تأثیر اعمال سریع و تدریجی تنش سرما در پاسخ فیزیولوژیک و سازگاری انگور بی‌دانه سفید

شیماالسادات بهشتی روی*، مهدی قبولی، روح‌الله کریمی
دپارتمان به زراعی و به نژادی، پژوهشکده انگور و کشمش، دانشگاه ملایر
*نویسنده مسئول: shima_beheshti@yahoo.com

چکیده

گیاهان در اثر قرارگیری در معرض تنش دمای پایین ممکن است رفتارهای متفاوتی را از طریق مکانیسم‌های مختلف بروز دهند. در این پژوهش تأثیر گرادیان کاهش دما در پاسخ انگور به سرما مطالعه شده است. طرح آزمایش کاملاً تصادفی بود. پاسخ‌های برگ انگور بی‌دانه سفید در اثر کاهش تدریجی دما (۲ درجه در ساعت) و نیز کاهش سریع سرما (۵ درجه در ساعت) از دمای ۲۴ به ۴ درجه سانتی‌گراد بررسی شده و با تاک‌های شاهد تحت دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد مقایسه گردیده است. بعد از اعمال تنش سرما، نشت یونی، محتوای نسبی آب، پراکسیداسیون لیپیدها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در برگ‌های گیاهان اندازه‌گیری شد. تفاوت قابل توجهی بین نشت یونی و پراکسیداسیون لیپید تحت دو رژیم کاهش دما مشاهده گردید. این شاخص‌ها در تیمار کاهش سریع دما، بزرگ‌تر بودند. می‌توان چنین روندی را به کمتر بودن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت داد. نتایج نشان می‌دهد که در تیمار کاهش تدریجی دما، فعالیت بیشتر آنزیم‌های مقابله کننده با ROS موجب کاهش آسیب‌های ناشی از سرما شده و در نتیجه پراکسیداسیون لیپید در غشاهای زیستی سلولی و نشت محلول‌ها نسبت به حالت کاهش سریع دما، پایین‌تر است.

کلمات کلیدی: **رژیم اعمال تنش، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تنش سرما، محفظه سرمادهی، انگور.**

مقدمه

تنش سرما عموماً موجب تأثیر بر رشد و محصول دهی انگور در مناطق معتدل می‌گردد. بنابراین بهبود مقاومت به سرما یکی از مهم‌ترین اهداف برنامه‌های اصلاحی انگور است. مطالعه گیاهان انگور تحت رژیم‌های متفاوت سرمایی و مشاهده رفتار آن‌ها تحت این شرایط می‌تواند به اصلاح گران برای استفاده از شاخص‌های فیزیولوژیک مرتبط با سرما برای انتخاب ارقام مقاوم به سرما کمک کند. سازگاری به سرما ازآن‌جهت که نقش مهمی در رشد، تولید محصول و قدرت زنده ماندن گیاهان ایفا می‌کند، یک ویژگی مطلوب به‌حساب می‌آید (Thomashow, 1999). در طبیعت گیاهان بخصوص گیاهان چوبی نواحی معتدله نظیر انگور ممکن است در دو زمان یکی در اواخر تابستان و دیگری اواسط پاییز به سرما تطابق یابند. از عوارض ناشی از سرمای ناگهانی پاییز می‌توان به رشد ناقص پریدرم در شاخه‌های یک‌ساله، ریزش غیرطبیعی یا سریع برگ‌ها و تشکیل ضعیف لیگنین و سوبرین در جوانه‌ها اشاره کرد (Karimi & Ershadi. 2015). معمولاً پتانسیل ژنتیکی درختان برای مقابله با سرما حین کاهش سریع دما در مقایسه با اعمال تنش تدریجی به‌طور کامل به فعلیت نمی‌رسد. می‌توان گفت در اثر کاهش تدریجی دما، گیاه فرصت کافی برای ایجاد مجموعه‌ای از تغییرات فیزیولوژیک و مورفولوژیک در اثر قرارگیری در معرض تنش سرما را خواهد داشت (Karimi & Ershadi. 2015). تنش سرما موجب ازدیاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌گردد (Lukatkin et al., 2012; Karimi et al., 2016).

در انگور فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به‌منظور حذف یا کاهش آثار مخرب ROS، افزایش می‌یابد (Lukatkin et al., 2012; Karimi et al., 2016). طبیعت پاسخ‌های تطابقی پیچیده بوده و در میان گونه‌ها و ارقام مختلف بسته به تیمار دمایی، مدت زمان و سرعت (نرخ) قرارگیری در معرض تنش، متفاوت است (Thomashow 1999; Gusta et al., 2005; Ershadi et al., 2015). آثار تنش سرما به شکل گسترده‌ای در گیاهان علفی و چوبی بررسی شده است، اما طراحی آزمایش‌ها عموماً متمرکز بر یک نوع تنش سرما بوده است. تاکنون هیچ مطالعه‌ای به‌صورت همزمان تأثیر دو رژیم سرمایی (سرمادهی سریع و سرمادهی تدریجی) را بررسی نکرده است. در این پژوهش به‌منظور مطالعه آثار دو شکل از رژیم سرمایی بر مقاومت انگور بی‌دانه به تنش سرما یک برنامه آزمایشگاهی اجرا شد؛ به‌طور خاص تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی شامل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپید، محتوای آب و نشت یونی، در برگ‌های انگور تحت اعمال تنش تدریجی و سریع سرما بررسی شد.

مواد و روش‌ها

قلمه‌های یک‌ساله انگور بی‌دانه سفید در گلدان‌های پلاستیکی ۶ لیتری در گلخانه به مدت ۴ ماه رشد داده شدند. طرح آزمایش کاملاً تصادفی با سه تکرار بود. یک هفته قبل از اعمال تنش، نهال‌ها به محفظه‌ای با دمای ۲۴ ^{o}C منتقل شدند. سپس گلدان‌های انگور با استفاده از یک محفظه سرمادهی قابل برنامه‌ریزی در معرض تنش سرما قرار گرفتند. سرمادهی به دو روش متفاوت کاهش تدریجی دما (۲ $^{o}C/hr$) و کاهش سریع دما (۵ $^{o}C/hr$) از ۲۴ ^{o}C به ۴ ^{o}C انجام شد و ۱۲ ساعت دمای ۴ ^{o}C در هر دو حالت حفظ شد (Karimi and Ershadi 2015). برای اندازه‌گیری تغییرات شاخص‌های مورد نظر در برگ‌های ارقام انگور، نمونه‌هایی از برگ‌های کاملاً رشد یافته از هر بوته انگور گرفته شد و قبل از قرارگیری در دمای ۸۰- ^{o}C در نیتروژن مایع منجمد گردید.

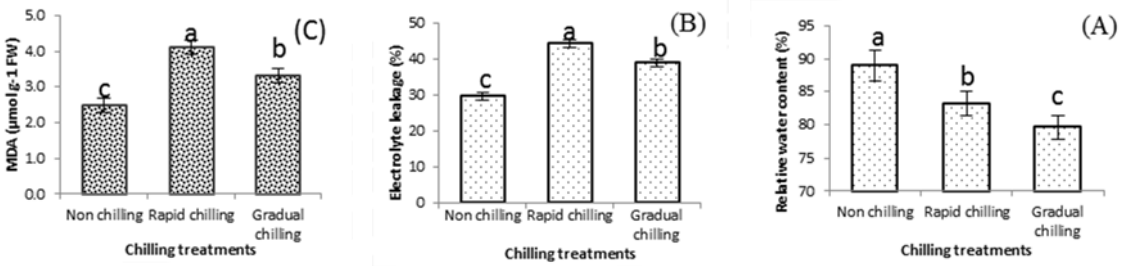
محتوی نسبی آب (مطابق با روش Kirnak et al., 2001) اندازه‌گیری شد. پراکسیداسیون لیپید در قالب غلظت مالون دی آلدهید (MDA) اندازه‌گیری شد(Heath & Packer, 1968). فعالیت کاتالاز با اندازه‌گیری کاهش جذب H_2O_2در طول موج ۲۴۰nm تعیین گردید(Bergmeyer, 1970). فعالیت پراکسیداز پس از اکسیداسیون گایاکول به‌وسیله H_2O_2 در طول موج ۴۷۰nm اندازه‌گیری شد.(Herzog and Fahimi, 1973) . فعالیت آسکوربات پراکسیداز به‌وسیله اندازه‌گیری میزان کاهش جذب در طول موج ۲۹۰nm، یک دقیقه پس از اکسیداسیون آسکوربات تعیین شد(Nakano and Asada, 1981). فعالیت ویژه هر آنزیم آنتی‌اکسیدانی در واحد میلی‌گرم پروتئین بیان شد. داده‌ها تجزیه واریانس گردید و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

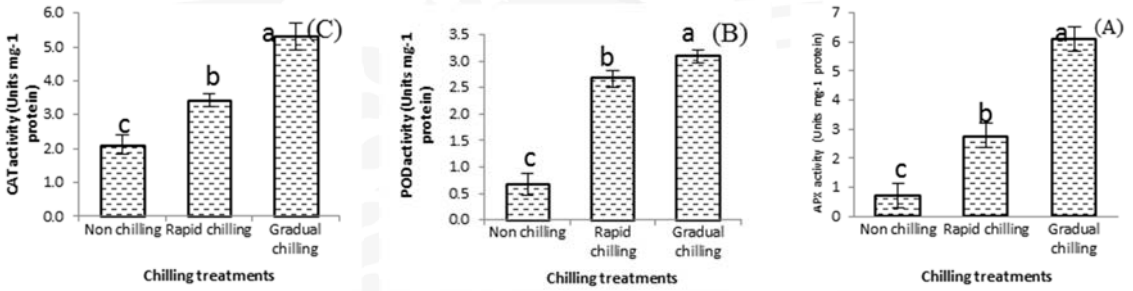
افزایش قابل ملاحظه‌ای در درصد نشت یونی ($P\leq$۰/۰۰۱) در اثر تنش سرما مشاهده گردید. اما میزان نشت یونی تاک‌هایی که تدریجی سرما دیده بودند، کمتر از گیاهانی بود که به‌صورت سریع با سرما مواجه شده بودند (شکل ۱). تیمار سرما تأثیر معنی‌داری بر محتوی آب نسبی برگ‌های انگور داشت (شکل ۱)؛ محتوی آب نسبی در گیاهانی که در معرض تیمار سرمای تدریجی قرار گرفته بودند، کمتر از گیاهان در معرض تیمار سرمای سریع و شاهد بود. افزایش غلظت‌های MDA در برگ، به‌عنوان نشانگر زیستی تنش اکسیداتیو به شکل قابل توجهی در اثر اعمال تنش سرما مشاهده شد. MDA در گیاهانی که با مکانیسم تدریجی سرما دیده بودند، کمتر از تیمار اعمال سریع سرما بود(شکل ۱). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تیمار سرمای تدریجی و سریع ۲ تا ۳ برابر نسبت به تاک‌های شاهد سرما ندیده، افزایش یافت(شکل ۲). فعالیت آنزیم‌های مذکور در گیاهان قرار گرفته در معرض تنش تدریجی بیشتر از گیاهانی بود که در معرض اعمال تنش سریع قرار گرفته بودند (شکل ۲).

عقیده بر این است که سیستم آنتی‌اکسیدانی نقش حساسی در تنش سرما دارند. آنزیم‌های مهم مقابله کننده با ROS در گیاهان اولین سیستم دفاعی علیه اثرات مخرب تنش سرما هستند. در پژوهش حاضر سیستم آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدانی برگ‌های سرما دیده فعالیت بیشتری در تاک‌های تیمار شده با سرمای تدریجی در قیاس با تاک‌های تیمار شده با تنش سریع نشان داد. این یافته کمتر بودن نشت یونی محلول‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها را در تاک‌های قرار گرفته در معرض تنش تدریجی و هم‌چنین نتایج دیگر تحقیقات مرتبط را تأیید می‌کند (Karimi et al. 2016). به‌عبارت‌دیگر بیشتر بودن فعالیت آنزیم‌های مقابله کننده با ROS در تاک‌های قرار گرفته در معرض تنش سرمای تدریجی را می‌توان با توجه به پایداری غشاهای زیستی تشریح کرد.



شکل ۱- تأثیر کاهش تدریجی و سریع دما بر محتوای آب (A) نشت یونی (B) و غلظت مالون دی آلدهید (C)



شکل ۲- تأثیر کاهش تدریجی و سریع دما بر آسکوربات پراکسیداز (A) پراکسیداز(B) و کاتالاز (C)

منابع

Bergmeyer, N. 1970. Methoden der Enzymatischen Analyse. Volume 1. AkademieVerlag, Berlin, Germany. 636–647.

Ershadi, A., Karimi, R. and Mahdei, K.N., 2016. Freezing tolerance and its relationship with soluble carbohydrates, proline and water content in 12 grapevine cultivars. Acta Physiol. Plant. 38, 1-10.

Gusta LV, Trischuk R, Weiser CJ, 2005. Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. J. Plant Growth Regulat. 24: 308-318.

Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photo-peroxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189- 198.

Herzog, V., Fahimi, H.D. 1973. Determination of the activity of peroxidase. Anal. Biochem. 55, 554–562.

Karimi R, Ershadi A , 2015. Role of exogenous abscisic acid in adapting of 'Sultana' grapevine to low temperature stress. Acta Physiol Plant 37: 15.

Karimi R, Ershadi A, Rezaeinezhad A, Khanizadeh S, 2016. Abscisic acid alleviates the deleterious effects of cold stress on 'Sultana' grapevine (Vitis vinifera L.) plants by improving the anti-oxidant activity and photosynthetic capacity of leaves. J Hortic Sci Biotechnol. Doi:10.1080/14620316.2016.1162027

Karimi, R. 2017. Potassium-induced freezing tolerance is associated with endogenous abscisic acid, polyamines and soluble sugars changes in grapevine. Sci. Hort. 215, 184-194.

Kirnak H, Kaya C, Tas I, Higgs D, 2001. The influence of water deficit on vegetative growth, physiology, fruit yield and quality in egg plants. Plant Physiol 27: 34-46.

Lukatkin A S, 2002. Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. The activity of antioxidant enzymes during plant chilling. Russ J Plant Physio. 49: 782–788.

Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22, 867–880.

Thomashow MF, 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50:571–599.

Velikova, V., Loreto, F., 2005. The relationship between isoprene emission and thermo-tolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery fr1qom a heat stress. Plant Cell Environ. 28, 318–327.

The Effect of Gradual and Shock Chilling Stress on Physiological Response and Cold Acclimation of Bidaneh-Sefid Grapevine

Shima Sadat Beheshti Rooy*, Mehdi Ghabooli, Rouhollah Karimi
Grapevine Production and Genetic Improvement Department, Iranian Grape and Raisin Institute, Malayer University
*Corresponding Author: shima_beheshti@yahoo.com

Abstract

Plants may show different behaviors during exposure to low temperature stress through various mechanisms. In this study, the chilling responses of 'Bidaneh Sefid' grapevine was investigated during a gradual chilling (2°C/h) and also during a shock chilling (5°C/h) from 24°C to 4°C. The experimental design was completely randomized. After artificial chilling stress, electrolyte leakage, lipid peroxidation, relative water content and antioxidant enzyme activities were measured in plants leaves. Based on the results, a significant difference was found between electrolyte leakage and lipid peroxidation of plants under two chilling regimes. These indices were found to be higher in shock chilling stressed plants compared to gradual chilling stressed vines. This trend can be attributed to the lower catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase activities in shock chilling treatment. The results show that higher activity of ROS enzymes in gradual cold treated plants, decrease the chilling injury by lower cell biomembranes lipid peroxidation and solute leakage than those of rapid chilling treated vines.

Keywords: Antioxidant activity, Grapevine, Cold stress, Cooling chamber, Cold treatment regime.