نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱ ، ص. ۳۲۶-۳۲۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 26, No. 3, Fall 2012, P. 321-326
ISSN: 2008 - 4730

بررسی اثرات پایه و دمای پایین بر واکنش‌های آنتی‌اکسیدانی نارنگی پیج [(*Citrus reticulata* ×*C. paradise*) × (*C. clementina*)]

یحیی تاجور[1*]- رضا فتوحی قزوینی[2]- یوسف حمیداوغلی[3]- رضا حسن ساجدی[4]

تاریخ دریافت:۹۰/۳/۸
تاریخ پذیرش:۹۱/۳/۲

چکیده

تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در اثر تنش دمای پایین از عوامل مؤثر آسیب به گیاه است. به منظور بررسی اثر پایه و دما بر واکنش‌های آنتی-اکسیدانی درختان جوان نارنگی پیج آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. عامل دما در هفت سطح شامل دمای ۹، ۶، ۳، ۰، ۳-، ۶- و ۲ ± ۲۵ °C (به عنوان شاهد) و پایه در سه سطح نارنج، سیترنج و پونسیروس انتخاب شد. بر اساس تجزیه داده‌ها کاهش دما در افزایش نشت یونی، پراکسیداسیون‌لیپیدها، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات‌پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز تاثیر معنی‌دار داشت ($P<0.01$). پایه میزان پراکسیداسیون‌لیپید را تا ۱/۲۳۷ مایکرومول مالون‌دآلدئید در گرم وزن‌تر برگ کاهش داد ($P<0.05$) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت کاتالاز را به ترتیب تا میانگین ۷۲/۸۷ درصد و ۰/۴۳۱ واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ بالا برد ($P<0.01$). اثر متقابل پایه و دما نیز بر نشت یونی و فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز معنی‌دار بود ($P<0.05$). بطوریکه بیشترین نشت یونی تا ۸۶/۹۷درصد روی پایه نارنج در ۶- °C و فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز تا میانگین ۴/۶۲۰ واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ روی پونسیروس در صفر درجه سانتیگراد ثبت شد. با توجه به شاخص‌های بیوشیمیایی اینگونه به نظر می‌رسد که نارنگی پیج روی پایه پونسیروس در مقایسه با پایه‌های سیترنج و نارنج، دمای یخبندان را بهتر تحمل می‌نماید

واژه های کلیدی: مرکبات، تنش، آنتی‌اکسیدان

مقدمه

تنش دمای پایین از تنش‌های محیطی غیره زنده است (۹). نارنگی دورگ کمپلکس پیج [(*Citrus reticulata* ×*C paradise*) [(*C. clementina*)] × یکی از ارقام تجاری مهم کشور بوده که متعلق به خانواده مرکبات و حساس به تنش دمای پایین است (۳). در تنش دمای پایین به علت عدم تعادل بین نور دریافتی و فتوسنتز، احتمال وقوع تنش اکسیداتیو (به عنوان تنش ثانویه) وجود داشته که بروز چنین وضعیتی ناشی از افزایش تولید رادیکالهای فعال اکسیژن می‌باشد (۷). در دمای پائین فعالیت آنزیمها از جمله آنزیم روبیسکو کاهش یافته که این تنزل فعالیت باعث کاهش عملکرد چرخه کالوین می‌شود (۱۴). از آنجائیکه محصولات مرحله نوری از جمله NADPH در چرخه کالوین مصرف می‌شود، بنابراین در تنش دمای پایین به دلیل کاهش فعالیت چرخه کالوین این ترکیب تجمع می‌یابد. در چنین وضعیتی ترکیب $NADP^+$ کاهش یافته و منجر به انتقال الکترونها از فرودوکسین به اکسیژن شده که با افزایش تولید رادیکال اکسیژن تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد (۷). به‌علاوه در دمای پائین به دلیل کاهش کارائی انتقال انرژی به مرکز فتوسیستم II احتمال تشکیل کلروفیل سه تائی وجود داشته که با انتقال الکترون به اکسیژن، رادیکال فعال تولید می‌گردد (۱۲).

یکی از اثرات مخرب تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپید است که در پژوهش‌های تنش سرما بر لیمو آب شیراز (۵)، و زیتون (۹) افزایش پراکسیداسیون‌لیپید گزارش گردید. از اثرات دیگر تنش دمای پایین کاهش سیالیت غشاء بوده که در کنار پراکسیداسیون‌لیپید موجب تخریب بیشتر غشاء و در نتیجه افزایش نشت یونی می‌گردد. در این زمینه گزارش‌های متعددی ارائه شد که می‌توان به افزایش نشت یونی لیمو آب شیراز (۵)، زیتون (۹) و قهوه (۱۱) تحت تنش یخبندان اشاره

۱- استادیار بخش اصلاح و تهیه نهال و بذر، موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: ytajvar@yahoo.com)
۲و۳- استاد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۴- استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

داشت.

برخی از گیاهان سازگار به تنش اکسیداتیو ناشی از تنش دمای پایین، از طریق بکارگیری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی) ادامه حیات را در شرایط مذکور بهبود می‌بخشند (۱). در پژوهشی روی سازگاری لیمو آب شیراز مشخص شد که بکارگیری اسپرمین در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مقاومت این گیاهچه‌ها به تنش دمای پایین تاثیر گذار بود (۵). در زمینه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توان به این نکته اشاره داشت که سوپراکسایددیسموتاز جزء اولین آنزیمی است که در فرایند خنثی‌سازی رادیکال‌های فعال اکسیژن دخالت دارد. این آنزیم با تبدیل رادیکال سوپراکساید به مولکول پراکسیدهیدروژن، اقدام به خنثی سازی رادیکال سوپراکساید می‌نماید (۲۱). بر این اساس در پژوهش انجام گرفته روی گیاهچه‌های بذری مرکبات تحت تنش یخبندان افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسایددیسموتار گزارش شد (۴). با افزایش رادیکال پراکسید هیدروژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دیگری فعال شده که در این خصوص می‌توان به آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز اشاره داشت (۸). در این زمینه می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه هلو (۱۸) و میوه پرتقال (۲۰) تحت تنش دمای پایین اشاره نمود. در خصوص فعالیت سایر آنزیم‌ها نیز می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در میوه نارنگی فورچون[1] (۱۹) و افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه ذرت (۱۵) تحت تنش سرما استناد داشت.

به دلیل مزیت‌هایی چون کوتاه کردن دوره جوانی درخت (زود-باردهی) و یا بهره‌مندی از ویژگی‌های مطلوب پایه مانند مقاومت به برخی تنش‌های محیطی و بیماری‌ها، ازدیاد تجاری مرکبات به صورت پیوندی رایج است (۳). در این زمینه گزارش‌های در خصوص تاثیر-گذاری پایه در مقاومت مرکبات به تنش دمای پایین (۲) و سمیت بر (۱۶) ارائه شده است.

علی‌رغم جایگاه هفتم ایران در تولید جهانی مرکبات (۱۳)، کشت و پرورش این محصول از آسیب دوره‌ای تنش یخبندان (مانند یخبندان ۱۳۸۶) مصون نیست. بنابراین بررسی واکنش ارقام تجاری مرکبات روی پایه‌های رایج منطقه در دامنه مختلف دمای پایین، حائز اهمیت است. به همین جهت در این پژوهش تحمل درختان جوان پیچ تحت تاثیر پایه‌ها و دمای پایین مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

این آزمایش طی سال‌های ۸۹-۱۳۸۷ در شرایط کنترل شده روی نهال‌های پیوندی دو ساله نارنگی دورگ پیچ روی سه پایه مختلف در موسسه تحقیقات مرکبات کشور واقع در شهر رامسر انجام شد. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد که پایه‌ها شامل نارنج، سیترنج، پونسیروس و تیمار دمایی شامل دمای ۶-، ۳-، ۰، ۳، ۶ و ۹ درجه سانتیگراد بود (در شرایط کنترل شده اتاق رشد) که با نمونه‌های شاهد (۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد) مورد مقایسه قرار گرفتند. کاهش دمای محیط گیاهان از دمای شاهد تا تیمارهای دمایی به صورت تدریجی روزانه یک درجه سانتیگراد بود. گیاهان در هر تیمار به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از اعمال هر تیمار دمایی، شاخص‌های پراکسیداسیون‌لیپید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسایددیسموتاز، آسکوربات‌پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز و نشت یونی به شرح زیر مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای اندازه‌گیری شاخص پراکسیداسیون‌لیپیدها، غلظت مالون-دآلدئید[2] (محصول واکنش پراکسیداسیون‌لیپید) مورد ارزیابی قرار گرفت. مالون‌دآلدئید در واکنش با تیوباربیتوریک اسید[3] تشکیل کمپلکس رنگی داده که در طول موج ۵۳۲ نانومتر جذب آن ثبت و سپس جذب سایر رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از جذب ۵۳۲ نانومتر کسر گردید (۹).

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، از روش سنجش ۱ و۱-دی فنیل پیکریل هیدرازیل[4] استفاده شد. برای این منظور ۱۰ مایکرولیتر عصاره استخراجی (استخراج ترکیات آنتی‌اکسیدانی با متانول) با ۹۰ مایکرولیتر محلول دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل (۶ میلی-مولار) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه (به همراه کنترل) در شرایط تاریک (دمای اتاق) نگهداری گردید. سپس میزان جذب کنترل و نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر ثبت و با استفاده از فرمول زیر، درصد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محاسبه گردید (۶).

۱۰۰ × (جذب کنترل / جذب نمونه – جذب کنترل) = ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسایددیسموتاز نیاز به محلول واکنش نمونه، بلانک و کنترل بود. تیوپ نمونه حاوی محلول واکنشی به حجم ۱۰۰۰ مایکرولیتر شامل EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، متیونین۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۲ میکرومولار و عصاره آنزیمی بود. محلول واکنش بلانک و کنترل نیز همانند نمونه، لکن فاقد عصاره آنزیمی بود. تیوپ نمونه و کنترل به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور ۴۰۰ لوکس به آرامی شیکر شدند. همزمان بلانک نیز به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط تاریک قرار داشت. سپس دستگاه توسط بلانک صفر و در ادامه جذب نمونه و کنترل، در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط

1- Fortune

2- Malondialdehyde

3- Thiobarbituric acid

4- 1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl

دستگاه اسپکتوفتومتر ثبت و فعالیت آنزیم بر اساس واحد آنزیمی در میلی‌گرم وزن‌تر برگ محاسبه و بیان شد (۲۱).

فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز با استفاده از ترکیب آسکوربیک اسید ارزیابی گردید. محلول واکنش به حجم یک میلی‌لیتر متشکل از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار، پراکسیدهیدروژن ۰/۱ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی با pH=۷ بود. فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز با بررسی کاهش جذب نمونه واکنش، در طول موج ۲۹۰ نانومتر ارزیابی شد. فعالیت این آنزیم بر حسب یک واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ بیان شد (۱۷).

محلول واکنش برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز به حجم یک میلی‌لیتر متشکل از پراکسیدهیدروژن ۱۵ میلی‌مولار، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی با pH=۷ بود. فعالیت این آنزیم نیز بر حسب یک واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ بیان شد (۱۹).

برای سنجش فعالیت سینیتیکی آنزیم پراکسیداز محلول واکنشی به حجم یک میلی‌لیتری متشکل از ۴۷۵ میکرولیتر گایاکول ۴۵ میلی‌مولار، ۴۷۵ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۱۰۰ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی، بکار گرفته شد. این ترکیبات در حمام یخ با هم مخلوط و سپس منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر ثبت گردید. فعالیت این آنزیم بر حسب یک واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ بیان شد (۱۰).

برای اندازه‌گیری نشت یونی از روش کامپوز و همکاران (۱۱) استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها نیز از طریق آزمون توکی انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها بیان‌گر آن بود که عامل دما در افزایش پراکسیداسیون‌لیپیدها، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات‌پراکسیداز، کاتالاز، پراکسیداز و نشت یونی در سطح یک درصد تاثیر معنی‌دار داشت. عامل پایه در کاهش پراکسیداسیون‌لیپید در سطح پنج و در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت کاتالاز در سطح یک درصد معنی‌دار بود. برهمکنش اثر پایه و دما نیز بر نشت یونی و فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز تاثیرگذار بود ($P<0.05$).

جدول مقایسه میانگین داده‌ها (جدول۱) بیان‌گر آن است که افزایش پراکسیداسیون‌لیپید از دمای ۳ درجه سانتیگراد بوده و بیشترین مقدار آن به میزان ۲/۵۳۴ مایکرومول مالون‌دآلدئید در گرم وزن تر برگ در ۳- درجه سانتیگراد ثبت گردید. با مقایسه تاثیر پایه‌ها بر پراکسیداسیون‌لیپید، بیشترین و کمترین مقدار پراکسیداسیون‌لیپید به ترتیب با میانگین ۱/۵۳۰ و ۱/۲۳۷ مایکرومول مالون‌دآلدئید در گرم وزن‌تر برگ در نارنج و پونسیروس ثبت شد (جدول۲). افزایش پراکسیداسیون‌لیپید نشان دهنده افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن و تخریب بیشتر غشاء سلولی است که در تیمار ۳- درجه‌سانتیگراد این تخریب بیشتر بود. در بین پایه‌ها نیز، احتمالاً پایین بودن پراکسیداسیون‌لیپید پونسیروس می‌تواند مرتبط با مقاومت آن به تنش دمای پایین باشد. گزارش‌های مشابه‌ای در خصوص تاثیر تنش دمای پایین بر افزایش پراکسیداسیون‌لیپید در گیاهانی همچون لیمو آب شیراز (۵) و زیتون (۹) ارائه شد که تایید کننده نتایج این پژوهش می‌باشد.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر دما بر واکنش بیوشیمایی نارنگی پیج روی سه پایه نارنج، سیترنج و پونسیروس تحت تنش دمای پایین

تیمار دمایی	صفات نشت یونی %	پراکسیداسیون‌لیپید MDA (µmol/gr FW)	ظرفیت آنتی اکسیدانی %	فعالیت سوپراکساید دیسموتاز (IU/mg FW)	فعالیت پراکسیداز (IU/g FW)	فعالیت آسکوربات	فعالیت کاتالاز (IU/g FW)	فعالیت پراکسیداز (IU/g FW)
۲۵±۲°C	۱۱/۲۳ b	۰/۶۴۶۷ e	۵۸/۱۸ b	۳۶/۰۷ c	۱/۱۴۱ e		۰/۳۱۴۴ b	۴/۲۳۱ b
۹°C	۱۱/۳۳ b	۰/۶۵۳۳ e	۵۷/۷۵ b	۳۶/۳۴ bc	۱/۱۸۹ e		۰/۳۱۵۶ b	۴/۳۰۶ b
۶°C	۱۲/۵۳ b	۰/۸۷۶۷ de	۵۸/۲۳ b	۴۰/۳۷ bc	۱/۳۰۲ de		۰/۳۲۲۲ b	۴/۶۲۳ b
۳°C	۱۱/۷۵ b	۱/۲۲۴ cd	۶۳/۸۲ ab	۴۹/۱۷ abc	۱/۶۲۳d		۰/۳۳۷۸ b	۵/۳۰۰ ab
۰°C	۱۲/۵۱ b	۱/۵۸۸ bc	۶۷/۳۴ a	۵۹/۳۰ a	۴/۳۳۸ a		۰/۴۴۲۲ ab	۶/۶۸۸ ab
-۳°C	۱۳/۵۳ b	۲/۵۳۴ a	۶۸/۳۰ a	۵۳/۷۶ ab	۳/۴۴۲ b		۰/۵۱۵۶a	۸/۹۴۶ a
-۶°C	۸۰/۲۸ a	۱/۹۳۹ b	۶۵/۰۷ ab	۴۶/۸۶ abc	۲/۶۷۹ c		۰/۳۶۳۳ b	۷/۹۵۷ ab

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۱٪ آزمون توکی با هم اختلاف معنی‌دار ندارند

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر پایه بر پراکسیداسیون‌لیپید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت کاتالاز نارنگی پیج تحت تنش دمای پایین

صفات / پایه	پراکسیداسیون‌لیپید MDA (µmol/gr FW)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی %	فعالیت آنزیم کاتالاز (IU/g FW)
نارنج	۱/۵۳۰ a*	۵۶/۵۵ b**	۰/۳۳۱۰ b **
سیترنج	۱/۲۸۸ b*	۵۸/۵۹ b**	۰/۳۵۷۱ ab**
پونسیروس	۱/۲۳۷ b*	۷۲/۸۷ a **	۰/۴۳۱۰ a**

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف مشترک در سطح ۱ (**) و ۵ (*) درصد آزمون توکی اختلاف معنی‌دار ندارند

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها تحت تاثیر دما (جدول۱) نشان داد که بیشترین و کمترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب با میانگین ۶۸/۳ و ۵۷/۷۵ درصد مربوط به تیمار دمایی ۳- و ۹ درجه سانتی‌گراد بود. از نظر پایه نیز بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با میانگین ۷۲/۸۷ درصد مربوط به پایه پونسیروس بوده و پایه‌های سیترنج و نارنج به ترتیب با میانگین ۵۸/۵۹ و ۵۶/۵۵ درصد در رتبه بعدی قرار داشتند (جدول۲). در تفسیر این نتایج می‌توان اینگونه عنوان داشت که احتمالاً افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن بوده تا گیاهان مذکور بتوانند از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، اثرات سمی رادیکال‌های اکسیژن را خنثی نمایند (۱). عدم افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تا تیمار دمایی ۶ درجه سانتی‌گراد نیز می‌تواند نشان دهنده تداوم واکنش فتوسنتز و در نتیجه تعادل بین تولید و خنثی سازی رادیکال‌های فعال اکسیژن تا دمای مزبور باشد. افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پایه پونسیروس نیز احتمالاً مرتبط با نوع ژنوتیپ این گیاه است (۳). نجف‌زاده (۵) در پژوهشی روی لیمو آب شیراز پس از سازگاری به تنش دمای پایین، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را گزارش داشته که در مشابهت این نتایج است.

نتایج مقایسه میانگین داده‌های تاثیر دما بر فعالیت آنزیم سوپراکسایددیسموتاز (جدول۱) نشان می‌دهد که بیشترین و کمترین میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب با میانگین ۵۹/۳۰ و ۳۶/۰۷ واحد آنزیمی در میلی‌گرم وزن‌تر برگ مربوط به تیمارهای دمایی صفر و شاهد بود که مشاهده و ثبت گردید. در توجیه این نتایج می‌توان اینگونه استنباط داشت که تنش دمای پایین با اعمال محدودیت‌هایی در فتوسنتز گیاه موجب تولید رادیکال فعال اکسیژن مانند رادیکال سوپراکساید می‌گردد. این رادیکال به عنوان سیگنال عمل نموده که فعال سازی آنزیم سوپراکسایددیسموتاز را به همراه خواهد داشت. این آنزیم با تبدیل رادیکال سوپراکساید به پراکسیدهیدروژن ضمن خنثی سازی رادیکال سوپراکساید، موجب فعال سازی سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز می‌گردد (۸). در پژوهش مشابه‌ای بر گیاهچه مرکبات تحت تنش یخبندان به افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسایددیسموتاز اشاره شد که تایید کننده نتایج فوق است (۴).

نتایج مقایسه میانگین داده نشان داد که از نظر دما (جدول۱) بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز به ترتیب با میانگین فعالیت ۴/۳۳۸ و ۱/۱۴۱ واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ در دمای صفر و شاهد (۲±۲۵ درجه سانتیگراد) مشاهده شد. در برهمکنش اثر پایه و دما (جدول ۳) بیشترین فعالیت این آنزیم با میزان ۴/۶۲۰ واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ در نهال‌های پیوندی روی پایه پونسیروس در دمای صفر و کمترین مقدار فعالیت با میانگین ۱/۰۰۷ واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ متعلق به گیاهان پیوندی روی پایه نارنج در دمای شاهد بود. در تفسیر نتایج فوق می‌توان اینگونه اذعان داشت که افزایش رادیکال فعال پراکسیدهیدروژن در نمونه‌های تحت تنش به عنوان سیگنال عمل نموده که موجب فعال شدن آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز گردید (۵). این آنزیم با استفاده از سوبسترای آسکوربیک‌اسید رادیکال پراکسیدهیدروژن را متابولیزه و خنثی می‌نماید. آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز علاوه بر متابولیزه نمودن پراکسیدهیدروژن در احیاء آسکوربات نیز تاثیرگذار است (۴). نکته قابل توجه این است که در اثر متقابل بین پایه و دما، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز تا دمای ۳ درجه سانتیگراد تغییر معنی‌داری نداشت که می‌تواند نشان دهنده پایین بودن میزان رادیکال پراکسید-هیدروژن تا تیمار دمای مورد نظر باشد. لکن با کاهش دما در صفر درجه فعالیت این آنزیم در بالاترین سطح قرار گرفت. علی‌رغم کاهش فعالیت در تیمار دمایی ۳- و ۶- درجه، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در تیمار دمایی ذکر شده حدود دو برابر فعالیت آن در دمای بالای صفر درجه بود. در گیاهچه هلو (۱۸) و میوه پرتقال ناولیت (۲۰) تحت تنش دمای پایین، افزایش فعالیت آسکوربات-پراکسیداز گزارش شد که در مشابهت نتایج فوق است.

جدول۳- اثر متقابل دما و پایه در مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز برگ (IU/g FW) نارنگی پیج تحت تنش دمای پایین

	دما						
پایه	۲۵±۲ ˚C	۹ ˚C	٦ ˚C	۳ ˚C	۰ ˚C	-۳ ˚C	-٦ ˚C
نارنج	۱/۰۰۷ f	۱/۰۸۰ f	۱/۲۵۰ f	۱/۶۲۰ f	۴/۱۷۰ ab	۳/۲۹۰ cd	۲/۸۵۰ de
سیترنج	۱/۱۳۷ f	۱/۱۶۰ f	۱/۲۴۷ f	۱/۶۷۰ f	۴/۲۳۳ ab	۳/۴cd	۲/۸۲۳ de
پونسیروس	۱/۲۸۰ f	۱/۳۲۷ f	۱/۴۱۰ f	۱/۵۸۰ f	۴/۶۲۰ a	۳/۶۳۷ bc	۲/۳۶۳ e

در هر ستون و ردیف میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ آزمون توکی اختلاف معنی‌دار ندار ند

بر اساس نتیجه مقایسه میانگین داده‌ها (جدول۱). از نظر دما به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز با میانگین ۰/۵۱۶ و ۰/۳۱۴ واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ مربوط به تیمارهای دمایی ۳- و شاهد بود که ثبت گردید. به ترتیب بیشترین و کمترین میزان فعالیت این آنزیم تحت تاثیر پایه (جدول۲) با میانگین ۰/۴۳۱ و ۰/۳۳۱ واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ مربوط به پایه‌های پونسیروس و نارنج بود. در توجیه نتایج فوق می‌توان اینگونه استنباط داشت که افزایش رادیکال پراکسیدهیدروژن می‌تواند به عنوان سیگنال موجب فعال سازی آنزیم کاتالاز شده تا ساختارهای سلولی مانند پراکسی‌زوم و میتوکندری را از اثرات مخرب تنش اکسیداتیو محافظت نماید. نکته قابل ذکر در مورد آنزیم کاتالاز این است که این آنزیم بر خلاف پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز برای خنثی سازی رادیکال پراکسیدهیدروژن به نیروی احیایی خاصی نیاز ندارد (۸). در پژوهشی روی میوه نارنگی فورچون تحت تنش دمای پایین، افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز گزارش شد که در مشابهت نتایج فوق می‌باشد (۱۹).

مقایسه میانگین داده‌ها (جدول۱) بیانگر آن است که بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به ترتیب با میانگین ۸/۹۴۶ و ۴/۲۳۱ واحد آنزیمی در گرم وزن‌تر برگ در تیمار دمایی ۳- و شاهد مشاهده شد. در تفسیر این نتیجه می‌توان اینگونه استدلال داشت که پراکسیداز اکسیداسیون بین رادیکال پراکسیدهیدروژن و احیا کننده‌ها را کاتالیز می کنند. آنها معمولا از سوبسترای فنلی برای حذف پراکسیدهیدروژن استفاده می‌کنند. به همین دلیل جزء شناساگرهای مفید برای ارزیابی میزان تحمل‌پذیری گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی و اکسیداتیو (تنش ثانویه) محسوب می‌گردند (۱). در پژوهشی روی ذرت تحت تنش سرمایی افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز گزارش شده که تایید کننده نتایج فوق می‌باشد (۱۵).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول۱) بیان‌گر آن است که از نظر نشت یونی بین تیمارهای دمایی شاهد، ۹، ۶، ۳، ۰ و ۳- درجه سانتیگراد تفاوت معنی‌داری نبود. لکن تیمار ۶- درجه با میانگین ۸۰/۲۸ درصد بیشترین نشت یونی را نشان داد. در اثر متقابل دما و پایه (جدول۴)، نارنگی پیج روی هر سه پایه نارنج، سیترنج و پونسیروس در دمای ۶- درجه سانتیگراد، افزایش نشت یونی داشت. بطوریکه در دمای مذکور بیشترین مقدار نشت یونی با میانگین ۸۶/۹۷درصد متعلق به نهال‌های پیوندی روی پایه نارنج و کمترین مقدار نیز به ترتیب با میانگین ۷۸/۱۹ و ۷۵/۶۷ درصد مربوط به نهال‌های پیج روی پایه‌های پونسیروس و سیترنج بود. با توجه به نتایج حاصل می‌توان اینگونه استنباط کرد که تا دمای ۳- درجه سانتیگراد از لحاظ نشت یونی تفاوتی بین تیمارهای دمایی و پایه‌ها مشاهده نشد، بنابراین نهال‌های مسقر در تیمار دمای ۹ تا ۳- درجه سانتیگراد در مرحله بازگشت از تنش، به رشد عادی خود ادامه دادند. لکن نهال‌های تحت تیمار دمایی ۶- درجه سانتیگراد به دلیل نشت یونی بالا (بیش از ۷۰درصد) و فعالیت ضعیف ریشه در جذب و انتقال آب، دچار آسیب‌هایی همچون خشکی و ریزش برگ شدند. در این خصوص گزارش‌های مشابه‌ای در زمینه افزایش نشت یونی برگ در گیاهانی همچون لیمو آب شیراز (۵)، قهوه (۱۱) و زیتون (۹) تحت تنش دمای پایین ارائه شد که تایید کننده نتایج این پژوهش است.

جدول ٤- برهمکنش اثر دما و پایه در میزان نشت یونی (بر حسب درصد) برگ نارنگی پیج تحت تنش دمای پایین

	دما						
پایه	۲۵±۲ ˚C	۹ ˚C	٦ ˚C	۳ ˚C	۰ ˚C	-۳ ˚C	-٦ ˚C
نارنج	۱۰/۸۰ c	۱۰/۶۲ c	۱۲/۷۳ c	۱۱/۲۶ c	۱۱/۲۹ c	۱۳/۱۰ c	۸۶/۹۷ a
سیترنج	۱۱/۶۵ c	۱۲ c	۱۲/۳۴ c	۱۲/۳۷ c	۱۳/۶۹ c	۱۴ c	۷۵/۶۷ b
پونسیروس	۱۱/۲۳ c	۱۱/۳۷ c	۱۲/۵۱ c	۱۱/۶۱ c	۱۲/۵۴ c	۱۳/۴۸ c	۷۸/۱۹ b

در هر ستون و ردیف میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ آزمون توکی اختلاف معنی‌دار ندارند

نتیجه‌گیری

شروع واکنش فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نهال‌های جوان پیچ روی سه پایه از تیمار دمایی ۳ و صفر درجه سانتیگراد بود. حد آستانه تحمل نهال پیچ بر روی سه پایه مورد نظر دمای ۳- درجه سانتیگراد بود که فاقد علائم مورفولوژیک خسارت بودند. لکن در تیمار دمایی ۶- درجه سانتیگراد آسیب تنش و بروز علائم مورفولوژیک خسارت همچون خشکی و ریزش برگ آغاز گردید. رقم پیوندی روی پایه پونسیروس در مقایسه با پایه‌های نارنج و سیترنج، به دمای ۳- درجه سانتیگراد و پایین‌تر تحمل‌پذیری بهتری نشان دادند.

منابع

۱- جعفری ر.، منوچهری کلانتری خ. و احمدی موسوی ع. ۱۳۸۶. اثر پاکلوبوترازول بر تجمع آنتی اکسیدان‌ها در نهالهای گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما. مجله زیست شناسی ایران. ۲۰(۳): ۲۱۶ – ۲۰۶.

۲- رادنیا ح. ۱۳۷۵. پایه‌های درختان میوه. انتشارات نشر آموزش کشاورزی. کرج.

۳- فتوحی قزوینی ر. و فتاحی مقدم ج. ۱۳۸۹. پرورش مرکبات در ایران. انتشارات دانشگاه گیلان. رشت.

۴- گلوانی م. ۱۳۸۸. ارزیابی پروتئین‌های آنتی‌فریز در دو گونه مرکبات کشت شده در شمال ایران. پایان نامه کارشناسی‌ارشد. گروه بیوشیمیایی دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان.

۵- نجف‌زاده م. ۱۳۸۹. مطالعه اثرات پلی‌آمین و کلسیم بر مکزیکن لایم (*Citrus aurantifolia*) تحت تنش دمای پایین. پایان نامه کارشناسی-ارشد. گروه باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان.

6- Abd Ghafar M.F., Prasad K.N., Weng K., and Ismail A. 2010. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. African Journal of Biotechnology, 9(3):326-330.

7- Allen D.J., and Ort D.R. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends In Plant Science, 6(1):36-41.

8- Arora A., Sairam R.K., and Srivastava G.C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science, 82(10):1227-1238.

9- Azzareollo E., Mugnai S., and Pandolfi C. 2009. Comparing image (fractal analysis) and electrochemical (impedance spectroscopy and electrolyte leakage) techniques for the assessment of the freezing tolerance in olive. Trees, 23:159–167.

10- Ballester A.R., Lafuente M.T., and Gonzalez-Candelas L. 2006. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit–*Penicillium digitatum* interaction. Postharvest Biology and Technology, 39:115–124.

11- Campos P.S., Quartin V., Ramalho J.C., and Nunes M.A. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of Coffea sp. Plants. Journal of plant physiolology, 160:283–292.

12- Flexas J., Badger M., Chow W.S., Medrano H., and Osmond C.B. 1999. Analysis of the relative increase in photosynthetic O_2 uptake when photosynthesis in grapevine leaves is nhibited following low night temperatures and/or water stress. Plant Physiology,121:675-684.

13- Food and Agricultural Organization .2009. Faostat, Production. Retrieved January 2010 from http//www.fao.org/Production.

14- Guo Y.H., and Cao K.F. 1999. Effect of night chilling on photosynthesis of two coffee species grown under different irradiances. Horticultural science & biotechnology, 79(5):713-716.

15- Janda A., Szalai G., Tari I., and Paldi E. 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decrease the effect of chilling injury in maize plant. Planta, 208:175-180.

16- Papadakis I.E., Dimassi K.N., Bosabalidis A.M., Therios I.N., Patakas A., and Giannakoula A. 2004. Boron toxicity in 'Clementine' mandarin plants grafted on two rootstocks. Plant Science, 166:539–547.

17- Rivas F., Fornes F., and Agusti M. 2008. Girdling induces oxidative damage and triggers enzymatic and non-enzymatic antioxidative defences in *Citrus* leaves. Environmental and Experimental Botany, 64:256–263.

18- Ruth G. 2002. Oxidative stress and Acclimation Mechanisms in plants. American society of plant biologists, 17:1-20.

19- Sala J.M., and Lafuente M.T. 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. Postharvest Biology and Technology, 20:81–89.

20- Sala J.M., and Lafuente M.T. 2004. Antioxidant enzymes activities and rindstaining in 'Navelina' oranges as affected by storage relative humidity and ethylene conditioning. Postharvest Biology and Technology, 31:277–285.

21- Sheng Wu Q., Zou Y.N., and Xia R.X. 2006. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. European Journal of Soil Biology, 42:166–172.