مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری

دوره ۹، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲

صفحات ۶۸-۴۰

Online ISSN: 4493-2476

Print ISSN: 2020-2538

www.irijournals.com

اثرات تنش سرما بر خصوصیات بیوشیمیایی در گیاهان مقاوم به سرما

زهره نصیریان جزی[۱]، منصوره شفیعی[۲]

[۱]کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه پیام نور یزد مرکز تفت

[۲]کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان

چکیده

قرارگیری گیاهان تحت تنش سرما، موجب تغییرات بیوشیمیایی در آنها میشود. سرما یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی است که باعث افزایش خاصیت شکل‌پذیری، توزیع جغرافیایی و عملکرد بسیاری از گیاهان می‌شود. تنش سرما در یک محدوده کم، باعث ایجاد ناهنجاری‌های مختلف در سطوح مختلف سازمان سلولی می‌شود. با هدف بررسی پاسخهای بیوشیمیایی تحت تنش سرما در دو گونه گیاهی گیاه بنفشه (viola odorata) و گل میمونی (Antirrhinum majus)، در شرایط کنترل شده با سه تیمار دمایی شامل دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر، دمای ۳ درجه سانتی‌گراد و ۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ هفته در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید. سپس میزان کلروفیل a و b، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، اسمولیتهای سازگار شامل قندکل، پرولین و بتائین گلیسین، پروتئین، مالون دآلدهید و همچنین فعالیت آنزیمهای کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و آسکوربات پراکسیداز (APX) در برگ‌های گیاهان مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنش سرمای ۱۰ درجه سانتیگراد زیر صفر، موجب افزایش مقدار کاروتنوئیدها، پرولین، قند کل، ترکیبات فنلی، آنتوسیانینها و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گردید. در حالیکه مقدار کلروفیل a، مالون دآلدهید، پروتئین و فعالیت آنزیمهای کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، نسبت به گیاهان شاهد در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد تغییری نشان ندادند. نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه گل میمونی و گل بنفشه با افزایش مقدار اسمولیتهای سازگار و آنتیاکسیدانهای غیرآنزیمی و برخی آنتیاکسیدانهای آنزیمی از آسیبهای ناشی از تنش سرما جلوگیری مینماید.

واژه‌های کلیدی: بنفشه، پاسخ های بیوشیمیایی، تنش سرما، گل میمونی

مقدمه

پیشبینی میشود که جمعیت جهان با سرعت نگران‌کننده‌ای به شش میلیارد نفر تا پایان سال ۲۰۵۰ برسد. از طرف دیگر، بهرهوری کشاورزی با تقاضای مواد غذایی مطابقت ندارد. دلایل این امر کمبود آب، کاهش باروری خاک و تنشهای غیرعادی مختلف است. ازاین‌رو، به حداقل رساندن این خسارات نگرانی همه ملل جهت افزایش نیازهای غذایی است. تنش به‌عنوان متغیرهای محیطی تعریف‌شده است که میتواند یک فشار مضر آسیب‌زننده را در گیاهان ایجاد کنند. موجودات زنده با توجه به شرایط محیطی، دو استراتژی اصلی اجتناب از تنش یا تحمل تنش را برای زنده ماندن تحقق بخشیده‌اند. مکانیسم اجتناب از تنش در حیوانات خونگرم که به‌راحتی حرکت می‌کنند مشهود است. گیاهان فاقد این مکانیسم پاسخ هستند که تحرک است؛ ازاین‌رو آن‌ها ازنظر بیوشیمیایی، مولکولی و ژنتیکی تکامل‌یافته‌اند و مکانیسم‌هایی جهت جلوگیری از تنش به کار میبرند(Shanker and Venkateswarlu, 2011).

مبانی نظری

تنش

تنش[1]، واژه‌ای است که اولین بار توسط دانشمندان علوم بیولوژیک در مورد موجودات زنده بکار برده شد. بعدها این واژه از علم فیزیک گرفته شده و آن را به‌عنوان هر عاملی که امکان بالقوه وارد آوردن صدمه به موجودات زنده را دارد تعریف نمودند. همان طوری که در تعریف آمده، تنش دارای توان آسیب‌رسانی است که به‌صورت نتیجه یک متابولیسم غیرعادی روی داده و ممکن است به‌صورت افت رشد، مرگ گیاه و یا مرگ بخشی از گیاه بروز کند (حکمت شعار، ۱۳۷۲). تنش‌های محیطی را معمولاً به دو دسته تقسیم کرده‌اند: تنش‌های زیستی[2] و تنش‌های غیر زیستی[3]. تنش غیر زیستی باعث از بین رفتن عمده گیاهان زراعی در سراسر جهان می‌شود و شامل تشعشع، شوری، سیلاب، خشکسالی، افراط در دما، فلزات سنگین و غیره است. از طرف دیگر حملات توسط عوامل بیماری زا مختلفی از قبیل قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتدها و گیاهخواران انجام می‌شود. از آنجا که گیاهان از نظر طبیعت بی‌ثبات هستند، چاره‌ای برای فرار از این نشانه‌های محیطی ندارند. گیاهان برای غلبه بر این تهدیدات ناشی از فشارهای زیستی و غیر زیستی مکانیسم‌های مختلفی را ایجاد کرده‌اند. آن‌ها محیط تنش خارجی را حس می‌کنند، تحریک می‌شوند و پاسخ‌های سلولی مناسب ایجاد می‌کنند. آن‌ها این کار را با محرک‌های دریافت شده از حسگرهای مستقر در سطح سلول یا سیتوپلاسم انجام داده و به کمک مسیرهای مختلف انتقال سیگنال به ماشین‌های رونویسی واقع در هسته منتقل می‌کنند. این منجر به تغییرات رونویسی می‌شود که گیاه را در برابر تنش تحمل می‌کند. مسیرهای سیگنالینگ به‌عنوان یک پیوند دهنده عمل می‌کنند و نقش مهمی بین سنجش محیط تنش و تولید یک واکنش بیوشیمیایی مناسب بازی می‌کنند(Gull et al., 2019).

گیاهان و تنش های محیطی

گیاهان در چرخه زندگی خود با دامنه‌ای از تنش‌های محیطی نظیر گرما، سرما، خشکی، شوری و غیره مواجه هستند که به‌شدت بر عملکرد گیاه تأثیر گذاشته و یکی از عوامل کلیدی در پراکندگی گونه‌های گیاهی محسوب می‌شود. گیاهان سازوکارهای خاصی برای تحمل در برابر این تنش‌ها بکار می‌گیرند. وقتی گیاهان در معرض تنش قرار می‌گیرند، اطلاعات توسط مسیر انتقال پیام منتقل شده و نهایتاً پاسخ به این پیام‌ها منجر به تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان می‌شود. معمولاً یک نوع تنش با تنش‌های دیگر همراهی یا دنبال می‌شود؛ مثلاً تنش گرما با تنش خشکی ناشی از دست دادن فیزیکی آب و تنش سرما با تنش خشکی ناشی از در دسترس نبودن فیزیولوژیک آب دنبال می‌شود. به دلیل تعداد زیاد خطرات محیطی که گیاه

[1] Stress

[2] Biotic stress

[3] Abiotic stress

در یک زمان خاص با آن روبروست، علامت دهی تنش غیرزنده پدیده بسیار پیچیده‌ای است. گیاهان ابزارهایی برای احتراز و مقابله با این تنش‌ها دارند. از یک‌سو قادر به تولید پاسخ‌های قابل القا و مناسبی هستند که منجر به یک تغییر خاص مطلوب شده که برای آن شرایط تنش ویژه تخصصی یابد. از سوی دیگر، همپوشانی قابل ملاحظه‌ای بین اجزای علامت‌دهی غیرزنده با نقاط آغازی که مسیرهای علامت‌دهی تنش در آن‌ها هماهنگ می‌شوند، وجود دارد. تنش‌ها با بیان یک سری از ژن‌ها گیاه را قادر به ترمیم آسیب ناشی از تنش کرده یا گیاه را در برابر تنش‌های محیطی که در آینده پیش خواهد آمد، حمایت می‌کنند یعنی در واقع گیاه را با محیط سازگار کرده و بقای آن را بیشتر تأمین و تضمین می‌کنند و از این طریق به‌نوعی با محیط خود سازش می یابند. سازش‌ها اعم از مورفولوژیکی و بیوشیمیایی به نحوی انجام می‌گیرد که گیاه بتواند بهتر با محیط تطابق پیدا کرده و از امکانات مادی محیط خود به گونه شایسته‌ای استفاده کند .به‌طور مثال سازش بیوشیمیایی در گیاهان شامل انواع تغییرات بیوشیمیایی در سلول است .این تغییرات شامل تکامل راه‌های متابولیکی جدید، تجمع متابولیت های با وزن مولکولی کم، سنتز پروتئین‌های خاص، سازوکارهای سم زدایی و تغییر در میزان فیتوهورمونها هستند که اغلب تنش‌های محیطی این تغییرات ایجاد شده و گیاهانی را که با تنش مواجه شده‌اند در مقابله با آن تنش و سایر تنش‌ها کمک می‌کنند (کارگر خرمی و زنگنه، ۱۳۹۷).

باروری گرده و مجموعه بذر در تنش سرما

تحمل سرما در مرحله تولید مثل به‌عنوان مجموعه بذر و باروری گرده بیان می‌شود. این تا حد زیادی تابعی از ساختار گل و عملکرد تحت تنش است. تنش سرد باعث واکنشی در گیاه می‌شود که مانع از رسیدن قند به گرده می‌شود. بدون قند هیچ نشاسته‌ای وجود ندارد که انرژی لازم برای جوانه زنی گرده‌ها را فراهم کند؛ و بدون گرده افشانی نمی‌تواند رخ دهد، در نتیجه هیچ دانه‌ای تولید نمی‌شود. تمام مواد لازم برای نشاسته موجود است اما در جایی که مورد نیاز است وارد دانه گرده نمی‌شوند. یک لایه سلولی در اطراف گرده به نام تپتوم[۴] مسئول تغذیه گرده با قند است. تپتوم فقط برای ۱-۲ روز فعال است بنابراین اگر در این زمان یک ضربه محکم و ناگهانی سرد رخ دهد، دیگر احتمال رشد گرده وجود ندارد؛ اما قند نمی‌تواند آزادانه به داخل تپتوم حرکت کند و از طریق آن به گرده منتقل شود. در عوض قند باید شکسته شود و سپس به گرده منتقل شود. "اینورتاز" کاتالیزوری است که به تجزیه مولکول قند کمک می‌کند تا قبل از انتقال به گرده، آن را به تپتوم منتقل کند (Oliver et al., 2005). مقادیر اینورتاز وقتی در معرض دمای سرما قرار می‌گیرند در برنج معمولی کاهش می‌یابد، اما هنگامی که سرمازدگی را تجربه می‌کنند، در حد نرمال در حد متوسط تحمل می‌کنند. تحقیقات اولیه نشان می‌دهد که ژن اینورتاز توسط هورمون اسید آبسیزیک (ABA) تنظیم می‌شود. همچنین نشان داده شده است که این مکانیسم ممکن است نیاز به تعامل با سایر هورمون‌های گیاهی مانند اکسین ها داشته باشد (Bhatnagar-Mathur et al., 2008).

گیاه‌شناسی بنفشه (viola odorata)

ویولا از گیاهان گل‌دار در خانواده ویولاسه[۵] است. این بزرگ‌ترین سرده در خانواده است که حاوی ۵۲۵ تا ۶۰۰ گونه است (Ning et al., 2012). بیشتر گونه‌ها در نیمکره معتدل شمالی یافت می‌شوند. با این حال ، برخی نیز در مناطق بسیار واگرا مانند هاوایی ، استرالیا و آند یافت می‌شود. برخی از گونه‌های ویولا گیاهان چند ساله ، برخی از آن‌ها گیاهان یک ساله و تعدادی نیز بوته‌های کوچک هستند. گونه‌ها و ارقام زیادی به دلیل گل‌های زینتی خود در باغ‌ها پرورش می‌یابند. در باغبانی اصطلاح pansy برای آن دسته از ارقام چند رنگ و پر گل که سالانه یا دوساله از بذر پرورش می‌یابند و به‌طور گسترده استفاده می‌شود ، بکار می‌رود(Paxton et al., 2004).

بنفشه به‌طور طبیعی در شمال ایران می‌روید، ولی با توجه به این که امروزه به‌عنوان یک گل زینتی در باغچه‌ها کاشته می‌شود، می‌توان آن را در اکثر نقاط ایران مشاهده نمود. به بنفشه گل زیر برف می‌گویند؛ زیرا آن را در زمستان می‌کارند. مقاومت بنفشه در سرما یکی از صفات بارز آن محسوب می‌شود و حتی در فصل زمستان اگر در جای گرمی محفوظ شود در مقابل

[4] Tapetum

[5] *Violaceae*

سرما مقاوم است. گونه‌های زودرس آن در پاییز گل می‌دهند و سپس در اوایل بهار دوباره شروع به گل دادن می‌کنند و گلدهی آن در ماه خرداد متوقف می‌شود. گونه‌های دیررس نیز از اردیبهشت تا مرداد ماه به گل می‌نشیند.

شکل 1-گیاه بنفشه (viola odorata)

گیاه‌شناسی گل میمونی (Antirrhinum majus)

Antirrhinum majus (Snapdragon)، گونه‌ای از گیاهان گلدار متعلق به جنس Antirrhinum است. این گیاه پس از بازنگری در خانواده کلاسیک قبلی خود، Scrophulariaceae، در خانواده Plantaginaceae قرار گرفت(Hudson et al., 2008). نام snapdragon ، از واکنش گل به فشردن گلوی آن‌ها ناشی می‌شود ، که باعث می‌شود "دهان" گل مانند دهان اژدها باز شود. از این گیاه به‌عنوان یک گیاه زینتی در مرزها و به‌عنوان یک گل بریده استفاده می‌شود. معمولاً سالی یک‌بار کشت می‌شود. این گیاه چندساله علفی است ، به طول ۰/۵ تا ۱ متر رشد می‌کند ، به‌ندرت تا ۲ متر. برگ‌ها به‌صورت مارپیچ ، طول ۷ سانتی‌متر و ۲-۲/۵سانتی‌متر عرض دارند. گاهی چوبی برگ‌های آن ساده ، بیضوی تا پهن ، گاه خطی و معمولاً سفید است. گل‌ها سنبله بلند ، هر گل ۳/۵-۵/ سانتی‌متر طول ، زیگومورفیک و دو لب آن را بسته است که لوله کرولا را به سه قسمت تقسیم کرده و به رنگ قرمز بنفش ، تقریباً ۵ سانتی‌متر طول دارد. گیاهان وحشی دارای گل‌های صورتی تا بنفش ، اغلب با لبهای زرد هستند. بیشتر ۸ تا ۳۰ گل کوتاه ساقه در یک گل آذین باهم قرار دارند. محور گل آذین موی غده‌ای است. تاج از ۲۵ تا ۴۵ (به‌ندرت تا ۷۰) میلی‌متر و در رنگ‌های مختلف (قرمز ، صورتی ، نارنجی ، زرد ، سفید) است. میوه یک کپسول تخم‌مرغی به قطر ۱۰-۱۴ میلی‌متر است که به‌صورت جمجمه شکل گرفته است و حاوی تعداد زیادی دانه کوچک است ۰۱:۳۸ ص. بومی منطقه مدیترانه است. آن‌ها اغلب در شکاف‌ها و دیوارها رشد می‌کنند(Mateu-Andres and Boscaiu, 2003). Antirrhinum majus تا حدی می‌تواند در یخ زدگی و همچنین درجه حرارت بالاتر زنده بماند ، اما در دماهای حدود ۱۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد بهترین عملکرد را دارد. دمای شبانه در حدود ۱۵ تا ۱۷ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند (Hudson et al., 2008). این گونه قادر است از دانه‌ها به‌خوبی رشد کند ، در ۳ تا ۴ ماه به‌سرعت گلدهی می‌کند(Sutton, 1988).

این گونه‌ها معمولاً به‌عنوان گیاه دوسالانه یا چند سالانه کشت می‌شوند، به‌خصوص در مناطق سردتر که ممکن است در زمستان زنده نماند. Antirrhinum majus نزدیک به یک قرن به‌عنوان ارگانیسم الگویی در ژنتیک بیوشیمیایی و رشدی مورد استفاده قرار گرفته است. بسیاری از خصوصیات A. majus آن را به‌عنوان یک ارگانیسم مدل مطلوب می‌کند. این‌ها شامل وراث دیپلوئید آن، سهولت در کشت (داشتن مدت زمان تولید نسبتاً کوتاه حدود ۴ ماه)، سهولت در گرده‌افشانی و گرده‌افشانی متقابل و تنوع A. majus در مورفولوژی و رنگ گل است. همچنین مطالعات در A. majus نشان می‌دهد، در دماهای بالا، متیلاسیون DNA در سرکوب transposon Tam3 حیاتی نیست. پیش از این، پیشنهاد می‌شد که متیلاسیون DNA در این فرایند دارای اهمیت است، این نظریه ناشی از مقایسه درجه‌های متیلاسیون در هنگام جابجایی فعال و غیرفعال است. اجازه آن برای جابجایی در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و سرکوب شدید انتقال در دماهای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد که سرکوب حالت انتقال به‌احتمال زیاد توسط حالت متیلاسیون ایجاد نمی‌شود (Hashida et al., 2005).

نقش دیگری که A. majus در بررسی رابطه بین گرده‌افشان و گیاه ایفا کرد، در مطالعات رایحه‌های گل بود. دو مورد از آنزیم‌های A. majus، فنیل پروپانوئیدها و ایزوپرونوئیدها، در مطالعه تولید عطر و بوی آن و تأثیر رایحه در جذب گرده‌افشان‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. آنتی تیرینین، آنتوسیانین است که در A. majus یافت می‌شود. این ۳-روتینوزید سیانیدین است. ترکیبات فعال آن شامل اسید گالیک، رزین، پکتین و تلخ است. این ماده موضعی تسکین دهنده، ضد فشار خون، قابض، ضد باکتری، کبدی و مدر است. در برابر التهاب مؤثر است، از آن برای بواسیر استفاده می‌شود. از این ماده در غرغره ها در برابر زخم‌های حفره دهان استفاده شده است. از نظر داخلی می‌توان از آن برای کولیت و سوزش سر دل استفاده کرد۰۱:۳۸ ص.

شکل 2- گیاه Antirrhinum majus (www.gardenerspath)

پیشینه تحقیق

آپوپلاسم اولین محفظه‌ای است که با تنش‌های محیطی روبرو می‌شود و برای تحمل گیاهان نسبت به دمای پایین بسیار مهم است. تأثیر سیلیکون (Si) بر تحمل به تنش در دمای پایین، به‌عنوان مثال، سرمازدگی و انجماد، در برخی از گونه‌های گیاهی نشان داده شده است. در این پژوهش یک رقم جو زمستانی و یک رقم بهاری جو (Hordeum vulgare L.) بدون یا با Si رشد داده شدند و در معرض کاهش تدریجی دما از ۲۵ تا + ۵ درجه سانتی‌گراد برای همخوانی سرما و سپس با دمای انجماد (۵-درجه سانتی‌گراد) درمان می‌شوند. مهار رشد، کاهش فتوسنتز و از بین رفتن تمامیت غشایی در شرایط دمای پایین در جو بهاره بیشتر از ارقام زمستانی بود، اما این پارامترها به‌طور مشابه توسط Si در هر دو رقم کاهش یافت. سازگاری با سرما باعث کاهش دمای کشنده (LT50)[6] و افزایش بقای گیاهان در معرض دمای انجماد می‌شود. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و غلظت کربوهیدرات‌های محلول و پروتئین‌ها در آپوپلاسم برگ‌ها و خصوصاً در تیمار Si افزایش یافت. بالاترین مقادیر در گیاهان با آب و هوای سرد مشاهده شد. داده‌ها با اصلاح خصوصیات بیوشیمیایی موجود در آپوپلاسم برگ، اثر تسکین دهنده Siرا در هر دو تنش سرد و انجماد در جو نشان دادند(Joudmand and Hajiboland, 2019).

[6] Lethal *Temperature*

در بررسی وضعیت برگ برنج (Oryza sativa L.) در پاسخ به تنش سرما که می‌تواند باعث کاهش عملکرد و کیفیت برنج شود. باهدف تجزیه و تحلیل تغییرات شرایط برگ در گیاه برنج در مرحله رسیدن به پاسخ به دمای پایین نتایج نشان داد که فعالیت فتوسنتز برگ به‌طور مداوم کاهش می‌یابد و در شرایط سرما بیشتر کاهش می‌یابد. محتوای کلروفیل موجود در برگ نیز در کنترل و سرما بعد از تیمار کاهش یافت. در شرایط شاهد، میزان کلروفیل با محتوای نیتروژن موجود در برگ ارتباط معنی‌داری داشت. با این حال، میزان کلروفیل در شرایط سرد، همبستگی بالایی با محتوای مالون دی آلدئید داشت. این نتایج به‌شدت نشان می‌دهد که پراکسیداسیون چربی برگ در اثر تنش سرما می‌تواند باعث کاهش میزان کلروفیل برگ و فعالیت فتوسنتز برگ در مرحله رسیدن برنج شود(Hwang et al., 2019).

بررسی پارامترهای بیوشیمیایی

اندازه‌گیری آنتوسیانین

جهت سنجش میزان آنتوسیانین، مقدار ۰/۰۵ گرم از نمونه فریز شده را با متانول اسیدی (۰/۳ سی‌سی HCl و ۳۰ سی‌سی متانول خالص) سائیده و حجم آن به ۲ سی‌سی رسانده شد. نمونه به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید و اسپکتروفتومتری آن در طول موج ۵۵۰ مورد بررسی قرار گرفت(Wagner, 1979).

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی

در بررسی میزان ترکیبات فنلی نمونه‌های تحت تنش سرما، ۰/۰۵ گرم از نمونه فریز شده با متانول خالص سائیده و به حجم ۲ سی‌سی رسانده شد و ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد سپس با دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد و ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره، ۲۰۰ میکرو لیتر معرف فولین (۲ سی‌سی فولین و ۲ سی‌سی آب مقطر) و ۱۷۰۰ میکرو لیتر از کربنات سدیم (۱/۴۸ گرم پودر کربنات سدیم و ۲ سی‌سی آب مقطر) را مخلوط کرده و در طول موج ۷۲۵ با دستگاه اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت(Stone et al., 2002).

اندازه‌گیری مقدار قند کل

۰/۰۲۵ گرم از برگ‌های خشک شده با ۲ میلیلیتر اتانول ۸۰٪ ساییده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و محلول رویی به لوله آزمایش انتقال داده شد. به رسوب ایجاد شده ۲ سیسی اتانول اضافه کرده و دوباره سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به لوله آزمایش انتقال داده شد. تا آنجایی این عمل تکرار شد تا حجم لوله آزمایش به ۵ سیسی از عصاره رسید. سپس لوله آزمایش داخل حمام آب گرم ^{o}C ۱۰۰ به مدت یک ساعت قرار داده شد تا اتانول آن تبخیر شود و حجم آن به ۱ سیسی رسید. ۰/۴ سیسی از محلول را با ۰/۴ سیسی ترکیبات فنل و ۲ سیسی H_2SO_4 مخلوط کرده و ۱ سی‌سی از آن با ۱ سیسی اتانول ۸۰٪ اضافه و میزان جذب آن با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ mg/g در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازهگیری شد(Sivakumar et al., 2000).

اندازه گیری بتائین گلیسین

۰/۰۲۵ گرم از برگ‌های جوان خشک را در ۱ سی‌سی آب مقطر ساییده و به مدت یک ساعت بر روی دستگاه شیکر قرار داده شد. ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی را با ۲۵۰ میکرولیتر H_2SO_4 مخلوط و یک ساعت بر روی یخ قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرو معرف ید (1.25g I, 2g KI, 10cc water) به آن اضافه و ۲۴ ساعت بعد با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته و رسوب ایجاد شده را سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. در مرحله بعد ۱ سی‌سی محلول ۱ و ۲ دی کلرو اتان اضافه و ورتکس شد تا مواد رسوب به‌خوبی در حلال حل شد و یک محلول صاف و آلبالویی رنگ به دست آمد. جذب آن در طول موج ۳۶۵ نانومتر اندازهگیری شد(Lever et al., 1992).

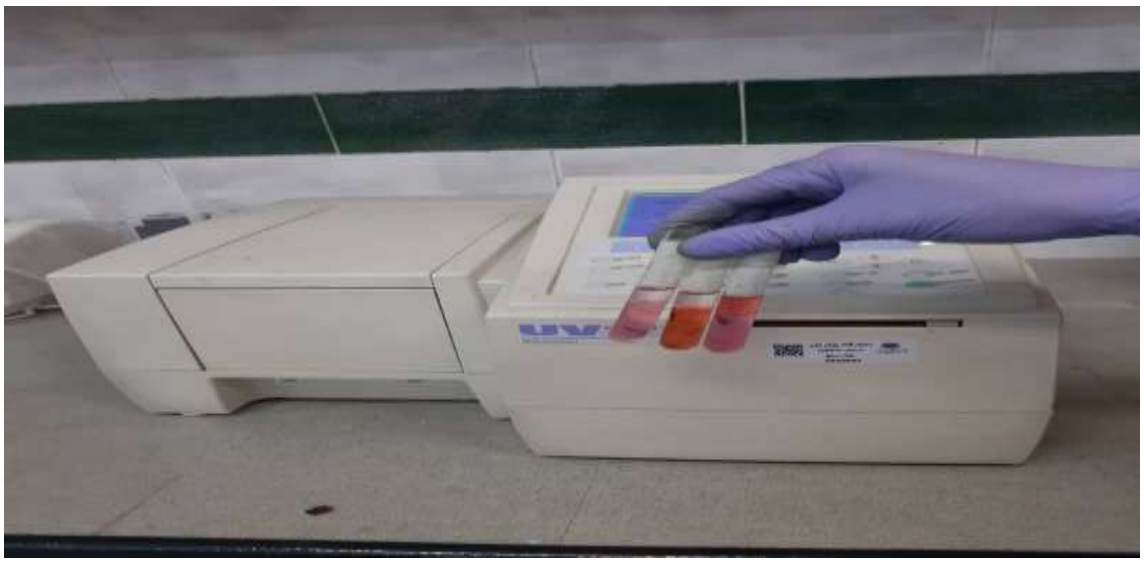
سنجش میزان پرولین

سنجش میزان پرولین برگ

جهت اندازه گیری میزان پرولین، ۰/۰۵ گرم از نمونه فریز شده را در ۱/۵ سیسی سولفوسالیسیک اسید ۰/۳٪ خوب ساییده و به میکروتیوب انتقال داده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. ۱ سیسی از مایع رویی با ۱ سیسی اسید استیک گلایسال و ۱ سیسی معرف نین هیدرین (20cc H_3PO_4 6M, 30cc acetic acid, 1.20 g ninhydrin) به مدت یک ساعت در حمام آب گرم 100^{oC} قرار داده شد. پس از ظهور رنگ صورتی در نمونهها، ۲ سیسی محلول تولوئن اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس و جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در غلظتهای ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ اندازهگیری شد(Bates et al., 1973).

سنجش میزان پرولین ریشه

برای سنجش پرولین ریشه، ۰/۰۲۵ گرم از ریشه خشک شده را به‌خوبی ساییده و در ۱/۵ سیسی سولفوسالیسیک اسید ۰/۳٪ خوب ساییده و به میکروتیوب انتقال داده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰، سانتریفیوژ گردید. ۱ سیسی از مایع رویی با ۱ سیسی اسید استیک گلایسال و ۱ سیسی معرف نین هیدرین (20cc H_3PO_4 6M, 30cc acetic acid, 1.20 g ninhydrin) به مدت یک ساعت در حمام آب گرم 100^{oC} قرار داده شد. پس از ظهور رنگ صورتی در نمونه ها، ۲ سیسی محلول تولوئن اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس و جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در غلظتهای ۰، ۲۵ و ۱۰۰ mg/g اندازه گیری شد(Bates et al., 1973).



شکل ۳- اندازه گیری میزان پرولین گیاهان بنفشه (Viola gracilis) و گل میمونی (Antirrhinum majus) تحت تنش سرما با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری

سنجش میزان پروتئین

برای بررسی میزان پروتئین از معرف برادفورد استفاده گردید. جهت تهیه معرف برادفورد، ۰/۰۲ گرم از پودر کوماسی برلیانت با ۱۰ سیسی اتانول ۹۶٪ و ۲۰ سیسی اسید اورتوفسفریک مخلوط و حجم آن با آب مقطر به ۲۰۰ سی‌سی رسانده شد و دو بار محلول صاف شد. ۵۰ میکرولیتر از نمونه های فریز شده که قبلا توضیح داده شد با ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر و ۵ سیسی محلول برادفورد مخلوط و بعد از طی شدن نیم ساعت، میزان جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976).

سنجش میزان ماده مالون د آلدئید (MDA)

۰/۰۵ گرم از نمونه فریز شده برگ گیاهان تحت تنش را با محلول تری کلرو استیک (TCA) ساییده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۲۵ از عصاره رویی را با ۱/۲۵ میلی میکرو لیتر TCA ۲۰ درصد و ۰/۵ میلی میکرو لیتر TBA ۰/۵ درصد (تیو باربیوتیک اسید) به مدت نیم ساعت در حمام آب جوش انکوبه گردید و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و میزان جذب آن در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد(Davey et al., 2005).

سنجش میزان H_2O_2 (پراکسید هیدروژن)

۰/۱ گرم از نمونه فریز شده در نیتروژن مایع را در ۱ سیسی TCA (محلول تری کلرو استیک) ساییده و داخل میکروتیوپ ریخته، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی محلول به میکروتیوپ جدید انتقال داده و ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۱۰۰۰ میکرولیتر یدید پتاسیم اضافه و مخلوط شد (تمام مراحل بر روی یخ انجام گرفت) و میزان جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازهگیری گردید(Sergiev et al., 1997).

سنجش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

جهت اندازهگیری آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش سرما، مقدار ۰/۰۰۵ گرم از پودر آسکوربات را با ۰/۰۰۴ اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۲ میلی مولار و ۵۰ سی‌سی بافر فسفات را با هم مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده تا محلول یکنواخت به دست آید. سپس عصاره‌های فریز شده با نیتروژن مایع را با ۱۴۰۰ میکرولیتر از محلول آماده شده و ۱۰۰ میکرو لیتر H_2O_2 دویست میلی مولار اضافه کرده (تمام مراحل بر روی یخ انجام گرفت) و میزان جذب آن در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازهگیری شد۲۲/۴/۲۰۲۳.

سنجش میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

در بررسی آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تنش سرما قرار گرفته، از عصاره آماده شده فریز شده به‌طور تصادفی انتخاب کرده و به هر کدام ۱۰۰ میلی لیتر گایاکول، ۳۴ میکرولیتر H_2O_2 و ۱۴۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات اضافه کرده و مخلوط گردید (تمامی مراحل بر روی یخ انجام گرفت) و میزان جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازهگیری شد(Fielding and Hall, 1978; Plewa et al., 1991).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، به‌طور تصادفی از نمونه‌های عصاره تحت تنش فریز شده انتخاب و به هر میکروتیوپ ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات، ۵۰ میکرولیتر H_2O_2 اضافه گردید (تمام مراحل بر روی یخ انجام گرفت). سپس میزان جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد(Chandlee and Scandalios, 1984).

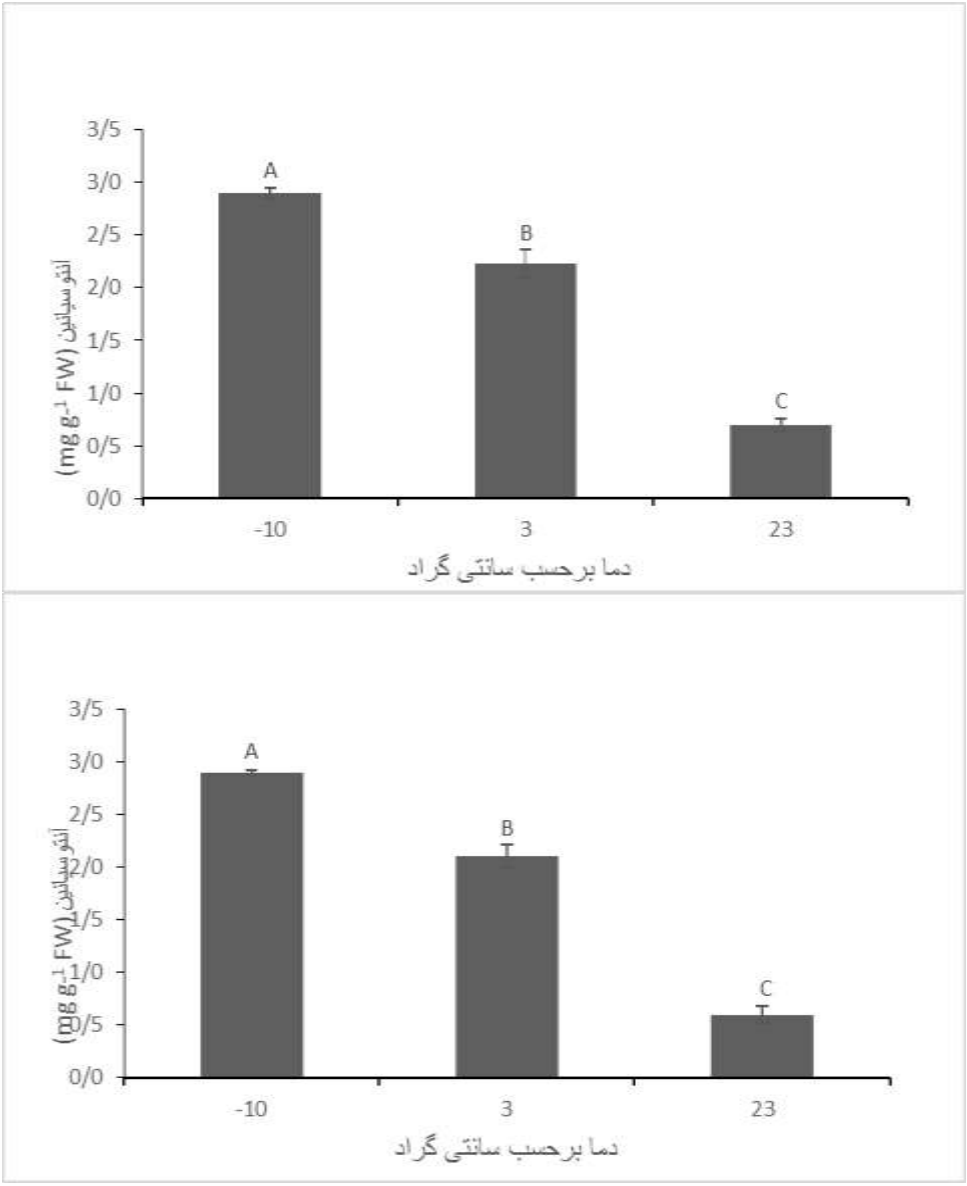
تحلیل آماری

برای تجزیه آماری داده های بدست آمده از دو گیاه بنفشه و گل میمونی تحت تنش سرما با سه سطح تیمار دمایی (۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتیگراد) در قالب طرح کاملا تصادفی از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. در آنالیز واریانس و مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن با سطح اطمینان ۰/۹۵ استفاده شد.

نتایج پارامترهای بیوشیمیایی

مقدار آنتوسیانینها

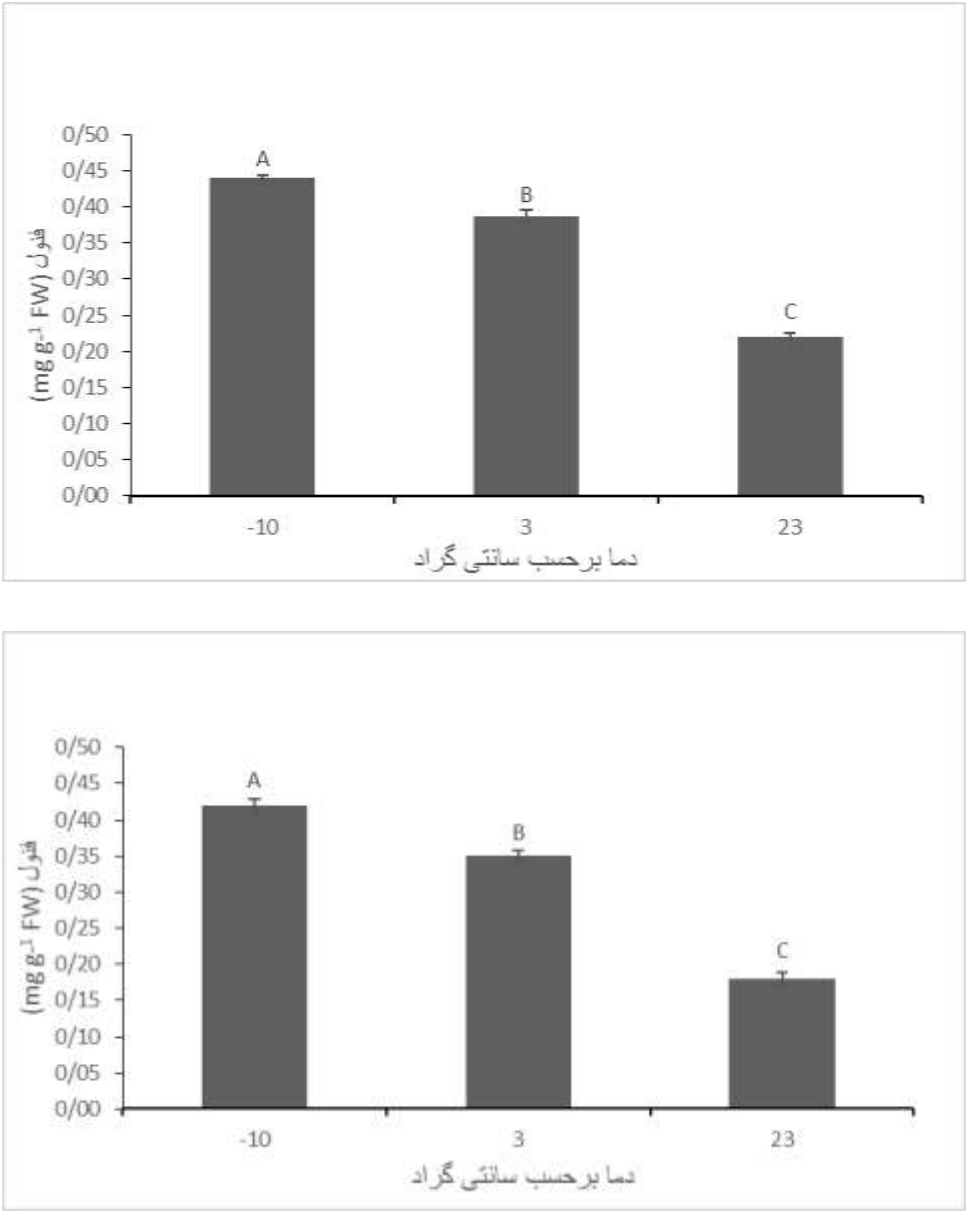
میزان آنتوسیانین‌ها در هر دو گیاه با افزایش دما کاهش یافت این کاهش هم در گیاه بنفشه شکل ۴ و هم در گیاه گل میمونی (شکل ۴) معنی دار بود ($P<0.05$).



شکل ۴-بررسی میزان آنتوسیانین در برگ گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). ستونهای دارای حرف غیرمشترک (ABC) از لحاظ آماری نشاندهنده عدم اختلاف معنیدار در آزمون دانکن میباشد.

بررسی میزان ترکیبات فنل

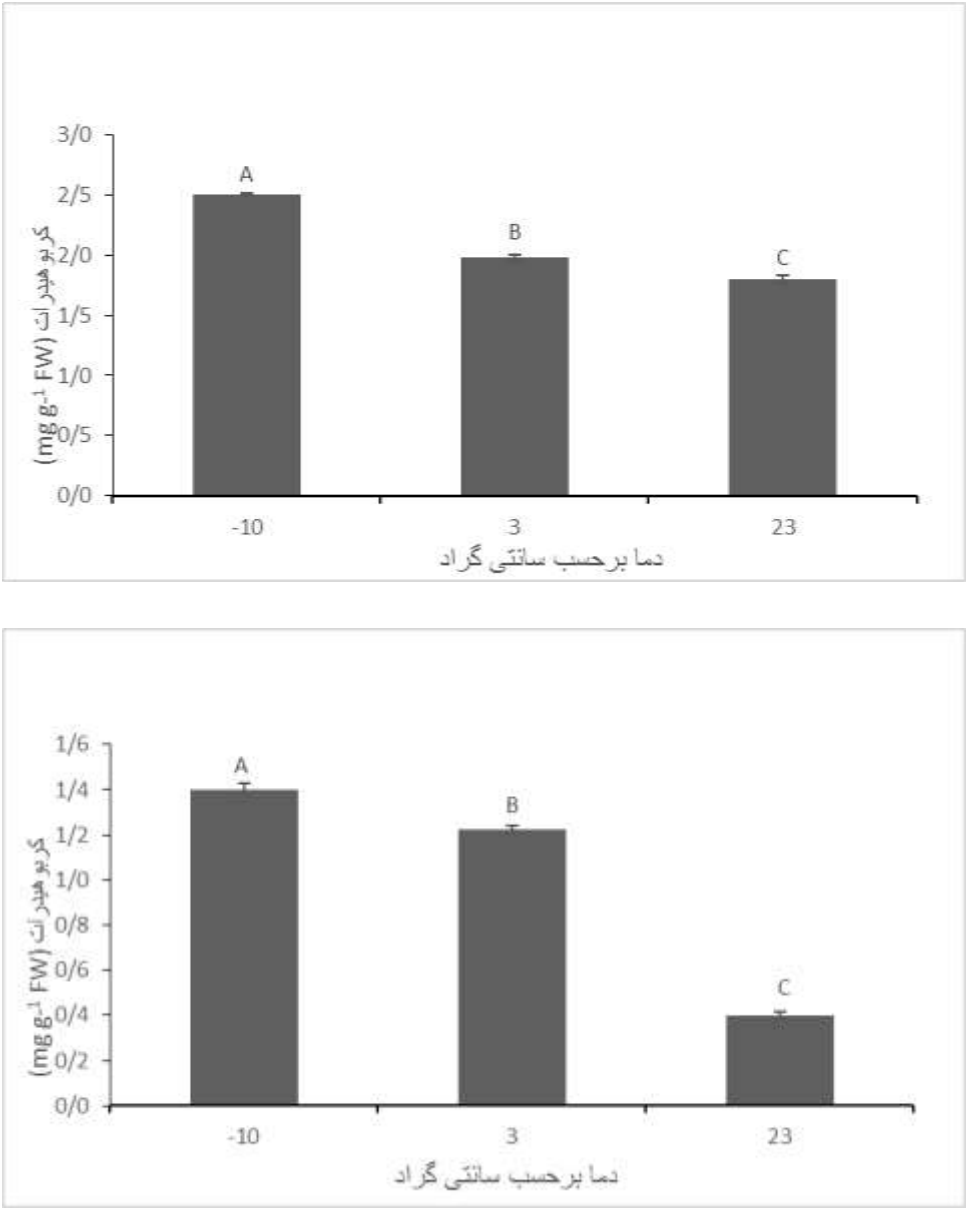
دربررسی میزان ترکیبات فنل میزان در گیاه بنفشه و گیاه گل میمونی مشاهده شد که در هر دو گیاه میزان ترکیبات فنل با افزایش دما کاهش یافت. این کاهش هم در گیاه بنفشه شکل ۵ و هم در گیاه گل میمونی (شکل ۵) معنی دار بود ($P<0.05$).



شکل ۵-بررسی مقدار ترکیبات فنل در برگ گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). ستونهای دارای حرف غیرمشترک(ABC) از لحاظ آماری نشاندهنده اختلاف معنیدار در آزمون دانکن هستند.

میزان قندهای کل

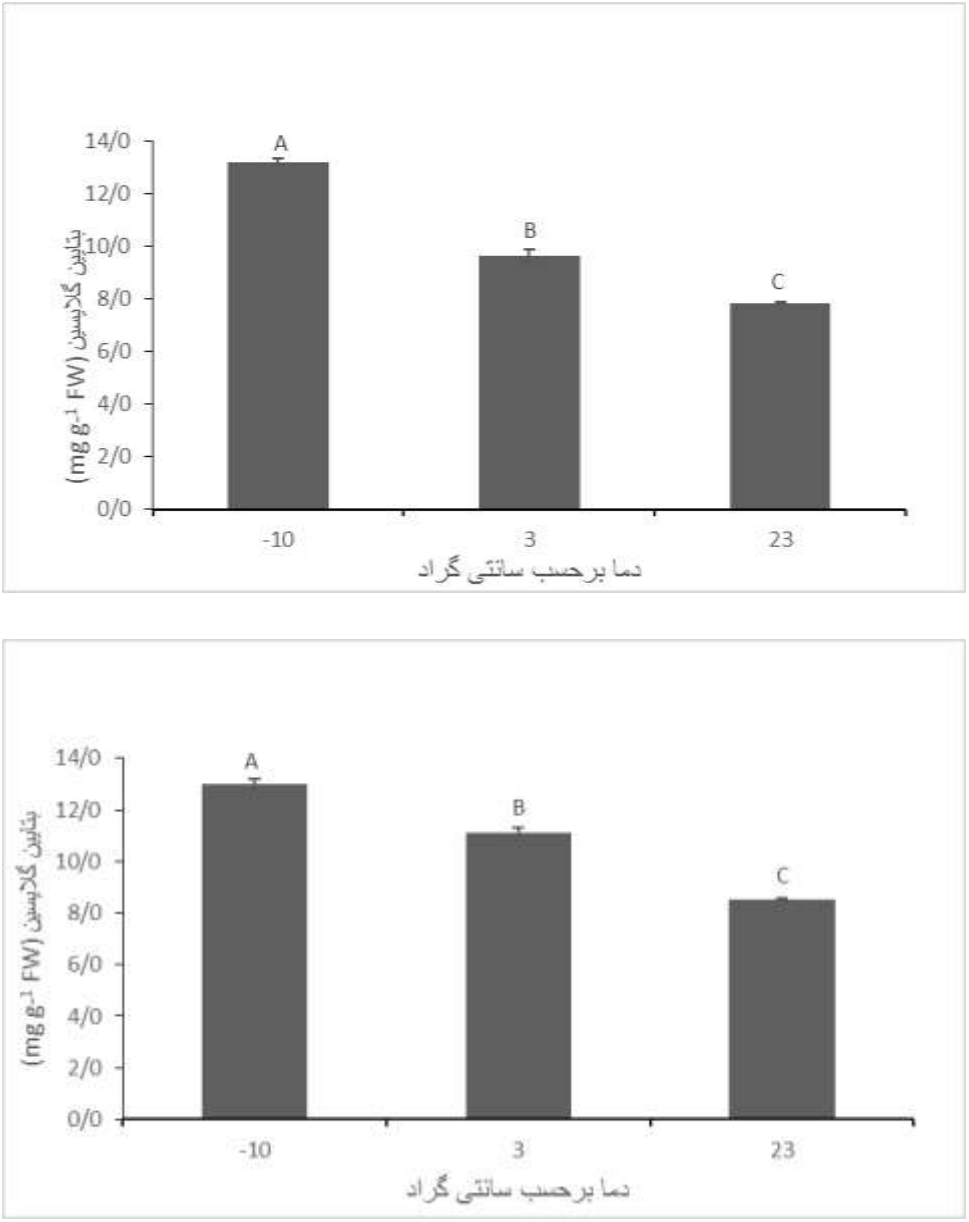
در بررسی تغییرات قند کل در برگ دو گیاه تحت تنش سرما مشاهده شد که در هر دو گیاه میزان قندهای محلول با افزایش دما کاهش یافت این کاهش هم در گیاه بنفشه شکل ۶ و هم در گیاه گل میمونی شکل ۶ معنی دار بود ($P<0.05$).



شکل ۶-بررسی تغییرات قند کل در برگ گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). ستونهای دارای حرف غیرمشترک (ABC) از لحاظ آماری نشاندهنده اختلاف معنیدار در آزمون دانکن هستند.

میزان بتائین گلیسین

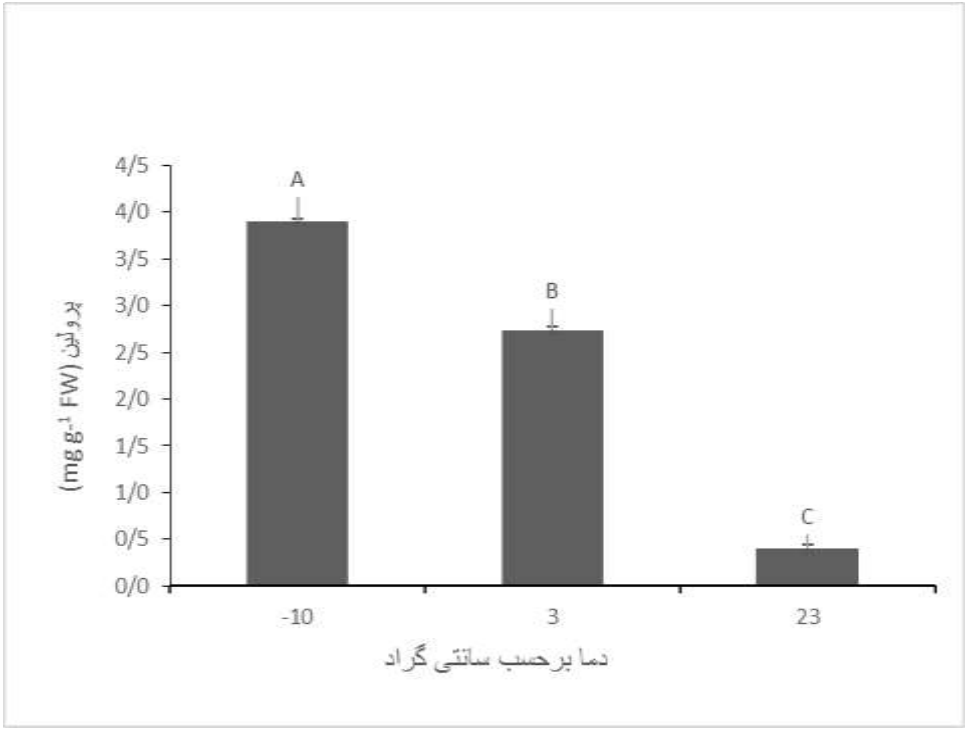
میزان بتائین گلیسین در برگ هر دو گیاه بنفشه (Viola odorata) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) با افزایش دما کاهش معنی داری نشان داد ($P<0.05$). شکل ۷ میزان بتائین گلیسین در گیاه بنفشه و شکل ۷ در گیاه گل میمونی را نشان می‌دهد.

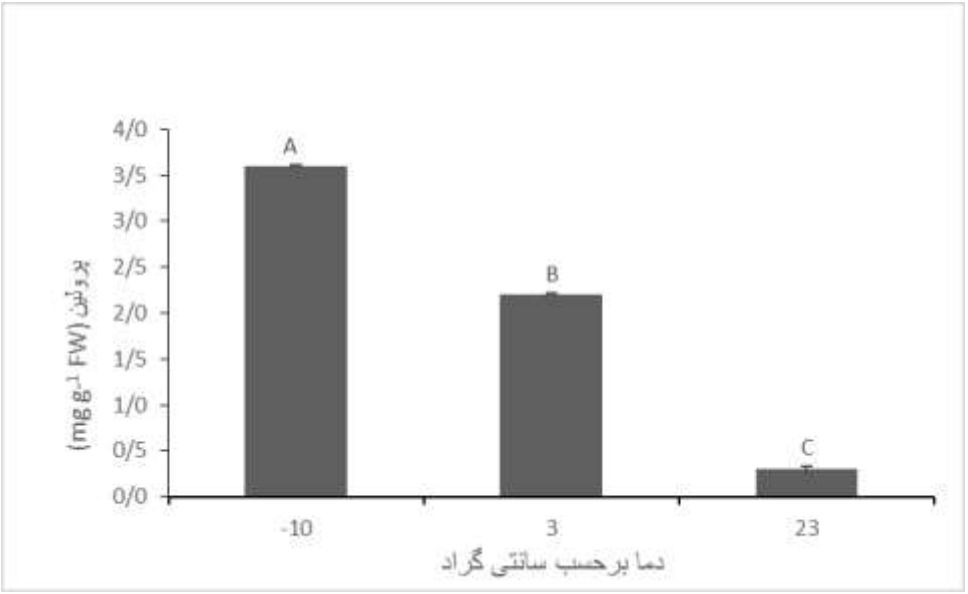


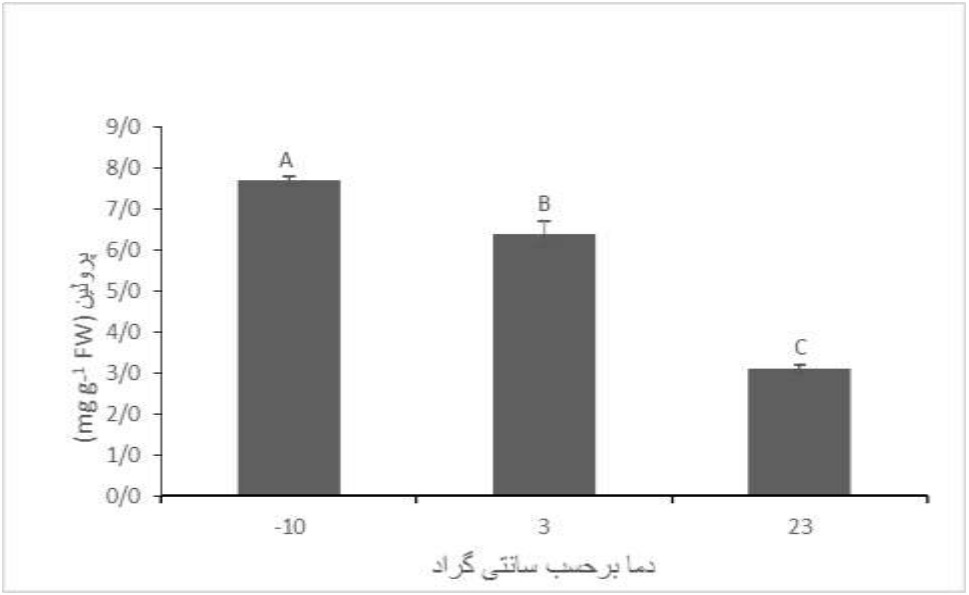
شکل ۷-بررسی میزان بتائین گلیسین در برگ گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). ستونهای دارای حرف غیرمشترک(ABC) از لحاظ آماری نشاندهنده اختلاف معنیدار در آزمون دانکن هستند.

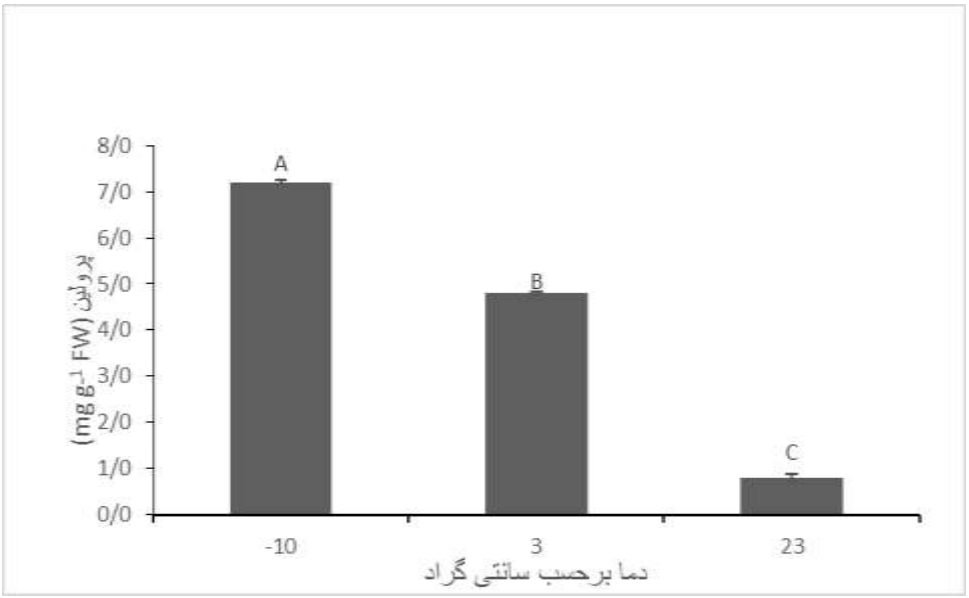
بررسی تغییرات پرولین

در بررسی مقدار پرولین در برگ گیاه بنفشه و گیاه گل میمونی تحت تنش سرما مشخص شد که در هر دو گیاه میزان پرولین با افزایش دما کاهش داشت و این کاهش هم در گیاه بنفشه شکل ۸ و هم در گیاه گل میمونی (شکل ۸) معنی دار بود ($P<0.05$). همچنین میزان پرولین در ریشه هر دو گیاه با افزایش دما کاهش یافت و این کاهش هم در گیاه بنفشه شکل ۸ و هم در گیاه گل میمونی (شکل ۸) معنی دار بود ($P<0.05$).


4/5
4/0
3/5
3/0
2/5
2/0
1/5
1/0
0/5
0/0
پروتین (mg g-1 FW)
A
B
C
-10
3
23
دما برحسب سانتی گراد


4/0
3/5
3/0
2/5
2/0
1/5
1/0
0/5
0/0
پروتین (mg g-1 FW)
A
B
C
-10
3
23
دما برحسب سانتی گراد

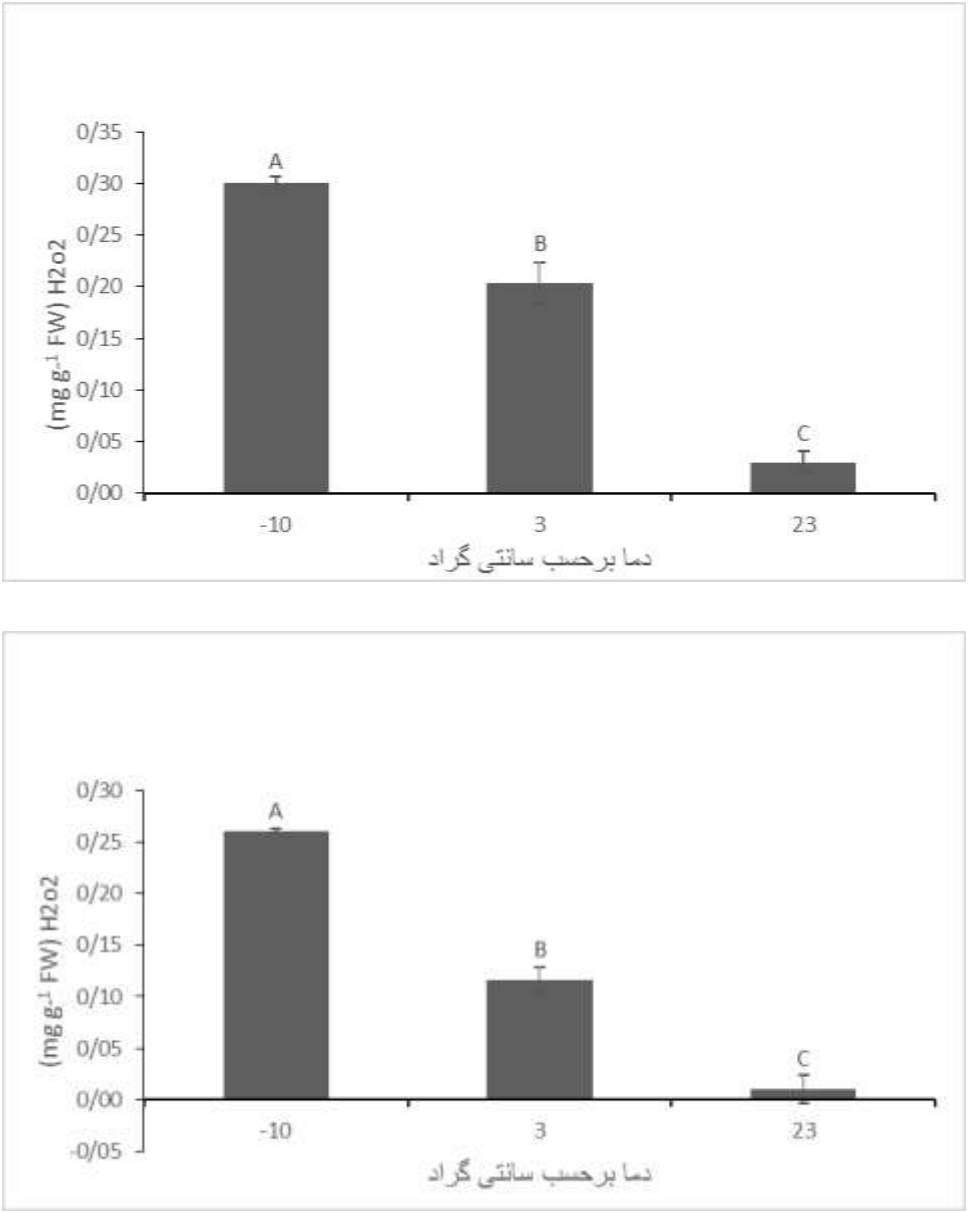




شکل ۸-بررسی مقدار پرولین در برگ و ریشه گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد. پرولین برگ در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). میزان پرولین ریشه در گیاه بنفشه (Viola odorata) (C) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (D). ستونهای دارای حرف غیرمشترک (ABC) از لحاظ آماری نشاندهنده اختلاف معنیدار در آزمون دانکن هستند.

میزان آنزیم پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

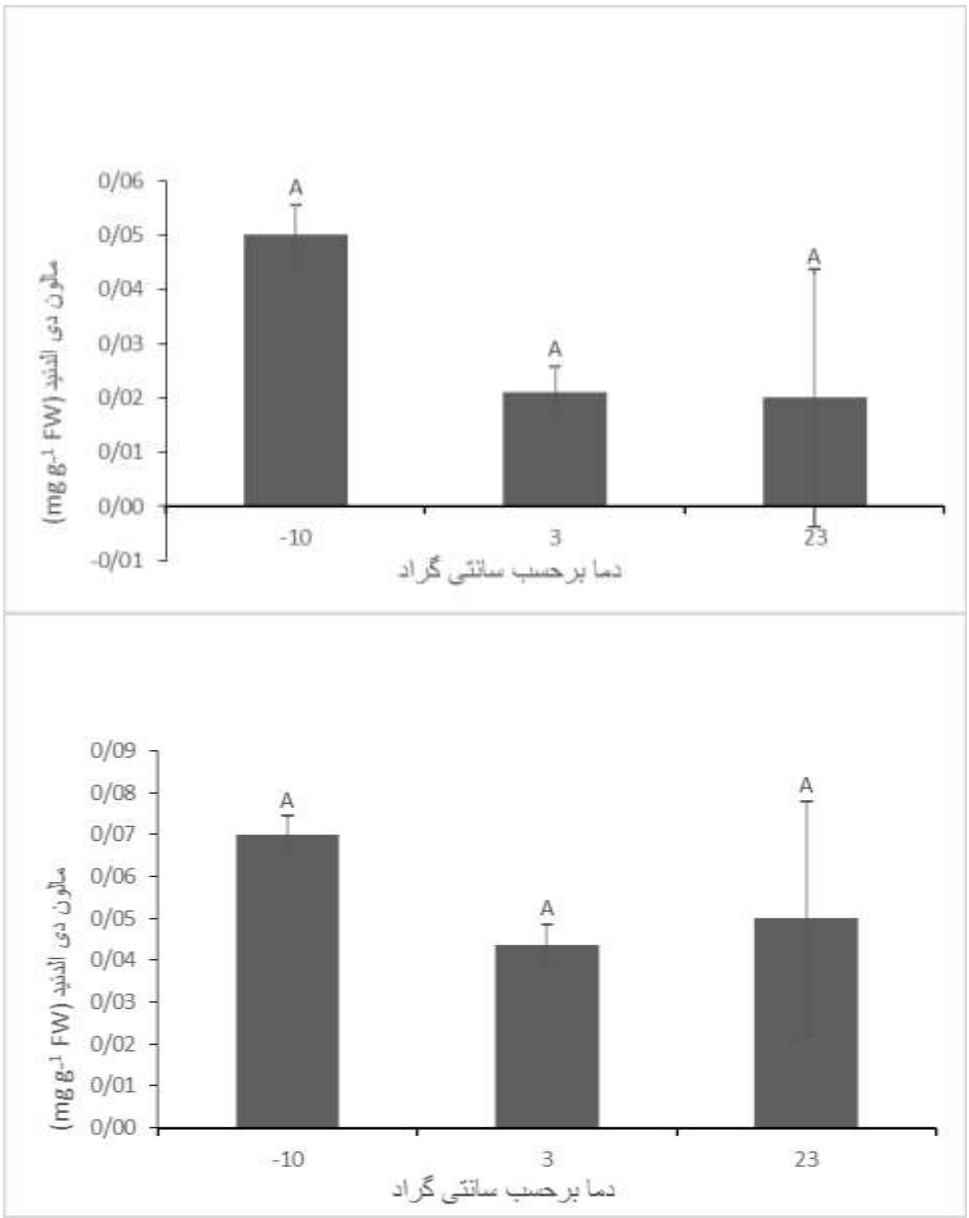
در بررسی میزان آنزیم پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در دو گیاه تحت تنش سرما مشاهده شد که در هر دو گیاه میزان آنزیم پراکسید هیدروژن با افزایش دما کاهش یافت این کاهش هم در گیاه بنفشه شکل ۹و هم در گیاه گل میمونی شکل ۹معنی دار بود ($P<0.05$).



شکل ۹-بررسی میزان آنزیم پراکسیداز در برگ گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). ستونهای دارای حرف غیرمشترک (ABC) از لحاظ آماری نشاندهنده اختلاف معنیدار در آزمون دانکن هستند.

میزان آنزیم مالون دآلدهید (MDA)

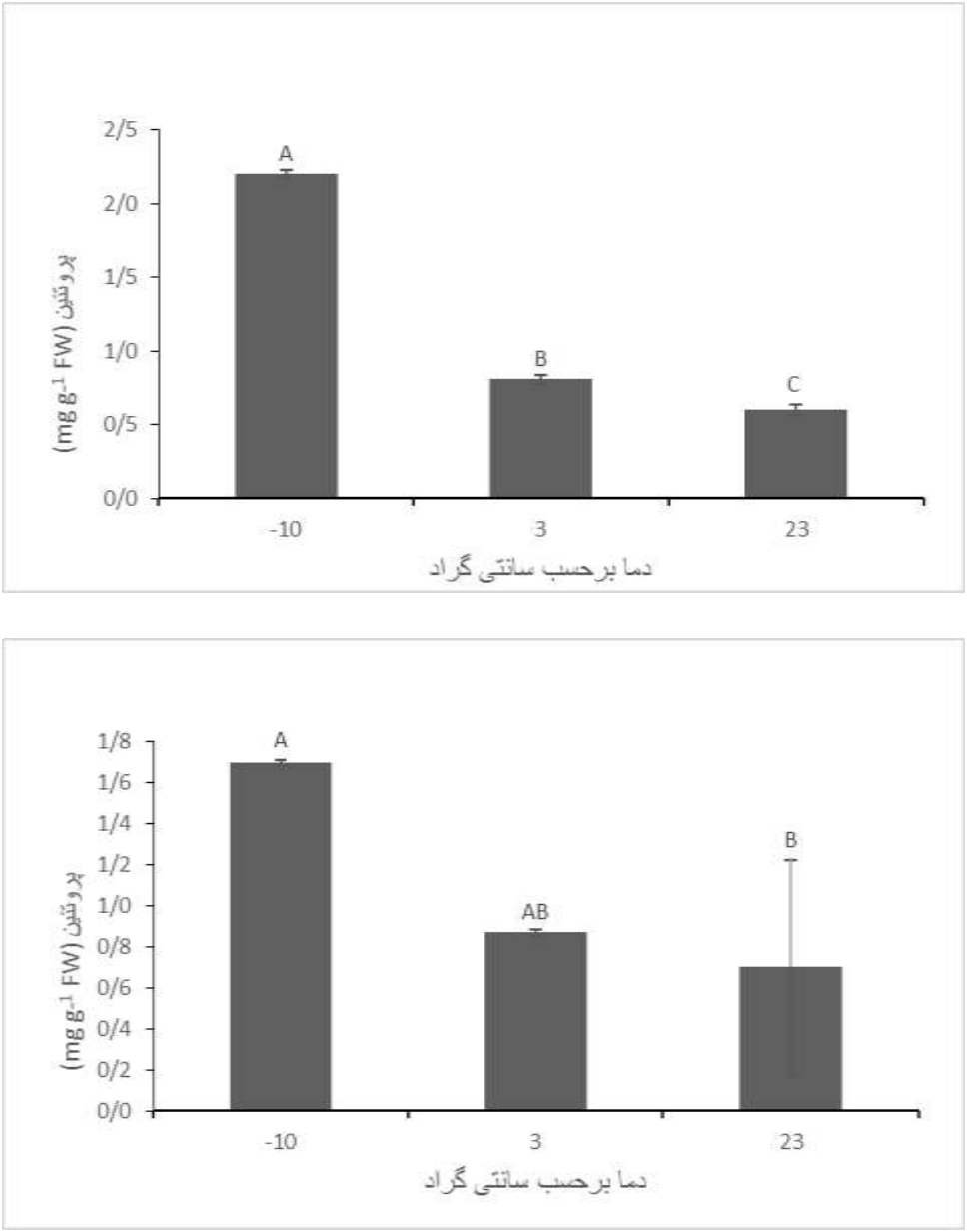
در بررسی میزان آنزیم مالون دآلدهید (MDA) در گیاه بنفشه (Viola odorata) مشخص شد که میزان آنزیم در دمای ۳ درجه نسبت به دمای ۱۰- کاهش داشت و در دمای ۲۳ و ۳ مساوی بود. ولی در هیچ‌کدام از دماها اختلاف معنی دار وجود نداشت ($P<0.05$) (شکل ۱۰). در گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus)، شکل ۱۰ میزان آنزیم مالون دآلدهید در دمای ۳ درجه نسبت به دمای ۱۰- کاهش و در دمای ۲۳ نسبت به دمای ۳ درجه افزایش داشت ولی اختلاف بین سه دما معنی دار نبود ($P<0.05$).



شکل ۱۰-بررسی میزان آنزیم مالون دآلدهید (MDA) در برگ گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). ستونهای دارای حرف مشابه (AAA) از لحاظ آماری نشاندهنده عدم اختلاف معنیدار در آزمون دانکن هستند.

مقدار کل پروتئین‌ها

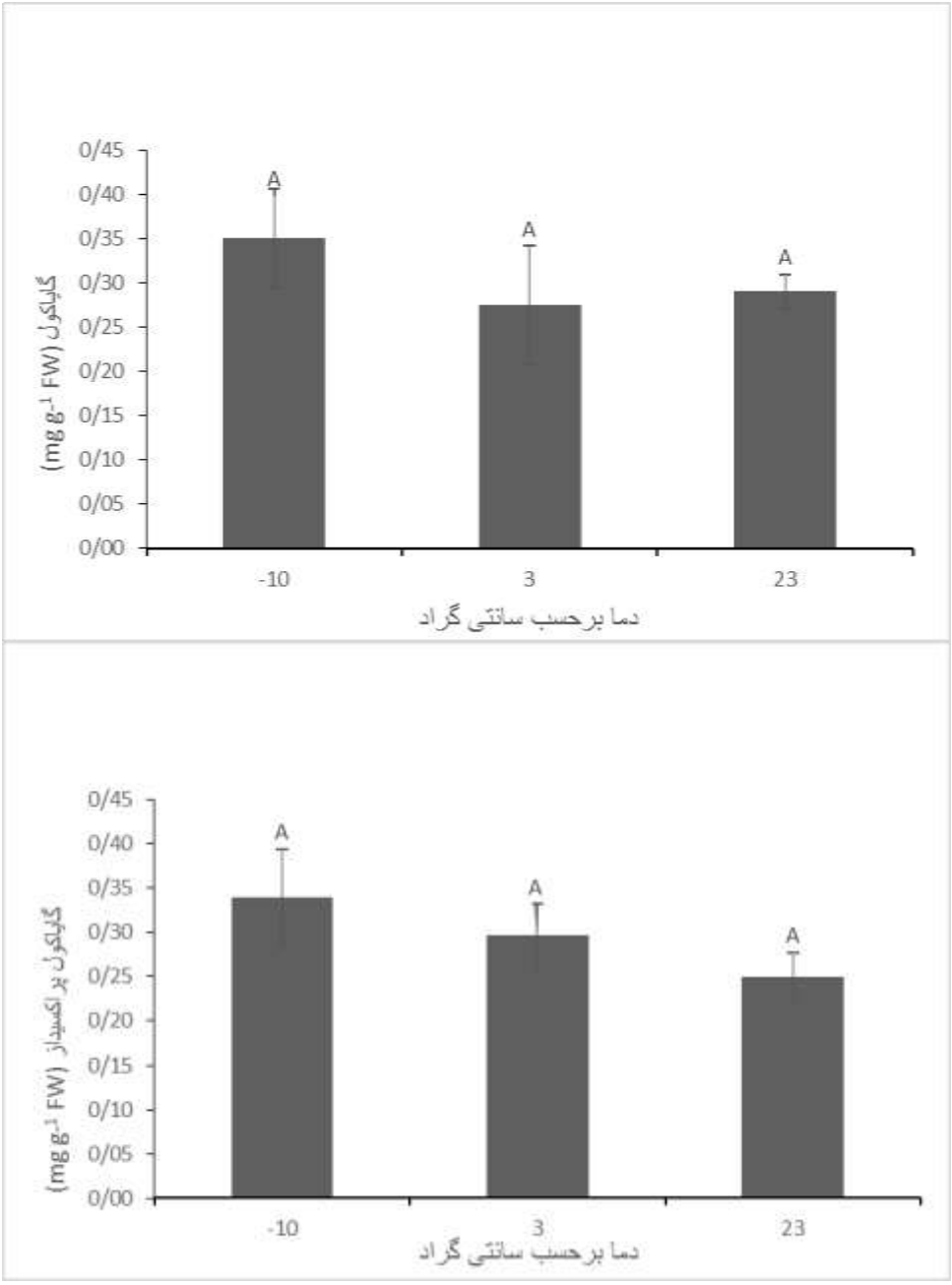
میزان کل پروتئین‌ها در گیاه بنفشه شکل ۱۱ با افزایش دما کاهش یافت که این کاهش معنی دار بود ($P<0.05$). در گیاه گل میمونی، شکل ۱۱ ، میزان کل پروتئین‌ها در دمای ۳ درجه نسبت به دمای ۱۰- درجه کاهش داشت که این کاهش معنی دار نبود ولی دمای ۲۳ درجه نسبت به دمای ۱۰- کاهش معنی داری داشت ($P<0.05$).



شکل ۱۱-بررسی مقدار پروتئین در برگ گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). ستونهای دارای حرف مشابه(AABB) از لحاظ آماری نشاندهنده عدم اختلاف معنیدار در آزمون دانکن هستند.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

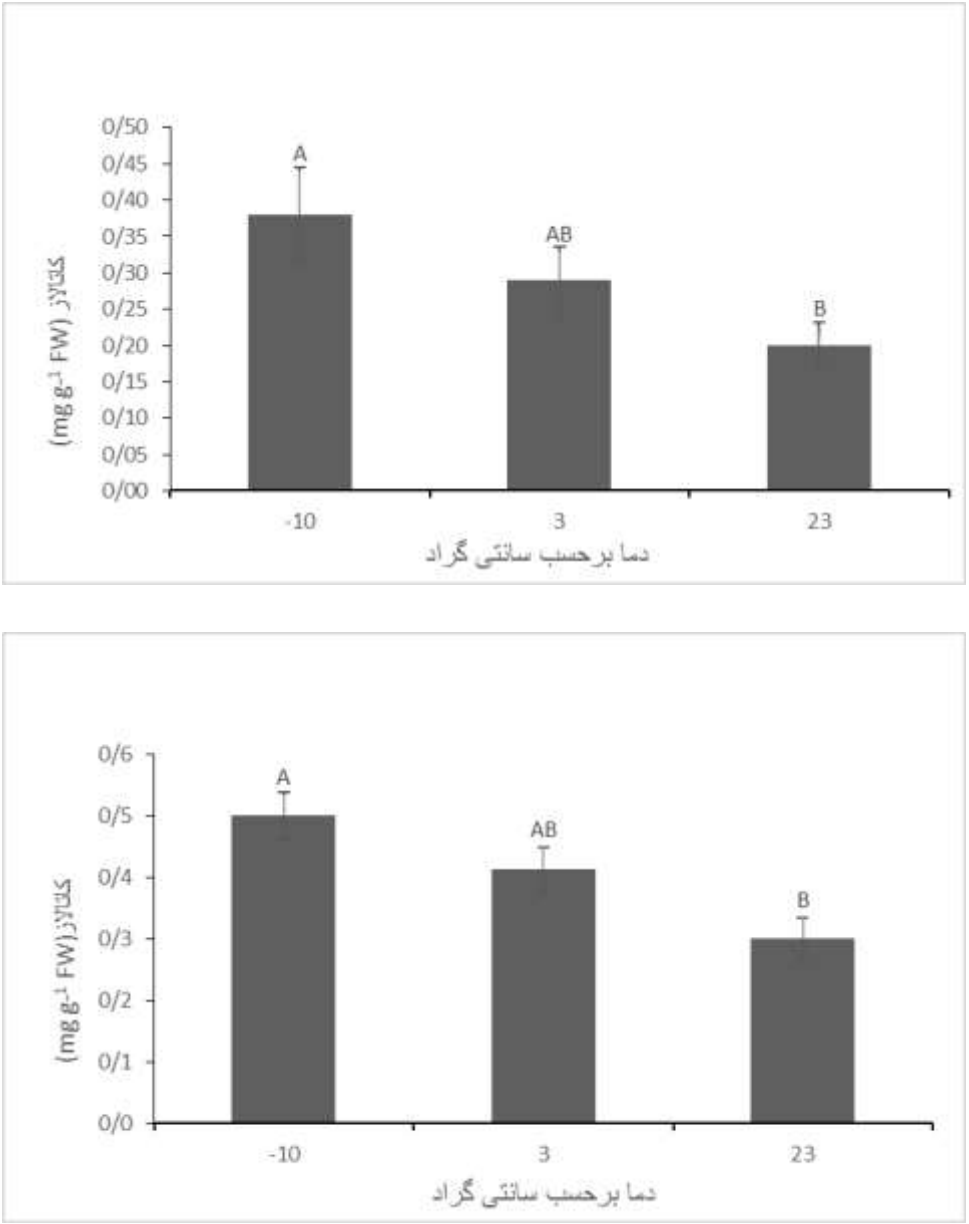
میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه بنفشه ۱۲ با افزایش دما در ۳ درجه کاهش داشت ولی در ۲۳ درجه نسبت به دمای قبل کمی افزایش داشت ولی میزان آنزیم در هیچکدام از دماها باهم اختلاف معنی داری نداشت ($P<0.05$). در گیاه گل میمونی، شکل ۱۲ میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز با افزایش دما کاهش یافت ولی این کاهش معنی دار نبود ($P<0.05$).



شکل ۱۲-بررسی آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). ستونهای دارای حرف مشابه (AAA) از لحاظ آماری نشاندهنده عدم اختلاف معنیدار در آزمون دانکن هستند.

مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

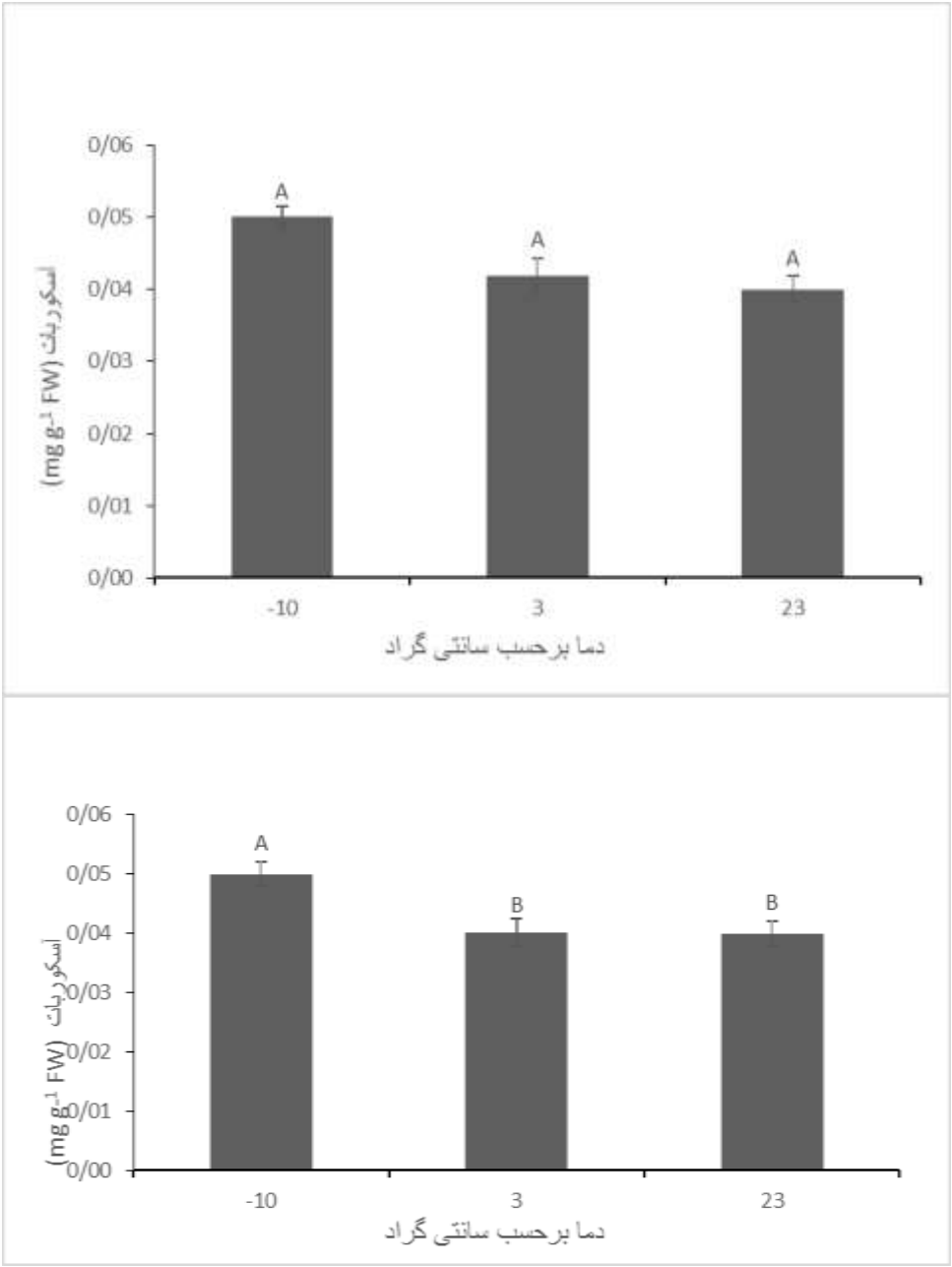
مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ هر دو گیاه بنفشه، شکل ۱۳ و گیاه گل میمونی، شکل۱۳، در دمای ۳ درجه نسبت به دمای ۱۰- کاهش داشت که این کاهش معنی دار نبود ولی دمای ۲۳ درجه نسبت به دمای ۱۰- کاهش معنی داری داشت ($P<0.05$).



شکل ۱۳-بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). ستونهای دارای حرف مشابه (AABC) از لحاظ آماری نشاندهنده عدم اختلاف معنیدار در آزمون دانکن هستند.

میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز

در بررسی میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ گیاه بنفشه تحت تنش سرما شکل ۱۴ مشخص شد که میزان آنزیم با افزایش دما درجه کاهش داشت، ولی میزان آنزیم در هیچکدام از دماها باهم اختلاف معنی داری نداشت ($P<0.05$). در گیاه گل میمونی، شکل ۱۴ میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز با افزایش دما در ۳ درجه کاهش داشت و این کاهش معنی دار بود ($P<0.05$)، میزان آنزیم در ۲۳ درجه نسبت به دمای قبل تفاوتی نداشت.



شکل ۱۴-بررسی میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ گیاهان تحت تنش سرما در سه دمای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گیاه بنفشه (Viola odorata) (A) و گیاه گل میمونی (Antirrhinum majus) (B). ستونهای دارای حرف مشابه (ABB) از لحاظ آماری نشاندهنده عدم اختلاف معنیدار در آزمون دانکن هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

تنش درجه حرارت پایین یکی از مخرب‌ترین فشارهای محیطی است که به‌طور قابل توجهی کارایی و کیفیت محصولات در حال رشد در مناطق گرمسیری را محدود می‌کند. این تنش باعث ایجاد اختلال در ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و آناتومیکی گسترده‌ای می‌شود. در غشاها به دلیل تغییرات ناشی از سرما از جمله کاهش سیالیت، تعادل بین جذب آب و تعرق مختل می‌شود و کم آبی در شاخه‌ها اتفاق می‌افتد. سرانجام مکانیسم باز و بسته شدن روزنه‌ها تحت تأثیر قرار گرفته و فتوسنتز به‌طور قابل توجهی کاهش مییابد. علاوه بر این، نقص در سیستم حمل و نقل الکترونی در میتوکندری و کلروپلاست منجر به تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر می‌شود (ROS). تولید بیش از حد (گونه اکسیژن فعال) ROS منجر به

پراکسیداسیون لیپیدها در غشاها، شکستن زنجیره‌های DNA و غیرفعال کردن آنزیم‌های مختلف می‌شود. گیاهان استراتژی‌های مختلفی را برای محافظت از خود در برابر اثرات مضر ROS (گونه اکسیژن فعال) ایجاد کرده‌اند. مهم‌ترین آن‌ها داشتن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی قدرتمند است که از ترکیبات آنزیمی و غیر آنزیمی تشکیل شده است. به‌منظور بهبود مقاومت گیاهان در برابر تنش سرما، مطالعات بی‌شماری انجام می‌شود. امروزه، بسیاری از متابولیتها و تنظیم‌کننده‌ها که نقش مهمی در تنظیم تنش سرمازدگی گیاهان دارند، برای این منظور مورد مطالعه قرار گرفته است؛ اما مقاومت گیاهان در برابر تنش سرما نمی‌تواند بهبود یابد. تنش سرما که شامل هم خسارت سرد (کمتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد) و هم آسیب یخزدگی (کمتر از ۰ درجه سانتی‌گراد) است، یکی از مهم‌ترین تنش‌های گیاهان کشاورزی است که روی رشد گیاه تأثیر می‌گذارد. این یک عامل اصلی در تعیین توزیع طبیعی گیاهان است؛ بنابراین، درجه حرارت، بسته به موقعیت نسبی مطلوب، بر رشد تأثیر می‌گذارد. بسیاری از گونه‌های گیاهی گرمسیری و نیمه گرمسیری هنگامی که در چرخه زندگی خود در معرض کمتر از حد مطلوب قرار دارند، به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار می‌گیرند. به‌عنوان مثال، در برنج، دمای سرمازدگی مسئولیت کاهش ۳۰-۴۰٪ عملکرد در مناطق معتدل را دارد با این حال، تنش سرما نیز یکی از دلایل اصلی کاهش تولید محصول و کیفیت در بسیاری از محصولات منطقه معتدل و خشک است. بسیاری از محصولات مهم اقتصادی از جمله پنبه، سویا، برنج ذرت حساس به سرما هستند و قادر به زنده ماندن در سرما نیستند(Akbulut et al., 2019).

بررسی وضعیت محتوای کلروفیل نشان از تفاوت معنی دار در گیاه بنفشه داشت. مقایسه میانگینها به روش دانکن در خصوص محتوای کلروفیل بین شرایط نرمال و دمای ۱۰- درجه سانتیگراد، نشانگر برتری شرایط دمای پایین به عادی بود. گسترش ریشه در گیاه تحت تنش سرما و در نتیجه ساخت بیشتر سیتوکینین و افزایش انتقال آن به اندام هوایی میتواند منجر به افزایش سنتز کلروفیل گردد. در درجه حرارت‌های پایین، انرژی نورانی جذب شده به‌وسیله رنگیزهها نمی‌تواند در واکنش‌های فتوسنتزی به کار گرفته شود. این انرژی نورانی جذب شده باعث واکنش‌های اکسیداسیون نوری می‌شود که موجب از دست رفتن رنگیزهها، لیپیدها و اسیدهای چرب به‌خصوص در غشای تیلاکوئیدی می‌شود(McCue et al., 2000). که به‌نوبه خود باعث کاهش فعالیت فتوسنتزی و در نتیجه رشد گیاه خواهد شد (Paeizi and Shariati, 2012). چون میزان کلروفیل همبستگی مثبتی با سرعت فتوسنتز دارد (Wang et al., 2008). بانو و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که کلروفیل a به‌عنوان بازتابی از کارایی فتوسنتزی هر گیاه، تغییرات زیادی در تنش‌ها از خود نشان می‌دهد و می‌تواند بهترین پارامتر برای تشخیص مقاومت به دمای پایین باشد(Bano et al., 2015). در گیاه سویا، تنش سرما تأثیر معنی داری بر محتوای کلروفیل نداشت هرچند تنش سرما میزان کلروفیل a وb را به‌طور معنی داری کاهش داد (Jenabiyan et al., 2014).

میزان کاروتنویید در طول تنش سرما کمی افزایش یافته است که نقش حفاظتی خود را ایفا کرده است. مقاومت به سرما گاهی با افزایش سطح رنگیزههایی مانند کاروتنوئید صورت می‌گیرد. این رنگیزهها در دمای پایین اکسید شده و سبب کاهش تلفات کلروفیل a و b می‌شود که ممکن است از خسارت سرما جلوگیری کند. در بررسی سازگاری دو رقم گندم به سرما، میزان کلروفیل a در رقم زمستانه پس از دو هفته سازگاری نسبت به شاهد کاهش معنی داری را نشان داد اما در رقم بهاره افزایش یافت، در حالی که افزایش کاروتنوئید در هر دو رقم گندم مشاهده شد ۰۱:۳۸ ص.

آنتوسیانینهای موجود در برگ دو گیاه بنفشه و گل میمونی در تنش سرما افزایش پیدا کرده که در گل میمونی این افزایش محسوس‌تر است. آنتوسیانینهای برگ به‌عنوان گیرنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و گیاهان را در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند۰۱:۳۸ ص. به غیر از فعالیت‌های آنزیمی و تجمع مواد محلول، تجمع متابولیتهای ثانویه از جمله ترکیبات آنتوسیانین تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرد و شواهد زیادی نشان می‌دهد که در شرایط تنش، تولید برخی از آن‌ها چندین برابر افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد در این پژوهش سیستم دفاع غیر آنزیمی از جمله آنتوسیانین به‌طور توأم با سیستم دفاع آنزیمی همکاری می‌نماید تا اثر مخرب تنش را خنثی نمایند. متابولیتهای ثانویه برای پاک سازی گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد. این ترکیبات نه تنها رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند بلکه از تولید بیشتر آن‌ها در گیاه جلوگیری می‌کنند.

گزارش مشابهی مبنی بر افزایش مقدار آنتوسیانین در Begononia Semperflorencs در پاسخ به تنش وجود دارد(Zhang et al., 2010a).

میزان ترکیبات فنلی در اثر افزایش تنش سرما در دو گیاه بنفشه و گل میمونی بالا رفت و این افزایش در تنش ۱۰- درجه سانتی‌گراد در گل میمونی بیشتر مشاهده شد. در این پژوهش افزایش میزان ترکیب‌های ترکیبات فنلی بر اثر افزایش تنش سرما مشاهده شد که این امر ارتباط مستقیم با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها دارد(Kim et al., 1997). در دو واریته از فلفل (Capsicum annuum L.) در تنش سرما میزان این ترکیب در گیاه افزایش پیدا کرد(Esra et al., 2010). در سایر تنش‌های غیر زیستی و زیستی نیز این افزایش مشاهده شده است(André et al., 2009). پس می‌توان نتیجه گرفت پیش از آنکه سیستم آنزیمی وارد عمل شود ترکیبات فنلها و فلاونوئیدها دست به کار شده اما با افزایش تنش، سیستم آنزیمی وارد عمل شده و از میزان ترکیبات فنلها کمی کاسته می‌شود. ترکیبات ترکیبات فنلی از اجزا سیستم دفاع غیر آنزیمی و آنتی‌اکسیدانی سلول به‌حساب می‌آید. این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان خاموش کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا سایر گونه‌های فعال اکسیژن عمل نمایند(Solecka, 1997).

میزان قند کل در دو گیاه بنفشه و گل میمونی تحت تنش سرما افزایش یافت، این افزایش در گیاه گل میمونی در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد بیشتر بود. قندهای کل محلول نقش مهمی در تنظیم اسمزی سلول‌ها طی تنش‌های محیطی مانند خشکی و دمای پایین دارند. برخی از گیاهان از طریق تجمع مقدار زیادی از مواد محلول محافظت کننده اسمزی نظیر قندهای محلول نسبت به تنش‌های دمای پایین و دیگر تنش‌ها تحمل ایجاد نمایند. پژوهش‌ها نشان داده که محافظت‌کننده‌های اسمزی، تحمل گیاهان را نسبت به تنش سرما به‌طور معنی داری افزایش می‌دهند. هل و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که محافظت کننده‌های اسمزی در دانه‌ها، به‌طور معنی داری تحمل نسبت به دمای پایین را افزایش داده است (Hell et al., 2019).

بتائین گلایسین در گل بنفشه تحت تنش سرما افزایش محسوسی داشت. در گل میمونی در دمای ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد تغییر چندانی نداشت. تنظیم اسمزی در گیاهان از طریق تولید انواع مختلفی از محلول‌های سازگار (اسمولیتها) انجام می‌گیرد. این محلول‌های سازگار کننده همانند پرولین، پلی ال ها، گاماآمینوبوتیریک اسید و گلایسین بتائین در افزایش تحمل به کمبود آب ناشی از تنش سرما مؤثر هستند. گلایسین بتائین یکی از معمول‌ترین ترکیب آلی سازگار است که در میکروارگانیسم‌های مختلف گیاهان عالی و حیوانات می‌تواند وجود داشته باشد(Malekzadeh, 2015). غلظت گلایسین بتائین در بافت‌ها و گونه‌های مختلف گیاهی که این ماده را به‌عنوان محلول سازگار کننده استفاده می‌کنند، متفاوت است.افزایش این ماده می‌تواند سبب محافظت از غشای پلاسمایی سلول‌ها در مقابل اثرات تخریبی دمای محیط گردد. بتائین گلایسین از طریق بهبود ساختار غشا پلاسمایی موجب کاهش نشت الکترولیت‌ها گردد(Zarei et al., 2010).

در این پژوهش مقدار پروتئین برگ‌ها تحت تأثیر معنی دار تیمار دماهای پایین قرار گرفت که در گیاه بنفشه محسوس‌تر بود. بر پایه میانگین داده‌ها، تنش دمای پایین توانست مقدار پروتئین برگ بنفشه را نسبت به شرایط بدون تنش (تیمار شاهد) افزایش دهد. افزایش میزان پروتئین تحت تنش دمایی ۱۰- درجه سانتی‌گراد نسبت به شاهد می‌تواند به علت افزایش در سنتز پروتئین‌های ویژه (پروتئین شوک حرارتی و دهیدرین)، افزایش فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز و گلوتامین سنتتاز و فعال شدن آنزیم‌های درگیر در سنتز پروتئین‌ها باشد(Sharma and Dietz, 2009). افزایش میزان پروتئین تحت تنش سرما در درخت زیتون (Ortega-García and Peragón, 2009) و در برگ خیار (Lee and Lee, 2000)نیز مشاهده شد.

تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف دمایی و نوع اندام گیاهی بر محتوای پرولین نشان داد که دما و نوع اندام گیاهی (برگ و ریشه) در سطح ۰/۰۵ معنا دار بوده است. در هر دو گیاه بنفشه و گل میمونی در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد، افزایش در میزان پرولین مشاهده شد. به نظر می‌رسد گیاهان با افزایش اسیدآمینه پرولین، سعی در حفظ پتانسیل آب بافت‌هایشان دارند و نسبت به تنش سرما حساس‌تر باشند. این نتایج با مطالعه بر روی ارقام پسته مطابقت دارد. تنش سرما در گندم بهاره نیز باعث افزایش پرولین شد ۰۱:۳۸ ص. غلظت قند کل و پرولین طی مقاوم شدن به سرما افزایش می‌یابد (Brown et al., 2019). تجمع پرولین به‌عنوان یک سازوکار مقاومت در برابر تنش سرما در گیاهان مطرح است. در گیاهان پرولین تجمع یافته

در پاسخ به تنش سرما نقش مهمی در سم زدایی رادیکال‌های آزاد و حفظ انسجام غشای سلولی ایفا می‌کند (Yadegari et al., 2007).

نتایج ماده مالون دآلدهید در دماهای ۲۳، ۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در دو گیاه بنفشه و گل میمونی نشان داد که تیمار سرما، سبب کاهش میزان مالون دآلدهید گردید. پراکسیداسیون لیپیدها منجر به تخریب غشاهای بیولوژیکی میشود که نمایانگر تنشهای اکسیداتیو در گیاهان تحت تنشهای مختلفی مانند تنش سرما ایجاد میشود. مالون دآلدهید به‌عنوان یک نشانه برای مشخص کردن شدت صدمات اکسیداتیو به لیپیدها بکار میرود(Guo et al., 2006). مهم‌ترین بخش از خسارتهای ناشی از تنش، تولید رادیکال‌های آزاد مربوط به پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که باعث تولید مالون دآلدهید میشود(Yadegari et al., 2007). مالون دآلدهید همانند نشت یونی به‌عنوان شاخص آسیب غشایی برای اندازه‌گیری غیرمستقیم انسجام سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد و وقوع آسیب سرمازدگی را در محصولات تحت تنش سرما نشان می‌دهد. میزان کم پراکسیداسیون غشا در سلول‌های برگ عامل مهم تحمل گیاهان به تنش‌های سرما است. لپورت و همکاران گزارش دادند که تنش سرما با آسیب به غشاهای کلروپلاستی می‌تواند بیشترین خسارت را به فتوسنتز و راندمان تولید گیاه وارد کند. تیمار دمایی پایین سبب کاهش میزان مالون دآلدهید گردید که اهمیت سازگاری به سرما را تائید می‌کند(Palta et al., 2007). یادگاری و همکاران (۲۰۰۷) نیز کاهش میزان مالون دآلدهید در برگ گیاه سویا (Glycine max) تحت تنش سرما را بیان نمودند(Yadegari et al., 2007). بالا بودن میزان مالون دآلدهید تا حد زیادی به وجود کلروپلاست و زنجیره انتقال الکترون مربوط میشود که باعث افزایش تولید انواع اکسیژن‌های فعال شده و در نتیجه افزایش آسیب وارده به غشای سلولی و میزان مالون دآلدهید می‌شود.

مقدار H_2O_2 با کاهش دما در دو گیاه بنفشه و گل میمونی، افزایش یافت و بیشترین میزان این افزایش در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد بود. افزایش H_2O_2 در گیاه دلالت بر تنش اکسیداتیو دارد که پراکسیداسیون لیپیدها و دیگر اثرات زیان‌بخش بر غشاها را سبب می‌شود ۰۱:۳۸ ص. آنزیم‌های مهم ROS (گونه اکسیژن فعال) از گیاهان شاملSOD ، APX، CATو PODاست .تعادل بین فعالیت‌های SOD و APX یا CAT در سلول‌ها یک نکته مهم برای حفظ سطح پایدار ROS (گونه اکسیژن فعال) است در مرحله اول SOD تجزیه مولکول‌های H2O2 را کاتالیز می‌کند .سپس، H2O2توسطAPX ، PODو CAT در ارگان‌های مختلف و چرخه‌های آنتی‌اکسیدانی سم زدایی می‌شود. چندین روش نشان می‌دهد که با کاهش بیان آنتی‌اکسیدان‌ها از جملهSOD ، CAT، PODوAPX ، قابلیت دفاع در برابر آسیب‌های اکسیداتیو مهار می‌شود .تحمل سرما هنگامی که سطحPOD ، CATو SOD گیاه افزایش می‌یابد، بهبود می‌یابد .مطالعات نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با تحمل گیاه در برابر تنش‌های سرما، مانند پاسخ به تنش سرما در گندم، توت‌فرنگی و جو ارتباط دارد(Lei et al., 2019).در برگ‌های گندم زمستانه تحت تنش سرما نیز میزان پراکسید هیدروژن ۴۰ درصد و در برگ‌های گندم بهاره تا ۱۰۰ درصد افزایش یافت ۰۱:۳۸ ص. در گیاه عدس نیز تنش سرما سبب افزایش آسیب اکسیداتیو به‌صورت تولید H_2O_2 شد (HUSEYIN and FUSUN, 2008). بنابراین می‌توان گفت با افزایش H_2O_2، نشت یونی افزایش پیدا کرده و در نتیجه پایداری غشا کاهش می‌یابد.

در دو گیاه بنفشه و گل میمونی با کاهش دما به ۱۰- درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش نشان نداد. افزایش فعالیت کاتالاز پاسخ سازشی برای غلبه بر آسیب‌های ناشی از سطوح سمی و احیا کننده H_2O_2 است که طی متابولیسم سلول تولید می‌شود۲۲/۴/۲۰۲۳. کاتالاز سلول‌ها را از تأثیرات پراکسید هیدروژن محافظت می‌کند. گونه‌های فعال اکسیژن از مهم‌ترین عوامل آسیب رسان به سیستم‌های فتوسنتزی در شرایط تنش‌های محیطی از جمله تنش سرما است(Baghizadeh and Shahbazi, 2013).

میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دو گیاه بنفشه و گل میمونی تحت تنش سرما تغییری پیدا نکرد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز با کمک اسید آسکوربیک باعث حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. عدم تغییر فعالیت این آنزیم به معنی حذف کمتر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در نتیجه افزایش مرگ سلولی و کاهش مقاومت به تنش سرما است۰۱:۳۸ ص. این آنزیم

کلیدی برای تجزیه پراکسید هیدروژن است. بر اساس گزارش‌ها، جمع آوری H_2O_2 از کلروپلاست یا سیتوزول، می‌تواند سطح تنش‌های اکسیداتیو را کاهش دهد. اهمیت نقش آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ارتباط با افزایش مقاومت به تنش اکسیداتیو در بسیاری از گیاهان گزارش شده است. تاجور و همکاران (۱۳۹۰) تأثیر تنش سرما در دماهای ۹، ۶، ۳، صفر ، ۶-، ۳- درجه سانتی‌گراد را به مدت ۲۴ ساعت بر روی نارنگی پیج، بررسی کردند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در دمای صفر درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار بود. نظری و همکاران (۱۳۹۰) تنش سرمای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۴۸ ساعت بر روی ژنوتیپهای ایرانی نخود بررسی کردند. نتایج نشان داد که تنش سرما موجب افزایش فعالیت آنزیم شد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم در برگ‌های گیاه استویا، اختلاف معنی داری را در ۲ تیمار دمایی بررسی شده در مقایسه با کنترل نشان ندادند(Moradi Peynevandi et al., 2018).

مقدار آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاهان بنفشه و گل میمونی تیمار شده با دمای پایین تفاوت معنی داری نداشت. آنزیم گایاکول پراکسیداز یکی از آنزیم‌های اکسیدکننده ترکیبات فنلی است و نقش مهمی در افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی دارد(Agarwal and Pandey, 2004). یکی از راه‌های مقابله گیاهان به‌منظور کاهش آثار مخرب گونه‌های اکسیژن فعال، تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که در این میان آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز از مهم‌ترین آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن به شمار می‌آیند(Hong and Jin, 2007). این دو آنزیم در این پژوهش افزایش معنا داری در تیمارهای دمایی پایین نداشت.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزایش قند کل به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر خسارات سرما باشد. در طول تنش، گیاه با از دست دادن تدریجی آب، غلظت مواد را افزایش داده و تشکیل یخ کاهش و از آبگیری القا شده توسط یخ جلوگیری می‌شود. در این آزمایش با کاهش دما تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد، فعالیت بیشتر آنزیم‌ها و محتوای پروتئین در مقایسه با شاهد در دو گیاه بنفشه (Viola odorata) و گل میمونی (Antirrhinum majus) افزایش یافتند. با توجه به یافته‌های پس از تنش می‌توان نتیجه گرفت که هر دو گیاه بنفشه و گل میمونی به تنش دمای پایین تحمل نسبی دارند. در انتها پیشنهادات زیر ارائه میشود:

-اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدانی بنفشه (Viola odorata) و گل میمونی (Antirrhinum majus)، قبل و بعد از تنش سرما

-بررسی نشت پذیری غشای سلولی گیاه بنفشه (Viola odorata) و گل میمونی (Antirrhinum majus) تحت تنش سرما

-الکتروفورز پروتئین های ذخیره ای بذر گیاهان بنفشه (Viola odorata) و گل میمونی (Antirrhinum majus) تحت تنش سرما

-بررسی بیان ژنهای تحمل به سرما و بررسی ژنوتیپهای برتر در گیاهان بنفشه (Viola odorata) و گل میمونی (Antirrhinum majus) تحت تنش سرما

منابع

۱. تاجور، ی.، فتوحی قزوینی، ر.، حمیداوغلی، ی. و حسن ساجدی، ر. (۱۳۹۰). پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نارنگی پیج تحت تنش دمای پایین، زیست شناسی گیاهی، ۹: ۱-۱۲.

۲. حکمت شعار، ح. (۱۳۷۲). فیزیولوژی گیاهان در شرایط دشوار، انتشار نیکنام تبریز.

۳. رضایی، ش.، افشار محمدیان، م. و بخشی، د. (۱۳۹۳). بررسی تغییرات برخی ترکیبات موثره دارویی و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در دو رقم زیتون تحت تنش سرما، مجله زیست شناسی گیاهی ایران. ۱۹: ۱-۱۶.

۴. فلاحتیان، س، دلجو، ع، میرزایی اصل، ا. و حسینی واسوکلائی، م. (۱۳۹۱). بررسی بیان ژن در شرایط تنش سرما در گیاه بنفشه با استفاده از روش نمایش افتراقی، دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران، تهران، انجمن ژنتیک ایران،

۵. کارگر خرمی، س. و زنگنه، ر. (۱۳۹۷). سازوکارهای سلولی و مولکولی گیاهان در برابر تنشهای غیرزیستی، انتشارات دانشگاه ارومیه، ۲۴۵.

۶. ونایی، س. و حیدری، ع. (۲۰۱۲). اثرات تنش سرما در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای بر فعالیت آنزیم های گیاهچه‌ای و برخی صفات فیزیولوژیکی در نخود. پژوهشهای زراعی ایران ۹: ۵۱۴-۵۲۴

7. Agarwal, S., Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in Cassia angustifolia. Biologia Plantarum 48, 555-560.
8. Amini-Khoei, H., Mohammadi-Asl, A., Amiri, S., Hosseini, M.-J., Momeny, M., Hassanipour, M ,.Rastegar, M., Haj-Mirzaian, A., Haj-Mirzaian, A., Sanjarimoghaddam, H., 2017. Oxytocin mitigated the depressive-like behaviors of maternal separation stress through modulating mitochondrial function and neuroinflammation. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 76, 169-178.
9. Amini, Z., Haddad, R., 2013. Role of photosynthetic Pigments and antioxidant enzymes against oxidative stress. Veterinary Journal 81, 383-386.
10. Amirkhiz, K., Dehaghi, M., Sanavy, S., Zadeh, A., Heshmati, S., 20 .۱۱Effect of iron application on enzymatic activity, grain yield and oil content of safflower under water deficit conditions. Iranian Journal of Crop Sciences 13, 452-465.
11. Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology 24, 324-331.
12. André, C.M., Schafleitner, R., Legay, S., Lefèvre, I., Aliaga, C.A.A., Nomberto, G., Hoffmann, L., Hausman, J.-F., Larondelle, Y., Evers, D., 2009. Gene

expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. Phytochemistry 70, 1107-1116.

13. Apostolova, P., Yaneva, I., Apostolova, P., Yaneva, I., 2006. Antioxidative defense in winter wheat plants during early cold acclimation'. Plant Physiology, 101-108.
14. Aroca, R., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M., 2003. Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress. Physiologia Plantarum 117, 540-549.
15. Blamey, M., Grey-Wilson, C., 1989. Illustrated flora of Britain and Northern Europe. Hodder and Stroughton.
16. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72, 248-254.
17. Chandra Babu, R., Shashidhar, H., Lilley, J., Thanh, N., Ray, J., Sadasivam, S., Sarkarung, S., O'toole, J., Nguyen, H., 2001. Variation in root penetration ability, osmotic adjustment and dehydration tolerance among accessions of rice adapted to rainfed lowland and upland ecosystems. Plant breeding 120, 233-238.
18. Charrier, G., Lacointe, A., Améglio, T., 2018. Dynamic Modeling of Carbon Metabolism During the Dormant Period Accurately Predicts the Changes in Frost Hardiness in Walnut Trees Juglans regia L .Frontiers in plant science 9, 1746.
19. Choudhury, S., Panda, S.K., 2004. Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in Oryza sativa L. roots. Bulg J Plant Physiol 30, 95-110.
20. Elisafenko, T., 2015. Features of seed germination in different ecological groups of the species of the section Violidum, subgenus Nomimium, genus Viola L.(Violaceae). Contemporary problems of ecology 8, 523-533.
21. Esra, K., İŞLEK, C., Üstün, A.S., 2010. Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (Capsicum annuum L.) varieties. Gazi University Journal of Science 23, 1.۶-
22. Fang, Y., Xiong, L., 2015. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. Cellular and molecular life sciences 72, 673-689.
23. Fielding, J., Hall, J., 1978. A biolchemical and cytochemical study of peroxidase activity in roots of Pisum sativum: I. a comparison of DAB-peroxidase and guaiacol-peroxidase with particular emphasis on the properties of cell wall activity. Journal of Experimental Botany 29, 969-981.
24. Fowler, S., Thomashow, M.F., 2002. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. The Plant Cell 14, 1675-1690.

25. Gomès, E., Jakobsen, M.K., Axelsen, K.B., Geisler, M., Palmgren ,M.G., 2000. Chilling tolerance in Arabidopsis involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases. The Plant Cell 12, 2441-2453.
26. Gulen, H., Turhan, E., Eris, A., 2016. 15 Molecular and Physiological Responses of Strawberry Plants to Abiotic Stress. Strawberry: Growth, Development and Diseases, 288.
27. Hashida, S.-n., Kishima, Y., Mikami, T., 2005. DNA methylation is not necessary for the inactivation of the Tam3 transposon at non-permissive temperature in Antirrhinum. Journal of plant physiology 162, 1292-1296.
28. Heidari, H., Golbabaei, F., Shamsipour, A., Forushani, A.R., Gaeini, A., 2015. Outdoor occupational environments and heat stress in IRAN. Journal of Environmental Health Science and Engineering 13, 48.
29. Hell, A.F., Kretzschmar, F.S., Simões, K., Heyer, A.G., Barbedo, C.J., Braga, M.R., Centeno, D.C., 2019. Metabolic changes on the acquisition of desiccation tolerance in seeds of the Brazilian native tree Erythrina speciosa. Frontiers in plant science 10, 1356.
30. Hess, J., 1993. Vitamin E, α-Tocopherol. Antioxidants in Higher Plants. RG Alscher, J. L. Hess, CRC Press, Inc., Boca Raton.
31. Hildebrandt, U., Kaldorf, M., Bothe, H., 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Plant Physiology 154, 709-717.
32. Hong, W., Jin, J.-Y., 2007. Effects of zinc deficiency and drought on plant growth and metabolism of reactive oxygen species in maize (Zea mays L). Agricultural Sciences in China 6, 988-995.
33. Horváth, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Török, Z., Páli, T., Balogh, G., Kovács, E., Nádasdi, L., Benkö, S., Joó, F., 1998. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in Synechocystis PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene". Proceedings of the National Academy of Sciences 95, 3513-3518.
34. Janas, K.M., Cvikrová, M., Pałągiewicz, A., Eder, J., 2000. Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. Plant Physiology and Biochemistry 38, 587-593.
35. Jenabiyan, M., Pirdashti, H., Yaghoubian, Y., 2014. The combined effect of cold and light intensity stress on some morphological and physiological parameters in two soybean (Glycine max L.) cultivars. International Journal of Biosciences (IJB) 5, 189-197.
36. Joudmand, A., Hajiboland, R., 2019. Silicon mitigates cold stress in barley plants via modifying the activity of apoplasmic enzymes and concentration of metabolites. Acta physiologiae plantarum 41, 29.

37. Khorsidi, M., Nijavan, A., 2006. The effects of abscisic acid and CaCl2 on the activities of antioxidant enzymes under cold stress in maize seedlings in the dark. Pak. J. Biol. Sci 9, 54-59.
38. Kuroda, H ,.Sagisaka, S., 1993. Ultrastructural changes in cortical cells of apple (Malus pumila Mill.) associated with cold hardiness. Plant and cell physiology 34, 357-365.
39. Larcher, W., Bauer, H., 1981. Ecological significance of resistance to low temperature, Physiological plant ecology I, Springer, pp. 403-437.
40. Ozfidan-Konakci, C., Yildiztugay, E., Yildiztugay, A., Kucukoduk, M., 2019. Cold stress in soybean (Glycine max L.) roots: exogenous gallic acid promotes water status and increases antioxidant activities. Botanica Serbica 43, 59-71.
41. Ozkur, O., Ozdemir, F., Bor, M., Turkan, I., 2009. Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte Capparis ovata Desf. to drought. Environmental and experimental botany 66, 487-492.
42. Pál, M., Szalai, G., Janda, T., 2015. Speculation: polyamines are important in abiotic stress signaling. Plant Science 237, 16-23.
43. Palta, J., Turner, N., French, R., Buirchell, B ۲۰۰۷ ,.Physiological responses of lupin genotypes to terminal drought in a Mediterranean-type environment. Annals of applied biology 150, 269-279.
44. Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and environmental safety 60, 324-349.
45. Patton, A.J., Cunningham, S.M., Volenec, J.J., Reicher, Z.J., 2007. Differences in freeze tolerance of zoysiagrasses: II. Carbohydrate and proline accumulation. Crop Science 47, 2170-2181.
46. Routaboul, J.-M ,.Fischer, S.F., 2000. Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. Plant physiology 124, 1697-1705.
47. Saadati, S., Baninasab, B., Mobli, M., Gholami, M., 2019. Measurements of freezing tolerance and their relationship with some biochemical and physiological parameters in seven olive cultivars. Acta Physiologiae Plantarum 41, 51.
48. Sah, S.K., Reddy, K.R., Li, J., 2016. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. Frontiers in plant science 7, 571.
49. Sakai ,A., Yoshida, S., 1968. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. Cryobiology 5, 160-174.
50. Sanghera, G., Wani, S., 2008. Innovative approaches to enhance genetic potential of rice for higher productivity under temperate conditions of Kashmir. J. Plant Sci. Res 24, 99-113.
51. Sanghera, G.S., Wani, S.H., Hussain, W., Singh, N., 2011. Engineering cold stress tolerance in crop plants. Current genomics 12, 30.

52. Sarwat, M., Ahmad, A., Abdin, M., Ibrahim, M.M., 2016. Stress signaling in plants: genomics and proteomics perspective. Springer.
53. Sasaki, T., 1974. Studies on germination ability under low temperature condition of rice varieties. Kamikawa Agric. Exp. Sta., Hokkaido 24, 1-90.