

مطالعه مقاومت به دمای انجماد توت آمریکایی (*Maclura pomifera*) با هدف کاربری در فضای سبز شهری

روح انگیز نادری^{۱*}، علی رضا خالقی^۲، مصباح بالار^۳ و سیدعلی رضا سلامی^۴

۱، ۳ و ۴. استادان و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۲. دانشجوی سابق دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج و استادیار، دانشگاه اراک

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۵/۴)

چکیده

دما و به‌ویژه یخبندان‌های دیر هنگام از فاکتورهای مهم محیطی محدودکننده پراکنش جغرافیای گیاهان چوبی است. مطالعه‌ای درباره میزان مقاومت به تنش یخ‌زدگی گیاهان چهارساله و درختان بالغ توت آمریکایی با هدف کاربری در فضای سبز شهری در دانشگاه تهران به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نمونه‌برداری از شاخه‌های یک‌ساله با رشد یکسان از پانزدهم آذر تا پانزدهم اسفند با فاصله زمانی سی روز یکبار انجام شد. نمونه‌ها برای اعمال دماهای انجماد (۵-، ۱۰-، ۱۵-، ۲۰-، ۲۵- و ۳۰- درجه سانتی‌گراد) به سرماساز ترموگرادیان منتقل شدند؛ سپس میزان مقاومت به دماهای انجماد با اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها، رشد مجدد نمونه‌ها، رطوبت نسبی شاخه‌ها، میزان پرولین، پروتئین و کربوهیدرات‌های محلول ارزیابی شد. نتایج نشان داد با کاهش دمای یخ‌زدگی، نشت الکترولیت‌ها در اسفندماه در نمونه‌های درختان بالغ و چهارساله به‌طور معناداری افزایش می‌یابد، اما در سایر ماه‌ها مقاومت بالایی نشان دادند و بین درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقای نمونه‌ها همبستگی معناداری ($r = -0.88^{**}$) مشاهده شد. بیشترین و کمترین کربوهیدرات‌های محلول در ماه‌های مختلف به ترتیب مربوط به ماه‌های آذر و اسفند بود و همبستگی منفی بالایی با درصد نشت الکترولیت‌ها ($r = -0.98^{**}$) داشت. حداقل محتوای پرولین شاخه‌ها نیز مربوط به ماه اسفند بود که بیشترین نشت یونی و کمترین رشد مجدد در نمونه‌ها مشاهده شد. با توجه به اینکه خسارت عمده یخ‌زدگی در این گونه مربوط به ماه اسفند و دماهای کمتر از ۲۰- درجه سانتی‌گراد است، به نظر می‌رسد درخت توت آمریکایی نسبت به دماهای انجماد مقاوم و یا به نسبت مقاوم است.

واژه‌های کلیدی: پرولین، تنش یخ‌زدگی، رشد مجدد، کربوهیدرات‌های محلول، نشت الکترولیت.

مقدمه

سبز شهری به‌شمار می‌آید (USDA Forest Service, 2012). با وجود این در حال حاضر این درخت در فضای سبز شهری ایران جایگاهی ندارد. از سویی دما مهم‌ترین فاکتور محیطی محدودکننده در پراکنش جغرافیایی گیاهان چوبی است (Grace, 1987). یکی از نتایج گرم‌شدن کره زمین در دهه‌های اخیر، گرم‌شدن هوا در ماه‌های زمستان است؛ و از سویی مدل‌های

توت آمریکایی با نام علمی *Maclura pomifera* از خانواده Moraceae و بومی آمریکای مرکزی است. این درخت مقاوم به آفات و بیماری‌ها، گرما و کم‌آبی، وزش بادهای تند و آلودگی هواست و می‌تواند در هر نوع خاکی از جمله خاک‌های آهکی رشد کند، که با داشتن این ویژگی‌ها، گیاهی ارزشمند برای کشت در فضای

وجود دارد (Xavier et al., 2007)؛ آن‌ها عنوان کردند که بیشترین مقاومت به سرما بستگی به غلظت کربوهیدرات‌های کل دارد. با بررسی تغییرات الگوی فصلی پروتئین‌های وابسته به شوک دمایی از جمله دهیدرین‌ها در هشت گونه چوبی، نشان داده شد که همبستگی بالایی بین تنش‌های دمایی و مقادیر دهیدرین‌ها وجود دارد (Wisniewski et al., 1996). همچنین گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد محتوای پرولین بعد از تطابق به سرما در گیاهان افزایش می‌یابد (Cook et al., 2004).

مقاومت به از دست دادن سازگاری (Deacclimation resistance) نیز نقش مهمی در تعیین مقاومت گیاه در اواخر زمستان و اوایل بهار دارد (Arora et al., 2003). نشان داده شده است که از دست دادن سازگاری، سریع‌تر از زمان لازم برای سازگاری رخ می‌دهد. برگ‌های *Solanum commersonii* مقاوم‌شده به سرما در مواجهه با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در مدت ۲ تا ۳ ساعت، مقاومت خود را به سرما از دست دادند (Chen & Li, 1980). با توجه به ویژگی‌های مطلوب توت آمریکایی برای کشت در فضای سبز شهری و با دانستن این موضوع که تنش سرما از عوامل محدودکننده در انتخاب و کشت گیاهان زینتی است. در این پژوهش سعی شد با نمونه‌برداری از نهال‌های چهارساله و درختان بالغ توت آمریکایی طی ماه‌های آذر تا اسفند و اعمال دماهای انجماد و اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با مقاومت به سرما، میزان مقاومت به سرمای این گونه گیاهی ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای ارزیابی میزان مقاومت به یخزدگی درخت توت آمریکایی، در اواسط ماه‌های آذر، دی، بهمن و اسفند، نمونه‌های شاخه به قطر تقریبی ۱۰ میلی‌متر با رشد یکسان از بخش میانی شاخه‌های یک‌ساله گیاهان چهارساله و درختان بالغ توت آمریکایی در سال ۱۳۹۱ به ترتیب از نهالستان و باغ گیاه‌شناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انتخاب و

چرخش عمومی (Circulation Models General) نشان می‌دهد که با وجود افزایش دمای کره زمین، وقوع تعداد یخبندان‌ها کاملاً ثابت باقی مانده است (IPCC, 2007). بنابراین، احتمال آسیب یخبندان‌های دیرنگام پس از شروع نمو گیاه، افزایش یافته است (Xavier et al., 2007). از جمله این آسیب‌ها می‌توان به سرمای اسفند ماه سال ۱۳۸۶ هجری شمسی اشاره کرد که بسیاری از درختان و درختچه‌های زینتی استان البرز خسارت دیدند (مشاهدات نگارنده).

خسارت اصلی دماهای زیر صفر ناشی از تشکیل یخ درون سلولی است و واضح است که غشاها، مکان‌های اصلی سلول هستند که تحت تنش یخ‌زدگی، آسیب می‌بینند. مؤثرترین روش برای غلبه بر این خسارت، استفاده از گونه‌های گیاهی مقاوم به سرماست (Barranco & Ruiz, 2005). آزمون‌های ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی گیاهان به‌طور عمده در شرایط کنترل‌شده انجام می‌شود و درصد بقای گیاه پس از قرارگرفتن در معرض دماهای انجماد به‌منزله یکی از شاخص‌های مقاومت به یخ‌زدگی معرفی شده است. از دیگر روش‌ها، اندازه‌گیری نشت یونی از سلول‌های گیاهی پس از اعمال تنش یخ‌زدگی است (Nezami & Naghedi Nia, 2011). نشان داده شده است که با استفاده از آزمون نشت یونی می‌توان از بین ۱۲ رقم زیتون، ارقام مقاوم و حساس به سرما را تفکیک کرد (Bartolozzi & Fontanazza, 1999)؛ آن‌ها نشان دادند که مشاهدات میدانی تطابق خوبی با نتایج آزمون نشت یونی دارد.

مطالعات نشان داده است که مقدار پروتئین کل و کربوهیدرات‌های محلول همبستگی بالایی با مقاومت به یخ‌زدگی دارند (Fotouhi Ghazvini et al., 2012). در صنوبر (*Populus tremuloides*) قندهای درونی از جمله استاکیوز و رافینوز با کاهش دما در اوایل زمستان، افزایش و با افزایش دما در بهار، کاهش یافتند (Cox & Stushnoff, 2001). با بررسی همبستگی بین تغییر در مقاومت به سرما و غلظت کربوهیدرات‌ها از زمان القای رکود تا شکوفایی جوانه‌ها در دو جمعیت خزان‌کننده و یک جمعیت همیشه‌سبز بلوط نشان داده شد که همبستگی نزدیکی بین غلظت کربوهیدرات‌های محلول و مقاومت به سرمای تخمین زده‌شده با نشت یونی پیدا

برای تعیین درصد بقا و رشد مجدد، نمونه‌های گیاهی پس از خروج از دستگاه سرماساز، درون گلدان‌های حاوی ماسه و پرلیت با نسبت حجمی ۳۰:۷۰ کشت شدند و به مدت ۲ ماه در گلخانه با دمای متوسط روزانه ۲۴ و شبانه ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از این مدت زمان از طریق رابطه زیر درصد رشد مجدد هر یک از نمونه‌ها محاسبه شد (Barka & Audran, 1997).

= درصد رشد مجدد

(جوانه‌های رشد کرده/تعداد کل جوانه‌های روی شاخه‌ها)×۱۰۰

همچنین شاخص‌های درصد آب نسبی شاخه‌ها و کربوهیدرات‌های محلول، محتوای پرولین و پروتئین جوانه‌های برگ نمونه‌های جمع‌آوری شده در هر ماه ارزیابی شد. درصد آب نسبی شاخه‌ها از رابطه زیر محاسبه شد. بدین منظور وزن خشک نمونه‌ها با خشک کردن شاخه‌ها در خشک‌کن با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت به دست آمد.

= درصد آب نسبی شاخه‌ها

۱۰۰×وزن تر / (وزن خشک-وزن تر)

در ضمن محتوای پرولین با استفاده از روش Bates (1973) *et al.*، پروتئین کل به روش Bradford (1976) و کربوهیدرات‌های محلول از طریق روش فنل-اسید سولفوریک Kochert (1978) اندازه‌گیری شدند.

تجزیه آماری

آزمایش‌های مربوط به ارزیابی نشت یونی و رشد مجدد به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار که در آن زمان نمونه‌گیری در هر ماه و تنش‌های دمایی اعمال شده است فاکتورهای آزموده شده بودند و آزمایش‌های مربوط به اندازه‌گیری درصد آب نسبی شاخه‌ها، مقدار پرولین، پروتئین و کربوهیدرات‌های کل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1.3 و مقایسه میانگین‌ها برای تجزیه همبستگی از روش پیرسون و با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19.0 انجام شد.

بلافاصله به سردخانه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. فاصله کشت درختان توت آمریکایی در نهالستان در بخش کلکسیون آموزشی ۷ متر بین ردیف‌ها و ۴ متر بین درختان بود.

اعمال تنش یخ‌زدگی

تیمارهای سرمایی آزموده شده شامل دماهای ۵-، ۱۰-، ۱۵-، ۲۰-، ۲۵- و ۳۰- درجه سانتی‌گراد بود. در هر ماه پس از جمع‌آوری شاخه‌ها، بخش میانی شاخه‌ها در قطعات ۱۵ سانتی‌متری آماده شدند و پس از بسته‌بندی در کیسه فریزر به منظور جلوگیری از کاهش رطوبت شاخه‌ها، درون دستگاه سرماساز قرار گرفتند. روند کاهش دمای دستگاه سرماساز ۲ درجه سانتی‌گراد بر ساعت بود و پس از رسیدن به هر یک از تیمارهای دمایی مورد نظر نمونه‌ها به مدت دو ساعت در آن دما نگهداری شدند. سپس دمای دستگاه سرماساز با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد در ساعت تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد (Yamori *et al.*, 2005). لازم به یادآوری است که در این مرحله از آزمایش، بخشی از نمونه‌های جمع‌آوری شده در هر ماه، به منظور بررسی میزان پرولین، کربوهیدرات‌ها و پروتئین کل جوانه‌های برگ، بلافاصله پس از خنک کردن در نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

ارزیابی شاخص‌های مورد نظر

برای اندازه‌گیری درصد نشت الکترولیت‌ها، ابتدا شاخه‌ها به قطعات کوچک‌تر حاوی یک جوانه‌برگ تقسیم و درون فالكون‌های حاوی ۲۰ سی‌سی آب مقطر دوبار تقطیر منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر با ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از سپری شدن این مدت هدایت الکتریکی اولیه (EC_1) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها (EC_2)، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از سرد شدن نمونه‌ها، هدایت الکتریکی کل اندازه‌گیری شد و درصد نشت الکترولیت‌ها از معادله زیر محاسبه شد (Sekozawa *et al.*, 2003).

$EL (\%) = (EC_1/EC_2) \times 100$

نتایج و بحث

از این دو گروه درخت با یکدیگر مقایسه نشدند و به صورت جداگانه آنالیز و بررسی شدند. نتایج نشان داد که درصد نشت الکترولیت‌ها و رشد مجدد نمونه‌ها در ماه‌های مختلف و نیز در تیمارهای دمایی مختلف و اثر متقابل آن‌ها در نهال‌های چهارساله و درختان بالغ در سطح ۱ درصد معنادار است (جدول ۱).

با توجه به اینکه شرایط رشد گیاهان چهارساله (در نهالستان خارج از شهر با فضای باز و نسبتاً خشک) و درختان بالغ توت آمریکایی (در باغ گیاه‌شناسی دانشکده با محیطی به نسبت مرطوب به دلیل آبیاری بارانی باغ یادشده) با یکدیگر متفاوت بود نتایج حاصل

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر زمان نمونه‌گیری و دماهای انجماد بر صفات بررسی شده در نهال‌های چهارساله توت آمریکایی

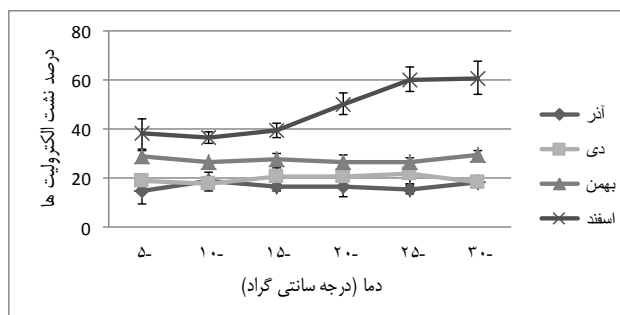
منابع تغییرات	درجه آزادی	نشت الکترولیت در نهال‌های چهارساله	نشت الکترولیت در گیاهان بالغ	رشد مجدد نمونه‌های نهال‌های چهارساله	رشد مجدد نمونه‌های گیاهان بالغ
زمان	۳	۳۳۰/۱۵**	۱۶۰/۰۶**	۹۳/۹۸**	۲۶/۹۳**
دما	۵	۱۰/۵۱**	۲۰/۷۱**	۴۴/۶۶**	۱۴۷/۵۷**
زمان × دما	۱۵	۸/۹۴**	۴/۱۱**	۲۷/۳۷**	۲۸/۹۲**
خطای آزمایش	۴۸	۱۴/۱۳	۲۹/۷۶	۶۲/۱۱	۶۸/۰۰
ضریب تغییرات		۱۳/۵۱	۱۷/۰۹	۹/۵۳	۱۵/۹۱

** معنادار در سطح ۱ درصد.

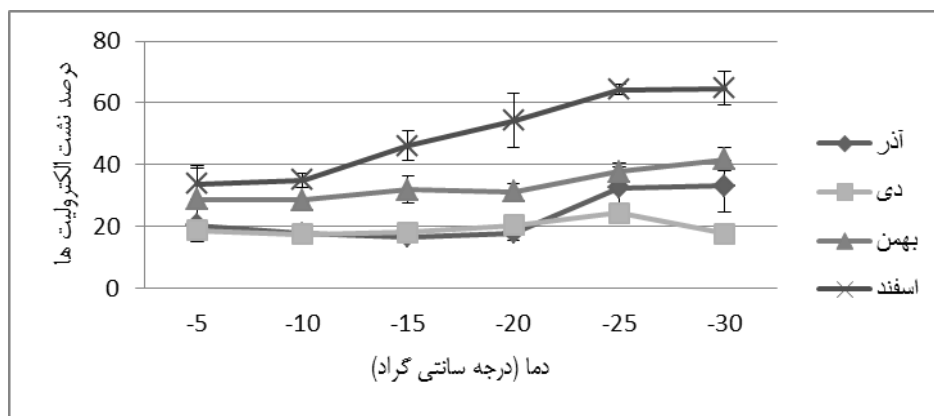
۲۰۱۱). افزایش نشت الکترولیت‌ها به‌ویژه در ماه اسفند نشان می‌دهد که علاوه بر تغییر وضعیت غشا از حالت کریستال-مایع به حالت جامد-ژل، یکپارچگی غشاهای سلولی نیز تحت تأثیر دماهای یخ‌زدگی مختل شده و نشت مواد به خارج سلول افزایش یافته است (Baek & Skinner, 2003).

با بررسی تحمل به یخ‌زدگی ۸ رقم زیتون نتیجه گرفته شد که میزان نشت الکترولیت‌ها بر اثر اعمال هرچه بیشتر سرما تا ۲۲- درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد (Barranco & Ruiz, 2005). همچنین براساس میزان نشت الکترولیت‌ها در محدوده دمایی صفر تا ۲۲- درجه سانتی‌گراد آستانه تحمل ۱۰ رقم زیتون تعیین شده است (Gomez-del-Campo & Barranco 2005).

بررسی میانگین داده‌ها نشان داد که کمینه و بیشینه درصد نشت الکترولیت‌ها در نهال‌های چهارساله به ترتیب مربوط به نمونه‌های تهیه شده در ماه آذر و اسفند با تیمار سرمایی ۵- و ۳۰- درجه سانتی‌گراد و میانگین ۱۴/۷۴ و ۶۰/۹۲ درصد بودند (شکل ۱). در درختان بالغ نیز بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها مربوط به تیمار دمایی ۳۰- درجه سانتی‌گراد در ماه اسفند و با میانگین ۶۴/۷۳ درصد بود (شکل ۲). افزایش شیب نشت الکترولیت‌ها تقریباً از دمایی ۱۵- درجه سانتی‌گراد در ماه اسفند شروع شد و با کاهش دما افزایش پیدا کرد و در دمایی ۲۵- به بیشترین حد رسید. تفاوت در شیب منحنی نشت الکترولیت‌ها یکی از نشانه‌های مهم شدت خسارت ناشی از تنش سرماست (Nezami & Naghedhi Nia, 2011).



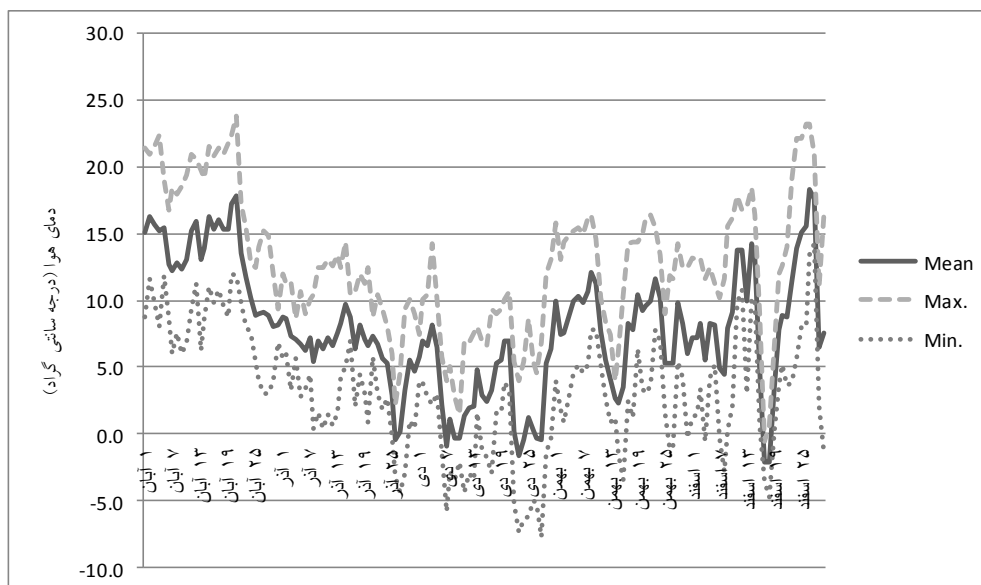
شکل ۱. میانگین درصد نشت الکترولیت‌ها از شاخه‌های گیاهان چهارساله توت آمریکایی تحت تأثیر دماهای یخ‌زدگی در شرایط کنترل شده و در ماه‌های مختلف سال



شکل ۲. میانگین درصد نشت الکترولیت‌ها از شاخه‌های گیاهان بالغ توت آمریکایی تحت تأثیر دماهای یخ‌زدگی در شرایط کنترل شده و در ماه‌های مختلف سال

(Naghedi Nia, 2011). بنابراین، پایین بودن میزان نشت الکترولیت‌ها در ماه‌های آبان تا بهمن نشان‌دهنده تحمل مناسب توت آمریکایی به تنش یخ‌زدگی طی این ماه‌ها نسبت به ماه اسفند است. افزایش شدت خسارت در ماه اسفند ممکن است به دلیل از دست دادن سازگاری ناشی از افزایش دمای محیط باشد (شکل ۳).

تأثیر تنش سرما بر اختلال فعالیت غشاهای سلولی و به دنبال آن نشت الکترولیت‌ها بسته به تحمل به یخ‌زدگی ارقام مختلف گیاهی متفاوت است، بنابراین، اندازه‌گیری میزان نشت از بافت‌ها یا اندام‌های گیاهی تحت تنش سرما معیار مناسبی برای ارزیابی مقاومت گیاهان به تنش سرما ذکر شده است (Nezami &



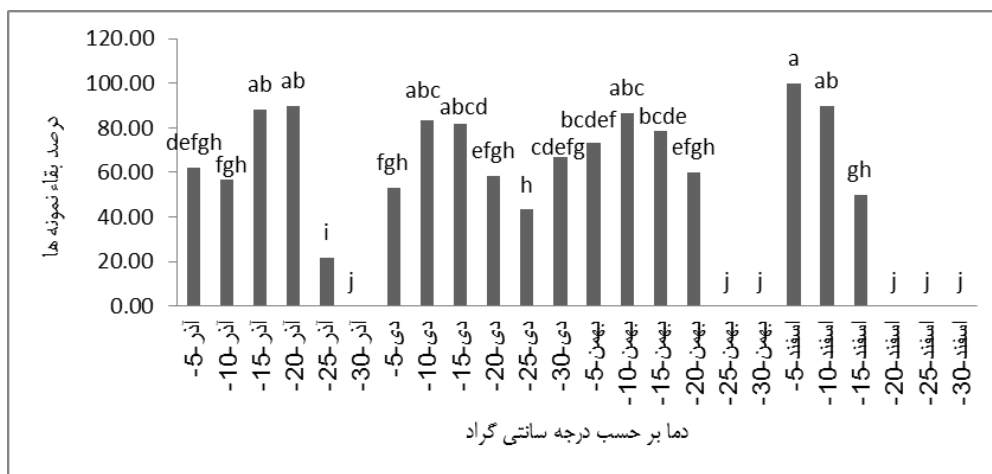
شکل ۳. بیشینه، کمینه و میانگین دمای هوای ماه‌های آبان تا اسفند استان البرز در سال ۱۳۹۱

۵ مشخص است بیشترین میزان خسارت مربوط به ماه اسفند و دماهای پایین‌تر از -20 درجه سانتی‌گراد است که در این دماها رشد مجدد به شدت کاهش یافت و یا هیچ‌گونه رشد مجددی مشاهده نشد. این نتایج مطابق با نتایج Bartolozzi & Fontanazza (1999) است.

نتایج حاصل از درصد رشد مجدد شاخه‌های گیاهان چهارساله و درختان بالغ توت آمریکایی همبستگی منفی بالایی ($r = -0/88^{**}$) در گیاهان چهارساله و ($r = -0/63^{**}$) در درختان بالغ) با نتایج آزمون نشت الکترولیت‌ها نشان داد. همان‌طور که در شکل‌های ۴ و



شکل ۴. میانگین درصد رشد مجدد شاخه‌های نهال‌های چهارساله توت آمریکایی پس از قرار گرفتن در دماهای یخ‌زدگی طی ماه‌های مختلف سال



شکل ۵. میانگین درصد رشد مجدد شاخه‌های درختان بالغ توت آمریکایی پس از قرار گرفتن در دماهای یخ‌زدگی طی ماه‌های مختلف سال

در بسیاری از گونه‌های گیاهی پرولین از اسمولیت‌های مهم ارگانیک در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله سرماست. پرولین علاوه بر تنظیم پتانسیل اسمزی سلول، تأثیرات مثبتی در حفظ یکپارچگی آنزیم‌ها و دیواره سلولی دارد (Ashraf & Foolad, 2007). با جلوگیری از بیان ژن‌های دخیل در تخریب پرولین در آرابیدوپسیس نشان داده شده است که تجمع پرولین در سلول سبب افزایش مقاومت به یخ‌زدگی و شوری می‌شود (Nanjo *et al.*, 1999). بسیاری از مطالعات نشان داده است که آمینو اسید پرولین نقش بسزایی در تحمل به تنش‌های محیطی از جمله تنش یخ‌زدگی در گیاهان بازی می‌کند (Ashraf & Foolad, 2007).

از شاخص‌های فیزیوشیمیایی، مقدار کربوهیدرات‌های محلول و پرولین در گیاهان چهارساله و نیز درختان بالغ توت آمریکایی در سطح یک درصد معنادار شدند و درصد آب نسبی تنها در درختان بالغ در سطح ۱ درصد معنادار بود (جدول‌های ۲ و ۳).

حداقل محتوای پرولین شاخه‌ها مربوط به ماه اسفند است که بیشترین نشت یونی و حداقل رشد مجدد در نمونه‌ها مشاهده شد (شکل‌های ۶ و ۷). از اواسط اسفندماه و با از دست دادن سازگاری میزان پرولین کاهش یافت. این نتایج نشان‌دهنده این است که افزایش پرولین طی سازگاری به دماهای انجماد و طی ماه‌های سرد سال از سازوکارهای مقاومت به دماهای انجماد در این گونه است.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر زمان نمونه‌گیری بر صفات بررسی شده در نهال‌های چهارساله توت آمریکایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	کربوهیدرات‌های محلول	پرولین	پروتئین	درصد آب نسبی
زمان	۳	۴۵۷۹/۶۲**	۹۸/۸**	۰/۰۷۴ ^{ns}	۹۹/۸۶**
خطای آزمایش	۸	۴۱/۰۰	۶/۱۷	۰/۱۰	۷/۰۹۹
ضریب تغییرات		۵/۷۱	۷/۰۲	۱۷/۵۶	۱۴/۱۴

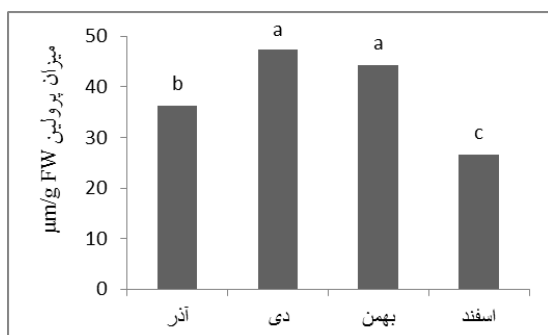
** معنادار در سطح ۱ درصد، ns = عدم معنادار

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر زمان نمونه‌گیری بر صفات بررسی شده در گیاهان بالغ توت آمریکایی

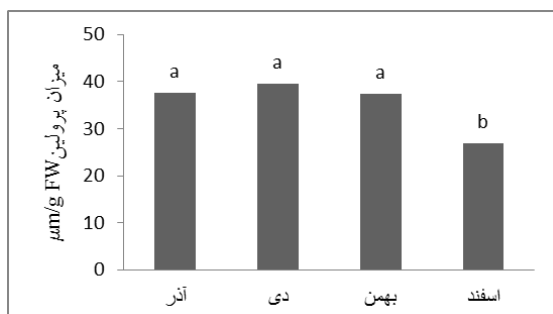
منابع تغییرات	درجه آزادی	کربوهیدرات‌های محلول	پرولین	پروتئین	درصد آب نسبی
زمان	۳	۴۵۷۹/۶۲**	۹۸/۸**	۰/۰۷۴ ^{ns}	۹۹/۸۶**
خطای آزمایش	۸	۴۱/۰۰	۶/۱۷	۰/۱۰	۷/۰۹۹
ضریب تغییرات		۵/۷۱	۷/۰۲	۱۷/۵۶	۱۴/۱۴

** معنادار در سطح ۱ درصد، ns = عدم معنادار.

درصد آب نسبی شاخه‌ها در اسفندماه خیلی محسوس نیست. اما در نهال‌های چهارساله (شکل ۹) تغییرات درصد آب نسبی نمونه‌ها روند مشخص و ثابتی نداشت و به‌طور کلی، تغییرات معنادار نبود و بررسی میزان آب نسبی شاخه‌ها در ماه‌های قبل از آذر و همچنین در اواخر اسفند و اوایل بهار ضرورت دارد.



شکل ۶. میزان پرولین شاخه‌های نهال‌های چهارساله توت آمریکایی در ماه‌های مختلف سال

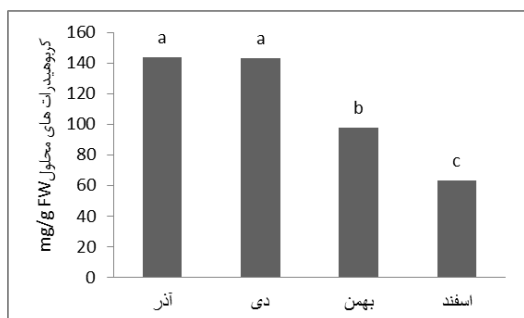


شکل ۷. میزان پرولین شاخه‌های درختان بالغ توت آمریکایی در ماه‌های مختلف سال

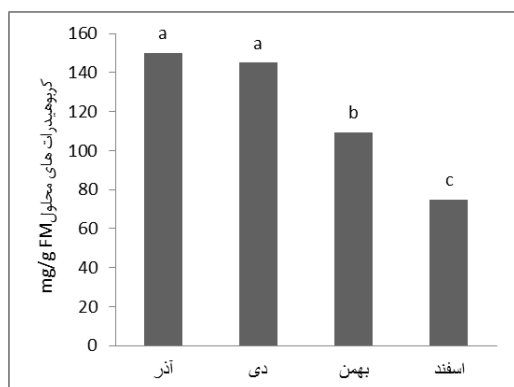
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در محتوای پروتئین، بین ماه‌های مختلف معناداری وجود ندارد که مغایر با نتایج Arora et al. (1992) است. باین‌حال پیشنهاد شده است به جای پروتئین کل، پروتئین‌های ویژه‌ای که LEA-Protein (Wolkers et al., 2001) نامیده می‌شوند از جمله دهیدرین‌ها (Palonen, 1999)، در مقاومت به تنش‌ها از جمله دماهای انجماد نقش داشته باشند. گروهی دیگر از پروتئین‌ها که در واکنش به دمای پایین تحریک می‌شوند، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز هستند که مسئول جذب گونه‌های اکسیژن فعال تولیدشده در واکنش به تنش سرما هستند (Fotouhi Ghazvini et al., 2012). به نظر می‌رسد برای درک بهتر نقش پروتئین‌ها در واکنش به تنش سرما در این گیاه، نیاز به اندازه‌گیری اجزای تشکیل‌دهنده پروتئین‌های تشکیل‌دهنده سلول به جای پروتئین کل باشد.

محتوای آب نسبی شاخه‌ها با برخی نتایج پژوهش‌های قبلی به‌ویژه در گیاهان چهارساله مغایرت داشت. به نظر می‌رسد از دست دادن سازگاری با افزایش محتوای آب جوانه‌ها و ساقه (Sakai & Larcher, 1987) همراه است. اما همان‌طور که در شکل ۸ مشخص است نتایج حاصل از درختان بالغ توت آمریکایی تا حدودی با نتایج پژوهش‌های قبلی مطابقت دارد، هرچند که افزایش

Koussa *et al.* (1998) نقش کربوهیدرات‌های محلول را به‌منزله ترکیبات محافظت‌کننده در زمستان به اثبات رساندند. درواقع قندها به‌عنوان عامل مهم کاهش‌دهنده نقطه انجماد و افزایش پتانسیل اسمزی درون سلول شناخته شده‌اند.



شکل ۱۰. مقدار کربوهیدرات‌های محلول شاخه‌های در حال رکود نهال‌های چهارساله توت آمریکایی در ماه‌های مختلف سال



شکل ۱۱. مقدار کربوهیدرات‌های محلول شاخه‌های در حال رکود گیاهان بالغ توت آمریکایی در ماه‌های مختلف سال

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که کربوهیدرات‌های محلول و آمینواسید پرولین نقش مهمی در مقاومت به یخ‌زدگی توت آمریکایی بازی می‌کنند. از عوامل مهم از دست دادن مقاومت به سرما افزایش دمای محیط است. از آنجاکه این گیاه در ماه‌های سرد سال (آذر، دی و بهمن) مقاومت بسیار خوبی به دماهای پایین خصوصاً گیاهان جوان از خود نشان دادند، به نظر می‌رسد توت آمریکایی از درختان مقاوم یا به نسبت مقاوم به دماهای انجماد باشد و صدمه یخبندان در صورتی در این گیاه رخ می‌دهد که یا فرایندهای مقاومت به دمای انجماد در پاییز یا زمستان به قدر کافی توسعه پیدا نکرده باشند یا در اواخر زمستان و اوایل بهار به‌علت



شکل ۸. درصد آب نسبی شاخه‌های در حال رکود گیاهان بالغ توت آمریکایی در ماه‌های مختلف سال



شکل ۹. درصد آب نسبی شاخه‌های در حال رکود گیاهان چهارساله توت آمریکایی در ماه‌های مختلف سال

همان‌طور که در شکل‌های ۱۰ و ۱۱ نشان داده شده است، کربوهیدرات‌های کل در گیاهان چهارساله و درختان بالغ توت آمریکایی در ماه‌های آذر و دی که گیاهان بیشترین مقاومت را به سرما نشان دادند در بیشترین مقدار بود و در ماه اسفند هم‌زمان با از دست دادن سازگاری و افزایش خسارت تنش یخ‌زدگی محتوای کربوهیدرات‌های کل کاهش یافت و این نتایج همبستگی منفی بالایی ($r = -0.97^{**}$ در نهال‌های چهارساله و $r = -0.98^{**}$ در درختان بالغ) با نتایج آزمون نشت یونی داشت. این نتایج مطابق با بسیاری از نتایج پژوهش‌های قبلی است. به‌عنوان مثال در انگور (Jones *et al.*, 1999) و اکالیپتوس (Leborgne *et al.*, 1995) همبستگی بالایی بین سطوح کربوهیدرات‌های محلول و مقاومت به سرما مشاهده شد. قرارگرفتن برگ‌های *Pinus sylvestris* در برابر دماهای گرم سبب کاهش قندها به بیش از ۵۸ درصد شد و یک ارتباط خطی بین سطوح قندهای محلول و مقاومت به سرما در برگ‌های این گونه وجود دارد (Ogren, 1996).

گرم شدن هوا فرایند از دست دادن سازگاری پیش از موعد
به وقوع بپیوندد. با این وجود از آنجاکه خسارت معنادار
تنش دماهای انجماد از دماهای پایین تر از ۲۰- درجه
سانتی گراد به ویژه در اسفندماه آغاز می شود و از سویی
وقوع این دما در ماه اسفند به ندرت اتفاق می افتد، می توان
کشت این درخت را در مناطق معتدله پیشنهاد کرد.

REFERENCES

1. Arora, R., Rowland, L.J. & Tanino, K. (2003). Induction and release of bud dormancy in woody perennials: A science comes of age. *Horticultural Science*, 38, 911-921.
2. Arora, R., Wisniewski M. E. & Scorza, R. (1992). Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). I. Seasonal changes in cold hardiness and polypeptides of bark and xylem tissues. *Plant Physiology*, 99, 1562-1568.
3. Ashraf, M. & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.
4. Baek, K.H. & Skinner, D.Z. (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science*, 165, 1221-1227.
5. Barka, E.A. & Audran, J.C. (1997). Response of 'Champenoise' grapevine to low temperature: changes of shoot and proline concentration in response to low temperatures and correlations with freezing tolerance. *Horticultural Science*, 72, 557-582.
6. Barranco, D. & Ruiz, N. (2005). Frost tolerance of eight olive cultivars. *Horticultural Science*, 40, 558-560.
7. Bartolozzi, F. & Fontanazza, G. (1999). Assessment of frost tolerance in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 81, 309-319.
8. Bates, L. S., Waldren, R.P. & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
9. 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, 248-54.
10. Chen, H.H. & Li P.H. (1980). Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiology*, 65, 1146-1148.
11. Cook, D., Fowler, S., Fiehn, O. & Thomashow, M.F. (2004). A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15243-15248.
12. Cox, S. E. & Stushnoff, C. (2001). Temperature-related shifts in soluble carbohydrate content during dormancy and cold acclimation in *Populus tremuloides*. *Forest Research*, 31, 730-737.
13. Fotouhi Ghazvini, R., Heydari, M. & Hashempour, A. (2012). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Published by University Jihad of Mashhad. (In Farsi)
14. Gomez-del-Campo, M. & Barranco, D. (2005). Field evaluation of frost tolerance in 10 olive cultivars. *Plant Genetic Resources*, 3, 385-390.
15. Grace, J. (1987). Climatic tolerance and the distribution of plants. *New Phytologist*, 106, 113-130.
16. IPCC (2007). *Executive summary of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, February 2007, www.ipcc.com.ch.
17. Jones, K.S., Paroschy, J., Mckersie, B.D. & Bowley, S. R. (1999). Carbohydrate Composition and Freezing Tolerance of Canes and Buds in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology*, 155, 101-106.
18. Kochert, G. (1978). *Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method*. In: Hellebust, J. A., Craigie, J. S. (ed.) *Handbook of physiological methods—physiological and biochemical methods*. Cambridge University Press, London, p. 96-97.
19. Koussa, T., Cherrad, M., Bertrazd, A. & Broquedis, M. (1998). Comparison of the contents of starch, soluble carbohydrates and abscisic acid of latent buds and internodes during the vegetative cycle of grapevine. *Vitis*, 37, 5-10.
20. Leborgne, N., Teulieres, C., Cauvin, B., Travert, S. & Boudet, A.M. (1995). Carbohydrate content of *Eucalyptus gunnii* leaves along an annual cycle in the field and during induced frost-hardening in controlled conditions. *Trees*, 10, 86-93.
21. Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 461, 205-210.
22. Nezami, A. & Naghedi Nia, N. (2011). Effect of freezing stress on electrolyte leakage in six varieties of safflower. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 8, 891-896. (In Farsi)
23. Ogren, E. (1996). Premature dehardening in *Vaccinium myrtillus* during a mild winter: a cause for winter dieback? *Functional Ecology*, 10, 724-732.

24. Palonen, P. (1999). Relationship of Seasonal Changes in Carbohydrates and Cold Hardiness in Canes and Buds of Three Red Raspberry Cultivars. *American Society for Horticultural Science*, 124, 507-513.
25. Sakai, A. & Larcher, W. (1987). *Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress*. Ecological Studies, Berlin, Springer Verlag. 321 Pages.
26. Sekozawa, Y., Sugaya, S., Gemma, H. & Iwahori, S. (2003). Cold tolerance in 'Kousui' Japanese pear and possibility for avoiding frost injury by treatment with n-propyl dihydrojasmonate. *Horticultural Science*, 38, 288-292.
27. USDA Forest Service. (2012). *Silvics of Trees of North America. "Maclura pomifera"*. From: http://www.na.fs.fed.us/pubs/silvics_manual/volume_2/maclura/pomifera.htm
28. Wisniewski, M., Timothy, J. C., Timothy, A. & Arora, R. (1996). Seasonal patterns of dehydrins and 70-kDa heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants. *Physiologia Plantarum*, 96, 496-505.
29. Wolkers, W.F., McCready, S., Brandt, W.F., Lindsey, G.G. & Hoekstra, F.A. (2001). Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544, 196-206.
30. Xavier, M., Thierry, A., Rein, A., Cathy, K., Vojtich, L., Francois, L., Franco, M. & Isabelle, C. (2007). Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology*, 27, 817-825.
31. Yamori, W., Kogami, H. & Masuzawa, T. (2005). Freezing tolerance in alpine plants as assessed by the FDA-staining method. *Polar Bioscience*, 18, 73-81.