مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۴، شماره ۲، ۱۳۹۲ (۳۴۵-۳۲۷)

ارتباط تجمع برخی متابولیت‌ها با سازوکارهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تحمل سرما و انجماد در گندم نان

شهریار ساسانی[1]، رضا توکل افشاری[2]*، سیروس محفوظی[3]
۱، استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه، ۲، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،
۳، استاد موسسه تهیه بذر و نهال
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۴ - تاریخ تصویب: ۹۲/۴/۱۸)

چکیده

بهاره‌سازی از بارزترین فرایندهای سازگاری غلات زمستانه در مناطق معتدل و سرد است. هدف از اجرای این پژوهش مطالعه ارتباط پاسخ تیمارهای خوگیری[1] به سرما مبتنی بر دوره‌های متفاوت سرمادهی در چهار رقم گندم نان (نورستار، شهریار، الوند، کویر) واجد نیازهای متفاوت بهاره‌سازی (از زمستانه تا بهاره) در شرایط مزرعه و نیز دو شرایط محیط تحت کنترل (اتاق سرد و عادی)، با انباشت برخی ترکیبات بیوشیمیایی مرتبط با بیان تحمل به انجماد و برخی پاسخ‌های متابولیک و فیزیولوژیک بود. توان خوگیری ارقام مورد ارزیابی طی دوره سرما و متعاقب آن، روند تحلیل رفتن این توانایی با مراحل نموی گیاهان از همبستگی قابل ملاحظه‌ای برخوردار بود. اوج تحمل به انجماد در فاز رویشی گیاه و توأم با مرحله برجستگی ساده در مریستم انتهایی ساقه بود و ظهور برجستگی دوگانه مقارن با کاهش میزان تحمل گیاه به انجماد بود. در بوته‌های گندم واجد نیازهای متفاوت بهاره‌سازی، اعمال تیمار دمایی ۱±۳ درجه سانتیگراد شرایط تنش سرما را القاء ننمود، با این‌حال، در گیاهان متأثر از تیمارهای خوگیری به سرما در محیط کنترل‌شده اتاق سرد هماهنگ با گیاهان مزرعه‌ای متأثر از تنش سرمای پاییز و زمستان، بیان تحمل به انجماد و تا حدودی انباشت ترکیبات محافظ گیاه در برابر سرما و انجماد و پاسخ‌های فیزیولوژیک مشاهده شد. محتوای کلروفیل در ارقام زمستانه متحمل به انجماد به طرز معنی‌داری از ارقام بینابین و بهاره بیشتر بود. محتوای پرولین در گیاهان از روندی مشابه با محتوای کلروفیل، در طول فصل سرما در مزرعه و نیز با تکمیل تیمار خوگیری به سرما در اتاق سرد برخوردار بود. خسارت غشای سلولی در رقم بهاره در مقایسه با دیگر ارقام متأثر از فصول سرما در مزرعه مشهود بود به طوری‌که میانگین محتوای مالون‌دی‌آلدهاید در رقم بهاره کویر به ترتیب قریب به دو، چهار و هشت برابر بیشتر از رقم بینابین الوند و نیز ارقام زمستانه شهریار و نورستار بود. میانگین تجمع پراکسیدهیدروژن نیز در ارقام حساس در شرایط تنش سرما در مزرعه قریب به دو برابر بیشتر از ارقام متحمل به انجماد بود. در مجموع نتایج این پژوهش در تأیید فرضیه‌ای است که اذعان می‌دارد انباشت اسمولیت‌های سازگار و تغییرات متابولیک طی فصل سرما به عنوان رویدادی حیاتی در غلات، همسو با خوگیری و بیان مقاومت به سرما مطرح بوده که زمینه انطباق مناسب با دمای پایین را برای این گروه از گیاهان فراهم می‌آورد.

واژه های کلیدی: **بهاره‌سازی، پراکسیدهیدروژن، پرولین، خوگیری به سرما، فلوئورسانس کلروفیل، کلروفیل، گندم، مالون‌دی‌آلدهاید**

مقدمه

توانائی غلات در واکنش به تنش سرما که به‌وسیله فرایندهای سازگاری به محیط از قبیل نیاز بهاره‌سازی کنترل می‌شود از عواملی است که می‌تواند موفقیت کشت آن‌ها را در مناطق معتدل و سرد تضمین نماید. خوگیری به سرما ویژگی بارز غلات پاییزه است که تغییرات مهم بیوشیمیایی و متابولیک، همسو با تکمیل آن و انجام دیگر مؤلفه‌های فیزیولوژیک مرتبط، در طول فصل‌های پاییز و زمستان در این گیاهان صورت می‌گیرد و در نتیجه گیاهان به انباشت گروهی از مواد محافظت کننده در برابر تنش سرما[1] رو می‌آورند تا خود را برای

1. Acclimation
2. Cryoprotectant

* نویسنده مسئول: رضا توکل افشاری تلفن: ۰۹۱۵۱۸۲۶۲۰۹ E-mail: tvakkol@ut.ac.ir

مقابله با شرایط سخت زمستان مهیا نمایند (Thomashow, 1999). تجمع پرولین به عنوان یک ایمینواسید[1] با قابلیت انحلال بسیار زیاد در آب، در برگ بسیاری از گونه‌های گیاهی هالوفیت، در نواحی شور (Treichel, 1986) در برگ و مریستم انتهایی ساقه گیاهان مواجه با تنش‌های رطوبتی (Jones et al., 1980) در دانه‌های گرده گیاهان مواجه با تنش (Lansac et al., 1996)، در نواحی مریستمی ریشه گیاهان رویش یافته در نواحی کم آب (Voetberg & Sharp, 1991) و حتی در محیط کشت گیاهان سازگار شده به تنش رطوبتی و یا تنش شوری (Thomas et al., 1992) گزارش و استناد شده‌است. میزان پرولین تجمع یافته در بوته‌های توتون در معرض تنش بیش از ۸۰٪ از کل اسیدهای آمینه موجود را دربر می‌گیرد که نشان‌گر نقش بارز پرولین در فرایند تنظیم اسمزی[2] سیتوپلاسم در شرایط تنش می‌باشد (Binzel et al., 1987). با اعمال تیمار شوری معادل ۲۰۰ مایکرومول نمک طعام بر گیاه *Distichlis spicata* به اندازه‌گیری میزان پرولین تجمع یافته در سایتوسول پرداختند که غلظت پرولین به بیش از ۲۳۰ مایکرومول افزایش یافت (Ketchum et al., 1991). در پتانسیل آبی ۱/۶- مگاپاسکال در محیط ریشه گیاه ذرت، غلظت پرولین اندازه‌گیری شده در هر میلیمتر مکعب از سلول‌های مریستم انتهایی ریشه معادل ۱۲۰ میلی‌مول گزارش گردیده است به‌طوری‌که بیش از نیمی از ظرفیت تنظیم اسمزی این ناحیه از ریشه مرهون تجمع پرولین بود (Voetberg & Sharp, 1991). به نظر می‌رسد که اسید آبسیسیک بر تجمع پرولین در نواحی مریستم رویشی گیاه تأثیر می‌نهد (Ober & Sharp, 1994). با این حال هنوز به‌طور دقیق مشخص نیست که آیا تجمع پرولین در ناحیه مریستمی، ناشی از انتقال این ایمینواسید از دیگر بافت‌های گیاه از طریق آوند آبکش است و یا این‌که سنتز پرولین به خودی خود و در القای متأثر از تنش در سلول‌های مریستمی رخ می دهد (Voetberg & Sharp, 1991). تجمع پرولین در سایتوپلاسم، مقارن با کاهش غلظت دیگر حل شونده‌های سازگار و همسو با افزایش حجم آب سایتوسول به وقوع می‌پیوندد (Cayley et al., 1992). اندوخته پرولین در سلول‌های گیاهان عالی می‌تواند در نقش یک محافظ اسمزی سلول و نیز محافظ در برابر سرما عمل نماید (Lone et al., 1987). تنش سرما و انجماد همچون بسیاری دیگر از تنش‌ها موجب بروز اختلال در متابولیسم گیاه و افزایش تولید انواع اکسیژن‌های کنش‌گر[3] تحت عنوان رادیکال‌های آزاد می‌گردد که این رادیکال‌ها می‌توانند با اکسیدکردن مولکول‌های زیستی همچون چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، موجب بروز خسارت در انواع ماکرومولکول‌های سلولی گردیده و نوعی تنش ثانوی را بر گیاه تحمیل نمایند که آن‌را تنش اکسیداتیو[4] می‌خوانیم (Desican et al., 2004). بروز پراکسیداسیون در مولکول‌های چربی غشاء به‌واسطه فعالیت گونه‌های اکسیژن کنش‌گر ناشی از تنش سرما، موجب اختلال در نفوذ پذیری غشاء و کاهش شاخص پایداری آن گردیده و ازاین‌رو زمینه پیدایش اخلال و خسارت بر غشاء را فراهم می‌آورد (Dehindsa, 1991)، بنابراین تغییر در پراکسیداسیون چربی‌ها به دلیل بروز اختلال در یکپارچگی غشاء، به عنوان یک شاخص برای تعیین میزان خسارت تنش اکسیداتیو در موجودات زنده با شرایط تنش‌زا مطرح است (Borsani et al., 2001)، مالون‌دی‌آلدهاید محصول پراکسیداسیون غشای سلولی است (Stewart & Bewley, 1980) که در شرایط تنش بر اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع توسط گونه‌های اکسیژن کنش‌گر تولید می‌شود (Stewart & Bewley, 1980) و از این طریق، کاهش شاخص پایداری غشاء و افزایش نفوذ پذیری آن در سلول‌های گیاه القاء می‌گردد (Sairam et al., 2001). ارزیابی کلروفیل و فلوئورسانس آن طی چندین دهه به عنوان روشی سریع و کارآمد در برآورد اثرات تنش‌های محیطی بر گیاه مورد استناد بوده است (Bolhàr-Nordenkampf et al, 1989). برخی دیگر از محققین پس از وی، به بررسی ارتباط بین تغییرات محتوای کلروفیل و نیز تغییر در

2. Imino acid
3. Osmotic adjusment
4. Reactive oxygen species
5. Oxidative stress

فلوئورسانس آن طی مواجهه برگ با تنش‌های سرما و یخزدگی در بسیاری از گونه‌های گیاهی پرداختند (Bolhàr-Nordenkampf et al, 1994). برای سالیان متمادی، اندازه‌گیری فلوئورسانس کلروفیل به عنوان روشی دقیق، موثق و سریع در تعیین اثرات تنش‌های محیطی همچون خشکی، سرما، گرما، نور شدید و حتی آلودگی هوا بر گیاهان سبز مطرح بوده‌است (Bolhàr-Nordenkampf et al, 1989) و از سویی، دیگر مؤلفه‌های فلوئورسانس از جمله ETR, Φ_{PSII}, qN, qP, Ft, Fs, Ftv/Fm ,Fo, Fm، برای ارزیابی خسارت تنش‌های سرما (Brennan & Jefferies, 1990) و یخبندان (Bolhàr-Nordenkampf & Lechner, 1988) بر گیاهان، مورد استفاده قرار گرفته و پژوهش‌گران دیگری نیز از مؤلفه فلوئورسانس کلروفیل برای رتبه‌بندی گونه‌ها و ارقام گیاهی در شرایط محیط‌های واجد دمای زیر صفر درجه سانتیگراد بهره گرفته‌اند (اوکوئیست و همکاران، ۱۹۹۳). در اغلب این پژوهش‌ها تفاوت در متغیرهای فلوئورسانس متأثر از دمای انجماد بر گیاهان قابل ارزیابی بود هر چند که این مقوله بستگی تام به گونه گیاهی، محتوای کلروفیل، ضخامت برگ و حتی سمت برگ داشت (Björkman & Demmig, 1987). هدف از اجرای این پژوهش مطالعه ارتباط پاسخ تیمارهای خوگیری[1] به سرما مبتنی بر دوره‌های متفاوت سرمادهی در چهار رقم گندم نان واجد نیازهای متفاوت بهاره‌سازی (از زمستانه تا بهاره) در شرایط مزرعه و نیز دو شرایط محیط تحت کنترل (اتاق سرد و عادی)، با انباشت برخی ترکیبات بیوشیمیایی مرتبط با بیان تحمل به انجماد و برخی پاسخ‌های متابولیک و فیزیولوژیک بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تعداد چهار رقم گندم نان (*Triticum aestivum* L.) شامل: نورستار[2] - رقمی بسیار متحمل به سرما و انجماد - با تیپ رشد زمستانه و نیاز درازمدت بهاره‌سازی (۴۲ روز)، رقم شهریار[3] با تیپ رشد زمستانه و نیاز میان‌مدت بهاره‌سازی (۲۸ روز)، رقم الوند[4] با تیپ رشد بینابین و نیاز کوتاه‌مدت بهاره‌سازی (۱۴ روز) و رقم کویر[5] با تیپ رشد بهاره بدون نیاز بهاره‌سازی مورد اعمال تیمار و ارزیابی قرار گرفتند.

محیط رشد گیاهان

این پژوهش در دو شرایط رشد متفاوت شامل محیط کنترل شده و نیز مزرعه به شرح ذیل اجرا گردید:

محیط کنترل شده

ابتدا بذرها توسط محلول قارچ‌کش تیرام به نسبت نیم در هزار (۰/۰۵٪) ضدعفونی شدند. آنگاه در دستگاه ژرمیناتور در دمای ۱±۱۹ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت در شرایط تاریک و به روش استقرار بین کاغذهای صافی مرطوب، جوانه دار شدند. بذرهای جوانه‌دار همسان از جنبه وضعیت رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه، در گلدان‌های سفیدرنگ به قطر ۲۰ سانتیمتر و ارتفاع ۲۵ سانتیمتر در محیط رشد کنترل شده عادی با دمای ۱±۱۹ درجه سانتیگراد، رطوبت ۶۵٪ و طول روزهای بلند ۱۶ ساعته با شدت تشعشع ۴۰۰ مایکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه (μE[6]) در اتاقک رشد تا مرحله سه برگی (z=۱۳/۲۱) (Zadoks et al., 1974) رویش یافتند که این مرحله (z=۱۳/۲۱) به عنوان مرحله استقرار اولیه در غلات مورد قبول پژوهشگران است. تعداد بوته در هر گلدان ۱۲ عدد و هر واحد آزمایش مشتمل بر ۱۲ گلدان بود. آنگاه به منظوراعمال تیمار خوگیری به سرما در دوره‌های متفاوت (۰، ۲، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۴۲، ۵۶ و ۷۰ روز)، نیمی از گلدان‌ها در مرحله سه‌برگی به اتاق رشد سرد با دمای ۱±۳ درجه سانتیگراد و طول روز بلند مشابه (۱۶ ساعت) با شدت تشعشع ۲۵۰ (μE) منتقل شدند و بقیه گلدان‌ها در همان محیط باقی ماندند. این آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار اجرا

---

1. Acclimation

۲. Norstar: رقم دیررس حاصل از تلاقی بین ارقام وینولتا (Vinolta) و آلباسکاجا (Albaskaja) که در سال ۱۹۷۷ در کشور کانادا معرفی گردید.

۲. با شجره Kvz/Ti71/3/Maya"s"//Bb/Inia/4/Karaj2/5/Anza/3/Pi/Nar//Hys. نسبتاً دیررس، انتخابی از دورگ‌های داخلی. سال معرفی ۱۳۸۱ خورشیدی.

۳. با شجره 1-27-6275/cf1770. نسبتاً دیررس، انتخابی از دورگ‌های داخلی. سال معرفی ۱۳۷۴ خورشیدی.

۴. با شجره Stm/3/Kal/V534/Jit716 . زودرس، انتخابی از دورگ‌های داخلی. سال معرفی ۱۳۷۶ خورشیدی.

5. Micro Einstein

گردید به طوری که گلدان‌ها طی دوره رشد به طور مرتب و تصادفی در محیط اتاقک‌های رشد جابجا می‌شدند. در دوره‌های یاد شده تیمار خوگیری به سرما، نمونه‌گیری‌های مربوطه برای تعیین وضعیت مریستم انتهایی ساقه، تحمل به انجماد از یک سو و نیز محتوای پرولین، مالون‌دی‌آلدهاید، پراکسیدهیدروژن، محتوای کلروفیل و فلوئورسانس کلروفیل برگ هم‌زمان در هر دو محیط کنترل شده عادی (دمای ۱±۱۹ درجه سانتیگراد) و اتاق رشد سرد (دمای ۱±۳ درجه سانتیگراد) انجام گرفت.

شرایط مزرعه

پس از آغشته نمودن بذرها به قارچ کش تیرام به نسبت ۲/۵ در هزار بذرها در مزرعه پژوهشی با مشخصات ۳۵ درجه و ۵۶ دقیقه عرض شمالی، ۵۰ درجه و ۵۸ دقیقه طول شرقی و ارتفاع ۱۳۱۶ متر از سطح دریا، بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مورخ ۲۰ مهرماه کشت گردید، عملیات خاک‌ورزی، تهیه بستر کاشت، تراکم، تغذیه و مبارزه با آفات، بیماری‌ها و علف-های هرز مبتنی بر اصول متداول اجرا گردید. طی فصول پاییز و زمستان سال زراعی ۸۶-۸۵ نمونه‌گیری مربوطه در زمان های پیش بینی شده برای مشخص کردن وضعیت مریستم انتهایی ساقه، تحمل به تنش سرما و انجماد از یک سو و نیز محتوای پرولین، مالون‌دی-آلدهاید، پراکسیدهیدروژن، محتوای کلروفیل برگ در فرصت‌های مناسب با توجه به طول دوره، وضعیت نمو گیاه و داده‌های هواشناسی انجام گرفت. همچنین دماهای کمینه و بیشینه روزانه هوا و خاک (در عمق ۵ سانتی متری) از اوایل مهرماه تا اواخر فروردین ماه یادداشت برداری گردید.

ارزیابی روند تحمل به انجماد (آزمون انجماد)

به منظور تعیین قابلیت تحمل به انجماد در گیاهان از روش پیشنهادی Limin & Fowler (1988) با تعیین LT_{50} و ارتباط آن با طول دوره بهاره‌سازی در شرایط محیط کنترل شده و نیز در مزرعه به‌صورت جداگانه بهره گرفته شد. روش LT_{50} برگرفته از سری دماهای انجمادی است که در آن حداقل ۵۰٪ بوته‌ها در دمای مزبور از بین می‌روند. برای این منظور از هر تکرار و هر رقم، تعداد ۵ بوته از محیط کنترل شده (دمای ۴ درجه سانتی گراد) و یا از مزرعه، جمع‌آوری گردید و با قیچی قسمت‌های ریشه و ساقه حذف، به‌طوری‌که محدوده طوقه گیاه (یک سانتیمتری بالا و زیر محل طوقه) برای آزمون انجماد آماده شد. در روش LT_{50}، ابتدا نمونه‌ها (طوقه گیاهان) را در داخل ظروف آلومینیومی حاوی ماسه نرم مرطوب مستقر شدند به نحوی‌که تمامی طوقه‌ها به گرداگرد دیواره قوطی آلومینیومی چسبیده بود، آن‌گاه قوطی‌های آلومینیومی، در فریزر تحقیقاتی قابل برنامه‌ریزی که پیشتر در دمای منهای سه درجه سانتیگراد تنظیم شده بود، قرار گرفتند. به منظور پیشگیری از بروز سوپرکولینگ طوقه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳- درجه در فریزر تحقیقاتی قابل برنامه‌ریزی نگهداری شدند. ضمن آن‌که اعمال این تیمار بر نمونه‌های مربوط به بوته‌های مستقر در اتاق سرد، به نوعی القاء کننده شب‌های انجماد مزرعه بر گیاهان مستقر در محیط کنترل‌شده است که از آن تحت عنوان تیمار خوگیری زیر صفر درجه[1] یاد می‌شود (Herman et al., 2006) و همین مزیت موجب‌شده تا روش پیشنهادی Limin and Fowler (1988) در مورد شرایط محیط کنترل شده از همبستگی بسیار بالایی (در سطح ۰/۹۵) با شرایط طبیعی بقا در مزرعه[2] برخوردار باشد. پس از سپری شدن ۱۲ ساعت در دمای منهای سه درجه سانتیگراد، به کمک رایانه، دمای فریزر با شیب یک درجه سانتیگراد به ازای بازه زمانی ۳۰ دقیقه‌ای رو به کاهش گذاشته شد که این کاهش تا دمای منهای ۱۷ درجه سانتیگراد از این روند تبعیت می‌نمود. سپس میزان کاهش دما به شیب یک درجه به ازای هر ۲۰ دقیقه تشدید می‌گردید که این تنزل دما تا منهای ۲۵ درجه سانتیگراد تداوم یافت. در زمان های هر دمای مشخص، نمونه‌های مزبور از فریزر خارج گردید و پس از استقرار ۱۲ ساعته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ذوب تدریجی بافت و ماسه یخزده (بدون بروز هرگونه آسیب، تنش و یا خشکیدگی طوقه‌ها)، نمونه‌ها به شرایط گلخانه‌ای با دمای ۲±۱۸ درجه سانتیگراد، طول روز بلند ۱۶ ساعت و حداقل شدت تشعشع ۳۵۰ (µE)

1. Subzero acclimation
2. Field survival

منتقل شده و در بستری با بافت سبک مشتمل بر مخلوطی مرطوب از ورمی‌کولیت، کوکوپیت و پرلیت کشت گردید. پس از سه هفته بر اساس ارزیابی سیستم ریشه‌ای و هوایی زنده و فعال، تعداد بوته‌های مرده و زنده ثبت شده و بر این اساس میزان LT_{50} و تحمل سرما تعیین شد.

وضعیت توسعه مریستم انتهایی ساقه

به منظور ارزیابی وضعیت نمو در مریستم انتهایی ساقه و تعیین مرحله گذار فیزیکی از فاز رویشی به زایشی، تعداد پنج بوته را در هر دوره تیمار سرمادهی در شرایط تحت کنترل و یا زمان نمونه‌گیری در شرایط مزرعه به ازای هر تکرار و رقم، انتخاب نموده و با تشریح بوته و به‌کمک میکروسکوپ به ارزیابی دقیق وضعیت نمو در محل مریستم انتهایی ساقه اقدام گردید. نکته مهم در این مرحله تعیین وضعیت رویشی[1]، برجستگی واحد[2] و نیز برجستگی دوگانه[3] به عنوان نماد وضعیت فیزیکی انتقال از مرحله رویشی به زایشی بود که در این پژوهش با دقت زیاد بررسی شد (Sassani et al., 2009).

محتوای پرولین

تعیین محتوای پرولین براساس روش Bates et al., (1973) صورت گرفت که در این راستا از نمونه‌های برگ تازه که در طول دوره‌های اعمال تیمار بهاره‌سازی بر روی ارقام، در شرایط محیط کنترل‌شده (اتاق سرد و همزمان با آن در شرایط عادی) و نیز در شرایط مزرعه در زمان‌های نمونه برداری طی پاییز و زمستان، ارزیابی انجام گرفت.

لازم به توضیح است که برگ‌های مورد نظر در نمونه‌گیری، آخرین برگ توسعه یافته بوته (برگی که لیگول آن مشخص شده است) بود که بر اساس مقیاس زیداکس (Zadoks et al., 1974) برای هر تیمار در سه تکرار تعیین گردید.

ارزیابی بر اساس پروتوکل یادشده، قرائت در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل SHIMADZU UV-160A ژاپن) انجام گرفت.

محتوای مالون‌دی‌آلدهاید[4] (MDA)

در راستای برآورد میزان پراکسیداسیون چربی‌ها، براساس روش Stewart & Bewley (1980) و با استفاده از نمونه‌های برگ تازه که در طول دوره‌های اعمال تیمار بهاره‌سازی بر ارقام، در شرایط محیط کنترل‌شده (اتاق سرد و همزمان با آن در شرایط نرمال) و نیز در شرایط مزرعه در زمان‌های نمونه برداری طی پاییز و زمستان، میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخص تعیین خسارت به غشای پلاسمایی، اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که در این روش پس از دنبال کردن مراحل متوالی پروتوکل، میزان جذب مخلوط با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل SHIMADZU UV-160A ژاپن) در دو طول موج ۵۳۲ نانومتر و۶۰۰ نانومتر قرائت گردید (جذب در طول موج دوم غیر خاص است که باید از جذب در طول موج اول کسر گردد و با استفاده از ضریب خاموشی ($155\ mM^{-1}cm^{-1}$) میزان مالون دی‌آلدهید تولید شده برحسب نانومول در گرم ماده تر برگ محاسبه شد). علت کسر میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر این است که برخی مواد آلی با اسید تیوباربیتوریک[5] (یکی از بافرهایی که مخلوط با اسیدتری‌کلرواستیک در استخراج مالون‌دی‌آلدهاید طی مراحل انتهایی پروتوکل استفاده می‌شود) واکنش می‌دهند و باعث افزایش جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر می‌شوند، بنابراین برای کاهش خطا، میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر از آن کسر می‌شود. لازم به توضیح است که برگ‌های مورد ارزیابی در نمونه‌گیری، آخرین برگ توسعه یافته بوته (برگی که لیگول آن مشخص شده است) بودند که بر اساس مقیاس زیداکس (Zadoks et al., 1974) برای هر تیمار در ۳ تکرار تعیین گردید.

محتوای پراکسیدهیدروژن

به منظور ارزیابی وضعیت توسعه احتمالی تنش اکسیداتیو متأثر از سرما، تعیین میزان پراکسیدهیدروژن تولیدی براساس روش لورتو و ولیکووا (۲۰۰۱) صورت گرفت که در این راستا از نمونه‌های برگ تازه که در طول دوره‌های بهاره‌سازی در شرایط محیط کنترل‌شده

1. Vegetative stage
2. Single ridge
3. Double ridge

4. Malondialdehyde 1,3-propandial
5. Thiobarbituric acid (TBA)

(اتاق سرد و همزمان با آن در شرایط نرمال) و نیز در شرایط مزرعه در زمان‌های نمونه برداری طی پاییز و زمستان بر روی ارقام گرفته‌شده بود، ارزیابی در سه تکرار انجام گرفت (برای آگاهی بیشتر از روش کار به پیوست رساله مراجعه شود). لازم به توضیح است که برگ‌های مورد در نمونه‌گیری آخرین برگ توسعه یافته بوته (برگی که لیگول آن مشخص شده است) بود که بر اساس مقیاس زیداکس (زیداکس و همکاران، ۱۹۷۴) تعیین گردید. قرائت در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل SHIMADZU UV-160A ژاپن) انجام گرفت.

محتوای کلروفیل

برای برآورد محتوای کلروفیل از میزان سبزینگی برگ بهره گرفته‌شد. اندازه‌گیری میزان سبزینگی به روش غیر تخریبی در طول دوره‌های بهاره‌سازی در شرایط محیط کنترل‌شده (اتاق سرد و همزمان با آن در شرایط عادی) و نیز در شرایط مزرعه در زمان‌های نمونه‌برداری طی پاییز و زمستان بر روی ارقام در سه تکرار انجام گرفت. میزان سبزینگی توسط دستگاه کلروفیل‌متر[1] برآورد گردید که از طریق اندازه‌گیری میزان عبور متوالی دو طول موج قرمز (۶۵۰ نانومتر) و مادون‌قرمز (۹۴۰ نانومتر) و تفاضل بین میزان عبور این دو طول موج از مولکول‌های کلروفیل برگ در واحد سطح برآورد گردید به‌طوری‌که محتوای کلروفیل از این طریق محقق می-گردد (Martinez and Guiamet, 2004). پیش از شروع هر اندازه‌گیری نسبت به آزمون کالیبراسیون دستگاه با استفاده از صفحه قرائت استاندارد اقدام نموده و پس از حصول اطمینان از کالیبره‌بودن دستگاه، اندازه‌گیری آغاز می‌شد. برای اندازه‌گیری سبزینگی، آخرین برگ توسعه یافته (برگی که لیگول آن مشخص شده بود) (Zadoks et al., 1974)، در شش بوته به صورت تصادفی انتخاب و میزان سبزینگی در ۵ نقطه در فواصل مساوی در طول هر برگ قرائت می‌شد، میانگین اعداد قرائت شده به عنوان میزان سبزینگی بوته‌های هر تیمار در نظر گرفته می‌شد و اندازه‌گیری در سه تکرار صورت می‌گرفت، نتایج بر اساس واحد SPAD گزارش می‌گردید.

ارزیابی مؤلفه‌های فلوئورسانس کلروفیل

به منظور ارزیابی وضعیت گیاهان در محیط تحت کنترل و تعیین این نکته که آیا دوره‌های خوگیری به سرما می‌تواند مستقل از تنش سرما، به انباشت مواد محافظت کننده گیاه در برابر سرما[2] و یخزدگی بیانجامد، در پایان هر یک از دوره‌های خوگیری به سرما در محیط تحت کنترل، نسبت به ارزیابی بوته‌ها با استفاده از دستگاه فلوئورسانس‌متر OS-30 و مقایسه هم‌زمان آن با شرایط نرمال اقدام گردید، از این‌رو آخرین برگ توسعه یافته (برگی که لیگول آن مشخص شده بود) (زیداکس و همکاران، ۱۹۷۴)، در سه بوته به صورت تصادفی انتخاب و در دو شرایط سازگارشده با تاریکی (قرائت در محیط تاریک بطوری‌که بوته‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در این محیط استقرار یافته بودند) و نیز شرایط روشنایی، به طور همزمان در هر دو محیط اتاق سرد و محیط نرمال دمایی(۱ ± ۱۹ درجه سانتیگراد) مؤلفه‌های Fo (فلوئورسانس کمینه در شرایط سازگارشده با تاریکی) Fm (فلوئورسانس بیشینه در شرایط سازگارشده با تاریکی) Fv:Fm (بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم-دو در شرایط سازگارشده با تاریکی) Ft (فلوئورسانس کمینه در شرایط سازگارشده با نور) Fm' (فلوئورسانس بیشینه در شرایط سازگارشده با نور) Φ_{PSII} (عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو در شرایط سازگارشده با نور) برگ قرائت می‌شد، میانگین اعداد قرائت شده در سه برگ مربوط به هر مؤلفه به عنوان معیار مؤلفه‌های مزبور در بوته‌های هر تیمار تعیین و این اندازه‌گیری در سه تکرار صورت می‌گرفت. در تکرار آزمایش، کلیه پارامترهای ذکر شده توسط دستگاه فلوئورسانس متر PAM2000 (مدل والز- آلمان) در شرایطی مشابه در بوته‌هایی با همان ویژگی‌ها و تیمارهای اعمال شده نظیر سری پیشین، ارزیابی شدند.

تجزیه آماری داده‌ها

قبل از انجام محاسبات آماری داده‌ها، با استفاده از نرم-افزار Minitab نرمال بودن واریانس خطاهای آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در شرایط مزرعه به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی،

1. Chlorophyll meter SPAD-502 (Konica Minolta, Osaka, Japan)

2. Cryoprotectants

در سه تکرار با چهار ژنوتیپ و هشت مرحله نمونه‌گیری و در محیط کنترل شده فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی، در سه تکرار با چهار ژنوتیپ و نه دوره بهاره‌سازی بود. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS، MSTATC و SPSS و برای رسم نمودارها و جدول‌ها نیز از نرم‌افزار از Excel و Word استفاده شد. بعد از انجام تجزیه واریانس توسط نرم‌افزارهای مربوطه، میانگین صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

نتایج

نمو فنولوژیک و بیان تحمل به انجماد

ارزیابی فنولوژی نمو ارقام در شرایط کنترل شده و مزرعه در جدول شماره ۱ آورده شده است. در رقم کویر توسعه مریستم انتهایی ساقه و گذار از فاز رویشی به زایشی به سرعت محقق گردید به‌طوری‌که بروز برجستگی دوگانه به عنوان نماد حضور در فاز زایشی، در محیط کنترل شده اتاق سرد پس از ۷ روز اعمال تیمار سرما و در مزرعه در اواخر پاییز رخ داد؛ در رقم بینابین الوند ظهور برجستگی دوگانه در مریستم انتهایی ساقه پس از ۴۲ روز استقرار در اتاق سرد دیده شد؛ در مزرعه نیز بروز برجستگی دوگانه در اوایل زمستان (سیزدهم ژانویه) رقم خورد. ظهور برجستگی دوگانه در رقم زمستانه شهریار پس از ۵۶ روز استقرار بوته در اتاق سرد محرز گردید در حالی‌که در دیگر رقم زمستانه یعنی نورستار برجستگی دوگانه پس از ۹۸ روز حضور در اتاق سرد رؤیت گردید؛ در مزرعه مشاهده برجستگی دوگانه به ترتیب در نیمه دوم زمستان و اوایل بهار برای شهریار و نورستار محرز شد. در شرایط مزرعه (شکل ۲ الف) بروز تغییرات در میزان تحمل به سرما و انجماد از سوی رقم بهاره کویر چندان قابل ملاحظه نبود، به‌طوری‌که شاخص LT_{50} در این رقم طی پاییز از روند کاهش نه چندان معنی دار کاهش تدریجی برخوردار بود آنگاه پس از افزایشی جزئی، این شاخص در نیمه دوم پاییز تا اواخر زمستان تقریباً ثابت ماند. در رقم بینابین الوند و نیز در ارقام زمستانه شهریار و نورستار این شاخص در پاییز رو به افول نهاد بطوریکه در انتهای پاییز به کمترین مقدار خود رسید اما در طول زمستان با روندی تدریجی رو به فزونی نهاد، در مجموع پایین‌ترین حد شاخص LT_{50} در ارقام نورستار، شهریار، الوند و کویر به ترتیب ۱۸/۷- ، ۹/۳- ، ۶/۷- و ۳/۷- درجه سانتیگراد به ترتیب بین ۲۶ آذرماه تا ۳ دی ماه، ۱۵ تا ۲۶ آذرماه و ۱۵ تا ۲۶ آذرماه دسامبر به ثبت رسید که تقریباً مصادف با محدوده‌های تکمیل بهاره‌سازی این ارقام بود. در محیط کنترل شده (شکل ۲ ب) وضعیت شاخص LT_{50} برای رقم بهاره کویر بدون تغییر معنی‌دار قریب به ۲- درجه سانتیگراد طی دوره تیمارهای انطباق با سرما در اتاق سرد، به‌طور نسبی ثابت باقی ماند اما در ارقام دیگر این شاخص از روز دوم استقرار در اتاق سرد رو به توسعه نهاد بطوریکه مقادیر ۱۸/۳- ، ۸/۳- و ۶/۳- درجه سانتیگراد برای ارقام نورستار، شهریار و الوند به ترتیب در ۵۶، ۲۸ و ۲۸ روز اعمال تیمار بهاره‌سازی به ثبت رسید. معادله رگرسیون و ضریب تبیین مربوط به منحنی‌های برازش داده شده در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- وضعیت نمو فنولوژیک ارقام در شرایط محیط تحت کنترل اتاق سرد و نیز در مزرعه.

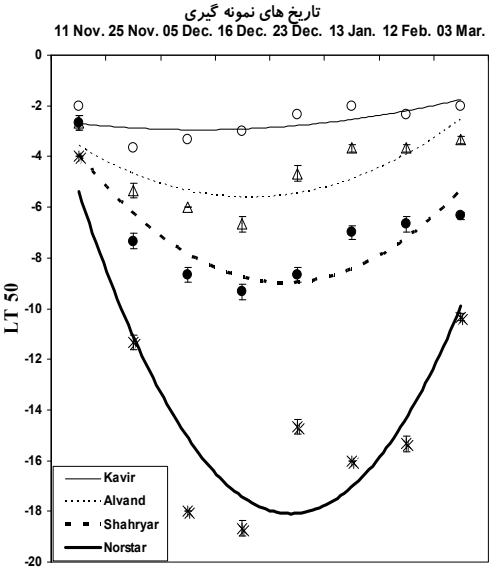
مزرعه		اتاق سرد		رقم
برجستگی دوگانه	برجستگی واحد	برجستگی دوگانه	برجستگی واحد	
۱۵ آذرماه	۲۲ آبان ماه	روز هفتم	بدو استقرار	کویر
۲۴ دی ماه	۲۶ آذر ماه	روز چهل و دوم	روز بیست و یکم	الوند
۱۵ بهمن ماه	۳ دی ماه	روز پنجاه و ششم	روز بیست و هشتم	شهریار
۶ فروردین ماه	۲۴ دی ماه	روز نود و هشتم	روز چهل و دوم	نورستار

ارزیابی تغییرات محتوای کلروفیل

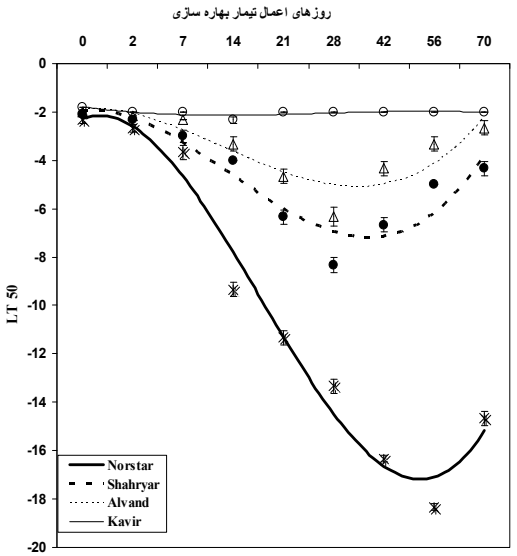
بررسی وضعیت محتوای کلروفیل در شرایط مزرعه نشان از وجود تفاوت معنی‌دار بین همگی ارقام داشت و ارقام زمستانه نسبت به ارقام بینابین و بهاره از موقعیت برتری برخوردار بودند. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن مربوط به محتوای کلروفیل این ارقام در مزرعه (شکل ۳ الف) گویای آن بود که رقم زمستانه نورستار از برترین جایگاه (۵۲/۶ واحد SPAD) برخوردار بود و در جایگاه

بعدی رقم زمستانه شهریار (۴۳/۴ واحد SPAD) قرار داشت. رقم بینابین الوند (۴۰/۵ واحد SPAD) مرتبه بعد را به خود تخصیص داده بود و آنگاه رقم بهاره کویر با میانگین ۳۸/۲ واحد SPAD در موقعیت آخر قرار داشت. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در خصوص محتوای کلروفیل بین دو شرایط نرمال و اتاق سرد در محیط کنترل‌شده نشان‌گر برتری شرایط اتاق سرد نسبت به عادی بود (شکل ۳ ب) به‌طوری‌که میانگین محتوای کلروفیل ارقام در اتاق سرد ۲۸ درصد بیشتر از شرایط نرمال بود. بررسی وضعیت محتوای کلروفیل در شرایط عادی نیز همچون مزرعه نشان از وجود تفاوت معنی‌دار بین همگی ارقام داشت اما نتایج کاملاً عکس نتایج مزرعه بود. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در مورد محتوای کلروفیل ارقام در این شرایط (شکل ۳ پ) برتری جایگاه رقم کویر (۴۴/۶ واحد SPAD) را نشان داد، در جایگاه بعدی رقم الوند (۴۰/۲ واحد SPAD) قرار داشت، رقم شهریار (۳۸/۷ واحد SPAD) مرتبه دیگر را به خود اختصاص داده بود و آن‌گاه رقم نورستار با میانگین ۳۶/۲ واحد SPAD در موقعیت آخر قرار داشت. در همین راستا در شرایط اتاق سرد و با اعمال تیمارهای خوگیری به سرما (۱±۳ درجه سانتیگراد) محتوای کلروفیل رقم نورستار (۴۹/۶ واحد SPAD) با احراز تفاوتی معنی‌دار بیشتر از بقیه ارقام و در جایگاه برتر بود، ارقام شهریار و الوند به ترتیب با احراز میانگین ۴۸/۷ و ۴۸/۵ واحد SPAD به طور مشترک در مرتبه بعد قرار داشتند و رقم کویر (۴۷ واحد SPAD) جایگاه آخر را به خود اختصاص داده بود (شکل ۳ ت).

الف



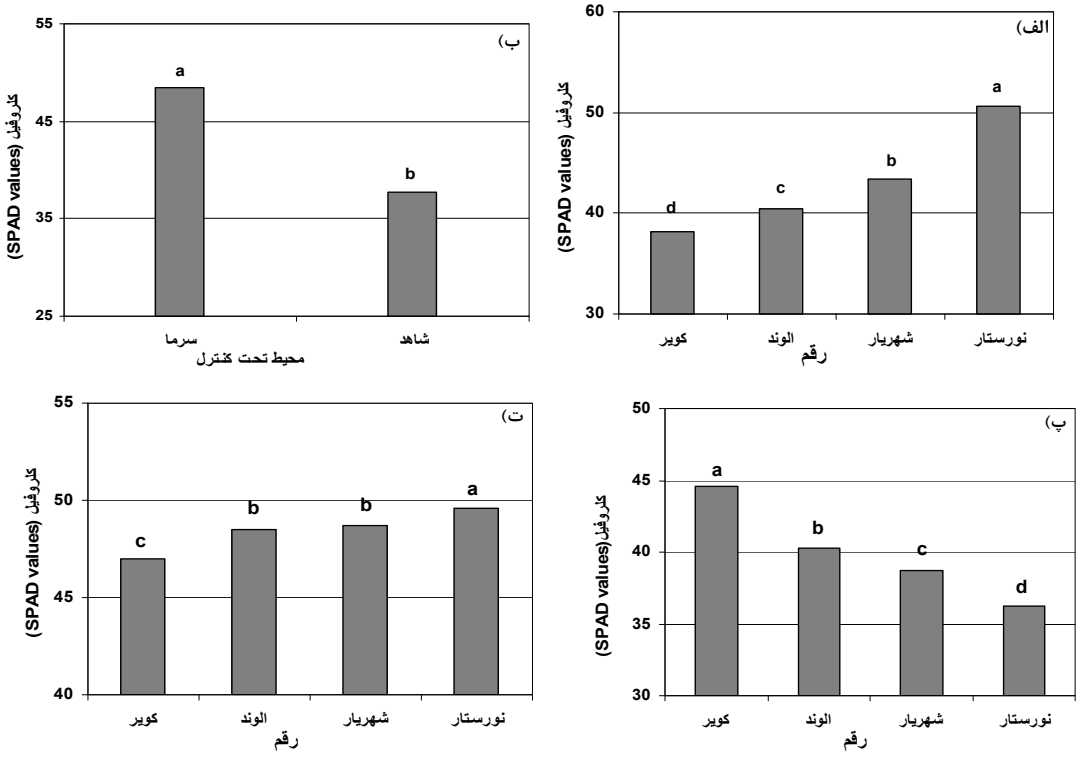
ب



شکل ۲- ارتباط تکمیل بهاره سازی با بیان مقاومت به سرما LT_{50} در ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار.
الف) LT_{50} در مزرعه (LSD = 0.50). **ب)** LT_{50} در محیط کنترل شده(دمای ۱±۳ درجه سانتیگراد و طول روز بلند به مدت ۱۶ ساعت با شدت تشعشع ۲۵۰ مایکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه) تحت دوره‌های بهاره‌سازی متفاوت (۰، ۲، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۴۲ ، ۵۶ و ۷۰ روز)(LSD = 0.44)

بررسی روند تغییرات محتوای کلروفیل ارقام در شرایط مزرعه در طول پاییز و زمستان نیز تفاوت بین ارقام را تایید نمود (شکل ۴ ث). در آغاز پاییز با شروع دوره خوگیری به سرما، محتوای کلروفیل رقم نورستار به گونه‌ای متمایز در جایگاه برتر قرار داشت، درحالی‌که دیگر ارقام در ابتدا تفاوتی معنی‌دار با یکدیگر نداشتند، اما به سرعت ارقام شهریار و الوند از رقم کویر جدا شدند. هر چند که محتوای کلروفیل رقم شهریار از الوند در طول دوره بیشتر بود اما تفاوت چندان معنی‌دار نبود و این دو رقم به صورت مشترک در جایگاه دوم قرار

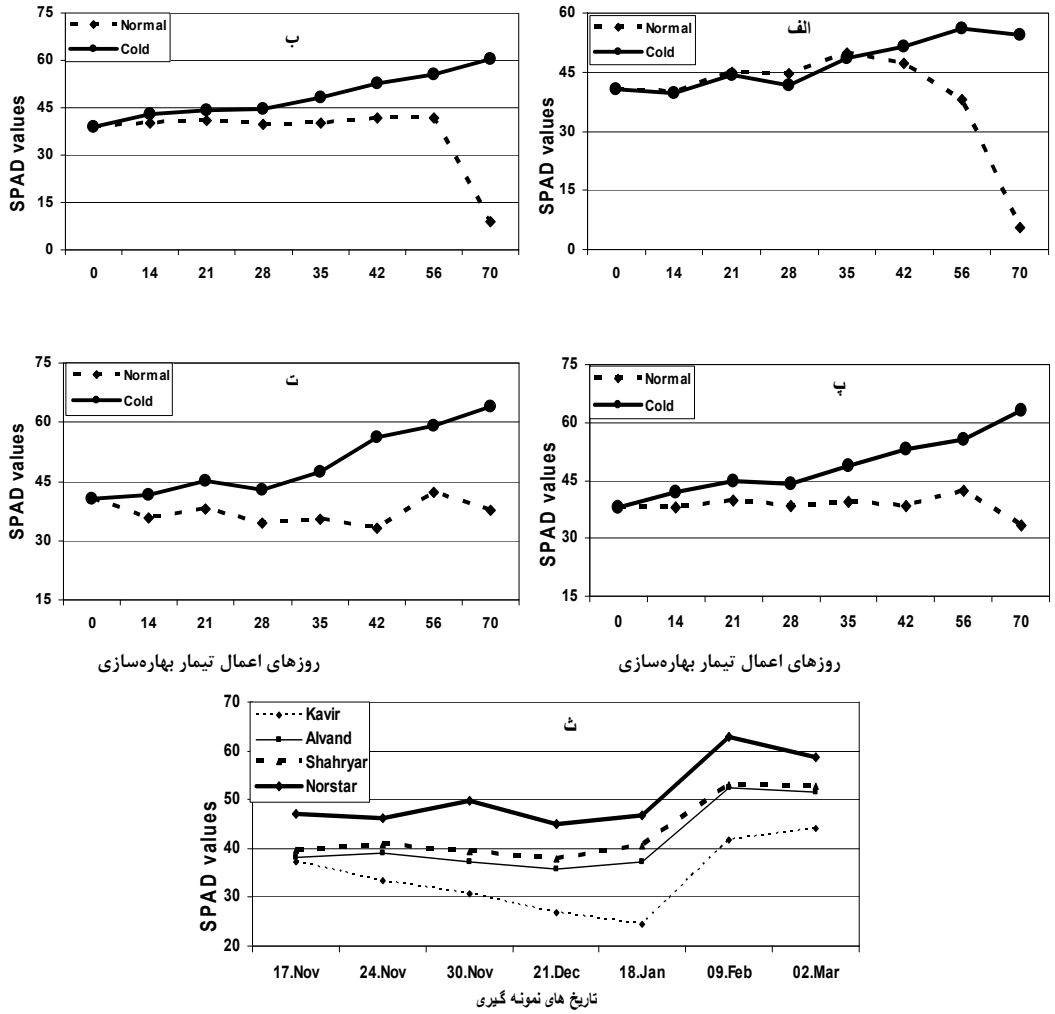
گرفتند. تمایز و برتری رقم نورستار نسبت به دیگر ارقام در طول دوره اندازه‌گیری تداوم یافت. محتوای کلروفیل مربوط به رقم‌های شهریار و الوند طی پاییز تا پایان ماه نخست زمستان نسبتاً ثابت ماند که این وضعیت در خصوص رقم نورستار نیز به همین صورت بود، اما در این بازه زمانی، محتوای کلروفیل رقم کویر از روندی نزولی برخوردار بود به‌طوری‌که از مقدار ۳۷/۲ واحد SPAD به ۲۴/۵ واحد SPAD کاهش یافت. با شروع نیمه دوم زمستان محتوای کلروفیل در همه ارقام از روندی هماهنگ و صعودی پیروی نمود به طوری‌که به طور مثال محتوای کلروفیل ارقام کویر و نورستار به عنوان حدود پایین و بالای ارقام به ترتیب به میزان ۴۱/۷ و ۶۲/۸ واحد SPAD ارتقاء یافت. مقایسه روند تغییرات محتوای کلروفیل رقم کویر در شرایط عادی با شرایط اتاق سرد بیانگر آن بود که تا هفته پنجم، بوته‌های مستقر در اتاق سرد کم و بیش از وضعیتی مشابه با بوته‌های نگاه‌داشته شده در شرایط عادی برخوردار بودند، اما از هفته ششم روند نزولی در محتوای کلروفیل بوته‌های مستقر در محیط نرمال آغاز شد و این وضعیت طی هفته‌های هشتم تا دهم شدت یافت (شکل ۴ الف)، درحالی‌که این روند در مورد بوته‌های مستقر در اتاق سرد از وضعیتی صعودی تبعیت نمود و از هفته هشتم، رو به ثبات نهاد (شکل ۴ الف).



شکل ۳- تغییرات محتوای کلروفیل در ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار تحت شرایط مختلف.
مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن مربوط به برآورد محتوای کلروفیل ارقام: الف) در شرایط مزرعه، ب) در دو محیط کنترل شده عادی و سرد، پ) در محیط کنترل شده عادی، ت) در محیط کنترل شده اتاق سرد.

درخصوص رقم الوند، روند تغییرات محتوای کلروفیل در شرایط نرمال تا هفته هشتم نسبتاً بدون تغییر بود، ولی از هفته هشتم به شدت کاهش یافت، درحالی‌که این وضعیت در شرایط اتاق سرد تا پایان هفته دهم از وضعیتی صعودی برخوردار بود (شکل ۴ ب). روند تغییرات محتوای کلروفیل رقم شهریار در شرایط نرمال تا هفته هشتم نسبتاً بدون تغییر بود، ولی از هفته هشتم به صورت جزئی رو به افول نهاد، درحالی‌که این وضعیت در شرایط اتاق سرد تا پایان هفته دهم از وضعیتی صعودی برخوردار بود (شکل ۴ پ). در ارتباط با رقم

نورستار، روند تغییرات محتوای کلروفیل در شرایط نرمال تا هفته ششم نسبتاً بدون تغییر بود، اما از هفته هشتم از روندی افزایشی برخوردار شد و آنگاه با افولی جزئی مواجه گشت، درعین حال، این وضعیت در شرایط اتاق سرد تا پایان هفته دهم از روندی افزایشی تبعیت نمود (شکل ۴ ت).

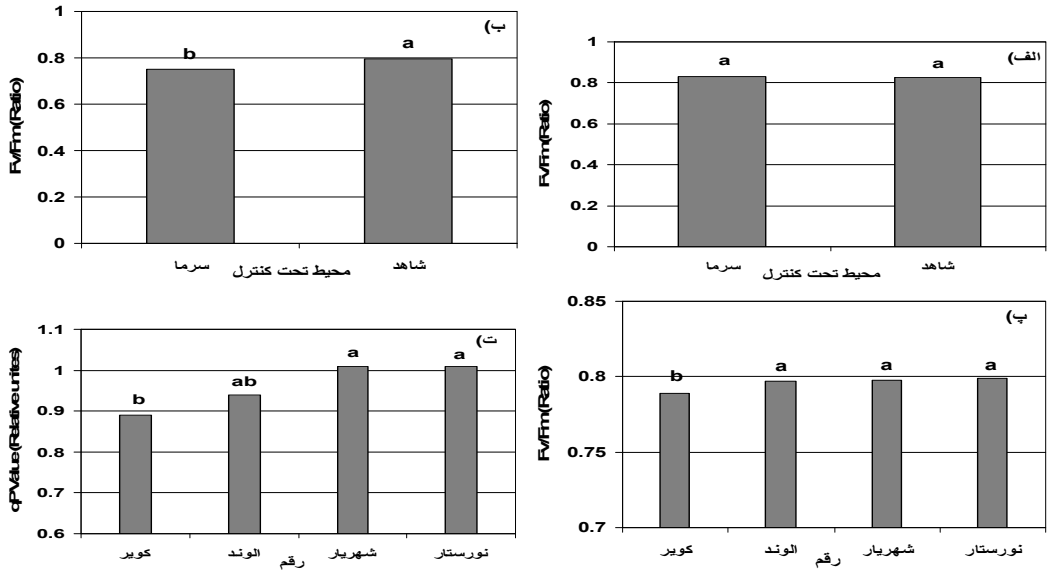


شکل ۴- مقایسه روند تغییرات محتوای کلروفیل **الف)** رقم کویر در شرایط کنترل شده نرمال در مقایسه با اتاق سرد، **ب)** رقم الوند در شرایط کنترل شده نرمال در مقایسه با اتاق سرد، **پ)** رقم شهریار در شرایط کنترل شده نرمال در مقایسه با اتاق سرد، **ت)** رقم نورستار در شرایط کنترل شده نرمال در مقایسه با اتاق سرد، **ث)** ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط مزرعه.

ارزیابی تغییرات مؤلفه‌های فلوئورسانس کلروفیل

با مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن مؤلفه‌های مربوط به فلوئورسانس کلروفیل ارزیابی شده توسط دستگاه OS30 در دو شرایط محیط تحت کنترل نرمال با اتاق سرد حاکی از عدم وجود تفاوت معنی دار بین مؤلفه‌های Fo، Fm، Fv:Fm، Ft، Fm' و Φ_{PSII} بود. به طور مثال شکل ۵ الف گویای این وضعیت در مورد مؤلفه بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو در شرایط سازگارشده با تاریکی می‌باشد. ارزیابی میانگین این مؤلفه‌ها با دستگاه PAM2000 نشان داد که بین مؤلفه‌های Fo، Fm و Fv:Fm در دو شرایط عادی و اتاق سرد تفاوتی جزئی اما معنی دار وجود داشت به‌طوری‌که میزان مؤلفه Fv:Fm در شرایط نرمال ۰/۰۴۵ بیشتر از مقدار این مؤلفه در شرایط اتاق سرد بود (شکل ۵ ب). در خصوص دیگر مؤلفه‌ها، تفاوت معنی داری ملاحظه نگردید. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در خصوص مؤلفه‌های

ETR و Yield نیز حاکی از عدم وجود تفاوتی معنی‌دار بین محیط رشد نرمال با اتاق سرد بود. از سوی دیگر، بین ارقام نیز در خصوص این دو مؤلفه در محیط نرمال و نیز در اتاق سرد تفاوت معنی‌داری ملاحظه نگردید.



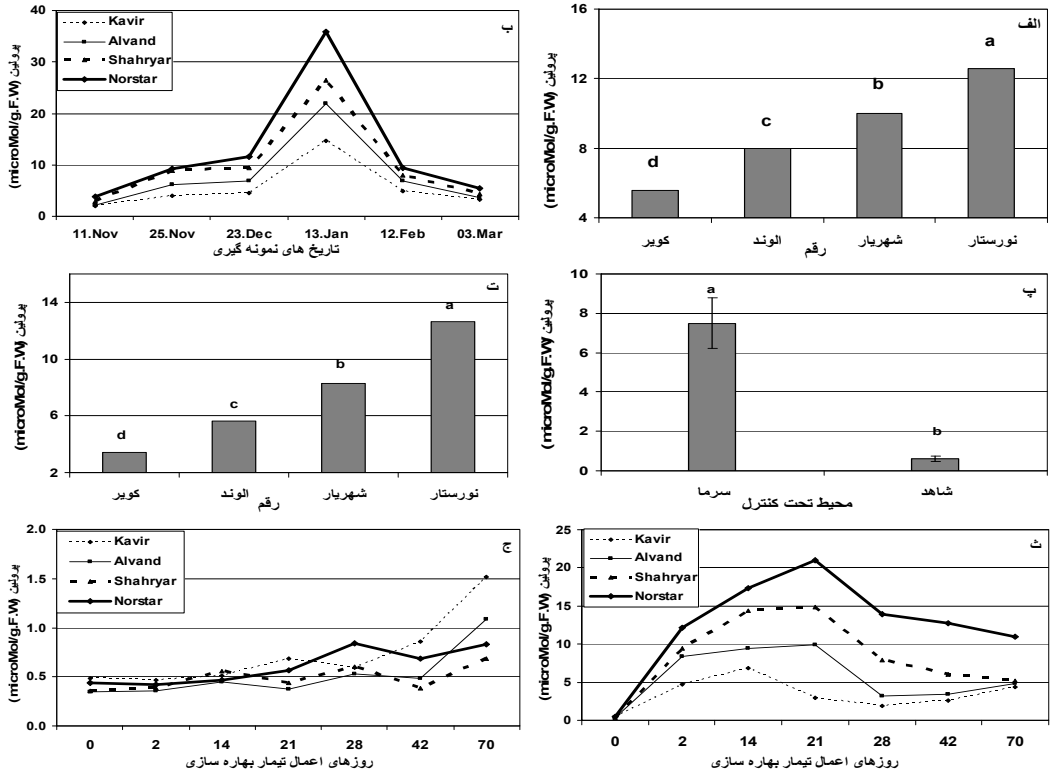
شکل ۵- ارزیابی مؤلفه‌های فلوئورسانس کلروفیل در ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط محیط تحت کنترل. مقایسه میانگین بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم‌دو **الف)** با استفاده از دستگاه OS30 به روش دانکن در شرایط سازگارشده با تاریکی در دو محیط کنترل شده نرمال و سرد، **ب)** با استفاده از دستگاه PAM2000 به روش دانکن در شرایط سازگارشده با تاریکی در دو محیط کنترل شده نرمال و سرد، **پ)** با استفاده از دستگاه PAM2000 به روش دانکن در ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط اتاق سرد، **ت)** مقایسه میانگین فرونشانی فتوشیمیایی کلروفیل برانگیخته با استفاده از دستگاه PAM2000 به روش دانکن در ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط اتاق سرد.

مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن مربوط به مؤلفه Fv:Fm در ارقام و تحت شرایط اتاق سرد حاکی از عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ارقام نورستار، شهریار و الوند بود و تنها رقم بهاره کویر در این شرایط با تفاوت ناچیز اما معنی‌داری در مرتبه پایین قرار داشت (شکل ۵ پ). با مقایسه میانگین مؤلفه qP به روش دانکن در شرایط اتاق سرد عدم وجود تفاوت معنی دار بین ارقام زمستانه و بهاره ملاحظه گردید، از سوی دیگر درحالی‌که رقم بهاره کویر با ارقام زمستانه (نورستار و شهریار) دارای تفاوت معنی‌دار بود اما این رقم با رقم بینابین الوند تفاوتی معنی‌دار نداشت (شکل ۵ ت). در خصوص دیگر مؤلفه‌های مربوط به فلوئورسانس کلروفیل، مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن حاکی از عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ارقام در شرایط نرمال و نیز در شرایط اتاق سرد بود.

ارزیابی تغییرات محتوای پرولین

با انجام مقایسه میانگین محتوای پرولین ارقام در شرایط مزرعه محرز گردید که میانگین در تمامی ارقام از تفاوتی معنی‌دار با یکدیگر برخوردار بود، رقم نورستار با ۱۲/۶ مایکرومول در گرم برگ تازه از بیشترین میزان محتوای پرولین بهره می‌برد آنگاه رقم شهریار با ۱۰ مایکرومول در گرم برگ تازه در جایگاه دوم قرار داشت، الوند با هشت مایکرومول در گرم برگ تازه در مرتبه بعدی مستقر بود و کویر با ۵/۶ مایکرومول در گرم برگ تازه از جایگاه آخر برخوردار بود (شکل ۶ الف). مقایسه میانگین روند تغییرات محتوای پرولین ارقام در شرایط مزرعه (شکل ۶ ب) نیز حکایت از برتری محتوای پرولین به ترتیب در ارقام زمستانه، بینابین و بهاره داشت. روند تغییرات محتوای پرولین در تمامی ارقام در طول پاییز و زمستان از رویه‌ای مشابه تبعیت نمود به‌طوری‌که بیشترین میزان تجمع پرولین در کلیه ارقام در ماه نخست زمستان دیده شد که به ترتیب معادل ۳۶، ۲۶/۵، ۲۲ و ۱۴/۷ مایکرومول در گرم برگ تازه در ارقام نورستار، شهریار، الوند و کویر بود. مقایسه میانگین محتوای پرولین ارقام به روش دانکن در دو شرایط محیط کنترل‌شده نرمال و اتاق سرد از وجود تفاوتی

بسیار معنـی‌دار در بیـــن دو محیط حـــکایت داشت به‌طوری‌که میانگین تجمع پرولین ارقام در شرایط اتاق سرد حدود شش برابر بیشتر از متوسط آن در شرایط عادی بود (شکل ۶ پ). مقایسه میانگین محتوای پرولین تجمع یافته در ارقام به روش دانکن در شرایط اتاق سرد از وجود وضعیتی مشابه با شرایط مزرعه حکایت داشت به‌طوری که وجود تفاوت معنی‌دار بین همگی ارقام مشاهده شد و جایگاه ارقام به ترتیب برتری عبارت بود از نورستار، شهریار، الوند و کویر (شکل ۶ ت) درحالی‌که در شرایط نرمال همه ارقام وضعیتی مشابه داشتند. روند تغییرات تجمع پرولین در ارقام در شرایط اتاق سرد با شروع اعمال تیمار خوگیری از وضعیتی صعودی برخوردار بود (شکل ۶ ث) به‌طوری‌که این روند افزایشی در ارقام زمستانه و بینابین تا سه هفته و در رقم بهاره تا دو هفته اعمال تیمار خوگیری تداوم داشت. بیشینه تجمع پرولین در ارقام نورستار، شهریار، الوند و کویر به ترتیب معادل ۲۱، ۱۵، ۱۰ و ۷ مایکرومول در گرم برگ تازه بود و آن‌گاه از رویه‌ای نزولی تبعیت نمودند. این وضعیت در رقم بهاره کویر پس از چهار هفته دوباره از روندی صعودی اما جزئی برخوردار گشت و در رقم بینابین نیز پس از شش هفته چنین حالتی مشاهده گردید (شکل ۶ ث). روند تغییرات محتوای پرولین در شرایط محیط تحت کنترل نرمال در تمامی ارقام از وضعیتی نسبتاً ثابت و مشابه در مقادیر تجمع ناچیز بین ۰/۴ تا ۰/۹ مایکرومول در گرم برگ تازه برخوردار بود اما در ارقام بهاره و بینابین از هفته هفتم با جهش مقدار مواجه گشت (شکل ۶ ج).



شکل ۶- مقایسه محتوای پرولین در ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط محیط تحت کنترل و نیز در مزرعه در دورهای خوگیری به سرما .

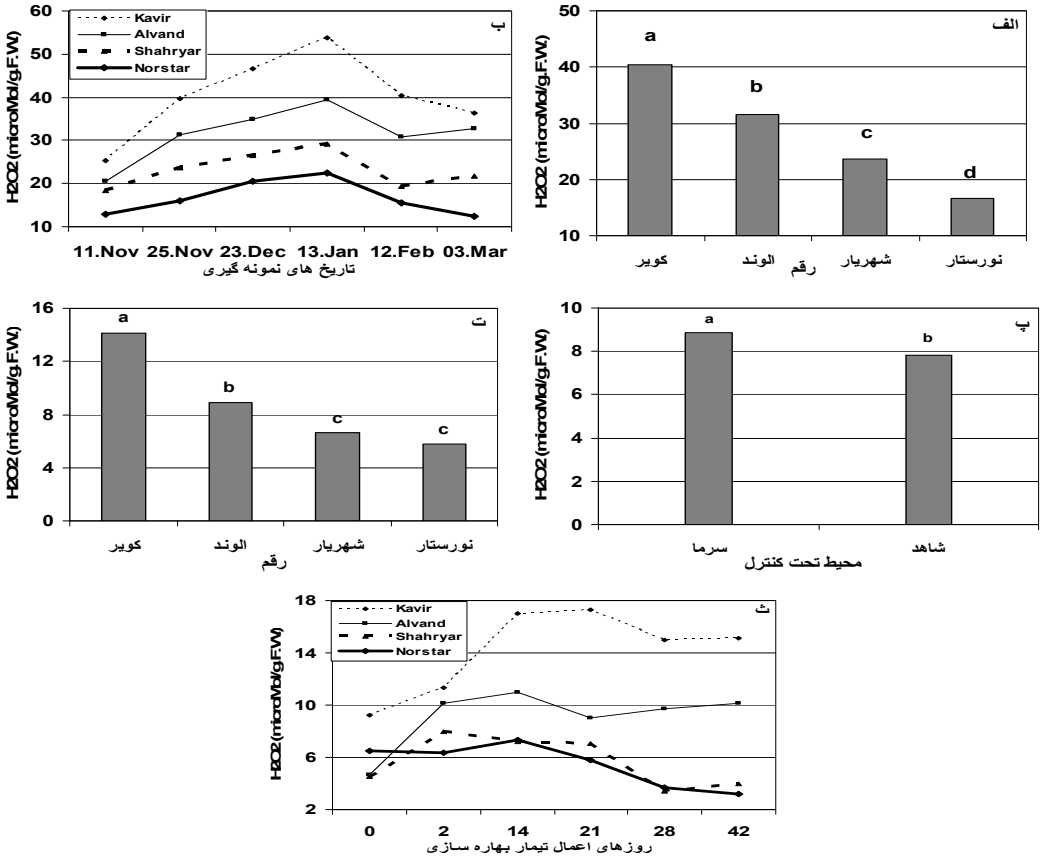
مقایسه میانگین‌های محتوای پرولین به روش دانکن: الف) ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط مزرعه، پ) در دو محیط کنترل شده نرمال و سرد، ت) ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط اتاق سرد. مقایسه روند تغییرات محتوای پرولین ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار ب) در شرایط مزرعه، ث) در شرایط محیط کنترل‌شده نرمال، ج) در شرایط اتاق سرد.

ارزیابی تغییرات تجمع پراکسیدهیدروژن

ارزیابی وضعیت تجمع پراکسیدهیدروژن ارقام در شرایط مزرعه نشان از فزونی مقادیر آن به ترتیب در ارقام بهاره و بینابین بود. با بررسی مقایسه میانگین ارقام در شرایط مزرعه به روش دانکن، تجمع پراکسیدهیدروژن در رقم بهاره کویر (۴۰/۴ مایکرومول در گرم برگ تازه) از

بیشترین میزان برخوردار بود و آنگاه در مرتبه بعدی رقم بینابین الوند (۳۱/۶ مایکرومول در گرم برگ تازه) قرار داشت و ارقام زمستانه شهریار و نورستار به ترتیب با مقادیر ۲۳/۶ و ۱۶/۶ مایکرومول در گرم برگ تازه در رتبه‌های آتی قرار داشتند (شکل ۷ الف). روند تغییرات محتوای پراکسیدهیدروژن در شرایط مزرعه از رویه‌ای نسبتاً مشابه برخوردار بود، هرچند که در طول پاییز و زمستان وجود تفاوت معنی‌دار بین وضعیت تجمع پراکسیدهیدروژن ارقام تداوم داشت با این‌حال، روند تجمعی در تمامی ارقام در طول پاییز افزایشی بود به‌طوری‌که در اوایل زمستان به حداکثر خود رسید. بیشترین میزان تجمع پراکسیدهیدروژن در رقم بهاره کویر در اوایل زمستان (۵۳/۷ مایکرومول در گرم برگ تازه) دیده شد و در همین تاریخ ارقام الوند، شهریار و نورستار به ترتیب با مقادیر ۳۹، ۲۹ و ۲۲ مایکرومول در گرم برگ تازه در مرتبه‌های بعدی قرار داشتند. در طول زمستان از مقادیر پراکسیدهیدروژن تجمعی در برگ ارقام کاسته‌شد (شکل ۷ ب).

در شرایط محیط کنترل شده تفاوتی ناچیز اما معنی‌دار بین میانگین محتوای پراکسیدهیدروژن ارقام در شرایط نرمال و اتاق سرد وجود داشت (۸/۹ مایکرومول در گرم برگ تازه در شرایط اتاق سرد در مقایسه با ۷/۸ مایکرومول در گرم برگ تازه در شرایط نرمال) (شکل ۷ پ). در شرایط اتاق سرد، مقایسه میانگین تجمع پراکسیدهیدروژن در ارقام به روش دانکن، از وجود تفاوتی معنی‌دار بین ارقام بهاره، بینابین و زمستانه حکایت داشت. بیشترین میزان تجمع مربوط به رقم کویر (۱۴/۲ مایکرومول در گرم برگ تازه) بود، در مرتبه بعد رقم الوند (۸/۹ مایکرومول در گرم برگ تازه) قرار داشت.



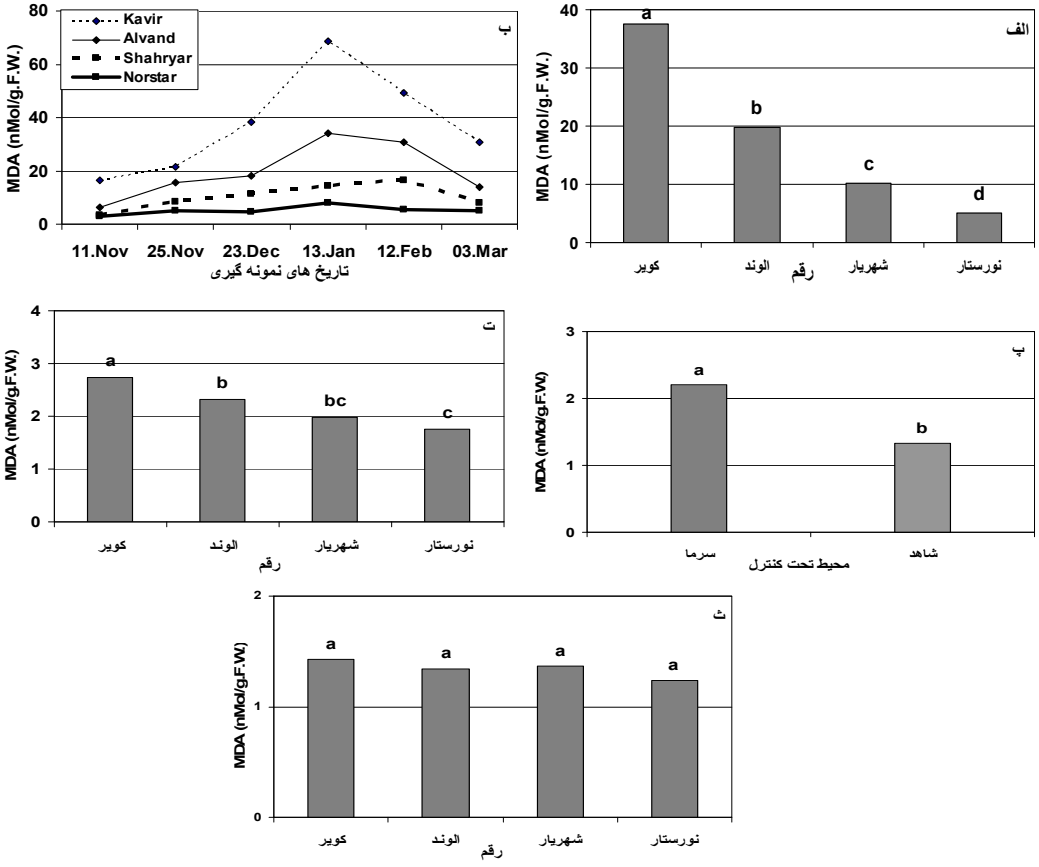
شکل ۷- مقایسه محتوای پراکسیدهیدروژن در ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط محیط تحت کنترل و نیز در مزرعه در دورهای خوگیری به سرما .

مقایسه میانگین‌های محتوای پراکسیدهیدروژن به روش دانکن **الف)** ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط مزرعه، **پ)** در دو محیط کنترل شده نرمال و سرد، **ت)** ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط اتاق سرد. مقایسه روند تغییرات محتوای پراکسیدهیدروژن ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار **ب)** در شرایط مزرعه، **ث)** در شرایط اتاق سرد.

بین محتوای پراکسیدهیدروژن ارقام زمستانه نورستار و شهریار تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (شکل ۷ ت). روند تغییرات میزان پراکسیدهیدروژن تجمعی در برگ ارقام متأثر از تیمار خوگیری به سرما در اتاق سرد حکایت از وجود روندی فزاینده تزایدی در رقم بهاره کویر طی دو هفته نخست اعمال تیمار بود و پس از آن از شرایط نسبتاً پایداری تبعیت نمود. در خصوص رقم بینابین الوند طی دو روز نخست اعمال تیمار، این روند از وضعیتی صعودی برخوردار بود و آنگاه کم و بیش ثابت ماند. در رقم شهریار نیز ابتدا طی دو روز نخست با کمی افزایش مواجه شد، آنگاه از ثباتی نسبی تا سه هفته اعمال تیمار خوگیری به سرما برخوردار بود و سپس رو به افول نهاد. محتوای پراکسیدهیدروژن طی دو هفته اعمال تیمار سرما بر رقم زمستانه نورستار نسبتاً ثابت بود، سپس از هفته دوم رو به کاهش گذاشت (شکل ۷ ث).

ارزیابی تغییرات تجمع مالون‌دی‌آلدهاید

مقایسه میانگین محتوای مالون‌دی‌آلدهاید تجمع یافته در ارقام به روش دانکن در سطح ۵٪، در شرایط مزرعه طی پاییز و زمستان گویای آن بود که تجمع مالون‌دی-آلدهاید در رقم بهاره دو برابر بیشتر از رقم بینابین و حدود چهار تا هفت برابر بیشتر از ارقام زمستانه بود. بیشترین میزان تجمع مربوط به رقم بهاره کویر (۳۷/۵ نانومول در گرم برگ تازه) و آن‌گاه، رقم الوند با ۱۹/۸ نانومول در گرم برگ تازه بود، ارقام شهریار و نورستار نیز به ترتیب با ۱۰ و پنج نانومول در گرم برگ تازه در مرتبه‌های بعدی قرار داشتند (شکل ۸ الف).



شکل ۸- مقایسه محتوای مالون‌دی‌آلدهاید در ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط محیط کنترل و نیز در مزرعه در دورهای خوگیری به سرما .

مقایسه میانگین‌های محتوای مالون‌دی‌آلدهاید به روش دانکن الف) ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط مزرعه. **پ)** در دو محیط کنترل شده نرمال و سرد. ت) ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط اتاق سرد. ث) ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط محیط کنترل شده نرمال. ب) مقایسه روند تغییرات محتوای مالون‌دی‌آلدهاید ارقام گندم کویر، الوند، شهریار و نورستار در شرایط مزرعه.

محتوای مالون‌دی‌آلدهاید طی فصل‌های پاییز و زمستان در رقم زمستانه نورستار در کمترین میزان قرار داشت و روند تغییرات آن از رویه‌ای نسبتاً ثابت پیروی نمود. رقم شهریار نیز کم و بیش، رویه‌ای مشابه با نورستار را در این مدت دنبال نمود. رقم بینابین الوند رویه‌ای افزایشی ملایم اما قابل ملاحظه را تا اوایل زمستان دنبال نمود و آن‌گاه به تدریج این تجمع در این رقم رو به افول نهاد. در رقم بهاره کویر این وضعیت طی پاییز تا اوایل زمستان از رویه‌ای صعودی با سرعت فزاینده برخوردار بود و آنگاه رو به افول نهاد (شکل ۸ ب). مقایسه میانگین مقادیر تجمع مالون‌دی‌آلدهاید به روش دانکن در دو محیط نرمال و اتاق سرد از وجود تفاوتی نه چندان زیاد اما معنی‌دار بین دو محیط حکایت داشت، به‌طوری‌که متوسط مقادیر در اتاق سرد (۲/۲ نانومول در گرم برگ تازه) در جایگاه برتر و این محتوی در شرایط نرمال (۱/۳ نانومول در گرم برگ تازه) در مرتبه پایین‌تر قرار داشت (شکل ۸ پ). مقایسه میانگین میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهاید در ارقام به روش دانکن در شرایط نرمال نشان از عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ارقام داشت (شکل ۸ ت). در شرایط اتاق سرد بیشترین میزان تجمع مالون‌دی‌آلدهاید در رقم کویر (۲/۷۴ نانومول در گرم برگ تازه) ثبت گردید که حائز تفاوتی معنی‌دار با سایر ارقام بود، بین رقم بینابین الوند و رقم زمستانه شهریار تفاوت معنی‌داری ملاحظه نگردید ضمن آن‌که بین ارقام زمستانه شهـــریار و نورستـــار نیز تفاوت معنی‌داری در این خصوص وجود نداشت (شکل ۸ ث).

بحث

اندازه‌گیری میانگین روزانه دمای هوا و خاک در ایستگاه هواشناسی کرج در سال زراعی ۸۶-۱۳۸۵ ازوجود شرایطی مطلوب و مناسب برای تکمیل نیاز بهاره‌سازی، خوگیری به سرما و بیان تحمل به انجماد بر گیاهان استقرار یافته در مزرعه طی فصل‌های پاییز و زمستان حکایت داشت. در این پژوهش، پاسخ رقم‌ها به شرایط بهاره‌سازی با توجه به تیپ رشد رقم، متفاوت بود. رقم نورستار با تیپ رشد زمستانه که به دلیل نیاز بهاره‌سازی طولانی مدت، در گروه ارقام سازگار به مناطق واجد زمستان‌های سخت و طولانی قرار می‌گیرد (Fowler et al., 1996) در تحقیق حاضر نیز دارای گسترده‌ترین نیاز بهاره‌سازی بود. در مقابل، ارقام گندم شهریار (زمستانه) و الوند (بینابین)، که به صورت متداول در نواحی سرد و معتدل‌سرد کشورکشت می‌گردند از نظر طول دوره بهاره‌سازی دارای نیاز کمتری نسبت به نورستار بودند. چنین استنباط می‌شود که طول دوره بهاره‌سازی در ارقام، به قابلیت سازش آنان با شرایط آب و هوایی مناطقی که از آن نشأت گرفته‌اند، وابسته است. این سازگاری موجب می‌شود که در مناطق سرد، ارقام زمستانه بتوانند در طول فصل زمستان تنش سرما و انجماد را با کمترین آسیب، پذیرا باشند. طبق گزارش‌های علمی منتشره، طولانی بودن دوره بهاره‌سازی موجب توسعه بیان ژن‌های مرتبط با تحمل به انجماد شده (Mahfoozi et al., 2006) که این موضوع در نهایت، گیاه را در مناطق سرد در برابر تنش سرما مصون می‌دارد؛ در مقابل، رقم بهاره کویر بی‌نیاز از بهاره‌سازی است به‌طوری‌که پس از مدت بسیار کوتاهی وارد مرحله زایشی شده و لذا نسبت به تنش سرما حساس است.

بررسی نتایج شرایط کنترل شده و مزرعه گویای وجود رابطه مستقیم بین تکمیل نیاز بهاره‌سازی و بیان تحمل انجماد در سطح فنوتیپی بود. در هر سه رقم الوند، شهریار و نورستار بیشینه تحمل در محدوده زمانی تکمیل نیاز بهاره‌سازی به‌دست آمد که نقطه عطفی در بیان تحمل به انجماد است و پس از آن، میزان تحمل به‌طور چشم‌گیر رو به افول نهاد، به‌طوری‌که در شرایط محیط کنترل شده و تحت تیمارهای دمایی بالای صفر درجه سانتیگراد (۱ ± ۳ درجه سانتیگراد) نیز این فرایند، همسنگ با شرایط طبیعی مزرعه محقق گردید. نکته قابل اهتمام دیگر، وجود شرایط آب و هوایی مناسب در منطقه کرج برای انجام روند سازگاری ارقام به سرما است زیرا رقم نورستار که در زمره واریته‌های بسیار مقاوم به سرما قلمداد می‌گردد توانست میزان تحمل بالایی اکتساب نماید. در دیگر گزارشات نیز میزان LT_{50} رقم نورستار در شرایط کنترل شده و کشت هایدروپونیک حداکثر حدود ۲۲- ^{o}C ذکر شده است (Mahfoozi et al., 2001). هر چند Mahfoozi et al.,

(2006) در تحقیقاتی که در شرایط مزرعه در منطقه سرد کشور انجام دادند میزان LT_{50} رقم نورستار را برابر ۲۶- ^{o}C گزارش نمودند، ولی این روند به احتمال زیاد متأثر از وجود شرایط بسیار مناسب آب و هوایی برای سازگاری رقم در منطقه سرد شمال غرب کشور بوده است. نتیجه تحقیق حاضر نیز صرفنظر از سطح بیان تحمل، با دیگر نتایج هماهنگ است (Limin et al., 2003). در همین راستا نتایج مشابهی نیز برروی ارقام بهاره و زمستانه توسط Fowler et al., (1999) و Limin et al., (2003) در کشور کانادا گزارش گردیده‌است. از سوی دیگر این نتیجه با یافته‌ها بر روی رقم جو پاییزه کولد که در شرایط کنترل شده (دمای ۴^{o}C و طول روز ۲۰ ساعت) بهاره‌سازی شده بود هم‌خوانی دارد که بیشینه مقاومت این رقم به سرما در اواخر پاییز رقم خورد (Mahfoozi et al., 2006). در پژوهش حاضر نیز در شرایط مزرعه، حداکثر تحمل در رقم شهریار (LT_{50} = -۹/۳^{o}C) بود که پس از تکمیل نیاز بهاره‌سازی رو به کاهش گذاشت و در رقم نورستار نیز، حداکثر میزان LT_{50} برابر با ۱۸/۷- ^{o}C بود که مصادف با محدوده زمانی تکمیل نیاز بهاره‌سازی محقق گردید.

دیگر نتایج این پژوهش گویای آن بود که بین میزان نیاز بهاره‌سازی ارقام با محتوای کلروفیل آن‌ها همبستگی مستقیم و معنی‌داری وجود دارد، به‌طوری‌که تحت تیمار بهاره‌سازی، ارقام زمستانه، بینابین و بهاره ضمن داشتن تفاوت معنی‌دار در محتوای کلروفیل، به ترتیب در رتبه‌های برتر تا پایین تر قرار داشتند و این تفاوت در مرتبه را در طول دوره اعمال تیمار در اتاق سرد و نیز طی پاییز و زمستان در شرایط مزرعه حفظ نمودند. شاید به همین دلیل، رنگ برگ ارقام مقاوم‌تر به سرما از تیرگی بیشتری برخوردار بود. بنابراین چنین استنباط می‌گردد که هر چند انباشت محتوای کلروفیل در همه ارقام حساس و متحمل به تنش انجماد در شرایط دمای پایین محقق می‌گردد، اما این انباشت در رقم متحمل در سطحی برتر و به‌صورت تزایدی صورت می‌گیرد که احتمالاً متأثر از سازوکارهای فنولوژیک نظیر طول دوره بهاره‌سازی است. مقایسه شرایط اتاق سرد و محیط نرمال نیز به تفکیک ارقام گویای نکات جالب توجهی بود، محتوای کلروفیل آخرین برگ توسعه یافته بوته‌ها در رقم کویر تا شش هفته اعمال تیمار بهاره‌سازی در اتاق سرد، تفاوتی معنی‌دار با بوته‌های هم‌سن در محیط نرمال نداشت، اما دلیل کاهش محتوای کلروفیل پس از هفته ششم در محیط نرمال شاید با زمان رسیدن بوته‌های کویر در این محیط مرتبط باشد، چرا که این رقم در آستانه آغاز اعمال تیمار سرما در مرحله زایشی به‌سر می‌برد (مشاهده برجستگی دوگانه) و با ظهور برگ پرچم از هفته دوم در محیط نرمال کلیه اندازه‌گیری‌ها بر روی این برگ به عنوان آخرین برگ تظاهر یافته گیاه انجام گرفت، ظهور سنبله در این رقم پس از هفته چهارم محقق گردید و طی تکمیل تدریجی مراحل پرشدن دانه در هفته ششم و ایام پس از آن به تدریج زمینه کلروزه شدن این برگ در محیط نرمال آغاز گردید، به‌طوری‌که در هفته دهم بوته‌های کویر مستقر در شرایط نرمال در آستانه مرحله رسیدگی فیزیولوژیک قرار داشتند و برگ پرچم نیز تقریباً کلروزه شده بود. در بررسی روند تغییرات محتوای کلروفیل در ارقام گندم مشخص شد که محتوای کلروفیل برگ در مرحله ظهور سنبله در بیشینه مقدار خود قرا دارد. در چنین شرایطی، رقم بینابین الوند نیز از روندی کم و بیش مشابه با کویر اما توأم با تأخیری دو هفته‌ای تبعیت نمود، به‌گونه‌ای‌که ظهور سنبله در بوته‌های این رقم در محیط کشت نرمال در هفته ششم رقم خورد. ناگفته نماند که اعمال تیمار طول روزهای بلند می‌تواند از طریق تحریک بیان ژن-های فتوپریود به ایفای نقشی جایگزین با ژن‌های بهاره-سازی، در القای گلدهی ارقام زمستانه بپردازد که شدت و ضعف آن با توجه به دامنه برآورد نیاز بهاره‌سازی رقم متفاوت خواهد بود (Sassani et al., 2009)، از این‌رو ارقام زمستانه شهریار و نورستار نیز به ترتیب در بازه‌های زمانی طولانی‌تر و پس از تولید برگ‌های بسیار، در شرایط محیط نرمال به مرحله ظهور سنبله نائل شدند که نمودارهای مربوط به آن‌ها نشان داده نشده است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، همبستگی منفی و معنی-داری بین میزان تولید پراکسیدهیدروژن و تحمل ارقام به سرما و انجماد وجود داشت به‌طوری‌که در شرایط مزرعه مقادیر اندازه‌گیری شده پراکسیدهیدروژن مربوط به رقم بهاره کویر بیش از دو برابر تولید آن در رقم زمستانه نورستار بود. با توسعه سرما و برودت هوا طی

فصل پاییز و زمستان، تولید پراکسیدهیدروژن در کلیه ارقام افزایش یافت که البته شدت روند تولید به ترتیب در ارقام بهاره و بینابین بیشتر از ارقام زمستانه بود، نقطه اوج تولید آن در تمامی ارقام در سردترین ماه سال یعنی دی‌ماه رقم خورد و متعاقب آن با کاهش برودت هوا از مقادیر آن در همه ارقام کاسته شد و به‌طورکلی وضعیت مرتبه تولید پراکسیدهیدروژن در طول پاییز و زمستان در ارقام حفظ گردید.

نتایج پژوهش حاضر گویای وجود یک همبستگی مثبت و معنی‌دار بین تیمار خوگیری به سرما و انباشت پرولین در کلیه ارقام بود. در شرایط مزرعه و نیز در اتاق سرد، بیشترین میزان انباشت پرولین به ترتیب در ارقام زمستانه، بینابین و بهاره تحقق یافت. مقادیر پرولین موجود در تمامی ارقام در شرایط نرمال در حدی بسیار نازل (کمتر از ۰/۵ میکرومول در گرم برگ تازه) در طول دوره باقی ماند و تفاوت معنی‌داری بین ارقام ملاحظه نگردید. فقط در ارقام بهاره و بینابین در هفته‌های انتهایی، محتوای پرولین رو به فزونی نهاد که دلیل آن احتمالاً به مراحل نمو زایشی این ارقام در آن شرایط باز می‌گردد. به‌نظرمی‌رسد که توسعه انباشت پرولین به عنوان راه‌کاری عمومی در کلیه ارقام با تیپ‌های رشد متنوع مطرح باشد به گونه‌ای که با توسعه شدت سرما، این انباشت در تمامی ارقام نمود یافت. هر چند به فراخور قابلیت‌های تحمل انجماد در ارقام، توسعه انباشت پرولین متفاوت بود، با این‌حال، به‌طور متوسط میزان پرولین موجود در ارقام گویای افزایشی معادل هفت تا ده برابر بود به‌گونه‌ای‌که در سردترین ماه سال میزان پرولین اندازه‌گیری شده در ارقام در بیشترین حد انباشت قرار داشت که با کاهش شدت برودت هوا، از میزان انباشت پرولین در کلیه ارقام نیز کاسته شد که البته این نزول در ارقام زمستانه از شدت بیشتری برخوردار بود. میانگین انباشت پرولین کلیه ارقام در شرایط اتاق سرد، ۱۲ برابر بیش از معادل آن در محیط کنترل شده بود. نکته دیگری که از مقایسه توسعه انباشت پرولین ارقام در دو شرایط مزرعه و اتاق سرد به نظر می‌رسد نقش دماهای پایین و شرایط انجماد بر تجمع پرولین است به‌طوری‌که وضعیت انباشت این متابولیت سازگار تحت دماهای زیر صفر درجه مزرعه از توسعه بیشتری در تمامی ارقام برخوردار بود که این نتیجه بیش از پیش بر نقش محافظت کننده پرولین در گیاهان عالی صحه می‌گذارد و احتمالاً بیان‌گر آن‌است که دماهای زیر صفر درجه سانتیگراد که به‌طور معمول طی فصل‌های پاییز و زمستان در مناطق معتدل وسرد حادث می‌گردد، به عنوان عامل القای خوگیری به دمای انجماد،[1] زمینه انباشت بیشتر پرولین در شرایط مزرعه را نسبت به دماهای بالای صفر درجه سانتیگراد خوگیری به سرما (شرایط اتاق سرد) فراهم می‌آورد. دستاورد این پژوهش در این زمینه با نتایج بسیاری از محققین از جمله Santarius (1992) هماهنگ و هم‌سو بود. ناگفته نماند که در بسیاری از پژوهش‌های دهه اخیر، گزارشی مبتنی بر وجود همبستگی چندان مستدلی بین تجمع پرولین و تحمل به تنش‌ها به‌ویژه شوری و خشکی مشاهده نمی‌شود. در پژوهش حاضر ملاحظه گردید که هرچند در شرایط سرما و انجماد، ارقام حساس و متحمل به سرما به انباشت پرولین می‌پردازند ولی این انباشت در رقم متحمل از سطح و دوام بیشتری برخوردار است که احتمالاً متأثر از اثرات فنولوژیک رشد نظیر طول دوره نیاز بهاره‌سازی باشد

مالون‌دی‌آلدهاید محصول پراکسیداسیون غشای سلولی است که تولید آن به واسطه کاهش شاخص پایداری و افزایش نفوذ پذیری غشاء در سلول‌های گیاه القاء می‌گردد (Sairam et al., 2001). در پژوهش حاضر همبستگی منفی و معنی‌داری بین دامنه تحمل رقم به انجماد و میزان مالون‌دی‌آلدهاید تجمع‌یافته در رقم وجود داشت (نتایج آورده نشده است)، به‌طوری‌که درک تنش توسط گیاه زمینه تولید مالون‌دی‌آلدهاید را در سلول‌ها فراهم می‌آورد. به‌طور کلی در شرایط محیط کنترل‌شده به واسطه عدم احراز شرایط تنش بر گیاهان، تجمع مالون‌دی‌آلدهاید در کلیه ارقام در مقادیر بسیار ناچیز حدود ۲ نانومول در هر گرم برگ تازه بود به‌گونه‌ای‌که ارقام در شرایط نرمال فاقد هرگونه تفاوت معنی‌دار در زمینه تولید مالون‌دی‌آلدهاید با یکدیگر بودند و در اتاق سرد نیز تفاوت بین ارقام نورستار و کویر به عنوان حدود نهایی تحمل و حساسیت به تنش در حدی کمتر

1. Sub-zero acclimation

از یک نانومول بود. در مزرعه تفاوت بین ارقام در تجمع مالون‌دی‌آلدهاید بسیار چشم‌گیر بود به‌نحوی‌که میانگین مالون‌دی‌آلدهاید تجمع یافته در رقم بهاره کویر به‌ترتیب ۲، ۴ و ۸ برابر بیشتر از ارقام الوند، شهریار و نورستار بود و روند تجمع این ترکیب در ارقام بهاره و بینابین همسو با افزایش شدت برودت هوای محیط دستخوش تزاید گردید که حاکی از خسارت وارده به غشاءها در شرایط تنش سرما و یخبندان است، به‌گونه‌ای‌که اوج تجمع مالون‌دی‌آلدهاید در دو رقم کویر و الوند در سردترین ماه رقم خورد. نتایج این بخش از پژوهش حاضر با گزارش Apostolova et al., (2008) هم‌خوانی دارد.

با توجه به دستاوردهای این تحقیـق در مجموع می‌توان چنین استنباط نمود که صفات نموی از قبیل طول دوره بهاره‌سازی و انتقال از مرحله رویشی به زایشی، از طریق تأثیر بر طول دوره رویش، مدت زمان بیان تحمل انجماد و انباشت اسمولیت‌ها و متابولیت‌های محافظ گیاه در برابر سرما را تحت تأثیر قرار داده و زمینه افزایش تحمل در برابر انجماد را در گیاه فراهم می‌آورند. محدوده تکمیل نیاز بهاره‌سازی به عنوان نقطه عطفی در بیان تحمل انجماد، و انباشت متابولیت‌های حفاظت‌کننده گیاه در برابر سرما مطرح است که پس از این محدوده کاهشی قابل ملاحظه در بیان تحمل به انجماد رقم می‌خورد. وجود تغییرات عمده مرفولوژیک و فنولوژیک در طول دوره خوگیری به سرما زمینه مناسبی را برای مطالعه صفات فیزیولوژیک و متابولیک در گیاهان فراهم می‌آورد.

REFERENCES

1. Apostolova P., Yordanova R. and Popova L. (2008). Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars. *Gen. Appl. Plant Physiology.*34(3-4), 281-294.
2. Bates L.S., Waldren R. P. and Teare I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water–stress studies. *Plant and Soil.* 39, 205– 207.
3. Binzel M.L., Hasegawa P.M., Rhodes D., Handa S., Handa A.K. and Bressan R.A. (1987). Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiol.* 84, 1408-1415.
4. Björkman O. and Demmig B. (1987). Photon yield of O2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504.
5. Bolhàr-Nordenkampf H.R. and Lechner E. (1988). Winter stress and chlorophyll fluorescence in Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.). In Applications of chlorophyll fluorescence. *Lichtenthaler HK, ed, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 173-180.
6. Bolhàr-Nordenkampf H.R., Long S.P., Baker N.R., Öquist G., Schreiber U. and Lechner E.G. (1989). Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instumentation. *Funct. Ecology.* 3, 497-514.
7. Bolhàr-Nordenkampf H.R., Critchley Ch., Haumann J., Ludlow M.M., Postl W. and Syme A.J. (1994). Can chlorophyll fluorescence and P700 changes detect environmental stress? In Plant production on the threshold of a new century, Struik P.C., Vredenberg W.J., Renkema J.A. and Parlevliet J.E., *eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,* 295-302.
8. Borsani O., Valpuesta V. and Botella M.A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings, *Plant Physiol*, 126, 1024–1030.
9. Brennan R.M. and Jefferies R.A. (1990). The use of chlorophyll fluorescence in assessment of low temperature hardiness in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Ann. app. Biol.* 117, 667-672.
10. Cayley S., Lewis B.A. and Record M.T.Jr. (1992). Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 174, 1586-1595.
11. Dhindsa, R.S. 1991. Drought stress, Enzymes of Glutation Metabolism, Oxidation Injury, and Protein Synthesis in *Turtula ruralis*. *Plant Physiol*. 95, 648-651.
12. Desican R., Hancock J.T. and Neill S.j. (2004). Oxidative stress signaling. *Plant responses to abiotic stress. Springer.*120-150.
13. Fowler D.B., Chauvin L.P. ,Limin A.E. and Sarhan F. (1996). The regulatory role of vernalization in the expression of low-temperature-induced genes in wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* 93, 554-559.
14. Fowler D.B., Limin A.E. and Ritchie J.T. (1999). Low-temperature tolerance in cereals: Model and genetic interpretation. *Crop Sci.* 39, 626-633.
15. Herman E.M., Rotter K., Premakumar R., Elwinger G., Bae R., Ehler-King L., Chen S. and Livingston D.P. (2006). Additional freeze hardiness in wheat acquired by exposure to –3 °C is associated with extensive physiological, morphological, and molecular changes. *Journal of Experimental Botany.* 57, 3601-3618.

16. Jones M.M., Osmond C.B. and Turner N.C. (1980). Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. *Aust. J. Plant Physiol.* 7, 193-205.
17. Ketchum R.E.B., Warren R.C., Klima L.J., Lopez-Gutierrez F. and Nabors M.W. (1991). The mechanism and regulation of proline accumulation in suspension cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata* L. *J. Plant Physiol*. 137, 368-374.
18. Lansac A.R., Sullivan C.Y. and Johnson B.E. (1996). Accumulation of free proline in sorghum (*Sorghum bicolor*) pollen. *Can. J. Bot.* 74, 40-45.
19. Limin A.E. and Fowler D.B. 1988. Cold hardiness expression in interspecific hybrids and amphiploids of the Triticeae. *Genome*. 30, 361-365.
20. Limin A.E., Gao M., Selvaraj G. and Fowler D.B. (2003). The phenotypically affected Vrn-1 region of wheat: evidence of multiple copies of *Arabidposis* autonomous flowering pathway orthologous and their effect on flowering. *In*: *Proceedings of tenth international wheat genetics symposium Paestum, Italy.* 3, 983-985.
21. Lone M.I., Kueh J.S.H., Wyn Jones R.G. and Bright S.W.J. (1987). Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. *J. Exp. Bot.* 38, 479-490.
22. Mahfoozi S., Limin A.E. and Fowler D.B. (2001)a. Influence of vernalization and photoperiod responses on cold hardiness in winter cereals. *Crop Sci*. 41, 1006-1011.
23. Mahfoozi S., Limin A.E., Ahakpaz F. and Fowler D.B. (2006). Phenological development and expression of freezing resistance in spring and winter wheat under field conditions in north-west Iran. *Field Crops Research*. 97, 182–187.
24. Martinez D.E. and Guiamet J.J. (2004). Distortion of the SPAD 502 chlorophyll meter readings by changes in irradiance and leaf water status. *Agronomie.* 24, 41–46.
25. Ober E.S. and Sharp R.E. (1994). Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiol*. 105, 981-987.
26. Öquist G., Hurry V.M. and Huner N.P.A. (1993). Low-temperature effect on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. *Plant Physiol.* 101: 245-250.
27. Sairam R.K., Chandrasekhar V. and Srivastava G.C. (2001). Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their response to water stress. *Biol. Plant.* 44, 89–94.
28. Santarius K.A. (1992). Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. *Physiol. Plant.* 84, 87-93.
29. Sasani S., Hemming M.H., Oliver S.N., Greenup A., Tavakkol-Afshari R., Mahfoozi S., Poustini K., Sharifi H.R., Dennis E.S., Peacock W.J. and Trevaskis B. (2009). The influence of vernalization and daylength on expression of flowering-time genes in the shoot apex and leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 60, 2169-2178.
30. Stewart R.R.C. and Bewley J.D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology.* 65, 245-248.
31. Thomas J.C., De Armond R.L. and Bohnert H.J. (1992). Influence of NaCl on growth, proline, and phospho*enol*pyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiol*. 98, 626-631.
32. Thomashow M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol.* 50, 571-599.
33. Treichel S. (1986). The influence of NaCl on delta-pyrroline-5-carboxylate reductase in proline-accumulating cell suspension cultures of *Mesembryanthemum nodiflorum* and other halophytes. *Plant Physiol*. 67, 173-181.
34. Voetberg G.S. and Sharp R.E. (1991). Growth of the maize primary root tip at low water potentials. III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiol.* 96, 1125-1130.
35. Zadoks, J.C., Chang, T.T. and Konzak, C.F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*. 14, 415-421.