

بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی القایی در لاین‌های حاصل از تلاقی گندم زمستانه و بهاره تحت دوره‌های سرمادهی

سعیده مرتجائی، رضا معالی امیری*، حسن زینالی خانقاه،

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. کرج. ایران.
۲. نویسنده مسئول، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. کرج. ایران. رایانامه: rmamiri@ut.ac.ir
۳. گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. کرج. ایران.

چکیده

سرما یکی از عوامل محیطی مهم دخیل در بقا، رشد و تولید غلات است. در این پژوهش صفات مرتبط با تحمل سرما در لاین‌های حاصل از تلاقی گندم نورستار (متحمل به سرما) و پیشتاز (حساس به سرما) در مرحله رویشی (آذر ماه، دی و بهمن ماه در شرایط مزرعه ارزیابی شدند. والد زمستانه نورستار و لاین‌های ۴۰۰۵ و ۴۰۰۳ بیشترین درجه تحمل (به ترتیب ۲۲-، ۲۰- و ۱۸- سانتی‌گراد) بر حسب دمای ۵۰ درصد کشندگی (LT_{50}) را در دی ماه نشان دادند. کاهش تحمل به سرما همزمان با شروع فاز زایشی در بهمن ماه در همه ژنوتیپ‌ها مشاهده شد. شاخص‌های خسارت H_2O_2 و MDA در لاین‌های زمستانه کمتر از لاین‌های بهاره بود. محتوی H_2O_2 در والد نورستار و لاین‌های ۴۰۰۳ و ۴۰۰۵ در طول دوره‌های عادت‌دهی به سرما پایین بود اما با انتقال از مرحله رویشی به مرحله زایشی افزایش یافت. بالا بودن میزان MDA در بهمن ماه به ویژه در ژنوتیپ‌های بهاره نشان دهنده حضور تنش اکسیداتیو و MDA بود. فعالیت ژنهای استیل کوانزیم آ کرپوکسیلاز و $Al2$ دساتوراز با تداوم دوره عادت‌دهی به سرما افزایش یافت به طوری که بیشترین افزایش‌ها در لاین‌های زمستانه و در دی ماه مشاهده شد. بنابراین ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی با تنظیم صفات مرتبط با تحمل به سرما در مرحله رویشی از تحمل بالاتری به سرما برخوردار هستند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تنش اکسیداتیو، دساتوراز، گندم، عادت‌دهی به دمای پایین

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) مهم‌ترین محصول زراعی دنیا است که حدود ۲۲ درصد از اراضی قابل کشت دنیا را به خود اختصاص داده و نقش اساسی در امنیت غذایی جمعیت بشری دارد. بررسی مصرف سرانه در ایران نشان می‌دهد که حدود ۲۵ درصد مواد غذایی مردم ایران حاوی محصولات مشتق شده از گندم است (Alipour et al., 2017). پژوهش‌ها نشان داده که جمعیت دنیا تا سال ۲۰۵۰ به بیش از ۸ میلیارد نفر خواهد رسید به طوری که تقاضا برای محصولات کشاورزی از جمله گندم افزایش یافته، لذا همگام با افزایش جمعیت، تولید این محصول هم از طریق توسعه سطح کشت و هم از طریق بهبود عملکرد در واحد سطح، باید افزایش یابد (Ghasemi et al., 2013; Alipour et al., 2017; Cheli et al., 2017; Hosseini et al., 2021). چالش افزایش جمعیت همچنین با تغییرات آب و هوایی کره زمین نیز همراه شده که پتانسیل وقوع نوسانات دمایی شامل سرمای زودرس پاییزه، سرمای شدید زمستان و یا سرمای دیررس بهاره ایجاد می‌کند. به‌طور تقریبی ۶۶ درصد از اراضی تحت کشت گندم ایران در مناطق معتدل سرد واقع شده به طوری که سالانه خسارت‌های زیادی بر میزان عملکرد گندم در ایران وارد می‌کند (Mahfoofi et al., 2019).

تحت تنش سرما، معمولاً گیاهچه‌های جوان گندم در معرض خسارت سرما، بادهای شدید، یخ‌زدگی اندام هوایی و یخ‌زدگی خاک قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر اگرچه تغییرات آب و هوایی سبب گرم شدن زمین شده، اما نوسانات دمایی شدیدی در پاییز و زمستان و یا در اوایل بهار ایجاد می‌کند که خسارت‌های بیشتری را بر سلول‌های گیاهی حتی گیاهان زمستان‌گذران در پی داشته است (Samsami and Maali-Amiri, 2024)، وضعیتی که چالش مهم در توسعه کشت گیاهان نیز محسوب می‌شود. تنش سرما سبب

اختلال در مجموعه وسیعی از تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی می‌شود. در مقابله با تنش سرما، غلات زمستانه از دو راهبرد ویژه پاسخ بهاره‌سازی^۱ و سازگاری^۲ بهره گرفته به طوری که با فعالیت این دو راهبرد، توسعه تحمل به سرما^۳ و یخزدگی^۴ (زیر صفر درجه) انجام می‌شود (Hosseini *et al.*, 2016; Hosseini *et al.*, 2021). نیاز بهاره‌سازی گندم با تنظیم زمان انتقال از فاز رویشی به فاز زایشی از آسیب غلات بر اثر سرمای زمستان جلوگیری می‌کند (Mahfoofi *et al.*, 2001; Waalen *et al.*, 2014). نکته جالب آن است که تحت تنش سرما، اگر گندم انتقال از مرحله رویشی به زایشی را مدیریت کند، ظرفیت سازگاری به سرما نیز در آن افزایش یافته و بدین ترتیب میزان مطلوب عملکرد نیز قابل انتظار خواهد بود (Feng *et al.*, 2016; Shourbalal *et al.*, 2019).

از لحاظ بیولوژیکی، سازگاری به سرما شامل تغییرات متعدد در بیان ژن، متابولیسم، فیزیولوژی و مورفولوژی بوده که این تغییرات شامل افزایش یا کاهش بیان ژن‌ها، کاهش یا توقف رشد، تجمع اسید آسزیک، تغییر در ترکیب لیپیدهای غشاء، تغییر در ترکیب محلول‌های سازگار و افزایش آنتی‌اکسیدانت‌های سلولی از جمله آنزیمی و غیر آنزیمی است. این تغییرات، به طور مستقیم در تحمل به تنش درگیر بوده و بنابراین به عنوان عناصر فعال در تحمل به تنش‌های محیطی به خصوص تنش سرما محسوب می‌شوند (Kazemi Shahandashti & Maali-Amiri, 2018). بنابراین در بسیاری از موارد ارتباط منطقی بین تغییرات در سطح مولکولی با تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی وجود دارد. تنش سرما اغلب دو اثر مستقیم و غیر مستقیم بر سلول‌های گیاهی ایجاد می‌کند: تاثیر مستقیم آن اغلب بر ساختارهای غشایی از آن جمله غشای پلاسمایی است که به عنوان اولین سد دفاعی سلول در مقابله با تغییرات محیطی عمل می‌کند (Los & Murata, 2004; Heidarvand *et al.*, 2011). تنش سرما سبب تجمع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) از جمله پراکسید هیدروژن (H₂O₂) در سلول‌ها شده که منجر به القای تنش اکسیداتیو می‌شود. ROS باعث اختلال در واکنش‌های انتقال الکترون، خسارت به لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و دیگر واکنش‌های بیوشیمیایی اساسی سلول می‌شوند. بنابراین شکل‌گیری ROS منجر به آسیب سلولی شده و نهایتاً مرگ گیاه را بدنبال خواهد داشت. فرایند عادت‌دهی به سرما منجر به القای پاسخ‌های دفاعی سلول و پاکسازی ROS از طریق آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و پلی فنول اکسیداز (PPO) می‌شود و متعاقباً آسیب اکسیداتیو القا شده توسط تنش سرما در گیاهان را کاهش می‌دهد (Kazemi-Shahandashti *et al.*, 2014; Caverzan *et al.*, 2016). بنابراین بررسی عوامل ایجاد اکسیداسیون سلولی و همچنین پاکسازی آن‌ها می‌تواند به عنوان نشانگر بیوشیمیایی به ترتیب در برآورد خسارت و دفاع سلول در اثر تنش سرما مفید باشد. همچنین گیاهان با قرار گرفتن در شرایط تنش سرما مستعد خسارت از دیگر عوامل محیطی زیستی و غیر زیستی نیز هستند (Janská *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2018; Hosseini & Saidi, 2019).

مطالعات نشان داده که تجمع نسبی ROS همچنین در مسیر پیام‌رسانی سلولی نیز مشارکت دارد و نکته جالب آن است که این وضعیت هم در اثر مستقیم و هم در اثر غیر مستقیم سرما مشاهده شده است (Gill & Tuteja, 2010; Amini *et al.*, 2021). تحت تنش سرما ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی چربی‌های غشای پلاسمایی تغییر می‌کند و این تغییرات اثر مشابهی در بیان ژن‌های موثر در سازگاری به سرما دارد. وضعیت فیزیکی چربی‌های غشایی به طور مستقیم در تنظیم فعالیت پروتئین‌های متصل به غشا از جمله ناقلین مولکول‌های کوچک، کانال‌های یونی، پروتئین کینازهای گیرنده و پروتئین‌های حسگر نقش دارد. به نظر می‌رسد سلول،

^۱Vernalization

^۲Acclimation

^۳Cold tolerance

^۴Freezing

^۵Reactive oxygen species

^۶Superoxide dismutase

^۷Catalase

^۸Guaiacol peroxidase

^۹Polyphenol oxidase

تنش سرما را از طریق پروتئین‌های موجود در غشا درک کرده و از طریق آنها پیام‌ها را از محیط به شبکه‌های انتقال پیام و هسته می‌رساند. عادت‌دهی به سرما تحت کنترل دقیق ژنتیکی بوده و با به راه انداختن برنامه‌های تنظیمی بسیار پیچیده منجر به تنظیم فاکتورهای رونویسی، تنظیم مجدد بیان ژن‌های مرتبط با تنش و سازماندهی مجدد گسترده ترانسکریپتوم می‌شود (Wu *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2016). سهم لیپیدهای غشایی به خصوص اسیدهای چرب غیر اشباع جهت تحمل به سرما در گیاهان در تحقیقات مورد بحث قرار گرفته است. تحت تنش سرما چربی‌هایی که حاوی پیوند دوگانه در اسیدهای چرب هستند، سیالیت غشایی خود را حفظ می‌کنند به طوری که در شرایط طبیعی با کاهش پی در پی دمای محیط، سیالیت غشا به تدریج کاهش یافته و بدین ترتیب در هموستازی سلولی و بقا سلول گیاه ایفای نقش می‌کنند. نقش اصلی را در این مسیر ژن‌های دساتوراز^۱ ایفا می‌کند که پیوندهای دوگانه را به زنجیره لیپیدی اسیدهای چرب اضافه می‌کنند (Nishida & Murata, 1996; Kazemi Shahandashti *et al.*, 2014). این ژن‌ها با افزایش میزان غیراشباعی چربی‌ها در ساختار غشا، از غیرفعال شدن آن جلوگیری می‌کند (Maali-Amiri *et al.*, 2010).

برخی برنامه‌های به‌نژادی گندم برای تحمل به تنش‌های محیطی شامل بهبود تحمل به سرما از طریق معرفی صفات دخیل در سازگاری ارقام تجاری می‌باشد که ممکن است این صفات از طریق لاین‌های نوترکیب^۲ (RILs) شناسایی شوند (Sun *et al.*, 2018). در این برنامه به‌نژادی به دلیل استفاده از لاین‌های مختلف، RILها در هر دو جهت ویژگی‌های والدی (والد متحمل و حساس به تنش سرما) توسعه یافته، به طوری که پاسخ‌های فنوتیپی و ژنتیکی به سرما به تدریج از حساس به متحمل تغییر می‌کند. بنابراین گندم زمستانه را می‌توان با گندم‌های بهاره و بینابین^۳ در یک شرایط محیطی به ویژه در مزرعه مقایسه کرد (Hosseini *et al.*, 2023). بررسی شبکه‌های تنظیم متابولیک درگیر در بهاره‌سازی فرآیند و فرصتی ارزشمند برای شناسایی برخی از مکانیسم‌های درگیر در فرآیند تحمل به تنش سرما می‌باشد. در مطالعه حاضر رقم گندم بهاره پیش‌تاز، رقم زمستانه نورستار، لاین‌های نوترکیب خالص حاصل از تلاقی آن‌ها که دارای نیاز بهاره‌سازی و میزان تحمل به سرمای متفاوت بودند، جهت مطالعه ارتباط بین میزان تحمل به سرما، تجمع H₂O₂ و میزان بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های دساتوراز بررسی شد. درک ارتباط بین فرایندهای دخیل در تحمل به سرما، تضمین کننده پایداری عملکرد گندم و افزایش سطح زیر کشت گندم در مناطق سرد کشور است.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت و نمونه برداری

در این پژوهش مواد گیاهی مورد مطالعه شامل هفت ژنوتیپ گندم نان به ترتیب شامل رقم والد پیش‌تاز (رقم گندم ایرانی با عادت رشد بدون نیاز بهاره‌سازی و حساس به سرما)، رقم والد نورستار (رقم زمستانه کانادایی با نیاز بهاره‌سازی طولانی و بسیار متحمل به سرما) و پنج لاین نوترکیب خالص (RIL) (شامل L1 تا L5) نسل هفت حاصل از کراس ساده بین والدین با نیاز بهاره‌سازی بسیار متفاوت و متنوع از نظر زمان انتقال از مرحله رویشی به زایشی بود. برنامه اصلاح گندم شامل بهبود تحمل به تنش سرما از طریق معرفی صفات دخیل در سازگاری به ژرم‌پلاسماهای تجاری است. چنین صفاتی ممکن است از طریق RILها شناسایی شوند. همه این ژنوتیپ‌ها در شرایط مزرعه در اقلیم معتدل سرد (کرج) به مدت یک سال زراعی در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۷ به صورت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار ارزیابی شدند. مطابق با داده‌های هواشناسی حداقل دما در زمستان در بهمن ماه ۱۲- درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Hosseini *et al.*, 2021). ژنوتیپ‌ها در مزرعه دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی کرج با مشخصات جغرافیایی ۵۱ درجه طول شرقی و ۳۵ درجه عرض جغرافیایی و با ارتفاع ۱۳۲۱ متر از سطح دریا 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. در سه مرحله عادت‌دهی به سرما به ترتیب آذر ماه (۶۰ روز پس از کشت یا ماه دسامبر)، دی ماه (۹۰ روز پس از کشت یا ماه ژانویه) و بهمن ماه (۱۲۰ روز پس از کشت یا ماه فوریه) نمونه برداری انجام شد. همه این ژنوتیپ‌ها همچنین

^۱Desaturase

^۲Recombinant inbred line

^۳Facultative

در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با نور ۲۰۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه و ۱۶ ساعت روشنایی به عنوان شاهد در شرایط اتافک رشد کشت شدند و در مرحله چهار برگی از آن‌ها نمونه‌برداری انجام شد. تمام نمونه در نیتروژن مایع فریز و سپس در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ارزیابی درجه تحمل به انجماد (آزمون انجماد)

جهت تعیین قابلیت تحمل به انجماد از روش تعیین دمای ۵۰ درصد کشندگی (LT_{50}) استفاده شد. از هر تکرار و هر رقم، تعداد ۵ بوته از مزرعه جمع‌آوری، سپس طوقه گیاه (یک سانتی‌متری بالا 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. سپس دمای فریزر یک درجه سانتی‌گراد هر ۳۰ دقیقه کاهش یافت و این کاهش تا دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد ادامه داشت. در موعد هر دمای مشخص، نمونه‌های مزبور از فریزر خارج شده و پس از استقرار ۱۲ ساعته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت ذوب تدریجی بافت یخ‌زده، نمونه‌ها به شرایط کنترل منتقل شدند و در بستری با بافت سبک کشت شد. پس از سه هفته، بر اساس ارزیابی سیستم ریشه‌ای و هوایی زنده و فعال، تعداد بوته‌های مرده و زنده ثبت شده و بر این اساس میزان LT_{50} و تحمل سرما تعیین شد (Mahfoozi *et al.*, 2001).

سنجش میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

مقدار ۳۵۰ میلی‌گرم نمونه برگی پس از اضافه کردن نیتروژن مایع در هاون چینی به خوبی سائیده شد و به فالكون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت. پنج میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید یک درصد (محلول در حمام یخ) به فالكون اضافه شد و تا یکنواخت‌سازی نمونه‌ها در حمام یخ قرار داده شد. فالكون حاوی نمونه یکنواخت شده به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ °C با سرعت $g \times 12000$ سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به یک فالكون جدید حاوی یک میلی‌لیتر محلول یک مولار یدید پتاسیم و ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار افزوده شد و پس از چند بار وارونه کردن فالكون در محیط تاریک برای یکنواخت نمودن محتوی آن، مقدار جذب هر نمونه در طول موج ۳۹۰ nm توسط دستگاه پلیت ریدر (model EON, Biotek company, USA) اندازه‌گیری شد (Loreto & Velikova, 2001). نتایج بصورت میکرومول در گرم وزن تر گیاه بیان شد.

سنجش میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشاء (MDA)

میزان اکسیداسیون ژنوتیپ‌ها گندم در انتهای دوره‌های عادت‌دهی به LT بر اساس تجمع MDA از واکنش رنگ با تیوباربتوریک اسید (TBA) و اندازه‌گیری چگالی نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Shimadzu UV160 ساخت کشور ژاپن تعیین شد. چگالی نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد. محتوی MDA بر اساس فرمول $C = \frac{D}{E}$ محاسبه شد که در آن D چگالی و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر $1/56 \times 10^5$) است (Maali-Amiri *et al.*, 2007).

استخراج RNA، سنتز cDNA و واکنش QRT-PCR

استخراج RNA به کمک کیت تهیه شده از شرکت دنا زیست با ۸۰ میلی‌گرم نمونه برگ فریز شده به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل انجام گرفت. تشکیل دو نوار RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۵S بر روی ژل کیفیت بالای RNA تخلیص شده را تایید کرد. برای بررسی کمی میزان غلظت RNA از دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتر (Thermo Scientific model, 1000) در طول موج ۲۶۰ nm استفاده شد.

¹Lethal temperature (LT_{50})

²Malondialdehyde

³ Complementary DNA

⁴ Quantitative reverse transcriptase PCR

⁵ Nanodrop spectrophotometer

RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI تیمار شد. دو میکروگرم RNA، یک میکرولیتر بافر، یک واحد (u) آنزیم DNaseI و ۱۰ واحد (u) آنزیم RNase inhibitor، مخلوط و با افزودن آب DEPC^۱ حجم محلول به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. سپس یک میکرولیتر EDTA به تیوبها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار داده شدند. تیوبها در ۸۰°C- نگه‌داری شدند.

جهت ساخت cDNA، پنج میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase با کمک آغازگر الیگو دی تی (یک پیکومول) (۲۰-۱۸ نوکلئوتید) مخلوط شد و حجم محلول با استفاده از آب DEPC به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفت و پس از آن روی یخ سرد شد. سپس چهار میکرولیتر بافر واکنش و دو میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتری فسفات (dNTPs) با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhibitor به هر تیوب اضافه شد و حجم محلول با آب DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. پس از آن ۲۰۰ واحد (u) آنزیم- Revert Aid M- Mulv به این محلول افزوده شده و پس از مخلوط کردن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲°C قرار داده شد. سپس برای غیرفعال کردن واکنش، تیوبها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰°C قرار گرفتند. ۱۱۴۵ نانوگرم در میکرو لیتر RNA برای سنتز cDNA استفاده شد.

۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر کیت حاوی رنگ فلورسنت شرکت پارس توس، سه میکرولیتر آب مقطر استریل، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس با غلظت ۱۰ میکرومول و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA سنتز شده با غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میکرو لیتر (رقیق شده با نسبت ۱:۲۰) بررسی شد. برای هر واکنش دو تکرار زیستی و دو تکرار تکنیکی استفاده شد. پس از آماده کردن مخلوط واکنش، پلیت موردنظر به دستگاه iQ5 منتقل شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به این صورت انجام گرفت: ۲ دقیقه در دمای ۹۴°C و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵°C، ۱۰ ثانیه در دمای ۵۷°C آغازگر و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲°C. نسبت بیان نسبی هر توالی با توجه به شاخص Cq محاسبه شده که میانگین کارایی PCR ژن‌های خانه‌دار مورد نظر در پلیت را در بر می‌گیرد. با توجه به نتایج منحنی‌های استاندارد، از نرم‌افزار REST^۲ می‌توان برای محاسبه نسبت بین میزان ژن هدف و ژن خانه‌دار (*Actin1*) در هر نمونه مشخص با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ بعنوان بیان نسبی آن ژن استفاده کرد (Livak & Schmittgen, 2001) در این روش بیان ژن مورد نظر با بیان ژن *Actin1* که یک ژن خانه‌دار تنظیم شده است نرمال شده و سپس از مقادیر نرمال شده برای مقایسه بیان متفاوت ژن‌ها در نمونه‌های مختلف استفاده شد. طراحی آغازگر برای ژن خانه‌دار *Actin1* با استفاده از تارنمای Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) به آدرس (<https://www.idtdna.com>) برای دستیابی به آغازگرهای دارای خصوصیات مناسب انجام گرفت. در جدول ۱ نام آغازگرهای ژن‌های اختصاصی و خانه‌دار، توالی و شماره دسترسی آنها ارائه شده است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر *qRT-PCR* ژن‌های استیل کوانزیم آ کربوکسیلاز، دلتا دساتوراز و اکتین تحت دوره‌های عادت‌دهی به سرما در والد نورستار و پیش‌تاز و لاین‌های حاصل از تلاقی آنها.

| Genes | Accession number | Primer pair sequences (5'-3') | Expected amplicon size (bp) |
|------------------------------|------------------|---|-----------------------------|
| <i>Acety CoA carboxylase</i> | XM_044474138.1 | TGCTAAGGCTGTGGGTTATG TACCTGCAACCGTGGATTAAG | 103 |
| <i>Δ12 desaturase</i> | XM_044475360.1 | CAGACATCACGCCAAGACAA GCAAAGACACACGCCAAACT | 228 |
| <i>Actin1</i> | AB181991.1 | AAGAGTCGGTGAAGGGGACT TTCATACAGCAGGCAAGCAC | 98 |

¹ Diethyl pyrocarbonate

² Deoxynucleotide triphosphates

³ Annealing temperature

⁴ Representational state transfer software

تجزیه داده‌ها

این مطالعه بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار زیستی برای آزمایش‌های بخش فیزیولوژی و دو تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی برای آزمایش‌های بخش بیان نسبی ژن انجام شد و آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن ($P < 0.01$) با نرم افزار SAS 9.4 انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ارقام، سطوح تیماری و اثر متقابل آن‌ها از لحاظ میزان MDA، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. تحت شرایط مزرعه در آذر ماه ژنوتیپ‌های گندم با تیپ رشد زمستانه و بینابینی، LT_{50} بالاتری نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها داشتند (۱۰/۶۶- سانتی‌گراد برای نورستار، ۱۰- سانتی‌گراد برای لاین L2 و ۸- سانتی‌گراد برای لاین L1) (جدول ۲).

جدول ۲. میزان LT_{50} تحت دوره‌های عادت‌دهی به سرما در آذر ماه (December)، دی ماه (January) و بهمن ماه (February) در والد نورستار و پیشتاز و لاین‌های حاصل از تلاقی آن‌ها.

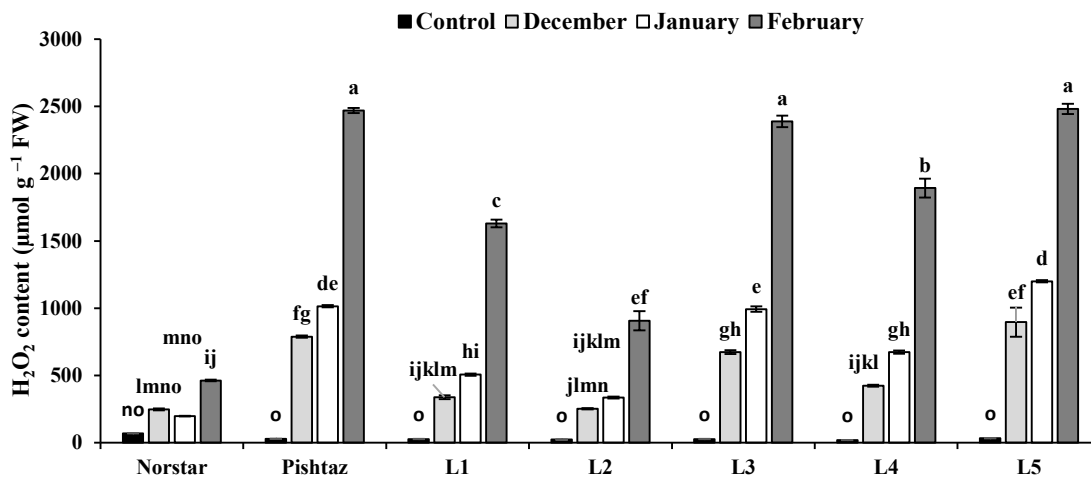
| LT ₅₀ در دوره‌های سازگاری به سرما (درجه سانتی‌گراد) | | | | |
|---|------|-------|---|--|
| بهمن | دی | آذر | ژنوتیپ و لاین‌های حاصل از تلاقی والدین | |
| -12 | -22 | -10.6 | Norstar | |
| -2 | -4 | -2 | Pishtaz | |
| -10 | -18 | -8 | L1 | |
| -10 | -20 | -10 | L2 | |
| -2 | -5.3 | -2 | L3 | |
| -2 | -10 | -2 | L4 | |
| -2 | -2 | -2 | L5 | |

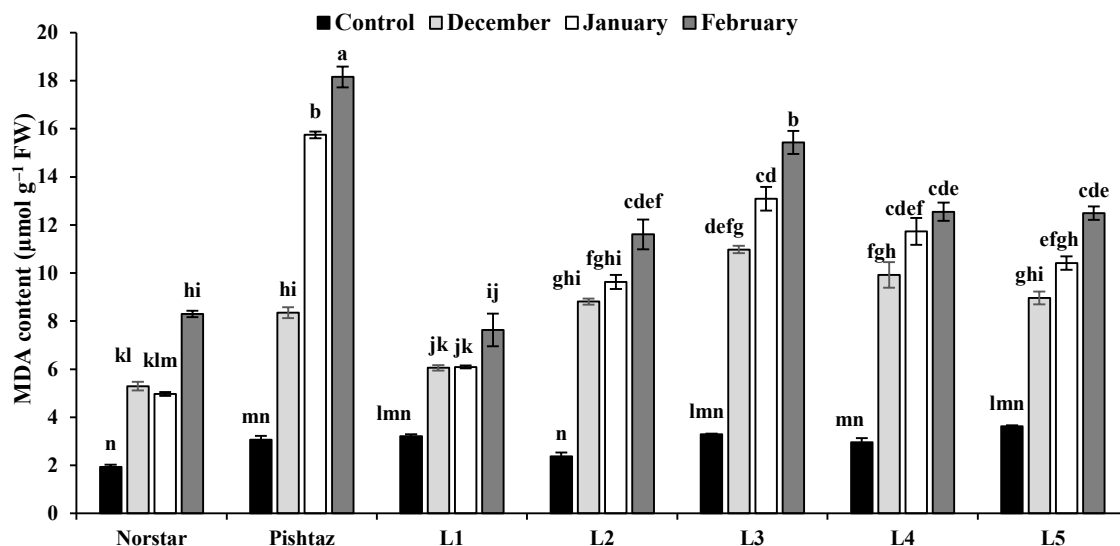
بالا بودن تحمل به سرما در ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی نشان داد که این ژنوتیپ‌ها در شرایط مزرعه و قبل از آغاز تنش یخ‌زدگی، شروع به عادت‌دهی به سرما کرده و با طولانی‌کردن دوره فاز رویشی، امکان بقای زمستانه خود را فراهم کردند. والد زمستانه نورستار و لاین‌های L2 و L1 بیشترین درجه LT_{50} (به ترتیب ۲۲-، ۲۰- و ۱۸- سانتی‌گراد) را در دی ماه نشان داد که به نظر می‌رسد براساس زمان و دمای هوا مصادف با محدوده اشباع بهاره‌سازی و در امتداد با ورود به فاز زایشی در این ژنوتیپ‌ها می‌باشد لذا میزان تحمل به سرما در بهمن ماه کاهش یافت.

گزارش‌ها نشان می‌دهد که با تکمیل نیاز بهاره‌سازی در غلات زمستانه و همزمان با شروع فاز زایشی، میزان تحمل به سرما به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (Hosseini et al., 2016; Janmohammadi et al., 2018). بنابراین نتایج حاصل از ارزیابی LT_{50} نشان دهنده کاهش تحمل به سرما همزمان با شروع فاز زایشی در بهمن ماه در همه ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی بود. ژنوتیپ‌های با عادت رشد بهاره از جمله والد پیشتاز و لاین‌های L3 و L5 نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها ظرفیت پایینی در تحمل به سرما داشتند.

بیشترین تحمل این ژنوتیپ‌ها در آذر ماه (۴- درجه سانتی‌گراد برای پیشتاز، ۵/۳۳- و ۴- درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای لاین‌های L3 و L5) اندازه‌گیری شد. به‌نظر می‌رسد که تحمل به سرمای پایین در این ژنوتیپ‌ها به هیچ وجه نیاز بهاره‌سازی ندارند. میزان تحمل به سرما در لاین L4 که دارای نیاز بهاره‌سازی کوتاه بود، در دی ماه (محدوده اشباع نیاز بهاره‌سازی) به بیشترین مقدار خود (۱۰- درجه سانتی‌گراد برای L4) رسید و پس از آن در بهمن ماه کاهش یافت. مطابق با نتایج، در بهمن ماه، تحمل به سرما در همه ژنوتیپ‌ها با این وجود تفاوت قابل توجهی بین ژنوتیپ‌ها از نظر تحمل به سرما وجود داشت. در بهمن ماه به ترتیب ژنوتیپ‌های با تیپ رشد زمستانه و بینابینی از میزان تحمل بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌ها با تیپ رشد بهاره برخوردار بودند. از این رو از این ژنوتیپ‌ها می‌توان جهت جلوگیری از خسارت ناشی از نوسانات دمایی استفاده کرد.

در مطالعه حاضر در تمامی ژنوتیپ‌ها به استثنا والد نورستار، با شروع دوره‌های عادت‌دهی به سرما، میزان تجمع H_2O_2 تا دی ماه نسبت به شرایط شاهد افزایش یافت، اما این افزایش در ژنوتیپ‌های با عادت رشد بهاره (والد پیشتاز و لاین‌های L3 و L5) بیشتر بود (شکل ۱).





شکل ۱. میزان H_2O_2 و MDA تحت دوره‌های عادت‌دهی به سرما (آذر ماه (December)، دی ماه (January) و بهمن ماه (February) در والد نورستار و پیشتاز و لاین‌های حاصل از تلاقی آن‌ها.

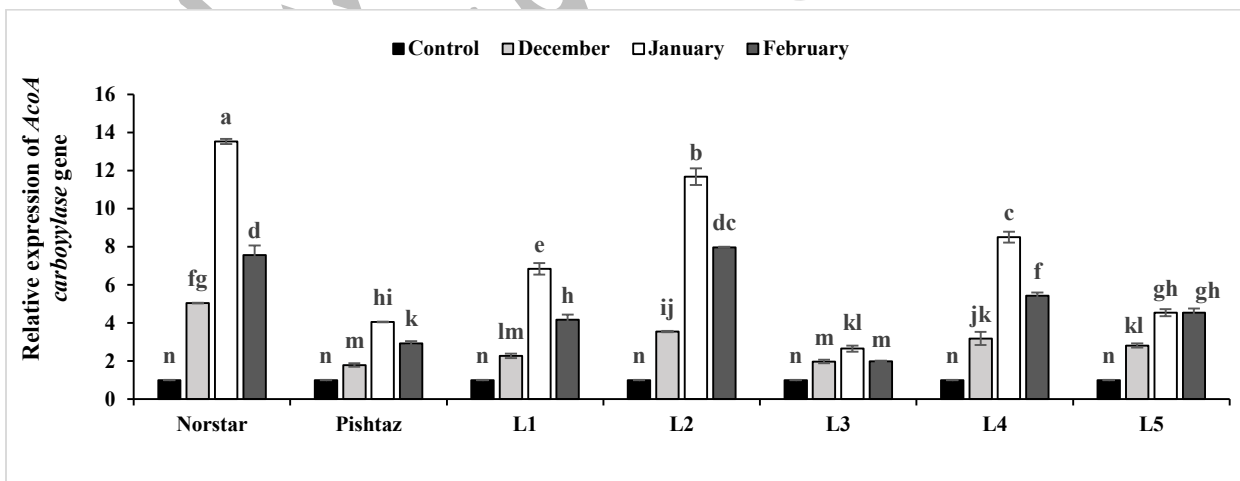
به دنبال آن و با ورود ژنوتیپ‌ها به بهمن ماه محتوی H_2O_2 به ویژه در ژنوتیپ‌های بهاره بطور چشم‌گیری افزایش یافت. بیشترین میزان تجمع H_2O_2 به ترتیب مربوط به لاین L5، والد پیشتاز و لاین L3 در بهمن ماه بود که به ترتیب ۷۱، ۸۳ و ۸۵ برابر شرایط شاهد افزایش یافت. همانطور که انتظار می‌رفت محتوی H_2O_2 در والد زمستانه نورستار در شرایط شاهد و در طول دوره‌های عادت‌دهی به سرما پایین بود. در لاین‌های L1 و L2 که داری نیاز بهاره‌سازی بسیار قوی بودند میزان تجمع H_2O_2 تا دی ماه پایین بود، اما با انتقال از مرحله رویشی به مرحله زایشی که مصادف با از دست رفتن تحمل به سرما در این ژنوتیپ‌ها بود، افزایش یافت. پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی اغلب با تجمع ROS در ارتباط است.

مابین ROSها، H_2O_2 به عنوان پایدارترین مولکول با بسیاری از مکانیسم‌های مربوط به دفاع در ارتباط است (Arfan *et al.*, 2019). H_2O_2 در پاسخ به شرایط تنش ممکن است نقش دوگانه داشته باشد، به عنوان مثال، می‌تواند به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان، پاسخ به تنش را میانجی‌گری کرده و یا به عنوان یک مولکول فعال اکسیژن، منجر به تنش اکسیداتیو در سلول شود (Shi *et al.*, 2021; Hosseini *et al.*, 2010). بنابراین، در مطالعه حاضر در زمان شروع فرایند عادت‌دهی به سرما، یک نقش دوگانه‌ای را برای H_2O_2 می‌توان پیشنهاد کرد. تولید H_2O_2 در سطح پایین در ژنوتیپ‌های متحمل از جمله والد متحمل، لاین‌های L1 و L3 ممکن است به عنوان یک مولکول پیام‌رسانی عمل کرده و نمو گیاه و سازگاری به تنش سرما را تنظیم کند. اما افزایش تجمع آن در بهمن ماه احتمالاً منجر به خسارت سلولی در ژنوتیپ‌های با عادت رشد بهاره شده است. اختلاف محتوی H_2O_2 در ژنوتیپ‌های با عادت رشد زمستانه و بهاره در بهمن ماه تایید کننده این موضوع بود. ویژگی منحصر به فرد برخی از ژنوتیپ‌ها از جمله والد زمستانه نورستار، در تجمع H_2O_2 حتی در بهمن ماه در مقایسه با بقیه ژنوتیپ‌ها می‌تواند به عنوان شاخص انتخاب مورد استفاده قرار گیرد. تحت شرایط آزمایشی روند تغییرات MDA مشابه روند تغییرات H_2O_2 بود. بنابراین به نظر می‌رسد در گیاهان تجمع ROS از جمله H_2O_2 ، سرآغاز تنش اکسیداتیو بوده و منجر به پراکسیداسیون لیپید غشای سلولی می‌شود، از این رو، غلظت MDA، محصول متداول پراکسیداسیون لیپید، به عنوان یک شاخص تحلیلی حساس برای خسارت اکسیداتیو در نظر گرفته شده است (Heidarvand *et al.*, 2011; Kazemi Shahandashti *et al.*, 2018). بالا رفتن غلظت MDA و H_2O_2 در بهمن ماه به ویژه در ژنوتیپ‌های با عادت رشد بهاره، نشان دهنده حضور تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدهای غشای ناشی از صدمات غشایی است

(Golizadeh & Kumleh, 2019). ارتباط محتوی H_2O_2 و MDA با LT_{50} ، نشان می‌دهد که تنش اکسیداتیو القا شده توسط سرما بسیار مرتبط با تحمل سرما است. از این رو به نظر می‌رسد که ژنوتیپ‌های زمستانه با فاز رویشی بلند به دلیل نیاز بهاره‌سازی افزایش یافته دارای محتوی پایین H_2O_2 و MDA بوده و از تحمل به سرمای بالاتری برخوردار بودند.

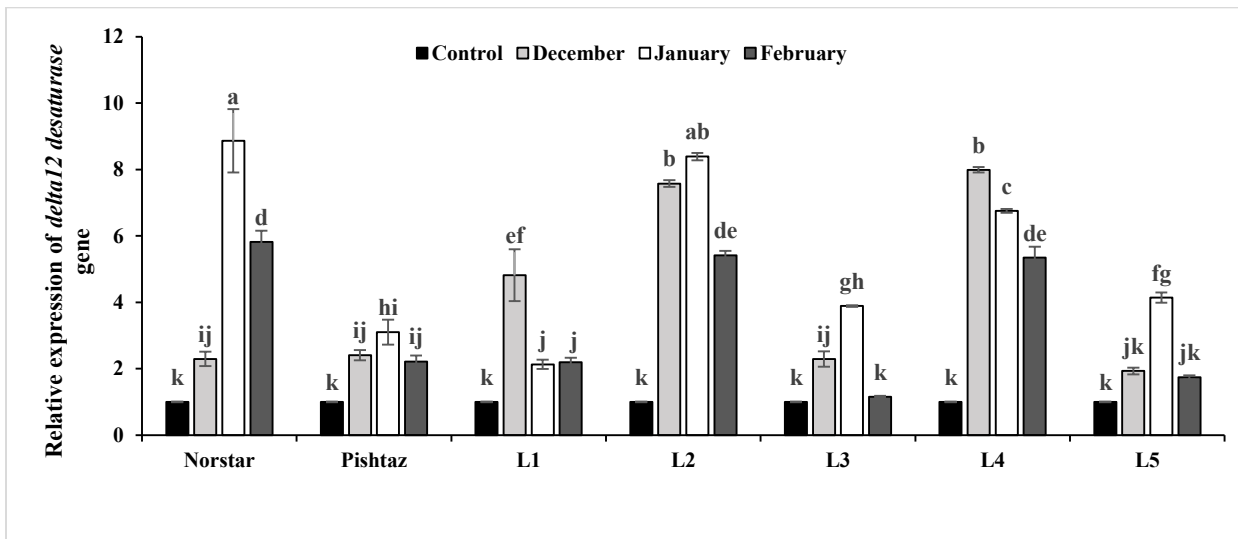
از آنجا که افزایش H_2O_2 و MDA در ژنوتیپ‌های با تیپ رشد زمستانه خیلی کمتر از ژنوتیپ‌های با تیپ رشد بهاره بود، از این رو به نظر می‌رسد افزایش محتوی این متابولیت‌ها در این ژنوتیپ‌ها به معنی خسارت نیست. بر اساس نتایج، منطبق بودن MDA و میزان ROS‌های سلولی نشان‌دهنده ارتباط فیزیولوژیک این شاخص‌ها بوده به نحوی که با کاهش میزان ROS‌ها در اثر فرایندهای عادت دهی به سرما به ویژه در لاین‌های زمستانه، میزان پراکسیداسیون لیپیدها کاهش یافت. بنابراین اجرای آزمایش تحت شرایط مزرعه و دماهای محیط در دوره‌های عادت‌دهی به سرما قادر به تفکیک لاین‌ها و ژنوتیپ‌های مطالعه شده از نظر تحمل به تنش سرما شده است، نتایجی که می‌تواند با مقایسه داده‌های MDA و H_2O_2 تایید شود.

مطابق با نتایج ظرفیت تحمل به تنش سرما در ژنوتیپ‌ها یکسان نبوده و وابسته به ژنوتیپ، مرحله رشد و نمو و شدت تنش سرما تغییر می‌کند. مابین ماکرومولکول‌های سلولی، لیپیدهای غشایی به خصوص غشای پلاسمایی و کلروپلاستی، بیشترین تاثیر را در بروز تحمل به تنش نشان می‌دهند (Hameed *et al.*, 2012; Kazemi Shahandashti & Maali-Amiri, 2018). ظرفیت تحمل به سرما احتمالاً مرتبط با فعالیت ژنهای بیوسنتزی اسیدهای چرب دخیل در ساختارهای غشایی خواهد بود. مابین این ژنها استیل کوانزیم آ کربوکسیلاز (*TaACO*)، دخیل در سنتز مالونیل کوانزیم آ^۲، پیش ماده اصلی بیوسنتز اسیدهای چرب می‌باشد. در مطالعه حاضر میزان بیان نسبی ژن *TaACO* در والد زمستانه نورستار در شرایط کنترل پایین بوده لیکن با شروع تنش سرما میزان بیان ژن افزایش یافت و در دی ماه با بالاترین میزان خود (حدود ۱۳/۴ برابر) رسید (شکل ۲). پس از تکمیل نیاز بهاره‌سازی در دی ماه با ورود این ژنوتیپ به فاز زایشی در بهمن ماه، میزان بیان این ژن کاهش نسبی نشان داد اگرچه هنوز میزان بیان آن ۸ برابر بیان این ژن در شرایط شاهد بود. تغییرات بیان این ژن در لاین‌های لاین‌های L1، L2 و L4 نیز مشابه والد متحمل به سرما بود. در این لاین‌ها با شروع دوره‌های عادت‌دهی به سرما میزان بیان این ژن به تدریج افزایش یافت و با ورود آن‌ها به فاز زایشی در بهمن ماه کاهش نسبی نشان داد.



^۱Acetyl-CoA carboxylase

^۲Malonyl-CoA



شکل ۲. میزان بیان نسبی ژن‌های استیل کوآنزیم A کربوکسیلاز و دلتا دساتوراز تحت دوره‌های عادت‌دهی به سرما (آذر ماه (December)، دی ماه (January) و بهمن ماه (February) در والد نورستار و پیشتاز و لاین‌های حاصل از تلاقی آن‌ها.

بالا بودن بیان ژن *TaACO* نشان دهنده روبه رو شدن گیاهان با تنش سرما و حفظ ساختار غشایی به دنبال افزایش میزان ROS در سلول دارد. افزایش میزان ROSهای سلولی باعث القاء تنش اکسیداتیو ثانویه در سلول‌ها شده که پراکسید شدن اسیدهای چرب غیراشباع غشاها را بدنبال داشته و سبب اختلال در فعالیت غشاء و مرگ سلولی می‌شود (Javidi et al., 2023). بنابراین بیشترین میزان سنتز اسیدهای چرب می‌تواند با تعدیل میزان H_2O_2 در سلول همراه باشد. کاهش نسبی میزان بیان ژن در بهمن ماه در اثر افزایش نسبی دما و شروع فاز زایشی در این دوره بوده که فعالیت تعدیل شده سیستم دفاعی گیاه را نشان می‌دهد. افزایش نسبی میزان H_2O_2 می‌تواند تایید کننده این فرضیه باشد.

بر اساس نتایج، بالا بودن میزان بیان نسبی ژن *TaACO* در ژنوتیپ‌های زمستانه و در فاز رویشی، از ویژگی‌های تحمل به تنش سرما در این لاین‌ها می‌باشد. افزایش بیان کمتر این ژن در ژنوتیپ‌های بهاره در مقایسه با لاین‌های متحمل به سرما تایید کننده این موضوع می‌باشد. با قرار گرفتن ژنوتیپ‌های بهاره تحت شرایط عادت‌دهی به سرما بیان ژن *TaACO* در دی ماه نسبت به شرایط شاهد تنها افزایش نسبی نشان داد. بنابراین به نظر می‌رسد افزایش زود هنگام، مداوم و قابل توجه بیان ژن *TaACO* در ژنوتیپ‌های پاییزه (والد نورستار و لاین‌های L1، L2 و L4) تایید کننده عادت رشدی این ژنوتیپ‌ها و همچنین تاثیر قابل توجه این ژن به نقش غشاهای سلولی در تحمل به تنش سرما اشاره دارد. بیشترین میزان LT_{50} در دی ماه و به خصوص در ژنوتیپ‌های نوع پاییزه در امتداد با بیشترین میزان بیان این ژن به نقش اساسی آن در دوره عادت‌دهی به سرما و القای تحمل به سرما اشاره دارد. به قرارگیری حدواسط میزان بیان نسبی ژن *TaACO* در ژنوتیپ L1 احتمالاً می‌تواند توجیه کننده عادت رشدی بینابینی آنرا نسبت به دو والد پاییزه و بهاره نشان باشد. بنابراین مطابق با نتایج ژن *TaACO* بطور پیوسته در ژنوتیپ‌های پاییزه بیان بیشتری در مقایسه با ژنوتیپ‌های بهاره داشته و مربوط به دوره عادت‌دهی به تنش سرما می‌باشد.

آنزیم‌های دساتوراز نقش مهمی در پایداری و حفظ سیالیت غشا در اثر افزودن پیوندهای دوگانه در زنجیره اسیدهای چرب غشاء تحت تنش سرما دارند. در فرآیند غیراشباع اسیدهای چرب، تنش سرما بیان ژن *Δ12* دساتوراز را تحت تاثیر قرار داد. در این

ژنوتیپ‌ها، بیان نسبی ژن *Al2* تحت شرایط مزرعه به تدریج افزایش یافت و در دی ماه به بیشترین مقدار خود رسید و پس از آن با ورود ژنوتیپ‌ها به فاز زایشی در بهمن ماه کاهش نشان داد.

مطابق با نتایج، بیشترین بیان این ژن در دی ماه در امتداد با بیشترین میزان پاسخ به سرما در این ژنوتیپ‌ها رخ داد. در والد زمستانه نورستار بیان نسبی ژن *Al2* طی دوره‌های عادت‌دهی به سرما تا بهمن ماه افزایش نشان داد. در مقابل در والد بهاره پیش‌تاز میزان افزایش‌ها کمتر از لاین‌های زمستانه مشاهده شد. بیشترین افزایش بیان این ژن مربوط به رقم نورستار (به تقریب ده برابر) و کمترین افزایش (به تقریب دو برابر) به ژنوتیپ‌های با تیپ بهاره اختصاص یافت.

مطابق با نتایج، به نظر می‌رسد تحت تنش سرما میزان LT_{50} احتمالاً با فعالیت این ژن در ارتباط بوده به طوری که با افزایش فعالیت این ژن، درجه تحمل به سرما در ژنوتیپ‌ها تحت تاثیر بوده است. تغییر میزان شاخص خسارت از نوع H_2O_2 و نیز MDA با میزان پاسخ‌های سلولی در ارتباط بوده و در لاین‌های متحمل تعدیل شدن بیشتر H_2O_2 با افزایش میزان بیان این ژن و میزان LT_{50} در ارتباط بود. نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن *Al2* در شرایط تنش، نشان دهنده افزایش معنی‌دار بیان نسبی آن در لاین‌های متحمل به تنش سرما نسبت به لاین‌های حساس بود. میزان بیان این ژن در گیاهان زراعی از جمله گندم، سیب‌زمینی و نخود زراعی تحت شرایط تنش سرما در ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس به طور قابل توجهی افزایش یافته است (Baek & Skinner 2003; Maali-Amiri *et al.*, 2010; Nejdadsadeghi *et al.*, 2015). بنابراین با افزایش میزان فعالیت این ژن میزان غیراشباعی اسیدهای چرب غشا افزایش یافته و تحت تنش سرما سیالیت غشا حفظ خواهد شد، شرایطی که به تحمل بالاتر لاین‌های زمستانه در مقایسه با لاین‌های بهاره کمک می‌کند. این شرایط می‌تواند به کاهش میزان MDA در لاین‌های زمستانه منجر شود. در همین راستا نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که در دی ماه که ژنوتیپ‌ها زمستانه از تحمل به سرمای بالایی برخوردار بودند، میزان بیان نسبی این ژن نیز نسبت به ارقام حساس در سطح بالایی قرار داشت. بر همین اساس و به دلیل افزایش بیان ژن *Al2* در ژنوتیپ‌های متحمل، مطالعه الگوی تغییرات این ژن به عنوان یک شاخص جهت انتخاب ارقام متحمل به سرما در برنامه اصلاح گندم می‌تواند استفاده شود.

نتیجه‌گیری کلی

میزان پاسخ‌ها در دو تیپ گندم بهاره و زمستانه اشاره به ظرفیت ژنتیکی بالقوه والد و لاین‌های زمستانه در مقایسه با انواع بهاره داشت. این موضوع بیانگر نقش مهم فرایند فیزیولوژیکی مولکولی سازگاری در تحمل به تنش سرما می‌باشد. این نتایج اثرات معنی‌دار توسعه فنولوژیکی و تغییرات متابولیکی گندم را در تحمل به سرما نشان داد. در ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی، ژن‌های دخیل در مسیرهای بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع فعال‌تر از ژنوتیپ‌های با عادت رشد بهاره بوده و به واسطه میزان طول فاز رویشی، میزان تحمل به سرما را تحت تاثیر قرار داد. ظرفیت ژنتیکی تحمل به سرما که در تحقیق حاضر از طریق میزان تجمع H_2O_2 و MDA اندازه‌گیری شد، در ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی منجر به افزایش تحمل به سرما شد. بنابراین کمترین افزایش‌ها در شاخص‌های خسارت لاین‌های زمستانه در مقایسه با لاین‌های بهاره در بهمن ماه در فاز رویشی اتفاق افتاده و انتقال از مرحله رویشی به زایشی نقطه عطفی در بیان تحمل به سرما بوده به طوری که پس از ورود به فاز زایشی و تکمیل نیاز بهاره‌سازی، باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان تحمل به سرما و بیان ژن‌های مرتبط با تحمل به سرما می‌شود. بررسی شبکه‌های تنظیم متابولیک درگیر در بهاره‌سازی فرآیند و فرصتی ارزشمند برای شناسایی برخی از مکانیسم‌های درگیر در فرآیند تحمل به تنش سرما بود. نتایج این آزمایش وضعیت بیوشیمیایی غشا سلول را به موازات میزان خسارت MDA (به عنوان شاخص اکسیداسیون غشا) نشان داد به طوری که والد زمستانه نورستار، لاین زمستانه L2 و لاین بینابینی L1 می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی به عنوان والد در تحقیقات مربوط به سرما استفاده شده و یا به عنوان ارقام متحمل به سرما وارد چرخه تولید شوند.

منابع

Alipour, H., Bihamta, M.R., Mohammadi, V., Peyghambari, S.A., Bai, G., Zhang, G. (2017). Genotyping-by-sequencing (GBS) revealed molecular genetic diversity of Iranian wheat landraces and cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1293.

- Amini, S., Maali-Amiri, R., Kazemi-Shahandashti, S.S., Lopez-Gomez, M., Sadeghzadeh, B., Sobhani-Najafabadi, A., Kariman, K. (2021). Effect of cold stress on polyamine metabolism and antioxidant responses in chickpea. *Journal of Plant Physiology*, 258, p.153387.
- Amiri, R.M., Yur'eva, N.O., Shimshilashvili, K.R., Goldenkova-Pavlova, I.V., Pchelkin, V.P., Kuznitsova, E.I., Tsydendambaev, V.D., Trunova, T.I., Los, D.A., Jouzani, G.S. Nosov, A.M. (2010). Expression of acyl-lipid $\Delta 12$ -desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance of potato. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 289-297.
- Arfan, M., Zhang, D.W., Zou, L.J., Luo, S.S., Tan, W.R., Zhu, T., Lin, H.H. (2019). Hydrogen peroxide and nitric oxide crosstalk mediates brassinosteroids induced cold stress tolerance in *Medicago truncatula*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 144.
- Baek, K.H., Skinner, D.Z. (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science*, 165, 1221-1227.
- Cheli, F., Pinotti, L., Novacco, M., Ottoboni, M., Tretola, M., Dell'Orto, V. (2017). Mycotoxins in wheat and mitigation measures. *Wheat Improvement, Management and Utilization*, 25, 227.
- Feng, Y., Zhao, Y., Wang, K., Li, Y.C., Wang, X., Yin, J. (2016). Identification of vernalization responsive genes in the winter wheat cultivar Jing841 by transcriptome sequencing. *Journal of Genetics*, 95, 957-964.
- Gao, C., Sheteiwy, M.S., Han, J., Dong, Z., Pan, R., Guan, Y., Alhaj Hamoud, Y., Hu, J. (2020). Polyamine biosynthetic pathways and their relation with the cold tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Signaling and Behavior*, 15, 1807722.
- 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.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Golizadeh, F., Kumleh, H.H. (2019). Physiological responses and expression changes of fatty acid metabolism-related genes in wheat (*Triticum aestivum*) under cold stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, 37, 224-236.
- Heidarvand, L., Maali-Amiri, R., Naghavi, M.R., Farayedi, Y., Sadeghzadeh, B., Alizadeh, K. (2011). Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58, 157-163.
- 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, 87.
- Hosseini, M., Saidi, A. (2019). Phylogenetic and structural study of plant polyamine oxidases. *Journal of Crop Biotechnology*, 23, 19-36.
- 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, 104299.
- Hosseini, M., Saidi, A., Maali-Amiri, R., Khosravi-Nejad, F., Abbasi, A. (2023). Low-temperature acclimation related with developmental regulations of polyamines and ethylene metabolism in wheat recombinant inbred lines. *Plant Physiology and Biochemistry*, 205, 108198.
- Janmohammadi, M., Sabaghnia, N., Mahfoozi, S. (2018). Frost tolerance and metabolite changes of rye (*Secale cereale*) during the cold hardening and overwintering. *Acta Physiologiae Plantarum* 40:42.
- Javidi, M.R., Maali-Amiri, R., Poormazaheri, H., Niaraki, M.S., Kariman, K. (2022). Cold stress-induced changes in metabolism of carbonyl compounds and membrane fatty acid composition in chickpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 192, 10-19.
- Karami-Moalem, S., Maali-Amiri, R., Kazemi-Shahandashti, S.S. (2018). Effect of cold stress on oxidative damage and mitochondrial respiratory properties in chickpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 122, 31-39.
- Kazemi-Shahandashti, S.S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A., Ramezanpour, S.S. (2014). Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 171, 1106-1116.
- Loreto, F., Velikova, V. (2001). Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology*, 127, 1781-1787.
- Los, D.A., Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1666, 142-157.
- Mahfoozi, S., Limin, A.E., Fowler, D.B. (2001). Developmental regulation of low-temperature tolerance in winter wheat. *Annals of Botany*, 87, 751-757.

- Mahfoozi, S., Majidi, M., Janmohammadi, M., Sasani, S., Tavakol-Afshari, R., Hosseini-Salekdeh, G. (2019). Developmental control of cold tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). *Wheat Research*, 18, 53-68.
- 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.
- Nejadsadeghi, L., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Ramezanpour, S., Sadeghzade, B. (2015). Membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in tetraploid and hexaploid wheats. *Molecular Biology Reports* 42, 363-372.
- Orlova, I.V., Serebriiskaya, T.S., Popov, V., Merkulova, N., Nosov, A.M., Trunova, T.I., Tsydendambaev, V.D., Los, D.A. (2003). Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants. *Plant Cell Physiology*, 44, 447-450.
- Samsami, H., Maali-Amiri, R. (2024). Global insights into intermediate metabolites: Signaling, metabolic divergence and stress response modulation in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 213, 108862.
- 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.
- Shourbalal, S.K., Soleymani, A., Javanmard, H.R. (2019). Shortening vernalization in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) using plant growth regulators and cold stratification. *Journal of Cleaner Production* 10:443-50.
- Sun, J., Yang, L., Wang, J., Liu, H., Zheng, H., Xie, D., Zhang, M., Feng, M., Jia, Y., Zhao, H. and Zou, D. (2018). Identification of a cold-tolerant locus in rice (*Oryza sativa* L.) using bulked segregant analysis with a next-generation sequencing strategy. *Rice*, 11, 1-12.
- Waalén, W.M., Stavang, J.A., Olsen, J.E., Rogli, O.A. (2014). The relationship between vernalization saturation and the maintenance of freezing tolerance in winter rapeseed. *Environmental and Experimental Botany*, 106:164-173.
- Wu, Z.G., Jiang, W., Chen, S.L., Mantri, N., Tao, Z.M., Jiang, C.X. (2016). Insights from the cold transcriptome and metabolome of *dendrobium officinale*: global reprogramming of metabolic and gene regulation networks during cold acclimation. *Frontiers in Plant Science*, 7:1653.

Investigating physiological and molecular responses in lines obtained from winter and spring wheat crossing during cold acclimation

ABSTRACT

Cold is one of the important environmental factors involved in the survival, growth and performance of crop plants. In this research, the traits related to cold tolerance were evaluated in the lines resulting from crossing Norstar (cold-tolerant) and Pishtaz (cold-sensitive) wheat (*Triticum aestivum* L.) in the vegetative stage (December, January and February) under field conditions. Norstar parent and lines L2 and L1 showed the highest LT₅₀ degrees (-22, -20 and -18 °C, respectively) in January. A decrease in cold tolerance was observed simultaneously with the beginning of the reproductive phase in February in all genotypes. Damage indices such as H₂O₂ and MDA were lower in winter lines than in spring lines. The content of H₂O₂ in the Norstar parent and lines L1 and L2 was low during cold acclimation periods, but increased with the transition from the vegetative stage to the reproductive stage. The high level of MDA in February, especially in spring genotypes, indicated the presence of oxidative stress and MDA. The activity of acetyl coenzyme A carboxylase and $\Delta 12$ desaturase genes increased with the continuation of the cold acclimation period, so that the highest increases were observed in winter lines and in January. Therefore, the genotypes with vernalization requirement by adjusting the traits related to cold tolerance in the vegetative stage have higher tolerance to cold stress.

Keywords: Cold acclimation, Desaturase, Gene expression, Oxidative stress, Wheat