Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
Phycological Society of Iran

Effect of cold stress on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence and activity of oxidative enzymes of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.)

Ali Bashirzadeh[1*], Khanlar Dayyan Abdullayev[2], Zaman Mahmudov[2]

[1] Department of Agriculture and Plant Breeding, Astara Branch, Islamic Azad University, Astara, Iran,
Email: ali_bashirzadeh@yahoo.com

[2] Institute of Botany, Natural Academic Science, Baku State University, Azerbaijan

Article type:
Research article

Article history
Received: 19.08.2022
Revised: 02.10.2022
Accepted: 07.10.2022
Published:22.12.2023

Keywords
Chlorophyll a
Electron transfer
Hydrogen peroxide
Malondialdehyd
Thermal stress

Abstract

Cold is one of the most important abiotic stresses that limits crop growth and yield worldwide. In order to investigate how 20-day-old barley seedlings adapt to short-term cold stress, the present study was carried out in a factorial experiment with four replications in the seed laboratory of Karaj Seedling and Seed Breeding Research Institute. The experimental factors included barley cultivars (cold-sensitive Karon, semi-cold-tolerant Fasih, and cold-tolerant Makoi) and cold stress with three levels of 4, 8, and 22 ºC (control). Temperature treatments were applied to barley seedlings for 48 hours. The results of analysis of variance showed that the interaction of cold and cultivar was significant on most of the measured traits in this study. The mean comparison also showed that the highest value of F_0 was observed in Karun and Fasih cultivars at 8 ºC and in Makoi cultivar at 4 ºC, while in all three cultivars, F_v value and chlorophyll a content decreased with decreasing temperature. The ratio of F_m/F_v in Makoui and Fasih cultivars decreased with decreasing temperature, however no significant change was observed in Karon cultivar. In addition, with decreasing temperature, malondialdehyd (MDA) and H_2O_2 concentration and peroxidase (POX) activity increased in all three cultivars, especially Karon cultivar, but catalase (CAT) and super oxid dismutase (SOD) activity were not affected by the cultivar, and the highest CAT and SOD activity were obtained at 8 and 4 ºC, respectively. The obtained results showed that the cultivars more tolerant than the sensitive cultivar (Karon) at low temperatures by limiting the production of compounds such as H_2O_2 and MDA, had higher chlorophyll content and photosynthetic efficiency, which probably reflects greater adaptation to cold.

Cite this article as: Bashirzadeh, A., Abdullayev, Kh.D., Mahmudov, Z. (2023). Effect of cold stress on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence and activity of oxidative enzymes of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Environmental Physiology*, 18(4): 97-114.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Doi: https://doi.org/10.71890/iper.2023.1105564

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

اثر تنش سرما بر محتوای کلروفیل، فلورسانس کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو سه رقم جو (*Hordeum vulgare* L.)

علی بشیرزاده[1*]، خانلار عبداله‌اف[2]، زمان محموداوف[2]

[1] گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد آستارا، دانشگاه آزاد اسلامی، آستارا، ایران، رایانامه: ali_bashirzadeh@yahoo.com

[2] موسسه گیاه شناسی، علوم آکادمیک طبیعی، دانشگاه دولتی باکو، آذربایجان.

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۵
تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱۰/۰۱

واژه‌های کلیدی:
انتقال الکترون
پراکسید هیدروژن
تنش حرارتی
کلروفیل a
مالون‌دی آلدئید

چکیده

سرما یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که رشد و عملکرد محصول را در سراسر جهان محدود می‌کند. به منظور بررسی چگونگی سازگاری گیاهچه‌های ۲۰ روزه جو با تنش سرمای کوتاه مدت، مطالعه حاضر به‌صورت فاکتوریل با چهار تکرار در آزمایشگاه بذر مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل ارقام جو (رقم کارون حساس به سرما، فصیح نیمه متحمل به سرما و ماکویی متحمل به سرما) و سه سطح تنش سرما شامل ٤، ٨ و ٢٢ (شاهد) سلسیوس، بود که تیمارهای دمایی به‌مدت ٤٨ ساعت بر گیاهچه‌های جو اعمال شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش سرما و رقم بر روی اغلب صفات اندازه‌گیری شده در این مطالعه معنی‌دار بود. مقایسه میانگین نیز نشان داد بیشترین مقدار F_0 در رقم کارون و فصیح در ٨ درجه و در رقم ماکویی در ٤ درجه مشاهده شد در حالی‌که در هر سه رقم با کاهش دما مقدار F_v و محتوای کلروفیل a کاهش یافت. نسبت F_m/F_v در رقم ماکویی و فصیح با کاهش دما کاهش یافت اما در رقم کارون تغییر معنی‌داری در این نسبت مشاهده نشد. علاوه بر این با کاهش دما میزان مالون‌دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن و نیز فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر سه رقم به‌ویژه رقم کارون افزایش یافت اما فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز تحت تاثیر رقم قرار نگرفت و بیشترین فعالیت کاتالاز و پراکسیداز به ترتیب در دمای ٨ و ٤ درجه به‌دست آمد. نتایج به‌دست آمده نشان داد ارقام متحمل‌تر نسبت به رقم حساس (کارون) در دماهای پایین با محدود کردن تولید ترکیباتی مانند H_2O_2 و مالون‌دی‌آلدهید ، محتوای کلروفیل و کارایی فتوسنتزی بالاتری داشته که احتمالاً منعکس کننده سازگاری بیشتر به سرما است.

استناد: بشیرزاده، علی؛ عبداله‌اف، خانلار؛ محموداوف، زمان. (١٤٠٢). اثر تنش سرما بر محتوای کلروفیل، فلورسانس کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو سه رقم جو (*Hordeum vulgare* L.). *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ١٨ (٤)، ١١٤-٩٧.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
Doi: https://doi.org/10.71890/iper.2023.1105564
© نویسندگان.

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) به دلیل مقاوم بودن به خشکی، تحمل خاک‌های شور و قلیایی، سهولت کشت و کار، قابلیت انبارداری بالا، برخورداری از عملکرد زیاد و مرغوبیت علوفه، ساده‌تر بودن کاشت، داشت و برداشت، دارا بودن مواد قندی و نشاسته‌ای زیاد در مقایسه با زراعت‌های دیگر، از اهمیت قابل توجهی در تغذیه دام و طیور برخوردار است (Shamsifar et al., 2021). جو از جمله گیاهانی است که در شرایط آب و هوایی کاملاً متفاوت رشد نموده و در مقایسه با گندم، نسبت به خشکی و بیماری‌ها متحمل‌تر است و در انواع بهاره و زمستانه وجود دارد. برای جلوگیری از تنش گرما و خشکی در پایان فصل، ارقام بهاره باید زودتر کاشته شوند (Valizadeh-Kamran et al., 2018). سرما در اواخر زمستان و ابتدای بهار در طول نمو گیاه عامل عمده‌ای است که بر رشد جو بهاره تأثیر می‌گذارد، زیرا می‌تواند منجر به مرگ و میر، استقرار ضعیف گیاه و متعاقب آن کاهش عملکرد شود (Capo-chichi et al., 2015). تنش سرمای بهاره می‌تواند به گندم و جو آسیب برساند و باعث کاهش عملکرد تا ۳۰ تا ۵۰ درصد شود (Nesterova et al., 2019). خطر سرمای بهاره در غالب برنامه‌های اصلاحی به دلیل اهمیت زودرسی نادیده گرفته می‌شود. در نتیجه، در حال حاضر سرمای بهاره بسیار کمتر از سازگاری به انجماد و یخزدگی مورد توجه بوده است (Marečková and Barták, 2017). تنش سرما منجر به طیف وسیعی از پاسخ‌ها در گیاهان می‌شود، از جمله پاسخ‌های فیزیوبیوشیمیایی، که همراه با نوسانات بیان ژن اتفاق می‌افتد و این تغییرات باعث می‌شود گیاهان نسبت به شرایط سرد تحمل بیشتری داشته باشند (Heidarvand and Amiri, 2010; Begovic et al., 2020).

در تنش دمای پایین به علت تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن در محیط سلول، احتمال وقوع تنش اکسیداتیو (به عنوان تنش ثانویه) وجود دارد (Longo et al., 2017; Doğru and Çakirlar, 2020). رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌توانند به ترکیبات حیاتی سلول مانند اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و رنگیزه‌های گیاهی حمله کنند. عموماً گیاهان از طریق فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانی، شامل آنزیم‌ها (سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، ...) و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی (فنل، کاروتنوئیدها، ...) تحمل خویش به تنش دمای پایین را افزایش می‌دهند (Landi et al., 2021). یکی از واکنش‌هایی که در حضور گونه‌های فعال اکسیژن سرعت بیشتری پیدا کرده، اثر تخریبی به‌جا می‌گذارد، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است. از آثار دیگر تنش دمای پایین کاهش سیّالیت غشا بوده که در کنار پراکسیداسیون لیپید موجب تخریب غشا و در نتیجه افزایش نشت یونی می‌گردد (Apostolova et al., 2008; Fahimirad et al., 2013). از طرفی Margutti و همکاران (۲۰۱۷) در گزارشی بیان کردند که در اثر سرمازدگی احتمال بروز تنش خشکی (به‌عنوان تنش ثانویه) نیز وجود دارد که ناشی از کاهش جذب آب و افزایش نشت یونی می‌باشد. با توجه به موارد ذکر شده تنش دمای پایین با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تأثیرگذاری بر غشا تیلاکوئید، باعث تخریب کلروفیل و در نتیجه کاهش فتوسنتز می‌گردد (Kowalczewski et al., 2020).

همچنین کاهش دما در حضور نور خطر اکسیداسیون نوری را به علت عدم توان استفاده لازم از نور افزایش می‌دهد (Telfer, 2014). دمای پایین فعالیت آنزیم‌ها از جمله فعالیت آنزیم روبیسکو را کاهش داده و کارآیی انتقال انرژی به مرکز فتوسیستم II را کاهش می‌دهد و کلروفیل سه‌تایی تشکیل

می‌گردد که می‌تواند با انتقال الکترون به اکسیژن، رادیکال فعال اکسیژن تولید کند (Kalaji et al., 2011; Zhang et al., 2016). در واقع انرژی نورانی جذب شده به وسیله مولکول‌های کلروفیل برگ می‌تواند یکی از این سه سرنوشت را داشته باشد: بخشی از انرژی نور جذب شده به وسیله مولکول‌های کلروفیل در یک برگ برای پیشبرد فتوسنتز استفاده می‌شود (خاموشی فتوشیمیایی) و انرژی مازاد به صورت حرارت پراکنده شده (خاموشی غیرفتوشیمیایی) و یا به شکل نور با طول موج بلند از سطح برگ منعکس می‌شود که به این پدیده فلورسانس کلروفیل گفته می‌شود (Marečková et al., 2019). با توجه به اینکه طیف گسیل فلورسانس با طیف نور جذب شده متفاوت است، عملکرد آن قابل اندازه‌گیری می‌باشد. به‌منظور تعیین وضعیت فیزیولوژیکی گیاه و میزان آسیب وارده به دستگاه فتوسنتزی از تکنیکی به نام سنجش فلورسانس کلروفیل استفاده می‌شود. در حقیقت، مقدار فلورسانس کلروفیل می‌تواند توانایی گیاه در تحمل به تنش‌های محیطی، سالم بودن غشاء تیلاکوئید، کارآیی نسبی انتقال الکترون از فتوسیستم II به فتوسیستم I و میزان خسارتی که تنش به گیاه وارد می‌کند را به خوبی نشان دهد. رابطه بین فلورسانس کلروفیل و کارآیی فتوسنتزی گیاه اثبات شده است (Telfer, 2014).

توانایی ارقام مختلف جو در تحمل به دمای پایین بسیار متفاوت است، به‌طوری‌که ارقام حساس به سرما و افت ناگهانی دما در نواحی مختلف کشور، ممکن است آسیب ببینند ولی مطالعات چندانی از اثر دماهای مختلف بر گیاهچه‌های ارقام جو وجود ندارد به همین منظور مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر دمای پایین بر فلورسانس کلروفیل، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو، بر ارقام جو انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور مطالعه اثر دماهای مختلف بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، کارایی کوانتومی فتوسیستم II و فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو گیاهچه‌های جو و ذرت، دو آزمایش جداگانه در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام شد. در ۲۷ مهر ماه بذرهای سه رقم جو (رقم کارون حساس به سرما، فصیح نیمه متحمل به سرما و ماکویی متحمل به سرما) در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، با عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۸ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۱۰ دقیقه شرقی با ارتفاع ۱۳۰۰متر از سطح دریای آزاد، کشت شدند. برای کشت از بذرهایی با قوه نامیه ۹۹ درصد و ضدعفونی شده با قارچ‌کش کاپتان استفاده شد. پس از گذشت ۲۰ روز از سبز شدن گیاهان، چندین گیاه شاداب و سالم انتخاب و به آرامی و بدون آسیب به ریشه، از عمق ۲۵ سانتی‌متری از خاک خارج شدند و سه گیاه در هر گلدان حاوی مخلوطی از خاک مزرعه، ماسه و خاک برگ (نسبت ۱:۱:۱) مجدد کشت شده و سپس گلدان‌ها آبیاری شدند و پس از خروج آب اضافی از گلدان‌ها، به آزمایشگاه منتقل شدند. برای هر تیمار سه گلدان با چهار تکرار در نظر گرفته شد.

گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های جو به مدت ٤٨ ساعت درون ژرمیناتور، تحت دمای ٤، ٨ و ٢٢ ، قرار داده شدند (Longo et al., 2017). بعد از ٤٨ ساعت برگ‌های سالم انتهایی چند بوته جدا شده و در نایلون‌های درب‌دار قرار داده شد و سپس در نمونه با فویل آلومینیومی پوشانده و در داخل نیتروژن مایع (دمای ۱۸۰- درجه سلسیوس) برای اندازه‌گیری بعضی از صفات، نگهداری شدند.

مقدار انتقال الکترون و کارایی کوانتومی فتوسیستم II: بلافاصله پس از خارج کردن گلدان‌ها از ژرمیناتور

اندازه‌گیری پارامترهای فلورسانس کلروفیل از محل میانه برگ و بین رگبرگ اصلی و لبه آخرین برگ توسعه یافته هر گیاه با استفاده از دستگاه فلوریمتر (Florimeter) مدل PAM 2500-Walz, Germany صورت گرفت (Yaghoubian et al., 2016). بدین‌منظور، برگ‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند، با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری فلورسانس، نور قرمز به برگ تابانده شد. فلورسانس حداقل (F_0) با همه‌ی مراکز واکنشی باز فتوسیستم II و فلورسانس حداکثر (Fm) با همه‌ی مراکز واکنشی بسته فتوسیستم II در برگ‌های سازگار به تاریکی و در مرحله بعد میزان فلورسانس پایدار (Ft)، فلورسانس حداقل (F_0') و حداکثر (Fm) در برگ‌های سازگار شده به روشنایی تعیین شد. با استفاده از پارامترهای تعیین شده در برگ‌های سازگار شده به تاریکی و روشنایی، میزان فلورسانس متغیر (Fv)، حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm)، کارایی کوانتومی فتوشیمیایی بر اساس جدول ۱ محاسبه شد.

جدول ۱: مؤلفه‌های بیوفیزیکی اندازه‌گیری شده فلورسانس کلروفیل و معادلات مربوط به آنها (Klughammer and Schreiber, 2008)

مؤلفه	شناسه	معادله
فلورسانس متغیر	Fv	$Fm-F_0$
حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II	Fv/Fm	$(Fm-F_0)/Fm$
کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II	Y(II)	$(Fm-Ft)/Fm'$

استخراج و اندازه‌گیری رنگیزه‌ها: برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a، b و کل از روش Arnon (۱۹۵٤) استفاده گردید که برای این منظور ۱۰۰ میلی‌گرم (۰/۱ گرم) وزن‌تر برگ به دقت توزین در داخل هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد خوب ساییده گردید. سپس عصاره حاصل به لوله‌های سانتریفوژ انتقال و به محلول درون لوله اضافه گردید. سپس لوله‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ٦۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. محلول فوقانی به بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتر انتقال یافته و حجم آن توسط استن ۸۰ درصد به ۲۵ میلی‌لیتر رسید. اندازه‌گیری رنگیزه‌ها با روش اسپکتروفتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UNICO- 2100 UV/Vis ساخت آمریکا)، انجام گرفت. به این ترتیب که مقدار جذب محلول‌ها در طول موج ٦٤٥ و ٦٦٣ نانومتر خوانده شد. در نهایت با احتساب ۲۵ میلی‌لیتر حجم نهایی، مقادیر کلروفیل به میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر برگ تبدیل شد و غلظت کلروفیل a، b و کل با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید:

معادله (۱)

$$Chl\ a\ (mg\ g^{-1}\ F.W.) = (12.68 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}) \times V/W$$

معادله (۲)

$$Chl\ b\ (mg\ g^{-1}\ F.W.) = (22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}) \times V/W$$

معادله (۲)

$$Chl\ a + b\ (mg\ g^{-1}\ F.W.) = (2.02 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}) \times V/W$$

این فرمول chl a، chl b و chl a+b به‌ترتیب میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کل است که برحسب عصاره گیاهی، V حجم نهایی استن مصرفی بر حسب میلی‌لیتر و W وزن بافت‌تر است.

میزان پراکسیدهیدروژن (H_2O_2): میزان H_2O_2 بر اساس روش توصیف شده توسط حبیبی و حاجی‌بلند (Habibi and Hajiboland, 2012) سنجش شد. محلول استخراج برگ‌ها محلول‌تری کلرواستیک اسید

(۰/۱ درصد وزنی به حجمی) بود. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده و روشناور مورد استفاده قرارگرفت. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل ۱۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) و یک مولار یدید پتاسیم اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ٦۰ دقیقه در تاریکی به‌منظور انجام واکنش قرارگرفت. جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل CamSpec M501, UV/Visible، ساخت انگلستان)، اندازه‌گیری شد. مقادیر براساس منحنی استاندارد H_2O_2 در محدودهٔ صفر تا ۵۰ نانومول محاسبه شد.

اندازه‌گیری مالوندی‌آلدئید (MDA): سنجش مالوندی‌آلدئید به‌عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس روش بومیناتان و دوران (Boominathan and Doran, 2002) صورت گرفت. عصارهٔ برگ در محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) استخراج شده و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. نسبت ۱ به ٤ از روشناور با محلول ۲۰ درصد از تری کلرواستیک اسید حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید در لولهٔ آزمایش باهم مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس قرارگرفت. سپس لوله‌ها به‌سرعت در یخ سرد شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. علاوه‌بر این هم‌زمان عصاره‌های برگ محلول‌های استاندارد در محدودهٔ صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۱،۳،۳- تترا اتوکسی پروپان تهیه شده و جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدلCamSpec M501, UV/Visible، ساخت انگلستان)، مورد اندازه‌گیری قرارگرفت. در نهایت میزان مالوندی‌آلدئید نمونه‌ها برحسب نانومول بر گرم وزن‌تر محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) مطابق روش جیاناپولیتیس و رایس (Giannopolitis and Ries, 1977) و براساس درصد ممانعت از احیاء NBT به ترکیب ارغوانی رنگ دی فورمازان بوسیله‌ی رادیکال سوپراکسید ($O2^{-\bullet}$) حاصل از فتولیز ریبوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش سایمون و همکاران (Simon et al., 1974) و براساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در ۲٤۰ نانومتر مورد اندازه‌گیری قرارگرفت. فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) از طریق تست گایاکول و تبدیل آن به تتراگایاکول به انجام رسید. نمونه‌ها در نیتروژن مایع پودر شده و عصارهٔ آنزیمی در بافر فسفات پتاسیم با میزان ۱۰ میلی‌مولار و pH =۷ استخراج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. سنجش فعالیت آنزیم در بافر فسفات پتاسیم با غلظت ۱۰ میلی‌مولار حاوی پنج میلی‌مولار از H_2O_2 و چهار میلی‌مولار از گایاکول به انجام رسید. واکنش با افزودن عصارهٔ آنزیمی در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس آغاز شده و جذب نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در طول موج ٤۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل CamSpec M501, UV/Visible، ساخت انگلستان)، اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی تتراگایاکول برحسب واحد میکرومولار تتراگایاگول بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد (Kato and Shimizu, 1987).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

طرح آزمایشی مورد استفاده، طرح پایه کاملاً تصادفی بود. نتایج ثبت شده برای مقایسه میانگین، میانگین سه تکرار در هر تیمار آزمایش بود (که برای هر واحد آزمایشی (پلات) جهار گلدان در نظر گرفته

شد به‌طوری‌که برای هر تیمار ۱۲ گلدان وجود داشت). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد (P <۰/۰۵) مورد مقایسه قرار گرفتند.

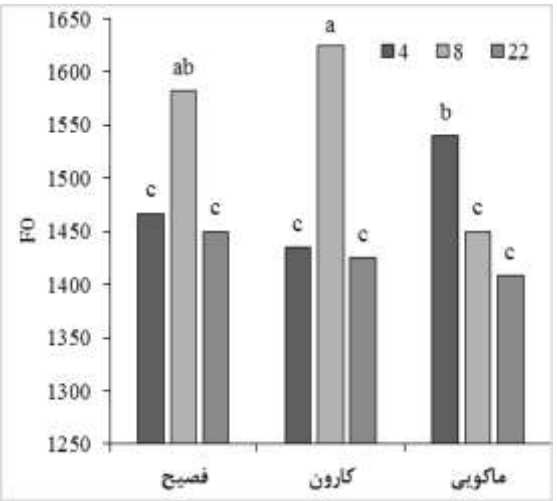
نتایج

تاثیر دما بر مؤلفه‌های بیوفیزیکی اندازه‌گیری شده فلورسانس کلروفیل: نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به پارامترهای فلورسانس کلروفیل نشان داد که اثر اصلی رقم بر Fm؛ اثر اصلی دما بر PAR و اثر متقابل رقم × دما بر پارامترهای F0، Fv، Fm/Fv معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تغییرات F0 در ارقام کارون و فصیح با رقم ماکویی نسبت به تغییر درجه حرارت متفاوت بود به این ترتیب که بالاترین مقدار F0 در رقم فصیح و کارون از دمای ۸ درجه و در رقم ماکویی از دمای ٤ درجه به‌دست آمد (شکل ۱). ضمن آن‌که تغییرات Fm فقط تحت تاثیر رقم بود و رقم ماکویی بالاترین Fm را نشان داد (شکل ۲). اما تغییرات مقدار PAR نیز تحت تاثیر رقم قرار نگرفت اما با افزایش درجه حرارت مقدار PAR افزایش یافت (شکل ۳). مقدار Fv در هر سه رقم در ۲۲ درجه نسبت به ۸ و ٤ درجه بالاتر بود و بین دماها در ارقام کارون و ماکویی تفاوت معنی‌دار وجود داشت اما در رقم فصیح بین دمای ۲۲ و ۸ تفاوت معنی‌دار نبود (شکل ٤). به‌طور کلی مقدار مشاهده شده برای نسبت Fm/Fv در تمام تیمارها بدون توجه به مقاوم یا حساس بودن رقم در دامنه بین ۰/۵۹٤ تا ۰/۸۹۳ بود که در رقم ماکویی و فصیح با افزایش درجه حرارت این نسبت افزایش یافت و حداکثر نسبت Fm/Fv و Fv نیز در رقم ماکویی تحت دمای ۲۲ درجه مشاهده شد (شکل ۵). مولفه Y(II) نیز تحت برهمکنش دما و رقم قرار گرفت (جدول ۲) و مقایسه میانگین نشان داد که کاهش دما مقدار Y(II) را نیز در هر سه رقم کاهش داد و رقم ماکویی نسبت به رقم فصیح و کارون در دمای ۸ و ۲۲ درجه سلسیوس، کارایی کوانتومی بالاتری نشان داد. علاوه براین در مقدار Y(II) بین دمای ٤ و ۸، در رقم فصیح و کارون، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد اما این تفاوت در رقم ماکویی معنی‌دار بود و بیشترین مقدار Y(II) در رقم ماکویی تحت دمای ۲۲ درجه به‌دست آمد اگرچه در همین دما با رقم فصیح به لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل ٦).

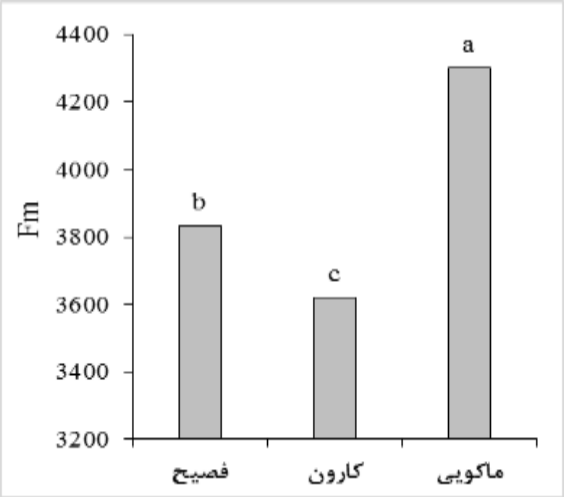
جدول ۲: انالیز واریانس اثر دماهای مختلف بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل یا کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II ارقام جو

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		F0	Fv	Fm	Fv/Fm	PAR	Y(II)
رقم (C)	۲	۵۱۷۹*	۷۵۸۳٦ns	۷۰۸۱۱٤**	۰/۰۲٦ns	۱۸۹٦۹ns	۰/۱۳۱ns
دما (T)	۲	۳٦٦۸٤**	۱٦۳۹۰۳۰**	۵۲۰۷ns	۰/۱٤۱**	٤۰۹۹۵۲*	۰/٤۸۹*
C × T	٤	۲٦۹٦۹**	۷۲٤٦۹۷**	۳۷۲۳٦ns	۰/۰۵۳**	۱۸۱۱۵۵ns	۰/۳۹۸*
خطا	۲۷	۱۱۸۵	٤۵۹۳۵	۵۲۷۱۱	۰/۰۱۰۷	۸۳۰۹۸	۰/۱۰۱۸
ضریب تغییرات (٪)	-	۲۱/۳۱	۱٦/۳۵	۸/۳۹	۱۲/٤۹	۱۷/۰۸	۲۸/۵٦

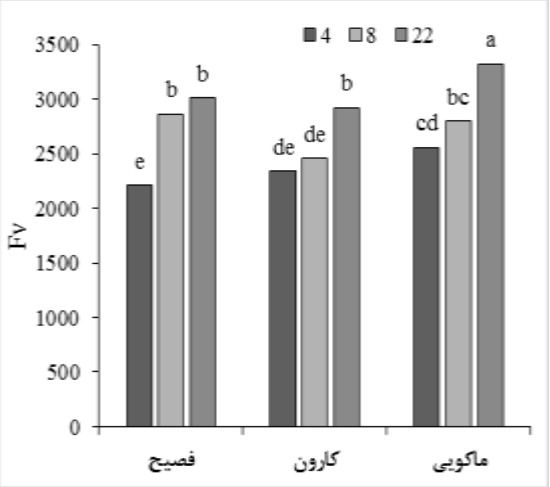
** و * به‌ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک و پنج درصد؛ ns عدم تفاوت معنی دار



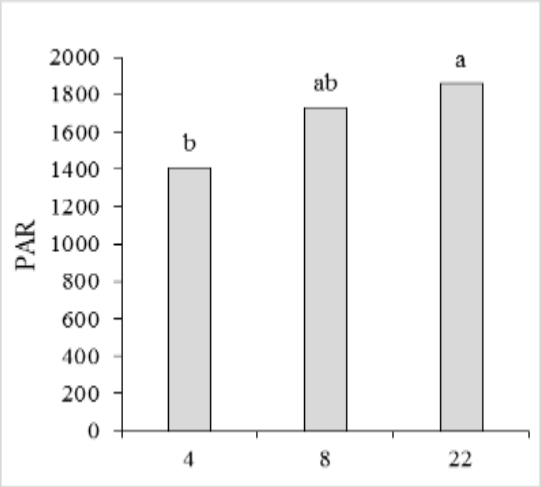
شکل ۱: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر مقدار F0



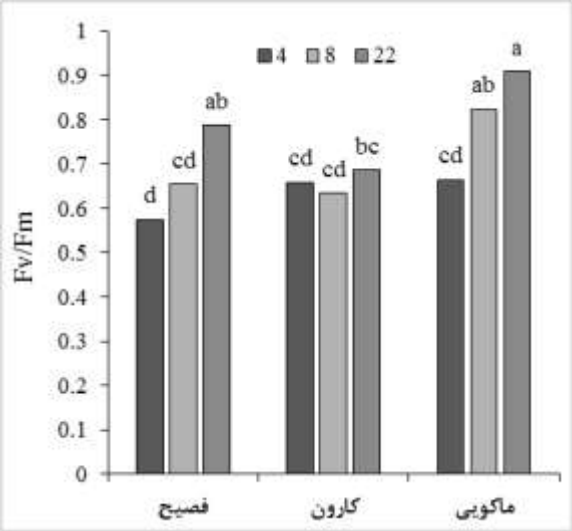
شکل ۲: مقایسه میانگین اثر اصلی رقم بر مقدار Fm



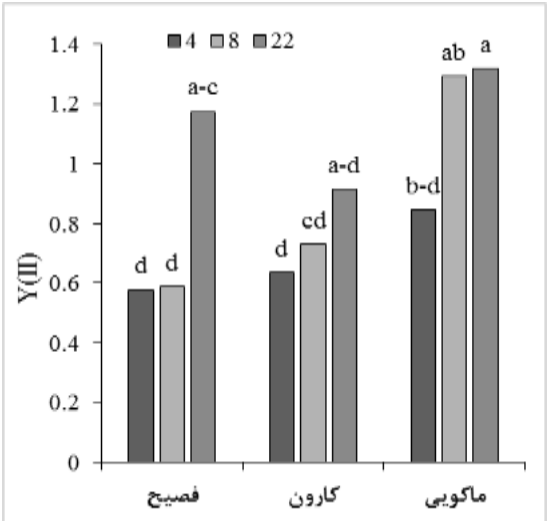
شکل ٤: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر مقدار Fv



شکل ۳: مقایسه میانگین اثر اصلی دما بر مقدار PAR



شکل ۵: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر Fv/Fm



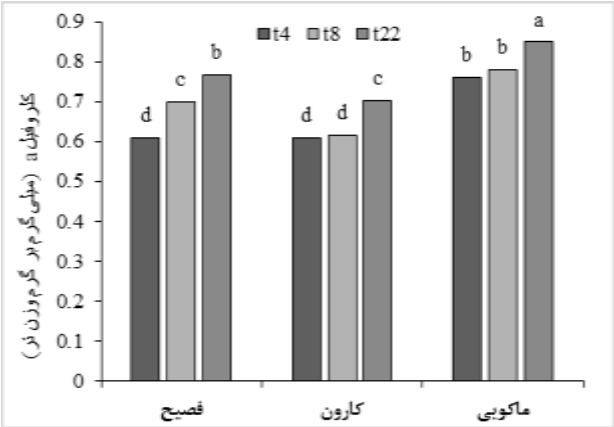
شکل ٦: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر Y(II)

جدول ۳: آنالیز واریانس اثر دماهای مختلف بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ ارقام جو

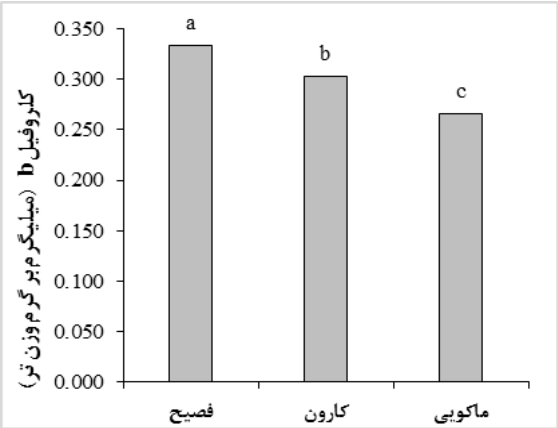
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل
رقم (C)	۲	۰/۰۲۹۲**	۰/۰۱۸۲**	۰/۰۳۶۱**
دما (T)	۲	۰/۰۱۰٤**	۰/۰۰۱۳ns	۰/۰۰۱٦ns
C × T	٤	۰/۰۱۳۹**	۰/۰۰۰٤ns	۰/۰۲۱*
خطا	۲۷	۰/۰۰۰۲٤	۰/۰۰۲٤	۰/۰۰٦۲
ضریب تغییرات (٪)	-	۱۵/۱٤	۱٦/۳۳	۷/۷٤

** و * به‌ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک و پنج درصد؛ ns عدم تفاوت معنی دار

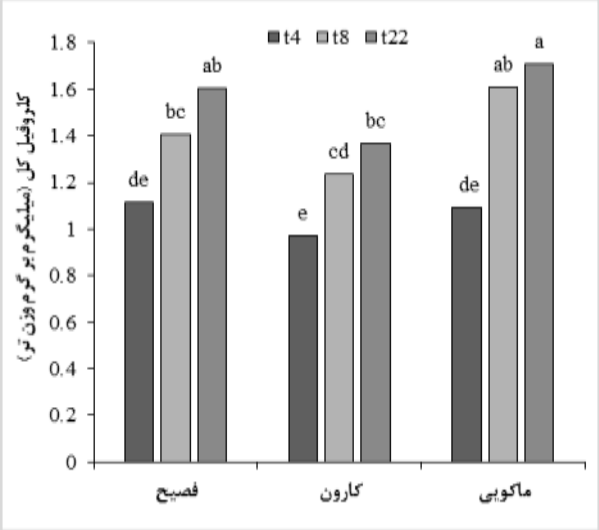
محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ: نتیجه حاصل از تجزیه واریانس محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که اثر متقابل دما و رقم بر محتوای کلروفیل a و کل و اثر اصلی رقم بر کلروفیل b معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین نشان داد که اگرچه در هر سه رقم بیشترین محتوای کلروفیل a در دمای ۲۲ درجه مشاهده شد اما فقط در رقم فصیح بین هر سه دما تفاوت معنی‌دار وجود داشت و در رقم ماکویی و کارون با تغییر دما از ۲ به ۸ درجه تغییر معنی‌دار در مقدار کلروفیل a دیده نشد (شکل ۷). بیشترین مقدار کلروفیل b نیز در بین ارقام جو، از رقم فصیح (۰/۳۳۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین آن در رقم ماکویی (۰/۲٦۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، به‌دست آمد (شکل ۸). مقدار کلروفیل کل نیز در هر سه رقم با افزایش دما افزایش یافت و در هر سه دما کمترین مقدار کلروفیل کل در رقم کارون مشاهده شد اگرچه به لحاظ آماری با برخی از تیمارها تفاوت معنی‌دار نداشت. نکته مورد توجه این است که در رقم ماکویی مقدار کلروفیل کل با تغییر دما از ٤ به ۸ درجه، ٤۳/۵ درصد (از ۸ به ۲۲ درجه، ٦/۷ درصد افزایش)، افزایش یافت که نشان‌دهنده کارایی بالاتر رقم ماکویی در تولید کلروفیل کل دماهای پایین، نسبت به دو رقم دیگر، است (شکل ۹).



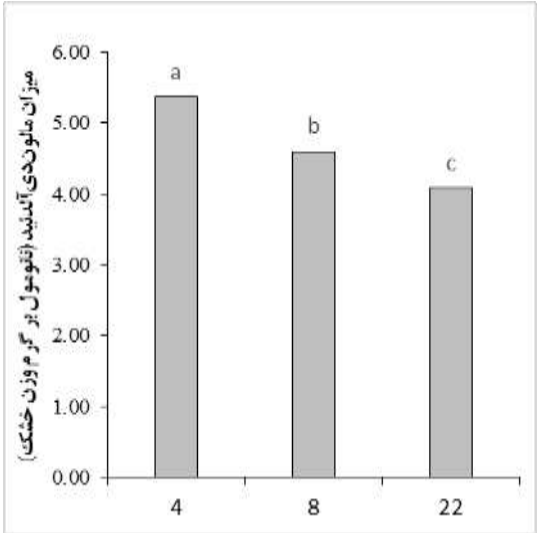
شکل ۷: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر مقدار کلروفیل a



شکل ۸: مقایسه میانگین اثر اصلی رقم بر مقدار کلروفیل b



شکل ۹: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر مقدار کلروفیل کل



شکل ۱۰: مقایسه میانگین اثر اصلی دما بر میزان مالون‌دی‌آلدئید برگ

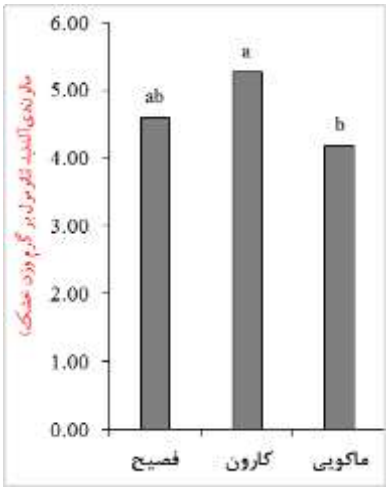
میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو: نتایج نشان داد که بین ارقام و دماهای مختلف تفاوت معنی‌دار از نظر مقدار MDA وجود داشت (جدول ٤). مقایسه میانگین MDA نشان داد که با کاهش دما مقدار MDA به‌طور معنی‌دار افزایش یافت (شکل ۱۰) و بین ارقام نیز رقم کارون بیشترین MDA را نشان داد (شکل ۱۱). مقدار فعالیت آنزیم CAT و SOD فقط تحت تأثیر دما قرار گرفت و بین ارقام تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ٤). مقایسه میانگین فعالیت SOD نشان داد که بین دمای ۲۲ و ۸ درجه به لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار وجود نداشت اما تیمار دمای ٤ درجه به‌طور مهنی‌دار فعالیت SOD را افزایش داد (شکل ۱۲). مقایسه فعالیت CAT تحت تیمارهای دمایی نیز نشان داد که فعالیت کاتالاز در دمای ۸ درجه نسبت به دمای ٤ و ۲۲ درجه به‌ترتیب ۱۳ و ۲۹ درصد، فعالیت بیشتری داشت (شکل ۱۳). جدول ٤ نشان می‌دهد که اثر برهمکنش رقم و دما بر میزان H_2O_2 معنی‌دار بود و مقایسه میانگین آن نشان داد که در دمای ٤ و ۸ درجه در هر سه رقم تفاوت معنی‌دار وجود داشت ولی در دمای ۲۰ درجه بین ارقام تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد، ضمن آن که بیشترین میزان H_2O_2 در رقم کارون تحت دمای ٤ درجه مشاهده شد (شکل ١٤).

بررسی مقدار فعالیت آنزیم POX نشان داد که تحت تأثیر برهمکنش رقم و دما قرار گرفت و در هر سه رقم، کاهش دما به‌طور معنی‌دار فعالیت POX را افزایش داد. بیشترین فعالیت POX در رقم فصیح تحت دمای ٤ درجه (١/٦٥ میکرومول بر میلی‌گرم بر پروتئین)، مشاهده شد اما در دمای ۸ و ۲۲ درجه رقم کارون بیشترین فعالیت POX را نشان داد (شکل ۱۵).

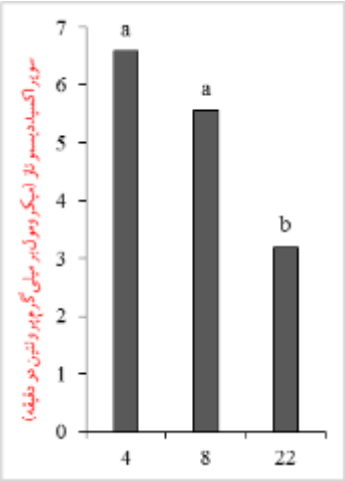
جدول ٤: آنالیز واریانس اثر دماهای مختلف بر میزان مالون‌دی‌آلدئید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ارقام جو

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA)	میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2)	فعالیت انزیم کاتالاز (CAT)	فعالیت انزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)	فعالیت انزیم پراکسیداز (POX)
رقم (C)	۲	۳/۵۳*	٥٦/٨٤ns	۱۰/۳۳*	۲/۲۲٥**	۰/۸۰۳**
دما (T)	۲	٥/۰٤*	۱۸۹/٦*	۷/۰۲ns	۰/۲۸۳ns	۰/۳۳۲**
C × T	٤	۰/۳۸ns	۳۲۱/۳**	٤/۰۸۳ns	۰/۰۹۹۲ns	۰/٤۹۳**
خطا	۲۷	۰/۹۱٦	٤۰/٥۳	۲/٥۰۹	۰/۲۷٥	۰/۰۲۲٥
ضریب تغییرات (٪)	-	۲۰/٤٥	۱۹/٤۲	۷/۰٦	۹/٤۷	۱٥/۱۸

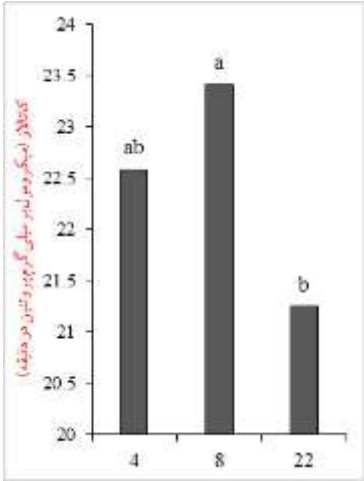
** و * به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد؛ ns عدم تفاوت معنی‌دار



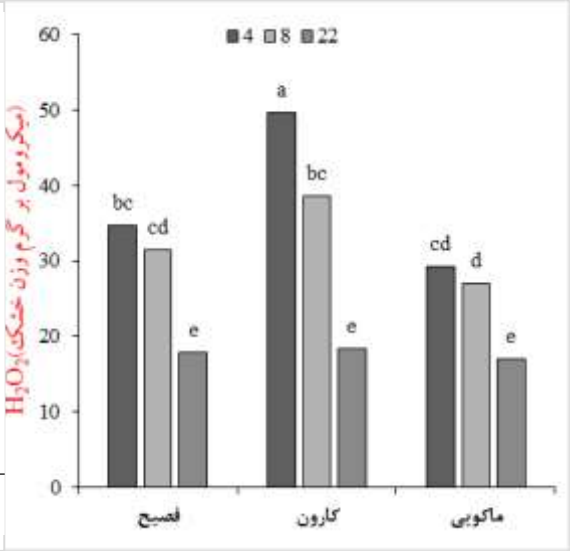
شکل ۱۱: مقایسه میانگین اثر اصلی رقم بر مقدار مالون دی‌آلدئید



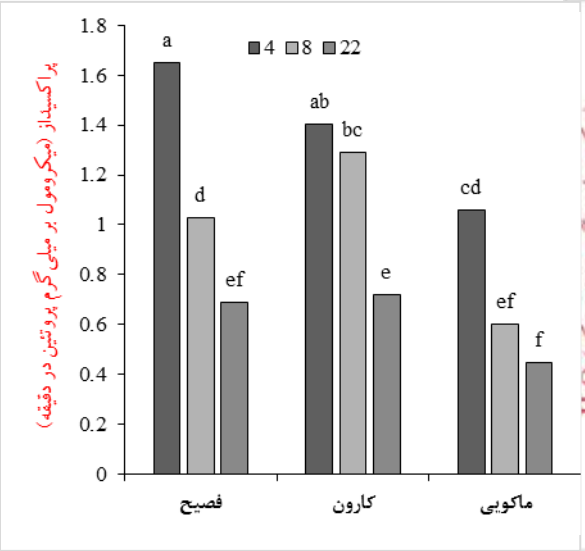
شکل ۱۲: مقایسه میانگین اثر اصلی دما بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز



شکل ۱۳: مقایسه میانگین اثر اصلی دما بر فعالیت آنزیم کاتالاز



شکل ١٤: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر مقدار H_2O_2



شکل ۱۵: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز

همبستگی ساده بین صفات: نتایج حاصل از همبستگی ساده بین صفات اندازه‌گیری شده در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج نشان داد که بین مولفه Fv/Fm با فعالیت آنزیم کاتالاز، کلروفیل a، Fv، Y(II) و PAR همبستگی مثبت معنی‌دار وجود داشت اما با YNO، کلروفیل b و مالون‌دی‌آلدئید همبستگی منفی معنی‌دار نشان داد. میزان کلروفیل a با میزان مالون‌دی‌آلدئید و H_2O_2 همبستگی منفی معنی‌دار، اما با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همبستگی مثبت معنی‌دار، داشت. کلروفیل a بیشترین همبستگی مثبت معنی‌دار را با کلروفیل کل (r^2 = ۰/۹۲۲)، آنزیم کاتالاز (r^2 = ۰/۸۶۱) و Fv (r^2= ۰/۷۰۸)، نشان داد (جدول ۵).

جدول ۵: همبستگی ساده (رگرسیون) بین صفات اندازه‌گیری شده ($r^2 = \pm1$)

	(۱)	(۲)	(۳)	(٤)	(٥)	(٦)	(٧)	(٨)	(٩)	(١٠)	(١١)	(١٢)	(١٣)	(١٤)
(۲)	-۰/۸٤۲**	۰/۰۰۱												
(۳)	۰/۸٤۷**	-۰/۹٤۳**	۰/۰۰۱											
(٤)	-۰/۸۲۱**	۰/۸۹٦**	۰/۹٤۳**	۱/۰۰۰										
(٥)	-۰/۷۲٤**	۰/٦۷۰**	-۰/۷۳۱**	۰/٦٦۹**	۱/۰۰۰									
(٦)	۰/۳۰۱	-۰/۳٦٦*	۰/۵۳۰**	-۰/۳٦٦*	-۰/۳۲۷*	۱/۰۰۰								
(۷)	۰/۲٤۲	-۰/۲۱۰	۰/۵۱۱**	-۰/۲۰۵	-۰/٤۱٤*	۰/۵۷۸**	۱/۰۰۰							
(۸)	۰/۵٦۷**	-۰/٤٦۳**	۰/٤۸۵**	۰/۵۳٦**	۰/۵۸۳**	۰/٦۵۷**	۰/۷۰۸**	۱/۰۰۰						
(۹)	۰/۲۸۰	۰/۱۸۸	-۰/۳۷۰*	-۰/۱۸۷	-۰/۳۱۳	-۰/٤۷۹**	-۰/۰٤٤	-۰/٤۰٤*	۱/۰۰۰					
(۱۰)	-۰/۰۹٦	۰/۱٦۱	۰/۱۲۱	۰/۱٦۲	۰/۰۷۸	۰/۳۰٤	۰/۸۰٦**	۰/۹۲۲**	۰/٤۳۸**	۱/۰۰۰				
(۱۱)	-۰/۷٤۲**	-۰/۳۸۳*	-۰/۵۹۲**	-۰/۷۱۲**	-۰/۵۹٦**	۰/۰۱۵	-۰/۱۹۲	-۰/۲۹۲	-۰/۲٦٦	۰/٤۳٤**	۱/۰۰۰			
(۱۲)	-۰/۳٦٦*	۰/۳۷۲*	۰/۵۳۷**	۰/۳۷۸*	۰/۷۲٤**	-۰/٤۹۱**	-۰/٦۰۸**	۰/۳۸٦*	۰/٤۹۲**	-۰/۱۵۳	-۰/۵۲۱**	۱/۰۰۰		
(۱۳)	۰/۱۲٦	۰/۰۸۲	۰/۰۸۹	۰/۰۸۳	-۰/۵۰۳**	-۰/۱۰٤	۰/٤۳۲**	۰/۸٦۱**	۰/۱۵۳	۰/۳۷٦*	-۰/۲۱۷	۰/۵۸۵**	۱/۰۰۰	
(۱٤)	۰/۲٦٤	-۰/۱۱۳	۰/۰۳۳	-۰/۱۱۳	-۰/۱۸۹	-۰/۱۳۹	-۰/۱۳۱	۰/۱۵۱	-۰/۱۹۵	۰/۰۱٦	-۰/۱٤٤	۰/۲۵٦	۰/۱۱۱	۱/۰۰۰
(۱۵)	-۰/٤۷۸**	۰/۱٤۲	-۰/۲۹٦	۰/۱٤۲	۰/۱٦۹	-۰/۰۵٦	۰/۲۱۷	-۰/۵۲۸**	۰/۵۳۱**	۰/۳۱٤	۰/۰۹۹	-۰/۲۹٦	-۰/۱٦۵	-۰/٤۸۷**

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد.

(۱): F0، (۲): Fm، (۳): Fv/Fm، (٤): PAR، (٥): YNO، (٦): Y(II)، (۷): Fv، (۸): کلروفیل a، (۹): کلروفیل b، (۱۰): کلروفیل کل، (۱۱): مالون‌دی آلدئید، (۱۲): سوپراکسیددیسموتاز، (۱۳): کاتالاز، (١٤): پراکسیداز، (١٥): H_2O_2.

بحث

بازدارندگی نوری با کاهش کارآیی مصرف فوتون‌ها به وسیله فتوسیستم II مشخص می‌شود. کاهش کارآیی فتوسیستم II در دو وضعیت رخ می‌دهد: اول زمانی که برگ‌ها به‌طور ناگهانی در معرض نور شدید قرار گیرند که به مرکز فتوسیستم IIصدمه می‌زند و دوم وقتی که در معرض تنش واقع شوند (Jedmowski and Brüggemann, 2015; Zhang et al., 2016). در این حالت، کاهش مربوط به افزایش شدید انرژی برانگیختگی غیرتشعشعی می‌شود که منجر به آزادسازی انرژی به‌صورت حرارتی می‌شود (Mohammad et al., 1996; Kalaji et al., 2011). از آنجایی که دماهای پایین سرعت جذب CO_2 را کاهش می‌دهند، الکترون‌های فعالی که از طریق جریان الکترون خطی از فتوسیستم II منتقل می‌شوند در فتوسیستم I تجمع می‌یابند، این پدیده به تولید رادیکال‌های هیدروکسیل و کاهش بیش از حد گیرنده‌ها در فتوسیستم II منتهی می‌شود (Sonoike 2006). در نتیجه، تحت دماهای سرد، سمت گیرنده فتوسیستم I توسط رادیکال‌های هیدروکسیل اکسیداتیو مورد حمله قرار گرفته و فتوسیستم I آسیب می‌بیند (Zhang and Scheller, 2004). Yang و همکاران (۲۰۱۷)، با ارزیابی اثر تنش دماهای پایین بر سه گونه *Paphiopedilum* گزارش کردند که آسیب رادیکال‌های هیدروکسیل اکسیداتیو به فعالیت فتوسیستم I می‌تواند متعاقباً منجربه مهار نوری فتوسیستم II و حتی مرگ گیاه شود (Suorsa et al. 2012). نتایج مشابهی نیز طی بررسی‌های مختلف گزارش شده است (Rizza et al., 2011; Begovic et al., 2020). شاخص F_0 که بیانگر سطحی از فلورسانس در زمانی است که پذیرنده کینون (QA) در بالاترین مقدار شرایط اکسیداسیونی قرار دارد به‌عبارت دیگر مراکز فتوسیستم II باز هستند

(Dai et al., 2007). نتایج ما در این پژوهش نشان داد که برهمکنش رقم و سرما بر F_0 معنی‌دار بود، این در حالی است که مقایسه ارقام نشان داد مقدار فلورسانس حداقل در رقم کارون و فصیح در ۸ درجه و در رقم ماکویی در ٤ درجه مشاهده شد و در مجموع رقم کارون میانگین بالاتری داشت که مقادیر کمتر آن نشان می‌دهد که فعالیت‌های فتوسنتزی و تثبیت گاز کربنیک (CO_2) به نحو مطلوب‌تری در جریان هستند یا به عبارتی ممکن است انتقال الکترون سریع‌تر آغاز شده باشد. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین مولفه‌های فلورسانس کلروفیل، به‌ویژه F_0، با کلروفیل a و کل نیز بر همین موضوع دلالت دارد. علاوه‌بر این بیشترین مقدار F_m در رقم ماکویی مشاهده شد، یعنی کارآیی کوانتومی فتوسیستم II برای تبدیل انرژی نور جذب شده به انرژی شیمیایی در رقم ماکویی نسبت به دو رقم دیگر بالاتر می‌باشد. F_m در اثر تابش فوتون‌های نوری و احیای همه ناقل‌های الکترون و بسته بودن (اشباع) همه مراکز واکنشی ایجاد می‌شود (Doğru and Çakirlar, 2020). وقتی همه مراکز واکنشی فتوسیستم II بسته است، نشان دهنده افزایش تدریجی عملکرد فلورسانس و کاهش سرعت واکنش‌های فتوشیمیایی است و هرچه سیستم دیرتر بسته شود، یعنی قادر باشد تعداد الکترون‌های بیشتری را بپذیرد، F_m آن بالاتر یا سیستم کاراتر خواهد بود (Zhou et al., 2018). Takahashi و همکاران (۲۰۱٦) اظهار نمودند که تنش به تنهایی تغییرات معنی‌دار در F_m ایجاد نمی‌کند. در حالی که Li و همکاران (۲۰۱۹) مشخص کردند که F_m توسط تنش‌های محیطی دچار تغییراتی می‌شوند که علت آن دگرگونی ساختار و تغییر در رنگیزه‌های فتوسیستم II می‌باشد. همچنین پارامتر F_v/F_m به عنوان یک ابزار موثر در کشف آسیب‌های وارده به دستگاه فتوسنتز کننده قبل از آشکار شدن آن در مورفولوژی گیاه ارزیابی می‌شود و شاخص مناسبی برای بازدارندگی نوری است (Zhang et al., 2016). این نسبت نشان‌دهنده پتانسیل عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (PSII) می‌باشد و مقدار آن برای گیاهانی که در شرایط تنش قرار ندارند، در گزارش‌های مختلف بین ۰/۸٦-۰/۷۱ گزارش شده است (Sayed, 2003; Mishra et al., 2011) و هرگونه تغییر در ورای این دامنه می‌تواند حاکی از فتواکسیداسیون نوری و آسیب رسیدن به مراکز واکنش فتوسیستم II و یا شاخص تنش باشد، که همبستگی مثبت و معنی‌دار بین کلروفیل a و نسبت F_v/F_m مبین همین مطلب می‌باشد. برخی از محققین نیز گزارش کردند که ارقام متحمل به سرما جو نسبت F_v/F_m بالاتری نسبت به ارقام حساس دارند، به عبارت دیگر، کارآیی سیستم نوری II در رقم مقاوم بیشتر بوده است (Jedmowski and Brüggemann, 2015). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که در هر سه رقم فلورسانس متغیر (F_v) و F_v/F_m با کاهش دما کاهش یافت و این کاهش در رقم ماکویی متحمل به سرما، کمتر بود. Kalaji و همکاران (۲۰۱۸) نیز نتیجه گرفتند که مقدار بالاتر نسبت F_v/F_m در برگ‌های جو مقاوم نسبت به برگ‌های ارقام حساس نشان می‌دهد که ظرفیت فتوسنتزی و سرعت تثبیت دی‌اکسیدکربن در برگ‌های ارقام مقاوم بیشتر است. Vasilescu و Petcu (۲۰۱۸) نیز نشان دادند گیاه جو توان حفظ کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II در طی ساعات اولیه کاهش دما را داشته ولی مقادیر این پارامتر به دلیل خسارت وارده به مراکز واکنش فتوسنتزی کاملاً به مقادیر قبل از تنش نرسید. Majdi و همکاران (۲۰۰۸) نیز کاهش شاخص‌های حداکثر فلورسانس کلروفیل (F_m) و کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II در ارقام بهاره گندم را دلیل افزایش خسارت سرما در گیاهان ذکر کردند. در مطالعه‌ایی مشابه نیز، Hajihashemi و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اثر تنش سرما بر تغییرات فیزیولوژیکی ارقام استویا (*Stevia*

rebaudiana) گزارش کردند که نش سرما حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) را در همه ارقام کاهش داد که در ارقام حساس بارزتر بود و علاوه‌بر این راندمان فتوسیستم I و II با کاهش دما، کاهش یافت، اما کاهش راندمان فتوسیستم I نسبت به فتوسیستم II به‌طور معنی‌دار کمتر بود.

یکی دیگر از پارامترهای فیزیولوژیکی متأثر از سرما، محتوای کلروفیل برگ است (Nezami et al., 2013). برخی گیاهان در طول تنش سرما میزان کلروفیل خود را حفظ می‌کنند و در برخی دیگر میزان کلروفیل کاهش می‌یابد. در این مطالعه، روند کاهشی معنی‌دار در مقدار کلروفیل a در دمای ٤ و ٨ درجه نسبت به ۲۲ درجه مشاهده شد، البته در این روند کاهشی بین دمای ٤ و ٨ درجه تفاوت معنی‌دار وجود نداشت، این کاهش را می‌توان به علت از بین رفتن آنزیم‌های بیوسنتزی رنگیزه‌های فتوسنتزی و همچنین القای تجزیه شدن یا مهار سنتز آن‌ها در شرایط تنش نسبت داد (Marečková et al., 2019). آنزیم گلوتامات لیگاز از جمله این آنزیم‌هایی است که نقش مهمی در سنتز کلروفیل دارد و کاهش سنتز کلروفیل تحت شرایط سرما به دلیل ممانعت از فعالیت آنزیم گلوتامات لیگاز می‌باشد (Apostolova et al., 2008). از دلایل دیگر کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی را می‌توان عموماً به تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی، فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها، واکنش آنها با رادیکال‌های آزاد اکسیژن و اختلالات هورمونی نسبت داد (Marečková and Barták, 2017). تخریب مولکولی کلروفیل به علت جدا شدن زنجیره فیتولی از حلقه پورفیرین در اثر ROS و یا آنزیم کلروفیلاز صورت می‌گیرد. بنابراین ابتدایی‌ترین و معنی‌دارترین تغییر در ساختار سلولی، تخریب ساختاری کلروپلاست است که در آن فرآیند متابولیکی تجزیه کلروفیل و ماکرومولکول‌های دیگر رخ می‌دهد (Heidarv and Amiri, 2010). به‌طور کلی می‌توان گفت که کاهش در مقادیر کلروفیل، به‌ویژه کلروفیل a، تحت سرما به علت تخریب بیشتر کلروفیل نسبت به سنتز آن است به‌طوری که با MDA و H_2O_2 همبستگی معکوس (منفی) معنی‌دار نشان داد. مطابق با نتایج به‌دست آمده، Dashti و همکاران (2014) نیز گزارش کردند که کاهش دمای محیط باعث کاهش کارآیی فتوسیستم II و کلروفیل a در ارقام حساس و متحمل شد، ولی میزان این کاهش در ارقام متحمل به‌صورت معنی‌دار کمتر از ارقام حساس بود. در مطالعه حاضر نیز کاهش میزان کلروفیل a تحت تیمار سرما در رقم ماکویی نسبت به رقم فصیح و کارون، کمتر بود. اما رقم کارون و فصیح نسبت به رقم ماکویی مقدار کلروفیل b بالاتری را نشان دادند. همچنین Longo و همکاران (2017)، کاهش میزان کلروفیل a و کل در اثر دماهای پایین مربوط به افزایش تولید ROS در سلول می‌باشد. این رادیکال‌های آزاد سبب پراکسیداسیون و در نتیجه تجزیه این رنگیزه‌ها می‌شوند (Nesterova et al., 2019). تحت تنش‌ها، اکسیژن موجود در پراکسی‌زوم‌ها، هیدروژن‌های حاصل از هیدروژن‌زدایی اسیدهای چرب تولید شده از فرآیند بتا-اکسیداسیون حاصل می‌شود و در نهایت به H_2O_2 تغییر می‌کند (Doğru and Çakirlar, 2020). تشکیل H_2O_2 با استفاده از فعالیت آمین‌اکسیداز در آپوپلاست نیز توسط استرس القا می‌شود (Mittler et al., 2002). افزایش سطح H_2O_2 از طریق تنش سرما در ارقام مختلف جو توسط Valizadeh-Kamran و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است، که مبین نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌باشد به‌طوری‌که مقدار H_2O_2 در هر سه رقم در دمای ٤ و ٨ درجه افزایش معنی‌دار داشت و رقم کارون بیشترین میانگین را دارا بود. با توجه به نتایج همبستگی بین صفات و بررسی روابط

صفات اندازه‌گیری شده با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین به موازات تجمع H_2O_2، افزایش فعالیت CAT و POX نیز تحت تیمار سرما مشاهده شد، که نیاز گیاه به تقویت این دفاع آنتی‌اکسیدانی را نشان می‌دهد. سطوح بالای H_2O_2 به طور مستقیم پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش می‌دهد (Yamazaki et al., 2003) و این موضوع با نتایج به‌دست آمده در مورد افزایش معنی‌دار در محتوای MDA تحت سرما مطابقت دارد و بین ارقام نیز رقم کارون افزایش معنی‌دار نسبت به رقم فصیح و ماکویی نشان داد. نتیجه مشابه، اثر سرما بر محتوای MDA، در ارقام گندم، برنج و کلزا نیز گزارش شده است (Fahimirad et al., 2013; Moieni-Korbekandi et al., 2014). از آنجایی که استرس دمای پایین بر فتوسنتز گیاه تأثیر می‌گذارد و نیاز به استفاده از نور را کاهش می‌دهد (Begovic et al., 2020)، در نتایج این مطالعه نیز کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل a و کلروفیل کل در دمای ٤ و ٨ درجه مشاهده شد. در طول تنش سرما، انتقال الکترون از فتوسیستم II به فتوسیستم I و گیرنده اصلی الکترون ($NADP^+$) مختل می‌شود و الکترون به مولکول اکسیژن منتقل می‌شود و در این لحظه، مقدار بالای کلروفیل تنها سطح ROS را بالا می‌برد (Hassibi et al., 2007). یکی از روش‌های کاهش تولید ROS، کاهش محتوای کلروفیل برگ، است که با افزایش فعالیت کلروفیلاز در گیاهان اتفاق می‌افتد (Longo et al., 2017). این آنزیم زنجیره خطی کلروفیل را از قسمت حلقوی جدا می‌کند. این زنجیره فیتول است که به عنوان پیش‌ساز آلفاتوکوفرول عمل می‌کند. علاوه بر این، در طی تجزیه کلروفیل، کلروفیل b به a تبدیل می‌شود (Liu et al., 2013). کاهش بیشتر در کلروفیل b نسبت به a و متعاقباً افزایش نسبت کلروفیل a/b نشان‌دهنده تبدیل کلروفیل b به a برای حفظ محتوای این فلاونوئید در سطح بالا در هنگام قرار گرفتن در معرض استرس سرما است. با توجه به تأثیر تنش سرما بر گیاهان برنج (Zhao et al., 2020)، جو (Nesterova et al., 2019) و کلزا (Moieni-Korbekandi et al., 2014) بیان شده است که تنش سرما باعث کاهش محتوای کلروفیل می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر هماهنگ می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج به‌دست آمده نشان داد که در هر سه رقم در دمای پایین کارایی فتوسیستم II و مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی به‌ویژه کلروفیل a کاهش، اما میزان MDA و H_2O_2 و نیز فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو افزایش یافت و در اغلب صفات بین دمای ۸ و ٤ درجه تفاوت معنی‌دار نبود. نکته مورد توجه این بود که در دمای ۸ درجه سلسیوس نیز میزان MDA و H_2O_2 و نیز فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو در مقایسه با ۲۲ درجه، بالا بود و این نشان دهنده اثر دماهای پایین بر افزایش هزینه برای گیاه جهت تحمل سرما می‌باشد. در بین ارقام نیز رقم کارون حساسیت بیشتری نسبت به دمای پایین نشان داد. برای مطالعات آتی نیز ارزیابی اثر دامنه‌های مختلف دمایی بالاتر و پایین‌تر از دمای بهینه بر ارقام متحمل و حساس، پیشنهاد می‌شود.

References

Apostolova, P., Yordanova, R. and Popova, L. (2008). Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars. Gen Apply Plant Physiology, 34(3-4):281-294.

Begovic, L., Galic, V., Abicic, I., Loncaric, Z., Lalic, A. and Mlinaric, S. (2020). Implications of intra-seasonal climate variations on chlorophyll a fluorescence and biomass in winter barley breeding program. Photosynthetica, 58(4):995-1008.

Boominathan, R. and Doran, P.M. (2002). Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumlator, *Alyssum bertoloni*. New Phytologist 156: 202-205.

Capo-chichi, L., Nyachiro, J., Juskiw, P. and Beattie A.S. (2015). Science and plants for people. The Shaw Conference Centre. Journal of Botany, (1): 25- 29.

Dai, F., Zhou, M. and Zhang, G. (2007). The change of chlorophyll fluorescence parameters in winter barley during recovery after freezing shock and as affected by cold acclimation and irradiance. Plant Physiology and Biochemistry. 45:915-921.

Dashti, M., Kafi, M., Tavakkoli, H., Mirza, M. and Nezami, A. (2014). Effects of freezing stress on Morpho-physiological indices and chlorophyll fluorescence of *Salvia leriifolia* Benth. Seedlings. Plant Reasearch Journal, 28(5): 964-973.

Doğru, A. and Çakirlar, H. (2020). Effects of leaf age on chlorophyll fluorescence and antioxidant enzymes activity in winter rapeseed leaves under cold acclimation conditions. Brazilian Journal of Botany, 43(1):11-20.

Fahimirad, S., Karimzadeh, G. and Ghanati, F. (2013). Cold-induced changes of antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. Journal of Plant Physiology and Breeding, 3(1):1-11.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutase: occurrence in higher plants. Plant Physiology, 59: 309-314.

Habibi, G. and Hajiboland, R. (2012). Comparison of photosynthesis and antioxidative protection in *Sedum album* and *Sedum stoloniferum* (Crassulaceae) under water stress. Photosynthetica, 50 (4): 508-518.

Hajihashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J. M., Djalovic, I. and Siddique, K.H. (2018). Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. Frontiers in Plant Science, 9, 1430.

Hassibi, P., Moradi, F. and Nabipour, M. (2007). Screening of rice genotypes for low temperature stress-using chlorophyll fluorescence. Iranian Journal of Crop Science, 9(1):14-31.

Heidarvand, L. and Maali Amiri, R. (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress?. Acta Physiologiae Plantarum, 32(3): 419-431.

Jedmowski, C. and Brüggemann, W. (2015). Imaging of fast chlorophyll fluorescence induction curve (OJIP) parameters, applied in a screening study with wild barley (*Hordeum spontaneum*) genotypes under heat stress. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 151:153-160.

Kalaji, H. M., Bosa, K., Kościelniak, J. and Hossain, Z. (2011). Chlorophyll a fluorescence—a useful tool for the early detection of temperature stress in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). Omics: a journal of integrative biology, 15(12): 925-934.

Kalaji, H.M., Rastogi, A., Živčák, M., Brestic, M., Daszkowska-Golec, A., Sitko, K. and Cetner, M.D. (2018). Prompt chlorophyll fluorescence as a tool for crop phenotyping: an example of barley landraces exposed to various abiotic stress factors. Photosynthetica, 56(3): 953-961.

Kato, M. and Shimizu, S. (1987). Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. Canadian Journal of Botany, 65(4):729-735.

Klughammer, C. and Schreiber, U. (2008). Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. PAM Application Notes, 1(2):201-247.

Kowalczewski, P.Ł., Radzikowska, D., Ivanišová, E., Szwengiel, A., Kačániová, M. and Sawinska, Z. (2020). Influence of abiotic stress factors on the antioxidant properties and polyphenols profile composition of green barley (*Hordeum vulgare* L.). International Journal of Molecular Sciences, 21(2): 397.

Landi, S., Capasso, G. and Esposito, S. (2021). Different G6PDH isoforms show specific roles in acclimation to cold stress at various growth stages of barley (*Hordeum vulgare*) and Arabidopsis thaliana. Plant Physiology and Biochemistry, 169:190-202.

Li, H., Li, H., Lv, Y., Wang, Y., Wang, Z., Xin, C. and Li, X. (2019). Salt priming protects photosynthetic electron transport against low temperature induced damage in wheat. Sensors, 20(1):62.

Liu, W., Yu, K., He, T., Li, F., Zhang, D. and Liu, J. (2013). The low temperature induced physiological responses of Avena nuda L., a cold-tolerant plant species. The Scientific World Journal, 13: 658-793.

Longo, V., Kamran, R. V., Michaletti, A., Toorchi, M., Zolla, L. and Rinalducci, S. (2017). Proteomic and physiological response of spring barley leaves to cold stress. Cell, 6(7): 659-667.

Majdi, M., Karimzadeh, G. andTehranMahfoozi, S. (2008). Effects of low temperature and exogenous calcium on the quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm) and relative content of chlorophyll in cold susceptible and tolerant wheat cultivars. Pajouhesh and Sazandegi, 77:175-181.

Marečková, M. and Barták, M. (2017). Short-term responses of primary processes in PS II to low temperature are sensitively indicated by fast chlorophyll fluorescence kinetics in Antarctic lichen Dermatocarpon polyphyllizum. Czech Polar Reports, 7(1): 74-82.

Marečková, M., Barták, M. and Hájek, J. (2019). Temperature effects on photosynthetic performance of Antarctic lichen Dermatocarpon polyphyllizum: a chlorophyll fluorescence study. Polar Biology, *42*(4), 685-701.

Margutti, M.P., Reyna, M., Meringer, M.V., Racagni, G.E. and Villasuso, A.L. (2017). Lipid signalling mediated by PLD/PA modulates proline and H_2O_2 levels in barley seedlings exposed to short-and long-term chilling stress. Plant Physiology and Biochemistry, 113: 149-160.

Mishra, A., Mishra, K.B., Höermiller, I.I., Heyer, A.G. and Nedbal, L. (2011). Chlorophyll fluorescence emission as a reporter on cold tolerance in Arabidopsis thaliana accessions. Plant Signaling and Behavior, 6(2): 301-310.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant science, 7(9): 405-410.

Mohammad, J., Naziri, M., Nazir, A., Shah, D. and Jamal, H. (1996). Wheat yield component as affected by low water stress at different growth stage. Sarhad Journal Agriculture, 12: 19-26.

Moieni-Korbekandi, Z., Karimzadeh, G. and Sharifi, M. (2014). Cold-induced changes of proline, malondialdehyde and chlorophyll in spring canola cultivars. Journal of Plant Physiolology and Breeding. 4: 1-11.

Nesterova, N., Pareniuk, O., Illienko, V., Ruban, Y., Shavanova, K. and Shpyrka, N. (2019). Physiological Reactions in Cereals Family Avena Sativa L. and Avena Nuda L., Caused by Low-Temperature Stress Factors. In 2019 IEEE 39th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO) (pp. 502-506). IEEE.

Nezami, A., Khazaei, H., Dashti, M., Mehrabadi, H., Eyshi Rezaee, E., Ahmadi, M. (2013). Evaluation of Morpho-physiological indices in autumn sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars under freezing stress at seedling stage. Journal of Sugar Beet, 29(1): 31-15.

Petcu, E. and Vasilescu, L. (2018). The effect of low temperatures on chlorophyll fluorescence and its relationtships with frost resistance of winter barley. Analele Institutului National de Cercetare-Dezvoltare Agricola Fundulea, 86: 293-299.

Rizza, F., Pagani, D., Gut, M., Prášil, I.T., Lago, C., Tondelli, A. Stanca, A.M. (2011). Diversity in the response to low temperature in representative barley genotypes cultivated in Europe. Crop Science, 51(6): 2759-2779.

Sayed, O.H. (2003). Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. Photosynthetica, 41(3): 321-330.

Shamsifar, S., Mirfakhraie, R., and Haghpanah, K. (2021). Study on Genetic Diversity of some Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars Using SSR Marker and Physiological Traits, Froctun and Ion Leakage under Late Spring Cold Stress. Journal of Crop Breeding, 12 (34):199-209.

Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E. and Matkovics, B. (1974). Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 166(5-6):387-392.

Sonoike, K. (2011). Photoinhibition of photosystem I. Plant Physiology, 142:56–64.

Suorsa, M., Järvi, S., Grieco, M., Nurmi, M., Pietrzykowska, M., Rantala, M. and Aro, E.M. (2012). Proton gradient regulation5 is essential for proper acclimation of Arabidopsis photosystem I to naturally and artificially fluctuating light conditions. The Plant Cell 24:2934–2948.

Takahashi, D., Kawamura, Y. and Uemura, M. (2016). Cold acclimation is accompanied by complex responses of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in *Arabidopsis*. J Exp Bot 67, PP: 5203-5215.

Telfer, A. (2014). Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of b-Carotene. Plant Cell Physiology, 55(7):1216-1223.

Valizadeh-Kamran, R., Toorchi, M., Mogadam, M., Mohammadi, H. and Pessarakli, M. (2018). Effects of freeze and cold stress on certain physiological and biochemical traits in sensitive and tolerant barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. Journal of Plant Nutrition, 41(1): 102-111.

Yaghoubian, Y., Siadat, S., Telavat, M. and Pirdashti, H. (2016). Quantify the response of purslane plant growth, photosynthesis pigments and photosystem II photochemistry to cadmium concentration gradients in the soil. Russian Journal of Plant Physiology, 63 (1):77-84.

Yamazaki, J. Y., Ohashi, A., Hashimoto, Y., Negishi, E., Kumagai, S., Kubo, T. and Kamimura, Y. (2003). Effects of high light and low temperature during harsh winter on needle photodamage of Abies mariesii growing at the forest limit on Mt. Norikura in Central Japan. Plant science, 165(1): 257-264.

Yang, Y.J., Chang, W., Huang, W., Zhang, S.B., and Hu, H. (2017). The effects of chilling-light stress on photosystems I and II in three *Paphiopedilum* species. Botanical Studies, 58(1):1-12.

Zhang Y.P., Yang S. J. and Cheny Y. (2016), Effects of melatonin on photosynthetic performance and antioxidants in melon during cold and recovery, Biologia Plantarum, 61(3):571–578.

Zhao, Y., Han, Q., Ding, C., Huang, Y., Liao, J., Chen, T. and Yuan, M. (2020). Effect of low temperature on chlorophyll biosynthesis and chloroplast biogenesis of rice seedlings during greening. International journal of molecular sciences, 21(4): 1390.

Zhou, H., Xu, M., Hou, R., Zheng, Y., Chi, Y. and Ouyang, Z. (2018). Thermal acclimation of photosynthesis to experimental warming is season-dependent for winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Environmental and Experimental Botany, 150, 249-259.