

پیامدهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تنش کوتاهمدت ازن در توت‌فرنگی

مهديه کریمی^۱، منصور غلامی^{۲*} و حسن ساری‌خانی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق دکتری، استاد و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۳)

چکیده

ازن (O_3) یکی از آلاینده‌های مهم موجود در جو پایینی زمین است که در حضور انرژی خورشید و از مواد فرار و اکسیدنیترژن حاصل از دود کارخانه‌ها و ماشین‌ها تولید می‌شود. پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر آلودگی ازن بر رشد و برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی توت‌فرنگی انجام شد. بدین منظور از رقم آروماس (مناسب کشت در شرایط مزرعه) و رقم سلوا (مناسب کشت در شرایط گلخانه)، به ترتیب به عنوان ارقام تجاری مقاوم و حساس به تنش‌های محیطی استفاده شد. گیاهان به صورت کشت گلدانی و در فضای بسته، در گلخانه تحت تنش ازن کوتاهمدت سه‌روزه با سه غلظت صفر (هوای دارای ازن طبیعی به عنوان شاهد)، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در متر مکعب قرار گرفتند. نتایج نشان داد که گیاهان تیمار شده، علائم آسیب ازن از جمله نقاط کلروزه در برگ‌ها، کاهش کلروفیل a، b و کلروفیل کل، کاهش کربوهیدرات محلول و افزایش وزن خشک، درصد ماده خشک، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و محتوای پرولین را نشان دادند. در رقم سلوا، پس از پایان دوره تنش و شروع رشد جدید، برخی ناهنجاری‌های مورفولوژیک نیز در گل‌های تولید شده مشاهده شد. با توجه به آسیب کمتر رقم آروماس طی تنش، دوره رشد بعدی پس از برطرف شدن تنش، توانایی در بالابردن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و محتوای پرولین در مقابله با تنش ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر متر مکعب ازن، به نظر می‌رسد این رقم نسبت به رقم سلوا در برابر این نوع تنش می‌تواند تحمل بیشتری از خود نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی ازن، پرولین، توت‌فرنگی، رقم آروماس، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل.

Morphological, physiological and biochemical effects of short-term ozone stress in Strawberry (*Fragaria anasassa*) cvs. Aromas and Selva

Mahdiyeh Karimi¹, Mansour Gholami^{2*} and Hassan Sarikhani³

1, 2, 3. Former Ph. D. Student, Professor and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received: Apr. 14, 2017 - Accepted: Oct. 15, 2017)

ABSTRACT

Ozone (O_3) is one of the important pollutants in lower atmosphere of earth which is created in the presence of sunlight from volatile substances and nitrogen oxide that emitted from the factories and cars. The aim of this research was to investigate the effect of ozone pollution on the growth and some traits of strawberry. In this study two strawberry cultivars 'Aromas' (suitable for field cultivation) and 'Selva' (suitable for greenhouse cultivation) were used as commercial cultivars, resistant and sensitive to environmental stresses, respectively. The present study was conducted to investigate the effect of ozone pollution on the growth and some other traits of plants which were pot-planted in a greenhouse and were treated with ozone. These cultivars were treated with three levels of ozone at concentrations of 0 (control - atmosphere with natural atmospheric ozone concentration), 50 and 100 $mg.m^{-3}$ for a short period of 3 days. The treated plants showed ozone damage symptoms including chlorosis spots on the leaves, decreased amounts of chlorophylls a and b and total chlorophyll, decreased soluble carbohydrate and increased dry weight, dry matter percentage, total antioxidant capacity and proline contents. In Selva cultivar, after finishing of stress period and beginning of new growth, some morphological disorders were also observed in the produced flowers. Keeping in mind the smaller damage in Aromas cultivar during stress and growth period after the stress was finished and the ability of this cultivar to increase total antioxidant capacity and proline contents in dealing with 50 and 100 $mg.m^{-3}$ ozone stresses, it seems that this cultivar can have stronger tolerance against the mentioned stress compared to Selva cultivar.

Keywords: Ozone pollution, proline and antioxidants capacity, strawberry.

* Corresponding author E-mail: mgholami@basu.ac.ir

مقدمه

هوای اطراف زمین علاوه بر اکسیژن (۲۱ درصد) و ازت (۷۸ درصد)، دارای مقادیر اندکی از ترکیبات دیگر شامل کربن دی‌اکسید، بخار آب و گازهای دیگر از جمله ازن (O_3) می‌باشد. مقدار برخی از این گازها مانند ازن، در مناطق صنعتی بسیار بالاتر از شرایط طبیعی است و به‌عنوان یک آلاینده محیطی محسوب می‌شود. ازن مضر یا ازن تریپوسفری که یکی از آلاینده‌های اصلی از نظر اثر و دومین آلاینده هوا از نظر وسعت آلودگی به‌شمار می‌رود، نزدیک سطح زمین شکل می‌گیرد و در اثر فعل و انفعالات فتوشیمیایی و در شرایط خاصی، به‌ویژه در ماه‌های بهار و تابستان تولید می‌گردد. در کشور ما نیز پژوهش‌های مؤسسه ژئوفیزیک دانشگاه تهران، وجود غلظت‌های بالای گاز ازن (۷۰ میلی‌گرم در متر مکعب) به‌ویژه در فصل‌های بهار و تابستان در حاشیه کلان‌شهرهایی مانند تهران را تأیید می‌کند (Shariepour & Aliakbari, 2013; Bidokhti, 2013).

توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch)، یکی از میوه‌هایی است که به‌صورت تجاری در بسیاری از کشورها و در دامنه وسیعی از شرایط آب و هوایی کشت می‌شود (Drogoudi & Ashmore, 2000). این محصول به‌دلیل اهمیت نزدیک‌بودن به بازار مصرف در بعضی از مناطق مانند استان تهران، اصفهان، خوزستان و مرکزی، اغلب در حواشی شهرها و مراکز اقتصادی و بعضاً صنعتی و در تراکم بالای آلاینده‌های زیست‌محیطی کشت می‌گردد. سوابق موجود نشان می‌دهد که توت‌فرنگی در مقایسه با گیاهان حساسی مثل گوجه‌فرنگی (Thwe et al., 2014)، جزء گیاهان به نسبت متحمل به تنش ازن است و محصول‌دهی آن نسبت به تنش ملایم ازن، کاهش معنی‌داری پیدا نمی‌کند؛ اما این واکنش در بین ارقام مختلف و در شرایط مختلف اقلیمی متفاوت است (Drogoudi & Ashmore, 2002; Keutgen & Lenz, 2001).

ازن در غلظت‌های ۷۰ میلی‌گرم در متر مکعب به بالا، تنش اکسیداتیو به گیاهان وارد کرده و در

غلظت‌های ۱۰۰ میلی‌گرم در متر مکعب و بالاتر، باعث نکروزه‌شدن کل بافت می‌گردد. پاسخ ارقام توت‌فرنگی کورونا و السانتا به غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در متر مکعب ازن، پراکسیداسیون بیشتر لیپیدها و کاهش قند در میوه‌ها، پس از برداشت بود. همچنین کاهش وزن خشک و وزن تر، افزایش پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی، تغییر غلظت آنزیم‌های آپوپلاستی و تغییرات مورفولوژیک در برگ‌ها و کاسبرگ‌ها وابسته به نوع رقم توت‌فرنگی گزارش شده است (Keutgen & Pawelzik, 2008). Thwe et al. (2014) گزارش کرده‌اند که تنش ازن در گیاه گوجه‌فرنگی، تعداد و اندازه میوه را کاهش داد؛ اما سرعت گلدهی و میوه‌دهی تحت تأثیر ازن قرار نگرفت. Agrawal & Chaudhary (2015) تفاوت‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی بین ارقام مختلف ماش را در دو غلظت کم و زیاد ازن سنجیدند و توانستند ارقام مقاوم به تنش ازن را معرفی کنند. آن‌ها گزارش کردند که ازن محیط، آسیب‌های قابل مشاهده در برگ‌ها و رشد بوته به‌جای می‌گذارد. در بیشتر پژوهش‌ها، تنش ازن در مدت طولانی بررسی شده است و اثر ورود ناگهانی و با غلظت بالای ازن به محیط طبیعی که اکثراً توسط کارخانجات تولید می‌شود، بررسی نشده است (Vahala et al., 2003).

با توجه به روزخنی بودن ارقام آروماس و سلوا توت‌فرنگی و محصول‌دهی منظم و با کیفیت در طول سال، جایگاه ویژه‌ای در تولید توت‌فرنگی کشور به خود اختصاص داده‌اند. رقم آروماس، قدرت رشد بوته و محصول‌دهی بالایی دارد و مناسب کشت در شرایط مزرعه‌ای و در معرض تنش‌های محیطی می‌باشد (Gecer et al., 2013). رقم سلوا یک رقم گلخانه‌ای حساس به تنش خشکی (Ghaderi & Siosemardeh, 2011)، شوری (Khayyat et al., 2009)، سرما و خاک‌های آهکی (Karami, 2017) است. بر این اساس در این پژوهش، آثار مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مربوط به حساسیت یا مقاومت به تنش با غلظت کم و بالای ازن در مدت کوتاه در دو رقم تجاری مقاوم و حساس به تنش‌های محیطی در توت‌فرنگی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای انجام این پژوهش، نشاءهای توت‌فرنگی رقم‌های آروماس و سلوا در اسفندماه سال ۱۳۹۴ از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان تهیه و به گلخانه‌های پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا منتقل شد. پس از تیمار ریشه‌های گیاهان با قارچ‌کش بنومیل (به نسبت ۱ در هزار)، در گلدان‌های ۴ لیتری حاوی مخلوط خاک، ماسه و کود دامی به نسبت ۱:۱:۱ کشت شدند و برای تقویت گیاهان، گل‌های از پیش‌انگیخته حذف شدند و هفته‌ای دو بار با محلول غذایی یک چهارم هوگلند، به‌میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر در هر گلدان، تا یک هفته قبل از شروع تیمارها تغذیه شدند. در زمان رشد بوته‌ها، دمای حداکثر ۳۰ و دمای حداقل ۸ درجه سانتی‌گراد بود. به‌منظور فراهم‌شدن محل مناسب برای اعمال تیمار ازن، ۳ اتاقک به حجم ۲ مترمکعب در کنار هم و در شرایط محیطی مشابه، در داخل فضای گلخانه ساخته و گلدان‌های توت‌فرنگی که رشد آن‌ها کامل و برگ‌هایشان گسترده شده بود، به‌طور جداگانه در داخل هر یک از آن‌ها قرار گرفت. در زمان تیماردهی، کلیه ابعاد و کف اتاقک‌ها با پلاستیک‌های شفاف کاملاً پوشانده و جهت آبیاری گلدان‌ها، از سیستم آبیاری قطره‌ای استفاده گردید و بعد از تیمار، به گلخانه با شرایط قبلی که برای رشد قرار داشتند، منتقل شدند.

تیماردهی گیاهان با ازن

گیاهان توسط دستگاه تولیدکننده ازن (هوا زیست محیط آراین، ایران) تحت تیمار غلظت‌های صفر، 20 ± 50 و 20 ± 100 میلی‌گرم در مترمکعب ازن قرار گرفتند. در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در مترمکعب ازن، تمام سه روز در همین غلظت و در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در مترمکعب ازن، در روز سوم، تنش با دو برابر غلظت (۱۰۰ میلی‌گرم در مترمکعب) انجام شد و روز چهارم تیمار قطع و هر سه اتاقک تهویه شدند. در طول دوره تیماردهی، به‌منظور جابجایی هوا و توزیع یکنواخت ازن در سطح گلدان‌ها، در زیر پوشش پلاستیکی از فن‌های کوچک استفاده شد. سنجش دما در اتاقک‌ها

با دماسنج ماکزیمم-مینیمم دیجیتال انجام شد و برای جلوگیری از بالا و پایین رفتن دما، از سیستم سرمایشی و گرمایشی مناسب در اطراف اتاقک‌ها استفاده شد. به‌منظور کنترل و ثابت نگه‌داشتن میزان ازن موجود در سطح برگ‌ها، از ازن‌سنج (GC21، چین) در داخل اتاقک‌ها استفاده گردید. همچنین در طول آزمایش و در ساعات مختلف روز، رطوبت نسبی و شدت نور درون اتاقک‌ها، به‌ترتیب با رطوبت‌سنج دیجیتال (KT-908، چین) و لوکس‌متر (لوترون مدل ۱۱۰۸، تایوان)، کنترل و ثبت شد.

اندازه‌گیری صفات

با اعمال غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در مترمکعب ازن، گیاهان پس از ۳ روز، علائم نکروره‌شدن برگ‌ها را نشان دادند و ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی مختلف آن‌ها اندازه‌گیری گردید. متوسط دما و رطوبت در زیر اتاقک‌ها در این سه روز به‌ترتیب ۳۱ درجه سانتی‌گراد و ۵۴ درصد بود. یک روز پس از تهویه، به‌منظور بررسی میزان آسیب ازن بر بوته‌های توت‌فرنگی، تعداد بوته‌های با ۰-۲ برگ آسیب‌دیده (بیشتر از نیمی از یک برگ علائم آسیب را نشان داده باشد)، به‌عنوان بوته‌های با آسیب کم و بوته‌های با ۳-۵ برگ آسیب‌دیده، به‌عنوان بوته‌های با آسیب متوسط و بوته‌های با بیش از ۵ برگ آسیب‌دیده، به‌عنوان بوته‌های با آسیب شدید و تعداد بوته‌های به گل رفته در هر تکرار شمارش گردید. شاخص آسیب بوته‌ها بر حسب درصد، با رابطه زیر محاسبه گردید:

$$(1) \quad = \text{شاخص آسیب (درصد)} \\ \{ (\text{درصد بوته‌های}) + (\text{درصد بوته‌های با آسیب کم} \times 1) \} \\ \{ (\text{درصد بوته‌های با آسیب زیاد}) + (\text{با آسیب متوسط} \times 2) \\ 3 \times 100 \times 4$$

اندازه‌گیری بقیه صفات، از روز بعد از اتمام تنش آغاز گردید. برای بررسی صفات از برگ‌های با اندازه و سن متوسط استفاده گردید. وزن تر و خشک برگ‌ها با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و برای خشک‌کردن نمونه‌های برگ، از دستگاه آون استفاده شد. درصد ماده خشک نمونه‌ها از رابطه زیر استفاده گردید:

$$(۶) = \text{کربوهیدرات محلول (گرم وزن تر / میلی گرم)} \\ \times \left\{ \frac{\text{برگ (۰/۵ گرم)} \div \text{عصاره (۱۵ میلی لیتر)}}{1000} \right\}$$

میزان فنل کل

برای اندازه‌گیری محتوای فنل کل، از معرف فولین سیکالتو (Singleton & Rossi, 1965) استفاده شد. ابتدا مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه برگ در داخل هاون با اضافه کردن ۳ میلی‌لیتر اتانول ۸۵ درصد له شد و پس از صاف کردن با کاغذ صافی، ۳۰۰ میکرولیتر آن برداشته شد و به آن ۱۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیکالتیو رقیق شده با نسبت ۱ به ۱۰ اضافه گردید و به مدت حدود ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به آن ۱۲۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۷ درصد افزوده شد و پس از ۱/۵ تا ۲ ساعت تکان دادن روی شیکر در دمای اتاق و رقیق‌سازی، جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل کری ۱۰۰، واریان، آمریکا) اندازه‌گیری شد. برای تهیه استاندارد از مقادیر صفر، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۴۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدگالیک استفاده شد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، بر اساس درصد مهارکنندگی DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) طبق روش Brand-Williams *et al.* (1995) انجام شد. بدین ترتیب که پس از سانتیفریوژ کردن عصاره برگ در دور ۵۵۰۰ در دقیقه به مدت ده دقیقه، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی را برداشته و پس از هم‌زدن با ۲۰۰۰ میکرولیتر DPPH یک میلی‌مولار، جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طیف ۵۱۵ نانومتر در دو زمان صفر و ۳۰ دقیقه پس از تهیه یادداشت گردید. و در نهایت درصد بازدارندگی از طریق رابطه زیر به دست آمد:

$$(۷) \text{ DPPH درصد بازدارندگی} = \frac{(A_0 - A_{30})}{A_0} \times 100$$

که A_0 میزان جذب نمونه پس از افزودن DPPH و A_{30} جذب نمونه ۳۰ دقیقه پس از قرائت جذب اول می‌باشد.

$$(۲) \text{ وزن تر / } 100 \times \text{وزن خشک} = \text{درصد ماده خشک}$$

میزان کلروفیل

جهت اندازه‌گیری از روش Porra (2002) استفاده شد. بدین منظور میزان کلروفیل، ۰/۲ گرم از برگ تازه در یک هاون چینی با ۵ میلی‌لیتر استون ساییده شده و به صورت یک توده یکنواخت درآمد. محلول حاصل با سانتیفریوژ (مدل فرولبو، فرانسه)، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴ هزار دور در دقیقه، سانتیفریوژ شد. پس از جدا کردن عصاره رویی، مرحله سانتیفریوژ دو بار دیگر تکرار گردید و در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل کری ۱۰۰، واریان، آمریکا)، میزان جذب آن در طول موج‌های ۶۴۶/۶ و ۶۶۳/۶ نانومتر قرائت گردید و کلروفیل‌های a، b و کل توسط روابط ذیل محاسبه گردید.

$$(۳) = \text{(میلی گرم بر گرم وزن تر) کلروفیل a} \\ (A_{663/6} \times 2/55) - (A_{646/6} \times 12/25)$$

$$(۴) = \text{(میلی گرم بر گرم وزن تر) کلروفیل b} \\ (A_{663/6} \times 4/91) - (A_{646/6} \times 20/31)$$

$$(۵) = \text{(میلی گرم بر گرم وزن تر) کلروفیل کل} \\ (A_{663/6} \times 7/34) - (A_{646/6} \times 17/76)$$

در روابط فوق $A_{663/6}$ و $A_{646/6}$ به ترتیب میزان جذب در طول موج‌های ۶۶۳/۶ و ۶۴۶/۶ نانومتر می‌باشد.

میزان کربوهیدرات‌های محلول

به منظور اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول از روش Paquin & Lechasseur (1979) استفاده شد. بدین منظور، به طور خلاصه ۰/۵ گرم از برگ پس از کوبیده شدن با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد و ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد، همگن‌سازی و سانتیفریوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی با ۳ میلی‌لیتر آنترون مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب‌جوش (بن‌ماری) با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس میزان جذب آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که برهمکنش غلظت ازن و رقم بر شاخص آسیب (درصد) و تعداد بوته‌های به گل‌رفته طی تنش و روز بعد از تهویه اتاقک‌ها، در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. بوته‌های توت‌فرنگی رقم سلوا در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر متر مکعب ازن، درصد آسیب شدید ظاهری (با شاخص آسیب ۹۸/۸۵ درصد) نشان دادند. همچنین رقم آروماس در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر متر مکعب، شاخص آسیب ۸۰/۵۶ درصد را نشان داد (شکل ۱). رقم آروماس طی تنش و با افزایش غلظت آن میانگین تعداد گل در هر بوته را افزایش داد. تنش ازن، اثر اندکی بر افزایش میزان گل‌های رقم سلوا داشت (شکل ۲).

طبق نتایج به‌دست آمده، علائم آسیب ازن به‌صورت زخم‌ها و نقاط نقره‌ای و نکروزه‌شده مایل به قرمز در برگ‌ها مشاهده شد (شکل ۳) که در گیاهان متحمل به تنش ازن، این علائم کمتر بود. در مجموع، توت‌فرنگی‌های رقم سلوا نسبت به رقم آروماس، مقدار بیشتری از علائم نکروزه‌شدن برگ‌ها را نشان دادند. همچنین در هر دو رقم، به‌ویژه رقم سلوا، آسیب شدید در گل‌های از پیش تولیدشده و میوه‌های در حال رشد مشاهده شد (شکل ۴).

میزان پرولین

مقدار پرولین براساس روش Bates *et al.* (1973) انجام شد. جهت تعیین میزان پرولین، مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول به‌دست آمده از ترکیب، ۰/۵ گرم بافت برگ همراه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک با ۲ میلی‌لیتر اسید استیک و ۲ میلی‌لیتر ناین‌هیدرین ترکیب شده و پس از ۲ ساعت قرارگرفتن در حمام بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه گردید و جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید.

$$(۸) = \text{پرولین (میکرومول/گرم)} \\ \left[\text{وزن نمونه (۰/۵ گرم)} \div \text{حجم عصاره (۱۰ میلی‌لیتر)} \right] \times [1000 \div \text{عدد قرائت شده}]$$

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل، با دو فاکتور رقم توت‌فرنگی در دو سطح و غلظت ازن در سه سطح و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و تعداد ۴ گلدان از هر رقم در هر تکرار و تعداد دو بوته در هر گلدان انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها به‌روش مدل خطی عمومی (GLM) و با کمک نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تیمار تنش کوتاه‌مدت ازن بر میانگین مربعات درصد شاخص آسیب، به گل‌رفتن، وزن تر، وزن خشک، درصد ماده خشک، کربوهیدرات کل و فنل کل برگ توت‌فرنگی ارقام آروماس و سلوا

Table 1. Analysis of variance the effects of short-term ozone stress on damage index, flowering, fresh weight, dry weight, dry material, total carbohydrate and total phenol in leaf of Aromas and Selva strawberry cultivars

Source of variation	df	MS						
		Plant damage index	No. flower/plants	Fresh weight	Dry weight	Dry material	Total carbohydrate	Total phenol
Ozone concentration (A)	2	1226.1321**	1.5555**	0.3343 ^{ns}	0.0955*	847.0755**	237.2863**	0.1710 ^{ns}
Cultivar (B)	1	0.8669 ^{ns}	34.7222**	0.1388 ^{ns}	0.0640 ^{ns}	24.3105 ^{ns}	845.5402**	0.9210 ^{ns}
A × B	2	461.0700**	8.1889**	0.2004 ^{ns}	0.0660*	377.9133**	249.3284**	0.4844 ^{ns}
Error	12	10.5954	0.2777	0.2392	0.0294	24.2691	7.1060	194.48
C.V. (%)	-	7.72	22.71	25.44	15.20	4.91	12.23	10.54

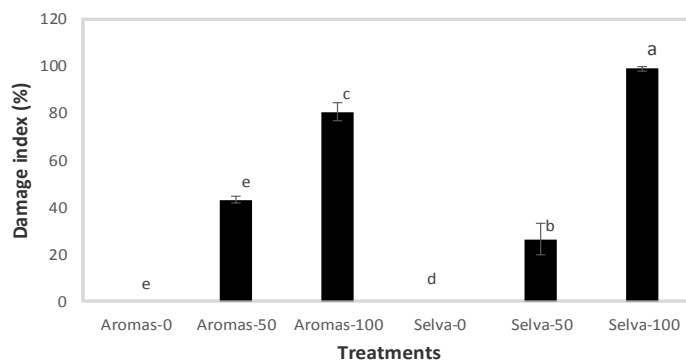
ns, *, **: Non-significant, and significant differences at 5 and 1% of probability levels, respectively.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تیمار تنش کوتاه‌مدت ازن بر میانگین مربعات کلروفیل a، b، کلروفیل کل، آنتی‌اکسیدان کل و پرولین برگ توت‌فرنگی ارقام آروماس و سلوا

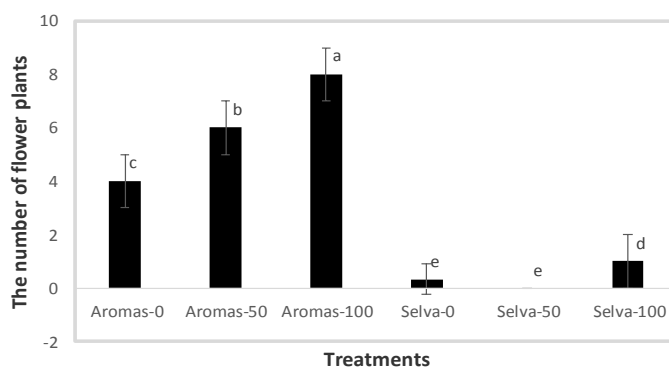
Table 2. Analysis of variance the effects of short-term ozone stress on mean squares a, b, total chlorophyll, total antioxidant capacity and proline in leaf of Aromas and Selva strawberry cultivars

Source of variation	df	MS				
		Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	Total antioxidant capacity	Proline
Ozone concentration (A)	2	112.1420**	30.0853**	237.3132**	17.5309 ^{ns}	3.9267**
Cultivar (B)	1	16.0288*	4.6484**	64.6005**	49.2584 ^{ns}	0.4880 ^{ns}
A × B	2	69.878**	13.1876**	114.6416**	232.1777**	2.0848**
Error	12	4.2689	0.1561	1.0020	17.2610	0.2888
C.V. (%)	-	16.42	9.61	8.66	16.22	20.08

ns, *, **: Non-significant, and significant differences at 5 and 1% of probability levels, respectively.



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف تیمار تنش کوتاه‌مدت ازن بر شاخص آسیب توت‌فرنگی ارقام آروماس و سلوا
 Figure 1. Effect of short-term ozone stress on damage index of Aromas and Selva strawberry cultivars



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف تیمار تنش کوتاه‌مدت ازن بر گلدهی توت‌فرنگی ارقام آروماس و سلوا
 Figure 2. Effect of short-term ozone stress on flowering of Aromas and Selva strawberry cultivars



شکل ۳. راست: عکس گرفته‌شده قبل از شروع تنش و چپ: پدیدار شدن آسیب ازن در برگ‌های توت‌فرنگی با افزایش غلظت ازن تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر متر مکعب در روز سوم تنش

Figure 3. Right: photo taken before stress start and left: the emergence of ozone damage in strawberry leaves with increasing ozone concentrations up to 100 mg/m³ on the third day of stress



شکل ۴. راست: مقایسه گل‌های باز شده توت‌فرنگی رقم سلوا در تیمار شاهد و تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر متر مکعب ازن و چپ: میوه توت‌فرنگی رقم سلوا در تیمار شاهد و ۵۰ میلی‌گرم بر متر مکعب ازن

Figure 4. Right: Flower compare of Selva strawberry cultivar in control and treated with 100 mg/m³ of ozone, left: fruits of Selva strawberry cultivar in control and 50 mg/m³ of ozone

معنی دار شد. اثر ساده غلظت ازن و رقم بر وزن تر معنی دار نشد. با بالا رفتن غلظت ازن، وزن خشک نمونه‌ها افزایش یافت. درصد ماده خشک برگ نیز در تیمار غلظت کم، ابتدا بالا رفت و با افزایش غلظت ازن، کاهش یافت و در کل وزن تر و درصد ماده خشک برگ‌های توت‌فرنگی‌های تیمار شاهد از بقیه تیمارها کمتر بود (جدول ۳). طی تنش ازن، مسیر حرکت کربوهیدرات‌ها تغییر پیدا می‌کند و با حرکت تریوزفسفات به خارج از کلروپلاست، ساخته شدن و رسوب نشاسته در کلروپلاست بیشتر می‌شود. همچنین تنش ازن در مدت کوتاه، سبب تحریک تولید اتیلن و جلوگیری از بسته شدن روزنه‌ها می‌گردد و بنابراین روزنه‌ها آب بیشتری از دست می‌دهند و زیست‌توده برگ‌ها افزایش پیدا می‌کند (Wilkinson & Davies, 2010). برهمکنش ارقام توت‌فرنگی سلوا و آروماس و غلظت ازن محتوی فنل کل و اثر ساده آن‌ها معنی دار نشد (جدول ۱).

بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس کربوهیدرات محلول (جدول ۱)، برهمکنش غلظت ازن و رقم توت‌فرنگی در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شد. بالاترین میزان کربوهیدرات محلول در تیمار شاهد و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر رقم سلوا مشاهده گردید و رقم سلوا در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کاهش کربوهیدرات محلول را نشان داد. در رقم آروماس، با بالا رفتن غلظت ازن، غلظت کربوهیدرات‌های محلول کاهش پیدا کرد. کمترین میزان کربوهیدرات محلول در رقم آروماس، در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در متر مکعب (ppb) ازن مشاهده شد.

در تیمار تنش ازن با غلظت بالا (۱۰۰ میلی‌گرم بر متر مکعب) در رقم آروماس، بیشترین تعداد بوته به گل‌رفته مشاهده گردید که تمامی آن‌ها پس از ریزش گلبرگ‌ها و تشکیل یک میوه ناقص کوچک از بین رفتند. در رقم سلوا هم گل‌های از قبل تولید شده از بین رفتند یا میوه‌های کوچک غیرعادی تولید کردند. به نظر می‌رسد یکی از فرآیندهای دفاعی رقم سلوا، اجتناب از تنش و با کاهش سطح برگ فعال و در رقم آروماس علاوه بر کاهش سطح فعال برگ، تحریک فرایند گلدهی می‌باشد. ازن با تخریب ساختار سلول‌ها، افزایش تولید اتیلن، کاهش فتوسنتز، تجزیه کلروفیل و افزایش تنفس، فرآیند پیری برگ را سرعت می‌بخشد که در نهایت منجر به کاهش سطح برگ می‌گردد. در پژوهش‌های قبلی گزارش شده است که تحت تنش ازن، سطح برگ توت‌فرنگی کاهش می‌یابد که به علت ایجاد تغییرات فیزیولوژیک است (Drogoudi & Ashmore, 2002; Keutgen & Lenz, 2001). آراییدوپسیس ۲۰ درصد (Yogesh *et al.*, 1994)، گیاه سلوی ۲۳ درصد (Pellegrini *et al.*, 2015) و ماش (Chaudhary & Agrawal, 2015) در مقایسه با شاهد علائم زرد شدن و پیری برگ‌ها را نشان دادند. مقاومت به تنش ازن، با دو مکانیسم اجتناب و تحمل صورت می‌گیرد (Iriti & Faoro, 2003).

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، برهمکنش غلظت ازن و رقم بر وزن تر معنی دار نشد. برهمکنش غلظت ازن و رقم بر وزن خشک، در سطح احتمال ۵ درصد و بر درصد ماده خشک در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۳. اثر غلظت‌های مختلف تیمار تنش کوتاه مدت ازن بر وزن تر، وزن خشک و درصد ماده خشک برگ، و فنل کل برگ

توت‌فرنگی ارقام آروماس و سلوا

Table 3. Effect of short-term ozone stress on fresh weight, dry weight, dry material, a, b, total chlorophyll and total phenol in leaf of Selva and Aromas strawberry cultivars

Cultivar×Ozone Concentrations	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Dry material (%)	Chlorophyll a (mg/grFW)	Chlorophyll b (mg/grFW)	Total chlorophyll (mg/grFW)	Total phenol (mg/grFW)
Aromas × 0	1.60	0.60b	53.22cd	9.78b	5.65b	15.49b	3.79
Selva × 0	1.81	0.84ab	52.35d	13.69a	7.37a	20.31a	3.80
Aromas × 50	1.87	0.78ab	60.38ab	8.05bc	3.36d	11.43c	3.58
Selva × 50	2.15	0.95b	64.84a	4.90c	4.11c	11.46c	3.99
Aromas × 100	2.12	1.00a	60.23ab	1.42d	1.79c	2.07a	2.69
Selva × 100	2.13	0.94a	58.15bc	6.15c	2.37c	5.58d	3.80

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

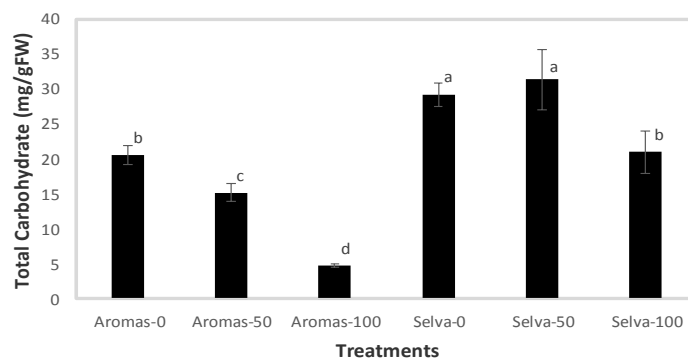
Similar letter in each column means non- significant differences at P<0.01 using Duncan's multiple range test.

به دنبال آن، اثرات منفی بر رشد و فیزیولوژی برگ می‌گذارد (Fiscus *et al.*, 2005). تنش ازن برگ‌های گیاه سلوی (Pellegrini *et al.*, 2015) و یونجه (Pukkettea *et al.*, 2012) را با کاهش معنی‌دار کلروفیل a و b مواجه کرد. کاهش میزان کلروفیل، ممکن است به خاطر تغییر متابولیسم نیتروژن در رابطه با ساخته شدن ترکیباتی مثل پرولین باشد که در تنظیم اسمزی، طی تنش به کار می‌روند (De La Rosa-Ibarra & Maiti, 1995). افزایش ساخت پرولین سبب می‌شود تا گلوتامات که پیش‌ماده سنتز کلروفیل و پرولین است، کمتر در مسیر سنتز کلروفیل شرکت کند (Qu *et al.*, 2009).

بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، برهمکنش غلظت ازن و رقم توت‌فرنگی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). طی آزمایش، رقم سلوا شاهد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بالاتری داشت و با افزایش تنش، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کاهش یافت و رقم آروماس، با افزایش تنش، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را بالا برد (شکل ۶). طی تنش ازن، تولید گونه‌های اکسیژن فعال از جمله هیدروژن‌پراکسید (H_2O_2)، سوپراکسید (O_2)، هیدروپراکسید (HOO) در سلول‌ها به خاطر شکست ازن افزایش می‌یابد. تفاوت تنش ازن با بقیه تنش‌ها در این است که در این نوع تنش، ازن مستقیماً به گونه‌های اکسیژن فعال در آپوپلاست تبدیل می‌شود؛ ولی در سایر تنش‌ها، گونه‌های اکسیژن فعال، به عنوان یک واسطه علامت‌دهی مطرح هستند.

در کل این رقم کربوهیدرات، محلول کمتری را نسبت به رقم سلوا داشت (شکل ۵). توزیع کربوهیدرات در گیاه، طی تنش ازن، بسته به نوع گیاه تغییر پیدا می‌کند و گاهی تنش ازن با کاهش فتوسنتز، از طریق کاهش هدایت‌روزنه‌ای (Thwe *et al.*, 2014) و جذب کربن‌دی‌اکسید (Pellegrini *et al.*, 2015) و کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو (Fontaine *et al.*, 2003) تولید کربوهیدرات‌های محلول برگ را نیز کاهش می‌دهد. یکی از ویژگی‌های مهم توت‌فرنگی، توانایی در کاهش ذخیره کربوهیدرات‌ها و فرستادن آن‌ها به نقاط فعال رشد رویشی و زایشی، در زمان اعمال تنش ازن می‌باشد (Keutgen & Pawelzik, 2008). این موضوع با نتایج بسیاری از پژوهشگران از جمله Bin *et al.* (2015) در برنج، دانهال گونه‌ای از کاج (Chen *et al.*, 2015) و کوبک کوهی (Neufeld *et al.*, 2012) مطابقت دارد.

برهمکنش غلظت ازن و رقم توت‌فرنگی بر میزان کلروفیل a و کلروفیل کل در سطح احتمال ۱ درصد و بر میزان کلروفیل b در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بالاترین میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در رقم سلوا و در تیمار شاهد مشاهده گردید (جدول ۳). در هر دو رقم، با بالا رفتن غلظت تنش ازن، میزان هر سه نوع کلروفیل کاهش یافت. در کل، رقم سلوا نسبت به رقم آروماس کلروفیل بالاتری داشت. ازن، پس از ورود به روزنه‌ها، با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen Species) و افزایش فعالیت کلروفیل‌لاز، بافت‌های برگ را با آسیب و تجزیه شدن کلروفیل مواجه می‌کند و



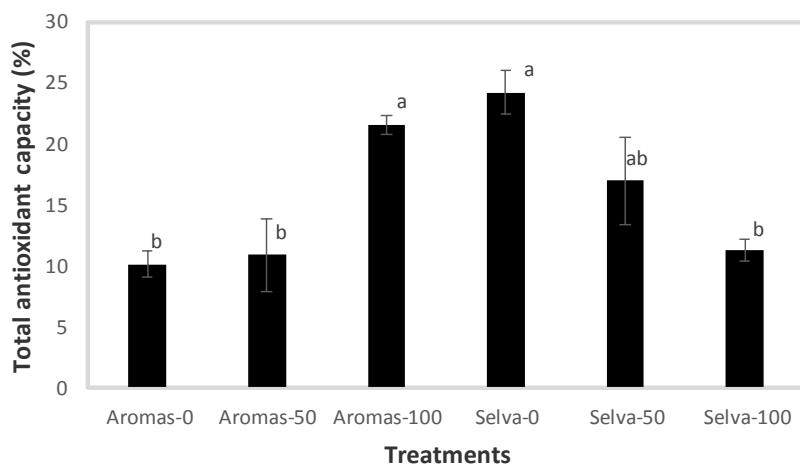
شکل ۵. اثر غلظت‌های مختلف تیمار تنش کوتاه‌مدت ازن میزان کربوهیدرات کل برگ توت‌فرنگی ارقام آروماس و سلوا
Figure 5. Effect of short-term ozone stress on total carbohydrate in leaf of Aromas and Selva strawberry cultivars

شده است، که در واکنش به تنش‌های محیطی مثل: خشکی، شوری، دماهای بالا، اشعه‌ی ماوراء بنفش و آلاینده‌ها در گیاهان تجمع می‌یابد (Verslues & Sharma, 2010). تجمع پرولین، نشانه متحمل‌بودن گیاه به آن نوع از تنش محیطی می‌باشد و پرولین، نقش بسیار مهمی را در تنش‌های اکسیداتیو، به‌ویژه تنش ازن، بازی می‌کند. گزارش شده است که تجمع پرولین در بافت، اثر بسیار مثبتی بر سیستم آنتی‌اکسیدانی، جلوگیری از تخریب غشای فسفولیپیدی و تجمع مالون‌دآلدئید دارد (Ozden *et al.*, 2009). رقم آروماس، به‌وضوح میزان پرولین بافت برگ را با افزایش تنش ازن، بالا برد (شکل ۷).

یک هفته پس از پایان تیمار، برگ‌های گیاهان شروع به ریزش کردند و سپس گیاهان به‌تدریج از قسمت جوانه مرکزی، برگ‌های جدید تولید کردند. رشد گیاهان بسیار کم بود و حتی تا ۶ ماه نیز، کم‌رشدی گیاهان ادامه داشت. بسیاری از گیاهان تیمار شده، به‌ویژه در رقم سلوا، حتی پس از رشد جدید، برگ‌ها و گل‌های غیرعادی تولید کردند؛ به این شکل که دمگل‌ها کوتاه و ضخیم و گلبرگ‌ها و اندام‌های زایشی به اندام‌های شبه‌برگ یا کاسبرگ تبدیل شدند (شکل ۸). در نتیجه می‌توان ناهنجاری گل‌ها و بدشکل‌شدن آن‌ها پس از رشد جدید را از دیگر اثرات ازن بر توت‌فرنگی رقم سلوا دانست.

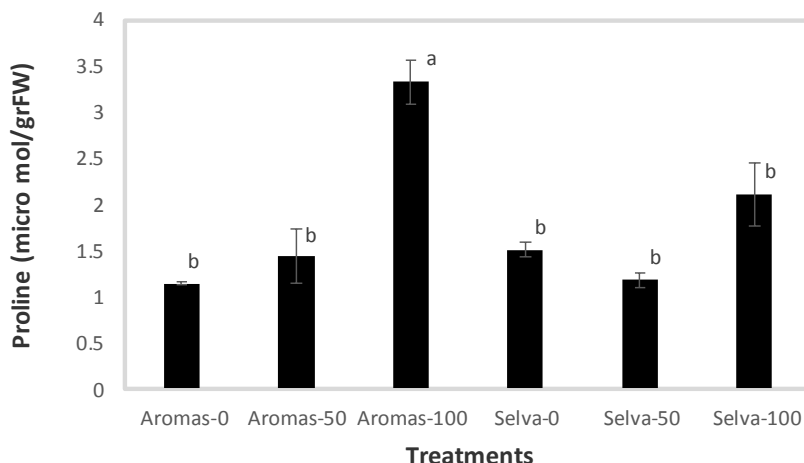
گیاه فرآیندهای دفاعی مختلفی را برای جلوگیری از افزایش آن‌ها و تخریب اندامک‌ها از جمله کلروپلاست‌ها پی می‌گیرد که یکی از آن‌ها، تولید آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی است (Baier *et al.*, 2005). تنش ازن، تولید آنتی‌اکسیدان‌ها را در گیاه سلوی (Pellegrini *et al.*, 2015) و آرابیدوپسیس (Mahalingam *et al.*, 2009) را افزایش داد. ارقام گندم (Wang *et al.*, 2012)، آرابیدوپسیس (Mahalingam *et al.*, 2009) و لوبیا (Chaudhary & Agrawal, 2015) با تولید بالاتر آنتی‌اکسیدان‌ها، به تنش ازن مقاومت بهتری نشان دادند. کاهش ویژگی آنتی‌اکسیدانی طی تنش، به گونه گیاه و رقم آن بستگی دارد (Bohler *et al.*, 201)؛ و وقتی در گیاهی، آنتی‌اکسیدان‌ها تحلیل می‌رود یا بیان ژن مربوط به بازسازی آنتی‌اکسیدان‌ها متوقف می‌شود، گونه‌های اکسیژن فعال تجمع پیدا می‌کنند (Pukkettea *et al.*, 2012).

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، برهمکنش غلظت ازن و رقم بر میزان پرولین برگ‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). بالاترین میزان پرولین را رقم آروماس در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر ازن نشان داد و بین بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۷). پرولین، یکی از مهمترین اسمولیت‌های آلی (تنظیم‌کننده اسمز) گیاهی شناخته



شکل ۶. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف تیمار تنش کوتاه‌مدت ازن بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل برگ توت‌فرنگی ارقام آروماس و سلوا

Figure 6. Comparison of the effect of short-term ozone stress on total antioxidant capacity in leaf of Aromas and Selva strawberry cultivars



شکل ۷. اثر غلظت‌های مختلف تیمار تنش کوتاه‌مدت ازن بر میزان پرولین برگ توت‌فرنگی ارقام آروماس و سلوا
Figure 7. Effect of short-term ozone stress on proline in leaf of Aromas and Selva strawberry cultivars



شکل ۸. تبدیل تمام اندام‌های گل به کاسبرگ در گل‌آذین جدید توت‌فرنگی رقم سلوا در زمان شش ماه پس از پایان تنش ازن
Figure 8. Transformation of all flower organs to sepals in new inflorescences of Selva strawberry cultivar at six months after the end of ozone stress

نتیجه‌گیری کلی

رقم آروماس در مقابل تنش، افزایش پرولین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را نشان داد و علائم آسیب ازن در برگ‌ها، در این رقم کمتر محسوس بود و در ماه‌های پس از اتمام تنش، تولید گل‌های طبیعی را داشت. مقاومت یا حساسیت به ازن بستگی به رقم، میزان غلظت ازن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، زمان تیمار طی روز و فصل رویشی دارد. در نهایت می‌توان گفت که رقم آروماس در مقایسه با رقم سلوا در مقابل تنش یکباره و با غلظت بالای ازن رقم متحمل‌تری است.

نتایج پژوهش نشان داد که طی تنش ازن در مدت سه روز و با افزایش غلظت ازن از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم در متر مکعب، رقم سلوا میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل و کربوهیدرات محلول بیشتر و رقم آروماس ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و پرولین بالاتری را داشتند. رقم سلوا از ابتدا رشد قوی‌تر، کلروفیل و کربوهیدرات محلول بالاتری داشت؛ ولی علائم آسیب ازن، از جمله کاهش رشد رویشی و زایشی و تولید گل‌های غیرطبیعی پس از اتمام تنش، در این رقم شدید بود.

REFERENCES

- Baier, M., Kandlbinder, A., Gollack, D. & Dietz, K. J. (2005). Oxidative stress and ozone: perception, signaling and response. *Plant Cell Environmental*, 28, 1012-1020.
- Bates, L. S., Waldern, R. P. & Teare, M. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Bin, P., Shang-kun, L., Li P. L., Yun-xia, W., Jian-guo, Z., Lian-xin, Y. & Yu-long, W. (2015). Effects of ozone stress on photosynthesis and dry matter production of rice under different planting densities. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 26 (1), 17-24.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology*, 28, 25-30.

5. Chaudhary, N. & Agrawal, S. B. (2015). The role of elevated ozone on growth, yield and seed quality amongst six cultivars of mung bean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 286-294.
6. Chen, Z., Shang, H., Cao, J. & Yu, H. (2015). Effects of ambient ozone concentrations on Contents of nonstructural carbohydrates in *Phoebe bournei* and *Pinus massoniana* seedlings in Subtropical China. *Water, Air and Soil Pollution*, 226, 310-328.
7. De La Rosa-Ibarra, M. & Maiti, R. K. (1995). Biochemical mechanism in glossy Sorghum lines for resistance to salinity stress. *Journal of Plant Physiology*, 146, 515-519.
8. Drogoudi, P. A. & Ashmore, M. R. (2002). Effects of elevated ozone on yield and carbon allocation in strawberry cultivars differing in developmental stage. *Phyton (Austria). Special issue: Global change*, 2, 45-53.
9. Drogoudi, P. D. & Ashmore, M. R. (2000). Does elevated ozone have differing effects in flowering and de-blossomed strawberry? *New Phytology*, 147, 561-569.
10. Fiscus, E. L., Booker, F. L. & Burkey, K. O. (2005). Crop loss responses to ozone: Uptake, mode of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell and Environment*, 28, 997-1011.
11. Fontaine, V., Cabane, M. & Dizengremel, P. (2003). Regulation of phosphoenol pyruvate of carboxylase in *Pinus halepensis* needles submitted to ozone and water stress. *Physiologia Plantarum*, 117, 445-452.
12. Geceer, M. K., Eyduran, E. & Yilmaz, H. (2013). The effect of different applications on fruit yield characteristics of strawberries cultivated under van ecological conditions. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(5), 1431-1435.
13. Ghaderi, N. & Siosemardeh, A. (2011). Response to Drought Stress of Two Strawberry Cultivars (cv. Kurdistan and Selva). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52(1), 6-12.
14. Iriti, M. & Faoro, F. (2003). Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Phytopathology*, 151, 171-180.
15. Karami, F. (2017). *Screening of some strawberry cultivars in response to low temperatures based on related morphological and physiological characteristics*. Ph.D. thesis. In the field of Horticultural Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
16. Keutgen, A. J. & Pawelzik, E. (2008). Apoplastic antioxidative system responses to ozone stress in strawberry leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165, 868-875.
17. Keutgen, N. & Lenz, F. (2001). Responses of strawberry to long-term elevated atmospheric ozone concentrations. I. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence, and macronutrient contents. *Gartenbauwissenschaft*, 66, 27-33.
18. Khayyat, M., Vazi feshenas, M. R., Rajaei, S. & Jamalian, S. (2009). Potassium effect on ion leakage, water usage, fruit yield and biomass production by strawberry plants grown under NaCl stress. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 17(1), 79-88.
19. Leisner, C. P. & Ainsworth, E. A. (2012). Quantifying the effects of ozone on plant reproductive growth and development. *Global Change Biology*, 18, 606-616.
20. Mahalingam, R. (2015). Combined Stresses in Plant. In: Bohler, S., Cuypers, A., Vangronsveld, J. & Mahalingam, R. (Eds), *Interactive effects between ozone and drought: Sorrow or Joy?* (p.p.151-154). Springer.
21. Mahalingam, R., Jambunathan, N., Gunjan, S., Faustin, E., Weng, H. & Ayoubi, P. (2006). Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment*, 29, 1357-1371.
22. Neufeld, H. S., Peoples, S. J., Davison, A. W., Chappelk, A. H., Somers, G. L., Thomley, J. E. & Booker, F. L. (2012). Ambient ozone effects on gas exchange and total non-structural carbohydrate levels in cutleaf coneflower (*Rudbeckia laciniata* L.) growing in Great Smoky Mountains National Park. *Environmental Pollution*, 16, 74-81.
23. Ozden, M., Demirel, U. & Kahraman, A. (2009). Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Scientia Horticulturae*, 119, 163-168.
24. Paquin, R. & Lechasseur, P. (1979). Observations sur une methode de dosage de la praline libre dans les extraits de plants. *Canadian Journal of Botany*, 57, 1851-1854. (in French)
25. Pellegrini, E., Alessandra, F., Giacomo, L. & Cristina, N. (2015). Ecophysiological and antioxidant traits of *Salvia officinalis* under ozone stress. *Environment Science Pollution Research*, 1-11.
26. Porra, R. J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, 73, 149-156.
27. Puckettea, M., Iyera, N. J., Tangb, Y., Daib, X. B. & Mahalingam, R. (2012). Differential mRNA Translation in *Medicago truncatula* Accessions with Contrasting Responses to Ozone-Induced Oxidative Stress. *Molecular Plant*, 5(1), 187-204.
28. Qu, Y. N., Zhou, Q. & Yu, B. J. (2009). Effects of Zn²⁺ and niflumic acid on photosynthesis in *Glycine soja* and *Glycine max* seedlings under NaCl stress. *Environmental and Experimental Botany*, 65, 304-309.

29. Sandermann, H. Jr. (1997). Forest Decline and Ozone. In: Heath, R. L. & Talor, J. G. (Eds). *Physiological Processes and Plant Responses to Ozone Exposure*. (p.p. 350-351). Ecological Studies.
30. Shariepour, Z. & Aliakbari Bidokhti, A. A. (2013). Investigation of surface ozone over Tehran for 2008-2011. *Journal of physics of the Earth and space*, 3(3), 191-206. (in Farsi)
31. Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
32. Thwe, A. A., Vercambre, G., Gautier, H., Gay, F., Phattaralerphong, J. & Kasemsap, P. (2014). Response of photosynthesis and chlorophyll fluorescence to acute ozone stress in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Photosynthetica*, 52 (1), 105-116.
33. Vahala, J., Keinanen, M., Schutzenhubel, A., Polle, A. & Kangasjarvi, J. (2003). Differential effects of elevated ozone on two hybrid Aspen genotypes predisposed to chronic ozone fumigation; Role of ethylene and salicylic acid. *Plant Physiology*, 196-205.
34. Verslues, P. E. & Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book*, 8 (140), 1-23.
35. Wang, X., Yang, L., Kobayashi, K., Zhu, J., Chen, C. P., Yang, K., Tang, H. & Wang, Y. (2012). Investigations of spikelet formation in hybrid rice as affected by elevated tropospheric ozone concentration in China. *Agriculture, Ecosystem and environment*, 150, 63-91.
36. Wilkinson, S. & Davies, W. J. (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell and Environment*, 33, 510-525.
37. Yogesh, K., Sharma, Keith, R. & Davi, K. R. (1994). Ozone-Induced Expression of Stress-Related Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 105, 1089-1096.