

Comparison of Carbohydrates and *Delta12* and *delta15* Genes Expression in Tetra and Hexa Ploid Wheat under Cold Acclimation and Cold Stress

Leila NejadSadeghi^{1*}, Reza Maali-Amiri² and Hasan Zinali Khanegah³

- 1- ***Corresponding Author:**, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (l.nejadSadeghi95@gmail.com)
- 2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: 6 January, 2018

Accepted: 21 November, 2018

Abstract

Background and Objectives

Plant cells often increase cold tolerance by reprogramming their genes expression, which results in adjusted metabolic alternations, a process enhanced under cold acclimation (CA). In this study, responses of Carbohydrate alteration and *delta12* and *delta15* genes expression to cold stress (CS) phases were comparatively studied in three genotypes of bread and durum wheat differing in sensitivity. Two of them (Norstar, bread wheat and Gerdish, durum wheat) were tolerant to CS and the other one, SRN (durum wheat) was sensitive to CS.

Materials and Methods

Seeds of Norstar (hexaploid, bread wheat) and the two genotypes of Gerdish and SRN (tetraploid, durum wheat) provided by Dryland Agriculture Research Institute (DARI) of Iran were soaked in distilled water and then germinated in Petri dishes on filter paper for 72 h at 25 °C in a thermostat. Subsequently, the seedlings were planted in pots. The cooling regime adopted in our experiments allowed us to differentiate the examined genotypes in terms of their tolerance to CS. In our experiment, the plants were moved from control conditions immediately into the acclimated temperature of 4–5 °C for 14 days with the same photoperiod and irradiance. Leaf samples of genotypes were harvested and analyzed after 14 days under these conditions. After 14 days of CA, the plants were placed into a climatic chamber chilled preliminary to 0 °C. During further treatments, the temperature was lowered gradually to -5 °C (at the rate of 0.5 °C min⁻¹), and the plants were incubated at this temperature for 12 and 24 h. Total cellular RNA was extracted by Biozol method (Fersion Pooyesh, Tehran, Iran) using 80 mg FM leaflets. Applying fermentase reverse transcriptase enzyme instruction, the first strand of cDNA was produced after DNase treatment. Primers were designed using primer 3 to obtain 18–21 bp length. Carbohydrate extraction and determining the carbohydrate concentration were done by 80% ethanol and the AOAC method, respectively.

Results

These responses confirmed the existence of a wide range of genetic capacity in durum wheat to increase cold tolerance particularly in Gerdish. The findings of the present study showed that under experimental treatments, the carbohydrate content significantly changed so that cold stress



in acclimated plants increased sucrose, glucose and fructose contents particularly in Norstar and Gerdish as compared to the SRN plants. Increasing expression of *delta12* and *delta15* genes under cold stress in Norstar and SRN genotypes in comparison with SRN indicates the capacity of cells in increasing cold stress.

Discussion

The results may be a sign for associating other metabolite or enzyme activities to create relative tolerance against cold-induced oxidative stress. Also, these responses showed high genetic diversity for cold tolerance in durum. Eventually, assessing the dynamics of cell responses after CS without CA phases could profitably be a novel path in plant stress response investigations in the short run.

Keywords: Antioxidant, Carbohydrates, Cold acclimation, Defense System, Solidarity

مقایسه تغییرات قندها و بیان ژن‌های دساتورزا ۱۲ و ۱۵ در گندم نان و دورم تحت

تنش سرما

لیلا نژادصادقی^{۱*}، رضا معالی امیری^۲ و حسن زینالی خانقاه^۳

۱- *نویسنده مسئول: استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶

چکیده

گیاهان از طریق تغییر بیان ژن‌ها و تغییر متابولیت‌های سازگارکننده تحمل به سرما را افزایش می‌دهند. در گیاهان این فرایند توسط دوره سازگاری به سرما تسریع می‌شود. در این مطالعه، پاسخ‌های تغییرات کربوهیدرات‌ها و بیان ژن‌های دساتورزا ۱۲ و ۱۵ تحت تنش سرما به صورت مقایسه‌ای در سه ژنوتیپ گندم دوروم و نان متفاوت از نظر تحمل سرما مقایسه شدند، دو ژنوتیپ (نورستار گندم نان و گردیش گندم دوروم) متحمل به سرما و ژنوتیپ SRN (گندم دوروم) حساس به سرما از مؤسسه تحقیقات دیم کشور واقع در مراغه در سال ۱۳۸۸-۱۳۸۹ تهیه شد و در اتاقک‌های رشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج کشت و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پتانسیل ژنتیکی مناسبی برای افزایش تحمل سرما در دوروم به‌ویژه گردیش را نشان داد. میزان کربوهیدرات‌ها تحت اغلب تیمارهای آزمایش اختلاف معنی‌دار نشان داد به طوری که تنش سرما در گیاهان سازگار شده سبب افزایش میزان ساکارز، گلوکز و فروکتوز مخصوصاً در نورستار و گردیش شد. افزایش بیان نسبی ژن‌های دساتورزا ۱۲ و ۱۵ تلاش ویژه سلول برای محافظت در برابر تنش سرما در ژنوتیپ‌های نورستار و گردیش در مقایسه با ژنوتیپ SRN را نشان داد. نتایج نشان داد که فرایند سازگاری تحمل به تنش اکسیداتیو را القاء می‌کند. همچنین این پاسخ‌ها وجود ظرفیت ژنتیکی مناسبی در گندم دوروم را برای افزایش تحمل به سرما به خصوص در ژنوتیپ گردیش برای صفات اندازه‌گیری شده، تأیید کرد.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌اکسیدان، سرما سازگاری، سیستم دفاعی، کربوهیدرات‌ها، همبستگی

مقدمه

(2010). تحقیقات نشان می‌دهد که سرما سازگاری باعث

افزایش تحمل در برابر تنش سرما (Cold stress) و کاهش

آسیب سرما می‌شود (Mullineaux and Baker, 2010).

(Larkindale and Vierling, 2008; Lang et al., 2005;

Nazari et al., 2012).

قندها را می‌توان در زمره متابولیت‌های سازگاری

برشمرده که از صدمه سلول‌های گیاهی تحت تنش سرما

جلوگیری می‌کنند، به طوری که نقش آن‌ها در تحمل

تنش‌های غیرزیستی و تأثیر مستقیم آن‌ها بر ساختار دو

تحمل گیاهان در برابر سرما ثابت نیست و با قرار گرفتن

گیاهان در برابر سرما، به تدریج افزایش می‌یابد که این

فرآیند با عنوان سرما سازگاری (Cold Acclimation)

شناخته شده است. تحمل سرما در گیاهان، واکنشی است

که آن‌ها نسبت به کاهش دما از خود نشان می‌دهند. در اکثر

گیاهان سازگاری به سرما با تجمع قندهای محلول در

سیتوپلاسم به‌ویژه ساکاروز همراه است (Koster and

Lynch, 1992, cited in Rajabi and Said Pourdard,

است. بنابراین مطالعه پاسخ‌های گندم دوروم در مقایسه با گندم نان نورستار ممکن است اطلاعات جامعی در خصوص تحمل به تنش سرما در گندم دوروم ارائه کند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تغییرات نشت الکترولیتی (Electrolyte Leakage Index (ELI)) کربوهیدرات‌ها و بیان ژن‌های دساتوراز ۱۲ و ۱۵ بعد از دمای سرماسازگاری و انتقال به تنش سرما در ژنوتیپ‌های دوروم گردیش و SRN و گندم نان نورستار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذرهای دو ژنوتیپ گردیش و SRN (گندم دوروم تراپلوئید) و رقم نورستار (گندم نان هگزاپلوئید) از مؤسسه تحقیقات دیم کشور واقع در مراغه تهیه شد، آزمایش در اتاقک‌های رشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج اجرا شد. بذرها در هیپوکلرید سدیم ۱۰ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شده و سپس با آب مقطر دوبار تقطیر شستشو داده شدند سپس بر روی کاغذ صافی در پتری دیش برای ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ سانتی‌گراد قرار گرفتند. گیاهچه‌ها در گلدان حاوی رس، شن و کود دامی کشت داده شدند. گیاهان در اتاقک رشد با دمای ۲۵ سانتی‌گراد و شدت نور $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ از لامپ سفید فلورسنت استفاده شد که شامل دوره فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با رطوبت نسبی ۷۵ درصد رشد داده شدند، گیاهان ۱۴ روزه بلافاصله از شرایط کنترل به سرماسازگاری در دمای ۵-۴ سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز انتقال داده شدند. آزمایش در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. این آزمایش دارای ۲ فاکتور شامل ژنوتیپ و دما بود که عامل ژنوتیپ مشتمل بر سه سطح شامل ژنوتیپ‌های گندم دوروم گردیش (متحمل به سرما)، SRN (حساس به سرما) و گندم نان نورستار متحمل به سرما بود، و عامل دما شامل ۷ سطح بود که در ادامه آورده شده است. نمونه‌های برگ‌ی ژنوتیپ‌ها بعد از ۷ و ۱۴ روز تحت دمای ۵-۴ سانتی‌گراد نمونه‌برداری و بررسی شدند. بعد از ۱۴ روز سرماسازگاری، گیاهان در یک اتاقک رشد با دمای

لایه‌ای غشا به اثبات رسیده است (Steponkus *et al.*, 1984). مسیرهای سیگنال‌رسانی قند نیز می‌توانند سرماسازگاری را تنظیم کنند. ژن‌های دساتوراز در پاسخ به تنش سرما تغییر بیان دارند که نسبت اسیدهای چرب غیراشباع را به اشباع افزایش داده و منجر به برگشت سیالیت غشا به فاز مایع، ترمیم غشا می‌شوند و در نتیجه مانع تغییر فاز غشایی می‌شود (Orlova *et al.*, 2003; Maali Amiri *et al.*, 2010). تاکنون تحقیقات زیادی در خصوص وجود رابطه معنی‌دار بین افزایش میزان اسیدهای چرب غیراشباع غشا با میزان افزایش بیان ژن‌های دساتوراز در گیاهان گزارش شده است (Orlova *et al.*, 2003; Popov *et al.*, 2006; Maali Amiri *et al.*, 2010). آنزیم‌های دساتوراز ۱۲ و ۱۵ در تنظیم فعالیت‌های غشا، سیگنال‌دهی و تولید متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی دارند (Maali Amiri *et al.*, 2010).

گندم از عمده‌ترین محصولات کشاورزی ایران و تأمین‌کننده بیشترین نیاز غذایی کشور می‌باشد که به دلیل ارزش غذایی و سازگاری نسبتاً وسیع به شرایط آب و هوایی در مقایسه با سایر گیاهان زراعی در وسیع‌تری کشت می‌گردد (Lotfi Jala Abadi *et al.*, 2013). با توجه به اهمیت گندم دوروم برای اقتصاد روستائیان، کشور ایران در تحقیقات، اصلاح، توسعه و تولید گندم دوروم موفق عمل نکرده است، به علت حساسیت گندم دوروم در برابر تنش سرما (Marti and Slafer, 2014) تولید ارقام جدید متحمل به سرما یکی از اولویت‌های تحقیقاتی گندم دوروم است. اغلب تنش سرما بر کشت پاییزه تأثیر می‌گذارد. ژنوتیپ گردیش در مناطق غرب ایران در تناوب با گندم نان کشت می‌شوند و اطلاعات موجود درباره فیزیولوژی، بیوشیمی و مولکولی تحمل به سرما در این ژنوتیپ بسیار کم است. ژنوتیپ‌های SRN و نورستار به ترتیب به عنوان ژنوتیپ‌های دوروم حساس به سرما و گندم نان متحمل به سرما مورد ارزیابی قرار گرفتند ژنوتیپ نورستار بومی کشور کانادا بوده (Nejadsadeghi *et al.*, 2014) و تحقیقات گسترده نشان داده که درجه تحمل به سرما در این گیاه بیشتر از دیگر ژنوتیپ‌های گندم نان

اساس دانکن انجام شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA کل با روش بایوزول (Biozol) انجام شد، همچنین جهت تعیین کیفیت باندهای RNA مقدار ۵ میکروگرم از هر نمونه روی ژل ۱/۵ درصد آگارز، الکتروفورز شد تا نسبت به کیفیت بالای آن اطمینان حاصل شود. تیمار DNase برای تمامی نمونه‌ها بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز اعمال شد. جهت ساخت cDNA، از روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد.

طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ انجام شد. توالی، شماره دسترسی مورد استفاده در سایت NCBI و خصوصیات آغازگر ژن‌های اختصاصی و ژن خانه دار در جدول (۱) ارائه شده است. ژن‌های بررسی شده در این تحقیق شامل ژن دساتوراز دلتا ۱۲ یا امگا ۶ و دساتوراز دلتا ۱۵ یا امگا ۳ می‌باشد.

روش انجام QRT-PCR (Quantitative Reverse Transcript PCR)

در این تحقیق از دستگاه iQ5 شرکت BioRAD و کیت حاوی رنگ فلورسنس SYBR BioPars (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) برای ارزیابی کمی استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR BioPars، یک میکرولیتر آغازگر اختصاصی پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ میکرومول، ۳ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA مورد بررسی بود. بیان نسبی ژن‌ها (Relative expression software tool) با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (Pfaffl, 2007) و جهت تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار REST (Pfaffl et al., 2002) استفاده شد.

صفر سانتی‌گراد قرار داده شدند و جهت بررسی مطالعه بیشتر دما به تدریج به ۵- سانتی‌گراد کاهش پیدا کرد ۰/۵ سانتی‌گراد در هر دقیقه کاهش پیدا کرد) و گیاهان برای یک روز در این دما نگهداری شدند و نمونه‌برداری در ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد انجام شد. گیاهان بدون تیمار سازگاری (Non-acclimated) از شرایط تیمار کنترل مستقیماً به تنش سرما در دمای ۵- سانتی‌گراد انتقال یافتند و نمونه‌برداری در ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت بعد انجام شد. بر اساس داده‌های فیزیولوژیکی برای بیان ژن تیمار ۱۲ ساعت با تیمار سازگاری و بدون تیمار سازگاری از اندازه‌گیری حذف شدند. تیمار دمایی یعنی ترکیب دما و فتوپریود بر اساس مطالعات قبلی (Nejadsadeghi et al., 2014) انتخاب شدند. همه آزمایشات بر روی ۲ سانتی‌متر وسطی اولین برگ گیاهچه گندم انجام شد. نمونه‌برداری در سن یکسان نمونه‌ها انجام شد (Hurry and Huner, 1991).

اندازه‌گیری نشت الکترولیتی

تحمل به سرما بر اساس شاخص نشت الکتریکی بافت‌های خسارت دیده گیاهان گندم بعد از تیمار سرما با روش (Campos et al., 2003) محاسبه شد.

اندازه‌گیری قندهای محلول گیاهی

غلظت قندهای محلول در گیاه طبق روش AOAC (1995) با اعمال تغییراتی انجام گرفت. استخراج قندها با اتانول ۸۰ درصد صورت گرفت. برای اندازه‌گیری غلظت هر یک از قندهای مدنظر از دستگاه High Performance Liquid Chromatography (مدل کنوئر (Knauer)، آلمان) استفاده شد. داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت، مقایسه میانگین داده‌ها نیز بر

جدول ۱- توالی و مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای QRT-PCR

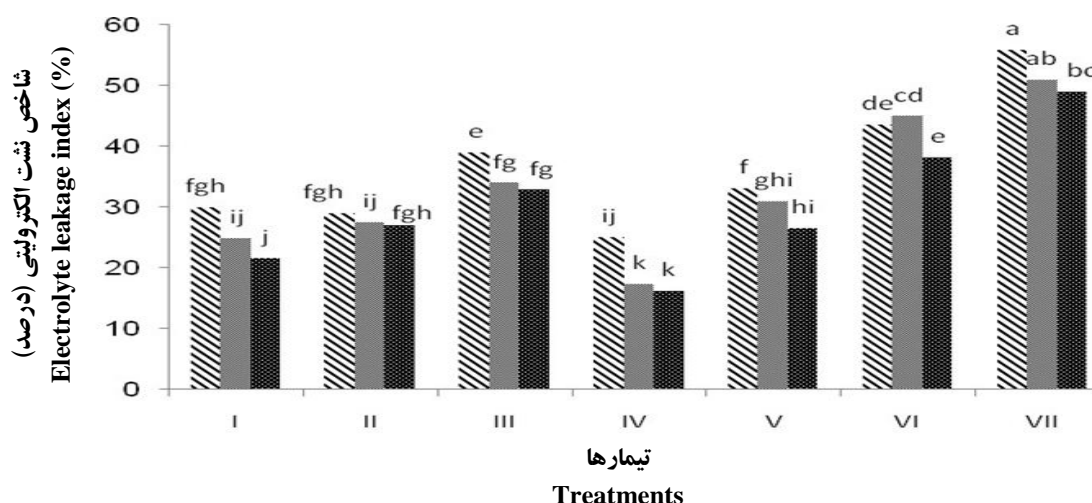
Table 1. sequence and details of primers for QRT-PCR

Accession numbers	Primer name	Seq. (5' → 3')	Product size (bp)
AJ012691	TaOmega3 For TaOmega3 Rev	CGGAACCGACAAGCAGAAGT ACAACCGCAATGGGAGAATG	220
AM709773.1	TaOmega6 For TaOmega6 Rev	CAGACATCACGCCAAGACAA GCAAAGACACACGCCAAACT	228
AB181991.1	TaActin For TaActin Rev	AAGAGTCGGTGAAGGGGACT TTCATACAGCAGGCAAGCAC	191

نتایج و بحث

به‌عنوان یک شاخص فیزیولوژیکی به منظور تعیین آسیب غشاهای سلولی در اثر تنش کوتاه مدت سرما در میان ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ELI در دیگر مطالعات نیز به منظور غربال گیاهان برای تحمل به سرما به خوبی استفاده قرار شده است (Orlova *et al.*, 2003; Maali Amiri *et al.*, 2010). مطالعات نشان داده که در صورت بروز تنش در گیاه، اولین محل درک تنش غشاهای سلولی می‌باشند و در نتیجه اولین خسارت‌های ایجادشده در گیاه و به دنبال آن اولین پاسخ‌ها به تنش را نیز می‌توان در سطح غشاهای سلولی مطالعه کرد. از جمله تغییرات صورت گرفته در غشای سلولی را می‌توان تغییر در فشار اسمزی غشا و در نتیجه پتانسیل غشایی عنوان کرد. نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که تنش سرما در دوره زمانی کوتاه باعث افزایش میزان نشأت الکترولیت‌ها می‌شود. تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف با الگوی مشابه در هر سه ژنوتیپ وجود دارد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در تیمار کنترل میزان نشأت الکترولیت‌های غشایی در گندم‌های دوروم (SRN)، گردیش) بیشتر از ژنوتیپ گندم نان (نورستار) بوده است. در ژنوتیپ SRN بیشترین درصد نشأت الکترولیت‌ها (۳۰/۰۴) و در ژنوتیپ گردیش متوسط ۲۵/۸۵ درصد و ژنوتیپ نورستار حداقل میزان ۲۱/۵۹ درصد دیده شده است. در عین حال در تیمار سرماسازگاری افزایش در همه ژنوتیپ صورت گرفته درحالی‌که افزایش معنی‌دار تنها در هفته دوم تیمار اتفاق افتاده است، در ژنوتیپ SRN میزان نشأت الکترولیت‌ها به ۳۹ درصد رسیده ولی در گردیش و نورستار به ترتیب ۳۴ و ۳۲ درصد بوده است. سرماسازگاری باعث کاهش میزان خسارت در همه ژنوتیپ‌ها شده که حداقل درصد نشأت در ژنوتیپ نورستار بوده است، پس از ۱۲ ساعت اعمال تنش سرما، بیشترین مقدار نشأت الکترولیتی برای ژنوتیپ SRN بوده و افزایش این مقدار پس از ۲۴ ساعت، نشان‌دهنده ظرفیت کمتر تحمل در آن ژنوتیپ بوده است. کاهش شاخص هدایت الکتریکی پس از سازگاری به دمای ۴ سانتی‌گراد برای یک الی ۲ هفته و سپس تنش

۵- سانتی‌گراد به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت در مقایسه با تنش مستقیم ۵- سانتی‌گراد به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت (بدون سرماسازگاری) نشان‌دهنده آن است که سازگاری به تنش سرما سبب هدایت کمتر غشا سلولی می‌شود (شکل ۱). 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 (Boyko *et al.*, 1999) و به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها احتمالاً گندم‌های دوروم را حساس‌تر به تنش‌های محیطی خشکی، شوری یا سرما ساخته است (Matri and Gorham, 1987; Marti and Slafer, 2013). به نظر می‌رسد افزایش میزان نشأت الکترولیت‌ها در ساعات آغازین تنش نشان‌دهنده درک سیگنال تنش توسط گیاه و به دنبال آن راه‌اندازی سازوکارهای پاسخ به این سیگنال در سطوح مختلف فیزیولوژیکی و مولکولی می‌باشد. بنابراین برای آزمایش این فرضیه که تغییر در وضعیت غشایی پلاسمایی (از نتایج نشأت الکترولیتی استنباط می‌شود)، فرایندهای فیزیولوژیکی و مولکولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد در ادامه اثر تنش سرما بر روی کربوهیدرات‌ها و بیان ژن‌های دساتورزا ۱۲ و ۱۵ مطالعه شد. تنش سرما با افزایش فعالیت ساکارز سینتاز سبب تغییر در میزان ساکارز محلول می‌شود. ساکارز در تنظیم اسمزی، سوخت و ساز کربوهیدرات‌ها، آمینواسیدها و لیپیدها، بیوسنتز دیواره‌ها، تولید انرژی، تولید متابولیت‌های ثانویه، ساخت و نگهداری پروتئین‌ها ایفای نقش می‌کند (Fernandez *et al.*, 2009). میزان ساکارز اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌داری را در بین تیمارهای مختلف نشان داد. در شرایط کنترل‌شده تفاوت بین ژنوتیپ‌های SRN و نورستار معنی‌دار نبوده ولی ژنوتیپ گردیش دارای ساکارز کمتری از دو ژنوتیپ دیگر بود. در فاز سازگاری بعد از ۷ و ۱۴ روز میزان ساکارز در هر سه ژنوتیپ افزایش معنی‌داری را نشان داد که این افزایش در ژنوتیپ نورستار بیشتر از دو ژنوتیپ دیگر مشاهده شد.



شکل ۱- اثر تیمارهای دمایی بر شاخص نشت الکترولیتی در ژنوتیپ‌های گندم در شرایط کنترل شده (۲۵ سانتی‌گراد) (I)، فاز سازگاری (۴ سانتی‌گراد) بعد از ۷ روز (II) و ۱۴ روز (III)، فاز سرما (۵- سانتی‌گراد) بعد از ۱۲ ساعت (IV) و ۲۴ ساعت (V) در گیاهان سازگار شده و فاز سرما (۵- سانتی‌گراد) بعد از ۱۲ ساعت (VI) و ۲۴ ساعت (VII) در گیاهان سازگار نشده (ستون‌های هاشور خورده، بدون هاشور و تیره به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های گندم دوروم (SRN و گردیش) و گندم نان (نورستار) می‌باشند)

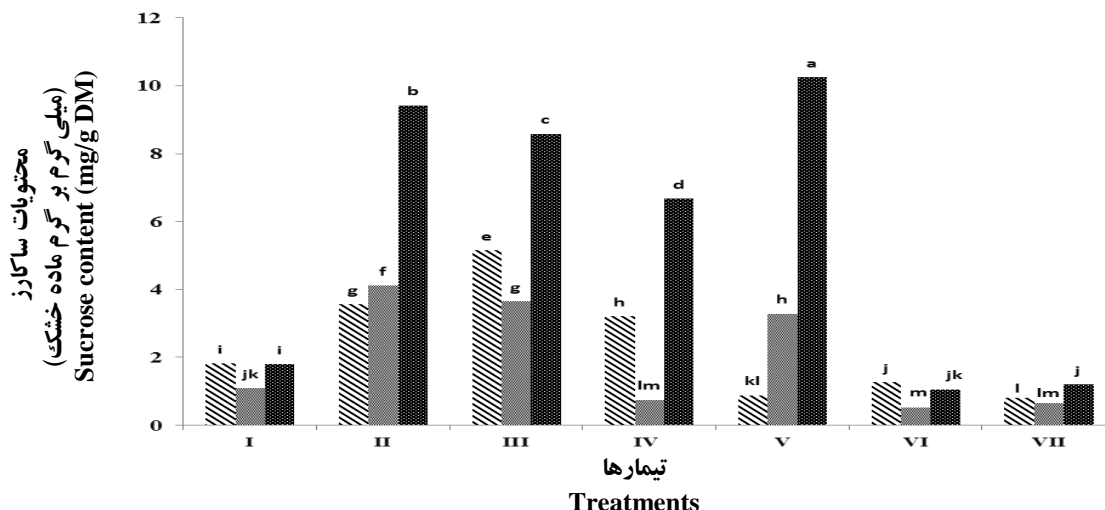
Figure 1. Effects of thermal electrolyte leakage index in the leaves of wheat genotypes incubated in control (25 °C) (I), acclimation phase (4 °C) after 7 days (II) and 14 days (III), cold phase (-5 °C) after 12 h (IV) and 24 h (V) in acclimated plants and cold phase (-5 °C) after 12 h (VI) and 24 h (VII) in non-acclimated plants

(Hatched, without hatched and dark bars indicate durum (SRN and Gerdish) and bread wheat (Norstar) genotypes. Treatments with similar letters haven't significant difference)

بود. در فاز سازگاری میزان گلوکز بعد از ۷ روز در هر سه ژنوتیپ افزایش یافت، همچنین در نورستار بالاتر بود اما بعد از ۱۴ روز سازگاری میزان گلوکز در SRN و گردیش ثابت بوده و در نورستار افزایش یافت. در گیاهان سازگار شده در فاز سرما بعد از ۱۲ ساعت میزان گلوکز اختلاف زیادی را با فاز سازگاری نشان نداد اما بعد از ۲۴ ساعت اختلاف شدید و معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و نسبت به مرحله سازگاری مشاهده شد و در ژنوتیپ SRN کمترین میزان و برای ژنوتیپ نورستار بیشترین میزان گلوکز مشاهده شد. در گیاهان سازگار نشده در فاز سرما بعد از ۱۲ ساعت در ژنوتیپ گردیش افزایش اندکی نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد اما در دو ژنوتیپ دیگر میزان گلوکز مشابه گیاهان شاهد بود اما بعد از ۲۴ ساعت میزان گلوکز در هر سه ژنوتیپ افزایش یافت که این افزایش در نورستار و SRN شدیدتر و در ژنوتیپ گردیش کمتر بود (شکل ۳). نتایج روند افزایشی را در میزان گلوکز برای ژنوتیپ نورستار نشان

میزان ساکارز در فاز سرما در گیاهان سازگار شده نورستار و گردیش پس از یک کاهش در ۱۲ ساعت، افزایش نشان داد در حالی که در SRN روند کاهشی مشاهده شد. روند تغییرات ساکارز در گیاهان سازگار شده و سازگار نشده مشابه نبود و در تنش سرما میزان ساکارز در گیاهان سرماسازگار شده بیشتر از گیاهان کنترل (۲۳ سانتی‌گراد) بود اما در گیاهان سازگار نشده تفاوت معنی‌داری را با گیاهان شاهد نشان نداد. در گیاهان سازگار نشده در فاز سرما میزان ساکارز تغییرات شدیدی در مقایسه با گیاهان شاهد نشان نداد (شکل ۲). به نظر می‌رسد که میزان ساکارز در ژنوتیپ نورستار بیشتر تحت تأثیر سازگاری قرار گرفت و افزایش قابل توجهی را در فاز سازگاری نشان داد که این افزایش ساکارز در فاز سرما نیز حفظ شد به طوری که بیشترین میزان ساکارز اندازه‌گیری شده ساکارز در این ژنوتیپ و در فاز سازگاری در روز ۷ بود.

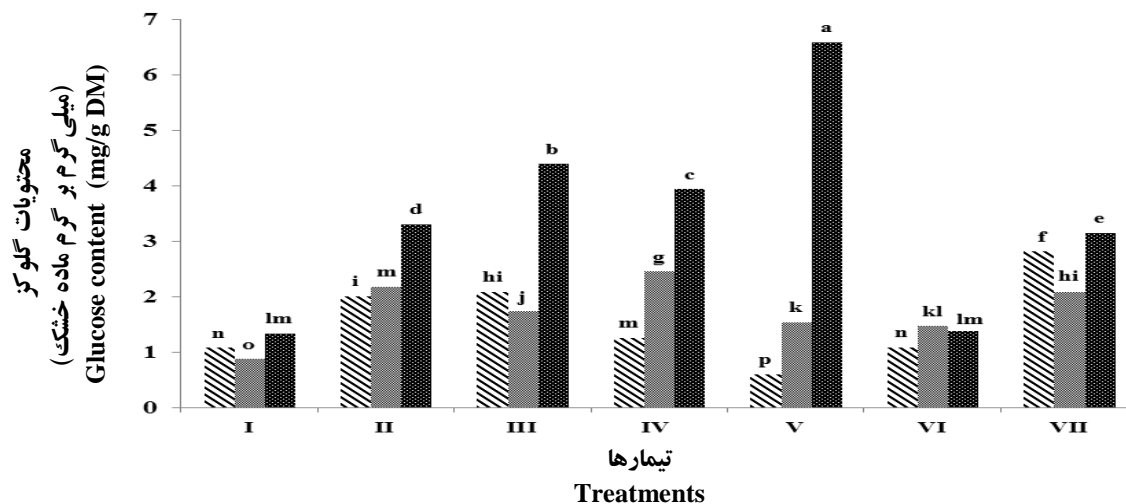
میزان گلوکز در گیاهان شاهد اختلاف زیادی را نشان نداد و در ژنوتیپ نورستار بالاتر از دو ژنوتیپ دیگر



شکل ۲- اثر تیمارهای دمایی بر میزان ساکارز در ژنوتیپ‌های گندم در شرایط کنترل شده (۲۵ سانتی‌گراد) (I)، فاز سازگاری (۴ سانتی‌گراد) بعد از ۷ روز (II) و ۱۴ روز (III)، فاز سرما (۵- سانتی‌گراد) بعد از ۱۲ ساعت (IV) و ۲۴ ساعت (V) در گیاهان سازگار شده و فاز سرما (۵- سانتی‌گراد) بعد از ۱۲ ساعت (VI) و ۲۴ ساعت (VII) در گیاهان سازگار نشده (ستون‌های هاشور خورده، بدون هاشور و تیره به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های گندم دوروم (SRN و گردیش) و گندم نان (نورستار) می‌باشند. تیمارهای با حرف یا حروف مشترک اختلاف معنی‌دار ندارند)

Figure 2. Effects of thermal treatments on Sucrose content in the leaves of wheat genotypes incubated in control (25 °C) (I), acclimation phase (4 °C) after 7 days (II) and 14 days (III), cold phase (-5 °C) after 12 h (IV) and 24 h (V) in acclimated plants and cold phase (-5 °C) after 12 h (VI) and 24 h (VII) in non-acclimated plants

(Hatched, without hatched and dark bars indicate durum (SRN and Gerdish) and bread wheat (Norstar) genotypes. Treatments with similar letters haven't significant difference)



شکل ۳- اثر تیمارهای دمایی بر میزان گلوکز در ژنوتیپ‌های گندم در شرایط کنترل شده (۲۵ سانتی‌گراد) (I)، فاز سازگاری (۴ سانتی‌گراد) بعد از ۷ روز (II) و ۱۴ روز (III)، فاز سرما (۵- سانتی‌گراد) بعد از ۱۲ ساعت (IV) و ۲۴ ساعت (V) در گیاهان سازگار شده و فاز سرما (۵- سانتی‌گراد) بعد از ۱۲ ساعت (VI) و ۲۴ ساعت (VII) در گیاهان سازگار نشده (ستون‌های هاشور خورده، بدون هاشور و تیره به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های گندم دوروم (SRN و گردیش) و گندم نان (نورستار) می‌باشند. تیمارهای با حرف یا حروف مشترک اختلاف معنی‌دار ندارند)

Figure 3. Effects of thermal treatments on glucose content in the leaves of wheat genotypes incubated in control (25 °C) (I), acclimation phase (4 °C) after 7 days (II) and 14 days (III), cold phase (-5 °C) after 12 h (IV) and 24 h (V) in acclimated plants and cold phase (-5 °C) after 12 h (VI) and 24 h (VII) in non-acclimated plants

(Hatched, without hatched and dark bars indicate durum (SRN and Gerdish) and bread wheat (Norstar) genotypes. Treatments with similar letters haven't significant difference)

ژنوتیپ گردیش مشاهده شد ولی بعد از ۲۴ ساعت مانند ساکارز و گلوکز در نورستار به شدت افزایش، در گردیش و SRN کاهش یافت. در گیاهان سازگار نشده در فاز سرما بعد از ۱۲ ساعت اختلاف معنی داری در سطح فروکتوز در ژنوتیپ‌های SRN و گردیش مشاهده شد اما سطح آن در نورستار نسبت به گیاهان شاهد معنی دار نبود اما بعد از ۲۴ ساعت مانند گلوکز سطح آن در هر سه ژنوتیپ افزایش یافت که این افزایش برای SRN و نورستار شدیدتر بود و گردیش به میزان کمتری افزایش یافت (شکل ۴). نتایج میزان فروکتوز اندازه‌گیری شده مانند ساکارز و گلوکز اشاره بر این دارد که میزان قندهای محلول در ژنوتیپ نورستار در طی تنش سرما بیشتر دستخوش تغییرات می‌شود و ژنوتیپ نورستار احتمالاً پتانسیل ژنتیکی بالاتری برای افزایش قندها در برابر تنش سرما را دارد.

در مطالعه حاضر اعمال تنش سرما تحت تیمارهای آزمایشی سبب تغییر بیان ژن‌های دساتوراز ۱۲ و ۱۵ شد. تاکنون تحقیقات متعددی در خصوص وجود رابطه معنی دار بین تغییر میزان اسیدهای چرب غشاء با میزان بیان ژن‌های دساتوراز در گیاهان گزارش شده است (Orlova et al., 2003; Popov et al., 2006; Maali et al., 2010) با توجه به این که آنزیم‌های دساتوراز ۱۲ و ۱۵ در تنظیم فعالیت‌های غشاء، سیگنال‌دهی و تولید متابولیت‌های ثانویه نقش دارند (Popov et al., 2006; Maali Amiri et al., 2010) بررسی کمی بیان این ژن‌ها در گیاهان تحت تنش سرما در تیمارهای آزمایشی ضروری به نظر می‌رسد. تجزیه داده‌ها به کمک نرم‌افزار REST نشان داد که بیان ژن‌های دساتوراز در فواصل زمانی پس از قرارگیری در دمای ۴ سانتی‌گراد اختلاف معنی داری با تیمار کنترل (۲۳ سانتی‌گراد) داشت به طوری که تحت شرایط سازگاری بیان ژن‌های دساتوراز ۱۲ در ژنوتیپ نورستار بیشترین و در ژنوتیپ SRN کمترین میزان تغییر را نسبت به تیمار کنترل نشان داد. قرارگیری گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما به مدت ۲۴ ساعت سبب کاهش میزان بیان ژن‌های دساتوراز در مقایسه با گیاهان سازگار شده شد اگرچه این میزان فعالیت بیشتر از گیاهان سازگار نشده تحت

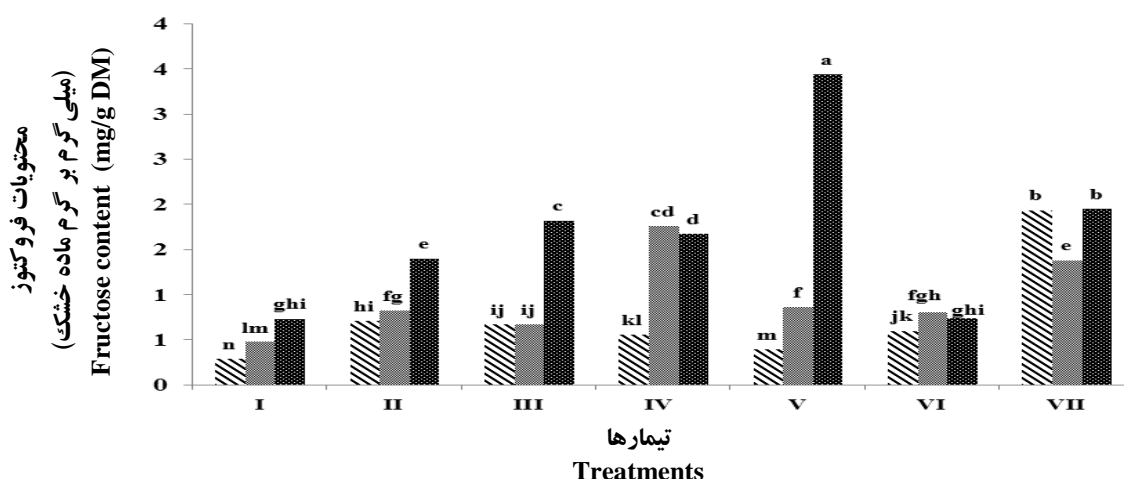
داد این روند افزایشی برای گردیش نیز تا حدودی قابل مشاهده است اما ژنوتیپ SRN در فاز اول سرما ابتدا کاهش شدید و در ادامه افزایش یافت. نتایج نشان داد که نقش گلوکز در ژنوتیپ نورستار نقش مهم‌تری را در تحمل به سرما ایفا می‌کند. با توجه به این واقعیت که تنش باعث کاهش کارایی دستگاه فتوسنتزی شده و انتظار بر این است که گلوکز نیز به عنوان اصلی‌ترین محصول نیز کاهش یابد اما گیاه برای حفظ هموستازی خود و تحمل تنش سرما مجبور به تجزیه پلیمرهای پلی‌ساکارید مانند نشاسته شده تا سطح قندهای محلول خود را برای مقابله با تنش افزایش دهد و در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این مطالعه به نظر می‌رسد که نورستار کارا تر از دو ژنوتیپ دیگر عمل کرده است.

مطالعات نشان داده که فروکتوز در تنش‌های خشکی و سرما نقش مهمی را در سازگاری گیاه بازی می‌کند (Kaur et al., 2000). گلوکز، فروکتوز و ساکارز از مهم‌ترین قندهای محلول می‌باشند که در تنش سرما تجمع می‌یابند. در گندم تجمع فروکتان‌ها سبب افزایش تحمل به تنش سرما شده است (Arroyo et al., 2003). فروکتوز نه تنها به عنوان محافظت‌کننده‌های اسمزی فعالیت دارند بلکه نقش مهمی در حفاظت از غشای سلولی از طریق برهم‌کنش با لایه لیپید تحت تنش برعهده دارد (Shao et al., 2004; Anchordoguy et al., 1987). در برخی مطالعات مشخص شده که در میان قندهای محلول آزاد، فروکتوز به مقدار بیشتری از گلوکز و ساکارز در زمان مواجه شدن گیاهان با شرایط نامساعد محیطی تجمع می‌یابد، قندهای محلول نقش مهمی در تنظیم اسمزی سلول‌ها به عهده دارند (Balibrea et al., 1997). میزان فروکتوز برخلاف گلوکز بین گیاهان شاهد نیز اختلاف معنی داری را نشان داد و سطح آن مانند ساکارز و گلوکز در ژنوتیپ نورستار بالاتر بود. در فاز سازگاری بعد از ۷ روز در هر سه ژنوتیپ اختلاف معنی داری نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. اما بعد از ۱۴ روز اختلاف معنی داری نسبت به فاز قبل نشان نداد و تنها در نورستار افزایش معنی دار بود. در فاز سرما و در گیاهان سازگار شده بعد از ۱۲ ساعت افزایش معنی دار تنها در

ژنوتیپ‌ها ممکن است در اثر پایداری خصوصیات فیزیکی بیوشیمیایی غشا باشد که برخی از این ویژگی‌ها در سطح رونویسی (تغییر میزان رونوشت) و برخی در سطوح تغییر عملکرد ژن (تغییر اسیدهای چرب) کنترل می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که الگوی بیان ژن‌های دساتورزا ممکن است به تخصیص روند بیان ژن‌های دیگر دخیل در پاسخ به تنش سرما کمک کرده و توجه‌کننده پاسخ‌های متمایز ژنوتیپ‌ها و احتمالاً تنوع در میزان فعالیت سایر ژن‌های مرتبط باشد. همچنین بیان ژن‌های دساتورزا و سطح قندها شباهت فراوانی نشان دادند، احتمال دارد قندها به‌عنوان سیگنال مولکولی در جهت پاسخ‌های ژن‌های دساتورزا به تنش سرما عمل کند، قبلاً نقش سیگنال‌دهی قندها در پاسخ به تنش‌های غیرزنده و در نتیجه در تنظیم بیان ژن ثابت شده است، همچنین فرآیندهای مختلف بعد از رونویسی و بعد از ترجمه در تنظیم بیان ژن تحت تنش‌های غیرزنده دخیل هستند که ممکن است سطوح بیان ژن‌های دساتورزا را تعیین کند.

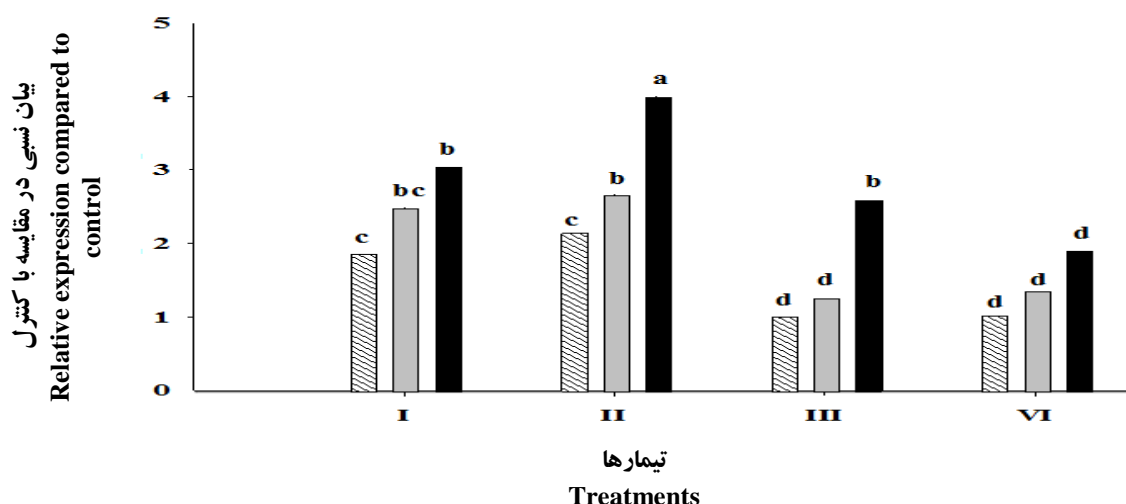
تنش سرما بود (شکل ۵). به نظر می‌رسد مکانیسم‌های فعال‌تری بیان ژن دساتورزا ۱۲ در ژنوتیپ‌های نورستار را در مقایسه با ژنوتیپ‌های دوروم تنظیم می‌کند. تحت تنش سرما، ساختار غشای سلولی تغییر وضعیت داده که بر قابلیت نفوذپذیری غشا تأثیر می‌گذارد. تغییر وضعیت غشا منجر به تحریک مکانیسم‌های می‌شود که نتیجه آن افزایش بیان ژن‌های تنظیم‌کننده سیالیت غشا سلول شده که یکی از آن‌ها ژن دساتورزا ۱۲ و ۱۵ می‌باشد که سبب افزایش میزان اسیدهای چرب لینولئیک اسید می‌شود. بنابراین در ادامه کار بیان ژن‌های دساتورزا ۱۲ و ۱۵ اندازه‌گیری شد.

بررسی الگوی تغییر بیان ژن دساتورزا ۱۲ و ۱۵ نشان داد که فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ نورستار در مقایسه با ژنوتیپ‌های دوروم بیشتر بوده است، همچنین بیان این ژن در گیاه سازگار شده تحت تنش سرما در مقایسه با گیاهان سازگار نشده افزایش بیشتری نشان داده که اهمیت فاز سازگاری را در تنظیم متابولیت‌های سلولی نشان می‌دهد (شکل‌های ۵ و ۶). به نظر می‌رسد تحمل بیشتر در بعضی



شکل ۴- اثر تیمارهای دمایی بر میزان فروکتوز در ژنوتیپ‌های گندم در شرایط کنترل شده (۲۵ سانتی‌گراد) (I)، فاز سازگاری (۴ سانتی‌گراد) بعد از ۷ روز (II) و ۱۴ روز (III)، فاز سرما (-۵ سانتی‌گراد) بعد از ۱۲ ساعت (IV) و ۲۴ ساعت (V) در گیاهان سازگار شده و فاز سرما (-۵ سانتی‌گراد) بعد از ۱۲ ساعت (VI) و ۲۴ ساعت (VII) در گیاهان سازگار نشده (ستون‌های هاشور خورده، بدون هاشور و تیره به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های گندم دوروم (SRN) و گردیش) و گندم نان (نورستار) می‌باشند. تیمارهای با حرف یا حروف مشترک اختلاف معنی‌دار ندارند)

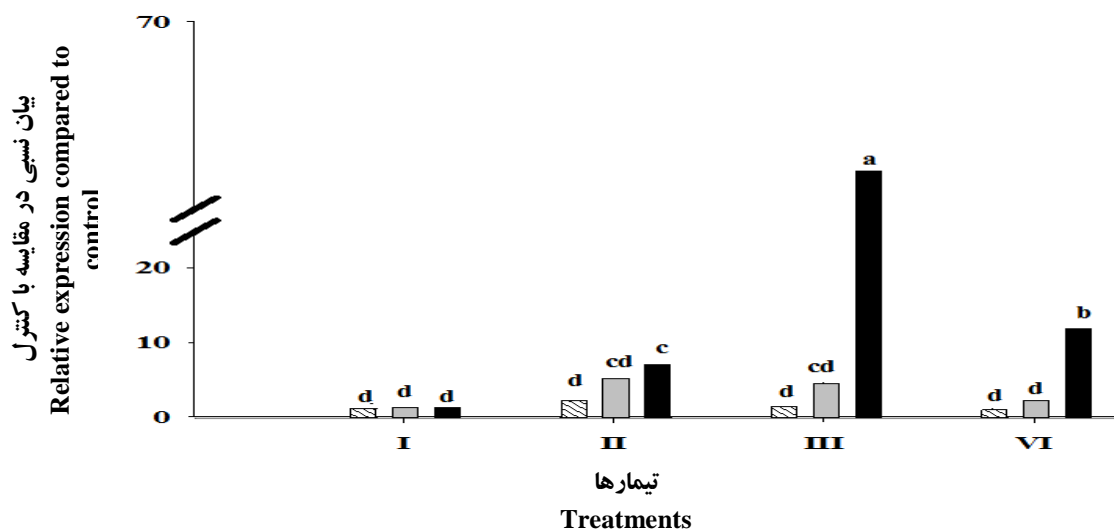
Figure 4. Effects of thermal treatments on fructose content in the leaves of wheat genotypes incubated in control (25 °C) (I), acclimation phase (4 °C) after 7 days (II) and 14 days (III), cold phase (-5 °C) after 12 h (IV) and 24 h (V) in acclimated plants and cold phase (-5 °C) after 12 h (VI) and 24 h (VII) in non-acclimated plants (Hatched, without hatched and dark bars indicate durum (SRN and Gerdish) and bread wheat (Norstar) genotypes. Treatments with similar letters haven't significant difference)



شکل ۵- بیان نسبی ژن دساتوراز ۱۲ در ژنوتیپ‌های گندم تحت تیمارهای دمایی: فاز سازگاری (۴ سانتی‌گراد) (I) بعد از ۷ روز و (II) بعد از ۱۴ روز، فاز سرما (-۵ سانتی‌گراد) (III) بعد از ۲۴ ساعت در گیاهان سازگار شده و فاز سرما (-۵ سانتی‌گراد) (VI) بعد از ۲۴ ساعت در گیاهان سازگار نشده

(ستون‌های هاشور خورده، خاکستری و سیاه به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های گندم دوروم (SRN و گردیش) و گندم نان (نورستار) می‌باشند)

Figure 5. Effects of thermal treatments on *delta12* gene expression in the leaves of, acclimation phase (4 °C) after 7 days (I) and 14 days (II), cold phase (-5 °C) after 24 h (III) in acclimated plants and cold phase (-5 °C) after and 24 h (VI) in non-acclimated plants (Hatched, without hatched and dark bars indicate durum (SRN and Gerdish) and bread wheat (Norstar) genotypes. Treatments with similar letters haven't significant difference)



شکل ۶- بیان نسبی ژن دساتوراز ۱۵ در ژنوتیپ‌های گندم گندم تحت تیمارهای دمایی: فاز سازگاری (۴ سانتی‌گراد) (I) بعد از ۷ روز و (II) بعد از ۱۴ روز، فاز سرما (-۵ سانتی‌گراد) (III) بعد از ۲۴ ساعت در گیاهان سازگار شده و فاز سرما (-۵ سانتی‌گراد) (VI) بعد از ۲۴ ساعت در گیاهان سازگار نشده

(ستون‌های هاشور خورده، خاکستری و سیاه به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های گندم دوروم (SRN و گردیش) و گندم نان (نورستار) می‌باشند)

Figure 6. Effects of thermal treatments on *delta15* gene expression in the leaves of, acclimation phase (4 °C) after 7 days (I) and 14 days (II), cold phase (-5 °C) after 24 h (III) in acclimated plants and cold phase (-5 °C) after and 24 h (VI) in non-acclimated plants (Hatched, without hatched and dark bars indicate durum (SRN and Gerdish) and bread wheat (Norstar) genotypes. Treatments with similar letters haven't significant difference)

نتیجه‌گیری

سطوح مختلف خسارت نشت الکترولیت‌ها در تیمارهای دمایی، شاید نشانهای از تفاوت پاسخ ژنوتیپ‌ها به خصوص در تیمار سرماسازگاری باشد. افزایش نشت الکترولیت‌ها در SRN بیشتر از ژنوتیپ‌های گردیش و نورستار بوده که احتمالاً شاخصی از تحمل بیشتر ارقام متحمل به سرما باشد. از آنجا که تنش سرما یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در کشت پاییزه یا زمستانه گندم می‌باشد، برای درک فرآیند سازگاری به تنش سرما در برگ گیاه گندم درک مکانیسم سازگار شدن بسیار مهم می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان داد ژنوتیپ‌های گندم هگزاپلوئید (گندم نان) و تتراپلوئید (گندم دوروم) پاسخ‌های فیزیولوژیکی-بیوشیمیایی متفاوتی به تنش سرما در شرایط سازگاری و ناسازگاری نشان دادند که نشان‌دهنده محدوده وسیعی از ظرفیت ژنتیکی آن‌ها در افزایش تحمل به سرما است. از تغییر الگوی بیان ژن‌های دساتوراز ۱۲ و ۱۵ استنباط می‌شود که این تغییر بیان ژن بخشی از تحمل در مقابله با تنش اکسیداتیو القاء شده توسط سرما را فراهم کند. افزایش میزان گلوکز و فروکتوز ممکن است در اثر تخریب بیشتر ساکارز باشد. اما همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد میزان ساکارز سلول نیز افزایش یافته است، افزایش کربوهیدرات‌ها در سلول یک پاسخ محافظتی سلول در برابر تنش سرما است.

همچنین ممکن است افزایش میزان ساکارز در اثر کاهش میزان انتقال آن از سلول باشد که بایستی با جزئیات مورد مطالعه قرار گیرد. با این حال باید روشن شود که چه پاسخ‌های سلولی ویژه‌ای تحت تیمارهای آزمایش در گیاهان رخ داده است زیرا این یافته‌ها می‌تواند مرتبط با فعالیت ژن‌ها و یا عوامل ژنتیکی در ژنوم‌های A و B در گندم تتراپلوئید و ژنوم‌های A، B و D در گندم هگزاپلوئید باشد. شاید بتوان گفت که سازمان‌دهی ژنومی مختلف اثر مستقیم بر سازگاری گیاه به تنش سرما دارد. ژنوتیپ گردیش به موازات گندم نورستار پاسخ‌های مناسب‌تری در مقایسه با ژنوتیپ SRN به تنش سرما نشان داد و به نظر دارای متابولیت‌های فعال‌تر یا سنتز فعال‌تر متابولیتی بود. لازم به ذکر است که این پاسخ‌ها در ژنوتیپ‌های گندم تتراپلوئید و هگزاپلوئید وجود دارد اما درجه فعالیت و در نتیجه درجه سازگاری و تحمل آن‌ها در تتراپلوئیدها و هگزاپلوئیدها متفاوت است. این تفاوت‌ها ممکن است در اثر ساختار ژنومی و ویژگی‌های دیگر باشد که بعضی از این ویژگی‌ها، پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متمایزی را القاء می‌کنند و ظرفیت ژنتیکی تحمل به سرما را افزایش می‌دهند. پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتر تحمل به سرما روی ژنوتیپ گردیش انجام شود تا در صورت امکان در آینده در تلاقی‌ها به‌عنوان یک منبع تحمل به سرما استفاده شود.

References

- Anchordoguy, T. J., Rdolph, A. S., Carpenter, J. F. and Crowe, J. H. (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiol*, 24(4), 324-331.
- AOAC (Association of official analysis committee). (1995). *Official methods of analysis* (16th ed.). Arlington, VA, USA: Association of Analytical Chemists.
- Arroyo, A., Bossi, F., Finkelstein, R. R. and Leon, P. (2003). Three genes that affect sugar sensing (Abscisic acid insensitive 4, Abscisic acid insensitive 5 and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(1), 231-242.
- Balibrea, M. E., Rus-Alvarez, A. M., Bolarin, M. C. and Perez-Alfocea, F. (1997). Fastchanges in soluble carbohydrates and praline contents in tomato seedlings in response to ionic and nonionic iso-osmotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 151(2), 221-226.
- Boyko, E. J., Ahroni, J. H., Stensel, V., Forsberg, R. C., Davignon, D. R., Smith, D. G. (1999). A prospective

- study of risk factors for diabetic foot ulcer: The Seattle Diabetic Foot Study. *Diabetes Care*, 22(7), 1036-1042.
- Campos, P. S., Quartin, V., Ramalho, J. C., Nunes, M. A. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plant. *Journal of Plant Physiology*, 160(3), 283-292.
- Fernandez, A., Alvarez-Ordenez, A., Lopez, M. and Bernardo, A. (2009). Effects of organic acids on thermal inactivation of acid and cold stressed *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*, 26(5), 497-503.
- Hurry, V. M. and Huner, N. P. A. (1991). Low growth temperature effects a differential inhibition of photosynthesis in spring and winter wheat. *Plant Physiology*, 96(2), 491-497.
- Kaur, S., Gupta, A. K. and Kaur, N. (2000). Effect of GA₃, kinetin and indole acetic acid on carbohydrate metabolism in chickpea seedlings germinating under water stress. *Plant Growth Regulation*, 30(1), 61-70.
- Lang, P., Zhang, C., Ebel, R. C., Dane, F. and Dozier, W. A. (2005). Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. *Gene*, 359, 111-118.
- Larkindale, J. and Vierling, E. (2008). Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiology*, 146(2), 748-761.
- Lotfi Jala Abadi, A., Siadat, S. A., Bakhsandeh, A., Fathi, Gh. and Alemi Saied, Kh. (2013). Effect of chemical, organic and biological fertilizers systems on yield and yield components of wheat genotypes (*T. aestivum* and *T. durum*) in Ahvaz conditions. *Plant Productions*, 36(1), 103-116. [In Farsi]
- Maali Amiri, R., Yur'eva, N. O., Shimshilashvili, K. R., Goldenkova-Pavlova, I. V., Pchelkin, V. P., Kuznitsova, E. I., Tsydendambaev, V. D., Trunova, T. I., Los, D. A., Salehi, G. and Nosov, A. M. (2010). Expression of acyl lipid-12-desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance of potato *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(3), 289-297.
- Marti, J. and Slafer, G. A. (2014). Bread and durum wheat yields under a wide range of environmental conditions. *Field Crops Research*, 156, 258-271.
- Mullineaux, P. M. and Baker, N. R. (2010). Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death. *Plant Physiology*, 154(2), 521-525.
- Nazari, M. R., Habibpour Mehraban, F., Maali-Amiri, R. and Zeinali Khaneghah, H. (2012). Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 183-89.
- Nejadsadeghi, L., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Ramezanpour, S. and Sadeghzade, B. (2014). Comparative analysis of physio-biochemical responses to cold stress in tetraploid and hexaploid wheat. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(1), 399-408.
- Orlova, I. V., Serebriiskaya, T. S., Popov, V., Merkulova, N., Nosov, A. M., Trunova, T. I., Tsydendambaev, V. D. and Los, D. A. (2003). Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants. *Plant Cell Physiol*, 44(4), 447-450.
- Pfaffl, M. W. (2007). Relative quantification. In M.T. Dorak (Ed.), *Real-time PCR* (pp. 63-82.). U.K.: Taylor and Francis Group.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(3), 36-46.
- Popov, V. N., Kipaikina, N. V., Astakhova, N. V. and Trunova, T. I. (2006). Specific features of oxidative stress in the chilled tobacco plants following transformation with the desC gene for acyl-lipid D9desaturase from *Synechococcus vulcanus*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(4), 469-47.

- Rajabi, R. and Said Pourdad, S. (2010). A study on cold resistance in safflower varieties and lines by physiological and biochemical indices. *Plant Productions*, 33(2), 1-14. [In Farsi]
- Shao, Y. C., Ding, H. D., Wan, Y. H., NM, Q. I., Zhu, W. M. and Yang, X. F. (2004). Effects of Cd²⁺ and Zn²⁺ stress on antioxidant enzyme system of tomato seedlings. *Acta Agriculturae Shanghai*, 20(4), 79-82.
- Steponkus, P. L. (1984). Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiol*, 35(1), 543-584.