

بررسی برخی شاخص‌های خسارت سلولی تحت تنش سرما در نخود جم

سیده صنم کاظمی شاهاندشتی^{۱*}، رضا معالی‌امیری^۲، حسن زینالی خانقاه^۳

۱، ۲، ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار پردیس کشاورزی و منابع

طبیعی دانشگاه تهران

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Sanam.kazemi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۹)

چکیده

در این تحقیق پاسخ‌های القاء شده نخود جم در دمای سازگاری و تنش سرما از طریق اندازه‌گیری شاخص خسارت برگ (ELI)، پراکسیداسیون چربی‌های غشاء یا مالون دی آلدئید (MDA) و فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان کاتالاز ارزیابی شد. گیاهان پس از قرارگیری در شرایط سازگاری به سرما آمادگی بیشتر در رویارویی با تنش سرمای بالای صفر و به طور واضح‌تر در دمای زیر صفر نشان دادند. نتایج نشان داد که تنوع بالقوه در شدت و سرعت پاسخ‌های سلولی در این ژنوتیپ وجود دارد و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (به‌عنوان سیستم دفاع سلولی) و نتایج MDA و ELI (به‌عنوان شاخص خسارت) با هم در تعامل هستند. بررسی گیاهان در فاز بهبودی نشان داد که افزایش تحمل تحت شرایط دمای پایین ویژگی موقت بوده و پس از گذر از تنش سرما از طرفی فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافته و از طرف دیگر میزان خسارت به غشاهای سلولی نیز کاهش می‌یابد. بنابراین، اعمال تیمار سازگاری، سبب افزایش تحمل گیاه به تنش سرما شده و توان زیستی گیاه را در تنش‌های سرمای افزایش داده و سبب بهبودی گیاه حتی پس از تنش‌های سرمای شدید می‌شود.

واژه‌های کلیدی

آنزیم کاتالاز،
پراکسیداسیون چربی‌های غشاء،
سازگاری به سرما،
نخود زراعی،
هدایت الکترولیتی غشاء.

مقدمه

رشد و پراکنش گیاهان در طبیعت تحت تاثیر انواع تنش‌های زنده و غیرزنده قرار دارد. گیاهان به‌طور متناوب با انواع تنش‌های محیطی مثل دمای پایین، تنش اسمزی، خشکی، غرقابی، گرما، تنش اکسیداتیو و سمیت فلزات سنگین مواجه هستند. دما، عامل محیطی مهمی است که از فصلی به فصل دیگر تغییر می‌کند و دستخوش نوسانات غیرقابل پیش‌بینی و زودگذر روزانه است. گیاهان، به‌عنوان موجودات غیر متحرک از یک طرف باید قادر به درک نوسانات و تغییرات فصلی دما بوده و از طرف دیگر در این شرایط توانایی پاسخ و حفظ توازن دمایی مناسب برای سلول داشته باشند (۲۸ و ۵).

Archive of SID

پلاسمایی تغییر می‌کند. به نظر می‌رسد سلول، تنش سرما را از طریق پروتئین‌های موجود در غشاء درک کرده و از طریق آن‌ها سیگنال‌هایی را از محیط به شبکه‌های انتقال سیگنال رسانده و در نهایت منجر به تنظیم بیان ژن‌ها می‌شود. تغییر شیمیایی و ژنتیکی چربی‌های غشایی اثر مشابهی در بیان ژن‌های موثر در سازگاری به سرما سلول‌ها دارد. وضعیت فیزیکی چربی‌های غشایی به‌طور مستقیم در تنظیم فعالیت پروتئین‌های متصل به غشاء مثل ناقلین مولکول‌های کوچک، کانال‌های یونی، پروتئین کینازهای گیرنده و پروتئین‌های حسگر نقش دارد. تنش سرما سبب القای فرآیندهای اکسیداتیو سلول‌های گیاهی شده که این فرآیندها به‌وسیله گونه‌های اکسیژن فعال^۳ (ROS) آغاز می‌شود. ROSها مولکول‌های متعددی در سلول شامل رادیکال‌های اکسیژن و پراکسید اکسیژن و مولکول‌های واکنش‌پذیر دیگر در سلول است که در اندامک‌های سلولی مثل میتوکندری و کلروپلاست در اثر عدم توازن چرخه‌های الکترونی حاصل شده و واکنش‌پذیری زیادی با ماکرومولکول‌های سلولی مثل پروتئین‌ها، چربی‌ها، DNA دارد و بنابراین موجب خسارت به بخش‌های مختلف از جمله غشاهای سلولی می‌شود. تنش سرما نفوذ پذیری غشا را به‌وسیله خروج الکترولیت‌ها از بافت‌ها افزایش می‌دهد (۳۰، ۲۹، ۲۶، ۲۳، ۲۰، ۱۹، ۱۶، ۱۲، ۶). چربی‌های غیراشباع غشاهای سلولی در اثر این گونه‌های اکسیژن فعال دچار اکسیداسیون شده که این ویژگی می‌تواند به‌عنوان نشانگر بیوشیمیایی در برآورد خسارت غشاء در اثر تنش سرمایی مفید باشد. قابل ذکر است که این تغییرات همگی قبل از آن که سبب تغییرات مورفولوژیکی در برگ شوند، قابل برآورد هستند. در ردیابی تغییرات، میزان گونه‌های اکسیژن فعال نیز همواره در اثر میزان بیان ژن‌ها و در نتیجه پروتئین‌های متعدد آنتی‌اکسیدان تنظیم می‌گردد. بنابراین اندازه‌گیری این پروتئین‌ها می‌تواند در بررسی و کنترل خسارت‌های ناشی از اکسیژن فعال مهم باشد (۲۲).

به‌دلیل پیچیدگی عوامل محیطی که اغلب چندین تنش هم‌زمان سلول‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند و تنوع پاسخ‌های سلولی که بسته به طبیعت تنش (مدت و شدت تنش) تغییر می‌کند، بررسی دینامیکی پاسخ‌های بیوشیمیایی سلول تحت تنش

یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های دمایی گیاهان، توانایی آن‌ها در افزایش تحمل به تنش سرما در اثر گذراندن دوره‌ای از دمای پایین غیر یخبندان، قبل از هجوم سرمای انجماد زمستان، است. این فرآیند سازگاری به سرما^۱ نامیده می‌شود. در طبیعت، دماهای غیر یخبندان در اواخر پاییز و اوایل زمستان محرک‌های اصلی سازگاری به سرما هستند گرچه دوره نوری نیز در این پاسخ موثر است (۱۰). بررسی اثر سازگاری به سرما گیاهان در القای تحمل به تنش سرما می‌تواند راهکار موثری در انجام کشت پاییزه گیاهانی مثل نخود (*Cicer arietinum* L.)، که کشت بهاره آن در ایران مرسوم است، باشد. در حال حاضر با توجه به مشکلات کشت بهاره نخود از جمله خشکی و کمبود رطوبت آخر فصل، کشت پاییزه این محصول با توجه به بارندگی و وجود رطوبت در پاییز و زمستان منطقی به نظر می‌رسد. لیکن سرما عامل محدود کننده در توسعه کشت پاییزه نخود در بیشتر نواحی کشور است و می‌تواند اثرات مخربی مثل یخ‌زدگی را نیز به همراه داشته باشد بنابراین سازگاری به سرما می‌تواند سازوکار مناسبی در رفع این محدودیت باشد. در نتیجه شناخت سازوکارهای گیاهان در فرآیند سازگاری در جهت ارتقای تحمل گیاهان به سرما یکی از تلاش‌های محققان خواهد بود (۱). 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، افزایش تجمع اسید آبسزیک (ABA)، تغییر در ترکیب لیپیدی غشاء، تغییر در ترکیب محلول‌های سازگار (مثل پرولین و بتائین و پلیول و قندهای محلول) و افزایش آنتی‌اکسیدان‌های سلولی است. این تغییرات، به‌طور مستقیم در تحمل به تنش درگیر بوده و بنابراین به عنوان عناصر فعال^۲ در تحمل به تنش‌های محیطی به‌خصوص تنش سرما محسوب می‌شوند. بنابراین در بسیاری از موارد ارتباط منطقی بین تغییرات در سطح مولکولی این گروه با تغییرات فیزیولوژی و مورفولوژی وجود دارد (۳۲ و ۳۱). یکی از این تغییرات مهم، تغییر در غشای پلاسمایی است و در اثر تنش‌های محیطی از جمله تنش سرما و اسمزی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی چربی‌های غشای

^۱ Cold acclimation^۲ Functional element^۳ Reactive oxygen species (ROS)

Archive of SID

سازگار شده به تنش سرما (پس از ۵ روز سازگاری به سرما در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد) اعمال گردید (شکل ۱).

اندازه گیری تحمل به سرما براساس قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی گیاه

تحمل به سرما بر اساس شاخص هدایت الکتریکی^۲ بافت های خسارت دیده نخود بعد از انجام تیمار سرما اندازه گیری شد (۱۱).

در اندازه گیری میزان هدایت الکترولیتی از برگ های کاملاً سالم بخش میانی ساقه استفاده شد. هشتاد میلی گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ده سی سی آب مقطر انتقال یافت.

جهت جذب بهتر آب با استفاده از پمپ خلا هوای درون محیط خارج شده و لوله های آزمایش به مدت سی دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند. سپس میزان هدایت الکترولیتی نمونه ها (EC₁)

با استفاده از دستگاه EC متر (Inolab, آلمان) قرائت شد. محتوی لوله آزمایش پس از قرار گرفتن در حمام آب جوش (۹۵ درجه سانتی گراد) به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه قرارگیری در دستگاه شیکر و میزان هدایت الکترولیتی (EC₂) تعیین شد و در نهایت

مقدار شاخص خسارت براساس فرمول $I = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$ محاسبه گردید (۲۲).

اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس مالون دی آلدئید (MDA)

میزان اکسیداسیون گیاهچه ها براساس تجمع مالون دی آلدئید برگ با استفاده از تیوباربتوریک اسید تعیین شد (۱۹). ۲۵۰ میلی گرم نمونه برگگی از بخش میانی ساقه در دو میلی لیتر بافر استخراج

(TCA یک درصد) همورژنه شده و به مدت پانزده دقیقه در سانتریفوژ به سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. یک میلی لیتر از سوپرناتانت به دست آمده با دو میلی لیتر محلول تیوبار

بتوریک اسید (TBA پنج درصد) حاوی اسید تری کلرواستیک (TCA بیست درصد) مخلوط و در حمام آب جوش (۹۵ درجه سانتی گراد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از سانتریفوژ با

سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه، چگالی^۳ نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu 160) تعیین شد. غلظت مالون دی آلدئید براساس

سرما ضروری به نظر می رسد. تاکنون آزمایشات متعددی برای تعیین میزان خسارت ناشی از تنش سرما طراحی و اجرا شده است. با توجه به این که اولین بخش سلول که در اثر تنش سرما آسیب می بیند، غشا است. در این تحقیق ابتدا اثر سازگاری به سرما و تنش سرمایی در غشای پلاسمایی و همچنین اثر آن بر فعالیت آنزیم کاتالاز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

شرایط رشد گیاهان

در این پژوهش از نخود کابلی جم استفاده شده که به طور وسیع در کشور کشت می شود. بذور با هیپوکلریت سدیم (وایتکس تجاری ده درصد) به مدت ده دقیقه ضد عفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در پتری دیش با رطوبت لازم قرار گرفتند. پتری دیش ها در شرایط بدون نور و دمای ۲۳

درجه سانتی گراد قرار گرفتند (۱۳) و پس از جوانه زنی، گیاهچه ها به گلدان ها انتقال یافت. انتقال غیر مستقیم گیاهان به خاک به دلیل اهمیت سبز شدن یکنواخت آن ها و اجرای دقیق تیمارهای آزمایش در نمونه ها بود. گلدان ها در اتاقک رشد با نور

۲۰۰ میکرومول بر انیشتن و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شدند. نمونه گیری از برگ گیاهچه های سه-

هفته ای انجام شد. گیاهچه های دو تا سه هفته ای به دو قسمت تقسیم شدند بخشی از آن ها در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد و شرایط فوق الذکر نگهداری شده و بخشی دیگر به دمای ۱۰ درجه سانتی گراد جهت سازگاری به سرما انتقال یافتند. به منظور

سازگاری به سرما، گیاهچه ها ۵ روز در این دما نگهداری شدند. سپس، گیاهچه ها به دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز انتقال یافتند. بعد از اتمام دوره تنش و جهت بررسی فرآیند بهبود، گیاهچه ها به دمای ۲۳ درجه سانتی گراد انتقال یافتند.

بررسی بهبود گیاهچه ها به مدت ۵ روز انجام گرفت. جهت مطالعات تکمیلی و بررسی پاسخ گیاهچه ها، تیمار دمایی ۱۰-

درجه سانتی گراد نیز انجام گرفت. این تنش بر گیاهچه های نگهداری شده در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد و گیاهچه های

نگهداری شده در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد و گیاهچه های

² Electrolyte Leakage Index

³ Optical density

¹ Recovery

Archive of SID

آن از ۲۰/۳۱ به ۳۳/۳۵ دیده شد. این افزایش بیانگر آن است که گیاه تنش دمای پایین را درک کرده و پاسخ های متعدد در سطوح مولکولی و فیزیولوژیکی را آغاز کرده است. اما با این حال این افزایش میزان ELI در روز نخست به معنای خسارت تلقی نمی شود زیرا میزان شاخص خسارت ۵۰ درصد بافت گیاهی به عنوان مرگ گیاه در اثر عامل تنش می باشد (۲۶). بنابراین ژنوتیپ های با ELI کمتر، تحمل بیشتری به شرایط تنش نشان می دهند. ادامه تیمار سازگاری به سرما سبب کاهش میزان ELI شد به طوری که در روز سوم میزان ELI به ۱۴/۷۶ رسید. کاهش میزان ELI در روزهای دوم و سوم ممکن است مربوط به فعالیت مکانیسم های تحمل گیاه باشد که با فعالیت اکسیداسیونی و خصوصیات و ترکیب شیمیایی غشاهای سلولی در ارتباط باشد (۲۱ و ۱۷). معالی - امیری و همکاران (۲۰۰۷) تغییر خصوصیات غشای پلاسمایی سلول را عامل مهم تحمل به سرما در گیاهان بیان کردند. بعد از کاهش دما، ساختار غشای سلولی موقتاً تغییر وضعیت می دهد که بر قابلیت نفوذپذیری غشاء تاثیر می گذارد. تغییر موقت وضعیت غشاء منجر به تحریک مکانیسم هایی می گردد که نتیجه آن افزایش بیان ژن های تنظیم کننده در غشاهای سلولی است. یکی از ژن های درگیر در این فرایند، ژن های دساتوراز^۳ است که نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع را افزایش می دهند و منجر به برگشت سیالیت غشاء به حالت مایع می شود. بنابراین کاهش میزان ELI در روز سوم و چهارم ممکن است در اثر پایداری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی غشاء باشد که باید جزئیات بیشتر آن مطالعه شود. بررسی داده ها نشان داد که در روز چهارم میزان ELI تغییر چندانی نداشت اما میزان این شاخص در روز پنجم افزایش یافت که به نظر می رسد این افزایش در اثر کاهش فعالیت مکانیسم های دفاعی گیاه در دوره های طولانی تر تنش سرمایی و در نتیجه افزایش میزان خسارت به سلول باشد. این وضعیت از ویژگی های گیاهان حساس به تنش سرمایی است که دوره های طولانی مدت تنش سبب افزایش خسارت و معمولاً مرگ گیاه می شود که به طور حتم شدت تنش نیز از عوامل مهم در آن خواهد بود. اما همانطور که می دانید دمای سازگاری به سرما معمولاً بیشتر از دمای حداقل رشد گیاه بوده و در محدوده فیزیولوژیکی قرار دارد

فرمول $C = D/E$ محاسبه شد که D اشاره به چگالی و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی متر $1/056 \times 105$) دارد (۳۳ و ۱۸).

استخراج پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز استخراج آنزیم و سنجش آن براساس روش وناکر و همکاران (۱۹۹۸) (۲۴)، با اعمال تغییرات جزئی صورت گرفت. تمامی مراحل استخراج در نمونه ها روی یخ انجام شد. نمونه ها در هاون چینی، به کمک ازت مایع سائیده و پودر شدند. ۲/۵ میلی لیتر بافر استخراج ۱ را به ۰/۲۵ گرم از پودر اضافه کرده و ورتکس شدند. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی، عصاره آنزیمی، برای سنجش کمی آنزیم کاتالاز، استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر و به روش ابی^۲ (۱۹۸۴) (۲) اندازه گیری شد. برای سنجش فعالیت آنزیم ها از دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت کشور ژاپن در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده شد. مواد استفاده شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH ۷) ۵۰ میلی مولار، ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳/۴۱ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی گرم پروتئین محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری

داده های آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS 10.0 مورد تجزیه و تحلیل آماری بر اساس آزمون t قرار گرفته و میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن مقایسه شدند (جدول ۱).

نتایج و بحث

گیاه نخود معمولاً به عنوان گیاه بهاره در نواحی خاورمیانه کشت و کار می شود و در تنش های دمای پایین اغلب خسارت می بیند (۲۵). نتایج این تحقیق نشان داد که میزان خسارت غشایی بر اساس شاخص ELI در تیمارهای دمایی مورد آزمایش، تفاوت معنی داری داشتند. انتقال گیاهچه ها از دمای ۲۳ درجه سانتی گراد به دمای سازگاری به سرما ۱۰ درجه سانتی گراد سبب ایجاد نوسانات میزان ELI گردید به طوری که از روز اول افزایش میزان

¹ Extraction buffer² Aebi³ Desaturase

Archive of SID

رسد که سازگاری به سرما سبب آمادگی سلول های گیاه در مواجهه با تنش های دمایی شدیدتر شده است. گیاهان تنش دیده در ۴ درجه سانتی گراد جهت بررسی میزان ELI در فاز بهبودی به دمای ۲۳ درجه سانتی گراد انتقال یافتند که نتایج تایید کننده داده ها در جهت کاهش میزان ELI تا میزان ۳۶/۲۹ و بهبود وضعیت گیاه بود. این بدان معنی است که گیاه نخود توانسته است در مواجهه با دمای ۱۰ درجه توانایی لازم جهت تحمل به دمای ۴ درجه سانتی گراد و تنش های شدیدتر ۱۰- درجه سانتی-گراد را کسب کند. نتایج فوق الذکر اغلب مربوط به بررسی قابلیت نفوذپذیری غشاء پلاسمایی در تیمارهای دمایی بود. در مطالعه واکنش غشاء کلروپلاستی به تنش سرما از روش MDA استفاده شد. آزمون مقایسه میانگین داده ها اختلاف معنی داری بین تیمارهای دمایی نشان داد که بیانگر تنوع بالقوه پاسخ های گیاه تحت تنش های دمایی می باشد (جدول ۱). تجزیه نتایج MDA در دمای ۲۳ و ۱۰- درجه سانتی گراد روندی مشابه با نتایج ELI را نشان داد به طوری که تیمار سازگاری به سرما سبب کاهش میزان MDA نسبت به گیاهان سازگار نشده گردید. میزان کم پراکسیداسیون غشا در سلول های برگ عامل مهم تحمل گیاهان به تنش های سرما محسوب می شود (۸ و ۱۸). لپورت و همکاران گزارش کردند که ۵۰-۸۰ درصد کاهش عملکرد در اثر محدودیت در فتوسنتز است و تنش سرما با آسیب به غشاهای کلروپلاستی می تواند بیشترین خسارت را به فتوسنتز و راندمان تولید گیاه وارد کند (۱۵ و ۱۴). تیمار دمایی ۴ درجه سانتی گراد در گیاهان سازگار شده ابتدا سبب کاهش شدید میزان MDA گردید که اهمیت سازگاری به سرما در گیاه را تایید می کند اما ادامه اعمال این تیمار سبب افزایش میزان خسارت به گیاه شد. بیشترین میزان خسارت MDA در روز سوم در دمای ۴ درجه سانتی گراد بدست آمد که مشابه نتایج ELI در این روز بود. یعنی گیاه سازگار شده قادر به پاسخ در دماهای پایین بالای صفر درجه در زمان های کوتاه مدت^۱ می باشد. در فاز بهبودی نیز نتایج حاکی از کاهش میزان MDA در سطح سلول می باشد که بیانگر بهبود پاسخ های گیاه در جهت مقابله با تنش سرمایی است. تحقیقات نشان می دهند که در گیاهان در طی تنش اکسیداتیو از جمله تنش سرما، گونه های فعال

یعنی در این شرایط دمایی گیاه هنوز می تواند به دلیل فعال کردن مکانیسم های دفاعی با شرایط نامساعد محیطی مقابله کرده و به رشد خود (حتی با تاخیر زمانی) ادامه دهد. بنابراین افزایش ELI تا حد ۵۰ درصد خسارت های جزئی و معمولاً برگشت پذیر پس از قرارگیری در دماهای فیزیولوژیکی ایجاد می کند. نتایج نشان داد که تیمار سازگاری به سرما می تواند گیاه را از آسیب های احتمالی تنش سرما حفظ نماید. با توجه به اینکه در بسیاری از نقاط تحت کشت گیاه نخود در ایران، دما در فصل پاییز معمولاً به طور ناگهانی افت نکرده و الگویی مشابه سازگاری به سرما ایجاد می کند، ممکن است کشت پاییزه نخود نیز به عنوان یک راهکار مهم در مقابله با تنش خشکی و کمبود آب در کشت بهاره محسوب شود و بدین ترتیب به افزایش دوره رشد گیاه و افزایش عملکرد منجر شود. اهمیت وجود سازگاری به سرما هنگامی دقیق تر بیان شد که گیاهان سازگار شده در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد و گیاهان رشد یافته در شرایط دمایی ۲۳ درجه سانتی-گراد به دمای ۱۰- درجه به عنوان تیمار دمای زیر صفر انتقال یافتند. همان گونه که ذکر شد، دمای اعمال شده (۱۰ درجه سانتی-گراد)، دمای سازگاری گیاهچه های نخود به سرما است و انتظار می رود گیاهان پس از قرارگیری در این شرایط، آمادگی بیشتری در رویارویی با دمای پایین تر نشان دهند. به منظور بررسی بیان ژن مورد نظر در دمای پایین تر، مطالعات تکمیلی با قرار دادن گیاهچه های سازگار شده در دمای ۱۰- درجه سانتی گراد نیز انجام شد. نتایج نشان داد که میزان ELI گیاهان سازگاری نشده از ۲۰/۳۱ به ۵۶/۶۵ رسید که بیانگر آسیب شدید غشایی و مرگ فیزیولوژیکی گیاه است در حالی که اعمال این تیمار دمایی در گیاهان سازگار شده سبب افزایش میزان ELI تا ۴۲/۸۸ گردید که در فاز بهبودی، این گیاهان قابلیت برگشت پذیری خواهند داشت. بنابراین سازگاری به سرما به عنوان یکی از عوامل مهم تحمل گیاه می تواند سبب کاهش خسارت به غشای سلولی تلقی شود. جهت بررسی تکمیلی پاسخ های گیاه گیاهان سازگار شده به تنش سرمایی بالای صفر (۴ درجه سانتی گراد) نیز انتقال یافتند. نتایج نشان داد که انتقال گیاهان سازگار شده به دمای ۴ درجه سبب افزایش موقت و ابتدایی میزان ELI تا ۴۸/۳۷ شد و پس از آن کاهش میزان ELI در روز سوم مشاهده شد. بنابراین به نظر می-

¹ Short-term

Archive of SID

گیاهان سازگار شده است که به دنبال افزایش میزان ROSها در سلول انجام می‌گیرد. مقایسه داده‌های آنزیم CAT، ELI و MDA نشان می‌دهد که آنزیم CAT مهم‌ترین آنزیم شرکت‌کننده در حذف ROSها می‌باشد و نتایج این آزمایش تحقیقات قبلی ما در خصوص اینکه CAT قادر به کاهش خسارت سلولی پس از تجمع ROSها است را تایید کرد (۱). در فاز بهبودی به سبب کاهش میزان خسارت سلولی (مشخص شده در نتایج ELI و MDA)، فعالیت آنزیم کاتالاز نیز کاهش یافت یعنی سلول فعالیت خود را پس از دوره سرما حفظ کرده و پاسخ‌های معقول به محیط می‌دهد و سازگاری به سرما عامل مهم در ایجاد توازن جدید و پاسخ‌های سلولی است. نتایج انتقال گیاهان به دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد به عنوان فاز شدید تنش سرما در گیاهچه‌ها مطالعه شد. انتقال گیاهان سازگار شده به دمای زیر صفر ۱۰- درجه سانتی‌گراد سبب افزایش نسبی میزان فعالیت آنزیم نسبت به شرایط سازگاری شد در حالی که در گیاهان سازگار نشده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به کم‌ترین میزان خود رسید. این نتایج نشان می‌دهد که در دماهای زیر صفر افزایش فعالیت مکانیسم‌های تخریب پروتئینی از یک طرف و کاهش فعالیت مکانیسم‌های سنتز پروتئینی از طرف دیگر، سبب روند رو به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است. در گیاهان سازگار شده به علت ایجاد تطابق نسبی و موقتی این وضعیت محسوس نبوده اما در عوض در گیاهان سازگار نشده تغییرات فعالیت آنزیمی شدید می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که پاسخ سریع به تنش سرما و در نتیجه آن کاهش خسارت در گیاه نخود می‌تواند در مدت زمان کوتاهی پس از شروع سازگاری به سرما آغاز شود که این مدت کوتاه می‌تواند گیاهچه‌های نخود را برای مقابله با اثرات تنش آماده کند. در طول فازهای سازگاری به سرما و تنش سرما میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (به‌عنوان سیستم دفاع سلولی) و نتایج MDA و ELI (به‌عنوان شاخص‌های خسارت) با هم در تقابل بودند. بررسی گیاهان در فاز بهبودی نشان داد که افزایش تحمل تحت شرایط دمای پایین ویژگی موقت بوده و پس از گذر از تنش سرما به علت کاهش خسارت به غشاهای سلولی فعالیت آنزیم کاتالاز نیز کاهش یافت اما با توجه به وجود تغییرات در مکانیسم‌های متعدد پاسخ سلولی لزوم بررسی‌های گسترده در سطوح پروتئینی و فیزیولوژیکی-

اکسیژن (ROS) تجمع می‌یابند. سمیت با اکسیژن ویژگی ذاتی زندگی هوازی بوده تا جایی که حدود یک درصد اکسیژن مصرفی گیاهان به‌منظور تولید گونه‌های فعال اکسیژن تغییر می‌یابد (۳ و ۷). ROS با اکسیداسیون ترکیبات سلولی از جمله پروتئین و چربی-های غشاء و اندامک‌های سلولی سبب خسارت به آن‌ها می‌شود به‌طوری که مطالعه آن‌ها امروزه به عنوان رخداد‌های تغییرپذیر در دوره‌های کوتاه زمانی تلقی می‌شود و مطالعه این مسئله در فهم مکانیسم‌های تحمل به تنش‌های دمایی پایین بسیار ارزشمند است. در عوض گیاهان، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی خود را بعنوان یک سیستم دفاعی در مقابله با تنش اکسیداتیو افزایش می‌دهند و بدین طریق از تجمع و خسارت ROSها جلوگیری می‌کنند. بنابراین پیشنهاد شده که دلیل اصلی خسارت تنش اکسیداتیو، ناتوانی سیستم‌های دفاعی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد که بدین ترتیب در این قسمت فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بررسی شد. پراکسید هیدروژن (H_2O_2) یکی از مهم‌ترین ROSها، علاوه بر نقش تخریبی به علت طول عمر طولانی‌تر آن نسبت به سایر ROSها، به‌عنوان سیگنال سلولی در جهت تحریک سیستم‌های دفاعی محسوب می‌شود. یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در حذف H_2O_2 کاتالاز بوده که در شرایط تنش‌های کوتاه مدت (چندین ساعت تا یک روز) سریع‌ترین پاسخ‌ها را در سلول نشان می‌دهد (۴ و ۱). انتقال گیاهچه‌ها به دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد ابتدا سبب کاهش میزان فعالیت این آنزیم نسبت به دمای ۲۳- درجه سانتی‌گراد شد که منطقی به نظر می‌رسد. زیرا فعالیت آنزیم‌ها علیرغم حضورشان در سلول تحت تنش سرما کاهش می‌یابد و در نتیجه ممکن است ROSها سبب ایجاد خسارت به غشاهای سلولی شوند. نتایج ELI و MDA نیز در این آزمایش تایید کننده این مطلب است. اما در روز سوم سازگاری، میزان فعالیت آنزیم CAT بعد از تطابق نسبی سلول با شرایط دمایی افزایش یافت و در نتیجه میزان خسارت سلولی به کمترین مقدار خود رسید. بنابراین به نظر می‌رسد فعالیت آنزیمی CAT و نتایج MDA، ELI با هم در تقابل هستند. با ورود گیاهان سازگار شده به دمای ۴- درجه سانتی‌گراد، میزان فعالیت آنزیم سیر صعودی گرفت که به نظر می‌رسد بیانگر سنتز بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله کاتالاز در وضعیت توازن جدید سلولی

منابع

۱. نظری م.ر، معالی امیری ر، رمضانپور س.س. ارزیابی کمی الگوی بیان ژنهای بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکوزیداز تحت تنش سرما در گیاه نخود، ژنتیک نوین. ۱۳۸۹: شماره ۴: ۷۰-۵۹
2. Abei H. Catalase invitro methods in enzymology 1984; 105, 121-126.
3. Asada K, Takahashi M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ. Photoinhibition. Elsevier Science Publishers, The Netherlands 1987; 227-287.
4. Bettaieb T, Mahmoud M, Galarreta J, et al. Relation between the Low Temperature Stress and Catalase Activity in Gladiolus Somaclones (Gladiolus grandilrorus Hort.). Sci. Hort 2007; 113, 49-51.
5. Browse J and Xin Z. Temperature sensing and cold acclimation. Physiology and metabolism 2001; 4, 241-246.
6. Carratu L, Franceschelli S, Pardini CL, et al. Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93, 3870-3875.
7. Chaitanya KV, Sundar D, Masilamani S, et al. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. Plant Growth Regulation 2001; 00, 1-6.
8. Deryabin AN, Dubinina IM, Burakhanova EA, et al. Influence of yeast-derived invertase gene expression in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature. Thermal Biology 2005; 30, 73-77.
9. Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. 1. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. Arch. Biochem. Biophys 1968; 125, 189-215.
10. Heidarvand L., Maali Amiri R. What Happens in Plant Molecular Responses to Cold Stress. Acta Physiol. Plant 2010; 32, 419-431.
11. Hepburn HA, Naylor REL, Stokes DT. Electrolyte Leakage from Winter Barley Tissue as Indicator of Winter Hardiness Ann. Appl. Biol 1986; 108, 164-165.
12. Horvath I, Glatz A, Varvasovszki V, et al. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in Synechocystis PCC 6803: identification of hsp17 as a bfluidity geneQ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95, 3513-3518.
13. Kaur G, Kumar S, Nayyar H, et al. Cold Stress Injury during the Pod-Filling Phase in Chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects on Quantitative and Qualitative Components of Seeds. Journal of Agronomy and Crop Sciences 2008; 194, 457-464.
14. Kingston-Smith AH, Harbinson J, Williams J. Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. Plant Physiology 1997, 114, 1039-1046.
15. Leport, L., Turner, N.C., French, R.J., Barr, M.D., Duda, R., Davies, S.L., Tennant, D. F. & Siddique, K.H.M. (1999). Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a mediterranean-type environment. European Journal of Agronomy, 11, 279-291.
16. Los DA, Murata N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1666, 142-157.
17. Los DA, Murata N. Structure and Expression of Fatty Acid Desaturases. Biochim. Biophys. Acta 1998; 1394, 3-15.
18. Maali-Amiri R, Goldenkova-Pavlova I., Pchelkin VP, et al. Lipid Fatty Acid Composition of Potato Plants Transformed with the $\Delta 12$ -Desaturase Gene From Cyanobacterium. Russian Journal of Plant Physiol 2007; 54, 678-685.
19. Maali Amiri R, Yur'eva NO, Shimshilashvili KR, Goldenkova-Pavlova, IV, Pchelkin VP, Kuznitsova EI, Tsydendambaev VD, Trunova TI, Los DA, Salehi Jouzani GR, Nosov AM. 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 2010 ; 52, 289-297.
20. Murata N, Los DA. Membrane fluidity and temperature perception. Plant Physiol 1997; 115, 875-879.
21. Osamu M, Iba K. Trienoic fatty acids and stress responses in higher plants. Plant Biotechnol 2005; 22, 423-430.
22. Popov VN, Orlova IV, Kipaikina NV, et al. The Effect of Tobacco Plant Transformation with a Gene for Acyl-Lipid $\Delta 9$ -Desaturase from *Synechococcus vulcanus* on Plant Chilling Tolerance. Russian Journal of Plant Physiol. 2005; 52, 664-667.
23. SamachA, Wigge PA. Ambient temperature perception in plants. Current Opinion In Plant Biology 2005; 8, 483-486.
24. Scebba F, Sebastiani L, Vitagliano C. Changes in Activity of Antioxidative Enzymes in Wheat (*Triticum aestivum*) Seedlings under Cold Acclimation. Physiologia Plantarum 1998; 104, 747-752.
25. Srinivasan A, Johansen C, Saxena NP. Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): characterization of stress and genotypic variation in pod set, Field Crops Res 1998; 57, 181-193.
26. Sukharev S. Mechanosensitive channels in bacteria as membrane tension reporters. FASEB J 1999; 13, 55-61.
27. Sukumaran NP, Weiser CJ. An Excised Leaflet Test for Evaluation Potato Frost Tolerance. HorScience 1972; 7, 467-468.
28. Thomashow MF. Plant cold tolerance: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 1999; 50, 571-599.
29. Vigh L, Los DA, Horvath I, Murata N. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-

Archive of SID

catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desA gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90, 9090–9094.

30. Wood JM. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based Sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 1999; 63, 230 – 262.

31. Xin Z, Browse J. eskimo1 mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95, 7799-7804.

32. Xin Z, Browse J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ* 2000; 23,893-902.

33. Zhirov VK, Merzlyak MN, Kuznetsov LV. Peroxidation of membrane lipids in cold-resistant plants damaged by below-zero temperature. *Sov. Plant Physiol* 1982; 29,1045–1052.