فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا (س)
دوره ۳۶، شماره ۲، پیاپی ۷۶، تابستان ۱۴۰۲، ص ۹۴-۸۱
نوع مقاله: پژوهشی
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۳
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir

The Quarterly Scientific Journal Of Applied Biology
Vol.36, No.2, Sering. 76, Summer 2024, p. 87-100.
Article type: Research Paper

https://doi.org/10.22051/jab.2023.41521.1507

اثر تنش یخ‌زدگی بر برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی گل‌های زینتی میمونی (*Antirrhinum majus*) و بنفشه (*Viola × wittrockiana*)

بهروز صالحی اسکندری*[۱]، زهره نصیریان جزی[۲]، جلیل عباس‌پور[۳]

چکیده

مقدمه: *یخ زدگی یکی از تنش‌های غیرزیستی است که اثرات زیانباری بر رشد و بهره‌وری گیاهان دارد. این پژوهش به منظور بررسی برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دو گیاه زینتی و مقاوم به سرما شامل گل میمونی (Antirrhinum majus) و بنفشه (Viola × wittrockiana) در شرایط تنش یخ‌زدگی انجام شد.* ***مواد و روش‌ها:*** *از کمینه دمایی دی‌ماه سه مکان مختلف گلخانه، شهر اصفهان و فریدون‌شهر (به ترتیب دماهای ۲۰، ۳- و ۱۱- درجه سانتی‌گراد) جهت اعمال تیمارهای مختلف دمایی بر روی گیاهان ۷۰ روزه کشت شده در گلدان به‌مدت ۱۵ روز استفاده شد.* ***نتایج:*** *اگرچه روند تغییرات نسبت کلروفیل a و b در دو گیاه متفاوت بود، اما با افزایش برودت هوا رشد طولی ساقه روند کاهشی داشت بطوری‌که در پایین‌ترین دما، طول ساقه گل میمونی و بنفشه به‌ترتیب ۶۳ و ۵۰ درصد نسبت به گیاهان رشد یافته در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد کاهش داشت. مقدار ترکیبات فنلی، کربوهیدرات‌های محلول و هیدروژن‌پراکسید روند افزایشی داشت. همچنین افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم کاتالاز هر دو گیاه و آسکوربات پراکسیداز گل میمونی تحت برودت ۱۱- درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید اما فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در هیچ یک از سطوح دمای انجماد تغییر معنی‌داری نداشت.* ***بحث:*** *بنابراین به نظر می‌رسد گیاه گل میمونی و بنفشه با بکارگیری سازوکارهای تنظیم اسمزی و با توانایی‌های متفاوت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، می‌توانند در برابر تنش حاصل از انجماد مقاومت کنندکه نشان‌دهنده راهکارهای مقاومتی متفاوت وابسته به ژنوتیپ آنهاست.*

واژه های کلیدی: ***ترکیبات فعال اسمزی، تنش سرما، رنگدانه‌های فتوسنتزی، گیاهان زینتی***

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران ایمیل (*نویسنده مسئول: Behsalehi@ Pnu.ac.ir)
۲- دانش‌آموخته ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۳- دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان

مقدمه

گیاهان هنگامی تنش غیرزیستی سرما را می‌توانند تجربه کنند که برای مدت طولانی در معرض دمای پایین قرار گیرند. تنش یخبندان یا دمای کمتر از صفر درجه برای گیاهان، به‌ویژه زمانی که گیاهان در مرحله رشد فعال هستند (در اواخر بهار یا اوایل پاییز) بسیار مضر است (Nievola *et al.*, 2017; Hajihashemi *et al.*, 2020). تنش سرما سبب تغییر فرآیندهای مختلف ریختی، سلولی، فیزیولوژیکی و سایر فرآیندهای بیوشیمیایی گیاهان می‌شود که کاهش رشد و نمو و بهره‌وری را در پی دارد (Yadav, 2010). بنابراین، دمای پایین یکی از بزرگترین عوامل محیطی کاهش‌دهنده محصول است که منجر به تلفات سنگین محصولات زراعی می‌شود. با توجه به تغییرات آب و هوایی، کشف راهکارهایی و اتخاذ تدابیری برای کاهش آسیب‌های وارد شده به محصولات مختلف توسط دماهای پایین برای پژوهشگران به یک چالش تبدیل شده است (Saleem *et al.*, 2021). تنش حاصل از دمای پایین، به دو تنش سرمایی (chilling stress) و تنش یخزدگی (freezing stress) تقسیم می‌شود که برای تنش سرما، دمای بین صفر و ۱۵ درجه سانتی‌گراد را در نظر می‌گیرند و تنش یخزدگی را دمای کمتر از صفر درجه می‌دانند (Ding *et al.*, 2019). دماهای پایین علاوه بر تاثیر بر رشد و نمو گیاهان، به‌صورت مشهود پراکنش جغرافیایی آنها را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. گیاهان مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر به تنش سرما حساس هستند و فاقد توانایی سازگاری با تنش سرما هستند ولی گیاهان مناطق معتدل اگر برای مدتی در معرض تنش سرما قرار گیرند قادر به تحمل دماهای یخزدگی خواهند بود که اصطلاحاً به آن سازگاری به تنش سرما (Cold acclimation) می‌گویند (Sanghera *et al.*, 2011; Ritonga & Chen, 2020).

پاسخ گیاهان زراعی به تنش دمای پایین متنوع است. بسیاری از محصولات زراعی مانند برنج (*Oryza sativa*)، ذرت(*Zea mays*) ، سویا (*Glycine max*)، کتان (*Gossypium herbaceum*)، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) به تنش سرما حساس هستند و قابلیت سازگاری به سرما را ندارند. برخلاف آن، برخی گیاهان از جمله جو دوسر (*Avena sativa*) به تنش سرما مقاوم بوده ولی به یخ زدگی حساس هستند. گروه سوم گیاهانی مانند گندم (*Hordeum sativa*)، جو (*Hordeum sativa*) و چاودار(*Secale cereale*) هستند که به خوبی با تنش یخزدگی سازگار شده‌اند (Ritonga & Chen, 2020). با این وجود، برخی گیاهان همچون گندم زمستانه (*Triticum aestivum*)، آرابیدوسیس (*Arabidopsis*) و جو (*Hordeum vulgaris*) بدون سازگاری به تنش سرما قادر به تحمل دمای یخزدگی نخواهند بود (Zhao *et al.*, 2015).

تنش سرما رشد و نمو گیاهان را به چند دلیل مختل می‌کند. اول اینکه با تاثیر بر پایداری غشاء، سبب ایجاد یکسری پاسخ‌های پایین‌دست در گیاه می‌شود (Orvar *et al.*, 2000) سپس، ثبات پروتئین‌ها یا کمپلکس‌های پروتئینی را مختل می‌کند و فعالیت آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های حذف کننده گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) را کاهش می‌دهد. این فرآیندها منجر به ممانعت نوری، اختلال در فتوسنتز و تخریب قابل توجه غشاها می‌شود (Siddiqui & Cavicchioli, 2006; Ruelland *et al.*, 2009). در نهایت، تنش سرما با تاثیر بر بیان ژن‌ها، سنتز پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار خواهد داد (Ruelland *et al.* 2009; Ding *et al.* 2019).

باید توجه داشت که تنش یخ زدگی بیش از تنش سرما به گیاهان آسیب می‌رساند و حتی ممکن است منجر به مرگ گیاه شود. در شرایط طبیعی، آسیب انجماد با ایجاد یخ در خارج سلول شروع می‌شود (Pearce, 2001). با تشکیل هسته‌ی یخ، این هسته رشد کرده و بلورهای یخی را ایجاد می‌کند که در آپوپلاست نفوذ کرده و با ایجاد تفاوت در فشار اسمزی بیرون و درون سلول، منجربه خروج آب از سلول و کم آبی آن می‌شود. همچنین با رشد بلور یخ، به غشا سلولی نیز آسیب وارد می‌شود (Thomashow, 1999). در جریان سازگاری گیاهان به تنش دمای پایین، اسموتیکوم‌هایی چون پرولین، قندهای محلول و مولکول‌های دیگری با وزن کم تولید می‌شوند که نقش آنها محافظت از گیاهان در برابر تخریب حاصل از سرماست (Ruelland *et al.*, 2009).

یکی از مهمترین پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله دمای پایین، تجمع ROS است. در مورد دماهای

پایین اعتقاد بر این است که تجمع آنها به‌دلیل عدم تعادل در واکنش‌های اولیه (واکنش‌های نوری) و ثانویه (واکنش‌های تثبیت دی‌اکسیدکربن) فتوسنتز صورت می‌گیرد (Li *et al.*, 2009). تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال موجب آسیب به اجزای ضروری سلول و اختلال در متابولیسم سلولی می‌شود (Siddiqui & Cavicchioli 2006; Ruelland *et al.* 2009;). گیاهان برای کاهش اثرات مخرب گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن، سیستم دفاعی خود را فعال می‌کنند تا با فرآیند خنثی‌سازی، پتانسیل آسیب-زایی آنها را کاهش دهند. این سیستم کارآمد شامل سازوکارهای آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی است که این دو باهمدیگر به عنوان یک سیستم موثر سم‌زدا عمل می‌کنند. سیستم غیرآنزیمی شامل فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ترکیبات فنلیک، توکوفرول، گلوتاتیون و آسکوربات بوده و پاسخ آنتی‌اکسیدان آنزیمی شامل محدوده وسیعی از آنزیم‌ها از جمله سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوتاتیون از جمله آسکوربات پراکسیداز (APX) گلوتاتیون رودکتاز (GR)، منودهیدروآسکوربات ردکتاز (MDHAR) و دهیدروآسکوربات‌ردکتاز (DHAR) می شود (Rajput *et al.*, 2021).

گل میمونی (*Antirrhinum majus*) از گیاهان زینتی مناطق معتدل مدیترانه‌ای است که گل‌دهی آن به سرمای بهاره وابسته است (Noto & Romano 1988). بنفشه (*Viola* × *wittrockiana*) گیاهی زینتی با گل‌های زیبا و مقاوم به سرماست (Deljou *et al.*, 2016). اثر تیمارهای مختلف یخزدگی بر گیاه بنفشه (*Viola gracilis* L) نشان داد کاهش دما منجر به کاهش رشد و افزایش نشت الکترولیت این گیاه می‌شود و مرگ این گیاه در دماهای پایین‌تر از ۱۸- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (Nezami *et al.*, 2011). در پژوهش دیگر رابطه تنش سرما و تنش خشکی در گیاه بنفشه (*Viola* × *wittrockiana*) بررسی شد، ظرفیت زراعی ۶۰ درصد در دمای صفر درجه با افزایش ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان منجر به افزایش رشد رویشی و افزایش مقاومت به تنش یخزدگی این گیاه می‌گردد (Oraee *et al.*, 2022). هدف از این تحقیق ارزیابی واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاهان زینتی بنفشه و گل میمونی به یخزدگی است که منجر به درک بهتر نقش سازگاری، در مقاومت آنها به یخزدگی می‌شود و بخشی از مکانسیم‌های اختصاصی تحمل به یخزدگی در این گیاهان مشخص می‌گردد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گل‌های زینتی مقاوم به سرما بنفشه و گل میمونی از موسسه پاکان بذر خریداری شد. قبل از جوانه‌زنی بذرها (در اواسط مهرماه)، سطوح آن‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی و سپس چندین بار با آب معمولی شستشو شدند. پس از جوانه‌زنی و رشد بذرها در سینی کشت حاوی پیت ماس، سه گیاهچه یکسان به گلدان‌های پلاستیکی حاوی پیت ماس، خاک معمولی، پرلیت و خاک برگ با نسبت‌های برابر منتقل و در گلخانه‌ای با دمای ۵±۲۵ درجه سانتی‌گراد (با نور طبیعی) نگهداری شدند. پس از ۵۰ روز گیاهان برای سازگاری با تنش سرما (در اواخر آذرماه) در محیط بیرون گلخانه (شهر اصفهان) با دمای ۶/۲ ± ۸/۴ درجه سانتی‌گراد قرارگرفته و در نهایت گیاهچه‌ها ۷۰ روزه در اوایل دی‌ماه بمدت ۱۵ روز در سه مکان مختلف شامل محیط گلخانه (۵±۲۵ درجه سانتی‌گراد)، مزرعه کنار گلخانه (شهر اصفهان با ارتفاع ۱۵۵۰ متر از سطح دریا) و مزرعه واقع در فریدون‌شهر (با ارتفاع ۲۴۹۰ متر از سطح دریا) قرار گرفتند. کمینه دما ثبت شده برای این مکان‌ها در این مدت ۲۰، ۳/۴- و ۱۰/۵- درجه‌سانتی‌گراد بود و نمودارها براساس این کمینه دمایی ترسیم شدند، به‌نحوی که دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد و مابقی تیمارها نسبت به آن ارزیابی گردید. آزمایش‌ها بر اساس طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی (برای هر تیمار با سه تکرار) صورت گرفت.

محاسبه میزان رشد: پس از ۱۵ روز گلدان‌های حاوی گیاه به آزمایشگاه منتقل شده و طول ساقه هر گیاه در تیمارهای مختلف اندازه گیری و برحسب سانتی‌متر ثبت شد که به عنوان معیاری برای اندازه گیری رشد مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری نسبت کلروفیل a و b: برای اندازه‌گیری نسبت کلرفیل a به b، قطعاتی از چهارمین برگ (از راس) گیاهان به طور تصادفی جدا شد سپس ۵۰ میلی‌گرم از بافت برگ گیاهان وزن و با استون ۸۰ درصد در هاون به‌طور کامل ساییده و حجم آن با استون به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل سانتریفیوژ شد و از محلول فوقانی برای اندازه‌گیری

کلروفیل استفاده شد. جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج‌های، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد (Arnon, 1949) و کلروفیل a و b طبق روابط ۱ و ۲ محاسبه و مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه و از تقسیم میزان کلرفیل a به b نسبت آنها ارائه گردید.

رابطه ۱: $$Chl\ b(mg/g) = (22.9A_{645} - 4.68A_{663}) \times \frac{V}{1000} \times \frac{1}{W}$$

رابطه ۲: $$Chl\ a(mg/g) = (12.7A_{663} - 2.69A_{645}) \times \frac{V}{1000} \times \frac{1}{W}$$

در رابطه ۱ و ۲، A، V و W به‌ترتیب، میزان جذب نوری عصاره در طول موج مورد مطالعه، حجم نهایی عصاره و وزن برگ تر است.

اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنلی: محتوای فنل کل از روش Velioglu و همکاران (۱۹۹۸) محاسبه شد. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از چهارمین برگ (از راس) هر تیمار را با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد حاوی اسید کلریدریک ۱ درصد سائیده و به‌مدت ۴۸ ساعت در تاریکی نگه‌داری شد. سپس مخلوط حاضر در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و از محلول رویی و با استفاده از معرف فولین جهت تعیین ترکیبات فنلی کل استفاده شد (Velioglu *et al.*, 1998). برای محاسبه غلظت ترکیبات فنلی کل با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک طبق رابطه ۳، غلظت ترکیبات فنلی بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر گزارش شد.

رابطه ۳: $$Y = 0.0299X + 0.1056 \quad \text{و} \quad R^2 = 0.9699$$

در این رابطه، Y، X و R به‌ترتیب، میزان جذب نوری عصاره در طول موج ۷۲۵ نانومتر، میزان ترکیبات فنلی و ضریب اطمینان منحنی می‌باشد.

سنجش کربوهیدرات‌های محلول: اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول در آب (Water Soluble Content; WSC) به روش Dubois و همکاران (۱۹۵۶) (Abou-Shanab *et al.*, 2003)، با استفاده از بافت تازه برگ به روش فنل- اسیدسولفوریک انجام پذیرفت. بدین منظور ۱ گرم بافت برگ توزین شد و با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد. سپس مخلوط حاضر در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک افزوده شد و با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از گلوگز میزان قند برحسب میلی گرم در گرم وزن تر، طبق رابطه ۴ گزارش شد.

رابطه ۴: $X = \frac{A}{W}$ در این رابطه، X، A و W به‌ترتیب، کربوهیدرات‌های محلول در آب برحسب میلی‌گرم در گرم وزن‌تر، میزان قند بر اساس منحنی استاندارد و وزن برگ تر می‌باشد.

محاسبه محتوای پراکسیدهیدروژن: برای سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۰/۵ گرم بافت برگ توزین شد و با تری-کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد (w/v) درون هاون چینی بر روی یخ کاملاً ساییده شدند. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار به مدت ۱۵ دقیقه در دور rpm ۱۰۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ، ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $۲۸۰ mM^{-1}\ Cm^{-1}$ و رابطه ۵ محاسبه شد (Sergiev *et al.*, 1997).

رابطه ۵: $A=\varepsilon bc$ در این رابطه، A، ε، b و c به‌ترتیب، میزان جذب نوری عصاره، ضریب خاموشی، میزان پراکسید هیدروژن و عرض کوت که یک سانتی‌متر بود.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: برای استخراج عصاره‌ی گیاهی، ۰/۱ گرم از بافت تر اندام هوایی به همراه ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج فسفات ۵۰ میلی‌مولار (با اسیدیته ۷/۸) حاوی پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP) ۲ درصد، اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار و دی‌تیول تریتول (DDT) ۱ میلی‌مولار، در هاون سرد ساییده شد. محلول

حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) : سنجش فعالیت آنزیم CAT با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۳) انجام شد. مخلوط واکنش جهت سنجش آنزیم کاتالاز، شامل ۹۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی ۱۰ میلی‌مولار هیدروژن‌پراکسید و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز به صورت جذب کاهشی در مدت زمان ۱ دقیقه و در طول موج ۲۴۰ نانومتر ثبت و توسط ضریب خاموشی $۰/۰۳۶\ m\ M^{-1}\ cm^{-1}$، طبق رابطه ۵ محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): سنجش فعالیت این آنزیم با استفاده از روش Asada (۱۹۸۷) انجام شد. مخلوط واکنش جهت سنجش فعالیت این آنزیم، شامل ۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی ۰/۲ میلی‌مولار EDTA و ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات سدیم بود که به آن ۵۰ میکرولیتر هیدروژن‌پراکسید ۴ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراجی افزوده شد. فعالیت APX طی ۱ دقیقه و در طول موج ۲۹۰ نانومتر ثبت و توسط ضریب خاموشی $۲/۸\ m\ M^{-1}\ cm^{-1}$، طبق رابطه ۵ محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز(POD): برای سنجش میزان فعالیت آنزیم POD، از مخلوط واکنش استفاده شدکه شامل ۸۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷)، حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۱۰۰ میکرولیتر هیدروژن‌پراکسید ۰/۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراجی بود. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در گروه شاهد و تیمار بر اساس تغییرات جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۶ نانومتر برای مدت یک دقیقه ثبت و توسط ضریب خاموشی $۲۵/۵\ m\ M^{-1}\ cm^{-1}$، طبق رابطه ۵ محاسبه شد (Plewa *et al.*, 1991). فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین براساس تغییرات واحد جذب در دقیقه محاسبه گردید.

محاسبه‌های آماری: کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار SPSS 26 انجام شد. نتایج با استفاده از Tow-way ANOVA با دو عامل اصلی گیاهان زینتی و سرما تحلیل شدند. در شکل‌ها، ستون‌ها نماینده میانگین ۳ تکرار و میله‌های عمودی نشان دهنده خطای معیار ($\pm$ SE) می‌باشند. مقایسه میانگین‌ها با بکارگیری آزمون چند دامنه‌ای دانکن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

نتایج آنالیز واریانس اثر دما، گیاه و برهمکنش آنها در جدول ۱ نشان داد که دما، تمام شاخص‌های اندازه‌گیری شده را بجز نسبت کلروفیل a/b و فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز تحت تاثیر قرار داد ($P<0.05$)، تاثیر گیاه نیز همانند دما بود، هرچند بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز تاثیر نداشت ($P>0.05$). برهمکنش دما و گیاه نیز همانند تاثیر گیاه بود البته برخلاف عدم تاثیر دو عامل اصلی دما و گیاه بر نسبت کلروفیل a/b و محتوای فنل کل برهمکنش آنها بر این شاخص‌ها معنی‌دار شد ($P<0.05$).

مطابق شکل ۱- A، با کاهش دما، طول ساقه در هر دو گیاه مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد (۲۰ درجه‌سانتی‌گراد) روند کاهشی معنی‌داری را نشان داد. این کاهش در دمای ۳- و ۱۱- در گل میمونی به ترتیب مقادیر ۱۸/۸ و ۳۷/۵ درصد بود ($P<0.05$) و در گیاه بنفشه کاهش معنی‌دار ۲۱/۴ و ۵۰ درصدی در مقایسه با گیاه شاهد (دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد) داشت. با توجه به این‌که روند کاهش طول در هر دو گیاه با کاهش دما مشابه بود بنابراین طبق جدول ۱ برهمکنش‌های آنها (گیاه × سرما) معنی‌دار نشد ($P>0.05$).

نسبت کلروفیل a به b در گل میمونی در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد (۲۰ درجه‌سانتی‌گراد) داشت ($P<0.05$) ولی در پایین‌ترین دما (۱۱- درجه سانتی‌گراد) این نسبت تغییر معنی‌داری نداشت و با گروه

شاهد در یک سطح قرار گرفت. نسبت کلروفیل a به b در گل بنفشه با افزایش برودت هوا نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P<0.05$) ولی اختلاف معنی‌داری بین دمای ۳- و ۱۱- درجه سانتی‌گراد مشاهده نشد (شکل ۱-B). با توجه به پاسخ متفاوت دو گیاه به افزایش برودت دما بنابراین طبق جدول ۱ برهمکنش‌های آنها (گیاه × یخزدگی) معنی‌دار شد ($P<0.05$).

جدول ۱- آنالیز واریانس (مجموع مربعات) اثر دما،گیاه و برهمکنش اولیه آن‌ها بر طول ساقه، نسبت کلروفیل a به b، کربوهیدرات‌ها، فنل کل، میزان پراکسیدهیدروژن و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (POD) .

Table 1. The analysis of variance (Sum of square) of the effect of temperature, plant and their interaction on stem length, the ratio of chlorophyll a to b, on total phenolic, carbohydrate so, hydrogen peroxide (H_2O_2) and activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (POD).

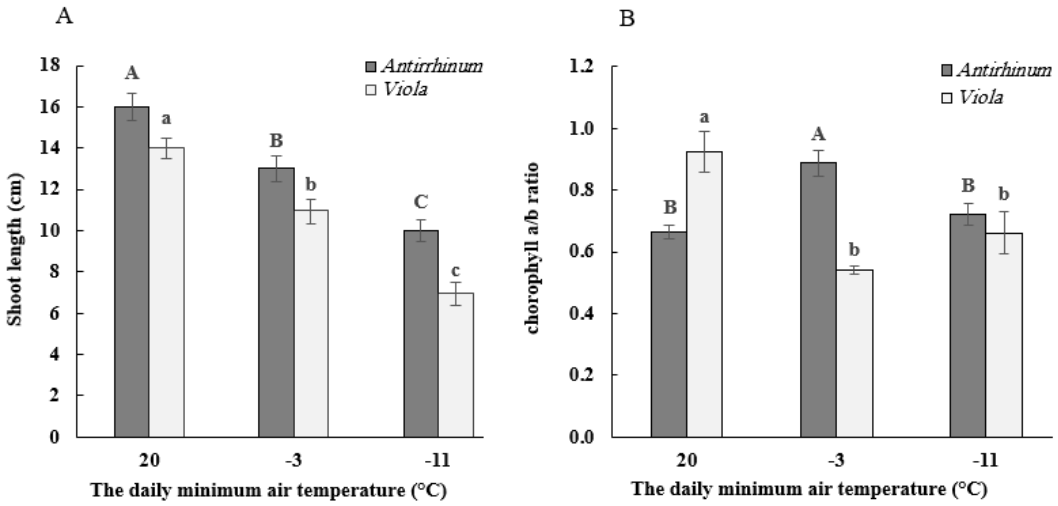
مجموع مربعات (Sum of square)									
Sources of variations	Degrees of freedom	POD activity	APX activity	CAT activity	Hydrogen peroxide	soluble carbohydrates	Total phenolic	Chl. a to b ratio	Shoot length
Cold	2	0.023^{ns}	0.00^{*}	2.88^{***}	0.27^{***}	2.84^{***}	0.22^{***}	0.05^{ns}	127^{***}
Plant	1	0.00^{ns}	0.00^{ns}	0.11^{***}	0.014^{***}	6.5^{***}	0.006^{***}	0.01^{ns}	24.5^{**}
Cold × Plant	2	0.00^{ns}	0.00^{ns}	0.001^{***}	0.005^{*}	0.342^{***}	0.001^{ns}	0.4^{***}	1^{ns}
Error		0.009	0.000	0.008	0.001	0.002	0.000	0.009	1
The coefficient of variation		6.1	2.3	6.9	15.1	2.9	6.2	4.4	6.2

ns ، *،** و *** بترتیب نشان‌دهنده معنی دار نبودن، معنی‌دار در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد، معنی‌دار در سطح احتمال کمتر از ۱ درصد و معنی‌دار در سطح احتمال کمتر از ۰/۱ درصد

ns, *, ** and ***: non-significant, significant at probability level 5%, 1% and 0.1% respectively

نتایج حاصل از تنش یخزدگی بر تغییرات محتوای فنل کل در برگ گل میمونی و بنفشه نشان داد که کاهش دما میزان محتوای فنل کل در برگ هر دو گیاه را افزایش داد (شکل ۲-A). افزایش فنل کل در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد برای گل میمونی ۱/۹ برابر و در بالاترین سطح تنش (دمای ۱۱- سانتی‌گراد) به ۲/۴ برابر گیاهان کشت داده شده در دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد رسید. در گل بنفشه نیز به ترتیب در دمای ۳- و ۱۱- درجه سانتی‌گراد افزایش ۱/۷ و ۲ برابری محتوای فنل کل در مقایسه با گروه شاهد دیده شد ($P<0.05$). همچنین با توجه به پاسخ مشابه فنل کل در هر دو گیاه نسبت به تنش، برهمکنش آن‌ها با تنش یخزدگی (گیاه × یخزدگی) معنی‌دار نشد (جدول ۱).

میزان قندهای محلول در اندام‌های هوایی هر دو گیاه با کاهش دمای هوا روندی افزایشی داشت بطوری‌که میزان کربوهیدرات‌های محلول گل میمونی در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد، ۲/۸ برابر میزان کربوهیدرات‌های محلول این گیاه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود و در پایین‌ترین دما (۱۱- درجه سانی‌گراد) این افزایش به ۳/۳ برابر رسید. گیاه بنفشه نیز در نتیجه اعمال سرمای ۳- و ۱۱- درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب افزایش معنی‌دار ۱۱/۴ و ۳۸/۱ درصدی کربوهیدرات‌های محلول را نسبت به دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد داشت (شکل ۲-B). با توجه به روند افزایشی متفاوت کربوهیدرات‌های محلول در هر دو گیاه تحت تنش یخزدگی، اثر تقابل گیاه و یخزدگی معنی‌دار شد (جدول ۱).

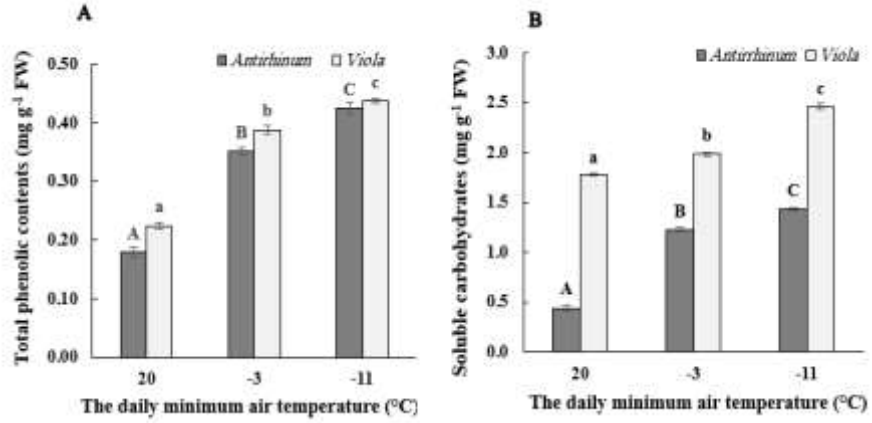


شکل۱- اثر دماهای مختلف بر طول اندام‌های هوایی (A) و نسبت کلروفیل a / b (B) در گل میمونی و بنفشه. داده‌ها، میانگین ± خطای استاندارد از سه تکرار است. حروف مشابه در هر ستون (حروف کوچک و بزرگ به‌ترتیب برای گیاه بنفشه و میمون) بر اساس آزمون دانکن نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار (P > ۰/۰۵) می باشد.

Fig. 1- The effect of different temperatures on shoot length (A) and the ratio of chlorophyll a to b (B) in snapdragon (*Antirrhinum majus*) and viola (*Viola* × *wittrockiana*). Data are mean ± SE of three replicates (n = 3). The presence of similar letters, in each column, (Lowercase letters for viola and uppercase letters for snapdragon), indicate no statistical significant difference based on Duncan's test (P>0.05).

در نتیجه تنش یخزدگی در دمای ۳- درجه‌سانتی‌گراد، افزایش معنی‌داری در محتوای آب اکسیژنه (پراکسیدهیدروژن) هر دو گیاه در مقایسه با گروه شاهد (۲۰ درجه‌سانتی‌گراد) مشاهده شد (P<0.05) بطوری‌که این افزایش به‌ترتیب در گل میمونی و بنفشه ۱۳/۱ و ۶/۲ برابر نمونه‌های شاهد هر یک از گیاهان بود که در دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد رشد یافته بودند (شکل ۳-A). بیشترین مقدار پراکسیدهیدروژن در تنش دمایی ۱۱- درجه‌سانتی‌گراد مشاهده شد که منجر به افزایش ۲۹/۶ برابری این ماده در گیاه گل میمونی شد. در گیاه بنفشه مقدار پراکسیدهیدروژن گیاهان قرار گرفته در دمای ۱۱- حدود ۸/۹۶ برابر گیاهان شاهد بود (P<0.05). با توجه به الگوی متفاوت افزایش میزان پراکسیدهیدروژن دو گیاه نسبت به تنش یخزدگی، اثر هر کدام از عوامل و برهمکنش آن‌ها (گیاه × یخزدگی) معنی‌دار شد (جدول ۱).

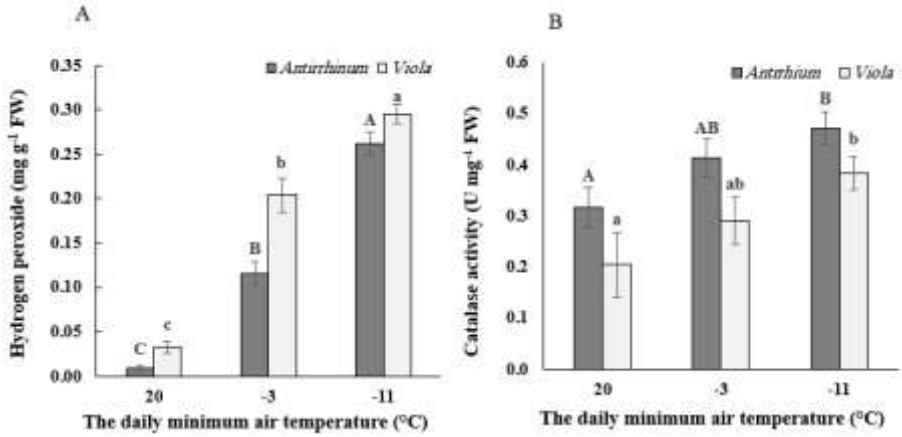
مطابق شکل ۳-B، با کاهش دما تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو گیاه مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد (۲۰ درجه‌سانتی‌گراد) روند افزایشی نشان داد. این افزایش در دمای ۳- و ۱۱- درجه‌سانتی‌گراد در گیاه میمونی بترتیب مقادیر ۳۰/۳ و ۴۸/۶ درصد بود و در گیاه بنفشه، افزایش ۴۲/۱ و ۸۷/۹ درصدی در مقایسه با گیاهان شاهد رشد یافته در دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد داشت که تغییرات افزایش فعالیت آنزیم در هر دو گیاه فقط در تیمار ۱۱- درجه‌سانتی‌گراد معنی‌دار بود (P<0.05). با توجه به این‌که روند افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز با کاهش دما در هر دو گیاه متفاوت بود بنابراین طبق جدول ۱ اثر هرکدام از عوامل (یخزدگی و گیاه) و برهمکنش‌های آنها معنی‌دار شد.



شکل ۲- اثر دماهای مختلف بر محتوی فنل کل (A) و محتوی کربوهیدرات محلول (B) در گل میمونی و بنفشه. داده‌ها میانگین ± خطای استاندارد از سه تکرار است. حروف مشابه در هر ستون (حروف کوچک و بزرگ به‌ترتیب برای گیاه بنفشه و میمون) بر اساس آزمون دانکن نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار (P > ۰/۰۵) می باشد.

Fig. 2. The effect of different temperatures on total phenolic (A) and carbohydrate content (B) in snapdragon (*Antirrhinum majus*) and viola (*Viola* × *wittrockiana*). Data are mean ± SE of three replicates (n = 3). The presence of similar letters, in each column, (Lowercase letters for viola and uppercase letters for snapdragon), indicate no statistical significant difference based on Duncan's test (P>0.05).

نتایج حاصل از تنش حاصل از برودت دما بر تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ گل میمونی و بنفشه در شکل A-۴ نشان داده شده است. افزایش فعالیت این آنزیم در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد برای هیچ کدام از گیاهان مورد بررسی نسبت به تیمار شاهد (۲۰ درجه سانتی‌گراد) معنی‌دار نشد (P>0.05). اما در بالاترین سطح تنش (دمای ۱۱ - سانتی‌گراد) نسبت به گروه شاهد در گل میمونی افزایش ۱۹/۸ درصدی مشاهده شد (P<0.05). با توجه به پاسخ مشابه هر دو گیاه نسبت به تنش یخزدگی، اثر گیاه در تقابل با سرما معنی‌دار نشد (جدول ۱). مطابق شکل B-۴، فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام‌های هوایی هر دو گیاه با کاهش دمای هوا تغییر معنی‌دار مشاهده نشد به طوری که تمام تیمارها در یک سطح قرار گرفتند (P>0.05). با توجه به روند مشابه هر دو گیاه نسبت به تنش یخزدگی، اثر گیاه، یخزدگی و تقابل یخزدگی و گیاه معنی‌دار نشد (جدول ۱).

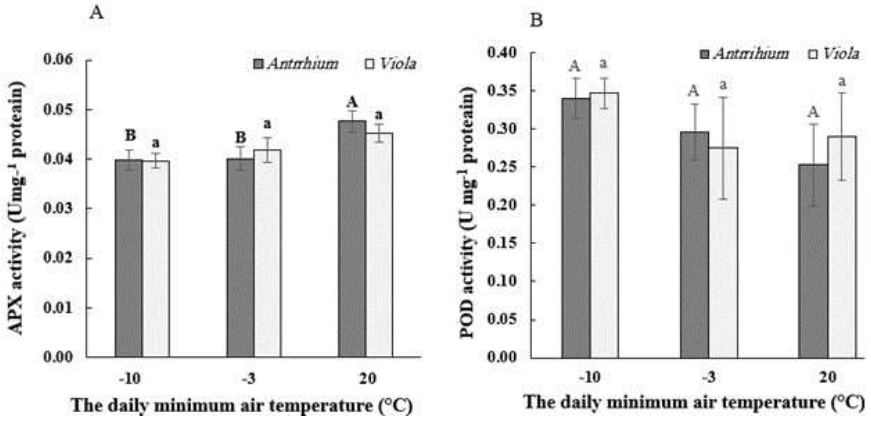


شکل ۳- اثر دماهای مختلف بر میزان پراکسیدهیدروژن (A) و فعالیت آنریم کاتالاز (B) در گل میمونی و بنفشه. داده‌ها میانگین ± خطای استاندارد از سه تکرار است. حروف مشابه در هر ستون (حروف کوچک و بزرگ به‌ترتیب برای گیاه بنفشه و میمون) بر اساس آزمون دانکن نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار (P > ۰/۰۵) می باشد.

Fig. 3. The effect of different temperatures on hydrogen peroxide (H_2O_2) content (A) and activity of catalase (B) in snapdragon (*Antirrhinum majus*) and viola (*Viola* × *wittrockiana*). Data are mean ± SE of three replicates (n = 3). The presence of similar letters, in each column, (Lowercase letters for viola and uppercase letters for Snapdragon), indicate no statistical significant difference based on Duncan's test (P>0.05).

بحث

رشد و نمو گیاهان تابع شرایط بهینه محیطی است به گونه‌ای که انحراف از این شرایط می‌تواند باعث ایجاد تنش در آنها شود. یکی از شرایط محیطی نامساعد، دمای پایین است که رشد، نمو و توزیع جغرافیایی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. علاوه بر این دماهای پایین می‌تواند تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی زیادی در گیاهان ایجاد کند (Hereme *et al.*, 2021). نتایج این پژوهش نشان داد که با کاهش دمای محیط (در حد یخزدگی)، رشد طولی ساقه دو گیاه گل میمونی و بنفشه به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. کاهش رشد طولی گیاهان در نتیجه تنش یخزدگی پیش از این نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال، تنش یخزدگی بر روی دو اکوتیپ گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgar* L.) منجر به کاهش طول ساقه این اکوتیپ‌ها شده است (Rashed Mohassel *et al.*, 2009). مهمترین واکنش گیاهان به تنش دمای پایین در رشد آنها نمایان می‌گردد. دمای پایین با ممانعت از رشد سلول‌ها، رشد ریشه و ساقه را کاهش می‌دهد (Pouramir-Dashtmian *et al.*, 2014). گیاهان برای دستیابی به مقاومت لازم در برابر سرما، باید رشد خود را در طول مدت سازگاری با سرما متوقف کنند. در چنین شرایطی، گیاهان دارای تشکیلات ریختی فشرده می‌شوند و انواع گیاهان زمستانه معمولاً دارای برگ‌های رُزت (طوقه‌ای) می‌گردند (Rashed Mohassel *et al.* 2009). کاهش طولی اندام‌های هوایی در گیاه تراریخت گل اطلسی (*Petunia* spp) که ژن‌های مقاوم کننده در برابر یخزدگی را دریافت کرده بود نیز مشاهده شد بطوری‌که این تغییرات، مقاومت آنها را به تنش دمای پایین افزایش داد (Walworth *et al.*, 2014). برخلاف رشد طولی، تغییرات نسبت کلروفیل a به b در گل میمونی و بنفشه متفاوت بود. در گل میمونی تحت تنش دمایی ۳- درجه سانتی‌گراد افزایش نسبت کلروفیل a به b دیده شد درحالی‌که هر دو دمای زیر صفر (۳- و ۱۱- درجه سانتی‌گراد) سبب کاهش این نسبت در گیاه بنفشه شد. کاهش نسبت کلروفیل a به b در گیاهانی که در معرض تنش سرما قرار گرفته‌اند دیده شده است اما این کاهش در گیاهانی که فرآیند سازگاری در آنها ایجاد شده بود در مقایسه با گیاهانی که بدون سازگار شدن، در معرض سرما قرار گرفته‌اند کمتر بوده است (Shen *et al.*, 2021). تغییرات میزان کلروفیل بسته به گونه گیاهی و شدت تنش دمای پایین می‌تواند متفاوت باشد. برخی مطالعات افزایش میزان کلروفیل (Yu *et al.*, 2020) و برخی دیگر کاهش (Rehman & Tanti, 2021) را نشان داده‌اند. کاهش نسبت کلروفیل a به b در گیاه بنفشه ممکن است نشان دهنده حساسیت بیشتر کلروفیل a در دماهای زیر صفر در دستگاه فتوسنتزی این گیاه باشد درحالی‌که بالا بودن این نسبت در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد در گیاه میمونی احتمالاً نشان‌دهنده ممانعت نوری فتوسیستم I (PSI) توسط سرما است (Kalisz *et al.*, 2016).



شکل ۴- اثر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (A) و گایاکول پراکسیداز (B) در گل میمونی و بنفشه. داده‌ها میانگین ± خطای استاندارد از سه تکرار است. حروف مشابه در هر سری (حروف کوچک و بزرگ به ترتیب برای گیاه بنفشه و میمون) بر اساس آزمون دانکن نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار (P > ۰/۰۵) می باشد.

Fig. 4. The effect of different temperatures on activity of APX and POD in snapdragon (*Antirrhinum majus*) and viola (*Viola* × *wittrockiana*). Data are mean ± SE of three replicates (n = 3). The presence of similar letters, in each column, (Lowercase letters for viola and uppercase letters for Snapdragon), indicate no statistical significant difference based on Duncan's test (P>0.05).

محتوای ترکیبات فنلی هر دو گیاه با افزایش تنش به‌تدریج افزایش یافت. مشابه با نتایج این پژوهش، افزایش ترکیبات فنلی تحت تنش یخزدگی در گیاه *Haberlea rhodopensis* نیز گزارش شده است (Georgieva *et al.*, 2021). به خوبی مشخص شده است که مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئید که در بیوسنتز ترکیبات فنلی نقش دارد، در نتیجه تنش‌های محیطی منجر به تجمع ترکیبات فنلی مختلف می‌شود (Sharma *et al.*, 2019). ترکیبات فنلی در گیاهان، آنتی‌اکسیدان‌های قدرتمندی هستند که با از بین بردن گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، تحت تنش‌های غیرزیستی، نقش مهمی در مقاوم‌سازی آنها ایفاء می‌کنند (Bistgani *et al.*, 2019). همچنین مشخص شده است تحت تنش دمای پایین، تولید ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد، سپس این ترکیبات به دیواره سلولی به‌عنوان سوبرین یا لیگنین اضافه می‌شوند. رسوب سوبرین و لیگنین مقاومت گیاهان در برابر دماهای پایین افزایش می‌دهد (Chalker-Scott & Fuchigami, 2018) و قدرت کش‌سانی دیواره سلولی را کاهش داده در نهایت منجر به کاهش رشد می‌شود (Solecka, 1997) که با یافته‌های قبلی ما در مورد کاهش وزن خشک این گیاهان در تنش یخ زدگی مطابقت دارد (Salehi-Eskandari *et al.*, 2022). بنابراین افزایش مقدار ترکیبات فنلی در گیاه میمونی و بنفشه در اثر دماهای انجماد احتمالاً با ایفای نقش آنتی‌اکسیدانی آنها مرتبط است که موجب کاهش گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر و مقاوم‌سازی آنها می‌شود تا تحمل این گیاهان به سرمای شدید را افزایش دهد. افزایش بیشتر ترکیبات فنلی در دمای ۱۱- نسبت به ۳- درجه سانتی‌گراد در هر دو گیاه، شاهد دیگری بر نقش آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات برای مقابله با آثار مخرب دماهای انجماد است.

دماهای انجماد (۱۱- و ۳- درجه سانتی‌گراد) موجب افزایش معنی‌دار کربوهیدرات‌های محلول در دو گیاه مورد مطالعه شد. یکی از بارزترین تغییرات بیوشیمیایی در طول سازگاری با سرما، تجمع قندهای محلول در سلول‌ها است. قندهای محلول به‌عنوان اسمولیت، املاح سازگار، مولکول سیگنال‌دهنده، اسکلت کربن و ذخایر انرژی در بافت‌های گیاهی در زمستان عمل می‌کنند (Couée *et al.*, 2006; Guy *et al.*, 2008). در طول فصل زمستان، قندهای محلول گیاهانی که در معرض دمای پایین قرار می‌گیرند افزایش می‌یابد و سپس در بهار کاهش می‌یابند زیرا آنها در این فصل در حال سازگاری نیستند (Siminovitch, 1981).

در این مطالعه دماهای زیر صفر، سبب افزایش شدید محتوای هیدروژن‌پراکسید در هر دو گیاه زینتی شد به‌طوری که این مقدار در سرمای ۱۱- به اوج خود رسید. به‌طور مشابه، افزایش محتوای هیدروژن‌پراکسید در دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به سرمای نخود (*Cicer arietinum* L.) که در معرض دماهای انجماد قرار گرفته بوده‌اند نیز مشاهده شده است اما به دلیل تولید کمتر هیدروژن‌پراکسید در ژنوتیپ مقاوم به سرما چنین استنباط شده بود که تولید کمتر این گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS)، رابطه مستقیمی با بقاء ژنوتیپ‌های گیاه نخود در شرایط تنش یخزدگی دارد (Soureshjani *et al.*, 2021). پیشنهاد شده است که هیدروژن‌پراکسید اثر دوگانه دارد زیرا در غلظت‌های کم به‌عنوان یک سیگنال (پیام) برای القاء سنتز آنزیم‌های مهارکننده ROS عمل می‌کند و از طرفی دیگر با تجمع در مقادیر بالا می‌تواند اثر زیان‌باری بر اجزای سلولی داشته باشد (Quan *et al.*, 2008). دمای انجماد باعث تجمع ROS و افزایش فعالیت آنزیم‌های مهارکننده آنها می‌شود که در این شرایط افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برای حذف هیدروژن‌پراکسید تجمع یافته کافی نیست (Arslan *et al.*, 2018). بنابراین به‌نظر می‌رسد تولید هیدروژن‌پراکسید در دمای انجماد با ظرفیت ارتقاء یافته آنتی‌اکسیدانی گیاه میمونی و بنفشه مطابقت نداشته و در نتیجه تجمع آن رخ داده است.

بین تحمل به تنش یخزدگی و یک سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمد ارتباط تنگاتنگی وجود دارد (Kaur *et al.*, 2009). گیاهان مقاوم به سرما به‌دلیل داشتن محتوای آنتی‌اکسیدان آنزیمی قوی‌تر می‌توانند با کاهش تولید ROS و پراکسیداسیون لیپیدی، بقاء خود را افزایش دهند (Soureshjani *et al.*, 2021). در این مطالعه بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز نشان داد که قرارگیری گیاه بنفشه در معرض دماهای انجماد (۱۱- و ۳- درجه سانتی‌گراد) تنها سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۱۱- درجه سانتی‌گراد شده است و دو آنزیم دیگر در هر دو شرایط دمایی تغییر معنی‌داری نداشته‌اند. این نتایج نشان داد آنزیم کاتالاز مسئول اصلی کاهش هیدروژن‌پراکسید در سرمای ۱۱- درجه سانتی‌گراد گیاه بنفشه است و از این نظر با یافته‌هایی که هماهنگی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با یکدیگر در ایجاد مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو را نشان می‌دهند (Zhang *et al.*, 2017)، در تضاد است. مقایسه فعالیت کاتالاز در بین ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه، نقش این آنزیم را در ایجاد مقاومت به سرما در ژنوتیپ‌های مقاوم تایید شده است (Janda *et al.*, 2007; Soureshjani *et*

al., 2021). در گیاه میمونی افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در دمای ۱۱- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. با توجه به مطالعات انجام شده، افزایش فعالیت کاتالاز ممکن است با حذف سریع هیدروژن‌پراکسید، گیاهان را از آسیب اکسیداتیو محافظت کند. همچنین مشخص شده است که افزایش سطح هیدروژن‌پراکسید به دلیل انجماد، می‌تواند از طریق فعالیت ترکیبی کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز کاهش یابد (Lee *et al.*, 2004; Pfeiffer *et al.*, 2013). با این وجود، افزایش زیاد هیدروژن‌پراکسید با افزایش برودت، حاکی از آن است که علی‌رغم افزایش فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی برای کاهش هیدروژن‌پراکسید، میزان این گونه‌های اکسیژن فعال همچنان در گیاه گل میمونی و بنفشه بالاست. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که سرمای ۳- درجه سانتی‌گراد تاثیری معنی‌داری در القاء فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در هر دو گیاه ندارد. بنابراین در این سطح از تنش یخزدگی، پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی این دو گیاه شامل این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نبوده و احتمالاً در این دما سایر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی وارد عمل شده‌اند. باید توجه داشت که کاتالاز نسبت به آسکوربات پراکسیداز میل ترکیبی کمتری به هیدروژن‌پراکسید دارد. بنابراین در مقادیر بالای هیدروژن‌پراکسید حذف این گونه واکنش‌گر اکسیژن عمدتاً توسط کاتالاز انجام می‌شود در حالی‌که آسکوربات پراکسیداز در غلظت‌های کمتر وارد عمل می‌شود (Sofo *et al.*, 2015). همچنین بر اساس مطالعات قبلی، مشخص شده است که تحت تنش یخزدگی تغییرات فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهان مختلف و حتی در بین ارقام یک گونه می‌تواند متفاوت و گاهی متضاد باشد (Tajvar *et al.*, 2011; Pfeiffer *et al.*, 2013). در این پژوهش برخلاف مطالعات پیشین (Tajvar *et al.*, 2011)، تغییر معنی‌داری در فعالیت گایاکول پراکسیداز در هر دو گیاه و هر دو سطح تنش یخزدگی رخ نداد که این احتمالاً نشان از عدم مشارکت این آنزیم در پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی دو گیاه مورد مطالعه در این شرایط تنشی دارد.

نتیجه‌گیری

تنش یخزدگی، رشد طولی گیاهان زینتی را کاهش داد اما اثرات متفاوتی بر نسبت کلروفیل a و b در دو گیاه در اولین سطح تنش (۳- درجه سانتی‌گراد) داشت. الگوی افزایشی مشابهی در مقدار ترکیبات فنلی و کربوهیدرات‌های محلول با افزایش برودت در دو گیاه دیده شد. افزایش ترکیبات فنلی علاوه بر از خاصیت اکسیدانتی، با چوبی و چوب‌پنبه‌ای شدن دیواره‌ها و کاهش کش‌سانی آنها در نهایت منجر به کاهش رشد می‌شود که از مکانیسم‌های اصلی مقاومت در برابر انجماد است و افزایش کربوهیدرات‌های محلول بیانگر نقش تنظیم اسمزی در ایجاد مقاومت در این گیاهان برای مواجه با دماهای انجماد است. افزایش شدید محتوای هیدروژن‌پراکسید در دو گیاه نشان دهنده تنش اکسیداتیو تحت شرایط دمایی زیر صفر است و پاسخ سیستم-آنتی‌اکسیدان آنزیمی در این گیاهان شامل افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز در بنفشه و کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گل میمونی در دمای ۱۱- درجه سانتی‌گراد است که نشان‌دهنده سازوکار متفاوت این دو گیاه زینتی در مقابل تنش یخبندان است.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور استان اصفهان به دلیل حمایت مالی از این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می-شود.

عدم تعارض منافع

نویسندگان در انتشار این مقاله علمی پژوهشی از هرگونه سرقت ادبی و جعل نداشته و انتشار این مقاله برای نویسندگان فاقد منفعت مالی و تجاری است. این مقاله قبلا در مجله دیگر منتشر نشده و تا مشخص شدن نظر نهایی داوران و مدیر مجله به جای دیگری ارسال نخواهد شد.

منابع

Abou-Shanab, R., J. Angle, T. Delorme, R. Chaney, P. Van Berkum, H. Moawad, Ghanem, K. and Ghozlan, H. (2003) Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. New Phytologist 158: 219-224.

Aebi, H. (1983) Catalase. Methods of enzymatic analysis.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiology 24: 1-15.

Arslan, Ö., Eyidoğan, F. and Ekmekci, Y. (2018) Freezing tolerance of chickpea: biochemical and molecular changes at vegetative stage. Biologia Plantarum 62: 140-148.

Asada, K. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. Photoinhibition 227-287.

Bistgani, Z.E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F. and Morshedloo, M.R. (2019) Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. Industrial Crops and Products 135: 311-320.

Chalker-Scott, L. and Fuchigami, L.H. (2018) The role of phenolic compounds in plant stress responses. In: Paul HL (ed) Low temperature stress physiology in crops. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp 27−40.

Couée, I., C. Sulmon, Gouesbet, G. and El Amrani, A. (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 57: 449-459.

Deljou, A., Hosseini-Vasoukolaei, M., Goudarzi, S., Falahatian, S., Mirzaie-Asl, A., Hosseini-Vasoukolaei, N. and Shad, M.A.A. (2016) Differential gene expression in response to cold stress in *Viola wittrockiana*. BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology 97: 87-94.

Ding, Y., Shi, Y. and Yang, S. (2019) Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. New Phytologist 222: 1690-1704.

Georgieva, K., Mihailova, G., Gigova, L., Dagnon, S., Simova-Stoilova, L. and Velitchkova, M. (2021) The role of antioxidant defense in freezing tolerance of resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. Physiology and Molecular Biology of Plants 27: 1119-1133.

Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J. and Hincha, D.K. (2008) Metabolomics of temperature stress. Physiologia Plantarum 132: 220-235.

Hajihashemi, S., Brestic, M., Landi, M. and Skalicky, M. (2020) Resistance of *Fritillaria imperialis* to freezing stress through gene expression, osmotic adjustment and antioxidants. Scientific Reports, 10: 1-13.

Hereme, R., Galleguillos, C., Morales-Navarro, S. and Molina-Montenegro, M.A. (2021) What if the cold days return? Epigenetic mechanisms in plants to cold tolerance. Planta 254: 1-11.

Janda, T., Szalai, G., Leskó, K., Yordanova, R., Apostol, S. and Popova, L.P. (2007) Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. Phytochemistry 68: 1674-1682.

Kalisz, A., Jezdinský, A., Pokluda, R., Sękara, A., Grabowska, A. and Gil, J. (2016) Impacts of chilling on photosynthesis and chlorophyll pigment content in juvenile basil cultivars. Horticulture, Environment, and Biotechnology 57(4):330-309.

Karimzadeh Soureshjani, H., Nezami, A., Nabati, J., Oskoueian, E. and Ahmadi-Lahijani, M.J. (2022) The Physiological, Biochemical, and Molecular Modifications of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seedlings Under Freezing Stress. Journal of Plant Growth Regulation 41(3):1109-1124.

Kaur, S., Gupta, A. K., Kaur, N., Sandhu, J. S. and Gupta, S. K. (2009). Antioxidative enzymes and sucrose synthase contribute to cold stress tolerance in chickpea. Journal of Agronomy and Crop Science, 195(5): 393-397.

Lee, J., Koo, N. and Min, D. B. (2004) Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 3: 21-33.

Li, Z., Wakao, S., Fischer, B.B. and Niyogi, K.K. (2009) Sensing and responding to excess light. Annual Review of Plant Biology 60: 239-260.

Nezami, A., Keykha, A.F., Mousavi, M.J., Izadi, E., Nezami, S., Yousef, S. M. (2011) Effect of freezing stress on viola (*Viola gracilis* L.) under laboratory conditions. Journal of Agroecology 3(4): 430-438. (In Persian).

Nievola, C.C., Carvalho, C.P., Carvalho, V. and Rodrigues, E. (2017) Rapid responses of plants to temperature changes. Temperature 4: 371-405.

Noto, G. and Romano, D. (1988) Timing of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) in cold greenhouse cultivation. Acta Horticulturae 246: 175-182.

Oraee, A., Tehranifar, A., Nezami, A., Shoor, M. (2019) Evaluation of biochemical and morphophysiological responses of Viola× wittrockiana to drought and cold stress. Journal of Plant Process and Function 8 (32): 103-120.

Orvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F. and Dhindsa, R.S. (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. The Plant Journal 23:785-794.

Pearce, R. S. (2001) Plant freezing and damage. Annals of Botany 87: 417-424.

Pfeiffer, T., Štolfa, I., Žanić, M., Pavičić, N., Cesar, V. and Lepeduš, H. (2013) Oxidative stress in leaves of two olive cultivars under freezing conditions. Acta Biologica Hungarica 64: 341-351.

Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wagner, E. D. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 247: 57-64.

Pouramir-Dashtmian, F., Khajeh-Hosseini, M. and Esfahani, M. (2014) Alleviating harmful effects of chilling stress on rice seedling via application of spermidine as seed priming factor. African Journal of Agricultural Research 9: 1412-1418.

Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W. and Li, H.Y. (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. Journal of Integrative Plant Biology 50: 2-18.

Rajput, V.D., Singh, R.K., Verma, K.K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F.R., Meena, M., Gour, V.S., Minkina, T., Sushkova, S. and Mandzhieva, S. (2021) Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. Biology 10: 267.

Rashed Mohassel, M.H., Nezami, A., Bagheri, A., Hajmohammadnia, K. and Bannayan, M. (2009) Evaluation of freezing tolerance of two fennel (*Foeniculum vulgar* L.) ecotypes under controlled conditions. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 15: 131-140.

Rehman, M. and Tanti, B. (2021) Screening of boro rice varieties of Assam, India to estimate their potential resistance to cold and heat stresses. Vegetos 34: 540–554.

Ritonga, F. N. and Chen, S. (2020) Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants. Plants 9: 560.

Ruelland, E., M.-N. Vaultier, A. Zachowski, and Hurry, V. (2009) Cold signalling and cold acclimation in plants. Advances in Botanical Research 49: 35-150.

Saleem, M., Fariduddin, Q. and T, Janda. (2021) Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: a review. Journal of Plant Growth Regulation 40: 464-485.

Salehi-Eskandari, B., Nasirian Jazi, Z., Abbaspour, J. and Daneshmand, F. (2022) Some growth and biochemical changes of viola (*Viola* × *wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) ornamental plants to freezing stress. Journal of Plant Process and Function 11 (48): 249-262 (In Persian)

Sanghera, G.S., Wani, S.H., Hussain, W. and Singh, N.B. (2011) Engineering cold stress tolerance in crop plants. Current Genomics 12: 30.

Sergiev, I., Alexieva, V. and Karanov, E. (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences 51(3): 121-124.

Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M. and Zheng, B. (2019) Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. Molecules 24: 2452.

Shen, Z.J., Qin, Y.Y., Luo, M.R., Li, Z., Ma, D.N., Wang, W.H. and Zheng, H.L. (2021) Proteome analysis reveals a systematic response of cold-acclimated seedlings of an exotic mangrove plant *Sonneratia apetala* to chilling stress. Journal of Proteomics 248: 104349.

Siddiqui, K. S. and Cavicchioli, R. (2006) Cold-adapted enzymes. Annual review of biochemistry 75: 403-433.

Siminovitch, D. (1981) Common and disparate elements in the processes of adaptation of herbaceous and woody plants to freezing-a perspective. Cryobiology 18: 166-185.

Solecka, D. (1997) Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. Acta Physiologiae Plantarum 19(3): 257-268.

Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. and Vitti, A. (2015) Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. International Journal of Molecular Sciences 16: 13561-13578.

Tajvar, Y., Ghazvini, R.F., 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: 576-580.

Thomashow, M. F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annual Review of Plant Biology 50: 571-599.

Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4113-4117.

Walworth, A. E., Song, G.q. and Warner, R. M. (2014) Ectopic AtCBF3 expression improves freezing tolerance and promotes compact growth habit in petunia. Molecular Breeding 33: 731-741.

Yadav, S. K. (2010) Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. Agronomy for Sustainable Development 30: 515-527.

Yu, P., Jiang, N., Fu, W., Zheng, G., Li, G., Feng, B., Chen, T., Ma, J., Li, H., Tao, L. and Fu, G. (2020) ATP hydrolysis determines cold tolerance by regulating available energy for glutathione synthesis in rice seedling plants. Rice 13: 1-16.

Zhang, Y.P., Xu, S., Yang, S.J. and Chen, Y.Y. (2017) Melatonin alleviates cold-induced oxidative damage by regulation of ascorbate–glutathione and proline metabolism in melon seedlings (*Cucumis melo* L.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 92: 313-324.

Zhao, C., Lang, Z. and Zhu, J.K. (2015) Cold responsive gene transcription becomes more complex. Trends in Plant Science 20: 466-468

Effect of freezing stress on some physiological and enzymatic responses of ornamental plants, viola (*Viola* × *wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*)

Behrooz Salehi-Eskandari [1*], Zohre Nasirian Jazi[2], Jalil Abbaspour[3]

Received: 2022.08.19
Accepted: 2023.02.12

Abstract

Introduction: Freezing is one of the abiotic stresses that has harmful effects on plant growth and productivity. This study was performed to investigate some physiological and biochemical responses of two ornamental and cold-resistant plants, including the viola (*Viola* × *wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) under freezing stress. **Materials and methods:** To apply different temperature treatments on 70-days-old plants, the minimum temperature in January was used in three different places, including the greenhouse, the city of Isfahan and Fereydunshahr (temperatures of 20, 3- and -11 ° C, respectively) for 15 days. **Results:** Changes in the chlorophyll a/b ratio were differences in the two plants with increasing freezing stress, but shoot length gradually decreased and at the lowest temperature in viola and snapdragon plants were 63 and 50% of their controls (20 °C), respectively. The content of phenolic compounds, soluble carbohydrates and hydrogen peroxide also increased. In addition, a significant increase in catalase activity was observed in both plants under freezing temperatures, while the increase in ascorbate peroxidase activity was significant only in snapdragon at -11 °C. However, no significant change in the activity of guaiacol peroxidase was found in two plants under freezing temperatures. **Discussion:** Therefore, it seems that snapdragon and violet plants can withstand freezing stress by using osmotic regulation mechanisms as well as different abilities of antioxidant enzymes, which indicate different resistance strategies depending on their genotype.

Keywords: **Cold stress, ornamental plants, osmoticum, photosynthesis pigments**

Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran
2. Graduated from MSc in biochemistry, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran
Graduated from PhD in Plant Physiology, University of Isfahan
E-mail of corresponding author*: Behsalehi@pnu.ac.ir