش اکسیداتیو ناشی از دمای پایین، از طریق بکارگیری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی یا غیرآنزیمی) ادامه حیات را در شرایط مذکور بهبود می‌بخشند. در پژوهشی که بر روی سازگاری لیمو انجام گرفت مشخص شد که در شرایط تنش، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، در ارتقاء تحمل‌پذیری این گیاهچه به تنش دمای پایین تأثیرگذار بود [۶]. در زمینه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توان به این نکته اشاره داشت که سوپراکساید دیسموتاز، جزء نخستین آنزیمی است که در فرآیند خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن دخالت دارد. این آنزیم با تبدیل گونه سوپراکساید به مولکول پراکسید هیدروژن، اقدام به خنثی‌سازی سوپراکساید می‌کند [۲۱]. بر این اساس در پژوهش انجام گرفته روی گیاهچه‌های بذری مرکبات تحت تنش یخبندان افزایش فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز گزارش شد [۴].

بنابراین، می‌توان اینگونه بیان کرد که تنش دمای پایین می‌تواند یکی از فاکتورهای بسیار مخرب در مرکبات، همچنین ارقام زیتنی آن به‌شمار آید. همانگونه که بیان شد مرکبات زیتنی مذکور پتانسیل بالایی برای کاربرد در فضای سبز شهری به‌ویژه منظرسازی و طراحی فضای سبز دارند، اما با توجه به سابقه وقوع یخبندان‌های متعدد و حساسیت بالای برخی از ارقام مرکبات زیتنی به دمای پایین، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ارقام زیتنی و تعیین گونه‌های متحمل به تنش دمای پایین است.

۲. مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر تنش دمای پایین بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی چهار رقم مرکبات زیتنی مورد

لیپیدهای غشایی است که در پژوهش‌های صورت گرفته روی زیتون [۱۱] و لیموآب شیراز [۶]، افزایش این شاخص در شرایط تنش دمای پایین گزارش شد. کاهش دما همچنین موجب تغییر سیالیت غشاء می‌شود که در کنار پراکسیداسیون لیپیدها باعث تغییر غشاء از حالت نیمه‌مایع به حالت کریستاله شده و یخ درون سلولی تشکیل می‌شود. همچنین به دنبال آن، فرآیند آب‌گزیدگی و نشت یونی افزایش می‌یابد که دلیل آن واکنش گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط دمای پایین با اسیدهای چرب است که باعث آب‌گزیدگی و سپس نشت محتوای سلولی، خشکی سریع و در نهایت مرگ سلول می‌شود [۲۸]. در گیاه زیتون دمای پایین سبب ایجاد نشت یونی و آب‌گزیدگی برگ و در نتیجه افزایش تخریب برگ گیاه شد [۷].

یکی از سازوکارهای مؤثری که گیاه برای غلبه بر آثار سوء تنش دمای پایین از آن بهره می‌گیرد، تنظیم اسمزی است. از مهمترین اسمولیت‌های سهیم در تنظیم اسمزی، محتوای پرولین و قندهای محلول است. پرولین به‌عنوان اسمولیتی مهم، با دخالت در فرآیند تعدیل اسمزی، در تحمل‌پذیری گیاه به شرایط تنش دخالت می‌کند [۲۲]. بر این اساس نتایج پژوهش روی سیترنج نشان داد که افزایش پرولین موجب افزایش تحمل‌پذیری گیاه به تنش دمای پایین شد [۳۱]. همچنین، در گزارشی دیگر بیان شد که در برخی از ارقام مرکبات همچون نارنج و والنسیا در مرحله سازگاری به تنش دمای پایین، محتوای پرولین (به میزان ۳ تا ۶ برابر) افزایش یافت [۲۵]. نقش و اهمیت قندهای محلول به این علت است که تجمع این مواد سبب تنظیم فشار اسمزی، کاهش از دست دادن آب سلول و نگهداری تورژسانس می‌شود. در این خصوص گزارش شده است که گیاهان در مرحله سازگاری به تنش دمای پایین با تجمع آبسزیک اسید در برگ‌های خود موجب فعالیت برخی از ژن‌ها و تغییراتی در قندهای درون سلول می‌شوند که در

نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو و پس از سرد شدن، هدایت الکتریکی ثانویه (EC₂) قرائت شد. مقدار نشت یونی بر اساس درصد و با استفاده از فرمول (۱) محاسبه شد [۳۰].

$$(1) \quad 100 \times (EC_1/EC_2) = \text{درصد نشت}$$

یونی

برای محاسبه درصد آب‌گزیدگی برگ^۲، بلافاصله بعد از وقوع تنش یخبندان، سطح کل و سطح آب‌گزیده نمونه برگ‌های مورد مطالعه با استفاده از دستگاه سطح‌سنج برگ^۳ اندازه‌گیری شد و میزان درصد آب‌گزیدگی برگ بر اساس فرمول (۲) محاسبه شد [۴۴].

(۲)

$100 \times (\text{سطح کل برگ} / \text{سطح آب‌گزیده برگ}) = \text{درصد آب‌گزیدگی برگ}$
برای اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدهای محلول برگ، یک هفته بعد از اعمال تنش دمای پایین، ۰/۲ گرم نمونه برگی به ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد خنک اضافه و پس از آن به مدت پنج دقیقه در ۱۴۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ^۴ ساخت آلمان شد. پس از افزودن پنج میلی لیتر استون به محلول بالایی، با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم ۲۰ میلی لیتر رسانده شد و با استفاده از اسپکتروفوتومتر^۵ ساخت آمریکا، میزان جذب (A) در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ قرائت و مقدار رنگدانه‌ها طبق فرمول (۳، ۴، ۵ و ۶) محاسبه شد [۳۵]:

$$(3) \quad Chla = 12.7 A663 - 2.63 A645$$

$$(4) \quad Chlb = 22.9 A645 - 4.68 A663$$

$$(5) \quad \text{Total Chl} = Chla + Chlb$$

$$(6) \quad \text{Total Carotenoid} = (1000 A470 - 1.8 Chla - 85.02 Chlb) / 198$$

برای اندازه‌گیری میزان پروکلین، ۰/۳ گرم از نمونه‌های

استفاده در فضای سبز، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری کشور در سال ۱۳۹۴ اجرا شد. فاکتورها شامل دمای پایین در چهار سطح (۳، ۰، ۳- و ۶- درجه سلسیوس) و چهار رقم مرکبات زیتنی شامل (کامکوات، انگشت بودا، کالاموندین، لایم کوآت) بودند. نخست نهال‌های چهار ساله یکنواخت انتخاب شدند و در داخل گلدان‌های ۱۰ کیلویی از خاک منطقه (بافت لومی سیلتی) قرار داده شدند. قبل از شروع تیمارهای دمایی به منظور سازگاری ترکیبات گیاهی به کاهش دما، نهال‌ها به درون انکوباتور با رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و شدت نور ۱۵۰۰۰ لوکس (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) منتقل شدند (مبنای این رطوبت و شدت نور، میزان رطوبت و شدت نور خورشید مورد نیاز برای رشد مرکبات در مناطق شمالی کشور است، زیرا که متوسط رطوبت نسبی در مناطق شمالی کشور برای رشد و پرورش مرکبات ۷۰ درصد و متوسط شدت نور خورشید معادل نوری است که طی ۱۲ ساعت روشنایی ساطع می‌شود). کاهش دمای محیط از دمای طبیعی رشد به صورت تدریجی روزانه یک درجه سانتی‌گراد بود سپس نهال‌ها به مدت ۲۴ ساعت در هر تیمار دمایی قرار داده شدند [۳۵].

به منظور ارزیابی پایداری غشای سلولی، بلافاصله بعد از اعمال تیمار دمایی، میزان نشت یونی مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ۰/۵ گرم برگ از نمونه‌های جدا شده، به صورت قطعاتی به ابعاد یک سانتی متر مربع برش داده شد و به درون لوله آزمایش درپوش دار حاوی ۱۵ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر منتقل شد. این نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر شدند و مقدار هدایت الکتریکی اولیه محلول (EC₁)، با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج^۱ ساخت چین اندازه‌گیری شد. سپس

1. Mettler-Toledo GmbH Model

2. Water Soaking
3. AM300 Model
4. Universal 320 R Model
5. ND-1000 Model

آنتی‌اکسیدانی بر مبنای درصد جمع‌آوری رادیکال آزاد طبق فرمول ۷ محاسبه شد [۱۸].

(۷)

= درصد جمع‌آوری رادیکال آزاد

$\times 100$ (جذب کنترل / جذب نمونه - جذب کنترل)

مالون‌دآلدئید^۱، محصول نهایی پراکسیداسیون

اسیدهای چرب غیراشباع است که با تیوباریتوریک‌اسید واکنش داده و تشکیل کمپلکس رنگی می‌دهد. به این منظور نخست ۰/۱ گرم از نمونه‌های برگ با دو میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک‌اسید پنج درصد مخلوط و به شدت تکان داده شد. سپس نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ و فاز روئی آن جدا شد. در ادامه یک میلی‌لیتر از عصاره^۱ واکنش با چهار میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد تری‌باربیتوریک‌اسید مخلوط و محلول واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سرد شدن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. غلظت کمپلکس رنگی با استفاده از معادله $A = \epsilon BC$ محاسبه شد که عدد A شامل کسر جذب ۵۳۲ از ۶۰۰ نانومتر، ϵ ضریب خاموشی کمپلکس با مقدار عددی $1555 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، B عرض کووت و C غلظت کمپلکس است که بر حسب میلی‌مول بر گرم وزن تر برگ، محاسبه شد [۳۲].

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، نخست نمونه‌های برگ با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج و سانتریفیوژ شد. مخلوط روئی در محفظه‌ای با لامپ فلورسنت (نور تولیدی ۴۰۰ لوکس) در دمای اتاق قرار داده شد و میزان جذب نمونه، بلانک و کنترل در طول موج ۵۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر بر مبنای واحد آنزیمی در میلی‌گرم وزن تر برگ بیان شد [۴۰].

برگی با ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک‌اسید ۱۰ درصد عصاره‌گیری شد. سپس، این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در 10000 rpm ، سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه قرار گرفت سپس و محلول روئی آن جدا شد. در ادامه، عصاره^۱ حاصله با معرف ناین هیدرین (شامل ۱/۲۵ گرم ناین هیدرین، ۳۰ میلی‌لیتر استیک‌اسید گلاسیال با ۲۰ میلی‌لیتر ارتوفسفریک‌اسید ۶ مولار) و اسید استیک (هرکدام به میزان ۲ میلی‌لیتر) مخلوط شد. بعد از قرارگیری در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سلسیوس، مخلوط نمونه بلافاصله سرد شد. در ادامه ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط نمونه اضافه شد که بعد از تکان شدید دو فاز جداگانه شکل گرفت. سپس جذب فاز روئی در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل ND-1000) قرائت شد [۱۲].

اندازه‌گیری قندهای محلول برگ، از طریق به‌کارگیری روش فنل سولفوریک، که مبتنی بر آبیگری قندهای محلول و تشکیل ترکیب فورفورال است، انجام پذیرفت. میزان جذب ترکیب حاصل در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری و سپس با استفاده از منحنی استاندارد، میزان قندهای محلول ارزیابی شد [۵].

برای سنجش میزان جمع‌آوری رادیکال آزاد و تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، از سنجش ۱ و ۱-دی فنیل پیکریل هیدرازیل^۱ استفاده شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر عصاره^۱ استخراجی با ۹۰ مایکرولیتر محلول DPPH (۶ میلی‌مولار) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریک (دمای اتاق) نگهداری شد. برای آماده‌سازی تیمار کنترل، به جای عصاره، از ۱۰ مایکرولیتر متانول ۸۵ درصد استفاده شد. سپس جذب کنترل و نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و ثبت شد. با قراردادن جذب در فرمول ارائه شده، ظرفیت

سلسیوس) بیشترین مقدار خسارت نشت یونی در انگشت بودا و کمترین مقدار آن، در کامکوات مشاهده شد (شکل ۲). گزارش های بسیاری وجود دارد که بیان کننده افزایش تنش اکسیداتیو در شرایط دمایی پایین است [۱۱]. گونه های فعال اکسیژن با تأثیر بر غشای سلولی، منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، تغییر در نفوذپذیری و سیالیت آن (نشت الکترولیت ها به خارج از سلول) و خسارت به سلول های گیاهی می شوند [۲۷]. هرچه میزان نشت یون ها به فضای بیرون سلول بیشتر باشد، خسارت وارده به غشاء سلولی بیشتر می شود. افزایش میزان نشت یونی برگ در نهال های قهوه [۱۴] تحت تنش دمایی پایین گزارش شد که نتایج آن تأییدکننده این مطلب است.

پس از اجرای پژوهش و جمع آوری داده ها، آنالیز واریانس داده های حاصل از اندازه گیری صفات با استفاده از نرم افزار آماری SAS (نسخه ۹/۰) انجام شد. مقایسه میانگین هر صفت نیز با استفاده از آزمون توکی و در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار اکسل استفاده شد.

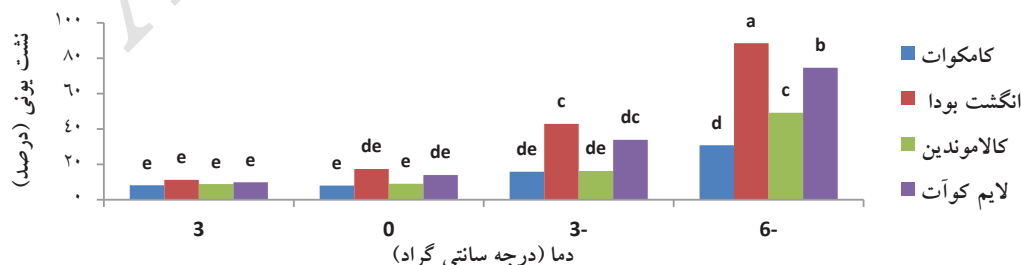
۳. نتایج و بحث

۱.۳. نشت یونی

نتایج نشان داد که با کاهش دما نشت یونی به طور معنادار افزایش یافت. بیشترین میزان نشت یونی (۵۸/۸ درصد) در تیمار دمایی ۶- درجه سانتی گراد و کمترین مقدار (۹/۵۴ درصد) در دمایی ۳ درجه سانتی گراد مشاهده شد (شکل ۱). با کاهش دما و در پایین ترین سطح دمایی (دمای ۶- درجه



شکل ۱. اثر دما بر میزان درصد نشت یونی



شکل ۲. اثر سطوح مختلف دما بر شاخص نشت یونی برگ کامکوات، انگشت بودا، کلاموندین و لایم کوآت

۲.۳. آب‌گزیدگی

توجیه این نتایج می‌توان این‌گونه استدلال کرد که بر اثر تنش یخبندان با افزایش نشت یونی، خروج آب از درون سلول به فضای بیرون صورت گرفته که در چنین وضعیتی احتمال بروز پدیده آب‌گزیدگی برگ نیز وجود دارد. بنابراین، افزایش همزمان نشت یونی و پدیده آب‌گزیدگی برگ ارقام زیتنی مورد مطالعه می‌تواند تأییدکننده این استدلال باشد. گزارش مشابهی در خصوص تأثیر تنش یخبندان بر آب‌گزیدگی برگ گیاهچه بذری هلو [۲۶] و ارقام حساس مرکبات [۱۷] ارائه شده، که مطابق نتایج این مطالعه است.

جدول مقایسه میانگین اثر ساده رقم بر میزان آب‌گزیدگی برگ نشان داد که در بین ارقام زیتنی مورد مطالعه، انگشت بودا بیشترین خسارت آب‌گزیدگی را نشان داد (جدول ۱). همچنین اثر دما بر آب‌گزیدگی نشان داد که شروع آب‌گزیدگی از دمای ۳- درجه سانتی‌گراد بوده و در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد به بالاترین مقدار خود رسید (جدول ۲). اثر متقابل رقم و دما بر شاخص آب‌گزیدگی برگ نشان داد که در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار آب‌گزیدگی در انگشت بودا مشاهده شد (شکل ۳). در

جدول ۱. مقایسه میانگین اثر رقم بر صفات آب‌گزیدگی، پرولین، قندهای محلول، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپید

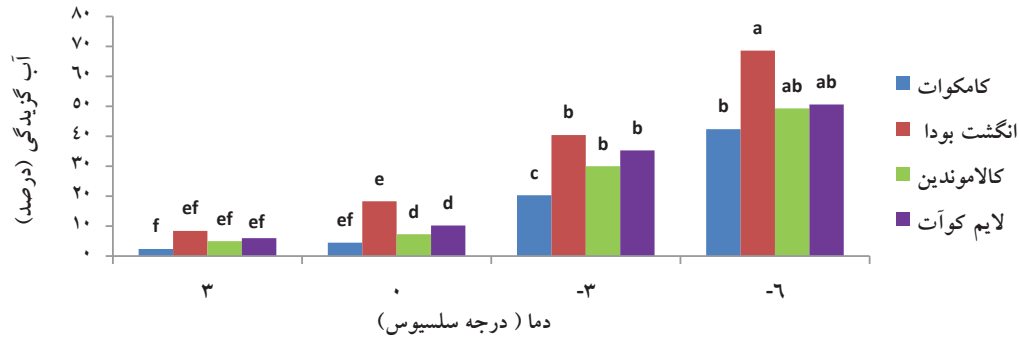
رقم	آب‌گزیدگی (%)	پرولین (mg/gFW)	قندهای محلول (mg/gFW)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (%)	مالون دآلدئید (μg/gFW)
کامکوات	۲۰/۹۲d	۲۰/۱۸a	۵۶/۹a	۴۴/۳۳b	۱/۱۷ab
انگشت بودا	۳۹/۷۵a	۱۲/۵۷b	۴۰/۷b	۴۶/۳۶ab	۱/۵۵a
کالاموندین	۲۹/۵c	۱۸/۰۳a	۵۰/۱ab	۵۱/۳۲a	۰/۹۶b
لایم کوآت	۳۳/۹b	۱۳/۲b	۴۳/۶b	۴۱/۳۱b	۱/۲۲ab

* میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، از لحاظ آماری اختلاف معناداری ندارند

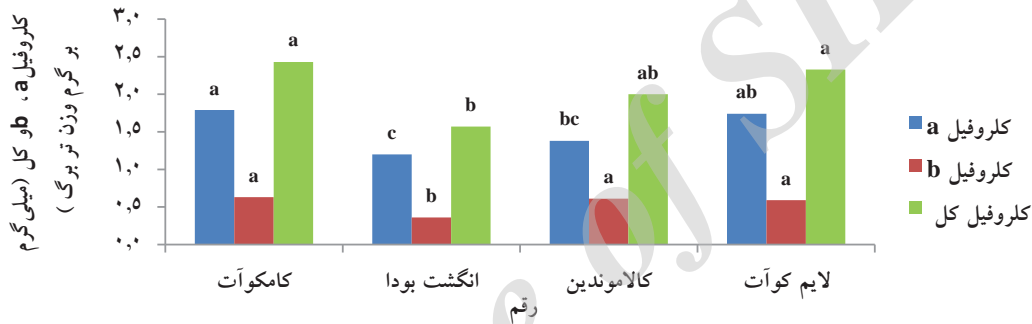
جدول ۲. مقایسه میانگین اثر دما بر صفات آب‌گزیدگی، کلروفیل a و کل، کاروتنوئید، پرولین قندهای محلول و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

دما (درجه سلسیوس)	آب‌گزیدگی (%)	کلروفیل a (mg/gFW)	کلروفیل کل (mg/gFW)	کاروتنوئید (mgr/grFW)	پرولین (mg/gFW)	قندهای محلول (mg/gFW)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (%)
۳	۳d	۲/۰۱a	۲/۶۳a	۰/۱۶b	۸/۵۱c	۴۵/۹b	۳۶/۸۶b
۰	۱۴/۰۸c	۱/۹۲a	۲/۵a	۰/۱۷b	۱۲/۷۴b	۶۸/۱a	۴۰/۸۶b
-۳	۴۱/۲۵b	۱/۲۴b	۱/۷b	۰/۱۸b	۲۲/۲۸a	۵۱/۲b	۵۴/۸۵a
-۶	۶۹/۷۵a	۰/۹۴b	۱/۴۴b	۰/۲۱a	۲۰/۴۲a	۴۹/۳b	۵۰/۷۵a

* میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، از لحاظ آماری معنادار نیستند.



شکل ۳. اثر سطوح مختلف دما بر شاخص آب‌گزیدگی برگ کامکوات، انگشت بودا، کالاموندین و لایم‌کوات.



شکل ۴. اثر رقم بر محتوای کلروفیل a، b و کل

۳.۳. کلروفیل a، b و کل و کاروتنوئید

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که مقادیر کلروفیل a، b و کل در بین چهار رقم، متفاوت بود. کامکوات نسبت به سه رقم دیگر مقادیر بالاتری از کلروفیل a، b و کل را نشان داد (شکل ۴). با کاهش دما میزان کلروفیل a و کل به طور معناداری کاهش یافت. بیشترین مقدار کلروفیل a (۲/۰۱) میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ، کلروفیل کل (۲/۶۳) میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) و کاروتنوئید (۰/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) در پایین‌ترین سطح دمایی یعنی دمای -۶ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول ۲). نتایج آثار متقابل نیز نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل a و کل در بالاترین سطح دمایی (۳ درجه سانتی‌گراد) در کامکوات مشاهده شد و کمترین میزان این دو شاخص نیز

در پایین‌ترین سطح دمایی (-۶ درجه سانتی‌گراد) در انگشت بودا به دست آمد (جدول ۳). یکی دیگر از آثار منفی تنش دمای پایین کاهش میزان رنگدانه‌های کلروفیل و در نتیجه کاهش فتوسنتز است. کاهش میزان کلروفیل برگ این ارقام مرکبات در تنش دمایی پایین و یخبندان به احتمال زیاد در ارتباط با افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن، وقوع پدیده پراکسیداسیون و در نتیجه تخریب این رنگدانه‌ها در غشای کلروپلاست و تیلاکوئیدها است [۳۵]. کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی و در نتیجه کاهش رنگ سبز برگ در پرتقال والنسیا [۳۷] تحت تنش دمای پایین گزارش شد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. در سازگاری نهال بلوط سبز [۴۲] طی تنش دمایی پایین، افزایش کاروتنوئیدها گزارش شد که با نتایج این آزمایش مشابه است.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر نوع رقم و سطوح مختلف دما بر صفات کلروفیل a، کلروفیل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

صفات				رقم	دما (درجه سلسیوس)
سوپراکساید دیسموتاز (IU/mgrFW)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (%)	کلروفیل کل (mgr/grFW)	کلروفیل a (mgr/grFW)		
۱/۷h	۳۵/۵۳c	۲/۹۳a	۲/۲۷a	کامکوات	۳
۴/۶۶g	۴۱/۲۱c	۲/۴۲ab	۱/۹۱ab	انگشت بودا	
۲۰/۲۷d	۳۶/۱۴c	۲/۶۷ab	۱/۵۶abc	کالاموندین	
۱۳/۷۳e	۳۴/۵۸c	۲/۴۹ab	۱/۸۸ab	لایم کوآت	
۷/۲f	۴۴/۱۳bc	۲/۶۲ab	۲a	کامکوات	۰
۲۱/۸bcd	۴۱/۵۸c	۲/۳۵ab	۱/۸۱ab	انگشت بودا	
۲۶/۴a	۴۲/۶ c	۲/۴۲ab	۱/۸۲ab	کالاموندین	
۱۵/۳e	۳۷/۸۲c	۲/۵۷ab	۱/۹ab	لایم کوآت	
۲۶/۵۳a	۶۹/۲۴a	۲/۴۱ab	۰/۸۷bcd	کامکوات	-۳
۲۰/۱۳d	۵۱/۰۵abc	۰/۸۸cd	۰/۶۷cd	انگشت بودا	
۲۳/۰۷bc	۵۱/۱۸abc	۱/۴۸bcd	۱/۸ab	کالاموندین	
۲۰/۹۳cd	۴۷/۹۳bc	۲/۲۶ab	۱/۶۱abc	لایم کوآت	
۱/۵h	۶۰/۶۱ab	۲/۲۱ab	۱/۵۶abc	کامکوات	-۶
۴/۵۳g	۴۹/۰۶bc	۰/۸۴d	۰/۴۱d	انگشت بودا	
۲۴/۱۳ab	۴۸/۴۳bc	۰/۹۲cd	۱/۴۶abcd	کالاموندین	
۲۲/۱۳bcd	۴۴/۹۰bc	۲/۰۹abc	۰/۳۴d	لایم کوآت	

* میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، از لحاظ آماری معنادار نیستند.

۴.۳. پرولین

نتایج نشان داد کمترین تجمع پرولین (۱۲/۵۷ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ) در انگشت بودا و بیشترین مقدار آن (۲۰/۱۸ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ) در کامکوات مشاهده شد (جدول ۱). با توجه به مقایسه میانگین اثرهای ساده دما بر میزان تجمع پرولین، نشان داده شد که میزان این تجمع در دماهای مختلف متفاوت بود. به گونه‌ای که کمترین مقدار پرولین در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد و بیشترین مقدار آن در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. بررسی‌ها نشان داده است که در شرایط تنش، موادی با

در حقیقت برای خنثی کردن آثار سمی گونه‌های فعال اکسیژن، یک سیستم آنتی‌اکسیدان نیاز است و کاروتنوئیدها می‌توانند ترکیبی آنتی‌اکسیدانی در محافظت از رنگدانه‌های کلروفیل نقش داشته باشند. کاروتنوئیدها می‌توانند مستقیماً اکسیژن منفرد را خاموش و غیرفعال کنند و یا به وسیله اکسیژن منفرد اکسید شوند. همچنین، کاروتنوئیدها از طریق مکانیسمی که چرخه گزانتوفیل نامیده می‌شود باعث مصرف اکسیژن و حفاظت از کلروفیل در مقابل فتواکسیداسیون می‌شوند [۱۰].

مؤثر در تنظیم اسمزی، موجب حفظ آماس سلول و محافظت ساختار ماکرومولکول‌ها می‌شود. در بین ترکیبات مؤثر بر تنظیم اسمزی تغییر در میزان قندهای محلول از اهمیت خاصی برخوردار بوده، زیرا با فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه همانند فتوسنتز و تنفس ارتباط دارد [۱۶]. بنابراین، افزایش قندهای محلول برگ گیاهان تحت تنش دمای پایین می‌تواند، از طریق حفظ تعادل اسمزی و کاهش آثار منفی آبکشیدگی سلول، در ارتقای مقاومت گیاهان مؤثر باشد [۳۰].

۶.۳. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ با میانگین (۵۲/۳۲ درصد) در کامکوات و کمترین مقدار این صفت با میانگین (۴۱/۳۱ درصد) در لایم‌کوات مشاهده شد (جدول ۱). همچنین مقایسه میانگین اثر دما بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که حداکثر مقدار این صفت در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد درحالی‌که که دمای ۳ درجه سانتی‌گراد کمترین مقدار را داشت (جدول ۲). با کاهش دما تا ۳- درجه سانتی‌گراد میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در تمامی ارقام زینتی روند افزایشی داشت که رقم زینتی کامکوات در مقایسه با سایر ارقام بیشترین مقدار را داشت. پس از آن با تنزل دما، کاهش در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد که علت این امر می‌تواند تأثیر دمای پایین بر کاهش فعالیت‌های درون سلولی باشد (جدول ۳). همان‌طور که قبلاً اشاره شد، یکی از آثار مخرب تنش دمای پایین تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن است که افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با خنثی‌سازی رادیکال‌های مربوطه در محافظت گیاهان تحت تنش مؤثر باشد [۲۳]. همچنین، نتایج نشان داد که افزایش تخریب اکسیداتیو اغلب با یک سیستم کارا و مؤثر آنتی‌اکسیدانی در شرایط دمای پایین مرتبط است. بر این

وزن مولکولی کم که مواد محلول سازگار نامیده می‌شود تجمع می‌یابد. یکی از مهمترین ترکیبات سازگار، پرولین است که سنتز آن در شرایط دمای پایین به مقدار زیادی افزایش می‌یابد [۳۶]. تجمع پرولین، شاخص انتخاب برای تحمل تنش است. در شرایط تنش، غلظت اسیدآمینه پرولین نسبت به سایر اسیدهای آمینه افزایش می‌یابد. پرولین به صورت ماده محلولی که پتانسیل اسمزی را کاهش می‌دهد عمل می‌کند و تحمل‌پذیری گیاه را به شرایط تنش بالا می‌برد [۸]. پرولین در سلول‌های تحت تنش، نقش آنتی‌اکسیدانی دارد و با تجمع در سیتوپلاسم سلول‌ها از طریق کاهش پتانسیل اسمزی درون سلولی تجمع نمک در واکوئل را تنظیم می‌کند. در شرایط تنش، پرولین، جاروکننده گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) است و سبب افزایش سنتز سلولی در طول تنش در گیاهان شده و تأثیر مهمی در افزایش تحمل‌پذیری گیاه به شرایط تنش دارد [۱۵ و ۲۹].

۵.۳. قندهای محلول

نتایج مقایسه میانگین داده‌های چهار رقم مرکبات زینتی نشان داد که از لحاظ تأثیر رقم بر میزان قندهای محلول برگ، کامکوات با میانگین (۵۶/۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) در رتبه اول و کالاموندین، لایم‌کوات و انگشت بودا به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (جدول ۱). همچنین عامل دما در افزایش مقدار قندهای محلول برگ تأثیرگذار بود به طوری‌که بیشترین مقدار قندهای محلول (۶۸/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) بوده که در تیمار دمایی صفر درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول ۲). افزایش میزان قندهای محلول در شرایط دمای پایین، در نهال بلوط [۳۰] و پرتقال والنسیا [۴۳] گزارش شد. در توجیه این نتایج می‌توان استنباط کرد که تجمع ترکیبات

پراکسیداسیون لیپیدها اشاره شده‌است که در این زمینه می‌توان به پژوهش انجام شده روی گونه‌های دو جنس *Citrus* و *Fortunella* تحت تنش یخبندان [۳۹] و زیتون [۱۱] اشاره داشت که با نتایج حاصل نیز همخوانی دارد.

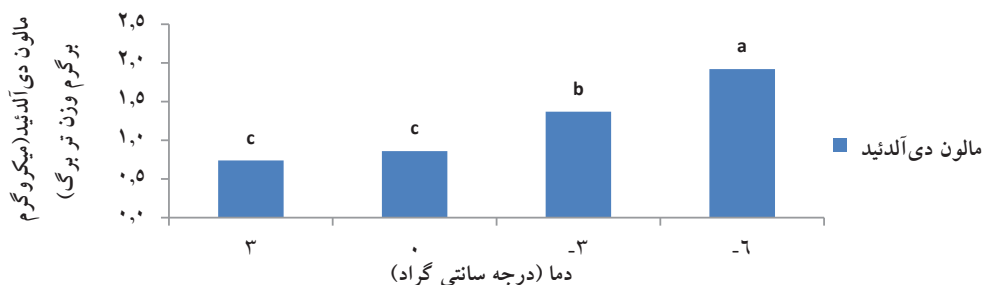
۸.۳. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

مقایسه میانگین اثر ساده دما بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم با میانگین (۲۴/۳۳) واحد آنزیمی در میلی‌گرم وزن تر برگ) در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۶). اثر نوع رقم بر سطوح مختلف دما نیز نشان داد که در تمامی ارقام با کاهش دما مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت و حداکثر مقدار فعالیت این آنزیم در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد در کامکوات مشاهده شد (جدول ۳). در شرایط دمای پایین گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید به عنوان پیام‌هایی عمل می‌کنند که موجب تسریع افزایش تولید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز می‌شود. این آنزیم ضمن خنثی‌سازی رادیکال سوپراکسید، می‌تواند در فعال‌سازی سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز تأثیرگذار باشد [۲۱]. نتایج پژوهش انجام شده بر روی نهال هلو تحت تنش دمای پایین، افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را گزارش کرد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد [۲۶]. نتایج تحقیقات انجام گرفته بر روی نهال مرکبات [۳۸] و انگور [۳۴] تحت تنش اکسیداتیو ناشی از شرایط نامساعد محیطی، افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را نشان داد که بیانگر نقش این آنزیم در سیستم حفاظتی گیاهان است.

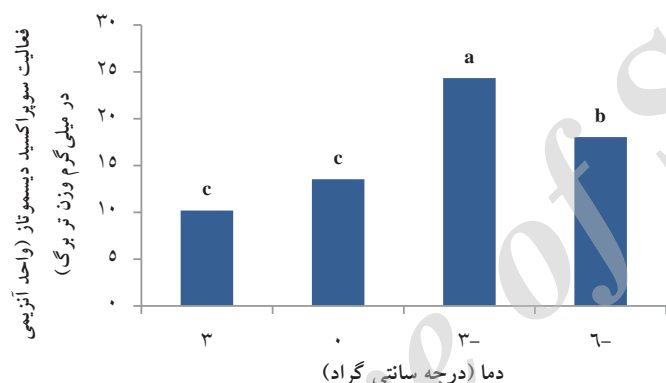
اساس می‌توان افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کامکوات تحت تنش یخبندان را با مکانیسم دفاعی متابولیتی آنتی‌اکسیدانی رقم مذکور مربوط دانست. نتایج پژوهش روی دو رقم انگور نشان داد که در شرایط تنش دمای پایین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به میزان چشمگیری افزایش یافت [۲۴]. در گزارشی دیگر که روی چند رقم مرکبات انجام گرفت نیز به اثر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ارتقای تحمل‌پذیری مرکبات به تنش یخبندان اشاره شده که مشابه نتایج این مطالعه است [۴۱].

۷. پراکسیداسیون لیپیدها (مالون دی‌آلدئید)

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کمترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید مربوط به رقم زیتنی انگشت بودا و بیشترین آن در کامکوات مشاهده شد (جدول ۱). همچنین حداقل مقدار مالون دی‌آلدئید در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد (۰/۷۴ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) مشاهده شد پس از آن با کاهش دما این میزان رو به افزایش گذاشت و در دمای ۶- درجه سانتی‌گراد (۱/۹۲ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) به اوج خود رسید (شکل ۵). از نتایج تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدهاست و میزان تجمع مالون دی‌آلدئید تعیین‌کننده آن است. این ماده در شرایط دمای پایین بر اثر تجزیه زنجیره لیپیدهای غیراشباع و به‌علت فعالیت آنزیم‌های لیپوکسیژناز تولید می‌شود. رقم‌های زیتنی مختلف در حفظ تعادل بین آنزیم‌های تبدیل‌کننده اسیدهای چرب اشباع به‌نوع غیراشباع آن و آنزیم‌های اکسیدکننده اسیدهای چرب غیراشباع، در دماهای پایین متفاوت عمل می‌کنند و همین امر، علت مهمی در کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و در نتیجه افزایش تحمل‌پذیری به دمای پایین در آن گیاه است [۲۷ و ۳]. در پژوهش‌های متعدد به ارتباط دمای پایین و افزایش



شکل ۵. اثر دما بر پراکسیداسیون لیپیدها (تجمع مالون دی آلدئید)



شکل ۶. اثر دما بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

۴. نتیجه گیری

دمای پایین، امکان تحمل پذیری بیشتر کامکوات را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو در دوره تنش نشان داد. بنابراین، می‌توان این‌گونه بیان کرد که تحمل‌پذیری چهارگونه زینتی مرکبات به تنش دمای پایین به ترتیب شامل کامکوات، کالامون‌دین، لایم‌کوات و انگشت بودا بوده که روند کاهشی داشت. به‌همین دلیل می‌توان توصیه کرد که رقم انگشت بودا، با حفظ جوانب احتیاط و مدیریت در برابر تنش یخبندان، به‌عنوان رقم زینتی استفاده شود. اما، درباره استفاده از کامکوات و همچنین دو رقم دیگر در فضاهای سبز شهری به خصوص شمال ایران، محدودیت خاصی وجود ندارد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که شروع اغلب واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در این چهار رقم، از تیمار دمایی ۳ و صفر درجه سانتی‌گراد بود. با کاهش دما، مقدار نش‌یونی و آب‌گزیدگی برگ در بین رقم‌های بررسی شده افزایش یافت، اگرچه میزان تغییر این صفات در رقم‌های مختلف متفاوت بود. بر این اساس، بیشترین مقادیر این دو صفت در انگشت بودا مشاهده شد. همچنین، با بیشترشدن تنش، از میزان رنگدانه‌های کلروفیل در برگ‌های انگشت بودا کاسته شد، در حالی‌که کامکوات بیشترین مقدار را داشت. از سوی دیگر افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در شرایط

8. Akhondi M., Safarnejad E. and Lahooti M. (2006) Effect of drought stress on proline and accumulation of ions. *Agricultural Science*. 10: 165-173.
9. Allen D.J. and Ort D.R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*. 6(1):36-41.
10. Arora A., Sairam R.K. and Srivastava G.C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. India. 82: 1227-1238.
11. Azzareolli E., Mugnai S. and Pandolfi C. (2009) Comparing image (fractal analysis) and electrochemical (impedance spectroscopy and electrolyte leakage) techniques for the assessment of the freezing tolerance in olive. *Trees*. 23:159-167.
12. Bates L.S., Waldren R.P. and Teares I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205-207.
13. Cakmak I. (2005) Role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 168: 521-530.
14. Compose P.S., Quartin V., Ramalho J.C. and Nunes M.A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea sp.* *Plant Physiology*. 160: 283-292.
15. El-Tayeb M.A. (2005) Response of barley grain to the interactive effect of salinity and glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 36(10): 767-772.
16. Fedine L.S. and Popova A.V. (1996) Photosynthesis, photorespiration and proline accumulation in water-stressed pea leaves. *Crop Science*. 32: 213-220.
- منابع**
۱. تاجوری. (۱۳۹۰) پاسخ دو رقم تجاری مرکبات (*Citrus sp.*) روی دو پایه تحت تنش دمایی پایین. رساله دکتری. دانشگاه گیلان. گیلان، ص ۱۰۴-۱۲۰.
۲. تاجوری، قاسمی م. و فیفایی ر. (۱۳۹۲) سرمزادگی در مرکبات و راه‌های کنترل آن. نشریه فنی ۴۳۵۶۱ مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی. انتشارات مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور. رامسر. ص ۳۰-۳۴.
۳. کریمی ن. و سوری ز. (۱۳۹۴) بررسی اثر متقابل آرسنیک و فسفر بر محتوی کلروفیل و میزان تجمع مالون دآلدئید در گیاه *Isatis cappadocica*. فرآیند و کارکرد گیاهی. ۱۱(۴): ۸۰-۸۳.
۴. گلوانی م. (۱۳۸۸) ارزیابی پروتئین‌های آنتی‌فریز در دو گونه مرکبات کشت‌شده در شمال ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. گروه بیوشیمیایی دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان.
۵. قربانلی م. ل.، نوجوان م.، حیدری ر. و فرودنیا (۱۳۸۰) تغییرات فندهای محلول، نشاسته و پروتئین‌ها در اثر تنش خشکی در دو رقم نخود ایرانی (*Cicer arietnum L.*). نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم. ۱(۱): ۳۸-۵۳.
۶. نجف‌زاده م. (۱۳۸۹) بررسی اثرات پلی‌آمین و کلسیم بر دانه‌های بذری مکزیکن لایم (*Citrus aurantifolia*) تحت تنش دمایی پایین. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان. صص ۴۲-۴۵.
۷. نظامی الف. و ناقدی‌نیا ن. (۱۳۸۹) اثر تنش یخ‌زدگی بر نشت الکترولیت‌ها در شش رقم گلرنگ. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. ۸ (۶): ۸۹۱-۸۹۶.

17. Fotouhi Ghazvini R., Baghbanha M.R. Hatamzadeh A. and Heidari M. (2008) Effect of water stress on freezing tolerance of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* L.) seedling. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 49 (5): 267-280.
18. Ghafar M.F.A., Prasad K.N., Weng K.K. and Ismail A. (2010) Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from (*Citrus* species). *African Journal of Biotechnology*. 9: 330.
19. Gusta L., Trischuk V. and Weiser, C.J. (2005) Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. *Journal of Plant Growth Regulation*. 24: 308-318.
20. Heidarvand L. and Maali Amiri R. (2010) What's happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 419-431.
21. Jithesh M.N., Prashanth S.R. Sivaprakash K.R. and Parida A.K. (2006) Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *Journal of Genetics*. 85: 237-254.
22. Kavi Kishor P.B., Sangam I S., Amrutha R.N., Sri Laxmi P., Naidu K.R., Rao S.S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P. and Sreenivasulu N. (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*. 88: 424-438.
23. Kiara D.V. and Roy D.N. (1999) Oxidative stress and antioxidative defense with an emphasis on plants antioxidants. *Environmental Reviews*. 7: 31-51.
24. Król A., Amarowicz R.S. and Weidner S. (2015) Effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology*. 10: 176-193.
25. Kushad M.M. and yelenosky G. (1987) Evaluation of Polyamine and proline levels during low temperature acclimation of citrus. *Plant Physiology*. 84: 692-695.
26. Leng P. and J.X. Qi (2003) Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress. *Scientia Horticulture*. 97: 27-39.
27. Los D.A., Mironov K.S. and Allakhverdiev S.I. (2013) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynthesis Research*. 116:489-509.
28. Mahajan S. and Tuteja N. (2005) Cold salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 444:139-158.
29. Miri H.R. (2009) *Plant Stress Physiology*. Kermanshah Islamic Azad University Press. 472p.
30. Molla S.P., Villar-Salvador P., Garcia F. and Rubira J.L. (2006) Physiological and transplanting performance of *Quercus ilex* L. (holm oak) seedlings grown in nurseries with different winter conditions. *Forest Ecology and Management*. 237: 218-226.
31. Molinari H.B.C., Marur C.J., Filho J.C.B., Kobayashi A.K., Pileggi M., Ju'nior R.P.L., Pereira L.F.P. and Vieira L.G.E. (2004) Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science*. 167: 1375-1381.
32. Nayyar H., Bains T.S. and Kumar S. (2005) Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage.

- Environmental and Experimental Botany. 54: 275–285.
33. Nicolosi E. (2007) Origin and Taxonomy. In Khan, I. A. (ed.) Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology. CABI. pp. 370.
34. Ozden M., Demirel U. and Kahraman A. (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. Sci. Horticulture. Amsterdam. 119: 168.
35. Pietrini F., Chaudhuri D., Thapliyal A.P. and Massacci A. (2005) Analysis of chlorophyll fluorescents in mandarin leaves during photo-oxidative cold shock and recovery. Agriculture, Ecosystems and Environment. 106:189-198.
36. Penna S. and An R. (2013) Molecular evolution of plant P5CS gene involved in proline biosynthesis. Molecular Biology Reports. 40:6429–35.
37. Ribeiro R.V., Machado E.C., Santos M.G. and Oliveira R.F. (2009) Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of young sweet orange trees. Environment and Experimental Botany. 66: 203–211.
38. Rivas F., Fornes F. and Agusti M. (2008) Girdling induces oxidative damage and triggers enzymatic and nonenzymatic antioxidative defences in Citrus leaves. Environmental and Experimental Botany. 64: 256–263.
39. Santini J., Giannettini J., Pailly P., Herbette S., Ollitrault P., Berti L. and Luro F.O. (2013) Comparison of photosynthesis and antioxidant performance of several Citrus and Fortunella species (Rutaceae) under natural chilling stress. Trees. 27:71–83.
40. Shen Wu Q., Zou Y.N. and Xia R.X. (2006) Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. European Journal of Soil Biology. 42:166–172.
41. Tajvar Y., Fotouhi G.R., Hamidoghli Y. and Sajedi R.H. (2011) Antioxidant Changes of Thomson Navel Orange (*Citrus sinensis*) on Three Rootstocks under Low Temperature Stress. Horticulture, Environment, and Biotechnology. 52(6):576-580.
42. Xavier M., Thierry A., Rein A., Cathy K., Vojtech L., Francois L., Franco M. and Isabelle C. (2007) Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. Tree Physiology. 27: 817-825.
43. Yelenosky G. and Guy C.L. (1989) Freezing tolerance of Citrus, Spinach, and Petunia leaf tissue osmotic adjustment and sensitivity to freeze induced cellular dehydration. Plant Physiology. 89:444-451.
44. Zhao-Shi X., Lan-Qin X., Ming C., Xian-Guo C.C., Rui-Yue Z., Lian-Cheng L., Yun-Xiang Z., Yan L., Yi-Yong N., Li L., Zhi-Gang Q. and You-Zhi M. (2007) Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (TaERF1) that increases multiple stress tolerance. Plant Molecular Biology. 65: 719-732.



Crops Improvement

(Journal of Agricultural Crops Production)

Vol. 19 ■ No. 4 ■ Winter 2017

Evaluation of physiological and biochemical responses of some ornamental *Citrus* varieties under low temperature stress

Seyedeh Marziyeh Hosseini Valashkolee¹, Yahya Tajvar², Masoud Azadbakht³, Zeinab Rafie-Rad^{4*}

1. M.Sc., Department of Landscape, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran
2. Assistant Professor, Horticultural Science Research Institute, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ramsar, Iran
3. Assistant Professor, Department of Landscape, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran
4. Ph.D. Student, Department of Soil Science, Agriculture Collage, Zanjan University, Zanjan, Iran

Received: January 27, 2017

Accepted: April 22, 2017

Abstract

Low temperature stress is one of the most important abiotic environmental stresses that affects the growth and yield of ornamental plants. In order to investigate of some physiological and biochemical indices of four varieties of ornamental *Citrus* used in urban landscapes under low temperature stress conditions, a factorial experiment in a completely randomized design with three replications was conducted in the *Citrus* and Subtropical Fruits Research Center of Ramsar in 2015. Treatments were included the temperature with four levels (3, 0, -3 and -6°C) and four varieties of ornamental *Citrus* including (Kumquat, Fingered citron, Calamondin and Limequat). Results showed that amounts of electrolyte leakage, water soaking, prolin content, antioxidant capacity, lipid peroxidation and superoxide dismutase activity were increased significantly by reducing of temperature, while chlorophyll and total chlorophyll contents were decreased. Accordingly, the lowest leaf water soaking (20.92%) and electrolyte leakage (30.81%) amount, which are destructive indices, were showed in Kamquate. Total chlorophyll amount (2.21 mg/gFW), antioxidant capacity (60.61%) and superoxide dismutase activity (26.53 IU/gFW), that are tolerability indices, were more relevant at Kamquate. In general, Kumquat could tolerate the freezing stress up to -3°C by increasing of some indices such as proline, soluble sugars, antioxidant capacity and superoxide dismutase activity.

Keywords: antioxidant capacity, chlorophyll, electrolyte leakage, landscape, prolin.