

## ارزیابی برخی پاسخ‌های القا شده گندم نان و دوروم در تنش سرما

### Evaluation of some cold-induced responses in bread and durum wheat plants

لیلا نژادصادقی<sup>۱</sup>، رضا معالی‌امیری<sup>۱\*</sup>، حسن زینالی<sup>۱</sup>، بهزاد صادق‌زاده<sup>۲</sup>، سیده‌ساناز رمضانپور<sup>۳</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
۲- استادیار، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، مراغه  
۳- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

Nedjadsadeghi L<sup>1</sup>, Maali-Amiri R<sup>\*1</sup>, Zeynali Kkanghah H<sup>1</sup>, Sadeghzadeh B<sup>2</sup>, Ramezanzpour SS<sup>3</sup>

1. PhD Student, Associate Professor, Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj
2. Assistant Professor, Dryland Agricultural Research Institute, Ministry of Jihad-e-Agriculture Research and Education Organization
3. Associate Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: [rmamiri@ut.ac.ir](mailto:rmamiri@ut.ac.ir)

(تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱)

#### چکیده

در این تحقیق پاسخ‌های القا شده گیاهان سازگار شده و سازگار نشده گندم نان (*Triticum aestivum* L.) (رقم نورستار) و گندم دوروم (*Triticum turgidum* L.) (ژنوتیپ‌های گردیش و SRN) به تنش سرما از طریق اندازه‌گیری شاخص‌های خسارت (ELI)، پراکسیداسیون چربی‌های غشا (MDA) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز) ارزیابی شد. ژنوتیپ‌ها پاسخ‌های متفاوتی به تیمارهای دمایی (۲۳ و ۵- درجه سانتی‌گراد) نشان دادند. تحت تنش سرما، به موازات کاهش شاخص‌های خسارت، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به خصوص در گیاهان سازگار شده افزایش یافت، طوری که افزایش فعالیت آنزیم‌ها در نورستار بیشترین و در SRN کمترین بود. سازگاری به سرما، آمادگی بیشتری را در مقابله با تنش سرما در نورستار در مقایسه با ژنوتیپ‌های دوروم ایجاد کرد و کمترین میزان خسارت و بیشترین میزان فعالیت سیستم دفاعی سلول در این شرایط بدست آمد. نتایج نشان داد که تفاوت فراوانی در شدت و سرعت پاسخ‌های سلولی در این ژنوتیپ‌ها وجود دارد. تغییر همزمان الگوی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که با تغییر شاخص‌های خسارت (MDA و ELI) مرتبط است، گویای آن است که فعالیت این آنزیم‌ها احتمالاً در همراهی با سایر مکانیسم‌های دفاع سلولی، تحمل به تنش سرما یا توان زیستی گندم را افزایش داده و یا سبب بهبودی گیاه پس از اعمال تنش شدید می‌شود. دوره‌های سازگاری کوتاه مدت سبب افزایش ظرفیت ژنتیکی تحمل به سرما در ژنوتیپ‌های گندم شد به طوری که درجه تحمل در نورستار بیشتر از ژنوتیپ‌های دوروم بود. چنین شاخص‌هایی ممکن است در ارزیابی ژنوتیپ‌های گندم به تنش سرما به همراه تیمارهای تنش کوتاه مدت که موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه پژوهش شده، موثر باشند.

#### واژه‌های کلیدی

آنتی‌اکسیدان  
پراکسیداسیون  
گندم دوروم  
گندم نان  
پایداری غشا

## مقدمه

تنش سرما به عنوان یکی از تنش‌های محیطی مهم سبب کاهش عملکرد کمی و کیفی و حتی مرگ گیاهان می‌شود (Saibo et al. 2009). گونه‌های گیاهی، تقریباً تنش سرما را در اوایل فصل بهار و یا در طول کشت پاییزه تجربه می‌کنند. در این دوران شدت تنش تحت تاثیر حداقل دمای تنش، طول دوره، مرحله رشدی و شرایط فیزیولوژیکی گیاه می‌باشد. پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی شامل تغییرات متعدد فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی می‌باشد که می‌تواند سطح تحمل گیاهان به تنش را افزایش دهد (Guy et al. 1999). در طبیعت القای تحمل به سرما با استقرار تدریجی گیاه در دماهای پایین اما بالای صفر درجه سانتی‌گراد ایجاد می‌شود، فرآیندی که سرما سازگاری<sup>۱</sup>، نامیده می‌شود (Thomashow 1999). سرما سازگاری از طریق تغییرات متعدد در بیان ژن، کاهش یا توقف رشد، تغییر در ترکیب لیپیدی غشا، تغییر در ترکیب محلول‌های سازگار و افزایش آنتی‌اکسیدان‌های سلولی انجام می‌شود (Nayyar et al. 2005). این تغییرات، به طور مستقیم در تحمل به تنش درگیر بوده و بنابراین به عنوان عناصر فعال در تحمل به تنش‌های محیطی به خصوص تنش سرما محسوب می‌شوند. بنابراین در بسیاری از موارد ارتباط منطقی بین تغییرات در سطح مولکولی این گروه با تغییرات فیزیولوژی و مورفولوژی وجود دارد.

تنش سرما سبب افزایش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۲</sup> (ROS) در گیاهان شده و بدین ترتیب بروز تنش اکسیداتیو<sup>۳</sup> را به عنوان یک تنش ثانویه در پی دارد. مجموعه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه شامل سوپراکسیددیسموتاز<sup>۴</sup>، کاتالاز<sup>۵</sup>، آسکوربات پراکسیداز<sup>۶</sup> و گاپاکول پراکسیداز<sup>۷</sup> در هماهنگی با یکدیگر و در همکاری با سایر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی نقش مهمی در تعیین و حفظ تعادل بین میزان تولید و تخریب ROS دارند. بنابراین واکنش آنتی‌اکسیدانی در گیاهان علاوه بر جبران خسارت تنش

اکسیداتیو، میزان تحمل گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی را نیز بیان می‌کند (Baek and Skinner 2003). ژنوتیپ‌های متحمل گیاهان به سرما قابلیت بیشتری در حذف<sup>۸</sup> انواع ROS و عوامل خسارت‌زای سلولی دارند، در عین اینکه سطوح بالاتری از آنتی-اکسیدان را نیز تولید می‌کنند (Verma and Dubbey 2003; Heidarvand and Maali-Amiri 2010).

گندم دوروم (*Triticum turgidum* L.) دومین گونه مهم جنس گندم در دنیا بوده و حدود ۱۰ درصد از کل مساحت کشت جهانی گندم به کشت آن اختصاص دارد و بیشترین مساحت کشت این محصول (۱۱ میلیون هکتار) در منطقه مدیترانه قرار دارد (Nachit 2002). ضرورت توجه به گندم دوروم جهت تهیه ماکارونی با کیفیت مطلوب، به تبع افزایش جمعیت انسانی و نیاز مبرم به مواد اولیه مورد لزوم، در حال حاضر بیش از پیش آشکار می‌باشد. بر اساس گزارش‌های متعدد گندم دوروم تحمل کمتری به تنش سرما در مقایسه با گندم نان (*Triticum aestivum* L.) دارد (Limin and Fowler 1985). کشت و کار دوروم در ایران به طور سنتی و از دیرباز در مناطق سرد و دیم کشور با ارتفاع ۱۲۰۰-۴۰۰ متر از سطح دریا مرسوم بوده و در این نواحی تنش سرما در زمستان و تنش خشکی آخر فصل، عمده‌ترین عوامل محدود کننده تولید گندم دوروم محسوب شده و سبب کاهش محصول می‌شود (Sadeghzadeh and Alizadeh 2005).

در سال‌های اخیر معرفی ارقام مناسب دوروم با عملکردی تقریباً معادل گندم نان مخصوصاً برای مناطق سردسیر دیم، بیش از پیش احساس می‌شود. بنابراین فرار از خطر تنش سرما موضوع جالبی را پیش روی به‌نژادگران قرار داده است. اولین تلاش‌ها در راستای افزایش تحمل به سرما در گیاهان از طریق روش‌های اصلاح سنتی صورت گرفت. بهبود تحمل به سرما به وسیله روش‌های اصلاح سنتی، به وجود ژنوتیپ‌ها یا گونه‌هایی با درجه تحمل بالا بستگی دارد. اگرچه این روش‌ها در افزایش تحمل به سرما در گیاهان کمک شایانی کرده اما به طور کلی اصلاح گسترده برای اهداف مختلف، سبب کاهش فراوانی ژن‌های مرتبط با تحمل به سرما در خزانه ژنی هر گونه شده است (Heidarvand et al. 2011). دستکاری ژنتیکی گذر از سدهای والدینی در روش‌های

<sup>1</sup> Cold acclimation

<sup>2</sup> Reactive oxygen species

<sup>3</sup> Oxidative stress

<sup>4</sup> Superoxide dismutase

<sup>5</sup> Catalase

<sup>6</sup> Ascorbate peroxidase

<sup>7</sup> Guaiacol peroxidase

<sup>8</sup> Scavenging

دوروم در مقایسه با گندم نان نورستار ممکن است اطلاعات جامعی در خصوص تحمل به تنش سرما در گندم دوروم ارائه کند. هدف از این تحقیق، مطالعه میزان تحمل تنش سرما در ژنوتیپ‌های گندم دوروم در مقایسه با گندم نورستار بود. به دلیل پیچیدگی عوامل محیطی که اغلب چندین تنش همزمان سلول‌های گیاهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند و تنوع پاسخ‌های سلولی که بسته به طبیعت تنش (مدت و شدت تنش) تغییر می‌کند، بررسی دینامیکی پاسخ‌های بیوشیمیایی سلول تحت تنش سرما ضروری به نظر می‌رسد.

### مواد و روش‌ها

#### شرایط رشد گیاهان

در این مطالعه دو ژنوتیپ گندم دوروم SRN و گردیش به همراه رقم نورستار که از موسسه دیم مراغه تهیه شده بودند، استفاده شد. گردیش رقم زراعی است که در آزمایش‌های مزرعه‌ای تحمل مناسبی به تنش سرما در مقایسه با SRN نشان داده است. رقم گردیش بومی استان اردبیل بوده و دارای تیپ زمستانه است و در آزمایش‌های مزرعه‌ای تحمل مناسبی به تنش سرما نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر دوروم داشته است. ژنوتیپ SRN دارای تیپ بهاره بوده و از موسسه ایکاردا تهیه شده است و تحمل کمتری به تنش سرما نسبت به گردیش دارد. رقم نورستار نیز به عنوان یکی از متحمل‌ترین ارقام به تنش سرما در نظر گرفته شده است این رقم بومی کشور کانادا بوده و دارای تیپ زمستانه است. بذور با هیپوکلریت سدیم ده درصد به مدت پنج دقیقه ضد عفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در پتری دیش با رطوبت لازم قرار گرفتند. پتری دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای ۲۳ درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از جوانه زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌ها منتقل شدند. انتقال غیر مستقیم گیاه به خاک به دلیل اهمیت یکنواخت سبز شدن آنها و اجرای همزمان تیمار سرما در نمونه‌ها ضروری است. گلدان‌ها در اتاقک رشد با نور ۲۰۰ میکرومول بر متر مربع بر مجذور ثانیه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار داده شدند. گیاهچه‌های دو هفته‌ای به دو قسمت تقسیم شدند بخشی از آنها در دمای ۲۳

اصلاح سنتی و انتقال ژن‌های تحمل شناسایی شده در گونه‌های متحمل به گونه‌های حساس در هر خانواده‌ای را امکان پذیر ساخته است. با این وجود پایه‌ریزی یک استراتژی مناسب، درک مکانیسم‌هایی که فرآیند سازگاری به سرما و را هدایت می‌کنند، ضروری است. علاوه بر این از آنجا که تنش سرما در برخی خصوصیات عمومی با دیگر تنش‌ها نظیر خشکی و شوری همسان است، تشخیص وقایعی که مختص این مکانیسم‌ها هستند، بسیار مهم است. بررسی موشکافانه پاسخ یک گیاه به تنش سرما در سطوح مولکولی می‌تواند راه‌گشای مناسبی در فهم بهتر تحمل به این تنش بوده و مطالعات اصلاحی را هر چه بیشتر هدفمند کند.

گندم دوروم با دو دسته ژنومی A و B، دارای فرمول ژنومی AABB بوده که از نظر ژنتیکی با گندم نان با فرمول AABBDD متفاوت است. مطالعات گذشته نشان داده که بسیاری از ژن‌های تحمل به شرایط محیطی بر روی ژنوم D قرار دارد (Boyo et al. 2010; Laino et al. 1999) و به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها احتمالاً گندم‌های دوروم را حساس‌تر به تنش‌های محیطی خشکی، شوری یا سرما ساخته است (Gorham et al. 1987; Munns et al. 2006; Marti and Slafer 2013). با این وجود، حتی گیاهان حساس نیز دارای مکانیسم‌های عمومی و اختصاصی در پاسخ به تنش‌های محیطی هستند که ممکن است به اصلاح ژنتیکی آنها کمک کند، اگرچه چنین مکانیسم‌هایی اغلب ضعیف‌تر از مکانیسم‌های موجود در گیاهان متحمل فعالیت می‌کنند (Heidarvand and Maali-Amiri 2013). با این وجود مکانیسم‌های دخیل در تحمل به تنش سرما در گندم دوروم به خوبی شناخته نشده و در نتیجه به منظور یافتن راه‌هایی برای ایجاد تحمل به تنش سرما مسیرهای القایی این تنش بایستی مورد مطالعه قرار گیرند در حالی که مطالعات تحمل به سرما در گندم نان در سطوح مختلف ژنتیکی به طور گسترده‌ای انجام شده است (Janmohammadi and Mahfoozi 2013). یکی از این ژنوتیپ‌ها نورستار<sup>۱</sup> است که رقم بومی کشور کانادا بوده و تحقیقات گسترده نشان داده که درجه تحمل به سرما در این گیاه بیشتر از دیگر ژنوتیپ‌های گندم نان است. بنابراین مطالعه پاسخ‌های گندم

<sup>1</sup> Norstar

$$I = \frac{Ec_1}{Ec_2} \times 100$$

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون سلولی بر اساس مالون دی آلدئید

میزان پراکسیداسیون ژنوتیپ‌های گندم براساس تجمع مالون دی آلدئید برگ با استفاده از تیوباربتوریک اسید تعیین شد (Heath and Packer 1968). ۳۰۰ میلی‌گرم نمونه برگ از بخش میانی ساقه در ۵ میلی لیتر بافر استخراج (۰/۱ مولار Tris-HCl، pH=۷/۶، حاوی NaCl) کوبیده شد تا یک محلول یکنواخت به دست آید. سپس سه میلی لیتر از این محلول شده با دو میلی لیتر محلول تیوباربتوریک اسید حاوی اسید تری کلرواستیک در لوله آزمایش مخلوط شد و در حمام آب جوش (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از عبور از صافی یا سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، چگالی نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه اسپکتروفومتر (Shimadzuon 160) تعیین شد. غلظت مالون دی‌آلدئید براساس فرمول زیر محاسبه شد که D اشاره به چگالی و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر  $10^5 \times 1/56$ ) دارد.

$$C = D/E$$

استخراج پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کلیه مراحل استخراج در نمونه‌ها بر روی یخ انجام شد. نمونه‌ها در هاون چینی، به کمک ازت مایع ساییده و پودر شدند. ۲/۵ میلی لیتر بافر استخراج<sup>۱</sup> را به ۰/۲۵ گرم از پودر اضافه کرده و ورتکس شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت  $13000 \times g$  و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس، مایع رویی، عصاره آنزیمی، برای سنجش کمی آنزیم‌ها استفاده شد. غلظت پروتئینی نمونه‌ها بر اساس روش Bradford (1976) تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز طبق روش Beyer and Fridovich (1987) انجام شد. فعالیت این آنزیم به صورت

درجه سانتی‌گراد و شرایط فوق‌الذکر نگهداری شده و بخشی دیگر به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت سرما سازگاری با شرایط یکسان نوری انتقال یافتند. به منظور سرماسازگاری، گیاهچه‌ها دو هفته در این دما نگهداری شدند. مطالعات نشان داده که دوره‌های سازگاری طولانی مدت با تغییرات متعدد در سطوح فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سبب القا پاسخ‌های دفاعی بیشتری نسبت به دوره‌های کوتاه آن دارند با این حال ژنوتیپ‌هایی که پاسخ‌های دفاعی مطلوب‌تری تحت دوره‌های سازگاری کوتاه نشان دهند، احتمالاً پاسخ‌های بهتری در دوره‌های طولانی مدت سازگاری نیز نشان می‌دهند. از طرف دیگر این روش مطالعه به دلیل کوتاهی دوره ارزیابی ژنوتیپ‌ها، تعداد زیادی ژنوتیپ را می‌توان با هزینه‌های کمتری مورد ارزیابی قرار داد (Nazari et al. 2012; Kazemi Shahandashti et al. 2013). سپس، گیاهچه‌ها به دمای ۵- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت انتقال یافتند. تعیین دما و زمان تنش سرما بر اساس آزمایش‌های اولیه انجام شد. نمونه‌گیری از گیاهچه‌ها بلافاصله پس از اعمال تیمارهای فوق‌الذکر انجام شد و نمونه‌ها در ازت مایع قرارداده شدند و سپس جهت نگهداری در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

اندازه‌گیری تحمل به سرما براساس قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی گیاه

تحمل به سرما بر اساس شاخص نشت یا هدایت الکترولیتی بافت‌های خسارت دیده گیاهان گندم بعد از تیمار سرما اندازه‌گیری شد (Hepburn et al. 1986). در اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیتی از برگ‌های کاملاً سالم بخش میانی ساقه استفاده شد. هشتاد میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ده میلی لیتر آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب آب برگ-ها، مکش انجام شد و لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند. سپس میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها ( $EC_1$ ) با استفاده از دستگاه EC متر (آلمان، Inolab) اندازه‌گیری شد. سپس مجدداً آب، به درون لوله‌ها بازگردانده شد و محتوی لوله آزمایش پس از قرار گرفتن در حمام آب گرم به مدت ۱۰ دقیقه، در شیکر قرار گرفته و بلافاصله میزان هدایت الکتریکی ( $EC_2$ ) تعیین شد و در نهایت مقدار شاخص خسارت براساس فرمول ذیل محاسبه شد.

<sup>1</sup> Extraction buffer

Dionisio-Sese and Tobita (1998) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات (pH=7) میلی‌مولار 50، گایاکول 10 میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن 15 میلی‌مولار و 50 میکرولیتر عصاره پروتئینی بود. پس از افزودن عصاره، بلافاصله جذب در طول موج 470 nm قرائت شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول گایاکول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

### نتایج و بحث

در این آزمایش ژنوتیپ‌های گندم دوروم و نان در مراحل رشد گیاهچه تحت تنش کوتاه مدت سرما قرار گرفتند. غلات زمستانه و مخصوصاً گندم‌های دوروم عموماً در مناطق جغرافیایی کشت می‌شوند که بروز پدیده سرما زدگی در زمستان ممکن است خسارت‌های فراوانی به آنها وارد کند. در کشور تحقیقاتی در خصوص تحمل به تنش سرما در گندم‌های دوروم در سطح آزمایشگاهی انجام نشده است. لذا تلاش برای یافتن ژنوتیپ‌هایی که تحمل به دماهای زیر صفر داشته باشند ضروری به نظر می‌رسد. تنش کوتاه مدت روشی موثر در ارزیابی ژنوتیپ‌ها در شرایط کنترل شده محسوب شده و می‌تواند معیاری در برآورد تحمل به تنش‌های طولانی مدت نیز تلقی شود (Maruyama and Nakamura 1997; Heidarvand et al. 2011). نتایج این آزمایش نشان داد که گیاهان در پاسخ به تنش سرما تغییراتی را در الگوی دفاعی و ترکیبات پروتئینی خود ایجاد کردند. مطالعات نشان داده که غشاهای سلولی اولین محل درک تنش‌های محیطی و بروز خسارت در گیاهان می‌باشند (Los and Murata 2004; Heidarvand and Maali Amiri 2010) طوری که نتایج نشأت‌الکترولیت‌ها می‌تواند زمینه را برای مطالعه سایر واکنش‌های صورت گرفته در سلول در نتیجه تغییر نفوذپذیری غشای سلولی فراهم کند.

فتمتريک بررسی می‌شود. بافر اصلی واکنش شامل بافر فسفات (pH=7/8) 100 میلی‌مولار، متیونین 12 میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیوم 75 میکرومولار، EDTA 100 میکرومولار و تریاتون ایکس-100 (0.25 درصد) بود. از بافر اصلی به هر چاهک به میزان 290 میکرو لیتر اضافه شد. سپس از بافر ریوفلاوین دو میکرو مولار به میزان 5 میکرو لیتر به مخلوط واکنش اضافه شد و دستگاه روی طول موج 560 nm کالیبره شد. برای سنجش هر نمونه 10 میکرولیتر از عصاره پروتئینی استفاده شد. این واکنش بر اساس میزان احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم و توانایی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ممانعت از این واکنش بررسی می‌شود. میزان فعالیت آنزیم بر اساس واحد آنزیم در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu 160) به روش Scalba et al. (1998) اندازه‌گیری شد. مواد استفاده شده شامل 3000 میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=7) 50 میلی‌مولار، 5 میکرولیتر پراکسید هیدروژن 3/41 مولار و 100 میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به روش Ranieri et al. (2003) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم (pH=7/8) 50 میلی‌مولار، آسکوربات 5 میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن یک میلی‌مولار و عصاره پروتئینی به میزان 10 میکرولیتر بود. از آنجا که حداکثر جذب آسکوربات در طول موج 290 nm صورت می‌گیرد، دستگاه روی این طول موج تنظیم شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز مشابه آنزیم کاتالاز، در دمای 25 درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر به روش

جدول ۱- نتایج آزمون دانکن در مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های گندم دوروم و نان تحت شرایط دمایی کنترل (۲۳ درجه سانتی گراد)\*

Genotypes	GPX ( $\mu\text{mol}$ of guaiacol oxidized $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	CAT ( $\mu\text{mol}$ of $\text{H}_2\text{O}_2$ reduced $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	APX ( $\mu\text{mol}$ oxidized Ascorbate $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	SOD ( $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	ELI (%)	MDA ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FM}$ )
SRN	103.7 $\pm$ 2.93 (c)	239.8 $\pm$ 2.67 (c)	151.5 $\pm$ 5.32 (b)	320.7 $\pm$ 1.42 (c)	30.4 $\pm$ 2.32 (a)	6.237 $\pm$ 0.94 (a)
Gerdish	120.2 $\pm$ 2.05 (b)	314.2 $\pm$ 1.73 (a)	116.9 $\pm$ 4.21 (c)	337.8 $\pm$ 3.39 (b)	24.85 $\pm$ 1.75 (ab)	5.55 $\pm$ 0.75 (a)
Norstar	134.7 $\pm$ 3.21 (a)	304.4 $\pm$ 4.22 (b)	217.2 $\pm$ 1.1 (a)	359.4 $\pm$ 7.29(a)	21.6 $\pm$ 2.53 (b)	4.747 $\pm$ 1.29 (a)

\*حروف یکسان در جدول نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها در سطح معنی دار  $p \leq 0.01$  است.

جدول ۲- نتایج آزمون دانکن در مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های سازگار شده گندم دوروم و نان (در دمای سازگاری ۴ درجه سانتی گراد) تحت شرایط دمایی (۵- درجه سانتی گراد)\*.

Genotypes	GPX ( $\mu\text{mol}$ of guaiacol oxidized $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	CAT ( $\mu\text{mol}$ of $\text{H}_2\text{O}_2$ reduced $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	APX ( $\mu\text{mol}$ oxidized Ascorbate $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	SOD ( $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	ELI (%)	MDA ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FM}$ )
SRN	171.5 $\pm$ 2.29 (c)	497.7 $\pm$ 50.52 (b)	230.7 $\pm$ 3.07 (c)	602.8 $\pm$ 3.1 (c)	25.11 $\pm$ 0.84 (a)	5.067 $\pm$ 0.55 (a)
Gerdish	193.8 $\pm$ 2.96 (b)	529 $\pm$ 3.45 (ab)	268.6 $\pm$ 4.49 (b)	713.8 $\pm$ 4.18 (b)	17.34 $\pm$ 1.35 (b)	4.787 $\pm$ 1.19 (a)
Norstar	217.1 $\pm$ 2.58 (a)	602.7 $\pm$ 2.66 (a)	387.1 $\pm$ 3.3 (a)	881 $\pm$ 5.61 (a)	16.22 $\pm$ 1.05 (b)	6.367 $\pm$ 2.27 (a)

\*حروف یکسان در جدول نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها در سطح معنی دار  $p \leq 0.01$  است.

جدول ۳- نتایج آزمون دانکن در مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های سازگار نشده گندم دوروم و نان تحت شرایط دمایی (۵- درجه سانتی گراد)\*.

Genotypes	GPX ( $\mu\text{mol}$ of guaiacol oxidized $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	CAT ( $\mu\text{mol}$ of $\text{H}_2\text{O}_2$ reduced $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	APX ( $\mu\text{mol}$ oxidized Ascorbate $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	SOD ( $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein)	ELI (%)	MDA ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FM}$ )
SRN	171.6 $\pm$ 1.18 (b)	301.5 $\pm$ 1.99 (b)	163 $\pm$ 3.49 (b)	571.9 $\pm$ 3.39 (a)	43.6 $\pm$ 0.92 (a)	21.5 $\pm$ 2.44 (a)
Gerdish	175.2 $\pm$ 2.72 (b)	318.1 $\pm$ 1.73 (b)	170.5 $\pm$ 6.07 (b)	459.8 $\pm$ 1.36 (c)	45 $\pm$ 2 (a)	19.9 $\pm$ 2.08 (a)
Norstar	194.2 $\pm$ 5.12 (a)	368.1 $\pm$ 14.87 (a)	209.4 $\pm$ 1.39 (a)	476.2 $\pm$ 2.95 (b)	38.22 $\pm$ 3.34 (b)	20.04 $\pm$ 2.44 (a)

\*حروف یکسان در جدول نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها در سطح معنی دار  $p \leq 0.01$  است.

تجزیه ELI نشان داد که اختلاف معنی داری بین ژنوتیپ‌ها به ترتیب در گیاهان سازگار شده به سرما و گیاهان سازگار نشده وجود دارد. شاخص خسارت در گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش داشت و میزان آن از ۱۶/۱۲ در نورستار تا ۲۵/۱۱ در SRN متغیر بود در حالی که در گیاهان سازگار نشده این میزان افزایش معنی دار نشان داد و میزان آن از ۳۸/۲۳ در نورستار تا ۴۳/۶ در SRN متغیر بود. میزان شاخص خسارت ۵۰ درصد بافت گیاهی به عنوان مرگ گیاه در اثر عامل تنش در نظر گرفته می‌شود (Sukumaran and Weiser 1972) بنابراین ژنوتیپ‌های با ELI کمتر، تحمل بیشتری به شرایط تنش دارند. لذا اعمال تیمار ۵- درجه سانتی گراد اهمیت دوره‌های سازگاری را در ژنوتیپ‌ها نشان داد. مطالعات در گندم نشان داده که رقم نورستار به عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ گندم، جهت سازگاری نیاز به دوره‌های طولانی مدت سازگاری دارد (Mahfoozi et al. 2001). با این حال نتایج این تحقیق علاوه بر

نتایج تجزیه ELI نشان داد که تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ‌ها در تیمارهای دمایی وجود داشت که نشان دهنده رابطه تیمارهای دمایی در ژنوتیپ‌ها بود. تحت شرایط کنترل، میزان نشت یا هدایت الکترولیتی در گندم‌های دوروم بیشتر از گندم نان بود. در رقم SRN، بیشترین مقدار (۳۰/۰۴) و در رقم گردیش، متوسط (۲۵/۸۵) و در رقم نورستار، حداقل مقدار نشت الکترولیت‌ها (۲۱/۵۹) مشاهده شد. تیمار دمایی ۵- درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت توانست تفاوت‌های فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌ها را نشان دهد و در نتیجه شدت و مدت تنش به عنوان عناصر کلیدی در مطالعه تحمل به تنش سرما، در نظر گرفته شد. این اختلاف ممکن است بیانگر تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها در پاسخ به دمای پایین و منعکس کننده سازوکارهای متمایز درونی گیاه و احتمالاً تنوع در میزان فعالیت ژن‌ها بوده و این مسئله با توجه به پاسخ‌های معنی دار ژنوتیپ‌ها در تجزیه ELI حتی قبل از اعمال تنش سرما قابل نتیجه‌گیری بود (Maali Amiri et al. 2007). نتایج

عنوان جایگاه اصلی فتوستنز در نظر گرفته می‌شود، لذا در این تحقیق نیز به همین منظور خسارت سرما (MDA و ELI) در این نوع بافت مورد مطالعه قرار گرفت.

کاهش میزان خسارت‌های سلولی (MDA و ELI) بیانگر فعالیت مکانیسم‌های دفاع در مقابله با ROS است که داده‌های این آزمایش نشان می‌دهد که رقم نورستار ظرفیت ژنتیکی و فیزیولوژیکی بیشتری در جهت سازگاری به سرما داشت. همچنین این ظرفیت در ژنوتیپ گردیش بالاتر از SRN بود. ژنوم گندم دوروم از دو دسته ژنومی A و B تشکیل شده در حالی که در گندم نان سه دسته ژنومی A، B و D وجود دارد. الگوی تغییر شاخص‌های خسارت سلولی (MDA و ELI) نشان می‌دهد که تغییر ژنتیکی در گندم نان و دوروم احتمالاً سبب تغییر ظرفیت تحمل به سرما در ژنوتیپ‌های گندم شده و چنین وضعیتی در گیاهان سازگار شده و سازگار نشده مشاهده می‌شود. نتایج آزمایش نشان داد که میزان MDA در تیمارهای دمایی برخلاف ELI اختلاف معنی داری بین ژنوتیپ‌ها ندارد. اما داده‌های تکمیلی گروه ما نشان داده که محصولات MDA ممکن است در مسیر اکسی لیپین<sup>1</sup> و تولید متابولیت‌های ثانویه جریان یابد که در نهایت به القا برخی مکانیسم‌های دفاعی منجر شود (Kazemi Shahandashti et al. 2013). لذا اغلب، تایید داده‌های MDA توسط آزمون ELI می‌تواند به تفسیر صحیح پاسخ‌های سلولی منجر شود.

ROS با اکسیداسیون ترکیبات سلولی از جمله پروتئین و چربی-های غشا و اندامک‌های سلولی سبب خسارت به آنها می‌شود طوری که مطالعه آنها امروزه به عنوان رخدادهای تغییر پذیر در دوره‌های کوتاه زمانی پس از القای تنش در گیاهان تلقی می‌شود و مطالعه این مسئله در فهم مکانیسم‌های تحمل به تنش سرما بسیار ارزشمند است. با این حال گیاهان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی خود را به عنوان یک سیستم دفاعی در مقابله با تنش سرما افزایش می‌دهند و بدین طریق از تجمع و خسارت ROS جلوگیری می‌کنند. بنابراین پیشنهاد شده که دلیل اصلی خسارت تنش سرما، ناتوانی سیستم‌های دفاعی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد (Nazari et al. 2012) که بدین

این که تحمل بیشتر این ژنوتیپ را نسبت به ژنوتیپ‌های دوروم بیان کرد بلکه گویای این نکته بود که تحمل بیشتر به سرما در نورستار و سپس گردیش در مقایسه با SRN حتی در دوره‌های کوتاه مدت سرماسازگاری، ممکن است در اثر فعال‌سازی مکانیسم‌های درونی در جهت تحمل به سرما باشد که احتمالاً با فعالیت‌های اکسیداسیونی و خصوصیات و ترکیب غشاهای سلولی در ارتباط است (Los and Murata 2004; Osamu and Iba 2005) که باید در جزئیات بیشتر مطالعه شود.

تغییر میزان ELI می‌تواند در نتیجه اثرات مستقیم سرما بر پروتئین‌ها و ترکیب اسیدهای چرب غشا یا در اثر خسارت غیرمستقیم سرما یعنی افزایش میزان ROS باشد. اندازه‌گیری میزان MDA نشان داد که افزایش میزان ROS می‌تواند نقش مهمی در خسارت غشایی داشته که این عمل در نتیجه اکسید شدن اسیدهای چرب غیراشباع غشاهای سلول ایجاد می‌شود. بنابراین در این صورت افزایش غلظت MDA شاخصی از بروز خسارت در گیاه تلقی می‌شود که افزایش هر چه بیشتر آن نشانه حساسیت بیشتر گیاه به تنش می‌باشد. آزمون مقایسه میانگین داده‌های MDA، اختلاف معنی‌داری را بین تیمار ۲۳ و ۵- درجه سانتی‌گراد نشان داد که نشان دهنده ارتباط تیمارهای دمایی و وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها بود. مقدار MDA بر حسب میکرومول در گرم وزن تر برگ در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد از ۴/۷۵ در نورستار تا ۶/۲۴ در ژنوتیپ SRN متغیر بود. دمای ۵- درجه سانتی‌گراد در گیاهان سازگار شده تغییر معنی‌داری در میزان MDA ایجاد نکرد در حالی که در گیاهان سازگار نشده منجر به افزایش معنی‌دار در همه ژنوتیپ‌ها شد اگرچه این میزان در SRN بیشترین و در نورستار کمترین بود که نشان دهنده ظرفیت کمتر تحمل در SRN است. الگوی تغییر میزان MDA تحت تیمارهای دمایی نتایج ELI را تأکید می‌کند. همچنین این نتایج نشان می‌دهد که میزان ROS به عنوان یکی از عوامل مهم خسارت غشای پلاسمایی در نظر گرفته می‌شود (Leport et al. 1999) گزارش کردند که ۸۰-۵۰ درصد کاهش در عملکرد در اثر محدودیت در فتوستنز است. تنش سرما با آسیب به غشاهای کلروپلاستی می‌تواند بیشترین خسارت را به فتوستنز و راندمان تولید گیاه وارد سازد (Kingston-Smith et al. 1997). با توجه به اینکه برگ به

<sup>1</sup> Oxylipin pathway

CAT به کمترین میزان خود رسید. این نتایج نشان می‌دهد که تحت تنش سرما افزایش فعالیت مکانیسم‌های تخریب پروتئینی از یک طرف و کاهش فعالیت مکانیسم‌های سنتز پروتئینی از طرف دیگر، سبب روند رو به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است. در گیاهان سازگار شده به علت ایجاد تطابق نسبی و موقتی این وضعیت نه تنها محسوس نبوده بلکه افزایش شدید در فعالیت CAT نیز دیده شده اما در عوض در گیاهان سازگار نشده تغییرات فعالیت آنزیمی شدید می‌باشد.

آنزیم‌های پراکسیداز به دلیل حذف ROS و دخالت در مسیرهای مختلف سلولی مانند چرخه گلوکوتایون-آسکوربات، لیگنینی شدن و مسیرهای هورمونی در همکاری با سایر آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی برای انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی استفاده می‌شوند (Ring et al. 2013). الگوی تغییر فعالیت آنزیم APX مشابه الگوی فعالیت آنزیم GPX بود بدین معنا که در رقم نورستار بیش از دوروم‌ها فعالیت آنزیمی مشاهده شد که می‌تواند نشان دهنده اختلاف ژنتیکی گندم‌های دوروم و نان باشد. بیشترین افزایش فعالیت آنزیمی مربوط به گیاهان سازگار شده تحت تیمار سرما بود که در آن بیشترین فعالیت متعلق به رقم نوراستار و کمترین فعالیت در رقم SRN دیده شد در حالی که در گیاهان سازگار نشده تحت تنش میزان فعالیت این آنزیم‌ها با حفظ همان الگو کاهش نشان داد.

تغییر همزمان الگوی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که با تغییر شاخص‌های خسارت (ELI و MDA) همراه بوده گویای آن است که فعالیت این آنزیم‌ها احتمالاً در همراهی با سایر مکانیسم‌های دفاع سلولی در افزایش تحمل به تنش سرما در گندم فعالیت دارند. چنین شاخص‌هایی ممکن است در ارزیابی ژنوتیپ‌های گندم به تنش سرما به همراه تیمارهای تنش کوتاه مدت که موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه پژوهش شده، موثر باشند. بنابراین مطالعه پاسخ به تنش‌ها در گندم می‌تواند بر پایه نتایج حاصل از فعالیت آنزیم‌ها و سطوح نشت الکترولیت‌ها و غلظت مالون دی‌آلدهید باشد. سازگاری در گیاهان حتی در دوره‌های کوتاه‌مدت می‌تواند سبب بهبود پاسخ‌های ژنوتیپ‌ها به تنش سرما باشد. در این مطالعه ارقام نورستار و گردیش تحت تیمارهای دمایی پاسخ‌های مناسبی به تنش سرما در مقایسه با ژنوتیپ

ترتیب در این قسمت فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، APX و GPX بررسی شد.

آنزیم SOD به عنوان اولین سد دفاعی در مقابله با ROS در سلول‌ها مطرح بوده به طوری که میزان فعالیت آنزیم تعیین کننده نسبت تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن می‌باشد. نتایج تجزیه داده‌ها تفاوت معنی‌داری بین تیمارها برای فعالیت آنزیم SOD نشان داد. در تیمار شاهد الگوی مشابهی در تمام گیاهان مشاهده شد اگرچه در نورستار فعالیت آنزیم بیشتر و در SRN کمتر بود. فعالیت آنزیم تحت تنش سرما در گیاهان سازگار شده افزایش یافت به طوری که در گیاهان سازگار شده این افزایش در نورستار بیشترین و در SRN کمترین بود. افزایش فعالیت آنزیم SOD بیانگر فعالیت سیستم دفاعی گیاه و پاسخ به تنش سرما در جهت تحمل و بقا است (Heidarvand and Maali-Amiri 2013). اهمیت سازگاری به تنش سرما هنگامی آشکار شد که میزان فعالیت SOD در گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما مورد مطالعه قرار گرفت که پایین تر از میزان فعالیت آنزیم در گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما بود. کمترین میزان خسارت در تیمارهای دمایی با بیشترین فعالیت آنزیم تحت این تیمارها گویای هماهنگی پاسخ‌های گیاهی در جهت مهار خسارت‌های سلولی است.

افزایش غلظت پراکسید هیدروژن سبب انتشار این ماده به بخش‌های مختلف سلول و خسارات شدید می‌شود (Srivalli et al. 2003) زیرا این ماده دارای طول عمر بیشتری نسبت به ROS‌های دیگر از جمله سوپراکسید است که در این حالت CAT با حذف پراکسید هیدروژن سلول را یاری کند به طوری که در طبیعت نیز عملاً هر جا که SOD وجود دارد CAT نیز با آن همراه و فعال است. نتایج آزمایش نشان داد که در شرایط شاهد، فعالیت آنزیم در رقم گردیش بالاتر از نورستار و در ژنوتیپ SRN کمترین بود. الگوی تغییر میزان فعالیت CAT تحت تنش سرما در گیاهان سازگار شده و سازگار نشده همانند الگوی تغییر فعالیت آنزیم SOD بود که تایید کننده هماهنگی سلول در پاسخ به شرایط تنش است. تحت تنش سرما در گیاهان سازگار شده بیشترین میزان فعالیت آنزیم SOD در رقم نورستار و کمترین میزان در رقم SRN بوده است. در گیاهان سازگار نشده میزان فعالیت آنزیم

با برهمکنش‌های پیچیده سلولی در ژنوم مرتبط بوده که ارتباط مستقیم با سازگاری و مکانیسم‌های متعدد دارد که بایستی در جزئیات مورد مطالعه قرار گیرد.

SRN نشان دادند که بیانگر ظرفیت ژنتیکی بالای آن‌ها می‌باشد. با این وجود، تحمل به تنش سرما یک فرایند پیچیده محسوب شده که شامل تغییرات متعدد ژنتیکی بیوشیمیایی سلول است که بخشی از آن با تفاوت ژنوم‌ها در گندم دوروم و نان و بخش دیگر

### منابع

Baek KH, Skinner DZ (2003) Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science* 165:1221-1227

Bettaieb T, Mahmoud M, Ruiz de Galarreta JI, Jardin PD (2007) Relation between the low temperature stress and catalase activity in gladiolus somaclones (*Gladiolus grandiflorus* Hort.). *Science Horticulture* 113:49-51.

Beyer WF, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in condition. *Analytical Biochemistry* 161:559-566.

Boyko EV, Gill KS, Mickelson-Young L, Nasuda S et al. (1999) A high-density genetic linkage map of *Aegilops tauschii*, the D-genome progenitor of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 99:16-26.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254

Dionisio-Sese ML, Tobita S (1998) Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135:1-9

Gorham J, Hardy C, Wyn Jones RG, Joppa LR, Law CN (1987) Chromosomal location of a K/Na discrimination character in the D genome of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 74:584-588.

Guy C (1999) Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1:231-242.

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archive Biochemistry and Biophysics* 125:189-215

Heidarvand L, Maali-Amiri R (2013) Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of Plant Physiology* 170:459-469.

Heidarvand L, Maali Amiri R, Naghavi MR, Farayedi Y, Sadeghzadeh B, Alizadeh KH (2011) Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 58:157-163

Heidarvand L, Maali Amiri R (2010) What Happens in Plant Molecular Responses to Cold Stress? *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 419-431.

Hepburn HA, Naylor REL, Stokes DT (1986) Electrolyte leakage from winter barley tissue as indicator of winter hardiness. *Annals of Applied Biology* 108:164-165.

Janmohammadi M, Mahfoozi S (2013) Regulatory network of gene expression during the development of frost tolerance in plants. *Current Opinion in Agriculture* 2:14-22.

Kazemi Shahandashti S, Maali Amiri R, Zeinali H, Ramezanzpour SS (2013) Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. *Molecular Biology Reports* 40:893-903.

Kingston-Smith AH, Harbinson J, Williams J, Foyer CH (1997) Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. *Plant Physiology* 114: 1039-1046.

Laino P, Shelton D, Finnie C, Leonardis MD, Mastrangelo AM, Svensson B, Lafiandra D, Masci S (2010) Comparative proteome analysis of metabolic proteins from seeds of durum wheat (cv. Svevo) subjected to heat stress. *Proteomics* 10: 2359-2368.

Leport L, Turner NC, French RJ, Barr MD, Duda R, Davies SL, Tennant DF, Siddique KHM (1999) Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a mediterranean-type environment. *European Journal of Agronomy* 11: 279-291.

Limin AE, Fowler DB (1985) Cold hardiness in *Triticum* and *Aegilops* species. *Canadian Journal of Plant Science* 65:71-77.

Los DA, Murata N (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666: 142-157.

Maali-Amiri R, Goldenkova-Pavlova I, Pchelkin VP, Tsydendambaev VD, Vereshchagin AG, Deryabin AN, Trunova TI, Los DA, Nosov AM (2007) Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the D12-desaturase gene from Cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology* 54:678-685

Mahfoozi S, Limin AE, Fowler DB (2001) Influence of vernalization and photoperiod responses on cold hardiness in winter cereals. *Crop Science* 41:1006-1011.

Marti J, Slafer GA (2013) Bread and durum wheat yields under a wide range of environmental conditions. *Field Crops Research* (in press).

Maruyama S, Ibaraki T, Nakamura Y (1997) Photosynthesis, dark respiration and protein synthesis of rice (*Oryza sativa*) leaves at low temperature: Analysis of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase. *Japanese Journal of Crop Science* 66:85-91.

- Munns R, James RA, Lauchli A (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* 57:1025-1043.
- Nayyar H, Bains TS, Sanjeev K (2005) Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany* 54:275-285.
- Nachit MM (2002) Breeding for improved resistance to drought in durum wheat. ICARDA Caravan, ICARDA
- Nazari MR, Habibpour Mehraban F, Maali Amiri R, Zeinali Khaneghah H (2012) Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology* 59:183-189
- Osamu M, Iba K (2005) Trienoic fatty acids and stress responses in higher plants. *Plant Biotechnology* 22:423-430.
- Ranieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, Mensuali Sodi A, Soldatini GF (2003) Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany* 54:2529-2540.
- Ring L, Yeh SY, Hücherig S, Hoffmann T, Blanco-Portales R, Fouche M, Villatoro C, Denoyes B, Monfort A, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Gershenson J, Schwab W (2013) Metabolic interaction between anthocyanin and lignin biosynthesis is associated with peroxidase FaPRX27 in strawberry fruit. *Plant Physiology* 163:43-60.
- Sadeghzadeh D, Alizadeh Kh (2005) Relationship between grain yield and some agronomic characters in durum wheat under cold dryland conditions in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8: 959-962.
- Saibo NJ, Lourenco T, Oliveira M (2009) Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany* 103:609-623
- Scebba F, Sebastiani L, Vitagliano C (1998) Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 104:747-752
- Srivalli B, Sharma G, Khanna-Chopra R (2003) Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum* 119:503-512.
- Sukumaran NP, Weiser CJ (1972) An excised leaflet test for evaluation potato frost tolerance. *HortScience* 7:467-468.
- Thomashow MF (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots!. *Plant Physiology* 125:89-93
- Verma S, Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164:645-655.