نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال یازدهم، شماره ۴۲، تابستان ۱۳۹۵ / صفحات: ۲۴-۱۳

بررسی تغییرات ترکیبات کربوهیدراتی، فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در حذف خواب جوانه‌های جانبی گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) تحت تیمارهای مختلف سرمادهی

ژیلا قلی‌زاده*[1]، حمیدرضا صادقی‌پور[1]، احمد عبدل‌زاده[1]، خدایار همتی[2]

[1]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

[2]گروه تولیدات گیاهی، دانشکده باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۷

چکیده

هدف از این پژوهش مطالعه اثر تیمار ساعات مختلف سرمادهی بر حذف خواب جوانه‌های جانبی گردو، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، محتوای ترکیبات فنلی و فعالیت پراکسیداز محلول، دیواره‌ای و پلی‌فنل اکسیداز بود. در این راستا شاخه‌های یک‌ساله درختان ۱۰ ساله روستای زیارت (از توابع شهرستان گرگان)، پس از خزان برگ‌ها به‌صورت تصادفی جمع‌آوری و به قطعات ۹ سانتی‌متری حاوی یک جوانه جانبی تقسیم و در دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد تحت زمان‌های مختلف (۰، ۷۰۰، ۱۴۰۰ ساعت) قرار گرفتند و سپس در شرایط القایی شکوفایی جوانه (۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، فتوپریود ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی و شدت نور سفید فلورسانت $۲۰\mu\ mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) واقع شدند. نتایج نشان داد که تیمارهای ۷۰۰ و ۱۴۰۰ ساعت سرمادهی، درصد و سرعت حذف خواب را در جوانه‌های جانبی گردوی ایرانی در مقایسه با شاهد به شکل معنی‌داری افزایش و زمان آغاز شکوفایی را کاهش داد. همچنین سرمادهی سبب تجزیه نشاسته و قندهای غیراحیایی و افزایش قندهای احیایی شد که با افزایش درصد حذف خواب جوانه ارتباط مثبت و معنی‌داری داشت. محتوای فنل‌ها، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز محلول و دیواره‌ای تا ۷۰۰ ساعت و فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تا ۱۴۰۰ ساعت سرمادهی نسبت به شاهد افزایش یافت. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد در ساعات طولانی تر سرما دهی افزایش قندهای احیایی انرژی مورد نیاز جهت حذف خواب جوانه را تامین کرده و افزایش فنل کل و فعالیت پراکسیداز محلول و دیواره‌ای منجر به کاهش تنش اکسیداتیو و ایجاد تحمل سرما شد. به علاوه، افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز، نیز حذف فنل‌های بازدارنده و ساخت فنل‌های آنتی‌اکسیداتیو را در پی داشت که در نهایت این فرایندها به موازات هم منجر به حذف خواب در ساعات بالای سرما دهی جوانه‌های گردوی ایرانی شدند.

واژه‌های کلیدی: سرمادهی، حذف خواب، شرایط القایی شکوفایی جوانه، فعالیت آنزیمی، متابولیسم کربوهیدرات.

مقدمه

فرایند خواب به مفهوم تاخیر موقتی رشد در ساختارهای گیاهی حاوی مریستم از قبیل جوانه، بذر، پیاز و کامبیوم است (Prassinos et al., 2011) و در اغلب درختان چندساله مناطق معتدله به‌عنوان یک پاسخ سازشی سبب توانایی گیاه در مواجهه با شرایط زمستان می‌شود. کوتاه شدن طول روز و کاهش دما مهم‌ترین عوامل محیطی القاء خواب جوانه بشمار می‌رود. برای رفع خواب، جوانه‌های خفته باید ابتدا درجه و طول دوره معینی از سرمادهی که نیاز سرمایی

*نویسنده مسئول: Jillagholizadeh@yahoo.com

نامیده شده و به طور ژنتیکی کنترل می‌شود را دریافت کنند (Egea et al., 2003). به دو دلیل مطالعه خواب جوانه و شکوفایی آن اهمیت دارد. اول این‌که درختان خزان‌کننده در مناطقی با زمستان‌های ملایم، سرمادهی مطلوب را دریافت نمی‌کنند که این امر خواب را طولانی کرده و منجر به اضمحلال کربوهیدرات‌های نامحلول شده (Bonhomme et al., 2005) و الگوهای غیرمعمول شکست خواب جوانه را در پی دارد که در نهایت منجر به کاهش محصول خواهد شد (Erez, 1995). دوماً، زیان‌های سرمای دیررس نیز خطر مهمی بر کمیت و کیفیت محصول دارد (Hellman et al., 2006) بنابراین شناخت مکانیسم‌های حذف خواب جوانه بینش ما را درخصوص دست‌ورزی دوره خواب و مدیریت استفاده از ترکیبات مؤثر برای اجتناب از زیان‌های نامبرده را افزایش داده و به حفاظت محصولات اقتصادی کمک می‌کند. اغلب مطالعات انجام شده درخصوص خواب جوانه و رفع آن در خصوص تحقیقاتی است که نیاز سرمایی و گرمایی جوانه‌ها را ارزیابی می‌کند (Campoy et al., 2011). در این مطالعات تاریخ شکوفایی جوانه‌ها ضرورت‌های سرمایی و گرمایی گونه مورد مطالعه در یک محیط اختصاصی را نشان می‌دهد. لذا صحت این نوع تحقیقات در تعیین زمان پایان خواب ممکن است تنها به مناطق خاصی محدود شده و کمکی به درک کامل چگونگی حذف خواب جوانه نکند (Dennis, 2003). از این رو دسته دوم مطالعات با تأکید بر وضعیت فیزیولوژیکی گیاه در طول دوره خواب جوانه و حذف آن انجام می‌شود (Ito et al., 2012; Ben Mohamed et al., 2010). در این دوره براساس درجه حرارت سرمادهی، محتوای کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و بیان ژن‌های مربوط تغییر می‌کند که می‌تواند با فرآیند شکوفایی جوانه و زمان آن مرتبط باشد (Wang and Faust, 1987). کربوهیدرات‌ها منابع اولیه انرژی برای فرآیندهای متابولیکی در طول فرآیند خواب و شکوفایی جوانه هستند (Sherson et al., 2003). در تحقیقی مشخص گردید در آغاز فصل خواب غلظت نشاسته در جوانه انگور زیاد و غلظت قندهای محلول کم است. از سوی دیگر در طول دوره سازش و حذف خواب نشاسته کاهش یافته و غلظت قندهای محلول افزایش می‌یابد (Vergara and Pérez, 2010).

همچنین تحقیقات نشان داده است تنش‌های محیطی تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را در گیاهان تحریک می‌کند. برای مثال در بذر سویا سرمادهی منجر به تولید ROS، تنش اکسیداتیو و سرانجام پراکسیداسیون غشاهای لیپید در محور جنینی می‌شود (Posmyk et al., 2001). بنابراین گیاهان در دماهای پایین به‌منظور پالایش گونه‌های فعال اکسیژن ترکیبات آنتی‌اکسیدانت مانند فنل‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو را افزایش می‌دهند (Cansev et al., 2012). در تحقیقی Scalabrelli و همکاران (۱۹۹۱) عنوان کردند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو در بذرها و جوانه‌های انگور در دوره خواب بیشتر بوده و بعد از حذف خواب کاهش می‌یابد. در جوانه‌های سیب نیز فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در فصل خواب اندک و محتوای فنل درون‌زاد آنها زیاد بوده و برعکس در هنگام شکوفایی جوانه فعالیت این آنزیم افزایش و مقدار فنل‌ها کاهش می‌یابد (Wang et al., 1991).

گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) یکی از گونه‌های درختی مهم در باغبانی است که در مناطق معتدل رشد می‌کند. جوانه‌های گردو در زمان خزان برگ‌ها وارد وضعیت خواب شده و پس از کسب نیازهای سرمایی از خواب رها می‌شوند (Charrier et al., 2011). با توجه به مطالب فوق در تحقیق حاضر اثر تیمار ساعات سرمادهی بر حذف خواب جوانه‌های

گردوی بررسی شد. همچنین به‌منظور درک بهتر ویژگی‌های فیزیولوژیکی فرآیند خواب، محتوای نشاسته، قندهای غیراحیایی، قندهای احیایی، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز محلول و دیواره‌ای و پلی فنل اکسیداز جوانه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی از باغات گردو (*Juglans regia* L.) در ارتفاعات روستای زیارت واقع در ۱۰ کیلومتری جنوب گرگان، با ارتفاع از سطح دریا ۱۵۶۳ متر و دارای آب و هوای معتدل کوهستانی با متوسط بارندگی ۵۰۰ میلی‌متر، به‌صورت کاملاً تصادفی برداشت شد. شاخه‌های یکساله پس از خزان برگ‌ها جمع‌آوری، به قطعات ۹ سانتی‌متری حاوی یک جوانه جانبی بریده و با قارچ کش کاپتان ۴۰۰۰ ppm ضدعفونی شدند. پس از آن درون پارچه‌های مرطوب و در کیسه‌های پلاستیکی تیره در دمای ۱±۴ درجه (در یخچال) برای تیمارهای مختلف سرمادهی (۰، ۷۰۰ و ۱۴۰۰ ساعت) در ۳ تکرار قرارگرفتند. جوانه‌های کنترل هیچ گونه تیمار سرمادهی نداشتند و بلافاصله پس از نمونه برداری در شرایط القایی شکوفایی جوانه قرار داده شوند.

اثرات سرمادهی بر فرآیند حذف خواب جوانه: قطعات ساقه‌ای در آب مقطر برای ۶ هفته تحت شرایط القایی شکوفایی جوانه با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، فتوپریود ۱۲ ساعت نور- ۱۲ ساعت تاریکی و شدت نور سفید فلورسانت $\mu\ mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ۲۰ قرار گرفتند. هر هفته ۳ بار از انتهای پایه‌ای قطعات بریده و آب مقطر روزانه تعویض شد. تعداد جوانه‌های شکوفا به‌طور روزانه شمارش شدند. سرعت، درصد و زمان رسیدن به ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد حذف خواب در جوانه‌های تحت تیمار توسط نرم‌افزار GerminG محاسبه شد.

استخراج و اندازه‌گیری قندها، فنل کل و نشاسته: استخراج قندها و فنل کل به روش Fukoda و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. ۰/۰۶ گرم بافت تر جوانه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد استخراج، سپس عصاره ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و ۸ دقیقه با سرعت ۵۳۰۰g سانتریفیوژ گردید. پس از ۴ بار تکرار، رسوب برای سنجش نشاسته استفاده شد.

قندهای غیر احیایی به روش Handel (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شدند. بدین‌ترتیب که ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره با ۰/۱ میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم مخلوط و ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ۳ میلی‌لیتر آنترون به آن افزوده و ۲۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس جذب نور در ۶۲۰ نانومتر قرائت و غلظت قندهای غیراحیایی با منحنی استاندارد ساکارز محاسبه شد.

قندهای احیایی به روش Prado و همکاران (۱۹۹۸) اندازه‌گیری شد. ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره را با ۰/۰۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید و ۰/۱ میکرولیتر آلکالین مخلوط و به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانیده و به دنبال آن ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داد شد. سپس ۱ میلی‌لیتر بافر رنگی و ۰/۵ میلی‌لیتر آب به آن افزوده و ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد جذب نور در ۵۰۵ نانومتر قرائت و غلظت با استاندارد گلوکز محاسبه شد.

استخراج و اندازه‌گیری نشاسته به روش McCready و همکاران (۱۹۵۰) انجام شد. در ظرف یخ ۰/۰۶ گرم از بقایای بافتی با ۰/۲ میلی‌لیتر آب و ۰/۲۶ میلی‌لیتر اسید پرکلریک مخلوط و بعد از ۱۵ دقیقه ۰/۴ میلی‌لیتر آب افزوده و ۱۰دقیقه در ۵۸۰۰g سانتریفیوژ شد. فاز بالایی جدا و رسوبات با ۰/۱ میلی‌لیتر آب و ۰/۱۳ میلی‌لیتر

پرکلریک استخراج، سانتریفیوژ و به حجم ۲ میلی‌لیتر رسید. برای اندازه‌گیری آن ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره با ۳ میلی‌لیتر آنترون مخلوط و ۲۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از تعیین جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر، غلظت نشاسته با استاندارد نشاسته محاسبه شد.

سنجش فنل به روش Price and Butler (۱۹۷۱) انجام شد. ۵۰ میکرولیتر عصاره با آب به ۳ میلی‌لیتر رسانده و ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آهن در اسیداستیک و هگزا فروسیانات پتاسیم افزوده شد. پس از ۲۰ دقیقه جذب در ۷۲۰ نانومتر قرائت و غلظت فنل با استاندارد اسید گالیک محاسبه شد.

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، پراکسیداز محلول و پراکسیداز دیواره‌ای: استخراج آنزیم‌ها به روش Kara and Mishra (۱۹۷۶) صورت گرفت. ۰/۰۶ گرم بافت تر با ۲ میلی‌لیتر فسفات سدیم ۰/۲ مولار حاوی پلی‌وینیل فسفات ۲/۵ درصد (w/v) و ۲ درصد (v/v) تریتون، استخراج و ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. برای اندازه‌گیری پلی‌فنل‌اکسیداز ۳ میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی ۲/۸ میلی‌لیتر فسفات سدیم، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره و ۱۰۰ میکرولیتر پیروگالل تهیه شد. سپس تغییرات جذب در ۴۲۰ نانومتر تعیین و فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز براساس تولید پورپوروگالین از پیروگالل محاسبه شد (Resende et al., 2002).

برای اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز محلول واکنش حاوی ۲/۷ میلی‌لیتر استات سدیم، ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بود. تغییرات جذب در ۴۷۰ نانومتر مشخص و تولید تتراگایاکول در دقیقه بر گرم وزن تر محاسبه شد (Liu and Huang, 2000). رسوب حاصل از اندازه‌گیری پراکسیداز محلول را ۲ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط، پس از سانتریفیوژ در ۱۵۰۰۰g فاز بالایی دور و پس از ۴ بار تکرار با کلرید سدیم ۲ مولار مخلوط و سانتریفیوژ شد. بعد از تکرار این عمل فاز بالایی جمع‌آوری و برای اندازه‌گیری پراکسیداز دیواره‌ای استفاده شد. اندازه‌گیری این آنزیم مشابه پراکسیداز محلول است (Doblinski et al., 2003).

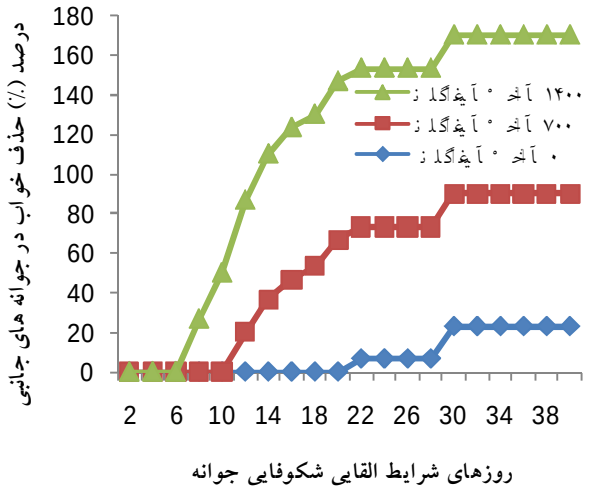
در این پژوهش نتایج توسط نرم‌افزارSAS 9.1.3 تحت آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح آماری ۱ درصد و ۵ درصد آنالیز شده و آزمون دانکن به منظور مقایسات میانگین مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

اثر تیمار سرمادهی بر فرآیند حذف خواب جوانه‌های جانبی گردو: طبق نتایج به دست آمده در مقایسه با شاهد، افزایش زمان سرمادهی منجر به افزایش معنی‌دار درصد حذف خواب جوانه‌ها شد به‌طوری که این مقادیر در تیمار ۷۰۰ و ۱۴۰۰ به‌ترتیب ۶۶/۷ و ۸۰ درصد بود. علاوه بر این زمان رسیدن به ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد حذف خواب در تیمار فاقد سرمادهی به شکل معنی‌داری بیشتر از جوانه‌های تیمار ۷۰۰ و ۱۴۰۰ بود. این روند نشان داد که سرعت حذف خواب در جوانه‌های شاهد کمتر از جوانه‌های تحت تیمار بود. بدین صورت که سرعت حذف خواب در تیمار ۰، ۷۰۰، ۱۴۰۰ سرمادهی به‌ترتیب ۰/۰۳۵، ۰/۰۷۳ و ۰/۱۱۴ بود. از سوی دیگر جوانه‌های فاقد سرمادهی در روز ۲۲ شرایط القایی شکوفایی جوانه را پیدا کرده و فرآیند حذف خواب را آغاز کردند، درحالی‌که در جوانه‌های تیمار ۷۰۰ و ۱۴۰۰ این فرآیند به‌ترتیب در روزهای ۱۲ و ۸ انجام شد (جدول ۱ و شکل‌های ۱ و ۲).

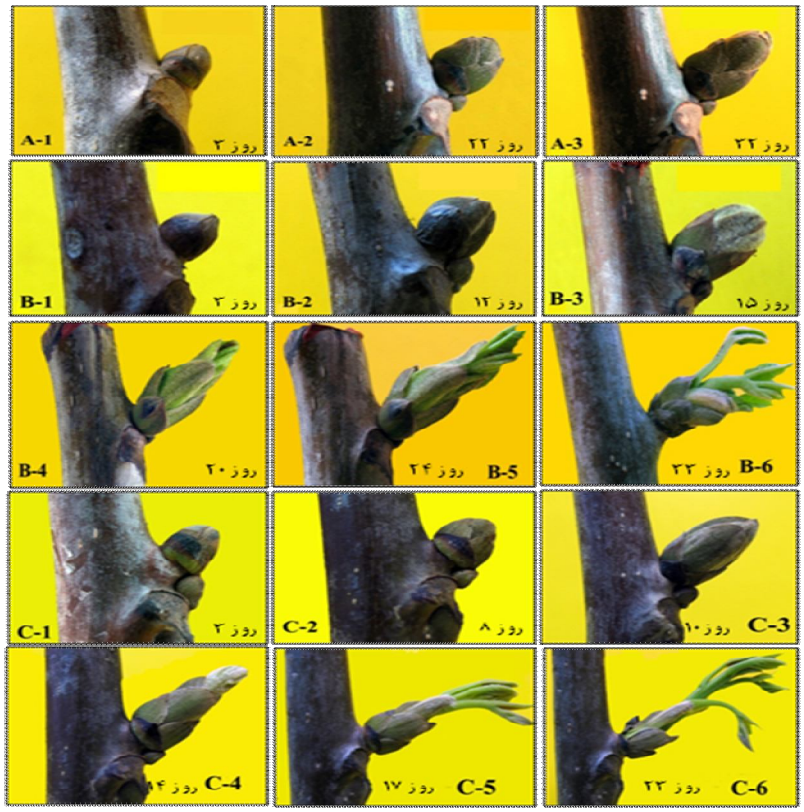
جدول ۱. تأثیر تیمار سرمادهی بر درصد، سرعت و زمان رسیدن به ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد حذف خواب در جوانه‌های جانبی گردوی ایرانی. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها طبق آزمون دانکن در سطح P≤0.01 می‌باشد.

	درصد حذف خواب	سرعت (بر روز) حذف خواب	زمان (روز) رسیدن به ۱۰٪حذف خواب	زمان (روز) رسیدن به ۵۰٪ حذف خواب	زمان (روز) رسیدن به ۹۰٪ حذف خواب
تیمار ۰ ساعت سرمادهی	٪۲۳/۳c	۰/۰۳۵c	۲۳/۵۳a	۲۸/۵۸a	۲۹/۱۸a
تیمار ۷۰۰ ساعت سرمادهی	٪۶۶/۷b	۰/۰۷۸b	۱۱/۳۳b	۱۳/۶۷b	۱۸/۷۸b
تیمار ۱۴۰۰ ساعت سرمادهی	٪۸۰/۰a	۰/۱۱۴a	۷/۴۲c	۸/۸۳c	۱۴/۸۶b



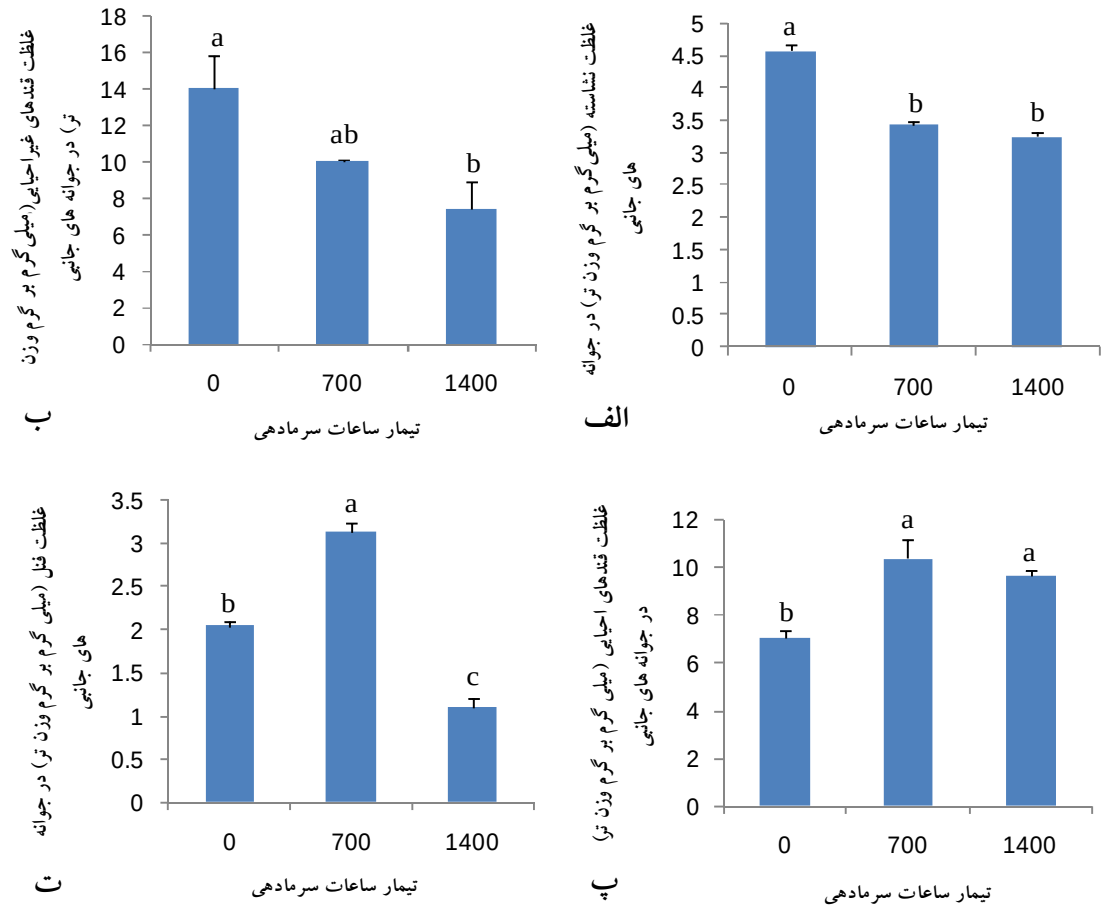
شکل ۱. تأثیر تیمار سرمادهی بر درصد حذف خواب در جوانه‌های جانبی گردوی ایرانی. قطعات ساقه‌ای به‌مدت ۶ هفته در شرایط القایی شکوفایی جوانه (۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، فتوپریود ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی، شدت نور سفید فلورسانت $20\mu\ mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) قرار داشتند.

تیمار سرمادهی بر غلظت نشاسته، قندهای غیر احیایی، قندهای احیایی و فنل کل جوانه‌های جانبی گردو: غلظت نشاسته در جوانه‌های جانبی گردو با افزایش مدت سرمادهی تا ۷۰۰ و ۱۴۰۰ ساعت در مقایسه با جوانه‌های فاقد تیمار به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت (شکل۳- الف). میانگین غلظت نشاسته در جوانه‌های جانبی فاقد سرمادهی، ۴/۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر بود و افزایش مدت سرمادهی تا ۷۰۰ و ۱۴۰۰ ساعت به‌ترتیب آن را ۲۵ و ۲۹ درصد کاهش داد. غلظت قندهای غیراحیایی در شاهد حداکثر بود (شکل ۳-ب). میانگین غلظت قندهای غیراحیایی در جوانه‌های فاقد سرمادهی ۱۴/۱ میلی‌گرم به گرم وزن تر بود که در تیمارهای ۷۰۰ و ۱۴۰۰ ساعت به‌ترتیب ۲۹ و ۴۷ درصد کمتر بود. افزایش سرمادهی، غلظت قندهای احیایی را در جوانه‌های گردو به‌صورت معنی‌داری افزایش داد (شکل۳-پ). میانگین غلظت قندهای احیایی در جوانه‌های جانبی فاقد سرمادهی، ۷/۰۷ میلی‌گرم به گرم وزن تر بود و اعمال سرمادهی تا ۷۰۰ و ۱۴۰۰ ساعت غلظت قندهای احیایی را به‌ترتیب ۳۲ و ۲۷ درصد افزایش داد. مقدار فنل کل جوانه‌های فاقد سرمادهی ۲/۰۴۷ میلی‌گرم به گرم وزن تر بود و افزایش سرمادهی تا ۷۰۰ آن را به مقدار ۳۵ درصد افزایش داد (شکل۳-ت). اما غلظت فنل در جوانه‌هایی که تحت تیمار ۱۴۰۰ ساعت بودند به نسبت جوانه‌های تیمار ۷۰۰ ساعت و فاقد سرمادهی، کاهش یافت.

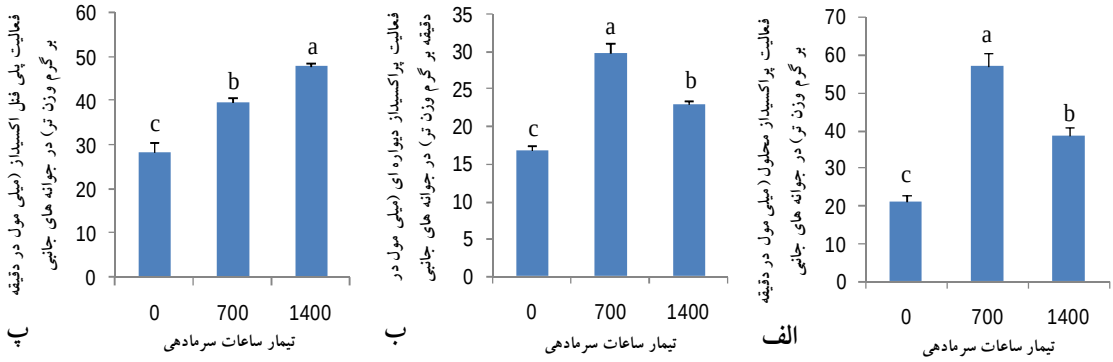


شکل ۲: فرایند خواب و شکوفایی جوانه‌های جانبی گردو در نمونه‌های فاقد سرمادهی(A)، ۷۰۰ (B) و ۱۴۰۰(C). A-1) جوانه‌ها در وضعیت خواب. (روز۳). A-2) آغاز فرایند شکوفایی (روز ۲۲). A-3) جوانه شکوفا شده (روز ۳۲). B-1) جوانه‌ها در وضعیت خواب. (روز ۳). B-2) آغاز فرایند شکوفایی. (روز ۱۲). B-3). ظهور پریموردیوم برگی (روز ۱۵). B-4) آغاز برگ زایی (روز ۲۰). B-5, 6) پیشرفت مراحل تولید برگ (روزهای ۲۴ و ۳۳). C-1) جوانه‌ها در وضعیت خواب (روز ۳). C-2) آغاز فرایند شکوفایی (روز۸). C-3) ظهور پریموردیوم برگی (روز ۱۰). C-4) آغاز برگ‌زایی (روز ۱۴). C-5, 6) پیشرفت مراحل تولید برگ (روزهای ۱۷ و ۲۳).

فعالیت آنـزیم‌هـا: فعالیت آنـزیم پلـی‌فنـل‌اکسـیداز همراستا با افزایش ساعات سرمادهی از ۰ تا ۱۴۰۰ به صورت معنی‌داری ($p\leq0.05$) افزایش یافت (شکل ۴-الف). فعالیت آنزیم پلـی‌فنـل اکسـیداز در جوانـه‌های فاقد سرمادهی ۲۸/۴۲۱ میلـی‌مـول در دقیقـه بـرگـرم وزن‌تر بود و افزایش ساعات سرمادهی تا مقادیر ۷۰۰ و ۱۴۰۰ فعالیت این آنزیم را به‌ترتیب به میـزان ۲۹ و ۴۱ درصد افزایش داد. فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول در جوانه‌هـای فاقـد سـرمادهی ۲۰/۹۷ میلـی‌مـول در دقیقه بـرگـرم وزن تـر بـود و بـا تیمـار ۷۰۰ سـاعت سرمادهی حدود سه برابر افزایش یافـت. هرچنـد کـه افزایش ساعات سرمادهی تا ۱۴۰۰ منجـر بـه کـاهش فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار۷۰۰ ساعت شد. البته همین مقدار فعالیت هنوز ۴۵ درصـد بیشـتر از مقـدار فعالیت پراکسـیدازی در جوانـه‌هـای فاقـد سـرمادهی اسـت (شـکل ۴-ب). فعالیـت پراکسـیداز دیـواره‌ای رونـدی مشـابه فعالیـت پراکسـیداز محلـول داشـت، به‌طوری که فعالیت آن در جوانه‌های فاقـد سـرمادهی ۱۶/۸۲ میلی‌مول در دقیقه برگرم وزن تر بود و افزایش ساعات سرمادهی تا ۷۰۰ میزان فعالیت ایـن آنـزیم را ۴۴ درصـد افـزایش داد. فعالیـت آنـزیم پراکسـیداز دیواره‌ای در جوانه‌های تیمار ۱۴۰۰ بـه نسـبت تیمـار ۷۰۰، ۲۳ درصد کاهش داشت، اما فعالیت آن ۷ درصد از جوانه‌های فاقد تیمار بیشتر است (شکل۴-پ).



شکل ۳: غلظت نشاسته (الف)، قندهای غیراحیایی (ب)، قندهای احیایی (پ) و فنل (ت) در جوانه‌های جانبی گردو تحت تیمار ساعات مختلف سرمادهی (۰، ۷۰۰، ۱۴۰۰). حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح $P\leq0.05$ می‌باشد.



شکل٤: فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز الف)، آنزیم پراکسیداز محلول ب) و پراکسیداز دیواره ای پ) در جوانه‌های جانبی گردو تحت تیمار ساعات سرمادهی (۰، ۷۰۰، ۱۴۰۰). حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها برطبق آزمون دانکن در سطح $P\leq0.05$ می‌باشد.

جدول ۲: ضریب همبستگی صفات در جوانه‌های جانبی گردوی ایرانی

	سرعت حذف‌خواب	درصدحذف خواب	نشاسته	قندهای غیراحیایی	قندهای احیایی	فنل	پلی‌فنل اکسیداز	پراکسیداز محلول	پراکسیداز دیواره‌ای
سرعت حذف خواب	۱								
درصد حذف خواب	۰/۹۲ **	۱							
نشاسته	−۰/۸۶ **	−۰/۹۶ **	۱						
قندهای غیراحیایی	−۰/۸۱ *	−۰/۷۹ *	۰/۷۱ *	۱					
قندهای احیایی	۰/۶۴	۰/۷۸ *	−۰/۸۰ *	−۰/۶۸	۱				
فنل	−۰/۳۵	−۰/۰۶۱	۰/۰۲۹	۰/۰۲۶	۰/۴۰	۱			
پلی فنل اکسیداز	۰/۹۳ **	۰/۹۰ **	−۰/۹۲**	−۰/۸۳ *	۰/۶۹	−۰/۲۳	۱		
پراکسیداز محلول	۰/۴۷	۰/۶۹	−۰/۷۶ *	−۰/۵۸	−۰/۹۳**	۰/۶۴	۰/۵۷	۱	
پراکسیداز دیواره‌ای	۰/۵۲	۰/۷۴ *	−۰/۸۳ *	−۰/۶۳	۰/۷۷ *	۰/۵۳	۰/۶۵	۰/۹۱ **	۱

** همبستگی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد

* همبستگی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد

بحث

طبق نتایج به دست آمده فقدان سرمادهی در جوانه‌های جانبی گردو فرآیند حذف خواب را به‌طور کامل مختل نمی‌سازد، جوانه‌هایی که هیچ‌گونه تیمار سرمادهی نداشته و بلافاصله پس از خزان برگ‌ها جمع‌آوری و در شرایط القایی شکوفایی جوانه قرار گرفتند، به میزان ۲۳/۳ درصد حذف خواب را نشان دادند. اما با افزایش مدت سرمادهی تا ۷۰۰ و ۱۴۰۰ ساعت، روند افزایشی قابل توجهی در فرآیند حذف خواب مشاهده شد (جدول ۱) که ارتباط نزدیک حذف خواب در جوانه‌ها با دریافت ساعات سرمادهی را آشکار می‌سازد. مطالعات قبلی بر جنس *Pruns* نیز نشان داد که در شرایط فقدان سرمادهی حدود ۲۰ درصد جوانه‌های شلیل و آلو شکوفا می‌شوند، در حالی که این مقدار در هلو و زردآلو صفر است (Gonzalez-Rossia et al., 2008). در گیاه انگور نیز در صورت عدم دریافت سرمادهی تنها ۲ درصد جوانه‌ها شکوفا می‌شود (Ben Mohamed et al., 2010). همچنین گزارش شده برخی از گیاهان مانند هلو و شلیل با دریافت ساعات متوسط سرمادهی بیشترین مقدار شکوفایی جوانه را نشان داده و افزایش بیشتر ساعات سرمادهی این روند را کاهش داد (Gonzalez-Rossia et al., 2008). در انگور نیز رابطه خطی مثبتی میان افزایش شکوفایی جوانه و افزایش طول دوره سرمادهی وجود داشت (Ben Mohamed et al., 2010). در تحقیق حاضر نکته قابل توجه آن بود که فقدان سرمادهی مقادیر اندک حذف خواب را حاصل کرد، اما سرعت حذف خواب در جوانه‌هایی که تحت ساعات سرمادهی بیشتر بودند به مراتب بیشتر بود. به گونه ای که جوانه‌های فاقد سرمادهی در روز ۲۲ شرایط القایی، شکوفا شدند. در حالی که در جوانه‌های تحت ساعات متوسط و زیاد (۷۰۰–۱۴۰۰) سرمادهی، آغاز شکوفایی جوانه‌ها به‌ترتیب در روز ۱۲ و هشتم شرایط القایی بود (جدول ۱ و شکل‌های ۱و۲). بنابراین فرآیند سرمادهی سرعت رهاسازی از خواب و درصد آن را افزایش داد.

در تحقیق حاضر آنالیزهای بیوشیمیایی انجام شده بر روی جوانه‌های جانبی که تحت تیمارهای فاقد سرمادهی، ساعات متوسط و زیاد سرمادهی بودند، نشان داد که میزان نشاسته با افزایش سرمادهی به نسبت شاهد کاهش معنی‌داری داشت همزمان با این فرآیند میزان قندهای غیراحیایی کاهش و قندهای احیایی افزایش معنی‌داری یافت (شکل۳ الف، ب، پ). به نظر می‌رسد اثر سرمادهی در افزایش قندهای

احیایی به‌سبب تبدیل کربوهیدرات‌های غیرمحلول به محلول و از طریق فعال سازی آنزیم‌های هیدرولیتیکی باشد. مطالعات پیشین بر روی *Pruns* sp. نیز کاهش غلظت نشاسته را در بافت پوست آنها تحت تیمار سرمادهی نشان داد و افزایش بیشتر زمان سرمادهی میزان نشاسته را در هلو، زردآلو، و آلو کاهش داد. در مطالعه فوق در شلیل کاهش غلظت نشاسته دیده نشد، ولی غلظت سوربیتول به‌عنوان قند انتقالی این گونه کاهش داشت. همزمان با آن در هلو، آلو و شلیل غلظت گلوکز با افزایش ساعات سرمادهی زیاد گشت (Gonzalez-Rossia et al., 2008). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزایش سرمادهی منجر به تجزیه نشاسته شده و در این روند قندهای غیراحیایی به قندهای احیایی تبدیل شدند. کاهش غلظت نشاسته به‌دلیل تبدیل نشاسته به قندهای محلول از طریق فعالیت آلفا و بتا آمیلاز و نشاسته فسفریلاز است که گلوکز ۱- فسفات را تولید می‌کند که مستقیماً در فرآیند شکوفایی جوانه استفاده می‌شود (Rady and Seif El-Yazal, 2013). از سوی دیگر نقش آنزیم اینورتاز نیز در تبدیل ساکارز به هگزوزها در جوانه‌های تحت تیمار سرمادهی انگور اثبات شده است (BenMohamed et al., 2010; Sergeeva et al., 2012). در تحقیق ما نیز احتمالاً کاهش معنی‌دار غلظت قندهای غیراحیایی در نمونه‌های تحت تیمار ساعات متوسط (۷۰۰) و زیاد (۱۴۰۰) سرمادهی با فعالیت زیاد آنزیم اینورتاز ارتباط دارد که منجر به تبدیل قندهای غیراحیایی به احیایی شده است. قندهای احیایی مانند هگزوزها مولکول‌های مناسبی جهت فرایندهای متابولیکی شرکت‌کننده در شکوفایی جوانه هستند و با توانایی رشد جوانه ارتباط مثبتی دارند (Maurel et al., 2004). در طول استراتیفیکاسیون تجمع هگزوزها در جوانه، کربوهیدرات و انرژی مورد نیاز برای ساخت ترکیبات لازم برای رشد جوانه را مهیا و از سوی دیگر پتانسیل آب درون جوانه را حفظ کرده و جذب آب، ایجاد فشار تورژسانس و انبساط سلول‌ها را تنظیم می‌کنند. علاوه بر آن قندها به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی کنترل کننده نمو جوانه نیز عمل می‌کنند (Roitsch and Gonzalez, 2004). آزمون همبستگی صفات حاکی از آن است که میزان نشاسته و قندهای غیراحیایی همبستگی منفی معنی‌داری با سرعت و درصد حذف خواب، و برعکس میزان قندهای احیایی همبستگی مثبت معنی‌داری با درصد حذف خواب دارد (جدول۲). با این‌وجود در جوانه‌هایی که تحت هیچ‌گونه سرمادهی نبودند نیز مقداری قند مشاهده شد که احتمالاً درصد اندک رهاسازی از خواب آنها را سبب شده است. طبق گزارشات Bonhemm و همکاران (۲۰۰۵) الگوهای رهاسازی از خواب بیشتر به توانایی استفاده از قندهای محلول ارتباط دارد و فراوانی قندها در این فرآیند از اهمیت کمتری برخوردار است. در واقع جوانه‌های فاقد سرمادهی نمی‌توانند از مقدار قند حاصل از تجزیه نشاسته به‌صورت بهینه استفاده کنند و تیمار ساعات سرمادهی امکان استفاده مطلوب از ذخایر قندی را فراهم می‌کند. نتایج ما نشان داد که بیشترین مقدار قندهای احیایی در ساعت ۷۰۰ و ۱۴۰۰ سرمادهی بوده، از سوی دیگر قطعات ساقه‌ای حاوی جوانه تحت این دو تیمار، برگ‌زایی سریع تری را در مقایسه با شرایط فاقد سرمادهی نشان دادند (شکل‌های ۳ـ پ و۲). افزایش قابل توجه قندهای احیایی در طول دوره رشد در مقایسه با دوره خواب نیز گزارش شده است (Baz et al., 1984). شرایط محیطی تنش‌زا مانند دماهای پایین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را در گیاهان تحریک کرده و گیاهان به‌منظور پالایش گونه‌های فعال اکسیژن سطوح ترکیبات آنتی‌اکسیدانت مانند فنل‌ها و یا فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو را افزایش

می‌دهند (Cansev et al., 2012). ارتباط میان ترکیبات فنلی و تحمل دماهای سرد در گیاه اطلسی گزارش شده که نقش فنل‌ها را با توجه به عملکرد آنها در پالایش رادیکال هیدروکسیل، به‌عنوان پایدارکننده غشاها و تنظیم‌کنندگان اسمزی معرفی کردند (Pennycooke and Stushnoff, 2005). از سوی دیگر فنل‌ها و آنزیم‌هایی مانند پراکسیدازها نقش مهمی در حفظ و حذف خواب در گیاهان دارند (Benkeblia et al., 2004). در تحقیق حاضر غلظت فنل‌ها در جوانه‌های جانبی با افزایش سرمادهی تا ۷۰۰ ساعت نسبت به جوانه‌های فاقد سرمادهی افزایش یافت که ممکن است با پالایش رادیکال‌های آزاد ناشی از سرما و کسب مقاومت به آن در شرایط خواب ارتباط داشته باشد. طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق افزایش سرمادهی تا ۱۴۰۰ ساعت غلظت فنل‌ها را کاهش داد (شکل۳-ت). Wang و همکاران (۱۹۹۱) گزارش کردند که در جوانه‌های به خواب رفته ترکیبات فنلی زیاد بوده و در دوره حذف خواب کاهش می‌یابد. به‌علاوه غلظت فنل کل در دوره رسیدن میوه کاهش می‌یابد که بخاطر هیدرولیز آن به سایر ترکیبات مانند قندها یا اسیدهای آلی است (Mann and Singh, 1990).

بخش دیگری از مکانیزم‌های پالایش گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط دماهای پایین در گیاهان مربوط به فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو است (Zhang et al.,1995). نتایج آزمایشات تحقیق حاضر نشان داد که افزایش سرمادهی تا ۷۰۰ ساعت نسبت به تیمار بدون سرما میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز محلول و دیواره‌ای را افزایش داد. احتمالاً این افزایش به‌دلیل پالایش رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش سرما است. مقدار فعالیت این دو آنزیم در جوانه‌های ۱۴۰۰ ساعت سرمادهی به نسبت جوانه‌های ۷۰۰ ساعت کاهش یافت که البته هنوز نسبت به جوانه‌های فاقد سرمادهی بیشتر بود (شکل۴-ب و پ). از آنجا که پراکسیدازها می‌توانند انواع فنل‌ها، پیش‌سازهای لیگنین یا متابولیت‌های ثانویه را اکسید و به‌عنوان آنزیم‌های چندعملکردی در فرایندهای فیزیولوژیکی مانند چوبی‌کردن، چوب پنبه‌ای شدن و اتصالات پروتئین‌های دیواره سلول شرکت کنند (Noriega et al., 2007). احتمالاً فعالیت پراکسیدازی در تیمار ۱۴۰۰ سرمادهی هم راستا با برطرف شدن نیاز سرمایی و آغاز رشد جوانه‌ها باشد. آزمون همبستگی صفات نیزارتباط مثبت معنی‌داری را میان فعالیت پراکسیداز دیواره‌ای و درصد حذف خواب جوانه نشان می‌دهد (جدول۲). افزایش قابل توجه فعالیت پراکسیدازی در دوره خواب که در راستای حفظ تنش اکسیداتیو ناشی از سرما بوده و کاهش فعالیت پراکسیدازی بعد از این دوره در گیاه آلو نیز گزارش شده است (Szecsko et al., 2002). در پژوهش ما فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با افزایش سرمادهی نسبت به جوانه‌های فاقد سرمادهی افزایش یافت (شکل۴-الف). احتمالاً این افزایش فعالیت، مسئول حذف بعضی از فنل‌های بازدارنده رشد می‌باشد. از سوی دیگر مواد فنلی نیز می‌توانند فعالیت این آنزیم را هم به‌صورت تحریک‌کننده و هم به‌صورت ممانعت‌کننده تغییر دهند. همبستگی میان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با سرعت و درصد حذف خواب جوانه نیز مثبت و معنی‌دار بود (جدول۲). تحقیقات قبلی بر روی جوانه‌های سیب نیز نشان داده‌اند که در جوانه‌های خوابیده فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز اندک ولی محتوای فنل درون‌زاد آنها زیاد بوده است اما در هنگام شکوفایی جوانه مقدار فعالیت این آنزیم افزایش یافته و مقدار فنل‌ها کاهش می‌یابد (Wang et al., 1991).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که تیمار سرمادهی، فرآیند حذف خواب جوانه‌های جانبی گردو را از طریق دو مسیر هدایت کرده است. در مسیر اول سرمادهی با تحریک تجزیه نشاسته و قندهای غیراحیایی، افزایش قندهای احیایی را سبب شد. در مسیر دوم سرمادهی منجر به افزایش مقادیر فنل و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز محلول و دیواره‌ای و پلی‌فنل اکسیداز گردید.

Reference

Baz, A.G. (1984). Some physiological studies on dormancy in Mit-Ghamr peach cultivar. A seasonal changes in native growth materials related to bud dormancy in peach. Annals of Agricultural Sciences 21: 465-479.

Benkeblia, N. and Shiomi, N. (2004). Chilling effect on soluble sugars, respiration rate, total phenolic, peroxidase activity and dormancy of onion bulbs. Sciences Agricultural Piracicaba, Brazil. 61: 281-285.

Ben Mohamad, H., Vadel, A.M., Geuns, J.M.C. and Khemira, H. (2010). Biochemical changes in dormant grapevine shoot tissues in response to chilling: Possible role in dormancy release. Scientia Horticulturae. 124: 440-447.

Bonhomme, M., Rageau, R., Lacointe, A. and Gendraud, M. (2005). Influences of cold deprivation during dormancy on carbohydrate contents of vegetative and floral primordia and nearby structures of peach buds (*Prunus persica* L. Batch). Scientia Horticulturae. 105: 223-240.

Campoy, J.A, Ruiz, D., Cook, N., Allderman, L. and Egea, J. (2011). High temperature and time to budbreak in low chill apricot. Towards a better understanding of chill and heat requirements fulfillment. Scientia Horticulturae.129: 649-655.

Cansev, A., Gulen, H., Celik, G. and Eris, A. (2012). Alterations in total phenolic content and antioxidant capacity in response to low tempratures ib olive (*Olea Europaea* L.). Plant Archives 10(1): 489-494.

Charrier, G., Bonhomme, M., Lacointe, A. and Améglio, T. (2011). Are budburst dates, dormancy and cold acclimation in walnut trees (*Juglans regia* L.) under mainly genotypic or environmental control? International Journal of Biometeorology. 55: 763-774.

Dennis, F.G. (2003). Problems in standardizing methods for evaluating the chilling requirements for the breaking of dormancy in buds of woody plants. Horticulture Science 38: 347-350.

Doblinski, P.M.F. and Ferrarese, M.L.L. (2003). Peroxidase and lipid proxidation of soybean roots. Brazilian Archives of Biology and Tecnology.46 (2): 193-198.

Egea, J., Ortega, E., Martynez-Gomez, P. and Dicenta, F. (2003). Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. Environmental Experimental Botany. 50: 79-85.

Erez, A. (1995). Means to compensate for insufficient chilling to improve bloom and leafing. Acta Horticulturae. 395: 81-95.

Fukoda, T., Ito, H. and Yoshida, T. (2003). Antioxidative polyphenols from Walnuts (*Juglans regia* L.). Phytochemistry. 63: 795-801.

Gonzalez-Rossia, D., Reig, C., Dovis, V., Gariglio, N. and Agusti, M. (2008). Changes on carbohydrates and nitrogen content in the bark tissues induced by artificial chilling and its relationship with dormancy bud break in *Prunus* sp. Scientia Horticulturae.118: 275-281.

Handel, E.V. (1968). Direct micro determination of sucrose. Analytical Biochemistry. 22: 280-283.

Hellman, E., Shelby, S. and Lowery, C. (2006). Exogenously applied abscise acid did not consistently delay budburst of deacclimating grapevines. Journal of the American Pomological Society. 60: 178-186.

Ito, A., Sakamoto, D. and Moriguchi, T. (2012). Carbohydrate metabolism and its possible roles in endodormancy transition in Japanese pear. Scientia Horticulturae. 144: 187-194.

Kara, M. and Mishra, D. (1976). Catalase, Peroxidase and polyphenolxidase activities during rice leaf senescence. Plant Phsiology. 57: 315-319.

Liu, X. and Huang, B. (2000). Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in greeping bentgrass. Crop Science. 40:503-510.

Mann, S.S. and Singh, B. (1990). Some aspects on development physiology of patharankh pear. Acta Horticulturae 279: 155-158.

Maurel, K., Leite, G.B., Bonhomme, M., Guilliot, A., Rageau, R., Petel, G. and

Sakr, S. (2004). Trophic control of bud break in peach (*Prunus persica*) trees: a possible role of hexoses. Tree Physiology. 24: 579-588.

McCready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H.S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. Analytical Chemistry 22: 1156-1158.

Noriega, X., Burgos, B. and Pérez, F.J. (2007). Short day-photoperiod triggers and low temperatures increase expression of peroxidase RNA transcripts and basic peroxidase isoenzyme activity in grapevine buds. Phytochemistry 68: 1376-1383.

Pennycooke, J.C., Cox, S. and Stushnoff, C. (2005). Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia* x *hybrida*). Environmental Experimental Botany. 53: 225-232.

Posmyk, M.M, Corbineau, F., Vinel, D., Bailly, C. and Come, D. (2001). Osmoconditioning reduces physiological and biochemical damage induced by chilling in soybean seeds. Physiologia Plantarum 111: 473-482.

Prado, D.E., Gonzalea, J.A., Boero, C. and Sampietro, A.R. (1998). A simple and sensitive method for determining reducing sugars in plant tissues. Application to quantify the sugar content in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. Phytochemistry Analysis. 9: 58-63.

Price, M.D. and Buttler, L.G. (1971). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. Journal of Agriculture Food Chemistry. 251: 1268-1273.

Prassinos, C., Rigas, S., Kizis, D., Vlahou, A. and Hatzopoulos, P. (2011). Subtle proteome differences identified between post-dormant vegetative and floral peach buds. Journal of Proteomics. 74: 607-619.

Rady, M.M. and Seif El-Yazal, M.A. (2013). Response of “Anna” apple dormant buds and carbohydrate metabolism during floral bud break to onion extract. Scientia Horticulturae. 155: 78-84.

Resende, M.L.V., Nojosa, G.B.A., Cavalcant, L.S., Aguilar, M.A.G., Silva, L.H.C.P., Perez, J.O., Andrade, G.C.G., Carvalho, G.A. and Castro, R.M. (2002). Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). Plant Pathology. 51: 621- 628.

Roitsch, T. and Gonzalez, M.C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. Trends Plant Scientia. 19: 606–613.

Scalabrelli, G., Viti, R. and Cinelli, F. (1991). Changes in catalase activity and dormancy of apricot buds in response to chilling. Acta Horticulture. 293: 267-274.

Sergeeva, L.I., Claassens, M.M.J., Jamar, D.C.L., Van Der Plas, L.H.W. and Vreugdenhil, D. (2012). Starch related enzymes during potato tuber dormancy and sprouting. Russian Journal of Plant Physiology. 59: 556-564.

Sherson, S.M., Alford, H.L., Forbes, S.M., Wallace, G. and Smith, S.M. (2003). Roles of cellwall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of Arabidopsis. Journal of Experimental Botany. 54: 525-531.

Szecsk, V., Hrotk, K. and Stefanovits-Banyai, E. (2002). Seasonal variability in phenol content, peroxidase and polyphenoloxidase enzyme activity during the dormant season in plum rootstocks. Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology. 46(3): 211-212.

Vergara, R. and Pérez, F.J. (2010). Similarities between natural and chemically induced bud endodormancy release in grapevine *Vitis vinifera* L. Scientia Horticulture. 125: 648-653.

Wang, S.Y. and Faust, M. (1987). Metabolic activities during dormancy and blooming of deciduous fruit trees. Isr. Journal of Botany. 37: 227-243.

Wang, S.H., Jiao, H.J. and Faust, M. (1991). Changes in the activity of catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase in apple buds during bud break induced by thidiazuron. Journal of Plant Growth Regulation. 10: 33-39.

Zhang, J., Cui, S., Li, J., Wei, J. and Kirkham, M.B. (1995). Protoplasmic factors, antioxidants responses, and chilling resistance in maize. Plant Physiology. Biochemistry. 33: 567-575.