



Physiological and Photosynthetic Responses of Rice (*Oryza sativa* L.) subsp. *indica* and *japonica* to Cold Stress

Farid Eshaghi-Gorji¹  | Reza Maali-Amiri²  | Mohammadreza Ghaffari³ 

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Corresponding Author, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: rmamiri@ut.ac.ir
3. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: November 04, 2025

Revised: December 10, 2025

Accepted: December 10, 2025

Keywords:

Chlorophyll fluorescence, cold stress, *japonica*, oxidative stress, rice.

Extended Abstract

Introduction. Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the staple crops in the world and has a special place in food security due to its essential role in providing daily calories to a large part of the world's population. Despite high importance of this crop, its production is affected by various abiotic stresses, particularly cold stress. Exposure of rice plants to cold, especially in the early stages of vegetative growth, disrupts vital physio-biochemical processes and ultimately reduces growth, survival, photosynthetic efficiency, and crop yield. Rice sensitivity to cold is significantly genotype-dependent, and identification of acclimation mechanisms in different genotypes, in particular from a physiological and molecular perspective, can be widely used in breeding programs to develop cold-tolerant cultivars. In this regard, the present study was conducted to comprehensively investigate the physio-biochemical changes caused by exposure of rice to cold stress in four cultivars Shiroodi, Hashemi, Kouhsar, and Gerde.

Materials and Methods. In this study, 24-day-old seedlings were exposed to cold stress at 4 °C under controlled temperature conditions and at three-time intervals of 1, 3, and 6 days after stress (DAS), hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration as the most important indicator of oxidative stress, photosynthetic pigments, including chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll, and carotenoids, as well as chlorophyll fluorescence parameters related to photosystem II function were measured. These indicators were selected due to their direct role in maintaining energy balance, regulating defense responses, and determining the level of plant susceptibility or tolerance to cold stress.

Results and Discussion. The results showed that cold stress significantly increased H₂O₂ levels in the cultivars. However, change patterns of H₂O₂ showed that the intensity of H₂O₂ accumulation of in the cultivars Gerde and Kouhsar was significantly lower than that of in the cultivars Shiroodi and Hashemi. This difference indicates higher efficiency of protective system in cold-tolerant cultivars, which contain greater ability to scavenge ROS. These results also show that the cultivars Gerde and Kouhsar are able to mitigate ROS levels to prevent cold-induced damages compared to sensitive cultivars. The levels of photosynthetic pigments including chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total chlorophyll decreased in response to cold stress, and this decrease was more severe in the cultivars Shiroodi and Hashemi. The maintenance of higher levels of chlorophyll in tolerant cultivars indicates higher structural stability of chloroplasts. On the other hand, the study of carotenoids showed that in the early stages of stress, the levels of carotenoids increased in cultivars. The increase in these pigments in tolerant cultivars indicates the activation of plant defense mechanisms against cold stress. Chlorophyll fluorescence parameters such as Fv/Fm (maximum photochemical efficiency of PSII), Fv/Fo, and PI (photosystem II performance index) reduced during cold stress. The results showed that the reduction of these parameters was more severe in cultivars Shiroodi and Hashemi, and these cultivars suffered more photosynthetic damages probably due to damage or disruption in the PSII reaction center and accumulation of ROS in the chloroplast. In contrast, the cultivars Gerde and Kouhsar showed a smaller reduction in these indices, which indicates their greater flexibility and higher ability to maintain energy transfer capacity and stable PSII function.

Conclusion. Comprehensive comparison of data showed that cold tolerance is closely related to several key mechanisms: Effective control of ROS levels-induced oxidative stress, preservation of chlorophyll pigments and stabilization of chloroplast structure, increase in carotenoids in a protective role, and maintenance of photosystem II efficiency by reducing structural damage. All of these mechanisms functioned more coherently in the cultivars Gerde and Kouhsar, causing these two cultivars to show greater tolerance to cold stress. In contrast, the cultivars Shiroodi and Hashemi showed a significant decrease in physiological performance under stress conditions due to cold-induced oxidative stress and higher sensitivity of photosynthetic apparatus.

Cite this article: Eshaghi-Gorji, F., Maali-Amiri, R., & Ghaffari, M.R. (2025). Physiological and photosynthetic responses of rice (*Oryza sativa* L.) subsp. *indica* and *japonica* to cold stress. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 56(4), 147-162. DOI: 10.22059/ijfcs.2025.405517.655167.





انتشارات دانشگاه تهران

علوم گیاهان زراعی ایران

شاپا الکترونیکی: ۸۰۸۲-۲۴۲۳

Homepage: <https://ijfcs.ut.ac.ir/>

پاسخ‌های فیزیولوژیک و فتوسنتزی زیر گونه‌های ایندیکا و ژاپونیکا برنج (*Oryza sativa* L.) به تنش سرما

فرید اسحقی-گرگی^۱ | رضا معالی-امیری^۲ | محمدرضا غفاری^۳

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

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>نوع مقاله: مقاله پژوهشی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۳</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۱۹</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۹</p>	<p>برنج (<i>Oryza sativa</i> L.) به‌عنوان یکی از غلات استراتژیک، سهم مهمی در تأمین امنیت غذایی ایران و جهان دارد. با این وجود تولید آن به شدت تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی از جمله سرما قرار دارد. این پژوهش با هدف بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک و فتوسنتزی چهار ژنوتیپ برنج از زیرگونه ایندیکا شامل "شیرودی" و "هاشمی" (ارقام تجاری) و "کوهسار" (زودرس و متحمل به سرما) و یک زیرگونه ژاپونیکا با نام "گرده" در مواجهه با تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران در سال ۱۴۰۲ بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تنش سرما موجب افزایش معنی‌دار پراکسیدهایروژن (H_2O_2) در همه ژنوتیپ‌ها شده؛ درحالی‌که میزان آن در ارقام گرده و کوهسار کاهش معنی‌داری در مقایسه با شیرودی و هاشمی داشت که این نتایج با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر ارقام گرده و کوهسار مرتبط بود. محتوای کلروفیل a و b و کل به‌ترتیب ۸۱٪، ۷۳٪ و ۷۸٪ در اثر سرما به‌طور معنی‌داری کاهش یافت؛ درحالی‌که میزان کاهش در ژنوتیپ‌های متحمل (گرده و کوهسار) کمتر بود. در مقابل، تجمع کاروتنوئیدها به‌عنوان بخشی از پاسخ دفاعی در تنش افزایش ۴۶ درصدی داشت. شاخص‌های فلورسانس کلروفیل تا ۷۳ درصد کاهش نشان دادند که بیانگر آسیب به سیستم فتوسنتز II بود، اما در ارقام گرده و کوهسار میزان افت این شاخص‌ها کمتر بود. نتایج حاکی از ارتباط مستقیم بین کاهش تجمع خسارت سلولی، حفظ رنگدانه‌های فتوسنتزی و پایداری فتوسنتز II در بهبود تحمل سرما در برنج است که نشان می‌دهد تعدیل تنش اکسیداتیو و خسارت سلولی موجب افزایش فتوسنتز و زنده‌مانی گیاه می‌شود. ژنوتیپ‌های گرده و کوهسار با دارا بودن تعادل اکسیداتیو بهتر و راندمان بالاتر فتوشیمیایی، به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به تنش سرما شناسایی شدند.</p>
<p>کلیدواژه‌ها:</p> <p>برنج، تنش اکسیداتیو، تنش سرما، ژاپونیکا، فلورسانس کلروفیل.</p>	

استناد: اسحقی-گرگی، ف.، معالی-امیری، ر.، و غفاری، م. ر. (۱۴۰۴). پاسخ‌های فیزیولوژیک و فتوسنتزی زیرگونه‌های ایندیکا و ژاپونیکا برنج (*Oryza sativa* L.) به تنش سرما. *علوم گیاهان زراعی ایران*، ۵۶(۴)، ۱۴۷-۱۶۲. DOI: 10.22059/ijfcs.2025.405517.655167



© نویسندگان

ناشر: موسسه انتشارات دانشگاه تهران.

۱. مقدمه

برنج (*Oryza sativa L.*) از غلات اصلی در تغذیه نیمی از جمعیت جهان می‌باشد که بیش از ۲۰ درصد کالری مورد نیاز هر فرد را تامین می‌کند و در امنیت غذایی جهان نقش مهمی دارد (Thapa et al., 2023; Wu et al., 2023). در سراسر جهان، دانه برنج منبع اصلی کربوهیدرات‌ها و پروتئین و همچنین سایر مواد مغذی ضروری برای میلیاردها نفر به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (Saleh et al., 2019). باتوجه به پیش‌بینی افزایش جمعیت به ۱۰ میلیارد نفر تا سال ۲۰۵۰، افزایش ۵۰ درصدی تولید برنج در سال‌های آینده موردانتظار است (OECD/FAO, 2020). سومین سطح کشت پس از گندم و جو در ایران با ۷۹۱/۶۰۵ هکتار مساحت به برنج اختصاص دارد که ۳/۶۲۹/۲۲۶ تن معادل ۶۶ درصد نیاز کشور تولید می‌شود و برای جبران کمبود ۳۴ درصد دیگر برنج وارد می‌شود (آمارنامه، کشاورزی ۱۴۰۱).

برنج یک گیاه گرمسیری با ۱۲ کروموزوم ($2n=24, AA$) بوده و بخش عمده تولید آن مربوط به زیرگونه‌های ایندیکا (*Oryza sativa L. ssp. indica*) و ژاپونیکا (*Oryza sativa L. ssp. japonica*) است (Zhang, 2020). این دو زیرگونه، نیاز اکولوژیکی متفاوت داشته؛ به‌طوری که زیرگونه ژاپونیکا برای کشت در عرض‌های جغرافیایی بالا و در مناطق معتدل و یا ارتفاعات بالا توصیه شده، در حالی که زیرگونه ایندیکا برای کشت در عرض‌های جغرافیایی پایین و در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و ارتفاعات کم مناسب است (Zhang, 2020).

مطابق با گزارش‌ها کاهش عملکرد حدود ۷۰ درصدی گیاهان زراعی در محیط‌های نامطلوب و میانگین عملکرد ۳۰ درصد پتانسیل ژنتیکی در شرایط تنش نشان داده شده که برای پایداری تولید برنج، تغییرات آب و هوایی چالشی بزرگ بوده؛ به‌طوری که سازگاری برنج باید با سرعت تغییرات همگام شود (Lee et al., 2020; Zhang et al., 2020). یک راهبرد ضروری برای غلبه بر این چالش‌ها، اصلاح گونه‌های کارآمد در مصرف منابع و انعطاف‌پذیر و هوشمند برای آب‌وهوا^۱ است (Meynard et al., 2020). چگونگی تأثیر محیط‌های نامطلوب بر رشد گیاهان نه تنها یک چالش علمی محسوب شده، بلکه برای کشاورزی و امنیت غذایی نیز از اهمیت حیاتی برخوردار است.

تنش‌ها باتوجه به ماهیت آن‌ها به دو گروه زیستی (مانند باکتری‌ها، نامتدها، قارچ‌های بیوتروف و نکروتروف و ویروس‌ها) و غیرزیستی (مانند سرما، انجماد، شوری، خشکسالی، گرما، فلزات سنگین و شدت نور بالا) تقسیم می‌شوند که در زیستگاه‌های طبیعی به‌طور مداوم و هم‌زمان بر عملکرد گیاهان تأثیر گذاشته و امنیت غذایی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (Ali & Baek, 2020; Nejat & Mantri, 2017). تنش‌های غیرزیستی ناشی از بیش‌بود یا کمبود در عوامل محیطی از جمله نمک (شوری)، آب، دما، نور و مواد مغذی می‌توانند به‌طور قابل ملاحظه‌ای بر رشد، بهره‌وری و حتی بقای گیاه تأثیر بگذارند (Zhang et al., 2020). در نواحی کشت برنج دنیا، تنش سرما اغلب در شروع فصل رشد اتفاق افتاده که توزیع جغرافیایی، ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک، رشد، عملکرد و کیفیت برنج را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و دلیل کاهش ۴۰ درصدی عملکرد است (Nurhasanah Ritonga & Chen, 2020). بررسی چهار دهه داده‌های هواشناسی شمال ایران نشان داده که شالیزارها همواره در تهدید تنش سرما به‌خصوص در مرحله خزان و ابتدایی فصل رشد بوده که برای عملکرد بالا عامل محدودکننده هستند (Hasani et al., 2013).

تجمع گونه‌های فعال اکسیژن^۲ (ROS) در سلول‌های برنج به اجزای مختلف سلولی مانند پروتئین‌های ساختاری، لیپیدهای غشا و آنزیم‌ها آسیب وارد می‌کند. با این‌وجود، ROS به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان نیز عمل کرده و بیان ژن‌های مختلف کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و تعدیل‌کننده‌های تولید H_2O_2 را تنظیم می‌کند، و بدین ترتیب منجر به سازگاری به تنش در گیاه نیز می‌شود (Xie et al., 2019).

1. Climate-smart

2. Reactive oxygen species (ROS)

تحت تنش، مولکول‌های کلروفیل با جذب نور برانگیخته شده که علاوه بر بکارگیری آن در فرآیند فتوسنتز، اغلب سبب اتلاف به صورت گرما، یا انتشار به صورت فلورسانس می‌شود (Zhang et al., 2014). مطابق با گزارش‌ها کلروفیل فلورسانس، تابش نور توسط مولکول‌های کلروفیل در حین فتوسنتز می‌باشد و زمانی رخ می‌دهد که این مولکول‌ها انرژی نوری را جذب می‌کنند؛ اما نمی‌تواند تمام انرژی دریافت‌شده را برای فرآیند فتوسنتز استفاده کند و در نتیجه، انرژی اضافی به صورت فلورسانس (تابش نور) آزاد می‌شود (Zhang et al., 2014). اندازه‌گیری کلروفیل فلورسانس اطلاعات ارزشمندی در خصوص وضعیت فیزیولوژیکی گیاه ارائه می‌دهد و به‌عنوان ابزاری حیاتی برای مطالعه فتوسنتز، پاسخ گیاه به تنش و سلامت کلی گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Zhang et al., 2014). تنش سرما با اختلال در حفظ ساختار کلروپلاست و مهار سنتز کلروفیل، سبب کاهش کارایی فتوسیستم II و افت شاخص‌های فلورسانس کلروفیل می‌شود که یکی از شاخص‌های حساس به تنش سرما محسوب می‌شود (Zhang et al., 2014). دماهای کم می‌توانند عملکرد غشاهای تیلاکوئیدی را تحت تأثیر قرار داده و انتقال الکترون را مختل کنند که این امر منجر به اختلال در کل سامانه فتوسنتزی می‌شود (Zhang et al., 2014).

شاخص Fm^2 نشان‌دهنده حداکثر سطح فلورسانس حاصل از بسته‌شدن کامل مراکز واکنش فتوسیستم PII^4 پس از یک پالس نوری اشباع است. این شاخص معیاری مهم در تعیین کمیت انرژی نور جذب‌شده و ارزیابی راندمان تبدیل انرژی به حساب می‌آید (Bhagooli et al., 2021). نسبت Fv/Fm حداکثر راندمان کوانتومی فتوشیمی 5 فتوسیستم II را اندازه‌گیری کرده و شاخص اصلی راندمان فتوسنتز گیاه و پاسخ به تنش می‌باشد (Raza et al., 2023). در گیاهان متحمل به سرما، کاهش Fv/Fm معمولاً ملایم‌تر بوده؛ در حالی که در گیاهان حساس، این کاهش قابل توجه خواهد بود (Aazami et al., 2021). در شرایط سرما، افزایش Fo^6 معمولاً به دلیل آسیب به مراکز واکنش PSII یا اختلال در ساختار آنتن‌ها رخ داده و با کاهش Fm نیز همراه شده و بدین ترتیب نشان‌دهنده افت ظرفیت انتقال الکترون و پتانسیل برداشت نور در PSII است (Lutts, 1996; Kalaji et al., 2016; Zhao et al., 2020). کاهش فلورسانس متغیر (Fv) بیانگر غیرفعال شدن مراکز واکنش و کاهش کارایی فتوشیمیایی محسوب شده که به‌عنوان شاخص اولیه آسیب فتوسنتزی عمل می‌کند (Sayed, 2003). بنابراین، بررسی هم‌زمان این پارامترها ابزار مؤثری برای غربالگری ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به سرما در گیاهان محسوب می‌شود (Eshaghi-Gorji et al., 2025).

باتوجه به پیچیدگی شبکه‌های مولکولی و مسیرهای متابولیکی دخیل در تحمل به سرما، شناسایی سازوکارهای کلیدی تحمل به تنش سرما همواره به‌عنوان یک چالش پیش‌روی برنامه‌های به‌نژادی قرار داشته‌است. در این راستا، مطالعات تطبیقی ژنوتیپ‌ها با سطوح مختلف تحمل، از جمله مقایسه زیرگونه‌های معروف ژاپونیکا (متحمل) و ایندیکا (حساس)، می‌تواند بینش ارزشمندی در مورد سازوکارهای کمتر شناخته‌شده پاسخ به تنش سرما ارائه دهد. در بسیاری از مناطق کشت برنج ایران، به‌ویژه در شمال کشور، کاهش ناگهانی دما در مرحله گیاهچه‌ای و خزانه موجب خسارات قابل توجهی می‌شود. این شرایط معمولاً به شکل تنش‌های سرمای کوتاه‌مدت (با حداقل دمای حدود چهار درجه سانتی‌گراد) ظاهر می‌شود. بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف واکاوی پاسخ‌های اولیه و دیر هنگام به سرما در ارقام شيرودی و هاشمی (از زیرگونه ایندیکا، حساس)، رقم کوهسار (به‌عنوان رقم زودرس و متحمل به سرما شناخته شده) و گرده (از زیرگونه ژاپونیکا، متحمل) طراحی شد. بدیهی است انجام چنین پژوهش‌هایی می‌تواند راهگشای توسعه راهبردهای اصلاحی مؤثر برای افزایش تحمل برنج در برابر تنش سرما و تضمین امنیت غذایی در شرایط اقلیمی در حال تغییر باشد.

3. Maximum fluorescence

4. Photosystem II

5. Maximum Quantum Efficiency of PSII

6. Minimum fluorescence

7. Variable fluorescence

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲-۱. کشت، اعمال تیمار سرما و نمونه‌برداری

در این تحقیق، از سه رقم برنج (*Oryza sativa L.*) از زیرگونه ایندیکا شامل ارقام شیرودی، هاشمی و کوهسار و یک رقم از گونه ژاپونیکا (رقم گرده) استفاده شد. بذرها به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی شدند و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر، در پتری‌دیش جوانه زده و سپس در گلدان‌هایی حاوی دو واحد خاک، یک واحد ماسه و یک واحد هوموس کاشته شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد (آروین تجهیز اسپادانا، ایران) با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و رطوبت نسبی ۵۰ درصد قرار داده شدند. گیاهچه‌های برنج هر دو روز یک‌بار به مدت ۲۴ روز با آب مقطر تا حد ظرفیت مزرعه آبیاری شدند. گیاهچه‌های ۲۴ روزه به چهار قسمت تقسیم شدند. سه‌چهارم گیاهچه‌ها با ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر و سه تا چهار برگ، به اتاق رشد دیگری با دمای چهار درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (سایر شرایط رشد بدون تغییر باقی ماندند) درحالی‌که یک قسمت به‌عنوان گیاهان در شرایط شاهد (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. برای هر تیمار شش گلدان با هفت گیاهچه و هر تکرار دو گلدان در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری در یک، سه و شش روز پس از شروع تنش سرما (^۸ DAS) انجام شد. پس از نمونه‌گیری برگ‌ها با نیتروژن مایع منجمد شده و برای تجزیه و تحلیل بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۲. سنجش غلظت هیدروژن پراکسید

جهت سنجش غلظت هیدروژن پراکسید ۰/۳۵ گرم نمونه گیاهی در نیتروژن مایع کوبیده شد. سپس به هر نمونه ۱/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۰/۱ درصد اضافه شده و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $12000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. ۵۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی حاصل به ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) و یک میلی‌لیتر پتاسیم‌یدید اضافه شدند. جذب محلول حاصل در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و غلظت هیدروژن پراکسید بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر گزارش شد. محلول بلانک از عصاره هموژنیزه شده با ۵۰۰ میکرولیتر TCA ۰/۱ درصد به‌دست آمد (Naderi et al., 2020).

۲-۳. سنجش کلروفیل و کلروفیل فلورسانس

برای اندازه‌گیری کلروفیل، ۰/۱ گرم وزن تازه بافت برگ کوبیده شده با یک میلی‌لیتر متانول ۱۰۰ درصد ترکیب شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $12000 \times g$ و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز بالایی در $700 \times g$ میکرولیتر متانول ۱۰۰ درصد حل شد و پس از سانتریفیوژ مجدد، جذب نوری در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۵۲ و ۶۶۵ نانومتر با دستگاه پلیتری‌در (مدل model EON, Biotek company, USA) قرائت شد (Lichtenthaler, 1987).

شاخص فلورسانس کلروفیل در برگ‌های جوان کاملاً توسعه یافته گیاهان تحت تیمار سرما با استفاده از فلورومتر قابل حمل Handy-PEA (Hansatech Instruments Ltd., United Kingdom) اندازه‌گیری شد. برای سازگاری با تاریکی، قسمتی از برگ با گیره‌های مخصوص به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس، با قرار دادن حسگر فلورومتر روی گیره‌ها، ارتباط بین برگ سازگار با تاریکی و منبع نور فلورومتر ($3000 \times g$ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) برقرار شد و پارامترهای فلورسانس کلروفیل ثبت شدند (Strasser et al., 2000).

۲-۴. تجزیه داده‌ها

این پژوهش بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام شده و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد.

۳. یافته‌های پژوهش و بحث

در گیاهان H_2O_2 نقش کلیدی در پاسخ به تنش‌های محیطی، به‌ویژه تنش سرما ایفا می‌کند (Niu & Liao, 2016). نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر ژنوتیپ، تیمار سرما و اثر متقابل آن‌ها بر میزان H_2O_2 در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. این یافته‌ها بر وجود تفاوت‌های ژنتیکی مابین ژنوتیپ‌ها، اثر تنش سرما و واکنش‌های متفاوت ارقام نسبت به این تنش دلالت داشت. در شرایط شاهد، اختلاف معنی‌داری در سطح H_2O_2 مابین ژنوتیپ‌های مورد بررسی مشاهده نشد. به‌طور معمول، گیاهان در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی، غلظت پایینی از H_2O_2 را برای تنظیم پیام‌های درون‌سلولی حفظ می‌کنند (Wang *et al.*, 2024). در روز اول پس از اعمال تنش، افزایش قابل‌توجهی در محتوی H_2O_2 در تمامی ژنوتیپ‌ها مشاهده شد. رقم شیروودی و هاشمی بیشترین افزایش را به‌ترتیب با ۹ و ۸/۳ برابر نسبت به گیاهان شاهد داشته، درحالی‌که این افزایش در کوهسار ۶/۳ برابر و گرده ۴/۵ برابر بود. این افزایش اولیه نمایانگر شروع یک پاسخ اکسیداتیو سریع در مواجهه با تنش سرما می‌باشد (Xu *et al.*, 2023). در مواجهه با تنش سرما، اختلال در عملکرد اندامک‌هایی مانند کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم، به‌ویژه در زنجیره‌های انتقال الکترون باعث افزایش تولید H_2O_2 می‌شود (Niu & Liao, 2016; Wang *et al.*, 2024). افزایش میزان H_2O_2 از یک‌سو شاخصی از شدت آسیب اکسیداتیو، و از سوی دیگر محرکی برای القای سازوکارهای دفاعی گیاه در نظر گرفته شده است (Hossain *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2023).

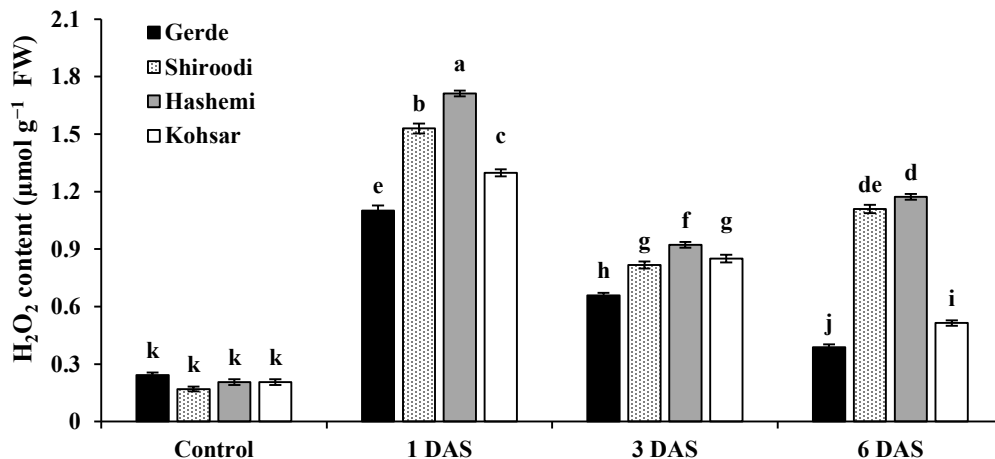
با گذشت زمان تنش تا روز سوم و ششم، میزان H_2O_2 در ژنوتیپ‌ها کاهش یافته اما همچنان بالاتر از شرایط شاهد باقی بود. چنین نتایجی بیانگر فعالیت نسبی سازوکارهای دفاعی در سلول بوده که میزان آن در ژنوتیپ‌ها بر اساس ظرفیت ژنتیکی متفاوت بود. در کلیه مراحل تنش، ارقام گرده و کوهسار دارای کمترین میزان H_2O_2 بود که احتمالاً نشان‌دهنده ظرفیت بالاتر آن‌ها در حذف ROS و در نتیجه، تحمل بیشتر نسبت به تنش سرما بود. در روز ششم، بیشترین میزان H_2O_2 در ارقام شیروودی و هاشمی اندازه‌گیری شد، درحالی‌که رقم گرده پایین‌ترین سطح را به خود اختصاص داد (شکل ۱). بنابراین مطابق با نتایج، افزایش مجدد میزان H_2O_2 در ارقام شیروودی و هاشمی در امتداد با کاهش تدریجی آن‌ها در ارقام گرده و کوهسار در شش روز پس از تنش سرما به‌ترتیب نشان‌دهنده تداوم خسارت‌های اکسیداتیو در دو رقم اول و مهار نسبی آن در دو رقم دوم بود.

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات پراکسیدیدروژن، کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در ارقام برنج تحت تنش چهار درجه سانتی‌گراد.

Table 1. Variance analysis of hydrogen peroxide, chlorophylls, and carotenoids traits in rice cultivars under 4°C stress.

Source	DF	Mean Squares				
		H_2O_2	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Total Chl	Carotenoid
Genotype (A)	3	0.4**	0.298**	0.048**	0.573**	0.02**
Cold stress (B)	3	2.9**	18**	1.338**	29.12**	0.329**
A × B	9	0.11**	0.025**	0.017**	0.07**	0.004**
Error	32	0.0009	0.0082	0.0043	0.0196	0.0013
CV		3.8	4.6	10.2	5.3	7.8

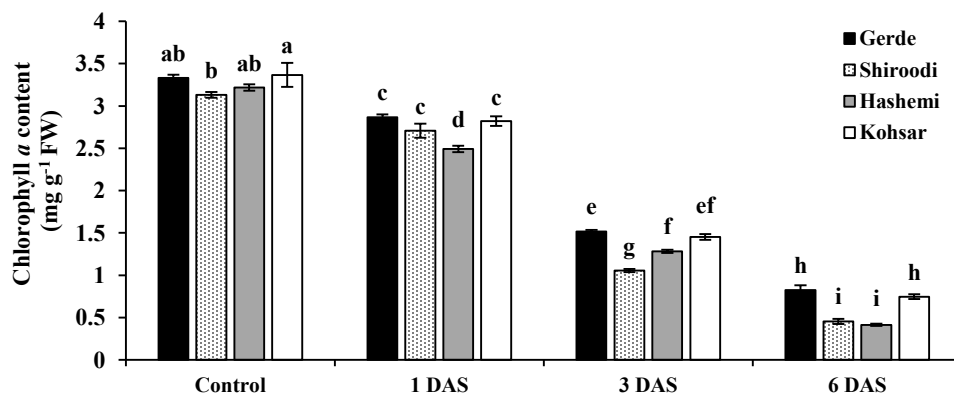
حفظ فتوسنتز در گیاهان و تنظیم میزان رنگدانه‌ها، نقش مستقیمی در جذب نور و چرخه انتقال الکترون تحت تنش سرما ایفا می‌کند (Hajihashemi *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2023). یافته‌های این تحقیق نشان داد که اثر ژنوتیپ، تنش سرما و اثر متقابل این دو عامل بر شاخص‌های کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کلروفیل کل از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۱). تنش سرما موجب کاهش شدید محتوی کلروفیل در کلیه ژنوتیپ‌ها شد (شکل ۲). در روز ششم پس از اعمال تنش، میزان کلروفیل *a* در رقم گرده تا ۷۵ درصد، در کوهسار تا ۷۸ درصد، در شیروودی تا ۸۵ درصد و در هاشمی تا ۸۷ درصد نسبت به شرایط شاهد کاهش یافت. مطابق با نتایج، کاهش بیشتر کلروفیل *a* در ارقام شیروودی و هاشمی بیانگر حساسیت بالاتر این ژنوتیپ‌ها به تنش سرما می‌باشد.



شکل ۱. الگوی تغییر میزان پراکسید هیدروژن (H₂O₂) ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک، سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد.

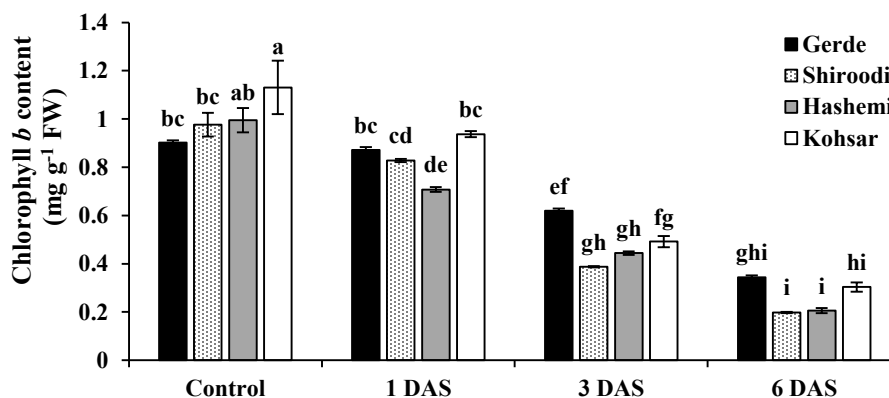
Figure 1. Pattern of changes in hydrogen peroxide (H₂O₂) content of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shiroodi (dotted), Hashemi (gray), and Kouhsar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.

الگوی تغییر میزان کلروفیل *b* نیز با کلروفیل *a* مشابه بود؛ به طوری که در روز ششم، میزان آن در ژنوتیپ‌های گرده، کوهسار، شیروودی و هاشمی به ترتیب تا ۶۲، ۸۰، ۷۹ و ۷۳ درصد نسبت به شرایط کاهش یافت. این کاهش هم‌زمان در دو نوع کلروفیل احتمالاً نشان‌دهنده آسیب‌های گسترده بر ساختارهای فتوسنتزی، به ویژه کلروپلاست‌ها می‌باشد (شکل ۳). تحقیقات نشان داده‌اند که دماهای پایین باعث کاهش بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های درگیر در ساخت کلروفیل می‌شود. در مقابل، فعالیت آنزیم‌های تخریبی مانند کلروفیل‌لاز و پراکسیداز نیز افزایش یافته که اغلب با تخریب غشای تیلاکوئیدی، جایگاه اصلی تجمع رنگدانه‌های فتوسنتزی بوده که به کاهش میزان کلروفیل در این پژوهش می‌انجامد (Li et al., 2024; Zhao et al., 2020). مطابق با نتایج ژنوتیپ‌های گرده و کوهسار از توانایی بیشتری برای حفظ رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت شرایط سرما برخوردار بودند (شکل ۴). این ویژگی می‌تواند ناشی از پایداری بیشتر غشاها، تنظیم مطلوب‌تر مسیره‌های بیوسنتزی کلروفیل یا عملکرد مؤثرتر سیستم‌های دفاعی این ژنوتیپ‌ها در مقابله با تنش سرما باشد.



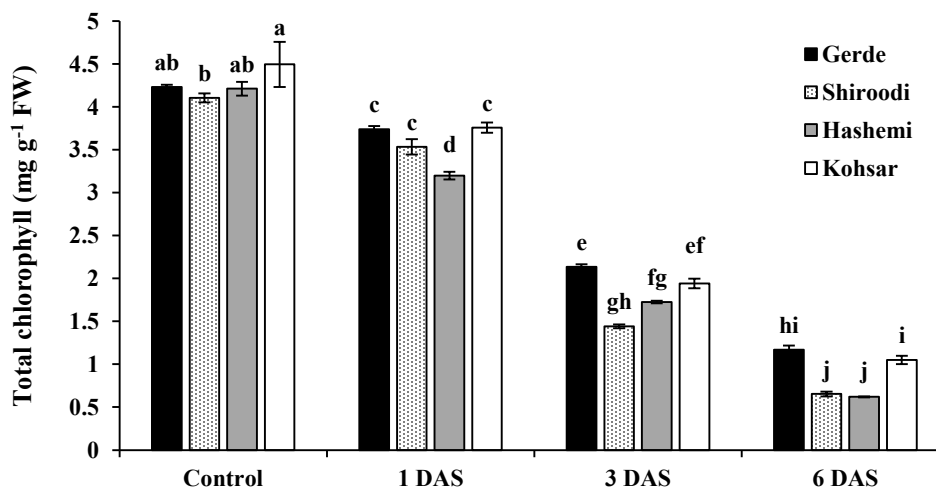
شکل ۲. الگوی تغییر محتوی کلروفیل *a* ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک، سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد.

Figure 2. Pattern of change in chlorophyll a content of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shiroodi (dotted), Hashemi (gray), and Kouhsar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.



شکل ۳. الگوی تغییر محتوی کلروفیل *b* ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک، سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد.

Figure 3. Pattern of change in chlorophyll *b* content of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shiroodi (dotted), Hashemi (gray), and Kouhsar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.



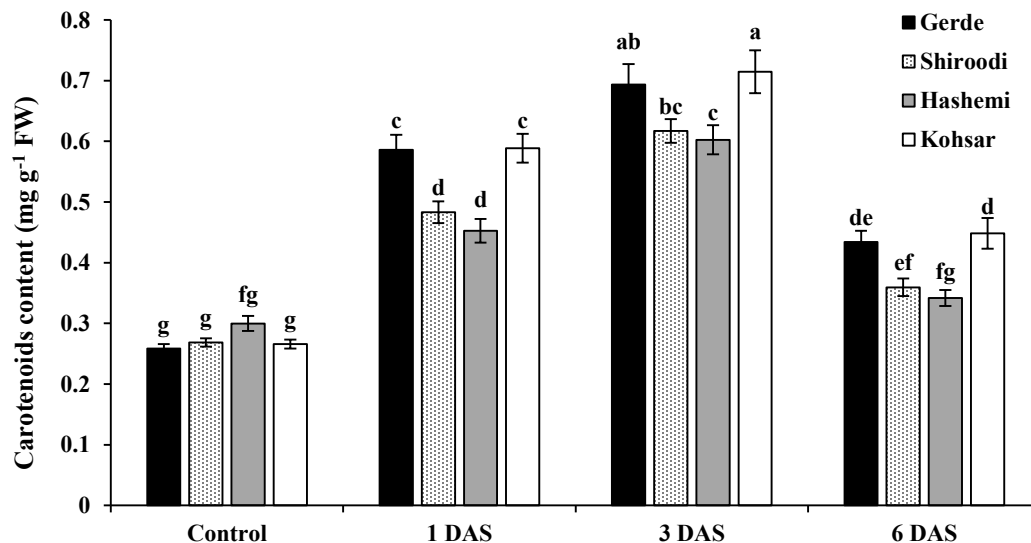
شکل ۴. الگوی تغییر محتوی کلروفیل کل ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک، سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد.

Figure 4. Pattern of change in chlorophyll *a* content of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shiroodi (dotted), Hashemi (gray), and Kouhsar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.

کاروتنوئیدها رنگدانه‌های فرعی اما ضروری در سیستم فتوسنتزی گیاهان محسوب شده که نقش دوگانه‌ای در برداشت انرژی نوری و محافظت نوری تحت تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند (Swapnil *et al.*, 2021; Uarrota *et al.*, 2018). بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثر ژنوتیپ، تنش سرما و اثر متقابل آن‌ها بر میزان کاروتنوئید در سطح یک درصد معنی‌دار بود. بررسی‌ها نشان داد که تنش سرما موجب افزایش معنی‌دار محتوی کاروتنوئید در همه ژنوتیپ‌ها شد و بیشترین سطح آن در روز سوم پس از اعمال تنش بود (شکل ۵). در این زمان، نسبت به شرایط شاهد، محتوی کاروتنوئید در ژنوتیپ‌های گرده و کوهسار تا ۲/۷ برابر، در شیروودی تا ۲/۳ برابر و در هاشمی تا دو برابر افزایش یافت. با این وجود، در روز ششم پس از تنش، کاهش نسبی در میزان کاروتنوئیدها مشاهده شده؛ به طوری که میزان آن در ژنوتیپ‌های گرده و کوهسار به ترتیب به ۱/۷ برابر، شیروودی ۱/۳۴ برابر و هاشمی ۱/۱۴ برابر نسبت به شاهد رسید. مطابق با یافته‌های گذشته کاروتنوئیدها به واسطه خواص

آنتی‌اکسیدانی خود از تخریب اکسیداتیو غشاهای تیلاکوئیدی جلوگیری کرده و به تثبیت ساختار و عملکرد فتوسیستم‌ها کمک می‌کند (Uarrota *et al.*, 2018). از این رو، تجمع کاروتنوئیدها در دمای پایین را می‌توان یکی از سازوکارهای تطبیقی حیاتی برای محافظت فتوسنتزی تلقی کرد که هم به‌عنوان سپر دفاعی (آنتی‌اکسیدان غیرآزمی) و هم نقش حفاظت ساختاری دارد (Swapnil *et al.*, 2021; Uarrota *et al.*, 2018).

این الگو نشان می‌دهد که گیاهان در پاسخ اولیه به سرما با افزایش ساخت یا حفظ کاروتنوئیدها سعی در تقویت سیستم دفاعی خود داشته اما با گذشت زمان در امتداد با کاهش خسارت‌های سلولی (نتایج H_2O_2), این افزایش ممکن است به دلیل مصرف منابع یا شروع سازگاری متابولیکی کاهش یابد. در مجموع، ژنوتیپ‌های گرده و کوهسار که بیشترین افزایش و پایداری محتوی کاروتنوئید را نشان دادند، احتمالاً از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری فتوشیمیایی بیشتری برخوردار بودند. بنابراین در امتداد با ارزیابی شاخص خسارت‌های سلولی (نتایج H_2O_2) که به‌طور غیرمستقیم وضعیت دفاعی سلول را نشان می‌دهد، میزان رنگدانه‌ها شاخص حساس و قابل اتکا در ارزیابی وضعیت فتوسنتزی گیاه در مواجهه با تنش سرما بود. تلفیق این شاخص با پارامترهای کلروفیل فلورسنس، می‌تواند چشم‌انداز جامعی از سازوکارهای تحمل سرما ارائه داده و در انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل برای برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۵. الگوی تغییر محتوی کاروتنوئیدها ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک، سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد. Figure 5. Pattern of change in carotenoids content of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shirooti (dotted), Hashemi (gray), and Kouhsar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.

جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ، تنش سرما و اثر متقابل آن‌ها بر شاخص F_0 از نظر آماری معنی‌دار نبودند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که F_0 تحت تاثیر ژنتیک و شرایط تنش سرما نیست و تقریباً ثابت باقی می‌ماند. فلورسانس اصلی F_0 یا F_0^9 به‌عنوان انتشار پایه F_0^{10} در زمانی است که تمام مراکز واکنش فتوسیستم II (PSII) F_0^{11} باز بوده و ظرفیت ذاتی برداشت نور توسط آنتن‌ها F_0^{12} و حداقل تلفات انرژی از فرآیندهای غیرفتوشیمیایی در برگ‌های سازگار شده با

9. Original fluorescence

10. Baseline emission

11. Photosystem II (PSII) reaction centers

12. Antennae

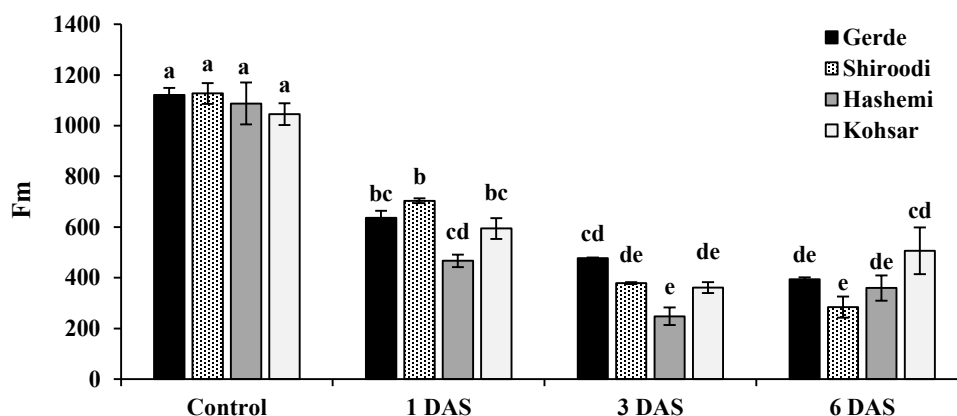
تاریکی را به نمایش می‌گذارد (Bhagooli *et al.*, 2021). بنابراین پایداری Fo تحت تیمارهای آزمایش نشان می‌دهد که اجزای اولیه PSII دچار آسیب واضح نشده‌اند.

جدول ۲. تجزیه واریانس شاخص‌های کلروفیل فلورسانس در ارقام برنج تحت تنش چهار درجه سانتی‌گراد.

Table 2. Variance analysis of chlorophyll fluorescence indices in rice cultivars under 4°C stress.

S.O.V	DF	Mean Squares						
		Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	RC/ABS	Fv/Fo	PI
Genotype (A)	3	704 ^{n.s}	30110 ^{**}	23826 ^{**}	0.042 ^{**}	0.1523 [*]	0.265 ^{**}	0.129 ^{**}
Condition (B)	3	1836 ^{n.s}	1381252 ^{**}	1446109 ^{**}	0.6778 ^{**}	1.8013 ^{**}	25.3293 ^{**}	9.786 ^{**}
A × B	9	2787 ^{n.s}	18734 ^{**}	11133 ^{**}	0.0129 ^{**}	0.1182 ^{**}	0.1815 ^{**}	0.095 ^{**}
Error	32	1483	5411	2597	0.0004	0.036	0.0305	0.0092
CV		15	12	14	4	34	12	16

اثر ژنوتیپ، تنش سرما و اثر متقابل آن‌ها روی شاخص Fm معنی‌دار بوده، به طوری که هم ژنتیک و هم تنش سرما بر توانایی مرکز واکنش PSII تأثیر گذاشته است. Fm برای ارزیابی حداکثر کارایی فتوشیمیایی بالقوه PSII و ارزیابی راندمان تبدیل انرژی استفاده می‌شود و برای تشخیص اثر تنش بر گیاه به کار می‌رود (Zhao *et al.*, 2020). معنی‌دار بودن اثر متقابل نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌ها واکنش متفاوتی به تنش سرما نشان داده‌اند؛ بنابراین Fm می‌تواند شاخص مناسبی برای غربال ژنوتیپ‌های متحمل یا حساس باشد. با اعمال تنش یک روز مقدار Fm در تمامی ژنوتیپ‌ها کاهش یافت؛ اما شدت کاهش در ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. ژنوتیپ شیروودی پایین‌ترین مقدار Fm را نشان داد؛ در حالی که گرده، کوهسار و هاشمی افت کمتری را نشان دادند. در سه روز پس از تنش، روند کاهشی ادامه یافت و اختلاف ژنوتیپی بارزتر شد (شکل ۶).



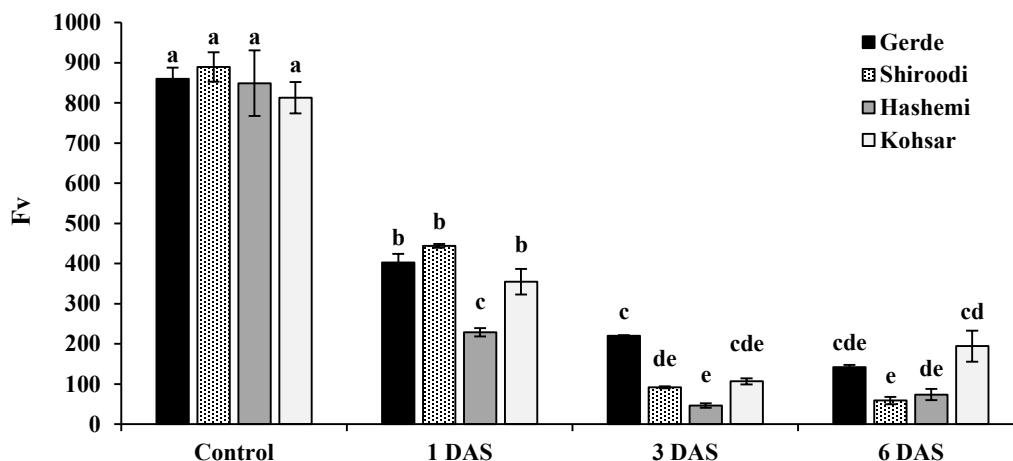
شکل ۶. الگوی تغییر شاخص حداکثر فلورسانس (Fm) ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک،

سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد.

Figure 6. Pattern of change in maximum fluorescence (Fm) index of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shirooti (dotted), Hashemi (gray), and Kouhsar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.

ژنوتیپ گرده برتری نسبی در حفظ Fm داشته، در حالی که هاشمی کمترین مقدار Fm را نشان داد که بیانگر آسیب شدیدتر فتوسیستم II در این ژنوتیپ بود. در روز ششم پس از تنش سرما رقم کوهسار Fm بالاتری را حفظ کرد؛ در حالی که شیروودی کمترین مقدار (۲۵ درصد نسبت به شاهد) را داشت. این امر نشان می‌دهد که کوهسار دارای توانایی حفظ پایدار فتوسیستم II در درازمدت بوده است. فلورسانس متغیر (Fv) خاموشی فتوشیمیایی و آسیب به دستگاه فتوسنتزی را کمی‌سازی می‌کند (Kalaji *et al.*, 2016; Sayed, 2003). اثر متقابل معنی‌دار تأیید می‌کند که توان ترمیم یا تحمل سیستم فتوسنتزی در ژنوتیپ‌ها

متفاوت بود. در یک روز پس از تنش سرما، کاهش شدیدی در مقدار Fv مشاهده شد و ژنوتیپ هاشمی کمترین مقدار را حفظ کرده و پس از آن سایر ژنوتیپ بدون اختلاف معنی‌دار قرار گرفتند. در مقابل، ارقام گرده، کوهسار و شیروودی مقدار بالاتری از Fv را حفظ کردند. در سه و شش روز پس از اعمال تنش سرما، Fv به حداقل میزان خود رسید و اختلاف ژنوتیپی واضح‌تر شد (شکل ۷).



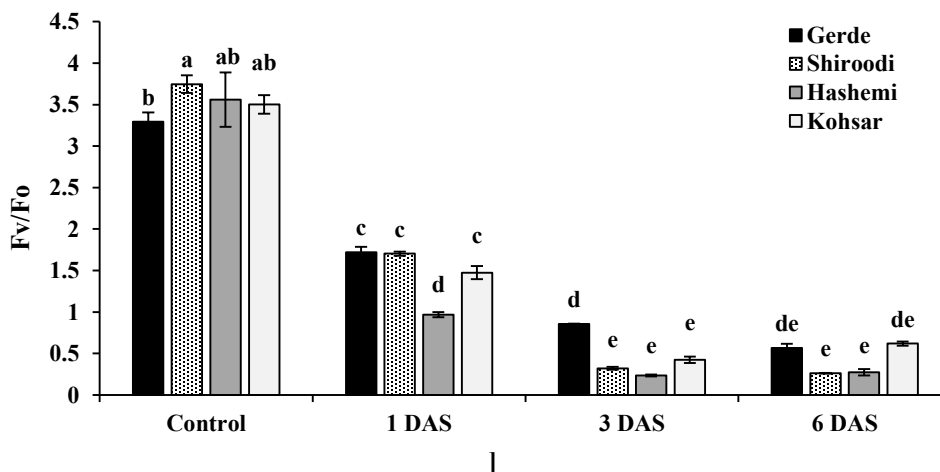
شکل ۷. الگوی تغییر شاخص فلورسانس متغیر (Fv) ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک، سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد.

Figure 7. Pattern of change in variable fluorescence (Fv) index of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shiroodi (dotted), Hashemi (gray), and Kousar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.

F_v/F_o یک پارامتر کلیدی فلورسانس کلروفیل است که ظرفیت ذاتی برداشت نور و جذب انرژی PSII را کمی می‌کند (Lichtenthaler & Rinderle, 1988). در یک روز پس از تنش همه ژنوتیپ‌ها با بیشترین کاهش در F_v/F_o روبرو شدند. تحت این شرایط کوهسار، گرده و شیروودی سطح بالاتری از F_v/F_o را نمایش داد؛ درحالی‌که هاشمی میزان پایین‌تری را نشان داد (شکل ۸). کاهش قابل توجه در روز اول تنش می‌تواند نشان‌دهنده اختلالات ساختاری یا تخصیص مجدد انرژی به سازوکارهای حفاظتی مانند خاموشی غیرفتوشیمیایی باشد. این پارامتر به‌عنوان یک پیام هشدار اولیه برای تنش‌های محیطی عمل کرده و در القای پاسخ‌های دفاعی مناسب است (Cisse et al., 2020).

هم‌زمانی کاهش F_v/F_o و افزایش H_2O_2 حاکی از آن است که تجمع سریع ROS به‌ویژه H_2O_2 منجر به اختلال در زنجیره‌های انتقال الکترون در کلروپلاست‌ها می‌شود. بنابراین، ارتباط منفی بین F_v/F_o و H_2O_2 در روز اول تنش نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌هایی با حفظ کارایی نسبی PSII و مقادیر پایین‌تر H_2O_2 ، ظرفیت بالاتری در حذف ROS و تحمل به تنش سرما داشته، درحالی‌که ژنوتیپ‌های حساس مانند هاشمی با کاهش بیشتر F_v/F_o و تجمع بالاتر H_2O_2 دچار آسیب اکسیداتیو شدیدتری شده‌اند. در سه و شش روز پس از اعمال تنش سرما افت F_v/F_o تداوم داشته به‌طوری‌که شش روز پس از تنش سرما تفاوت معنی‌داری در این شاخص مشاهده شد که این نتایج بیانگر کاهش احتمالی ظرفیت انتقال الکترون و غلبه مسیرهای اتلاف انرژی است (Sayed, 2003). در شرایط تنش‌های غیرزیستی مانند سرما، هرگونه اختلال در ساختار یا عملکرد PSII مستقیماً در تغییر F_v/F_m و کارایی PSII در جهت تبدیل انرژی نوری به انرژی فتوشیمیایی بازتاب می‌یابد (Aazami et al., 2021; Jat et al., 2024). یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که در شرایط شاهد، اختلاف معنی‌داری در مقدار F_v/F_m بین

ژنوتیپ‌های مختلف مشاهده نشد. با این وجود، اعمال تنش سرما منجر به کاهش تدریجی و قابل توجه این شاخص در همه ژنوتیپ‌ها شد.



شکل ۸. الگوی نسبت فلورسانس متغیر به فلورسانس حداقل (Fv/Fo) ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک، سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد.

Figure 8. Pattern of change in variable to minimum fluorescence ratio (Fv/Fo) of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shiroodi (dotted), Hashemi (gray), and Kouhsar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.

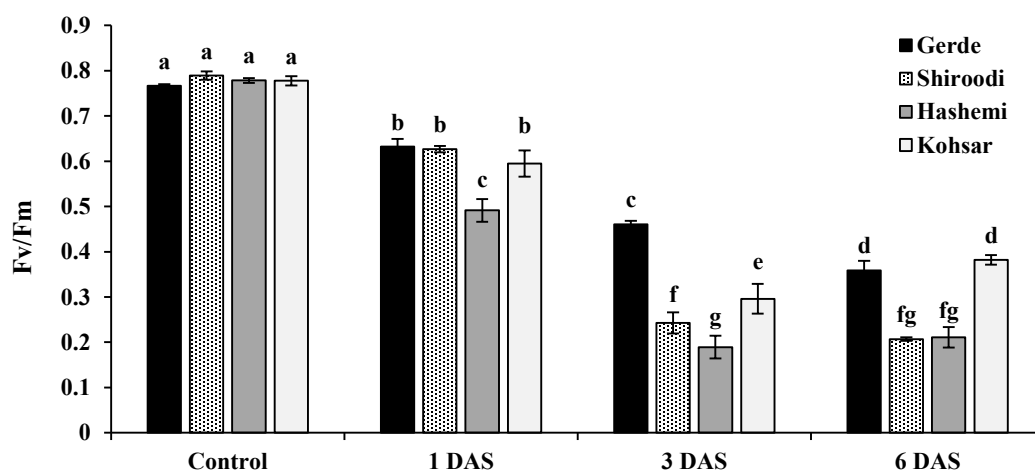
در روز ششم پس از آغاز تنش، مقدار Fv/Fm در ژنوتیپ گرده ۵۳ درصد، در کوهسار ۵۱ درصد، در هاشمی ۷۳ درصد و در شیروودی ۷۴ درصد نسبت به مقادیر شاهد کاهش یافت (شکل ۹). تنش سرما با کاهش سیالیت غشای تیلاکوئیدی، مهار فرآیند ترمیم پروتئین D1 و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) باعث کاهش نرخ انتقال الکترون و غیرفعال‌سازی مراکز واکنش PSII می‌شود. این فرایندها در نهایت منجر به کاهش معنی‌دار در مقدار Fv/Fm و در نتیجه، افت ظرفیت فتوشیمیایی گیاه خواهد شد (Azami et al., 2021). نکته دیگر الگوی کاهشی متفاوت Fv/Fm بین ژنوتیپ‌ها بوده؛ به طوری که در ژنوتیپ‌های شیروودی و هاشمی، افت شدید این شاخص تا روز سوم ادامه یافت، اما پس از آن تغییری مشاهده نشد که ممکن است نشان‌دهنده توقف عملکرد ترمیمی PSII باشد. در مقابل، ژنوتیپ کوهسار که در روز سوم کاهش بیشتری نسبت به گرده داشت، در روز ششم افزایش نسبی Fv/Fm را تجربه کرد؛ امری که می‌تواند حاکی از آغاز فعالیت‌های ترمیمی و سازگاری تدریجی این ژنوتیپ به سرما باشد. این یافته‌ها حاکی از آن است که ژنوتیپ‌های گرده و به‌ویژه کوهسار از توانایی بیشتری در حفظ یا بازسازی عملکرد PSII و سازگاری مطلوب‌تر تحت تنش برخوردارند.

شاخص^{۱۴} RC/ABS رابطه بین تعداد مراکز واکنش فعال^{۱۵} و انرژی نور جذب‌شده در گیاهان را کمی‌سازی می‌کند (Lichtenthaler & Rinderle, 1988). در یک روز پس از تنش سرما کاهش قابل توجهی در این شاخص مشاهده شد، اما شدت کاهش‌ها متفاوت بود (شکل ۱۰). میزان این شاخص در شیروودی در بالاترین مقدار باقی ماند که نشان می‌دهد در مراحل اولیه تنش تحمل بیشتری در حفظ مراکز واکنش دارد. در مقابل، کوهسار، گرده و هاشمی کاهش در شاخص نشان داده که بیانگر حساسیت بیشتر آن‌ها در حفظ مراکز واکنش در مراحل اولیه تنش است. در روز سوم و ششم پس از اعمال تنش، تمام ژنوتیپ‌ها به‌طور معنی‌داری نسبت به شرایط شاهد کاهش یافتند؛ با این وجود، گرده هنوز کمی بالاتر از کوهسار، شیروودی و هاشمی باقی ماند. این موضوع نشان می‌دهد که در شرایط تنش شدید، اختلاف ژنتیکی ارقام برنج کمتر شده اما گرده همچنان اندکی

14. Reaction Centers per Absorbed Photon

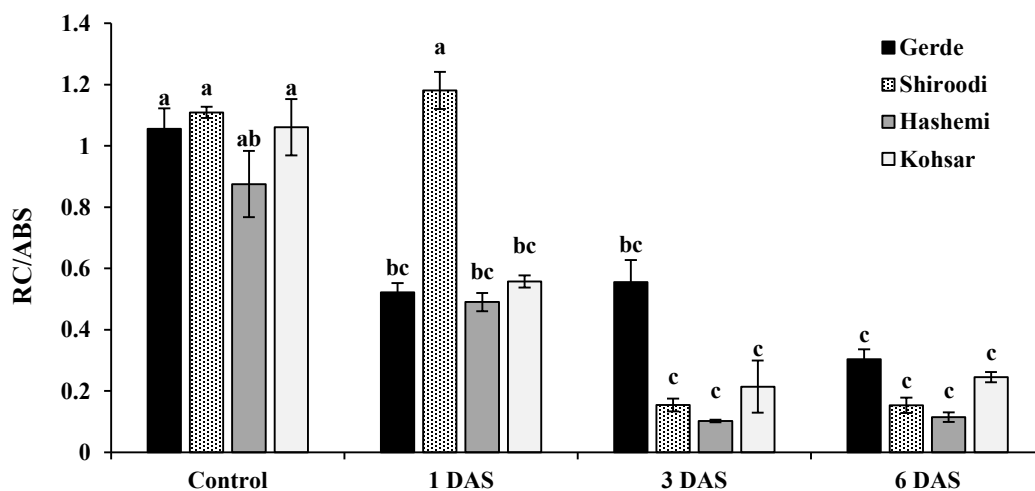
15. Active reaction centers (RC)

برتری خود را حفظ می‌کند. مطالعات گذشته نیز در گیاهان برنج نشان داده‌اند که تنش سرما می‌تواند تعادل بین جذب نور و تبدیل انرژی را مختل کرده و منجر به کاهش RC/ABS شود (Kalaji et al., 2016).



شکل ۹. الگوی نسبت فلورسانس متغیر به فلورسانس حداکثر (Fv/Fm) ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک، سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد.

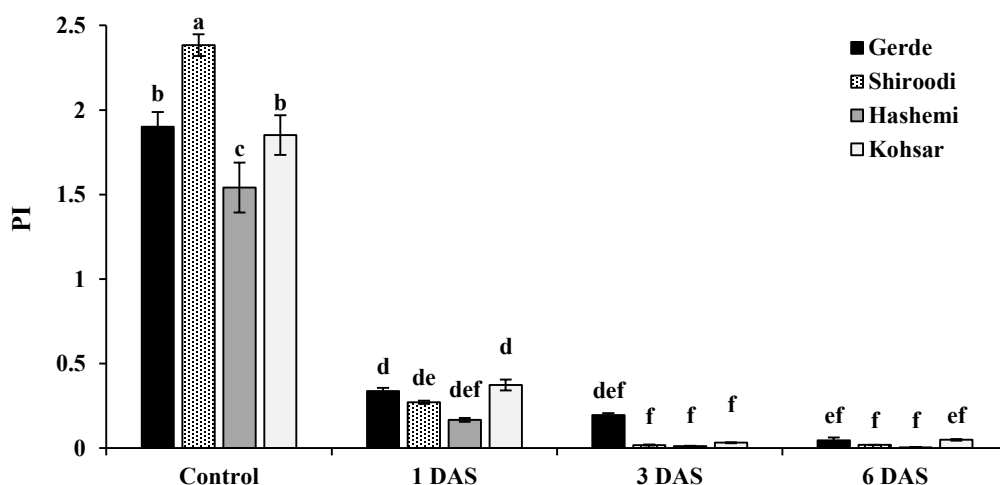
Figure 9. Pattern of change in the maximum quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm) of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shiroodi (dotted), Hashemi (gray), and Kouhsar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.



شکل ۱۰. الگوی نسبت مراکز واکنش به فوتون جذب شده (RC/ABS) ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک، سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد.

Figure 10. Pattern of change in the ratio of reaction centers to absorbed photons (RC/ABS) of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shiroodi (dotted), Hashemi (gray), and Kouhsar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.

از آنجایی که شاخص PI^{16} چندین جنبه از عملکرد PSII، از جمله تراکم مرکز واکنش، راندمان به دام انداختن انرژی و انتقال الکترون را ترکیب می‌کند، معیاری کلی از زنده ماندن گیاه و تحمل به تنش را ارائه می‌دهد (Kalaji et al., 2016). در شرایط شاهد شیروودی بالاترین مقدار PI را نشان داده، در حالی که گرده، کوهسار و پس از آن هاشمی در سطوح پایین‌تری قرار گرفتند که نشان می‌دهد حتی در شرایط بهینه نیز کارایی فتوسنتزی این ژنوتیپ‌ها متفاوت است. تنش سرما به‌طور قابل توجهی مقادیر PI را در برنج کاهش داد و این کاهش در گونه‌های حساس بیشتر مشهود بود (Kalaji et al., 2016; Sayed, 2003). تداوم کاهش‌ها در سه و شش روز پس از اعمال تنش سرما و همچنین کاهش در سایر شاخص‌های کلروفیل فلورسانس بیانگر اختلال شدید در کارکرد PSII و غیرفعال شدن بیشتر مراکز واکنش بود. با این وجود کوهسار و گرده هنوز مقادیر نسبی بالاتری نسبت به شیروودی و هاشمی به نمایش گذاشتند (شکل ۱۱).



شکل ۱۱. الگوی تغییر شاخص عملکرد (PI) ارقام برنج گرده (تیره)، شیروودی (نقطه‌ای)، هاشمی (خاکستری) و کوهسار (روشن) در شرایط یک، سه و شش روز پس از تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها با احتمال یک درصد می‌باشد.
Figure 11. Pattern of change in performance index (PI) of rice cultivars: Gerdeh (dark), Shiroodi (dotted), Hashemi (gray), and Kohsar (light) at one, three, and six days after exposure to cold stress at 4°C. Different letters indicate a significant difference between the means at the 1% probability level.

۴. نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش سرما اثر چشمگیری بر شاخص‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و فتوسنتزی ارقام برنج داشته و شدت این اثر با ظرفیت ژنتیکی ژنوتیپ‌ها مرتبط بود. در مجموع، ژنوتیپ‌های گرده و کوهسار نسبت به شیروودی و هاشمی از کارایی مطلوب‌تری در حفظ تعادل اکسیداتیو، پایداری رنگدانه‌ها و عملکرد فتوسیستم II برخوردار بودند. این ویژگی مرتبط با تجمع پایین‌تر H_2O_2 در گرده و کوهسار نسبت به شیروودی و هاشمی بوده که غیرمستقیم بیانگر ظرفیت بالاتر سیستم آنتی‌اکسیدانی آنها و کارایی بهتر حذف ROS بود. کاهش محتوی رنگدانه‌های کلروفیل در ژنوتیپ‌های شیروودی و هاشمی بیشتر بوده؛ در حالی که پایداری بیشتر آن در گرده و کوهسار به موازات افزایش نسبی کارتنوئید، کارایی فتوسنتزی را بهبود بخشید. پارامترهای فلورسانس کلروفیل نیز در این آزمایش اغلب تحت تاثیر تنش سرما کاهش نشان داده و قادر به تفکیک پاسخ‌های اکسیداتیو به تنش بودند. همچنین شاخص Fv/Fm از روز سوم تنش اختلاف معنی‌داری بین ارقام متحمل و حساس نشان داد که می‌تواند شاخصی مهم و متمایزکننده برای استفاده در غربالگری باشد. در مجموع، نتایج نشان داد که حذف مؤثر ROS، حفظ رنگدانه‌های فتوسنتزی و پایداری سیستم فتوشیمیایی همگی با میزان تحمل گیاه برنج به تنش سرما ارتباط مستقیم

16. Performance index

17. Vitality

دارند و نشانگر مطلوب در ارزیابی پاسخ به تنش سرما در برنج هستند. به‌عنوان ابزار ارزشمند پیشنهاد می‌شود این شاخص‌ها در غربالگری سریع ژنوتیپ‌های برنج متحمل به سرما استفاده شوند.

۵. منابع

- Aazami, M.A., Asghari-Aruq, M., Hassanpouraghdam, M.B., Ercisli, S., Baron, M., & Sochor, J. (2021). Low temperature stress mediates the antioxidants pool and chlorophyll fluorescence in *Vitis vinifera* (L.) cultivars. *Plants*, 10(9), 1877.
- Ali, M.S., & Baek, K.H. (2020). Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 621
- Bhagooli, R., Mattan-Moorgawa, S., Kaullysing, D., Louis, Y.D., Gopeechund, A., Ramah, S., Soondur, M., Pilly, S.S., Beesoo, R., Wijayanti, D.P., Bachok, Z., Bin, Monrás, V.C., Casareto, B.E., Suzuki, Y., & Baker, A.C. (2021). Chlorophyll fluorescence – A tool to assess photosynthetic performance and stress photophysiology in symbiotic marine invertebrates and seaplants. *Marine Pollution Bulletin*, 165, 112059.
- Cisse, A., Zhao, X., Fu, W., Kim, R.E.R., Chen, T., Tao, L., & Feng, B. (2020). Non-photochemical quenching involved in the regulation of photosynthesis of rice leaves under high nitrogen conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2115.
- Eshaghi-Gorji, F., Maali-Amiri, R., & Naderi, S. (2025). Acclimation-mediated tolerance to low temperature in bread and durum wheat cultivars via regulation of antioxidative responses and genes involved in ethylene metabolism. *Journal of Plant Growth Regulation*, 44(7), 3579–3597.
- Hajhashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J.M.C., Djalovic, I., & Siddique, K.H.M. (2018). Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1430.
- Hossain, M.A., Bhattacharjee, S., Armin, S.M., Qian, P., Xin, W., Li, H.Y., Burritt, D.J., Fujita, M., & Tran, L.S.P. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6, 420.
- Kalaji, H.M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I.A., Cetner, M.D., Łukasik, I., Goltsev, V., & Ladle, R.J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 102.
- Lee, J.S., Chebotarov, D., Platten, J.D., McNally, K., & Kohli, A. (2020). Advanced strategic research to promote the use of rice genetic resources. *Agronomy*, 10(11), 1629.
- Li, Y., Zhu, J., Xu, J., Zhang, X., Xie, Z., & Li, Z. (2024). Effect of cold stress on photosynthetic physiological characteristics and molecular mechanism analysis in cold-resistant cotton (ZM36) seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1396666.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Lichtenthaler, H.K., & Rinderle, U. (1988). The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 19(sup1), S29–S85.
- Meynard, D., Vernet, A., Meunier, A.C., Mieulet, D., Bès, M., Portefaix, M., Breitler, J.C., Périn, C., & Guiderdoni, E. (n.d.). *Thirty years of genome engineering in rice: From gene addition to gene editing* §.
- Naderi, S., Fakheri, B.A., Maali-Amiri, R., & Mahdinezhad, N. (2020). Tolerance responses in wheat landrace Bolani are related to enhanced metabolic adjustments under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150, 244-253.
- Nejat, N., & Mantri, N. (2017). Plant immune system: Crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing link in understanding plant defence. *Current Issues in Molecular Biology*, 23, 1–16.
- Niu, L., & Liao, W. (2016). Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: Crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in Plant Science*, 7, 230.
- Nurhasanah Ritonga, F., & Chen, S. (2020). Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants. *Plants*, 9(5).
- Raza, A., Charagh, S., Najafi-Kakavand, S., Abbas, S., Shoaib, Y., Anwar, S., Sharifi, S., Lu, G., & Siddique, K.H.M. (2023). Role of phytohormones in regulating cold stress tolerance: Physiological and molecular approaches for developing cold-smart crop plants. *Plant Stress*, 8, 100152.
- Saleh, A.S.M., Wang, P., Wang, N., Yang, L., & Xiao, Z. (2019). Brown rice versus white rice: Nutritional quality, potential health benefits, development of food products, and preservation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 1070–1096.

- Sayed, O.H. (2003). Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica*, 41(3), 321–330.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., & Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*, 25, 445-483.
- Swapnil, P., Meena, M., Singh, S.K., Dhuldhaj, U.P., Harish, & Marwal, A. (2021). Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects. *Current Plant Biology*, 26, 100203.
- Thapa, R., Tabien, R.E., Johnson, C.D., & Septiningsih, E.M. (2023). Comparative transcriptomic analysis of germinating rice seedlings to individual and combined anaerobic and cold stress. *BMC Genomics*, 24(1).
- Uarrotta, V.G., Stefen, D.L.V., Leolato, L.S., Gindri, D.M., & Nerling, D. (2018). Revisiting carotenoids and their role in plant stress responses: From biosynthesis to plant signaling mechanisms during stress. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, 207–232. Springer International Publishing.
- Wang, P., Liu, W., Han, C., Wang, S., Bai, M., & Song, C. (2024). Reactive oxygen species: Multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 66(3), 330–367.
- Wu, B., Chen, S., Cheng, S., Li, C., Li, S., Chen, J., Zha, W., Liu, K., Xu, H., Li, P., Shi, S., Yang, G., Chen, Z., Liu, K., You, A., & Zhou, L. (2023). Transcriptome analysis revealed the dynamic and rapid transcriptional reprogramming involved in cold stress and related core genes in the rice seedling stage. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1914.
- Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q., & Cai, Y. (2019). The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *BioMed Research International*, 9732325.
- Xu, C., Wang, Y., Yang, H., Tang, Y., Liu, B., Hu, X., & Hu, Z. (2023). Cold acclimation alleviates photosynthetic inhibition and oxidative damage induced by cold stress in citrus seedlings. *Plant Signaling & Behavior*, 18(1).
- Zhang, G. (2020). Prospects of utilization of inter-subspecific heterosis between indica and japonica rice. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(1), 1–10.
- Zhang, H., Zhao, Y., & Zhu, J.K. (2020). Thriving under stress: How plants balance growth and the stress response. *Developmental Cell*, 55(5), 529-543.
- Zhang, Q., Chen, Q., Wang, S., Hong, Y., & Wang, Z. (2014). Rice and cold stress: Methods for its evaluation and summary of cold tolerance-related quantitative trait loci. *Rice*, 7(1), 24.
- Zhao, Y., Han, Q., Ding, C., Huang, Y., Liao, J., Chen, T., Feng, S., Zhou, L., Zhang, Z., Chen, Y., Yuan, S., & Yuan, M. (2020). Effect of low temperature on chlorophyll biosynthesis and chloroplast biogenesis of rice seedlings during greening. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1390.