Archive of SID

زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره نهم، پاییز ۱۳۹۰، صفحه ۱-۱۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۰۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۳/۳۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۴/۲۰

پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نارنگی پیج روی پایه سیترنج تحت تنش دمای پایین

یحیی تاجور [۱*]، رضا فتوحی قزوینی [۱]، یوسف حمید اوغلی [۱] و رضا حسن ساجدی [۲]
[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

تنش دمای پایین، یکی از عوامل محیطی مهم محدود کننده در توسعه کشت و تولید مرکبات است. در این پژوهش تأثیر تنش دمای پایین بر شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نارنگی پیج بر روی پایه سیترنج (نهال دو ساله)، در شرایط کنترل شده انکوباتور (با رطوبت نسبی ۵±۶۵٪ و شدت نور ۱۵۰۰۰ لوکس) بررسی گردید. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با اعمال تیمار دماهای پایین (۶-، ۳-، ۰، ۳، ۶ و ۹ درجه سانتیگراد) و شاهد (۲±۲۵ درجه سانتیگراد) اجرا شد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که کمترین مقدار کلروفیل کل (۱/۵۱۳ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ)، رنگ سبز(۶۱/۲۵٪) و محتوی آب برگ (۳۳/۵۵٪ وزن تازه برگ) در تیمار دمایی ۶- درجه سانتیگراد به دست آمد. بیشترین مقدار پرولین (۴۸ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ) در دمای ۳- و حداکثر کربوهیدرات (۵۵/۳ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ) نیز در صفر درجه سانتیگراد حاصل شد. همچنین، بیشترین مقدار آب‌گزیدگی (۵۱ تا ۷۵٪) و نشت یونی (۷۵/۶۶٪) در دمای ۶- درجه بود. بیشترین مقدار پراکسیداسیون لیپیدها (۲/۶۴۳ میکروگرم مالون دآلدئید در گرم وزن تازه برگ)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۶۳/۵٪) و فنل (۲/۸۶۳ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ) نیز در دمای ۳- درجه بود. حداکثر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($۸/۴۴\times۱۰^{۴}$ واحد آنزیمی در گرم وزن تازه برگ) در ۳ درجه سانتیگراد مشاهده گردید. به عنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت که نارنگی پیج (روی پایه سیترنج) از طریق افزایش برخی از شاخص‌ها، همچون پرولین، کربوهیدرات، و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قادر به تحمل تنش یخبندان تا دمای ۳- درجه سانتیگراد است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان‌ها، تنش دمای پایین، مرکبات، نارنگی

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ytajvar@yahoo.com، شماره تماس: ۰۱۹۲۵۲۲۲۰۸۱

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ایران یکی از کشورهای عمده تولید کننده مرکبات در دنیاست که سالانه بیش از ۳/۵ میلیون تن انواع پرتقال و نارنگی تولید می‌کند. یکی از ارقام مهم تجاری نارنگی در شمال کشور، رقم پیج است. این رقم یک هیبرید کمپلکس است که از تلاقی نارنگی مینئولاتانجلو (مینئولاتانجلو (Minneola tangelo) حاصل تلاقی نارنگی دنسی (Dancy) و گریپ فروت دانکن (Duncan) است) و کلمانتین (Clementine) حاصل شده است (معرفی به دنیا در سال ۱۹۶۳)، که ورود این رقم به ایران نیز سال ۱۳۴۷ گزارش شده است (فتوحی قزوینی و فتاحی مقدم، ۱۳۸۵).

مرکبات جزو محصولات گرمسیر و نیمه‌گرمسیر حساس به تنش دمای پایین است (فتوحی و فتاحی، ۱۳۸۵). تنش دمای پایین شامل پدیده سرما و یخبندان بوده (Chen *et al.*, 2006)، که با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک باعث عدم تعادل متابولیسمی، کاهش رشد، عملکرد و در بعضی موارد مرگ در گیاهان حساس می‌گردد (جعفری و همکاران، ۱۳۸۶).

گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی، از قبیل سرما و یخبندان در مرحله سازگاری، با ذخیره مواد تنظیم‌کننده اسمزی، مقاومت خویش به دمای پایین را افزایش می‌دهند. مواد تنظیم‌کننده فشار اسمزی بیشتر شامل اسیدهای آمینه، کربوهیدرات، برخی یون‌های معدنی و پروتئین‌ها هستند. پرولین یکی از اسید آمینه‌های فعال در پدیده تنظیم اسمزی است (جعفری و همکاران، ۱۳۸۵). بر این اساس Molinari و همکاران (۲۰۰۴) در آزمایشی از طریق دست‌ورزی ژنتیکی اقدام به تولید پایه‌های سیترنج (*Citrus sinensis* × *poncirus trifoliate*) نموده‌اند که با افزایش تولید پرولین سازگاری این گیاهان به تنش‌های محیطی افزایش یافت.

نقش و اهمیت کربوهیدرات محلول به این علت است که تجمع این مواد سبب تنظیم فشار اسمزی، کاهش از دست دادن آب سلول و نگهداری تورژسانس می‌گردد. در این خصوص Gusta و همکاران (۲۰۰۵) در گزارشی عنوان داشته‌اند که گیاهان در مرحله سازگاری به تنش دمای پایین با تجمع آبسیزیک اسید در برگ‌های خود موجب فعالیت برخی از ژن‌ها و تغییراتی در کربوهیدرات درون سلول می‌شوند که در نتیجه تنظیم فشار اسمزی، تحمل‌پذیری گیاهان نسبت تنش دمای پایین، افزایش می‌یابد.

در تنش دمای پایین به علت تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن در محیط سلول، احتمال وقوع تنش اکسیداتیو (به عنوان تنش ثانویه) وجود دارد (Molla *et al.*, 2006). رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌توانند به ترکیبات حیاتی سلول مانند اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و رنگدانه‌های گیاهی حمله کنند. عموماً گیاهان از طریق فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی، شامل آنزیم‌ها (سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، ...) و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی (فنل، کاروتنوئیدها، ...) سازگاری خویش به تنش دمای پایین را افزایش می‌دهند (جعفری و همکاران،۱۳۸۶؛ Chen *et al.*, 2006). در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ایزوآنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز به دلیل خنثی‌سازی رادیکال سوپراکسید، جزو اولین و مهمترین سیستم دفاعی

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیمی (در مقابل رادیکال‌های فعال اکسیژن) محسوب می‌شود (Allen, 1995). یکی از واکنش‌هایی که در حضور انواع اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا کرده، اثر تخریبی به‌جا می‌گذارد، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است. در این زمینه Nayyar و همکاران (۲۰۰۵) در پژوهشی روی سرمازدگی در گیاه نخود گزارش کردند که به‌کارگیری ترکیب آبسیزیک اسید موجب کاهش پراکسیداسیون لیپید و در نتیجه، خسارت کمتر سرمازدگی در این گیاه گردید. از آثار دیگر تنش دمای پایین کاهش سیّالیت غشا بوده که در کنار پراکسیداسیون لیپید موجب تخریب غشا و در نتیجه افزایش نشت یونی می‌گردد (Campos *et al.*, 2003). بر این اساس Azzarello و همکاران (۲۰۰۹) در پژوهشی بر روی نهال‌های زیتون نیز این‌گونه گزارش کردند که تنش یخبندان موجب تسریع تخریب غشا و در نتیجه، افزایش نشت یونی شده است. از طرفی Verslues و همکاران (۲۰۰۶) در گزارشی بیان کردند که در سرمازدگی و یخبندان به دلیل کاهش جذب آب و افزایش نشت یونی، احتمال بروز تنش خشکی (به عنوان تنش ثانویه) نیز وجود دارد.

با توجه به موارد ذکر شده تنش دمای پایین با افزایش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و تأثیرگذاری بر غشا تیلاکوئید، باعث تخریب کلروفیل، رنگ سبز و در نتیجه کاهش فتوسنتز می‌گردد (Campos *et al.*, 2003). در پژوهشی Berova و همکاران (۲۰۰۲) نیز در مطالعه خویش بر روی گندم تحت تنش دمای پایین، کلروز برگ‌ها را مشاهده و در گزارش خود عنوان نمودند که در مقابل این تخریب محیطی، کاروتنوئیدها به عنوان یک آنتی‌اکسیدان وظیفه حفاظت از فتوسیستم‌ها را به عهده دارند و از طریق فروکش کردن سریع وضعیت برانگیخته کلروفیل، حفاظت نوری را انجام می‌دهند.

شروع فعالیت‌های رشد و نمو مرکبات در محدوده دمای ۱۰ درجه سانتیگراد است که در فصل بهار با افزایش دما (بالاتر از ۱۰ درجه سانتیگراد) گیاه وارد مرحله برگ و گل‌دهی می‌گردد. در میان ارقام و گونه‌های مختلف مرکبات از لحاظ مقاومت به تنش دمای پایین تفاوت‌هایی وجود دارد، و در یک رقم نیز اندام‌های مختلف مثل گل، میوه، برگ و ساقه دارای مقاومت‌های متفاوتی هستند؛ به‌طوری‌که حد آستانه دمای بحرانی برای گل ۱±۱ درجه، برای میوه و برگ ۱±۲- درجه و برای ساقه ۱±۴- درجه سانتیگراد گزارش شده که این دما با توجه به نوع ژنوتیپ، سن و اندم گیاهی تحت تنش، متغیر است. بنابراین، در برخی ارقام مانند لیموها به علت حساسیت به تنش دمای پایین، در تنش ملایم و در دمای بالاتر از دمای ذکر شده علایم خسارت مشهود است، لیکن ارقام نارنگی انشو (Unshiu) به علت متحمل بودن، در دمای پایین‌تر از دمای مذکور نیز فاقد علایم خسارت هستند(فتوحی قزوینی و فتاحی مقدم، ۱۳۸۵). بر این اساس Lang و همکاران (۲۰۰۵) برای مطالعات ژنی مقاومت به تنش دمای پایین از نارنگی انشو استفاده نمودند که بیانگر متحمل بودن این رقم به تنش یاد شده است.

با توجه به استقبال باغداران به کشت و توسعه نارنگی پیج در شمال کشور (منطقه نیمه‌گرمسیر)، بروز تنش یخبندان دوره‌ای و نبود اطلاعات علمی و کاربردی کافی در این زمینه (به‌صورت پایه و پیوندک در دامنه دمایی مختلف) این پروژه ارائه و اجرا گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

هدف این پروژه، تعیین حد آستانه تحمل و دمای تخریبی نهال نارنگی پیج روی پایه سیترنج بوده (رقم 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.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از نهال‌های دو ساله و گلدانی نارنگی پیج روی پایه سیترنج تولید شده در سال‌های ۱۳۸۷–۱۳۸۸ استفاده شد. این نهال‌ها دارای ساقه به قطر ۱/۲±۰/۲ و ارتفاع ۱۰±۱۰۰ سانتی‌متر بود. تیماردهی و ارزیابی‌های آزمایشگاهی نهال‌ها در سال ۱۳۸۹ انجام پذیرفت. قبل از تیماردهی، به منظور سازگاری مواد گیاهی به کاهش دما، نهال‌ها به درون انکوباتور با رطوبت نسبی ۵±۶۵٪ و شدت نور ۱۵۰۰۰ لوکس (۱۲ ساعت روشنایی به همراه ۱۲ ساعت تاریکی) منتقل شدند و به تدریج دمای آن روزانه یک درجه سانتیگراد کاهش یافت. شروع تنزل دمای انکوباتور از ۲۱ درجه سانتیگراد بوده، تا رسیدن به هر یک از تیمارهای دمایی این کاهش ادامه داشت (Pietrini *et al*., 2005). پس از مرحله سازگاری به کاهش دما، مواد گیاهی موجود در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در تیمارهای دمایی ۹، ۶، ۳، ۰، ۳- و ۶- درجه قرار گرفتند. همزمان نمونه‌های مستقر در گلخانه (با شرایط محیطی مشابه انکوباتور) تحت تیمار دمایی ۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از اعمال هر تیمار دمایی صفات نشت یونی، آب‌گزیدگی برگ (با استفاده از نمونه برگ‌های تازه)، پرولین، کربوهیدرات، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنل، فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، کلروفیل و کاروتنوئید (با استفاده از نمونه برگ‌های تثبیت شده با ازت مایع) بررسی گردید. برای ارزیابی واکنش نهال‌ها در مرحله بازگشت از تنش دمای پایین، پس از اعمال هر تیمار دمایی، مجدداً دمای انکوباتور به تدریج (روزانه یک درجه) تا دمای ۲۱ درجه سانتیگراد افزایش یافت و در نهایت، نهال‌ها (موجود در انکوباتور) به شرایط کنترل شده گلخانه منتقل شدند. پنج هفته پس از خروج نمونه‌ها از شرایط انکوباتور، صفاتی همچون رنگ، محتوی آب برگ، و خسارت ساقه پایه و پیوندک ارزیابی گردید.

برای سنجش پرولین، ۲ میلی‌لیتر از عصاره برگ (استخراج از طریق محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۱۰٪) با ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید مخلوط و به حمام آب گرم (۱۰۰ درجه سانتیگراد و به مدت یک ساعت) منتقل شدند. پس از سرد شدن محلول واکنش فوق، به هر یک ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد که پس از ورتکس دو فاز جداگانه تشکیل گردید. با قرائت جذب فاز رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین نمونه‌های تحت تیمار ارزیابی گردید (Xiao-Shan and Jian-guo 2009).

اندازه‌گیری کربوهیدرات 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 کربوهیدرات ارزیابی شد (قربانلی و همکاران، ۱۳۸۰).

www.SID.ir

Archive of SID

برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان و فنلی، حلال متانول به‌کار گرفته شد. در اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، از سنجش DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl) استفاده شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتر عصاره استخراجی با ۹۰ میکرولیتر محلول DPPH (۶ میلی‌مولار) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه (به همراه شاهد) در شرایط تاریک و دمای اتاق نگهداری گردید. سپس میزان جذب شاهد و نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر ثبت و با قرار دادن جذب هر کدام در فرمول ارائه شده، درصد جمع‌آوری رادیکال آزاد محاسبه گردید (Ghafar *et al*., 2010).

۱۰۰ × (جذب شاهد/جذب نمونه – جذب شاهد) =درصد جمع‌آوری DPPH

برای ارزیابی فنل کل نیز از روش اسپکتروفتومتری استفاده شده، که با استفاده از محلول فولین و استاندارد گالیک‌اسید، مقدار فنل نمونه‌های برگی (در طول موج ۷۶۵ نانومتر) بررسی گردید (Ghafar *et al*., 2010).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز از طریق بررسی توانایی این آنزیم در جلوگیری از کاهش فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم بوده، که به کمک دستگاه اسپکتروفتومتردر طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Huang *et al*., 2008).

برای اندازه‌گیری شاخص پراکسیداسیون لیپیدها، غلظت مالون‌دآلدئید (محصول واکنش پراکسیداسیون لیپیدها) ارزیابی شد. مالون‌دآلدئید در واکنش با تیوباربیتوریک اسید تشکیل کمپلکس رنگی داده که در طول موج ۵۳۲ نانومتر جذب آن ثبت و سپس جذب سایر رنگیزه‌های غیر اختصاصی نیز در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از جذب ۵۳۲ نانومتر کسر گردید (Azzarello *et al*., 2009). سنجش آب‌گزیدگی برگ نیز بلافاصله پس از اعمال هر تیمار دمایی بوده که از طریق دستگاه سنجش سطح برگ (leaf area meter AM 300) درصد آب‌گزیدگی سطح برگ، محاسبه و سپس بر اساس رتبه‌دهی (بدون خسارت رتبه ۱، خسارت تا ۲۵ ٪ رتبه ۲، ۲۶ تا ۵۰٪ رتبه ۳، ۵۱ تا ۷۵٪ رتبه۴ و ۷۶ تا ۱۰۰٪ رتبه ۵) ارزیابی شد (Zhao-Shi *et al*., 2007).

پس از طی نمودن مرحله بازگشت (پنج هفته پس از خروج نمونه‌ها از انکوباتور) میزان خسارت ساقه پایه و پیوندک نیز بر اساس رتبه‌دهی (همانند آب‌گزیدگی) بررسی شد (Zhao-Shi *et al*., 2007). محتوی آب برگ (پنج هفته پس از خروج نمونه‌ها از انکوباتور) بر اساس فرمول ارائه شده ارزیابی شد (جعفری و همکاران، ۱۳۸۵).

۱۰۰×[وزن خشک برگ/(وزن خشک برگ- وزن تازه برگ)]=محتوی آب برگ

برای اندازه‌گیری شاخص‌هایی، همچون نشت یونی (بلافاصله پس از اعمال هر تیمار دمایی) از روش Campos و همکاران (۲۰۰۳)، رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید از روش Pietrini و همکاران (۲۰۰۵) و ارزیابی رنگ برگ (با دستگاه Minolta CR 300) نیز از طریق روش Sanchez و همکاران (۲۰۰۳) استفاده شد.

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی بوده که تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها نیز از طریق آزمون توکی و در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که (جدول ۱) غلظت پرولین تحت تنش دمای پایین افزایش سیگموئیدی داشته، به‌طوری‌که بیشترین مقدار این اسید آمینه (۴۸ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ) در تیمار دمایی ۳- درجه سانتیگراد مشاهده شد. میزان کربوهیدرات محلول نیز تحت تنش دمای پایین افزایش سیگموئیدی معنی‌داری داشته، بیشترین مقدار آن (۵۵/۳ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ) مربوط به تیمار دمایی صفر درجه بود. این‌گونه گزارش شده است که در شرایط کاهش شدید دما، و یا تداوم تنش یخبندان، احتمال وقوع تنش خشکی نیز (به عنوان تنش ثانویه) وجود دارد (Verslues *et al*., 2006). در گزارش‌هایی، به تأثیر پرولین (Molinari *et al*., 2004) و کربوهیدرات محلول (Gusta *et al*., 2005) در افزایش مقاومت گیاهان به تنش محیطی اشاره شد که در مشابهت این نتایج است. لذا می‌توان این‌گونه استنباط داشت که احتمالاً افزایش سیگموئیدی پرولین و کربوهیدرات محلول برگ‌های نارنگی پیج تحت تنش دمای پایین، در جهت تنظیم اسمزی بوده تا با کاهش پتانسیل آب وحفظ تورژسانس سلول، موجب بقای گیاه (تحت شرایط تنش) گردد. نتایج حاصل از همبستگی داده‌ها نیز بیانگر وجود همبستگی مثبت بین پرولین و کربوهیدرات (r=٪۵۰) بوده که می‌تواند تأییدکننده موارد اشاره شده باشد (جدول ۲).

بر اساس نتایج این تحقیق، تأثیر تنش دمای پایین بر شاخص‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، مقدار فنل و فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نیز معنی‌دار بوده، به‌طوری‌که بیشترین مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (٪۶۳/۵۰) و فنل (۲/۸۶۳ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ) در تیمار دمایی ۳- درجه مشاهده شد. در خصوص فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نیز حداکثر فعالیت آن ($۸/۴۴\times۱۰^{۴}$ واحد آنزیمی در گرم وزن تازه برگ) در دمای ۳ درجه سانتیگراد مشاهده گردید (جدول ۱). این نتایج با گزارش Chen و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد. در توجیه این نتایج می‌توان این‌گونه استنباط نمود که در شرایط تنش دمای پایین به علت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در محیط سلول، احتمال وقوع تنش اکسیداتیو (به عنوان تنش ثانویه) وجود دارد که باعث اختلال در اعمال فیزیولوژیک سلول می‌شود. برای خنثی کردن اثر سمّی رادیکال‌های فعال اکسیژن، به ترکیبات آنتی‌اکسیدانت نیاز است. سلول‌های گیاهی از دو سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی برای حل این معضل استفاده می‌کنند (Chen *et al*., 2006; Molla *et al*., 2006). بنابراین، می‌توان افزایش سیگموئیدی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنل و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز برگ نهال‌های پیج در مرحله سازگاری را، مرتبط با این گزارش‌های علمی دانست. همبستگی مثبت بین پراکسیداسیون لیپیدها (ناشی از حضور رادیکال‌های فعال اکسیژن) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (r=٪۶۱) نیز تا حدودی این تفسیر را توجیه می‌نماید (جدول ۲).

تأثیر کاهش دما بر پراکسیداسیون لیپید غشا سلولی نیز معنی‌دار بوده، بیشترین مقدار مالون‌دآلدئید تولید شده (۲/۶۴۳ میکروگرم در

www.SID.ir

Archive of SID

گرم وزن تازه برگ) در تیمار دمایی ۳- درجه سانتیگراد مشاهده شد. پدیده آب‌گزیدگی برگ نیز از تیمار دمایی ۳- درجه شروع شد که بیشترین آب‌گزیدگی در تیمار دمایی ۶- درجه سانتیگراد (۵۱ تا ۷۵٪) ثبت شد. شاخص نشت یونی تحت تنش دمای پایین تغییر معنی‌داری داشته، که بیشترین مقدار آن (۷۵/۶۶٪) در تیمار دمایی ۶- درجه ثبت شد. دمای پایین بر میزان محتوی آب برگ نیز تأثیرگذار بوده، کمترین مقدار آب برگ (۳۳/۵۵٪ وزن تازه برگ) در نمونه برگ‌های مستقر در تیمار دمایی ۶- درجه سانتیگراد دیده شد (جدول ۱). گزارش مشابهی در خصوص افزایش پراکسیداسیون لیپید (Nayyar *et al.*, 2005)، نشت یونی، آب‌گزیدگی (Azzarello *et al.*, 2009) و کاهش محتوی آب برگ (Verslues *et al.*, 2006) در گیاهان تحت تنش دمای پایین ارائه شده، که تأییدکننده نتایج این آزمایش است. یکی از آثار منفی تنش دمای پایین آسیب به غشا سلول بوده که در توجیه این وضعیت می‌توان چنین گفت که رادیکال‌های آزاد در درون سلول باعث آسیب رساندن به لیپیدها و اسیدهای چرب غشایی شده، رادیکال‌های لیپید و پراکسی و هیدرو پراکسی تولید می‌کنند. رادیکال‌های جدید تولید شده می‌توانند واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها (منجر به افزایش تولید مالون‌دآلدئید) را تسریع کنند. تداوم این امر موجب تخریب بیشتر غشا سلول و خروج آب از درون سلول به فضای بین سلولی شده که نتیجه این وضعیت، بروز پدیده آب‌گزیدگی و افزایش نشت یونی است که در نهایت کاهش محتوی آب برگ را به‌دنبال خواهد داشت (Azzarello *et al.*, 2009; Nayyar *et al.*, 2005; Verslues *et al.*, 2006). نتایج همبستگی صفات نیز تأییدکننده تفسیر فوق است؛ به‌طوری‌که نشت یونی با آب‌گزیدگی برگ دارای همبستگی مثبت(r=۰/۹۵) و با محتوی آب برگ دارای همبستگی منفی (r=-۰/۹۹) بود (جدول ۲).

تنش دمای پایین موجب کاهش معنی‌دار کلروفیل کل شد که عمدتاً این کاهش مربوط به کلروفیل نوع b بود؛ به‌طوری‌که کمترین مقدار کلروفیل کل (۱/۵۱۳ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ) و b (۰/۳۲۳ میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ) به تیمار دمایی ۶- درجه سانتیگراد مربوط بود که مشاهده و ثبت شد. مقدار کلروفیل a تغییر معنی‌داری نداشت و این در حالی است که میزان کاروتنوئید، تحت تنش دمای پایین کاهش معنی‌داری داشت که این کاهش از دمای صفر درجه (۰/۳۳۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) ثبت گردید. از لحاظ تخریب رنگ سبز برگ‌ها نیز بیشترین کاهش رنگ (با بقای رنگ سبز ۶۱/۲۵٪ نسبت به شاهد) در تیمار دمایی ۶- درجه سانتیگراد مشاهده شد (جدول ۱). این نتایج با گزارش جعفری و همکاران (۱۳۸۵) مطابقت دارد. احتمالاً کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل کل این تحقیق به علت کاهش عوامل لازم جهت

www.SID.ir

Archive of SID

سنتز کلروفیل و تخریب ساختمان آن تحت تأثیر رادیکال‌های فعال اکسیژن است (Campos *et al.*, 2003). همبستگی منفی معنی‌دار بین پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و محتوی کلروفیل کل (r=-۶۰٪) نیز می‌تواند تأییدکننده اثر تخریبی رادیکال‌های فعال اکسیژن روی رنگدانه‌های کلروفیل در شرایط تنش دمایی پایین باشد (جدول ۲)؛ به‌طوری‌که کاتابولیسم کلروفیل در شرایط تنش دمای پایین، خصوصاً یخبندان افزایش یافته که زرد شدن برگ نهال‌ها در تیمار دمایی ۶- درجه سانتیگراد را به همراه داشت. در خصوص کاهش کاروتنوئیدها و ثبات مقدار کلروفیل a در این آزمایش می‌توان این‌گونه استنباط نمود که احتمالاً کاهش کاروتنوئیدها به علت اکسیده شدن این رنگدانه توسط رادیکال فعال اکسیژن بوده که از این طریق می‌تواند کلروفیل a را از گزند مولکول‌های اکسیژن یکتایی حفاظت کند (Berova *et al.*, 2002)، لیکن کلروفیل b در مقابل کلروفیل a نسبت به تنش دمای پایین حساسیت بیشتری داشته که به کاهش این رنگدانه در تنش مزبور منجر شده است (جعفری و همکاران، ۱۳۸۵).

نتایج داده‌ها بیانگر آن بود که تنش دمای پایین بر روی ساقه پایه (سیترنج) و پیوندک (پیج) تأثیر معنی‌داری نداشته، به‌طوری‌که در همه تیمارهای دمایی ساقه‌ها سبز بودند. در توجیه این نتیجه می‌توان این‌گونه استنباط کرد که احتمالاً تحمل‌پذیری بیشتر ساقه (در مقایسه با برگ) نسبت به تنش دمای پایین، با تفاوت در میزان تحمل‌پذیری اندام‌ها مرتبط است (فتوحی قزوینی و فتاحی مقدم، ۱۳۸۵).

جمع‌بندی

در جمع بندی و نتیجه‌گیری این پژوهش می‌توان چنین گفت که نهال نارنگی پیج بر روی پایه سیترنج تا دمای ۳- درجه سانتیگراد در صورت طی نمودن مرحله سازگاری (به دمای پایین) آثار تخریبی چندانی نداشته، به‌طوری‌که اغلب نهال‌ها (بیش از ۹۵٪) پس از اتمام مرحله تیمار و بازگشت از تنش یخبندان به رشد عادی خود برگشتند، لیکن در تیمار دمای ۶- درجه سانتیگراد اغلب برگ‌ها (بیش از ۷۰٪) علایم تخریبی چون زردی، جمع شدن برگ و خشکی را نشان دادند. این در حالی بود که ساقه پیوندک و پایه در این دما آسیبی نشان نداده، سبز باقی ماندند.

www.SID.ir

جدول ۱- جدول مقایسه میانگین اثر سطوح تنش دمای پایین (سرما و یخبندان) بر برخی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نارنگی پیچ پیوندی روی پایه سیترنج. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی است. میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حداقل یک حرف مشابه هستند، بر اساس آزمون توکی دارای تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نیستند.

صفات / تیمار دمایی	آسیب ساقه پایه (رتبه‌دهی)	آسیب ساقه پیوندک (رتبه‌دهی)	آب‌گزیدگی (رتبه‌دهی)	محتوی آب برگ (درصد)	نشت یونی (درصد)	پراکسیداسیون لیپید (میکروگرم در گرم وزن تازه برگ)	کربوهیدرات محلول (میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ)	پرولین (میلی‌گرم در گرم وزن تازه برگ)
شاهد ۲±۲۵ °C	۱ a	۱ a	۱ c	۶۳/۲۸ a	۱۱/۶۵ b	۰/۷۹۶ c	۳۸/۳ b	۳۴/۴۹۷ d
۹ °C	۱ a	۱ a	۱ c	۶۲/۹۴ a	۱۱/۹۹ b	۰/۶۶۶ c	۳۷/۳ b	۳۳/۰۵ d
۶ °C	۱ a	۱ a	۱ c	۶۲/۶۱ a	۱۲/۳۴ b	۰/۹۲۶ c	۳۹/۳ b	۳۵/۹۴ dc
۳ °C	۱ a	۱ a	۱ c	۶۲/۴۸ a	۱۲/۳۷ b	۱/۳۳۶ bc	۴۰/۳ b	۴۰/۵۸۷ bc
۰ °C	۱ a	۱ a	۱ c	۶۱/۴۳ a	۱۳/۶۹ b	۲/۲۹۳ ab	۵۵/۳ a	۴۴/۱۴۷ ab
-۳ °C	۱ a	۱ a	۲ b	۶۱ a	۱۶/۲۸ b	۲/۶۴۳ a	۴۲/۳ ab	۴۸/۰۰۷ a
-۶°C	۱ a	۱ a	۴ a	۳۳/۵۵ b	۷۵/۶۶ a	۲/۱۹۶ ab	۴۰/۳ b	۴۲/۰۲۳ ab

صفات / تیمار دمایی	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (درصد)	فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (واحد آنزیمی در گرم وزن تازه برگ)	فنل (میلی گرم در گرم وزن تازه برگ)	رنگ سبز برگ (درصد)	کلروفیل a (میلی گرم در گرم وزن تازه برگ)	کلروفیل b (میلی گرم در گرم وزن تازه برگ)	کلروفیل کل (میلی گرم در گرم وزن تازه برگ)	کاروتنوئید (میلی گرم در گرم وزن تازه برگ)
شاهد ۲±۲۵ °C	۵۳/۲۳ b	$۶/۲۸\times۱۰^{۴}$ b	۲/۸۴۰ c	۱۰۰ a	۱/۵۳۰a	۰/۵۹۶ ab	۲/۱۲۶ a	۰/۵۶ a
۹ °C	۵۳/۶۷ b	$۶/۲۱\times۱۰^{۴}$ b	۲/۸۴۳ c	۹۴/۵۰ a	۱/۵۴۶ a	۰/۶۲۶ a	۲/۱۷۰ a	۰/۵۹ a
۶°C	۵۲/۷۹ b	$۶/۳۴\times۱۰^{۴}$ b	۲/۸۴۰ c	۱۰۰/۴۵ a	۱/۵۱ a	۰/۵۶۶ ab	۲/۰۷۶ a	۰/۵۲۶ a
۳°C	۶۱/۷۸ a	$۸/۴۴\times۱۰^{۴}$ a	۲/۸۴۰ c	۹۹/۹۶ a	۱/۴۵ a	۰/۵۳۳ ab	۱/۹۸۳ ab	۰/۵۲ a
۰°C	۶۲/۳۳ a	$۷/۷۶\times۱۰^{۴}$ ab	۲/۸۵۶ ab	۱۰۲/۸۹ a	۱/۳۹۰a	۰/۴۹۳ ab	۱/۸۸۳ ab	۰/۳۳۶ b
-۳°C	۶۳/۵۰ a	$۷/۸۷\times۱۰^{۴}$ ab	۲/۸۶۳ a	۹۹/۳۲ a	۱/۲۷ a	۰/۳۷۳ ab	۱/۶۴۳ ab	۰/۳۲ b
-۶°C	۶۲/۸۵ a	$۶/۱۵\times۱۰^{۴}$ b	۲/۸۵۰ bc	۶۱/۲۵ b	۱/۱۸۶ a	۰/۳۲۳ b	۱/۵۱۳ b	۰/۲۹۶ b

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- ضریب همبستگی برخی واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نارنگی پیج پیوندی بر روی پایه سیترنج تحت تنش دمای پایین. * و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد؛ آب‌گزیدگی (Y_1)، محتوی آب (Y_2)، کربوهیدرات (Y_3)، نشت یونی (Y_4)، پرولین (Y_5)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (Y_6)، فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (Y_7)، رنگ سبز (Y_8)، فنل (Y_9)، پراکسیداسیون لیپید (Y_{10})، کلروفیل a (Y_{11})، کلروفیل b (Y_{12})، کاروتنوئید برگ (Y_{13})، کلروفیل کل (Y_{14}).

صفات	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9	Y_{10}	Y_{11}	Y_{12}	Y_{13}	Y_{14}
Y_1	۱													
Y_2	-۰/۹۴ **	۱												
Y_3	-۰/۰۸	۰/۰۵	۱											
Y_4	۰/۹۵ **	-۰/۹۹ **	-۰/۰۷	۱										
Y_5	۰/۳۸	-۰/۲۱	۰/۵۰ *	۰/۲۰	۱									
Y_6	۰/۳۵	-۰/۳۱	۰/۰۴	۰/۲۹	۰/۵۱ *	۱								
Y_7	۰/۲۶	-۰/۱۸	۰/۴۱	۰/۲۴	۰/۴۰	۰/۴۹ *	۱							
Y_8	-۰/۸۶ **	۰/۸۹ **	۰/۲۰	-۰/۹۰ **	-۰/۰۹	-۰/۱۳	-۰/۲۱	۱						
Y_9	۰/۲۲	-۰/۱۴	۰/۵۴ *	۰/۱۶	۰/۸۱ **	۰/۳۸	۰/۵۴ **	-۰/۰۶	۱					
Y_{10}	۰/۳۰	-۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۴۰	۰/۸۲ **	۰/۶۱ **	۰/۶۳ **	-۰/۲۰	۰/۷۷ **	۱				
Y_{11}	-۰/۶۴ **	۰/۵۴ *	۰/۰۵	-۰/۵۰ *	-۰/۶۸ **	-۰/۳۱	-۰/۳۱	۰/۵۴ **	-۰/۵۴ *	-۰/۵۰ *	۱			
Y_{12}	-۰/۶۷ **	۰/۵۴ *	-۰/۲۹	-۰/۵۴ *	-۰/۷۳ **	-۰/۱۳	-۰/۳۵	۰/۵۱ *	-۰/۵۳ *	-۰/۶۱ **	۰/۶۶ **	۱		
Y_{13}	-۰/۶۳ **	۰/۵۳ *	-۰/۳۱	-۰/۵۴ *	-۰/۷۸ **	-۰/۶۷ **	-۰/۵۱ **	۰/۳۷	-۰/۷۰ **	-۰/۸۵ **	۰/۶۴ **	۰/۶۷ **	۱	
Y_{14}	-۰/۷۲ **	۰/۵۹	-۰/۱۷	-۰/۵۷ **	-۰/۷۷ **	-۰/۲۵	-۰/۳۵	۰/۵۷ **	-۰/۵۹ **	-۰/۶۰ **	۰/۹۳ **	۰/۸۹ **	۰/۷۱ **	۱

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

جعفری، ر.، منوچهری کلانتری، خ. و احمدی موسوی، ع. (۱۳۸۶) اثر پاکلوبوترازول بر تجمع آنتی‌اکسیدان‌ها در نهال‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما. مجله زیست‌شناسی ایران ۲۰: ۲۰۶-۲۱۶.

جعفری، ر.، منوچهری کلانتری، خ. و ترک‌زاده، م. (۱۳۸۵) بررسی اثرات پاکلوبوترازول بر افزایش مقاومت به سرما در نهال‌های گوجه‌فرنگی. مجله زیست‌شناسی ایران ۱۹: ۲۹۰-۲۹۸.

فتوحی قزوینی، ر. و فتاحی مقدم، ج. (۱۳۸۵) پرورش مرکبات در ایران. انتشارات دانشگاه گیلان، رشت.

قربانلی، م.، نوجوان، م.، حیدری، ر. و فربودنیا، ط. (۱۳۸۰) تغییرات قندهای محلول، نشاسته و پروتئین‌ها در اثر تنش خشکی در دو رقم نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L.). نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم ۱: ۳۸-۵۳.

Allen, R. D. (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiology 107: 1049-1054.

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.

Berova, M., Zlatev, Z. and Stoeva, N. (2002) Effect of paclobutrazol on wheat seedling under low temperature stress. Plant Physiology 28:75-84.

Campos, 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. Plants. Journal of Plant Physiology 160: 283-292.

Chen, Y., Zhang, M., Chen, T., Zhang, Y. and An, L. (2006) The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of *Sabina*. South Afrcan Journal of Botany 72: 272-279.

Ghafar, M. F., Prasad, N., Weng, K. K. and Ismail, A. (2010) Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from *Citrus* species. African Journal of Biotechnology 9: 326-330.

Gusta, L. V., Trischuk, R. and Weiser, C. J. (2005). Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. Journal of Plant Growth Regulation 24: 308- 318.

Huang, R. H., Liu, J. H. Lu, Y. M. and Xia, R. X. (2008) Effect of salicylic acid on the antioxidant system in the pulp of 'Cara' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) at different storage temperatures. Postharvest Biology and Technology 47: 168-175.

Lang, P., Zhang, C. K. Ebel, R.C., Dane, F. and Dozier, W. A. (2005) Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. Gene 359: 111-118.

Molla, S., Villar-Salvador, P., Garcia-Fayos, P. 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

Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Filho, J. C. B., Kobayashi, A. K. Pileggi, M., Junior, R. P. L., Pereira, L. F. P. and Viiera, L. G. E. (2004) Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. × *Poncirus trifuliata* L., Raf.) overproducing proline. Plant Science 167: 1375-1381.

Nayyar, H., Bains, T. S. and Kumar, S. (2005) Chilling stressed chickpea seedlings: effect

www.SID.ir

Archive of SID

of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Environmental and Experimental Botany 54:275–285.

Pietrini, F., Chaudhuri, D., Thapliyal, A. P. and massacci, A. (2005) Analysis of chlorophyll fluorescents in mandarin leaves during aphoto-oxidative cold shock and recovery. Agriculture Ecosystems and Environment 106: 189-198.

Sanchez F. G., Carvajal, M., Porras I., Botıa, P., and Martınez, V. (2003) Effects of salinity and rate of irrigation on yield, fruit quality and mineral composition of 'Fino 49' lemon European. Journal of Agronomy. 19: 427-437.

Verslues, P. E., Agrawal, M., Katiyar-Agrwal, S., Zhu, J. and Zhu, J. K. (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. The Plant of Journal 45:523-539.

Xiao-shan, W. and Jian-guo, H. (2009) Changes of proline content, activity and active isoforms of antioxidative enzymes in two Alfalfa cultivars under salt stress. Agricultural Science in China 8: 431-440.

Zhao-Shi, X., Lan-Qin, X., Ming, C., Xian-Guo, C. C., Rui-Yue, Z., Lian-Cheng, L., Yun-Xiang, Z., Yan, L., Zhi-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 and Biology 65:719-732.

www.SID.ir

Archive of SID

Physiological and biochemical responses of Page mandarin on citrange rootstock to low temperature stress

Yahya Tadjvar [1]*, Reza Fotouhi Ghazvini [1], Yousef Hamidoghli [1] and Reza Hassan Sajedi [2]

[1] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Guilan, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran

Abstract

Low temperature stress is an important environmental factor that limits citrus cultivation and yields. In this study, the effect of low temperature stress on physiological and biochemical responses of Page mandarin on citrange rootstock (on two year old plants), in incubator condition (with 65±5 relative humidity and 15000 lux Light intensity) has been investigated. Experiment was conducted using randomized design including low temperature (9, 6, 3, 0, -3 and -6°C) and control treatments (25±2°C). The comparison of treatment means showed that the lowest total chlorophyll (1.513 mg/gr leaf FW), green color (61.25%) and leaf water content (33.55% leaf FW) were related to -6°C temperature treatment. The highest accumulation of proline (48 mg/gr leaf FW) was related to -3°C temperature and maximum amount of carbohydrate (55.3 mg/gr leaf FW), was obtained with 0°C temperature treatment. Also, the highest amount of water soaking (51-75%) and electrolyte leakage (75.66%) in -6°C temperature, lipid peroxidation (2.643 MDA µgr/gr leaf FW), antioxidant capacity (63.5%) and phenol (2.863 mg/gr leaf FW) in -3°C temperature, were observed. The highest SOD enzyme activity (8.44×10^4 IU/gr leaf FW) was related to 0°C temperature. It could be concluded that Page mandarin (on citrange rootstock) could tolerate the freezing stress up to -3°C by increasing of proline, carbohydrate (osmotic adjustment) and antioxidant capacity.

Key words: Antioxidants, Low temperature stress, Mandarin, Citrus

* Corresponding Author: ytajvar@yahoo.com

www.SID.ir