

بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و میزان بیان ژن *Ptcorp* نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار بر پایه نارنج به تنش سرما

علی صالحی ساردویی^{۱*}، مهدی شریفانی^۲، مصطفی خوشحال‌سرمست^۳ و محمود قاسم‌نژاد^۴

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۳۰)

چکیده

تنش دمای پایین، یکی از عوامل محیطی مهم محدودکننده در توسعه کشت و تولید مرکبات است. در این پژوهش تأثیر تنش دمای پایین بر شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار بر روی پایه نارنج (نهال دوساله) بررسی گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با اعمال تیمار دماهای پایین (۸-، ۴-، ۴+ درجه سانتی‌گراد) بر دو رقم نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار اجرا شد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بالاترین بیان نسبی ژن *Ptcorp* در دمای ۴- درجه سلسیوس و بیشترین مقدار نشت یونی برگ و کمترین میزان رنگدانه کلروفیل a، کارتنوئید و کلروفیل کل در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد در گریپ‌فروت به دست آمد. محتوای رطوبت نسبی برگ با کاهش دما تا ۸- درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. بیشترین مقدار پراکسیداسیون لیپید (۱/۵۵ میکروگرم در گرم وزن تر برگ مالون‌دی‌آلدئید)، فلاونوئید کل (۳۰/۴۲ میلی‌گرم کوئرستین در گرم بافت تازه برگ) نیز در دمای ۴- درجه در گریپ‌فروت بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز به ترتیب با میانگین ۳۶/۳۶ میکرومولار بر گرم وزن تازه در دقیقه، ۵۹/۳ واحد آنزیمی در میلی‌گرم وزن تازه و ۱۶۱/۳ میکرومول بر گرم وزن تازه، در نارنگی، گریپ‌فروت و نارنگی در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد حاصل شد. گیاهچه نارنگی ژاپنی بر روی پایه نارنج تا دمای ۸- درجه سانتی‌گراد در طی مرحله سازگاری (به دمای پایین) آثار تخریبی نداشت به طوری که نهال‌ها پس از اتمام مرحله تیمار و بازگشت از تنش یخبندان به رشد عادی خود برگشتند، لیکن در گریپ‌فروت رابی‌استار در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد اغلب برگ‌ها علائم تخریبی چون جمع شدن برگ را نشان دادند.

کلمات کلیدی: ارقام مرکبات، بیان ژن، پایداری غشا، تحمل‌پذیری، ریل‌تایم، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

۱- دانشجوی دکترای علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۴- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران.

* پست الکترونیک: alisalehisardoei@gau.ac.ir

مقدمه

مرکبات جزء محصولات مناطق نیمه‌گرمسیری و متعلق به خانواده روتاسه بوده که اغلب گیاهان تجاری موجود در این خانواده به دلیل همیشه‌سبز بودن، نسبتاً حساس به تنش دمای پایین هستند (تاجور و همکاران، ۱۳۹۱). در بین استان‌های تولیدکننده مرکبات در کشور، مازندران با عملکرد ۸۸/۱ میلیون تن، رتبه اول تولید را به خود اختصاص داده است (فائو^۱، ۲۰۱۹).

تنش دمای پایین جزء تنش‌های غیرزیستی است که از اثرات منفی آن بر گیاهان می‌توان به اختلال در فتوسنتز، تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن، آسیب به غشاء سلولی، تخریب رنگدانه‌های گیاهی و اسیدهای نوکلئیک، اشاره کرد (شانکر و ونکاتسورلو^۲، ۲۰۱۱). یکی از اثرات منفی تنش دمای پایین، اختلال در فرآیند انتقال الکترون در عرض غشاء تیلاکوئید بوده که منجر به تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده که می‌تواند، تخریب کلروفیل‌های گیاهی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی را به همراه داشته باشد (ژانگ^۳ و همکاران، ۲۰۱۲؛ حسن‌زمان^۴ و همکاران، ۲۰۲۰a).

یکی از واکنش‌هایی که در حضور انواع رادیکال‌های فعال اکسیژن سرعت پیدا می‌کند، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که باعث تولید آلدئیدهایی مثل مالون‌دی آلدئید (MDA) می‌شود (حسن‌زمان و همکاران، ۲۰۲۰b). رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌توانند با گروه‌های متیل اسیدهای چرب غیراشباع وارد واکنش شده و رادیکال‌های فعال اسید چرب تولید نمایند. رادیکال‌های شکل گرفته بسیار واکنش‌گر بوده که قادر به شروع واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون لیپید می‌باشد. تداوم این وضعیت موجب از هم گسیختگی ساختار غشاء و خروج آب و یون‌ها از سلول می‌شود (حسین^۵ و همکاران، ۲۰۲۱). مطالعه انجام گرفته بر روی برخی از ارقام تاک (کریمی و همکاران، ۱۳۹۴) و انار (صلاح‌ورزی و همکاران، ۱۳۸۹) مشخص کرد که با کاهش دما، پراکسیداسیون غشا و نشت یونی افزایش یافت.

در شرایط تنش سرما برخی گیاهان سعی می‌کند تا از طریق تغییراتی در فرایندهای فیزیولوژیکی و بکارگیری

سیستم آنتی‌اکسیدانی، بقاء خویش را حفظ کنند (تاجور و همکاران، ۱۳۹۰). یکی از مسائل مطرح سازگاری در زمان وقوع تنش یخبندان، حفظ محتوای آب و جلوگیری از انجماد سیتوپلاست بوده که عموماً گیاهان از طریق افزایش اسمولیت‌ها در مقابله با چالش ذکر شده انجام می‌دهند (مشایخی و همکاران، ۱۳۹۳). مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بسیاری از گیاهان در واکنش به تنش‌های محیطی مانند تنش سرما افزایش می‌یابد و این واکنش فیزیولوژی می‌تواند بر مقاومت ماده گیاهی تحت تنش تأثیرگذار باشد، در گزارش علمی نقش عمده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در پایداری گیاهان تحت تنش را به تأثیر بر پتانسیل اسمزی مرتبط دانستند، افزایش مقاومت به سرما با مقدار اسمولیت‌ها نیز در ارتباط است (افشاری و همکاران، ۱۳۹۳) بر این اساس در پژوهش‌های انجام شده در مدیریت کم آبیاری انگور (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۲) این گونه عنوان شده است که مدیریت کم آبیاری با تأثیرگذاری بر افزایش تولید ترکیبات موثر بر پتانسیل اسمزی توانسته بر سازگاری بیشتر آن‌ها نسبت به تنش دمای پایین، موثر باشد. گزارش شده است که تجمع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فلاونوئیدی به سبب تغلیظ شیره سلولی، دمای انجماد را کاهش داده و باعث حفظ محتوای آب گیاهی و افزایش مقاومت به دمای پایین می‌شوند. سازگاری به سرما موجب تجمع ترکیبات فلاونوئیدی می‌شود که این ترکیبات به طور مثبت با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ارتباط دارند (کریمی و همکاران، ۱۳۹۴).

علاوه بر شاخص‌های فیزیولوژیکی بیان شده، برخی صفات مورفولوژیک در ارزیابی میزان آسیب‌پذیری گیاهان تحت تنش یخبندان، مورد استفاده قرار می‌گیرند (مشایخی و همکاران، ۱۳۹۳). از جمله این صفات در مرکبات می‌توان به سبزی‌نگی برگ در زمان تنزل دما و تغییر رنگ این اندام بعد از وقوع تنش اشاره داشت (تاجور و همکاران، ۱۳۹۰). هدف پروژه حاضر، تعیین حد آستانه تحمل گیاهچه نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار روی پایه نارنج بوده (ژنوتیپ و پایه تجاری در شمال کشور) که از طریق بررسی واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه مربوطه در دامنه مختلف دمایی تنش دمای پایین، انجام پذیرفت.

4. Hasanuzzaman
5. Hossain

1. Annual statistics Horticultural Crops
2. Shanker and Venkateswarlu
3. Zhang

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه و گلخانه بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان با هدف تعیین میزان تحمل به دمای پایین نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار در ۳ سطح دمایی (۴، -۴، -۸ درجه سلسیوس) در سال ۱۴۰۰ اجرا شد. نخست نهال‌های دوساله یکنواخت انتخاب شدند و در داخل گلدان‌های ۱۰ کیلویی از خاک منطقه (بافت لومی‌سیلتی) قرار داده شدند (تاجور و همکاران، ۱۳۹۰). قبل از شروع تیمارهای دمایی به منظور سازگاری ترکیبات گیاهی به کاهش دما، نهال‌ها به درون گلخانه معتدله با دمای روزانه و شبانه 15 ± 1 و 12 ± 1 درجه سلسیوس با رطوبت نسبی 70 ± 5 (پی‌ترینی^۱ و همکاران، ۲۰۰۵) و سپس به سردخانه 4°C درجه سلسیوس با رطوبت نسبی 65 ± 5 منتقل شدند (مبنای این رطوبت، میزان رطوبت مورد نیاز برای رشد مرکبات در مناطق شمالی کشور است، زیرا که متوسط رطوبت نسبی در مناطق شمالی کشور برای رشد و پرورش مرکبات 70% درصد می‌باشد).

شروع کاهش دمای دستگاه Chamber test از دمای 4°C درجه سلسیوس بود. کاهش دمای دستگاه یک و نیم درجه سلسیوس به ازای هر ساعت بود که پس از رسیدن به هر تیمار دمایی، نمونه‌ها به مدت ۱۰ ساعت در دماهای ذکر شده نگهداری و پس از اتمام این دوره زمانی (۱۰ ساعت) نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری صفات انجام گردید (هاشم پور^۲ و همکاران، ۲۰۱۹). با توجه به ماهیت بروز علائمی چون نشت یونی، محتوای نسبی آب (RWC) برگ و LT_{50} بلافاصله بعد از هر تیمار دمایی، شاخص‌های ذکر شده بررسی شدند. بر این اساس سنجش نشت یونی با استفاده از روش ارائه شده توسط سولیوان و رز^۳ (۱۹۷۹) و محتوای نسبی آب (RWC) برگ بر اساس روش ریچی^۴ و همکاران (۱۹۹۰)، انجام شد.

به‌منظور اندازه‌گیری صفاتی همچون سبزی‌نگی برگ (کلروفیل و کاروتنوئید)، فلاونوئید کل، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در مراحل بعد

از تنش، نمونه‌ها سریعاً در ازلت مایع، منجمد و سپس در فریزر 80°C درجه سلسیوس نگهداری و سپس در مراحل بعدی مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.

فلاونوئید کل بر اساس روش بیتس^۵ و همکاران (۱۹۷۳) سنجش شد. پراکسیداسیون لیپیدهای غشا طبق روش کامپوز^۶ و همکاران (۲۰۰۳)، براساس غلظت مالون‌دی‌آلدهید تولید شده (در اثر آسیب به غشا) و سپس واکنش آن با تیوباریبوتیک اسید که ترکیب رنگی تیوباریبوتیک اسید-مالون‌دی‌آلدهید تشکیل می‌دهد، اندازه‌گیری گردید. مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (کلاریون^۷، ۱۹۸۵)، سوپراکسید دیسموتاز (شین^۸ و همکاران، ۲۰۰۶) و آسکوربات پراکسیداز (چانسه و مهلی^۹، ۱۹۹۵) نیز مورد بررسی قرار گرفت. سنجش میزان LT_{50} (لیم^{۱۰} و همکاران، ۱۹۹۸) و میزان سبزی‌نگی برگ مطابق روش بارنز^{۱۱} و همکاران، ۱۹۹۲ اندازه‌گیری شد.

طراحی پرایمر

برای طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *Ptcorp* و ژن کنترل (*EFL*)، توالی‌های مربوط به این ژن‌ها که در بانک جهانی داده‌های زیست‌فناوری وجود دارند، استخراج شدند و به‌وسیله نرم‌افزار بیوآدیت (Bioedit) هم‌ردیف کردن توالی‌ها انجام شد (جدول ۱). نواحی حفاظت شده این ژن‌ها شناسایی گردید و به‌منظور طراحی پرایمر در نرم‌افزار اولیگو ۷ (Oligo7) مورد استفاده قرار گرفتند. کلیه نکات مربوط به طراحی از جمله میزان GC بالای ۵۰ درصد، قرار گرفتن نوکلئوتید G یا C در انتهای ۳' پرایمرها، دمای ۶۰ درجه برای اتصال و طراحی پرایمر از سمت ۵' ژن رعایت شد. در پایان، به‌منظور ارزیابی اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی‌شده از ابزار primer-BLAST سایت NCBI استفاده شد.

ارزیابی بیان کمی ژن‌های هدف به شیوه Real Time PCR

از کیت Maxima SYBR Green/ROXqPCR Master Mix شرکت کیمیا پارس ژن برای انجام واکنش‌های Real Time PCR استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۱ میکرولیتر cDNA به همراه ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس

7. Clarbhone
8. Shen
9. Chance and Maehly
10. Lim
11. Barnes

1. Pietrini
2. Hashempour
3. Sullivan and Ross
4. Ritchie
5. Bates
6. Campos

جدول ۱- مشخصات پرایمرها

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول پرایمر	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)
<i>PtCorp F</i>	GTTTGGTGGGGAAGTTGATG	۲۰	۵۴/۵۵
<i>PtCorp R</i>	CACACTGAACAGGCACAACA	۲۰	۵۴/۳۴
<i>EF1 F</i>	GGTCAGACTCGTGAGCATGC	۲۰	۵۳/۴۸
<i>EF1 R</i>	ATCGTACCTAGCCTTTGAGTACTTG	۲۵	۵۲/۱۲

از آنجایی که این وظیفه این چسب‌ها فیلتر جذب نور فلورسنت است، لازم است که در نظافت آن دقت شود. پلیت بعد از یک ورتکس کوتاه به داخل دستگاه Real Time PCR انتقال داده شد. در نهایت آغازگرهای ویژه هر ژن برای کنترل صحت اتصال و تکثیر به وسیله دستگاه Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

(Master Mix qPCR)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی با غلظت ۱۰ میلی‌مولار و ۹/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود که حجم نهایی آن ۲۵ میکرولیتر بود. نمونه‌های آزمایش به شکل سه‌تایی و عمودی به ۳۶ چاهک پلیت مخصوص Real Time PCR انتقال داده شدند. سپس روی پلیت با استفاده از چسب‌های مخصوص پوشانده شد.

جدول ۲- مواد شیمیایی و مقادیر مورد استفاده برای تیمار - DNase نمونه‌های RNA

RNA	۳ ug
10X DNase I Buffer	۱/۵ µl
RNase INhibitor	۱ ul
DNase I, RNase-free	۱/۵ µl
DEPC treated water	۲۰ µl

در مورد میزان LT_{50} نیز مشاهده گردید که نارنگی ($LT_{50}=7.4$)، تحمل‌پذیری بیشتری را به خود اختصاص داده بود. در نقطه مقابل کمترین میزان تحمل‌پذیری مربوط به گریپفروت ($LT_{50}=2.24$) بود (شکل ۱). در این پژوهش تحمل به یخ‌زدگی در ژنوتیپ‌های مرکبات مورد مطالعه از لحاظ آماری معنی‌دار و قابل توجه بود که این نتایج بیانگر این است که توقف در رشد گیاه، نیاز قطعی برای سازگاری به سرما نیست، همچنین نتایج نشان می‌دهد که مرکبات مانند دیگر درختان چوبی قادرند تا حدودی سرما را تحمل نمایند که به این معنی است که دارای مکانیسم اجتناب از یخ‌زدگی است (جیانگ^۳ و همکاران، ۲۰۲۱). با اینکه درختان مرکبات نسبتاً متحمل به سرما در بین درختان نیمه‌گرمسیری می‌باشند، اما میزان تحمل به یخ‌زدگی بین ژنوتیپ‌های مرکبات متفاوت بود که این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های فیزیولوژیکی و ژنتیکی مرتبط با تحمل به یخ زدگی بین آنها باشد (اریز^۴ و همکاران، ۲۰۱۵). پژوهش‌های انجام شده در مرکبات نشان داد ژنوتیپ‌های متحمل به یخ

تجزیه آماری

داده‌های حاصل از آنالیز بیان ژن با کمک مدل دلتا ($\Delta\Delta Ct$) در نرم‌افزار اکسل^۱ آنالیز شدند (سان^۲ و همکاران، ۲۰۱۶). مقایسه میانگین تیمارهای مختلف در نرم‌افزار SAS وارد شد و از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین ($P<0.05$) گروه‌های مختلف استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) بیانگر آن بود که اثر متقابل دما و ژنوتیپ در صفات‌های پراکسیداسیون لیپید، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، فلاونوئید کل، نشت یونی، محتوای رطوبت نسبی، کلروفیل a، کلروفیل کل، کلروفیل b و LT_{50} در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار بوده است. این در حالی است که اثر متقابل ژنوتیپ و دما بر فعالیت آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، کاروتنوئید در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار گردید (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر دمای پایین بر واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار

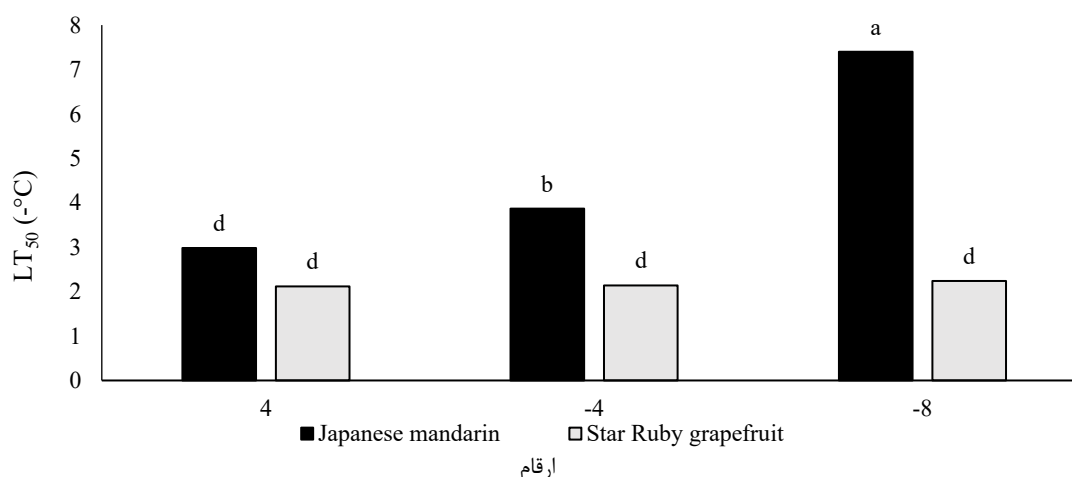
درجه آزادی	LT ₅₀	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	کلروفیل کل	نشت یونی
۱	۱۴۰/۵**	۴/۰۴**	۵۱/۰۱۷/۰ ^{sn}	۱/۹۸**	۳/۵۱**	۸۴۳/۰۹**
۲	۱۳/۳**	۴/۳**	۵۱/۰۱۹**	۰/۰۳ ^{ns}	۱/۹۳**	۹۳۱/۰۵**
۲	۲۱/۸۷**	۰/۶۳**	۰/۰۷۷**	۰/۰۴۵*	۰/۰۷۰**	۱۷۱۰/۴**
۱۰	۰/۸۴۶	۰/۰۵۱	۰/۰۰۵۸	۰/۱۸۵	۰/۰۷۳	۱/۲۹
-	۱۶/۸	۱۹/۵۴	۱۱/۸۷	۱۷/۶۱	۱۵/۱۱	۴/۳۱

**، *، ^{ns} به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار در سطح ۵ درصد آماری آزمون دانکن

جدول ۱ (ادامه) - تجزیه واریانس اثر دمای پایین بر واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار

درجه آزادی	محتوای رطوبت نسبی	فلاونوئید کل	پراکسیداسیون لیپید	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز
۱	۲۷۱۷/۵**	۶۰۶/۱**	۱/۲**	۱۷۸۰/۰۵**	۱۶/۰ ^{sn}	۵۵/۵ ^{sn}
۲	۱۸۱۸/۳**	۱۹۶/۳**	۰/۰۸**	۴۳۰/۱/۵**	۹۸/۳**	۲۵۱۰/۷**
۲	۸۶۳۷/۷**	۲۵۶/۲**	۰/۶۵**	۲۳۸/۲**	۱/۶۵*	۶۷/۳۸*
۱۰	۴۰/۲۰	۰/۶۰	۰/۰۰۴۴	۱۱/۱۸	۰/۳۶۷	۱۳/۵۵
-	۶/۵	۷/۴۷	۸/۱۲	۲/۶۴	۱/۹۴	۹/۳۱

**، *، ^{ns} به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار در سطح ۵ درصد آماری آزمون دانکن



شکل ۱- اثر برهمکنش دما و ژنوتیپ بر LT₅₀ نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار. میانگین‌ها با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد در گریپ‌فروت مشاهده شد. بیشترین میزان کلروفیل a، کارتنوئید و کلروفیل کل در نارنگی در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد بود. در مورد میزان کلروفیل b نیز مشاهده گردید که گریپ‌فروت در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار این صفت را به خود اختصاص داده بود. در نقطه مقابل کمترین میزان کارتنوئید ۰/۲۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بود که در گریپ‌فروت در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۲).

زدگی، عموماً غشا سیتوپلاسمی پایدارتر و نشت الکترولیت کمتری نسبت به ارقام حساس دارند (مولرینگ^۱ و همکاران، ۲۰۱۰).

برهمکنش ژنوتیپ و دما بر صفات کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل در سطح آماری ۱ درصد و بر میزان کارتنوئید در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، بر این اساس مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد (شکل ۲) که کمترین میزان رنگدانه کلروفیل a، کارتنوئید و کلروفیل کل

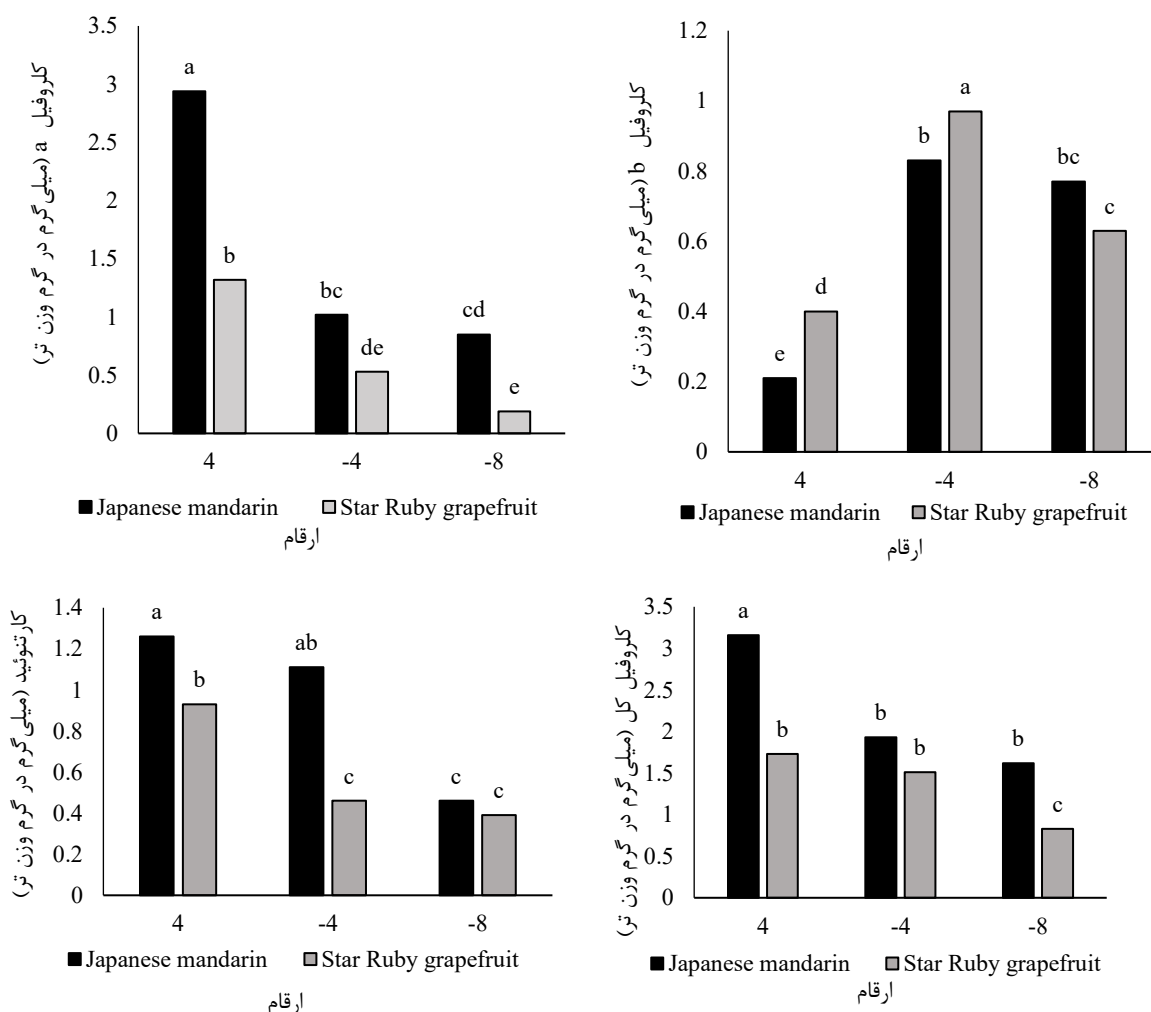
کاهش کلروفیل در ژنوتیپ‌های مورد نظر می‌تواند ناشی از اکسیداسیون این رنگدانه‌ها در غشاء تیلاکوئید باشند (تاجور و همکاران، ۱۳۹۱). به عبارت دیگر افزایش پراکسیداسیون لیپید (ناشی از افزایش تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن) به موازات کاهش رنگدانه‌های کلروفیل می‌تواند توجیه‌کننده تفسیر فوق باشد، در ارزیابی واکنش گریپ‌فروت در مواجهه با تنش یخبندان، تخریب رنگدانه‌های کلروفیل اشاره شده که با نتایج این آزمایش هماهنگی دارد (قزوینی^۱ و همکاران، ۲۰۰۸). کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل کل این تحقیق به علت کاهش عوامل لازم جهت سنتز کلروفیل و تخریب ساختمان آن تحت تأثیر رادیکال‌های فعال اکسیژن است (فهمی‌راد و همکاران، ۱۳۹۲). در خصوص کاهش کاروتنوئیدها و ثبات مقدار کلروفیل a در این آزمایش می‌توان این گونه استنباط نمود که احتمالاً کاهش کاروتنوئیدها به علت اکسید شدن این رنگدانه توسط رادیکال فعال اکسیژن بوده که از این طریق می‌تواند کلروفیل a را از گزند مولکول‌های اکسیژن یکتایی حفاظت کند (ولیزاده-کامران^۲ و همکاران، ۲۰۱۷). کاهش میزان سبزی‌نگی برگ با افزایش تنش به این علت است که با افزایش برخی از مواد تنظیم‌کننده رشد نظیر اتیلن و اسید آبسزیک در اثر تنش فعالیت کلروفیل‌از تحرک و با تجزیه کلروفیل، کلروفیلید آزاد و در مراحل بعدی با باز شدن حلقه‌های پورفیرینی این محصولات به صورت فعال به واکوئل منتقل می‌شوند. نتایج فعالیت‌های پژوهشی پژوهشگران در این رابطه نشان می‌دهد که با کاهش دما در مرکبات فعالیت کلروفیل‌از به طور ناگهانی زیاد می‌شود که خود مؤید این مسئله است (خان^۳ و همکاران، ۲۰۱۴). همچنین گزارش شده است تنش سرما غلظت کلروفیل b را بیش از کلروفیل a کاهش می‌دهد. بنابراین منجر به افزایش نسبت کلروفیل a به b می‌گردد (محمدرضاخانی^۴ و همکاران، ۲۰۲۱). در آزمایش حاضر نیز با کاهش دما نسبت کلروفیل a به b افزایش پیدا نمود (شکل ۲).

مقایسه میانگین تنش یونی (شکل ۳) نشان داد که با توجه به نوع ژنوتیپ، بیشترین میزان این صفت در دمای ۸- سانتی‌گراد رخ داد. به طوری که در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد کمترین میزان تنش یونی برگ (۲/۲۴ درصد) در

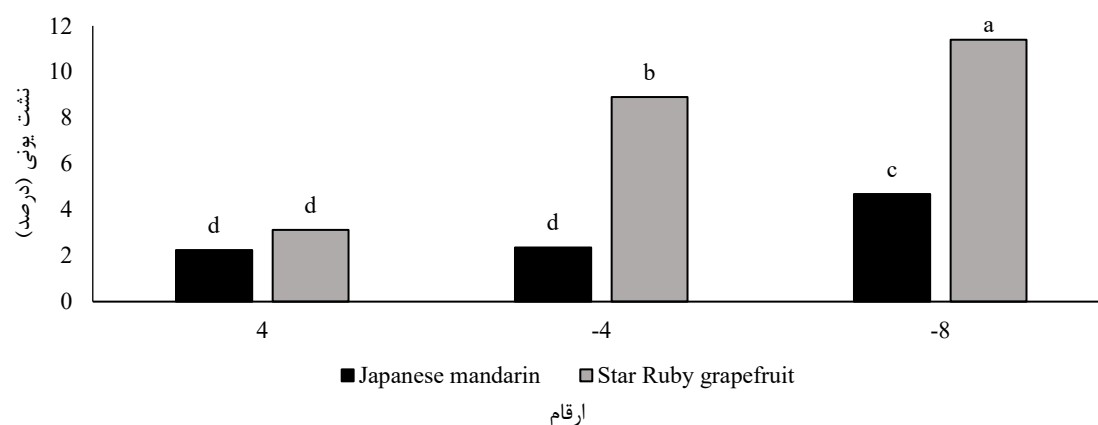
نارنگی ثبت شد. در نقطه مقابل بیشترین مقدار تنش یونی برگ (۱۱/۴ درصد) در نمونه‌های گریپ‌فروت ملاحظه گردید. در خصوص اثرات کاهش دما در افزایش تنش یونی گزارش‌های متعددی ارائه شده که می‌توان به مطالعات صورت گرفته روی ژنوتیپ مکزیکن لایم در مرکبات (قزوینی و همکاران، ۲۰۰۸) و درختان زیتون تحت شرایط کنترل شده تنش یخبندان (بارتولوزی^۵ و همکاران، ۲۰۱۱) اشاره داشت. در توجیه وقوع هم‌زمان تنش یونی می‌توان این گونه استدلال داشت که احتمالاً وقوع یخبندان می‌تواند از طریق افزایش تنش یونی، موجب خروج آب از درون سلول به فضای بیرون شده که در چنین وضعیتی این بروز در برگ نیز قابل ملاحظه خواهد بود. بنابراین افزایش تنش یونی برگ نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش نیز می‌تواند تأییدکننده این استدلال باشد. غشاهای سلولی اولین نواحی هستند که تحت تأثیر آسیب‌های یخ‌زدگی قرار می‌گیرند. تنش دمای پایین باعث کاهش سیالیت غشا شده که در کنار پراکسیداسیون لیپیدها موجب تخریب غشا و در نتیجه افزایش تنش یونی می‌گردد (صالحی ساردویی، ۱۳۹۸). در پژوهشی روی نهال‌های زیتون، تنش یخ‌زدگی موجب تسریع تخریب غشا و در نتیجه، افزایش تنش یونی شد (آذرلو^۶ و همکاران، ۲۰۱۹). تنش یونی کمتر در ژنوتیپ‌های متحمل می‌تواند به دلیل پایداری بیشتر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی غشای پلاسمایی باشد. درجه آسیب به بافت با خسارت وارده به غشای پلاسمایی سلول‌های مزوفیل همبستگی دارد (هاشم‌پور و همکاران، ۲۰۱۹). مطالعات ایمانی^۷ و همکاران (۲۰۱۱) روی مقاومت به سرمای ۶۰ رقم و ژنوتیپ بادام نشان داد که شدت آسیب یخ‌زدگی به ژنوتیپ گیاه بستگی دارد و ژنوتیپ‌هایی که مقاومت بیشتری دارند قطعاً تنش یونی کمتری خواهند داشت. بیشترین آسیب ناشی از تنش یخ‌زدگی درون سلولی است. گیاهان متحمل به یخ‌زدگی می‌توانند یخ‌زدگی برون سلولی را بدون پذیرش خسارت تحمل کنند، اما قادر به تحمل یخ‌زدگی درون سلولی نیستند (ذبیحی^۸ و همکاران، ۲۰۱۶). در پژوهش مذکور صفت محتوای رطوبت نسبی نیز تحت تأثیر اثر ژنوتیپ، دما و اثر متقابل ژنوتیپ و دمای پایین بود (جدول ۱). لذا مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن است که

5. Bartolozzi
6. Azzarello
7. Imani
8. Zabihi

1. Ghazvini
2. Valizadeh-Kamran
3. Khan
4. Mohammadrezakhani



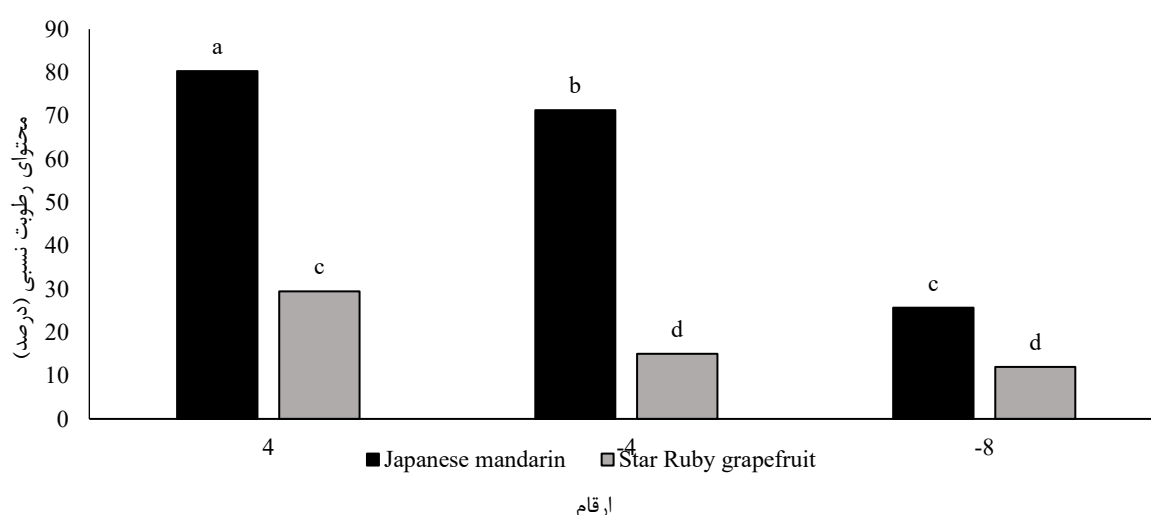
شکل ۲- اثر برهمکنش دما و ژنوتیپ بر کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید برگ نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار. میانگین‌ها با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.



شکل ۳- اثر برهمکنش دما و ژنوتیپ بر نشست یونی برگ نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار. میانگین‌ها با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

عدم خروج به فضای بین سلولی است (پادهان^۲ و همکاران، ۲۰۱۹). مطابق با یافته‌های این پژوهش، ارایز و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که برگ‌های ژنوتیپ زیتون سازگار شده به سرما در طی زمستان، دارای محتوای آب آپوپلاستی، LT_{50} و ظرفیت سوپرکولینگ بیشتری بودند. در آزمایشی عوامل دخیل در فرآیند سازگاری به سرما و نقش آنها در القای تحمل به یخ‌زدگی در مرکبات مورد بررسی قرار گرفت (هی^۳ و همکاران، ۲۰۲۰)، نتایج نشان داد که تنش آب قسمتی از فرآیند سازگاری به سرما و برای القای تحمل کامل به یخ‌زدگی در توت‌فرنگی ضروری است (لئو^۴ و همکاران، ۲۰۱۱). آنچه مسلم است بین پتانسیل آب گیاه و محتوای نسبی آب برگ همبستگی مثبت و بالایی وجود دارد و گیاهانی که در پایان دوره تنش بتوانند محتوای نسبی آب برگ بالاتری را حفظ کنند به لحاظ مقاومت به تنش نیز برتر خواهند بود (شکل ۴). کاهش محتوای آب برگ باعث می‌شود که هدایت روزنه‌ای، فتوسنتز و آسیمیلاسیون دی‌اکسیدکربن کاهش پیدا کند. اگرچه پایین بودن محتوای آب نسبی برگ در دماهای پایین در ژنوتیپ‌ها مقاوم می‌تواند ناشی از شکستن مولکول‌های درشت مانند پلی‌ساکاریدها و تولید قندهای ساده‌تر باشد که منجر به افزایش پتانسیل اسمزی و کاهش محتوای آب نسبی می‌گردد (سریری^۵ و همکاران، ۲۰۱۵).

با کاهش دما میزان آن رو به کاهش نهاد. بیشترین محتوای رطوبت نسبی، متعلق به نارنگی (۸۰/۱ درصد) در دمای +۴ درجه سانتی‌گراد بود. در بین دماها، مقدار محتوای رطوبت نسبی گریپ‌فروت در تمامی نمونه‌ها در پایین‌ترین سطح بود (شکل ۴). محتوای نسبی آب برگ یکی از پارامترهای فیزیولوژیکی مهم است که همبستگی خوبی با تحمل به تنش یخ‌زدگی نشان داده است. به طور کلی با افزایش محتوای نسبی آب برگ، فشار درون سلول برای رشد و در نهایت اتساع دیواره سلول افزایش می‌یابد و همین امر باعث کاهش پایداری غشا سلولی و افزایش میزان نشت سلولی می‌شود. در همین رابطه محمدرضاخانی و همکاران (۲۰۲۱) در پژوهشی روی ژنوتیپ‌های مرکبات، نشان دادند که افزایش درصد محتوای نسبی آب برگ با کاهش میزان پایداری غشا همراه بود. علاوه بر این آسیب به گیاه با یخ زدن آب بین سلولی و حرکت آب از پروتوپلاسم به فضای بین سلولی و تشکیل کریستال‌های یخ در داخل پروتوپلاسم صورت می‌گیرد. اما اغلب خسارت یخ‌زدگی به دلیل دهیدراسیون ناشی از یخ‌زدگی است (بهشتی‌روی^۱ و همکاران، ۲۰۱۷). بنابراین تحمل به یخ‌زدگی بالای ارقامی که دارای محتوای نسبی آب کمتری هستند هم به دلیل افزایش غلظت شیره سلولی و حفظ تعادل اسمزی و هم به دلیل پیوند محکم آب با ماکرومولکول‌های داخل سلول و



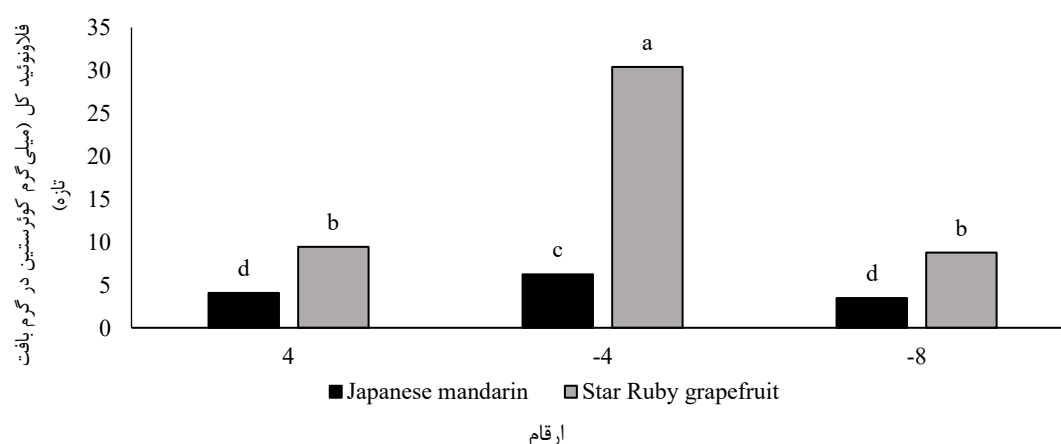
شکل ۴- اثر برهمکنش دما و ژنوتیپ بر محتوای رطوبت نسبی برگ نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار. میانگین‌ها با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

4. Luo
5. Seriri

1. Beheshti Rooy
2. Pradhan
3. He

همچنین، یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی نشان می‌دهد (ووگت^۳، ۲۰۱۰). خسارت بیشتر ساختار غشا (افزایش MDA و نشت یونی) و افزایش فعالیت سه آنزیم SOD، CAT، AXP در طی تنش سرما، نشان‌دهنده تولید ROS و افزایش خسارت اکسیداتیو در دو تیمار دمای پایین می‌باشد. با این وجود، کاهش میزان فلاونوئیدها در دمای ۸- ممکن است ناشی از اکسیداسیون آنها توسط ROSها (وین سنت^۴ و همکاران، ۲۰۲۰) باشد. پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء از علائم تخریب تنش دمای پایین است که در این پژوهش با توجه به نوع رقم، بیشترین پراکسیداسیون لیپید در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد ثبت گردید. از این رو مقایسه میانگین داده‌های ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این دما نشان داد که (شکل ۶) کمترین میزان واکنش (با ۰/۳ میکروگرم مالون‌آلدئید در گرم در وزن تر برگ) مربوط به نارنگی در دمای ۴+ درجه سلسیوس بود. بیشترین میزان این صفت نیز ۱/۵۵ میکروگرم در گرم وزن تر برگ مالون‌دی‌آلدئید در دمای ۴- درجه سلسیوس بود که در گریپ‌فروت ثبت شد. یکی از واکنش‌هایی که در شرایط تنش و در حضور اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پراکسیداسیون چربی‌های غشایی است و این می‌تواند منجر به پارگی غشا سلولی در گیاهان شود (اورجلیا-پلاکو^۵ و همکاران، ۲۰۱۹). مالون‌دی‌آلدئید که محصول تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع هیدروپروکسیداز

مقایسه میانگین داده‌های حاصل از فلاونوئید کل (شکل ۵) بیانگر آن بود که مقدار این صفت با توجه به نوع ژنوتیپ با تنزل دما به دمای ۴- درجه سلسیوس افزایش داشت. به طوری که در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد کمترین میزان فلاونوئید برگ در نارنگی ژاپنی (۳/۴۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم بافت تازه) ثبت شد و در نقطه مقابل در دمای ذکر شده، بیشترین مقدار فلاونوئید برگ در نمونه‌های گریپ‌فروت (۸/۷۵ میلی‌گرم کوئرستین در گرم بافت تازه) مشاهده گردید. در بین ارقام مورد مطالعه در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نیز واکنش‌های متفاوتی ملاحظه شد، بیشترین مقدار این صفت (۳۰/۴۲ میلی‌گرم کوئرستین در گرم بافت تازه) در رقم گریپ‌فروت ثبت گردید (شکل ۸). در این پژوهش با کاهش دما به ۴- درجه سانتی‌گراد، فلاونوئید روند افزایشی را نسبت به شرایط بدون تنش نشان داد. گزارش مشابهی در خصوص تأثیر تنش یخبندان بر فلاونوئید برگ گیاهچه بذری هلو (لینگ و کوئی^۱، ۲۰۰۳) و ژنوتیپ‌های مرکبات (خان و همکاران، ۲۰۱۴)، ارائه شده که مطابق نتایج این پژوهش است. فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان هستند که در تنش‌های محیطی با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تولید آنها افزایش می‌یابد (میونگ-مین^۲ و همکاران، ۲۰۰۹). مطالعات انجام شده نقش اکوفیزیولوژی این ترکیبات را به عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و



شکل ۵- اثر برهمکنش دما و ژنوتیپ بر فلاونوئید کل برگ نارنگی ژاپنی و گریپ‌فروت رابی‌استار. میانگین‌ها با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

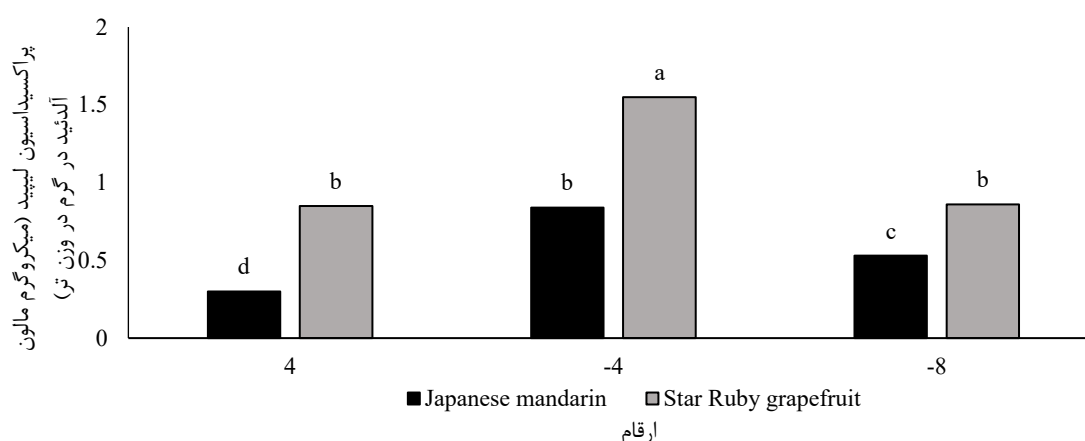
4. Vincent
5. Orjuela-Palacio

1. Leng and Qi
2. Myung-Min
3. Vogt

به طوری که روند افزایش این صفت تا دمای ۸- درجه سلسیوس ادامه داشت. از این رو بیشترین فعالیت میزان آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب با میانگین ۳۶/۳۶ میکرومولار/گرم وزن تازه در دقیقه، ۵۹/۳ واحد آنزیمی در میلی گرم وزن تازه و ۱۶۱/۳ میکرومول/گرم وزن تازه در نارنگی، گریپ فروت و نارنگی در دمای ۸- درجه سلسیوس ثبت گردید. در این آزمایش مشخص شد که آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز آنزیم‌های مقاومت به تنش‌اند و در نتیجه سطوح آنها در نارنگی که نسبتاً مقاوم به دمای پایین می‌باشد، بیشتر بود. در مقابل فعالیت آسکوربات پراکسیداز که آنزیم پاسخ به تنش هست و در گریپ فروت که نسبتاً حساس به دمای پایین می‌باشد، سطح بالاتری داشت (شکل ۷). ژنوتیپ متحمل سریعتر به کاهش دما پاسخ می‌دهند و با حذف سریع‌تر گونه‌های فعال اکسیژن منجر به کاهش آسیب‌های ناشی از تنش می‌شوند و از آنجایی که نارنگی بیشتر و سریع‌تر از گریپ فروت تحت تأثیر تغییر دما قرار می‌گیرد. به نظر می‌رسد بالا بودن سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در نارنگی، امری طبیعی باشد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به عنوان اولین سد دفاعی در مقابل حمله اکسیژن‌های فعال عمل می‌کند. این آنزیم نقش مرکزی در مکانیسم دفاعی ارگانیسم‌ها در برابر گونه‌های اکسیژن فعال دارد که در طی تنش‌های محیطی تولید می‌شود و جلوگیری از خسارات

و پراکسیداسیون لیپیدها تحت تأثیر تنش‌های اکسیداتیو است به عنوان یک مارکر زیستی مناسب برای اکسیداسیون لیپید مورد استفاده قرار می‌گیرد (سلیمان‌زاده^۱ و همکاران، ۲۰۱۰). غلظت آن در محدوده نانومولار است و فرایندهای شدید پراکسیداسیون لیپید از قبیل تخریب و تبدیل غشا در نتیجه تنش اکسیداتیو یا تغییرات مورفولوژیکی، باعث افزایش در غلظت آن در مرکبات می‌شود (زو^۲ و همکاران، ۲۰۱۶). مطالعات ولیزاده-کامران و همکاران (۲۰۱۷) که بر روی چند ژنوتیپ جو انجام شده، نشان می‌دهد که با کاهش دما در بازه دمایی ۲۰ تا ۴- درجه سانتی‌گراد مقدار مالون دی‌آلدید افزایش یافته و در ۴- درجه سانتی‌گراد بالاترین میزان را داشته، همچنین مقدار آن در ژنوتیپ‌های حساس بیشتر از ژنوتیپ‌های مقاوم جو بوده است. در پژوهش‌های متعددی به ارتباط خسارت تنش دمای پایین و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء اشاره شده که در این زمینه می‌توان به پژوهش‌های انجام شده روی ارقام انگور (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۲)، عناب (اشرف و فولاد^۳، ۲۰۰۷) و قهوه (کامپوز و همکاران، ۲۰۰۳) اشاره داشت.

مقایسه میانگین اثر متقابل تنش دمای پایین و ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (الف)، آسکوربات پراکسیداز (ب) و سوپراکسید دیسموتاز (پ) نشان داد که با توجه به نوع ژنوتیپ، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز با تنزل دما افزایش یافت (شکل ۷)،



شکل ۶- اثر برهمکنش دما و ژنوتیپ بر پراکسیداسیون لیپید برگ نارنگی ژاپنی و گریپ فروت رابی استار. میانگین‌ها با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.

اکسیداتیو افزایش می‌دهند (سریری و همکاران، ۲۰۱۵) که نتایج پژوهش حاضر با آن مطابقت دارد.

میزان بیان نسبی ژن *Ptcorp*

میزان نسبی بیان ژن *Ptcorp* در ارقام نارنگی ژاپنی و گریپ فروت رابی‌استار در مرحله بازیابی (۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش) در دماهای ۴+، ۴-، ۸- درجه سلسیوس مطالعه شد. نتایج نشان داد که الگوی بیان ژن *Ptcorp* در ارقام مورد مطالعه متفاوت بوده است، یعنی بسته به نوع ژنوتیپ، میزان بیان ژن افزایش پیدا کرده است. پاسخ ارقام در دمای ۴+ درجه سلسیوس در بیان ژن *Ptcorp* با افزایش نسبی بیان پس از تنش مشاهده شد، این میزان افزایش در ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود که بالاترین بیان به ترتیب در ارقام نارنگی ژاپنی (۱۳۵ واحدی) بود. با ادامه تنش یخ‌زدگی در دمای ۴- درجه سلسیوس الگوی بیان در ژنوتیپ‌ها افزایش یافت و نارنگی ژاپنی با (۱۴۳) و گریپ‌فروت رابی‌استار با (۴/۴۶) بیان ژن افزایشی معنی‌داری بود. در تنش ۸- درجه سلسیوس میزان بیان ژن در ژنوتیپ‌ها نارنگی ژاپنی (۲۰/۷۲) ($P < 0.01$) بود. الگوی بیان ژن در ۸- درجه سلسیوس کاهشی بود نسبت به دمای ۴- و ۴+ درجه سلسیوس (شکل ۸).

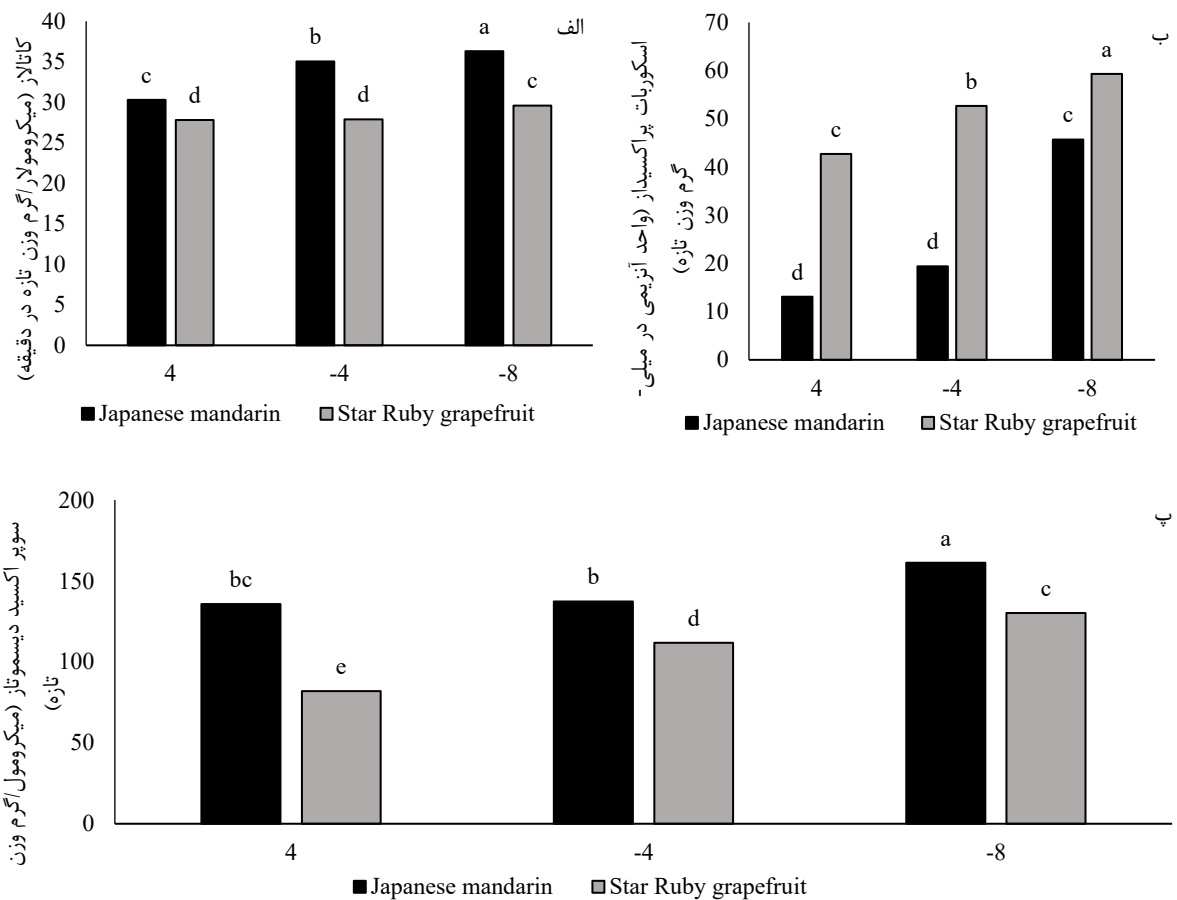
نتیجه‌گیری کلی

در جمع‌بندی و نتیجه‌گیری این پژوهش می‌توان چنین گفت که ژنوتیپ نارنگی ژاپنی بر روی پایه نارنج تا دمای ۸- درجه سانتی‌گراد در صورت طی نمودن مرحله سازگاری (به دمای پایین) آثار تخریبی نداشته، به طوری که اغلب نهال‌ها (بیش از ۹۵٪) پس از اتمام مرحله تیمار و بازگشت از تنش یخبندان به رشد عادی خود برگشتند، لیکن در گریپ‌فروت رابی‌استار در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد اغلب برگ‌ها علایم تخریبی چون جمع شدن برگ را نشان دادند. بر این اساس گریپ‌فروت رابی‌استار در مقابل کاهش دما تا دمای ۴- پایداری بهتری داشت. تنش سرما باعث افزایش بیان ژن و نشأت‌الکترولیت‌ها شد و مقادیر کلروفیل گیاه را در مراحل ابتدایی پس از اعمال تنش کاهش داد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که همواره با کاهش دما مقادیر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و بیان نسبی ژن

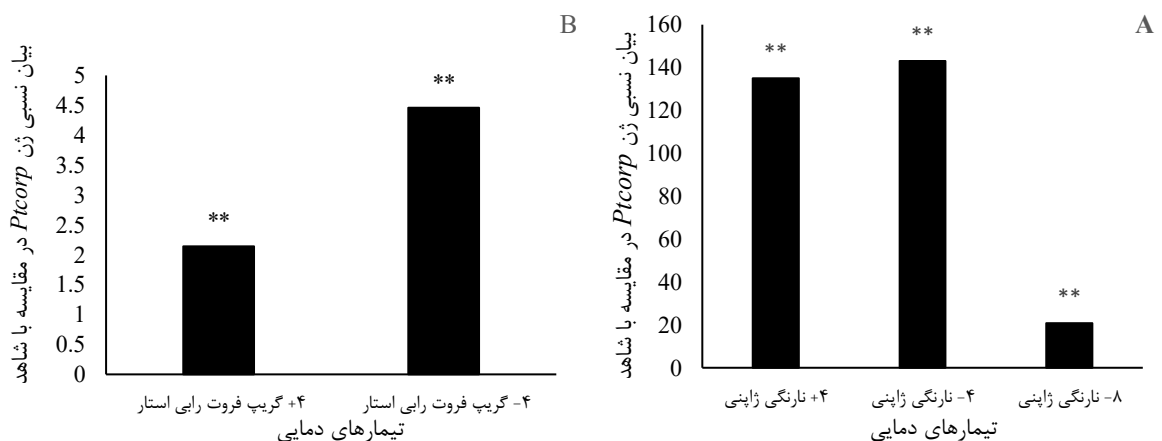
ناشی از تنش اکسیداتیو را به عهده دارد (ژیراکو و والکر^۱، ۲۰۲۱). نتایج آزمایشی در زمینه ارزیابی تغییر آنزیم‌های ضد اکسایشی در دو رقم توت‌فرنگی تحت شرایط دمای پایین، نشان داد فعالیت آنزیم SOD در شروع تیمار سرما سریعاً افزایش یافت و به حداکثر میزان خود رسید (لئو و همکاران، ۲۰۱۱). در پرتقال تامسون نشان داده شده است که با شروع تیمار سرما فعالیت SOD در برگ‌ها افزایش یافته اما با طولانی شدن مدت سرما کاهش یافته و به سطح ثابتی رسیده است (صالحی ساردویی^۲ و همکاران، ۲۰۲۱). پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که بین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و تحمل گیاه به تنش‌های غیرزنده مانند تنش سرما همبستگی وجود دارد و گیاهانی که دارای سطوح بالاتری از آنتی‌اکسیدانت‌ها هستند، مقاومت بیشتری را به آسیب‌های اکسیداتیو نشان می‌دهند (سیورستین و گراسیا-سانچز^۳، ۲۰۱۴). نتایج آزمایش‌های مختلف هم نشان می‌دهد که با کاهش دما، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به منظور جلوگیری از آسیب‌های وارده به گیاه ناشی از تنش سرما و تولید هیدروژن پراکسید افزایش می‌یابد (راجو^۴ و همکاران، ۲۰۱۸). یکی از دلایل تحمل بیشتر ژنوتیپ نارنگی می‌تواند، فعالیت بیشتر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز نسبت به گیاهچه حساس‌تر گریپ‌فروت و در نتیجه حذف کاراتر هیدروژن-پراکسید باشد (شکل ۷). روسوس^۵ و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند که در توت‌فرنگی نیز تیمار سرما موجب افزایش فعالیت پراکسیدازها می‌شود. مطالعه صورت گرفته روی نارنگی نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در هنگام بروز تنش سرما افزایش یافت. مطالعه‌ای بر توت‌فرنگی (لئو و همکاران، ۲۰۱۱) نشان داد که بین فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی با تحمل گیاه به تنش سرما همبستگی مثبت وجود دارد. نتایج تحقیقات در زمینه مرکبات نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ارقام متحمل به سرما افزایشی است (جیانگ و همکاران، ۲۰۲۱). در پژوهشی در زمینه مقاومت به سرمای چای مشخص شد که سه آنزیم مهم آنتی اکسیدانی شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در اثر کاهش دما فعالیت خود را با هدف خنثی کردن و به حداقل رساندن آسیب‌های

4. Raju
5. Roussos

1. Juurakko and Walker
2. Salehi Sardoei
3. Syvertsen and Garcia-Sanchez



شکل ۷- اثر برهمکنش دما و ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (الف)، آسکوربات پراکسیداز (ب) و سوپراکسید دیسموتاز (پ) برگ نارنگی ژاپنی و گریپ فروت رابی استار. میانگین‌ها با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن ندارند.



شکل ۸- اثر دما بر بیان نسبی ژن *Ptcorp* نارنگی ژاپنی (الف) و گریپ فروت رابی استار (ب). داده‌ها میانگین سه تکرار بیولوژیکی می‌باشد.

Ptcorp افزایش یافته و عموماً سطح آنها در نارنگی ژاپنی بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از معاونت آموزشی وقت دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان که امکانات لازم جهت انجام این آزمایش را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تشکر و قدردانی

منابع

- افشاری، ح.، زاهدی، ر.، پروانه، ت. و زاده‌باقری، م. ۱۳۹۳. تأثیر اسید سالیسیلیک بر نشت قند محلول پرولین و الکترولیت در رقم دو رقم زردآلو تحت تنش سرما. *مجله به‌زراعی کشاورزی*، ۱۶: ۱۲۷-۱۳۸.
- تاجور، ی.، فتوحی‌قزوینی، ر.، حمیداوغلی، ی. و حسن‌ساجدی، ر. ۱۳۹۰. پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نارنگی پیچ روی پایه سیترنج به تنش دمای پایین. *زیست‌شناسی گیاهی*، ۳: ۱-۱۲.
- تاجور، ی.، فتوحی‌قزوینی، ر.، حمیداوغلی، ی. و حسن‌ساجدی، ر. ۱۳۹۱. بررسی اثرات پایه و دمای پایین بر واکنش آنتی اکسیدانی برگ ماندارین. *مجله علوم و فنون باغبانی ایران*، ۱۲(۳): ۳۰۷-۳۱۶.
- صالحی‌ساردویی، ع. ۱۳۹۸. پیشرفت در استراتژی تنش سرما: فیزیولوژیکی و مولکولی. *انتشارات نوروزی*. ۲۶۴ ص.
- صالحی‌ساردویی، ع.، شریفانی، م.، خوشحال سرمست، م. و قاسم نژاد، م. ۱۴۰۲. مقایسه پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پرتقال تامسون و لیموی لیسبون در مواجهه با تنش سرما. *مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)*. ۳۶(۴): ۳۵۱-۳۶۱.
- صلاح‌ورزی، ی.، داوری‌نژاد، غ.ح.، تهرانی‌فر، ع.، نعمتی، ح. و نظامی، ع. ۱۳۸۹. پاسخ‌های فیزیولوژیکی شش رقم انار خراسان رضوی تحت تنش یخ‌زدگی. *مجله علوم و فنون باغبانی ایران*، ۱۱: ۲۱۷-۲۳۰.
- فهمی‌راد، س.، قاسم‌کریم‌زاده، گ. و قناتی، ف. ۱۳۹۲. تغییرات ناشی از سرما فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی در دو رقم کلزا. *مجله فیزیولوژی و اصلاح*، ۳: ۱-۱۱.
- کریمی، ر.، ارشادی، ع.، اثنی‌عشری، م. و مشهدی‌اکبربوجار، م. ۱۳۹۴. تغییرات فصلی در محتوای پروتئین محلول، فنل کل و MDA و رابطه آنها با تحمل به سرما ارقام انگور. *مجله به‌زراعی کشاورزی*، ۱۶: ۹۹۹-۱۰۱۳.
- مشایخی، ک.، صادقی، ح.، اکبرپور، آتشی، س.، قاسمی، ی. و موسوی‌زاده، س. ۱۳۹۳. تغییرات کربوهیدرات‌های برگ و میوه در طول فصل رشد در شلیل قرمز گلد شرایط آب و هوایی گرگان. *مجله علوم باغبانی*، ۹: ۹-۱.
- Arias, N.S., Bucci, S.J., Scholz, F.G. and Goldstein, G. 2015. Freezing avoidance by supercooling in *Olea europaea* cultivars: the role of apoplastic water, solute content and cell wall rigidity. *Plant, cell & environment*, 38(10): 2061-2070.
- Ashraf, M.F.M.R. and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*, 59(2): 206-216.
- Azzarello, E., Mugnai, S., Pandolfi, C., Masi, E., Marone, E. and Mancuso, S. 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.
- Barnes, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S. and Davison, A.W. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental botany*, 32(2): 85-100.
- Bartolozzi, F., Mencuccini, M. and Fontanazza, G. 2001. Enhancement of frost tolerance in olive shoots in vitro by cold acclimation and sucrose increase in the culture medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67(3): 299-302.
- Bates, L.S., Waldren, R.A. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39: 205-207.
- Beheshti Rooy, S.S., Hosseini Salekdeh, G., Ghabooli, M., Gholami, M. and Karimi, R. 2017. Cold-induced physiological and biochemical responses of three grapevine cultivars differing in cold tolerance. *Acta physiologiae plantarum*, 39: 1-13.

- Campos, P.S., nia Quartin, V., chicho Ramalho, J. and Nunes, M.A. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of plant physiology*, 160(3): 283-292.
- Chance, B. and Maely, A.C. 1955. Assay of catalase and peroxidase methods. *Enzymology*, 2: 755-784.
- Clairbone, A. 1985. Catalase activity. *Handbook of methods for oxygen radical research*. In CRC Press Boca Raton FL. pp. 283-284.
- FAOSTAT. 2019. FAO primary crops statistical database. FAO, Rome, Italy.
- Ghazvini, R.F., Baghbanha, M.R., Hatamzadeh, A. and Heidari, M. 2008. Effect of water stress on freezing tolerance of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* L.) seedlings. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 49(5): 276-280.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.B., Parvin, K., Bhuiyan, T.F., Anee, T.I., Nahar, K., Hossen, M.S., Zulfiqar, F., Alam, M.M. and Fujita, M. 2020. Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22): 8695.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Mahmud, J.A., Fujita, M. and Fotopoulos, V. 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8): 681.
- Hashempour, A., Ghasemnezhad, M., Sohani, M.M., Ghazvini, R.F. and Abedi, A. 2019. Effects of freezing stress on the expression of fatty acid desaturase (FAD2, FAD6 and FAD7) and beta-glucosidase (BGLC) genes in tolerant and sensitive olive cultivars. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66: 214-222.
- He, Z., Zhao, T., Yin, Z., Liu, J., Cheng, Y. and Xu, J. 2020. The phytochrome-interacting transcription factor CsPIF8 contributes to cold tolerance in citrus by regulating superoxide dismutase expression. *Plant Science*, 298: 110584.
- Hossain, M.J., Tillaboeva, S., Sirel, I.A., Kaya, R.B., Dönmez, B.A., Aasim, M. and Bakhsh, A., 2021. Genetic engineering of ion transporters for osmotic stress tolerance. In *Transporters and Plant Osmotic Stress*. Academic Press. pp. 133-166.
- Imani, A., Barzegar, K. and Piripireivatlou, S. 2011. Relationship between frost injury and ion leakage as an indicator of cold hardiness in 60 almond selections. *International Journal of Nuts and Related Sciences*, 2: 22-26.
- Jiang, J., Hou, R., Yang, N., Li, L., Deng, J., Qin, G. and Ding, D. 2021. Physiological and TMT-labeled proteomic analyses reveal important roles of sugar and secondary metabolism in *Citrus junos* under cold stress. *Journal of Proteomics*, 237: 104145.
- Juurakko, C.L. and Walker, V.K., 2021. Cold acclimation and prospects for cold-resilient crops. *Plant Stress*, 2, p.100028.
- Khan, M.K. and Dangles, O. 2014. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1): 85-104.
- Leng, P. and Qi, J.X., 2003. Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress. *Scientia horticulturae*, 97(1): 27-39.
- Lim, C.C., Arora, R. and Townsend, E.C. 1998. Comparing Gompertz and Richards functions to estimate freezing injury in *Rhododendron* using electrolyte leakage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(2): 246-252.
- Luo, Y., Tang, H. and Zhang, Y. 2011. Production of reactive oxygen species and antioxidant metabolism about strawberry leaves to low temperatures. *Journal of Agricultural Science*, 3(2): 89.
- Moellering, E.R., Muthan, B. and Benning, C. 2010. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science*, 330(6001): 226-228.
- Mohammadrezakhani, S., Rezanejad, F. and Hajilou, J. 2021. Effect of putrescine and proline on profiles of GABA, antioxidant activities in leaves of three *Citrus* species in response to low temperature stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 30: 545-553.
- Myung-Min, H., Trick, H.N. and Rajasheka, E.B. 2009. Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 166: 180-191.

- Orjuela-Palacio, J.M., Graiver, N., Santos, M.V. and Zaritzky, N.E. 2019. Effect of the desiccation tolerance and cryopreservation methods on the viability of Citrus limon L. Burm cv. Eureka seeds. *Cryobiology*, 89: 51-59.
- Pietrini, F., Chaudhuri, D., Thapliyal, A.P. and Massacci, A. 2005. Analysis of chlorophyll fluorescence transients in mandarin leaves during a photo-oxidative cold shock and recovery. *Agriculture, ecosystems & environment*, 106(2-3): 189-198.
- Pradhan, S., Goswami, A.K., Singh, S.K., Prakash, J., Goswami, S., Chinnusamy, V., Talukdar, A. and Maurya, N.K. 2019. Low temperature stress induced physiological and biochemical alterations in papaya genotypes. *South African Journal of Botany*, 123: 133-141.
- Raju, S.K.K., Barnes, A.C., Schnable, J.C. and Roston, R.L. 2018. Low-temperature tolerance in land plants: Are transcript and membrane responses conserved? *Plant science*, 276: 73-86.
- Ritchie, S.W., Nguyen, H.T. and Holaday, A.S., 1990. Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop science*, 30(1): 105-111.
- Roussos, P.A., Ntanos, E., Tsafouros, A. and Denaxa, N.K. 2020. Strawberry physiological and biochemical responses to chilling and freezing stress and application of alleviating factors as countermeasures. *Journal of Berry Research*, 10(3): 437-457.
- Seriri, D., Raufi Masouleh, A. and Khaniki, R. 2015. The effect of cold on oxidative degradation and activity of antioxidant enzymes in tea leaves of northern Iran. *New findings in the biological sciences*, 2: 292-133
- Shanker, A. and Venkateswarlu, B. eds. 2011. *Abiotic stress in plants: mechanisms and adaptations*. BoD-Books on Demand.
- Wu, Q.S., 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.
- Soleimanzadeh, H., Habibi, D., Ardakani, M.R., Paknejad, F. and Rejali, F. 2010. Effect of potassium levels on antioxidant enzymes and malondialdehyde content under drought stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(1): 56-61.
- Sullivan, C.Y. and Ross, W.M. 1979. *Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum*. Stress physiology in crop plants, John Wiley and Sons, New York, pp. 263-281.
- Sun, X., Zhao, T., Gan, S., Ren, X., Fang, L., Karungo, S.K., Wang, Y., Chen, L., Li, S. and Xin, H. 2016. Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of Ethylene Response Factor 057. *Scientific Reports*, 6(1): 24066.
- Syvertsen, J.P. and Garcia-Sanchez, F. 2014. Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, 103: 128-137.
- Valizadeh-Kamran, R., Toorchi, M., Mogadam, M., Mohammadi, H. and Pessarakli, M. 2018. Effects of freeze and cold stress on certain physiological and biochemical traits in sensitive and tolerant barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 41: 102-111.
- Vincent, C., Morillon, R., Arbona, V. and Gómez-Cadenas, A. 2020. *Citrus in changing environments*. In *The genus citrus* (pp. 271-289). Woodhead Publishing.
- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1): 2-20.
- Zabihi, H., Vogeler, I., Amin, Z.M. and Gourabi, B.R. 2016. Mapping the sensitivity of citrus crops to freeze stress using a geographical information system in Ramsar, Iran. *Weather and climate extremes*, 14: 17-23.
- Zhang, J., Wu, X., Niu, R., Liu, Y., Liu, N., Xu, W. and Wang, Y. 2012. Cold-resistance evaluation in 25 wild grape species. *Vitis*, 51(4): 153-160.
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C. and Zhou, Z. 2016. Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food chemistry*, 196: 885-896.