

## برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ارقام گندم نان به تنش سرما در مرحله گیاهچه‌ای

یاسین خالدیان<sup>۱</sup>، رضا معالی امیری<sup>\*۱</sup>، امین عباسی<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی دکتری و استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج،

۲- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۲۵)

### چکیده

شناسایی ساز و کارهای تحمل به تنش سرما، نقش بسزایی در پایداری عملکرد گندم دارد. در این پژوهش، پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از قبیل میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، شاخص پایداری غشا سلول (MSI) و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پنج رقم گندم نان پاییزه و یک رقم متحمل به سرما بهاره تحت شرایط شاهد (۲۳ درجه سانتی-گراد)، سازگاری (چهار درجه سانتی‌گراد) و تنش سرما (-۵ درجه سانتی‌گراد) در گیاهان سازگار شده و گیاهان سازگار نشده مطالعه شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در صفت شاخص پایداری غشا (MSI)، تفاوت معنی‌داری بین ارقام و سطوح دمایی و در سایر صفات، بین اثرات متقابل آن‌ها وجود داشت. نتایج آزمایش نشان داد که کاهش دما، سبب افزایش مقدار MDA و کاهش MSI در ارقام شد. تحت تنش سرما، میزان پروتئین کل و همچنین فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در گیاهان سازگار شده افزایش یافت، درحالی‌که در گیاهان سازگار نشده، این شاخص‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت. تحت شرایط تنش، درصد تغییرات (کاهش) شاخص پایداری غشا و MDA ارقام نورستار و باران نسبت به سایر ارقام کمتر بود. به نظر می‌رسد که کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش در گیاهان سازگار نشده، منجر به کاهش توانایی گیاه در تحمل صدمات ناشی از تنش شد. بنابراین، کاهش خسارت سلولی و افزایش ظرفیت سیستم‌های دفاع سلولی ناشی از فرآیند سازگاری را می‌توان عامل اصلی تحمل ارقام تحت تنش سرما دانست.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سرما، گندم نان، MSI، MDA.

### Some physiological and biochemical responses of wheat cultivar seedlings to cold stress

Yasin Khaledian<sup>1</sup>, Reza Maali-Amiri<sup>\*1</sup>, Amin Abbasi<sup>2</sup>

1. Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. 2. Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Iran.

(Received: January 21, 2020 - Accepted: July 15, 2020)

### ABSTRACT

Identifying mechanisms involved in cold tolerance can play an important role in maintaining yield. In this study, physiological and biochemical responses, including malondialdehyde (MDA), cell membrane stability index (MSI), and activities of antioxidant enzymes in five autumn bread wheat cultivars and one spring tolerant cultivar in four treatments: under normal conditions (23°C), acclimation (4°C) and cold stress (-5°C) were studied in acclimated and non-acclimated wheat plants. Analysis of variance showed significant differences between the effects of cultivars and environment temperatures on the membrane stability index, while in other indices, significant differences derived between interactive effects. Results showed that lower temperatures increased MDA, while decreased MSI in different cultivars. As plants exposed to cold stress, their total protein content as well as activities of superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase increased only in cold-acclimated plants, while decreased significantly in non-acclimated strands. Results also showed lower decrease of membrane stability index and MDA in Norstar and Baran cultivars under stress conditions. It seems that in non-acclimated plants under cold stress, decrease in activity of antioxidant enzymes has impaired plant's ability to withstand stress. Therefore, a decrease in cell damages as well as an increase in capacity of cell defense systems, coming down to acclimation process, can be regarded as important factors contributing to tolerance to cold stress.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, cold, MDA, MSI, wheat.

\* Corresponding author E-mail: rmamiri@ut.ac.ir

## مقدمه

که در نتیجه، رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهد (Choudhury *et al.*, 2017).

ROSها، مولکول‌های اکسیدکننده‌ای هستند که در غلظت‌های بالا، عامل اصلی خسارت در درون سلول می‌باشند. این ترکیبات، در بخش‌های مختلف سلول تولید می‌شوند و سبب خسارت به ماکرومولکول‌های حیاتی، غشاها و اندامک‌های سلولی می‌شوند. در نتیجه، فعالیت‌های تنفسی در میتوکندری و توانایی تثبیت CO<sub>2</sub> در کلروپلاست کاهش می‌یابد و نشت الکترولیت‌ها از سلول افزایش می‌یابد. به علاوه، این ترکیبات، لیپیدهای موجود در غشای سلولی را اکسید می‌کند و منجر به تغییر ساختار غشا و اختلال در یکپارچگی آن می‌شود و در نهایت شاخص پایداری غشا (MSI) سلول را کاهش می‌دهد. یکی از واکنش‌هایی که در حین تجمع ROS سرعت بیشتری می‌یابد، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که باعث تولید آلدئیدهایی مانند مالون دی‌آلدئید (MDA) می‌شوند. تاثیر ROS بر لیپیدها و پراکسیداسیون آن‌ها، ناشی از اثر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد که واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون را تحریک کرده و باعث تخریب اسیدهای چرب می‌شوند (Loggini *et al.*, 1999; Maali-Amiri *et al.*, 2010).

ترکیبات ROS با اکسیداسیون آمینواسیدها در پروتئین‌ها و همچنین کوفاکتور متصل به آن‌ها، موجب غیرفعال شدن بعضی از آنزیم‌های خاص می‌شوند. این ترکیبات همچنین به قندها و بازهای سازنده مولکول DNA خسارت وارد می‌کنند و باعث حذف شدن بازها، ایجاد موتاسیون و اثرات مختلف ژنتیکی می‌شوند (Nita & Grzybowski, 2016).

سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه، جزء مهمی از سازوکارهای حفاظتی جهت مقابله با ROS و تنظیم میزان آن‌ها و همچنین جهت حفظ تعادل سلولی است (Kazemi Shahandashti *et al.*, 2014). این سیستم، شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپر اکسید

گندم از مهم‌ترین گیاهان زراعی است که ۴۱ درصد از انرژی مورد نیاز مردم جهان را تامین می‌کند و بیشترین میزان سطح زیر کشت را در بین غلات در جهان به خود اختصاص داده است (FAOSTAT, 2018). بخش شایانی از سطح زیر کشت گندم نان کشور در نواحی سردسیر و مرتفع کوهستانی قرار گرفته است. با توجه به این‌که خسارت سرما و یخ‌زدگی، منجر به کاهش چشم‌گیر عملکرد گندم در این نواحی می‌شود، بنابراین شناخت ساز و کارهای مقاومت به سرما و انتخاب ژنوتیپ‌های گندم متحمل به سرما، از اهمیت بسزائی برخوردار است (Winfield *et al.*, 2010). طی تنش سرما، دسترسی گیاه به انرژی متابولیکی در جهت رشد کمتر می‌شود؛ جذب عناصر غذایی و آب با محدودیت مواجه می‌شود؛ آسیمیلاسیون کاهش می‌یابد و در نهایت رشد کاهش یافته و یا متوقف می‌شود (Fowler, 2008). از آن‌جا که تنش سرما در مرحله جوانه‌زنی، موجب عدم استقرار مطلوب گیاه می‌شود و ضعف گیاهچه در این مرحله، دست‌یابی به عملکرد مناسب را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بنابراین عدم پوشش یکنواخت در کشت‌های پاییزه گندم، به خسارات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ناشی از سرما نسبت داده شده است (Monroy *et al.*, 2007).

تنش سرما، فعالیت بیوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهد؛ مانع عملکرد معمول فرآیندهای فیزیولوژیکی می‌شود و می‌تواند آسیب‌های دائمی در گیاه ایجاد کند و در موارد شدید، مرگ گیاه را به همراه داشته باشد (Nazari *et al.*, 2012). تقریباً تمام گونه‌های گیاهی مناطق معتدل و مرطوب، تنش سرما را در اوایل فصل بهار و یا کل دوران کشت پاییزه تجربه می‌کنند. بیشترین میزان خسارت در گیاهان در شرایط تنش، در نتیجه اختلال در زنجیره‌های انتقال الکترون و تولید بیش از اندازه گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) از قبیل رادیکال سوپر اکسید (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)، پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) و رادیکال هیدروکسیل (OH) در گیاه می‌باشد. افزایش بیش از اندازه این ترکیبات سمی سلولی، منجر به اختلال در تعادل ROS و سازوکار دفاعی گیاه می‌شود

<sup>2</sup> Membrane stability index

<sup>3</sup> Malondialdehyde

<sup>1</sup> Reactive oxygen species

هشت ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۷۵ درصد به مرحله اجرا درآمد. فاکتور اول ارقام در شش سطح و فاکتور دوم تیمارهای دمایی شامل چهار سطح شاهد (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، سازگاری (چهار درجه سانتی-گراد) به مدت ۱۵ روز در مرحله چهار برگی و تنش سرما در گیاهان سازگار شده (۵- درجه سانتی‌گراد) و تنش سرما در گیاهان سازگار نشده (۵- درجه سانتی‌گراد) بود (Nejadsadeghi *et al.*, 2014). هر واحد آزمایشی، در گلدان سه کیلوگرمی با پنج عدد بذر کاملاً سالم که در سه تکرار کاشته شد. نمونه‌های برگی در مرحله پنج تا شش برگی از هر پنج بوته مربوط به هر تکرار تهیه شد و پس از پیچیده شدن در داخل فویل، بلافاصله در نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

#### مالون دی‌آلدئید

تجمع مالون دی‌آلدئید برگ با استفاده از آزمون تیوباریوتیک اسید تعیین شد (Heath & Packer, 1968). ۳۰۰ میلی‌گرم نمونه برگی در پنج میلی‌لیتر بافر استخراج (یک مولار Tris-HCl با pH = ۷/۶)، هموژنه شد و سه میلی‌لیتر از این ترکیب با دو میلی-لیتر محلول تیوباریوتیک اسید ۰/۵ درصد حاوی تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد مخلوط شد و در حمام آب جوش به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از عبور از صافی، با سانتریفیوژ با سرعت  $g \times 5000$  به مدت ۱۰ دقیقه، چگالی نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. غلظت مالون دی‌آلدئید بر اساس رابطه ۱ محاسبه شد:

$$C=D/E \quad \text{رابطه ۱}$$

که در آن، D: جذب نمونه و E: ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر  $10^5 \times 1/56$ ) است (Maali-Amiri *et al.*, 2007).

#### شاخص پایداری غشا سلولی

شاخص پایداری غشا سلولی نیز به روش Sairam & Srivastava (2001) اندازه‌گیری شد. برای تعیین شاخص پایداری غشا سلولی، برگ‌های بالایی گیاه جدا شدند و پس از قرار گرفتن در کیسه پلاستیکی، به آزمایشگاه منتقل شدند. یک گرم برگ وزن شد و دو سری نمونه یکسان در دو لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر قرار گرفت. سپس یک

دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (GPX) و متابولیت‌های غیر آنزیمی آنتی‌اکسیدان (اسید آسکوربیک، ترکیبات فنولیک ویتامین E، گلوکاتینون، ملاتونین، ترکیبات فلاونوئیدی، کاروتنوئیدها و ...) می-باشد (Kazemi Shahandashti *et al.*, 2014; Hasanuzzaman *et al.*, 2017). با توجه به اهمیت خسارات وارده به عملکرد گندم نان در ایران و لزوم شناسایی و بهره‌برداری از سازوکارهای مقاومت به تنش سرما، پژوهش اخیر با هدف شناخت سازوکارهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مقاومت به سرما در گندم نان طراحی و اجرا شد.

#### مواد و روش‌ها

در این پژوهش، با توجه به نتایج ارزیابی مزرعه‌ای و همچنین بررسی برخی شاخص‌های مورفوفیزیولوژیکی تحت تنش سرما، از شش رقم گندم دیم شامل پنج رقم پاییزه (سرداری، نورستار، باران، صدرا و آذر ۲) و یک رقم بهاره (کریم) تهیه شده از موسسه دیم مراغه استفاده شد (Mohammadi *et al.*, 2012; Rostaii *et al.*, 2015). دو رقم بومی سرداری و آذر ۲، تقریباً حدود ۹۰ درصد سطح زیر کشت گندم دیم کشور را به خود اختصاص داده‌اند و ارقام باران و صدرا نیز دو رقم تازه معرفی شده هستند که براساس مطالعات انجام شده، عملکرد و تحمل به سرمای مناسبی نسبت به سایر ارقام نشان داده‌اند. جهت ارزیابی دقیق‌تر پاسخ به تنش سرما، این ارقام با رقم نورستار که بومی کشور کانادا است و متحمل‌ترین رقم به سرما می-باشد، مقایسه شدند (Mahfoozi *et al.*, 2001). رقم بهاره کریم نیز در بررسی‌های اولیه مزرعه‌ای، تحمل نسبی به تنش سرما مابین ارقام بهاره داشت؛ بنابراین می‌تواند در ارزیابی دقیق‌تر پاسخ‌های سلولی ارقام پاییزه و بهاره به کار گرفته شود.

آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار در اتاقک رشد با شرایط نوری ۲۰۰ میکرومول بر انیشتن و ۱۶ ساعت روشنایی و

1 Superoxide dismutase

2 Catalase

3 Ascorbate peroxidase

4 Guaiacol peroxidase

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم CAT

فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-160) به روش Scebba *et al.* (1998) اندازه‌گیری شد. مواد استفاده شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=7) ۵۰ میلی‌مولار، پنج میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳/۴۱ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بود و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم APX

فعالیت آنزیم APX در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفوتومتر به روش Ranieri *et al.* (2003) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم (pH=7/8) ۵۰ میلی‌مولار، آسکوربات پنج میلی‌مولار، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> یک میلی‌مولار و عصاره پروتئینی به میزان ۱۰ میکرولیتر بود. بر اساس حداکثر جذب آسکوربات در طول موج ۲۹۰ nm، میزان فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد و بر اساس میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم GPX

فعالیت آنزیم GPX مشابه آنزیم کاتالاز، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفوتومتر به روش Dionisio-Sese & Tobita (1998) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات (pH=7) میلی‌مولار ۵۰، گایاکول ۱۰ میلی‌مولار، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی بود. پس از افزودن عصاره پروتئینی، بلافاصله جذب در طول موج ۴۷۰ nm قرائت شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول گایاکول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS، مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

سری از نمونه‌ها در دستگاه بن‌ماری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و پس از این زمان، هدایت الکتریکی نمونه‌ها به کمک دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. سری دوم از لوله آزمایش را نیز به مدت نیم ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند:

$$\text{رابطه ۲} \quad \text{MSI} = 1 - (\text{EC}_{40} / \text{EC}_{100})$$

که در این رابطه، MSI: شاخص پایداری غشا، EC<sub>40</sub>: هدایت الکتریکی آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد و EC<sub>100</sub>: هدایت الکتریکی آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد است.

### استخراج پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدان

کلیه مراحل استخراج در نمونه‌ها بر روی یخ انجام شد. نمونه‌ها در هاون چینی و به کمک ازت مایع، ساییده و پودر شدند. ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=7/6) به ۰/۲۵ گرم از پودر اضافه شد و ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ × g و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس، مایع رویی (عصاره آنزیمی) برای سنجش کمی آنزیم‌ها استفاده شد. غلظت پروتئینی نمونه‌ها بر اساس روش برادفورد تعیین شد (Bradford, 1976).

### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم SOD

اندازه‌گیری فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز طبق روش Beyer & Fridovich (1987) انجام شد. بافر اصلی واکنش شامل بافر فسفات (pH=7/6) ۱۰۰ میلی‌مولار، متیونین ۱۲ میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار و تریپتون ایکس-۱۰۰ (۰/۲۵ درصد) بود. از بافر اصلی به هر چاهک به میزان ۲۹۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس پنج میکرو-لیتر بافر ریبو فلاوین دو میکرومولار به مخلوط واکنش اضافه شد و دستگاه در طول موج ۵۶۰ nm کالیبره شد. برای سنجش هر نمونه، ۱۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استفاده شد. این واکنش بر اساس میزان احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم و توانایی آنزیم SOD در ممانعت از این واکنش بررسی شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس واحد آنزیم در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

## نتایج و بحث

اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که بین میزان MDA در ارقام، سطوح تیماری و اثر متقابل آن‌ها،

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در پاسخ به سطوح تیماری در ارقام مختلف گندم.

Table 1. Variance analysis of measured traits in response to treatment levels in different wheat cultivars.

Source of variation	df	Mean Squares(MS)						
		MDA	MSI	Total Protein	CAT	APX	GPX	SOD
Cold treatments	3	0.698**	0.014**	29.36**	0.020**	4.89**	0.210**	196.57**
Cultivar	5	131.036**	0.279**	249.53**	0.093**	22.53**	0.967**	25.26**
Cold treatments×cultivar	15	0.18**	0.0027 <sup>ns</sup>	2.40**	0.004**	0.986**	0.042**	4.30**
Experimental error	48	0.022	0.00271	0.318	0.0001	0.028	0.0012	0.281
Coefficient of variation( %	-	3.57	9.20	4.381	7.34	7.33	5.27	6.93

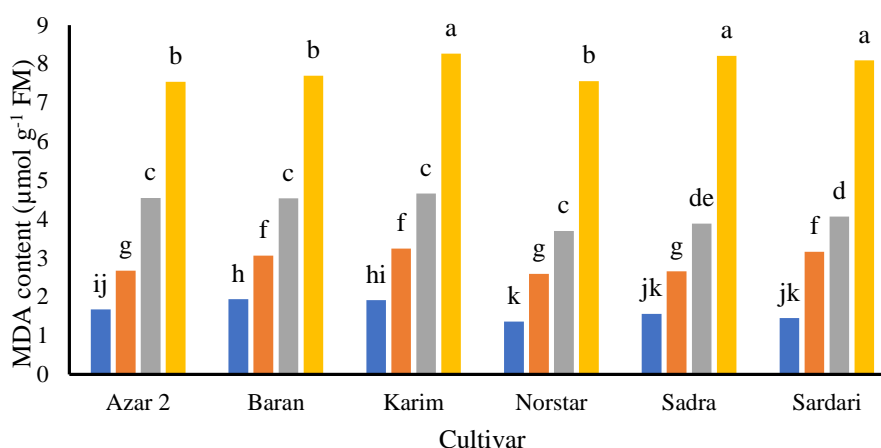
ns و \*\*: به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

ns and \*\*: non-significant and significant differences at 1% of probability level, respectively.

غشا را نسبت به سایر ارقام نشان داد، این رقم از نظر این صفت نسبت به بقیه متحمل‌تر بود. افزایش MDA در شرایط سازگاری که کمتر از شرایط تنش بود، به نقش سیگنالینگ MDA اشاره دارد که سبب افزایش فعالیت سیستم‌های دفاعی در جهت مقابله با تنش سرما می‌شود. بنابراین افزایش نسبی ROS در دوره-های سازگاری، به‌عنوان پیش‌نیاز فعالیت سیستم‌های دفاعی در گیاهان معرفی شده‌اند (Kazemi Shahandashti *et al.*, 2018).

حفظ یکپارچگی ساختار غشاهای سلولی طی تنش سرما، بیانگر تنظیم فرآیندهای متعدد سلولی است (Maali-Amiri *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2015). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین سطوح دمایی و ارقام از نظر شاخص پایداری غشا، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۱). بر اساس نتایج، بیشترین میزان شاخص پایداری غشا در ارقام باران و نورستار مشاهده شد و سایر ارقام از این نظر تفاوت معنی‌داری نسبت به هم نداشتند. تحت تنش سرما، پایداری غشا به‌طور معنی‌داری نسبت به شرایط شاهد کاهش یافت و بیشترین میزان کاهش مربوط به تیمار تنش سرما در گیاهان سازگار نشده بود که کمترین شاخص پایداری غشا را به خود اختصاص داد (شکل ۲). بر اساس نتایج، منطبق بودن MDA و MSI نشان‌دهنده ارتباط فیزیولوژیک بین این دو شاخص بود، به نحوی که با کاهش میزان پایداری ساختار غشا، میزان پراکسیداسیون لیپیدها افزایش یافت.

بیشترین میزان تجمع MDA مربوط به ارقام کریم، صدرا و سرداری تحت تنش سرما در گیاهان سازگار نشده و کمترین میزان آن مربوط به رقم نورستار در شرایط شاهد (۲۳ درجه سانتی‌گراد) بود. تحت تنش سرما، تیمار سازگاری باعث کاهش میزان MDA شد، به‌طوری‌که میزان MDA در ارقام آذر ۲، باران، کریم، نورستار، صدرا و سرداری، به ترتیب ۳۹/۷، ۴۱، ۴۳/۶، ۵۱/۱، ۵۲/۶ و ۴۹/۸ درصد کمتر از شرایط غیر سازگاری در گیاهان بود که دو موضوع را مشخص کرد: الف- تیمار سازگاری موثر بوده است و قادر به تفکیک ارقام از نظر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بود و ب- به‌طور غیرمستقیم، ظرفیت ارقام را در مقابله با تنش سرما نشان داد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با کاهش دما، محتوای MDA در ارقام در اثر اعمال تنش، افزایش یافت (شکل ۱). با کاهش دما در اثر تجمع ترکیبات ROS و متعاقب آن‌ها تخریب غشا، میزان MDA بیشتری در سلول آزاد می‌شود (Choudhury *et al.*, 2017). کمترین درصد تغییرات در تمامی سطوح تیماری نسبت به شاهد، به رقم باران اختصاص داشت که در تیمارهای سازگاری، تنش سرما پس از سازگاری و غیر سازگاری، به ترتیب ۵۸، ۱۳۴ و ۲۹۸ درصد بود (اعداد به صورت درصد تغییرات نسبت به شاهد محاسبه شده است). بین ارقام، رقم باران با کمترین میزان درصد تخریب غشا و آسیب‌پذیری، تحمل بیشتری نسبت به سایر ارقام از خود نشان داد. با توجه به این‌که تحت شرایط تنش سرما، رقم باران کمترین میزان تغییرات تخریب



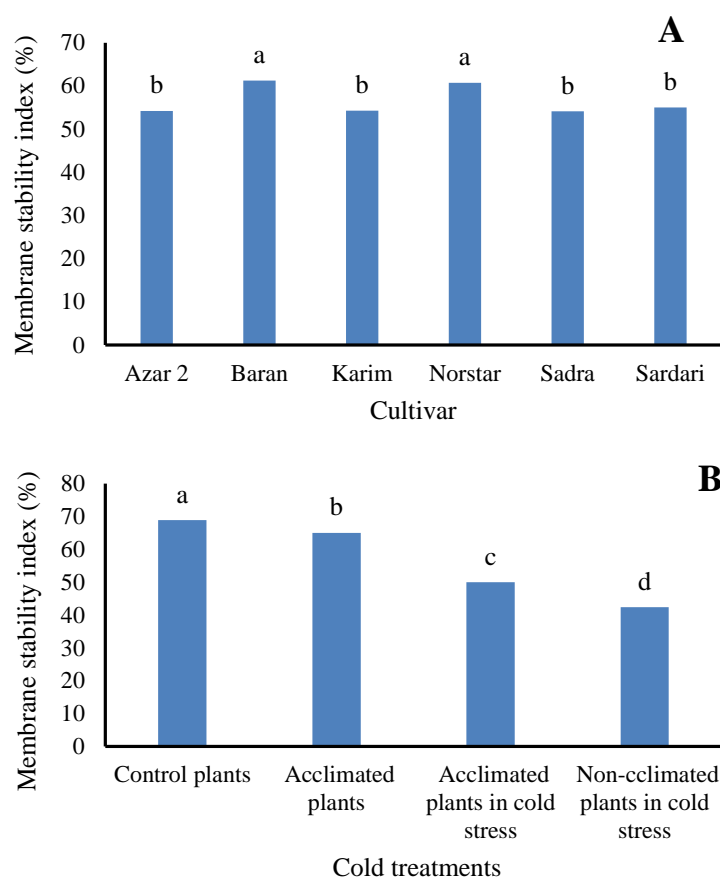
شکل ۱- تغییر میزان مالون دی آلدئید در ارقام گندم تحت تیمارهای مختلف دمایی، از چپ به راست ستون‌های هر رقم به ترتیب مربوط به گیاهان شاهد، گیاهان سازگار شده (دمای چهار درجه سانتی‌گراد)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما (دمای -۵ درجه سانتی‌گراد) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما (دمای -۵ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. حروف متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد می‌باشد.

Figure 1. Malondialdehyde content changes in wheat cultivars under cold treatments [from left to right, columns of each cultivar are control plants, acclimated plants (4°C), acclimated plants under cold stress (-5°C), and non-acclimated plants under cold stress (-5°C), respectively]. Different letters indicate a significant difference among the means based on Duncan's multiple range test ( $P < 0.01$ ).

تری از نظرتحمل به یک تنش نشان دهد. نتایج MDA نیز تایید کننده حساسیت بیشتر این رقم در مقایسه با باران و نورستار و برخی ارقام دیگر مانند صدرا و سرداری بود. بنابراین تیمارهای سرمایی اعمال شده در این آزمایش، قادر به تفکیک ارقام مختلف از نظر تحمل به تنش سرما شد؛ نتایجی که می‌تواند با مقایسه داده‌های MDA و پایداری غشا تایید شود.

از تغییرات عمده بیوشیمیایی سلول‌های گیاهی، تغییر غلظت پروتئین کل در اثر تخریب و یا مهار سنتز برخی از پروتئین‌ها و به‌کارگیری انرژی سلول در ساخت پروتئین‌های مخصوص مقابله با تنش است (Heidarvand & Maali-Amiri, 2013). بر اساس نتایج تجزیه واریانس، بین محتوی پروتئین کل در ارقام، تیمارهای دمایی و اثر متقابل رقم در تیمار، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۱). با کاهش دما، میزان پروتئین کل در دمای سازگاری و همچنین در شرایط تنش در گیاهان سازگار شده در تمامی ارقام به‌جز رقم کریم افزایش و در تمامی ارقام در گیاهان سازگار نشده تحت تنش کاهش یافت (شکل ۳).

در نتیجه، می‌توان شاخص MSI نیز به‌عنوان معیاری در شناسایی میزان تحمل به تنش سرما در نظر گرفت، به‌طوری‌که هرچه مقدار این شاخص در ارقام بیشتر باشد، پایداری ساختار غشا بیشتر می‌شود و گیاه حساسیت کمتری به شرایط تنش دارد. بر این اساس، کاهش معنی‌دار MSI در ارقام کریم، صدرا، آذر ۲ و سرداری، نشان‌دهنده پایداری کمتر ساختار غشا نسبت به دو رقم نورستار و باران بود که این مساله احتمالاً در نتیجه تجمع ROS به دنبال کاهش دما می‌باشد که در ادامه در مورد آن بحث خواهد شد. نکته جالب آن است که رقم کریم که یک رقم بهاره متحمل به سرما است، شاخص پایداری غشا کمتری در مقایسه با ارقام باران و نورستار داشت. در مطالعات مزرعه‌ای، این رقم در غربال اولیه ارقام بهاره، تحمل بیشتری به سرما نشان داد. با این وجود و تحت شرایط کنترل شده، اختلاف معنی‌داری با ارقامی همچون صدرا، آذر ۲ و سرداری نداشت. بنابراین به‌نظر می‌رسد که به موازات مطالعات مزرعه‌ای که گیاهان در معرض انواع متفاوتی از شرایط محیطی قرار می‌گیرند، مطالعات تحت شرایط گلخانه می‌تواند ارزیابی دقیق-



شکل ۲- تغییر شاخص پایداری غشا در ارقام مختلف گندم (A) و تیمارهای دمایی (B). حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد می‌باشند.

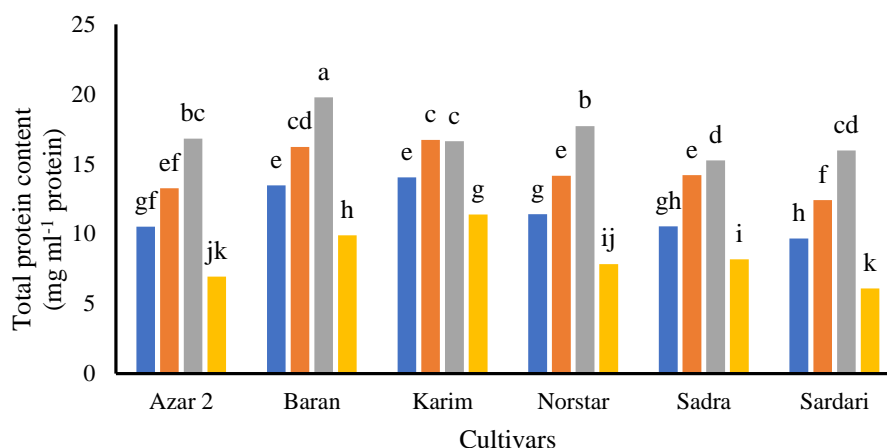
Figure 2. Membrane stability index Changes in wheat cultivars (a) and cold treatments (b). Different letters indicate a significant difference among means based on Duncan's multiple range test ( $P < 0.01$ ).

تنش در گیاهان سازگار شده، به ترتیب ۱۲ و ۱۴ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. این موضوع نشان‌دهنده ظرفیت بالقوه ژنتیکی کم این رقم در مقایسه با ارقام دیگر می‌باشد. بخشی از داده‌های MDA و شاخص پایداری نیز نشان‌دهنده تحمل کمتر این رقم در مقایسه با دیگر ارقام می‌باشند. به نظر می‌رسد که راهکار تدافعی سلول با افزایش ترکیبات ROS، افزایش میزان ترکیبات دفاعی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که افزایش میزان پروتئین، احتمالاً نشان‌دهنده آن می‌باشد. در شرایط تنش سرما در گیاهان سازگار نشده، میزان پروتئین کل در تمامی ارقام در مقایسه با شاهد کاهش یافت. مطالعات نشان داده است که کاهش پروتئین محلول برگ به‌عنوان یک عامل غیر روزنه‌ای محدودکننده فتوسنتز محسوب

این موضوع بیانگر نقش فرآیند سازگاری در القا پاسخ‌های سلولی تحت تنش سرما می‌باشد. افزایش میزان پروتئین کل، نشان‌دهنده سنتز پروتئین‌های سلولی به‌خصوص پروتئین‌های دخیل در دفاع سلولی است که از آن جمله می‌توان به پروتئین‌های خانواده ژنی WCS 120، دهیدرین‌ها، فاکتورهای رونویسی متعدد و همچنین ژن‌های سنتزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اشاره کرد (Kazemi Shahandashti *et al.*, 2018). بیشترین میزان پروتئین کل، به رقم باران تحت تنش سرما در گیاهان سازگار شده و کم‌ترین مقدار پروتئین، به رقم سرداری و آذر ۲ در گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما تعلق داشت. کم‌ترین درصد تغییرات در افزایش میزان پروتئین کل در رقم کریم مشاهده شد که در سازگاری و همچنین تحت شرایط

میزان پروتئین کل تحت تنش سرما پس سازگاری و غیر سازگاری در رقم باران در مقایسه با ارقام دیگر، احتمالاً فعالیت بیشتر مکانیسم‌های دفاعی این گیاه را در مقابله با خسارت اکسیداتیو (نتایج MDA و شاخص پایداری غشا) نشان می‌دهد.

می‌شود، به طوری که در این حالت، تنش بر گیاه اثرگذار است و خسارت ایجاد می‌شود. با طولانی‌تر شدن مدت زمان قرارگیری گیاه در شرایط تنش، میزان خسارت، سبب کاهش سنتز یا افزایش تخریب پروتئین‌ها می‌شود (Laino *et al.*, 2010). بیشتر بودن



شکل ۳- تغییر میزان پروتئین کل در ارقام گندم، از چپ به راست ستون‌های هر رقم به ترتیب مربوط به گیاهان شاهد، گیاهان سازگار شده (دمای چهار درجه سانتی‌گراد)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما (دمای ۵- درجه سانتی‌گراد) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما (دمای ۵- درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. حروف متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد می‌باشد.

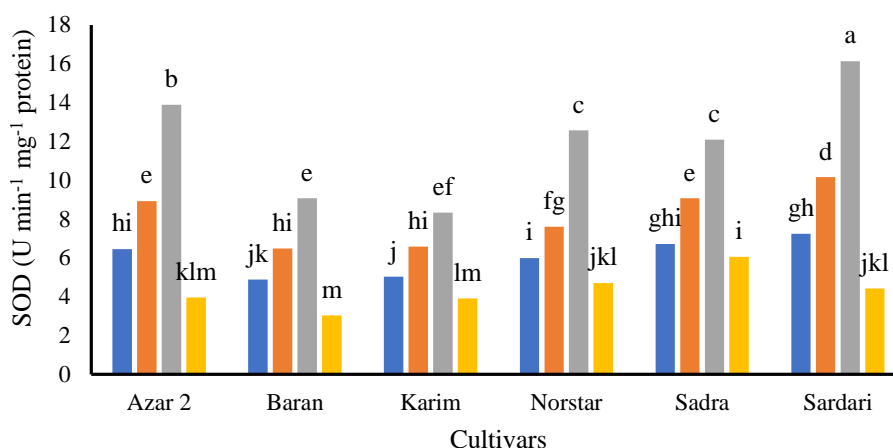
Figure 3. Total protein content change in wheat cultivars [from left to right, columns represent: control, acclimated plants (4°C), acclimated plants under cold stress (-5°C), and non-acclimated plants under cold stress (-5°C), respectively]. Different letters indicate a significant difference among means based on Duncan's multiple range test ( $P < 0.01$ ).

شد که تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر نشان ندادند. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم تحت تنش در گیاهان سازگار شده، در رقم سرداری مشاهده شد، درحالی‌که بیشترین تغییر فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد، در دو رقم آذر ۲ (۱/۱۵ برابر) و نورستار (۱/۰۹ برابر) مشاهده شد. این نتایج مطابقت بسیار زیادی با نتایج مربوط به میزان MDA این ارقام داشت، به طوری که این دو رقم، کمترین میزان MDA را به همراه رقم باران به خود اختصاص دادند (شکل ۴). در شرایط تنش، کاهش میزان فعالیت آنزیم در گیاهان سازگار نشده در مقایسه با گیاهان سازگار شده، به نقش مهم فرآیند سازگاری در القا فعالیت سیستم‌های دفاعی اشاره دارد. عدم وجود دوره‌های سازگاری، سبب القا تنش‌های شدیدتر سرما در ارقام شد که احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت

### میزان فعالیت آنزیم SOD

تغییر میزان پروتئین کل، احتمالاً با تغییر در فعالیت سیستم‌های دفاعی سلول از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همراه می‌شود که بر تحمل گیاه به تنش سرما تاثیر گذار است؛ بنابراین در ادامه تغییر، فعالیت برخی از این آنزیم‌ها بررسی شد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، بین ارقام، سطوح تیماری و اثر متقابل آن‌ها از نظر میزان فعالیت آنزیم SOD اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با کاهش دما، میزان فعالیت آنزیم SOD در شرایط سازگاری و همچنین در شرایط تنش در گیاهان سازگار شده در تمامی ارقام افزایش یافت. کمترین میزان فعالیت در شرایط تنش در گیاهان سازگار نشده در ارقام باران، آذر ۲ و کریم مشاهده





شکل ۴- تغییر میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در ارقام گندم، از چپ به راست ستون‌های هر رقم به ترتیب مربوط به گیاهان شاهد، گیاهان سازگار شده (دمای چهار درجه سانتی‌گراد)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما (دمای ۵- درجه سانتی‌گراد) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما (دمای ۵- درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. حروف متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد می‌باشد.

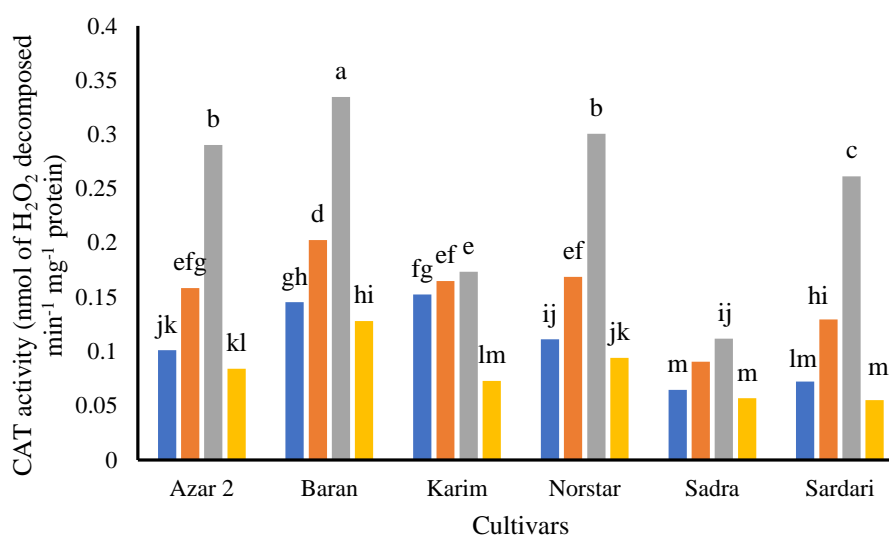
Figure 4. Superoxide dismutase (SOD) enzyme activity changes in wheat cultivars [from left to right, columns represent: control, acclimated plants (4°C), acclimated plants under cold stress (-5°C), and non-acclimated plants under cold stress (-5°C), respectively]. Different letters indicate a significant difference among the means based on Duncan's multiple range test ( $P < 0.01$ ).

در شرایط تنش در گیاهان سازگار نشده، کاهش میزان فعالیت آنزیم در ارقام مختلف نسبت به گیاهان در شرایط سازگار شده مشاهده شد که احتمالاً افزایش فعالیت سازوکارهای تخریب پروتئینی و کاهش فعالیت سازوکارهای سنتز پروتئینی از دلایل آن می‌باشد. آنزیم کاتالاز به دلیل ساختار چند قسمتی آن، فعالیت آن تحت تنش‌های شدید مختل شده است، بنابراین کاهش فعالیت آن به درستی نقش شدید تنش سرما تحت شرایط سازگار نشده گیاهان را در مقایسه با شرایط سازگاری نشان می‌دهد. نکته جالب، میزان فعالیت کمتر آنزیم در رقم نورستار در مقایسه با رقم باران تحت شرایط تنش پس از سازگاری بود. به نظر می‌رسد که در رقم نورستار به دلیل نیاز به دوره‌های سازگاری طولانی‌تر در مقایسه با بقیه ارقام، میزان فعالیت آنزیم هنوز به ماکزیمم فعالیت نرسیده است. با این وجود و به دلیل هماهنگی در فعالیت سیستم‌های دفاعی و هم‌تنظیمی آن‌ها، میزان خسارت این رقم تحت تنش پس از سازگاری در مقایسه با رقم باران به‌طور معنی‌داری کمتر بود. بیان این نکته مهم است که دوره

سازوکارهای تخریب پروتئینی و کاهش فرآیندهای بیوسنتز پروتئین، فعالیت آنزیم کاهش یافت (شکل ۴). با افزایش فعالیت CAT در گیاهان تحت تنش، میزان  $H_2O_2$  حاصل از متابولیسم سلولی کاهش می‌یابد و از آسیب بافت‌ها جلوگیری می‌شود (Gill & Tuteja, 2010). بر اساس نتایج تجزیه واریانس، بین ارقام، سطوح تیماری و اثر متقابل آن‌ها از نظر میزان فعالیت آنزیم CAT، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم تحت تنش در گیاهان سازگار شده، در رقم باران مشاهده شد که بیشترین میزان شاخص پایداری غشا را نیز به خود اختصاص داد. کمترین میزان فعالیت CAT در شرایط تنش در گیاهان سازگار نشده، در ارقام صدرا، سرداری و کریم مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر نشان ندادند و این ارقام از نظر پایداری غشا نیز کمترین میزان پایداری را داشتند. این امر، منطبق بودن نتایج فعالیت آنزیم CAT با میزان MSI را نشان می‌دهد (شکل ۵).

باشد (Mahfoozi et al., 2001).

سازگاری در گندم نورستار به‌عنوان یکی از ارقام  
متحمل به سرما در جهان، حدود ۴۰-۵۰ روز می-



شکل ۵- تغییر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام گندم، از چپ به راست ستون‌های هر رقم به‌ترتیب مربوط به گیاهان شاهد، گیاهان سازگار شده (دمای چهار درجه سانتی‌گراد)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما (دمای ۵- درجه سانتی‌گراد) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما (دمای ۵- درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح یک درصد می‌باشد.

Figure 5. Catalase (CAT) enzyme activity change in wheat cultivars [from left to right, columns represent: control, acclimated plants (4°C), acclimated plants under cold stress (-5°C), and non-acclimated plants under cold stress (-5°C), respectively]. Different letters indicate a significant difference among means based on Duncan's multiple range test ( $P < 0.01$ ).

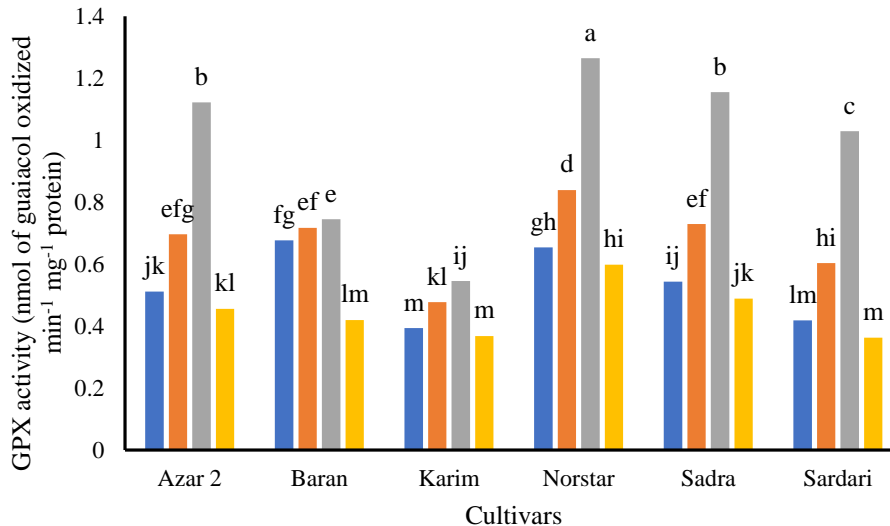
شرایط تنش بستگی دارد. به‌عبارت‌دیگر، ارقام مختلف پاسخ‌های متفاوتی برحسب فعالیت آنزیم‌های مختلف به تنش نشان می‌دهند. بر اساس نتایج، افزایش و کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، نوعی سازگاری عمومی در راستای مواجهه با شرایط تنش به شمار می‌رود و تغییر در میزان فعالیت این آنزیم می‌تواند ناشی از سازگاری به شرایط محیطی باشد (شکل ۵).

در شرایط تنش شدید، رادیکال‌های سوپر اکسید توسط آنزیم SOD به  $H_2O_2$  تبدیل می‌شود. افزایش فعالیت این آنزیم باعث تولید  $H_2O_2$  بیشتری می‌شود که برای سلول سمی است و باید سریعاً به‌وسیله سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی از قبیل APX و GPX و CAT به آب و اکسیژن تجزیه شود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین میزان فعالیت آنزیم GPX در ارقام، سطوح تیماری و اثر متقابل آن‌ها

با این وجود در این آزمایش، دوره سازگاری ۱۵ روز انتخاب شد. عقیده بر آن است که در شرایط طبیعی در مزرعه، همواره شرایط برای سازگاری کامل یک گیاه فراهم نیست، بنابراین ژنوتیپی می‌تواند بقا و عملکرد مناسب داشته باشد که در دوره زمانی کوتاه‌تری، بیشترین سازگاری را در خود ایجاد کند تا بتواند به‌عنوان یک رقم جهت آزادسازی و کشت مد نظر قرار گیرد. بنابراین دوره‌های کوتاه سازگاری و سرما در این آزمایش، شرایطی ایجاد کرد که بتوان ارزیابی مطلوب اما در مدت زمان کوتاه انجام داد. همچنین چنین شرایط آزمایشی می‌تواند به ارزیابی تعداد بیشتری ارقام با هزینه‌های کمتر منجر شود. بیشترین تغییر فعالیت آنزیم در گیاهان سازگار شده در دو رقم سرداری و آذر ۲ (به‌ترتیب ۲۶۱ و ۱۸۷ درصد نسبت به شاهد) بود. بنابراین میزان افزایش فعالیت آنزیمی گیاه تحت تنش سرما به نوع رقم و

تیمارهای دمایی، به ترتیب افزایش و کاهش معنی-داری نسبت به آنزیم CAT نشان دادند، اما در سایر ارقام به ویژه سرداری و آذر ۲، روند تغییرات مشابهی نسبت به CAT مشاهده شد (شکل ۶).

اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم GPX تحت تنش سرما نشان داد که درصد تغییر فعالیت این آنزیم در ارقام صدرا و باران در



شکل ۶- تغییر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ارقام گندم، از چپ به راست ستون‌های هر رقم به ترتیب مربوط به گیاهان شاهد، گیاهان سازگار شده (دمای چهار درجه سانتی‌گراد)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما (دمای ۵- درجه سانتی-گراد) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما (دمای ۵- درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی-دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد می‌باشد.

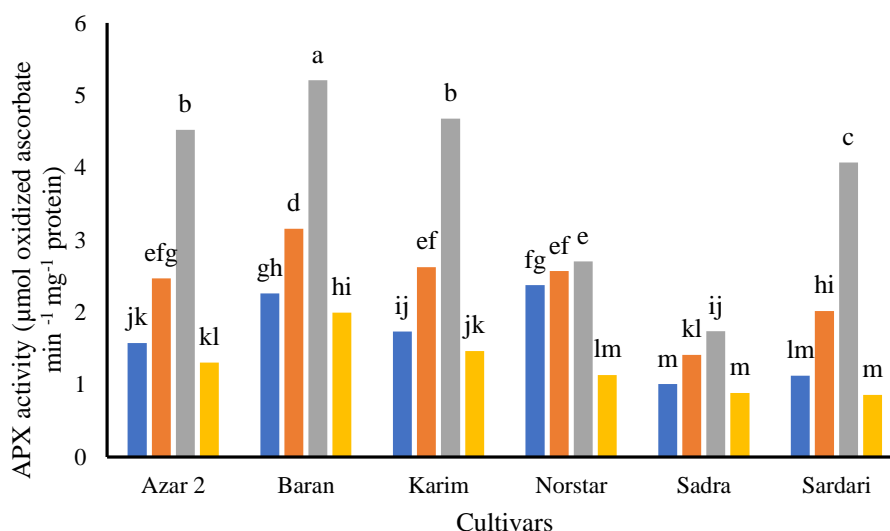
Figure 6. Guaiacol peroxidase (GPX) enzyme activity change in wheat cultivars [from left to right, columns represent: control, acclimated plants (4°C), acclimated plants under cold stress (-5°C), and non-acclimated plants under cold stress (-5°C), respectively]. Different letters indicate a significant difference among the means based on Duncan's multiple range test ( $P < 0.01$ ).

تحت تنش در گیاهان سازگار شده، GPX، با کاتالیز اکسیداسیون الکل‌های سینامیل که مرحله نهایی تولید لیگنین می‌باشد، در چوب شدگی نقش دارند. گیاهان برای جلوگیری از هدر رفت آب از طریق دیواره سلولی در تنش، سنتز لیگنین را افزایش می-دهند (Khaledian *et al.*, 2015)؛ بنابراین تحت تنش سرما، کاهش میزان خسارت‌های سلولی (نتایج MDA)، به دلیل هم تنظیمی فعالیت GPX با سایر آنزیم‌های حذف کننده ROSها بویژه  $H_2O_2$  می‌باشد که نقش مهمی در بهبود تحمل به تنش سرما دارد. این موضوع به پیچیدگی پاسخ‌های تحمل در گیاه گندم اشاره دارد، به طوری که فرضیه بهبود تحمل به تنش به وسیله تشدید فعالیت یک ژن را با چالش

افزایش فعالیت آنزیم GPX تحت تنش، مشارکت آن را در حذف ترکیبات ROS به موازات فعالیت سایر آنتی‌اکسیدان‌ها مانند CAT و APX نشان داد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم تحت تنش در گیاهان سازگار شده در رقم نورستار و کمترین میزان فعالیت در شرایط تنش در گیاهان سازگار نشده در ارقام باران، سرداری و کریم مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر نداشتند. تطابق این نتایج با داده‌های MSI و MDA نشان داد که به موازات فعالیت آنزیم‌های حذف کننده  $H_2O_2$ ، فعالیت GPX نیز در کاهش میزان خسارت در شرایط تنش در تمامی ارقام به خصوص رقم باران و نورستار مشارکت داشت. علاوه بر نقش موثر حذف  $H_2O_2$

گیاهان سازگار شده، میزان فعالیت آنزیم APX افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم به رقم باران در شرایط تنش در گیاهان سازگار شده و کمترین میزان آن نیز به ارقام سرداری و صدرا در شرایط تنش در گیاهان سازگار نشده اختصاص یافت (شکل ۷).

مواجه می‌کند. نتایج تجزیه واریانس میزان فعالیت آنزیم APX نشان داد که بین ارقام، سطوح تیماری و اثر متقابل آن‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم APX نشان داد که با کاهش دما در گیاهان سازگار شده و همچنین در شرایط تنش در



شکل ۷- تغییر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ارقام گندم، از چپ به راست ستون‌های هر رقم به ترتیب مربوط به گیاهان شاهد، گیاهان سازگار شده (دمای چهار درجه سانتی‌گراد)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما (دمای ۵- درجه سانتی‌گراد) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما (دمای ۵- درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد می‌باشد.

Figure 7. Ascorbate peroxidase (APX) enzyme activity change in wheat cultivars [from left to right, columns represent: control, acclimated plants (4°C), acclimated plants under cold stress (-5°C), and non-acclimated plants under cold stress (-5°C), respectively]. Different letters indicate a significant difference among means based on Duncan's multiple range test ( $P < 0.01$ ).

ببرند و تا حد زیادی سلول را از آسیب‌های ناشی از تنش محافظت کنند. افزایش فعالیت APX در شرایط تنش در تحقیقات فراوانی گزارش شده است (Turkan *et al.*, 2005; Terzi *et al.*, 2010; Saglam *et al.*, 2011; Nita & Grzybowski, 2016). فعالیت بالای APX نشان‌دهنده حفاظت بیشتر گیاه در برابر صدمات اکسایشی القا شده به‌وسیله تنش می‌باشد (Nita & Grzybowski, 2016). از طرف دیگر، محصول واکنش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) یعنی  $H_2O_2$ ، سوپراکسید فعالیت APX می‌باشد. بنابراین،

تحت تنش، بیشتر بودن فعالیت آنزیمی APX در رقم باران در مقایسه با نورستار، احتمالاً به فعالیت‌های موازی دیگر آنزیم‌های حذف‌کننده  $H_2O_2$  از جمله GPX اشاره دارد که تحت تنش سرما در نورستار بیشتر از باران بود. بنابراین به نظر می‌رسد که تحت تنش سرما، کاهش خسارت‌های سلولی در ارقام باران و نورستار، حاصل برآیند فعالیت‌های آنزیمی در مسیر حذف ROSها باشد. بنابراین این ارقام احتمالاً می‌توانند میزان بیشتری از ترکیبات ROS را که در اثر اعمال تنش در گیاهان تولید می‌شوند از بین

پایداری غشا و افزایش میزان مالون دی آلدئید سلول همراه بود. تحت شرایط تنش، دو رقم باران و نورستار از بیشترین میزان شاخص پایداری غشا (MSI) برخوردار بودند. همچنین این ارقام، بیشترین فعالیت آنزیم SOD، GPX و APX را در مقایسه با سایر ارقام از خود نشان دادند. تحت شرایط تنش در گیاهان سازگار نشده، محتوی پروتئین کل در تمامی ارقام کاهش یافت که این کاهش ممکن است از یک سو به دلیل کاهش سنتز پروتئین و از سوی دیگر به دلیل تخریب پروتئین‌ها در اثر واکنش با رادیکال‌های آزاد باشد (Kazemi Shahandashti & Maali-Amiri, 2018). در مقایسه دو تیپ بهاره و زمستانه، به نظر می‌رسد که هر دو تیپ در شرایط بدون تنش از میزان MDA، MSI، پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی تقریباً یکسانی برخوردار بودند، اما با کاهش دما و اعمال تنش، کاهش معنی‌داری در میزان پایداری غشا، پروتئین کل و افزایش معنی‌داری در میزان MDA اتفاق افتاد که میزان پاسخ‌ها، اشاره به ظرفیت ژنتیکی بالقوه ارقام زمستانه در مقایسه با ارقام بهاره داشت. از طرف دیگر در شرایط تنش در گیاهان سازگار شده، میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شده افزایش و همچنین شاخص‌های خسارت در تمامی این ارقام کاهش یافت که این نتایج، بیانگر نقش مهم سازگاری در تحمل به تنش سرما می‌باشد. بنابراین ارقام نورستار و باران می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی به‌عنوان والد در تحقیقات مربوط به سرما استفاده شوند و یا به‌عنوان ارقام متحمل به سرما وارد چرخه تولید شوند.

می‌تواند نقش سیگنال را برای القای APX ایفا کند (Faize *et al.*, 2011). فعالیت بیشتر APX باعث تجزیه بیشتر  $H_2O_2$  و تحمل بیشتر گیاه به تنش اکسایشی می‌شود. کاهش فعالیت آنزیم نیز می‌تواند به دلیل کاهش ROS باشد که در نهایت سنتز آنزیم را کاهش می‌دهد. در شرایط تنش، افزایش ترکیبات ROS می‌تواند با فعال کردن مسیرهای انتقال پیام باعث افزایش بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل APX، GPX و CAT و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها شود (Mittler, 2002).

نتایج یافته‌ها در این پژوهش نشان داد که فرآیند سازگاری با تغییر متابولیت‌های سلولی از جمله آنتی-اکسیدان‌های آنزیمی، به‌عنوان سازوکار انطباقی مهم ارقام گندم تحت تنش سرما محسوب می‌شود. این ساز و کارها در ارقام زمستانه و بهاره، متمایز از یکدیگر هستند. تغییر متابولیسم سلولی که تغییر متابولیت‌ها را به دنبال دارد، پیامد برنامه‌ریزی مجدد ژنوم در سلول‌های گیاهی است (Amini *et al.*, 2017). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نتیجه فرآیند سازگاری می‌تواند در خنثی‌سازی اثرات تنش اکسیداتیو کمک - کند؛ بنابراین کاهش خسارت‌های سلولی یا تعدیل آن‌ها، مهم‌ترین عامل در مقابله با تنش سرما در گیاهان محسوب می‌شود (Kazemi Shahandashti & Maali-Amiri, 2018)؛ نتایج MDA در این مطالعه، تایید کننده این موضوع بود. افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD، GPX و APX در تمامی ارقام به خصوص ارقام نورستار و باران نسبت به شرایط شاهد بیشتر بود. تغییر فعالیت این آنزیم‌ها در این ارقام معمولاً با کمترین تغییر در کاهش شاخص

## REFERENCES

1. Amini, S., Maali-Amiri, R., Mohammadi, R. & Kazemi-Shahandashti, S. S. (2017). cDNA-AFLP analysis of transcripts induced in chickpea plants by  $TiO_2$  nanoparticles during cold stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 39-49.
2. 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(1-2), 248-254.
3. Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E. & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal*, 90(5), 856-867.
4. Dionisio-Sese, M. L. & Tobita, S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135(1), 1-9.

5. Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M. J., Alcobendas, R., Artlip, T. & Hernandez, J. A. (2011). Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2599-2613.
6. Fowler, D. (2008). Cold acclimation threshold induction temperatures in cereals. *Crop Science*, 48, 1147-1154.
7. Gill, S. S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
8. Guo, Z. F., Ou, W. Z., Lu, S. Y. & Zhong, Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11-12), 828-836.
9. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Hossain, M., Mahmud, J., Rahman, A., Inafuku, M., Hirotsuke, O. & Fujita, M. (2017). Coordinated actions of glyoxalase and antioxidant defense systems in conferring abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 200.
10. Hassan, N. M., El-Bastawisy, Z. M., El-Sayed, A. K., Ebeed, H. T. & Alla, M. M. N. (2015). Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 179-188.
11. Heidarvand, L. & Maali-Amiri, R. (2013). Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology*, 170(5), 459-469.
12. Kazemi-Shahandashti, S. S. & Maali-Amiri, R. (2018). Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. *Journal of Plant Physiology*, 226, 123-135.
13. Kazemi-Shahandashti, S. S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A. & Ramezanzpour, 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(13), 1106-1116.
14. Khaledian, Y., Maali-Amiri, R. & Talei, A. (2015). Phenylpropanoid and antioxidant changes in chickpea plants during cold stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62(6), 772-778.
15. Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E. & Navari-Izzo, F. (1999). Anti-oxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology*, 119, 1091-1099.
16. Maali-Amiri, R., 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(3), 289-297.
17. Mohammadi, M., Kalateharabi, M., Hosseinpour, T. & Hassanpour Hosni, M. (2012). Release of new cultivar- karim, a new spring bread wheat cultivar for semi-tropical rainfed areas in Iran. *Seed and Plant Production*, 28 (2), 253-256.
18. Mahfoozi, S., Limin, A. E. & Fowler, D. B. (2001). Developmental regulation of low-temperature tolerance in winter wheat. *Annual of Botany*, 87, 751-757.
19. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
20. Monroy, A. F., Dryanova, A., Malette, B., Oren, D. H., Farajalla, M. R., Liu, W., Danyluk, J., Ubayasena L. W. C., Kane, K., Scoles, G. J., Sarhan, F. & Gulick, P. J. (2007). Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Molecular Biology*, 64(4), 409-423.
21. 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(2), 183-189.
22. NejadSadeghi, L., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Ramezanzpour, S. & Sadeghzade, B. (2014). Comparative analysis of physio-biochemical responses to cold stress in tetraploid and hexaploid wheat. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(1), 399-408.
23. Nita, M. & Grzybowski, A. (2016). The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior

- eye segments in adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 3164734, 23 pages. doi: 10.1155/2016/3164734.
24. 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(392), 2529-2540.
  25. Rostaii, M., Hassanpour Hosni, M., Esmailzad, H., Sadeghzadeh, D., Sadeghzadeh, B., Amiri, A., Eslami, R., Rezaii, R., Golkari, S., Soleimani, K., Abedi Asl, G., Rohi, E., Pashapour, H., Haghparast, R., Aghaee, M., Ahmadi, M. M., Daryae, A., Afshari, F., Torabi, M., Dehghan, MA., Mardokhi, V., Hoshyar, R., Dadrezaii, S. T. & Ata Hosseini, S. M. (2015). Baran a new winter bread wheat cultivar for dryland condition in cold and moderate regions of Iran. *Research Achievements for Field and Horticulture Crops*, 3(4), 233-242.
  26. Sağlam, A., Saruhan, N., Terzi, R. & Kadioğlu, A. (2011). The relations between antioxidant enzymes and chlorophyll fluorescence parameters in common bean cultivars differing in sensitivity to drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1), 60-68.
  27. Sairam, R. K. & Srivastava, G. C. (2001). Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): Variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 186(1), 63-70.
  28. Terzi, R., Sağlam, A., Kutlu, N., Nar, H. & Kadioğlu, A. (2010). Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Turkish Journal of Botany*, 34(1), 1-10.
  29. Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 50, 571-599.
  30. Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F. & Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1), 223-231.
  31. Winfield, M. O., Lu, C., Wilson, I. D., Coghill, J. A. & Edwards, K. J. (2010). Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 749-771.