

بررسی برخی شاخص‌های خسارت سلولی تحت تنش سرما در نخود جم

سیده صنم کاظمی شاهاندشتی^{۱*}، رضا معالی‌امیری^۲، حسن زینالی خانقاه^۳

۱، ۲، ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار پردیس کشاورزی و منابع

طبیعی دانشگاه تهران

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Sanam.kazemi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۹)

چکیده

در این تحقیق پاسخ‌های القاء شده نخود جم در دمای سازگاری و تنش سرما از طریق اندازه‌گیری شاخص خسارت برگ (ELI)، پراکسیداسیون چربی‌های غشاء یا مالون دی آلدئید (MDA) و فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان کاتالاز ارزیابی شد. گیاهان پس از قرارگیری در شرایط سازگاری به سرما آمادگی بیشتر در رویارویی با تنش سرمای بالای صفر و به طور واضح‌تر در دمای زیر صفر نشان دادند. نتایج نشان داد که تنوع بالقوه در شدت و سرعت پاسخ‌های سلولی در این ژنوتیپ وجود دارد و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (به عنوان سیستم دفاع سلولی) و نتایج MDA و ELI (به عنوان شاخص خسارت) با هم در تعامل هستند. بررسی گیاهان در فاز بهبودی نشان داد که افزایش تحمل تحت شرایط دمای پایین ویژگی موقت بوده و پس از گذر از تنش سرما از طرفی فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافته و از طرف دیگر میزان خسارت به غشاهای سلولی نیز کاهش می‌یابد. بنابراین، اعمال تیمار سازگاری، سبب افزایش تحمل گیاه به تنش سرما شده و توان زیستی گیاه را در تنش‌های سرمایی افزایش داده و سبب بهبودی گیاه حتی پس از تنش‌های سرمایی شدید می‌شود.

مقدمه

رشد و پراکنش گیاهان در طبیعت تحت تاثیر انواع تنش‌های زنده و غیرزنده قرار دارد. گیاهان به طور متناوب با انواع تنش‌های محیطی مثل دمای پایین، تنش اسمزی، خشکی، غرقابی، گرما، تنش اکسیداتیو و سمیت فلزات سنگین مواجه هستند. دما، عامل محیطی مهمی است که از فصلی به فصل دیگر تغییر می‌کند و دستخوش نوسانات غیرقابل پیش‌بینی و زودگذر روزانه است. گیاهان، به عنوان موجودات غیر متحرک از یک طرف باید قادر به درک نوسانات و تغییرات فصلی دما بوده و از طرف دیگر در این شرایط توانایی پاسخ و حفظ توازن دمایی مناسب برای سلول داشته باشند (۲۸ و ۵).

واژه‌های کلیدی

آنزیم کاتالاز،
پراکسیداسیون چربی‌های غشاء،
سازگاری به سرما،
نخود زراعی،
هدایت الکترولیتی غشا.

یکی از مهم ترین پاسخ های دمای گیاهان، توانایی آن ها در افزایش تحمل به تنش سرما در اثر گذراندن دوره ای از دمای پایین غیر یخبندان، قبل از هجوم سرمای انجماد زمستان، است. این فرآیند سازگاری به سرما^۱ نامیده می شود. در طبیعت، دماهای غیر یخبندان در اواخر پاییز و اوایل زمستان محرک های اصلی سازگاری به سرما هستند گرچه دوره نوری نیز در این پاسخ موثر است (۱۰). بررسی اثر سازگاری به سرما گیاهان در القای تحمل به تنش سرما می تواند راهکار موثری در انجام کشت پاییزه گیاهانی مثل نخود (*Cicer arietinum* L.)، که کشت بهاره آن در ایران مرسوم است، باشد. در حال حاضر با توجه به مشکلات کشت بهاره نخود از جمله خشکی و کمبود رطوبت آخر فصل، کشت پاییزه این محصول با توجه به بارندگی و وجود رطوبت در پاییز و زمستان منطقی به نظر می رسد. لیکن سرما عامل محدود کننده در توسعه کشت پاییزه نخود در بیشتر نواحی کشور است و می تواند اثرات مخربی مثل یخ زدگی را نیز به همراه داشته باشد بنابراین سازگاری به سرما می تواند سازوکار مناسبی در رفع این محدودیت باشد. در نتیجه شناخت سازوکارهای گیاهان در فرآیند سازگاری در جهت ارتقای تحمل گیاهان به سرما یکی از تلاش های محققان خواهد بود (۱). از لحاظ بیولوژیکی، سازگاری به سرما شامل تغییرات متعدد در بیان ژن، متابولیسم، فیزیولوژی و مورفولوژی بوده که این تغییرات شامل افزایش یا کاهش بیان ژن ها، کاهش یا توقف رشد، افزایش تجمع اسید آبسزیک (ABA)، تغییر در ترکیب لیپیدی غشاء، تغییر در ترکیب محلول های سازگار (مثل پرولین و بتائین و پلیول و قندهای محلول) و افزایش آنتی اکسیدان های سلولی است. این تغییرات، به طور مستقیم در تحمل به تنش درگیر بوده و بنابراین به عنوان عناصر فعال^۲ در تحمل به تنش های محیطی به خصوص تنش سرما محسوب می شوند. بنابراین در بسیاری از موارد ارتباط منطقی بین تغییرات در سطح مولکولی این گروه با تغییرات فیزیولوژی و مورفولوژی وجود دارد (۳۱ و ۳۲). یکی از این تغییرات مهم، تغییر در غشای پلاسمایی است و در اثر تنش های محیطی از جمله تنش سرما و اسمزی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی چربی های غشای

پلاسمایی تغییر می کند. به نظر می رسد سلول، تنش سرما را از طریق پروتئین های موجود در غشاء درک کرده و از طریق آن ها سیگنال هایی را از محیط به شبکه های انتقال سیگنال رسانده و در نهایت منجر به تنظیم بیان ژن ها می شود. تغییر شیمیایی و ژنتیکی چربی های غشایی اثر مشابهی در بیان ژن های موثر در سازگاری به سرما سلول ها دارد. وضعیت فیزیکی چربی های غشایی به طور مستقیم در تنظیم فعالیت پروتئین های متصل به غشاء مثل ناقلین مولکول های کوچک، کانال های یونی، پروتئین کینازهای گیرنده و پروتئین های حسگر نقش دارد. تنش سرما سبب القای فرآیندهای اکسیداتیو سلول های گیاهی شده که این فرآیندها به وسیله گونه های اکسیژن فعال^۳ (ROS) آغاز می شود. ROS ها مولکول های متعددی در سلول شامل رادیکال های اکسیژن و پراکسید اکسیژن و مولکول های واکنش پذیر دیگر در سلول است که در اندامک های سلولی مثل میتوکندری و کلروپلاست در اثر عدم توازن چرخه های الکترونی حاصل شده و واکنش پذیری زیادی با ماکرومولکول های سلولی مثل پروتئین ها، چربی ها، DNA دارد و بنابراین موجب خسارت به بخش های مختلف از جمله غشاهای سلولی می شود. تنش سرما نفوذ پذیری غشا را به وسیله خروج الکترولیت ها از بافت ها افزایش می دهد (۲۰، ۲۳، ۲۶، ۲۹، ۳۰، ۱۹، ۱۶، ۱۲، ۶). چربی های غیراشباع غشاهای سلولی در اثر این گونه های اکسیژن فعال دچار اکسیداسیون شده که این ویژگی می تواند به عنوان نشانگر بیوشیمیایی در برآورد خسارت غشاء در اثر تنش سرمایی مفید باشد. قابل ذکر است که این تغییرات همگی قبل از آن که سبب تغییرات مورفولوژیکی در برگ شوند، قابل برآورد هستند. در ردیابی تغییرات، میزان گونه های اکسیژن فعال نیز همواره در اثر میزان بیان ژن ها و در نتیجه پروتئین های متعدد آنتی اکسیدان تنظیم می گردد. بنابراین اندازه گیری این پروتئین ها می تواند در بررسی و کنترل خسارت های ناشی از اکسیژن فعال مهم باشد (۲۲).

به دلیل پیچیدگی عوامل محیطی که اغلب چندین تنش همزمان سلول های گیاهی را تحت تاثیر قرار می دهند و تنوع پاسخ های سلولی که بسته به طبیعت تنش (مدت و شدت تنش) تغییر می کند، بررسی دینامیکی پاسخ های بیوشیمیایی سلول تحت تنش

^۱ Cold acclimation^۲ Functional element^۳ Reactive oxygen species (ROS)

سرما ضروری به نظر می‌رسد. تاکنون آزمایشات متعددی برای تعیین میزان خسارت ناشی از تنش سرما طراحی و اجرا شده است. با توجه به این که اولین بخش سلول که در اثر تنش سرما آسیب می‌بیند، غشا است. در این تحقیق ابتدا اثر سازگاری به سرما و تنش سرمایی در غشای پلاسمایی و هم‌چنین اثر آن بر فعالیت آنزیم کاتالاز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

شرایط رشد گیاهان

در این پژوهش از نخود کابلی جم استفاده شده که به‌طور وسیع در کشور کشت می‌شود. بذور با هیپوکلریت سدیم (وایتکس تجاری ده درصد) به مدت ده دقیقه ضد عفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در پتری دیش با رطوبت لازم قرار گرفتند. پتری دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۱۳) و پس از جوانه زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌ها انتقال یافت. انتقال غیر مستقیم گیاهان به خاک به دلیل اهمیت سبز شدن یکنواخت آن‌ها و اجرای دقیق تیمارهای آزمایش در نمونه‌ها بود. گلدان‌ها در اتاقک رشد با نور ۲۰۰ میکرومول بر انیشتن و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شدند. نمونه گیری از برگ گیاهچه‌های سه-هفته‌ای انجام شد. گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای به دو قسمت تقسیم شدند بخشی از آن‌ها در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط فوق‌الذکر نگهداری شده و بخشی دیگر به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد جهت سازگاری به سرما انتقال یافتند. به‌منظور سازگاری به سرما، گیاهچه‌ها ۵ روز در این دما نگهداری شدند. سپس، گیاهچه‌ها به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز انتقال یافتند. بعد از اتمام دوره تنش و جهت بررسی فرآیند بهبود، گیاهچه‌ها به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. بررسی بهبود گیاهچه‌ها به مدت ۵ روز انجام گرفت. جهت مطالعات تکمیلی و بررسی پاسخ گیاهچه‌ها، تیمار دمایی ۱۰- درجه سانتی‌گراد نیز انجام گرفت. این تنش بر گیاهچه‌های نگهداری شده در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و گیاهچه‌های

سازگار شده به تنش سرما (پس از ۵ روز سازگاری به سرما در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد) اعمال گردید (شکل ۱).

اندازه‌گیری تحمل به سرما براساس قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی گیاه

تحمل به سرما بر اساس شاخص هدایت الکتریکی^۲ بافت‌های خسارت دیده نخود بعد از انجام تیمار سرما اندازه‌گیری شد (۱۱). در اندازه‌گیری میزان هدایت الکترولیتی از برگ‌های کاملاً سالم بخش میانی ساقه استفاده شد. هشتاد میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ده سی‌سی آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب بهتر آب با استفاده از پمپ خلا هوای درون محیط خارج شده و لوله‌های آزمایش به مدت سی دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند. سپس میزان هدایت الکترولیتی نمونه‌ها (EC₁) با استفاده از دستگاه EC متر (Inolab، آلمان) قرائت شد. محتوی لوله آزمایش پس از قرار گرفتن در حمام آب‌جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه قرارگیری در دستگاه شیکر و میزان هدایت الکترولیتی (EC₂) تعیین شد و در نهایت مقدار شاخص خسارت براساس فرمول $I = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$ محاسبه گردید (۲۲).

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس مالون دی آلدئید (MDA)

میزان اکسیداسیون گیاهچه‌ها براساس تجمع مالون دی آلدئید برگ با استفاده از تیوباربتوریک اسید تعیین شد (۱۹). ۲۵۰ میلی-گرم نمونه برگی از بخش میانی ساقه در دو میلی‌لیتر بافر استخراج (TCA یک درصد) هم‌ورژنه شده و به مدت پانزده دقیقه در سانتریفیوژ به سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. یک میلی‌لیتر از سوپرناتانت به دست آمده با دو میلی‌لیتر محلول تیوباربتوریک اسید (TBA پنج درصد) حاوی اسید تری کلرواستیک (TCA بیست درصد) مخلوط و در حمام آب‌جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه، چگالی^۳ نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu 160) تعیین شد. غلظت مالون دی آلدئید براساس

^۲ Electrolyte Leakage Index

^۳ Optical density

^۱ Recovery

فرمول $C = D/E$ محاسبه شد که D اشاره به چگالی و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی متر $1/56 \times 10^5$) دارد (۱۸ و ۳۳).

استخراج پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز استخراج آنزیم و سنجش آن براساس روش وناکر و همکاران (۱۹۹۸) (۲۴)، با اعمال تغییرات جزئی صورت گرفت. تمامی مراحل استخراج در نمونه‌ها روی یخ انجام شد. نمونه‌ها در هاون چینی، به کمک ازت مایع سائیده و پودر شدند. $2/5$ میلی لیتر بافر استخراج ۱ را به $0/25$ گرم از پودر اضافه کرده و ورتکس شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی، عصاره آنزیمی، برای سنجش کمی آنزیم کاتالاز، استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از اسپکتروفتومتری و به روش ابی^۲ (۱۹۸۴) (۲) اندازه گیری شد. برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت کشور ژاپن در طول موج ۲۴۰ نانومتر استفاده شد. مواد استفاده شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH ۷) ۵۰ میلی مولار، ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن $3/41$ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی گرم پروتئین محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS 10.0 مورد تجزیه و تحلیل آماری بر اساس آزمون t قرار گرفته و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند (جدول ۱).

نتایج و بحث

گیاه نخود معمولاً به عنوان گیاه بهاره در نواحی خاورمیانه کشت و کار می‌شود و در تنش‌های دمای پایین اغلب خسارت می‌بیند (۲۵). نتایج این تحقیق نشان داد که میزان خسارت غشایی بر اساس شاخص ELI در تیمارهای دمایی مورد آزمایش، تفاوت معنی داری داشتند. انتقال گیاهچه‌ها از دمای ۲۳ درجه سانتی گراد به دمای سازگاری به سرما ۱۰ درجه سانتی گراد سبب ایجاد نوسانات میزان ELI گردید به طوری که از روز اول افزایش میزان

آن از ۲۰/۳۱ به ۳۳/۳۵ دیده شد. این افزایش بیانگر آن است که گیاه تنش دمای پایین را درک کرده و پاسخ‌های متعدد در سطوح مولکولی و فیزیولوژیکی را آغاز کرده است. اما با این حال این افزایش میزان ELI در روز نخست به معنای خسارت تلقی نمی‌شود زیرا میزان شاخص خسارت ۵۰ درصد بافت گیاهی به عنوان مرگ گیاه در اثر عامل تنش می‌باشد (۲۶). بنابراین ژنوتیپ‌های با ELI کمتر، تحمل بیشتری به شرایط تنش نشان می‌دهند. ادامه تیمار سازگاری به سرما سبب کاهش میزان ELI شد به طوری که در روز سوم میزان ELI به $14/76$ رسید. کاهش میزان ELI در روزهای دوم و سوم ممکن است مربوط به فعالیت مکانیسم‌های تحمل گیاه باشد که با فعالیت اکسیداسیونی و خصوصیات و ترکیب شیمیایی غشاهای سلولی در ارتباط باشد (۲۱ و ۱۷). معالی-امیری و همکاران (۲۰۰۷) تغییر خصوصیات غشای پلاسمایی سلول را عامل مهم تحمل به سرما در گیاهان بیان کردند. بعد از کاهش دما، ساختار غشای سلولی موقتاً تغییر وضعیت می‌دهد که بر قابلیت نفوذپذیری غشاء تاثیر می‌گذارد. تغییر موقت وضعیت غشاء منجر به تحریک مکانیسم‌هایی می‌گردد که نتیجه آن افزایش بیان ژن‌های تنظیم‌کننده در غشاهای سلولی است. یکی از ژن‌های درگیر در این فرایند، ژن‌های دساتوراز^۳ است که نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع را افزایش می‌دهند و منجر به برگشت سیالیت غشاء به حالت مایع می‌شود. بنابراین کاهش میزان ELI در روز سوم و چهارم ممکن است در اثر پایداری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی غشاء باشد که باید جزئیات بیشتر آن مطالعه شود. بررسی داده‌ها نشان داد که در روز چهارم میزان ELI تغییر چندانی نداشت اما میزان این شاخص در روز پنجم افزایش یافت که به نظر می‌رسد این افزایش در اثر کاهش فعالیت مکانیسم‌های دفاعی گیاه در دوره‌های طولانی‌تر تنش سرمایی و در نتیجه افزایش میزان خسارت به سلول باشد. این وضعیت از ویژگی‌های گیاهان حساس به تنش سرمایی است که دوره‌های طولانی مدت تنش سبب افزایش خسارت و معمولاً مرگ گیاه می‌شود که به طور حتم شدت تنش نیز از عوامل مهم در آن خواهد بود. اما همانطور که می‌دانید دمای سازگاری به سرما معمولاً بیشتر از دمای حداقل رشد گیاه بوده و در محدوده فیزیولوژیکی قرار دارد

³ Desaturase

¹ Extraction buffer

² Aebi

یعنی در این شرایط دمایی گیاه هنوز می تواند به دلیل فعال کردن مکانیسم های دفاعی با شرایط نامساعد محیطی مقابله کرده و به رشد خود (حتی با تاخیر زمانی) ادامه دهد. بنابراین افزایش ELI تا حد ۵۰ درصد خسارت های جزئی و معمولاً برگشت پذیر پس از قرارگیری در دماهای فیزیولوژیکی ایجاد می کند. نتایج نشان داد که تیمار سازگاری به سرما می تواند گیاه را از آسیب های احتمالی تنش سرما حفظ نماید. با توجه به اینکه در بسیاری از نقاط تحت کشت گیاه نخود در ایران، دما در فصل پاییز معمولاً به طور ناگهانی افت نکرده و الگویی مشابه سازگاری به سرما ایجاد می کند، ممکن است کشت پاییزه نخود نیز به عنوان یک راهکار مهم در مقابله با تنش خشکی و کمبود آب در کشت بهاره محسوب شود و بدین ترتیب به افزایش دوره رشد گیاه و افزایش عملکرد منجر شود. اهمیت وجود سازگاری به سرما هنگامی دقیق تر بیان شد که گیاهان سازگار شده در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد و گیاهان رشد یافته در شرایط دمایی ۲۳ درجه سانتی گراد به دمای ۱۰- درجه به عنوان تیمار دمای زیر صفر انتقال یافتند. همان گونه که ذکر شد، دمای اعمال شده (۱۰ درجه سانتی گراد)، دمای سازگاری گیاهچه های نخود به سرما است و انتظار می رود گیاهان پس از قرارگیری در این شرایط، آمادگی بیشتری در رویارویی با دمای پایین تر نشان دهند. به منظور بررسی بیان ژن مورد نظر در دمای پایین تر، مطالعات تکمیلی با قرار دادن گیاهچه های سازگار شده در دمای ۱۰- درجه سانتی گراد نیز انجام شد. نتایج نشان داد که میزان ELI گیاهان سازگاری نشده از ۲۰/۳۱ به ۵۶/۶۵ رسید که بیانگر آسیب شدید غشایی و مرگ فیزیولوژیکی گیاه است در حالی که اعمال این تیمار دمایی در گیاهان سازگار شده سبب افزایش میزان ELI تا ۴۲/۸۸ گردید که در فاز بهبودی، این گیاهان قابلیت برگشت پذیری خواهند داشت. بنابراین سازگاری به سرما به عنوان یکی از عوامل مهم تحمل گیاه می تواند سبب کاهش خسارت به غشای سلولی تلقی شود. جهت بررسی تکمیلی پاسخ های گیاه گیاهان سازگار شده به تنش سرمایی بالای صفر (۴ درجه سانتی گراد) نیز انتقال یافتند. نتایج نشان داد که انتقال گیاهان سازگار شده به دمای ۴ درجه سبب افزایش موقت و ابتدایی میزان ELI تا ۴۸/۳۷ شد و پس از آن کاهش میزان ELI در روز سوم مشاهده شد. بنابراین به نظر می -

رسد که سازگاری به سرما سبب آمادگی سلول های گیاه در مواجهه با تنش های دمایی شدیدتر شده است. گیاهان تنش دیده در ۴ درجه سانتی گراد جهت بررسی میزان ELI در فاز بهبودی به دمای ۲۳ درجه سانتی گراد انتقال یافتند که نتایج تایید کننده داده ها در جهت کاهش میزان ELI تا میزان ۳۶/۲۹ و بهبود وضعیت گیاه بود. این بدان معنی است که گیاه نخود توانسته است در مواجهه با دمای ۱۰ درجه توانایی لازم جهت تحمل به دمای ۴ درجه سانتی گراد و تنش های شدیدتر ۱۰- درجه سانتی گراد را کسب کند. نتایج فوق الذکر اغلب مربوط به بررسی قابلیت نفوذپذیری غشاء پلاسمایی در تیمارهای دمایی بود. در مطالعه واکنش غشاء کلروپلاستی به تنش سرما از روش MDA استفاده شد. آزمون مقایسه میانگین داده ها اختلاف معنی داری بین تیمارهای دمایی نشان داد که بیانگر تنوع بالقوه پاسخ های گیاه تحت تنش های دمایی می باشد (جدول ۱). تجزیه نتایج MDA در دمای ۲۳ و ۱۰- درجه سانتی گراد روندی مشابه با نتایج ELI را نشان داد به طوری که تیمار سازگاری به سرما سبب کاهش میزان MDA نسبت به گیاهان سازگار نشده گردید. میزان کم پراکسیداسیون غشا در سلول های برگ عامل مهم تحمل گیاهان به تنش های سرما محسوب می شود (۸ و ۸). لپورت و همکاران گزارش کردند که ۸۰-۵۰ درصد کاهش عملکرد در اثر محدودیت در فتوسنتز است و تنش سرما با آسیب به غشاهای کلروپلاستی می تواند بیشترین خسارت را به فتوسنتز و راندمان تولید گیاه وارد کند (۱۵ و ۱۴). تیمار دمایی ۴ درجه سانتی گراد در گیاهان سازگار شده ابتدا سبب کاهش شدید میزان MDA گردید که اهمیت سازگاری به سرما در گیاه را تایید می کند اما ادامه اعمال این تیمار سبب افزایش میزان خسارت به گیاه شد. بیشترین میزان خسارت MDA در روز سوم در دمای ۴ درجه سانتی گراد بدست آمد که مشابه نتایج ELI در این روز بود. یعنی گیاه سازگار شده قادر به پاسخ در دماهای پایین بالای صفر درجه در زمان های کوتاه مدت^۱ می باشد. در فاز بهبودی نیز نتایج حاکی از کاهش میزان MDA در سطح سلول می باشد که بیانگر بهبود پاسخ های گیاه در جهت مقابله با تنش سرمایی است. تحقیقات نشان می دهند که در گیاهان در طی تنش اکسیداتیو از جمله تنش سرما، گونه های فعال

^۱ Short-term

اکسیژن (ROS) تجمع می یابد. سمیت با اکسیژن ویژگی ذاتی زندگی هوازی بوده تا جایی که حدود یک درصد اکسیژن مصرفی گیاهان به منظور تولید گونه های فعال اکسیژن تغییر می یابد (۳ و ۷). ROS با اکسیداسیون ترکیبات سلولی از جمله پروتئین و چربی های غشاء و اندامک های سلولی سبب خسارت به آن ها می شود به طوری که مطالعه آن ها امروزه به عنوان رخداد های تغییر پذیر در دوره های کوتاه زمانی تلقی می شود و مطالعه این مسئله در فهم مکانیسم های تحمل به تنش های دمایی پایین بسیار ارزشمند است. در عوض گیاهان، فعالیت آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی خود را بعنوان یک سیستم دفاعی در مقابله با تنش اکسیداتیو افزایش می دهند و بدین طریق از تجمع و خسارت ROS جلوگیری می کنند. بنابراین پیشنهاد شده که دلیل اصلی خسارت تنش اکسیداتیو، ناتوانی سیستم های دفاعی از جمله آنزیم های آنتی اکسیدان می باشد که بدین ترتیب در این قسمت فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بررسی شد. پراکسید هیدروژن (H_2O_2) یکی از مهم ترین ROS ها، علاوه بر نقش تخریبی به علت طول عمر طولانی تر آن نسبت به سایر ROS ها، به عنوان سیگنال سلولی در جهت تحریک سیستم های دفاعی محسوب می شود. یکی از مهم ترین آنزیم های دخیل در حذف H_2O_2 کاتالاز بوده که در شرایط تنش های کوتاه مدت (چندین ساعت تا یک روز) سریع ترین پاسخ ها را در سلول نشان می دهد (۴ و ۱). انتقال گیاهچه ها به دمای ۱۰ درجه سانتی گراد ابتدا سبب کاهش میزان فعالیت این آنزیم نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی گراد شد که منطقی به نظر می رسد. زیرا فعالیت آنزیم ها علیرغم حضورشان در سلول تحت تنش سرما کاهش می یابد و در نتیجه ممکن است ROS ها سبب ایجاد خسارت به غشاهای سلولی شوند. نتایج ELI و MDA نیز در این آزمایش تایید کننده این مطلب است. اما در روز سوم سازگاری، میزان فعالیت آنزیم CAT بعد از تطابق نسبی سلول با شرایط دمایی افزایش یافت و در نتیجه میزان خسارت سلولی به کمترین مقدار خود رسید. بنابراین به نظر می رسد فعالیت آنزیمی CAT و نتایج MDA، ELI با هم در تقابل هستند. با ورود گیاهان سازگار شده به دمای ۴ درجه سانتی گراد، میزان فعالیت آنزیم سیر صعودی گرفت که به نظر می رسد بیانگر سنتز بیشتر آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله کاتالاز در وضعیت توازن جدید سلولی

گیاهان سازگار شده است که به دنبال افزایش میزان ROS ها در سلول انجام می گیرد. مقایسه داده های آنزیم CAT، ELI و MDA نشان می دهد که آنزیم CAT مهم ترین آنزیم شرکت کننده در حذف ROS ها می باشد و نتایج این آزمایش تحقیقات قبلی ما در خصوص اینکه CAT قادر به کاهش خسارت سلولی پس از تجمع ROS ها است را تایید کرد (۱). در فاز بهبودی به سبب کاهش میزان خسارت سلولی (مشخص شده در نتایج ELI و MDA)، فعالیت آنزیم کاتالاز نیز کاهش یافت یعنی سلول فعالیت خود را پس از دوره سرما حفظ کرده و پاسخ های معقول به محیط می دهد و سازگاری به سرما عامل مهم در ایجاد توازن جدید و پاسخ های سلولی است. نتایج انتقال گیاهان به دمای ۱۰- درجه سانتی گراد به عنوان فاز شدید تنش سرما در گیاهچه ها مطالعه شد. انتقال گیاهان سازگار شده به دمای زیر صفر ۱۰- درجه سانتی گراد سبب افزایش نسبی میزان فعالیت آنزیم نسبت به شرایط سازگاری شد در حالی که در گیاهان سازگار نشده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به کمترین میزان خود رسید. این نتایج نشان می دهد که در دماهای زیر صفر افزایش فعالیت مکانیسم های تخریب پروتئینی از یک طرف و کاهش فعالیت مکانیسم های سنتز پروتئینی از طرف دیگر، سبب روند رو به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است. در گیاهان سازگار شده به علت ایجاد تطابق نسبی و موقتی این وضعیت محسوس نبوده اما در عوض در گیاهان سازگار نشده تغییرات فعالیت آنزیمی شدید می باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که پاسخ سریع به تنش سرما و در نتیجه آن کاهش خسارت در گیاه نخود می تواند در مدت زمان کوتاهی پس از شروع سازگاری به سرما آغاز شود که این مدت کوتاه می تواند گیاهچه های نخود را برای مقابله با اثرات تنش آماده کند. در طول فازهای سازگاری به سرما و تنش سرما میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (به عنوان سیستم دفاع سلولی) و نتایج MDA و ELI (به عنوان شاخص های خسارت) با هم در تقابل بودند. بررسی گیاهان در فاز بهبودی نشان داد که افزایش تحمل تحت شرایط دمای پایین ویژگی موقت بوده و پس از گذر از تنش سرما به علت کاهش خسارت به غشاهای سلولی فعالیت آنزیم کاتالاز نیز کاهش یافت اما با توجه به وجود تغییرات در مکانیسم های متعدد پاسخ سلولی لزوم بررسی های گسترده در سطوح پروتئینی و فیزیولوژیکی-

منابع

۱. نظری م.ر، معالی امیری ر، رمضانپور س.س. ارزیابی کمی الگوی بیان ژنهای بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکوزیداز تحت تنش سرما در گیاه نخود، ژنتیک نوین. ۱۳۸۹: شماره ۴: ۷۰-۵۹
2. Abei H. Catalase invitro methods in enzymology 1984; 105, 121-126.
3. Asada K, Takahashi M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ. Photoinhibition. Elsevier Science Publishers, The Netherlands 1987; 227-287.
4. Bettaieb T, Mahmoud M, Galarreta J, et al. Relation between the Low Temperature Stress and Catalase Activity in Gladiolus Somaclones (Gladiolus grandilrorus Hort.). Sci. Hort 2007; 113, 49-51.
5. Browse J and Xin Z. Temperature sensing and cold acclimation. Physiology and metabolism 2001; 4, 241-246.
6. Carratu L, Franceschelli S, Pardini CL, et al. Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93, 3870-3875.
7. Chaitanya KV, Sundar D, Masilamani S, et al. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. Plant Growth Regulation 2001; 00, 1-6.
8. Deryabin AN, Dubinina IM, Burakhanova EA, et al. Influence of yeast-derived invertase gene expression in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature. Thermal Biology 2005; 30, 73-77.
9. Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. 1. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. Arch. Biochem. Biophys 1968; 125, 189-215.
10. Heidarvand L., Maali Amiri R. What Happens in Plant Molecular Responses to Cold Stress. Acta Physiol. Plant 2010; 32, 419-431.
11. Hepburn HA, Naylor REL, Stokes DT. Electrolyte Leakage from Winter Barley Tissue as Indicator of Winter Hardiness Ann. Appl. Biol 1986; 108, 164-165.
12. Horvath I, Glatz A, Varvasovszki V, et al. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in Synechocystis PCC 6803: identification of hsp17 as a bfluidity geneQ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95, 3513-3518.
13. Kaur G, Kumar S, Nayyar H, et al. Cold Stress Injury during the Pod-Filling Phase in Chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects on Quantitative and Qualitative Components of Seeds. Journal of Agronomy and Crop Sciences 2008; 194, 457-464.
14. Kingston-Smith AH, Harbinson J, Williams J. Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. Plant Physiology 1997; 114, 1039-1046.

بیوشیمیایی در این گیاه به موازات مطالعه ژنهای مهم درگیر در شرایط تنش سرما بیش از پیش احساس می شود.

15. Leport, L., Turner, N.C., French, R.J., Barr, M.D., Duda, R., Davies, S.L., Tennant, D. F. & Siddique, K.H.M. (1999). Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a mediterranean-type environment. European Journal of Agronomy, 11, 279-291.
16. Los DA, Murata N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1666, 142-157.
17. Los DA, Murata N. Structure and Expression of Fatty Acid Desaturases. Biochim. Biophys. Acta 1998; 1394, 3-15.
18. Maali-Amiri R, Goldenkova-Pavlova I., Pchelkin VP, et al. Lipid Fatty Acid Composition of Potato Plants Transformed with the $\Delta 12$ -Desaturase Gene From Cyanobacterium. Russian Journal of Plant Physiol 2007; 54, 678-685.
19. Maali Amiri R, Yur'eva NO, Shimshilashvili KR, Goldenkova-Pavlova, IV, Pchelkin VP, Kuznitsova EI, Tsydendambaev VD, Trunova TI, Los DA, Salehi Jouzani GR, Nosov AM. Expression of acyl-lipid $\Delta 12$ -desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance of potato. Journal of Integrative Plant Biology 2010 ; 52, 289-297.
20. Murata N, Los DA. Membrane fluidity and temperature perception. Plant Physiol 1997; 115, 875-879.
21. Osamu M, Iba K. Trienoic fatty acids and stress responses in higher plants. Plant Biotechnol 2005; 22, 423-430.
22. Popov VN, Orlova IV, Kipaikina NV, et al. The Effect of Tobacco Plant Transformation with a Gene for Acyl-Lipid $\Delta 9$ -Desaturase from *Synechococcus vulcanus* on Plant Chilling Tolerance. Russian Journal of Plant Physiol. 2005; 52, 664-667.
23. SamachA, Wigge PA. Ambient temperature perception in plants. Current Opinion In Plant Biology 2005; 8, 483-486.
24. Scebbba F, Sebastiani L, Vitagliano C. Changes in Activity of Antioxidative Enzymes in Wheat (*Triticum aestivum*) Seedlings under Cold Acclimation. Physiologia Plantarum 1998; 104, 747-752.
25. Srinivasan A, Johansen C, Saxena NP. Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): characterization of stress and genotypic variation in pod set, Field Crops Res 1998; 57, 181-193.
26. Sukharev S. Mechanosensitive channels in bacteria as membrane tension reporters. FASEB J 1999; 13, 55- 61.
27. Sukumaran NP, Weiser CJ. An Excised Leaflet Test for Evaluation Potato Frost Tolerance. HorScience 1972; 7, 467-468.
28. Thomashow MF. Plant cold tolerance: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 1999; 50, 571-599.
29. Vigh L, Los DA, Horvath I, Murata N. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-

catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desA gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90, 9090–9094.

30. Wood JM. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based Sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 1999; 63, 230 – 262.

31. Xin Z, Browse J. eskimo1 mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95, 7799-7804.

32. Xin Z, Browse J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ* 2000; 23,893-902.

33. Zhirov VK, Merzlyak MN, Kuznetsov LV. Peroxidation of membrane lipids in cold-resistant plants damaged by below-zero temperature. *Sov. Plant Physiol* 1982; 29,1045–1052.