"مجله علوم زراعی ایران"
جلد چهاردهم، شماره ۲ تابستان ۱۳۹۱

اثر دوره‌های کوتاه و طولانی مدت سرماسازگاری بر خصوصیات بیوشیمیایی دو رقم بهاره و زمستانه گندم نان (*Triricum aestivum* L.)

Effect of short and long terms cold acclimation on biochemical characteristics of spring and winter wheat (*Triricum aestivum* L.) cultivars

ارغوان علی سلطانی[۱]، هوشنگ علیزاده[۲]، سیروس محفوظی[۳] و فرنگیس خیالپرست[۴]

چکیده

علی سلطانی، ا.، ه. علیزاده، س. محفوظی و ف. خیالپرست. ۱۳۹۱. اثر دوره‌های کوتاه و طولانی مدت سرماسازگاری بر خصوصیات بیوشیمیایی دو رقم بهاره و زمستانه گندم نان (*Triricum aestivum* L.). **مجله علوم زراعی ایران. ۱٤(۲): ۱۲۰-۱۰۸.**

این آزمایش بمنظور مقایسه اثر دوره‌های کوتاه و طولانی مدت خوسرمایی بر خصوصیات بیوشیمیایی دو رقم گندم بهاره و زمستانه در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران در سال ۱۳۸۸ انجام گرفت. در این آزمایش میزان برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، قندهای احیا، محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها در دو رقم زمستانه (نوراستار) و بهاره (کوهدشت) گندم هنگامی که گیاهچه‌ها در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد بمدت صفر، ۳، ٦، ۱۲و ۲٤ ساعت و ۲ هفته تیمار شدند، اندازه‌گیری گردید. نتایج بررسی LT_{50} نشان داد که تنها رقم زمستانه نوراستار پس از دو هفته خوسرمایی توانست سرمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد را تحمل کند. در بیشتر موارد فعالیت آنزیم‌ها در مراحل اولیه سرما افزایش یافته، ولی پس از دو هفته خوسرمایی این روند کاهش یافت. افزایش میزان آنزیم‌ها در مراحل اولیه سرما نشان دهنده سمیت‌زدایی سریع گونه‌های فعال اکسیژن در کوتاه مدت است. با توجه به اینکه کلروفیل‌ها منبع تولید گونه‌های فعال اکسیژن هستند، کاهش محتوای کلروفیل در رقم نوراستار نشان می‌دهد که کاهش آن در طول خوسرمایی می‌تواند در تحمل به یخزدگی دخیل باشد. نتایج کلی این تحقیق نشان داد که هر دوی تیمارهای کوتاه و طولانی مدت خوسرمایی دارای اهمیت بوده و برخی از متابولیت‌ها در کوتاه مدت و برخی دیگر در طولانی مدت تاثیر گذار هستند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، کلروفیل، کاروتنوئیدها، گندم و LT_{50}.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۲۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. عضو انجمن علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران (مکاتبه کننده)
(پست الکترونیک:a_alisoltani@ut.ac.ir)
۲ و ۴- استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳- استادیار بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

www.SID.ir
Archive of SID

مقدمه

دمای پایین یکی از عوامل محیطی است که رشد و تولید را در گیاهان محدود می‌کند. در گیاهان میزان تحمل به یخزدگی با قرار گرفتن در معرض دماهای پایین (بدون یخبندان) افزایش می‌یابد که به آن فرآیند خوسرمایی گویند (Pearce, 1999). خوسرمایی فرآیندی است که با تغییرات متعددی در سطوح فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی همراه است. ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در تنش سرما می‌تواند باعث صدمه به غشای سلول شود، بنابراین یکی از عوامل اصلی صدمه گیاهان در دمای پایین ذکر شده است (Jian *et al*., 1999). گیاهان برای جلوگیری از افزایش خسارت این گونه ترکیبات دارای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز می‌باشند (Anjum *et al*., 2010).

دمای پایین باعث افزایش میزان ترکیبات فنلی و پلی‌فنل اکسیدازها می‌شود. نتایج بررسی‌ها نشان‌دهنده نقش مهم این آنزیم‌ها در پاکسازی سلول از گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند. در این میان بیشترین نقش برعهده آنزیم‌هایی چون پراکسیداز، کاتالاز و پلی فنل اکسیداز می‌باشد (Yadeghari *et al*., 2008; Yong *et al*., 2008). نتایج تحقیقات انجام شده نشان دهنده این است که ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس به تنش دارای فعالیت بالاتر آنزیم پراکسیداز هستند که باعث تجزیه بیشتر پراکسید هیدروژن و کاهش خسارت‌های ناشی از انباشته شدن آن می‌شوند (Scalet *et al*., 1995).

محتوای کلرفیل برگ یک عامل مهم تعیین کننده در تعیین ظرفیت فتوسنتزی برگ است (Yordanova and Popova, 2007). کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش باعث کاهش خسارت به سیستم فتوسنتزی گیاه به علت کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. در شرایط تنش، کاهش میزان کلروفیل و پایین بودن مقادیر آن در اثر کاسته شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، می‌تواند یک صفت مطلوب باشد (Kranner *et al*., 2002). یوردانوا و پوپوا (Yordanova and Popova, 2007) گزارش کردند که میزان پراکسیداز و متابولیت‌های دیگر در گندم پس از ۴۸ ساعت تیمار سرما افزایش و بعد از ۷۲ ساعت کاهش یافتند. نتایج برخی تحقیقات دیگر نیز نشان دهنده افزایش میزان آنتی اکسیدانت‌ها و سایر متابولیت‌ها در دوره کوتاه خوسرمایی و کاهش آن‌ها در طولانی مدت می‌باشد (Janda *et al*., 2007; Yadeghari *et al*., 2008). فعالیت برخی از پروتئین‌های تنظیم‌کننده در دوره‌های کوتاه خوسرمایی انجام گرفته و روی عمل بسیاری از متابولیت‌ها و پروتئین‌های دیگر تاثیر می‌گذارد (Yang *et al*., 2005)، بنابراین دستورزی ژن‌های آن‌ها می‌تواند راهکار مناسبی برای افزایش تحمل همه جانبه گیاه نسبت به تنش سرما باشد. لیکن یافتن پروتئین‌های تنظیم‌کننده و زمان تظاهر آن‌ها دشوار و نیازمند صرف وقت و هزینه بسیار است (Anjum *et al*. 2010). این پژوهش با هدف مطالعه اثر دوره‌های کوتاه و طولانی مدت خوسرمایی روی برخی صفات بیوشیمیایی گندم برای شناسایی تاثیر این صفات در تحمل به یخزدگی و همچنین یافتن زمان‌هایی که این متابولیت‌ها بیشترین تاثیر و فعالیت را دارند، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۸۸ در گلخانه گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. در این تحقیق از دو رقم بهاره (کوهدشت) و زمستانه (نوراستار) گندم نان استفاده شد. بذور این دو رقم از بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شدند. گلدان‌ها تا مرحله ۳-۴ برگی در اتاقک رشد (دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ثابت در شب و روز، شدت تابش ۳۰۰ میکرومول بر

www.SID.ir

مترمربع بر ثانیه، رطوبت ۹۵ درصد و طول روشنایی ۸/۱۶ ساعت به ترتیب در روز و شب) نگهداری شدند و پس از آن گیاهان تحت تیمار خوسرمایی داده شدند. شرایط اتاقک برای طول دوره خوسرمایی همانند دوره رشد بوده و تفاوت فقط در دمای اعمال شده (۳ درجه سانتی‌گراد) بود. نمونه‌برداری در زمان‌های صفر (شاهد بدون خوسرمایی) ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت و همچنین ۲ هفته پس از خوسرمایی انجام گرفت. نمونه‌ها در فریزر ۸۰- تا زمان استخراج ترکیبات مورد نظر نگهداری شدند.

میزان تحمل به سرما بر اساس روش پیشنهادی لیمین و فولر (Limin and Fowler, 1988) با تعیین LT_{50} در شرایط کنترل شده اندازه‌گیری شد. برای تعیین LT_{50}، از هر تکرار برای ۶ دمای انجماد مورد نظر (۳- ، ۵- ، ۷- ، ۹- ، ۱۱- و ۱۳- درجه سانتی‌گراد)، تعداد ۲۸ عدد بوته از محیط کنترل شده (دمای ۳ درجه سانتی‌گراد) تهیه و با قیچی قسمت های اضافی ریشه و ساقه حذف شد و طوقه گیاه برای آزمون انجماد آماده شد. نمونه‌ها (طوقه گیاهان) در داخل ظروف آلومینیومی حاوی ماسه مرطوب به فریزر (قابل برنامه ریزی) منتقل شدند. هنگامی که دمای فریزر به ۳- درجه سانتی‌گراد رسید، دمای فریزر با سرعت ۲ درجه سانتی‌گراد بر ساعت کاهش یافت. با رسیدن دمای فریزر به دمای انجماد مورد نظر، نمونه‌ها یک ساعت در این دما ثابت نگه داشته شدند، سپس نمونه ها از فریزر خارج و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت (برای خروج از وضعیت انجماد) نگهداری و روز بعد در گلدان کشت شده و به گلخانه با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و پس از سه هفته تعداد بوته‌های زنده شمارش شدند. درصد بقا از طریق نسبت بوته‌های زنده به کل بوته‌ها محاسبه شد. سپس از طریق رسم منحنی درصد بقا در مقابل دماهای انجماد، میزان LT_{50} نمونه‌ها تعیین شد.

برای تهیه عصاره آنزیمی از روش (Chang and Koa, 1988) استفاده شد. بدین ترتیب که نیم‌گرم برگ تازه از هر تیمار کاملا پودر شده و سپس ۶ میلی لیتر بافر استخراج (حاوی Tris-HCl ۰/۰۵ مولار (pH= ۷)، $MgCl_2$ ۳ میلی مولار و EDTA یک میلی مولار) به آن اضافه شد. در مرحله بعد محلول بمدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. پس از آن محلول روشناور برای اندازه‌گیری آنزیم ها برداشته شد. کلیه آنزیم ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV 180) سنجش شدند.

فعالیت کاتالاز به روش ابی (Aebi, 1984) اندازه‌گیری شد که بر پایه تجزیه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز استوار است. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH= ۷/۰)، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره بود. پس از اضافه کردن عصاره، کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

فعالیت پراکسیداز به روش چانس و مهلی (Chance and Maehly, 1955) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بر پایه تشکیل تتراگویاکول از گویاکول در حضور پراکسید هیدروژن و آنزیم گویاکول است. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH= ۷/۰)، ۳ میکرولیتر گویاکول ۲۰ میلی مولار، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره بود. پس از اضافه کردن عصاره، افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت دو دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

برای این منظور از روش سینگ و همکاران (Singh *et al*., 1999) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH= ۷/۰)، ۲۰ میکرولیتر پیروگالول ۲۰ میلی مولار، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار و ۵۰

www.SID.ir

میکرولیتر عصاره بود. پس از اضافه کردن عصاره، افزایش جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدت دو دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

بدین منظور از روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده شد. جهت این کار پروتئین‌های استاندارد (آلبومین سرم گاوی) با غلظت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شده و میزان جذب نور در نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. معادله خط رگرسیونی با استفاده از داده‌ها محاسبه و منحنی مربوطه ترسیم گردید. پس از تعیین معادله خط رگرسیون برحسب نمونه، مقادیر ۵ تا ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌های گیاهی به ۳ میلی‌لیتر محلول برادفورد اضافه کرده و مقادیر جذب در ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر به دست آمد. برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شده و میانگین آنها در معادله خط رگرسیون حاصله قرار داده شدند و سرانجام مقدار پروتئین کل محلول نمونه‌ها محاسبه شد.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها

برای این منظور از روش تغییر یافته آرنون (Arnon, 1949) استفاده شد. بدین ترتیب که ۰/۵ گرم از هر نمونه برگ تازه را در پنج میلی لیتر استون ۸۰ درصد هموژن گردید و بعد از سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، مایع روشناور برداشته شد و حجم آن با استن به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت کلروفیل a، b و مجموع آنها و کاروتنوئیدها با استفاده از روابط زیر بدست آمد:

(۱) میلی گرم در گرم بافت :کلروفیل a = 12.7 (A 663) − 2/69 (A 645) × V/1000 × W

(۲) میلی گرم در گرم بافت :کلروفیل b = 22.9 (A 645) − 4/69 (A 663) × V/1000 × W

(۳) میلی گرم در گرم بافت :کلروفیل کل = 20.2 (A 645) + 8/02 (A 663) × V/1000 × W

(۴) میلی گرم در گرم بافت :کاروتنوئیدها = 7.6 (A 480) − 14.9 (A 510) × V /1000 × W

در روابط بالا V حجم نهایی نمونه استخراج شده و W وزن تر نمونه است.

قندهای احیا به روش میلر (Miller, 1972) اندازه‌گیری شدند. بدین طریق که ۶ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به نیم‌گرم برگ پودر شده اضافه گردید و عصاره از صافی عبور داده شد. میزان قند به کمک استاندارد گلوکز محاسبه شد. به این صورت که میزان صفر ، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ میلی‌گرم در لیتر گلوکز در ۶ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد حل شد. در ادامه به سه میلی‌لیتر از عصاره بدست آمده و همچنین استانداردهای گلوکز، سه میلی‌لیتر دی نیترو سالیسیلیک اسید یک درصد اضافه گردید. پس از قرار دادن نمونه‌ها در آب جوش به مدت پنج دقیقه، زمانی که نمونه هنوز گرم بود، ۴۰ درصد سدیم پتاسیم تارتارات به آن افزوده شد. سپس جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میانگین ۳ تکرار از هر نمونه در معادله خط رگرسیون حاصل از استانداردهای گلوکز قرار داده شد و میزان قندهای احیا محاسبه گردید.

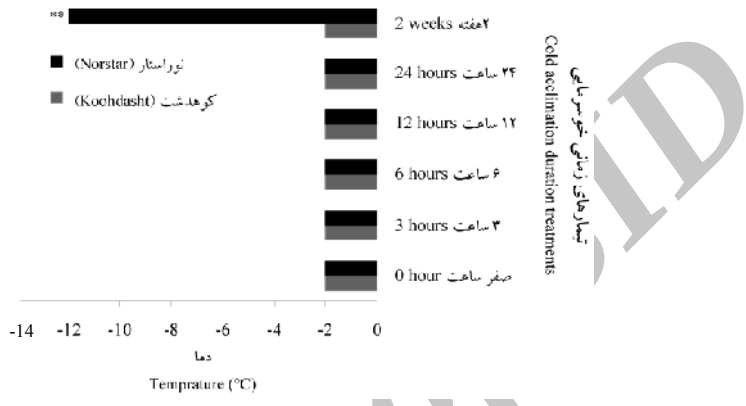
برای تعیین تنوع بین تیمارها، میانگین و انحراف معیار مشخص گردید و میانگین‌ها با آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت. به منظور تعیین ارتباط بین صفات

www.SID.ir

اندازه‌گیری شده از همبستگی پیرسون استفاده شد. انجام تمامی تجزیه‌ها با استفاده از نرم افراز SPSS (نسخه ۱۱) انجام شد و نمودارها با نرم افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اندازه‌گیری LT_{50} نشان داد که اگرچه رقم زمستانه (نوراستار) پس از دو هفته خوسرمایی توانست سرمای حدود ۱۲- را تحمل کند، ولی در دوره‌های کوتاه خوسرمایی تحمل نشان نداد. رقم بهاره (کوهدشت) نیز چه در دوره‌های کوتاه و چه طولانی مدت خوسرمایی، نسبت به سرما تحمل نداشتند (شکل ۱).



شکل ۱- تاثیر تیمارهای زمانی خوسرمایی بر LT_{50} در دو رقم بهاره (کوهدشت) و زمستانه (نوراستار) گندم (**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد)

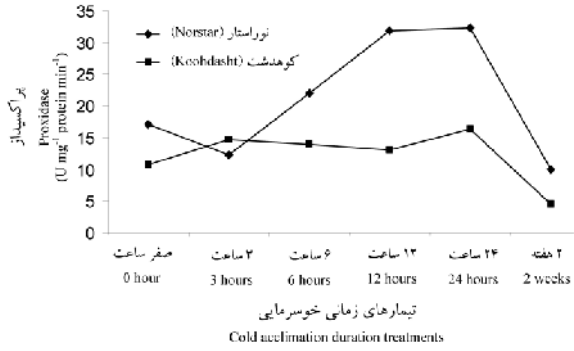
Fig. 1. The effect of cold acclimation duration treatments on LT_{50} in spring (Koohdasht) and winter (Norstar) wheat cultivars (**: Significant at 1% probability level)

دمای پایین تغییرات معنی‌داری را در مورد هر ۳ آنزیم اندازه‌گیری شده نشان داد. میزان پراکسیداز پس از افزایش و رسیدن به حداکثر خود پس از ۲۴ ساعت تیمار خوسرمایی، پس از دو هفته در هر دو رقم کاهش یافت (شکل ۲). فعالیت پراکسیداز در رقم زمستانه نوراستار به طور معنی‌دار بیشتر از رقم بهاره کوهدشت بود. نتایج مطالعات انجام شده نشان دهنده این است که ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس به تنش دارای فعالیت بالاتر آنزیم پراکسیداز هستند که باعث تجزیه بیشتر پراکسید هیدروژن و کاهش خسارت‌های ناشی از آن می‌شوند (Scalet *et al*., 1995).

روند تغییرات پلی‌فنل‌اکسیداز نیز تقریبا مشابه آنزیم پراکسیداز بود. بیشترین افزایش فعالیت برای رقم نوراستار و کوهدشت بترتیب ۳ ساعت و ۱۲ ساعت پس از تیمار خوسرمایی بود (شکل ۳).

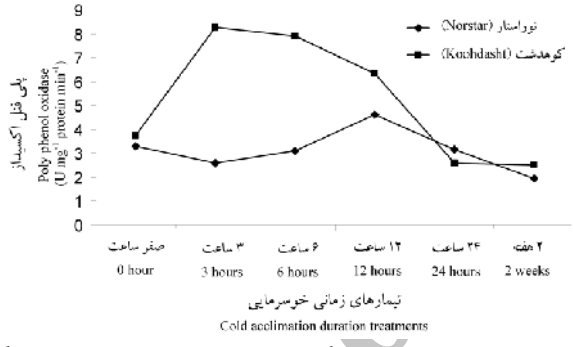
روند تغییر کاتالاز در طول مدت خوسرمایی دارای نوسان زیادی در هر دو رقم بود. اما همانند دو آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز، پس از دوره طولانی مدت خوسرمایی این میزان کاهش یافت (شکل ۴). آنزیم کاتالاز یک آنزیم مهم برای تجزیه پراکسید هیدروژن تولید شده در شرایط تنش است به طوری که در شرایط تنش ایزوفرم‌های جدیدی از آن تولید شده و میزان ایزوفرم‌های قبلی نیز افزایش می‌یابد (Srivalli *et al*., 2003). نتایج برخی مطالعات نشان‌دهنده بالاتر بودن فعالیت این آنزیم در ارقام

www.SID.ir



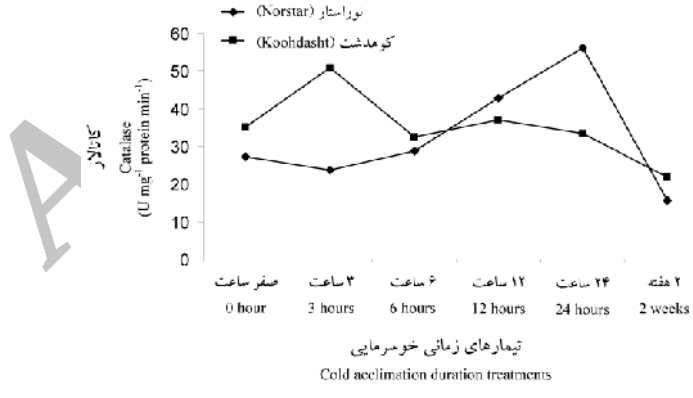
شکل ۲- میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز در دو رقم گندم در تیمار دمایی ۳ درجه سانتی‌گراد برای مدت‌های زمانی مختلف

Fig. 2. Changes in peroxydase activity in two wheat cultivars in 3°C treatment for different durations



شکل ۳- میزان تغییرات آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در دو رقم گندم در تیمار دمایی ۳ درجه سانتی‌گراد برای مدت‌های زمانی مختلف

Fig. 3. Changes in polyphenol oxidase activity in two wheat cultivars in 3°C treatment for different durations



شکل ۴- میزان تغییرات آنزیم کاتالاز در دو رقم گندم در تیمار دمایی ۳ درجه سانتی‌گراد برای مدت‌های زمانی مختلف

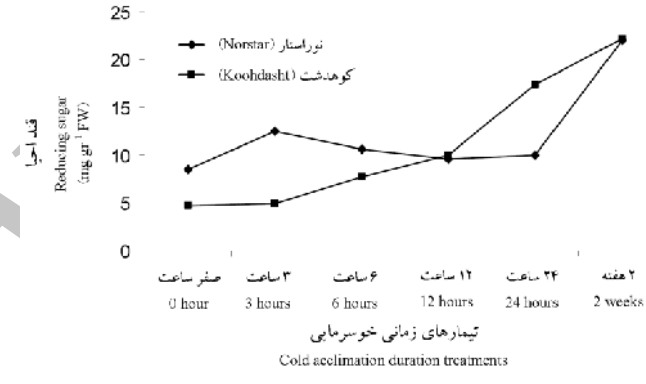
Fig. 4. Changes in catalase activity in two wheat cultivars in 3°C treatment for different durations

متحمل به تنش است (Khanna-Chopra and Selote, 2007; Srivalli *et al*., 2003). در پژوهشی بین ارقام گندم مورد مطالعه در شرایط تنش خشکی تفاوت بسیار معنی‌داری از لحاظ محتوای کلروفیل a، b و کل و پراکسیداز وجود داشت. نتایج مطالعات دیگر نشان داده است که گونه‌های

www.SID.ir

مختلف جوی بومی ایران از لحاظ محتوای کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئیدها، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز با هم متفاوت بوده‌اند (Ebrahimi *et al*., 2009). نتایج آزمایش‌های مختلف نشان داده است که نمی‌توان روند خاصی را برای این تغییرات در نظر گرفت، ولی در بسیاری آزمایش‌ها افزایش این آنزیم‌ها در شرایط تنش گزارش شده است (Anjum *et al*., 2010). یوردانوا و پوپوا (Yordanova and Popova, 2007) گزارش کردند که میزان پراکسیداز و متابولیت‌های دیگر در گندم پس از ۴۸ ساعت تیمار سرما افزایش و بعد از ۷۲ ساعت کاهش یافتند. نتایج آزمایش آن‌ها و برخی محققان نشان دهنده افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در کوتاه مدت و کاهش آن‌ها در طولانی مدت می‌باشد (Yadeghari *et al*., 2008; Yong *et al*., 2008). افزایش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در کوتاه مدت می‌تواند به دلیل افزایش سریع گونه‌های فعال اکسیژن باشد و کاهش آن‌ها پس از طولانی مدت می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که سیستم دفاعی گیاه توانسته است تنش اکسیداتیو را کنترل کند (Okuda 1991).

میزان قندهای احیا در هر دو رقم گندم دارای روند افزایشی بود (شکل۵). به نظر می‌رسد که قندها نقش مهمی در خوسرمایی گیاهان ایفا می‌کنند، به طوری که تصور می‌شود تجمع بسیار زیاد قندها در تنظیم اسمزی و تجمع نه چندان بالای قندها در انتقال پیام نقش دارند (Annikki and Palva, 2006). واگوجفالوی و همکاران (Vagujfalvi *et al*., 1999) افزایش میزان قندها را نه تنها در رقم متحمل، بلکه در رقم حساس گندم در طول دوره خوسرمایی گزارش نمودند. آن‌ها اظهار نمودند که علاوه بر قندها عوامل دیگری مانند پروتئین‌های تنظیم‌کننده، پرولین و سایر متابولیت‌ها در افزایش تحمل به یخزدگی در طول خوسرمایی دخیل هستند. بنابراین تجمع قندها در رقم حساس به تنهایی نمی‌تواند تحمل به یخزدگی را ایجاد نماید.



شکل ۵- میزان تغییرات قندهای احیا در دو رقم گندم در تیمار دمایی ۳ درجه سانتی‌گراد برای مدت‌های زمانی مختلف

Fig. 5. Changes in reducing sugars in two wheat cultivars in 3°C treatment for different durations

میزان کلرفیل a در رقم نوراستار پس از تیمار دو هفته خوسرمایی دارای کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد بود، در حالی که این میزان در رقم کوهدشت دارای افزایش معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین میزان کلرفیل a در شاهد نوراستار (۳/۱۷۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و تیمار ۶ ساعت خوسرمایی کوهدشت (۳/۵۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود. بیشترین میزان کاروتنوئیدها در تیمار ۲ هفته خوسرمایی نوراستار

www.SID.ir

جدول۱- محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های گندم رقم نوراستار و کوهدشت در تیمار دمایی ۳ درجه سانتی‌گراد برای مدت‌های زمانی مختلف

Table1. Photosynthetic pigment contents in Norstar and Koohdasht wheat cultivars in 3°C treatment for different durations

زمان‌های خوسرمایی Cold acclimation duration		ارقام گندم Wheat cultivars		کلروفیل a Chlorophyll a (mg g^{-1} FW)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg g^{-1} FW)	کلروفیل a+b Chlorophyll a+b (mg g^{-1} FW)	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg g^{-1} FW)
0 hour	صفر ساعت(شاهد)	Norstar	نوراستار	3.172ab	1.0950a	4.266b	1.0490ef
0 hour	صفر ساعت(شاهد)	Koohdasht	کوهدشت	2.003fg	1.0510a	3.053de	0.7630g
3 hours	۳ ساعت	Norstar	نوراستار	2.703bcd	1.1220a	3.824bcd	1.0470ef
3 hours	۳ ساعت	Koohdasht	کوهدشت	2.352def	1.8720a	4.223b	1.4370ab
6 hours	۶ ساعت	Norstar	نوراستار	1.566g	1.3220a	2.887e	1.2090cd
6 hours	۶ ساعت	Koohdasht	کوهدشت	3.559a	1.9380a	5.496a	1.3160bc
12hours	۱۲ ساعت	Norstar	نوراستار	2.602cde	1.1220a	3.724bcd	0.9557f
12hours	۱۲ ساعت	Koohdasht	کوهدشت	2.823bcd	1.4790a	4.301b	1.1030de
24hours	۲۴ ساعت	Norstar	نوراستار	3.018bc	0.8598a	3.876bc	1.0440ef
24hours	۲۴ ساعت	Koohdasht	کوهدشت	2.112ef	1.1570a	3.268cde	0.8216g
2weeks	۲ هفته	Norstar	نوراستار	2.340def	1.1090a	3.449cde	1.5130a
2weeks	۲ هفته	Koohdasht	کوهدشت	2.640cd	1.1450a	3.784bcd	1.0770def

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

Mean in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using Duncan,s Multiple Range Test

جدول ۲- همبستگی بین صفات بیوشیمیایی در گیاهچه‌های گندم رقم نوراستار و کوهدشت در تیمارهای زمانی خوسرمایی

Table 2. Correlation between biochemical characteristics in Norstar and Koohdasht wheat cultivars under cold acclimation duration treatments

		تحمل به یخ‌زدگی (LT_{50})	پراکسیداز Peroxidase	پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase	کاتالاز Catalase	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کاروتنوئیدها Carotenoids
Peroxidase	پراکسیداز	-0.034 ns	1					
Polyphenol oxidase	پلی فنل اکسیداز	-0.026 ns	0.033 ns	1				
Catalase	کاتالاز	-0.028 ns	0.548**	0.432**	1			
Chlorophyll a	کلروفیل a	-0.133 ns	0.66 ns	0.315*	0.088 ns	1		
Chlorophyll b	کلروفیل b	-0.145 ns	0.182 ns	0.412**	0.052 ns	0.210 ns	1	
Carotenoids	کاروتنوئیدها	0.133 ns	-0.179 ns	0.319*	-0.108 ns	0.157 ns	0.435 ns	1
Reducing sugars	قندهای احیا	0.542**	-0.341 ns	-0.510**	-0.476 ns	-0.113 ns	-0.304*	0.141 ns

ns: Not significant

ns: غیرمعنی‌دار

* and **: Significant 5% and 1% probability levels, respectively

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

Archive of SID

www.SID.ir

(۱/۵۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و تیمار ۳ ساعت خوسرمایی کوهدشت (۱/۴۳۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود (جدول ۱). کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش باعث کاهش خسارت به سیستم فتوسنتزی به علت کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. در شرایط تنش، کاهش میزان کلروفیل و پایین بودن مقادیر آن به علت کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌تواند یک صفت مطلوب باشد (Kranner *et al*., 2002). یوردانوا و پوپوا (Yordanova and Popova, 2007) کاهش میزان کلروفیل در گیاهچه‌های گندم که تحت سرمای ۳ درجه سانتی‌گراد بمدت ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار گرفته بودند را گزارش کردند. آن‌ها اظهار نمودند که کاهش میزان کلروفیل در پاسخ به سرما می‌تواند نشان دهنده اثرات تنش اکسیداتیو باشد.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل همبستگی داده‌ها نشان داد که بین دو آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز رابطه معنی‌داری وجود نداشت، ولی بین آنزیم کاتالاز و دو آنزیم دیگر همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت (جدول۲). عدم وجود رابطه بین این دو آنزیم احتمالا به علت نوسان تغییرات آن‌ها در دوره کوتاه مدت خوسرمایی می‌باشد. به نظر می‌رسد که بین کاهش هر دو آنزیم پس از دو هفته خوسرمایی همبستگی وجود داشته باشد (شکل‌های ۲ و ۳). نتایج برخی آزمایش‌ها عدم وجود همبستگی معنی‌دار، برخی همبستگی مثبت و برخی همبستگی منفی این دو آنزیم را گزارش کرده‌اند دلیل خاصی برای عدم وجود رابطه در این آزمایش‌ها گزارش نشده است (Honty *et al*., 2008; Arnnok *et al*., 2010). بعلاوه پلی‌فنل اکسیدازها و پراکسیدازها در اثر اکسیداسیون ترکیبات فنلی، پراکسید هیدروژن، تولید می‌کنند و افزایش آن‌ها منجر به تولید بیشتر پراکسید هیدروژن می‌شود (Arnnok *et al*., 2010). از آنجایی که کاتالاز یک آنزیم مهم برای مقابله با صدمات پراکسید هیدروژن تولید شده است، با افزایش پراکسید هیدروژن، کاتالاز نیز افزایش می‌یابد (Srivalli *et al*., 2003). بنابراین وجود همبستگی مثبت بین آنزیم کاتالاز و دو آنزیم دیگر طبیعی به نظر می‌رسد. این نتایج با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارند (Ebrahimi *et al*., 2009; Anjum *et al*., 2010)، ولی رابطه‌ای بین میزان عملکرد و آنزیم‌های مذکور گزارش نشده است. در این آزمایش همبستگی مثبت و معنی‌داری بین محتوای کلروفیل و آنزیم پلی‌فنل اکسیداز وجود داشت (جدول۲). از آنجایی که کلروفیل‌ها منبع تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند، کاهش آن‌ها منجر به کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه کاهش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌شود (Kranner *et al*., 2002). تحمل به یخزدگی تنها با میزان قندهای احیا همبستگی مثبت و معنی‌دار بود (جدول۲). همبستگی بین قندها و تحمل به یخزدگی نشان‌دهنده نقش مهم آن‌ها در فرآیند خوسرمایی می‌باشد (Vagujfalvi *et al*., 1999). عدم همبستگی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با تحمل به یخزدگی نه تنها در این آزمایش (جدول۲) بلکه در آزمایش‌های دیگر نیز نشان داده شده است (Janda *et al*., 2003; Apostolova *et al*., 2008). عدم وجود رابطه بین آنزیم‌ها و تحمل به یخزدگی نشان دهنده عدم تاثیر این آنزیم‌ها در فرآیند خوسرمایی نمی‌باشد، در واقع افزایش این آنزیم‌ها در کوتاه مدت نشان دهنده نقش موثر آن‌ها در سمّیت زدایی گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد، زیرا گونه‌های فعال اکسیژن خیلی سریع با قرار گرفتن گیاه در معرض سرما افزایش می‌یابند و به دنبال افزایش سریع آن‌ها، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت نیز افزایش می‌یابند (Okuda 1991).

نتیجه گیری

افزایش آنزیم‌های اندازه‌گیری شده در مراحل ابتدایی خوسرمایی می‌تواند گویای واکنش سریع گیاه

www.SID.ir

در این فرآیند و در واقع بیان سریع ژن‌های تنظیم‌کننده این آنزیم‌ها و دیگر متابولیت‌هایی که در این فرآیند دخیل هستند، باشد. نتایج این آزمایش نشان داد که تجمع قندها در کوتاه مدت آغاز شده و در دوره‌های طولانی به میزان بالایی می‌رسد. در واقع هر دوی تیمارهای کوتاه و طولانی مدت خوسرمایی دارای اهمیت بسیار هستند، بطوریکه برخی از متابولیت‌ها در کوتاه مدت و برخی دیگر در طولانی مدت فعالیت می‌کنند. در رابطه با اهمیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در فرآیند خوسرمایی گزارش شده است که سیستم دفاعی آنتی‌اکسیداتیو یکی از زمینه‌های امید بخش در تحقیقات برای چندین سال آینده خواهد بود و محققان می‌توانند با بهره‌گیری از پیشرفت‌های اخیر بیوتکنولوژی و با تغییر در سطوح تنظیم‌کننده‌های آنتی‌اکسیدانت‌ها فعالیت خود را در جهت افزایش کارایی دفاع آنتی‌اکسیداتیو و در نهایت افزایش تحمل گیاه به یخزدگی متمرکز کنند (Anjum *et al*. 2010). تیمارهای کوتاه خوسرمایی که در آن‌ها آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت دارای بیشترین فعالیت بودند، می‌توانند بعنوان کاندیداهای زمانی برای یافتن تنظیم‌کننده‌های این آنزیم‌ها معرفی شوند. پیشنهاد می‌شود برای یافتن زمان مناسب فعالیت متابولیت‌های دیگر، خصوصاً متابولیت‌هایی که عمل آن‌ها در طولانی مدت کامل می‌شود، تیمارهای زمانی را بطور پیوسته، در طولانی مدت مورد مطالعه قرار داد. نتایج این آزمایش می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینه شناسایی تنظیم‌کننده‌ها در اختیار محققان قرار دهد و پایه‌ای برای تحقیقات بعدی باشد.

منابع مورد استفاده

References

Aebi, H. **1984**. Catalase in vitro. Meth. Enzymol. 105: 121–126.

Anjum, N. A., S. Umar and M. T. Chan. 2010. Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants. Springer Dordrecht Heidelberg. 265–291.

Annikki, W. and E. T. Pavla. **2006**. Molecular control of cold acclimation in trees. Physiol. Plantarum. 127: 167–181.

Apostolova, A., R. Yordanova and L. Popova. **2008**. Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars. Genet. Appl. Plant Physiol. 34: 281–294.

Arnnok, P., C. Ruangviriyachai, R. Mahachai, S. Techawongstien and S. Chanthai. **2010**. Optimization and determination of polyphenol oxidase and peroxidase activities in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) pericarp. Int. Food Res. J. 17: 385–392.

Arnon, D. T. **1949**. Copper enzymes in isolation chloroplast phenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physol. 24: 1–15.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248–254.

Chance, A. and A. C. Maehly. 1955. Assay of catalases and proxidase. Meth. Enzymol. 2: 764–775.

Chang, C. J. and C. H. Koa. 1988. H_2O_2 metabolism during sense scence of rice leaves changes in enzyme activities in light and darkness. Plant Growth Regul. 25: 11–15.

Ebrahimi, A., M. R. Naghavi and M. Sabokdast. **2009**. Evaluation and comparision of chlorophyll content, carotenoid, protein and enzyme in different barley species native in Iran. Iran. J. Agri. Sci. 40: 77–89. (In

www.SID.ir

Persian with English abstract.)

Honty, K., E. Sardi, E. Stefanovits-Banyai and M. Toth. 2008. Frost induced changes in enzyme activities and carbohydrate content in the spurs of some pear cultivars during the dormancy. Int. J. of Hort. Sci. 14 (1–2): 41–44.

Janda, T., G. Szalai, R. Rios-Gonzalez, O. Veisz and E. Paldi. 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. Plant Sci. 164: 301–306.

Janda. T., G. Szalai, K. Lesko, R. Yordanova, S. Apostol and L. Popova. 2007. Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. Phytochem. 68: 1674–1782.

Jian, L. C., J. H. Li and W. P. **Chen. 1999**. Cytochemical localization of calcium and Ca^{+2}_ATPase activity in plant cells under chilling stress: A comparative study between the chilling sensitive maize and the chilling insensitive winter wheat. Plant Cell Physiol. 10: 1061–1071.

Khanna-Chopra, R. and D. S. Selote. 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than susceptible wheat cultivar under field conditions. Environ. Exp. Bot. 60: 276–283.

Kranner, I., R. P. Beckett, S. Wornik, M. Zorn and H. W. Pfeifhofer. 2002. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidants status. Plant J. 31: 13–24.

Limin, A. E. and D. B. Fowler. 1988. Cold hardiness expression in interspecific hybrids and amphiploids of the *Triticeae*. Genome. 30: 361–365.

Miller, G. L. 1972. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31: 426–428.

Okuda, T., Y. Matsuda, A. Yamanaka and S. Sagisaka. **1991**. Abrupt increase in the level of hydrogen-peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. Plant Physiol. 97: 1265– 1267.

Pearce, R. S. 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. Plant Growth Regul. 29: 47-76.

Scalet, M., R. Federice, M. C. Guido and F. Manes. 1995. Peroxidase activity and polyamine changes in response to ozon and simulated acid rain in Aleppo pine needles. Environ. Exp. Bot. 35: 417–425.

Singh, N., R. Singh, K. Kulwinder and H. **Singh. 1999**. Studies of the physico-chemical properties and polyphenol oxidase activity in seeds from hybrid sunflower (*Helianthus annuus*) varieties grown in India. Food Chem. 66: 241–247.

SPSS Inc. **2001**. SPSS 11.0 for Windows, USA, Inc. (http://www.spss.com)

Srivalli, B., G. Sharma and R. Khanna-Chopra. 2003. Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress following by recovery. Physiol. Planta. 119: 503–512.

Vagujfalvi, A., I. Kerepesi, G. Galiba, T. Tischner and J. Sutka. 1999. Frost hardiness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat. Plant Sci. 144: 85–92.

Yadeghari, L. Z., R. Heidari and J. Carapetian. **2008**. Cold pretreatment-induced changes in antioxidant enzyme activities and relative water content and soluble sugars in shoots and roots of soybean seedlings. J. Biol. Sci. 3(1): 68–73.

www.SID.ir

Yang, T., L. Zhang, T. Zhang, H. Zhang, S. Xu and L. An. 2005. Transcriptional regulation network of cold-responsive genes in higher plants. Plant Sci. 169: 987–995.

Yong, Z., T. Hao-Ru and L. Ya. 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. World J. Agri. Sci. 4(4): 458–462.

Yordanova, R. Y. and L. P. Popova. 2007. Effect of exogenous treatment with salicylic acid on photosynthetic activity and antioxidant capacity of chilled wheat plants. Genet. Appl. Plant Physiol. 33(3-4): 155–170.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of short and long terms cold acclimation on biochemical characteristics of spring and winter wheat (*Triricum aestivum* L.) cultivars

Alisoltani, A.[1], H. Alizadeh[2], S. Mahfoozi[3] and F. Khayalparast[4]

ABSTRACT

Alisoltani,A., H. Alizadeh, S. Mahfoozi and F. Khayalparast. 2012. The effect of short and long terms cold acclimation on biochemical characteristics of spring and winter wheat (*Triricum aestivum* L.) cultivars**. Iranian Journal of Crop Sciences. 14(1):108-120. (In Persian).**

To evaluate the effect of short and long term cold acclimation on biochemical characteristics of spring and winter wheat (*Triricum aestivum* L.) cultivars, an experiment was conducted in completely randomized design with three replications in greenhouses of the University of Tehran in 2009. The quantity of some antioxidant enzymes, reducing sugars, chlorophyll and carotenoids contents in two wheat winter (Norstar) and spring (Koohdasht) cultivars were measured and recorded, when seedling were acclimated at 3°C for 0, 3, 6, 12, 24 hours and two weeks. Results of LT_{50} showed that only Norstar winter cultivar was able to tolerate -12°C after two weeks of cold acclimation. In most cases the activities of enzymes were increased during the short term and then decreased after long term of cold acclimation. The increase of enzymes in the initial phases of cold acclimation represented that reactive oxygen species were rapidly detoxified during the short term cold acclimation. Since chlorophylls are the source of production of reactive oxygen species, the decrease in chlorophyll content in Norstar showed that this attribute, during cold acclimation, can be involved in freezing tolerance. In conclusion, results of this experiment indicated that both short-and long-term cold acclimation are important, however some metabolites are effective during the short term while others are effective during long term.

Key words: Antioxidant enzymes, Chlorophyll content, Carotenoids and LT_{50} and Wheat.

Archive of SID

Received: August, 2010 Accepted: September, 2011

1- M.Sc Student, Agricultural and Natural Resources Campus, The University of Tehran, Karaj, Iran (Corresponding author) (Email: a_alisoltani@ut.ac.ir)

2 & 4- Assistant prof., Agricultural and Natural Resources Campus, The University of Tehran, Karaj, Iran

3- Associate Prof., Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

www.SID.ir