

## اثر تنش سرما بر برخی صفات فیزیولوژیکی و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی بزرک ( *Linum usitatissimum* L. ) در مرحله گیاهچه‌ای

معظمه سلیمی، شهاب مداح حسینی\*، آرمان آذری و علی‌اکبر محمدی میریک

گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۲)

### چکیده

به منظور بررسی تأثیر تنش سرما بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی سه ژنوتیپ برگزیده بزرک، آزمایشی به صورت فاکتوریل در چارچوب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در اتاقک رشد دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان اجرا شد. عامل اول سرما در سه سطح (۲۵، صفر و ۲/۵- درجه سلسیوس) و عامل دوم ژنوتیپ در سه سطح شامل سه ژنوتیپ به نام‌های MAR778b، CYP706 و IND1257 بود. این سه ژنوتیپ بر اساس نتایج یک پیش‌آزمایش به ترتیب متحمل، نیمه‌متحمل و حساس به سرما بودند. نتایج نشان داد با کاهش دما از ۲۵ به صفر درجه سلسیوس تغییر معنی‌داری در هیچ یک از صفات‌های مورد بررسی دیده نشد اما با کاهش دما از صفر به ۲/۵- درجه محتوای قندهای محلول، پرولین و مالون دی‌آلدهید برگ ژنوتیپ حساس به سرما (IND1257) بسیار بیشتر از دو ژنوتیپ دیگر افزایش و محتوای کلروفیل (a+b) بسیار کمتر افزایش یافت. همچنین محتوای کاروتنوئیدهای برگ ژنوتیپ مقاوم (MAR778b) در دمای ۲/۵- درجه بطور معنی‌داری کمتر از دمای شاهد (۲۵ درجه سلسیوس) بود اما در دو ژنوتیپ دیگر تفاوتی با شاهد نداشت. در نهایت اینکه فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز با کاهش دما از شاهد به صفر و ۲/۵- درجه بطور معنی‌داری کاهش یافت اما فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در ژنوتیپ مقاوم به سرما (MAR778b) در دمای ۲/۵- درجه بطور معنی‌داری بیش از دمای صفر و ۲۵ درجه سلسیوس بود. نتایج آزمون همبستگی رابطه معکوس و معنی‌دار فعالیت این آنزیم را با شاخص حساسیت به تنش نشان داد.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، تحمل، پرولین، قندهای محلول، مالون دی‌آلدهید

### مقدمه

سبب وجود ترکیبات فیتواستروژن خواص درمانی زیادی به مصرف آن نسبت داده شده است (Cloutier, 2016 b). در برخی از مناطق جهان، گونه‌های زمستانه بزرک رشد می‌کنند. این گونه‌ها نیاز به بهاره‌سازی ندارند اما توانایی تحمل برخی درجه حرارت‌های پایین در مراحل آغازین رشد و نمو را دارند. گیاهچه‌های بزرک سرما یز صفر (۴- تا ۶- درجه سلسیوس) و بوته‌های استقرار یافته سرما یز نسبتاً شدید (تا ۱۰-

بزرک با نام علمی (*Linum usitatissimum* L.) گیاهی است یکساله، دانه روغنی، از تیره کتان (Linaceae)، روز بلند و سرمادوست که تنوع ژنتیکی قابل توجهی از آن در اقلیم‌های گوناگون ایران وجود دارد (بیدخوانی و همکاران، ۱۳۹۳). بزرک در بین گیاهان روغنی دارای بالاترین میزان امگا ۳ بوده که ارزش دارویی و تغذیه‌ای بسیار بالایی دارد. همچنین به

\* نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: shahab.mhoseini@vru.ac.ir

بسیاری از گیاهانی که نسبت به دماهای بسیار پایین متحمل هستند تجمع قند نقش مثبتی در مقابله با تنش سرما ایفا می‌کند (Peltzer *et al.*, 2002). برای نمونه در گلرنگ (رجبی و پورداد، ۱۳۸۹) و گندم (احمدی و همکاران، ۱۳۸۴) محتوای کربوهیدرات‌های محلول برگ در اثر سرما کاهش یافت با این حال در برخی رگه‌های گلرنگ این افزایش ارتباطی با سطح تحمل به سرما نداشت (رجبی و پورداد، ۱۳۸۹). در سه اکوتیپ علف چمنی (*Poa annua*) هم افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول ارتباطی با سطح تحمل به دمای پایین نداشت (Dionne *et al.*, 2001). همین رابطه بین تجمع پرولین و تحمل به سرما نیز گزارش شده است. تجمع پرولین آزاد در دماهای پایین افزایش می‌یابد و می‌تواند به‌عنوان یک شاخص تحمل به تنش سرما در گیاهان در نظر گرفته شود. افزایش سطح پرولین در طی تنش می‌تواند به سبب تغییراتی باشد که در سطوح نسخه‌برداری و ترجمه در فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز و تجزیه پرولین اتفاق می‌افتد (Kandpal *et al.*, 1981). نتایج برخی پژوهش‌ها بیانگر افزایش محتوای پرولین در بافت‌های گندم بهاره (Apostolova *et al.*, 2008)، گلرنگ (رجبی و پورداد، ۱۳۸۹) و جو (Chu *et al.*, 1978) در شرایط تنش سرما است و در این مورد هم واکنش ژنوتیپ‌ها متفاوت بوده است.

علاوه بر سازوکارهای فوق، گیاهان برای تحمل سرما و کاهش آسیب‌های ناشی از آن از سیستم‌های آنزیمی مختلفی نیز استفاده می‌کنند تا آسیب پدیدآمده توسط گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) کاهش یابد (Bakalova *et al.*, 2004) (Khanna-Chopra and Selote, 2007). پلی‌فنل اکسیداز یکی از این آنزیم‌ها است که سبب تبدیل مونوفنل به دی‌فنل و یا تبدیل دی‌فنل به کینون می‌گردد. با این حال، بسته به گونه گیاهی و شدت تنش میزان فعالیت آن در گیاه تغییر می‌کند (جعفری و همکاران، ۱۳۸۵). کاهش دما (۰-۴) درجه سلسیوس) بر روی گیاه هندوانه، گوجه‌فرنگی و گیاهچه کلزا سبب کاهش فعالیت آنزیم PPO و تجمع ترکیبات فنلی در گیاه شد (Rivero *et al.*, 2001). همچنین بنا بر برخی گزارش‌ها،

درجه) را به‌خوبی تحمل می‌کنند. اما گیاه پس از گلدهی به سرما حساس می‌شود و یخبندان موجب کاهش عملکرد و کیفیت دانه می‌گردد (Cloutier, 2016 a). پژوهش‌های ناچیزی بر روی تحمل به سرمای بزرگ انجام شده است و بیشترین دانش ما در این زمینه به گیاهان دیگر محدود است.

روشن شده است که ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان در اثر دماهای پایین بطور مشخصی تغییر می‌کند و برخی از آنها همبستگی بالایی با مقاومت گیاهان به یخ‌زدگی و سرمازدگی دارند (Mahajan and Tuteja, 2005).

بطور کلی، پسابیدگی ناشی از سرما می‌تواند سبب آسیب به ساختمان کلروفیل در اثر افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند کلروفیل‌لاز و پراکسیداز باشد (Parry *et al.*, 2002). با این حال نتیجه پژوهشی در مورد گندم (مجدی و همکاران، ۱۳۸۶) نشان داد که با اعمال تنش سرمایی محتوای کلروفیل برگ هم در رقم متحمل و هم در رقم حساس به سرما افزایش یافت که احتمالاً به سبب کاهش محتوای آب برگ و نه میزان سنتز کلروفیل بوده است. تغییرات محتوای کاروتنوئیدهای برگ نیز در واکنش به تنش‌های دمایی می‌تواند چشمگیر و مهم باشد. کاروتنوئیدها از طریق فرونشانی سریع وضعیت برانگیخته کلروفیل حفاظت نوری را انجام می‌دهند و بطور کلی نقش حفاظتی در طی آسیب اکسیداتیو دارند (Taiz and Zeiger, 2002). گزارش شده است که در آغاز تنش‌های محیطی میزان سنتز کاروتنوئید در برگ به علت نقش آنها در حفاظت در مقابل رادیکال‌های آزاد افزایش یافته اما با گذشت زمان و در تطابق گیاه با تنش میزان آن کاهش پیدا می‌کند (Groppa and Benavides, 2008). با این حال محتوای کاروتنوئیدهای ذرت در دمای کمتر از ۱۰ درجه سلسیوس (Lidon *et al.*, 2001) و کلزا (کشاورز و همکاران، ۱۳۹۰) در شرایط سرما کاهش یافت اگر چه در کلزا میزان کاهش در رقم حساس به سرما بیش از رقم مقاوم بود (Bandyopadhyay *et al.*, 1999).

از سوی دیگر، به‌نظر می‌رسد همبستگی مثبتی بین تجمع قندهای ذخیره‌ای و میزان تحمل تنش‌های غیرزیستی در گیاهان وجود دارد (Suzuki, 1989) اعتقاد بر این است که در

از بین رفتند. اما در دمای ۲/۵- درجه سلسیوس تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد. براساس وزن زیست‌توده در شرایط نرمال (دمای ۲۵ درجه) (Yp) و تنش (دمای ۲/۵-) (Ys) و روابط ۱ و ۲ شاخص‌های حساسیت به تنش (Stress Susceptibility Index) (SSI) (Fischer and Morrer, 1978) و تحمل به تنش (Stress Tolerance Index) (STI) (Fernandez, 1993) ژنوتیپ‌های MAR778b، CYP706 و IND1257 به ترتیب با مبدأ مراکش، قبرس و هند به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل، نیمه‌متحمل و حساس به سرما برای آزمایش اصلی و ارزیابی صفات فیزیولوژیک گزینش شدند

رابطه ۱  $SSI = (1 - Y_{si}/Y_{pi})/SI$ ;  $SI = (1 - \bar{Y}_s/\bar{Y}_p)$   
 $\bar{Y}_p$  و  $\bar{Y}_s$ : به ترتیب میانگین زیست‌توده همه ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش (۲/۵- درجه سلسیوس) و نرمال (۲۵ درجه سلسیوس)

$Y_{pi}$  و  $Y_{si}$ : زیست‌توده ژنوتیپ  $i$  به ترتیب در شرایط تنش و نرمال

SI: شدت تنش

رابطه ۲  $STI = (Y_{pi} \times Y_{si}) / (\bar{Y}_p)^2$

**آزمایش اصلی:** این آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی و در چارچوب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. عامل‌ها عبارت بودند از دما در سه سطح شامل ۲۵، صفر و ۲/۵- درجه سلسیوس و ژنوتیپ در سه سطح شامل ژنوتیپ‌های MAR778b، CYP706 و IND1257 که برگزیده از پیش‌آزمایش بودند.

**روش اجرا:** بذور گندزدایی‌شده در گلدان‌هایی استوانه‌ای به قطر ۸ و ارتفاع ۱۲/۵ سانتی‌متر و در عمق ۲ سانتی‌متری پرشده با خاک مزرعه ( $EC = 1/4 \text{ dS/m}$ ) کشت شدند و در اتاقک رشد آگروترون (Agrotron, Rahavard Danesh) (Paidar, IRAN) با دمای ۲۵ درجه روز و ۱۸ درجه شب و نور دوره ۱۴ ساعت و شدت نور ۱۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها، تعداد بوته‌ها به ۷ عدد (سالم و همگن) در هر گلدان کاهش یافت. تیمار سرما ۲۲ روز پس از کاشت (شش برگی، ارتفاع گیاهچه ۶/۵ سانتی‌متر) اعمال شد.

افزایش فعالیت فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) و میزان فنل کل در ارتباط با مقاومت به سرما در گیاهان است (سلیمانی‌ا قدم و اصغری، ۱۳۹۱). این آنزیم اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویدها است و فعالیت آن در شرایط سرما افزایش می‌یابد (Janas et al., 2000) نتایج آزمایشی با هدف بررسی واکنش به سرمای درختان زیتون نشان داد که در تنش سرمایی ملایم و متوسط فعالیت آنزیم PAL نسبت به شاهد افزایش و در سرمای نسبتاً شدید (۷- درجه سلسیوس) حدود ۴۷ درصد کاهش یافت. فعالیت این آنزیم احتمالاً در فرایند بهبود پس از سرما مؤثر است و نه مقاومت در برابر آن (Ortega-Garcia and Peragon, 2009).

در کشت پاییزه توانایی تحمل به سرما نقش تعیین‌کننده‌ای در موفقیت محصول دارد با این حال ارزیابی ارقام متحمل به سرما در شرایط مزرعه به دلیل عدم امکان کنترل شدت سرما و همچنین طولانی‌بودن زمان آزمایش بسیار مشکل به نظر می‌رسد. اعمال تیمارهای سرمایی در شرایط کنترل‌شده اتاق رشد یک روش برای حل این مشکل است. این پژوهش با هدف ارزیابی تغییرات برخی شاخص‌های فیزیولوژیک ژنوتیپ‌های بزرگ در واکنش به دماهای پایین در مرحله گیاهچه‌ای و ارتباط آنها با تحمل به سرما انجام شد.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت یک پیش‌آزمایش و یک آزمایش اصلی در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۵ و در اتاق رشد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر رفسنجان انجام شد.

**پیش‌آزمایش:** پیش از آزمایش اصلی، یک پیش‌آزمایش با هدف ارزیابی اولیه واکنش ده ژنوتیپ بزرگ به سرما با اعمال دماهای ۲۵، صفر، ۲/۵- و ۵- درجه سلسیوس در مرحله گیاهچه‌ای انجام شد. ژنوتیپ‌ها از ژرم‌پلاسما جهانی بزرگ واقع در کشور آلمان و با مبدأ مراکش، هند، انگلستان، قبرس، ایتالیا، ترکیه، لیبی، آرژانتین، مراکش و پاکستان انتخاب شدند. هیچ یک از آنها قادر به تحمل دمای ۵- درجه نبودند و

به آن بنزن اضافه شد و آنگاه میزان جذب محلول روشناور در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۱۵ نانومتر خوانده شد. داده‌های جذب به واحد میکرومول بر گرم وزن تر برگ تبدیل شدند (Bates *et al.*, 1973).

**پراکسیداسیون لپیدهای غشایی (محتوای مالون دی‌آلدهید):** ابتدا به نمونه‌های منجمد برگ که با تری‌کلرو استیک عصاره‌گیری شده بودند تیوباربتوییک اسید افزوده شد. پس از نیم ساعت قرارگرفتن در حمام آب گرم (دمای  $100^{\circ}\text{C}$ ) روشناور در دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و ضریب خاموشی ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) خوانده شد و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر برگ مالون دی‌آلدهید گزارش شد (De Vos *et al.*, 2013).

**سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO):** فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز براساس روش (Nicoli *et al.*, 1991) اندازه‌گیری شد. در این روش از پیروگالل به‌عنوان پیش‌ماده آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر پتاسیم فسفات، پیروگالل و عصاره آنزیمی بود. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر و بعد از سه دقیقه خوانده شد. فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی پیروگالل برابر با  $6.72 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  و برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بیان شد.

**سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز (PAL):** مخلوط بافر استخراج فنیل آلانین، آب دو بار تقطیر و عصاره آنزیمی به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در بن‌ماری قرار گرفتند. واکنش با اضافه‌کردن کلریدریک اسید متوقف شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (D'Cunha *et al.*, 1996).

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. آزمون همبستگی نیز بین شاخص‌های تحمل و حساسیت به تنش محاسبه‌شده در پیش آزمایش و صفت‌های فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده در آزمایش اصلی انجام شد.

بدین ترتیب که ابتدا تمام گلدان‌ها آبیاری شدند. پس از ۲۴ ساعت برای اعمال تنش سرما به اتاق رشد دوم (با ویژگی‌های یکسان با اتاق رشد اول اما دمای متفاوت) منتقل شدند و سپس دمای اتاق رشد با سرعت ۲ درجه سلسیوس در ساعت کاهش یافت و به ۵ درجه رسید و به مدت ۲۴ ساعت در این دما ثابت ماند. این دوره زمانی برای شروع فرایند سخت‌شدن (Hardening) یا خوپذیری به سرما در نظر گرفته شد (Rife and Zeinali, 2003) و در آن نور دوره طبیعی اعمال شد. آنگاه در شرایط تاریکی دما با سرعت ۲ درجه سلسیوس در ساعت کاهش یافت و به صفر یا  $-2/5$  درجه سلسیوس رسید و این شرایط به مدت ۷ ساعت ادامه یافت. پس از این مدت، دما با سرعت ۲ درجه سلسیوس در ساعت افزایش یافت و به ۲۵ درجه سلسیوس رسید. پس از ۲۴ ساعت (Deryabin *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2013)، نمونه‌برداری از اندام‌های هوایی انجام شد. این دوره معمولاً به‌عنوان دوره بازیابی (recovery) پس از سرما در نظر گرفته می‌شود که در آن یا فرآیندهای سازگاری یا تحمل به سرما (در صورت وجود) تکمیل می‌گردد.

#### صفات مورد بررسی، محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدهای

**برگ:** از قطعات برگ با محلول استن عصاره‌گیری شد و محلول به‌دست آمده سانتریفیوژ گردید. پس از آن میزان جذب محلول روشناور در طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵، ۶۵۲ و ۶۶۳ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. سپس با توجه به فرمول‌های موجود به اعداد غلظت بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ تبدیل شد (Arnon, 1949).

**محتوای قندهای محلول:** با استفاده از اتانل گرم نمونه‌های برگ عصاره‌گیری شدند. سپس به محلول آنترن افزوده شده و میزان جذب آن در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. آنگاه با توجه به محلول‌های استاندارد اعداد به واحد میلی‌گرم در کیلوگرم (ppm) وزن تر تبدیل شد (Irigoyen *et al.*, 1992).

**محتوای پرولین برگ:** عصاره اتانل گرم از نمونه برگ در معرض معرف نین‌هیدرین و استیک اسید قرار گرفت. سپس

## نتایج و بحث

محتوای کلروفیل (a+b) و کاروتنوئیدهای برگ: محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدهای برگ تحت تأثیر دما و برهمکنش دما در ژنوتیپ قرار گرفتند (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌های کلروفیل (جدول ۳) نشان داد که با کاهش دما از ۲۵ به صفر درجه سلسیوس محتوای کلروفیل برگ در هیچ یک از سه ژنوتیپ تغییر معنی‌داری نداشت اما با کاهش بیشتر دما (از صفر به ۲/۵- درجه) در ژنوتیپ‌های MAR778b و CYP706 (متحمل و نیمه‌متحمل به سرما) بطور معنی‌داری افزایش یافت (به ترتیب ۳۰ و ۲۵ درصد). با این حال در ژنوتیپ حساس به سرما (IND1257) در این دما نیز محتوای کلروفیل تفاوتی با شاهد و دمای صفر درجه نداشت. آزمون همبستگی (جدول ۲) نیز نشان داد که تغییرات میزان کلروفیل برگ نه با شاخص حساسیت به تنش و نه با شاخص تحمل به تنش ارتباط مشخصی نداشته است.

بطور کلی تأثیر تنش بر میزان کلروفیل بسیار متنوع بوده و بستگی به شدت تنش و ویژگی‌های ژنوتیپی گیاهان دارد. در برخی موارد کاهش دما (یا آب خاک) به سرعت سبب توقف رشد و کاهش سطح برگ می‌شود ولی بر سنتز کلروفیل یا تجزیه آن اثر فوری ندارد. در این شرایط ممکن است غلظت کلروفیل به سبب تراکم کلروفیل در واحد سطح برگ در نتیجه کوچکتر شدن سلول‌ها و کاهش سطح برگ افزایش یابد (صفاری و همکاران، ۱۳۹۲) در پژوهشی در مورد اثر سرما بر دو رقم پاییزه (متحمل به سرما) و یک رقم بهاره (حساس به سرما) گندم مشاهده شد که در هر سه رقم، با گذشت زمان سرمادهی محتوای کلروفیل برگ افزایش یافت. این پدیده به تفاوت در کاهش محتوای نسبی آب نسبی سلول‌های برگ نسبت داده شد. بدین صورت که با افزایش مدت زمان سرمادهی و کاهش محتوای آب نسبی سلول‌های برگ، غلظت کلروفیل در سلول‌های برگ به تدریج افزایش می‌یابد. البته این افزایش در رقم مقاوم به سرما بیشتر بود (مجدی و همکاران، ۱۳۸۶).

از سوی دیگر، تغییرات محتوای کاروتنوئیدهای برگ (جدول ۳) در دو ژنوتیپ CYP706 و IND1257 (نیمه‌متحمل

و حساس) با کاهش دما از ۲۵ تا ۲/۵- درجه سلسیوس معنی‌دار نبود اما در ژنوتیپ MAR778b (متحمل) در دمای ۲/۵- درجه بطور معنی‌داری کمتر از شاهد بود. همچنین در دماهای صفر و ۲/۵- درجه سلسیوس محتوای کاروتنوئیدهای برگ IND1257 بطور معنی‌داری بیش از MAR778b بود. با بررسی نتایج آزمون همبستگی (جدول ۲) دیده می‌شود تغییرات محتوای کاروتنوئیدهای برگ رابطه معکوس و معنی‌داری با شاخص تحمل به تنش و رابطه مستقیم و معنی‌داری با شاخص حساسیت به تنش دارد. به بیان دیگر با کاهش دما از ۲۵ به ۲/۵- درجه سلسیوس تجمع کاروتنوئیدها در برگ در گیاهان حساس به سرما بیشتر از گیاهان متحمل به آن بوده است با این حال بیشتر بودن محتوای کاروتنوئیدها در ژنوتیپ IND1257 نسبت به دو ژنوتیپ دیگر نتوانسته است سبب القا تحمل به سرما در آن گردد.

به نظر می‌رسد به سبب نقش حفاظتی کاروتنوئیدها در طی آسیب اکسیداتیو (Taiz and Zeiger, 2002) احتمالاً میزان آنها در اثر تنش افزایش می‌یابد. با این حال نتیجه برخی پژوهش‌ها بر خلاف این را نشان داده است. برای نمونه محتوای کاروتنوئیدهای ذرت در دمای کمتر از ۱۰ درجه سلسیوس (Lidon et al., 2001) و کلزا (کشاورز و همکاران، ۱۳۹۰) در شرایط سرما کاهش یافته است. البته در کلزا کاهش در رقم‌های حساس به سرما بیش از رقم مقاوم بود. این کاهش می‌تواند به دلیل اکسید شدن آنها توسط اکسیژن فعال و تخریب ساختار آنها باشد (Bandyopadhyay et al., 1999). همچنین در جهش یافته‌ای از برنج که فاقد توانایی تولید کاروتنوئید بود تحمل به خشکی کاهش اما تحمل به سرما افزایش یافته بود. این امر همراه با تغییر در مسیر بیوسنتزی IAA و ABA بود (Du et al., 2013). در گونه وحشی و دو نمونه جهش‌یافته از *Sloa num commersni* با توانایی تحمل یخبندان میزان کاروتنوئیدهای برگ در دمای پایین تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت و تنها در یک جهش‌یافته افزایش پیدا کرده بود (Pino et al., 2008).

محتوای مالون دی‌آلدهید برگ (MDA): تجزیه داده‌ها

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس برخی صفات فیزیولوژیک و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بزرک در سه تیمار دمایی در مرحله گیاهچه‌ای

منبع تغییر	df	محتوای کلروفیل a+b	محتوای کاروتنوئید	محتوای دی‌آلدئید	محتوای پرولین برگ	محتوای قندهای محلول برگ	فعالیت پلی‌فنل اکسیداز	فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز
دما	۲	۱۸/۴۷ **	۸۱/۶۲ ns	۲۴/۰۵ **	۰/۸۳۳ **	۲۳/۲۶ **	۳/۳۷ **	۰/۰۱۹ **
ژنوتیپ	۲	۴۳/۶۰ **	۱۲۴۴/۱۱ **	۲۱/۲۰ **	۰/۱۶۸ **	۴/۲۵ **	۱/۳۷ **	۰/۰۵۷ **
دما × ژنوتیپ	۴	۳۷/۵۸ **	۲۸۱/۰۶ **	۲۷/۱۷ **	۰/۰۶۳ *	۴/۹۸ **	۱/۰۸ **	۰/۰۰۶۹ **
خطا	۱۸	۰/۰۸۲	۴۷/۲۰۱	۰/۸۵۲	۰/۰۱۵	۰/۱۴۷	۱/۲ × ۱۰ <sup>-۷</sup>	۰/۰۰۰۶۰
ضریب تغییرات	-	۳/۷۱	۷/۰۷	۱۲/۳۳	۷/۰۸	۱۳/۵۸	۱۴/۸۸	۱۴/۶۴

\*\*\*, \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد و ns غیرمعنی‌دار. اعداد درون جدول میانگین مربعات هستند.

جدول ۲- نتایج آزمون همبستگی بین برخی صفات فیزیولوژیک و دو شاخص تحمل (STI) و حساسیت به تنش (SSI) ژنوتیپ‌های بزرک

STI	کلروفیل	کاروتنوئیدها	مالون دی‌آلدئید	پرولین	قندهای محلول	پلی‌فنل اکسیداز	فنیل آلانین آمونیلایز
SSI	- ۰/۸۸ **	- ۰/۲۵ ns	۰/۷۸ *	۰/۳۶ ns	۰/۰۸ ns	۰/۱۴ ns	- ۰/۷۶ *
STI	-	۰/۵۱ ns	- ۰/۶۲ *	- ۰/۳۱ ns	۰/۲۷ ns	۰/۳۷ ns	۰/۵۵ ns
کلروفیل	-	-	- ۰/۴۰ ns	+ ۰/۱ ns	۰/۹۲ **	- ۰/۵۷ ns	- ۰/۱۲ ns
کاروتنوئیدها	-	-	+ ۰/۶۱ *	۰/۳۱ ns	۰/۲۸ ns	- ۰/۳۵ ns	- ۰/۷۷ *
مالون دی‌آلدئید	-	-	-	۰/۰۹ ns	+ ۰/۷۶ *	۰/۱۹ ns	- ۰/۰۷ ns
پرولین	-	-	-	-	- ۰/۱۴ ns	- ۰/۱۱ ns	- ۰/۵۰ ns
قندهای محلول	-	-	-	-	-	۰/۷۰ *	۰/۳۳ ns

در محاسبه شاخص‌های SSI و STI، شرایط نرمال دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تنش دمای ۲/۵- درجه سلسیوس در نظر گرفته شد.

نشان داد که اثر سرما و ژنوتیپ و اثر متقابل سرما در ژنوتیپ بر میزان MDA معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که در هر سه ژنوتیپ با کاهش دما از ۲۵ (شاهد) به صفر درجه تغییرات این صفت معنی‌دار نبود اما با کاهش دما از صفر به ۲/۵- درجه سلسیوس محتوای MDA بطور معنی‌داری افزایش یافت که بیشترین افزایش (۱۰۶ درصد) در ژنوتیپ IND1257 (حساس به سرما) دیده شد. نتایج آزمون همبستگی (جدول ۲) نشان داد که میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (محتوای MDA) نه با شاخص حساسیت به تنش و نه با شاخص تحمل به تنش همبستگی معنی‌داری نداشت. بدین ترتیب به نظر می‌رسد عامل‌های

دیگری هم در حساسیت یا تحمل به سرما مؤثر بوده‌اند. بطور کلی میزان کم پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (محتوای مالون دی‌آلدئید) در سلول‌های برگ یکی از سازه‌های مهم تحمل گیاه به تنش سرما به شمار می‌آید (Deryabin et al., 2005). سطح پایین MDA در ریشه و برگ ژنوتیپ‌های متحمل نشان‌دهنده آن است که این گیاهان حفاظت بهتری در برابر اکسیداسیون ناشی از دمای پایین داشته‌اند (حسبی و همکاران، ۱۳۸۷). نتایج پژوهشی با هدف بررسی مقاومت به سرمای نهال‌های یکساله یک رقم حساس (سویلانا) و یک رقم مقاوم (فرانتوئو) زیتون نشان داد که با کاهش دما از ۲۵ تا صفر درجه آسیب قابل توجهی به هیچ یک

جدول ۳- تغییرات محتوای کلروفیل (a + b)، کاروتنوئیدها (میلی گرم بر گرم وزن تر)، قندهای محلول (میلی گرم بر کیلوگرم وزن تر)، مالون دی آلدئید و محتوای پرولین برگ (میکرومول بر گرم وزن تر برگ) به همراه فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لیاز (واحد آنزیم بر میلی گرم پروتئین محلول برگ) سه ژنوتیپ بزرگ در سه تیمار دمایی

دما (°C)	ژنوتیپ	کلروفیل a+b	تغییر کاروتنوئید تغییر	مالون دی آلدئید	تغییر پرولین	تغییر قندهای محلول	فعالیت آنزیم	
							تغییر پلی فنل اکسیداز	تغییر فنیل آلانین تغییر آمونیا لیاز
	MAR778b	۵/۹۶ <sup>d</sup>	- ۹۴/۹۱ <sup>cde</sup>	۵/۴۸ <sup>efg</sup>	- ۱/۴۲ <sup>ef</sup>	- ۲/۲۳ <sup>cd</sup>	- ۰/۰۰۳۷ <sup>a</sup>	۰/۱۹۷ <sup>b</sup>
۲۵	CYP706	۶/۳۹ <sup>cd</sup>	- ۹۸/۸۷ <sup>bcd</sup>	۶/۱۶ <sup>ef</sup>	- ۱/۸۰ <sup>bc</sup>	- ۱/۴۵ <sup>ef</sup>	- ۰/۰۰۱۸ <sup>c</sup>	۰/۱۱۷ <sup>cd</sup>
	IND1257	۶/۸۳ <sup>bc</sup>	- ۱۰۴/۹۶ <sup>bcd</sup>	۵/۴۴ <sup>ef</sup>	- ۱/۲۲ <sup>f</sup>	- ۱/۲۷ <sup>f</sup>	- ۰/۰۰۳۸ <sup>a</sup>	۰/۲۳۳ <sup>b</sup>
	MAR778b	۵/۰۱ <sup>de</sup>	-۱۶ ۸۵/۲۶ <sup>ef</sup>	۵/۰۶ <sup>g</sup>	-۷ ۱/۶۴ <sup>cd</sup>	+۱۱ ۲/۴۸ <sup>cd</sup>	+۰/۰۰۲۱ <sup>bc</sup>	۰/۱۹۷ <sup>b</sup>
۰	CYP706	۶/۴۲ <sup>bc</sup>	+۰/۴ ۹۰/۰۴ <sup>de</sup>	۵/۲۵ <sup>fg</sup>	-۱۴ ۱/۶۷ <sup>cd</sup>	۲/۰ <sup>de</sup>	+۳۸ ۰/۰۰۱۷ <sup>c</sup>	۰/۰۴۸ <sup>e</sup>
	IND1257	۶/۳۰ <sup>bc</sup>	-۷ ۱۰۶/۰۲ <sup>abc</sup>	۵/۳۲ <sup>efg</sup>	-۲ ۱/۵۱ <sup>de</sup>	+۲۴ ۲/۰ <sup>de</sup>	+۶۰ ۰/۰۰۱۹ <sup>bc</sup>	۰/۱۳۵ <sup>c</sup>
	MAR778b	۷/۷۹ <sup>a</sup>	+۳۰ ۷۳/۴۸ <sup>f</sup>	۷/۷۱ <sup>bcd</sup>	+۲۵ ۱/۹۷ <sup>ab</sup>	+۹ ۴/۳۰ <sup>b</sup>	+۹۲ ۰/۰۰۲۴ <sup>b</sup>	۰/۳۳۰ <sup>a</sup>
-۲/۵	CYP706	۷/۹۶ <sup>a</sup>	+۲۵ ۱۰۸/۲۲ <sup>abc</sup>	۷/۹۷ <sup>b</sup>	+۲۵ ۲/۱۴ <sup>a</sup>	+۱۹ ۲/۷۶ <sup>c</sup>	+۹۰ ۰/۰۰۱۹ <sup>bc</sup>	۰/۰۸۹ <sup>d</sup>
	IND1257	۶/۸۸ <sup>bcd</sup>	+۰/۷ ۱۱۲/۵۲ <sup>ab</sup>	۱۱/۰ <sup>a</sup>	+۱۰۶ ۲/۰۷ <sup>a</sup>	+۷۰ ۶/۹۱ <sup>a</sup>	+۴۴۴ ۰/۰۰۲۲ <sup>bc</sup>	۰/۲۰۰ <sup>b</sup>

در هر ستون میانگین های دارای یک حرف مشترک از لحاظ آماری تفاوتی با یکدیگر ندارند (دانکن ۰/۰۵). †: درصد نسبت به شاهد (۲۵ درجه سلسیوس)

CYP706 با کاهش دما از ۲۵ به صفر درجه نیز محتوای پرولین بطور معنی داری افزایش یافت. بدین ترتیب به نظر می رسد با کاهش دما در هر سه ژنوتیپ محتوای پرولین در مجموع افزایش یافته اما شدت افزایش در اثر دمای -۲/۵ بیشتر بوده است. با این حال مقایسه سه ژنوتیپ در دماهای -۲/۵ و صفر درجه تفاوت معنی داری از لحاظ محتوای پرولین را نشان نداد. از این رو می توان نتیجه گرفت که افزایش محتوای پرولین در این آزمایش ارتباطی با سطح تحمل یا حساسیت به سرما نداشته است. نتایج آزمون همبستگی (جدول ۲) نیز نشان داد که محتوای پرولین با دو شاخص حساسیت به تنش و تحمل به تنش رابطه معنی داری نداشته است.

پرولین به عنوان اسید آمینه ای غیر پروتئینی و چند منظوره نقش های متنوعی مانند پایدار کننده پروتئین ها، غشاها و ساختارهای سلولی و محافظت از کارکرد سلول ها با مهار گونه های اکسیژن فعال در شرایط تنش دارد (Kaur and Asthir, 2015).

از دو ژنوتیپ وارد نشد اما رقم فرانتونیو حتی تا دمای -۱۵ قادر به حفظ ساختارهای فتوسنتزی خود بود و میزان MDA نیز در آن افزایش چندانی در مقایسه با شاهد (دمای ۲۵ درجه سلسیوس) نداشت (افشارمحمدیان و همکاران، ۱۳۹۱). به همین ترتیب، درواکنش به دمای پایین میزان مالون دی آلدئید یک رقم متحمل به سرما کلزا بهاره (زرغام)، بسیار کمتر از رقم آپشن ۵۰۰، (حساس به سرما) افزایش یافت (Karimzadeh and Sharifi, 2014).

**محتوای پرولین برگ:** تجزیه داده ها نشان داد که اثر سرما و ژنوتیپ و اثر متقابل سرما در ژنوتیپ بر محتوای پرولین برگ معنی دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین (جدول ۳) نشان داد در هر سه ژنوتیپ مورد مطالعه (MAR778b، IND1257 و CYP706) با کاهش دما از ۲۵ به -۲/۵ درجه سلسیوس، محتوای پرولین برگ بطور معنی داری افزایش یافت. بیشترین افزایش در محتوای پرولین در اثر دمای -۲/۵ درجه در ژنوتیپ IND1257 (۷۰ درصد) دیده شد. همچنین بجز در ژنوتیپ

به سرما) بطور معنی‌دار و قابل توجهی بیشتر از ژنوتیپ CYP706 (نیمه‌حساس) به سرما بود. نتایج آزمون همبستگی (جدول ۲) نیز حاکی از عدم‌همبستگی مشخص قندهای محلول با شاخص تحمل و حساسیت به تنش بوده است.

به نظر می‌رسد در طی بروز تنش سرما گیاه با از دست‌دادن تدریجی آب و همچنین از طریق افزایش مقدار قند سلول، غلظت شیره سلولی را افزایش داده از تشکیل یخ و از القاشده توسط آن جلوگیری می‌کند (افشاری و همکاران، ۱۳۹۳). نتایج آزمایشی با هدف بررسی مقاومت به سرمای ارقام و لاین‌های گلرنگ نشان داد که تنش سرما (دماهای کمتر از ۱۵ درجه سلسیوس)، غلظت قندهای محلول برگ را بطور معنی‌داری افزایش داد اگر چه بین ارقام تفاوت زیادی مشاهده شد. همچنین در یک رقم از سه رقمی که بیشترین افزایش در محتوای قندهای محلول را نشان دادند این صفت ارتباطی با سطح تحمل نداشت. در این آزمایش همبستگی منفی بین میزان آسیب به غشا سلولی و محتوای قندهای محلول مشاهده شد. (رجبی و پورداد، ۱۳۸۹). در پژوهشی دیگر که با هدف شناسایی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی مرتبط با مقاومت به سرما در گیاهچه‌های سه رقم گندم انجام شد، نتایج نشان داد که پس از سرمادهی (۲ درجه سلسیوس) و پس از یخ‌زدگی (۱۰- درجه سلسیوس) غلظت قندهای محلول گیاهان نسبت به قبل از سرمادهی افزایش یافت. بیشترین افزایش مربوط به رقم مقاوم به سرما بود (احمدی و همکاران، ۱۳۸۴). در مقابل نتیجه پژوهشی دیگر نشان داد که برخلاف کلزای پاییزه، میزان ساکارز اندام‌های هوایی کلزای بهار سخت‌شده به سرما در واکنش به دمای پایین افزایش نیافت (Patton et al., 2007). به همین ترتیب در سه اکوتیپ علف چمنی یکساله (*Poa annua*) در اثر کاهش دما میزان قندهای محلول (ساکارز و فروکتان) افزایش یافت اما این افزایش ارتباطی با حد تحمل آنها به سرما نداشت (Dionne et al., 2001).

**فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO):** تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تحت تأثیر دما، ژنوتیپ و برهمکنش دما در ژنوتیپ قرار گرفت (جدول

افزایش غلظت پرولین تحت تنش ممکن است نشان‌دهنده نقش این اسیدآمینو در تنظیم پتانسیل اسمزی باشد. سرعت سنتز این ماده در شرایط تنش سرما که همراه با کاهش محتوای آب گیاه و القا خشکی فیزیولوژیک در هنگام تشکیل بلورهای یخ است، افزایش می‌یابد (Seppanen, 2000). در گیاهان حساس به سرما افزایش محتوای پرولین سلول آنقدر نیست که موجب افزایش مقاومت شود مگر اینکه مقادیر بالای پرولین قبل از تنش بوجود آمده باشد یا به بیان دیگر گیاه تطابق (خوپذیری) لازم را به دست آورده باشد (توپچی‌زاده تبریزیان و همکاران، ۱۳۹۴). در همین رابطه گزارش شده است در نوع وحشی آرابیدوپسیس در طی ۲ روز خوپذیری (Acclimation) به سرما در دمای ۴ درجه، میزان پرولین ۱۰ برابر افزایش یافت. با این حال، در نبود خوپذیری در یک جهش‌یافته از این گیاه میزان پرولین نسبت به نوع وحشی ۳۰ برابر بیشتر افزایش یافت که نشان می‌دهد کنترل ژنتیکی قابل توجهی در ساخته‌شدن پرولین اعمال می‌شود (Xin and Browse, 2000). نتایج برخی پژوهش‌ها بیانگر افزایش محتوای پرولین در بافت‌های گندم بهار (Apostolova et al., 2008)، گلرنگ (رجبی و پورداد، ۱۳۸۹) و جو (Chu et al., 1978) در شرایط تنش سرما است و در این مورد تنوع ژنوتیپی قابل توجهی نیز مشاهده شده است.

**محتوای قندهای محلول برگ:** نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای قند محلول برگ بیانگر آن است که این صفت بطور معنی‌داری تحت تأثیر سرما، ژنوتیپ و برهمکنش سرما در ژنوتیپ قرار گرفت (جدول ۱). براساس نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳) در هر سه ژنوتیپ مورد مطالعه (CYP706 و IND1257، MAR778b) با کاهش دما از ۲۵ به صفر و ۲/۵- درجه سلسیوس، محتوای قندهای محلول برگ افزایش یافت. بیشترین افزایش مربوط به ژنوتیپ IND1257 (۴۴۴ درصد) بود. غلظت قندهای محلول برگ سه ژنوتیپ در دمای صفر درجه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند اما در دمای ۲/۵- درجه سلسیوس محتوای قندهای محلول دو ژنوتیپ MAR778b (متحمل به سرما) و IND1257 (حساس

آنتی‌اکسیدانی دیگر مانند سوپراکسید دیسموتاز (Bartoli *et al.*, 1999) و کاتالاز (Apostolova *et al.*, 2008) در اثر کاهش دما یا اعمال تنش سرما گزارش شده است. کاهش فعالیت آنزیم در دماهای پایین ممکن است به سبب آسیب سرما به فعالیت (یا ساختار آن) باشد. با این حال، بسته به گونه گیاهی و شدت تنش میزان فعالیت آن در گیاه تغییر می‌کند (جعفری و همکاران، ۱۳۸۵).

**فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL):** تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز تحت تأثیر سطوح مختلف سرما، ژنوتیپ و برهمکنش سرما در ژنوتیپ قرار گرفت (جدول ۱). مقایسه میانگین (جدول ۳) نشان داد که در هر سه ژنوتیپ با کاهش دما از صفر به  $-2/5$  درجه سلسیوس فعالیت این آنزیم بطور معنی‌داری افزایش یافت اما بجز در ژنوتیپ MAR778b، نسبت به شاهد (۲۵ درجه) تفاوت معنی‌داری نداشت. در همین ژنوتیپ MAR778b (متحمل به سرما) افزایش معنی‌دار و قابل توجه فعالیت PAL نسبت به شاهد (۶۷ درصد) نشان از واکنش پذیری خوب آن به کاهش دما و اهمیت احتمالی آن در تحمل به سرما در این ژنوتیپ دارد. نتیجه آزمون همبستگی (جدول ۲) نشان داد که فعالیت PAL همبستگی منفی معنی‌دار و قابل توجهی با شاخص تحمل به تنش دارد ( $r = -0.76$ ) دارد به بیان دیگر فعالیت زیاد آن با حساسیت به تنش رابطه معکوس دارد با این حال همبستگی غیرمعنی‌دار (اما مثبت) آن با شاخص تحمل به تنش نشان می‌دهد که بالابودن فعالیت آن الزاماً نشان‌دهنده تحمل به سرما نیست و ممکن است سازوکارهای دیگری هم در تحمل دخالت داشته باشند.

بنا بر برخی گزارش‌ها، افزایش فعالیت PAL و میزان فنل کل در ارتباط با مقاومت به سرما در گیاهان است (سلیمانی اقدم و اصغری، ۱۳۹۱، Chen *et al.*, 2008). این آنزیم اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها است و فعالیت آن در شرایط سرما افزایش می‌یابد (Janas *et al.*, 2000). نتایج آزمایشی با هدف بررسی واکنش به سرمای درختان زیتون نشان داد که در تنش سرمای ملایم و متوسط فعالیت آنزیم

۱). نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳) نشان داد که با کاهش دما از ۲۵ به صفر فعالیت این آنزیم در دو ژنوتیپ MAR778b (متحمل به سرما) و IND1257 (حساس به سرما) به ترتیب ۴۳ و ۵۰ درصد کاهش یافت اما در ژنوتیپ CYP706 (نیمه‌متحمل) تغییر معنی‌داری نیافت. با کاهش دما از صفر به  $-2/5$  درجه سلسیوس کاهش بیشتری در فعالیت PPO مشاهده نشد. بدین ترتیب به نظر نمی‌رسد فعالیت این آنزیم ارتباط نزدیکی با سطح تحمل به سرمای ژنوتیپ‌های این آزمایش داشته باشد. نتایج آزمون همبستگی (جدول ۲) نیز نشان داد که فعالیت آنزیم PPO همبستگی معنی‌داری نه با شاخص تحمل و نه شاخص حساسیت به تنش ندارد.

پلی‌فنل اکسیداز نقش بسیار مهمی در غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های گیاهان دارد. این آنزیم موجب تبدیل مونوفنل به دی‌فنل و یا تبدیل دی‌فنل به کینون می‌گردد. از این رو، احتمالاً کاهش فعالیت آن سبب کاهش محتوای فنل‌های اسیدی می‌شود. بررسی اثر کاهش دما (۴ تا صفر درجه سلسیوس) بر روی هندوانه، گوجه‌فرنگی و گیاهچه کلزا نشان داد که فعالیت آنزیم PPO در سرما کاهش می‌یابد که ممکن است سبب تجمع ترکیبات فنلی در گیاه شود (Rivero *et al.*, 2001). فعالیت پلی‌فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لیاز و همچنین آسیب سرما در دو رقم موز با کاهش دما افزایش یافت اما تفاوت قابل توجهی بین ارقام وجود داشت و تفاوت در حساسیت به سرما به تنهایی به فعالیت این دو آنزیم ارتباطی نداشت (Nguyen *et al.*, 2003). از سوی دیگر، با کاهش دما فعالیت پلی‌فنل اکسیداز و تراکم لکه‌های قهوه‌ای (ترکیبات فنلی) درون میوه در چند رقم حساس به سرما آناناس افزایش یافت اما در رقم غیرحساس به سرما و در دمای شاهد فعالیت آن بسیار اندک بود (Raimbault *et al.*, 2011). همچنین، فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در جهش یافته‌هایی از گوجه‌فرنگی که آسیب نوراکسایشی کمتری در شرایط تنش خشکی دیده بودند کاهش یافته بود (Thipyapong *et al.*, 2004).

گزارش‌هایی مبنی بر کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های

درجه اثر قابل توجهی بر هیچ یک از شاخص‌های فیزیولوژیک ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این آزمایش نداشت اما دمای ۲/۵- درجه سبب افزایش قابل توجه در محتوای قندهای محلول، مالون دی‌آلدهید و محتوای پرولین برگ در ژنوتیپ حساس به سرما شد. فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در هر سه ژنوتیپ با کاهش دما کاهش یافت اما فعالیت آنزیم فنیل‌الانین آمونیلایز در ژنوتیپ متحمل به سرما بطور معنی‌داری افزایش و در ژنوتیپ حساس به سرما کاهش یافت. ممکن است فعالیت این آنزیم با تحمل به سرما در این ژنوتیپ در ارتباط باشد با این حال دیگر صفات فیزیولوژیک مورد بررسی در این آزمایش ارتباط نزدیکی به تحمل به سرما نداشتند.

PAL نسبت به شاهد افزایش و در سرمای نسبتاً شدید (۷- درجه سلسیوس) حدود ۴۷ درصد کاهش یافت. فعالیت این آنزیم احتمالاً در فرایند بهبود پس از سرما مؤثر است و نه مقاومت در برابر آن (Ortega-Garcia and Peragon, 2009). با این حال، گزارش‌هایی متضادی نیز وجود دارد. برای نمونه در آراییدوپسیس اگر چه افزایش قابل توجه در رونوشت‌های آنزیم PAL در اثر اعمال دماهای پایین مشاهده شد اما این افزایش ارتباطی با تحمل به سرما نداشت (Leyva et al., 1995).

### نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که اعمال تنش سرما با دمای صفر

### منابع

- احمدی، ع.، یزدی‌صمدی، ب. و زرگرنجاج، ج. (۱۳۸۴) واکنش فیزیولوژیکی گیاهچه‌های گندم به دمای پایین. نشریه دانش کشاورزی ۲: ۲۷-۴۳.
- افشارمحمدیان، م.، رضایی، ش. و رضانی ملک‌رودی، م. (۱۳۹۱) بررسی مقاومت دو رقم زیتون به تنش سرما. مجله فرایند و کارکرد گیاهی ۱: ۱۱-۲.
- افشاری، ح.، زاهدی، ر.، پروانه، ط. و باقری، م. ز. (۱۳۹۳) تأثیر سالیسیلیک اسید بر سطوح پرولین، قندهای محلول و نشت یونی دو رقم زردآلو تحت تنش سرما. مجله به‌زراعی کشاورزی ۱۶: ۱۳۸-۱۲۷.
- بیدخوانی، ف.، محمدی‌میریک، ع. ا. و دشتی، ح. (۱۳۹۳) ارزیابی دو زیر گونه بزرک (*Linum usitatissimum* L.) در مناطق مختلف جغرافیایی از نظر میزان و تنوع ژنتیکی برای عملکرد دانه و اجزای آن. مجله علوم گیاهان زراعی ایران ۴۵: ۶۱۱-۶۰۳.
- توپچی‌زاده تبریزیان، س.، حاجی‌لو، ج. و دهقان، غ. (۱۳۹۴) ارزیابی تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در طی رکود جوانه گل در چند رقم زردآلو (*Prunus armeniaca*) براساس تجمع نیاز سرمای. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۱: ۶۴-۵۴.
- جعفری، ر.، منوچهری کلانتری، خ. و احمدی موسوی، ع. ا. (۱۳۸۵) اثر پاکلوبوترازول بر تجمع آنتی‌اکسیدان‌ها در نهال‌های گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* L.) تحت تنش سرما. مجله زیست‌شناسی ایران ۳: ۲۱۷-۲۰۶.
- حسیبی، پ.، مرادی، ف. و نبی‌پور، م. (۱۳۸۷) اثر دمای پایین بر سازوکار آنتی‌اکسیدان‌های ژنوتیپ‌های حساس و متحمل برنج (*Oryza sativa* L.) در مرحله گیاهچه‌ای. مجله علوم زراعی ایران ۳: ۲۸۰-۲۶۲.
- رجبی، ر. و پورداد، س. (۱۳۸۹) بررسی مقاومت به سرما در ارقام و لاین‌های گلرنگ با استفاده از شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی. تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی) ۲: ۱۴-۱.
- سلیمانی‌ا قدم، م. و اصغری، م. ر. (۱۳۹۱) کاهش سرمادگی پس از برداشت میوه گوجه‌فرنگی با تیمار براسینواستروئید. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۳: ۴۳۹-۴۲۷.
- صفاری، ر.، مقصودی‌مود، ع. ا. و صفاری، و. ر. (۱۳۹۲) اثر تنش شوری بر فلونورسانس کلروفیل و عملکرد دانه برخی ارقام آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.). مجله به‌زراعی نهال و بذر ۱: ۱۳۰-۱۰۹.

کشاورز، ح.، مدرس‌ثانوی، ع. م.، زرین‌کمر، ف.، دولت‌آبادیان، آ.، پناهی، م. و اسیلان، ک. (۱۳۹۰) بررسی اثر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی دو رقم کلزا (*Brassica napus* L.) تحت شرایط تنش سرما. مجله علوم گیاهان زراعی ایران ۴۲: ۷۳۴-۷۲۳.

مجدلی، م.، کریم‌زاده، ق. و محفوظی، س. (۱۳۸۶) اثر دمای پایین و کلسیم خارجی بر روی راندمان کوانتومی فتوسیستم (Fv/Fm) II و میزان کلروفیل در ارقام گندم حساس و متحمل به سرما. پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی ۷۷: ۱۸۱-۱۷۵.

Apostolova, P., Yordanova, R. and Popova, L. (2008) Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars. *General and Applied Plant Physiology* 3-4: 281-294.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 1: 1-15.

Bandyopadhyay, U., Das, D. and Banerjee, R. K. (1999) Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science* 658-666.

Bakalova, S., Nikolova, A. and Nedeva, D. (2004) Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 1-2: 64-77.

Bartoli, C. G., Simonthacchi, M., Tambussi, E. A., Beltrano, J., Montaldi, E. R. and Puntarulo, S. (1999) Drought and watering dependent oxidative stress: Effect of antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* 50: 375-383.

Bates, L., Waldren, R. and Teare, I. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 1: 205-207.

Cloutier, S. (2016 a) Linseed, Reference Module in Food science. Elsevier.

Cloutier, S. (2016 b) Linseed, Encyclopedia of Food Grains 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press, Oxford.

Chen, J. Y., He, L. H., Jiang, Y. M., Wang, Y., Joyce, D. C., Ji, Z. and Lu, W. J. (2008) Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. *Physiologia Plantarum* 132: 318-328.

Chu, T., Jusaitis, M., Aspinall, D. and Paleg, L. (1978) Accumulation of free proline at low temperatures. *Physiologia Plantarum* 3: 254-260.

D'Cunha, G. B., Satyanarayan, V. and Nair, P. M. (1996) Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry* 1: 17-20.

De Vos, A. C., Broekman, R., de Almeida Guerra, C. C., van Rijsselberghe, M. and Rozema, J. (2013) Developing and testing new halophyte crops: A case study of salt tolerance of two species of the Brassicaceae, *Diplotaxis tenuifolia* and *Cochlearia officinalis*. *Environmental and Experimental Botany* 92: 154-164.

Deryabin, A., Dubinina, I., Burakhanova, E., Astakhova, N., Sabel'nikova, E. and Trunova, T. (2005) Influence of yeast-derived invertase gene expression in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature. *Journal of Thermal Biology* 1: 73-77.

Dionne, J., Castonguay, Y., Nadeau, P. and Desjardins, Y. (2001) Freezing tolerance and carbohydrate changes during cold acclimation of green-type annual Bluegrass (*Poa annua* L.) ecotypes contribution no. 677 of the Sainte-Foy Research Centre. *Crop Science* 41: 443-451.

Du, H., Wu, N., Chang, Y., Li, X., Xiao, J. and Xiong, L. (2013) Carotenoid deficiency impairs ABA and IAA biosynthesis and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 83: 475-488.

Fernandez, G. C. J. (1993) Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. Adaptation of food crops to temperature and water stress. In: Proceedings of International Symposium on Adaptation of Vegetables and Other Food Crops in Temperature and Water Stress (ed. Kuo, C. G.) Pp. 257-270. AVRDC Publication, Taiwan.

Fischer, R. A. and Maurer, R. (1978) Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research* 29: 897-912.

Groppa, M. and Benavides, M. (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 1: 35-45.

Irigoyen, J., Einerich, D. and Sanchez-Diaz, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 1: 55-60.

Janas, K. M., Cvikrova, M., Palagiewicz, A. and Eder, J. (2000) Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 587-593

Kandpal, R. P., Vaidyanathan, C., Kumar, M. U., Sastry, K. S. K. and Rao, N. A. (1981) Alterations in the activities of the enzymes of proline metabolism in ragi (*Eleusine coracana*) leaves during water stress. *Journal of Biosciences* 3: 361-370.

Karimzadeh, G. and Sharifi, M. (2014) Cold-induced changes of proline, malondialdehyde and chlorophyll in spring canola cultivars. *Journal of Plant Physiology and Breeding* 1: 1-11.

Kaur, G. and Asthir, B. (2015) Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum* 59: 609-619.

- Khanna-Chopra, R. and Selote, D. S. (2007) Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than-susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany* 2: 276-283.
- Lidon, F., Loureiro, A., Vieira, D., Bilho, E., Nobre, P. and Costa, R. (2001) Photoinhibition in chilling stressed wheat and maize. *Photosynthetica* 39: 161-166.
- Leyva, A., Jarillo, J. A., Salinas, J. and Martinez-Zapater, J. M. (1995) Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology* 108: 39-46.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2: 139-158.
- Nicoli, M. C., Elizalde, B. E., Pitotti, A. and Lerici, C. R. (1991) Effect of sugars and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *Journal of Food Biochemistry* 3: 169-184.
- Nguyen, T. B. T., Ketsa, S. and van Doorn, W. G. (2003) Relationship between browning and the activities of polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology* 30: 187-193.
- Ortega-Garcia, F. and Peragon, J. (2009) The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 9: 1565-1573.
- Parry, M. A., Andralojc, P. J., Khan, S., Lea, P. J. and Keys, A. J. (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany* 89: 833-839.
- Peltzer, D., Dreyer, E. and Polle, A. (2002) Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 141-150.
- Patton, A. J., Cunningham, S. M., Volenec, J. J. and Reicher, Z. J. (2007) Differences in freeze tolerance of Zoysiagrasses: II. Carbohydrate and proline accumulation. *Crop Science* 47: 2170-2181.
- Pino, M. T., Skinner, J. S., Jeknic, Z., Hayes, P. M., Soeldner, A. H., Thomashow, M. F. and Chen, T. H. H (2008) Ectopic AtCBF1 over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato. *Plant, Cell and Environment* 31: 393-406.
- Raimbault, A. K., Marie-Alphonsine, P. A., Horry, J. P., Francois-Haugrin, M., Romuald, K. and Soler, A. (2011) Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after a chilling injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 342-348.
- Rife, C. L. and Zeinali, H. (2003) Cold tolerance in oilseed rape over varying acclimation durations contribution. *Crop Science* 43: 96-100.
- Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Garcia, P. C., Lopez-Lefebvre, L. R., Sanchez, E. and Romero, L. (2001) Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* 160: 315-321.
- Seppanen, M. (2000) Characterization of freezing tolerance in *Solanum commersonii* (Dun.) with special reference to the relationship between freezing and oxidative stress. PhD Thesis, University of Helsinki, Turku, Finland.
- Suzuki, M. (1989) Fructans in forage grasses with varying degrees of coldhardiness. *Journal of Plant Physiology* 134: 224-231.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2002) *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Sunderland, Inc.
- Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D. W. and Steffens, J. C. (2004) Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Science* 167: 693-703.
- Xin, Z. and Browse, J. (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell and Environment* 9: 893-902.

## Effect of cold stress on some physiological characteristics and antioxidant systems in (*Linum usitatissimum* L.) genotypes at seedling stage

Moazame Salimi, Shahab Madahhosseini\*, Arman Azari and Ali Akbar Mohammadi Mirik

Genetic and Plant Production Department, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

(Received: 26/4/2018, Accepted: 12/1/2019)

### Abstract

In order to study the effects of cold stress on some physiological characteristics of three pre-selected of linseeds, a factorial experiment based on completely randomized design with two factors and three replications was carried out in growth chamber of Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, IRAN. The first factor was cold treatment at three levels (25, 0 and -2.5 °C) and the second factor was genotype including three accessions named MAR778b, CYP706 and IND1257 selected based on preliminary test as tolerant, semi tolerant and sensitive to cold, respectively. The results showed that temperature decrease from 25 to 0°C did not induce any significant change in any traits. On the contrary, -2.5 °C treatment significantly increased content of total soluble sugars, proline and malondialdehyde IND1257 (susceptible) much more, and chlorophyll content, much less than two other genotypes. Also, total leaf carotenoids content of tolerant genotype (MAR778b) at -2.5 °C was significantly lower compared to the control (25 °C), though those of two other genotypes were not different. Finally, poly phenol oxidase activity decreased by 0 and -2.5 °C in all three genotypes but phenyl alanine amonalyase increased at -2.5 °C compared to 0 and 25 °C only in tolerant cultivar (MAR778b). Correlation analysis revealed a significant reverse association of PAL activity with stress susceptibility index.

**Keywords:** Antioxidant, Malondialdehyde, Proline, Soluble sugars, Tolerance