



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

Ali Bashirzadeh<sup>1\*</sup>, Khanlar Dayyan Abdullayev<sup>2</sup>, Zaman Mahmudov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Agriculture and Plant Breeding, Astara Branch, Islamic Azad University, Astara, Iran,  
Email: ali\_bashirzadeh@yahoo.com

<sup>2</sup> Institute of Botany, Natural Academic Science, Baku State University, Azerbaijan

### Article type:

Research article

### 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 °C (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 °C and in Makoi cultivar at 4 °C, while in all three cultivars,  $F_v$  value and chlorophyll a content decreased with decreasing temperature. The ratio of  $F_m/F_v$  in Makouei 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 °C, 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.

### 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

**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

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

علی بشیرزاده<sup>۱\*</sup>، خانلار عبداله‌اف<sup>۲</sup>، زمان محموداوف<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد آستارا، دانشگاه آزاد اسلامی، آستارا، ایران، رایانامه: ali\_bashirzadeh@yahoo.com

<sup>۲</sup> موسسه گیاه شناسی، علوم آکادمیک طبیعی، دانشگاه دولتی باکو، آذربایجان.

### چکیده

### نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

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 به صورت 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 ۴، ۸ و ۲۲ (شاهد) سلسیوس، بود که تیمارهای دمایی به مدت ۴۸ 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 ۸ درجه و در رقم ماکویی در ۴ درجه مشاهده شد در حالی که 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 ۸ و ۴ 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 منعکس‌کننده سازگاری بیشتر به سرما است.

### واژه‌های کلیدی:

انتقال الکترون  
پراکسید هیدروژن  
تنش حرارتی  
کلروفیل  $a$   
مالون‌دی‌آلدهید

**استناد:** بشیرزاده، علی؛ عبداله‌اف، خانلار؛ محموداوف، زمان. (۱۴۰۲). اثر تنش سرما بر محتوای کلروفیل، فلورسانس کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو سه رقم جو (*Hordeum vulgare* L.). فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۸ (۴)، ۹۷-۱۱۴.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

© نویسندگان.



## مقدمه

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 Çakırlar, 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 سیالیت غشا بوده که در کنار پراکسیداسیون لیپید موجب تخریب غشا و در نتیجه افزایش نشت یونی می‌گردد (Apostolova et al., 2013; Fahimirad et al., 2008). 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 تیلوکوئید، 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 کارایی انتقال انرژی به مرکز فتوسیستم II را کاهش می‌دهد و کلروفیل سه‌تایی تشکیل

جو (*Hordeum vulgare* L.) به دلیل مقاوم بودن به خشکی، تحمل خاک‌های شور و قلیایی، سهولت کشت و کار، قابلیت انبارداری بالا، بر خورداری 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 فیزیوبوشیمیایی، 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).

### 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 ۱۳۰۰ متر 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 سانتی متری 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 ۴۸ ساعت درون ژرمیناتور، تحت دمای ۴، ۸ و ۲۲، قرار داده شدند (Longo et al., 2017). بعد از ۴۸ 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

III: بلافاصله پس از خارج کردن گلدان‌ها از ژرمیناتور

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. به منظور 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، کارایی 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 کارایی فتوسنتزی گیاه اثبات شده است (Telfer, 2014).

توانایی ارقام مختلف جو در تحمل به دمای پایین بسیار متفاوت است، به طوری که 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.

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<sub>0</sub>) 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.

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 (Yaghoobian et al., 2016). بدین منظور، برگ‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند، با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری فلورسانس، نور قرمز به برگ تابانده شد. فلورسانس حداقل (F<sub>0</sub>) با همه‌ی مراکز واکنشی باز فتوسیستم II و فلورسانس

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 <sub>0</sub>
حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II	Fv/Fm	(Fm-F <sub>0</sub> )/Fm
کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II	Y(II)	(Fm-Ft)/Fm'

تبدیل شد و غلظت کلروفیل a، b و کل با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید:

معادله (۱)

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

معادله (۲)

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

معادله (۳)

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

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

میزان پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> بر اساس روش توصیف شده توسط حبیبی و حاجی‌بلند (Habibi and Hajiboland, 2012) سنجش شد. محلول استخراج برگ‌ها محلول تری کلرواستیک اسید

استخراج و اندازه‌گیری رنگیزه‌ها: برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a، b و کل از روش Arnon (۱۹۵۴) استفاده گردید که برای این منظور ۱۰۰ میلی‌گرم (۱/۰ گرم) وزن تر 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 به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm 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 ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد. در نهایت با احتساب ۲۵ میلی‌لیتر حجم نهایی، مقادیر کلروفیل به میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ

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 ( $O_2^{\cdot-}$ ) حاصل از فتولیز ریوفلاوین، 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 ۲۴۰ نانومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) از طریق تست گایاکول و تبدیل آن به تتراگایاکول به انجام رسید. نمونه‌ها در نیتروژن مایع پودر شده و عصاره آنزیمی در بافر فسفات پتاسیم با میزان ۱۰ میلی‌مولار و  $pH = 7$  استخراج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتیفریژ 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 عصاره آنزیمی در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس آغاز شده و جذب نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل CamSpec M501, UV/Visible، ساخت انگلستان)، اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی تتراگایاکول برحسب واحد میکرومولار تتراگایاکول 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) چهار گلدان در نظر گرفته

۰/۱ درصد وزنی به حجمی) بود. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتیفریژ شده و روشن‌آور مورد استفاده قرار گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل ۱۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم ( $pH=7$ ) و یک مولار یدید پتاسیم اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی به منظور انجام واکنش قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل CamSpec M501, UV/Visible، ساخت انگلستان)، اندازه‌گیری شد. مقادیر براساس منحنی استاندارد  $H_2O_2$  در محدوده صفر تا ۵۰ نانومول محاسبه شد.

**اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (MDA):** سنجش مالون‌دی‌آلدئید به عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس روش بومیناتان و دوران (Boominathan and Doran, 2002) صورت گرفت. عصاره برگ در محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) استخراج شده و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتیفریژ گردید. نسبت ۱ به ۴ از روشن‌آور با محلول ۲۰ درصد از تری کلرواستیک اسید حاوی ۰/۵ درصد تیوباریتوریک اسید در لوله آزمایش باهم مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت. سپس لوله‌ها به سرعت در یخ سرد شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتیفریژ شدند. علاوه بر این هم‌زمان عصاره‌های برگ محلول‌های استاندارد در محدوده صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۳،۳- تترا اتوکسی پروپان تهیه شده و جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل CamSpec M501, UV/Visible، ساخت انگلستان)، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در نهایت میزان مالون‌دی‌آلدئید نمونه‌ها برحسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

شد به طوری که برای هر تیمار ۱۲ گلدان وجود داشت). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد ( $P < 0/05$ ) مورد مقایسه قرار گرفتند.

### نتایج

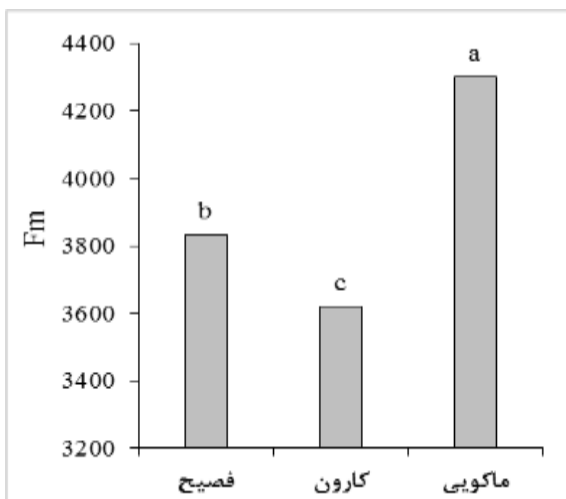
**تاثیر دما بر مؤلفه‌های بیوفیزیکی اندازه‌گیری شده فلورسانس کلروفیل:** نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به پارامترهای فلورسانس کلروفیل نشان داد که اثر اصلی رقم بر Fm؛ اثر اصلی دما بر PAR و اثر متقابل رقم  $\times$  دما بر پارامترهای Fv، F0، Fm/Fv، Fv معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد 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 ۴ درجه به دست 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 ۴ 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 ۴). به طور کلی مقدار مشاهده شده برای نسبت Fm/Fv در تمام تیمارها بدون توجه به مقاوم یا حساس بودن رقم در دامنه بین ۰/۵۹۴ 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). مؤلفه 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 ۴ 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 به دست آمد اگرچه در همین دما با رقم فصیح به لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل ۶).

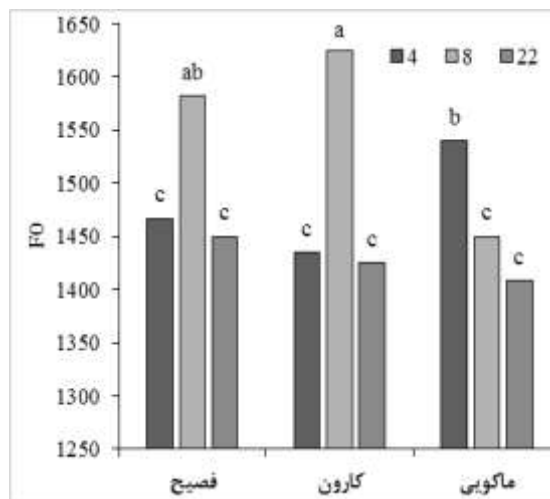
جدول ۲: آنالیز واریانس اثر دماهای مختلف بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل یا کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II ارقام جو

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		F0	Fv	Fm	Fv/Fm
رقم (C)	۲	۵۱۷۹*	۷۵۸۳۶ <sup>NS</sup>	۷۰۸۱۱۴**	۰/۰۲۶ <sup>NS</sup>
دما (T)	۲	۳۶۶۸۴**	۱۶۳۹۰۳۰**	۵۲۰۷ <sup>NS</sup>	۰/۱۴۱**
C $\times$ T	۴	۲۶۹۶۹**	۷۲۴۶۹۷**	۳۷۲۳۶ <sup>NS</sup>	۰/۰۵۳**
خطا	۲۷	۱۱۸۵	۴۵۹۳۵	۵۲۷۱۱	۰/۰۱۰۷
ضریب تغییرات (%)	-	۲۱/۳۱	۱۶/۳۵	۸/۳۹	۱۲/۴۹

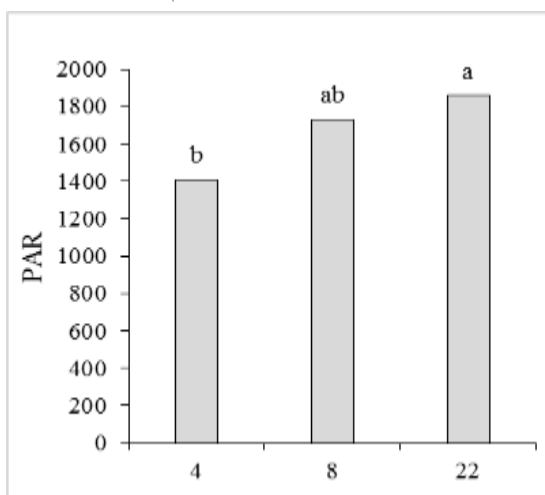
\*\* و \* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد؛ ns عدم تفاوت معنی‌دار



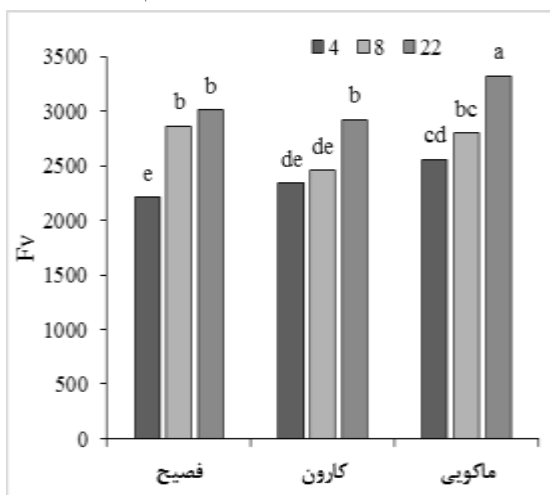
شکل ۲: مقایسه میانگین اثر اصلی رقم بر مقدار Fm



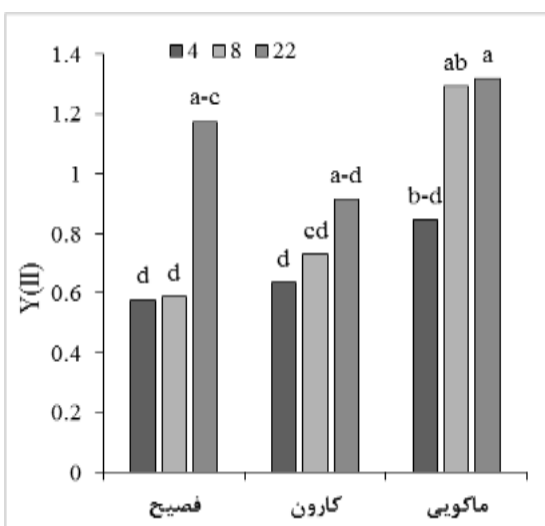
شکل ۱: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر مقدار F0



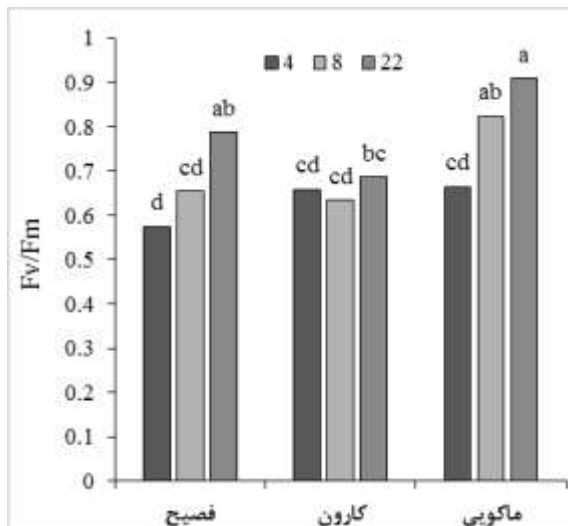
شکل ۳: مقایسه میانگین اثر اصلی دما بر مقدار PAR



شکل ۴: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر مقدار Fv



شکل ۶: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر Y(II)



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



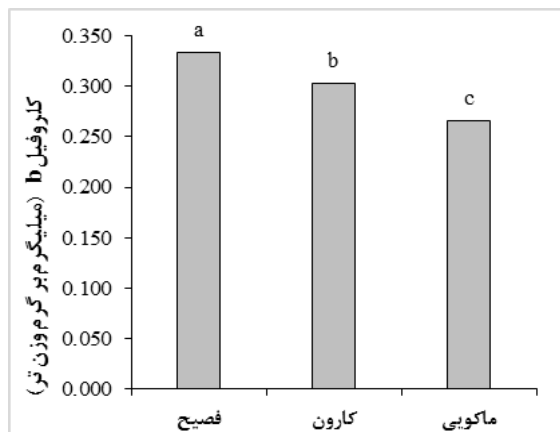
جدول ۳: آنالیز واریانس اثر دماهای مختلف بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ ارقام جو

میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییرات
کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a		
۰/۰۳۶۱**	۰/۰۱۸۲**	۰/۰۲۹۲**	۲	رقم (C)
۰/۰۰۱۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۱۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۰۴**	۲	دما (T)
۰/۰۲۱*	۰/۰۰۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۳۹**	۴	C × T
۰/۰۰۶۲	۰/۰۰۲۴	۰/۰۰۰۲۴	۲۷	خطا
۷/۷۴	۱۶/۳۳	۱۵/۱۴	-	ضریب تغییرات (%)

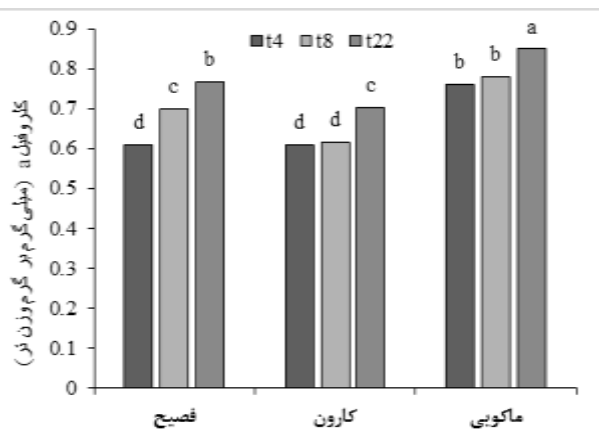
\*\* و \* به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک و پنج درصد؛ ns عدم تفاوت معنی دار

ماکویی (۰/۲۶۱ میلی گرم بر گرم وزن تر)، به دست 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 معنی دار نداشت. نکته مورد توجه این است که در رقم ماکویی مقدار کلروفیل کل با تغییر دما از ۴ به ۸ درجه، ۴۳/۵ درصد (از ۸ به ۲۲ درجه، ۶۷ درصد افزایش)، افزایش یافت که نشان دهنده کارایی بالاتر رقم ماکویی در تولید کلروفیل کل دماهای پایین، نسبت به دو رقم دیگر، است (شکل ۹).

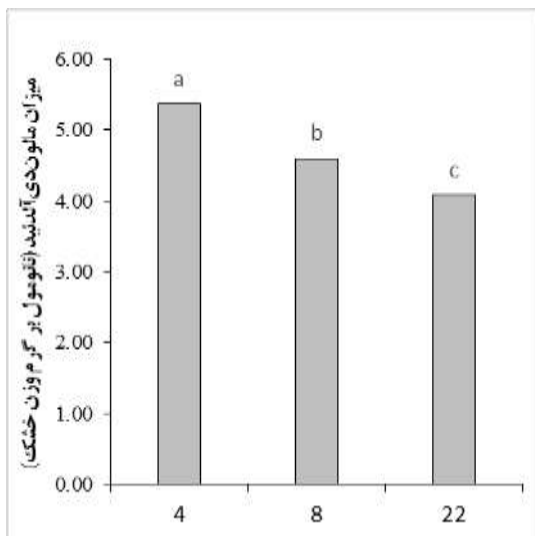
محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ: نتیجه حاصل از تجزیه واریانس محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که اثر متقابل دما و رقم بر محتوای کلروفیل a و کل و اثر اصلی رقم بر کلروفیل b معنی دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین نشان داد که اگرچه در هر سه رقم بیشترین محتوای کلروفیل a در دمای ۲۲ درجه مشاهده شد اما فقط در رقم فصیح بین هر سه دما تفاوت معنی دار وجود داشت و در رقم ماکویی و کارون با تغییر دما از ۲ به ۸ درجه تغییر معنی دار در مقدار کلروفیل a دیده نشد (شکل ۷). بیشترین مقدار کلروفیل b نیز در بین ارقام جو، از رقم فصیح (۰/۳۳۷ میلی گرم بر گرم وزن تر) و کمترین آن در رقم



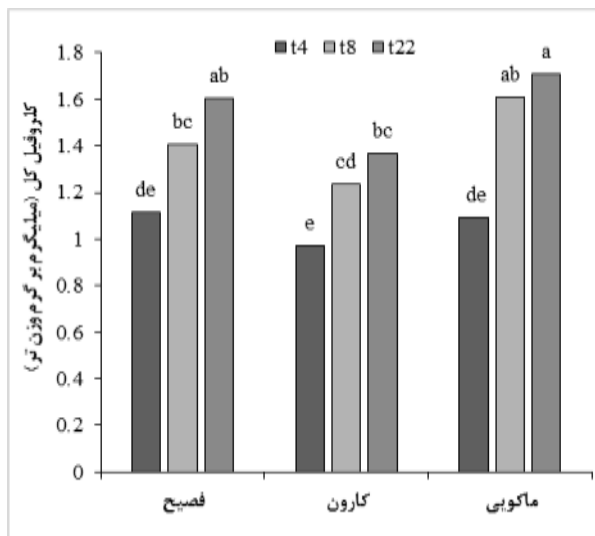
شکل ۸: مقایسه میانگین اثر اصلی رقم بر مقدار کلروفیل b



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



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



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

درصد، فعالیت بیشتری داشت (شکل ۱۳). جدول ۴ نشان می‌دهد که اثر برهمکنش رقم و دما بر میزان  $H_2O_2$  معنی‌دار بود و مقایسه میانگین آن نشان داد که در دمای ۴ 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 ۴ درجه مشاهده شد (شکل ۱۴).

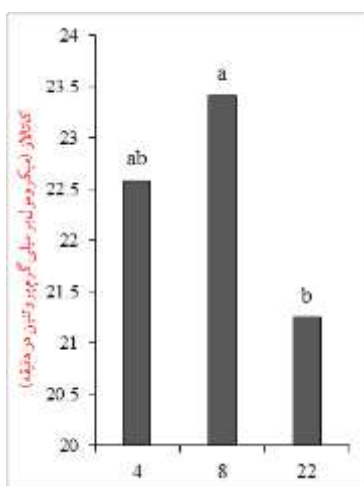
بررسی مقدار فعالیت آنزیم POX نشان داد که تحت تأثیر برهمکنش رقم و دما قرار گرفت و در هر سه رقم، کاهش دما به‌طور معنی‌دار فعالیت POX را افزایش داد. بیشترین فعالیت POX در رقم فصیح تحت دمای ۴ درجه (۱/۶۵ میکرومول بر میلی‌گرم بر پروتئین)، مشاهده شد اما در دمای ۸ و ۲۲ درجه رقم کارون بیشترین فعالیت POX را نشان داد (شکل ۱۵).

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 ۴). 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 ۴). مقایسه میانگین فعالیت SOD نشان داد که بین دمای ۲۲ و ۸ درجه به لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار وجود نداشت اما تیمار دمای ۴ درجه به‌طور معنی‌دار 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 ۴ و ۲۲ درجه به‌ترتیب ۱۳ و ۲۹

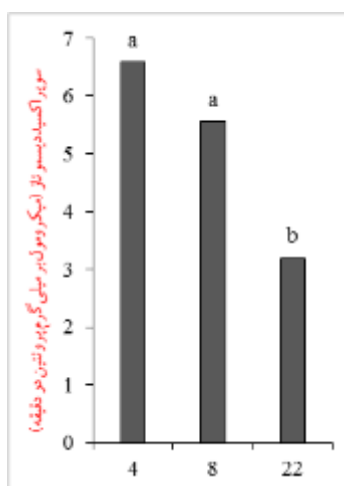
جدول ۴: آنالیز واریانس اثر دماهای مختلف بر میزان مالون‌دی‌آلدئید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ارقام جو

میانگین مربعات						
منابع تغییرات	درجه آزادی	میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA)	میزان پراکسید هیدروژن (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)	فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسمو تاز (SOD)	فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)
رقم (C)	۲	۳/۵۳*	۵۶/۸۴ <sup>ns</sup>	۱۰/۳۳*	۲/۲۲۵**	۰/۸۰۳**
دما (T)	۲	۵/۰۴*	۱۸۹/۶*	۷/۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۲۸۳ <sup>ns</sup>	۰/۳۳۷**
C × T	۴	۰/۳۸ <sup>ns</sup>	۳۲۱/۳**	۴/۰۸۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۹۹۲ <sup>ns</sup>	۰/۴۹۳**
خطا	۲۷	۰/۹۱۶	۴۰/۵۳	۲/۵۰۹	۰/۲۷۵	۰/۰۲۲۵
ضریب تغییرات (%)	-	۲۰/۴۵	۱۹/۴۲	۷/۰۶	۹/۴۷	۱۵/۱۸

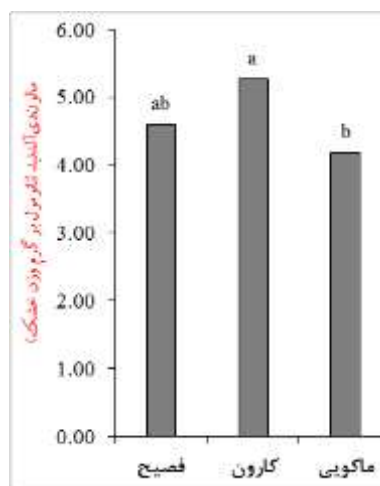
\*\* و \* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد؛ ns عدم تفاوت معنی‌دار



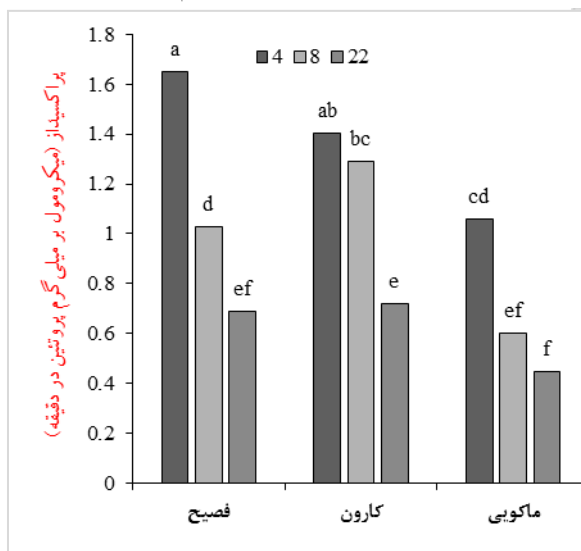
شکل ۱۳: مقایسه میانگین اثر اصلی دما بر فعالیت آنزیم کاتالاز



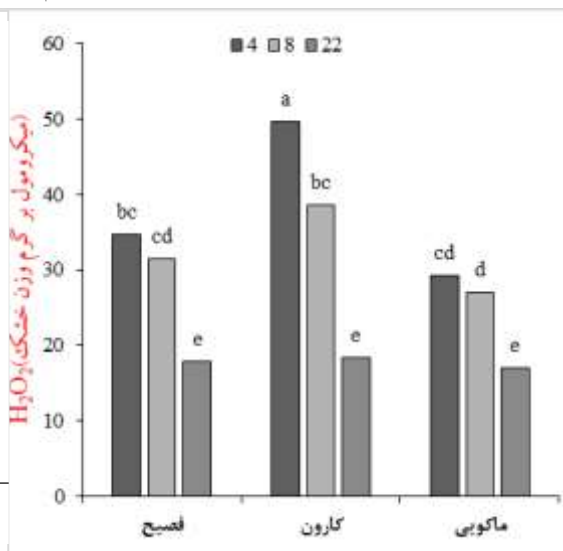
شکل ۱۲: مقایسه میانگین اثر اصلی دما بر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسمو تاز



شکل ۱۱: مقایسه میانگین اثر اصلی رقم بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید



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



شکل ۱۴: مقایسه میانگین اثر متقابل دما و رقم بر مقدار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Zhang et al.,) مناسبی برای بازدارندگی نوری است (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 ۰/۸۶-۰/۷۱ 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، کارایی سیستم نوری II در رقم مقاوم بیشتر بوده است (Jedrowski 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 فتوستتزی و سرعت تثبیت دی‌اکسیدکربن در برگ‌های ارقام مقاوم بیشتر است. Vasilescu و Petcu (۲۰۱۸) نیز نشان دادند گیاه جو توان حفظ کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II در طی ساعات اولیه کاهش دما را داشته ولی مقادیر این پارامتر به دلیل خسارت وارده به مراکز واکنش فتوستتزی کاملاً به مقادیر قبل از تنش نرسید. Majdi و همکاران (۲۰۰۸) نیز کاهش شاخص‌های حداکثر فلورسانس کلروفیل ( $F_m$ ) و کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II در ارقام بهاره گندم را دلیل افزایش خسارت سرما در گیاهان ذکر کردند. در مطالعه‌ای مشابه نیز، Hajhashemi و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اثر تنش سرما بر تغییرات فیزیولوژیکی ارقام استویا (*Stevia*

(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 ۴ درجه مشاهده شد و در مجموع رقم کارون میانگین بالاتری داشت که مقادیر کمتر آن نشان می‌دهد که فعالیت‌های فتوستتزی 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 کارایی 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 Çakırlar, 2020). وقتی همه مراکز واکنشی فتوسیستم II بسته است، نشان‌دهنده 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 کارا تر خواهد بود (Zhou et al., 2018). Takahashi و همکاران (۲۰۱۶) 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 فتوستتزی کننده قبل از آشکار شدن آن در مورفولوژی گیاه ارزیابی می‌شود و شاخص

(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 کارایی 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 Çakırlar, 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 به‌طوری که مقدار  $H_2O_2$  در هر سه رقم در دمای ۴ و ۸ درجه افزایش معنی‌دار داشت و رقم کارون بیشترین میانگین را دارا بود. با توجه به نتایج همبستگی بین صفات و بررسی روابط

(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 علاوه بر 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 ۴ و ۸ درجه نسبت به ۲۲ درجه مشاهده شد، البته در این روند کاهشی بین دمای ۴ و ۸ درجه تفاوت معنی‌دار وجود نداشت، این کاهش را می‌توان به علت از بین رفتن آنزیم‌های بیوستتزی رنگیزه‌های فتوستتزی 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 فتوستتزی را می‌توان عموماً به تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوستتزی، 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 کلروفیل‌لاز 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

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 (Moieni- et al., 2019) و کلزا (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 فتوستتزی 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 ۴ 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 نشان‌دهنده 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.

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., 2014; Moieni-Korbekandi et al., 2013). از آنجایی که استرس دمای پایین بر فتوستتزی 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 ۴ و ۸ 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 کلروفیل‌لاز 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

#### 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 hyperaccumulator, *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 Research Journal*, 28(5): 964-973.
- Doğru, A. and Çakırlar, 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. and TehranMahfoozi, 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 Physiology 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 relationships 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 Matkovic, 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 regulation 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 Chen 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.