

Research Article

Plant Prod., 2021, 44(3), 395-406  
<http://plantproduction.scu.ac.ir//>

ISSN (P): 2588-543X  
ISSN (E): 2588-5979

## Comparison of Physiological Indices in Response to Cold Stress in Wild Tomato (*Solanum habrochaites*) for Screening of Cold Tolerant Lines

Zahra Nemati<sup>1</sup>, Seyyed Hossein Nemati<sup>2\*</sup> , Amin Mirshamsi Kakhki<sup>3</sup>, Jafar Nabati<sup>4</sup>

- 1- Ph.D. Students of Olericulture, Department of Horticulture Plants, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
- 2- **\*Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Horticulture Plants, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran ([nemati@um.ac.ir](mailto:nemati@um.ac.ir))
- 3- Assistant Professor, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
- 4- Assistant Professor, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

**Citation:** Nemati, Z., Nemati, S. H., Mirshamsi Kakhki, A., & Nabati, J. (2021). Comparison of physiological indices in response to cold stress in Wild Tomato (*Solanum habrochaites*) for screening of cold tolerant lines. *Plant Productions*, 44(3), 395-406.

 10.22055/ppd.2020.31274.1833

Received: 1 October, 2019

Accepted: 19 February, 2020

### Abstract

#### Introduction

Many plants grown at low temperature exhibit different adaptation strategies involving physiological, ecological and morphological processes. *Solanum lycopersicum* L. is affected by cold stress at all stages of growth; however, wild tomato species such as *S. habrochaites* rapidly improve after exposure to the cold stress through various changes in physiological processes. In this study, the short-term stress method was used for rapid screening and cold tolerance selection of tomato lines instead of long-term stress at 4 °C.

#### Materials and Methods

This study was carried out as a factorial experiment based on completely randomized design with three replications at Ferdowsi University of Mashhad Iran in 2018. Experimental factors included two levels of cold stress (0 and 2 °C) and three tomato lines (LA1777, LA3969 and LA4024). In the study, electrolyte leakage, MDA, anthocyanin, phenol, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl DPPH, total soluble carbohydrate content, the maximum efficiency of photosystem II and the activity of the three antioxidant enzymes CAT, POD, and APX were measured.

#### Results and Discussion

According to the results of this experiment, LA1777 line showed the lowest leaf wilting after



exposure to low temperatures. There was a significant difference between these lines in terms of electrolyte leakage. Under cold stress conditions, lowest electrolyte leakage and malondialdehyde (MDA) were obtained from wild line LA1777 that compared to sensitive line LA4024. LA1777 and electrolyte leakage at LA4024 at 0 and 2 °C were 14 and 11% higher than LA1777, respectively. Inhibition of DPPH radical activity of tolerant line LA1777 were higher than sensitive line LA4024 at 0 and 2 °C (43 and 45% respectively). Anthocyanin content of LA1777 and LA3969 lines were 49% higher than LA4024 at 0 °C. Under cold stress, the activity of the three antioxidant enzymes CAT, POD, and APX significantly increased in wild line LA1777, indicating better hydrogen peroxide scavenging system. After cold stress, LA1777 and LA3969 had the highest maximum efficiency of photosystem II, respectively, in light-adapted conditions ( $F'_v / F'_m$ ), which may be due to higher cell membrane stability. The results showed that instead of long-term cold stress at 4 °C, the short-term stress method can be used for rapid screening of tomato lines for cold tolerance selection. Assessment of physiological parameters such as chlorophyll fluorescence, electrolyte leakage, MDA level, DPPH radical scavenging, catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase enzymes showed that these indices can be used to detect cold stress and to quantify the stress in tomato lines.

### Conclusion

Based on our data, we conclude that this short-term stress method is a useful method for rapid assessment of tomato chilling tolerance. The physiological parameters used in this study showed adequate difference between tomato lines.

**Keywords:** A1777, Anthocyanin, Electrolyte leakage, Malondialdehyde, Photosystem II

## بررسی شاخص‌های فیزیولوژیکی در پاسخ به تنش سرما در گوجه‌فرنگی وحشی (*Solanum habrochaites*) جهت غربالگری لاین‌های متحمل به سرما

زهرا نعمتی<sup>۱</sup>، سیدحسین نعمتی<sup>۲\*</sup> , امین میرشمسی کاخکی<sup>۳</sup>، جعفر نباتی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری باغبانی، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

۲- \*نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران (nemati@um.ac.ir)

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

۴- استادیار، گروه پژوهشی بقولات، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۹

### چکیده

به منظور تعیین ویژگی‌های تحمل به سرما و غربالگری لاین‌های گوجه‌فرنگی حساس به سرما، این مطالعه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کامل صادفی با چهار تکرار در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. عوامل آزمایش شامل دو سطح تنش سرما (صفر و دو درجه سانتی‌گراد) و سه لاین گوجه‌فرنگی (LA1777، LA3969 و LA4024) بودند. نتایج نشان داد در شرایط تنش سرما لاین وحشی LA1777 کمترین میزان نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) را نسبت به لاین حساس LA4024 نشان داد. میزان MDA در لاین LA4024 در دمای دو درجه سانتی‌گراد ۴۶ درصد و در دمای صفر درجه سانتی‌گراد ۳۶ درصد بیشتر از لاین LA1777 بود. مهارت فعالیت رادیکال DPPH در لاین متحمل LA1777 در دماهای دو و صفر به‌ترتیب ۴۳ و ۴۵ درصد بیشتر از لاین حساس LA4024 بود. میزان آنتوسیانین در لاین‌های LA1777 و LA3969، ۴۹ درصد بیشتر از لاین LA4024 در دمای صفر درجه سانتی‌گراد بود. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش سرما در لاین LA1777 که متحمل به سرما است بالاتر از دو لاین دیگر بود که حاکی از سیستم محافظتی قوی‌تر این لاین در به‌دام انداختن پراکسید هیدروژن است. بعد از تنش سرما لاین LA1777 و LA3969 به‌ترتیب بالاترین بیشینه‌ی کارایی پتانسیل فتوسیستم II را در شرایط سازگار شده با نور (F<sup>v</sup>/F<sup>m</sup>) داشتند، که احتمالاً می‌تواند دلیل ثبات بالاتر غشای سلولی باشد. به‌طور کلی نتایج نشان داد که به‌جای تنش طولانی مدت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد می‌توان از روش تنش کوتاه مدت به‌منظور غربالگری سریع لاین‌های گوجه‌فرنگی برای به‌گزینی تحمل به سرما استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: آنتوسیانین، فتوسیستم II، مالون دی‌آلدئید، نشت الکترولیت، LA1777

### مقدمه

تنش دمای پایین (۱۰-۱ درجه سانتی‌گراد) باعث ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی بی‌شماری در سلول‌های گیاهان حساس به سرما می‌شود و در نتیجه منجر به صدمه

سرمازدگی و مرگ گیاهان گرمسیری و نیمه‌گرمسیری (بسیاری از گونه‌های سبزی) می‌شود (Lukatkin et al., 2012). در دماهای سرمازدگی هیچ‌گونه تشکیل یخ وجود ندارد و شرایط سرمازدگی می‌تواند از ساعت‌ها تا

روزها ادامه داشته باشد. دمای بحرانی بسته به گونه‌های گیاهی متفاوت است (Levitt, 1980).

بیشتر ارقام گوجه‌فرنگی زراعی (*Solanum lycopersicum* L. در تمام مراحل رشد و توسعه گیاه، از جمله جوانه‌زنی، بذر، مراحل اولیه رشد رویشی و رشد زایشی به تنش سرما حساس هستند و رشد آن‌ها در دماهای پایین‌تر از ۱۲ درجه سانتی‌گراد محدود می‌شود (Hu et al., 2006). برخلاف گوجه‌فرنگی‌های زراعی، گونه‌های وحشی گوجه‌فرنگی مانند *S. habrochaites* S. Knapp & D.M. و *S. peruvianum* L. و *S. chilense* (Dunal) Reiche, Spooner بعد از قرار گرفتن در معرض تنش سرما به سرعت از طریق تغییر در فرایندهای فیزیولوژیک مانند تنفس، فتوسنتز و تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) بهبود یافته و منجر به بقای آن‌ها در این شرایط می‌گردد (Paupiere et al., 2014).

ارزیابی سریع و مؤثر تحمل گیاهان به تنش سرما مورد توجه محققان زیادی می‌باشد و پژوهش‌های متعددی برای یافتن روش‌های این مهم انجام شده است (Anderson and Gesick, 2004). از طرف دیگر پاسخ به تنش طولانی مدت سرما به طور گسترده در مطالعات مختلف روی گونه‌ها و لاین‌های گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفته است (Cao et al., 2015). در تحقیقات پیشین، شاخص‌های متعددی برای ارزیابی مؤثر لاین‌های گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار گرفتند، از جمله نشت الکترولیت‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کلروفیل فلورسانس بوده است (Liu et al., 2012a; Cao et al., 2015).

فتوسنتز یکی از فرایندهای اصلی در فیزیولوژی گیاهی است و به تنش سرما حساس است، از آنجایی که کلروپلاست‌ها اولین مکان صدمه سرمازدگی فراساختاری در سلول می‌باشند حتی قبل از نشانه‌های فیزیکی قابل رویت هستند (Soliman et al., 2018)؛ بنابراین، درجه حرارت پایین تثبیت CO<sub>2</sub> را کاهش می‌دهد، که به نوبه خود در دسترس بودن پیش ماده برای انتقال الکترون فتوسنتزی (NADP<sup>+</sup>) و فتوفسفوریلاسیون (ADP) را کاهش می‌دهد و منجر به بازخورد بازدارندگی انتقال الکترونی می‌شود. درجه حرارت پایین مستقیماً میزان انتقال

الکترون فتوسنتزی را با افزایش ویسکوزیته غشای تیلاکوئید، ناشی از تغییر در خصوصیات بیوفیزیکی لیپیدهای تیلاکوئیدی، کاهش می‌دهد (Huner et al., 1998). اثر دیگر دمای پایین بر فتوسنتز با چرخه کالوین مرتبط است، جایی که فعالیت آنزیم‌های درگیر در تثبیت کربن کند می‌شود. یکی دیگر از پیامدهای دماهای پایین در گیاهان افزایش تشکیل ROS می‌باشد. سوپراکسید مهمترین عامل آسیب نوری به PSI در تنش سرما است، در حالی که پراکسید هیدروژن و سوپراکسید بیشترین آسیب برای PSII هستند (Tjus, 2001). بهبود از بازدارندگی نوری PSII به شدت وابسته به دما است و درجه حرارت پایین سرعت ترمیم PSII را کاهش خواهد داد (Gombos et al., 1994).

استفاده از تکنیک فلورسانس کلروفیل، به عنوان یک روش سریع، حساس و غیرتخریبی در مطالعات فیزیولوژی مورد توجه قرار دارد (Maxwell and Johnson, 2000). در بررسی اثرات طولانی مدت تنش سرما در دمای ۴ °C بر لاین‌های LA4024، LA1777 و LA3969 مشاهده شد، حداکثر کارایی فتوسنتز II و نسبت Fv/Fm به شدت تا هفت روز بعد از تنش سرما کاهش یافت اما این کاهش در لاین متحمل کمتر بود و از قدرت بهبود بالاتری نیز برخوردار بود. همچنین در این پژوهش با اندازه‌گیری سایر شاخص‌ها مانند نشت الکترولیت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به خوبی تمایز بین لاین‌های متحمل و حساس نشان داده شد (Liu et al., 2012b). مطالعه فتوسنتز، مهار فوتونی و سیستم آنتی‌اکسیدان در برگ‌های گوجه‌فرنگی تحت درجه حرارت طولانی مدت در دمای ۵ °C نشان داد که تنش سرما موجب بازدارندگی نوری برگشت‌پذیر PSII، کاهش فعالیت PSII، افزایش عملکرد فتوشیمیایی PSI Y (I) و به طور قابل توجهی باعث محدودیت پذیرنده PSI شد (Liu et al., 2012a). مطالعه شاخص‌های فیزیولوژیکی از جمله نشت الکترولیت، شاخص آسیب سرمازدگی (CII)، محتوای کلروفیل، عوامل Fv/Fm و PSII در لاین‌های متحمل و حساس به سرما گوجه‌فرنگی تحت تنش طولانی مدت سرما نشان

سانتی گراد) قرار گرفتند. سپس گیاهان به اتاقک سرد با دمای  $4 \pm 1$  درجه سانتی گراد با رطوبت نسبی ۷۰-۸۰ درصد و فتوپریود ۱۶ ساعت (شدت تابش  $1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) منتقل و پس از نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در اتاقک رشد، نمونه برداری از برگ‌ها صورت گرفت. دو هفته پس از مواجه با تنش سرما، درصد بقاء و تغییرات فنوتیپی در لاین‌ها ثبت گردید (Nezami et al., 2018).

از روش سنجش نشت الکترولیت (Teutonica et al., 1993) و پراکسیداسیون لیپیدها با تعیین محتوی مالون‌دی آلدئید (MDA) (Stewart and Bewley, 1980) برای ارزیابی آسیب غشای سلولی استفاده شد. مقدار کربوهیدرات‌های محلول نیز با استفاده از روش فنل سولفوریک اسید و استاندارد گلوکز اندازه‌گیری شد (Dubois et al., 1956). اندازه‌گیری ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد با استفاده از ((DPPH) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) در طول موج ۵۱۷ نانومتر و استاندارد آسکوربیک اسید انجام شد (Abe et al., 1998). مقدار فنل کل با استفاده از روش معرف فولین سیکالتو در جذب ۷۶۵ نانومتر و با استفاده از استاندارد اسید گالیک تعیین شد (Singleton and Rossi, 1965). مقدار آنتوسیانین با استفاده از روش Wagner (1979) و جذب در طول موج ۵۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای ارزیابی فعالیت آنزیمی، ۱۰۰ میلی گرم بافت برگ تازه (جوان‌ترین برگ کاملاً توسعه‌یافته) در نیتروژن مایع، پودر شد و بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با اسیدیته ۷/۸، حاوی EDTA یک میلی مولار به آن اضافه شد. مواد نامحلول توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (سیگما مدل ۳-K۱۸) با ۱۲۰۰۰ جی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد جدا و محلول بالای به عنوان منبع برای استخراج آنزیم‌ها استفاده گردید. سپس فعالیت آسکوربات پراکسیداز (Velikova et al., 1995)، کاتالاز (Srinivas et al., 1999) از طریق اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد.

جهت اندازه‌گیری عوامل فلورسانس کلروفیل از جوان‌ترین برگ کاملاً توسعه یافته و دستگاه فلورومتر

داد که CII و نشت الکترولیت در پاسخ به تنش سرما افزایش یافت، درحالی که محتوای کل کلروفیل و میزان Fv/Fm و  $\phi\text{PSII}$  کاهش یافت. این شاخص‌های فیزیولوژی نیز به خوبی تمایز بین لاین‌های متحمل و حساس به سرما را نشان دادند (Cao et al., 2015). تاکنون توجه چندانی به استفاده از یک روش سریع سرما دهی برای غربالگری لاین‌های متحمل به سرما جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی نشده است؛ بنابراین با توجه به اهمیت و نقش تعیین کننده سرما در رشد و بقاء لاین‌های گوجه‌فرنگی این مطالعه به منظور بررسی اثر تنش سرما با استفاده از شاخص‌های فیزیولوژیک جهت غربالگری لاین‌های گوجه‌فرنگی انجام شد.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل صادفی و با چهار تکرار در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. عوامل آزمایش شامل دو سطح تنش سرما (صفر و دو درجه سانتی گراد) و سه لاین گوجه‌فرنگی (LA1777، LA3969 و LA4024) بودند. لاین‌های مورد مطالعه به ترتیب حساس و متحمل به سرما LA4024 (*S. habrochaites*) LA1777 و (*S. Lycopersicum*) LA3969 به همراه لاین LA3969 حاصل از تلاقی *S. Lycopersicum* × *S. habrochaites* واجد ناحیه اینترگرسیونی کروموزوم ۱۲ لاین LA1777 بودند که از کلکسیون بذر مرکز TGRC دانشگاه کالیفرنیا تهیه شدند.

بذرهای گل‌دان‌های پلاستیکی با قطر ۱۰ سانتی متر حاوی کوکوپیت و پرلایت کشت شدند. گیاهچه‌ها در رژیم‌های دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد روزانه و ۱۵ درجه سانتی گراد شبانه و رطوبت نسبی ۷۰-۸۰ درصد تحت نور طبیعی در گلخانه رشد کردند.

برای ارزیابی فنوتیپی پاسخ به تنش سرما، گیاهچه‌های شش هفته‌ای به فریزر ترموگرادیان در شرایط تاریکی و دمای پنج درجه سانتی گراد منتقل شدند. دما به صورت تدریجی با سرعت دو درجه سانتی گراد در ساعت کاهش یافت و گیاهچه‌ها به مدت یک ساعت در معرض دماهای مورد نظر (۲ و صفر درجه

پژمردگی برگ‌ها را بعد از قرار گرفتن در معرض دماهای پایین نشان داد. همچنین تغییرات فنوتیپی ایجاد شده بعد از تنش سرما در لاین LA3969 شبیه والد دهنده LA1777 بود و به نسبت لاین LA4024 پژمردگی کمتری را نشان داد. دو هفته پس از مواجه با تنش سرما، لاین LA1777 سریع‌تر و به‌صورت ۱۰۰ درصد بهبود یافت و شروع به رشد کرد (جدول ۱، شکل ۱).

**پایداری غشاء سلولی:** جهت بررسی پایداری غشاء سلولی درصد نشت الکترولیت‌ها و محتوی MDA اندازه‌گیری شد.

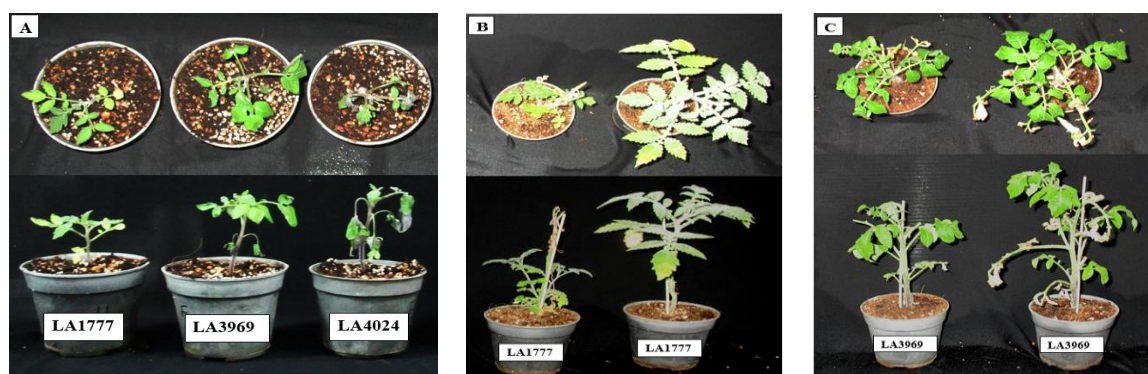
**نشت الکترولیت:** درصد نشت الکترولیت‌ها در لاین LA4024 در دمای دو و صفر درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ۱۴ و ۱۱ درصد بیشتر از لاین LA1777 بود (جدول ۱). از این‌رو، لاین LA1777 پایداری غشای بیشتری داشته و تحت تنش سرما دچار آسیب کمتری شده بود.

(MINI-PAM Portable Chlorophyll Fluorometer, WALZ, German) استفاده شد که این عوامل شامل کمینه بازتاب فلورسانسی از برگ سازگار شده به روشنایی ( $F_o$ )، بیشینه فلورسانس برگ سازگار شده به نور ( $F_m$ )، فلورسانس متغیر ( $F_v$ ) و بیشینه‌ی کارایی پتانسیل فتوسنتز ( $F_v/F_m$ ) بودند. قبل از قرارگیری نمونه‌ها در معرض دماهای پایین عوامل کلروفیل فلورسانس برگ اندازه‌گیری گردید و روند تغییرات عوامل فلورسانس کلروفیل در هر تیمار دمایی در ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از اعمال تنش سرما اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (Ver.9.4) انجام شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

**تغییرات فنوتیپی:** لاین LA1777 کمترین میزان



**Figure 1. Phenotypic responses of LA1777, LA3969 and LA4024 under cold stress (0°C)**  
A: three lines immediately after cold stress. B: recovery of LA1777 line after two weeks of cold stress.  
C: recovery of LA3969 line after two weeks of cold stress

**Table 1. Mean comparison of low temperature effects on some evaluated physiological indices of LA1777, LA3969 and LA4024**

| Line   | Temperature (°C) | Survival rate (%) | EL (%)           | MDA (nm/gfw)       | DPPH (mg/gfw)      | Total soluble content (mg/g fw) | Phenol (mg/gfw)     | Anthocyanin (mmol/gfw) | CAT ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \text{fw}$ ) | POD (unit. g <sup>-1</sup> fw) | APX (unit. g <sup>-1</sup> fw) |
|--------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| LA1777 | 2                | 100 <sup>a</sup>  | 63 <sup>b</sup>  | 11.1 <sup>c</sup>  | 0.33 <sup>c</sup>  | 2.4 <sup>d</sup>                | 18.4 <sup>abc</sup> | 0.16 <sup>b</sup>      | 352 <sup>a</sup>                                                            | 0.51 <sup>b</sup>              | 0.05 <sup>ab</sup>             |
| LA3969 |                  | 87 <sup>ab</sup>  | 71 <sup>ab</sup> | 15.7 <sup>cb</sup> | 0.23 <sup>bc</sup> | 5.7 <sup>ab</sup>               | 14.6 <sup>dc</sup>  | 0.16 <sup>b</sup>      | 334 <sup>a</sup>                                                            | 0.37 <sup>b</sup>              | 0.05 <sup>ab</sup>             |
| LA4024 |                  | 62 <sup>c</sup>   | 77 <sup>a</sup>  | 20.5 <sup>b</sup>  | 0.19 <sup>ab</sup> | 6.6 <sup>a</sup>                | 12.4 <sup>d</sup>   | 0.15 <sup>b</sup>      | 284 <sup>ab</sup>                                                           | 0.29 <sup>b</sup>              | 0.02 <sup>c</sup>              |
| LA1777 | 0                | 100 <sup>a</sup>  | 66 <sup>b</sup>  | 17.6 <sup>b</sup>  | 0.42 <sup>bc</sup> | 3.0 <sup>d</sup>                | 22.8 <sup>a</sup>   | 0.26 <sup>a</sup>      | 313 <sup>a</sup>                                                            | 1.62 <sup>a</sup>              | 0.05 <sup>a</sup>              |
| LA3969 |                  | 87 <sup>ab</sup>  | 76 <sup>a</sup>  | 19.4 <sup>b</sup>  | 0.21 <sup>bc</sup> | 3.7 <sup>dc</sup>               | 21.6 <sup>ab</sup>  | 0.26 <sup>a</sup>      | 221 <sup>b</sup>                                                            | 1.17 <sup>ab</sup>             | 0.04 <sup>b</sup>              |
| LA4024 |                  | 50 <sup>c</sup>   | 77 <sup>a</sup>  | 27.8 <sup>a</sup>  | 0.23 <sup>a</sup>  | 4.6 <sup>bc</sup>               | 17.6 <sup>bc</sup>  | 0.13 <sup>b</sup>      | 211 <sup>b</sup>                                                            | 0.38 <sup>b</sup>              | 0.03 <sup>c</sup>              |

In each column means with the same letters are not significant at 5% level of LSD test based on LSD test.

آنتی اکسیدان ها در این لاین می باشد؛ بنابراین وجود ترکیب های آنتی اکسیدان بیشتر در لاین متحمل به سرما، می تواند به طور مؤثر رادیکال های آزاد را حذف کند. در مطالعات متعدد از ظرفیت یک معرف زیستی برای مهار DPPH به عنوان شاخصی از ظرفیت آنتی اکسیدانی آن استفاده شده است و تقریباً مقاومت سیستم آنتی اکسیدانی گیاه در برابر رادیکال های آزاد پیرونی را نشان می دهد (Krola et al., 2015; Zhang et al., 2011).

**فنل:** کاهش دما اثر معنی داری بر میزان فنل کل داشت. با کاهش دما میزان تولید فنل در هر سه لاین افزایش یافت اما این افزایش در لاین متحمل LA1777 بیشتر از لاین حساس LA4024 بود، به طوری که میزان فنل در لاین LA1777، ۳۲ درصد در دمای دو درجه سانتی گراد و ۲۲ درصد در دمای صفر درجه سانتی گراد بیشتر از لاین حساس LA4024 بودند (جدول ۱). مکانیسم کلی ترکیب های فنلی در توانایی آن ها در حذف رادیکال های آزاد و مهار کردن پراکسیداسیون لیپید غشایی گیاهچه ها می باشد (Peng and Zhou, 2009; Naiji and Sour, 2018). همبستگی معنی داری بین میزان فنل و MDA مشاهده گردید (جدول ۲). تنش سرما موجب تجمع بیشتر ترکیب های فنلی در لاین متحمل به سرما شد و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی در این لاین افزایش یافت. از این رو می توان بیان کرد که افزایش محتوای فنل کل تحت تنش سرما، منعکس کننده این است که ترکیب های فنلی به عنوان بخشی از سیستم آنتی اکسیدانی

**MDA:** هم چنین کاهش دما بر محتوی MDA به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشاء در هر سه لاین اثر معنی داری داشت (جدول ۱). میزان افزایش اکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول و محتوای MDA در لاین حساس LA4024 در دمای صفر و دو درجه سانتی گراد بیشتر از دو لاین دیگر بود. هم چنین میزان MDA در لاین LA4024 در دمای دو درجه سانتی گراد ۴۶ درصد و در دمای صفر درجه سانتی گراد ۳۶ درصد بیشتر از لاین LA1777 مشاهده گردید (جدول ۱). MDA به عنوان یک ویژگی منعکس کننده آسیب ناشی از تنش سرما به خوبی شناخته شده است. سیستم غشای سلولی اولین محل در معرض آسیب ناشی از انجماد در گیاهان است. نتایج تحقیقات پیشین نشان داد که کاهش در میزان MDA نشانگر پایداری بیشتر اسیدهای چرب غیر اشباع و تحمل بیشتر به تنش سرما در ارقام برنج و لاین های گوجه فرنگی متحمل به سرما است (Hasannejad et al., 2014; Liu et al., 2012b).

#### اثر تنش سرما بر محتوی ترکیبات آنتی اکسیدانی

DPPH: مهار فعالیت رادیکال DPPH یک مقیاس از فعالیت آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی است. مهار فعالیت رادیکال DPPH در لاین متحمل LA1777 در دماهای دو و صفر به ترتیب ۴۳ و ۴۵ درصد بیشتر از لاین حساس LA4024 بود (جدول ۱). کاهش دما از دو به صفر اثر معنی داری بر میزان DPPH نداشت. با کاهش دما میزان مهار رادیکال DPPH در لاین متحمل به سرما افزایش یافت که این خود نشانگر قدرت مهار بیشتر

**Table 2. Correlation coefficients of lines traits under different cold temperatures**

| Trait                 | Anthocyanin         | DPPH                 | MDA                  | Phenol              | APX                 | CAT                 | Total soluble content | POD                | EL                 | Survival (%) |
|-----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| Anthocyanin           | 1                   |                      |                      |                     |                     |                     |                       |                    |                    |              |
| DPPH                  | -0.25 <sup>ns</sup> | 1                    |                      |                     |                     |                     |                       |                    |                    |              |
| MDA                   | 0.65 <sup>**</sup>  | -0.046 <sup>ns</sup> | 1                    |                     |                     |                     |                       |                    |                    |              |
| Phenol                | 0.26 <sup>ns</sup>  | 0.72 <sup>**</sup>   | -0.52 <sup>**</sup>  | 1                   |                     |                     |                       |                    |                    |              |
| APX                   | 0.38 <sup>ns</sup>  | -0.60 <sup>**</sup>  | 0.36 <sup>ns</sup>   | -0.33 <sup>ns</sup> | 1                   |                     |                       |                    |                    |              |
| CAT                   | 0.43 <sup>*</sup>   | 0.36 <sup>ns</sup>   | -0.34 <sup>ns</sup>  | -0.04 <sup>ns</sup> | -0.32 <sup>ns</sup> | 1                   |                       |                    |                    |              |
| Total soluble content | -0.29 <sup>ns</sup> | 0.37 <sup>ns</sup>   | -0.019 <sup>ns</sup> | 0.11 <sup>ns</sup>  | -0.34 <sup>ns</sup> | 0.50 <sup>**</sup>  | 1                     |                    |                    |              |
| POD                   | 0.78 <sup>**</sup>  | -0.16 <sup>ns</sup>  | -0.67 <sup>**</sup>  | 0.29 <sup>ns</sup>  | 0.32 <sup>ns</sup>  | -0.49 <sup>*</sup>  | -0.34 <sup>ns</sup>   | 1                  |                    |              |
| EL                    | 0.20 <sup>ns</sup>  | -0.28 <sup>ns</sup>  | 0.15 <sup>ns</sup>   | -0.20 <sup>ns</sup> | -0.57 <sup>**</sup> | -0.18 <sup>ns</sup> | -0.33 <sup>ns</sup>   | 0.23 <sup>ns</sup> | 1                  |              |
| Survival (%)          | 0.37 <sup>ns</sup>  | -0.53 <sup>**</sup>  | 0.15 <sup>ns</sup>   | -0.35 <sup>ns</sup> | 0.56 <sup>**</sup>  | -0.15 <sup>ns</sup> | -0.28 <sup>ns</sup>   | 0.34 <sup>ns</sup> | 0.20 <sup>ns</sup> | 1            |

\*\* and \*: Significant level at 0.01 and 0.05, respectively.

کاهش نشان داد (جدول ۱). در مطالعه‌ای که روی گونه‌های وحشی و ارقام زراعی انجام شده بود همبستگی منفی بین افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول و تحمل به سرما در گونه‌های گوجه‌فرنگی وحشی با منشأ ارتفاعات بالا (*S. peruvianum* و *S. chilense* *S. habrochaites*) گزارش شد (Venema et al., 1999). از این‌رو تجمع کربوهیدرات در گونه وحشی با منشأ ارتفاعات پایین (*S. pimpinellifolium*) و گونه گوجه‌فرنگی زراعی در طی تنش سرما از گونه‌های وحشی با منشأ ارتفاعات بالا بیشتر است. در صورتی که بسیاری از پژوهشگران ملاک ایجاد تحمل به سرما را توان تجمع کربوهیدرات‌ها در برگ عنوان می‌کنند. در مقایسه با نتایج این مطالعه که همبستگی بین تحمل به سرما و تجمع کربوهیدرات در اثر تنش سرما برای جنس *Lycopersicon* وجود نداشت (جدول ۲)، همبستگی مثبت بین تحمل سرما و میزان انباشت کربوهیدرات‌های محلول در هنگام تنش سرما برای ارقام گل‌رنج (*Carthamus tinctorius*)، برنج (*Oryza sativa* L.) و گندم (*Triticum aestivum* L.) گزارش شده است (Rajabi and Pordad, 2011; Boriboonkaset et al., 2008; Olenichenko et al., 2013).

برای این گونه‌ها، تجمع کربوهیدرات‌ها به‌عنوان بخشی از مکانیسم‌های سازگاری در نظر گرفته می‌شود که به تثبیت پروتئین و غشا در طی تنش یخ‌زدگی کمک می‌کند، در حالی که تجمع کربوهیدرات‌ها در اثر تنش سرما در گونه‌های حساس به سرما گوجه‌فرنگی نشان‌دهنده اختلال در تعادل بین فتوسنتز و مصرف کربوهیدرات می‌باشد. منطقی به نظر می‌رسد که گونه‌های وحشی (با منشأ در ارتفاعات)، کربن اضافی و یا تثبیت‌شده خود را از برگ‌های منبع به ریشه منتقل می‌کنند که می‌تواند در آن تجمع یابند یا برای رشد و یا تنفس مورد استفاده قرار گیرند (Venema et al., 1999). همبستگی مثبت بین سطح تحمل به سرمازدگی و تغییرات انتقال آسمیلات‌ها در دماهای پایین مشاهده شده است (Sowinsky et al., 1998)؛ بنابراین به نظر می‌رسد تفاوت مشاهده شده در تجمع کربوهیدرات بین لاین زراعی و وحشی در طی تنش سرما ناشی از مهار تفاوت انتقال کربن از برگ‌های منبع به ریشه باشد.

برای جمع‌آوری ROS تولید می‌شوند. گزارش شده است که سطوح فنل با تجمع MDA همبستگی دارد بدین صورت که در سویا (*Glycine max* (L.) Merr.) هنگامی که سطح MDA پایین بود، میزان فنل بالاتر بود (Posmyka et al., 2005).

### آنتوسیانین: بررسی تغییرات میزان آنتوسیانین نشان

داد کاهش دما اثر معنی‌داری بر میزان آنتوسیانین دارد (جدول ۱). با کاهش دما از دو به صفر درجه سانتی‌گراد میزان آنتوسیانین افزایش یافت و میزان آنتوسیانین در لاین‌های LA1777 و LA3969، ۴۹ درصد بیشتر از لاین LA4024 در دمای صفر درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۱). آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی، پرولین و کاروتنوئیدها تعدادی از ترکیبات مهم آنتی‌اکسیدانی با وزن مولکولی کم در گیاهان می‌باشند که نقش مهمی در محافظت از تنش دارند (Radyuk et al., 2009; Hatamian et al., 2019)؛ بنابراین فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و ترکیب‌های فنلی توانایی حذف رادیکال‌های آزاد و مهار کردن پراکسیداسیون لیپید غشایی گیاهچه‌ها را دارند (Peng and Zhou, 2009). در این مطالعه نیز در لاین متحمل به سرما میزان بالاتری آنتوسیانین مشاهده گردید. تنش سرما در گیاهچه‌های آراییدوبسیس (*Arabidopsis thaliana*) موجب افزایش میزان آنتوسیانین شد (Zhang et al., 2010). با مطالعه موتانت‌های آراییدوبسیس دربرگیرنده ژن‌های اصلی تنظیم‌کننده و بیوسنتزی آنتوسیانین، شواهد قانع‌کننده‌ای وجود دارد که ROS به‌عنوان سیگنال‌های مهمی در تنظیم تولید آنتوسیانین است و آنتوسیانین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌های مؤثری هستند که به نوبه خود سطح ROS را در موجود زنده تعدیل می‌کنند و بنابراین برای محافظت از گیاهان در برابر بسیاری از اشکال تنش مهم هستند (Xu et al., 2017).

### اثر تنش سرما بر محتوای کربوهیدرات‌های محلول برگ:

کاهش دما اثر معنی‌داری بر محتوای کل کربوهیدرات‌های محلول داشت (جدول ۱). میزان کربوهیدرات محلول در لاین حساس LA4024 در دمای دو درجه سانتی‌گراد ۶۲ درصد و در دمای صفر درجه سانتی‌گراد ۳۳ درصد بیشتر از لاین متحمل LA1777 بود. با کاهش دما از دو به صفر درجه سانتی‌گراد میزان کربوهیدرات‌های محلول

APX و میزان نشست یونی همبستگی منفی وجود دارد ( $r = -0.57^{**}$ ). فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش سرما در لاین LA1777 که متحمل به سرما است بالاتر از دو لاین دیگر بود که حاکی از سیستم محافظتی قوی‌تر این لاین در به دام انداختن پراکسید هیدروژن است.

### تغییرات عوامل کلروفیل فلورسانس در پاسخ

**به تنش سرما:** نتایج کلروفیل فلورسانس نشان داد که عوامل  $F_o$ ،  $F_m$  و  $F_v/F_m$  در لاین‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری در شرایط تنش سرما نشان می‌دهند.  $F_v$  اختلاف معنی‌داری بین سه لاین نشان نداد (جدول ۱). همچنین نتایج نشان داد میانگین  $F_m$  لاین LA1777 به میزان پنج درصد بیشتر از لاین LA4024 بود و لاین LA1777 شش درصد  $F_v/F_m$  بیشتری نسبت به لاین LA4024 داشت. میزان  $F_m$  در دو لاین LA1777 و LA3969 بالاتر از لاین زراعی LA4024 بود که در مجموع کاهش  $F_m$  تحت تنش سرما ممکن است مربوط به کاهش فعالیت کمپلکس آنزیم تجزیه‌کننده آب و نیز چرخه انتقال الکترون در فتوسیستم II باشد. پایین بودن  $F_m$  در لاین زراعی نشان‌دهنده حساس بودن این لاین در شرایط نامساعد محیطی است.  $F_v$  که نشان‌دهنده وضعیت جریان الکترون از بخش فتوسیستم به  $Q_A$  است در هر سه لاین از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در مجموع  $F_v/F_m$  که نشان‌دهنده بیشینه کارایی پتانسیل فتوسیستم II می‌باشد در دو لاین LA1777 و LA3969 بالاتر از لاین LA4024 بود (جدول ۳). با توجه به شکل ۲ روند کاهش  $F_v/F_m$  تا ۷۲ ساعت بعد از اعمال تنش ادامه دارد و بعد از با شیب ملایم رو به افزایش است. این کاهش در لاین LA4024 بیشتر از دو لاین دیگر بود به‌طوری که  $F_v/F_m$  در دو لاین

**اثر تنش سرما بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، آنزیم پراکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APX):** دمای پایین بر فعالیت آنزیم CAT تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۱) و سه ژنوتیپ پاسخ‌های متفاوتی نسبت به سرما نشان دادند. در تنش دو درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم کاتالاز در لاین LA1777، ۱۹ درصد از لاین LA4024 بیشتر بود در حالی که نسبت به لاین LA3969 فقط پنج درصد بیشتر بود. در تنش دمای صفر درجه سانتی‌گراد نسبت به تنش دمای دو درجه سانتی‌گراد در فعالیت آنزیم کاتالاز در لاین متحمل تغییر معنی‌داری مشاهده نشد اما در لاین‌های LA3969 و LA4024 فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش نشان داد (به ترتیب ۳۴ و ۲۶ درصد). عموماً فرض بر این است که کاهش در فعالیت کاتالاز ناشی از غلظت بالای  $H_2O_2$  است (Anderson et al., 1995). فعالیت آنزیم POD تحت تأثیر دما معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که با کاهش دما فعالیت آنزیم پراکسیداز POD در دو لاین LA1777 و LA3969 روند افزایشی داشت اما در لاین حساس LA4024 تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. فعالیت این آنزیم در لاین متحمل LA1777 نسبت به لاین LA4024، ۴۳ درصد در دمای دو درجه سانتی‌گراد و ۷۶ درصد در دمای صفر درجه سانتی‌گراد بالاتر بود (جدول ۱).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دو لاین LA1777 و LA3969 نسبت به لاین LA4024 در دمای دو و صفر درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۴۷ و ۴۱ درصد بود (جدول ۱). آنزیم APX یک آنزیم مهم است که  $H_2O_2$  را از غشای تیلاکوئید دفع می‌کند؛ بنابراین عمده نقش APX در محافظت از PSII از آسیب نوری بیشتر است هنگامی که گیاه تحت تنش سرما قرار می‌گیرند (Soliman et al., 2018). بررسی روابط همبستگی نشان داد که بین فعالیت

**Table 3. Mean comparison chlorophyll fluorescence components of leaves of three tomato lines affected by cold stress**

| Line   | $F_o$            | $F_m$             | $F_v$             | $F_v/F_m$          |
|--------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| LA1777 | 436 <sup>a</sup> | 1443 <sup>a</sup> | 1040 <sup>a</sup> | 0.713 <sup>a</sup> |
| LA3969 | 403 <sup>b</sup> | 1431 <sup>a</sup> | 990 <sup>a</sup>  | 0.713 <sup>a</sup> |
| LA4024 | 377 <sup>c</sup> | 1368 <sup>b</sup> | 995 <sup>a</sup>  | 0.675 <sup>b</sup> |

In each column, means followed by the same letters are not significantly different based on LSD test at 5% probability level.  $F_o$ : minimum fluorescence light-acclimated leaves,  $F_m$ : maximum fluorescence light-acclimated leaves,  $F_v$ : variable fluorescence, and  $F_v/F_m$ : maximum quantum yield of PSII photosystems light-acclimated leaves.

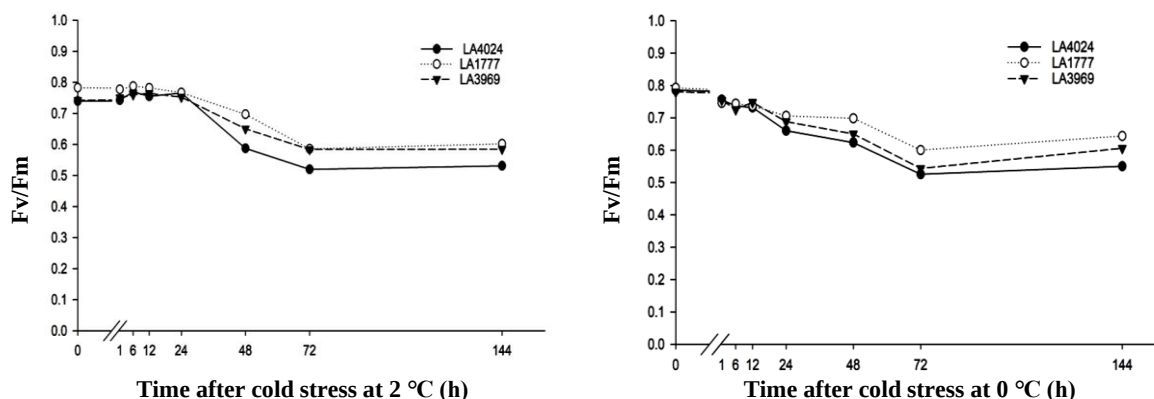


Figure 2. Maximum quantum yield of PSII photosystems light-acclimated leaves ( $F_v/F_m$ ) of three line until 144 hours after cold stress

(LA1777)، کمترین صدمه فتوسنتزی و بیشترین درصد بقاء مشاهده شد.

### نتیجه گیری

در این مطالعه، لاین LA1777 قادر به تحمل تنش سرمزدگی در دمای پایین‌تر از چهار درجه سانتی‌گراد (صفر و دو درجه سانتی‌گراد) بود. هم‌چنین مشاهده شد که به منظور غربالگری سریع لاین‌های گوجه‌فرنگی می‌توان روش تنش کوتاه مدت را جایگزین روش تنش طولانی مدت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد کرد. سنجش شاخص‌های فیزیولوژیکی از جمله فلورسانس کلروفل، نشت الکترولیت، میزان MDA، مهار فعالیت رادیکال DPPH، آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز نشان داد که از این شاخص‌ها می‌توان برای تشخیص تنش سرما و کمی کردن میزان تنش وارده در لاین‌های گوجه‌فرنگی استفاده نمود.

متحمل به سرما LA1777 و LA3969 به‌طور معنی‌داری در طی زمان بالاتر از لاین حساس LA4024 بود. استفاده از کلروفل فلورسانس برای ارزیابی و غربال لاین‌های گوجه‌فرنگی در مرحله گیاهچه‌ای برای تحمل به سرما نشان داد که بعد از هفت روز از تنش طولانی مدت سرما در این لاین‌ها بیشینه‌ی کارایی پتانسیل فتوسیستم II ( $F_v/F_m$ ) هنوز روند نزولی داشت (Liu et al., 2012b). از آنجایی که گوجه‌فرنگی بسیار حساس به سرمزدگی است باز یافت دستگاه فتوسنتزی II بعد از ۷۲ ساعت بسیار کند می‌باشد. وجود رابطه مستقیم بین بقاء و  $F_v/F_m$  نشان می‌دهد که بررسی صدمه به دستگاه فتوسنتزی و به‌ویژه فتوسیستم II می‌تواند به‌عنوان یک روش کارآمد در تعیین میزان خسارت و به‌گزینی ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گیرد (Nabati et al., 2017) چنانچه در این مطالعه نیز در لاین متحمل به سرما

### References

- Abe, N., Murata, T., & Hirota, A. (1998). Novel 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-radical scavengers, bisorbicillin and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Journal Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(4), 661-666.
- Anderson, M. D., Prasad, T.K., & Stewart, C. R. (1995). Changes in isoenzyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109(4), 1247-1257.
- Anderson, N. O., & Gesick, E. (2004). Phenotypic markers for selection of winter hardy garden chrysanthemums (*Dendranthema* × *grandiflora* Tzvel). *Scientia Horticulturae*, 101(1-2), 153-167.
- Boriboonkaset, T., Theerawitaya, C., Yamada, N., Pichakum, A., Supaibulwatana, K., Cha-um, S., Takabe, T., & Kirdmanee, C. (2013). Regulation of some carbohydrate metabolism-related genes, starch and soluble

- sugar contents, photosynthetic activities and yield attributes of two contrasting rice genotypes subjected to salt stress. *Protoplasma*, 250(5), 1157-1167.
- Cao, X., Jiang, F., Wang, X., Zang, Y., & Wu, Z. (2015). Comprehensive evaluation and screening for chilling tolerance in tomato lines at the seedling stage. *Euphytica*, 205(2), 569-584.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry Acta*, 28(3), 350-356.
- Gombos, Z., Wada, H., & Murata, N. (1994). The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of membrane lipids: A mechanism of chilling tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(19), 8787-8791.
- Hasannejad, Z., Seyyednejad, S. M., Gilani, A. A., & Hassibi, P. (2014). The effect of chilling stress on anti-oxidative enzymes activity in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant Productions*, 37(2), 27-37. [In Farsi]
- Hatamian, M., Nejad, A. R., Kafi, M., Souri, M. K., & Shahbazi, K., (2019). Growth characteristics of ornamental judas tree (*Cercis siliquastrum* L.) seedlings under different concentrations of lead and cadmium in irrigation water. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 18(2), 87-96.
- Hu, W. H., Zhou, Y. D., Du, Y. S., Xia, X. J., & Yu, J.Q. (2006). Differential response of photosynthesis in greenhouse and field ecotypes of tomato to long-term chilling under low light. *Journal of Plant Physiology*, 163(12), 1238-1246.
- Huner, N. P. A., Oquist, G., & Sarhan, F. (1998). Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science*, 3(6), 224-230.
- Krola, A., Amarowicz, R., & Weidner, S. (2015). The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology*, 189, 97-104.
- Levitt, J. (1980). Chilling injury and resistance: Chilling, freezing, and high temperature stresses. *Elsevier*, (1), 23-64.
- Liu, H., Ouyang, B., Zhang, J., Wang, T., & Li, H. (2012b). Differential modulation of photosynthesis, signaling, and transcriptional regulation between tolerant and sensitive tomato genotypes under cold stress. *PLoS One*, 7(11), 1-16.
- Liu, Y. F, Qi, M. F., & Li, T. L. (2012a). Photosynthesis, photoinhibition, and antioxidant system in tomato leaves stressed by low night temperature and their subsequent recovery. *Plant Science*, 196(1), 8-17.
- Lukatkin, A. S., Brazaityte, A., Bobinas, C., & Duchovskis, P. (2012). Chilling injury in chilling-sensitive plants: A review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 99(2), 111-124.
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.
- Nabati, J., Nezami, A., Hasanfard, A. R., & Haghighat Sheshvan, Zh. (2017). The trend of changes in chlorophyll fluorescence parameters in two *Vicia faba* ecotype during freezing stresses. *Iranian Journal of Pulses Research*, 9(2), 139-150. [In Farsi]
- Naiji, M., & Souri, M. K. (2018). Nutritional value and mineral concentrations of sweet basil under organic compared to chemical fertilization. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus*, 17(2), 167-175.
- Nezami, A., Khaninejad, S., Bahrami, M. R., & Zarif Ketab, H. (2018). Maximum efficiency of photosystem II as a freezing stress index in perennial ecotypes of rye (*Secale Montanum*). *Iranian Journal of Field Crops Research*, 16(1), 1-14. [In Farsi]
- Olenichenko, N. A., Zagorskina, N. V., Astakhova, N. V., Trunova, T. I., & Kuznetsov, Y. V. (2008). Primary and secondary metabolism of winter wheat under wold wardening and treatment with antioxidants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(5), 589-594.
- Paupiere, M. J., Van Heusden, A. W., & Bovy, A. G. (2014). The metabolic basis of pollen thermo-tolerance: perspectives for breeding. *Metabolites*, 4(4), 889-920.

- Peng, Q., & Zhou, Q. (2009). Antioxidant capacity of flavonoid in soybean seedlings under the joint actions of rare earth element La (III) and ultraviolet-B stress. *Biological Trace Element Research*, 127(1), 69-80.
- Posmyka, M. M., Bailly, C., Szafranska, K., Janas, K. M., & Corbineau, F. (2005). Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 162(4), 403-412.
- Radyuk, M. S., Domanskaya, N., Shcherbakov, R. A., & Shalygo, N. V. (2009). Effect of low above-zero temperature on the content of low-molecular antioxidants and activities of antioxidant enzymes in green barley leaves. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56(2), 175-180.
- Rajabi, R., & Pordad, S. S. (2011). A study on cold resistance in safflower varieties and lines by physiological and biochemical indices. *Plant Productions*, 33(2), 1-14. [In Farsi]
- Singleton, U. L., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(-), 144-158.
- Soliman, M. H., Alayafi, A. A., El Kelish, A. A., & Abu-Elsaoud, A. M. (2018). Acetylsalicylic acid enhance tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. to chilling stress, improving photosynthesis, antioxidants and expression of cold stress responsive genes. *Botanical Studies*, 59(6), 1-17.
- Sowinsky, P., Ruchner, W., Soldati, A., & Stamp, P. (1998). Assimilate transport in maize (*Zea mays* L.) seedlings at vertical low temperature gradients in the root zone. *Journal of Experimental Botany*, 49(321), 747-752.
- Srinivas, N. D., Rashmi, K. R., & Raghavarao, K. S. M. S. (1999). Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration. *Process Biochemistry*, 35(1-2), 43-48.
- Stewart, R. R. C., & Bewley, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, 65(2), 245-248.
- Teutonica, R. A., Palta, J. P., & Osborn, T. C. (1993). In vitro freezing tolerance in relation to winter survival of rapeseed cultivars. *Crop Science*, 33(1), 103-107.
- Tjus, S. E. (2001). Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I Is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiology*, 125(4), 2007-2015.
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151(1), 59-66.
- Venema, J. H., Posthumus, F., de Vries, M., & Van Hasselt, P. R. (1999). Differential response of domestic and wild *Lycopersicon* species to chilling under low light: Growth, carbohydrate content, photosynthesis and the xanthophyll cycle. *Physiologia Plantarum*, 105(1), 81-88.
- Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free aminoacids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*, 64(1), 88-93.
- Xu, Z., Mahmood, K., & Rothstein, S. J. (2017). ROS induces anthocyanin production via late biosynthetic genes and anthocyanin deficiency confers the hypersensitivity to ROS-generating stresses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 58(8), 1364-1377.
- Yamaguchi, K., Mori, H., & Nishimura, M. (1995). A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiology*, 36(6), 1157-1162.
- Zhang, Y., Zheng, S., Liu, Z., Wang, L., & Bi, Y. (2011). Both HY5 and HYH are necessary regulators for low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 168(4), 367-374.