

Physiological and biochemical responses of lines obtained from Norstar and Pishtaz wheat crossing to cold stress

Mohsen Hosseini¹, Reza Maali-Amiri^{2*}, Siros Mahfozi³, Abbas Saidi⁴, Yasin Khaledian⁵

1,4. Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. 2, 5. Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran 3. Department of Cereals Research, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran
(Received: February 13, 2021 - Accepted: May 10, 2021)

ABSTRACT

Low temperature (LT) is one of the most important factors that limit growth, distribution and production of cereals. The purpose of the present study was to identify some traits related to LT tolerance in different phenological development stages in lines resulted from crosses between Pishtaz and Norstar wheat. Under experimental conditions, LT tolerance, shoot apex development, final leaf number (FLN), activity of antioxidant enzymes, total sugars and H₂O₂ contents were investigated. Results of double ridges formation and FLN showed that winter and facultative genotypes spent the longer time in the vegetative phase and entered the reproductive phase with delay. These genotypes also were more tolerant to LT in comparison to spring genotypes. Analysis of variance showed that genotypes, sampling period, and their interaction were highly significant for the most of the traits. Ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX), polyphenol oxidase (PPO), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and total sugars content reached their maximum in all genotypes at the second period of LT acclimation but higher in winter and facultative than spring genotypes. The highest H₂O₂ content observed at the third period of LT acclimation was the highest in spring compared to winter and facultative genotypes. The significant correlations coefficients for antioxidative activities and sugar content with lethal temperature 50 (LT₅₀) suggest that they could be useful as indirect indices for LT tolerance in wheat. The results of this study showed that vernalization required genotypes had a higher potential for LT tolerance when the traits associated with LT tolerance in vegetative stage are adjusted.

Keywords: Antioxidant enzymes, low temperature, LT acclimation, total sugars content, vernalization.

پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لاین‌های حاصل از تلاقی ارقام گندم نورستار و پیشتاز تحت تنش سرما

محسن حسینی^۱، رضا معالی‌امیری^{۲*}، سیروس محفوظی^۳، عباس سعیدی^۴، یاسین خالدیان^۵

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و دانشجوی فعلی دکتری گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ۲۰۵. استاد و دانشجوی دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳. استادیار بخش غلات موسسه اصلاح نهال و بذر کرج، ۴. استاد گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۲۰)

چکیده

سرما یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده رشد، پراکنش و تولید در غلات است. تحقیق حاضر با هدف شناسایی برخی صفات مرتبط با تحمل به سرما در مراحل مختلف نمو در لاین‌های حاصل از تلاقی ارقام گندم نورستار و پیشتاز انجام شد. تحت شرایط آزمایشی، میزان تحمل به سرما، وضعیت توسعه مریستم انتهایی، شمارش تعداد برگ نهایی (FLN)، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، محتوی قند و پراکسید هیدروژن (H₂O₂) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی روند توسعه مریستم انتهایی و FLN نشان داد که ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی نسبت به ژنوتیپ‌های بهاره، مدت زمان بیشتری را در فاز رویش سپری کردند و با تاخیر وارد فاز زایشی شدند. همچنین ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی، از میزان تحمل به سرمای بیشتری برخوردار نسبت به ژنوتیپ‌های بهاره بودند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در اکثر صفات، بین ژنوتیپ‌ها، دوره‌های عادت‌دهی به سرما و اثر متقابل آن‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، پلی فنل اکسیداز (PPO)، کاتالاز (CAT)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و محتوی قند کل در همه ژنوتیپ‌ها در دومین دوره عادت‌دهی به سرما به بیشترین میزان رسید. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوی قند در ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی، بیشتر از ژنوتیپ‌های بهاره بود. محتوی H₂O₂ در سومین دوره عادت‌دهی به سرما به بیشترین میزان رسید؛ این افزایش در ژنوتیپ‌های بهاره بیشتر از ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی بود. ضریب همبستگی معنی‌دار بین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوی قند با دمای کشنده ۵۰ درصد (LT₅₀) نشان داد که این پارامترها می‌توانند جهت اندازه‌گیری غیر مستقیم تحمل به سرما استفاده شوند. نتایج این پژوهش نشان داد که ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره-سازی با تنظیم صفات مرتبط با تحمل به دمای پایین در مرحله رویشی از تحمل به سرمای بیشتری برخوردار هستند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سرما، بهاره‌سازی، عادت‌دهی به سرما، محتوی قند کل.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) به دلیل سازگاری بالا به شرایط مختلف محیطی و اهمیت آن در امنیت غذایی (غذای اصلی ۶۰ درصد از جمعیت جهان)، به‌طور وسیعی در سراسر جهان به‌طورکشت می‌شود. تقاضا برای گندم در جهان با افزایش سریع رشد جمعیت در حال افزایش است (Ji et al., 2017; Ghasemi- Mobtaker et al., 2020; Hosseini et al., 2021). پیش‌بینی می‌شود که جمعیت جهان در سال ۲۰۲۵ از هشت میلیارد نفر بگذرد؛ از این رو میزان تولید این محصول هم از طریق افزایش سطح کشت و هم از طریق افزایش در واحد سطح باید افزایش یابد (Ji et al., 2017). دما یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی محدود کننده تولید و توزیع جغرافیایی غلات از جمله گندم است و باعث کاهش چشمگیر عملکرد آن می‌شود. گیاهان تحت تنش سرما، دچار مجموعه‌ای از تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شوند که نهایتاً تاثیرات نامطلوبی را بر رشد و تولید آن‌ها به جای می‌گذارد (Solanke & Sharma, 2008). تنش سرما منجر به حادث شدن تنش اکسیداتیو به دلیل شکل گرفتن گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شوند که این ترکیبات باعث اختلال در واکنش‌های انتقال الکترون، آسیب رساندن به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و دیگر واکنش‌های بیوشیمیایی سلول می‌شوند. بنابراین شکل‌گیری ROSها منجر به آسیب سلولی و نهایتاً مرگ گیاه می‌شود. همچنین گیاهان با قرار گرفتن در شرایط دمای پایین، با سایر تنش‌های محیطی دیگر نیز روبه‌رو می‌شوند (Janská et al., 2010; Shen et al., 2018; Hosseini & saidi, 2019). جهت تطابق با تنش سرما، غلات زمستانه از جمله گندم، مکانیسم‌های انطباقی که توسط سرما تنظیم می‌شود را توسعه داده‌اند. پاسخ بهاره‌سازی و عادت‌دهی به سرما، مهم‌ترین مکانیسم‌های بقای زمستانه در غلات است. این دو مکانیسم از طریق برهمکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیکی که به عوامل ژنتیکی و محیطی وابسته است، تنظیم می‌شوند (Bond et al., 2011).

(Hosseini et al., 2016). پاسخ بهاره‌سازی در گندم زمستانه به‌عنوان یک ویژگی انطباقی بحرانی^۱، انتقال از مرحله رویش به مرحله زایشی را تا زمان قرار گرفتن در معرض یک دوره طولانی دمای پایین، به تاخیر می‌اندازد. این مکانیسم به گندم زمستانه این قابلیت را می‌دهد که زمستان را به‌صورت گیاهچه سپری کند؛ با این وجود، کاهش یا از بین رفتن تحمل سرما در ارقام گندم نیازمند نیاز بهاره‌سازی، اغلب با اشباع نیاز بهاره‌سازی در انتهای دوره رویشی شروع می‌شود (Janmohammadi et al., 2015). از دیدگاه آناتومیکی، اشباع نیاز بهاره‌سازی و شروع فاز زایشی، با شکل‌گیری "برجستگی دوگانه" قابل رویت است. در طول سرما، ارقام زمستانه و بینابینی گندم، تعداد برگ نهایی خود را تا نقطه اشباع نیاز بهاره‌سازی کاهش می‌دهند، درحالی‌که ارقام بهاره، زمانی که تحت رژیم روز بلند قرار گیرند، به دلیل عدم نیاز بهاره‌سازی به سرعت وارد فاز زایشی می‌شوند (Mahfoofi et al., 2006). نیاز بهاره‌سازی در گندم معمولی، *Triticum aestivum* L. (2n=42)، توسط سه ژن اصلی همولوگ شامل *Vrn-A1*، *Vrn-B1* و *Vrn-D1* که به‌ترتیب بر روی کروموزوم‌های 5A، 5B و 5D قرار دارند، تنظیم می‌شود. آلل غالب در یکی از این جایگاه‌ها، باعث به‌وجود آمدن تیپ بهاره و حضور آلل‌های مغلوب در هر سه جایگاه باعث شکل گرفتن تیپ زمستانه می‌شود (Hosseini et al., 2016). در شرایط مزرعه، بسیاری از گونه‌های گیاهی به‌منظور مقابله با صدمات ناشی از سرما، توانایی افزایش تحمل به سرما را در خود افزایش می‌دهند. این فرایند که از طریق قرارگیری در دماهای پایین بالای صفر در گیاهان شکل می‌گیرد، حاصل القای تغییرات مهم متابولیکی و مولکولی در سلول‌های گیاهی است و به‌عنوان عادت-دهی به سرما شناخته شده است. پاسخ عادت‌دهی به سرما که در گندم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، منجر به طیف وسیعی از تغییرات در بیان ژن، ترکیب لیپیدهای غشایی، اسمولیت‌های سازگار، سطوح آنتی-اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی و صفات نمودی می-

¹ Critical adaptive feature

نوترکیب خالص (Recombinant inbred lines (RIL)) نسل هفت حاصل از تلاقی ساده رقم نورستار با پیشتاز با نیاز بهاره‌سازی متفاوت از نظر زمان انتقال از مرحله رویشی به زایشی و یک لاین تقریباً ایزوژن Near (isogenic line (NIL)) حاصل از چهار بار تلاقی برگشتی نسل F1 با والد بهاره (به‌عنوان پایه مادری) پیشتاز و چهار بار خودگشتی با احتمال ۹۷/۵ درصد ریخته ارثی از رقم پیشتاز مورد استفاده قرار گرفت. برنامه اصلاح گندم شامل بهبود تحمل به تنش سرما از طریق معرفی کردن صفات دخیل در سازگاری به ژرم-پلاسماهای تجاری است که چنین صفاتی ممکن است از طریق RILها و NILها شناسایی شوند. همه این ژنوتیپ‌ها در شرایط مزرعه در اقلیم معتدل سرد (کرج) به مدت یک سال زراعی به‌صورت فاکتوریل و در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار ارزیابی شدند. فاکتورهای مورد ارزیابی شامل پنج عدد ژنوتیپ و چهار سطح نمونه‌برداری بود. ژنوتیپ‌ها در ایستگاه کرج با مشخصات جغرافیایی ۵۱ درجه طول شرقی و ۳۵ درجه عرض جغرافیایی و با ارتفاع ۱۳۲۱ متر از سطح دریا در تاریخ اول مهر ماه کشت شدند. هر لاین در هر تکرار به طول سه متر در یک پشته و در سه ردیف به فاصله ۲۰ سانتی‌متر از یکدیگر کاشت شدند. میزان بذر مصرفی بر اساس ۴۵۰ بذر در مترمربع در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری در سه مرحله عادت‌دهی به سرما شامل آذر ماه (۶۰ روز پس از کشت)، دی ماه (۹۰ روز پس از کشت) و بهمن ماه (۱۲۰ روز پس از کشت) نمونه‌برداری انجام شد. همچنین همه این ژنوتیپ‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با نور ۲۰۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه و ۱۶ ساعت روشنایی به‌عنوان شاهد در شرایط اتاقک رشد کشت شدند و در مرحله چهار برگی از آن‌ها نمونه‌برداری شد. تمام نمونه‌ها در نیتروژن مایع فریز و سپس در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ارزیابی روند تحمل به انجماد (آزمون انجماد)

جهت تعیین قابلیت تحمل به انجماد، از روش (Mahfoozi et al., 2001) با تعیین LT₅₀ استفاده شد. از هر تکرار و هر رقم، تعداد پنج بوته از مزرعه جمع‌آوری شد و سپس طوقه گیاه (یک سانتیمتری بالا

شود. در طی فرایند عادت‌دهی به سرما، گیاهان برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو القا شده به‌وسیله سرما، آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی از جمله کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، پلی‌فنول اکسیداز (PPO) و آسکوربات پراکسیداز (APX) و آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی از جمله پرولین را برای پاک‌سازی ROSها فعال می‌کنند. متابولیسم قندها، یکی دیگر از فرایندهای مرتبط با عادت‌دهی به سرما است و نقش فعالی را در تنظیم رشد، فتوسنتز، تقسیم‌بندی کربن، متابولیسم لیپید و کربوهیدرات، هموستازی اسمزی، سنتز پروتئین و بیان ژن بازی می‌کنند. تجمع ROSها به‌طور مستقیم توسط قندها جهت کاهش آسیب ناشی از تنش‌های محیطی تنظیم می‌شود (Sami, 2014; Das & Roychoudhury, 2014; Czarnecka et al., 2018).

در سال‌های، اخیر تغییرات آب و هوا و نوسانات دمایی بر تولید محصولات کشاورزی تاثیر گذاشته و به‌ویژه تنش سرما باعث کاهش سطح تولید گندم شده است. گرم شدن کره زمین و نوسانات دمایی، فرایند رشد و نمو گندم را تسریع کرده و منجر به اختلال در هماهنگ‌سازی فصلی تولید مثل شده است؛ در نتیجه تنش سرما حتی در نواحی که کشت گندم انجام می‌شود نیز می‌تواند خسارت‌زا باشد (Ji et al., 2017; Hosseini et al., 2021). بنابراین، درک عمیق تنظیمات نموی و ارتباط آن با تغییرات متابولیسمی در طول فرایند عادت‌دهی به سرما، مسیرهایی را که ژنوتیپ‌های گندم با سرما سازگار می‌شوند را مشخص می‌کند. در مطالعه حاضر، ارقام بهاره و زمستانه گندم و لاین‌های تقریباً ایزوژن و نوترکیب حاصل از تلاقی آن‌ها که دارای نیاز بهاره‌سازی و میزان تحمل به سرمای متفاوت هستند، جهت مطالعه تاثیر صفات نموی بر میزان تحمل به سرما، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، تجمع H₂O₂ و محتوی قند کل بررسی شد.

مواد و روش

شرایط کشت و نمونه‌برداری

در این پژوهش، پنج ژنوتیپ گندم نان شامل ارقام پیشتاز (Pishtaz) و نورستار (Norstar)، دو لاین

کلرواستیک اسید ۱٪ در صد هموژن شد. مخلوط هموژن شده با $g \times 12000$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشت شد و به ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم بافر پتاسیم فسفات یک مولار و یک میلی‌لیتر پتاسیم یدید یک مولار اضافه شد. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر Shimadzu UV-160 اندازه‌گیری شد. محتوای H_2O_2 با مقایسه منحنی کالیبراسیون استاندارد که قبلاً با غلظت‌های مختلف H_2O_2 ساخته شده بود تعیین شد. میزان H_2O_2 بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر گزارش شد (Nazari et al., 2012).

استخراج و سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانسی

برای استخراج عصاره جهت سنجش آنزیم‌ها، نمونه‌ها (۰/۵ گرم برگ) در نیتروژن مایع پودر و سپس در بافر استخراج (بافر Tris-HCL، حاوی ۱۰ درصد گلیسرول، pH: 7.8) هموژن شد. عصاره‌ها با $g \times 15000$ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتیفوژ شدند. فعالیت آنزیم CAT در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفوتومتر و به روش Aebi (1984) اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم APX با روش Ranieri et al. (2003) به‌دست آمد. در اثر واکنش بین APX و آسکوربیک اسید و H_2O_2 ، دهیدروآسکوربات تولید می‌شود که در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت شد (Ranieri et al., 2003). فعالیت آنزیم GPX نیز همانند آنزیم CAT در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به روش Chance & Maehly (1955) اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم GPX بر اساس میزان جذب ترکیب نارنجی رنگ تتراگایاکول در میلی‌گرم غلظت پروتئین محاسبه شد (Chance & Maehly, 1955). فعالیت PPO با روش Kar & Mishra (1976) مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم بر حسب مقادیر اکسید شده پیروگالول در طول موج ۴۲۰ نانومتر محاسبه شد (Kar & Mishra, 1976). اندازه‌گیری فعالیت SOD طبق روش Dhindsa et al. (1981) انجام شد. میزان فعالیت این آنزیم بر اساس میزان احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم و توانایی آنزیم SOD در

و زیر محل طوقه) برای آزمون انجماد آماده شد. در روش LT_{50} ، طوقه گیاهان در داخل ظروف آلومینیومی حاوی ماسه نرم مرطوب در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت در فریزر نگهداری شد و سپس دمای فریزر، هر ۳۰ دقیقه یک درجه سانتی‌گراد کاهش یافت و این کاهش تا دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد ادامه داشت. در موعد هر دمای مشخص، نمونه‌های مزبور از فریزر خارج شدند و پس از استقرار ۱۲ ساعته در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد جهت ذوب تدریجی بافت یخ‌زده، نمونه‌ها به شرایط کنترل منتقل شدند و در بستری با بافت سبک کشت شدند. پس از سه هفته، بر اساس ارزیابی سیستم ریشه‌ای و هوایی زنده و فعال، تعداد بوته‌های مرده و زنده ثبت و بر این اساس، میزان LT_{50} و تحمل سرما تعیین شد (Mahfoozi et al., 2001).

وضعیت توسعه مریستم انتهایی ساقه

جهت ارزیابی وضعیت نمو در مریستم انتهایی، پنج بوته در هر دوره عادت‌دهی به سرما در شرایط مزرعه به ازای هر تکرار و ژنوتیپ، انتخاب شد و با تشریح بوته به کمک میکروسکوپ، وضعیت نمو در محل مریستم انتهایی ساقه به دقت مورد ارزیابی قرار گرفت. نکته مهم در این مرحله، تعیین وضعیت رویشی، برجستگی واحد و نیز برجستگی دوگانه به‌عنوان نماد وضعیت فیزیکی انتقال از مرحله رویشی به زایشی بود (Hosseini et al., 2016; Hosseini et al., 2021).

شمارش تعداد برگ روی پنجه اصلی

به‌منظور تعیین FLN در هر دوره عادت‌دهی به سرما و شرایط کنترل، شش بوته برای هر تکرار و رقم به محیط اتاقک رشد با شرایط نرمال (دمای 19 ± 1 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۵ درصد و طول روز ۱۶ ساعت با شدت تشعشع ۴۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه) منتقل شدند و تا موعد ظهور برگ پرچم، تعداد برگ روی پنجه اصلی به‌طور متوالی شمارش و بر این اساس FLN مشخص شد (Hosseini et al., 2016).

سنجش میزان H_2O_2

میزان H_2O_2 بر اساس روش Loreto & Velikova (2001) اندازه‌گیری شد. ۰/۳۵ گرم برگ در داخل هاون چینی در ازت مایع به خوبی سائیده و با تری

ها بر اساس ANOVA، مقایسه میانگین با آزمون دانکن، ضریب همبستگی با نرم افزار SAS و بر اساس روش پیرسون تجزیه شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق، رشد فنولوژیکی و انتقال از مرحله رویشی به زایشی ژنوتیپها با تشریح مریستم انتهایی نوک ساقه و FLN مشخص شد. تشکیل حلقه‌های مضاعف در مریستم انتهایی ساقه، نشان دهنده گذار از فاز رویشی به زایشی و تکمیل نیاز بهاره‌سازی ژنوتیپها است. همچنین چنانچه ژنوتیپهای نیازمند بهاره‌سازی در معرض سرما قرار گیرند، تعداد نهایی برگ آنها تا رسیدن به نقطه اشباع بهاره‌سازی کاهش یافته و پس از آن ثابت می‌ماند (Mahfoofi *et al.*, 2001). همانطور که در شکل ۱ مشخص است، والد نورستار در طول دوره‌های عادت‌دهی به سرما نمو فنولوژیکی خود را کاهش داد و در طول دوره‌های عادت‌دهی به سرما، حلقه‌های مضاعف قابل رویت نبودند، اما در دوره‌های عادت‌دهی به سرما، FLN این رقم پس از اولین دوره عادت‌دهی به سرما شروع به کاهش کرد و نهایتاً پس از دومین دوره عادت‌دهی به سرما، نیاز بهاره‌سازی خود را تکمیل کرد و وارد فاز زایشی شد (شکل ۱).

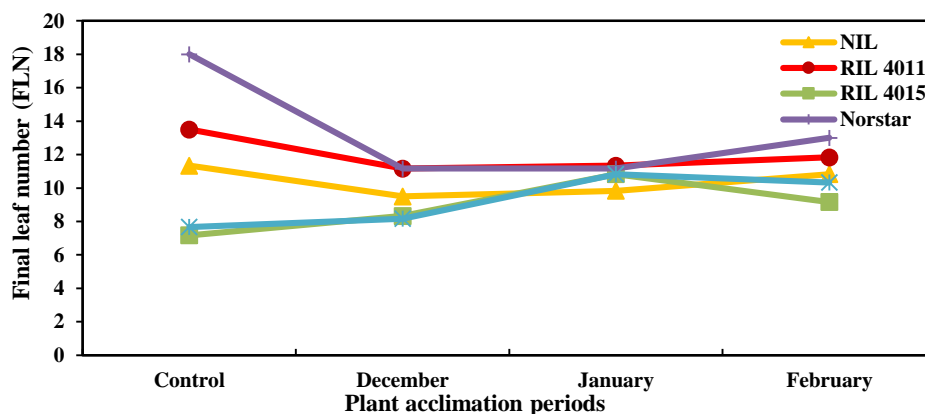
ممانعت از این واکنش بررسی می‌شود (Dhindsa *et al.*, 1981). جهت استخراج پروتئین کل، تمام روند استخراج در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام شد. محتوای پروتئین محلول کل بر اساس روش برادفورد برآورد شد (Bradford, 1976).

سنجش محتوی قند کل به روش فنل-اسید سولفوریک

جهت سنجش میزان قند کل از روش فنل-اسید سولفوریک استفاده شد. این روش مبتنی بر هیدرولیز اسیدی قندهای محلول و ایجاد ترکیب فورفورال است که با فنل، کمپلکس رنگی تولید می‌کند. در این روش، ۰/۱ گرم نمونه گیاهی با الکل ۷۰ درصد به حجم ۱۵ میلی لیتر رسانده شد و مخلوط حاصل، یک هفته در یخچال نگهداری و هر روز بهم زده شد پس از یک هفته، دو میلی‌لیتر از نمونه با یک میلی‌لیتر فنل پنج درصد به خوبی مخلوط شد سپس پنج میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن افزوده شد و نیم ساعت بعد، جذب محلول‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر ثبت شد (Mecozzi, 2005).

تجزیه داده‌ها

داده‌های به‌دست آمده به‌صورت فاکتوریل و در قالب بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار تجزیه شدند. داده-



شکل ۱- روند شمارش تعداد برگ نهایی (FLN) تحت شرایط کنترل و دوره‌های عادت‌دهی به سرما در مزرعه (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت و بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) در والد نورستار، پیشتاز، لاین تقریباً ایزوژن، لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵).

Figure 1. Final leaf number (FLN) under controlled environment and during plant cold acclimation in the field (December 20, 60 days after planting), January 19, 90 days after planting and February 18, 120 days after planting) in Norstar and Pishtaz parents and NIL and RIL 4011 and 4015.

بهاره‌سازی و عدم کاهش تعداد برگ نهایی در طول دوره‌های عادت‌دهی به سرما بود (شکل ۲). والد بهاره پیشتاز نسبت به RIL4015 از نمو فنولوژیکی پایین‌تری برخوردار بود و رویت حلقه‌های مضاعف در سومین دوره عادت‌دهی (حدود ۱۲۰ روز پس از کشت) به سرما امکان پذیر بود (شکل ۱). افزایش در تعداد برگ‌ها نیز در RIL 4015 در طول دوره‌های عادت‌دهی به سرما بیشتر از رقم پیشتاز بود (شکل ۲).

نتایج تجزیه واریانس آزمایشات مربوط به LT_{50} در دوره‌های مختلف عادت‌دهی به سرما نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها (لاین تقریباً ایزوژن، نوترکیب و ارقام والدینی)، دوره‌های عادت‌دهی به سرما (زمان‌های نمونه‌برداری) و اثر متقابل ژنوتیپ و دوره عادت‌دهی به سرما در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۱).

وضعیت رشد و رویت حلقه‌های مضاعف در NIL و RIL 4011 که دارای تیپ رشد بینابینی هستند، مانند رقم نورستار بود، با این تفاوت که این لاین‌ها از نمو فنولوژیکی بالاتری برخوردار بودند. در این تحقیق، این ژنوتیپ‌ها (نورستار، NIL و RIL 4011) تا دومین دوره عادت‌دهی به سرما تعداد برگ خود را کاهش دادند و پس از آن به تعدادی ثابت رسیدند؛ بنابراین این ژنوتیپ‌ها به دلیل عدم ادامه روند کاهش تعداد برگ نهایی در دی ماه، به نقطه اشباع نیاز بهاره‌سازی رسیدند (Mahfoofi *et al.*, 2006).

در والد بهاره پیشتاز و RIL4015، نمو فنولوژیکی در طول دوره‌های عادت‌دهی به سرما به سرعت ادامه یافت (شکل ۱). در RIL 4015 در اولین دوره عادت‌دهی به سرما (۶۰ روز پس از کشت)، حلقه‌های مضاعف قابل مشاهده بود. FLN این ژنوتیپ‌ها نیز حاکی از عدم نیاز

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های LT_{50} در دوره‌های عادت‌دهی به سرما (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت و بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) در والد نورستار، پیشتاز، لاین تقریباً ایزوژن و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵).

Table 1. Variance Analysis (ANOVA) of LT_{50} under controlled environment and during plant acclimation in the field (December 20, 60 days after planting, January 19, 90 days after planting and February 18, 120 days after planting) in Norstar and Pishtaz parent and, NIL and RIL 4011 and 4015.

Source of variation	df	Mean squares
		LT_{50}
Rep	2	0.62
Genotype	4	270.98**
Date	2	176.09**
Genotype*date	8	20.98**
Error	28	0.24
Coefficient of Variation (CV %)		8.12

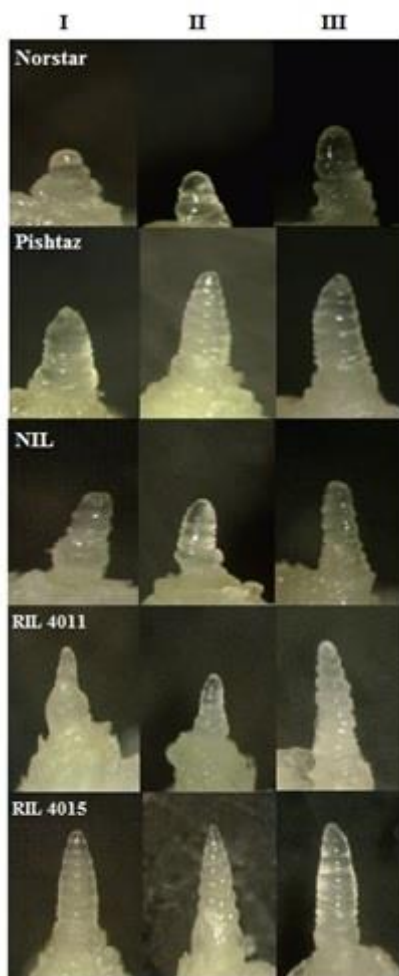
** : اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد..

** : Significantly different at 1% of probability level.

اشباع نیاز بهاره‌سازی (دی ماه، ۹۰ روز پس از کشت) از خود نشان داد. با توجه به این‌که NIL و RIL 4011 بینابینی هستند، خصوصیات مشابه دو والد را داشتند، اما میزان تحمل به سرمای کمتری از والد نورستار نشان دادند (شکل ۳). همه این ژنوتیپ‌های دارای نیاز بهاره‌سازی متفاوت، حداکثر تحمل به سرما خود را در شرایط عادت‌دهی به سرما در محدوده تکمیل نیاز بهاره‌سازی و به‌خصوص در محدوده اشباع بهاره‌سازی به‌دست آوردند. نیاز بهاره‌سازی که نشانگر انتقال از مرحله رویشی به زایشی است (Mahfoofi *et al.*, 2001; Hosseini *et al.*, 2021) وقتی تکمیل می‌شود که دمای پایین نتواند

در این پژوهش، ژنوتیپ‌های بهاره (پیشتاز و RIL 4015) نسبت به ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی، تحمل به سرمای کمی داشتند و در اولین دوره عادت‌دهی به سرما، به سرعت به حداکثر تحمل به سرما رسیدند و پس از آن هیچ نوع تحمل سرمایی از خود نشان ندادند، اما ژنوتیپ نیازمند بهاره‌سازی با آغاز دوره‌های عادت‌دهی به سرما، تحمل به سرما نشان دادند و تا زمستان این روند ادامه یافت. رقم نورستار که به دلیل نیاز بهاره‌سازی طولانی مدت، در زمهره ارقام سازگار به مناطق بسیار سرد با زمستان طولانی به شمار می‌آید، بیشترین تحمل به سرما (۲۲- درجه سانتی‌گراد) را در نقطه

FLN را کاهش دهد (شکل ۱).



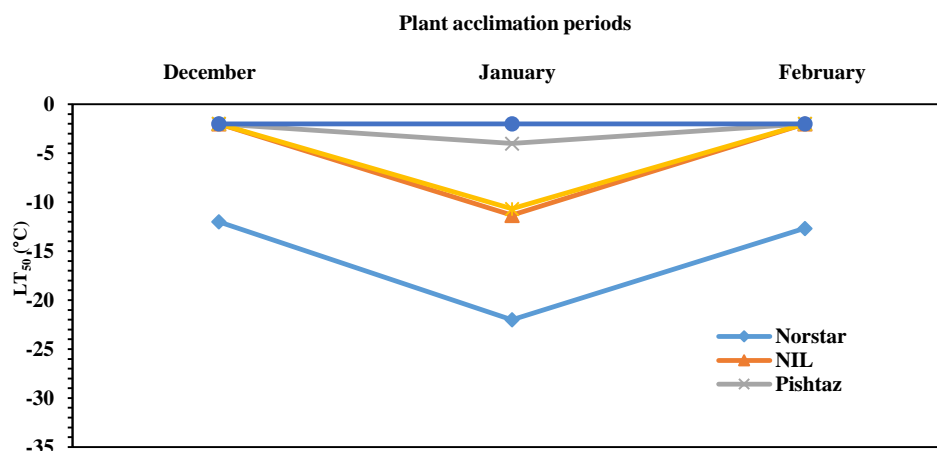
شکل ۲- توسعه مریستم انتهایی در طول عادت دهی به سرما در مزرعه: (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت، بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) در والد نورستار، پیشتاز، لاین تقریباً ایزوژن و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵).

Figure 2. Shoot apex development during plant acclimation in the field (December 20, 60 days after planting, January 19, 90 days after planting and February 18, 120 days after planting) in Norstar and Pishtaz parents and NIL and RIL 4011 and 4015.

به‌جز ناحیه‌ای که انتخاب برای آن انجام شده است. پس از تکمیل نیاز بهاره‌سازی و با پیشرفت نمودی به سوی مراحل زایشی پیشرفته، تحمل به سرما در اکثر این ژنوتیپ‌ها از بین رفت. این نتایج ضمن تایید بررسی‌های انجام شده، نظریه کنترل نمودی (Developmental Regulation) کاهش تحمل پس از انتقال از مرحله رویشی به زایشی را تایید می‌کند. طبق نظریه کنترل نمودی تحمل به سرما، ژن‌های نمودی نظیر ژن‌های فتوپریود، بهاره‌سازی و افزایش تعداد برگ، طول مدت بیان ژن‌های ساختمانی را تنظیم می‌کند، درحالی‌که سطح تحمل به سرما به مدت زمان و شدت بیان ژن-

در تهیه لاین تقریباً ایزوژن، یکی از صفات مربوط به والد دهنده (در اینجا نورستار) به والد زراعی (پیشتاز) انتقال داده شده است. در اینجا پس از تلاقی ساده بین دو والد، لاین تقریباً ایزوژن توسط فرایندهای بک کراس با انتخاب برای صفت مورد نظر ایجاد شد. در این تحقیق، تحمل به سرما صفت مطلوب بود، اما لاین حاصل، ویژگی مشابه با رقم نورستار را خواهد داشت. پس از چندین بک کراس، افراد انتخاب شده سلف می‌شوند تا برای صفت مدنظر هموزیگوس شوند؛ بنابراین نتیجه، یک جفت ژنوتیپ است (یکی والد مکرر و دیگری NIL) که در همه جایگاه‌ها یکسان هستند،

های ساختمانی بستگی دارد. همچنین شواهد علمی متعددی در سطح ملکولی بیانگر نیز آن است که بیان ژن-های ساختاری تحمل به انجماد، با آغاز مرحله زایشی به شدت کاهش می‌یابند (Mahfoofi et al., 2000).



شکل ۳- تغییرات LT₅₀ در دوره‌های عادت دهی به سرما (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت، بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) در والد نورستار، پیشتاز، لاین تقریباً ایزوژن و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵).

Figure 3. Lethal temperatures (LT₅₀) during plant acclimation in the field (December 20, 60 days after planting, January 19, 90 days after planting and February 18, 120 days after planting) in Norstar and Pishtaz parents and NIL and RIL 4011 and 4015.

GPX, PPO و محتوای قند کل و FLN در دوره‌های مختلف عادت‌دهی به سرما و شرایط کنترل حاکی از این بود که بین ژنوتیپ‌ها و بین دوره‌های مختلف عادت‌دهی به سرما، اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد وجود داشت و اثر متقابل آن‌ها نیز معنی‌دار بود (جدول ۲).

این مشاهدات همچنین نتایج بدست آمده از شرایط کنترل شده که در آن (Mahfoofi et al., 2001; Fowler & Limin, 2004) انتقال از مرحله رویشی به زایشی، شروع کاهش میزان تحمل را به دنبال دارد را تایید می‌کند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس میزان H₂O₂ و فعالیت آنزیم‌های SOD, APX, CAT.

جدول ۲- تجزیه واریانس محتوای H₂O₂, FLN, قند کل و میزان فعالیت آنزیم‌های SOD, APX, CAT, GPX و PPO در شرایط کنترل و دوره‌های مختلف عادت‌دهی به سرما (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت و بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) در والد نورستار، پیشتاز، لاین تقریباً ایزوژن و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵).

and total sugar contents, FLN, activities of SOD, CAT, APX, Table 2. Variance analysis (ANOVA) of H₂O₂ December 20, 60 (plant acclimation in the field environment and during PPO under controlled GPX and Norstar after planting and February 18, 120 days after planting) in planting, January 19, 90 days days after 4011 and 4015. NIL and RIL and Pishtaz parents and

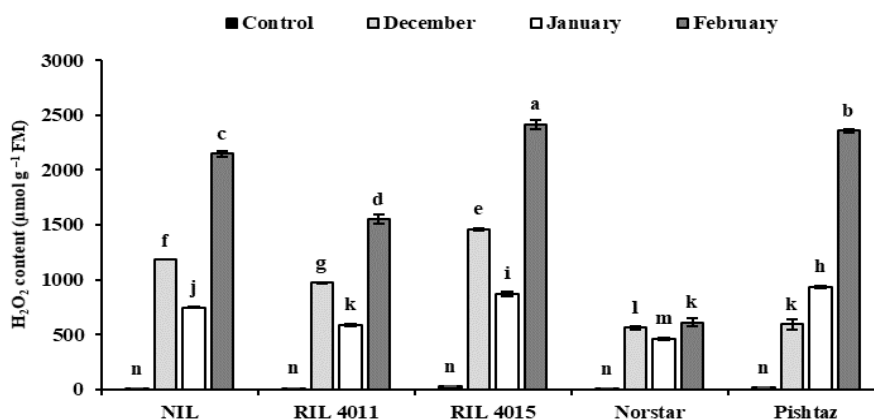
S.O.V	df	Mean squares							
		H ₂ O ₂	CAT	APX	SOD	GPX	PPO	Total sugar	FLN
Rep	2	9116.825	2.17027E-07	1.38595E-05	5.41E-06	2.10112E-07	7.14207E-06	0.000962305	0.129
Genotype	4	1074370.181**	0.000138811**	0.012978698**	0.000111216**	0.000271838**	0.002730643**	3.195140872**	42.119**
Date	3	8280273.611**	0.000251402**	0.016774782**	0.000197563**	0.000354865**	0.004092833**	4.343925414**	9.349**
Genotype*date	12	400660.5166**	2.02707E-05**	0.001918962**	2.3573E-05**	2.76033E-05**	0.00059869**	0.333394801**	10.505**
Error	38	4733.753	4.79769E-07	3.00233E-05	2.80824E-06	6.43989E-07	1.59403E-05	0.046653371	0.208
CV (%)		7.85	8.36	8.08	24.6	7.08	10.78	12.48	4.24

** : اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد..

** : Significantly different at 1% of probability level.

ROSها تکامل یافته‌اند (Heidarvand & Maali-Amiri, 2010). تنش‌های محیطی مختلف، این تعادل اکسیداسیون و احیاء را از طریق افزایش تولید ROSها و یا کاهش فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی برهم می‌زنند. در همین راستا، دمای پایین به‌ویژه در تلفیق با نور شدید، موجب تولید فزاینده ROSها می‌شود. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، با افزایش H_2O_2 ، تحمل ژنوتیپ‌ها به سرما از دست رفت، به‌طوری‌که در سومین دوره عادت‌دهی به سرما در بهمن ماه، میزان اندازه‌گیری شده H_2O_2 به بیشترین میزان خود رسید؛ البته این افزایش در ژنوتیپ‌های بهاره (Pishtaz و RIL 4015) بسیار بیشتر از ژنوتیپ‌های داری نیاز بهاره‌سازی بود. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق با نتایج با بسیاری از پژوهشگران که بر روی روند تحمل به سرما تحقیق انجام داده بودند، کاملاً هم‌خوانی دارد (Apostolova *et al.*, 2008; Janda *et al.*, 2007). همبستگی منفی بالا محتوای H_2O_2 و LT_{50} تایید کننده این واقعیت است که تنش اکسیداتیو القا شده توسط تنش سرما با تحمل به سرما در ژنوتیپ‌های گندم مرتبط است (جدول ۳).

ارزیابی میزان تجمع H_2O_2 ژنوتیپ‌ها در دوره‌های عادت‌دهی به سرما، نشان از فزونی مقادیر آن در سومین دوره عادت‌دهی به سرما مصادف با مرحله زایشی و از دست رفتن تحمل به سرما در ژنوتیپ‌های دارای نیاز بهاره‌سازی (Norstar، RIL 4011 و NIL) داشت. کمترین و بیشترین میزان H_2O_2 در شرایط کنترل، به‌ترتیب به رقم Norstar و RIL 4015 تعلق داشت. در دوره‌های عادت‌دهی به سرما، بیشترین میزان تجمع H_2O_2 در RIL 4015 در سومین دوره عادت‌دهی به سرما که مصادف با مرحله زایشی پیشرفته این لاین بود، مشاهده شد (شکل ۴). پیامد حاصل از تنش سرما همچون بسیاری دیگر از تنش‌ها، بروز اختلال در متابولیسم گیاه و افزایش تولید انواع ROSها از جمله H_2O_2 است (Nazari *et al.*, 2012). در سلول‌های گیاهی، انواع ROSها از دو طریق (مسیر اصلی و مسیر قابل‌القاء) در مقادیر بالا تولید می‌شوند، اما در شرایط طبیعی، تعادل اکسیداسیون و احیای سلول به‌طور بنیادی عمدتاً از طریق طیف وسیعی از سازوکارهای آن‌تی‌اکسیدانی حفاظت می‌شود که در زمینه پالایش



شکل ۴- محتوای H_2O_2 در شرایط کنترل و دوره‌های عادت‌دهی به سرما (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت، بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) ستون‌های دارای حروف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح یک درصد، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.

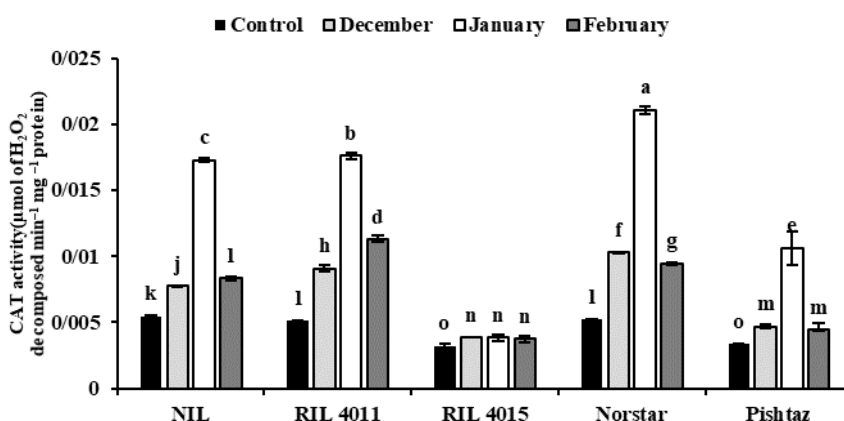
Figure 4. The content of H_2O_2 under controlled environment and during plant acclimation in the field (December 20, 60 days after planting, January 19, 90 days after planting and February 18, 120 days after planting) in Norstar and Pishtaz parents and NIL and RIL 4011 and 4015. Columns with different letters are significantly different based on the Duncan test at 1% of probability level.

میزان فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ‌های دارای نیاز بهاره‌سازی (Norstar، RIL 4011 و NIL) به شدت افزایش یافت، به‌طوری‌که در دومین دوره عادت‌دهی

به‌طور کلی، میزان فعالیت آنزیم‌های آن‌تی‌اکسیدانی (CAT، APX، GPX، SOD و PPO) در شرایط کنترل پایین بود و با افزایش دوره‌های عادت‌دهی به سرما،

سرما کمتر بود. تحت تنش سرما، افزایش فعالیت آنزیم CAT در گیاهان در مطالعات مختلفی گزارش شده است، به طوری که ارقام متحمل به سرما در مقایسه با ارقام حساس، میزان فعالیت این آنزیم بیشتر بوده است (Cakmak & Atici, 2009; Javadian *et al.*, 2010). این آنزیم نقش مهمی در حذف H_2O_2 تولید شده در تنش‌های محیطی ایفا می‌کند (Nazari *et al.*, 2012).

(محدوده تکمیل نیاز بهاره‌سازی) به سرما، بیشترین میزان فعالیت این آنزیم‌ها مشاهده شد (شکل ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹). با پیشرفت دوره‌های عادت‌دهی، در سومین دوره عادت‌دهی به سرما و با پیشرفت نمودی به سوی مراحل زایشی پیشرفته و نیز بعد از تکمیل نیاز بهاره‌سازی، میزان فعالیت این آنزیم‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کاهش یافت. در ژنوتیپ‌های بهاره، میزان تغییرات فعالیت این آنزیم‌ها در دوره‌های عادت‌دهی به



شکل ۵- میزان فعالیت آنزیم CAT در شرایط کنترل و عادت‌دهی به سرما در مزرعه (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت، بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) ستون‌های دارای حروف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح یک درصد، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.

plant acclimation in the field environment and during Figure 5. The activity of CAT under controlled after planting and February 18, 120 days after planting, January 19, 90 days (December 20, 60 days after 4011 and 4015. Columns with different letters are NIL and RIL Norstar and Pishtaz parents and planting) in significantly different based on the Duncan test at 1% of probability level

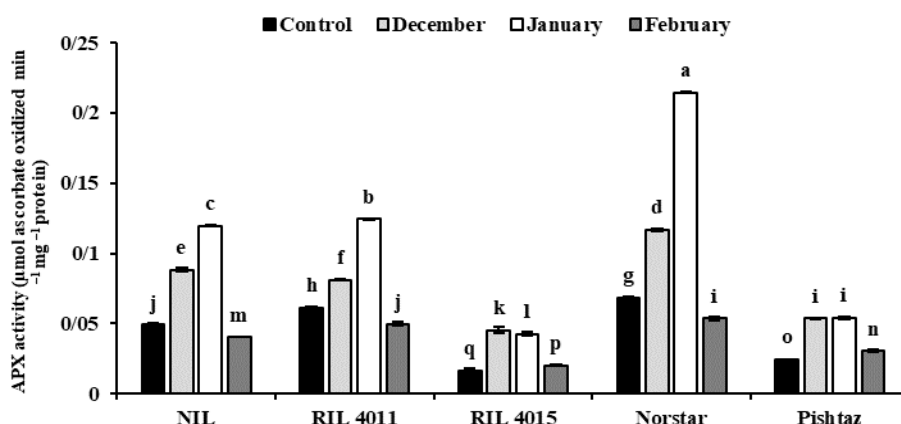
آنزیم کاسته شده است. ژنوتیپ‌های بهاره بدون نیاز - بهاره‌سازی (RIL 4015 و Pishtaz)، به دلیل ورود زود هنگام به مراحل زایشی پیشرفته، از میزان فعالیت آنزیم APX پایین‌تری برخوردار بودند.

تحت تنش شدید، رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-) توسط آنزیم SOD به H_2O_2 تبدیل می‌شوند. SOD تنها آنزیمی است که قادر به پاکسازی O_2^- است، درحالی‌که H_2O_2 می‌تواند مستقیماً توسط CAT یا به کمک احیاگرهای مانند APX، پراکسیدوکسین، GPX و PPO تجزیه شود (Mignolet-Spruyt *et al.*, 2016). با توجه به نتایج این پژوهش (شکل ۷) می‌توان افزایش ظرفیت فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی SOD در دومین دوره عادت‌دهی به سرما را همسو با نتایج دیگر محققین

آنزیم APX نیز در شرایط مواجهه با تنش سرما برای جلوگیری از خسارت‌های اکسیداتیو در گندم و دیگر گیاهان ایفای نقش می‌کند (Apostolova & Yaneva, 2006). در بوته‌های جو عادت داده شده به سرما در مقایسه با گیاهانی که به تنش سرما عادت ندارند، میزان فعالیت این آنزیم بیشتر بوده است (Dai *et al.*, 2009). با توجه به نتایج به‌دست آمده از روند تحمل به سرما در این تحقیق که مشخص کرد بیشترین تحمل را لاین‌ها در دومین دوره عادت‌دهی به سرما کسب کرده‌اند، افزایش فعالیت این آنزیم (شکل ۶) می‌تواند تایید کننده این مطلب باشد که در این دوره، گیاهان نسبت به سرما سازگار شده‌اند و با افزایش دوره عادت‌دهی به سرما، به دلیل ورود ژنوتیپ‌ها به فاز زایشی از میزان فعالیت این

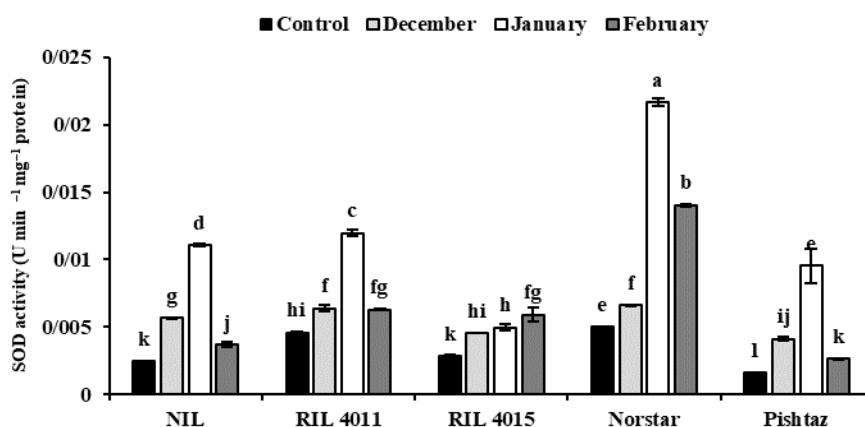
(Davis & Swanson, 2001; Javadian *et al.*, 2010)

که یکی از دلایل تحمل به دمای پایین را حذف موثر
در شرایط تنش سرما عنوان کرده بودند، دانست



شکل ۶- میزان فعالیت آنزیم APX در شرایط کنترل و عادت دهی به سرما در مزرعه (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت، بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) ستون‌های دارای حروف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح یک درصد، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.

Figure 6. The activity of APX under controlled environment and during plant acclimation in the field (December 20, 60 days after planting, January 19, 90 days after planting and February 18, 120 days after planting) in Norstar and Pishtaz parents and NIL and RIL 4011 and 4015. Columns with different letters are significantly different based on the Duncan test at 1% of probability level.



شکل ۷- میزان فعالیت آنزیم SOD در شرایط کنترل و عادت دهی به سرما در مزرعه (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت، بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) ستون‌های دارای حروف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح یک درصد، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.

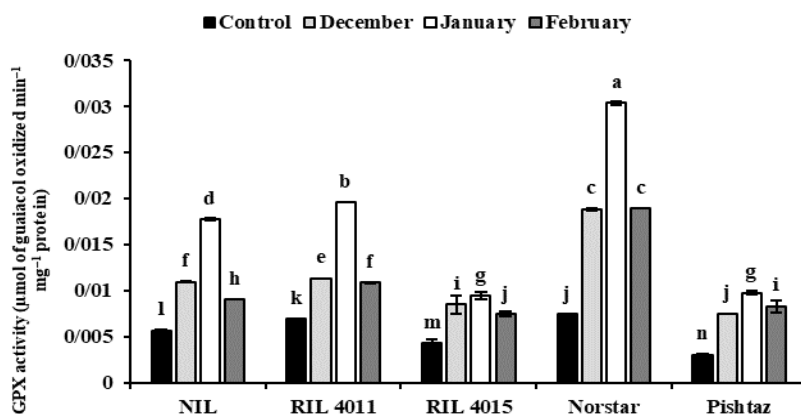
Figure 7. The activity of SOD under controlled environment and during plant acclimation in the field (December 20, 60 days after planting, January 19, 90 days after planting and February 18, 120 days after planting) in Norstar and Pishtaz parents and NIL and RIL 4011 and 4015. Columns with different letters are significantly different based on the Duncan test at 1% of probability level.

تجزیه H_2O_2 اضافی از سایر آنزیم‌های آنتی اکسیدان کمک می‌گیرد. بنابراین یکی از دلایل افزایش فعالیت دیگر آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله GPX، APX و PPO در دومین دوره عادت‌دهی به سرما را می‌توان

اما از طرف دیگر، افزایش فعالیت SOD باعث تولید H_2O_2 بیشتری می‌شود که برای سلول سمی است و سریعاً باید به‌وسیله سیستم دفاع آنتی اکسیدانی به آب و اکسیژن تجزیه شود. برای این منظور، گیاه برای

دفاعی گیاه تحت دمای پایین و نقش مهم آن در پیشگیری از اثرات زیانبار تجمع ROSها عنوان کردند، همخوانی کامل نشان می‌دهد. نتایج تحقیقات این محققین بالاتر بودن میزان فعالیت این آنزیم را در گیاهان سازگار شده نسبت به گیاهان سازگار نشده گزارش کردند (Ortega-García & Perago'n, 2009) که با یافته‌های تحقیقات حاضر مطابقت داشت. همبستگی منفی و معنی‌دار بین میزان فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی و محتوای H_2O_2 نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های دارای نیاز بهاره‌سازی (نورستار، NIL و RIL 4011) نسبت به ژنوتیپ‌های بهاره (پیش‌تاز و RIL 4015) به دلیل توانایی بالا در پاک‌سازی ROSها، در طول دوره‌های عادت‌دهی به سرما کمتر تحت تاثیر تنش اکسیداتیو قرار گرفتند و به دلیل پتانسیل بالای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ظرفیت بسیار بالایی در تحمل به دمای پایین داشتند (جدول ۳).

افزایش فعالیت SOD دانست (Hosseini *et al.*, 2021). کاهش و افزایش فعالیت PPO و GPX در شرایط تنش گزارش شده است (Ortega-García & Perago'n, 2009; Javadian *et al.*, 2010). از آن‌جا که این دو آنزیم تمام وظایف پراکسیدازها از جمله حفاظت در مقابل تنش‌های اکسیداتیو را دارند، یکی از دلایل ایجاد تحمل در نورستار، RIL 4015 و NIL را احتمالاً فعالیت بیشتر این دو آنزیم تشکیل می‌دهد. افزایش و کاهش فعالیت این دو آنزیم می‌تواند به ژنوتیپ گیاه، نوع تنش و کارایی آنزیم در شرایط تنش و عوامل مختلف دیگر بستگی داشته باشد. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ‌های دارای نیاز بهاره‌سازی در دومین دوره عادت‌دهی به سرما، دارای بیشترین میزان فعالیت این دو آنزیم بودند، درحالی‌که این دو آنزیم در والد Pish taz و RIL 4015 دارای فعالیت پایین‌تری بود (شکل ۸، ۹). این نتایج با یافته دیگر محققین که افزایش فعالیت این دو آنزیم را به‌عنوان یک وسیله



شکل ۸- میزان فعالیت آنزیم GPX در شرایط کنترل و عادت‌دهی به سرما در مزرعه (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت، بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) ستون‌های دارای حروف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح یک درصد، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.

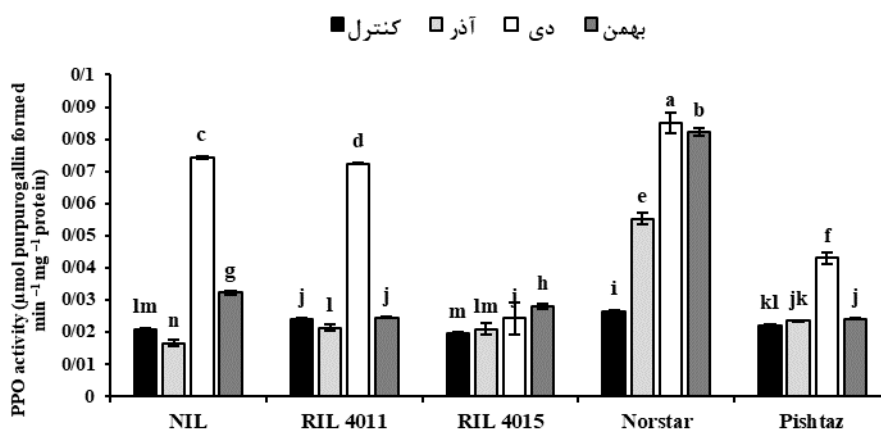
Figure 8. The activity of GPX under controlled environment and during plant acclimation in the field (December 20, 60 days after planting, January 19, 90 days after planting and February 18, 120 days after planting) in Norstar and Pish taz parents and NIL and RIL 4011 and 4015. Columns with different letters are significantly different based on the Duncan test at 1% of probability level.

شرایط کنترل، محتوای قند کل پایین بود و با شروع دوره‌های عادت‌دهی به سرما بر میزان آن افزوده شد. با پیشرفت دوره‌های عادت‌دهی به سرما، با عبور از مرحله رویشی به مرحله زایشی، محتوای قند کل کاهش یافت.

به‌طور کلی بیشترین محتوای قند کل در دومین دوره عادت‌دهی به سرما (۱۲۰ روز پس از کشت مصادف با محدوده اشباع نیاز بهاره‌سازی و حداکثر تحمل به دمای پایین) در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شد. در

بر بیان ژن *COR78* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که در طول پروسه عادت‌دهی به سرما و با اعمال ساکارز، بیان آن به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد (Rekarte-Cowie *et al.*, 2008). در گیاهان مختلف به خصوص غلات، افزایش تحمل به سرما توأم با افزایش محتوای قند گزارش شده است و یکی از دلایل احتمالی خو گرفتن به دمای پایین، افزایش محتوای قند است که منجر به بهبود تنظیم اسمزی سلول می‌شود (Yuanyuan *et al.*, 2009). همسو با یافته محققین قبلی، ی تحمل ژنوتیپ‌ها به دمای پایین در دومین دوره عادت‌دهی به سرما را می‌توان به افزایش محتوای قند کل در این دوره نسبت داد.

بیشترین میزان قند کل در والد نورستار در دومین دوره و کمترین آن در RIL 4015 در شرایط کنترل مشاهده شد (شکل ۱۰). در ژنوتیپ‌های دارد تیپ رشد بهاره با شروع عادت‌دهی به سرما بر میزان قند کل افزوده شد، ولی در مقایسه با ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی، این روند افزایشی با شیب کمتری ادامه پیدا کرد. افزایش محتوای قند تحت تنش‌های محیطی از جمله سرما، گزارش شده است (Janmohammadi *et al.*, 2012). ساکارز و دیگر قندها، نقش مهمی را به‌عنوان مولکول‌های سیگنال دهنده جهت تنظیم رشد و نمو، واکنش‌های فیزیولوژیکی و متابولیسمی گیاهان ایفا می‌کنند (Arroyo *et al.*, 2003). نقش تنظیمی ساکارز در پروسه عادت‌دهی به سرما در آرابیدوپسیس با تاثیر آن

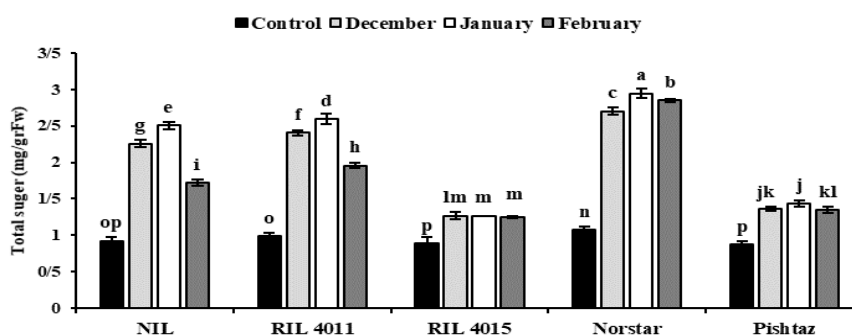


شکل ۹- میزان فعالیت آنزیم PPO در شرایط کنترل و عادت‌دهی به سرما در مزرعه (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت، بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) ستون‌های دارای حروف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح یک درصد، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.

Figure 9. The activity of PPO under controlled environment and during plant acclimation in the field (December 20, 60 days after planting, January 19, 90 days after planting and February 18, 120 days after planting) in Norstar and Pishtaz parents and NIL and RIL 4011 and 4015. Columns with different letters are significantly different based on the Duncan test at 1% of probability level.

قند بیشتر را شاخصی در تحمل بیشتر گیاهان به دمای پایین بیان نمودند. در پژوهش حاضر، آنالیز همبستگی نشان داد که بین محتوای قند و LT_{50} همبستگی مثبت و معنی‌دار وجود داشت. همسو با این نتایج، دیگر محققین همبستگی بالای محتوای قند با میزان تحمل به سرما را به دلیل نقش حفاظتی کربوهیدرات‌ها از دهیدراسیون پروتئین‌ها و حفاظت از غشای پلاسمایی در ارقام زمستانه گندم، گزارش کردند (Sasaki *et al.*, 2001; Janmohammadi *et al.*, 2012).

همانطور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود، میزان تجمع قند کل در والد Norstar، NIL و RIL 4011 نسبت به والد Pishtaz و RIL 4015 در دوره‌های عادت‌دهی به سرما بیشتر بوده است. یکی از دلایل تفاوت این دو گروه در میزان تحمل به سرما توانایی متفاوت آن‌ها در تجمع قند کل است (Galiba *et al.*, 1997; Javadian *et al.*, 2010). بسیاری از محققین به وجود همبستگی مثبت بین محتوای قند و میزان تحمل به تنش‌های محیطی در غلات اشاره کردند (Dionne *et al.*, 2001) و محتوای



شکل ۱۰- محتوای قند کل در شرایط کنترل و عادت دهی به سرما در مزرعه (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت، بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت) ستون‌های دارای حروف متفاوت، بر اساس آزمون دانکن و در سطح یک درصد، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.

Figure 10. Total sugar Content under controlled environment and during plant acclimation in the field (December 20. 60 days after planting, January 19. 90 days after planting and February 18. 120 days after planting) in Norstar and Pish taz parents and NIL and RIL 4011 and 4015. Columns with different letters are significantly different based on the Duncan test at 1% of probability level.

جدول ۳- ضریب همبستگی پیرسون بین میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، APX، SOD، GPX، PPO و محتوای قند کل، H_2O_2 و LT_{50} (علامت LT_{50} مثبت در نظر گرفته شده است) تحت شرایط کنترل و دوره‌های عادت‌دهی به سرما (آذر (دسامبر) ماه، ۶۰ روز پس از کشت، دی (ژانویه) ماه، ۹۰ روز پس از کشت و بهمن (فوریه) ماه، ۱۲۰ روز پس از کشت).

Table 3. Pearson's correlation coefficients among LT_{50} , H_2O_2 and total sugar content, activities of SOD, plant acclimation in the field environment and during PPO under controlled CAT, APX, GPX and after nlaning and February 18. 120 days after planting, January 19. 90 days (December 20. 60 days after 4011 and 4015. Columns with different letters are NIL and RIL Norstar and Pish taz parents and planting) in significantly different based on the Duncan test at 1% of probability level

Traits	CAT	APX	GPX	SOD	PPO	H_2O_2	Total Sugar
APX	0.86**						
GPX	0.86**	0.91**					
SOD	0.83**	0.79**	0.91**				
PPO	0.80**	0.68**	0.88**	0.87**			
H_2O_2	-0.54*	-0.64**	-0.62*	-0.58*	-0.57*		
Total Sugar	0.78**	0.77**	0.86**	0.72**	0.75**	-0.61*	
LT_{50}	0.55*	0.69**	0.82**	0.77**	0.73**	-0.56*	0.59*

* و **: اختلاف معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد..

* and **: Significantly different at 5% and 1% of probability levels.

بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در همه ژنوتیپ‌ها مشابه و در دی ماه نسبت به شرایط کنترل افزایش یافت. والد نورستار، NIL و RIL 4011 نسبت به RIL 4015 و والد پیشتاز (دارای عادت رشد بهاره) دارای میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بیشتری بودند و در مدت زمان بیشتری آن را حفظ کردند. محتوای قند کل نیز دارای روند مشابهی بود، با این تفاوت که با انتقال از مرحله رویشی به مرحله زایشی، به میزان کمتری کاهش یافت. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی با LT_{50} همبستگی مثبت و معنی‌دار و با محتوای H_2O_2 همبستگی منفی و معنی‌داری داشت.

به‌نظر می‌رسد که صفات نمودی نظیر نیاز بهاره‌سازی و تاخیر در نمو فنولوژیکی از طریق تاثیر بر طول دوره

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی در دوره‌های عادت‌دهی به سرما، نمود فنولوژیکی خود را کاهش دادند و بیشترین میزان تحمل به سرما در نقطه اشباع نیاز بهاره‌سازی در دومین دوره عادت‌دهی به سرما (۱۲۰ روز پس از کشت) به‌دست آمد. روند تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، محتوای پرولین و قند کل تحت شرایط کنترل و دوره‌های عادت‌دهی به سرما، روند تقریباً مشابهی داشت. با شروع دوره‌های عادت‌دهی به سرما در همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، فعالیت آنزیم‌های CAT، APX، GPX، PPO و SOD، افزایش یافت و در نقطه اشباع، نیاز بهاره‌سازی به حداکثر رسید و با انتقال به مرحله زایشی کاهش یافت (مشاهده حلقه‌های مضاعف). روند تغییرات

در طول دوره‌های عادت‌دهی به سرما انباشت می‌کنند. تفاوت ژنوتیپ‌های متحمل با حساس، در میزان و مدت زمان انباشت متابولیت‌های بیوشیمیایی است، به طوری که در ژنوتیپ‌های متحمل، مدت زمان انباشت مواد محافظت کننده به دلیل تاثیر صفات نمودی طولانی‌تر است. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، در برنامه‌های اصلاحی گندم برای اقلیم های سرد و یا سرد معتدل می‌توان از تغییرات فنولوژیکی، چرخه رشد و صفات مرتبط با تحمل به سرما از جمله میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، APX، GPX، SOD، PPO و همچنین محتوای قند کل به عنوان شاخص‌های بالقوه برای انتخاب بهتر ژنوتیپ‌های متحمل به سرما استفاده کرد.

رویشی بر مدت زمان تحمل به سرما تأثیر می‌گذارند و به همراه زمینه ژنتیکی، باعث تغییر میزان تحمل به سرما می‌شوند. تکمیل نیاز بهاره‌سازی و انتقال از مرحله رویشی به زایشی، نقطه عطفی در بیان تحمل به سرما است که بعد از تکمیل نیاز بهاره‌سازی، باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان تحمل به سرما می‌شود. تغییرات عمده فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی مهم در طول دوره‌های عادت‌دهی به سرما، زمینه مناسبی را برای مطالعه متابولیت‌های بیوشیمیایی فراهم می‌کند و این تغییرات می‌تواند در برنامه‌های انتخاب رقم برای تحمل به سرما مد نظر قرار گیرد. ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به سرما با وجود تفاوت بسیار زیاد از نظر میزان تحمل به سرما، مواد محافظت کننده مشابهی

REFERENCES

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *In Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
2. Apostolova, P., Yaneva, I., Apostolova, P. & Yaneva, I. (2006). Antioxidative defence in winter wheat plants during early cold acclimation. *Plant Physiology*, 101-108.
3. Apostolova, P., Yordanova, R. & Popova, L. (2008). Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars. *General and Applied Plant Physiology*, 34, 281-294.
4. Arroyo, A., Bossi, F., Finkelstein R. R. & León, P. (2003). Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133, 231-242.
5. Bond, D. M., Dennis, E. S. & Finnegan, E. J. (2011). The low temperature response pathways for cold acclimation and vernalization are independent. *Plant, Cell & Environment*, 34, 1737-1748.
6. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
7. Cakmak, T. & Atici, Ö. (2009). Effects of putrescine and low temperature on the apoplasmic antioxidant enzymes in the leaves of two wheat cultivars. *Plant Soil Environment*, 55, 320-326.
8. Chance, B. & Maehly, A. C. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases. 2, 764-775.
9. Czarnocka, W. & Karpiński, S. (2018). Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 4-20.
10. Dai, F., Huang, Y., Zhou, M. & Zhang, G. (2009). The influence of cold acclimation on antioxidative enzymes and antioxidants in sensitive and tolerant barley cultivars. *Biologia Plantarum*, 53, 257-262.
11. Das, K. & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 2-53.
12. Davis, D. G. & Swanson, H. R. (2001). Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 46, 95-108.
13. Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. & Thorpe T. A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32, 93-101.
14. Dionne, J., Castonguay, Y., Nadeau, P. & Desjardind, Y. (2001). Freezing tolerance and carbohydrate changes during cold acclimation of green-type annual Bluegrass (*Poa annual*L.) ecotypes. *Crop Science*, 41, 443-451.
15. Fowler, D. B. & Limin, A. E. (2004). Interactions among factors regulating phenological development and acclimation rate determine low-temperature tolerance in wheat. *Annals of Botany*, 94, 717-724.
16. Galiba, G., Kerepesi, I., Snape, J. W. & Sutka, J. (1997). Location of a gene regulating cold-induced carbohydrate production on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 265-270.
17. Ghasemi-Mobtaker, H., Kaab, A. & Rafiee, S. (2020). Application of life cycle analysis to assess environmental sustainability of wheat cultivation in the west of Iran. *Energy*, 193, 116-768.
18. Hosseini, M. & Saidi, A. (2019). Phylogenetic and structural study of plant Polyamine Oxidases. *Journal of Crop Biotechnology*, 23, 19-36. (In Persian)

19. Hosseini, M., Maali-Amiri, R., Mahfoozi, S., Fowler, D. B. & Mohammadi, R. (2016). Developmental regulation of metabolites and low temperature tolerance in lines of crosses between spring and winter wheat. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 4-87.
20. Hosseini, M., Saidi, A., Maali-Amiri, R., Abbasi, A. & Khosravi-Nejad, F. (2021). Developmental regulation and metabolic changes of RILs of crosses between spring and winter wheat during low temperature acclimation. *Environmental and Experimental Botany*, 182, 104-299.
21. Janda, T., Szalai, G., Leskó, K., Yordanova, R., Apostol, S. & Popova, L. P. (2007). Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. *Phytochemistry*, 68, 1674-1682.
22. Janmohammadi, M., Zolla, L. & Rinalducci, S. (2015). Low temperature tolerance in plants: changes at the protein level. *Phytochemistry*, 117, 76-89.
23. Janská, A., Maršík, P., Zelenková, S. & Ovesná, J. (2010). Cold stress and acclimation—what is important for metabolic adjustment. *Plant Biology*, 12, 395-405.
24. Javadian, N., Karimzadeh, G., Mahfoozi, S. & Ghanati, F. (2010). Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57, 540-547.
25. Ji, H., Xiao, L., Xia, Y., Song, H., Liu, B., Tang, L., Cao, W., Zhu, Y. & Liu, L. (2017). Effects of jointing and booting low temperature stresses on grain yield and yield components in wheat. *Agricultural and Forest Meteorology*, 243, 33-42.
26. Kar, M. & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57, 315-319.
27. Loreto, F., Velikova, V. (2001). Isoprene production by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 127, 1781-1787.
28. Mahfoozi, S., Limin, A. E. & Fowler, D. B. (2001). Developmental regulation of low-temperature tolerance in winter wheat. *Annals of Botany*, 87, 751-757.
29. Mahfoozi, S., Limin, A. E., Ahakpaz, F. & Fowler, D. B. (2006). Phenological development and expression of freezing resistance in spring and winter wheat under field conditions in north-west Iran. *Field crops Research*, 97, 182-187.
30. Mecozzi, M. (2005). Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 79, 84-90.
31. Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoeberichts, F. A., Mühlenbock, P., Brosché, M., Van Breusegem, F. & Kangasjärvi, J. (2016). Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 67, 3831-3844.
32. Nazari, M., Amiri, R. M., Mehraban, F. H. & Khaneghah, H. Z. (2012). Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59, 183-189.
33. Ortega-García, F. & Peragón, J. (2009). Phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, and phenol concentration in fruits of *Olea europaea* L. cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10331-10340.
34. Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali-Sodi, A. & Soldatini, G. F. (2003). Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany*, 54, 2529-2540.
35. Rekarte-Cowie, I., Ebshish, O. S., Mohamed, K. S. & Pearce, R. S. (2008). Sucrose helps regulate cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 59, 4205-4217.
36. Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A. & Hayat, S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 54-61.
37. Sasaki, H., Ichimura, K., Imada, S. & Yamaki, S. (2001). Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 158, 847-852.
38. Shen, Y., Li, J., Gu, R., Yue, L., Wang, H., Zhan, X. & Xing, B. (2018). Carotenoid and superoxide dismutase are the most effective antioxidants participating in ROS scavenging in phenanthrene accumulated wheat leaf. *Chemosphere*, 197, 513-525.
39. Solanke, A. U. & Sharma, A. K. (2008). Signal transduction during cold stress in plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14, 69-79.