

# ارزیابی بیان نسبی برخی ژن‌های تحمل سرما در لاین‌های حاصل از تلاقی ارقام گندم زمستانه و بهاره تحت دوره‌های عادت‌دهی به دمای

## پایین

### Evaluation of relative expression of some genes related with cold tolerance in lines of crosses between winter and spring wheat during low temperature acclimation

محسن حسینی<sup>۱</sup>، رضا معالی‌امیری<sup>۲\*</sup>، عباس سعیدی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و دانشجوی دکتری، گروه

علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- استاد، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

Hosseini M<sup>1</sup>, Maali-Amiri R<sup>\*2</sup>, Saeidi A<sup>3</sup>

1- Graduated MSc Student from College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran and PhD Student, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2- Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3- Professor, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rmamiri@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴)

## چکیده

تنش دمای پایین یکی از انواع تنش‌های غیر زیستی است که به‌طور مستقیم رشد و عملکرد محصولات مهم کشاورزی از جمله گندم را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد. این تحقیق به‌منظور بررسی ارتباط بین تنظیمات نموی با میزان تحمل دمای پایین، تجمع پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و میزان بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مراحل مختلف نموی در لاین‌های حاصل از تلاقی ارقام گندم نورستار و پشتاز انجام شد. نتایج حاصل از ارزیابی  $LT_{50}$  نشان داد که ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی در دومین دوره عادت‌دهی به دمای پایین، مصادف با نقطه اشباع نیاز بهاره‌سازی، به حداکثر میزان تحمل دمای پایین دست یافته و با ورود به فاز زایشی در سومین دوره عادت‌دهی به دمای پایین میزان تحمل دمای پایین کاهش یافت. ژنوتیپ‌های بهاره تحمل دمای پایین بسیار محدودی داشتند. بررسی میزان بیان نسبی ژن *TaVRT-1* نشان دهنده بیان بالا و دائمی آن در طول دوره‌های عادت‌دهی به دمای پایین در ژنوتیپ‌های بهاره بود. با این وجود در ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی، بیان نسبی این ژن تنها پس از تکمیل نیاز بهاره‌سازی افزایش یافت. بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی بیشتر از ژنوتیپ‌های بهاره بود و در دومین دوره عادت‌دهی به دمای پایین به بیشترین میزان خود رسید. با افزایش بیان ژن *TaVRT-1* و کاهش بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی میزان تجمع  $H_2O_2$  در سومین دوره عادت‌دهی به دمای پایین به بیشترین مقدار رسید. محتوی  $H_2O_2$  در ژنوتیپ‌های بهاره بیشتر از ژنوتیپ‌ها زمستانه و بینابینی بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی با کاهش بیان ژن *TaVRT-1* و متعاقباً افزایش طول مرحله رویشی و بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو القاء شده توسط دمای پایین را تعدیل نموده و سبب بهبود تحمل دمای پایین شدند.

## واژه‌های کلیدی

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

بهاره‌سازی

بیان نسبی ژن

توسعه نموی

عادت‌دهی به دمای پایین

گندم

به دلیل افزایش چشمگیر جمعیت جهان، تقاضا برای محصولات کشاورزی از جمله گندم (*Triticum aestivum* L.) به طور مداوم در حال افزایش است (Hosseini et al. 2021). گندم مهم‌ترین محصول زراعی دنیا است که در حدود ۲۲ درصد از اراضی قابل کشت در دنیا را به خود اختصاص داده و نقش اساسی در امنیت غذایی مردم دنیا دارد. بررسی مصرف سرانه در ایران نشان می‌دهد که حدود ۲۵ درصد مواد غذایی مردم ایران حاوی محصولات مشتق شده از گندم است (Alipour et al. 2017). از طرف دیگر بر اساس پیش‌بینی‌ها مشخص شده که جمعیت دنیا تا سال ۲۰۲۵ بالغ بر ۸ میلیارد نفر خواهد شد. از این رو، همگام با افزایش جمعیت، میزان تولید این محصول هم از طریق افزایش سطح کشت و هم از طریق افزایش در واحد سطح، باید افزایش یابد (Ghasemi et al. 2013; Alipour et al. 2017; Cheli et al. 2021). در حدود ۶۶ درصد از اراضی تحت کشت گندم ایران در مناطق معتدل سرد واقع شده است. به همین دلیل وقوع سرما زودرس پاییزه، سرما شدید زمستان و سرما دیررس بهاره سالانه خسارت‌های زیادی بر میزان عملکرد گندم در ایران وارد می‌کند (Mahfoofi et al. 2019).

دمای پایین به بسیاری از گونه‌های گیاهی به‌ویژه آن‌هایی که با مناطق معتدل سازگار شده‌اند از جمله غلات زمستانه، آسیب جدی می‌رساند (Alcázar et al. 2011). گیاهان تحت تنش دمای پایین دچار مجموعه‌ای از تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌شوند که ممکن است تأثیرات نامطلوبی را بر رشد و تولید آن‌ها به جای گذارد. یکی از مهم‌ترین تغییرات بیوشیمیایی تحت تنش دمای پایین، تجمع گونه‌های اکسیژن فعال ( $ROS^1$ ) از جمله پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) است (Golizadeh and Kumleh 2019).  $ROS$ ها شکل‌های فعال اکسیژن هستند که در غلظت‌های بالا می‌توانند منجر به آسیب‌های جدی به اجزای کلیدی سلول از جمله متابولیت‌های اولیه (پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک) شوند (Hosseini et al. 2016; Hosseini and saidi 2019; Hosseini et al. 2021).

<sup>1</sup> Reactive Oxygen Species

جهت سازگاری با تنش دمای پایین، غلات زمستانه از طریق دو سازوکار تنظیم‌شونده توسط دمای پایین شامل پاسخ بهاره‌سازی و عادت‌دهی به دمای پایین، قادر به توسعه تحمل به یخ‌زدگی (زیر صفر درجه) هستند (Hosseini et al. 2016; Hosseini et al. 2021). پاسخ بهاره‌سازی به‌عنوان یک ویژگی سازگاری بحرانی با تنظیم زمان انتقال از مرحله رویشی به مرحله زایشی از آسیب غلات بر اثر سرمای زمستان جلوگیری می‌کند (Mahfoofi et al. 2014; Waalen et al. 2001). اگر گیاه در پاسخ به تنش دمای پایین بتواند مرحله انتقال از مرحله رویشی به مرحله زایشی را به درستی مدیریت کند، ظرفیت عادت‌دهی به دمای پایین افزایش یافته و میزان عملکرد مناسب‌تری حاصل می‌شود (Feng et al. 2019; Shourbalal et al. 2016). ژن *TaVRT-1* که در مجاورت منطقه *Vrn-1* بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۵ (هر سه ژنوم A، B و C) قرار دارد، یکی از مهم‌ترین ژن‌هایی است که انتقال از مرحله رویشی به زایشی را در گندم کنترل می‌کند. سطح بیان ژن *TaVRT-1* با نیاز بهاره‌سازی، زمان انتقال از مرحله رویشی به زایشی و تحمل به انجماد مرتبط است (Danyluk et al. 2003). پاسخ بهاره‌سازی و زمان عادت‌دهی به دمای پایین تحت کنترل دقیق ژنتیک هستند. عادت‌دهی به دمای پایین از نظر ژنتیکی پیچیده بوده و با به راه انداختن برنامه‌های تنظیمی بسیار پیچیده منجر به تنظیم فاکتورهای رونویسی، تنظیم مجدد بیان ژن‌های مرتبط با تنش و سازمان‌دهی مجدد گسترده رونوشت می‌شود (Wu et al. 2016; Gao et al. 2020). این تغییرات نهایتاً منجر به فعال شدن سامانه‌های پیچیده دفاعی و ایجاد یک تعادل جدید در پاسخ به تنش دمای پایین می‌شود (Amini et al. 2021). فرایند عادت‌دهی به دمای پایین منجر به القای پاسخ‌های دفاعی سلول و پاکسازی  $ROS$ ها از طریق آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز ( $SOD^2$ )، کاتالاز ( $CAT^3$ )، گایاکول پراکسیداز ( $GPX^4$ ) و پلی‌فنول اکسیداز ( $PPO^5$ ) می‌شود و متعاقباً آسیب اکسیداتیو القاء شده توسط تنش دمای پایین در

<sup>2</sup> Superoxide Dismutase

<sup>3</sup> Catalase

<sup>4</sup> Guaiacol Peroxidase

<sup>5</sup> Polyphenol Oxidase

رویشی، اشباع نیاز بهاره‌سازی و فاز زایشی بودند. همه این ژنوتیپ‌ها به مدت یک سال زراعی به صورت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج (با مشخصات جغرافیایی ۵۱ درجه طول شرقی و ۳۵ درجه عرض جغرافیایی و با ارتفاع ۱۳۲۱ متر از سطح دریا) ارزیابی شدند. ژنوتیپ‌ها در هر تکرار در یک پشته به طول ۳ متر در ۳ ردیف به فاصله ۲۰ سانتی‌متر از یکدیگر با میزان بذر مصرفی ۴۵۰ بذر در مترمربع کاشت شدند. نمونه برگ‌ی مربوط به این ژنوتیپ‌ها در سه دوره عادت‌دهی به LT به ترتیب ۳۰ آذر ماه (۶۰ روز پس از کشت)، ۳۰ دی ماه (۹۰ روز پس از کشت) و ۳۰ بهمن ماه (۱۲۰ روز پس از کشت) جمع‌آوری شد. همه این ژنوتیپ‌ها نیز در گلدان‌های حاوی خاک گلدانی (خاک کشاورزی) در اتاقک رشد (آروین تجهیز اسپادانا، ایران) به عنوان شرایط کنترل (به‌طور مداوم در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با نور ۲۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و ۱۶ ساعت روشنایی، با ۴۰ درصد رطوبت) کشت شدند و در مرحله چهارم برگ‌ی از آن‌ها نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها در نیتروژن مایع فریز و سپس در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای تعیین میزان تحمل به انجماد از روش پیشنهادی Mahfoofi et al. (2001) با تعیین  $LT_{50}$  (دمای انجمادی که در آن ۵۰ درصد از بوته‌ها از بین می‌روند) استفاده شد. در هر دوره عادت‌دهی به دمای پایین از هر تکرار و هر ژنوتیپ، تعداد ۵ بوته کامل از مزرعه برداشت شده به طوری که طوقه آسیب نیند و پس از انتقال به آزمایشگاه، ریشه و برگ‌های آن‌ها جدا شده و طوقه‌ها داخل ظروف آلومینیومی حاوی شن مرطوب قرار داده شدند. سپس قوطی‌ها در داخل فریزر برنامه‌ریزی شده و مجهز به رایانه قرار داده شدند. فریزر را طوری تنظیم کردیم که در طول ۲۴ ساعت دمای آن در حدود دمای ۳- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت ثابت مانده و پس از آن طی هر ساعت دمای آن ۲ درجه سانتی‌گراد کاهش پیدا کند. روند کاهش دما تا رسیدن دمای فریزر به ۲۵- درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. در فواصل دماهای ذکر شده ۵ طوقه از هر تکرار و ژنوتیپ از فریزر خارج و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت ذوب تدریجی بافت یخ‌زده نگهداری شدند. سپس طوقه‌ها در شرایط گلخانه کاشت

گیاهان را کاهش می‌دهد (Kazemi-Shahandashti et al. 2014; Caverzan et al. 2016).

گرم شدن اخیر کره زمین از طریق تسریع فرایند رشد و نمو گندم و ایجاد اختلال در هماهنگ‌سازی فصلی تولید مثل منجر به افزایش مداوم فراوانی، شدت و مدت زمان تنش دمای پایین شده است (Liu et al. 2019). بنابراین، تغییرات آب و هوا و نوسانات دمایی سال‌های اخیر علاوه بر ایجاد تنش دمای پایین در نواحی که کشت گندم انجام می‌شود، امکان افزایش سطح زیرکشت در مناطق کوهستانی با ارتفاع زیاد در مناطق معتدله در ایران را با چالش‌های زیادی روبرو کرده است. از این رو، درک ارتباط بین فرایندهای مؤثر در زمستان‌گذرانی موفقیت‌آمیز، گاهی در جهت تضمین پایداری عملکرد گندم و افزایش سطح زیر کشت گندم در این مناطق از ایران است. از این رو، در مطالعه حاضر رقم گندم بهاره پیشتاز، رقم زمستانه نورستار، لاین ایزوژن نزدیک<sup>۱</sup> (NIL) و لاین‌های نوترکیب خالص<sup>۲</sup> (RIL) حاصل از تلاقی آن‌ها که نیاز بهاره‌سازی دارند و میزان تحمل به سرمای متفاوتی داشتند، جهت مطالعه ارتباط بین تنظیمات نموی با میزان تحمل به دمای پایین، تجمع  $H_2O_2$  و میزان بیان نسبی ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه، دو رقم گندم نان شامل رقم نورستار (رقم زمستانه کانادایی با نیاز بهاره‌سازی طولانی مدت و بسیار مقاوم به دمای پایین) و پیشتاز (رقم بهاره ایرانی بدون نیاز به بهاره‌سازی و حساس به دمای پایین) به‌عنوان والدین، دو لاین نوترکیب خالص نسل هفت حاصل از تلاقی ساده بین دو والدین و یک لاین تقریباً ایزوژن حاصل از چهار بار تلاقی برگشتی نسل F1 با والد پیشتاز و چهار بار خودگشتی مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه اخیر ما عادت رشدی و میزان نیاز بهاره‌سازی ژنوتیپ‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر و مرحله رشدی آن‌ها را در طی دوره‌های عادت‌دهی به دمای پایین تعیین کردیم. نتایج مطالعه اخیر نشان داد که در آذر، دی و بهمن ماه گیاهان به ترتیب در فاز رشد

<sup>1</sup> Near isogenic line

<sup>2</sup> Recombinant inbred lines

روش RT-PCR<sup>۲</sup> و الکتروفورز روی ژل دو درصد آگارز استفاده شد. نهایتاً واکنش *qRT-PCR* با استفاده از آغازگرهای ژن‌های *SOD*، *CAT*، *GPX*، *PPO*، *SOD* و *TaVRT-1* و ژن خانه‌دار اکتین انجام شد (جدول ۱). بیان نسبی ژن‌های مذکور با استفاده از روش 2<sup>-ΔΔCT</sup> محاسبه شد (Kazemi-Shahandashti et al. 2013; Khaledian et al. 2015). تجزیه و تحلیل آماری آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS22 و بر اساس ANOVA تجزیه شده و مقایسه میانگین با آزمون دانکن انجام شد. نمودارها در نرم‌افزار Excel رسم شدند.

### نتایج و بحث

در جدول ۲ نتایج حاصل از تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های *TaVRT1*، *SOD*، *APX*، *CAT*، *GPX* و *PPO* آورده شده است. در این مطالعه نتایج نشان داد که تحت شرایط کنترل و در طول دوره‌های مختلف عادت‌دهی به دمای پایین مابین ژنوتیپ‌ها، بین دوره‌های مختلف عادت‌دهی به دمای پایین و همچنین اثر متقابل آن‌ها در سطح یک درصد اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد. نیاز بهاره‌سازی در مناطق معتدل یک سازوکار ضروری است که با جلوگیری از انتقال زود هنگام به مرحله زایشی در آغاز بهار و گلدهی قبل از زمستان، هماهنگ‌سازی فصلی تولید مثل را امکان‌پذیر کرده و از آسیب غلات در اثر تنش دمای پایین جلوگیری می‌کند (Waalén et al. 2014).

شدند و بعد از سه هفته نگهداری در شرایط گلخانه، بوته‌های زنده و بوته‌های از بین رفته در هر ژنوتیپ، شمارش و  $LT_{50}$  (دمایی که در آن ۵۰ درصد بوته‌ها از بین می‌روند) تعیین شد. برای تعیین محتوی  $H_2O_2$  از روش Loreto and Velikove (2001) استفاده شد. بدین منظور ۰/۳۵ گرم بافت گیاهی در ازت مایع به‌خوبی سائیده شده و در حمام آب یخ با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد مخلوط شد. مخلوط هموزن شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰× g به مدت ۱۵ دقیقه سانتی‌فوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰ میلی‌مولار افزوده شد. سپس یک میلی‌لیتر پتاسیم یدید یک مولار اضافه شد و میزان جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. محتوی  $H_2O_2$  بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر گزارش شد.

استخراج RNA، توالی آغازگرهای استفاده شده، ساخت cDNA و نسخه برداری کمی معکوس-واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۱</sup> (*qRT-PCR*) بر اساس تحقیقات پیشین انجام شد (Naderi et al. 2020). استخراج RNA از ۸۰ میلی‌گرم نمونه برگ با استفاده از روش بایوزول انجام شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. همچنین جهت تعیین کیفیت RNA مقدار ۵ میکروگرم از هر نمونه روی ژل یک درصد آگارز، الکتروفورز شد. تیمار آنزیمی DNase بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمتاز اعمال شد. همچنین برای ساخت cDNA، از روش پیشنهادی شرکت فرمتاز استفاده شد. برای تایید سنتز cDNA از

<sup>۱</sup> Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

<sup>۲</sup> Real-Time Reverse Transcription PCR

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در *qRT-PCR* ژن‌های *SOD*، *CAT*، *GPX*، *PPO* و *TaVRT-1* و اکتین.

| Accession number | Gene           | Protein                              | Primer pair sequences (5'-3')                                     |
|------------------|----------------|--------------------------------------|---|
| JQ269674.1       | <i>SOD</i>     | Cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase | F:CGTCACTGGACTCAAGGAAGG<br>R:AGCAGGGTTGAAGTGTGGTCC                |
| D86327.1         | <i>CAT</i>     | Catalase                             | F:CTATGAGGAGCGGTTCGACTTC<br>R:CGTCCGAGTAGTACACCCC                 |
| EU595567         | <i>GPX</i>     | Class III peroxidase                 | F:GCGGTGACACCAACATCAAC<br>R:GTCCAGGTTCTCCAGGTTGG                  |
| AB254805.1       | <i>PPO</i>     | Polyphenol oxidase                   | F:CCGAGGAGATGAGGAAGGGA<br>R:GCGAGAGCGGACCACATTAG                  |
| AY280870         | <i>TaVRT-1</i> | <i>T. aestivum</i> MADS-box protein  | F:AAGGATCCGTTCTCCACCGAGTCATGTAT<br>R:GTGAATTCCTTCAGCCGTTGATGTGGCT |
| AB181991.1       | <i>Actin</i>   | Actin                                | F:GGGGAAAATATGGCATCACACG<br>R:GATTGCGACATACATTGTGGG               |

جدول ۲- تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن‌های *PPO* و *GPX*, *CAT*, *APX*, *SOD*, *TaVRT1* در والد نورستار، پیشتاز، لاین ایزوژن نزدیک و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۵ و ۴۰۱۱) تحت شرایط کنترل و در طول دوره‌های عادت‌دهی در مزرعه (آذر ماه (۶۰ روز پس از کشت)، دی ماه (۹۰ روز پس از کشت) و بهمن ماه (۱۲۰ روز پس از کشت)).

| میانگین مربعات |            |            |            |            |               | درجه آزادی | منبع تغییرات       |
|----------------|------------|------------|------------|------------|---------------|------------|--------------------|
| <i>PPO</i>     | <i>GPX</i> | <i>CAT</i> | <i>APX</i> | <i>SOD</i> | <i>TaVRT1</i> |            |                    |
| ۰/۰۰۳۷         | ۰/۰۱۸۷     | ۰/۰۰۶۳     | ۰/۰۱۴۷     | ۰/۰۴۸۵     | ۰/۰۱۵۷        | ۲          | تکرار              |
| ۰/۲۸۶۸**       | ۰/۲۵۰۶**   | ۰/۵۱۲۹**   | ۱/۷۲۷۴**   | ۰/۸۳۲۵**   | ۴/۰۳۹۵**      | ۴          | ژنوتیپ             |
| ۱/۲۰۷۲**       | ۰/۱۴۷۸**   | ۰/۰۸۸۵**   | ۲/۱۴۳۵**   | ۱/۰۶۳۰**   | ۵/۹۳۷۰**      | ۳          | تیمار              |
| ۰/۲۱۴۴**       | ۰/۰۴۴۴**   | ۰/۰۸۷۳**   | ۰/۲۱۴۳**   | ۰/۱۳۶۷**   | ۰/۴۷۹۲**      | ۱۲         | ژنوتیپ × تیمار     |
| ۰/۰۱۴۳         | ۰/۰۰۷۵     | ۰/۰۰۴۳     | ۰/۰۱۲۵     | ۰/۰۱۳۲     | ۰/۰۲۴۵        | ۳۸         | خطا                |
| ۹/۹            | ۱۲/۳۶      | ۱۳/۲۸      | ۱۱/۳۲      | ۱۱/۴۶      | ۱۲/۷۸         |            | ضریب تغییرات (%CV) |

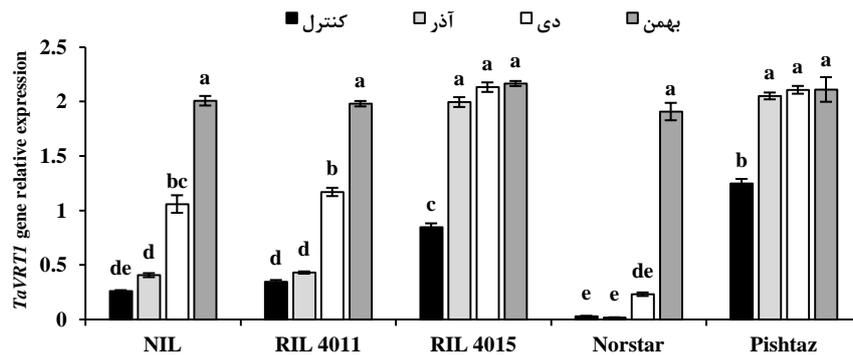
بهمن ماه همچنان در سطح بالایی قرار داشت. افزایش زود هنگام، مداوم و قابل توجه بیان نسبی ژن *TaVRT-1* در ژنوتیپ‌های بهاره (والد پیشتاز و RIL 4015) تایید کننده عادت رشدی این ژنوتیپ‌ها و همچنین تاثیر قابل توجه این ژن در ورود زود هنگام آن‌ها به مرحله زایشی است. بالا بودن میزان بیان نسبی ژن *TaVRT-1* در ژنوتیپ‌های بینابینی (NIL و RIL 4011) نسبت به والد زمستانه نورستار می‌تواند توجیه کننده عادت رشدی بینابینی آن‌ها باشد. نتایج تحقیق حاضر به وضوح نشان داد که ژن *TaVRT-1* به‌طور پیوسته در ژنوتیپ‌های بهاره بیان می‌شود ولی در ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی، بیان نسبی آن تنها زمانی که نیاز بهاره‌سازی گیاه تحت دوره‌های عادت‌دهی به دمای پایین تکمیل شود، القا می‌شود.

نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها، مراحل نمونه‌برداری و اثر متقابل آن‌ها برای  $LT_{50}$  و محتوی  $H_2O_2$  بود ( $P < 0.01$ ). در این مطالعه نتایج حاصل از ارزیابی روند تحمل به دمای پایین نشان داد که تحت شرایط مزرعه در آذر ماه والد نورستار با تیپ رشد زمستانه،  $LT_{50}$  بالاتری ( $-12^\circ C$ ) نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها داشت (شکل ۲).

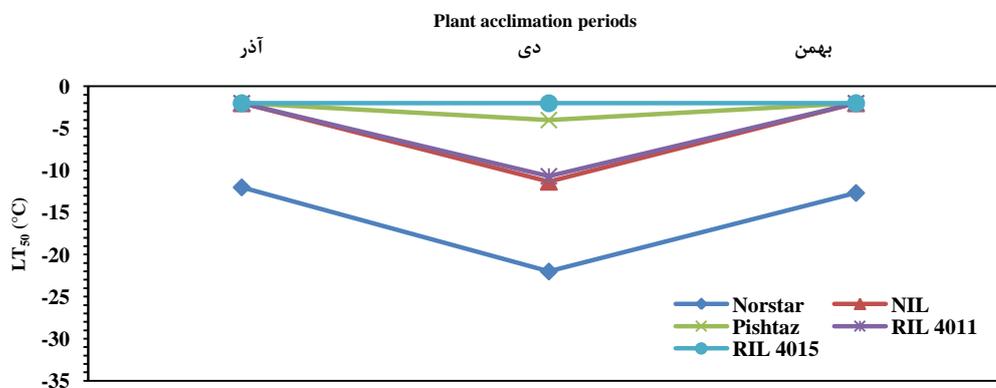
با ادامه زمستان در دی ماه (مصادف با محدوده اشباع نیاز بهاره‌سازی برای ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی که با شمارش تعداد برگ نهایی مشخص شد) والد زمستانه نورستار ( $LT_{50} = -22^\circ C$ ) و ژنوتیپ‌های بینابینی شامل NIL ( $LT_{50} = -11/33^\circ C$ ) و RIL 4011 ( $LT_{50} = -10/67^\circ C$ ) به بیشترین میزان تحمل دمای پایین رسیدند.

ژن‌های بهاره‌سازی به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های نموی<sup>۱</sup> نقش مهمی در تعیین عادت رشدی و میزان نیاز بهاره‌سازی گیاهان ایفا می‌کنند (Limin and fowler 2006). *TaVRT-1* یکی از مهم‌ترین ژن‌هایی است که زمان انتقال از مرحله رویشی به مرحله زایشی و پاسخ بهاره‌سازی را در گندم تنظیم می‌کند. در این مطالعه میزان بیان نسبی ژن *TaVRT-1* در والد زمستانه نورستار در شرایط کنترل، آذر و دی ماه پایین بود (شکل ۱). پس از تکمیل نیاز بهاره‌سازی در دی ماه با ورود این ژنوتیپ به مرحله زایشی در بهمن ماه، میزان بیان نسبی این ژن به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. تغییرات بیان نسبی این ژن در RIL 4011 و NIL مشابه بود. در این دو لاین با شروع دوره‌های عادت‌دهی به دمای پایین میزان بیان نسبی ژن *TaVRT-1* به تدریج افزایش یافت و با ورود آن‌ها به مرحله زایشی در بهمن ماه به بیشترین میزان رسید. Danyluk et al. (2003) در مطالعه خود نشان دادند که بالا بودن بیان نسبی ژن *TaVRT-1* بیانگر ورود ژنوتیپ‌ها به مرحله زایشی و زمان شکل‌گیری برجستگی دوگانه است. بر اساس نتایج این مطالعه پایین بودن میزان بیان نسبی ژن *TaVRT-1* در ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی با طولانی کردن مرحله رویشی از ورود زود هنگام آن‌ها به مرحله زایشی جلوگیری کرده است. افزایش زود هنگام بیان نسبی این ژن تحت دوره‌های عادت‌دهی به دمای پایین در ژنوتیپ‌های بهاره بیانگر پایین بودن یا عدم وجود نیاز بهاره‌سازی است. با قرار گرفتن ژنوتیپ‌های بهاره تحت شرایط عادت‌دهی به دمای پایین بیان نسبی ژن *TaVRT-1* در آذر ماه نسبت به شرایط کنترل به‌طور قابل توجهی افزایش یافت و تا

<sup>۱</sup> Developmental regulators



شکل ۱- بیان نسبی ژن *TaVRT-1* در والد نورستار، پیشتاز، لاین ایزوژن نزدیک و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵) تحت شرایط کنترل و در طول دوره‌های عادت‌دهی در مزرعه (آذر ماه ۶۰ روز پس از کشت)، دی ماه ۹۰ روز پس از کشت) و بهمن ماه ۱۲۰ روز پس از کشت)). ستون‌های دارای حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.



شکل ۲- LT50 در والد نورستار، پیشتاز لاین ایزوژن نزدیک و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵) در طول دوره‌های عادت‌دهی در مزرعه (آذر ماه ۶۰ روز پس از کشت)، دی ماه ۹۰ روز پس از کشت) و بهمن ماه ۱۲۰ روز پس از کشت)).

بودن میزان بیان نسبی این ژن در ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی از ورود زود هنگام آن‌ها به مرحله زایشی و کاهش تحمل دمای پایین جلوگیری کرده است.

بالا بودن میزان تحمل دمای پایین در ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی در دی ماه نشان می‌دهد که این ژنوتیپ‌ها در شرایط مزرعه و پیش از تهدید تنش یخ‌زدگی شروع به عادت‌دهی به دمای پایین کرده و با طولانی کردن مدت زمان مرحله رویشی امکان بقای زمستانه خود را فراهم کردند (Hosseini et al. 2021). نتایجی که با ارزیابی سطح بیان نسبی ژن *TaVRT-1* همخوانی دارد. (Janmohammadi et al. (2018). در مطالعه خود نشان دادند که با تکمیل نیاز بهاره‌سازی در غلات زمستانه و همزمان با شروع مرحله زایشی، میزان تحمل به دمای پایین به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. به همین ترتیب، در این مطالعه نتایج حاصل از

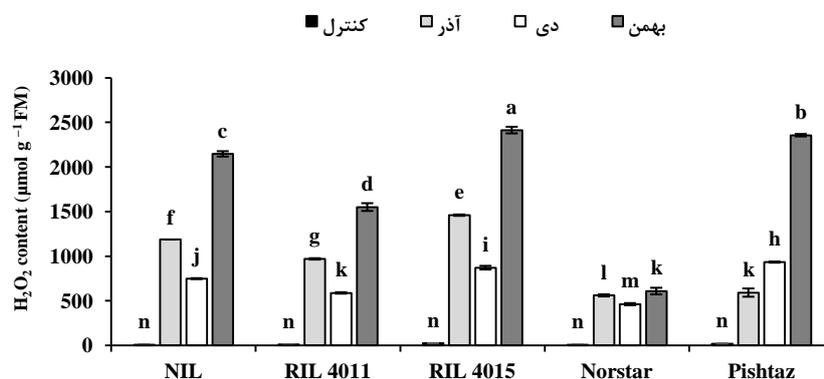
پس از آن، میزان تحمل دمای پایین در بهمن ماه (مصادف با حضور ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی در مرحله زایشی) در این ژنوتیپ‌ها کاهش یافت. ژنوتیپ‌های با تیپ رشد بهاره (والد پیشتاز و RIL 4015) در آذر ماه که دارای میزان بیان نسبی بالای ژن *TaVRT-1* بودند در تمامی مراحل نمونه‌برداری تحمل دمای پایین بسیار محدودی داشتند. نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که میزان بیان نسبی ژن *TaVRT-1* به‌طور منفی با سطح بیان ژن‌های *COR* و دیگر ژن‌های مرتبط با تحمل دمای پایین و متعاقباً سطح تحمل دمای پایین در ارتباط است (Danyluk et al. 2003). از این رو، در این مطالعه به‌نظر می‌رسد که بالا بودن و افزایش زود هنگام بیان نسبی ژن *TaVRT-1* در ژنوتیپ‌های بهاره منجر به ورود زود هنگام به مرحله زایشی و متعاقباً کاهش بیان ژن‌های مرتبط با تحمل دمای پایین شده باشد. بالعکس پایین

پایین، یک نقش دوگانه برای  $H_2O_2$  می‌توان پیشنهاد کرد (Hosseini et al. 2021).  $H_2O_2$  می‌تواند به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان، پاسخ به تنش دمای پایین را میانجی‌گری کند و یا به‌عنوان یک اکسیدان قوی منجر به آسیب اکسیداتیو شود (Shi et al. 2010; Hosseini et al. 2021). تولید  $H_2O_2$  در سطح پایین در ژنوتیپ‌های متحمل از جمله والد نورستار، NIL و RIL 4011 ممکن است به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان عمل کرده و نمو گیاه و سازگاری به تنش دمای پایین را تنظیم کرده باشد. اما افزایش تجمع آن در بهمن ماه احتمالاً منجر به آسیب سلولی در ژنوتیپ‌ها شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که هم‌زمان با افزایش محتوی  $H_2O_2$  به بیشترین میزان در بهمن ماه تحمل ژنوتیپ‌ها به دمای پایین به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. این نتایج با پژوهش‌های انجام شده توسط Hosseini et al. (2016) و Golizadeh and Kumleh (2019) که بیان کردند تجمع  $H_2O_2$  منجر به از دست رفتن تحمل دمای پایین می‌شود همخوانی دارد. ویژگی منحصر به فرد برخی از ژنوتیپ‌ها از جمله والد زمستانه نورستار در تجمع  $H_2O_2$  حتی در بهمن ماه در مقایسه با بقیه ژنوتیپ‌ها می‌تواند به‌عنوان شاخص انتخاب مورد استفاده قرار گیرد. تنظیم دقیق میزان ROSها در طول فرایند عادت‌دهی به دمای پایین جهت جلوگیری از سمیت آن‌ها و همچنین اطمینان از میزان وجود آن‌ها برای ایفای نقش پیام‌رسانی ضروری است.

ارزیابی  $LT_{50}$  بیانگر کاهش تحمل به دمای پایین هم‌زمان با شروع مرحله زایشی در بهمن ماه در همه ژنوتیپ‌های نیازمند نیاز به‌اره‌سازی بود. کاهش تحمل دمای پایین در این ژنوتیپ‌ها در بهمن ماه تاییدکننده نظریه تنظیم نموی<sup>۱</sup> بود. بر اساس این نظریه پس از تکمیل نیاز به‌اره‌سازی کاهش بیان ژن‌های ساختاری و ژن‌ها مرتبط با تحمل سرما منجر به کاهش میزان تحمل دمای پایین می‌شود (Mahfoozi et al. 2006).

پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله تنش دمای پایین اغلب با تجمع ROS در ارتباط است. در بین چندین ROS،  $H_2O_2$  به‌عنوان پایدارترین مولکول با بسیاری از سازوکارهای مربوط به دفاع در ارتباط است (Arfan et al. 2019). به‌طور کلی در این مطالعه با شروع دوره‌های عادت‌دهی به دمای پایین محتوی  $H_2O_2$  در تمامی ژنوتیپ‌ها در آذر ماه نسبت به شرایط کنترل افزایش یافت. با ورود ژنوتیپ‌ها به مرحله اشباع نیاز به‌اره‌سازی در دی ماه محتوی  $H_2O_2$  کاهش یافته و پس از آن در بهمن ماه هم‌زمان با از دست رفتن تحمل دمای پایین محتوی  $H_2O_2$  به بیشترین میزان خود رسید. به‌طور کلی محتوی  $H_2O_2$  در ژنوتیپ‌های به‌اره (والد پیشتاز و RIL 4015) بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود. در طول دوره‌های عادت‌دهی به دمای پایین کمترین و بیشترین میزان تجمع  $H_2O_2$  به‌ترتیب متعلق به رقم نورستار در دی ماه و RIL 4015 در بهمن ماه بود. در شروع فرایند عادت‌دهی به دمای

#### <sup>۱</sup> Developmental Regulation

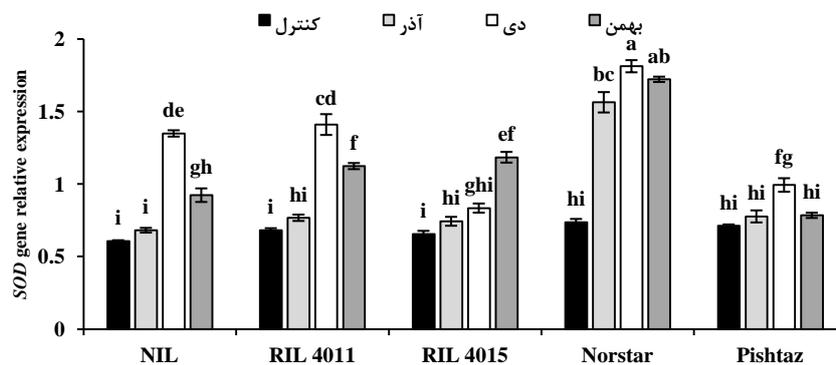


شکل ۳- میزان  $H_2O_2$  در والد نورستار، پیشتاز، لاین ایزوژن نزدیک و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵) تحت شرایط کنترل و در طول دوره‌های عادت‌دهی در مزرعه (آذر ماه ۶۰ روز پس از کشت)، دی ماه (۹۰ روز پس از کشت) و بهمن ماه (۱۲۰ روز پس از کشت)). ستون‌های دارای حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

نسبت به ژنوتیپ‌های بهاره، به‌طور مؤثرتری ROSها را پاکسازی می‌کنند. ژن *TaVRT-1* یک فاکتور رونویسی MADS-box که تاثیر قابل توجهی در انتقال گیاه از مرحله رویشی به مرحله زایشی دارد. به‌دلیل اینکه بیش بیان این ژن باعث کاهش بیان ژن‌های مرتبط با تحمل دمای پایین می‌شود، از این رو می‌توان گفت که کاهش بیان نسبی ژن *SOD* در بهمن ماه نسبت به دی ماه ممکن است به‌دلیل افزایش بیان نسبی ژن *TaVRT-1* بوده باشد. تحت شرایط عادت‌دهی به دمای پایین، *CAT* یکی از آنزیم‌های ضروری برای تجزیه  $H_2O_2$  در بافت‌های گیاهی است. این آنزیم  $H_2O_2$  را در غلظت‌های بالا بدون نیاز به انرژی تجزیه می‌کند (Fan et al. 2014; Chen et al. 2021). در این مطالعه در والد زمستانه نورستار بیان نسبی ژن *CAT* طی دوره‌های عادت‌دهی به دمای پایین تا بهمن ماه افزایش یافت. در مقابل در والد بهاره پیشتاز و RIL 4015 بیان نسبی این ژن تا بهمن ماه کاهش یافت.

بیشترین و کم‌ترین میزان بیان نسبی ژن *CAT* به‌ترتیب مربوط به والد نورستار و پیشتاز در بهمن ماه بود. روند تغییرات بیان نسبی ژن *CAT* در NIL و RIL 4011 مشابه بود. در این ژنوتیپ‌ها، بیان نسبی ژن *CAT* تحت شرایط مزرعه به تدریج افزایش یافت و در دی ماه به بیشترین مقدار خود رسید و پس از آن با ورود ژنوتیپ‌ها به مرحله زایشی در بهمن ماه کاهش یافت (شکل ۵).

برای این منظور سیستم آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در کنار هم جهت تعدیل غلظت میزان ROS فعالیت می‌کنند (Van Breusegem et al. 2006). *SOD* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تنها آنزیمی است که قادر به پاکسازی  $O_2^{2-}$  می‌باشد. این آنزیم اولین خط دفاعی بوده و نقش کلیدی در تبدیل  $O_2^{2-}$  بسیار واکنش‌پذیر به  $O_2$  و  $H_2O_2$  دارد (Wani et al. 2018; Liang et al. 2018). در این مطالعه تحت شرایط مزرعه و با شروع دوره‌های عادت‌دهی به دمای پایین، بیان نسبی ژن *SOD* در تمامی ژنوتیپ‌ها (به‌جز RIL 4015) به‌ویژه در والد نورستار و ژنوتیپ‌های بینابینی (NIL و RIL 4011) به تدریج افزایش یافت و در دی ماه به بیشترین میزان خود رسید (شکل ۴). بالاترین میزان بیان نسبی ژن *SOD* در دی ماه که گیاهان بیشترین تحمل به دمای پایین را از خود نشان دادند به‌ترتیب متعلق به والد نورستار و RIL 4011 با افزایش ۲/۴۶ و ۲/۰۷ برابری در مقایسه با شرایط کنترل بود. این نتایج در راستای یافته‌های (Fan et al. 2014) است که نشان داند بیان نسبی ژن *SOD* در طول فرایند عادت‌دهی به دمای پایین با میزان تحمل دمای پایین در ارتباط است. در بهمن ماه میزان بیان نسبی این ژن کاهش یافت. با این وجود، میزان بیان نسبی ژن *SOD* در والد نورستار در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها همچنان در سطح بالایی قرار داشت. بالا بودن بیان نسبی ژن *SOD* در دی ماه، که گیاهان بیشترین میزان تحمل دمای پایین را داشتند، نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی

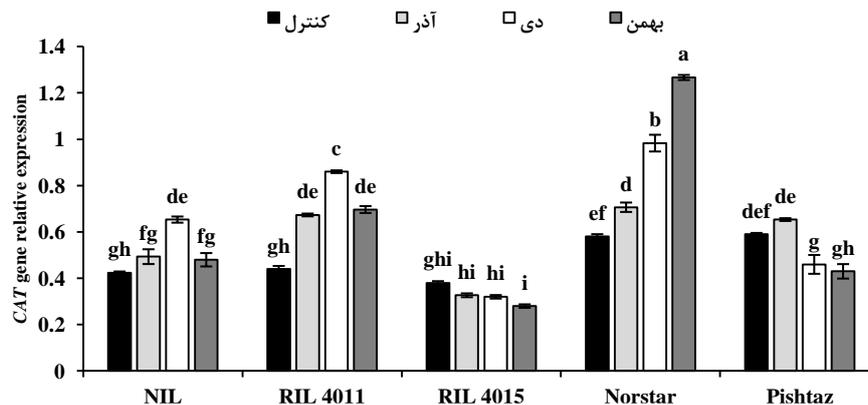


شکل ۴- بیان نسبی ژن *SOD* در والد نورستار، پیشتاز، لاین ایزوژن نزدیک و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵) تحت شرایط کنترل و در طول دوره‌های عادت‌دهی در مزرعه (آذر ماه ۶۰ روز پس از کشت)، دی ماه (۹۰ روز پس از کشت) و بهمن ماه (۱۲۰ روز پس از کشت)). ستون‌های دارای حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

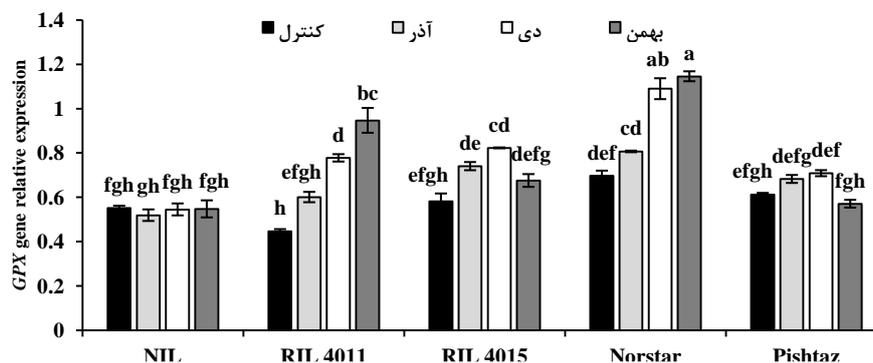
اصلاح گندم قابل استفاده خواهد بود. ژن *GPX* گلیکوپروتئینی را کد می‌کند که در سیتوزول، دیواره سلولی و واکوئل قرار داشته و از اکسیداسیون ترکیبات فنلی مانند گایاکول برای سم‌زدایی و تجزیه  $H_2O_2$  القاء شده در شرایط تنش از جمله تنش دمایی پایین استفاده می‌کند (Morales et al. 2012). تحت شرایط مزرعه‌ای با قرار گرفتن ژنوتیپ‌ها تحت دوره‌های عادت‌دهی به دمایی پایین میزان بیان نسبی ژن *GPX* در والد زمستانه نورستار و RIL 4011 تا بهمن ماه افزایش یافت (شکل ۶).

میزان بیان نسبی ژن *GPX* و *CAT* در والد نورستار در بهمن ماه که گیاه وارد مرحله زایشی شد دارای روند افزایشی بود، در حالی که میزان بیان نسبی دیگر ژن‌ها با انتقال گیاه از مرحله رویشی به مرحله زایشی کاهش یافت.

نتایج حاصل از ارزیابی بیان نسبی ژن *CAT* در شرایط تنش، نشان دهنده افزایش معنی‌دار بیان نسبی آن در ارقام متحمل به تنش نسبت به ارقام حساس بود. میزان بیان نسبی این ژن در کلزا و گندم تحت شرایط تنش خشکی و سرما در ارقام متحمل نسبت به ارقام حساس به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (Baek and Skinner 2003). در همین راستا نتایج این مطالعه نیز نشان داد که در دی ماه که ژنوتیپ‌ها زمستانه و بینابینی از تحمل به دمایی پایین بیشتری برخوردار بودند، میزان بیان نسبی ژن *CAT* نیز نسبت به ارقام حساس (والد نورستار و RIL 4015) در سطح بالاتری قرار داشت. بر همین اساس و به دلیل افزایش بیان ژن *CAT* در ژنوتیپ‌های متحمل، مطالعه الگوی تغییرات این ژن به‌عنوان یک شاخص جهت انتخاب ارقام متحمل به دمایی پایین در برنامه



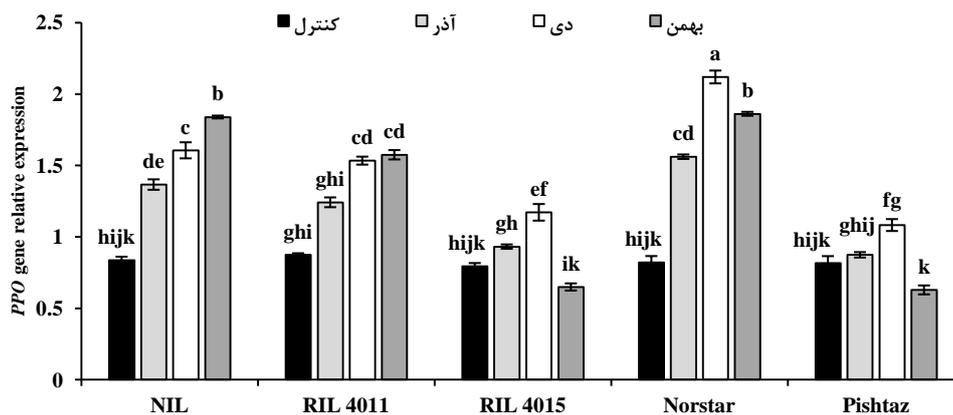
شکل ۵- بیان نسبی ژن *CAT* در والد نورستار، پیشتاز، لاین ایزوژن نزدیک و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵) تحت شرایط کنترل و در طول دوره‌های عادت‌دهی در مزرعه (آذر ماه ۶۰ روز پس از کشت)، دی ماه ۹۰ روز پس از کشت) و بهمن ماه ۱۲۰ روز پس از کشت)). ستون‌های دارای حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.



شکل ۶- بیان نسبی ژن *GPX* در والد نورستار، پیشتاز، لاین ایزوژن نزدیک و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵) تحت شرایط کنترل و در طول دوره‌های عادت‌دهی در مزرعه (آذر ماه ۶۰ روز پس از کشت)، دی ماه ۹۰ روز پس از کشت) و بهمن ماه ۱۲۰ روز پس از کشت)). ستون‌های دارای حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

عادت‌دهی به دمای پایین بیان نسبی ژن *PPO* در ژنوتیپ‌های بینابینی (NIL و RIL 4011) تا بهمن ماه افزایش یافت. در والد زمستانه نورستار و ژنوتیپ‌های بهاره (والد پیشتاز و RIL 4015) روند تغییرات بیان نسبی ژن *PPO* مشابه بود، به طوری که در دی ماه به بیشترین مقدار رسید و پس از آن با قرار گرفتن گیاهان در مرحله زایشی کاهش نشان داد. به طور کلی میزان بیان نسبی ژن *PPO* در ژنوتیپ‌های دارای نیاز بهاره‌سازی بیشتر از ژنوتیپ‌ها بهاره بود. بیشترین میزان بیان نسبی این ژن در دی ماه (بیشترین میزان تحمل به دمای پایین) به ترتیب متعلق به والد نورستار، NIL و RIL 4011 بود. افزایش فعالیت و بیان نسبی ژن رمزکننده آنزیم *PPO* در مطالعات مختلفی گزارش شده است (Hosseini et al. 2021; Naderi et al. 2020; 2016). اعتقاد بر این است که *PPO* به همراه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دیگر منجر به کاهش آسیب اکسیداتیو القا شده توسط تنش می‌شود. در مطالعه حاضر نیز، افزایش بیان نسبی ژن *PO* به همراه دیگر ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (به‌ویژه در دی ماه) نشان دهنده این واقعیت است که در شرایط تنش همه ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در قالب یک شبکه ژنی هم تنظیم شده تا از خسارت اکسیداتیو القا شده توسط ROSها جلوگیری می‌کنند (Milla et al. 2003).

از این رو، به نظر می‌رسد بالا بودن میزان نسبی بیان این دو ژن به پاک‌سازی ROSها و متعاقباً بالا بودن دمای پایین در این رقم (در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها که میزان تحمل دمای پایین آن‌ها در بهمن ماه کاهش یافت) در بهمن ماه (مصادف با حضور ژنوتیپ‌ها در فاز زایشی) کمک کرده باشد. الگو تغییرات بیان نسبی ژن *GPX* در ژنوتیپ‌های بهاره (والد پیشتاز و RIL 4015) مشابه بود. حداکثر میزان بیان نسبی این ژن در این دو ژنوتیپ در دی ماه به دست آمد. افزایش بیان ژن *GPX* تحت شرایط مختلف محیطی از جمله تنش خشکی (Naderi et al. 2020)، شوری (Alharby et al. 2016) و سرما (Wang et al. 2021) گزارش شده است. در همه این مطالعات محققین بر این باورند که افزایش بیان نسبی ژن *GPX* با خنثی کردن اثر ROSها از خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو القاء شده در شرایط تنش جلوگیری می‌کند. در همین راستا، با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که بالا بودن بیان نسبی ژن *GPX* به همراه ژن *CAT* در والد نورستار و RIL 4011 با ایجاد تعادل در غلظت ROS سلول به توسعه تحمل دمای پایین در دی ماه کمک کرده باشد. *PPO* آنزیمی است که تقریباً تمام وظایف پراکسیدازها از قبیل حفاظت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی را بر عهده دارند. این آنزیم توسط ژن‌های هسته‌ای رمز شده و به تیلاکوئید و کلروپلاست انتقال می‌یابد (Boeckx et al. 2015). در این مطالعه با قرار گرفتن گیاهان تحت شرایط



شکل ۷- بیان نسبی ژن *PPO* در والد نورستار، پیشتاز، لاین ایزوژن نزدیک و لاین‌های خالص نوترکیب (۴۰۱۱ و ۴۰۱۵) تحت شرایط کنترل و در طول دوره‌های عادت‌دهی در مزرعه (آذر ماه ۶۰ روز پس از کشت)، دی ماه ۹۰ روز پس از کشت) و بهمن ماه ۱۲۰ روز پس از کشت)). ستون‌های دارای حروف متفاوت بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که برخی از ژن‌های مرتبط با نیاز بهاره‌سازی از جمله ژن *TaVRT-1* از طریق تعیین عادت رشدی و نیاز بهاره‌سازی توسعه‌نموی را کنترل کرده و به‌واسطه تعیین طول مرحله رویشی میزان تحمل به دمای پایین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در واقع، در تحقیق حاضر بیان نسبی بالا و پیوسته ژن *TaVRT-1* منجر به ورود زود هنگام ژنوتیپ‌های بهاره به مرحله زایشی شده و میزان تحمل دمای پایین را محدود کرده است. عدم بیان زود هنگام ژن *TaVRT-1* در ژنوتیپ‌های زمستانه و بینابینی، امکان بیان کامل پتانسیل ژنتیکی تحمل به دمای پایین را فراهم کرد. پتانسیل ژنتیکی تحمل به دمای پایین که در تحقیق حاضر از طریق میزان تجمع  $H_2O_2$  و میزان بیان نسبی ژن‌های

*SOD*، *CAT*، *GPX* و *PPO* اندازه‌گیری شد، در ژنوتیپ‌های نیازمند بهاره‌سازی (والد نورستار، NIL و RIL 4011) منجر به افزایش تحمل دمای پایین شد. در این ژنوتیپ‌ها، عدم افزایش پیوسته بیان و زود هنگام ژن *TaVRT-1* با تأخیر زمان انتقال از مرحله رویشی به مرحله زایشی و به نوبه خود افزایش بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و متعاقباً کاهش تجمع  $H_2O_2$  میزان تحمل دمای پایین و بقای زمستانه آن‌ها را فراهم کرد. در طول عادت‌دهی به دمای پایین، تکمیل نیاز بهاره‌سازی و انتقال از مرحله رویشی به زایشی نقطه عطفی در بیان تحمل دمای پایین است، که پس از تکمیل نیاز بهاره‌سازی، باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان تحمل به دمای پایین و بیان ژن‌های مرتبط با تحمل دمای پایین می‌شود.

## منابع

- Alcázar R, Cuevas JC, Planas J, Zarza X, Bortolotti C, Carrasco P, Salinas J, Tiburcio AF, Altabella T (2011) Integration of polyamines in the cold acclimation response. *Plant Science* 180:31-8.
- Alharby HF, Metwali EM, Fuller MP, Aldhebani AY (2016) The alteration of mRNA expression of *SOD* and *GPX* genes, and proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under stress of NaCl and/or ZnO nanoparticles. *Saudi journal of biological sciences* 23:773-81.
- Alipour H, Bihamta MR, Mohammadi V, Peyghambari SA, Bai G, Zhang G (2017) Genotyping-by-sequencing (GBS) revealed molecular genetic diversity of Iranian wheat landraces and cultivars. *Frontiers in plant science* 8:1293.
- Amini S, Maali-Amiri R, Kazemi-Shahandashti SS, López-Gómez M, Sadeghzadeh B, Sobhani-Najafabadi A, Kariman K (2021) Effect of cold stress on polyamine metabolism and antioxidant responses in chickpea. *Journal of Plant Physiology* 258:153387.
- Baek KH, Skinner DZ (2003) Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science* 165:1221-7.
- Boeckx T, Winters AL, Webb KJ, Kingston-Smith AH (2015) Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization?. *Journal of experimental botany* 66:3571-9.
- Caverzan A, Casassola A, Brammer SP (2016) Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genetics and molecular biology* 39:1-6.
- Cheli F, Pinotti L, Novacco M, Ottoboni M, Tretola M, Dell'Orto V (2017) Mycotoxins in wheat and mitigation measures. *Wheat improvement, management and utilization Croatia* 24:227-51.
- Chen WL, Ko YT (2021) Exogenous hydrogen peroxide induces chilling Tolerance in Phalaenopsis seedlings through glutathione-related antioxidant system *Scientia Horticulturae* 289:110421.
- Danyluk J, Kane NA, Breton G, Limin AE, Fowler DB, Sarhan F (2003) *TaVRT-1*, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. *Plant Physiology* 132:1849-60.
- Fan J, Ren J, Zhu W, Amombo E, Fu J, Chen L (2014) Antioxidant responses and gene expression in bermudagrass under cold stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 139:699-705.
- Feng Y, Zhao Y, Wang K, Li YC, Wang X, Yin J (2016) Identification of vernalization responsive genes in the winter wheat cultivar Jing841 by transcriptome sequencing. *Journal of genetics* 95:957-64.
- Gao C, Sheteiwy MS, Han J, Dong Z, Pan R, Guan Y, Alhaj Hamoud Y, Hu J (2020) Polyamine biosynthetic pathways and their relation with the cold tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Signaling and Behavior* 15:1807722.
- Ghasemi S, Khoshgoftarmansh AH, Afyuni M, Hadadzadeh H (2013) The effectiveness of foliar applications of synthesized zinc-amino acid chelates in comparison with zinc sulfate to increase yield and grain nutritional quality of wheat. *European Journal of Agronomy* 45:68-74.
- Golizadeh F, Kumleh HH (2019) Physiological Responses and Expression Changes of Fatty Acid Metabolism-Related Genes in Wheat (*Triticum aestivum*) Under Cold Stress. *Plant Molecular Biology Reporter* 37:224-36.

- Hosseini M, Maali-Amiri R, Mahfoozi S, Fowler DB, Mohammadi R (2016) Developmental regulation of metabolites and low temperature tolerance in lines of crosses between spring and winter wheat. *Acta Physiologiae Plantarum* 38:4-87.
- Hosseini M, Saidi A (2019) Phylogenetic and structural study of plant Polyamine Oxidases. *Journal of Crop Biotechnology* 23:19-36 (In Persian).
- Hosseini M, Saidi A, Maali-Amiri R, Abbasi A, Khosravi-Nejad F (2021) Developmental regulation and metabolic changes of RILs of crosses between spring and winter wheat during low temperature acclimation. *Environmental and Experimental Botany* 182: 1-13.
- Hsu CH, Hsu YT (2019) Biochemical responses of rice roots to cold stress. *Botanical studies* 60:1-2.
- Janmohammadi M, Sabaghnia N, Mahfoozi S (2018) Frost tolerance and metabolite changes of rye (*Secale cereale*) during the cold hardening and overwintering. *Acta physiologiae plantarum* 40:1-1.
- Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R, Zeinali H, Khazaei M, Talei A, Ramezanpour SS (2014) Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. *Journal of plant physiology* 171:1106-16.
- Khaledian Y, Maali-Amiri R, Talei A (2015) Phenylpropanoid and antioxidant changes in chickpea plants during cold stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 62:772-8.
- Lei YA, Shah T, Cheng Y, Yan LÜ, ZHANG XK, ZOU XL (2019) Physiological and molecular responses to cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of Integrative Agriculture* 18:2742-52.
- Liang W, Ma X, Wan P, Liu L (2018) Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and biophysical research communications* 495:286-91.
- Limin AE, Fowler DB (2006) Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development. *Planta* 224:360-6.
- Liu L, Ji H, An J, Shi K, Ma J, Liu B, Tang L, Cao W, Zhu Y (2019) Response of biomass accumulation in wheat to low-temperature stress at jointing and booting stages. *Environmental and Experimental Botany* 157:46-57.
- Loreto F, Velikova V (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127:1781-7.
- Mahfoozi S, Limin AE, Ahakpaz F, Fowler DB (2006) Phenological development and expression of freezing resistance in spring and winter wheat under field conditions in north-west Iran. *Field crops research* 97:182-7.
- Mahfoozi S, Limin AE, Fowler DB (2001) Developmental regulation of low-temperature tolerance in winter wheat. *Annals of Botany* 87:751-7.
- Mahfoozi S, Majdi M, Janmohammadi M, Sasani S, Tavakol-Afshari R, Hosseini-Salekdeh G (2019) Developmental control of cold tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). *Wheat Research* 18:53-68.
- Milla MAR, Maurer A, Huete AR, Gustafson JP (2003) Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways *The Plant Journal* 36:602-615.
- Naderi S, Fakheri BA, Maali-Amiri R, Mahdinezhad N (2020) Tolerance responses in wheat landrace Bolani are related to enhanced metabolic adjustments under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 150:244-53.
- Shi SQ, Shi Z, Jiang ZP, Qi LW, Sun XM, Li CX, Liu JF, Xiao WF, Zhang SG (2010) Effects of exogenous GABA on gene expression of Caragana intermedia roots under NaCl stress: regulatory roles for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethylene production. *Plant cell and environment* 33: 149-162.
- Shourbalal SK, Soleymani A, Javanmard HR (2019) Shortening vernalization in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) using plant growth regulators and cold stratification. *Journal of Cleaner Production* 10:443-50.
- Van Breusegem F, Vranová E, Dat JF, Inzé D (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant science* 161:405-14.
- Waalén WM, Stavang JA, Olsen JE, Rognli OA (2014) The relationship between vernalization saturation and the maintenance of freezing tolerance in winter rapeseed. *Environmental and experimental botany* 106:164-73.
- Wang Y, Li Y, Wang J, Xiang Z, Xi P, Zhao D (2021) Physiological Changes and Differential Gene Expression of Tea Plants (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze var. *niaowangensis* QH Chen) Under Cold Stress. *DNA and Cell Biology* 21:6-21.
- Wani MA, Jan N, Qazi HA, Andrabi KI, John R (2018) Cold stress induces biochemical changes, fatty acid profile, antioxidant system and gene expression in *Capsella bursa pastoris* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 40:1-4.
- Wu ZG, Jiang W, Chen SL, Mantri N, Tao ZM, Jiang CX (2016) Insights from the cold transcriptome and metabolome of *Dendrobium officinale*: global reprogramming of metabolic and gene regulation networks during cold acclimation. *Frontiers in plant science* 7:1653.