



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 2322-2204
Vol. 15, Issue, No. 2, Summer 2023
Document Type: Research Paper
Received: 23/02/2024 Accepted: 15/04/2024

The effect of abscisic acid and salicylic acid on cold acclimation associated physiological and biochemical indices of chinaberry (*Melia azedarach* L.)

Homeyra Borumandi¹, Rouhollah Karimi¹ ^{*}, Mohamadreza Zokaei¹, Alireza Shayeganfar¹

¹ Department of Horticulture and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, Malayer University, Iran

Abstract

In the present study, the winter cold tolerance of 5-year-old chinaberry trees was investigated in response to salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) under a completely randomized design. Treatments included 1- Control (distilled water), 2- 100 μ M ABA, 3- 2 mM SA, and 4- 100 μ M ABA + 2 mM SA combination. One week after applying the treatments, leaves and buds were sampled and also the indices related to cold tolerance were evaluated during the winter in Jan. and Feb. under three temperature treatments of -6 -12 and -18 °C. The application of SA + ABA increased 42.4%, 50.3% and 21.4% of bud phenol, protein and proline content, respectively. Also, this treatment reduced 42.6, 36.1 and 37% of ion leakage, malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H₂O₂) of the buds, respectively. In January and February, the lowest ion leakage was related to trees sprayed with SA + ABA. The highest activity of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) was related to ABA treatment. However, the highest activity of guaiacol peroxidase (GPX) was related to SA + ABA and the lowest activity of these enzymes was related to the control. The highest endogenous ABA and the lowest gibberellic acid (GA₃) were related to SA + ABA treatment, and the lowest content of these phytohormones was related to the control trees. The content of putrescine, spermine and spermidine of treated plants with SA + ABA was 33.3, 16.9 and 9.37% higher than the control, respectively. In general, the application of ABA and salicylic acid can increase the cold tolerance in chinaberry trees by creating physiological and biochemical changes.

Introduction

Chinaberry (*Melia azedarach* L.) is a deciduous tree native to the semi-tropical areas of Australia and Southeast Asia. However, it is planted in many cold regions of the world.

* Corresponding Author: R.Karimi@malayeru.ac.ir



For this reason, improving the tolerance to cold and freezing damages of this tree has been one of the priorities of its planting in cold regions. One of the ways to increase cold tolerance is to use growth regulators such as SA and ABA. Foliar application of plants with SA increases cold tolerance by reducing ion leakage and cell membrane peroxidation. ABA plays an important role in cold acclimation of plants during exposure to low temperature. Since the effect of these growth regulators on cold tolerance of chinaberry trees has not been reported, therefore, we investigated the effects of exogenous SA and ABA on electrolyte leakage, soluble sugars, polyamines, ABA, GA₃, proline, total phenolic compounds, and water content in order to understand the tolerance mechanism of chinaberry trees under cold stress. Additionally, the effect of exogenous application of SA and ABA on cold tolerance and some physiological changes involved in cold acclimation was evaluated in chinaberry trees during cold acclimation stage.

Material and Methods

In the present study, the winter cold tolerance of 5-year-old chinaberry trees was investigated in response to SA and ABA application under a completely randomized design. Treatments included 1- Control (distilled water), 2- 100 µM ABA, 3- 2 mM SA, and 4- 100 µM ABA + 2 mM SA combination. One week after applying the treatments, some physiological traits including photosynthetic pigments, leaf abscission and periderm formation were recorded for each treatment group. Moreover, buds were sampled and their bud water content, total phenol, total soluble protein, proline, soluble sugars (glucose, fructose and sucrose), membrane stability indices (ion leakage, MDA and H₂O₂), phytohormones (ABA and GA₃), free polyamines (putrescine, spermidine and spermine) and activity of antioxidant enzymes (GPX, APX and CAT) were measured in this stage (Nov.). Also winter cold tolerance (based on ionic leakage) of treated and control plant were evaluated in January and February under three temperature treatments of -6 -12 and -18 °C. Finally, data were analyzed with SAS (9.1) software using GLM program and Duncan's multiple range test (5%).

Results and Discussion

Our results indicated that exogenous ABA especially in combination with SA led to an array of physiological changes in chinaberry plants during cold acclimation stages. The leaf photosynthetic pigment and bud water content was decreased but shoot periderm formation and leaf abscission increased by ABA + SA treatment. The application of SA + ABA increased 42.4%, 50.3% and 21.4% of bud phenol, protein and proline content, respectively. Biosynthesis and accumulation of osmoregulants is one of the important regulatory reactions of plants in response to environmental stresses. The highest content of soluble sugars including glucose, fructose and sucrose was related to SA + ABA treated trees and the lowest was related to the control. Also, this treatment reduced 42.6%, 36.1% and 37% of ion leakage, MDA and H₂O₂ of the buds, respectively. Cold stress, while increasing the peroxidation of membrane lipids and disrupting its permeability, caused the leakage of solutes and damage to the plant. The lower production of MDA and H₂O₂ in SA + ABA treated trees indicates the protective role of these hormones in membrane stability during cold acclimation period. In Jan. and Feb., the lowest ion leakage was related to trees sprayed with SA + ABA. The highest activity of CAT and APX was related to ABA treatment. However, the highest activity of GPX was related to those trees treated with SA + ABA and the lowest activity of these

enzymes was related to the control. Increased antioxidant capacity is one approach used by plants to improve their cold tolerance. Metabolic changes mediated by ABA and SA lead to changes in oxygen free radical levels, which in turn cause induction of the antioxidant defense system. The highest endogenous ABA and the lowest GA₃ were related to SA + ABA treatment, and the lowest content of these phytohormones was related to the control trees. ABA is an important signaling factor for low temperature stress and has a protective function for the microtubule structure of cells. The content of putrescine, spermine and spermidine of treated plants with SA + ABA was 33.3, 16.9 and 9.37% higher than the control, respectively.

Conclusion


The use of ABA, especially in combination with SA, with its effect on the physiological indices related to cold acclimation, led to a reduction in cold damage and ionic leakage of the membrane. The antioxidant properties of the treated plants were shown by increasing the activity of catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase enzymes and increasing the accumulation of phenolic compounds. On the other hand, the application of SA + ABA increase the compatible osmolytes, soluble sugars, polyamines and Phytohormones (ABA and GA₃) increased the cold tolerance in the treated chinaberry trees compared to the control, which can be used as a method to increase winter cold tolerance in chinaberry trees in cold climate regions.

Acknowledgements

Funding of the present research was provided by Malayer University of Iran (Grant No. 84.9–148). The authors gratefully acknowledge the Malayer University.

Key words: Antioxidant enzymes, Cold acclimation, Glucose, Ion leakage, Polyamines.

تأثیر اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با سازگاری به سرما در زیتون تلخ (*Melia azedarach* L.)

حمیرا برومندی^۱، روح الله کریمی^{۱*} , محمدرضا زکایی خسروشاهی^۱، علیرضا شایگان‌فر^۱
^۱ گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر تحمل سرمای زمستانه درختان ۵ ساله زیتون تلخ در پاسخ به کاربرد برگی اسید سالیسیلیک (SA) و اسید آبسزیک (ABA) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی بررسی شد. تیمارها شامل شاهد، ABA ۱۰۰ میکرومولار، SA ۲ میلی‌مولار و ABA ۱۰۰ میکرومولار + SA ۲ میلی‌مولار بود. یک هفته پس از اعمال تیمارها، نمونه‌برداری از برگ‌ها و جوانه‌ها انجام شد. همچنین، تحمل به سرمای زمستانه درختان تیمار شده و شاهد در دی و بهمن ماه بر اساس روش نشت یونی و تحت سه تیمار دمایی ۶-، ۱۲- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد. کاربرد ABA + SA به ترتیب سبب افزایش ۴۲/۴، ۵۰/۳ و ۲۱/۴ درصدی محتوای فنول، پروتئین و پرولین جوانه شد. همچنین، این تیمار سبب کاهش ۴۲/۶، ۳۶/۱ و ۳۷ درصدی نشت یونی، مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن جوانه شد. در دی و بهمن ماه، کمترین میزان نشت یونی مربوط به درختان محلول‌پاشی شده با ترکیب هردو تنظیم‌کننده رشد بود. بیشترین فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز مربوط به تیمار ABA به تنهایی بود. با این حال، بیشترین فعالیت گایاکول پراکسیداز مربوط به تیمار ABA + SA و کمترین فعالیت این آنزیم‌ها مربوط به شاهد بود. بیشترین محتوای ABA و کمترین محتوای اسید جیبرلیک درون‌زاد مربوط به تیمار ABA + SA و کمترین محتوای این هورمون‌ها مربوط به شاهد بود. محتوای پوتریسین، اسپریمین و اسپرمیدین درختان تیمار شده با ABA + SA به ترتیب ۳۳/۳، ۱۶/۹ و ۹/۳۷ درصد بیشتر از شاهد بود. در کل کاربرد ABA و SA توانست با ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی منجر به افزایش تحمل به سرما در زیتون تلخ شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پلی‌آمین‌ها، سازگاری به سرما، گلوکز، نشت یونی

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: r.Karimi@malayeru.ac.ir، شماره تماس: ۰۸۱۳۲۳۵۵۳۸۰



مقدمه

زیتون تلخ (*Melia azedarach* L.) درختی خزان‌پذیر از تیره زیتون‌تلخیان است. این گونه بومی نواحی نیمه‌گرمسیری استرالیا و آسیای جنوب‌شرقی می‌باشد که تا دمای حدود 40°C بدون مشکل خاصی رشد می‌کند. در دمای گرم‌تر نیز از بین نمی‌رود، اما از رشد و شادابی آن کاسته می‌شود. با این حال، این گونه یک گیاه نیمه‌گرمسیری و حساس به سرما می‌باشد. این درخت تحمل به سرمای کمی داشته و در مناطقی با دمای هوای کمتر از 10°C - ممکن است به طور کامل دچار یخزدگی شده و یا شاخساره درخت آسیب جدی ببیند (Batcher, 2008). با این حال عادت رشدی، رشد سریع، جنبه‌های زینتی برگ، گل و میوه و نیز اجتناب (فراسردی) و تحمل یخزدگی به دمای‌های پائین سازگار می‌شوند. فرایند سازگاری به سرما با کاهش محتوای آب بافت‌ها، تجمع تنظیم‌کننده‌های اسمزی از قبیل کربوهیدرات‌های محلول، اسیدهای آمینه، تغییر در محتوای تنظیم‌کننده‌های رشد شامل افزایش اسید آبسزیک و کاهش جیبرلین و رسوب بیشتر ترکیبات فنولی از قبیل چوب‌پنبه و لیگنین در اپیدرم و فلس‌های جوانه همراه است (Karimi, 2017; Yang et al., 2018). همچنین تنش سرما با تغییر سیالیت غشاء، پتانسیل آب کم، ترکیب لیپیدی، کاهش عرضه ATP، تجمع ترکیبات سمی، عدم تعادل عرضه یون و نشت املاح به غشای سلولی در گیاهان آسیب می‌رساند (Adhikari et al., 2022). از طرفی تحت تنش سرما، افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گایاکول‌پراکسیداز و آسکوربات

تحمل به خشکی و آفت این درخت (Han et al., 2022) سبب توسعه کاشت آن در نقاط سردسیر کشور شده است. تاکنون بیشتر پژوهش‌های انجام شده روی زیتون تلخ شامل بررسی فنولوژی، کشت و تولید بذر، تحمل به تنش‌های محیطی (شوری، خشکی، فلزات سنگین)، کارکرد دارویی، استفاده همه‌جانبه و ترکیبات شیمیایی موجود در پوست، برگ و میوه بوده است (Sultana et al., 2014; Han et al., 2022; Liao et al., 2022) و تحمل به سرمای این درخت کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. به این دلیل بهبود تحمل به سرما و یخزدگی زیتون تلخ از اولویت‌های کاشت این گونه چوبی در نقاط سردسیری می‌باشد. تحمل به سرما فرایندی پویا بوده و بافت‌های مختلف گیاهان با دو سازوکار پراکسیداز) سبب خنثی کردن فعالیت گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) شده و از سامانه فتوسنتزی در برابر صدمات ایجاد شده در اثر تنش اکسایشی در بیشتر گونه‌های گیاهی محافظت می‌کند (Pagter et al., 2008; Karimi et al., 2016).

روش‌های مختلفی برای کاهش یا کنترل خسارت سرمازدگی در درختان وجود دارد. یکی از روش‌های افزایش تحمل به سرمازدگی، استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد از جمله اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک است. اسید سالیسیلیک ضمن افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سبب کاهش سمیت رادیکال‌های آزاد می‌شود که بر اثر خسارت سرمازدگی تجمع یافته‌اند و به این طریق خسارت ناشی از تنش سرمایی را کاهش می‌دهد. همچنین، کاربرد اسید سالیسیلیک سبب افزایش محتوای پلی-آمین‌ها می‌شود که نقش مهمی در ایجاد تحمل به

تحمل سرما در انگور منجر می‌شود (Karimi & Ershadi, 2015). تیمار اسید آبسزیک با کاهش محتوای آب و صدمات اکسایشی به غشاء (پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و تولید پراکسید هیدروژن) و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب افزایش تحمل به سرمای انگور شده است (Karimi et al., 2016). کنش جغرافیایی و رشد و نمو درختان زیتنی به میزان زیادی تحت تأثیر دماهای پائین زمستان قرار می‌گیرد. بنابراین، ارزیابی تحمل به سرمای زمستان و شناخت سازوکارهای درگیر در آن با هدف انتخاب گونه‌های مناسب برای اقلیم‌های مختلف یکی از اولویت‌های مهم در برنامه‌های مدیریت پایدار درختان در پارک‌ها و فضاهای سبز شهری به‌ویژه در مناطق معتدل و سردسیر می‌باشد. از طرفی کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای افزایش سازگاری به سرما و بهبود تحمل به سرمای آنها یکی از روش‌های کاهش اثرات سرمازدگی است. همچنین تاکنون اثر اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک بر تحمل به سرمای درخت زیتون تلخ گزارش نشده است. بنابراین، در این پژوهش تحمل به سرمای زمستانه درخت زیتون تلخ با روش نشت یونی ارزیابی و ارتباط بین تحمل به سرما و غلظت کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های محلول و پرولین جوانه این درخت در پاسخ به کاربرد آخر فصل این تنظیم‌کننده‌های رشد بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارها

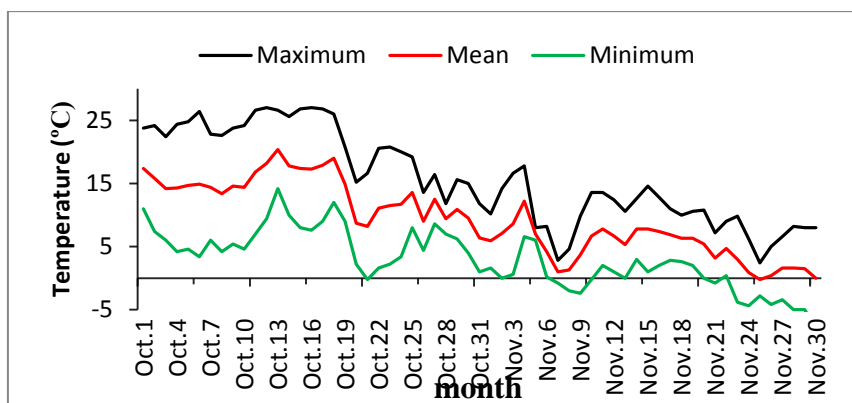
این پژوهش در پائیز و زمستان ۱۴۰۰ روی درختان ۵ ساله زیتون تلخ واقع در محوطه دانشگاه

سرما دارند (Jalili et al., 2023). محلول‌پاشی قلمه‌های انگور با اسید سالیسیلیک با افزایش پایداری غشاء، کاهش نشت یونی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی سبب افزایش تحمل به تنش سرما شده است (Ershadi & Taheri, 2013).

اسید آبسزیک نقش مهمی در پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزنده از جمله سرما دارد. تغییر محتوای این هورمون گیاهی طی دوره رکود در جوانه‌های بسیاری از گونه‌های گیاهی به خوبی اثبات شده است. پیشنهاد شده که اسید آبسزیک با تنظیم رکود جوانه در ارتباط است؛ زیرا با ورود گیاه به دوره رکود معمولاً محتوای آن افزایش یافته و در مرحله رکود عمیق در زمستان به حداکثر می‌رسد (Pagter et al., 2008). مصرف خارجی اسید آبسزیک روی برگ‌ها منجر به افزایش اسید آبسزیک درونی شده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را بالا می‌برد (Karimi et al., 2016). کاربرد خارجی اسید آبسزیک می‌تواند گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن را حذف کرده و با افزایش پایداری غشای سلولی، آسیب تنش‌ها به گیاه را کاهش دهد (Karimi et al., 2016). اسید آبسزیک با تنظیم بیان یک سری ژن‌های کلیدی طی دوره سازگاری به سرما نقش مهمی در تحمل به سرما و یخ‌زدگی درختان دارد (Zhang et al., 2008; Karimi et al., 2016). پژوهش‌های متعددی حاکی از توانایی کاربرد خارجی اسید آبسزیک در افزایش تحمل یخ‌زدگی گیاهان هستند. برای مثال، کاربرد برگی اسید آبسزیک با افزایش تجمع کربوهیدرات‌های محلول، پروتئین‌های محلول، پرولین و کاهش نشت یونی به افزایش

میلی مولار و ۴- اسید آبسزیک ۱۰۰ میکرومولار + اسید سالیسیلیک ۲ میلی مولار بود (Karimi & Ershadi, 2015). محلول پاشی تاج درخت با یک سمپاش ۶ لیتری تا مرحله آب چک انجام شد. این کار طی دو مرحله با فاصله زمانی ۱۲ ساعت در اواسط پاییز (۱۵ آبان ماه) انجام شد. نمونه برداری یک هفته پس از اتمام محلول پاشی در دهه سوم آبان ماه (۲۳ آبان ماه) از برگ‌ها و جوانه‌های شاخه‌های یکساله واقع در میانه بیرونی هر سمت تاج انجام و برای اندازه‌گیری سایر صفات استفاده شد. دمای حداقل، میانگین و حداکثر مکان آزمایش در شکل ۱ آورده شده است.

ملایر (ملایر، ایران) و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار (سه درخت) انجام شد. درختان با فواصل منظم در ردیف‌های شرقی-غربی تحت سیستم آبیاری قطره‌ای در بستری از خاک لومی رسی کاشته شده و دارای شرایط رشد، تغذیه و هرس یکسانی بودند. در این آزمایش، اثر کاربرد برگی اسید آبسزیک و اسید سالیسیلیک بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با سازگاری به سرما (اوایل تا اواخر آبان ماه) در درختان زیتون تلخ بررسی شد. تیمارهای محلول پاشی شامل ۱- آب مقطر (شاهد)، ۲- اسید آبسزیک ۱۰۰ میکرومولار، ۳- اسید سالیسیلیک ۲



شکل ۱- دمای حداقل، میانگین و حداکثر در بازه زمانی دهم مهر (Oct.1) تا ۱۰ آذر ماه (Nov.30) در منطقه مورد بررسی (دانشگاه ملایر)

Figure 1- Minimum, average and maximum temperature in the period from October 1 (Oct. 1) to November 30 (Nov. 30) in the study area (Malayer University)

زمانی مشخص (آخرین مرحله محلول پاشی تا ۵۰ درصد خزان کل برگ‌های تاج درخت) تعیین شد. درصد تشکیل پریدرم با امتیازدهی رنگ پوست اپیدرم خارجی (پریدرم) شاخه‌های یکساله (۵ شاخه از میانه بیرونی هر سمت تاج، مجموع ۲۰ شاخه) به کل شاخه‌های شمارش یافته از ۱ تا ۵ (رنگ سبز تا قهوه‌ای) مشخص شد (Karimi & Ershadi, 2015). اندازه‌گیری محتوای آب جوانه

سنجش شاخص‌های مورد بررسی در مرحله آبان‌ماه

غلظت کلروفیل‌های a, b و کل و کاروتنوئید کل به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری و بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر بیان شد (Dere et al., 1998). درصد خزان برگ با شمارش تعداد برگ‌های ریزش یافته از تعداد مشخصی شاخه (۵ شاخه در درخت) به کل برگ‌های شاخه در بازه

شد. سنجش غلظت پروتئین محلول با معرف رنگی بریلینت بلو (G-250) در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد (Bradford, 1976). توسط منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف آلبومین گاوی، غلظت پروتئین محلول بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر بیان شد. برای سنجش پرولین عمل استخراج با کمک اسید سولفوسالیسیلیک و اندازه‌گیری با حضور اسید استیک و معرف نین هیدرین انجام شد. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۸ نانومتر قرائت و غلظت پرولین جوانه بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر تعیین شد (Bates et al., 1973). استخراج و اندازه‌گیری فنول کل به روش معرف فولین - سیوکالتیو در حضور کربنات سدیم انجام شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت و بر اساس میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر بیان شد (Veliloglu et al., 1998). اندازه‌گیری قند محلول کل با روش رنگ‌سنجی به کمک آنترون در حضور اسید سولفوریک و در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد (Yemm & Willis, 1954). غلظت قند محلول بر اساس منحنی استاندارد گلوکز تعیین و به صورت میلی گرم بر گرم وزن تر بیان شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، نمونه‌های بافت تازه جوانه (۱۰۰ میلی گرم) در ازت مایع کوبیده شده و تا زمان مصرف در دمای °C ۸۰- نگهداری شدند. فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (Nakano & Asada, 1981)، کاتالاز (Bergmeyer, 1970) و گایاکول پراکسیداز (Herzog & Fahimi, 1973) به ترتیب در طول موج‌های ۲۹۰، ۲۴۰ و ۴۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شدند. هر یک واحد از فعالیت

با توزین جوانه‌ها قبل و بعد از قرار دادن در آون (مدت سه روز در دمای °C ۷۰) تعیین شد (Webster & Ebdon, 2005).
نشت یونی جوانه در مرحله آبان ماه بدون اعمال تیمار سرمادهی مصنوعی و با نمونه‌گیری از شاخه‌ها در ۲۳ آبان ماه (بر اساس سرمای محیط) اندازه‌گیری شد. از شاخه‌های نمونه‌برداری شده مربوط به هر تیمار، تعداد پنج جوانه جدا و در قوطی‌های حاوی ۴۰ میلی لیتر آب مقطر غوطه‌ور شد. قوطی‌ها به مدت ۱۵ ساعت روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شدند (Karimi & Ershadi, 2015). همچنین هدایت الکتریکی (EC_1) آنها با دستگاه هدایت سنج (آتاگو، ژاپن) اندازه‌گیری شد. سپس قوطی‌ها به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو (°C ۱۲۱) و هدایت الکتریکی مجدد اندازه‌گیری (EC_2) و نشت یونی (EL) از رابطه $EL = (EC_1/EC_2) \times 100$ محاسبه شد (Campos et al., 2001).
پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء بر اساس غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) تولید شده در اثر آسیب به غشاء و واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد. پس از استخراج با تری کلرواستیک اسید، جذب نمونه‌ها در دو طول موج ۶۰۰ و ۵۳۲ نانومتر خوانده و بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد (Health & Packer, 1968). اندازه‌گیری محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به روش Loreto & Velikova (2001) انجام شد. غلظت پراکسید هیدروژن نمونه‌ها توسط مقایسه جذب آن‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر و منحنی استاندارد آن در طیفی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومول بر میلی لیتر محاسبه و بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر بیان

گلوکز، فروکتوز و ساکاروز، نوع و مقدار قندهای محلول در نمونه‌های مجهول مشخص و به صورت میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد (Comis et al., 2001). برای استخراج و اندازه‌گیری پلی‌آمین‌ها مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی (جوانه) در ۲ میلی‌لیتر محلول ۴ درصد ClO_4H حاوی ۱ و ۷ دی‌آمینوپتتان (۵ میلی‌گرم در لیتر از اسید کلریدریک ۲ نرمال) هموژن شد. پس از یک ساعت ماندن در دمای 4°C از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس روی ۰/۲ میلی‌لیتر از این محلول، مقدار ۱ میلی‌لیتر بافر کربنات با $\text{pH}=9$ و یک میلی‌لیتر دانسیل کلراید (۱۰ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر استون) اضافه و به‌خوبی به هم زده شد. این مخلوط به مدت یک ساعت در دمای 60°C و در تاریکی قرار داده شد و سپس تا زمان تزریق به دستگاه HPLC در یخچال نگهداری شد. پس از این مراحل پلی‌آمین‌ها به فرم دانسیله در می‌آیند که توسط ۳ میلی‌لیتر تولوئن از مواد دیگر جدا شده و سپس به دستگاه HPLC تزریق شد. برای اندازه‌گیری غلظت پلی‌آمین‌ها ۱۰ میکرولیتر از محلول پایانی مرحله جداسازی، به ستون کوچک با طول ۱۰ سانتی‌متر و قطر داخلی ۳ میلی‌متر فاز معکوس از نوع Chorompack-Nederland متصل به دستگاه HPLC مدل 200 Unickam-crystal ساخت انگلستان، تزریق شد. فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل فوق خالص و آب دیونیزه به ترتیب با نسبت ۷۲ به ۲۸ حجم به حجم می‌باشد که با سرعت ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه حرکت آن با سیستم ایزوکرایک انجام می‌شود. آشکارساز دستگاه از نوع UV و در طول موج ۳۳۷ نانومتر تنظیم شد. اندازه-

آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز به عنوان مقداری از این آنزیم‌ها به صورت جداگانه در نظر گرفته شد که به کاهش یک میکرومول H_2O_2 در هر دقیقه منجر می‌شود. هر واحد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که سبب اکسیده شدن یک میکرومول آسکوربات در هر دقیقه می‌شود. میزان فعالیت هر سه آنزیم بر حسب واحد در میلی‌گرم پروتئین جوانه بیان شد. خواندن مربوط به تمامی شاخص‌های اندازه‌گیری شده در پژوهش حاضر با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS مدل SPEKOL 2000 شرکت AnalytikJena آلمان انجام شد.

برای استخراج قندهای محلول ابتدا جوانه‌ها از شاخه یکساله جدا و در ازت مایع منجمد و در مرحله بعد بافت‌ها با کمک ازت مایع کاملاً پودر شدند. سپس نیم گرم از بافت پودر شده توزین و در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ محلول و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. این محلول از صافی ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد تا برای تفکیک قندها به دستگاه HPLC تزریق شود. برای جداسازی قندها از دستگاه HPLC مدل Unicom-Crystal-200 ساخت کشور انگلیس که مجهز به آشکارساز Photodiode SPD MLOAD از نوع UV-Vis array بود استفاده شد. مقدار تزریق ۱۰ میکرولیتر و ستون به کار گرفته شده Spherisorb C8-ODS₂ به ابعاد طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات ۰/۳ میکرون بود. فاز متحرک شامل بافر سترات سدیم $\text{pH}=5/5$ و استونیتریل فوق خالص با نسبت ۹۹:۱ و با سرعت عبور ۰/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. بر اساس زمان بازداری و توسط استانداردهای

ساخت کشور انگلیس تزریق شد. فاز متحرک از متانول ۲۰ تا ۷۵٪ در اسید استیک ۱٪ با نرخ جریان ۰/۱ میلی‌لیتر در دقیقه شده برای جیرلین و ۱/۲ میلی‌لیتر در دقیقه برای اسید آسبزیک تشکیل شده بود. از آشکارساز UV-Vis SPD MLOAD نوع Photodiode array در طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده شد. بر اساس زمان بازداری طبق نمونه استاندارد اسید آسبزیک و اسید جیرلیک و سطح زیر منحنی، مقدار اسید آسبزیک و جیرلین نمونه‌ها مشخص و به صورت نانوگرم در گرم وزن تر بیان شد.

سنجش تحمل به سرمای زمستانه

در این مرحله به ازای هر تیمار دمایی از اطراف درختان پنج شاخه به طول ۲۰-۱۵ سانتی‌متر از گره‌های میانی شاخه‌های یکساله واقع در میانه بیرونی هر سمت تاج نمونه‌گیری شد. برای حذف آلودگی‌های سطحی، شاخه‌های یکساله با آب مقطر شستشو شدند. پس از حذف رطوبت اضافی با دستمال حوله‌ای، ۵ شاخه از هر تیمار درون کیسه‌های فریزر مجزا گذاشته و در معرض تیمارهای سرمایی مختلف (۶-، ۱۲- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد) در یک اتاقک سرماساز ترموگرادیان (رادالکترونیک، تهران) قرار داده شد. تیمارهای سرمایی بر اساس دمای پیش تیمار، سه روز قبل از شروع آزمایش اصلی تعیین شد. دمای شروع تیمار سرمایی بر اساس دمای محیط در روز نمونه‌برداری تعیین و روند کاهش دمای اتاقک سرماساز ۲°C در هر ساعت بود. نمونه‌های شاخه به مدت دو ساعت در تیمار نهایی سرما نگه داشته شد. بعد از اعمال

گیری پلی‌آمین‌های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین به روش (Walter & Geuns, 1987) انجام شد.

استخراج و اندازه‌گیری هورمون‌های درون‌زا گیاهی شامل اسید آسبزیک و اسیدجیرلیک به شرح ذیل انجام شد (Li et al., 2010). برای استخراج، یک گرم پودر منجمد شده بافت جوانه‌ها به ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪، ۰/۰۱ گرم پلی‌وینیل - پیرولیدون (PVP) و ۰/۰۱ گرم ویتامین ث اضافه و به مدت یک شب در دمای ۴°C روی شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد تا عمل انحلال هورمون اسید آسبزیک به خوبی صورت شود. سپس مخلوط هموزن شده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ و محلول رویی آن جدا شده و pH آن به ۸ رسانده شد. عمل استخراج از رسوبات باقیمانده دو بار تکرار شد. بعد از صاف کردن عصاره با کاغذ صافی (واتمن شماره ۱)، متانول اضافی تبخیر داده شد و سپس pH بخش باقیمانده با اسید هیدروکلریک ۰/۲ نرمال در حدود ۲/۵ تنظیم شده و به آن ۱۰ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه شد. سپس اتیل استات تبخیر شده و به رسوب باقیمانده یک میلی‌لیتر محلول متانول ۳٪ و اسیداستیک ۰/۱ مولار اضافه شد تا به صورت محلول درآید. مخلوط حاصل توسط صافی ۰/۴۵ میکرونی پالایش و از آن ۲۰ میکرولیتر برای مرحله ارزیابی برداشت شد.

ارزیابی با دستگاه HPLC: مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول استخراج شده به ستون Diamonsic-C18 با قطر ذرات ۵ میکرومتر، طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر با سیستم فاز معکوس در دستگاه HPLC مدل Unicam-Crystal-200

غلظت این رنگیزه‌ها ایجاد شد (جدول ۱). در پژوهشی بر روی زیتون تلخ همزمان با اعمال تنش خشکی به علت افزایش محتوای اسید آبسزیک برگ، محتوای کلروفیل برگ و سرعت فتوسنتز کاهش پیدا کرد (Han et al., 2022). این نتایج با یافته‌های قبلی از اثر اسید آبسزیک بر محتوای کلروفیل انگور طی مرحله سازگاری به سرما مطابقت دارد (Karimi et al., 2016). با این حال، در آزمایشی بر روی برگ‌نوی درخشان که یک گیاه زیتنی همیشه‌سبز است، مصرف اسید سالیسیلیک برون‌زاد به افزایش محتوای کلروفیل برگ منجر شد (Yang et al., 2018) که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی ندارد. این نتیجه ممکن است با عادت رشدی درخت برگ‌نو که همیشه‌سبز است در مقایسه با درخت زیتون تلخ که خزان‌پذیر است مرتبط باشد. زیرا در مرحله سازگاری به سرما در درختان خزان‌پذیر تسریع در تجزیه کلروفیل و زرد شدن برگ‌ها یکی از سازوکارهای سازگاری به سرماست که در پژوهش حاضر توسط اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک تحریک شده است (Liu et al., 2019).

تیمارهای سرمایی، شاخه‌ها از اتاقک سرماساز خارج و به منظور ذوب شدن تدریجی ابتدا ۲ ساعت در دمای 4°C و سپس ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند (Karimi & Ershadi, 2015). سپس از شاخه‌های اختصاص یافته به هر تیمار دمایی (سه تکرار)، پنج جوانه جدا و در قوطی‌های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور و نشت‌یونی آنها اندازه‌گیری شد (Campos et al., 2001; Karimi & Ershadi, 2015).

تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات به دست آمده، با نرم افزار (9.1.3) SAS انجام شد. اثر تیمارها و اثر متقابل بین آنها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن بررسی و نمودارها با نرم افزار Excel 2013 رسم شد.

نتایج و بحث

رنگیزه‌های فتوسنتزی

کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد در مرحله سازگاری به سرما سبب کاهش غلظت کلروفیل‌های a، b و کلروفیل کل برگ زیتون تلخ شد، به طوری که این اثر وابسته به نوع تنظیم‌کننده رشد بوده و در پاسخ به کاربرد اسید آبسزیک کاهش بیشتری در

جدول ۱- اثر کاربرد برگی اسید سالیسیلیک (SA) و اسید آبسزیک (ABA) بر محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای برگ زیتون تلخ در مرحله سازگاری به سرما (آبان ماه)

Table 1- The effect of foliar application of salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) on Chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids content of chinaberry leaf during cold acclimation stage (November)

Treatment	chlorophyll a ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$)*	chlorophyll b ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$)	total chlorophyll ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$)	Carotenoids ($\text{mg g}^{-1}\text{FW}$)
Control	3.69 ^a	1.84 ^a	5.54 ^a	0.95 ^c
SA	3.29 ^b	1.60 ^{ab}	4.89 ^b	0.97 ^c
ABA	3.11 ^c	1.23 ^c	4.35 ^c	1.18 ^a
SA+ABA	3.20 ^{bc}	1.52 ^b	4.72 ^b	1.01 ^b

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری (سطح ۵ درصد) اختلاف معنی‌داری ندارند.

*Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference (5% level).

که نشان دهنده سازگاری به سرما در بافت‌های جوانه و شاخه است. علاوه بر این، اسید آبسزیک یکی از هورمون‌هایی است که در مهار رشد شاخساره‌ها، رشد برگ و رشد پریدرم مؤثر است (Karimi & Ershadi, 2015). همچنین، چوبی شدن (افزودن لیگنین) یک فرایند فیزیولوژیکی پویا است که در طی رشد عادی گیاه در پاسخ به چندین تنش محیطی در سطوح مختلف رخ می‌دهد. افزودن لیگنین به دیواره‌های سلولی به سفتی ساختاری و دوام بافت‌های گیاهی منجر می‌شود (Lee et al., 2007). قابل ذکر است که محتوای لیگنین و ترکیب چوب به شدت در درون و بین گونه‌ها، بین مراحل رشد و در پاسخ به نشانه‌های محیطی متفاوت می‌باشد. برای مثال، در اکالیپتوس، ساختار و محتوای لیگنین تحت تأثیر وضعیت نیتروژن گیاه است به گونه‌ای که به علت تأخیر در توقف رشد آخر فصل و رقیق شدن ترکیب‌های فنولی پیچیده (لیگنین و سوبرین)، میزان تشکیل پریدرم و خشبی شدن چوب در این درختان کم می‌شود (Ployet et al., 2018). در پژوهشی بر روی نهال‌های ۶ ماهه اکالیپتوس، کاربرد طولانی مدت تنش سرما سبب رسوب بیشتر و ضخیم‌تر لیگنین در دیواره آوندهای چوبی و نیز، تنظیم ژن‌های سازنده دیواره یاخته‌ای به‌ویژه ژن‌های دخیل در بیوسنتز لیگنین در سطح رونویسی شده است (Ployet et al., 2018) که تأییدی بر یافته‌های پژوهش حاضر است. علاوه بر این، در پژوهش حاضر تشکیل پریدرم در درختان تیمار شده با اسید آبسزیک بیش از دیگر تیمارها بود که این تأثیر

به‌طور کلی، کاهش کلروفیل در پاسخ به کاربرد آخر فصل اسید آبسزیک می‌تواند به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز باشد. همچنین، تسریع در روند سازگاری به سرما از طریق تغییر در تعادل هورمون‌ها، مانع از فعالیت آنزیمی و سنتز کلروفیل در سلول می‌شود که این نقصان با کاربرد خارجی اسید آبسزیک و اسید سالیسیلیک تقویت شده و سبب کاهش پایداری کلروفیل برگ در پژوهش حاضر شده است. کاروتنوئیدها یکی از رنگیزه‌های فتوسنتزی هستند که میزان آن‌ها تحت تأثیر تنش سرما به شدت کم می‌شود. افزایش میزان کاروتنوئیدها در پاسخ به تیمار اسید آبسزیک نشان دادند این هورمون اثر معنی‌داری بر میزان کاروتنوئید داشته و سبب افزایش این ترکیب در برگ زیتون تلخ در مرحله سازگاری به سرما کمی قبل از شروع خزان شد (جدول ۱) که با نتایج پژوهش‌های کاربرد اسید آبسزیک در انگور (Karimi et al., 2016) مطابقت دارد.

تشکیل پریدرم و ریزش برگ

بیشترین و کمترین درصد تشکیل پریدرم شاخه به ترتیب مربوط به تیمار کاربرد اسید آبسزیک به تنهایی و شاهد بود. همچنین، بیشترین و کمترین درصد ریزش برگ به ترتیب مربوط به تیمار کاربرد اسید آبسزیک و تیمار کاربرد سالیسیلیک اسید به تنهایی بود (جدول ۲). سازگاری به سرما در درختان با کاهش و توقف کامل رشد و به دنبال آن پیری و ریزش برگ و توسعه پریدرم همراه است. بنابراین، توسعه پریدرم که بلوغ چوب نیز نامیده می‌شود، یکی از تغییرهای ریخت‌شناسی مهم است

جوانه‌ها در مرحله شروع سازگاری به سرما را تحت تأثیر قرار دهد که در پژوهش حاضر با تشکیل پریدرم بیشتر در درختان تیمار شده با این تنظیم کننده رشد در مقایسه با درختان شاهد تأیید شد.

می‌تواند در اثر تغییر مورفوفیزیولوژیکی و نیز، رسوب محتوای لیگنین بیشتر در درختان زیتون تلخ تیمار شده با این هورمون باشد. از سوی دیگر، کاربرد اسید سالیسیلیک از راه تأثیر بر بیوسنتز ترکیبات فنولی نیز ممکن است بیوسنتز لیگنین در

جدول ۲- اثر کاربرد برگی اسید سالیسیلیک (SA) و اسید آبسزیک (ABA) بر ریزش برگ، تشکیل پریدرم شاخه، محتوای آب، فنول کل و پروتئین محلول جوانه زیتون تلخ در مرحله سازگاری به سرما (آبان ماه)

Table 2- The effect of foliar application of salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) on leaf abscission, shoot periderm formation, bud water content, bud total phenolic contents and bud soluble proteins content of chinaberry during cold adaptation stage (November)

Treatment	Leaf abscission (%) [*]	Periderm formation (%)	Water content (%)	Total phenolic (mg g ⁻¹ FW)	Soluble proteins (mg g ⁻¹ FW)
Control	40.3 ^b	66.0 ^b	76.85 ^a	7.15 ^c	2.11 ^c
SA	17.3 ^c	68.3 ^b	72.67 ^b	10.59 ^b	2.83 ^{cb}
ABA	56.6 ^a	83.3 ^a	64.11 ^c	10.44 ^b	3.40 ^{ab}
SA+ABA	22.3 ^c	68.3 ^b	68.37 ^{bc}	12.42 ^a	4.19 ^a

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری (سطح ۵ درصد) اختلاف معنی‌داری ندارند.

*Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference (5% level).

فنول کل

بیشترین محتوای فنول کل جوانه مربوط به تیمار کاربرد ترکیبی اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک و کمترین آن مربوط به شاهد بود (جدول ۲). بیشترین محتوای فنول کل مربوط به درختان تیمار شده با ترکیب اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک بود که در مقایسه با شاهد تا ۴۲/۴۳ درصد افزایش داشت. این تغییر ممکن است ناشی از افزایش لیگنین و سوپرین به عنوان دو ترکیب فنولی پلیمری ساختاری برای افزایش چوبی شدن و چوب‌پنبه‌ای شدن جوانه جهت افزایش تحمل به سرما باشد (Karimi, 2017). افزایش ترکیبات فنولی در این گیاهان ممکن است به عنوان یک سازوکار برای غلبه بر تنش اکسایشی ناشی از تنش سرما عمل کند. کاربرد برگی اسید آبسزیک در انگور، تحمل به تنش سرما را از طریق افزایش ترکیبات فنولی

محتوای آب جوانه

کمترین محتوای آب در جوانه درختان تیمار شده با اسید آبسزیک به تنهایی مشاهده شد که البته با تیمار ترکیب اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک اختلاف معنی‌داری نداشت و بیشترین محتوای آب جوانه مربوط به درختان شاهد بود (جدول ۲). افزایش سازگاری به سرما در جوانه‌های درختان خزان‌دار با خروج تدریجی آب جوانه‌ها، کاهش آب قابل انجماد و در نتیجه، افزایش تحمل به یخ‌زدگی همراه است. کاهش محتوای آب جوانه‌ها در مرحله سازگاری به سرما اغلب با هدف تغلیظ شیره سلولی (افزایش قندهای محلول و پرولین) در راستای فرایند سازگاری به سرما تفسیر می‌شود که می‌تواند تحت تأثیر کاربرد تنظیم کننده‌های رشد از جمله اسید آبسزیک باشد که در پژوهش‌های دیگر روی انگور نیز گزارش شده است (Karimi & Ershadi, 2015).

افزایش داده است که نشانه دخالت این هورمون در مسیرهای ساخت ترکیبات فنولی به‌ویژه در گیاهان تحت تنش هستند (Karimi et al., 2016). همچنین، تجمع ترکیبات فنولی در اثر کاربرد برون-زاد اسید سالیسیلیک توسط عباسی کاشانی و همکاران (Abbasi Kashani et al., 2020) در نهال‌های انگور گزارش شده است که نتایج حاصل از پژوهش حاضر را تأیید می‌نماید.

پروتئین‌های محلول

در درختان تیمار شده با اسید آبسزیک و اسید سالیسیلیک محتوای پروتئین‌های محلول در مقایسه با شاهد افزایش یافت (جدول ۲) که با نقش تعدیل‌کنندگی هورمون اسید آبسزیک در تحمل به سرمای پائیزه در انگور (Karimi & Ershadi, 2015) و اسید سالیسیلیک در تحمل به سرمای بهاره در انگور (Ershadi & Taheri, 2013) و برگ‌نوی درخشان (Yang et al., 2018) توسط تولید پروتئین‌های محلول مطابقت دارد. افزایش پروتئین‌های محلول یکی از معمول‌ترین تغییرات بیوشیمیایی است که می‌تواند سبب محافظت گیاه از صدمات کشنده آب‌کشیدگی تحت تأثیر دمای پائین شود. پروتئین‌های محلول نیز همانند پرولین از محلول‌های سازگار هستند که از عوامل ارتقای مقاومت گیاه در برابر تنش سرما محسوب می‌شود. بنابراین، با سرد شدن هوا، گیاه از طریق تولید این درشت‌مولکول‌ها می‌تواند تا حدودی بر شرایط تنش چیره شود (Adhikari et al., 2022). اثرات محافظتی پروتئین‌ها در غشاهای سلولی و ساختارهای مختلف سلولی به خوبی مشخص شده

است. اسید آبسزیک قادر به افزایش ساخت اسیدهای آمینه در شرایط محیطی نامساعد است (Yang et al., 2018). افزایش پروتئین‌های محلول در اثر کاربرد اسید آبسزیک و اسید سالیسیلیک یکی از سازوکارهای حفاظتی برای متعادل کردن غلظت اسمزی درون سلولی است و می‌تواند سبب افزایش تحمل به سرما شود. مشخص شده است که اسید سالیسیلیک برون‌زاد از راه تأثیر بر مسیرهای بیوستتزی اسید آبسزیک و اسید جیرلیک و نیز، تحریک تجمع پرولین، قندهای محلول و پروتئین‌های محلول سبب بهبود تحمل در برابر دماهای پائین زمستان می‌شود (Yang et al., 2018).

نشت یونی

میزان نشت یونی جوانه در مرحله آبان‌ماه در پاسخ به تیمارهای اسید سالیسیلیک، اسید آبسزیک و ترکیب آنها کاهش چشمگیری نشان داد (جدول ۳). کمترین میزان نشت یونی مربوط به تیمار کاربرد ترکیبی اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک بود که در مقایسه با شاهد تا ۴۲/۶ کمتر بود. این مشاهدات نشان‌دهنده کارایی این ترکیب هورمونی در پایداری غشاء و حفظ نفوذپذیری انتخابی آن از راه کاهش نشت یون‌ها و مواد محلول از داخل به فضای بین سلولی است. افزایش نشت یونی تحت تنش سرما به دلیل تنش اکسایشی است. این امر به ایجاد تغییراتی در نفوذپذیری انتخابی غشاهای زیستی، نشت مواد از غشاء و تغییر در فعالیت آنزیم‌های متصل به غشاء منجر خواهد شد (Campos et al., 2003). بنابراین، اندازه‌گیری نشت یونی شاخصی از میزان آسیب اکسایشی وارد شده به غشاء و سلول است (Yu &

محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع ایجاد می‌شود (Campos et al., 2003). بدین ترتیب، با تغییر در ساختار غشاء و پروتئین‌ها و افزایش مواد محلول سمی، نفوذپذیری و انعطاف‌پذیری غشاء افزایش یافته و خروج یون‌ها از غشاء و در نتیجه، ایجاد خسارت به گیاهان تسریع می‌شود (Yu & Lee, 2020).

(Lee, 2020). کاهش دما سبب افزایش درصد نشت یونی در نمونه‌های ساقه و برگ انگور شد و کاربرد اسید سالیسیلیک با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار اثر چشمگیری بر کاهش نشت یونی و حفظ سلامت بافت‌ها در دامنه تنش سرمایی صفر تا -8°C داشت (Ershadi & Taheri, 2013). یکی از اثرات عمده تنش سرما بر غشاء، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که در اثر ایجاد مالون‌دی‌آلدئید به عنوان

جدول ۳- اثر کاربرد برگی اسید سالیسیلیک (SA) و اسید آبسزیک (ABA) بر نشت یونی، مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و پرولین جوانه زیتون تلخ در مرحله سازگاری به سرما (آبان ماه)

Table 3- The effect of foliar application of salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) on electrolyte leakage, malondialdehyde, hydrogen peroxide and proline content of chinaberry buds during cold acclimation stage (November)

Treatments	Electrolyte leakage (%)*	Malondialdehyde ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ FW}$)	Hydrogen peroxide ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ FW}$)	Proline ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ FW}$)
Control	59.29 ^a	4.96 ^a	8.44 ^a	4.90 ^b
SA	48.34 ^b	3.70 ^b	6.18 ^b	5.90 ^a
ABA	38.44 ^c	3.32 ^b	5.50 ^{bc}	5.99 ^a
SA+ABA	34.00 ^d	3.17 ^b	5.27 ^c	6.23 ^a

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری (سطح ۵ درصد) اختلاف معنی‌داری ندارند.

*Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference (5% level).

در این غلظت مشاهده شد. همچنین، کاربرد اسید سالیسیلیک منجر به کاهش معنی‌داری در نشت یونی برگ تاک انگور تحت تنش سرما شده است که نشان دهنده تأثیر این ترکیبات بر پایداری غشاء است (Ershadi & Taheri, 2013).

پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء

میزان مالون‌دی‌آلدئید جوانه در پاسخ به تیمارهای اسید سالیسیلیک، اسید آبسزیک و ترکیب آنها کاهش چشمگیری نشان داد (جدول ۳). کمترین میزان مالون‌دی‌آلدئید مربوط به تیمار کاربرد ترکیبی اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک بود که در مقایسه با شاهد تا ۳۶/۱ درصد میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء کاهش یافت.

پژوهش‌های گذشته روی چمن برمودا (Zhang et al., 2008)، خیار (Zhang et al., 2012) و انگور (Karimi & Ershadi, 2015) نشان دادند کاربرد اسید آبسزیک برون‌زاد به کاهش نشت یونی برگ گیاهان تحت تنش سرما و شوری منجر می‌شود که تأییدی بر یافته‌های پژوهش حاضر است. همچنین، کاهش آسیب ناشی از سرما در اثر مصرف برون‌زاد اسید سالیسیلیک در گیاهان مختلف گزارش شده است. در پژوهشی (Abbasi Kashani et al., 2020) گزارش کردند کاربرد برگی اسید سالیسیلیک با غلظت ۱ میلی‌مولار بر روی نهال‌های دوساله چند رقم انگور سبب کاهش صدمه به شاخه و افزایش قدرت بازیابی نهال‌ها شد. در آزمایش مذکور، کمترین میزان نشت الکترولیتی و مالون‌دی‌آلدئید نیز

حفظ نفوذپذیری آن می‌شوند. کاهش تولید مالون‌دی‌آلدئید به دنبال مصرف برگ‌گی اسید سالیسیلیک بر روی دانه‌های دو گونه انگور توسط عباسی کاشانی و همکاران (Abbasi Kashani et al., 2020) نیز گزارش شده است که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. به نظر می‌رسد اسید سالیسیلیک برون‌زاد با فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب کاهش مقادیر مالون دی‌آلدئید حاصل از تخریب غشاء می‌شود. در پژوهشی بر روی زردآلو کاربرد خارجی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک سبب کاهش نش‌یونی و محتوای مالون دی‌آلدئید جوانه‌های گل در شرایط تنش یخ‌زدگی شد (Guo et al., 2007) که تائیدی بر یافته‌های پژوهش حاضر است.

پراکسید هیدروژن

کاربرد ترکیبی اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک سبب کاهش محتوای پراکسید هیدروژن جوانه تا ۳۷ درصد در مقایسه با شاهد شد. بین مقدار پراکسید هیدروژن جوانه در درختان تیمار شده با ترکیب اسید آبسزیک + اسید سالیسیلیک و مقدار این شاخص در درختان محلول‌پاشی شده با اسید آبسزیک به تنهایی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۳). یکی از اثرات سوء تنش سرما تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در غشاءها و ایجاد پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء است که با توجه به نتایج این تحقیق در درختان زیتون تلخ تحت تنش سرما میزان پراکسید هیدروژن افزایش یافت. در پژوهشی بر روی انگور اعمال تیمار سرما ضمن ایجاد تنش اکسایشی به افزایش تدریجی غلظت

سرمازدگی منجر به از هم پاشیدگی مواد پکتیکی در دیواره سلولی، جامد شدن بخش لیپیدی و ایجاد شکاف‌هایی در غشاء و اختلال در فعالیت آنزیم‌های کنترل‌کننده ورود و خروج مواد از سلول می‌شود. اعمال دیگر تنش‌های محیطی از قبیل خشکی بسته به مدت و شدت تنش به افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید در درختان زیتون تلخ منجر شدند (Han et al., 2022). بررسی غلظت مالون دی‌آلدئید بافت گیاهی می‌تواند بیانگر میزان تخریب غشاء سلولی باشد؛ زیرا این ترکیب تحت تأثیر تخریب و پراکسید شدن غشاء سلولی آزاد می‌شود (Adhikari et al., 2022). کاهش تولید مالون‌دی‌آلدئید در درختان تیمار شده نشان‌دهنده نقش حفاظتی این هورمون‌ها در پایداری غشاء است. تنش سرما ضمن افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و برهم‌زدن نفوذپذیری آن سبب نش‌یونی مواد محلول و خسارت به گیاه شد. در واقع کاهش دما به افزایش شاخص‌های تنش اکسایشی از قبیل نش‌یونی، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و تولید گونه‌های فعال اکسیژن منجر می‌شود (Karimi et al., 2016). جالب توجه است که کاربرد برگ‌گی اسید سالیسیلیک + اسید آبسزیک سبب کاهش ۳۶ درصدی غلظت مالون‌دی‌آلدئید در درختان تیمار شده در مقایسه با شاهد شدند که نشان‌دهنده نقش کلیدی این تنظیم‌کننده‌های رشد در تحریک فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و کاهش تنش اکسایشی و افزایش تجمع اُسمولیت‌های سازگاری از قبیل قندها و پرولین است (Karimi et al., 2016). اُسمولیت‌های مذکور ضمن تنظیم اسمزی سبب افزایش پایداری غشای پلاسمایی و

پرویلین در اثر کاربرد برونزاد اسید سالیسیلیک در درختچه همیشه‌سبز برگ‌نو (Yang et al., 2018) و دانه‌های دوساله دو گونه انگور (Abbasi et al., 2020) گزارش شده است که نتایج حاصل از پژوهش حاضر را تأیید می‌کنند. همچنین، هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، در دانه‌های انگور تحت تنش سرما کاربرد برگی اسید آبسزیک سبب افزایش معنی‌دار غلظت پرویلین برگ شد (Karimi et al., 2016). با استفاده خارجی اسید آبسزیک، غلظت درونی اسید آبسزیک در برگ‌ها افزایش یافته و ضمن تنظیم اسمزی سبب تجمع بیشتر محلول‌های سازگاری سلول‌ها در شرایط تنش می‌شود (Karimi, 2017). تولید رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش‌های محیطی نظیر سرما افزایش یافته و در انتقال الکترون‌ها در کلروپلاست‌ها و میتوکندری اختلال ایجاد می‌کند. همچنین، تجمع رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش موجب تخریب و فروپاشی غشاءها می‌شود (Adhikari et al., 2022). پرویلین نقش آنتی‌اکسیدانی دارد و در از بین بردن رادیکال‌های آزاد مؤثر است و از این راه پروتئین‌ها و غشاءها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند (Cao et al., 2020). پرویلین از جمله محلول‌های سازگار است که گیاه در هنگام تنش سرما با تولید و ذخیره آن، سبب افزایش مقاومت خود در این شرایط شده و از اثرات سرمازدگی کم می‌کند. پرویلین انباشته شده در داخل سلول نه تنها منجر به تحمل تنش می‌شود، بلکه به عنوان یک نیتروژن آلی در طی دوران بهبودی از تنش ذخیره می‌شود (Cao et al., 2020). از بین نقش‌های متعدد پرویلین در گیاهان که برای مقابله با تنش سرما ذکر شد،

پراکسید هیدروژن در برگ گیاهان تحت تنش منجر شد (Karimi & Ershadi, 2015). در پژوهش حاضر، در درختان تیمار شده با اسید آبسزیک میزان کمتری پراکسید هیدروژن مشاهده شد که با نتایج دیگر مطالعات روی تنش‌های محیطی از قبیل سرما روی انگور (Karimi & Ershadi, 2015) و خیار (Zhang et al., 2012) همخوانی دارد. یکی از نقش‌های مهم اسید آبسزیک فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز است که در این تحقیق اثبات شد، به طوری که در نتیجه افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در درختان تیمار شده با این تنظیم‌کننده رشد میزان تجمع گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل پراکسید هیدروژن و به دنبال آن میزان آسیب وارده به غشاء کاهش پیدا کرد.

پرویلین

بین محتوای محتوای اسید آمینه پرویلین اندازه‌گیری شده در جوانه درختان زیتون تلخ تیمار شده با اسید سالیسیلیک، اسید آبسزیک و یا ترکیب این دو تنظیم‌کننده رشد از لحاظ آماری تفاوتی مشاهده نشد (جدول ۳). از سوی دیگر، بین مقدار پرویلین این تیمارها و درختان شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد، به طوری که مقدار پرویلین در درختان تیمار شده با ترکیب اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک تا ۲۱/۴ درصد بیشتر از مقدار این شاخص در درختان شاهد بود که نشان‌دهنده تأثیر این تنظیم‌کننده‌های رشد در بیوسنتز پرویلین در راستای افزایش تحمل به سرما در زیتون تلخ است. این مشاهدات با نتایج پژوهش‌های قبلی در مورد دیگر درختان مطابقت دارد. برای مثال، تجمع

قندهای محلول

محتوای قندهای محلول کل در جوانه درختان تیمار شده با اسید آبسزیک و اسید سالیسیلیک و به‌ویژه ترکیب آنها در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش معنی‌داری پیدا کرد (جدول ۴). بیشترین محتوای قند محلول مربوط به تیمار اسید آبسزیک به تنهایی بود که البته از لحاظ آماری با درختان تیمار شده با ترکیب اسید آبسزیک و اسید سالیسیلیک اختلاف معنی‌داری نداشت. اسید آبسزیک سبب افزایش قندهای محلول تا ۲۰ درصد در مقایسه با شاهد شد. بیوستت و تجمع محلول‌های سازگاری از جمله قندها یکی از واکنش‌های تنظیمی مهم گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی است (Adhikari et al., 2022). بیشترین محتوای هر یک از قندهای ساده گلوکز، فروکتوز و ساکارز مربوط به تیمار کاربرد ترکیبی اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک و کمترین آنها مربوط به شاهد بود (جدول ۴).

ممکن است در آزمایش حاضر، نقش پرولین به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی از اهمیت بیشتری برخوردار بوده و منجر به حفظ ساختار غشاء شده است. افزایش میزان پرولین تحت تیمار اسید سالیسیلیک در برگ‌نو (Yang et al., 2018) و انگور (Abbasi Kashani et al., 2020) گزارش شده است. بر اساس نتایج پژوهش‌های عباسی کاشانی و همکاران (Abbasi Kashani et al., 2020)، کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک تحت تنش سرما، محتوای اسید آبسزیک درون سلولی را افزایش داده و به این ترتیب، منجر به تجمع پرولین در شرایط سرما و افزایش مقاومت به سرما می‌شود. با توجه به نقش اسید آبسزیک در فعال‌سازی آنزیم‌ها از جمله آنزیم دلتا پرولین کربوکسیلات سینتاز که نقش کلیدی در بیوستت پرولین دارد (Cao et al., 2020)، این احتمال می‌رود که کاربرد برگی این هورمون در پژوهش حاضر با تأثیر بر فعالیت این آنزیم منجر به افزایش غلظت پرولین در جوانه بوته‌های تیمار شده با این تنظیم‌کننده رشد شده باشد که البته نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد.

جدول ۴- اثر کاربرد برگی اسید سالیسیلیک (SA) و اسید آبسزیک (ABA) بر محتوای کربوهیدرات کل و قندهای محلول (گلوکز، فروکتوز و سوکروز) جوانه زیتون تلخ در مرحله سازگاری به سرما (آبان ماه)

Table 4- The effect of foliar application of salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) on soluble sugars and total carbohydrate content of chinaberry buds during cold acclimation stage (November)

Treatments	Total carbohydrate (mg g ⁻¹ FW)*	Soluble sugars (μmol g ⁻¹ FW)		
		Glucose	Fructose	Sucrose
Control	60.54 ^c	48.73 ^b	41.71 ^b	52.94 ^c
SA	69.68 ^b	50.96 ^b	44.80 ^{ab}	60.13 ^b
ABA	75.85 ^a	52.70 ^a	46.57 ^a	64.70 ^{ab}
SA+ABA	74.32 ^a	53.71 ^a	47.85 ^a	69.28 ^a

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری (سطح ۵ درصد) اختلاف معنی‌داری ندارند.

*Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference (5% level).

محلول برگ شد (Abbasi Kashani et al., 2020) که نتایج حاصل از پژوهش حاضر را تأیید می‌نماید.

در پژوهشی کاربرد برگی اسید سالیسیلیک در دانه‌های انگور منجر به افزایش کربوهیدرات‌های

قبیل گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش اسید آبسزیک درون‌زاد ممکن است واکنش‌های دفاعی گیاه از قبیل سامانه آنتی‌اکسیدانی را تقویت و تجمع کربوهیدرات‌های غیرساختاری و اسیدهای آمینه را در شرایط تنش بیشتر کند (Zhang et al., 2008). همچنین، به دلیل نقش شبه‌هورمونی کربوهیدرات‌های محلول، ممکن است بین مسیر پیام‌رسانی اسید آبسزیک و قندها و ویژگی تحمل به سرما در گیاهان ارتباط وجود داشته باشد (Karimi, 2017).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به درختان تیمار شده با اسید آبسزیک بود که در مقایسه با شاهد ۴۴/۳ درصد بیشتر بود. همچنین، بیشترین فعالیت گایاکول‌پراکسیداز مربوط به کاربرد ترکیبی اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک و کمترین فعالیت آن مربوط به شاهد بود (جدول ۵). بیشترین فعالیت آسکوربات پراکسیداز مربوط به تیمار اسید آبسزیک به تنهایی بود که البته از این لحاظ با تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک اختلاف معنی‌داری نشان نداد. کمترین فعالیت این آنزیم مربوط به شاهد بود (جدول ۵). سازگاری گیاه به سرما با افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن صورت می‌گیرد. از جمله آنتی‌اکسیدان‌های مهم گیاهی که در این راستا نقش مهمی دارد کاتالاز است. بنابراین، میزان آن با افزایش تنش سرما بالا رفته و این اثر در تیمارهایی که از اسید آبسزیک استفاده شده، به دلیل نقش آن در تعدیل‌کنندگی سرما بسیار واضح‌تر است. گزارش‌ها نشان‌دهنده این است که

به نظر می‌رسد تجمع قندهای محلول توسط تنظیم اسمزی به کاهش صدمه سرمازدگی منجر شده که این مسئله با نتایج گزارش شده در انگور (Ershadi & Taheri, 2013) و برگ‌نوی درخشان (Yang et al., 2018) هم‌خوانی دارد.

در پژوهش حاضر، غلظت کربوهیدرات‌های محلول در جوانه درختان تیمار شده افزایش یافت. افزایش غلظت قندهای محلول در درختان تحت تنش سرما یکی از واکنش‌های سازگاری به این شرایط است که با تنظیم اسمزی به پایداری غشاء و بهبود تحمل به سرما منجر می‌شود (Karimi et al., 2016). در درختچه هیدرانجیا، دمای پائین سبب تجمع مقادیر بالای قندهای محلول از قبیل گلوکز، فروکتوز، ساکاروز و رافینوز شد (Pagter et al., 2008). کربوهیدرات‌های محلول به عنوان ترکیبات محافظ ساختار سلول‌ها در برابر یخ‌زدگی عمل کرده و با کاهش نقطه انجماد مایع سلولی از تشکیل یخ درون سلولی جلوگیری می‌کنند. به طور ویژه این قندها از طریق برهم‌کنش با سر قطبی فسفولیپیدها باعث پایداری غشاءها می‌شوند (Karimi, 2017).

در پژوهش حاضر، کاربرد اسید آبسزیک به‌ویژه در ترکیب با اسید سالیسیلیک سبب افزایش چشمگیری در غلظت قندهای محلول شد که نشان‌دهنده نقش این هورمون در ارتباط با تجمع قندهای محلول و افزایش سازگاری به سرما است. در پژوهش Meng et al., 2008 بر روی دانه‌های خیار تحت تنش سرما، تیمار اسید آبسزیک (غلظت ۱۵۰ میکرومولار) سبب افزایش غلظت کربوهیدرات‌های محلول شد. کاربرد خارجی اسید آبسزیک ضمن افزایش مولکول‌های پیام‌رسان از

در انگور (Karimi et al., 2016) و چمن (Zhang et al., 2008) نیز کاربرد اسید آبسزیک سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است که هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر می‌باشد. جدول ۵- اثر کاربرد برگی اسید سالیسیلیک (SA) و اسید آبسزیک (ABA) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز جوانه زیتون تلخ در مرحله سازگاری به سرما (آبان ماه)

Table 5- The effect of salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) on activity of catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase antioxidant enzymes of chinaberry buds during cold acclimation stage (November)

Treatments	Catalase (Unit mg ⁻¹ Protein)*	Guaiacol peroxidase (Unit mg ⁻¹ Protein)	Ascorbate peroxidase (Unit mg ⁻¹ Protein)
Control	2.87 ^c	7.83 ^c	4.96 ^b
SA	4.20 ^b	12.98 ^b	10.58 ^a
ABA	5.15 ^a	14.13 ^b	12.89 ^a
SA+ABA	4.41 ^b	17.36 ^a	12.04 ^a

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری (سطح ۵ درصد) اختلاف معنی‌داری ندارند.

*Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference (5% level).

سیستم پیام‌رسانی سلولی دخالت داشته و به عنوان پیام‌رسان ثانویه سبب القاء دفاع آنتی‌اکسیدانی تحت شرایط تنش سرما می‌شود (Cao et al, 2020). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز در پاسخ به تیمارهای مورد استفاده افزایش یافت. در واقع روند تغییرات آسکوربات پراکسیداز بسیار شبیه کاتالاز بود؛ زیرا این ترکیب نیز همانند کاتالاز یکی از آنتی‌اکسیدان‌های اصلی و مهم گیاهی بوده و در شرایط تنش، سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو به تولید این ترکیب که نقش سیستم جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد را دارد، می‌پردازند (Karimi et al, 2016). اسید آبسزیک با فعال کردن آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به حذف و غیرفعال کردن گونه‌های فعال اکسیژن منجر می‌شود. در نتیجه با القاء سطح آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی، پراکسید هیدروژن را به طور بالقوه از سلول‌های گیاهی توسط آسکوربات به عنوان یک بستر بسیار مهم سم‌زدایی پراکسید هیدروژن در دستگاه فتوسنتزی کاهش می‌دهد (Zhang et al.,

فعالیت بیشتر گایاکول پراکسیداز در جوانه درختان تیمار شده با تنظیم‌کننده‌های رشد از این جهت است که به عنوان آنزیم ضد رادیکال‌های آزاد اکسیژن، ضمن محافظت از درشت‌مولکول‌ها و غشاهای سلول، آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وجود آمده در اثر سرما را خنثی کند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد اسید آبسزیک می‌تواند به طور چشمگیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را در انگورهای تحت تنش سرما (Karimi et al., 2016) افزایش دهد. همچنین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بعد از تیمار اسید آبسزیک در خیار (Zhang et al., 2012) و فلفل (Guo et al., 2012) تحت تنش سرما گزارش شده است که تأییدی بر یافته‌های این پژوهش است. تغییرات متابولیکی ایجاد شده با اسید آبسزیک منجر به تغییر در سطوح رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. این تغییرات زمینه‌ساز القاء سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌شود. به نظر می‌رسد که اسید آبسزیک و گونه‌های فعال اکسیژن به ویژه پراکسید هیدروژن در

پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز تحت شرایط تنش سرمایی منجر شدند (Jalili et al., 2023) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. پژوهش‌ها نشان دادند پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک به عنوان یک فرایند مقاوم‌سازی عمل نموده و با افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سلول سبب حفاظت بیشتر غشاءهای سلولی و کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها و جلوگیری از اکسیداسیون پروتئین‌ها می‌شود (Luo et al., 2014). در آزمایشی بر روی گیلاس، پس از کاربرد اسید سالیسیلیک به دنبال افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز ترکیبات فنولی تجمع پیدا کرد (Chan & Tian, 2006). بنابراین، اسید سالیسیلیک نقش مهمی در بیوستز ترکیبات فنولی و بیان ژن‌های دفاعی گیاه دارد.

اسید آبسزیک و اسید جیبرلیک

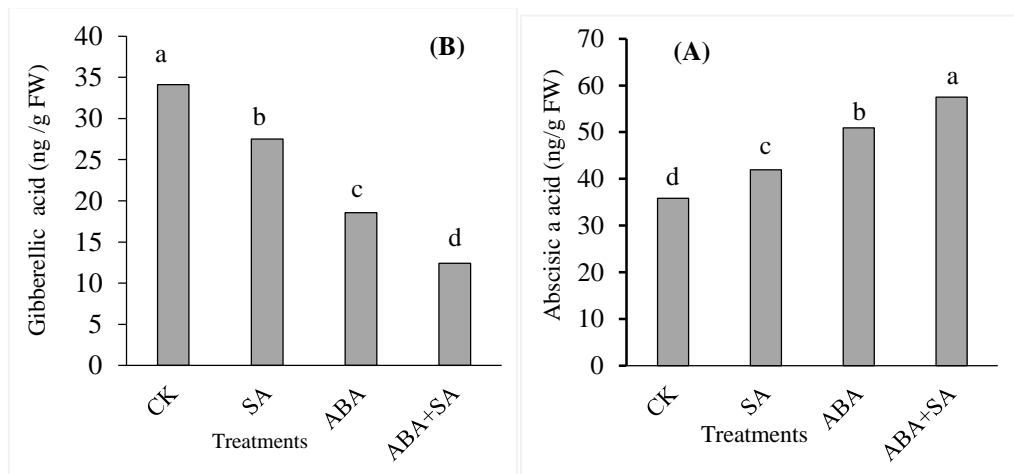
بیشترین محتوای اسید آبسزیک درون‌زاد مربوط به تیمار کاربرد ترکیبی اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک و کمترین آن مربوط به شاهد بود (شکل ۲). از سوی دیگر، کمترین محتوای اسید جیبرلیک مربوط به تیمار کاربرد ترکیبی اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک و بیشترین مقدار آن مربوط به شاهد بود (شکل ۲). طی مرحله سازگاری به سرما محتوای اسید آبسزیک در جوانه‌ها افزایش و اسید جیبرلیک کاهش نشان دادند (Liu & Sherif, 2019). در تأیید یافته‌های پژوهش حاضر، کیم و همکاران (Kim et al., 2016) نشان دادند که کاربرد اسید آبسزیک برون‌زاد سطوح درون‌زاد جیبرلین‌ها را تحت تأثیر قرار داده و مقاومت گیاه خریزه شرقی در برابر دمای پائین را افزایش می‌دهد. اسید آبسزیک یک عامل مهم پیام‌رسانی برای

(2012). در پژوهش حاضر، فعالیت هر سه آنزیم در درختان تحت تأثیر تنش در مقایسه با درختان بدون تنش بیشتر بود. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی یکی از سازوکارهای مهم گیاهان برای افزایش تحمل به تنش‌های محیطی از جمله سرما است. در پژوهشی بر روی دانه‌های زیتون تلخ، کاربرد تنش خشکی ملایم و متوسط سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد ولی کاربرد تنش خشکی شدید فعالیت آنزیم‌ها را در برگ این دانه‌ها کاهش داد (Han et al., 2022). کاربرد خارجی اسید آبسزیک به میزان زیادی سبب کاهش مالون دی‌آلدئید تولید شده در انگوره‌های تحت تنش سرما شده است (Karimi et al., 2016). در پژوهشی کاربرد اسید آبسزیک به کاهش تولید مالون دی‌آلدئید منجر شد که نشان‌دهنده توانایی این تنظیم‌کننده رشد گیاهی در خنثی‌سازی رادیکال‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از افزایش آن‌ها است (Yang et al., 2011). احتمالاً اسید آبسزیک با تأثیر بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب کاهش محتوای رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن شده و مانع فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز و تجزیه اسیدهای چرب غشاء شده و در نهایت، منجر به کاهش صدمات اکسیداتیو وارده به لیپیدهای غشاء طی دمای پائین شده است. یافته‌های فوق با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد.

در آزمایشی بر روی انگور، کاربرد پوتریسین، اسید سالیسیلیک و اسید آسکوربیک برون‌زاد به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات

زیاد و به سرعت برای انجام یک عملکرد محافظتی انباشته می‌کنند (Pagter et al., 2008).

دماهای پائین تنش‌زا و دارای کارکرد محافظتی برای ساختار میکروتوبول سلول‌ها می‌باشد و گیاهان تحت تنش دمای پائین اسید آبسزیک را در مقادیر



شکل ۲- اثر کاربرد برگ‌گی اسید سالیسیلیک (SA) و اسید آبسزیک (ABA) بر محتوای اسید آبسزیک (نمودار A) و اسید جیبرلیک (نمودار B) درون‌زاد جوانه زیتون تلخ در مرحله سازگاری به سرما (آبان‌ماه). میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (در سطح ۵ درصد).

Figure 2- The effect of foliar application of salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) on endogenous abscisic acid (Fig. A) and gibberellic acid (Fig. B) content of chinaberry bud during cold acclimation stage (November). Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference (5% level).

شد (Zhang et al., 2012). همچنین، افزایش محتوای اسید آبسزیک درون‌زاد به همراه پلی-آمین‌ها در جوانه تاک در مرحله سازگاری به سرما افزایش چشم‌گیری نشان داد که نشان‌دهنده نقش این ترکیبات در افزایش تحمل به سرما در گیاهان چوبی است (Karimi, 2017).

پوتریسین، اسپرمین و اسپرمین

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، بیشترین محتوای هر سه نوع پلی‌آمین مربوط به درختانی بود که با ترکیب اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک تیمار شده بودند. محتوای پوتریسین، اسپرمیدین و اسپرمین درون‌زاد درختان تیمار شده با اسید سالیسیلیک + اسید آبسزیک به ترتیب

در پژوهش حاضر، کاربرد خارجی اسید آبسزیک به‌ویژه در ترکیب با اسید سالیسیلیک سبب افزایش محتوای اسید آبسزیک و کاهش محتوای اسید جیبرلیک درون‌زاد شد که این تغییرات در راستای افزایش سازگاری به سرما و تحمل یخ‌زدگی در درختان انجام می‌شود. تغییر میزان درون‌زاد هورمون‌های اسید آبسزیک و اسید جیبرلیک پس از مصرف برون‌زاد اسید سالیسیلیک در گیاه زینتی برگ‌نوی درختان نیز گزارش شده است (Yang et al., 2018) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. در تأیید یافته‌های پژوهش حاضر، محلول‌پاشی اسید آبسزیک برون‌زاد به افزایش محتوای اسید آبسزیک درون‌زاد در برگ‌ها و بهبود تحمل بوته‌های خیار به دماهای پائین منجر

۳/۳۳، ۳۷/۹ و ۱۶/۹ درصد بیشتر از درختان شاهد بود (جدول ۶).

جدول ۶- اثر کاربرد برگی اسید سالیسیلیک (SA) و اسید آبسزیک (ABA) بر محتوای پلی آمین های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین جوانه زیتون تلخ در مرحله سازگاری به سرما (آبان ماه)

Table 6- The effect of foliar application of salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) on putrescine, spermidine and spermine content of chinaberry bud during cold acclimation stage (November)

Treatments	putrescine ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$)*	spermidine ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$)	Spermine ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$)
Control	49.74 ^c	72.28 ^b	92.72 ^d
SA	53.73 ^c	75.66 ^b	96.51 ^c
ABA	63.04 ^b	77.95 ^a	107.22 ^b
SA+ABA	74.58 ^a	79.76 ^a	111.46 ^a

*میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری اختلاف معنی داری در سطح پنج درصد ندارند.

*Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference at probability level of 5%.

روش نشت یونی طی دو مرحله دی و بهمن ماه مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان نشت یونی جوانه در هر مرحله از نمونه برداری (دی و بهمن ماه) در دمای ۶-، ۱۲- و ۱۸- درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. در هر سه تیمار دمایی ذکر شده در دی و بهمن ماه، کمترین میزان نشت یونی مربوط به درختان محلول پاشی شده با اسید سالیسیلیک در ترکیب با اسید آبسزیک بود. همچنین، بیشترین میزان نشت یونی در این سه تیمار دمایی مربوط به جوانه درختان شاهد بود (جدول ۷). بیشترین و کمترین محتوای نشت یونی در دمای ۶°C- درجه به ترتیب مربوط به شاهد و تیمار ترکیبی اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک بود. بیشترین محتوای نشت یونی در دمای ۱۲°C- مربوط به تیمار شاهد و کمترین آن مربوط به تیمار اسید سالیسیلیک + اسید آبسزیک بود. همچنین، بیشترین محتوای نشت یونی در دمای ۱۸°C- مربوط به شاهد و کمترین آن مربوط به ترکیب اسید سالیسیلیک و اسید آبسزیک بود.

گیاهان برای زنده ماندن در شرایط نامساعد محیطی، راهبردهای سازگاری مختلفی را ایجاد کرده اند که از جمله آنها می توان به تجمع متابولیت هایی با نقش محافظتی اشاره کرد. یکی از این متابولیت ها که در پاسخ به تنش یا تحمل تنش دخیل هستند، پلی آمین های آلیفاتیک با وزن مولکولی کم از جمله پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین هستند. پژوهش های قبلی نشان داده اند که پلی آمین ها به علت نقش مستقیم یا غیرمستقیم آنها در تنظیم سیستم های آنتی اکسیدانی یا جلوگیری از تولید گونه های فعال اکسیژن، نقش مهمی در تحمل به سرمای گیاهان دارند (Shi & Chan, 2014). محلول پاشی پوترسین، اسید سالیسیلیک و اسید آسکوربیک خسارت تنش یخ زدگی (دمای ۳°C-) در بوته های انگور را کاهش داد (Jalili et al., 2023) که تائیدی بر نقش مثبت پلی آمین ها در سازگاری به سرما در گیاهان است.

تحمل به سرمای زمستانه

تحمل به سرمای زمستانه درختان زیتون تلخ با

جدول ۷- اثر کاربرد برگی اسید سالیسیلیک (SA) و اسید آبسزیک (ABA) بر نشت یونی جوانه (درصد) به عنوان شاخصی از تحمل به سرمای زمستانه زیتون تلخ در دو مرحله دی و بهمن ماه تحت دماهای مختلف

Table 7- The effect of foliar application of salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA) on bud ion leakage (%) as an indicator of winter cold hardiness of chinaberry buds in January and February stages under different temperatures

Treatment	January			February		
	-6 °C	-12 °C	-18 °C	-6 °C	-12 °C	-18 °C
Control	25.49 ^a	45.97 ^a	62.21 ^a	21.73 ^a	36.67 ^a	58.91 ^a
SA	19.58 ^b	33.61 ^b	52.62 ^b	15.83 ^b	26.86 ^b	46.66 ^b
ABA	18.65 ^b	30.09 ^b	50.00 ^b	14.90 ^b	22.68 ^c	39.19 ^c
SA+ABA	16.16 ^c	32.48 ^c	46.88 ^c	12.41 ^c	21.37 ^c	36.50 ^c

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری (سطح ۵ درصد) اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference (5% level).

انگور (Karimi & Ershadi, 2015) نیز کاربرد برگی اسید آبسزیک سبب کاهش نشت یونی تحت تنش سرما شده است. اسید آبسزیک از راه ساخت پروتئین‌های جدید، تعدیل پلی‌آمین‌ها، تغییر در کربوهیدرات‌های محلول و تغییر در پایداری و عملکرد غشاء زمینه‌ساز افزایش تحمل به سرما در گیاهان می‌شود (Lim & Lee, 2020). این عملکرد اسید آبسزیک می‌تواند کاهش نشت یونی در درختان تیمار شده در پژوهش حاضر را توضیح دهد. اسید آبسزیک یک هورمون گیاهی است که نقش مهمی در سازگاری به سرمای گیاهان دارد (Zhang et al., 2012; Karimi et al., 2016). اسید آبسزیک سبب تنظیم بیان یک سری ژن‌های کلیدی مرتبط با تحمل به یخ‌زدگی در گیاهان طی دوره سازگاری به سرما می‌شود (Lim & Lee, 2020). کاربرد اسید سالیسیلیک برون‌زاد روی گیاه همیشه‌سبز برگ‌نوی درخشان به بهبود تحمل این گیاه طی مرحله مقاوم‌سازی طبیعی منجر شد (Yang et al., 2018) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. بهبود مقاومت این گیاه در برابر دمای

تنش سرما منجر به افزایش نشت یونی جوانه درختان زیتون تلخ به‌ویژه در گیاهان شاهد شد که نشان‌دهنده صدمات وارده به غشای سلول‌ها در این شرایط است. این نتایج با افزایش نشت یونی مشاهده شده تحت تنش سرما در خیار (Zhang et al., 2012) و انگور (Ershadi & Taheri, 2013) مطابقت دارد. یکی از دلایلی که سبب ایجاد صدمات غشایی می‌شود، تنش اکسایشی است که در نتیجه افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد می‌شود. تنش سرما با کاهش سیالیت فسفولیپیدهای غشاءهای زیستی یا غیرفعال کردن آنها و یا دست کم کاهش سرعت پمپ‌های یونی متصل به غشاء، ضمن کاهش یا اختلال در عملکرد غشاء، نشت یونی را افزایش می‌دهد (Adhikari et al., 2022). در پژوهش حاضر، کاربرد برگی اسید آبسزیک به طور معنی‌داری نشت یونی را به عنوان یک شاخص آسیب‌دیدگی غشاء در درختان زیتون تلخ سرما دیده کاهش داد، به طوری که با افزایش غلظت اسید آبسزیک درصد نشت یونی کاهش یافت. در مرکبات (Yang et al., 2011) و

پائین به انباشت پرولین، پروتئین محلول و قندهای محلول و نیز تنظیم بیوسنتز اسید جیبرلیک و اسید آبسزیک نسبت داده شد. به نظر می‌رسد اسید سالیسیلیک با تأثیر بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و متابولیسم پراکسید هیدروژن، به کاهش خسارت سرما و افزایش تحمل گیاه به سرما منجر می‌شود. نقش حفاظتی اسید سالیسیلیک در برابر آسیب سرمایی در گیاهان مختلف مانند زردآلو (Guo et al., 2007; Alirezaie Noghondar et al., 2013) گزارش شده است. علیرضایی نوقوندر و همکاران (Alirezaie Noghondar et al., 2013) نیز بیان نمودند محلول پاشی اسید سالیسیلیک روی جوانه‌های گل زردآلو سبب کاهش آسیب به مادگی و نشت یونی تحت تأثیر تنش یخ‌زدگی مصنوعی (چهار ساعت در دمای -4°C) نسبت به شاهد شد. به نظر می‌رسد اسید سالیسیلیک آنزیم‌های متابولیسم پرولین و نیز تجمع پرولین را افزایش می‌دهد. در پژوهشی Luo et al., 2014 بیان کردند محلول پاشی اسید سالیسیلیک روی نشاهای بادام زمینی منجر به افزایش میزان پرولین و قندهای محلول شدند و به نظر می‌رسد سبب بهبود تحمل به سرما شدند. استفاده غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در مرحله گلدهی روی زردآلوی شاهرودی نشان دادند غلظت دو میلی‌مولار این تنظیم کننده رشد توانست خسارت ظاهری سرمازدگی گل‌ها را کاهش دهد (Alirezaie Noghondar et al., 2013). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند کاربرد اسید آبسزیک و اسید سالیسیلیک منجر به یک سری تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شود که تا حد زیادی

مشابه با وقایعی است که در مرحله سازگاری به سرما (به واسطه کاهش دما یا کوتاه شدن طول روز) در درخت اتفاق می‌افتد. این تغییرات درختان را قادر می‌سازند تا بتوانند دماهای پائین را بدون خسارت یا با خسارت کمتری تحمل کنند. نقش اسید آبسزیک در تحمل یخ‌زدگی گیاهان از وقتی مشخص شد که کاربرد خارجی اسید آبسزیک سبب جایگزین شدن واکنش‌های سازگاری به سرما شد. در واقع اسید آبسزیک با القاء و تقویت برخی از مسیرهای متابولیکی مرتبط با سازگاری به سرما منجر به افزایش تحمل درختان به دمای پائین شده است (Cutler et al., 2010).

جمع‌بندی

کاربرد اسید آبسزیک به‌ویژه در ترکیب با اسید سالیسیلیک با تأثیر بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با سازگاری به سرما منجر به کاهش آسیب و نشت یونی غشاء شد. کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در اثر کاربرد این تنظیم کننده‌های رشد نشاندهنده تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان تیمار شده بود که با افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و تجمع بیشتر ترکیبات فنولی خود را نشان داد. از سوی دیگر، کاربرد ترکیب اسید آبسزیک و اسید سالیسیلیک با تغییر اسمولیت‌های سازگار، تجمع بیشتر قندهای محلول، پلی‌آمین‌ها و هورمون‌های گیاهی میزان تحمل به سرما در درختان زیتون تلخ تیمار شده را در مقایسه با شاهد افزایش داد که می‌تواند به عنوان یک راهکار برای افزایش تحمل به سرمای زمستانه زیتون تلخ در نقاط سردسیر استفاده شود.

[https://doi: 10.4236/jwarp.2013.51006](https://doi.org/10.4236/jwarp.2013.51006).

سپاسگزاری

هزینه این پژوهش (پایان‌نامه) از محل اعتبار ویژه پژوهشی نویسنده مسئول (گرنه سال ۱۴۰۲ شماره ۱۴۸-۸۴/۹) و دانشگاه ملایر تأمین شده است که به این وسیله قدردانی می‌گردد.

- Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254. [https://doi: 10.1006/abio.1976.9999](https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999).
- Campos, P. S., Quartin, V., Ramalho, J. C. & Nunes, M. A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. *Journal of Plant Physiology*, *160*, 283-292. [https://doi: 10.1078/0176-1617-00833](https://doi.org/10.1078/0176-1617-00833).
- Cao, X., Wu, L., Wu, M., Zhu, C., Jin, Q. & Zhang, J. (2020) Abscisic acid mediated proline biosynthesis and antioxidant ability in roots of two rice genotypes under hypoxic stress. *BMC Plant Biology*, *20*(198), 1-14. [https://doi: 10.1186/s12870-020-02414-3](https://doi.org/10.1186/s12870-020-02414-3).
- Chan, Z. & Tian, S. (2006) Induction of H₂O₂ metabolizing enzyme and total protein synthesis by antagonistic yeast and salicylic acid in harvested sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology*, *39*, 314-320. [https://doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.10.009](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.10.009).
- Comis, D. B., Tamayo, D. M. & Alonso, J. M. (2001) Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, *436*, 173-178. [https://doi:10.1016/S0003-2670\(01\)00889-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00889-3).
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R. & Abrams, S. R. (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 651-679. [https://doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112122](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122).
- Dere, S., Gunes, T. & Sivaci, R. (1998) Spectrophotometric determination of chlorophyll - A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of*

References

- Abbasi Kashani, A., Ebadi, A., Fattahi Moghaddam, M. R. & Shokrpour, M. (2020) Effect of salicylic acid on reduction of spring cold damage on some cultivars of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Journal of Horticultural Science*, *34*, 361-376. [in Persian]. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.20084730.1399.34.3.1.8>.
- Adhikari, L., Baral, R., Paudel, D., Min, D., Makaju, S. O., Poudel, H. P., Acharya, J.P. & Missaoui, A. M. (2022) Cold stress in plants: Strategies to improve cold tolerance in forage species. *Plant Stress*, *4*, 100081. 376. [https:// doi: 10.1016/j.stress.2022.100081](https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100081).
- Alirezaie Noghondar, M., Bayat, H. & Neamati, H. (2013) Effect of salicylic acid on alleviating of electrolyte leakage and flower organ damage in apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. 'Shahroudi') under artificial cold stress. *Notulae Scientia Biologicae*, *5*(1), 1-5. [https://doi: 10.15835/nsb518352](https://doi.org/10.15835/nsb518352).
- Batcher, M. S. (2008) Element of Stewardship Abstract for *Melia azedarach*, The Nature Conservancy. Viewed 22 February. [https://doi: 10.1079/cabicompendium.33144](https://doi.org/10.1079/cabicompendium.33144).
- Bates, L., Waldren, R. P. & Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, *13*, 39-250. [https://doi: 10.1007/BF00018060](https://doi.org/10.1007/BF00018060).
- Bergmeyer, H. U. (1970). Methods of enzymatic analysis. Akademie Verlag, Berlin, Germany, pp, 636-647.

- and soluble sugars changes in grapevine. *Scientia Horticultura*, 215, 184-194. [https://doi: 10.1016/j.scienta.2016.12.018](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.018).
- Karimi, R. & Ershadi, A. (2015) Role of exogenous abscisic acid in adapting of 'Sultana' grapevine to low temperature stress. *Acta Physiologia Plantarum*, 37(8), 1-11. [https://doi: 10.1007/s11738-015-1902-z](https://doi.org/10.1007/s11738-015-1902-z)
- 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. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2016, 1-7. [https://doi: 10.1080/14620316.2016.1162027](https://doi.org/10.1080/14620316.2016.1162027).
- Kim, Y., Choi, K., Khan, A., Waqas, M. & Lee, I. (2016) Exogenous application of abscisic acid regulates endogenous gibberellins homeostasis and enhances resistance of oriental melon (*Cucumis melo* var. L.) against low temperature. *Scientia Horticulturae*, 207, 41-47. [https://doi: 10.1016/j.scienta.2016.05.009](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.009).
- Lee, B. R., Kim, K. Y., Jung, W. J., Avicé, J. C., Ourry, A. & Kim, T. H. (2007) Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany*, 58(6), 1271-1279. [https://doi: 10.1093/jxb/erl280](https://doi.org/10.1093/jxb/erl280).
- Liao, B., Que, Q., Xu, X., Zhou, W., Ouyang, K., Li, P., Li, H., Lai, C. & Chen, X. (2022). Climate-driven adaptive differentiation in *Melia azedarach*: Evidence from a common garden experiment. *Genes*, 13(11), 1924. [https://doi: 10.3390/genes13111924](https://doi.org/10.3390/genes13111924).
- Li, Z., Zhao, X., Sandhu A. K. & Gu, L. (2010) Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. *Journal of Botany*, 22:13-17. <https://journals.tubitak.gov.tr/botany/vol122/iss1/3>.
- Ershadi, A. & Taheri, S. (2013) Effect of salicylic acid on spring frost tolerance of grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar 'Bidaneh Sefid'. *Journal of Crops Improvement*, 15(2), 135-146. [in Persian]. [https://doi: 10.22059/jci.2013.36105](https://doi.org/10.22059/jci.2013.36105).
- Guo, W. L., Chen, R. G., Gong, Z., Yin, Y. X., Ahmed, S. S. & He, Y. M. (2012) Exogenous abscisic acid increases antioxidant enzymes and related gene expression in pepper (*Capsicum annuum*) leaves subjected to chilling stress. *Genetic and Molecular Research*, 11, 4063-4080. [https://doi: 10.4238/2012](https://doi.org/10.4238/2012).
- Han, C., Chen, J., Liu, Z., Chen, H., Yu, F., & Yu, W. (2022). Morphological and physiological responses of *Melia azedarach* seedlings of different provenances to drought stress. *Agronomy*, 12(6), 1461. [https://doi: 10.3390/agronomy12061461](https://doi.org/10.3390/agronomy12061461).
- Health, R. L. & Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198. [https://doi: 10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1).
- Herzog, V. & Fahimi, H. D. (1973) Determination of the activity of peroxidase. *Analytica Chimica Acta* 55:554-562.
- Jalili, I., Ebadi, A., Askari, M. A., KalatehJari, S. & Aazami, M. A. (2023) Foliar application of putrescine, salicylic acid, and ascorbic acid mitigates frost stress damage in *Vitis vinifera* cv. Giziluzum. *BMC Plant Biology*, 23(135), 1-15. [https://doi: 10.1186/s12870-023-04126-w](https://doi.org/10.1186/s12870-023-04126-w)
- Karimi, R. (2017) Potassium-induced freezing tolerance is associated with endogenous abscisic acid, polyamines

- proteins during seasonal cold acclimation and deacclimation in *Hydrangea* species differing in cold hardiness. *Physiologia Plantarum*, 134, 473-485. [https://doi: 10.1111/j.1399-3054.2008.01154.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01154.x).
- Ployet, R., Soler, M., Carocha, V., Ladouce, N., Alves, A., Rodrigues, J., Harvengt, L., Marque, C., Teulieres, C., Grima-Pettenati, J. & Mounet, F. (2018) Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in *Eucalyptus*. *Tree Physiology*, 38(3), 409-422. [https://doi: 10.1093/treephys/tpx062](https://doi.org/10.1093/treephys/tpx062).
- Shi, H. & Chan, Z. (2014) Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56, 114-121. [https://doi: 10.1111/jipb.12128](https://doi.org/10.1111/jipb.12128).
- Sultana, S., Asif, H. M., Akhtar, N., Waqas, M., & Rehman, S. U. (2014) Comprehensive review on ethanobotanical use, phytochemistry and pharmacological properties of *Melia azedarach* L. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*, 16, 26-32. <https://scholar.ssclld.in/index.php/AJPRHC/article/view/127763>.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. & Oomah, B. D. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4113-4117. [https://doi: 10.1021/jf9801973](https://doi.org/10.1021/jf9801973).
- Walter, H. & Geuns, J. (1987) High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiology*, 83, 232-234. [https://doi: 10.1104/pp.83.2.232](https://doi.org/10.1104/pp.83.2.232).
- Webster, D. E. & Ebdon, J. S. (2005) Effects of nitrogen and potassium fertilization on perennial raygrass cold tolerance during deacclimation in late winter and early spring. *Hortscience*, *Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6503-9. [https://doi: 10.1021/jf1006962](https://doi.org/10.1021/jf1006962).
- Lim, C. W., & Lee, S. C. (2020). ABA-dependent and ABA-independent functions of RCAR5/PYL11 in response to cold stress. *Frontiers in Plant Science*, 11, 587620. [https://doi: 10.3389/fpls.2020.587620](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.587620).
- Liu, J. & Sherif, S. M. (2019) Hormonal orchestration of bud dormancy cycle in deciduous woody perennials. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1-21. [https://doi: 10.3389/fpls.2019.01136](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01136).
- Loreto, F. & Velikova, V. (2001). Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Journal of Plant Physiology*, 127, 1781-1787. [https://doi: 10.1104/pp.010497](https://doi.org/10.1104/pp.010497).
- Luo, Y. L., Su, Z. L., Bi, T. J., Cui, X. L. & Lan, Q. Y. (2014) Salicylic acid improves chilling tolerance by affecting antioxidant enzymes and osmoregulators in *sacha inchi* (*Plukenetia volubilis*). *Brazilian Journal of Botany*, 37(3), 357-363. [https://doi: 10.1007/s40415-014-0067-0](https://doi.org/10.1007/s40415-014-0067-0).
- Meng, F., Hu, L., Wang, S., Sui, X., Wei, L., Wei, Y., Sun, J. & Zhang, Z. (2008) Effects of exogenous abscisic acid (ABA) on cucumber seedling leaf carbohydrate metabolism under low temperature. *Plant Growth Regulators*, 56, 233-244. [https://doi: 10.1007/s10725-008-9303-6](https://doi.org/10.1007/s10725-008-9303-6).
- Nakano, Y. & Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880. [https://doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232).
- Pagter, M., Jensen, C. R., Petersen, K. K., Liu, F. & Arora, R. (2008) Changes in carbohydrates, ABA and bark

- Yu, D. J. & Lee, H. J. (2020) Evaluation of freezing injury in temperate fruit trees. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 61, 787-794. [https://doi: 10.1007/s13580-020-00264-4](https://doi.org/10.1007/s13580-020-00264-4).
- Zhang, X., Wang, K., & Ervin, E. H. (2008). Bermudagrass freezing tolerance associated with abscisic acid metabolism and dehydrin expression during cold acclimation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(4), 542-550. [https://doi: 10.21273/JASHS.133.4.542](https://doi.org/10.21273/JASHS.133.4.542).
- Zhang, Y., Jiang, W., Yu, H. & Yang, X. (2012) Exogenous abscisic acid alleviates low temperature-induced oxidative damage in seedlings of *Cucumis sativus*. L. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 28, 221-228. [https://doi: 10.1042%2Fbj0570508](https://doi.org/10.1042%2Fbj0570508).
- 40, 842-849. [https://doi: 10.21273/HORTSCI.40.3.842](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.3.842).
- Yang, H, Li, H., Rao, L., Long, G., Shi, G. & Peng, G. (2011) Effects of exogenous ABA on antioxidant enzymes in detached citrus leaves treated by rapid freezing. *African Journal of Biotechnology* 10 (48), 9779-9785.
- Yang, Y., Zhang, R., Leng, P., Hu, Z. & Shen, M. (2018) Effect of exogenous salicylic acid on the physiological and biochemical processes of *Ligustrum lucidum* during natural cold acclimation. *HortScience*, 53(6), 859-864. [https://doi: 10.21273/HORTSCI12949-18](https://doi.org/10.21273/HORTSCI12949-18).
- Yemm, E. W. & Willis, A. J. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemistry Journal*, 57, 508-514. [https://doi: 10.1042%2Fbj0570508](https://doi.org/10.1042%2Fbj0570508).