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

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

سیده‌مرضیه حسینی‌ولشکلایی[۱]، یحیی تاجور[۲]، مسعود آزادبخت[۳]، زینب رفیعی‌راد [۴]*

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

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۰۲

چکیده

تنش دمای پایین یکی از مهمترین تنش‌های محیطی غیرزنده است که رشد و عملکرد گیاهان زینتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌منظور بررسی برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی چهار رقم مرکبات زینتی مورد استفاده در فضای سبز شهری در شرایط تنش دمای پایین، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در پژوهشکدهٔ مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری کشور (رامسر) در سال ۱۳۹۴ اجرا شد. تیمارها شامل دما در چهار سطح (۳، ۰، ۳- و ۶- درجهٔ 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 کامکوآت مشاهده شد. همچنین، مقدار کلروفیل کل (۲/۲۱ میلی‌گرم برگرم وزن تر برگ)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۶۰/۶۱ درصد) و میزان فعالیت سوپراکساید دیسموتاز (۲۶/۵۳ واحد آنزیمی برگرم 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- درجهٔ سانتی‌گراد است.

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

* نویسنده مسئول
Email: z_rafierad@znu.ac.ir

۱. مقدمه

مرکبات از خانواده Rutaceae و زیرخانوادهٔ Aurantioideae است. به‌استثنای نارنج سه‌برگ، بقیهٔ ارقام مرکبات گیاهانی همیشه‌سبز با رایحهٔ مطبوع در زمان شکوفه‌دهی هستند. به‌همین دلیل برخی از ارقام آنها به‌عنوان پرکاربردترین گیاهان در فضای سبز استفاده می‌شود [۳۳]. یکی از مهمترین اصول در منظرسازی، تنوع گیاهی است که دربارهٔ کاربرد مرکبات در فضای‌سبز این اصل رعایت نشده است. یکی از دلایل این امر را می‌توان 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 می‌توان اشاره کرد [۲].

یکی از ارقام مرکبات، کامکوات[1] است که شامل گونه های متعددی است و زمان گلدهی این درختچه‌ها برخلاف اغلب ارقام مرکبات در اوایل تابستان است. از مشخصات دیگر این رقم، حجم کم تاج آنها بوده (بدون نیاز به هرس مکرر) که می‌تواند در طراحی باغ و فضای سبز به‌کار گرفته شود [۲]. انگشت بودا[2] به‌صورت درختچه‌ای کوچک با تاج باز بوده و در مرحلهٔ بلوغ، میوه آن به‌شکل انگشت‌های انسان رشد می‌کند که جلوهٔ خاصی به‌این درختچه می‌دهد و از جنبهٔ زینتی آن را بسیار حائز توجه کرده است. کالاموندین[3] یکی دیگر از ارقام مرکبات است که به‌صورت درختچه بوده و دورگی از نارنگی و کامکوات با میوه کوچک است و عموماً برای اهداف زینتی مطرح می‌شود [۲۷]. لایم‌کوات[4] رقم دیگری‌است که حاصل تلاقی کی‌لایم و کامکوات است و برخی ارقام آنها به‌صورت درختچه زینتی در زیباسازی پاسیو، تراس و فضای سبز کاربرد دارند [۲].

دما از جمله مهمترین فاکتورهای محیطی محدودکنندهٔ تنوع و پراکنش جغرافیایی گیاهان است [۴۴]. ایران، کشوری با سابقه وقوع یخبندان‌های متعدد است و از جمله یخبندان‌های ثبت‌شده می‌توان به یخبندان سال‌های (۱۳۴۲، ۱۳۴۷، ۱۳۵۴، ۱۳۸۶، ۱۳۹۲ و۱۳۹۵ هجری شمسی) اشاره کرد که در اثر آن، بسیاری از درختان و درختچه های زینتی کشور به‌ویژه استان‌های شمالی خسارت دیدند [۲]. بنابراین، یکی از موارد مهم در انتخاب ارقام مناسب برای منظرسازی، شناخت میزان مقاومت آنها نسبت به تنش دمای پایین، به‌ویژه شرایط یخبندان است که جزء مهم ترین چالش‌های مدیریت نگهداری مواد گیاهی در فضای‌سبز محسوب می‌شود.

تنش دمای پایین یکی از مهمترین تنش‌های زیستی غیرزنده و محدودکنندهٔ رشد و بهره‌وری گیاهان است که باعث کاهش عملکرد و در نهایت مرگ آنها می‌شود [۲۰]. فتوسنتز جزء نخستین فرآیندهایی است که درگیاهان عالی تحت تأثیر دمای پایین قرار می‌گیرد. در تنش دمای پایین به علت عدم تعادل بین نور دریافتی و فتوسنتز، احتمال وقوع تنش اکسیداتیو وجود دارد که ناشی از افزایش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن است [۹]. به‌طوری که با کاهش دما به‌علت تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی (رنگدانه‌های کلروفیل) و افزایش تولید کاروتنوئیدها به‌ویژه در غشاء تیلاکوئیدی، علائم مختلفی مانند پژمردگی، کلروز یا همان زردی برگ ها و نکروز (مرگ بافت) در گیاهان مشاهده می‌شود [۱۳و۴۴]. بر این اساس، کاهش میزان رنگدانه‌های کلروفیل در بلوط سبز [۴۲] و زیتون [۱۱] و به دنبال آن بروز عارضه کلروز (زردی برگ‌ها) در درختان پرتقال والنسیا [۳۷] و لیمو [۱] تحت تنش دمای پایین گزارش شد.

یکی از واکنش‌هایی که در حضور گونه‌های فعال اکسیژن سرعت تخریب بیشتری پیدا می‌کند، پراکسیداسیون

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

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 به‌حالت کریستاله شده و یخ درون‌سلولی تشکیل می‌شود. همچنین به‌دنبال آن، فرآیند آب گزیدگی و نشت‌یونی افزایش می یابد که دلیل آن واکنش گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط دمای پایین با اسیدهای چرب است که باعث آب گزیدگی و سپس نشت محتوای سلولی، خشکی سریع و در نهایت مرگ سلول می‌شود [۲۸]. در گیاه زیتون دمای پایین سبب ایجاد نشت یونی و آب گزیدگی 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 می گیرد، 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 تحمل پذیری 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 مرحلهٔ سازگاری به تنش دمای پایین با تجمع آبسیزیک اسید در برگ‌های خود موجب فعالیت برخی از ژن‌ها و تغییراتی در قندهای درون سلول می‌شوند که در نتیجهٔ 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، ازطریق بکارگیری ترکیبات آنتی اکسیدانی (آنزیمی یا غیرآنزیمی) ادامهٔ حیات را در شرایط مذکور بهبود می‌بخشند. در پژوهشی که بر روی سازگاری لیمو انجام گرفت مشخص شد که در شرایط تنش، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی، در ارتقاء تحمل پذیری این گیاهچه به تنش دمای پایین تأثیرگذار بود [۶]. در زمینهٔ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می توان به این نکته اشاره داشت که سوپراکساید دیسموتاز، جزء نخستین آنزیمی است که در فرآیند خنثی سازی گونه های فعال اکسیژن دخالت دارد. این آنزیم با تبدیل گونهٔ سوپراکساید به مولکول پراکسید هیدروژن، اقدام به خنثی سازی سوپراکساید می کند [۲۱]. بر این اساس در پژوهش انجام گرفته روی گیاهچه های بذری مرکبات تحت تنش یخبندان افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسایددیسموتاز گزارش شد [۴].

بنابراین، می توان اینگونه بیان کرد که تنش دمای پایین می تواند یکی از فاکتورهای بسیار مخرب در مرکبات، همچنین ارقام زینتی آن به‌شمار آید. همانگونه‌که بیان شد مرکبات زینتی مذکور پتانسیل بالایی برای کاربرد در فضای سبز شهری به‌ویژه منظرسازی و طراحی فضای‌سبز دارند، اما باتوجه به سابقهٔ وقوع یخبندان‌های متعدد و حساسیت بالای برخی از ارقام مرکبات زینتی به دمای پایین، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی شاخص های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ارقام زینتی 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 زینتی مورد

استفاده در فضای سبز، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در پژوهشکدهٔ مرکبات و میوه های نیمه گرمسیری کشور در سال ۱۳۹۴ اجرا شد. فاکتورها شامل دمای پایین در چهار سطح (۳، ۰، ۳- و ۶- درجهٔ سلسیوس) و چهار رقم مرکبات زینتی شامل (کامکوآت، انگشت بودا، کالاموندین، لایم‌کوآت) 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 به‌منظور سازگاری ترکیبات گیاهی به‌کاهش دما، نهال‌ها به‌درون انکوباتور با رطوبت نسبی ۵±۶۵ 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 نوری‌است که طی ۱۲ساعت روشنایی ساطع می‌شود). کاهش دمای محیط از دمای طبیعی رشد به‌صورت تدریجی روزانه یک درجهٔ سانتی‌گراد بود سپس نهال ها به‌مدت 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، به‌صورت قطعاتی به ابعاد یک سانتی‌مترمربع برش داده شد و به درون لولهٔ آزمایش درپوش‌دار حاوی ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر منتقل شد. این نمونه ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر شدند و مقدار هدایت‌الکتریکی اولیه محلول (EC_1)، با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج[1] ساخت چین اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو و پس از سرد شدن، هدایت‌الکتریکی ثانویه (EC_2) قرائت شد. مقدار نشت یونی بر اساس درصد و با استفاده از فرمول (۱) محاسبه شد [۳۰].

$$\text{درصد نشت یونی} = (EC_1/EC_2) \times 100 \quad (۱)$$

برای محاسبهٔ درصد آب‌گزیدگی برگ[2]، بلافاصله بعد از وقوع تنش یخبندان، سطح کل و سطح آب‌گزیده نمونه برگ‌های مورد مطالعه با استفاده از دستگاه سطح‌سنج برگ[3] اندازه‌گیری شد و میزان درصد آب‌گزیدگی برگ بر اساس فرمول (۲) محاسبه شد [۴۴].

$$\text{درصد آب‌گزیدگی برگ} = (\text{سطح آب‌گزیدهٔ برگ} / \text{سطح کل برگ}) \times 100 \quad (۲)$$

برای اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدهای محلول برگ، یک هفته بعد از اعمال تنش دمای پایین، ۰/۲ گرم نمونهٔ برگی به ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد خنک اضافه و پس از آن به مدت پنج دقیقه در ۱۴۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ[4] ساخت آلمان شد. پس از افزودن پنج میلی‌لیتر استون به‌محلول بالایی، با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از اسپکتروفوتومتر[5] 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]:

$$Chla = 12.7\ A663 - 2.63\ A645 \quad (۳)$$

$$Chlb = 22.9\ A645 - 4.68\ A663 \quad (۴)$$

$$Total\ Chl = Chla + Chlb \quad (۵)$$

$$Total\ Carotenoid = (1000\ A470 - 1.8\ Chla - 85.02\ Chlb)\ /198 \quad (۶)$$

برای اندازه‌گیری میزان پرولین، ۰/۳ گرم از نمونه‌های

1. Mettler-Toledo Gmbh Model

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

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

اندازه‌گیری قندهای محلول برگ، از طریق به‌کارگیری روش فنل سولفوریک، که مبتنی بر آبگیری 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 و۱- دی فنیل پیکریل هیدرازیل[1] استفاده شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر عصارهٔ استخراجی با ۹۰ مایکرولیتر محلول DPPH (۶ میلی مولار) مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریک (دمای اتاق) نگهداری شد. برای آماده‌سازی تیمار کنترل، به‌جای 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 درفرمول ارائه شده، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر مبنای درصد جمع‌آوری رادیکال آزاد طبق فرمول ۷ محاسبه شد [۱۸].

(۷)

درصدجمع آوری رادیکال آزاد =

۱۰۰× (جذب کنترل / جذب نمونه – جذب کنترل)

مالون‌دآلدئید[2]، محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای‌چرب غیراشباع است که با تیوباربیتوریک‌اسید واکنش داده و تشکیل کمپلکس رنگی می‌دهد. به‌این منظور نخست ۰/۱ گرم از نمونه‌های برگی با دو میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک‌اسید پنج درصد مخلوط و به‌شدت تکان داده شد. سپس نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ و فاز رویی آن جدا شد. در ادامه یک میلی‌لیتر از عصارهٔ واکنش با چهار میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد تری باربیوتوریک اسید مخلوط و محلول واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سردشدن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ جذب در طول موج های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. غلظت کمپلکس رنگی با استفاده از معادله $A=\varepsilon BC$ محاسبه شد که عدد A شامل کسر جذب ۵۳۲ از ۶۰۰ نانومتر، ε ضریب خاموشی کمپلکس با مقدار عددی $155 mM^{-1} cm^{-1}$، B عرض کووت و C غلظت کمپلکس است که برحسب میلی‌مول بر گرم وزن تر برگ، محاسبه شد [۳۲].

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، نخست نمونه های برگی با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج وسانتریفیوژ 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 اسپکتروفوتومتر بر مبنای واحد آنزیمی در میلی‌گرم وزن‌تر برگ بیان شد [۴۰].

1. DPPH

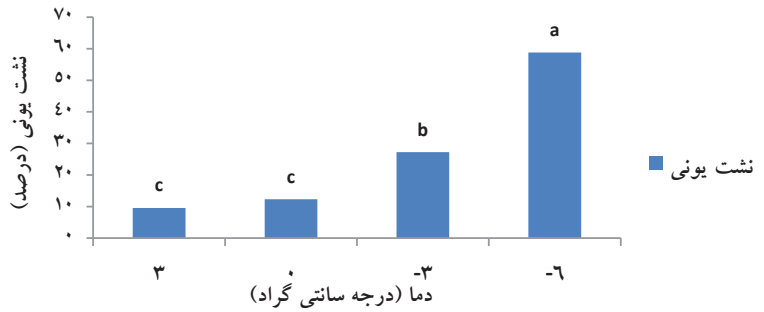
2. MDA

پس از اجـرای پـژوهش و جمـع آوری داده هـا، آنـالیز واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات بـا اسـتفاده از نرم افزار آماری SAS (نسخه ۹/۰) انجـام شـد. مقایسـهٔ میانگین هر صفت نیز با استفاده از آزمون توکی و در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

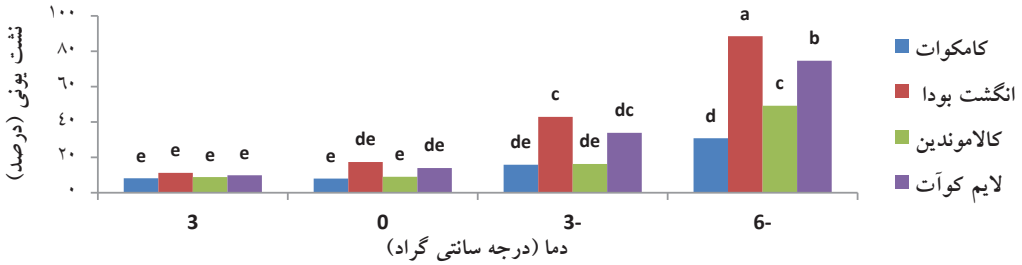
۳. نتایج و بحث

۱.۳. نشت یونی

نتایج نشان داد که با کاهش دما نشت یونی به‌طـور معنـادار افزایش یافت. بیشترین میزان نشت یونی (۵۸/۸ درصد) در تیمار دمایی ۶- درجهٔ سانتی‌گراد و کمتـرین مقـدار (۹/۵۴ درصد) در دمای ۳ درجهٔ سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۱). با کاهش دما و در پایین ترین سطح دمایی (دمای ۶- درجهٔ سلسیوس) بیشترین مقدار خسارت نشت یونی در انگشـت بودا و کمترین مقدار آن، در کامکوات مشاهده شد (شـکل ۲). گزارش های بسیاری وجود دارد که بیان کننـدهٔ افـزایش تنش اکسیداتیو در شرایط دمای پایین است [۱۱]. گونه های فعـال اکسـیژن بـا تـأثیر بـر غشـای سـلولی، منجـر بـه پراکسیداسـیون لیپیـدهای غشـاء، تغییـر در نفوذپـذیری و سیالیت آن (نشـت الکترولیـت هـا بـه خـارج از سـلول) و خسارت به سلول‌های گیاهی می‌شوند [۲۷]. هرچـه میـزان نشت یون‌ها به فضای بیرون سلول بیشتر باشـد، خسـارت وارده به غشاء سلولی بیشتر می شود. افزایش میـزان نشـت یونی برگ در نهال‌های قهوه [۱۴] تحت تنش دمای پـایین گزارش شد که نتایج آن تأییدکننده این مطلب است.



شکل ۱. اثر دما بر میزان درصد نشت یونی



شکل ۲. اثر سطوح مختلف دما بر شاخص نشت یونی برگ کامکوآت، انگشت بودا، کالاموندین و لایم‌کوآت

۲.۳. آب‌گزیدگی

جدول مقایسه میانگین اثر ساده رقم بر میزان آب‌گزیدگی برگ نشان داد که در بین ارقام زینتی مورد مطالعه، انگشت بودا بیشترین خسارت آب گزیدگی را نشان داد (جدول ۱). همچنین اثر دما بر آب‌گزیدگی نشان داد که شروع آب‌گزیدگی از دمای ۳- درجهٔ سانتی‌گراد بوده و در دمای ۶- درجهٔ سانتی‌گراد به بالاترین مقدار خود رسید (جدول ۲). اثر متقابل رقم و دما بر شاخص آب‌گزیدگی برگ نشان داد که در دمای ۶- درجهٔ سانتی‌گراد بیشترین مقدار آب گزیدگی در انگشت بودا مشاهده شد (شکل ۳). در توجیه این نتایج می توان این‌گونه استدلال کرد که بر اثر تنش یخبندان با افزایش نشت یونی، خروج آب از درون سلول به‌فضای بیرون صورت گرفته که در چنین وضعیتی احتمال بروز پدیدهٔ آب گزیدگی برگ نیز وجود دارد. بنابراین، افزایش همزمان نشت‌یونی و پدیده آب گزیدگی برگ ارقام زینتی مورد مطالعه می‌تواند تأییدکننده این استدلال باشد. گزارش مشابهی در خصوص تأثیر تنش یخبندان بر آب گزیدگی برگ گیاهچه بذری هلو [۲۶] و ارقام حساس مرکبات [۱۷] ارائه شده، که مطابق نتایج این مطالعه است.

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

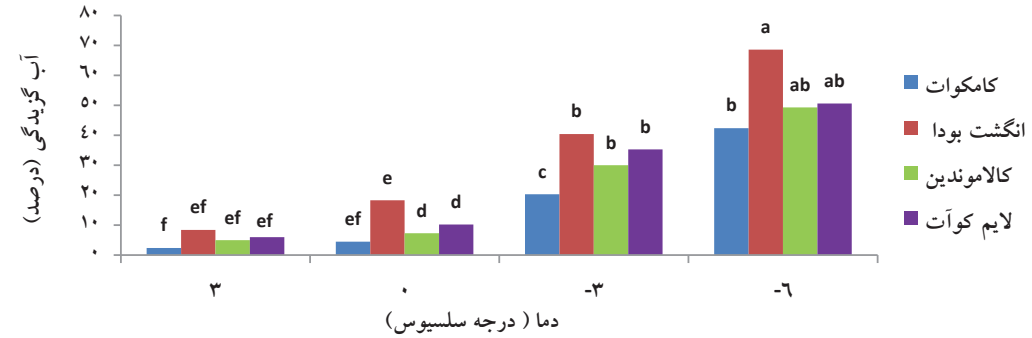
رقم	صفات				
	آب‌گزیدگی (٪)	پرولین (mg/gFW)	قندهای محلول (mg/gFW)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (٪)	مالون دآلدئید (µg/gFW)
کامکوات	۲۰/۹۲d	۲۰/۱۸a	۵۶/۹a	۴۴/۳۳b	۱/۱۷ab
انگشت بودا	۳۹/۷۵a	۱۲/۵۷b	۴۰/۷b	۴۶/۳۶ab	۱/۵۵a
کالاموندین	۲۹/۵c	۱۸/۰۳a	۵۰/۱ab	۵۱/۳۲a	۰/۹۶b
لایم کوآت	۳۳/۹b	۱۳/۲b	۴۳/۶b	۴۱/۳۱b	۱/۲۲ab

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

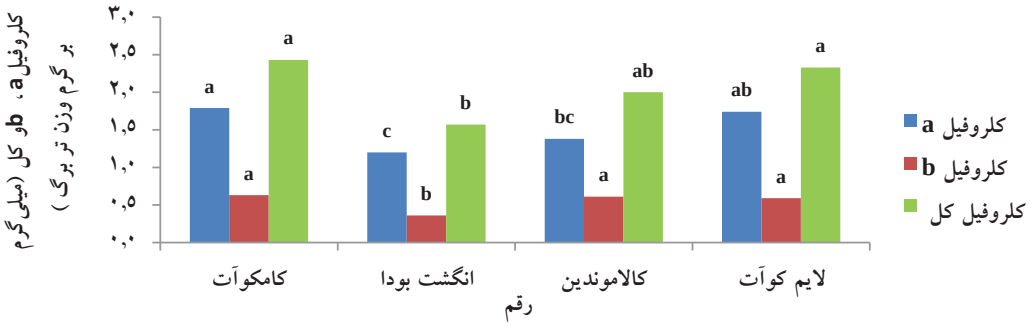
جدول ۲. مقایسه میانگین اثر دما بر صفات آب‌گزیدگی، کلروفیلa وکل، کاروتنوئید، پرولین قندهای محلول وظرفیت آنتی‌اکسیدانی

دما (درجه سلسیوس)	صفات						
	آب گزیدگی (٪)	کلروفیلa (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 درهر ستون با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، از لحاظ آماری معنادار نیستند.



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



شکل ۴. اثر رقم بر محتوای کلروفیلa،b و کل

۳.۳.کلروفیلa، b و کل و کاروتنوئید

مقایسهٔ 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 به‌طور معناداری کاهش یافت. بیشترین مقدار کلروفیل a (۲/۰۱ میلی گرم 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- درجهٔ سانتی‌گراد مشاهده شد (جدول ۲). نتایج آثار متقابل نیز نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل a و کل دربالاترین سطح دمایی (۳ درجه سانتی‌گراد) در کامکوات مشاهده شد و کمترین میزان این دو شاخص نیز در پایین ترین سطح دمایی (۶- درجهٔ 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 دمای پایین و یخبندان به احتمال زیاد در ارتباط با افزایش رادیکال های فعال اکسیژن، وقوع پدیده پراکسیداسیون و در نتیجه تخریب این رنگدانه‌ها در غشای کلروپلاست و تیلاکوئیدها است [۳۵]. کاهش رنگدانه های 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 دمای پایین، افزایش کاروتنوئیدها گزارش شد که با نتایج این آزمایش مشابه است.

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

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

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

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

۴.۳. پرولین

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

وزن مولکولی کم که مواد محلول سازگار نامیده می‌شود تجمع می یابد. 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 می برد [۸]. پرولین در سلول های تحت تنش، نقش آنتی اکسیدانی دارد و با تجمع در سیتوپلاسم سلول‌ها از طریق کاهش پتانسیل اسمزی درون سلولی تجمع نمک در واکوئل را تنظیم می کند. در شرایط تنش، پرولین، جاروکننده گونه های واکنشگر اکسیژن (ROS) است و سبب افزایش سنتز سلولی در طول تنش در گیاهان شده و تأثیر مهمی در افزایش تحمل پذیری گیاه به شرایط تنش دارد [۲۹و۱۵].

۵.۳. قندهای محلول

نتایج مقایسه میانگین داده‌های چهار رقم مرکبات زینتی نشان داد که از لحاظ تأثیر رقم بر میزان قندهای محلول برگ، کامکوآت با میانگین (**۵۶/۹** میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) در رتبهٔ اول و کالاموندین، لایم کوآت و انگشت بودا به‌ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (جدول۱). همچنین عامل دما در افزایش مقدار قندهای محلول برگ تأثیرگذار بود به‌طوریکه بیشترین مقدار قندهای محلول (**۶۸/۱** میلی گرم بر گرم وزن تر برگ) بوده که در تیمار دمایی صفر درجهٔ 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 می توان استنباط کرد که تجمع ترکیبات 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 نشان‌داد که حداکثر مقدار این صفت در دمای ۳- درجهٔ سانتی‌گراد مشاهده شد درحالیکه که دمای ۳ درجهٔ سانتی‌گراد کمترین مقدار را داشت (جدول ۲). با کاهش دما تا ۳- درجهٔ 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 آنتی اکسیدانی در شرایط دمای پایین مرتبط است. بر این

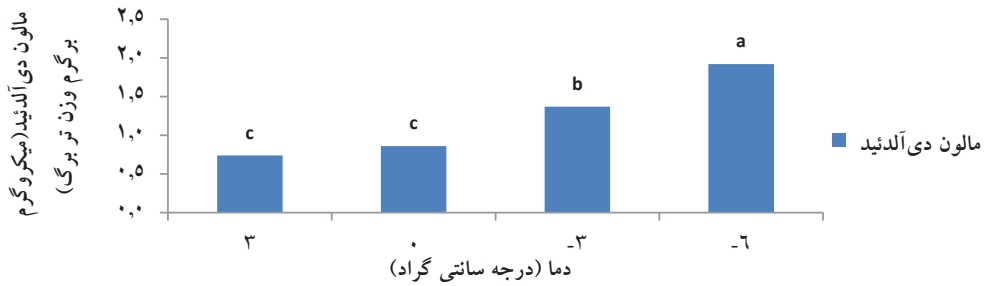
اساس می‌توان افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کامکوات تحت تنش یخبندان را با مکانیسم دفاعی متابولیتی آنتی‌اکسیدانی رقم مذکور مربوط دانست. نتایج پژوهش روی دو رقم انگور نشان داد که در شرایط تنش دمای پایین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌میزان چشمگیری افزایش یافت [۲۴]. در گزارشی دیگر که روی چند رقم مرکبات انجام گرفت نیز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

۷. پراکسیداسیون لیپیدها (مالون‌دی آلدئید)

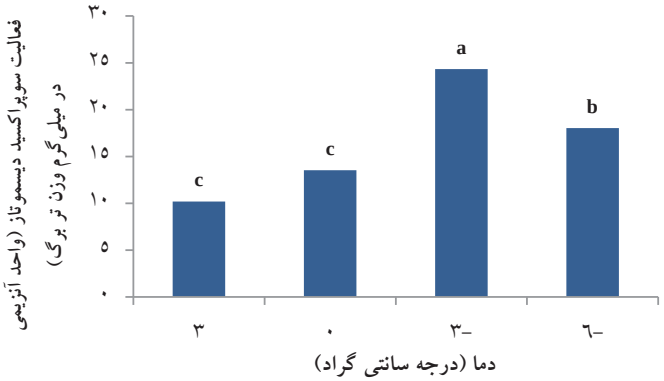
مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان داد که کمترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید مربوط به رقم زینتی انگشت بودا و بیشترین آن در کامکوات مشاهده شد (جدول ۱). همچنین حداقل مقدار مالون دی آلدئید در دمای ۳ درجهٔ سانتی‌گراد (۰/۷۴ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) مشاهده شد پس از آن با کاهش دما این میزان رو به افزایش گذاشت و در دمای ۶- درجهٔ 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 زینتی مختلف در حفظ تعادل بین آنزیم‌های تبدیل‌کننده اسیدهای‌چرب 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 تحمل پذیری به دمای پایین در آن گیاه است [۲۷و۳]. در پژوهش‌های متعدد به ارتباط دمای پایین و افزایش 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

مقایسهٔ 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- درجهٔ 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 سوپراکساید دیسموتاز افزایش یافت و حداکثر مقدار فعالیت این آنزیم در دمای ۳- درجهٔ سانتی‌گراد در کامکوآت مشاهده شد (جدول ۳). در شرایط دمای پایین گونه های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید به‌عنوان پیام‌هایی عمل می کنند 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.



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



شکل ۶. اثر دما بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسایددیسموتاز

۴. نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که شروع اغلب واکنش های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در این چهار رقم، از تیمار دمایی ۳ و صفر درجهٔ سانتی‌گراد بود. با کاهش دما، مقدار نشت یونی و آب‌گزیدگی برگ در بین رقم‌های بررسی شده افزایش یافت، اگرچه میزان تغییر این صفات در رقم‌های مختلف متفاوت بود. بر این اساس، بیشترین مقادیرِ 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 سوپراکساید دیسموتاز در شرایط دمای پایین، امکان تحمل پذیری بیشتر کامکوات را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو در دوره تنش نشان داد. بنابراین، می‌توان این‌گونه بیان کرد که تحمل‌پذیری چهارگونهٔ زینتی مرکبات به تنش دمای پایین به‌ترتیب شامل کامکوآت، 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، دربارهٔ استفاده از کامکوات و همچنین دو رقم دیگر در فضاهای سبز شهری به خصوص شمال ایران، محدودیت خاصی وجود ندارد.

منابع

۱. تاجور ی. (۱۳۹۰) پاسخ دو رقم تجاری مرکبات (Citrus sp.) روی دو پایه تحت تنش دمای پایین. رسالهٔ دکتری. دانشگاه گیلان. گیلان، ص۱۰٤-۱۲۰.

۲. تاجور ی.، قاسمی م. و فیفایی ر. (۱۳۹۲) سرمازدگی در مرکبات و راه های کنترل آن. نشریهٔ فنی ٤۳٥٦۱ مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی. انتشارات مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور. رامسر. ص۳۰-۳٤.

۳. کریمی ن. و سوری ز. (۱۳۹٤) بررسی اثر متقابل آرسنیک و فسفر بر محتوی کلروفیل و میزان تجمع مالون دآلدهید در گیاه Isatis cappadocica. فرآیند و کارکرد گیاهی. ۱۱(٤): ۸۰-۸۳.

۴. گلوانی م. (۱۳۸۸) ارزیابی پروتئین‌های آنتی‌فریز در دو گونهٔ مرکبات کشت‌شده در شمال ایران. پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد. گروه بیوشیمیایی دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه گیلان.

۵. قربانلی م.ل.، نوجوان م.، حیدری ر. و فربودنیا (۱۳۸۰) تغییرات قندهای محلول، نشاسته و پروتئین ها در اثر تنش خشکی در دو رقم نخود ایرانی (Cicer arietnum L.). نشریهٔ علوم دانشگاه تربیت معلم. ۱ (۱): ۳۸-۵۳.

۶. نجف‌زاده م. (۱۳۸۹) بررسی اثرات پلی‌آمین و کلسیم بر دانهال‌های بذری مکزیکن لایم (Citrus aurantifolia) تحت تنش دمای پایین. پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان. صص ٤۲-٤٥.

۷. نظامی الف. و ناقدی‌نیا ن. (۱۳۸۹) اثر تنش یخ‌زدگی بر نشت الکترولیت ها در شش رقم گلرنگ. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. ۸ (٦): ۸۹۱-۸۹٦.

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. Azzareollo 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 Tears 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.

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., Sangam1 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. Kr´ol 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 P13hysiology. 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. Hortic-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, Ecosysyems 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., Vojtich 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., hi-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 Valashkolee[1], Yahya Tajvar[2], Masoud Azadbakht[3], 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.

Corresponding Author: z_rafierad@znu.ac.ir