

بررسی پاسخ های فیزیوشیمیایی شش رقم انار خراسان رضوی در تنش یخ زدگی^۱

PHYSIOCHEMICAL RESPONSES OF SIX POMEGRANATE CULTIVARS FROM RAZAVI KHORASAN UNDER FREEZING STRESS

یحیی سلاح ورزی، غلامحسین داوری نژاد، علی تهرانی فر، حسین نعمتی و احمد نظامی^۲

چکیده

تنش یخ زدگی همواره یکی از مهمترین مشکلات پیش روی انارکاران ایران بوده است. چنان که سرمای زمستان ۸۶ باعث خسارت ۱۰۰ درصدی به بسیاری از باغ های خراسان و قسمت هایی از سایر نقاط ایران گردید. جهت شناسایی ارقام مقاومتر انار، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۶ رقم انار مهم منطقه (شیرین پوست قرمز، پوست سفید، شهوار، ترش ملس، شلغمی و شیشه کپ) و ۸ تیمار دمایی در دامنه ۱۰- تا ۲۴- درجه سلسیوس به همراه شاهد (بدون تیمار دمایی) در سال ۱۳۸۷ انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که هم زمان با کاهش دمای یخ زدگی، میزان قهوه ای شدن، محتوای پرولین، نشت الکترولیتی و فعالیت آنتی اکسیدانی در همه ارقام افزایش و از درصد بقای آن ها (رشد جوانه ها) کاسته شد. سه رقم شیرین پوست قرمز، پوست سفید و شهوار در دمای ۱۸- درجه سلسیوس هیچ گونه رشد مجددی نشان ندادند، اما در همین دما درصد بقای ارقام ترش ملس، شلغمی و شیشه کپ به ترتیب برابر ۳۰، ۲۱/۵ و ۶۱/۲٪ بود. همچنین رقم شیشه کپ در این آزمایش توانست تا دمای ۲۰- درجه سلسیوس ساختار غشای یاخته ای (سلولی) خود را حفظ و نشت الکترولیتی از یاخته ها را در کمینه نگه دارد. محتوای پرولین این رقم نیز در دمای ۲۴- درجه سلسیوس نسبت به شرایط شاهد ۱۲ برابر افزایش نشان داد. بنابراین به نظر می رسد رقم شیشه کپ در مقایسه با سایر ارقام مورد مطالعه به شکل موثرتری می تواند بقا خود را تحت تنش یخ زدگی حفظ نماید. **واژه های کلیدی:** پرولین، رشد مجدد، رقم شیشه کپ، فعالیت آنتی اکسیدانی، نشت یونی.

مقدمه

قسمت های وسیعی از سرزمین ما که در محدوده کویر مرکزی (دشت کویر و کویر لوت) واقع گردیده، دارای شرایط آب و هوای خشک و نیمه گرمسیری است، بنابراین طبیعی است کاشت بیشتر محصول های باغی از نظر اقتصادی در این مناطق مقرون به صرفه نباشد. اما در چنین شرایطی درخت انار می تواند به عنوان یکی از مهم ترین محصول های مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری اهمیت خاص پیدا نماید. بر اساس آمار فائو در سال ۲۰۰۹ سطح زیر کشت انار در ایران بیشتر از ۶۰ هزار هکتار بوده و با بیش از ۷۰۰ هزار تن بالاترین میزان تولید در دنیا را به خود اختصاص می دهد (۳۳). از سوی دیگر، ایران با میانگین ۲۵ هزار تن صادرات انار، بالاترین

۱- تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۵

۲- به ترتیب مربی (selahvarzi@ferdowsi.um.ac.ir) مرکز تحقیقات انار دانشگاه فردوسی، دانشیاران و استادیار گروه علوم باغبانی و دانشیار گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، جمهوری اسلامی ایران.

سهم را در بین کشورهای تولید کننده دارا می باشد (۳۲). اما از آن جا که این درختچه در نواحی حاشیه ای کویر با آب و هوای نیمه گرمسیری سازگاری یافته است، همواره به لحاظ تنش های محیطی به ویژه یخ زدگی مورد تهدید قرار می گیرد.

به طور معمول اگر دمای هوا در مناطق کشت انار به کمتر از ۱۲ تا ۱۴ درجه سلسیوس زیر صفر برسد، بخش هوایی آن مورد آسیب قرار گرفته و چاره ای جز کف بر کردن درخت باقی نمی ماند. در حالت های شدیدتر بخش زیرزمینی و ریشه های درختچه نیز مورد آسیب واقع شده و امکان رویش مجدد گیاه در فصل رشد بعدی نیز کاهش می یابد. به طور معمول دمای پایین اولین عامل محدود کننده و تعیین کننده بقا و رشد گیاهان می باشد (۳۰).

بارتولوزی و فونتانازا^۱ (۶) گزارش کردند که انتخاب نژادگان مقاوم زیتون که دارای مکانیزم تحمل به یخ زدگی می باشند می تواند به عنوان مهم ترین راهکار مقابله با یخ زدگی در این گیاه معرفی گردد.

پیتچ و همکاران^۲ (۱۹) طول روز و دما را مهمترین اجزای تحمل و تطابق به سرما در دو گونه چوبی خزان دار عنوان نمودند. آن ها تفاوت LT_{50} و ظرفیت تطابق گیاهان مورد آزمایش را به میزان نشت الکترولیتی آن ها مربوط دانستند. یوسفی (۲) اثر یخ زدگی روی نشت الکترولیتی ۱۱ رقم بادام در شرایط طبیعی و مصنوعی را مورد بررسی قرار داد و نتیجه گرفت که نتایج به دست آمده از شرایط آزمایشگاه با مشاهدات تجربی در منطقه مورد مطالعه منطبق می باشد. بر این اساس روش های متعددی به منظور سنجش میزان مقاومت گیاهان به سرما مورد استفاده واقع شده است، که از آن جمله می توان به فعالیت فتوسنتزی (۴)، تراکم روزنه ها (۲۳)، اندازه روزنه (۲۴)، نشت الکترولیتی (۱۳)، درصد بقا و رشد مجدد (۱۱، ۲۶) و آزمون تترازولیوم^۳ (۲۷، ۲۹) اشاره نمود. هر چند مکانیزم های تطابق به سرما در بیشتر گیاهان چوبی دراز عمر نامشخص و مبهم بوده (۳۰) ولی گزارش های متعددی وجود دارد که نشان می دهد محتوای پروتئین، پرولین و قندهای محلول بعد از تطابق به سرما در گیاهان همواره افزایش می یابد (۵، ۱۸). همچنین در شرایط مقاومت به سرما مشخص گردیده است که میزان فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز^۴، پر اکسیداز^۵، پلی فنل اکسیداز^۶ و به طور کلی فعالیت آنتی اکسیدانی بافت ها نیز بیشتر می گردد (۹، ۲۵، ۳۰). وظیفه شناس و هادی راد (۱) با استفاده از تعیین مقدار اسیدهای چرب و آب میان بافتی، ارقام انار 'خواجه ای قصر الدشت'، 'شهبوار'، 'پوست قرمز اصفهان'، 'شیرین جوک بجستان'، 'پوست سیاه' و 'وحشی کن تهران' را مقاوم به سرما معرفی نمودند.

با توجه به این که در سال ۱۳۸۶ بیشتر درختان انار ایران بر اثر یخ زدگی به صورت کامل از بین رفت، بنابراین افزون بر عدم برداشت هر گونه محصولی، هزینه های گزافی از جمله کف بر کردن و نگهداری باغ ها را نیز تحمیل نمود. بنابراین اگر هر ۱۰ سال دستکم یک بار این پدیده تکرار شود، حجم خسارات وارده غیرقابل پیش بینی و بیش از حد تصور خواهد بود. بنابراین هدف از انجام این پژوهش شناسایی ارقام یا نژادگان هایی از انار است که بتوانند در شرایط بروز سرماهای سخت مقاومت بیشتری از خود نشان دهند.

2,3,5- Triphenyl tetrazolium chloride -۳

Pietsch *et al.* -۲

Bartolozzi and Fontanazza -۱

Polyphenol oxidase -۶

Peroxidase -۵

Superoxide Dismutase -۴

مواد و روش ها

مواد گیاهی

در این بررسی ی یک رقم انار شامل: 'شهور'، 'ترش ملس'، 'و'، 'کپ' در زمستان از شهرستان فردوس جمع اوری و درنگ آزمایشگاه دانشگاه فردوسی مشهد.

اعمال تنش یخ زدگی

شاخه های انار رقم های یاد شده به طول بیدرنگ پس از علامت گذاری و بسته بندی، درون دستگاه فریزر ترموگرادیان قرار گرفتند. تیمارهای یخ زدگی در محدوده دمایی - - درجه سلسیوس با توالی کاهش درجه اعمال شد. برای رسیدن به هر یک از دماهای مورد نظر، کاهش دما به گونه ای اعمال گردید که دما در هر ساعت درجه سلسیوس کاهش یافته و پس از رسیدن به استانه دمایی مورد نظر جهت نفوذ بهتر سرما به درون بافت ها به مدت ساعت در همان دما (درون فریزر) نگهداری شدند. درنگ شاخه های مربوط به هر تیمار از دستگاه فریزر خارج و جهت ارزیابی ویژگی ها، در شرایط دمایی آزمایشگاه (درجه سلسیوس) و در مجاورت شاهد (بدون تیمار دما) قرار گرفتند (). این پژوهش حاضر به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با رقم، تیمار دمایی و تکرار در سال اجرا گردید.

ارزیابی ویژگی ها

نمونه های گیاهی پس از خروج از دستگاه فریزر، جهت تعیین قابلیت بقا و رشد مجدد به مدت روز در شرایط دمایی آزمایشگاه نگهداری شدند () و سپس از طریق رابطه زیر رشد مجدد (در صد بقا) هر یک از شاخه ها محاسبه گردید.

$$\text{رشد مجدد} = \frac{B_a}{B_t} \times$$

B_a بیانگر تعداد جوانه های فعال و B_t نشانگر تعداد کل جوانه های موجود روی هر شاخه می باشد. همچنین در این پژوهش دماهایی که باعث مرگ % جوانه ها (LT_{50}) گردید نیز مورد محاسبه و ارزیابی قرار گرفت (). برای اندازه گیری میزان قهوه ای شدن بافت اعدادی از در نظر گرفته ، به گونه ای که عدد نشان دهنده وضعیت کاملاً سالم و بدون عوارض یخ زدگی بوده و عدد به حالت کاملاً قهوه ای و بافت مرده، در نظر گرفته شد ().

جهت سنجش میزان نشت الکترولیت از بافت ساقه (شاخه های یکساله) را پس از شست و شو در ظروف شیشه ای محتوی میلی لیتر اب مقطر (دیونیزه) قرار داده و سپس شیشه ها را به مدت ساعت در دمای اتاق ب وسیله تکان دهنده () تکان داده تا در نهایت C_i (هدایت الکتریکی اولیه) توسط هدایت سنج خوانده شود. پس از آن شیشه ها به اتوکلاو با دمای درجه سلسیوس و فشار / اتمسفر به مدت دقیقه منتقل C_m (هدایت الکتریکی) خوانده شود. در نهایت از طریق رابطه زیر نشت الکترولیتی محاسبه گردید ().

$$EL = C_i / C_m \times$$

محتوای پرولین با استفاده از روش بیتز و همکاران^۱ (۷) و تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی از طریق روش دی پی پی اچ^۲ (۱۷) مورد اندازه گیری قرار گرفت. در این روش ۰/۱ میلی لیتر عصاره الکلی از هر نمونه گیاهی به ۱ میلی لیتر دی پی پی اچ (۵۰۰ میکرومول در متانول) اضافه شد. سپس مخلوط حاصل را به شدت تکان داده و پس از ۳۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. سپس محاسبه فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق رابطه زیر انجام پذیرفت.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Sample (5.7 nm)}}}{A_{\text{Control (517 nm)}}} \right) \times 100.$$

تجزیه آماری

تجزیه آماری داده های به دست آمده از ویژگی های اندازه گیری شده و همچنین مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال خطای ۵٪ توسط نرم افزار SAS انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

نتایج این پژوهش نشان می دهد که اثرهای اصلی و متقابل رقم و دما بر ویژگی های میزان قهوه ای شدن بافت، نشست الکترولیتی یاخته ها، محتوای پرولین و رشد مجدد نمونه ها معنی دار بوده است. میزان قهوه ای شدن بافت از شاهد تا تیمار ۲۴- درجه سلسیوس در همه رقم ها روند صعودی نشان داد (شکل ۱). در این بین رقم 'شیشه کپ' تا دمای ۱۴- درجه سلسیوس هیچ گونه تغییری را از نظر میزان قهوه ای شدن در مقایسه با شاهد و دمای بالاتر نشان نداد و در واقع قهوه ای شدن این رقم در دمای یخ زدگی ۱۶- درجه سلسیوس شروع شد (شکل ۱). این در حالی است که قهوه ای شدن مشخص ارقام 'شیرین پوست قرمز'، 'پوست سفید' و 'شهور' از دمای ۱۰- آغاز شد و خیلی زود در دمای ۱۸- به اوج رسید (شکل ۱). ارقام 'شلغمی' و 'ترش ملس' نیز همان طور که در شکل ۱ پیداست از دمای ۱۴- شروع به قهوه ای شدن کرده و در دمای ۲۲- درجه سلسیوس به بیش ترین میزان خود رسیدند.

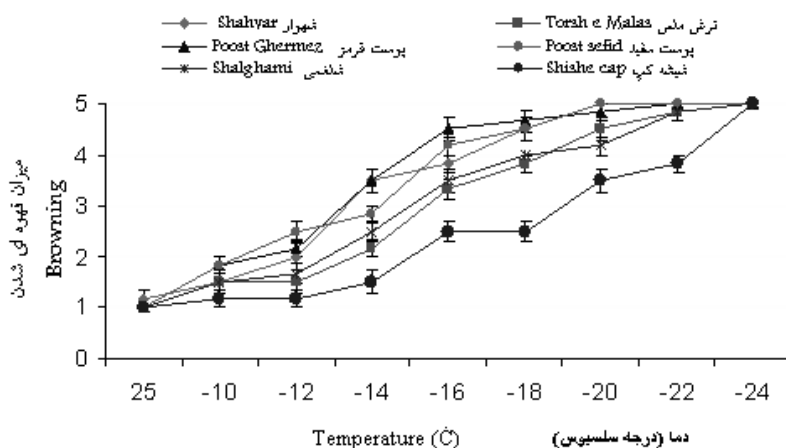


Fig. 1. Temperature effects on browning amount in six pomegranate cultivars, (means \pm SE).

شکل ۱- اثر دما بر میزان قهوه ای شدن بافت در شش رقم انار مورد آزمایش، (میانگین \pm خطای استاندارد).

میزان قهوه ای شدن بافت که در اثر تجمع مواد فنلی در گیاهان رخ می دهد با افزایش شدت یخ زدگی و کاهش دما افزایش می یابد (۳، ۱۶). به نظر می رسد رقم 'شیشه کپ' در مقایسه با سایر نژادگان ها در دمای پایین تری، شروع به قهوه ای شدن می کند این در حالی است که سایر ارقام به ویژه 'شیرین پوست قرمز'، 'شهواری' و 'پوست سفید' به محض این که در دمای ۱۰- درجه سلسیوس در شرایط یخ زدگی قرار گرفتند، بیدرنگ مواد فنلی را در بافت های خود تجمع داده و قهوه ای شده اند. لاوس و همکاران^۱ (۱۴) اثر دمای یخ زدگی بر جوانه ها و قلمه ساقه کیوی را مورد بررسی قرار دادند. آن ها تشریح کردند که در بسیاری از ارقام کیوی در دمای ۲۰- میزان نشت الکترولیتی و قهوه ای شدن پوست به بیشترین مقدار خودش می رسد. در مورد محتوای پرولین بافت نیز چنان که در شکل ۲ مشخص است همزمان با کاهش دما تا ۱۴- درجه سلسیوس در همه رقم ها روند افزایشی مشاهده می گردد. رقم 'شیشه کپ' از دمای ۱۴- درجه سلسیوس به پایین همچنان بر محتوای پرولین خود می افزاید به گونه ای که در دمای ۲۴- با ۱۲ برابر افزایش نسبت به شاهد بالاترین مقدار را به خود اختصاص می دهد. محتوای پرولین سایر رقم های مورد بررسی، در این دامنه دمایی (۱۴- تا ۲۴-) تغییر معنی داری نشان نمی دهند (شکل ۲). افزایش اسمولیت^۲ مهمی چون پرولین تحت تنش یخ زدگی (۲۱) یکی دیگر از مکانیزم های قابل مشاهده در رقم های مورد پژوهش می باشد. از آن جا که تنش ثانویه یخ زدگی، تنش خشکی می باشد که در اثر آن پسابیدگی^۳ سریع در یاخته رخ می دهد (۱۰)، بنابراین گونه ها و نژادگان های گیاهی مقاوم در برابر یخ زدگی باید بتوانند پتانسیل اسمزی خود را نیز تحت چنین شرایط دمایی در حد بهینه حفظ کنند (۲۰، ۲۲). بر این اساس رقم 'شیشه کپ' با تجمع و افزایش پرولین از دمای شاهد تا دمای ۲۴- درجه سلسیوس می تواند پتانسیل آب بافت را به شکل موثرتری حفظ نموده و از تخریب یاخته ای جلوگیری کند.

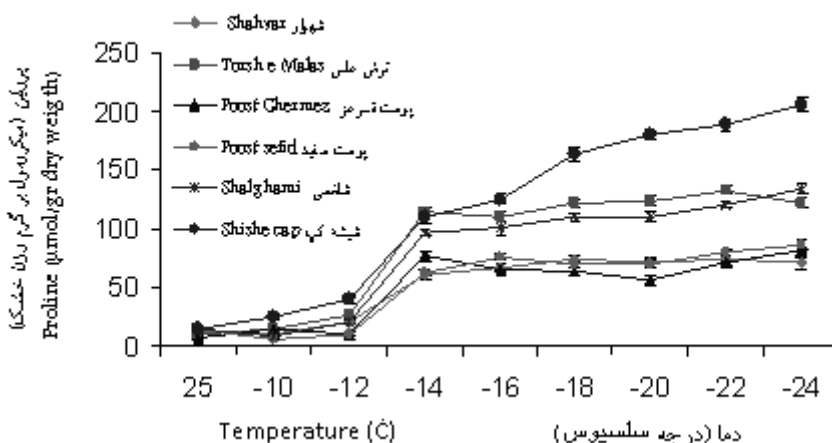


Fig. 2. Temperature effects on proline content in six pomegranate cultivars, (Means \pm SE).

شکل ۲- اثر دما بر محتوای پرولین بافت در شش رقم انار مورد آزمایش، (میانگین \pm خطای استاندارد).

بارکا و آدران^۱ (۵) مقادیر پرولین موجود در جوانه ها و شاخه های انگور را اندازه گیری و همبستگی آن را با تحمل به یخ زدگی محاسبه نمودند و مشخص شد که هر چه میزان پرولین بافت در مراحل فنولوژیکی مختلف افزایش یابد، قابلیت بقا نیز بیشتر می گردد. نانجو و همکاران^۲ (۱۸) نیز بیان داشتند که پرولین می تواند نقش بسزایی در تحمل به یخ زدگی گیاهان داشته باشد. آن ها بیان داشتند که تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش می تواند هم به دلیل فعالیت بیوسنتز آن باشد و هم در اثر جلوگیری از تجزیه آن صورت گیرد.

نشت الکترولیتی در رقم های 'شیرین پوست قرمز'، 'پوست سفید'، 'شهور' از دمای -۱۴ درجه سلسیوس شروع به افزایش نموده و در دمای یخ زدگی -۱۶ و -۱۸ به بالاترین سطح خود رسید. مقادیر نشت الکترولیتی در دو رقم 'ترش ملس' و 'شلغمی' نیز از دمای -۱۶ و رقم 'شیشه کپ' از دمای -۲۰ درجه سلسیوس افزایش یافت (شکل ۳). نشت الکترولیتی از یاخته ها که به صورت مشخص در اثر تخریب غشای یاخته ای و مختل شدن انتقال مواد در آن اتفاق می افتد (۶) به شدت در اثر دماهای یخ زدگی اعمال شده افزایش یافت. رقم 'شیشه کپ' در این آزمایش تا دمای -۲۰ توانست غشا پلاسمایی خود را حفظ کند. این در حالی است که شروع نشت مشخص الکترولیت ها از یاخته های سایر ارقام در دماهای بالاتر (-۱۶ و -۱۴ درجه سلسیوس) رخ می دهد. گومز دل کمپو و بارانکو^۳ (۱۲) توانستند بر اساس مقدار نشت الکترولیتی ایجاد شده در محدوده دمایی صفر تا -۲۲ درجه سلسیوس، آستانه تحمل ۸ رقم زیتون را مشخص نمایند.

میزان رشد مجدد نمونه ها پس از اعمال دماهای یخ زدگی در شکل ۴ نشان داده شده است. سه رقم 'شیرین پوست قرمز'، 'پوست سفید'، 'شهور' در دمای یخ زدگی -۱۸ هیچ گونه رشد دوباره ای را نشان ندادند، در حالی که ارقام 'ترش ملس'، 'شلغمی' و 'شیشه کپ' در این دما به ترتیب و به صورت میانگین ۲۵، ۳۲ و ۶۲٪ رشد مجدد داشتند. عدم رشد و مرگ کامل در نژادگان های 'ترش ملس' و 'شلغمی' در دمای -۲۲ و در نژادگان 'شیشه کپ' در دمای -۲۴ درجه سلسیوس اتفاق افتاد (شکل ۴).

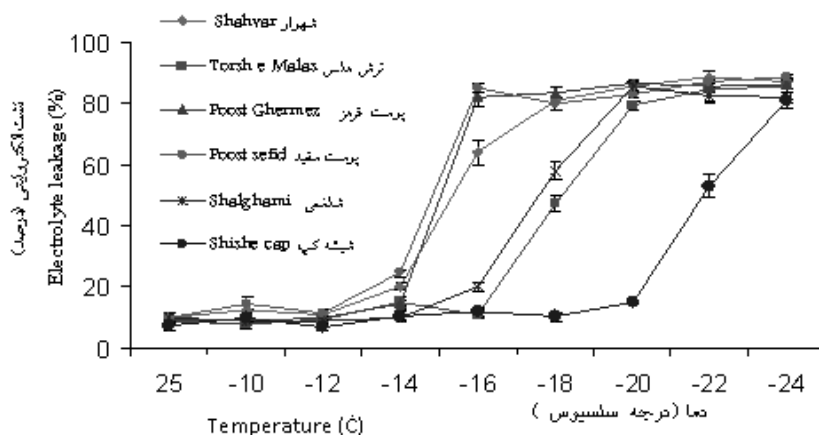


Fig. 3. Temperature effects on electrolyte leakage from stem tissue in six pomegranate cultivars, (means \pm SE).

شکل ۳- اثر دما بر نشت الکترولیت از بافت ساقه در شش رقم انار مورد آزمایش، (میانگین \pm خطای استاندارد).

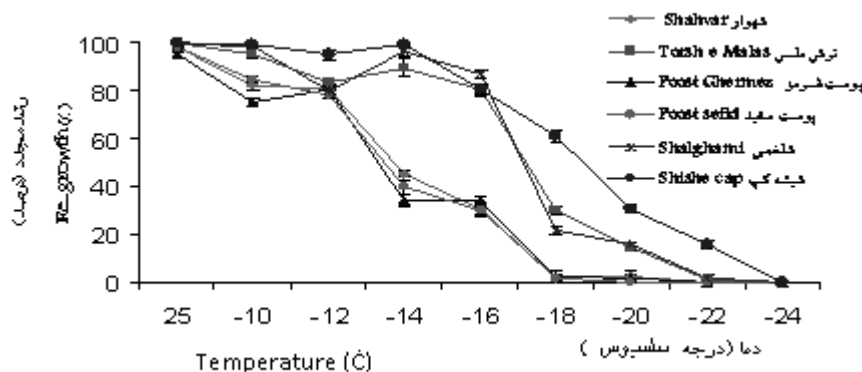


Fig. 4. Percentage of buds on stems growing after freezing treatments on six pomegranate cultivars, (means \pm SE).

شکل ۴- میزان رشد جوانه ها در شاخه های شش رقم انار مورد آزمایش پس از اعمال تیمار سرمایی، (میانگین \pm خطای استاندارد).

روش تعیین بقا و رشد مجدد نمونه های پس از اعمال یخ زدگی هر چند در زمان طولانی تری نسبت به سایر روش ها انجام می گردد ولی به صورتی که در شکل ۴ نشان داده شده است به درستی می توان با استفاده از این روش، آستانه دمایی مربوط به نابودی کامل نمونه ها در اثر تیمارهای یخ زدگی را مشخص نمود. در صورتی که میزان مرگ ۵۰٪ جوانه ها (LT_{50}) به عنوان معیار مقایسه و تعیین کننده حد صدمه اقتصادی در نظر گرفته شود، در این صورت و با توجه به شکل ۵ این دما برای رقم 'شیشه کپ' برابر با ۱۸/۷ درجه سلسیوس، برای رقم های 'ترش ملس' و 'شلمی' به طور میانگین برابر ۱۷/۱ درجه سلسیوس و برای سه رقم حساس تر ('شیرین پوست قرمز'، 'پوست سفید'، 'شهار') به طور میانگین برابر ۱۳/۴ درجه سلسیوس می باشد. از مهمترین دلایل کاهش درصد بقا تحت تنش یخ زدگی، می توان به تخریب یاخته های پارانشیمی (۱۵)، نشت الکترولیت ها (۱۹) و افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن (۲۱) اشاره نمود.

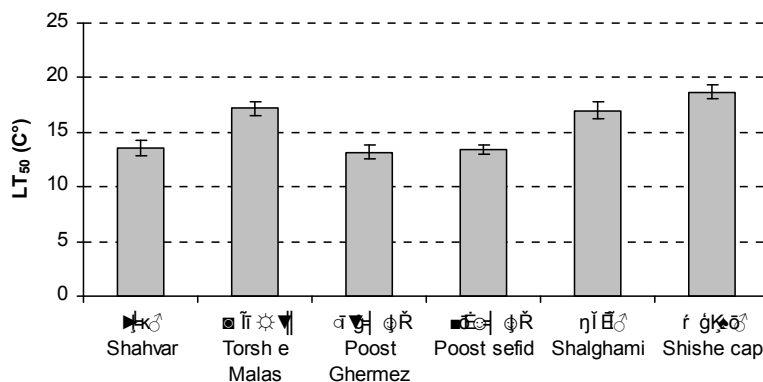


Fig. 5. Mean temperature causing 50% buds death (LT_{50}) in six pomegranate cultivars, (means \pm SE).

شکل ۵- میانگین دماهایی که باعث مرگ ۵۰٪ جوانه ها (LT_{50}) در شش رقم مورد آزمایش گردید، (میانگین \pm خطای استاندارد).

نتایج نشان داد که تنها اثر دما بر فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها معنی دار بوده است ($P \leq 0.01$) و بین رقم ها تفاوت معنی داری وجود نداشت. دمای -18 با میانگین $69/05\%$ بیش ترین مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی را در بین تیمارهای دمایی اعمال شده به خود اختصاص داد، این در حالی است که نمونه ها در شرایط آزمایشگاهی (دمای 25 درجه سلسیوس) با میانگین $19/29\%$ کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بودند (شکل ۶). بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد که تنش یخ زدگی (تا دمای -18 درجه سلسیوس) می تواند فعالیت آنتی اکسیدانی را نسبت به شرایط شاهد افزایش داده و بدین ترتیب از فعالیت رادیکال های آزاد اکسیژن جلوگیری نماید (۲۱). نکته قابل توجه این که فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها در این مطالعه بعد از دمای -18 نه تنها به روند صعودی و افزایشی خود ادامه نداد، بلکه دچار کاهش نیز گردید (شکل ۶).

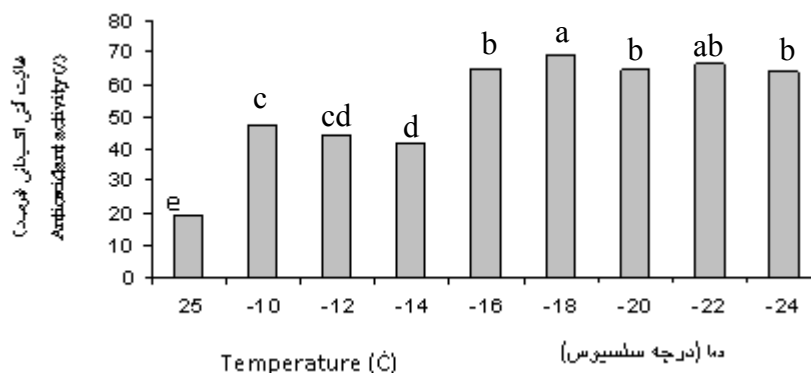


Fig. 6. Temperature effects on antioxidant activity of alcoholic extracts of pomegranate on 1-year wood.

شکل ۶- اثر دما بر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره الکلی شاخساره های یکساله انار.

بر این اساس می توان نتیجه گرفت که یاخته ها در مرحله اول برای داشتن فعالیت آنتی اکسیدانی بیشینه به تحریک دمای منفی نیاز داشته (۳۱) ولی پس از رسیدن به این نقطه بیشینه، به علت مرگ بیشتر یاخته های گیاهی فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش می یابد.

همبستگی ویژگی ها

نتایج همبستگی ویژگی ها در جدول ۱ نشان داد که بین ویژگی رشد مجدد و ویژگی های قهوه ای شدن بافت، نشت الکترولیتی، محتوای پرولین و فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها همبستگی منفی و معنی داری وجود دارد. در مورد همبستگی منفی ویژگی رشد مجدد با فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه بر اساس شکل ۶ به نظر می رسد که تا دمای -18 درجه سلسیوس تحریک فعالیت آنتی اکسیدانی به روشنی صورت پذیرفته و به تدریج بر مقادیر این ویژگی افزوده شده است ولی از این نقطه دمایی تا دمای -24 درجه سلسیوس به علت کاهش فعالیت حیاتی گیاه، فعالیت آنتی اکسیدانی آن نیز شروع به کاهش نموده است. هرچند که همچنان مقادیر این ویژگی بیش از دماهای بالاتر در شروع آزمایش بوده است. حال آن که در تمام مدت آزمایش به تدریج با کاهش دما، از مقادیر رشد مجدد گیاهان کاسته شد. بنابراین در این صورت همبستگی ویژگی رشد مجدد با فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه در دامنه دمایی مورد آزمایش منفی محاسبه گردید.

جدول ۱- ضرایب همبستگی ویژگی های مورد اندازه گیری.

Table 1. Correlation coefficients between measured characteristics.

	محتوای قهوه ای شدن Browning	محتوای پرولین Proline content	نشست الکترولیتی Electrolyte leakage	رشد مجدد Re-growth	فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity
قهوه ای شدن Browning	1				
محتوای پرولین Proline content	58.01 ^{††}	1			
نشست الکترولیتی Electrolyte leakage	88.37 ^{††}	42.94 [†]	1		
رشد مجدد Re-growth	-92.69 ^{††}	-54.38 ^{††}	-91.99 ^{††}	1	
فعالیت آنتی اکسیدانی Antioxidant activity	64.23 ^{††}	51.73 ^{††}	58.19 ^{††}	-61.63 ^{††}	1

†, †† indicate significance at 5 and 1 percent probability levels, respectively.

† و †† به ترتیب نشانگر معنی دار بودن در سطح احتمال خطای ۵ و ۱٪ می باشد.

اندازه گیری میزان رشد مجدد نمونه ها پس از اعمال تنش یخ زدگی به خوبی و به طور کامل عینی می تواند درصد بقای نمونه را مشخص نماید، ولی چنان که مشخص است، نیاز به زمان طولانی جهت ارزیابی میزان خسارت ها، نکته منفی در مورد این ویژگی محسوب می گردد. بنابراین می توان به دلیل همبستگی بالای ویژگی یاد شده با مقادیر نشست الکترولیتی ($r = -91/9$) و قهوه ای شدن بافت ($r = -92/6$)، از این روش های سریع و جایگزین استفاده نمود. بیگراس^۱ (۸) نیز ضمن پژوهش روی دانهال های نوئل دریافت که بین میزان نشست الکترولیتی بافت و درصد بقای درختان همبستگی بالایی وجود دارد. آن ها تخریب غشای یاخته ای در اثر بروز یخ زدگی و نشست یون ها به محیط خارج یاخته ای را از مهمترین دلایل مرگ نمونه ها عنوان کردند.

نتیجه گیری

مقادیر نشست الکترولیتی و میزان رشد مجدد نمونه ها در دماهای اعمال شده به روشنی نشان می دهد که ارقام مورد مطالعه را می توان در سه سطح مقاومتی طبقه بندی نمود. نشست الکترولیتی در ارقام 'شیرین پوست قرمز'، 'پوست سفید'، 'شهواری' به سرعت افزایش یافته و به همان نسبت درصد بقای آن ها کاهش یافت. بنابراین سه رقم یاد شده حساس به یخ زدگی ارزیابی شدند. اما رقم 'شیشه کپ' را که تا دمای ۲۰- درجه سلسیوس به خوبی توانست غشای یاخته ای خود را حفظ نموده و نسبت به سایر ارقام نیز درصد بقای بالاتری داشته باشد

می توان به عنوان رقم مقاوم در این پژوهش معرفی کرد. در این بین پاسخ ارقام 'ترش ملس' و 'شلغمی' در برابر تنش یخ زدگی و همچنین وضعیت نشت الکترولیتی و درصد بقای آن ها باعث می گردد که حالت بینابینی داشته و بنابراین در گروه ارقام نیمه مقاوم قرار گیرند.

REFERENCES

منابع

۱. وظیفه شناس، م. ر. و م. هادی راد. ۱۳۸۵. معرفی رقمی از انار با خصوصیات مقاومت به سرما. جشنواره انار. کاشان.
۲. یوسفی، م. ۱۳۸۷. اثر یخ زدگی روی نشت الکترولیتی ۱۰ رقم بادام زراعی و یک گونه بادام وحشی در استان اصفهان. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۹-۱: ۴۵.
3. Anisko, T. and O.M. Lindstrom. 1995. Applying the Richards function in freezing tolerance determination with electrolyte and phenolic leakage techniques. *Physiol. Plant.* 95:281-287.
4. Antognozzi, E., M. Pilli., P. Proietti and F. Romani. 1990. Analysis of some factors affecting frost resistance in olive trees. XXIII Int. Hort. Cong. Firenze (Italy). Abstracts of contributed papers 4289.
5. Barka, E.A and J.C. Audran. 1997. Response of 'Champenoise' grapevine to low temperature: changes of shoot and bud proline concentrations in response to low temperatures and correlations with freezing tolerance. *HortScience* 72:557-582.
6. Bartolozzi, F. and G. Fontanazza. 1999. Assessment of frost tolerance in olive (*Olea europaea* L.). *Sci. Hort.* 81:309-319.
7. Bates, L.S., R.P. Waldren and L.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.
8. Bigras, F.J. 1997. Root cold tolerance of black spruce seedlings: Viability tests in relation to survival and regrowth. *Tree Physiol.* 17:311-318.
9. Bridger, G.M., W. Yang., D.E. Falk and B.D. McKersie. 1994. Cold acclimation increases tolerance of activated oxygen in winter cereals. *J. Plant Physiol.* 144:235-240.
10. Chang, Y. and B.M. Reed. 2001. Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. *HortScience* 36:1329-1333.
11. Chat, J. 1995. Cold hardiness within the genus *Actinidia*. *HortScience* 30:329-332.
12. Gomezdel Campo, M and D. Barranco. 2005. Field evaluation of frost tolerance in 10 olive cultivars. *Plant Gen. Res.* 3:385-390.
13. La Porta, N., M. Zacchini., S. Bartolini., R. Viti and G. Roselli. 1994. The frost hardiness of some clones of olive cv. Leccino. *J. Hort. Sci.* 69:433-435.

14. Lawes, G.S., S.T. Cheong., and H.V. Alvarez. 1995. The effect of freezing temperatures on buds and stem cuttings of *Actinidia* species. *Sci. Hort.* 16:1-12.
15. Malone, S.R. and E.N. Ashworth. 1991. Freezing stress response in woody tissues observed using low-temperature scanning electron microscopy and freeze substitution techniques. *Plant Physiol.* 95:871-881.
16. Marriage, P.B, and H.A. Quamme. 1980. Effect of weed control on the winter hardiness of the bark and wood of young peach trees. *HortScience* 15:290-291.
17. Moon, J.H. and J. Terao. 1998. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *J. Agr. Food Chem.* 46:5062-5065.
18. Nanjo, T., M. Kobayashi., Y. Yoshiba., Y. Kakubari., K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18:185-193.
19. Pietsch, G.M., N.O. Anderson and P.H. Li. 2009. Cold tolerance and short day acclimation in perennial *Gaura coccinea* and *G. drummondii*. *Sci. Hort.* 120:418-425.
20. Ingram, J. and D. Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 47:377-403.
21. Inze, D. and M. Van Montagu. 2002. *Oxidative Stress in Plants*. Taylor & Francis. London. Inc. 74 p.
22. Jouve, L., T. Frank., T. Gaspar., L. Cattivelli and J.F. Hausman. 2000. Poplar acclimation to cold during *in vitro* conservation at low non-freezing temperature: metabolic and proteic changes. *J. Plant Physiol.* 157:117-123.
23. Roselli, G., G. Benelli and D. Morelli., 1989. Relationship between stomatal density and winter hardiness in olive (*Olea europaea* L.). *J. Hort. Sci.* 64:199-203.
24. Roselli, G. and G. Venora. 1990. Relationship between stomatal size and winter hardiness in the olive. *Acta Hort.* 286:89-92.
25. Schoner, S. and G.H. Krause. 1990. Protective systems against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light. *Planta* 180:383-389.
26. Sekozawa, Y., S. Sugaya., H. Gemma and S. Iwahori. 2003. Cold tolerance in 'Kousui' Japanese pear and possibility for avoiding frost injury by treatment with n-propyl dihydrojasmonate. *HortScience* 38:288-292.
27. Takeda, F., R. Arora, M.E. Wisniewski and G.A. Davis. 1993. Assessment of freeze injury in 'Bookoop Giant' black currant buds. *HortScience* 28:652-654.
28. Yamori, W., H. Kogami and T. Masuzawa. 2005. Freezing tolerance in alpine plants as assessed by the FDA-staining method. *Polar Biosci.* 18:73-81.

29. Yelenosky, G. 1975. Tetrazolium reduction in citrus cold hardening. HortScience 10:384-386.
30. Wang, W.J., Y.Z. Chen., M.G. Liu and C.F. Lu. 2008. Effects of cold-hardening on compatible solutes and antioxidant enzyme activities related to freezing tolerance in *Ammopiptanthus mongolicus* seedlings. Forest. Stud. China 10:101-106.
31. Wise, R.R. and A.W. Naylor. 1987. Chilling-enhanced photo-oxidation, evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. Plant Physiol. 83:278-282.
32. www.amar.sci.org.ir.
33. www.fao.org/corp/statistics/en.

PHYSIOCHEMICAL RESPONSES OF SIX POMEGRANATE CULTIVARS FROM RAZAVI KHORASAN UNDER FREEZING STRESS

Y. SALAHVARZI, GH. DAVARINEJAD, A. TEHRANIFAR, H. NEAMATI AND A. NEZAMI¹

Freezing stress is one of the most important problems for pomegranate growers in Iran. For example most pomegranate orchards were completely destroyed in the Khorasan province and other places because of severe winter freeze in 2008. Therefore, a factorial experiment based on completely randomized design (CRD) was performed during winter 2009. Six genotypes included ('Shirin e Poost Ghermez', 'Poost Sefid', 'Shahvar', 'Torsh e Malas', 'Shalghami' and 'Shishe Cap') and 8 temperatures in the range of -10 to -24°C as well as a control were compared. Results showed that the amount of browning, proline content, electrolyte leakage and antioxidant activity were increased by freezing incubation in all cultivars, whereas survival percentage was decreased. Not any re-growth was recorded in 3 cultivars ('Shirin e Poost Ghermez', 'Poost Sefid' and 'Shahvar') at -18°C but 'Torsh e Malas', 'Shalghami' and 'Shishe Cap' showed 30, 21.5 and 61.2 survival percentages respectively. The cultivar 'Shishe Cap' could stabilize its membrane structure and electrolyte leakage up to -20°C. The proline content of 'Shishe Cap' showed a 12-fold increase at -24°C in comparison with control. Therefore, it seems that 'Shishe Cap' pomegranate was able to retain its survival effectively compared with the other studied cultivars.

Keywords: Antioxidant activity, Electrolyte leakage, Proline, Re-growth, 'Shishe Cap' cultivar.

1. Instructor (selahvarzi@ferdowsi.um.ac.ir), Pomegranate Research Center, Ferdowsi University, Associate Professors and Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Associate Professor, Department of Agronomy, College of Agriculture, Mashhad Ferdowsi University, Mashhad, I.R. Iran, respectively.