Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

Alleviation of freezing injury to *Coronilla varia* ground cover by foliar application of glycine betaine

Zahra Hatami[1] | Zeynab Roein[*2] | Mohammad Ali Shiri[3]

1. M.Sc. Student, Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran. E-mail: hatamizahra@yahoo.com
2. Corresponding Author, Assistant Prof., Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran. E-mail: z.roein@ilam.ac.ir
3. Research Assistant Prof., Citrus and Subtropical Fruit Research Center, Horticulture Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran. E-mail: ma.shiri64@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 11.29.2020
Revised: 02.28.2021
Accepted: 04.03.2021

Keywords:
Coronilla,
Ion leakage,
Physiological response,
Proline,
Stress

ABSTRACT

Background and Objectives: *Coronilla varia* or crownvetch is belonging to the Fabaceae family that is wildly distributed in different parts of Iran. The rapid spread of roots and shoots, as well as the ability to grow in stressful conditions, has caused it to be used to control soil erosion. In addition, the possibility of moving and regrowth has made *Coronilla* an appropriate alternative to turfgrass in green spaces. The aim of this study was to evaluate the response of *Coronilla* to freezing stress and the effect of glycine betaine on reducing seedling damage.

Materials and Methods: a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. Low temperature for one hour in five levels [25 (control), 0, -5, -10 and -15 °C] were used as the first factor and spraying with glycine betaine (one day before freezing stress) on two levels (0 and 100 mM) was considered as the second factor. After freezing stress, freezing injury, and physiological (relative water content, ion leakage) and biochemical (chlorophyll, proline, lipid peroxidation, protein, and peroxidase) attributes were measured.

Results: According to the results, exposure to freezing temperatures (-10 and -15 °C) increased the damage to *Coronilla* shoots. The absence of the difference between 0 and -5 °C indicates that the temperature of -5 °C is tolerable for the *Coronilla*. Foliar application of glycine betaine reduced leaf damage. The results showed that under freezing stress the relative water content of leaves and roots decreases. The lowest relative water content of leaf with 57.18% and 59.02% was related to severe stress at -10 and -15 °C, respectively. Under freezing temperatures, the amount of ion leakage of roots and leaves increased, so that under severe stress of low temperature -15 °C compared to 25 °C, the amount of ion leakage of leaves increased by 27%. With decreasing temperature, the chlorophyll content of the leaves first increased at 0 °C compared to 25 °C, then decreased at temperatures below 0 °C. While the use of glycine betaine (100 mM) increased the leaf chlorophyll content under freezing conditions. The results showed that with lowering temperatures, the amount of proline in leaf and root increased. In addition, foliar application of glycine betaine increased leaf proline by 7%. On the other hand, freezing stress led to a decrease in leaf (16%) and root (26%) protein at -10 °C in *Coronilla*. In addition, compared to control with lowering the temperature, the high accumulation of malondialdehyde (leaf, 193%; root, 141%), and the activity of peroxidase enzyme in leaves (66%) and roots (156%) recorded.

Conclusion: Based on the results, it can be concluded that physiological and biochemical traits of *Coronilla* were affected by freezing stress. According to the results, leaf vulnerability was higher than the root. Low temperature caused damage to *Coronilla* by reducing the relative water content and ion leakage of leaves and roots. While spraying with 100 mM glycine betaine reduced the negative effects of freezing stress. Also, foliar application of glycine betaine effectively alleviates the adverse effects of freezing injury in *Coronilla* by increasing the accumulation of compatible osmolytes such as proline in leaves and roots.

Cite this article: Hatami, Zahra, Roein, Zeynab, Shiri, Mohammad Ali. 2022. Alleviation of freezing injury to *Coronilla varia* ground cover by foliar application of glycine betaine. *Journal of Plant Production Research*, 28 (4), 195-212.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2021.18569.2738
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

کاهش آسیب یخزدگی در گیاه پوششی کورونیلا (*Coronilla varia*) با محلول‌پاشی گلایسین بتائین

زهرا حاتمی[۱] | زینب روئین*[۲] | محمد علی شیری[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد علوم باغبانی- گیاهان زینتی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران. رایانامه: hatamizahra@yahoo.com
۲. نویسنده مسئول، استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران. رایانامه: z.roein@ilam.ac.ir
۳. استادیار پژوهشی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران. رایانامه: ma.shiri64@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۰۹
تاریخ ویرایش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۴

واژه‌های کلیدی:
پاسخ فیزیولوژیک،
پرولین،
تنش،
کورونیلا،
نشت یونی

چکیده

سابقه و هدف: کورونیلا (*Coronilla varia*) یا یونجه تاجی یکی از گیاهان خانواده Fabaceae است که به‌صورت خودرو در مناطق مختلف ایران پراکنش دارد. سرعت گسترش مناسب ریشه و شاخساره، هم‌چنین کیفیت ظاهری این گیاه در شرایط تنش سبب شده که برای کنترل فرسایش خاک از آن استفاده شود. علاوه بر این، دارا بودن پتانسیل سرزنی و رشد مجدد، کورونیلا را به یک گزینه مناسب برای جایگزین شدن با چمن در فضاهای سبز تبدیل کرده است. این مطالعه با هدف ارزیابی پاسخ کورونیلا به تنش یخزدگی و تاثیر گلایسین بتائین در کاهش آسیب به گیاهچه آن، انجام شد.

مواد و روش‌ها: آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. دمای پایین به‌مدت یک ساعت در پنج سطح [۲۵ (شاهد)، صفر، ۵-، ۱۰- و ۱۵- درجه سلسیوس] به عنوان عامل اول و محلول‌پاشی با گلایسین بتائین (یک روز قبل از تنش یخزدگی) در دو سطح (صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار) به عنوان عامل دوم در نظر گرفته شد. بعد از تنش یخزدگی، میزان آسیب یخزدگی و شاخص‌های فیزیولوژیک (محتوای نسبی آب، نشت یونی) و زیست- شیمیایی (میزان کلروفیل، پرولین، پراکسیداسیون لیپیدها، پروتئین و آنزیم پراکسیداز) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: براساس نتایج، مواجه گیاهچه کورونیلا با دماهای پایین (۱۰- و ۱۵- درجه سلسیوس) موجب افزایش آسیب به شاخساره آن شد. عدم تفاوت معنی‌دار بین دمای صفر و ۵- درجه سلسیوس نشان‌دهنده قابل تحمل بودن دمای ۵- درجه سلسیوس برای گیاه است. محلول‌پاشی با گلایسین بتائین خسارت و آسیب به برگ را کاهش داد. نتایج نشان داد که تحت تنش یخزدگی محتوای نسبی آب برگ و ریشه کاهش می‌یابد. کم‌ترین محتوای نسبی آب برگ با

میزان ۵۷/۱۸ درصد و ۵۹/۰۲ درصد به ترتیب مربوط به تنش شدید در دماهای ۱۰- و ۱۵- درجه سلسیوس بود. مواجه گیاه با دماهای یخزدگی مقدار نشت یونی ریشه و برگ را افزایش داد، به‌طوری‌که تحت تنش شدید دمای پایین (۱۵- درجه سلسیوس) نسبت به شاهد (دمای ۲۵ درجه سلسیوس) میزان نشت یونی برگ افزایش ۲۷ درصدی نشان داد. با کاهش دما، محتوای کلروفیل برگ ابتدا در دمای صفر درجه سلسیوس نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس افزایش و در دماهایی زیر صفر درجه سلسیوس کاهش یافت. در حالی‌که کاربرد گلایسین بتائین (۱۰۰ میلی‌مولار) باعث افزایش محتوای کلروفیل برگ تحت شرایط تنش یخزدگی شد. نتایج نشان داد که با کاهش دما، میزان پرولین در برگ و ریشه افزایش می‌یابد. محلول‌پاشی گلایسین بتائین باعث افزایش ۷ درصدی پرولین برگ شد. از طرف دیگر، تنش یخزدگی منجر به کاهش میزان پروتئین برگ (۱۶ درصد) و ریشه (۲۶ درصد) کورونیلا در دمای ۱۰- درجه سلسیوس شد. علاوه بر این با کاهش دما، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ (۶۶ درصد) و ریشه (۱۵۶ درصد) و هم‌چنین میزان مالون دی‌آلدهید برگ (۱۹۳ درصد) و ریشه (۱۴۱ درصد) افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: می‌توان جمع‌بندی کرد که شاخص‌های فیزیولوژیکی و زیست- شیمیایی کورونیلا تحت‌تأثیر تنش یخزدگی قرار گرفتند. براساس نتایج، میزان آسیب‌پذیری برگ کورونیلا بیش‌تر از ریشه بود. دمای پایین از طریق کاهش محتوای نسبی آب برگ و ریشه و افزایش نشت یونی سبب آسیب به شاخساره کورونیلا شد، در حالی‌که محلول‌پاشی با ۱۰۰ میلی‌مولار گلایسین بتائین اثرات منفی تنش را کاهش داد. هم‌چنین محلول‌پاشی گلایسین بتائین از طریق افزایش تجمع اسمولیت‌های سازگار مانند پرولین در برگ و ریشه باعث کاهش اثرات نامطلوب تنش دمای پایین در کورونیلا گردید.

استناد: حاتمی، زهرا، روئین، زینب، شیری، محمد علی (۱۴۰۰). کاهش آسیب یخزدگی در گیاه پوششی کورونیلا (*Coronilla varia*) با محلول‌پاشی گلایسین بتائین. *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۲۸ (۴)، ۲۱۲-۱۹۵.
DOI: 10.22069/JOPP.2021.18569.2738

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

کورونیلا (*Coronilla varia*) یا یونجه تاجی گیاه علفی چندساله از خانواده Fabaceae است که دامنه پراکنش گسترده‌ای در مناطق مدیترانه، آسیا، اروپا، شمال آفریقا و آمریکا دارد (۳). کورونیلا از طریق رشد ریزوم‌های چند شاخه‌ای می‌تواند تا سه متر گسترده شود. این گیاه طی مدت چهار سال ۲۰ تا ۳۰ مترمربع را به‌طور کامل پوشش می‌دهد (۳۱). کورونیلا به عنوان یک زمین‌پوش زینتی و مرتعی برای کنترل علف‌های هرز، تثبیت نیتروژن جوّ، افزایش فعالیت آنزیمی خاک و بهبود محیط خرد- بوم‌شناختی خاک به‌طور وسیعی در امتداد جاده‌ها و بزرگراه‌ها برای کنترل فرسایش یا استحکام حاشیه جاده به کار می‌رود (۴ و ۵۲).

تنش یخ‌زدگی مجموعه‌ای از تنش‌ها و آسیب‌هاست که در نتیجه قرار گرفتن گیاه در معرض دمای پایین و به همراه تنش مکانیکی ناشی از تشکیل یخ در بافت‌ها بروز می‌نماید (۴۴ و ۵۱)، به‌طوری‌که تشکیل بلورهای یخ در اطراف سلول‌های گیاه سبب تخریب غشا، نشت الکترولیت‌ها و ایجاد لکه‌های نکروزه در گیاه می‌شود (۵۱). گیاهان به‌منظور مقاومت در برابر صدمات ناشی از تنش‌های محیطی سازوکارهای متعددی به‌کار می‌گیرند. یکی از رایج‌ترین رفتارهای دفاعی گیاهان در برابر تنش‌های زیستی تولید و تجمع املاح سازگار (اسمولیت‌ها) است. این مواد دارای محلولیت بالا بوده و در غلظت‌های بالا غیرسمی هستند. از جمله اسمولیت‌های مهم می‌توان اسید آمینه پرولین، پلی‌آمین‌ها، گلایسین بتائین و قندها (مانیتول، سوربیتول و ترهالوز) را نام برد (۱۴). گلایسین بتائین به‌عنوان محافظت‌کننده اسمزی در اکثر ریزجانداران، گیاهان و حیوانات وجود دارد. این ترکیب از ترکیبات آمونیومی چهار ظرفیتی شناخته شده است که در پاسخ به تنش در مقادیر بالا در گیاهان وجود دارد (۱۱). گلایسین بتائین نقش مهمی در تحریک سامانه آنتی‌اکسیدانی گیاهان بازی می‌کند و موجب افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز می‌شود. علاوه بر این، با محافظت از رنگدانه‌های فتوسنتزی و محتوای کلروفیل به بهبود رشد گیاه کمک می‌کند (۲).

به دنبال کاهش دمای محیط و افزایش شدت یخ‌زدگی فعالیت‌های متابولیک گیاه دچار اختلال می‌شود و در نهایت درصد بقای گیاه کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای روی بنفشه (*Viola×wittrockiana*) مشخص شد که این گیاه تا دمای ۶- درجه سلسیوس را بدون خسارت تحمل می‌کند، اما با کاهش دما به ۱۵- درجه سلسیوس درصد بقای آن به صفر می‌رسد (۳۶). کاهش محتوای نسبی آب برگ و افزایش پرولین و مالون دی‌آلدهید در چمن زویشیا (*Zoysia*) از جمله تغییراتی است که در شرایط تنش سرما گزارش شده است (۴۹ و ۲۷). در بررسی اثر تنش یخ‌زدگی در گل لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*) مشاهده شد که میزان پرولین، پروتئین، مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش یخ‌زدگی افزایش یافت (۱۵). کاهش کارایی مصرف آب و فتوسیستم‌های I و II، هم‌چنین کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی از نتایج مواجه گیاهان استویا (*Stevia rebaudiana*)، ردودندرون (*Rhododendron catawbiense*) و چای (*Camellia sinensis*) با تنش سرمایی بود (۱۶، ۲۴ و ۲۶). افزایش رشد چمن (*Lolium perenne*) به دنبال کاربرد بیرونی گلایسین بتائین (۱۰۰ میلی‌مولار) در شرایط تنش دمای پائین نسبت به دماهای بهینه گزارش شده است (۳۰). از طرف دیگر، محلول‌پاشی با گلایسین بتائین در چمن فرش (*Axonopus compressus*) از طریق افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پرولین، پروتئین و کلروفیل سبب افزایش تحمل به تنش آن شد (۳۳).

در مناطق معتدله از جمله بخش‌هایی از ایران، چمن‌ها در پاییز و زمستان در معرض تنش دمای پایین قرار می‌گیرند که کیفیت ظاهری، رشد و بقاء زمستانه آن‌ها را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (۳۴). زمانی می‌توان یک گیاهان پوششی را به عنوان جانشین چمن معرفی کرد که حداقل یک ویژگی برجسته و منحصر به فرد مانند مقاومت به دمای پایین، خشکی و یا شوری داشته باشد. با توجه به عادت رشد چندساله گیاه کورونیلا و ادامه رشد و نمو آن در فصول سرد، رویارویی آن با تنش‌های زمستانه از جمله تنش یخ‌زدگی غیرقابل اجتناب است (۴۲). گیاه پوششی کورونیلا با داشتن برگ‌های مرکب و جذاب، قابلیت پاخوری و سرزنی مناسب می‌تواند در صورت مقاومت به یخ‌زدگی، در فضای سبز به‌عنوان جایگزین بسیار مناسبی برای چمن مطرح باشد. بنابراین آزمایش حاضر با هدف بررسی اثر محلول‌پاشی گلایسین بتائین بر رفتار فیزیولوژیکی گیاه کورونیلا در شرایط یخبندان انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیماردهی: این پژوهش در سال ۱۳۹۸ به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار و هر تکرار با سه نمونه در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام انجام گرفت. ترکیب تیماری آزمایش شامل پنج سطح دمایی [شاهد (۲۵+)، صفر، ۵-، ۱۰-، ۱۵- درجه سلسیوس] و محلول‌پاشی گلایسین بتائین در دو سطح (صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار) بودند. برای انجام پژوهش، قلمه‌های علفی کورونیلا (هشت سانتی‌متر) در بستر کشت شامل پیت و پرلایت (۱:۱) ریشه‌دار شد. پس از ریشه‌دار شدن قلمه‌ها، مراقبت‌های لازم ادامه داشت تا اندازه شاخساره در گیاهچه‌ها به حد مطلوبی برسد. قبل از اعمال تیمارها، همه گیاهچه‌های کورونیلا به‌مدت دو هفته در محیطی با دمای ۲۵ درجه سلسیوس جهت یکسان‌سازی شرایط قرار گرفتند. در ادامه تمام اندام هوایی گیاهچه‌های کورونیلا با محلول گلایسین بتائین ($C_5H_{11}NO_2$، وزن مولکولی ۱۱۷/۱۵ مولار، محصول شرکت ساینس لب) با دو غلظت صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار، محلول‌پاشی شدند. به منظور اعمال تیمارهای دمایی، ۲۴ ساعت پس از تیمار محلول‌پاشی گلایسین بتائین، گیاهچه‌ها (مستقر در گلدان و همراه با بستر کشت) به‌مدت یک ساعت به یخچال ترموگرادیان منتقل شده و در معرض دماهای یخ‌زدگی صفر، ۵، ۱۰-، ۱۵- درجه سلسیوس قرار گرفتند. لازم به ذکر است که گیاهان شاهد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از پایان اعمال تنش یخ‌زدگی، نمونه‌برداری‌های لازم جهت اندازه‌گیری صفات صورت گرفت.

اندازه‌گیری صفات: محتوای نسبی آب (RWC) برگ و ریشه بر اساس توزین وزن آماس و وزن خشک نمونه‌ها انجام شد (۴۷). برای تعیین پایداری غشاء پلاسمایی از روش اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها (EL) با دستگاه EC متر (مدل GLP 31) استفاده شد (۲۸). درصد آسیب یخ‌زدگی (FI) در هر تیمار سرمایی با استفاده از داده‌های حاصل از نشت یونی و رابطه ۱ محاسبه شد.

$$FI\ (\%) = [(\%L_{(t)} - \%L_{(C)} / (100 - \%L_{(C)}] \times 100 \quad (۱)$$

که در آن، $\%L_{(t)}$ و $\%L_{(C)}$ به‌ترتیب درصد نشت یونی در نمونه‌های تحت تیمار و نمونه شاهد هستند (۵).

سنجش میزان کلروفیل برگ (Chl) در طول موج ۶۴۷ و ۶۶۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Analytik Jena Specord 50 Plus) صورت

گرفت (۲۵). تعیین میزان پرولین برگ و ریشه با معرف نین هیدرین در طول موج ۵۲۰ نانومتر انجام شد (۸). در نهایت برای محاسبه مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده گردید و نتایج برحسب میکرومول بر گرم وزن‌تر گزارش شد.

به منظور استخراج عصاره آنزیمی، جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول، فعالیت آنزیم پراکسیداز و مالون‌دی‌آلدهید، ابتدا ۰/۱ گرم از نمونه‌های برگ فریز شده به کمک ترازو توزین و با استفاده از نیتروژن مایع درون هاون چینی آسیاب و به‌طور کامل پودر شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=۷) به نمونه پودر شده افزوده شد و در سطح یخ قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به‌منظور اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌های محلول برگ و ریشه از روش برادفورد (۹) در طول موج ۵۹۵ نانومتر استفاده شد که در نهایت بر اساس منحنی استاندارد، میزان پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر برگ محاسبه گردید. میزان مالون دی‌آلدهید (MDA) از روش هیث و پاکر (۱۹۶۸) در طول موج ۵۳۲ نانومتر سنجش گردید (۱۸). هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) در طول موج ۴۷۰ به‌مدت ۱۰۰ ثانیه با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۱۰).

تجزیه و تحلیل آماری: پس از انجام آزمون نرمال بودن داده‌ها، تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.1) و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

محتوای نسبی آب برگ و ریشه: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده تنش یخ‌زدگی بر محتوای نسبی آب برگ معنی‌دار شد. برای محتوای نسبی آب ریشه هم اثر ساده ترکیب تیماری آزمایش و هم اثر متقابل تنش یخ‌زدگی و گلایسین بتائین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). براساس مقایسه میانگین داده‌ها، با کاهش دما و افزایش شدت تنش محتوای نسبی آب برگ کاهش یافت. کم‌ترین محتوای نسبی آب برگ با میزان ۵۷/۱۸ درصد و ۵۹/۰۲ درصد به ترتیب مربوط به تنش شدید در دماهای ۱۰- و ۱۵- درجه سلسیوس بود (جدول ۲). نتایج اثر متقابل تنش یخ‌زدگی و گلایسین بتائین بر محتوای نسبی آب ریشه نشان داد که کاربرد گلایسین بتائین تا دمای ۵- درجه سلسیوس باعث کاهش اثرات منفی تنش یخ‌زدگی بر ریشه کورونیلا و حفظ محتوای نسبی آب آن می‌شود (شکل ۱). محتوای نسبی آب برگ به عنوان یک سازوکار جهت تعیین میزان مقاومت گیاهان به تنش شناخته شده است. برقرار بودن آماس سلول در هنگام تنش برای حفظ فرایندهای متابولیکی در گیاهان اهمیت بالایی دارد، بنابراین گیاهانی که بتوانند محتوای نسبی آب برگ بالاتری را داشته باشند به لحاظ مقاومت به تنش برتر خواهند بود (۴۶). در این پژوهش محلول‌پاشی گلایسین بتائین تا دمای ۵- درجه سلسیوس در حفظ محتوای نسبی آب ریشه (۱۹/۳۰ درصد) کورونیلا تأثیرگذار بود. گلایسین بتائین ممکن است از طریق افزایش هدایت هیدرولیکی و افزایش جریان آب از ریشه به برگ‌ها باعث افزایش محتوای نسبی آب و کاهش میزان تعرق شود (۲۰).

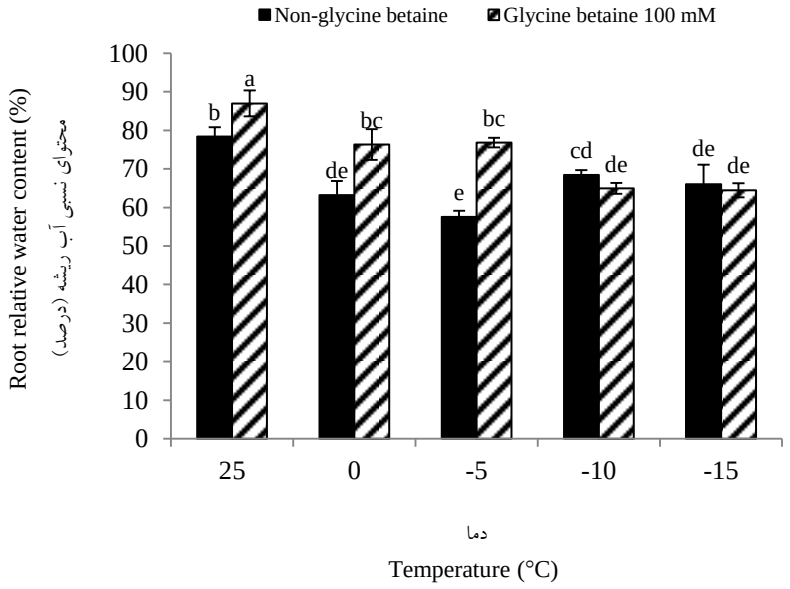
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر تنش یخ‌زدگی و محلول‌پاشی گلایسین بتائین بر صفات فیزیولوژیکی و زیست- شیمیایی کورونیلا.

Table 1. Results of variance analysis of freezing stress and glycine betaine foliar spraying on physiological and biochemical traits of *Coronilla.*

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square								
		محتوای نسبی آب برگ Leaf RWC	محتوای نسبی آب ریشه Root RWC	نشت یونی برگ Leaf EL	نشت یونی ریشه Root EL	آسیب یخ‌زدگی برگ Freezing injury in Leaf	آسیب یخ‌زدگی ریشه Freezing injury in root	کلروفیل Chl	پرولین برگ Leaf proline	پرولین ریشه Root proline
تنش یخ‌زدگی Freezing stress	4	157.6**	303**	301.9**	259.6**	2836**	2723**	0.576**	0.00014*	0.00093**
گلایسین بتائین GB	1	0.65^{ns}	387.5**	25.96^{ns}	132.25*	2065**	143.4^{ns}	0.376**	0.00040**	0.00507**
Freezing stress × GB	4	14. 73^{ns}	140.1**	57.35^{ns}	58.92*	353.5^{ns}	474.3^{ns}	0.113**	0.00006^{ns}	0.00086**
خطا Error	20	6.11	25	44	18.2	237	231	0.018	0.00004	0.00007
ضریب تغییرات (درصد) CV%		3.99	7.11	8.33	5.35	4.56	5.40	8.31	5.39	6.59

*، ** و ^{ns} به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و بدون تفاوت معنی‌دار.

*, **, ^{ns} Significantly differences at of 5% and 1% of probability levels and non-significantly differences, respectively.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش یخ‌زدگی و محلول‌پاشی گلایسین بتائین بر محتوای نسبی آب ریشه کورونیلا.

Fig. 1. Mean comparison interaction effect of freezing stress and glycine betaine foliar spraying on root relative water content of *Coronilla.*

نشت یونی برگ و ریشه: بر اساس داده‌های جدول ۱، فقط اثر ساده تنش یخ‌زدگی بر نشت یونی برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثرات ساده تنش یخ‌زدگی (در سطح احتمال یک درصد) و گلایسین بتائین (در سطح احتمال پنج درصد) و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال پنج درصد بر نشت یونی ریشه معنی‌دار شدند (جدول ۱). نتایج نشان داد که با افزایش تنش یخ‌زدگی میزان نشت یونی برگ افزایش یافت. به طوری که تحت تنش شدید یعنی دمای پایین ۱۵- درجه سلسیوس، نسبت به تیمار شاهد (دمای ۲۵ درجه سلسیوس) میزان نشت یونی برگ افزایش ۲۷ درصدی نشان داد (جدول ۲). از طرف دیگر، میزان نشت یونی ریشه با کاهش بیش‌تر دما روند افزایشی داشت. کاربرد گلایسین بتائین تا دمای ۵- درجه سلسیوس باعث کاهش اثرات منفی تنش یخ‌زدگی شد، اما حضور گلایسین بتائین در دماهای منفی‌تر (۱۵- درجه سلسیوس) موثر نبود (شکل ۲). برآورد صدمات فیزیولوژیکی ناشی از دماهای پایین در گیاهان، توسط اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها قابل ارزیابی است و با تعیین درصد خروج الکترولیت‌ها از سلول می‌توان میزان آسیب به ساختار غشاء سلولی را مشخص کرد (۳۲). همسو با نتایج حاضر، افزایش میزان نشت یونی در برگ و اندام زیرزمینی زعفران نیز در پاسخ به تنش سرمایی گزارش شده است (۲۲). از دلایل افزایش میزان نشت یونی تحت شرایط تنش می‌توان به تغییر در تراوایی غشاء سلولی اشاره کرد. زیرا این پدیده منجر به اختلال در ورود و خروج مواد به سلول می‌شود (۲۳). گلایسین بتائین می‌تواند سبب محافظت از غشای پلاسمایی سلول‌ها در مقابل اثرات تخریبی دمای محیط گردد (۲۹). گلایسین بتائین از طریق جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و حفظ یکپارچگی غشاء باعث کاهش آسیب اکسیداتیو به غشاء و بهبود تحمل سرما می‌شود (۳۸). مطابق با نتایج ما، استفاده از گلایسین بتائین قبل از تیمار سرمایی، در حفظ پایداری و یکپارچگی غشا سلولی موز نقش موثری داشت (۴۱).

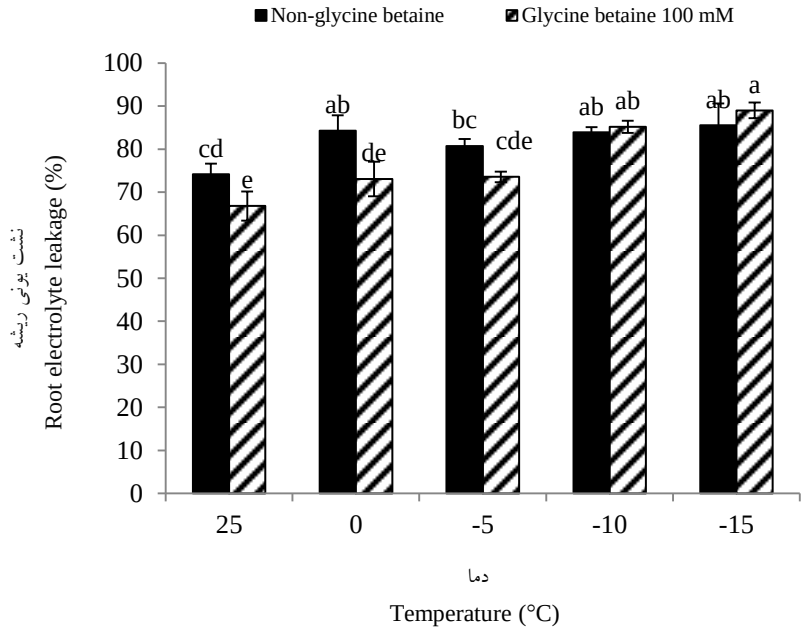
جدول ۲- مقایسه میانگین تنش یخ‌زدگی و محلول‌پاشی گلایسین بتائین بر میزان محتوای نسبی آب، نشت یونی و میزان پرولین برگ کورونیلا.

Table 2. Mean comparison of freezing stress and glycine betaine foliar spraying on RWC, ion leakage and proline content of *Coronilla* leaf.

تیمار Treatment	محتوای نسبی آب برگ Leaf RWC (%)	نشت یونی برگ Leaf EL (%)	پرولین برگ Leaf proline (µmol/g FW)
تنش یخ‌زدگی Freezing stress			
25 °C	70.30±0.92^{a}	68.28±3.71^{b}	0.106±0.002^{c}
0 °C	60.05±0.57^{bc}	78.96±2.23^{a}	0.108±0.002^{bc}
-5 °C	62.67±1.5^{b}	79.52±2.12^{a}	0.115±0.005^{ab}
-10 °C	57.18±1.13^{c}	84.48±1.46^{a}	0.118±0.003^{a}
-15 °C	59.02±1.16^{c}	86.6±3.53^{a}	0.113±0.002^{abc}
گلایسین بتائین Glycine betaine			
0 mM	-	-	0.108±0.002^{b}
100 mM	-	-	0.116±0.002^{a}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means in each column, followed by similar letters are not significantly different at the 5% probability level using LSD ($P\leq0.05$) test.

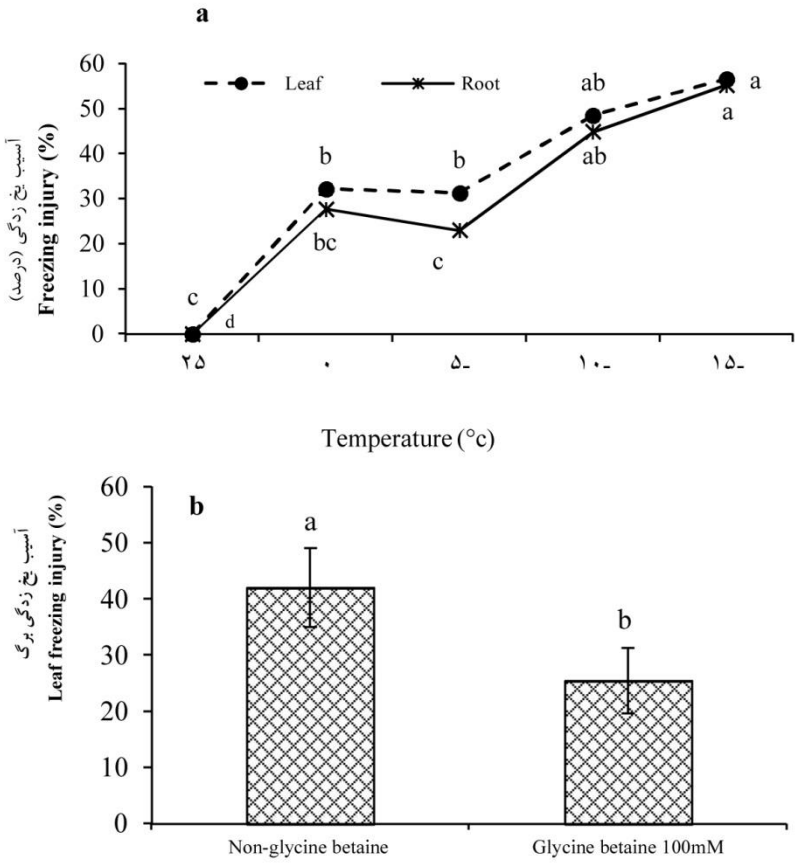


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش یخزدگی و محلول‌پاشی گلایسین بتائین بر نشت یونی ریشه کورونیلا.

Fig. 2. Mean comparison interaction effect of freezing stress and glycine betaine foliar spraying on root electrolyte leakage of *Coronilla.*

درصد آسیب یخزدگی به گیاهچه: بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها اثر ساده دمای پایین بر میزان آسیب یخزدگی برگ و ریشه، هم‌چنین اثر ساده گلایسین بتائین بر درصد آسیب به برگ کورونیلا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). اثر متقابل تنش دمای پائین و گلایسین بتائین در برگ و ریشه معنی‌دار نشد. نتایج این آزمایش نشان داد که کاهش دما به ۱۰- و ۱۵- درجه سلسیوس موجب افزایش آسیب یخزدگی برگ‌های کورونیلا می‌شود. درحالی‌که عدم تفاوت معنی‌دار بین دمای صفر و ۵- درجه سلسیوس نشان‌دهنده قابل تحمل بودن دمای ۵- درجه سلسیوس برای گیاه است (شکل ۳a). زمانی که محلول‌پاشی با گلایسین بتائین انجام شد، سطح خسارت و آسیب به بافت برگ تغییر کرد. به طوری که محلول‌پاشی گلایسین بتائین کاهش آسیب سرما (۴۰ درصد) در گیاه کورونیلا را در پی داشت. بیش‌ترین آسیب در برگ یا اندام هوایی مربوط به شرایط بدون حضور گلایسین بتائین بود (شکل ۳b). واکنش ریشه نسبت به آسیب سرمایی اندکی متفاوت بود (شکل ۳a). با وجود این‌که با کاهش دما به ۱۰- و ۱۵- درجه سلسیوس شدت آسیب به ریشه همانند بخش شاخساره افزایش یافت، اما در دمای ۵- درجه سلسیوس میزان آسیب ریشه کم‌تر از برگ بود. با مقایسه شدت آسیب برگ و ریشه مشخص می‌شود که برگ نسبت به تنش سرما حساس‌تر است و آسیب بیش‌تری به آن وارد شده است. به احتمال زیاد بستر کشت به‌عنوان یک عایق دمایی مانع از ایجاد اثرات مخرب دمای پایین بر ریشه شده است، در حالی‌که برگ‌ها مستقیم در معرض دمای پایین قرار گرفته و تخریب و پارگی غشاء در آن‌ها بیش‌تر اتفاق افتاده است. نکته دیگر این‌که، تأثیر گلایسین بتائین در برگ بهتر از ریشه بود. احتمالاً گلایسین بتائین از طریق کاهش میزان نشت یونی و آسیب اکسیداتیو باعث افزایش مقاومت گیاه به سرما شده است و از

این طریق خسارت یخ‌زدگی به گیاهچه کورونیلا را کاهش داده است. همسو با نتایج حاضر، کرمی و همکاران (۲۰۱۸) نیز آسیب دمای پائین را روی توت‌فرنگی گزارش نمودند (۲۱).

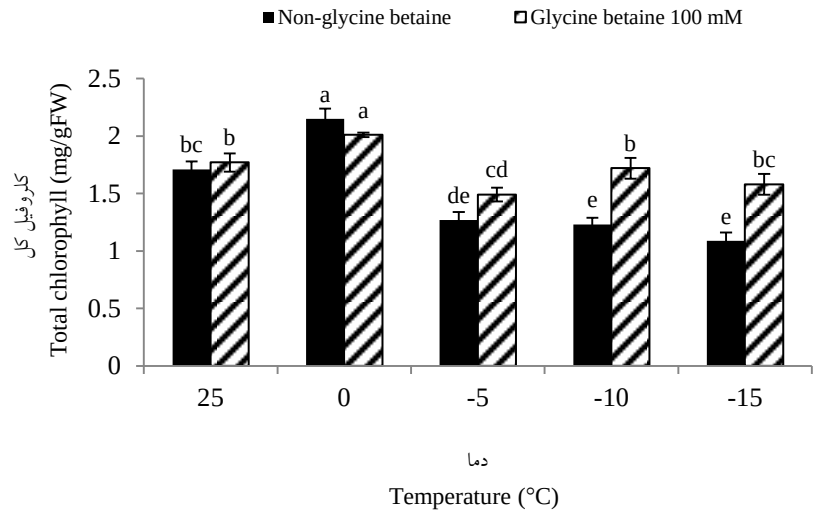


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر تنش یخ‌زدگی (a) و محلول‌پاشی گلایسین بتائین (b) بر آسیب یخ‌زدگی به برگ و ریشه کورونیلا.

Fig. 3. Mean comparison effect of freezing stress (a) and glycine betaine foliar spraying (b) on freezing injury for leaf and root of *Coronilla*.

محتوای کلروفیل: داده‌های جدول ۱ نشان داد که اثر ساده تنش یخ‌زدگی و تیمار گلایسین بتائین و اثر متقابل آن‌ها بر محتوای کلروفیل برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با کاهش دما به صفر درجه سلسیوس ابتدا محتوای کلروفیل برگ نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس افزایش یافت، اما با کاهش بیش‌تر دما و افزایش شدت تنش یخ‌زدگی در دماهایی زیر صفر درجه سلسیوس محتوای کلروفیل کاهش یافت. این نتایج در حالی به‌دست آمد که کاربرد گلایسین بتائین باعث افزایش محتوای کلروفیل برگ تحت شرایط تنش یخ‌زدگی شد. کم‌ترین محتوای کلروفیل مربوط به دمای ۱۵- درجه سلسیوس بدون محلول‌پاشی گلایسین بتائین بود که به ترتیب کاهش ۴۹ درصدی و ۳۶ درصدی نسبت به دمای صفر و ۲۵ درجه سلسیوس داشت (شکل ۴). همسو با نتایج حاضر، کاهش کلروفیل با کاهش دمای یخ‌زدگی در زعفران نیز گزارش شد (۲۲). تغییر میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تنش دمای پایین به‌عنوان یک شاخص برای ارزیابی پتانسیل برگشت‌پذیری گیاه بعد از تنش محسوب می‌شود (۳۵). این تغییر ممکن است

به‌دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، وقوع پدیده پراکسیداسیون و در نتیجه تخریب این رنگدانه‌ها در غشای کلروپلاست و تیلاکوئیدها باشد (۱۹). از آن‌جایی‌که گلایسین بتائین تجمع بالایی در کلروپلاست‌ها دارد، انتظار می‌رود که فعالیت آنزیم و یکنواختی غشا را بهبود بخشد. در نتیجه سبب حفظ کارایی فتوسنتز و تنظیم اسمزی گیاهان تحت شرایط تنش شود (۴۰). افزایش میزان کلروفیل در گیاهان تیمار شده با گلایسین بتائین می‌تواند با تأثیر این تیمار بر تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی، کاهش سطح گونه‌های فعال اکسیژن و تأخیر در تخریب کلروفیل مرتبط باشد (۱۱ و ۴۹).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش یخ‌زدگی و محلول‌پاشی گلایسین بتائین بر محتوای کلروفیل برگ کورونیلا.

Fig. 4. Mean comparison interaction effect of freezing stress and glycine betaine foliar spraying on total chlorophyll content of *Coronilla*.

میزان پرولین برگ و ریشه: بر اساس جدول تجزیه واریانس داده‌ها، اثر تنش یخ‌زدگی در سطح احتمال پنج درصد و گلایسین بتائین در سطح احتمال یک درصد بر میزان پرولین برگ معنی‌دار شد. از طرف دیگر، علاوه بر اثرات ساده، برهمکنش گلایسین بتائین و تنش یخ‌زدگی نیز بر میزان پرولین ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). نتایج نشان داد که با کاهش دما میزان پرولین در برگ و ریشه افزایش یافت، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان پرولین برگ در دمای ۱۰- درجه سلسیوس به‌دست آمد، هر چند با دمای ۵- و ۱۵- درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری نداشت. علاوه بر این، محلول‌پاشی گلایسین بتائین باعث افزایش ۷ درصدی پرولین برگ نسبت به شاهد شد (جدول ۲). بر اساس نتایج، با اعمال شرایط تنش دمای پائین (از دمای صفر درجه سلسیوس) میزان پرولین ریشه در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار گلایسین بتائین نسبت به شاهد افزایش یافت (جدول ۴). همسو با یافته‌های ما، اورعی و همکاران (۲۰۲۰) افزایش میزان پرولین در گل بنفشه را در افزایش تحمل تنش مؤثر دانستند (۳۷). تنظیم اسمزی برای حفظ عملکردهای سوخت‌وسازی سلول مهم است، زیرا به گیاه اجازه می‌دهد تا فشار تورگر و حجم سلول را در پتانسیل پایین آب حفظ کند. علاوه بر این، تنظیم اسمزی سبب تسهیل فعالیت‌های سوخت‌وسازی پس از

رهایی از تنش می‌شود. تجمع اسمولیت‌ها و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها راهبردهای مهم تحمل تنش هستند که با گذشت زمان در گیاهان مقاوم در برابر تنش، پایدار می‌مانند تا در برابر تنش‌های پی‌در پی مقاومت کنند (۱). پرولین یکی از مهم‌ترین مواد تنظیم‌کننده اسمزی در گیاهان است که موجب مقاومت غشاها در برابر خطرات یخزدگی می‌شود. در هنگام تنش، گیاهان می‌توانند مجموعه‌ای از تنظیمات فیزیولوژیکی و سوخت‌وسازی را انجام دهند و با تجمع مواد محلول دمای یخزدگی سلول‌ها و بافت‌ها را کاهش دهند (۷). افزایش میزان پرولین می‌تواند موجب افزایش تثبیت غشای سلول‌های گیاهی شده و از یکپارچگی غشاء در حین کم آبی ناشی از یخزدگی محافظت کند (۳۹).

میزان پروتئین برگ و ریشه: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده و بر همکنش تنش یخزدگی و گلایسین بتائین بر میزان پروتئین برگ و ریشه کورونیلا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). بررسی نتایج نشان داد که با کاهش دما و افزایش سطح تنش یخزدگی، میزان پروتئین در برگ و ریشه کاهش یافت. محلول‌پاشی کورونیلا با گلایسین بتائین ۱۰۰ میلی‌مولار در شرایط تنش یخزدگی (۱۰- درجه سلسیوس) باعث افزایش معنی‌دار پروتئین برگ (۱۱۲ درصد) و ریشه (۵۶ درصد) نسبت به شاهد ۲۵ درجه سلسیوس گردید (جدول ۴).

نقش اسمولیت‌هایی مانند گلایسین بتائین محافظت از ساختار چهارم پروتئین‌ها و حفظ فعالیت آنزیم از اثرات مخرب تنش‌های محیطی است (۶ و ۴۵). به احتمال زیاد گلایسین بتائین از طریق جلوگیری از تخریب پروتئین‌های موجود و زدودن گونه‌های فعال اکسیژن باعث حفاظت از غشاهای سلولی و تحمل به تنش سرما در کورونیلا شده است.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر تنش یخزدگی و محلول‌پاشی گلایسین بتائین بر صفات زیست- شیمیایی کورونیلا.

Table 3. Results of variance analysis of freezing stress and glycine betaine foliar spraying on biochemical traits of *Coronilla*.

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square					
		پروتئین برگ Leaf protein	پروتئین ریشه Root protein	مالون دی آلدهید برگ Leaf MDA	مالون دی آلدهید ریشه Root MDA	آنزیم پراکسیداز برگ Leaf POX	آنزیم پراکسیداز ریشه Root POX
تنش یخزدگی Freezing stress	4	17.71**	7.74**	8.95**	72.62**	0.263**	1.706**
گلایسین بتائین GB	1	44.97**	27.04**	0. 04^{ns}	46.05**	1.216**	0.160**
Freezing stress ×GB	4	22.84**	16.21**	9.12**	8.68**	0.192**	0.162**
خطا Error	20	0.24	6.43	0.30	0.95	0.003	0.014
ضریب تغییرات (درصد) CV%		8.16	0.29	11.01	8.33	8.30	7.39

*، ** و ^{ns} به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و بدون تفاوت معنی‌دار.

*, **, ^{ns} Significantly differences at of 5% and 1% of probability levels and non-significantly differences, respectively.

محتوای مالون‌دی‌آلدهید برگ و ریشه: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده تنش یخ‌زدگی و اثر متقابل آن با گلایسین بتائین بر میزان مالون دی‌آلدهید برگ معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۱) شد (جدول ۳). از طرف دیگر، محتوای مالون‌دی‌آلدهید ریشه به طور معنی‌داری تحت‌تأثیر اثر ساده و متقابل تنش یخ‌زدگی و محلول‌پاشی گلایسین بتائین قرار گرفت (جدول ۳). با کاهش دما محتوای مالون‌دی‌آلدهید برگ و ریشه نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس افزایش یافت. علاوه بر این محلول‌پاشی گلایسین بتائین موجب کاهش محتوای مالون‌دی‌آلدهید برگ در دمای صفر، ۱۰- و ۱۵- درجه سلسیوس شد که در دمای ۱۵- درجه سلسیوس موجب کاهش بیش‌تر آن شد، اما در دمای ۲۵ و ۵- درجه سلسیوس موجب افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدهید برگ شد (جدول ۴). همسو با نتایج حاضر، افزایش مالون‌دی‌آلدهید به دنبال محلول‌پاشی با بتائین گلایسین (۲/۵ میلی‌مولار) در گیاه پنبه (*Gossypium hirsutum*) نیز گزارش شده است (۱۷). از طرف دیگر، محلول‌پاشی گلایسین بتائین در شرایط تنش دمای پائین موجب کاهش مالون‌دی‌آلدهید ریشه نسبت به شرایط بدون محلول‌پاشی گلایسین بتائین شد و اثرات تنش یخ‌زدگی را کاهش داد (جدول ۴). در پی تنش سرما، نشت الکترولیت‌ها از سیستم انتقال الکترون در فرایندهای فتوسنتز و تنفس اتفاق می‌افتد که این موضوع با افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش میزان مالون‌دی‌آلدهید در ارتباط است (۵۰).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش یخ‌زدگی و محلول‌پاشی گلایسین بتائین بر صفات زیست- شیمیایی کورونیلا.

Table 4. Mean comparison interaction effect of freezing stress and glycine betaine foliar spraying on biochemical traits of *Coronilla.*

تیمار Treatment		پرولین ریشه Root proline (µmol/g FW)	پروتئین برگ Leaf protein (mg/gFW)	پروتئین ریشه Root protein (mg/gFW)	مالون دی‌آلدهید برگ Leaf MDA (nmol/gFW)	مالون دی‌آلدهید ریشه Root MDA (nmol/gFW)	آنزیم پراکسیداز برگ Leaf POX (U/gFW)	آنزیم پراکسیداز ریشه Root POX (U/gFW)
تنش یخ‌زدگی Freezing stress	گلایسین بتائین Glycine betaine							
25 °C	0 mM	0.11 ± 0^{e}	5.39 ± 0.34^{d}	7.45 ± 0.27^{e}	2.5 ± 0.36^{d}	6.71 ± 0.56^{g}	0.57 ± 0.02^{e}	0.86 ± 0.07^{e}
	100 mM	0.10 ± 0.006^{e}	6.21 ± 0.34^{e}	6.48 ± 0.22^{ef}	5.74 ± 0.16^{b}	7.57 ± 0.64^{fg}	0.53 ± 0.03^{ef}	0.63 ± 0.03^{f}
0 °C	0 mM	0.106 ± 0.003^{e}	3.93 ± 0.14^{e}	$10.83\pm0.25_{f}$	4.57 ± 0.27^{c}	15.03 ± 0.16^{b}	0.46 ± 0.05^{f}	1.48 ± 0.03^{c}
	100 mM	0.153 ± 0.007^{ab}	9.91 ± 0.20^{c}	9.43 ± 0.27^{d}	4.34 ± 0.25^{c}	10.66 ± 0.4^{5d}	0.85 ± 0.04^{d}	2.02 ± 0.02^{a}
-5 °C	0 mM	0.113 ± 0.003^{de}	6.81 ± 0.21^{c}	6.14 ± 0.25^{f}	5.63 ± 0.49^{b}	9.48 ± 0.31^{ed}	0.43 ± 0.01^{f}	1.74 ± 0.04^{b}
	100 mM	0.15 ± 0.006^{ab}	4.43 ± 0.29^{b}	10.43 ± 0.56^{cd}	7.07 ± 0.11^{a}	8.56 ± 0.56^{ef}	0.9 ± 0.04^{cd}	1.74 ± 0.05^{b}
-10 °C	0 mM	0.126 ± 0.003^{cd}	4.53 ± 0.20^{e}	5.49 ± 0.21^{c}	7.34 ± 0.53^{a}	16.2 ± 0.76^{ab}	0.95 ± 0.04^{c}	2.2 ± 0.12^{a}
	100 mM	0.14 ± 0.006^{bc}	11.46 ± 0.46^{a}	11.65 ± 0.33^{a}	4.99 ± 0.14^{bc}	13.09 ± 0.67^{c}	1.21 ± 0.02^{a}	2.19 ± 0.05^{a}
-15 °C	0 mM	0.113 ± 0.003^{de}	2.95 ± 0.10^{f}	7.45 ± 0.19^{g}	4.93 ± 0.26^{bc}	17.35 ± 0.4^{a}	0.15 ± 0.009^{g}	1.27 ± 0.05^{d}
	100 mM	0.156 ± 0.007^{a}	3.83 ± 0.27^{c}	8.87 ± 0.36^{b}	2.44 ± 0.24^{d}	12.5 ± 0.77^{c}	1.09 ± 0.03^{b}	1.7 ± 0.103^{b}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means in each column, followed by similar letters are not significantly different at the 5% probability level using LSD ($P\leq0.05$) test.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ و ریشه: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثرات ساده و متقابل تنش یخ‌زدگی و محلول‌پاشی گلایسین بتائین بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ و ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). با کاهش دما و افزایش شدت تنش میزان پراکسیداز برگ و ریشه افزایش یافت (جدول ۴). علاوه بر این، محلول‌پاشی گلایسین بتائین موجب افزایش میزان پراکسیداز برگ و ریشه شد. به طوری که بیش‌ترین میزان پراکسیداز برگ و ریشه در شرایط حضور گلایسین بتائین در دمای ۱۰- درجه سلسیوس به‌دست آمد که نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌ترتیب افزایش ۱۲۸ و ۲۴۸ درصدی داشت (جدول ۴). گزارش شده است که با کاهش دما میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌منظور جلوگیری از آسیب‌های وارده به گیاه ناشی از تنش سرما و تولید پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد (۱۲). مطابق با یافته‌های ما، تحت شرایط یخ‌زدگی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز و کاتالاز برای حفظ تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن در گل داوودی (۴۸) و زیتون (۴۳) به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. گلایسین بتائین می‌تواند از طریق جلوگیری از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب اکسیداتیو فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشد (۱۳). علاوه بر این گلایسین بتائین به عنوان یک اسمولیت سیتوپلاسمی عمل می‌کند و آنزیم‌ها و غشاها را از آسیب تنش حفظ می‌کند (۱۱).

نتیجه‌گیری کلی

در پژوهش حاضر تمام صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تحت‌تأثیر تنش یخ‌زدگی قرار گرفتند و با کاهش دما به پائین‌تر از ۵- درجه سلسیوس آسیب‌پذیری گیاه به شدت افزایش یافت. در حالی‌که محلول‌پاشی گلایسین بتائین اثرات منفی تنش را کاهش داد. محلول‌پاشی گلایسین بتائین از طریق افزایش تجمع اسید امینه پرولین در برگ و ریشه باعث تحمل به تنش دمای پایین (۵- درجه سلسیوس) در کورونیلا شد. علاوه بر این محلول‌پاشی گلایسین بتائین با کاهش میزان نشت یونی ریشه و میزان مالون دی‌آلدهید برگ و ریشه موجب حفظ و ثبات غشاء و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها در برابر دمای پایین شد و خسارات تنش را کاهش داد. این نتایج نشان می‌دهد که گلایسین بتائین از طریق افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز، جلوگیری از تخریب پروتئین‌ها و کلروفیل باعث پایداری بافت شده و از متلاشی شدن بافت و اندام گیاهی ممانعت نموده است. با توجه به نتایج حاضر، بررسی پاسخ کورونیلا به تنش دمای پائین بعد از خوسرمایی می‌تواند در شناخت رفتار گیاه در شرایط دمای پائین مؤثر باشد.

منابع

1.Abid, M., Ali, S., Qi, L. K., Zahoor, R., Tian, Z., Jiang, D., Snider, J.L. and Dai, T. 2018. Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). Sci. Rep. 8(1): 1-15.

2.Ali, S., Abbas, Z., Seleiman, M. F., Rizwan, M., YavaŞ, İ., Alhammad, B. A., Shami, A., Hasanuzzaman, M. and Kalderis, D. 2020. Glycine betaine accumulation, significance and interests for heavy metal tolerance in plants. Plants. 9(7): 896.

3.Al-Snafi, A.E. 2016. The pharmacological and toxicological effects of *Coronilla varia* and *Coronilla scorpioides*: A Review. Pharm. Chem. J. 3(2): 105-114.

4.Amini, F., Noori, M., Askari, M., Foroughi, M. and Abbaspour, J. 2012. Ni induction changes to some biochemical traits and protein electrophoresis pattern of *Coronilla varia* under hydroponic culture. J. Crop Prod. Proc. 2 (5): 143-152. (In Persian)

5.Arrora, R.M.E. and Wisniewski, R. 1992. Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* Batsch). Plant Physiol. 99: 1562-1568.

6.Ashraf, M. and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot. 59: 206-216.

7.Bao, G., Ao, Q., Li, Q., Bao, Y., Zheng, Y., Feng, X. and Ding, X. 2017. Physiological characteristics of *Medicago sativa* L. In response to acid deposition and freeze-thaw stress. Water Air Soil Pollut. 228(9): 376.

8.Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil. 39(1): 205-207.

9.Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72(1-2): 248-254.

10.Chance, B. and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Meth. Enzymol. 2: 764-775.

11.Chen, T.H. and Murata, N. 2011. Glycine betaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. Plant Cell Environ. 34(1): 1-20.

12.Fathi, E., Tahmasebi, I. and Teimoori, N. 2016. Electrolyte leakage and catalase and peroxidase activity in chickpea genotypes seedling, in response to low temperatures. Agroecol. J. 12(2): 25-34. (In Persian)

13.Gan, L., Zhang, X., Liu, S. and Yin, S. 2018. Mitigating effect of glycine betaine pretreatment on drought stress responses of creeping bentgrass. Hort. Sci. 53(12): 1842-1848.

14.Giri, J. 2011. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signal. Behav. 6(11): 1746-1751.

15.Hajihashemi, S., Brestic, M., Landi, M. and Skalicky, M. 2020. Resistance *of Fritillaria imperialis* to freezing stress through gene expression, osmotic adjustment and antioxidants. Sci. Rep. 10(1): 1-13.

16.Hajihashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J., Djalovic, I. and Siddique, K.H. 2018. Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. Front. Plant Sci. 9: 1430.

17.Hamani, A.K.M., Wang, G., Soothar, M.K., Shen, X., Gao, Y., Qiu, R. and Mehmood, F. 2020. Responses of leaf gas exchange attributes, photosynthetic pigments and antioxidant enzymes in NaCl-stressed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings to exogenous glycine betaine and salicylic acid. BMC Plant Biol. 20(1): 1-14.

18.Heath, R.L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125(1): 189-198.

19.Hosseini Valashkolaee, S., Tajvar, Y., Azadbakht, M. and Rafie-rad, Z. 2018. Evaluation of physiological and biochemical responses of some ornamental Citrus varieties under low temperature stress. J. Crop Improv. 19(4): 979-994. (In Persian)

20.Hu, L., Hu, T., Zhang, X., Pang, H. and Fu, J. 2012. Exogenous glycine betaine ameliorates the adverse effect of salt stress on perennial ryegrass. J. Am. Soc. Hort. Sci. 137(1): 38-46.

21.Karami, F., Gholami, M., Ershadi, A. and Sio-Se Mardeh, A. 2018. Evaluation of winter cold tolerance and critical temperature (LT_{50}) estimation in 21 strawberry cultivars. Iran. J. Hort. Sci. 49(1): 79-91. (In Persian)

22.Koocheki, A. and Seyyedi, S.M. 2019. Mother corm origin and planting depth affect physiological responses in saffron (*Crocus sativus* L.) under controlled freezing conditions. Ind. Crops Prod. 138: 111468.

23.Kubiś, J., Floryszak-Wieczorek, J. and Arasimowicz-Jelonek, M. 2014. Polyamines induce adaptive responses in water deficit stressed cucumber roots. Plant Res. 127(1): 151-158.
24.Li, X., Ahammed, G.J., Li, Z.X., Zhang, L., Wei, J.P., Yan, P. and Han, W.Y. 2018. Freezing stress deteriorates tea quality of new flush by inducing photosynthetic inhibition and oxidative stress in mature leaves. Sci. Hort. 230: 155-160.
25.Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Curr. Prot. Food Anal. Chem. 1(1): F4-3.
26.Liu, B., Xia, Y.P., Krebs, S.L., Medeiros, J. and Arora, R. 2019. Seasonal responses to cold and light stresses by two elevational ecotypes of *Rhododendron catawbiense*: A comparative study of overwintering strategies. Environ. Exp. Bot. 163: 86-96.
27.Long, S., Yan, F., Yang, L., Sun, Z. and Wei, S. 2020. Responses of Manila Grass (*Zoysia matrella*) to chilling stress: From transcriptomics to physiology. PloS one. 15(7): e0235972.
28.Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Ann. Bot. 78(3): 389-398.
29.Malekzadeh, P. 2015. Influence of exogenous application of glycine betaine on antioxidative system and growth of salt stressed soybean seedlings (*Glycine max* L.). Physiol. Mol. Biol. Plants. 20: 133-137.
30.Mickelbart, M.V. and Boine, B. 2020. Glycine betaine enhances osmotic adjustment of ryegrass under cold temperatures. Agron. 10(2): 210.
31.Molano-Flores, B. 2014. An invasive plant species decreases native plant reproductive success. Nat. Areas J. 34(4), 465-470.
32.Nah, G., Lee, M., Kim, D.S., Rayburn, A.L., Voigt, T. and Lee, D.K. 2016. Transcriptome analysis of *spartina pectinata* in response to freezing stress. PloS one. 11:e0152294.
33.Nawaz, M. and Wang, Z. 2020. Abscisic acid and glycine betaine mediated tolerance mechanisms under drought stress and recovery in *Axonopus compressus*: A new insight. Sci. Rep. 10(1):1-10.
34.Nezami, A., Ahmadi Lahijani, M.J., Shojaei Nofarst, K., Javad Rezaei, J. and Fazeli, F. 2016. Freezing tolerance of grass species under controlled conditions. Int. J. Plant Prod. 23 (1): 89-106. (In Persian)
35.Oquist, G., Hurry, V.M. and Huner, N.P.A. 1993. Low-temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. Plant Physiol. 101: 245-250.
36.Oraee, A., Tehranifar, A., Nezami, A. and Shoor, M. 2018. Effects of drought stress on cold hardiness of non-acclimated viola (*Viola×wittrockiana* 'Iona Gold with Blotch') in controlled conditions. Sci. Hort. 238: 98-106.
37.Oraee, A., Tehranifar, A., Nezami, A. and Shoor, M. 2020. The effects of three levels of irrigation water on the improvement of cold tolerance of acclimated viola. Acta Physiol. Plant. 42(7): 10-10.
38.Pan, Y., Zhang, S., Yuan, M., Song, H., Wang, T., Zhang, W. and Zhang, Z. 2019. Effect of glycine betaine on chilling injury in relation to energy metabolism in papaya fruit during cold storage. Food Sci. Nutr. 7(3): 1123-1130.
39.Pu, Y., Liu, L., Wu, J., Zhao, Y., Bai, J., Ma, L., Yue, J., Jin, J., Niu, Z., Fang, Y. and Sun, W. 2019. Transcriptome profile analysis of winter rapeseed (*Brassica napus*) in response to freezing stress, reveal potentially connected events to freezing stress. Int. J. Mol. Sci. 20(11): 2771.
40.Robinson, S. and Jones, G. 1986. Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. Func. Plant Biol. 13(5): 659-668.

41. Rodríguez-Zapata, L.C., Gil, F.L.E., Cruz-Martínez, S., Talavera-May, C.R., Contreras-Marin, F., Fuentes, G. and Santamaría, J.M. 2015. Preharvest foliar applications of glycine-betaine protects banana fruits from chilling injury during the postharvest stage. Chem. Biol. Technol. Agric. 2(1): 1-10.
42. Roein, Z. and Chameh, T. 2017. Evaluation of cold and drought stress tolerance of *Coronilla* ground cover (*Coronilla varia*) in seedling stage. Research Project. Ilam University. (In Persian)
43. Saadati, S., Baninasab, B., Mobli, M. and Gholami, M. 2021. Foliar application of potassium to improve the freezing tolerance of olive leaves by increasing some osmolite compounds and antioxidant activity. Sci. Hort. 276: 109765.
44. Sakai, A. and Larcher, W. 2012. Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress (Vol. 62). Springer Sci. Bus. Media.
45. Sakamoto, A. and Murata, N. 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. Plant Cell Environ. 25(2): 163-171.
46. Slabbert, M.M. and Krüger, G.H.J. 2014. Antioxidant enzyme activity, proline accumulation, leaf area and cell membrane stability in water stressed *Amaranthus* leaves. S. Afr. J. Bot. 95: 123-128.
47. Volaire, F., Thomas, H. and Lelievre, F. 1998. Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought: I. Growth, death, water relations and solute content in herbage and stubble. New Phytol. 140(3): 439-449.
48. Wang, K., Bai, Z.Y., Liang, Q.Y., Liu, Q.L., Zhang, L., Pan, Y.Z., Liu, G.L., Jiang, B.B., Zhang, F. and Jia, Y. 2018. Transcriptome analysis of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in response to low temperature stress. BMC Genomics. 19(1): 319.
49. Wei, S., Du, Z., Gao, F., Ke, X., Li, J., Liu, J. and Zhou, Y. 2015. Global transcriptome profiles of 'Meyer' Zoysia grass in response to cold stress. *PLoS One*. 10(6): e0131153.
50. Xiaochuang, C., Chu, Z., Lianfeng, Z., Junhua, Z., Hussain, S., Lianghuan, W. and Qianyu, J. 2017. Glycine increases cold tolerance in rice via the regulation of N uptake, physiological characteristics, and photosynthesis. Plant Physiol. Biochem. 112: 251-260.
51. Xin, Z. and Browse, J. 2000. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. Plant Cell Environ. 23(9): 893-902.
52. Zheng, W., Li, Y., Gong, Q., Zhang, H., Zhao, Z., Zheng, Z., Wang, Z., Zhao, Z. and Wang, Z. 2017. Improving yield and water use efficiency of apple trees through intercrop-mulch of crown vetch (*Coronilla varia* L.) combined with different fertilizer treatments in the Loess Plateau. Span. J. Agric. Res. 14(4): 1207.