نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۴۸۴-۴۷۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.3, Fall 2018, P. 471-484
ISSN: 2008 - 4730

بررسی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پسته رقم احمدآقایی روی ژنوتیپ‌های پایه متحمل و حساس به سرما در شرایط تنش یخ‌زدگی

علی تاج آبادی پور[1*]- محمد رضا فتاحی مقدم[2]- ذبیح الله زمانی[3]- فاطمه نصیبی[4]- حسین حکم آبادی[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۰

چکیده

به‌منظور بررسی اثر ژنوتیپ پایه بر واکنش پسته رقم احمدآقایی نسبت به تنش یخ‌زدگی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تیمارها در دو سطح: ژنوتیپ پایه (چهار ژنوتیپ متحمل و چهار ژنوتیپ حساس به سرما) و دما (۲- و ۴- درجه سانتی‌گراد) اجرا شد. در مرحله تمام گل، از شاخه‌های انتهایی رقم احمد آقایی پیوند شده روی این ژنوتیپ‌ها نمونه‌گیری شد. شاخه‌ها در گلدان‌های حاوی آب مقطر در دمای ۲- و ۴- درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت قرار گرفتند. پس از اعمال تیمارها، شاخص سرمازدگی تعیین شد، ازخوشه‌های گل تیمارها جهت اندازه‌گیری پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده گردید. نتایج نشان داد شدت سرمازدگی در ژنوتیپ‌های پایه متحمل به سرما به‌طور معنی‌داری کمتر از ژنوتیپ‌های پایه حساس در دو دمای ۲- و ۴- درجه سانتی‌گراد می‌باشد. میزان نشت یونی، پراکسیدهیدروژن، مالون‌دآلدهید در ژنوتیپ‌های پایه متحمل به سرما به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از ژنوتیپ‌های حساس به سرما بود. میزان قندهای محلول، پروتئین کل، پرولین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و گایاکول‌پراکسیداز در ژنوتیپ‌های پایه متحمل به سرما به‌طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ‌های پایه حساس به سرما بوده است. نتایج مربوط به اثر متقابل دما و ژنوتیپ نشان داد که دمای ۴- درجه سانتی‌گراد باعث افزایش معنی‌دار نشت یونی، پرولین، پراکسیدهیدروژن و مالون‌دآلدهید و کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و گایاکول‌پراکسیداز نسبت به دمای ۲- درجه سانتی‌گراد مخصوصا در پایه‌های حساس به سرما شد. با توجه به صفات مورد مطالعه، متحمل‌ترین ژنوتیپ پایه به سرما TR1 بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پایه، پسته، ژنوتیپ، مقاومت به سرما

مقدمه

سرمای بهاره در سال‌های اخیر تولید محصول پسته را با خطر جدی روبرو کرده است. در سال ۱۳۷۶، ۵۰ درصد محصول پسته استان کرمان در اثر سرمای بهاره از بین رفت که این میزان سرمازدگی بیش از ۲۵۰ میلیارد تومان خسارت در پی داشت و صادرات پسته را در حدود ۵۰ تا۷۰ درصد کاهش داد (۲۵). در سال های ۸۳ و ۸۴، در برخی مناطق پسته‌کاری استان کرمان به‌ویژه در رفسنجان تا ۶۰ درصد محصول پسته در اثر سرمای بهاره از بین رفت (۴۶). در تحقیقی مقاومت به سرما در سه رقم تجاری پسته دامغان و سه پایه عمده پسته‌کاری از طریق پارامترهای نشت‌یونی بررسی شد و مشخص گردید که با کاهش دما از صفر تا ۶- درجه سانتی‌گراد میزان نشت‌یونی افزایش می‌یابد. بین پایه‌ها تا دمای ۲- درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. همچنین نتایج نشان داد با کاهش دما تا ۴- درجه سانتی‌گراد، اختلافات بین پایه‌ها مشخص می‌گردد به‌طوری‌که در دمای ۴- و ۶- درجه سانتی‌گراد خسارت سرمازدگی در پایه بادامی و سرخس نسبت به دو پایه قزوینی و آتلانتیکا بیشتر بود (۲۵). مقاومت به سرما در چهار پایه مهم پسته شامل بادامی زرند، سرخس، بنه و آتلانتیکا در دماهای صفر، ۲- ، ۴- و ۶- درجه سانتی‌گراد بررسی گردید و گزارش شد که پایه بنه مقاوم‌ترین و آتلانتیکا حساس‌ترین پایه می‌باشد (۵). مقایسه سه رقم پسته (عباسعلی، خنجری و شاه‌پسند) نشان داد که رقم عباسعلی با داشتن بیشترین مقدار قندهای محلول و پرولین بیشترین مقاومت را نسبت به

۱- استادیار پژوهشکده پسته، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: tajabadi@pri.ir)
۲ و ۳- استادان گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۴- دانشیار گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۵- استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شاهرود
DOI: 10.22067/jhorts4.v32i3.69529

سرمای بهاره نشان می‌دهد و رقم شاه‌پسند به دلیل پایین بودن مقدار قندهای محلول و پرولین حساس ترین رقم بود (۲). پایه‌های مختلف به‌طور گسترده‌ای برای افزایش مقاومت درختان نسبت به تنش‌های زنده و غیرزنده استفاده می‌شوند (۳۲). در بررسی اثر پایه پسته بر روی برخی خصوصیات دانه پسته مشخص شد که پایه *Pistacia atlantica* عملکرد محصول، وزن کل پسته، میزان مواد معدنی پسته را نسبت به پایه‌های *P. integerrima* و *P. terebinthus* افزایش می‌دهد (۱۳). در بین چهار پایه مورد استفاده در صنعت پسته آمریکا، پایه *P. integerrima* و *P. atlantica* به‌ترتیب با صفر و ۳ درصد سرخشکیدگی ناشی از سرما مقاوم‌ترین پایه‌ها نسبت به سرمای زمستانه (۲۴- درجه سانتی‌گراد) شناخته شده‌اند. در صورتی که پایه های هیبرید UCB #1 و PGI به‌ترتیب ۷۹ و ۹۵ درصد سرخشکیدگی ناشی از سرما را نشان دادند (۱۹). در چندین تحقیق اثر پایه پسته بر روی مقاومت به خشکی و سرما مطالعه شده است (۲۰ و ۲۱). پایه *P. terebinthus* به‌عنوان مقاوم‌ترین پایه به سرما و خشکی شناخته شده است. در صورتی که *P. integerrima* حساس به سرما اما مقاوم به ورتیسیلیوم است (۲۰). تحقیقات مختلف روی سیب (۱۵) و هلو (۵۱) نشان داده است که پایه تاثیر مهمی بر روی رشد رویشی درخت دارد. تایید شده است که نوع پایه بر میزان نشت یونی درخت تحت تنش تاثیر دارد (۴۷). چندین روش برای انتخاب ژنوتیپ های مقاوم به سرما استفاده می‌شود که شامل بررسی تراکم روزنه‌ای، فعالیت فتوسنتزی، اندازه روزنه‌ها، آزادسازی ترکیبات فنولی، آنالیز تمایز دمایی و نشت یونی هستند (۶). ارزیابی مقاومت گیاهان به سرما شامل مشاهدات ظاهری بافت‌ها بعد وقوع سرماردگی بوده و اعمال سرمای مصنوعی برای محاسبه میزان مقاومت اندام گیاه در مقابل سرماهای کشنده است (۳۸). از صفات فیزیولوژیکی قندهای محلول، پرولین، پروتئین کل، مالون دآلدهید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای تعیین مقاومت به سرما درخت بادام استفاده شده است (۳۲). در سرمازدگی بهاره وسیع سال ۱۳۸۷ تعدادی درخت متحمل به سرما در باغات سرما زده شهرستان سیرجان مورد شناسایی قرار گرفتند. در بررسی‌های اولیه مشخص شد که باوجود یکنواختی نوع پیوندک در این باغ (رقم احمدآقایی)، تمامی پیوندک‌های موجود بر روی این درخت‌های متحمل به سرما بدون هیچ‌گونه علائم سرما زدگی بودند. بنابراین به نظر می‌رسد که مقاومت از طریق پایه به پیوندک‌ها القاء شده باشد. با توجه به اهمیت دستیابی به پایه مقاوم به سرما در پسته و ارزش بسیار بالای این پایه‌ها برای صنعت پسته کشور، ضرورت داردکه مقاومت آن‌ها به سرما مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. در صورت اثبات مقاومت آنها به سرما می توان در یک برنامه اصلاحی نسبت به تکثیر انبوه و در اختیار قرادادن آن‌ها برای مناطق پسته کاری اقدام کرد. با توجه به موارد ذکر شده هدف از این تحقیق بررسی اثر پایه در القاء مقاومت به سرما در درختان پسته احمدآقایی از طریق اندازه‌گیری برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در سرمازدگی وسیع بهاره در سال ۱۳۸۷ (دمای ۶- درجه سانتی گراد در زمان تمام گل) تعدادی پایه متحمل به سرما در یکی از باغ-های سرما زده شهرستان سیرجان مورد شناسایی قرار گرفتند. در بررسی‌های اولیه مشخص شد که با وجود یکنواختی نوع پیوندک در این باغ (رقم احمدآقایی)، تمامی پیوندک‌های موجود بر روی پایه‌های متحمل بدون هیچ‌گونه علائم سرمازدگی بودند. ژنوتیپ‌های پایه متحمل و حساس اتیکت‌گذاری شدند. باغ مورد تحقیق در ۱۰ کیلومتری جنوب سیرجان واقع شده که فواصل کاشت درختان روی ردیف بصورت نامنظم و حدود یک متر و فاصله بین ردیف ها ۶ متر بود. درختان در زمان آزمایش۲۳ ساله بودند. بذر پسته بادامی ریز به عنوان پایه جهت احداث باغ بصورت کاشت مستقیم بذر در زمین اصلی استفاده شده بود. این آزمایش جهت بررسی القاء مقاومت به سرمای پایه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تیمارها در دو سطح: ژنوتیپ پایه (چهار ژنوتیپ متحمل و چهار ژنوتیپ حساس به سرما) و دما (۲- و ۴- درجه سانتی‌گراد) اجرا شد. هر تیمار شامل ۴ تکرار و هر تکرار شامل یک ظرف حاوی چهار شاخه بود. از شاخه‌های انتهایی رقم احمدآقایی پیوند شده روی ژنوتیپ‌های پایه متحمل (TR[1]) و حساس (SR[2]) باغ مذکور در سیرجان در مرحله تمام گل نمونه‌گیری انجام شد. شاخه‌ها در ظرف های حاوی آب مقطر به آزمایشگاه پژوهشکده پسته رفسنجان منتقل و در انکوباتور یخچال‌دار قرار گرفتند. دمای انکوباتور در عرض ۵ ساعت از دمای محیط به صفر درجه سانتی‌گراد رسید و سپس تیمارهای سرمایی ۲- و ۴- درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو ساعت روی آن‌ها اعمال گردید. فاکتورهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در این آزمایش عبارتند از:

۱- شاخص سرمازدگی(CI[3]): از طریق فرمول

CI =∑(ni * i) / N محاسبه شد (۴۲). در این رابطه CI: شاخص سرمازدگی، Ni: تعداد نمونه که علائم سرمازدگی i (۴-۱) را نشان می‌دهند و N: تعداد کل نمونه‌ها می‌باشد.

۲- نشت یونی: درصد نشت یونی از طریق فرمول محاسبه شد (17).۱۰۰× نشت نهایی/نشت ابتدایی = درصد نشت یونی

۳- پرولین: اندازه‌گیری میزان پرولین با استفاده از معرف ناین هیدرین و روش توسعه یافته بیت در طول موج ۵۱۵ نانومتر صورت

1- Tolerant Rootstock
2- Sensitive Rootstock
3- Chilling Index

گرفت (۱۰).

۴- قندهای محلول: برای اندازه‌گیری قندهای محلول از معرف آنترون استفاده شد. میزان جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت محاسبه گردید (۲۹).

۵- پروتئین کل: برای سنجش غلظت پروتئین از معرف برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد (۱۱).

۶- پراکسیدهیدروژن: مقدار پراکسیدهیدروژن براساس واکنش H_2O_2 با پتاسیم‌یدید (KI) تعیین شد (۴).

۷- مالون‌دآلدهید: اندازه گیری غلظت مالون دآلدهید به روشهیت و پاکر تعیین شد (۲۴).

۸- فعالیت آنزیم‌ها: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) براساس کاهش جذب آب‌اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر تعیین گردید (۱۷). فعالیت آنزیم سکوربات‌پراکسیداز (APX) براساس اکسیداسیون آسکوربیک‌اسید و کاهش در جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۸). فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز (GPX) با استفاده از پیش‌ماده گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر تعیین شد (۴۳).

در نهایت تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA) توسط نرم‌افزار کامپیوتری SAS 9.1 صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد انجام گردید. قبل از تجزیه آماری داده‌ها از طریق ArcSin √x/100 نرمال شدند.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثر متقابل ژنوتیپ و دما بر روی صفات شاخص سرمازدگی، نشت یونی، قندهای محلول، پروتئین کل، پرولین، مالون‌دآلدهید، پراکسیدهیدروژن و کاتالاز، اسکوربات پراکسیداز، گایاکول‌پراکسیداز در سطح یک درصد معنی‌دار شد. اما در پروتئین کل، اسکوربات پراکسیداز و گایاکول‌پراکسیداز در سطح پنج درصد معنی‌دار شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر دما و ژنوتیپ‌های مختلف پایه پسته روی برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در رقم احمدآقایی

Table 1- ANOVA for the effect of temperature and different genotypes of pistachio rootstocks on some physiological and biochemical traits in Ahmad Ahaghi

منابع تغییرات Source of vaiation	df	میانگین مربعات Mean square									
		شاخص سرمازدگی CI	نشت یونی Ionic leakage	قندهای محلول Soluble sugars	پروتئین کل Total protein	پرولین Prolin	مالون‌دآلدهید MDA	پراکسیدهیدروژن H_2O_2	کاتالاز CAT	اسکوربات پراکسیداز APX	گایاکول پراکسیداز GPX
تکرار Replication	3	0.049 ns	2.713ns	1.023ns	0.026 ns	0.011ns	7.729ns	166.94 ns	0.020ns	ns 83.68	4.807ns
پایه Rootstock	7	** 2.88	**198.46	**1.023	**8.840	**1.535	**366.348	**2626.64	**2.103	**25679.1	**87.64
دما Temperature	1	**6.027	**127.97	**2.745	*0.181	**5.348	**1024	**9825.7	**0.173	**4726.5	516.4 ns
پایه × دما P*T	7	**0.463	**9.906	**0.032	*0.089	**0.076	**205.643	*242.62	**3.474	**11634.9	*13.23
خطا Error	45	0.038	1.379	0.004	0.040	0.025	5.862	94.977	0.010	131.988	5.341
ضریب تغییرات %CV		10	1.68	2.56	3.3	2.66	14.06	12.11	2.98	4.68	17.38

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

Significant F-test at $**p < 0.01$, at $*p < 0.05$ and non-significant (ns)

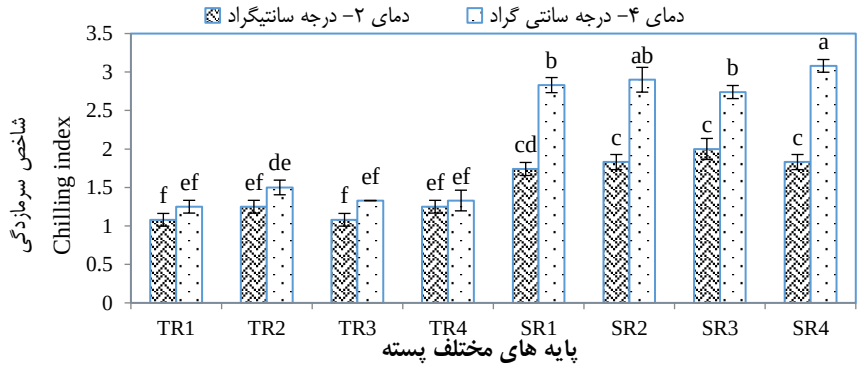
شاخص سرمازدگی پیوندک

نتایج نشان داد که شدت سرمازدگی در پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما نسبت به پایه‌های حساس به سرما به‌طور معنی‌داری در دو دمای ۲- و ۴- درجه سانتی‌گراد کمتر است. تفاوت‌های بین پایه‌های متحمل به سرما معنی‌دار نبودند. بیشترین شاخص سرمازدگی مربوط به پایه SR4 مشاهده شد که با دو پایه SR1 و SR3 اختلاف معنی‌داری داشت. شاخص سرمازدگی بین دو دمای ۲- و ۴- درجه سانتی‌گراد در تمامی پایه‌های حساس به سرما معنی‌دار بود درحالی‌که این شاخص در خصوص پایه‌های متحمل به سرما معنی‌دار نیست (شکل ۱).

نشت یونی پیوندک

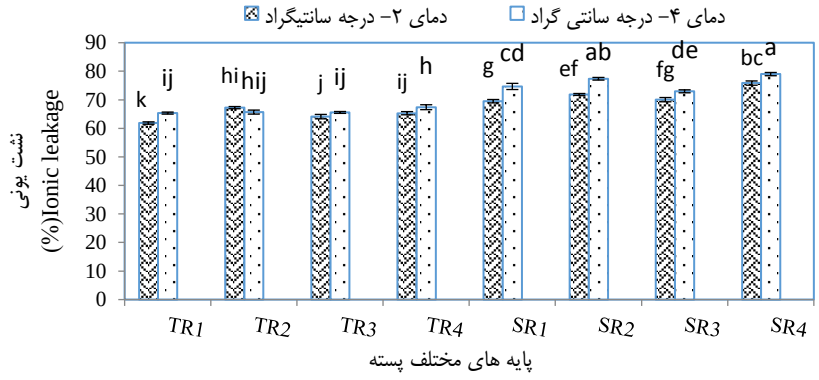
نتایج نشان داد که میزان نشت یونی در پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از پایه‌های حساس به سرما بود. کمترین میزان نشت یونی مربوط به پایه‌های TR1 و TR3 بود که اختلاف معنی‌داری با سایر پایه‌ها داشتند. بیشترین میزان نشت

یونی در پایه SR4 مشاهده شد که اختلاف آن با سایر پایه‌ها معنی‌دار بود (شکل ۲). نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که با افزایش مقدار نشت یونی حساسیت پایه به سرما بیشتر می‌شود. افزایش میزان نشت یونی برای اکثر گونه‌های حساس به یخزدگی در نتایج سایر محققین نیز آمده است که نتایج پژوهش حاضر را تأیید می‌کند (۸ و ۲۸). پایه های انگور مقاوم به سرما باعث میزان نشت یونی کمتری در پیوندک در شرایط تنش یخ زدگی شدند (۳۴). همچنین گزارش شده که پایه‌های متحمل پسته نسبت به سرمای بهاره کمترین میزان نشت یونی را داشتند (۵). در این تحقیق با کاهش دما میزان نشت یونی افزایش یافت، به‌طوری‌که میزان نشت یونی به‌طور معنی‌داری در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد بیش از ۲- درجه سانتی‌گراد بود (۵). مقدار نشت الکترولیت‌ها با شدت آسیب وارده بر سلول‌های گیاهی متناسب است (۷ و ۸).



شکل ۱- برهمکنش پایه‌های مختلف پسته × دما بر شاخص سرمازدگی پسته رقم احمداقایی (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، *p<0.05*)

Figure 1- Interaction effects of pistachio rootstocks ×temperature on chilling index in pistachio cv. 'Ahmad-Aghaii' (Duncan's multiple range test, *p<0.05*)



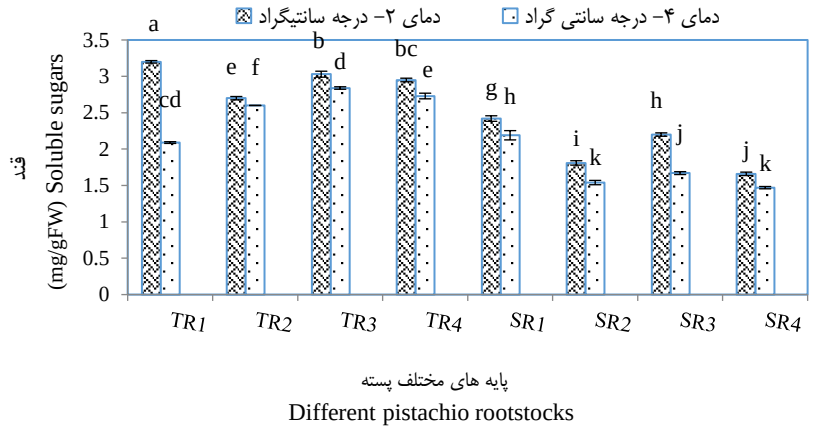
شکل ۲- برهمکنش پایه‌های مختلف پسته × دما بر میزان نشت یونی خوشه گل رقم احمداقایی (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، *p<0.05*)

Figure 2- Interaction effects of pistachio rootstocks ×temperature on ionic leakage in flower cluster of pistachio cv. 'Ahmad-Aghaii'(Duncan's multiple range test, *p<0.05*)

قندهای محلول پیوندک

نتایج مربوط به مقایسه میانگین‌ها نشان داد که به‌طور کلی میزان قندهای محلول در پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما به‌طور معنی‌داری بیشتر از پایه‌های حساس به سرما بوده است. بیشترین قندهای محلول مربوط به پایه TR1 (۳/۲۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد بود که اختلاف معنی‌داری با سایر پایه‌ها داشت. کمترین میزان قندهای محلول در پایه SR4 (۱/۴۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که اختلاف آن با سایر پایه‌ها معنی‌دار بود. میزان قندهای محلول در نمونه‌های تیمارشده در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری بیش از ۴- درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۳). دلیل بالا بودن تحمل به سرما در پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما در تحقیق حاضر نیز می

تواند افزایش میزان قندهای محلول و نقش آن‌ها در کاهش نقطه یخ‌زدگی سلول باشد. در بسیاری از گیاهان چوبی ارتباط بین غلظت قندهای محلول و مقاومت به سرما به اثبات رسیده است و می‌توان از آن برای شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم استفاده نمود (۲۶، ۲۷، ۳۲، ۳۴ و ۴۱). قندها با افزایش غلظت محلول سیتوپلاسمی و به تأخیر انداختن تشکیل هسته یخ نقش مهمی را حفاظت سلول گیاهی ایفاء می‌کنند (۴۴).



شکل ۳- برهمکنش پایه‌های مختلف پسته × دما بر میزان قندهای محلول خوشه گل رقم احمداقایی (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، *p<0.05*)

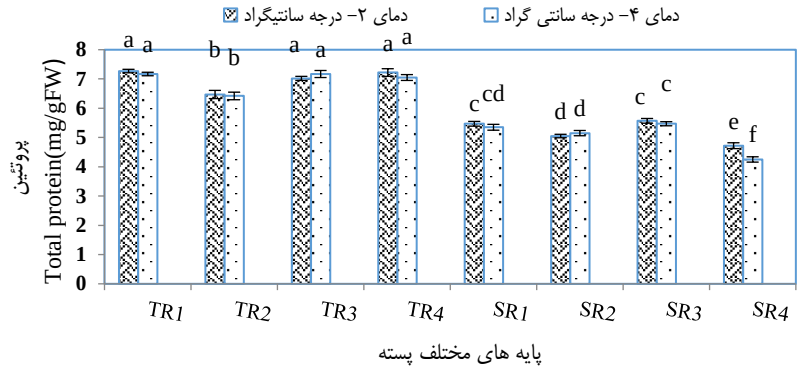
Figure 3- Interaction effects of pistachio rootstocks ×temperature on soluble sugars in flower cluster of pistachio cv. 'Ahmad-Aghaii' (Duncan's multiple range test, p<0.05)

پروتئین کل پیوندک

نتایج مربوط به مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان پروتئین کل در پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما به‌طور معنی‌داری بیشتر از پایه‌های حساس به سرما بوده است. بیشترین پروتئین کل مربوط به پایه‌های TR1 (۷/۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) و TR3 (۷/۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) و TR4 (۷/۲۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) بود که اختلاف معنی‌داری با سایر پایه‌ها داشتند. کمترین میزان پروتئین کل در پایه SR4 (۴/۲۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) مشاهده شد که اختلاف آن با سایر پایه‌ها معنی‌دار بود (شکل ۴). همان‌طوری که مشاهده می‌شود میزان پروتئین کل در ژنوتیپ پایه‌های متحمل نزدیک به دو برابر پایه حساس SR4 بوده است. افزایش میزان پروتئین‌ها نیز همانند محتوای قندهای محلول یکی از صفات سازگاری به تنش سرما محسوب می‌گردد (۴۹). در ژنوتیپ پایه‌های متحمل، افزایشی میزان پروتئین کل بعد از تنش مربوط به افزایش بیان ژن‌های دخیل در سنتز آنزیم‌های دفاعی است و میزان پرونئین کل افزایش می‌یابد (۲۳ و ۴۹). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تجمع پروتئین‌ها می‌تواند یکی از دلایل مقاومت به سرما در رقم احمدآقایی پیوند شده بر روی پایه با ژنوتیپ متحمل باشد که با نتایج بدست آمده بر روی بادام (۳۲)، و پسته (۳۷) مطابقت دارد. افزایش میزان پروتئین‌ها در رقم پسته احمدآقایی پیوند شده روی پایه‌های مقاوم به سرما نسبت به پایه های حساس در شرایط تنش سرمایی گزارش شده است (۴۵).

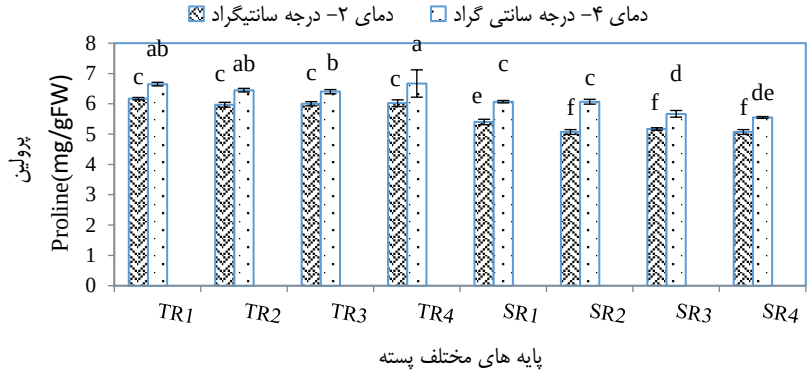
پرولین پیوندک

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما و پایه‌های حساس به سرما از نظر میزان پرولین وجود دارد. بیشترین میزان پرولین در پایه TR3 (۶/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) مشاهده شد که البته اختلاف معنی‌داری با پایه‌های TR1 و TR2 نشان نداد. کمترین میزان پرولین در پایه‌های SR4 (۵/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) مشاهده شد که اختلاف آن با پایه SR3 معنی‌دار نبود. میزان پرولین در نمونه‌های تیمارشده در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری بیش از ۲- درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۵). پرولین از مهمترین ترکیبات محلول سازگار است که سنتز آن تحت تنش سرما به میزان زیادی افزایش می‌یابد (۴۳). رابطه مستقیم بین مقاومت به سرما با پرولین در در ارقام مختلف گیاهانی ازجمله زردآلو (۱)، گردو (۲) و بادام (۳۲) نیز مشاهده شده است. در تحقیق حاضر نیز بالا بودن میزان پرولین از طریق خنثی کردن گونه‌های اکسیژن فعال، تنظیم فشار اسمزی و کاهش پتانسیل آب و تثبیت ساختار پروتئین‌ها در پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما، باعث افزایش مقاومت به یخ‌زدگی شده است (۴۸).



شکل ٤- برهمکنش پایه‌های مختلف پسته × دما بر میزان پروتئین کل خوشه گل رقم احمداقایی (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، *p<0.05*)

Figure 4- Interaction effects of pistachio rootstocks ×temperature on total protein in flower cluster of pistachio cv.'Ahmad-Aghaii' (Duncan's multiple range test, *p<0.05*).

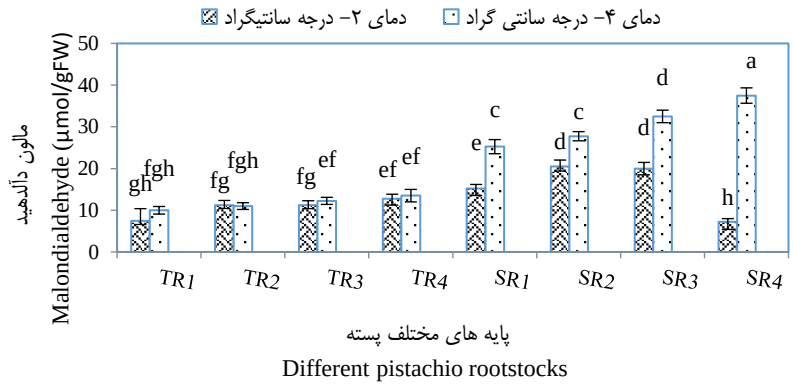


شکل ٥- برهمکنش پایه‌های مختلف پسته × دما بر میزان پرولین خوشه گل رقم احمداقایی (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، *p<0.05*)

Figure 5- Interaction effects of pistachio rootstocks ×temperature on proline in flower cluster of pistachio cv. 'Ahmad-Aghaii' (Duncan's multiple range test, *p<0.05*)

مالون دآلدهید پیوندک

نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما و پایه‌های حساس به سرما از نظر میزان مالون‌دآلدهید وجود دارد. کمترین میزان مالون‌دآلدهید در پایه TR1 (۷/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با پایه TR2 نداشته ولی با پایه‌های TR4 و TR3 و همچنین سایر پایه‌های حساس به سرما اختلاف معنی‌داری داشت. بیشترین میزان مالون دآلدهید در پایه SR4 (۳۷/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) مشاهده شد که اختلاف آن با سایر پایه‌ها معنی‌دار بود. در ژنوتیپ پایه‌های حساس به سرما با کاهش دما میزان مالون دآلدهید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان مالون دآلدهید در نمونه‌های تیمار شده در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری بیش از ۲- درجه سانتی‌گراد بود به‌طوری که پنج برابر ژنوتیپ پایه‌های متحمل به‌دست آمد (شکل ۶). مالون‌دآلدهید به‌عنوان یک نشانگر برای تشخیص مقدار صدمات اکسیداتیو به لیپیدها به‌کار می‌رود (۱۶) و همانند نشت یونی به‌عنوان شاخص آسیب غشایی برای اندازه‌گیری غیرمستقیم انسجام سلولی مورد توجه قرار گرفته است. بررسی منابع نشان داده است که در نهال‌های پسته تحت تنش یخزدگی (۶- درجه سانتی-گراد) میزان مالون‌دآلدهید به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۴) و در پایه‌های متحمل به سرما میزان مالون دآلدهید کمتری دارند (۱۶، ۳۴ و ۴۲).

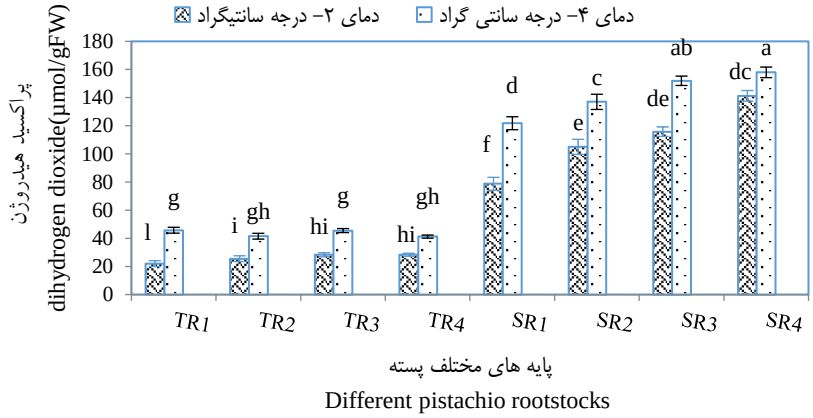


شکل ٦- برهمکنش پایه‌های مختلف پسته × دما بر میزان مالون‌دآلدهید خوشه گل رقم احمداقایی (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، *p<0.05*)

Figure 6- Interaction effects of pistachio rootstocks ×temperature on malon di-aldehyde (MDA) in flower cluster of pistachio cv. 'Ahmad-Aghaii' (Duncan's multiple range test, *p<0.05*)

پراکسیدهیدروژن پیوندک

نتایج مربوط به مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما و پایه‌های حساس به سرما وجود دارد. کمترین میزان پراکسیدهیدروژن در پایه‌های متحمل TR1 ، TR2، TR3 و TR4 در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر پایه‌ها داشتند. بیشترین میزان پراکسیدهیدروژن در پایه SR4 (۱۵۸ میکرومول بر گرم وزن تازه) در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که اختلاف آن با سایر پایه‌ها (به‌جز SR3) معنی‌دار بود (شکل ۷). TR1 متحمل‌ترین پایه از نظر شاخص میزان پراکسیدهیدروژن شناخته شد. همچنین نتایج نشان داد که با کاهش دما از ۲- درجه سانتی‌گراد به ۴- درجه سانتی‌گراد، میزان پراکسیدهیدروژن به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. میزان پراکسیدهیدروژن در پایه‌های با ژنوتیپ حساس چهار تا هفت برابر پایه‌های متحمل بود (شکل ۷). گزارش شده است که تنش سرما باعث افزایش میزان پراکسیدهیدروژن در گیاهان تحت تنش می‌شود (۵۲) و میزان بیش از اندازه‌ی آن در سلول‌های گیاهی منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود (۲۲). در این تحقیق، یکی از دلایل حساسیت رقم احمدآقایی پیوند شده روی پایه‌های حساس به سرما، افزایش میزان پراکسیدهیدروژن و در نتیجه تغییر ساختار و نسبت لیپیدهای غشاء و در نتیجه افزایش نفوذپذیری غشاء آن‌ها می‌باشد (۱۴).



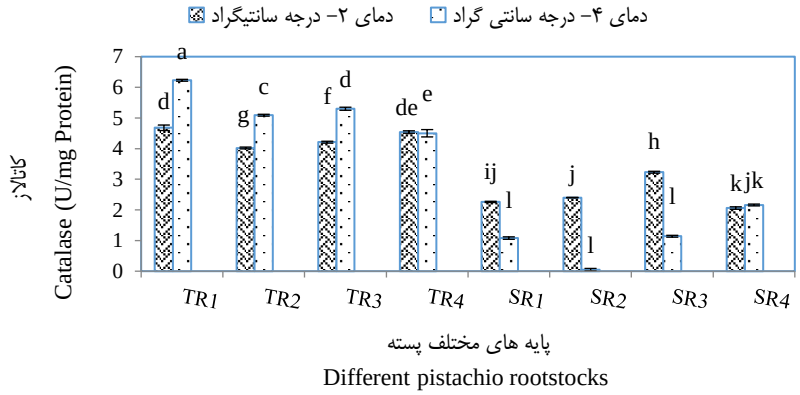
شکل ۷- برهمکنش پایه‌های مختلف پسته × دما بر میزان پراکسیدهیدروژن خوشه گل رقم احمداقایی (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، *p<0.05*)

Figure 7- Interaction effects of pistachio rootstocks ×temperature on dihydrogen dioxide (H_2O_2) in flower cluster of pistachio cv. 'Ahmad-Aghaii' (Duncan's multiple range test, *p<0.05*)

در درختان سیب پیوند شده روی پایه *Malus sieversii* مقدار رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن نسبت به درختانیکه که روی پایه*M. hupehensis* رشد کرده بودند تحت تنش خشکی کمتر بود (۳۳). همچنین در نهال‌های پسته تحت تنش یخزدگی (۶- درجه سانتی‌گراد)، افزایش میزان پراکسیدهیدروژن به‌طور معنی‌داری گزارش شده است (۱۲).

فعالیت آنزیم کاتالاز پیوندک

نتایج مربوط به مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم احمدآقایی پیوند شده روی پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما به‌طور معنی‌داری بیشتر از پایه‌های حساس به سرما بوده است. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به پایه TR1 (۶/۲۳ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین) بود که اختلاف معنی‌داری با سایر پایه‌ها داشت. کمترین فعالیت آنزیم کاتالاز در پایه‌های SR1 (۱/۰۸ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین)، SR2 (۰/۰۵ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین) و SR3 (۱/۱۴ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد که اختلاف آن با سایر پایه‌ها معنی‌دار بود. در ژنوتیپ پایه‌های متحمل به سرما با کاهش دما، فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. درصورتی که در ژنوتیپ پایه‌های حساس به سرما فعالیت آنزیم کاتالاز به‌جز در پایه SR4 با کاهش دما به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۸).



شکل ۸- برهمکنش پایه‌های مختلف پسته × دما بر میزان فعالیت کاتالاز خوشه گل رقم احمداقایی (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، *p<0.05*)

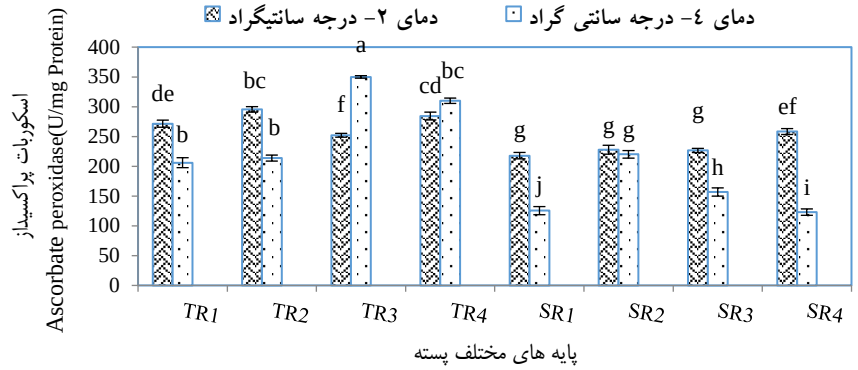
Figure 8- Interaction effects of pistachio rootstocks and temperature on catalase (CAT) in flower cluster of pistachio cv. 'Ahmad-Aghaii' (Duncan's multiple range test, *p<0.05*)

کاتالاز ، اولین آنزیم آنتی اکسیدان کشف و شناسایی شده است. میزان پایه فعالیت آنزیم کاتالاز در گونه‌های گیاهی متفاوت می‌باشد. در طی دوره سرمادهی، فعالیت پایه نسبت به گونه گیاهی و مدت زمان طی شده از آغاز شرایط تنش سرما تغییر پیدا می‌کند (۳۶). برخی پژوهشگران بر نقش آنزیم کاتالاز در حذف پراکسید هیدروژن تحت تنش اکسایشی ناشی از سرما تاکید کرده‌اند (۳۰ و ۳۴). تاثیر نوع پایه زردآلو بر روی برخی صفات کمی و کیفی میوه نظیر وزن میوه، محتوای آنتی اکسیدانی و فنل کل که در مقاومت به تنشها نقش دارند، در پیوندک زردآلو ثابت شده است (۹). در تحقیق حاضر می‌توان احتمال داد که فعالیت بیشتر آنزیم کاتالاز در پایه‌های با ژنوتیپ متحمل باعث از بین رفتن و جلوگیری از آسیب‌های H_2O_2 می‌شود (۳۶).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز پیوندک

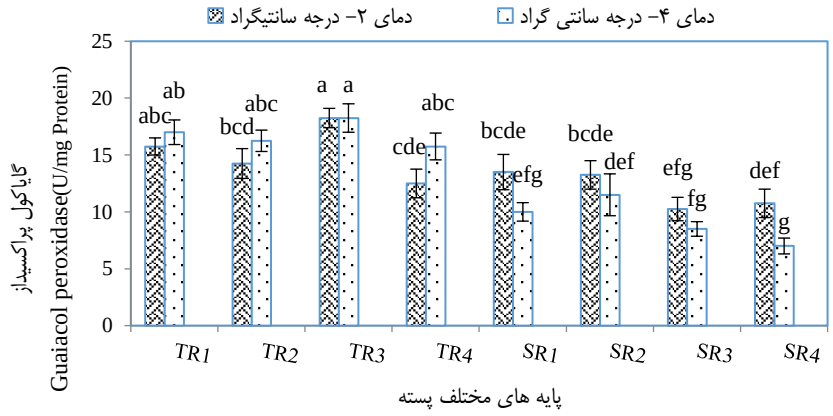
نتایج مربوط به مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در رقم احمدآقایی پیوند شده روی پایه‌های با ژنوتیپ متحمل به سرما به‌طور معنی‌داری بیشتر از پایه‌های حساس به سرما بوده است. بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز مربوط به پایه TR3 (۳۵۰ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین) در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد بود که اختلاف معنی‌داری با سایر پایه نشان داد. کمترین فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز نیز در همین دما در پایه SR1 (۱۲۵/۵ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد که اختلاف آن با سایر پایه‌ها معنی‌دار بود. در پایه TR3 با کاهش دما فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۹). در رابطه با آنزیم پراکسیداز نتایج آزمایش‌های مختلف نشان می‌دهد که با کاهش دما، فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز به منظور جلوگیری از

آسیب‌های وارده به گیاه ناشی از تنش سرما و تولید پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد (۳۱). همچنین در درختان سیب رشد کرده روی پایه *Malus sieversii* نسبت به پایه *M. hupehensis* فعالیت بیشتر آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز ثبت گردید (۳۳). نتایج محققین دیگر بر روی سیب (۳۳)، توتون (۵۲) و بادام (۳۲) با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.



شکل ۹- برهمکنش پایه‌های مختلف پسته × دما بر میزان فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز خوشه گل رقم احمداقایی (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، *p<0.05*)

Figure 9- Interaction effects of pistachio rootstocks ×temperature on Ascorbate peroxidase (APX) in flower cluster of pistachio cv. 'Ahmad-Aghaii' (Duncan's multiple range test, *p<0.05*)



شکل ۱۰- برهمکنش پایه‌های مختلف پسته × دما بر میزان فعالیت گایاکول‌پراکسیداز خوشه گل رقم احمداقایی (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، *p<0.05*)

Figure 10- Interaction effects of pistachio rootstocks ×temperature on guaiacol peroxidase (GPX) in flower cluster of pistachio cv. 'Ahmad-Aghaii' (Duncan's multiple range test, *p<0.05*)

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز پیوندک

نتایج مربوط به مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز در ژنوتیپ پایه‌های متحمل به سرما به‌طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ پایه‌های حساس به سرما بوده است. بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز مربوط به پایه TR3 (۱۸/۲۵ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین) در هر دو دما بود. ژنوتیپ‌های متحمل به سرما اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نشان ندادند. کمترین فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز در پایه‌های SR4 (۷ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین) و SR3 (۸/۵ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد که اختلاف آن با سایر پایه‌ها معنی‌دار بود (شکل ۱۰). همچنین در ژنوتیپ پایه‌های متحمل به سرما فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز برعکس ژنوتیپ پایه‌های حساس در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۲- درجه سانتی‌گراد بود. گرچه در مورد هر دو گروه ژنوتیپ‌ها به‌جز SR4 تفاوت فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز در دو دما معنی‌دار نبود (شکل ۱۰). تحقیقات دیگر، نتایج این تحقیق را تأیید می‌کند (۳۵ و ۵۰). گزارش شده است که پایه پسته بر روی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی

پیوندک تاثیر می‌گذارد. با اندازه‌گیری فنیل آلانین آمونیالیاز به‌عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی مشخص شد که در بین پایه‌های بنه، اهلی، سرخس و آتلانتیکا و سه رقم احمدآقایی، کله قوچی و اوحدی، بیشترین میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان در گل و برگ‌های پیوندک احمدآقایی روی پایه بنه وجود دارد (۳۹).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق با کاهش دما میزان خسارت به غشای سلول افزایش یافت. نتایج نشان داد که نوع پایه می‌تواند مقاومت به سرما را با افزایش میزان قندهای محلول، پروتئین، پرولین و افزایش فعالیت سیتم آنتی‌اکسیدان در شاخه و برگ پیوندک بالا ببرد. باتوجه به بررسی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شده مشخص شد که رقم احمدآقایی پیوند شده روی پایه‌های متحمل به سرما دارای میزان قندهای محلول، پروتئین کل، پرولین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و گایاکول‌پراکسیداز بیشتر و دارای شاخص سرمازدگی، میزان نشت یونی، پراکسیدهیدروژن و مالون‌دآلدهید کمتر بودند که بیانگر خسارت وارده کمتر به غشای سلول و محتویات آن در مقایسه با رقم احمد آقایی پیوند شده روی پایه‌های حساس است. با در نظر گرفتن کلیه صفات مورد بررسی می توان پایه TR1 را متحمل ترین پایه به سرما معرفی نمود.

منابع

1- Abedi B., Tafazol A., Rahimi M., Khaldabrin B., and Ganji A. 2010. Changes in sugars, starch, proline and inter-tissue water in cold weather in some cultivars of apricot (*Prunus armeniaca* L.). Journal of Horticultural Science, 4: 382-375. (In Persian with English abstract)
2- Afshar Mohammadian M., Rezaie S.h., and Ramezani Malekrudi M. 2012. Investigating the resistance of two olive cultivars to cold stress. Journal of Process and Plant Function, 2: 11-1. (In Persian with English abstract)
3- Afshari H., Hokmabadi H., Ebadi A., and Laee G. 2010. Measurement of chemical and non-chemical parameters of three native pistachio cultivars of damghan region (Iran) for studying spring frost. Asian Journal of Chemistry, 22(3): 2356.
4- Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., and Karanov E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant, Cell and Environment, 24(12): 1337-1344.
5- Arab H., Hakamabadi H., and Tajbadipour A. 2014. Investigation of cold resistance in four pistachio rootstocks through ion leakage parameter and macroscopic observations. Graduate Student, Islamic Azad University, Jiroft Branch. (In Persian with English abstract)
6- Azzarello E., Mugnai S., Pandolfi C., Masi E., Marone E., and Mancuso S. 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.
7- Bakht J., Bano A., Shafi M., and Dominy P. 2013. Effect of abscisic acid applications on cold tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). European Journal of Agronomy, 44: 10-21.
8- Barranco D., Ruiz N., and Gómez-del Campo M. 2005. Frost tolerance of eight olive cultivars. HortScience, 40(3): 558-560.
9- Bartolini S., Leccese A., Iacona C., Andreini L., and Viti R. 2014. Influence of rootstock on fruit entity, quality and antioxidant properties of fresh apricots (cv. 'Pisana'). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 42(4): 265-274.
10- Bates L.S. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39: 205-207.
11- 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(1-2): 248-254.
12- Brend A., Kalantari N., Nasibi F., and Rezandeh F. 2012. Physiological effects of arginine amino acid pre-treatment on induction of cold resistance in pistachio plant *Pistacia vera* under glassy conditions. Graduate Student of Shahid Bahonar University of Kerman. 99 pages. (In Persian with English abstract)
13- Carbonell-Barrachina Á.A., Memmi H., Noguera-Artiaga L., Gijón-López M.D.C., Ciapa R., and Pérez-López D. 2015. Quality attributes of pistachio nuts as affected by rootstock and deficit irrigation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(14): 2866-2873.
14- Chen B., Huang J., Wang J., and Huang L. 2008. Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of *Porphyridium cruentum*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 61(1): 88-92.
15- Cohen S., and Naor A. 2002. The effect of three rootstocks on water use, canopy con-ductance and hydraulic parameters of apple trees and predicting canopy from hydraulic conductances. Plant, Cell and Environment, 25: 17–28.
16- Davey M.W., Stals E., Panis B., Keulemans J., and Swennen R.I. 2005. High throughput of malondialdehyde in plant. Analytical Biochemistry, 347: 201-207.
17- Dhindsa R.S., Dhindsa P., and Thorpe A.T. 1981. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane

permeability and lipid peroxidation and decrease levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany, 32: 93-101.
18- Emmert F.H., and Howlett F.S. 1953. Electrolytic determinations of the resistance of fifty-five apple varieties to low temperatures. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 62: 311-318.
19- Ferguson L., and Buchner R. 1990. Relative cold tolerance of four unbudded pistachio seedling rootstocks. HortScience, 25(9): 1089-1089.
20- Ferguson L., Reyes H., Sanden B., Grattan S., Epstein L., and Krueger .2005. Pistachio rootstocks, in Pistachio Production Manual, ed. by Ferguson L Center for Fruit and Nut Research and Information, Davis, CA, pp. 67-73.
21- Gijon M.D., Gimenez C., Perez-Lopez D., Guerrero J., Couceiro J.F., and Moriana A. 2010. Rootstock influences the response of pistachio {*Pistacia vera* L. cv. Kerman) to water stress and rehydration. Scientia Horticulturae (Amsterdam), 125: 666-671.
22- Gill S.S., and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930.
23- Guy C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 41: 187-223.
24- Heath R.L., and Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125 (1): 189-198.
25- Hokmabadi H. 2016. Investigation of cold resistance in three commercial cultivars of pistachio Damghan and three major pistachio cultivars through ion leakage parameters. The final report of the research project of the Pistachio Research Institute of IRAN. 68 pages. (In Persian with English abstract)
26- Holt B.C. 2003. Substances which inhibit ice nucleation cryletters. Horticultural Reviews, 13: 215-237.
27- Honty K., Sárdi É., Stefanovits-Bányai É., and Tóth M. 2008. Frost induced changes in enzyme activities and carbohydrate content in the spurs of some pear cultivars during the dormancy. International Journal Horticultural Science, 14: 41-44.
28- Imani A., Barzegar K., and Piripireivatlou S. 2011. Relationship between frost injury and ion leakage as an indicator of cold hardiness in 60 almond selections. International Journal of Nuts and Related Sciences, 2(1): 22-26.
29- Irigoyen J.J., Einerich D.W., and Sánchez-Díaz M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativsa*) plants. Physiologia Plantarum, 84(1): 55-60.
30- Khorshidi M., Nojavan A.M. 2006. The effects of abscisic Acid and $CaCl_2$ on the activities of anti-oxidant enzymes under cold stress in maize seedlings in the dark. Journal of Biological Sciences, 9: 54-59.
31- Kim S.Y., Lim J.H., Park M.R., Kim Y.J., Park T.I., Seo Y. W., and Yun S.J. 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. BMB Reports, 38(2): 218-224.
32- Li B., Liu L.Q., Luo S.P., Li N., Li J., Cheng M.L., and Li L. 2012. Effects of low temperature stree on flower bud cold resistance of almonds. Journal of Xinjiang Agricultural University, 1: 002.
33- Liu B., Li M., Cheng L., Liang D., Zou Y., and Ma F. 2012. Influence of rootstock on antioxidant system in leaves and roots of young apple trees in response to drought stress. Plant Growth Regulation, 67(3): 247.
34- Lu J.X., Jiang H.Y., and Li W. 2012. Effects of low temperature stress on the cold resistance of rootstock and branch of wine grapes. Journal of Fruit Science, 29(6): 1040-1046.
35- Lučić B., Jovanović Ž., Radović S., and Maksimović V. 2009. Cold-induced response of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seedlings. Archives of Biological Sciences, 61(3): 3-4.
36- 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. Russian Journal of Plant Physiology, 49(6): 782-788.
37- Mansouri Dehsheebi R., Davari Nejad G.h., Hokmabadi H., and Tehranifar Z. 2011. Evaluation of changes in proline, total protein and soluble sugars during phonological stages of flower buds of Pistachio cultivars. Journal of Horticulture (Agricultural Science and Technology), 25(2): 121-116. (In Persian with English abstract)
38- Mohácsy M., Maliga P., and Mohácsy M. 1959. The peach. Agriculture Publisher, Budapest. 397 p.
39- Nadernejad N., Ahmadimoghadam A., Hossyinifard J., and Poorseyedi S. 2013. Effect of different rootstocks on PAL activity and phenolic compounds in flowers, leaves, hulls and kernels of three pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. Trees, 27(6): 1681-1689.
40- Nakano Y., and Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach choloroplast. Plant and Cell Physiology, 22: 867-880.
41- Palonen P., Buszard D., and Donnelly D. 2000. Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in *vitro* and in *vivo*. Physiologia Plantarum, 110: 393–401.
42- Perveen S., Anis M., and Aref I.M. 2013. Lipid peroxidation, H_2O_2 content, and antioxidants during acclimatization of *Abrus precatorius* to exvitro conditions. Biologia Plantarum, 57(3): 417-424.

43- Plewa M.J., Smith S.R., and Wagner E.D. 1991. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation Res, 247: 57-64.
44- Rodrigo J. 2000. Spring frost in deciduous fruit trees morphological damage and flower hardiness. Scintia Horticulture, 85: 155-173.
45- Salary Sorkhan R., Enteshari S., Hokmabadi H., and Tajabadipour A. 2011. Physiological evaluation of pistachio frost damage resistant rootstocks. International Journal of Nuts and Related Sciences, 2 (4): 55-66.
46- Sohrabi N., Hakam Abadi H., and Tajabadipour A. 2009. Freezing physiology in pistachio prees, Extension issue, Pistachio Research Institute of Iran. 35 p. (In Persian with English abstract)
47- Solari L., Johnson S., and Dejong T.M. 2006. Hydraulic conductance characteristics of peach (*Prunus persica*) trees on different rootstocks are related to biomass production and distribution. Tree Physiology, 26: 1343–1350.
48- Szabados L., and Savoure A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science, 15 (2): 89-97.
49- Vítámvás P., and Prášil I.T. 2008. WCS120 protein family and frost tolerance during cold acclimation, deacclimation and reacclimation of winter wheat. Plant Physiology and Biochemistry, 46(11): 970-976.
50- Wang W.B., Kim Y.H., Lee H.S., Yong Kim K., Deng X., and Wak S.K. 2009. Analysis of antioxidant enzymes activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 47(7): 570-577.
51- Weibel A., Johnson R.S., and DeJong T.M. 2003. Comparative vegetative growth responses of two peach cultivars grown on size-controlling versus standard rootstocks. Journal of the American Society for Horticultural Science, 128: 463–471
52- Xu S-C., Yong-Ping L., Hu J., Ya-Jing G., Yun-ye Z., and Shui-jin Z. 2010. Responses of antioxidant enzymes to chilling stress in tobacco seedlings. Agricultural Sciences in China, 9(11): 1594-1601.

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.3, Fall 2018, P. 471-484
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۴۸۴-۴۷۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Evaluation of Physiological and Biochemical Changes of Pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Ahmad-Aghaii) on Cold Tolerant and Sensitive Rootstocks under Freezing Stress Conditions

A. Tajabadipour[1]- M.R. Fattahi Moghadam[2] - Z. Zamani[3]- F. Nasibi[4]- H. Hokmabadi[5]

Received: 09-01-2018
Accepted: 01-09-2018

Introduction: Spring cold injury is one of the main limiting factors to production and distribution of pistachio. Pistachio is one of the most valuable and exported agricultural crops of Iran. Since, spring frosts results to considerabe damage to this plant, hence, it is important to investigate methods for reducing freezing damage. For this reason, selection of rootstocks and cultivars are an important objective in breeding programs. Freezing temperatures (below 0ºC) cause the movement of water from the protoplast to the extracellular space, resulting in the growth of extracellular ice crystals and ultimately, cell dehydration. Plants have developed complex processes to survive and recover from unfavorable conditions. To tolerate cold stresses, plants develop multiple mechanisms, including the accumulation of cryoprotective molecules and proteins, alterations in membrane lipid composition, and primary and secondary metabolite composition, as well as changes in global gene and protein expression Frost affects cell membranes, which become less permeable, and even break, giving rise to the leakage of solute from damaged cells. There is often a good correlation between ion leakage and freezing tolerance (22). Sugars may depress the freezing point of the tissue and act as a nutrient and energy reserve, alter phase properties of membranes in the dry state and act as cryoprotectants to preserve protein structure and function. Other compounds acting similarly are lipids, soluble proteins and free proline (44). Proline seems to have diverse roles under osmotic stress conditions, such as stabilization of proteins, membranes and subcellular structures and protecting cellular functions by scavenging reactive oxygen species (23). The aim of the present study was to evaluate different degrees of sensitivity to low temperatures in different genotypes and 'Ahmad-Aghaii' cultivar in relation to physiological and biochemical changes in field conditions.

Materials and Methods: In order to determine the effects of rootstock on pistachio cultivar 'Ahmad-Aghaii' under freezing stress conditions, an experiment was carried out as factorial based on a randomized completely design (RCD) with four replications. Treatments consisted of two levels: 1- rootstock genotype (four cold sensitive and tolerant rootstocks) and 2- temperatures (-2 and -4 ºC). The sampling was performed in full bloom stage from apical branches of pistachio cultivar 'Ahmad-Aghaii' budded on these rootstock genotypes. The branches in pots contain distillted water treated under -2 and -4 °C for 2 h. After treatment, the chilling index was determined. Flower clusters were used for measuring physiological and biochemical parameters. All determinations were carried out in four triplicates and data were subjected to analysis of variance. Analysis of variance was performed using the ANOVA procedure. Statistical analyses were performed according to the SAS software. Significant differences between means were determined by Duncan's multiple range tests. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results and Discussion: The results showed that chilling index was significantly lower in the cold-tolerant rootstocks than cold-sensitive rootstocks at -2 and -4 ºC. Also, Results indicated that electrolyte leakage, hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) were significantly lower in tolerant rootstocks than sensitive ones. The content of soluble carbohydrate, total protein and proline were significantly higher intolerant rootstocks than sensitive ones. The activity of anti-oxidant enzymes ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and catalase (CAT) in tolerant rootstocks was greater than sensitive rootstocks. The reaction

1- Assistant Professor, Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research,Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran
(*- Corresponding Author Email: tajabadi@pri.ir)
2 and 3- Professors, Horticultural Science and Landscape Department, University of Tehran, Karaj, Iran
4- Associate Professor, Biology Department, Faculty of Science, University of Shahid Bahonar, Kerman, Iran
5- Assistant Professor, Agriculture and Natural Resources Research Center, Shahrud, Iran

of temperature and rootstock indicated that electronic leakage, proline, H_2O_2, and MDA significantly increased in -4 ºC. The activity of anti-oxidant enzymes APX, GPX and CAT decreased in -4 ºC as compared to -2 °C especially in cold-sensitive rootstocks. Some researchers believe that the accumulation of proline is as an index to select the drought-resistance varieties (26, 48). Stated that there was no comprehensive information about the relationship between the accumulation of proline and tension resistance. Research on apricot and peach confirmed the results of the present study because this pattern is also seen in their proline level (26 and 41). While the starch concentration decreases during the dormancy, the amount of proline increases which is in accordance with their results (36).

Conclusions: In this study, the damage of the membrane increased with decreasing temperature. The results showed that the rootstocks could increase the resistance to cold by increasing the amount of soluble sugars, protein, proline and the activity of the antioxidant system in the shoots and leaves of the scion. Regarding physiological and biochemical studies, it was determined that 'Ahmad-Aghaii' cultivar budded on cold tolerant rootstocks had higher soluble sugars, total protein, proline and CAT, APX and GPX enzymes activity and had less chilling index, ion leakage, H_2O_2 and MDA, which indicates less damage to the membrane of the cell and its contents compared with the cultivar 'Ahmad-Aghaii' budding to sensitive rootstocks. Consequently, the findings of this study selected TR1 as the most tolerant rootstock compared to other ones.

Keywords: Antioxidant enzymes, Cold tolerance, Pistachio, Rootstock