

بررسی گزینش به کمک نشانگر ورنالیزاسیون و تحمل به انجماد در جو

Study of marker-assisted selection of vernalization and frost tolerance in barley

ایمان ناصح غفوری^۱، محمدرضا بی‌همتا^{۱*}، منصور امید^۱، ولی‌اله محمدی^۱

۱- دانشجوی دکتری، استادان، دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ایران.

Naseh Ghafoori I¹, Bihamta MR^{*1}, Omid M¹, Mohammadi V¹

1. PhD Student, Professors, Associate Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran.

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

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

تحمل به انجماد و توانایی بقای گیاه در دماهای زیر صفر از اجزای مهم تحمل زمستانه می‌باشد. پیشرفت‌های اخیر در زمینه کلون‌سازی ژن‌ها و نشانگرهای مولکولی در جو، زمینه مناسبی را جهت استفاده از نشانگرهای مبتنی بر PCR برای گزینش سریع ژنوتیپ‌های متحمل به انجماد بدون اعمال شرایط تنش، برای اصلاح‌گران در بستر مولکولی فراهم آورده است. در این بررسی ۵ نشانگر مولکولی مرتبط با تحمل به انجماد و نیاز به بهاره‌سازی در ۲۴ ژنوتیپ جو با تیپ رشد‌های زمستانه، بینابین و بهاره مورد آزمون قرار گرفته و تحمل به انجماد آن‌ها تحت شرایط کنترل شده انجماد در ۱۲- درجه سانتی‌گراد ارزیابی شدند. نشانگر HvBM5A مربوط به مکان‌های ژنی *Fr-H1* و *Vrn-H1* به دلیل وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین صفات پیشینه کارایی فتوشیمیایی فتوسنتز II و پایداری غشای سیتوپلاسمی در بین گروه‌های متشکله در این نشانگر، به عنوان مناسب‌ترین نشانگر در ژرم پلاسما مورد بررسی جهت گزینش انتخاب شد. همچنین در مکان ژنی *Fr-H2* نشانگر HvCBF3 همبستگی بیشتری نسبت به *HvCBF14* با تحمل به انجماد نشان داد. نتایج ارزیابی Fv/Fm نشان داد که تنش انجماد کارایی فتوشیمیایی فتوسنتز II را به طور معنی‌داری کاهش داده که این کاهش به صورت کلی در ژنوتیپ‌های متحمل (زمستانه و بینابین) کمتر از ژنوتیپ‌های حساس (بهاره) بود. علاوه بر آن تنش انجماد با ایجاد خسارت در غشای سلول اختلاف معنی‌داری را بین میانگین این صفت در ژنوتیپ‌های حساس (تیپ رشد بهاره) ۰/۳۸۱ نسبت به میانگین مربوط به ژنوتیپ‌های متحمل (تیپ رشد زمستانه و بینابین) ۰/۱۷۴ نشان داد.

واژه‌های کلیدی

تحمل به انجماد
تراوش یونی
فلورسانس کلروفیل
گزینش بر اساس نشانگر
HvCBF

مقدمه

بر اساس آمار موجود در کشور، حدود ۶۶ درصد اراضی دیم و ۵۱ درصد اراضی آبی زیر کشت گندم و جو، در مناطق سرد و کوهستانی واقع شده‌اند. متوسط حداقل مطلق درجه حرارت اراضی زیر کشت گندم و جو در مناطق سرد با ارتفاع بیش از هزار متر، در طی یک دوره طولانی کمتر از ۱۲ درجه سلسیوس می‌باشد (Mahfoozi et al. 2005). دمای پایین یکی از تنش‌های محدود کننده تولید در غلات به حساب می‌آید و منجر به تاخیر در رشد گیاه و افزایش طول دوره رشد می‌شود (Fowler et al. 1996).

در بین غلات، جو (*Hordeum vulgare* L.) به دلیل خودگشنی، دیپلوئید بودن، گستره وسیع سازگاری، دسترسی بالا به منابع ژنتیکی وحشی و دارای تشابه خطی بالای ژن و پروتئین^۱ با سایر اعضای گونه، مدل ژنتیکی مناسبی جهت بررسی پاسخ به شرایط نامساعد محیطی می‌باشد (Hayes et al. 2003). توانایی گیاه برای بقا در زمستان‌های سخت را تحمل زمستانه گویند. تحمل زمستانه صفت پیچیده‌ای است که شامل تحمل به انجماد، کم اکسیژنی، تشکیل بلور یخ، تحمل به بیماری و... می‌شود و عوامل متعددی از جمله مدت زمان تنش انجماد و شدت آن، دوره‌های متناوب انجماد و آب شدن، تجمع مواد سمی اثرگذار بر ظرفیت بازایی در گیاه، مرحله رشدی که گیاه با تنش روبرو می‌شود و مدت زمان خوگیری به سرما در بر آن تاثیر گذار می‌باشد (Fowler and limin 1997). تنش انجماد از مهمترین عوامل محدود کننده در بیشتر نواحی می‌باشد، در معنای وسیع خود شامل واکنش‌های پیچیده‌ای بوده و به حالتی اطلاق می‌شود که گیاهان تحت دمای زیر صفر قرار می‌گیرند (Russel et al. 2006).

قرارگرفتن گیاه در معرض دماهای پایین، ولی بالای صفر، تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در گیاهان بوجود می‌آورد که موجب افزایش تحمل گیاه به انجماد می‌شود. این فرایند را خوگیری یا عادت دهی به سرما می‌گویند (Palva et al. 2001). تظاهر ژن‌های ساختمانی مرتبط با تحمل به انجماد در گیاه در دمای عادت‌دهی به سرما آغاز و به تدریج بر میزان تحمل به انجماد در آن افزایش پیدا می‌کند و در نهایت به حداکثر میزان

خود می‌رسد. زمان لازم برای حصول حداکثر تحمل به انجماد در غلات بسته به نوع ژنوتیپ، میزان و طول دوره عادت دهی، ۴ تا ۸ هفته گزارش شده است (Mahfoozi et al. 2001). گیاه سازگار شده به سرما در اثر مواجه با دماهای بالاتر، کم‌کم سازگاری خود را به سرما از دست می‌دهد و در صورت عدم تداوم این شرایط به خصوص در مرحله مهم انتقال از فاز رویشی به زایش (Fowler and Limin 2004)، گیاه می‌تواند دوباره با قرارگیری در دماهای پایین، سازگاری به سرما را کسب کند (Rapacz 2002).

نتایج تحقیقات (Mahfoozi et al. 2001) ارتباط تنگاتنگی را بین زمان تکمیل بهاره‌سازی و حساسیت به طول دوره روشنایی را با تحمل انجماد نشان داد. در نتیجه عوامل تنظیمی فنولوژیکی رشد به خصوص نیاز به بهاره‌سازی و عکس‌العمل به طول دوره روشنایی می‌توانند نقش به سزایی در تحمل انجماد ایفا کنند. تغییرات مورفوفیزیولوژیک در دماهای پایین و نه دمای زیر صفر در گیاه بوجود می‌آید که از یک طرف به ظرفیت سازگاری گیاه در برابر تغییرات محیطی و از طرف دیگر توانایی کسب حداکثر تحمل انجماد وابسته است. عوامل تنظیمی گیاه در دمای سازگاری با سرما را شامل مراحل فنولوژیکی گیاه، نیاز بهاره‌سازی و طول دوره روشنایی معرفی کردند، همچنین سرعت سازگاری گیاه با سرما را مرتبط با زمینه ژنوتیپی گیاه معرفی کردند (Limin and Fowler 2006).

تنش انجماد به غشای سیتوپلاسمی آسیب می‌رساند و در صورت ادامه انجماد، پارگی غشای سیتوپلاسمی و متعاقب آن تراوش مواد سلولی را در پی دارد (Rizza et al. 1994; Esenta et al. 2003). روش تراوش یونی توسط Elena et al. (1995) برای ارزیابی میزان تحمل به انجماد در ژنوتیپ‌های گندم مورد استفاده قرار گرفته است. همچنین استفاده از این روش برای آزمایشات تحمل به انجماد توسط Wulff et al. (1994) نیز گزارش شده‌است.

امروزه، فلورسانس کلروفیل (Fluorescence Chlorophyll II) به عنوان یک معیار سنجش برای اندازه‌گیری تاثیر تنش‌های محیطی، از جمله تنش انجماد بر گونه‌های زراعی و تعیین میزان تحمل به انجماد آنها پیشنهاد شده است (Rizza et al. 2011). در حقیقت، مقدار فلورسانس کلروفیل نشان‌دهنده سالم بودن غشای تیلاکوئید

¹ Colinearity

به کمک نشانگرهای مولکولی و با استفاده از تجزیه‌های QTL می‌باشد که نتیجه آن شناسایی QTLهای تحمل به تنش‌ها می‌باشد. بررسی بر اساس روش ژنتیک مولکولی، پاسخ گیاه به تنش‌ها بر اساس شناسایی ژن‌های دخیل در درک تنش، انتقال پیام به داخل سلول و تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو می‌باشد (Xiong et al. 2002; Yamaguchi-shinozaki and Shinozaki 2005). بین مطالعات مولکولی پاسخ گیاه به تنش‌های خشکی و انجماد در گیاهان بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. روی بازوی بزرگ کروموزوم 5H جو ناحیه‌ای وجود دارد که مسئولیت اجزای مختلف در تحمل به انجماد از قبیل QTLهای مربوط به بهاره‌سازی، تحمل به دمای پایین محیط رشد و حساسیت به طول دوره روشنایی را بر عهده دارد (Cattivelli et al. 2002). دو QTL که نقش اساس در تحمل انجماد در جو را ایفا می‌کردند، در کروموزوم 5H در جمعیت نقشه‌یابی Nure (زمستانه) و Tremois (بهاره) مشخص شدند (Francia et al. 2004). اولین QTL، *Fr-H1* که در محل ژن *HvBM5A* قرار گرفته و مسئول نیاز به بهاره‌سازی می‌باشد و می‌تواند به صورت پلوتروپی روی تحمل به انجماد تاثیرگذار باشد (Szucs et al. 2006). بررسی‌ها روی جمعیت *Dicktoo × Morex* ارتباط این QTL را با تحمل انجماد تایید کرده است (Skinner et al. 2006). دومین QTL *Fr-H2* در محل ژن‌های *HvCBF* که عوامل رونویسی (TF) جهت بیان ژن‌های تنظیم شونده با سرما می‌باشند، قرار دارد (Francia et al. 2006; Skinner et al. 2006; Tondelli et al. 2004). نشان داده که عوامل رونویسی متعلق به خانواده CBF، نقش مهمی در سازگاری به انجماد را بر عهده دارند (Thomashow et al. 2001). ارتباط این دو QTL از یک طرف با بهاره‌سازی و از طرف دیگر با ژن‌های *COR* حاکی از اثرگذاری عوامل مجزا در تعیین بقای زمستانه در گیاه است. در گندم و جو حد آستانه دمای سازگاری به انجماد با مکان ژنی *FR2* مرتبط بوده در حالی که تنزل تحمل به انجماد در پایان دوره سازگاری مرتبط با مکان ژنی *VRN1* می‌باشد (Galiba et al. 2009). پروتئین‌های CBF/DREB عوامل رونویسی متصل به عناصر تنظیمی DNA، *CRT/DRE* در ناحیه پروموتوری اکثر ژن‌های تحریک شده توسط سرما می‌باشند که از اجزای مهم تنظیمی در

و کارایی نسبی انتقال الکترون را از فتوسیستم II به فتوسیستم I می‌باشد. وقتی مولکول‌های کینون (اولین کینون گیرنده الکترون فتوسیستم II) در وضعیت کاملاً اکسید شده (وضعیت باز مرکز واکنش فتوسیستم II) هستند، سیستم دارای کمترین فلورسانس (F_0) است که به تدریج با افزایش احیا شدن این مولکول‌ها، فلورسانس افزایش می‌یابد. این روند تا احیای کامل مولکول‌های آن ادامه پیدا می‌کند. در چنین حالتی مرکز فتوسیستم در حالت احیای کامل بوده، دارای بیشترین فلورسانس (F_m) است. در واقع، تنش انجماد ظرفیت پذیرش و انتقال الکترون را کاهش داده، در نتیجه سیستم به سرعت به F_m می‌رسد، که کاهش فلورسانس متغیر (F_v) را در پی خواهد داشت. از طرفی با افزایش شدت نور، سیستم فتوسنتزی با یک روش تنظیمی برای کاهش انرژی القا شده تحریکی، انرژی مازاد را به طریق افزایش خاموشی غیر فتوشیمیایی به صورت فرآیند غیر تشعشعی از دست می‌دهد. با این مکانیسم تنظیمی، ضمن حفاظت از مرکز واکنش، موجب می‌شود که حداقل صدمه به این مرکز وارد شود (Bhardway and Singhal 1981). از این رو کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II به صورت نسبت فلورسانس متغیر به ماکزیمم (F_v/F_m) بیان می‌شود. بنابراین تنش‌های محیطی با تاثیر بر فتوسیستم II باعث کاهش این نسبت می‌شوند (Akar et al. 2009). در تحقیقات Rizza et al. (2012) به کمک ارزیابی فلورسانس کلروفیل (F_v/F_m) در ژنوتیپ‌های جو، مشخص شد که خسارت ناشی از دماهای زیر صفر (انجماد) روی برگ اولیه پس از ۲۴ ساعت بازیابی گیاه بعد از تنش، اطلاعات بیشتری را نسبت به مدت زمان بیش از ۲۴ ساعت بازیابی گیاه (۴۸ ساعت) در اختیار محقق قرار می‌دهد.

به دلیل ناکارآمدی روش‌های سنتی اصلاح در شناسایی ساز و کارهای ژنتیکی تحمل به تنش‌ها در بهبود مقاومت غلات به انجماد و نقش به سزای این سازوکارها در شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل، توجه به سازوکارهای ژنتیکی در تحمل به تنش محیطی افزایش یافته است (Pecchioni et al. 2002). دو مسیر جهت بررسی ژنتیکی تحمل به تنش‌های غیر زنده در پیش گرفته می‌شود که شامل روش‌های مبتنی بر ژنتیک کمی و ژنتیک مولکولی می‌باشد. در بررسی بر اساس ژنتیک کمی، تشریح صفات پیچیده

سیتوپلاسمی در برابر تنش انجماد در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی تحمل به انجماد در جو، ۲۴ ژنوتیپ از ارقام بومی و خارجی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۸ تکرار در سینی‌های پلی‌استایرن حاوی پیت کاشته شدند و در اتاقک رشد به مدت یک هفته در شرایط جوانه‌زنی قرار گرفتند، پس از آن تحت شرایط ده ساعت روشنایی (۲۰۰ میکرو مول بر متر مربع در ثانیه) در دمای سه درجه سانتی‌گراد و ۱۴ ساعت تاریکی در دمای یک و نیم درجه سانتی‌گراد به مدت چهار هفته جهت سازگاری با سرما در اتاقک رشد قرار گرفتند سپس جهت مواجهه با تیمار انجماد، گیاهان در مرحله برگ اولیه، به مدت ۱۲ ساعت در دمای منفی سه درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفته و پس از آن دما به صورت پلکانی هر ساعت دو درجه کاهش یافته تا به دمای انجماد منفی دوازده درجه سانتی‌گراد رسیده و بعد از ۱۶ ساعت دما با همان نرخ دو درجه در هر ساعت افزایش یافته تا به یک درجه سانتی‌گراد برسد گیاهان در این دما به مدت یک ساعت نگهداری شده و مجدداً در شرایط جوانه‌زنی قرار گرفتند (Rizza et al. 2011).

جهت ارزیابی خسارت وارده به گیاه در اثر تنش انجماد، کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II با استفاده از پارامتر فلورسانس کلروفیل II (Fv/Fm)، که به ترتیب فلورسانس متغیر به ماکزیمم در شرایط سازگار شده به تاریکی می‌باشد در سه مرحله بعد از سازگاری با سرما، بلافاصله پس از تنش و ۲۴ ساعت پس از تنش در شرایط بازایی گیاه (دوره روشنایی ۸ ساعت با دمای بیست درجه سانتی‌گراد با شرایط روشنایی مشابه قبل و ۱۶ ساعت تاریکی با دمای پانزده درجه سانتی‌گراد) روی برگ اولیه گیاه به کمک دستگاه فلورومتر (PAM-2000- Walz, Germany) بر اساس روش Rizza et al. (2001) اندازه‌گیری شد. این ارزیابی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در ۸ تکرار انجام گرفت. میزان پایداری غشا سیتوپلاسمی به روش میزان تراوش یونی اندازه‌گیری شد و پس از اعمال تنش مشابه قبل، قطعات برگ‌ها در فالكون‌های حاوی بیست میلی‌لیتر آب دیونیزه قرار گرفت و پس از دو ساعت و نیم قرارگیری در حمام آب گرم در حال جنبش و رسیدن به دمای

رونوشت‌های DNA در مواجهه با دمای پایین بوده و منجر به افزایش تحمل انجماد می‌شوند (Novillo et al. 2004). یک خانواده بزرگ ۲۰ ژنی CBF توسط Skinner et al. (2006) شناسایی شدند که متصل به ژن‌های COR¹ بوده و جز اصلی تنظیمی در تحمل زمستانه محسوب علاوه بر آن Tondelli et al. (2006) موفق به شناسایی ۱۲ ژن CBF در ژنوم جو شدند که با ژن Fr-H2 تفکیک همزمان داشتند.

اثرات افزایشی را برای دو ژن Fr-H1 و Fr-H2 در تحقیقات Francia et al. (2007) پیشنهاد شد و ژن‌های HvCBF را به عنوان بهترین ژن کاندید جهت موقعیت مکانی و کارکردی QTL Fr-2 در جو معرفی کردند. همچنین در بین نتایج حساس و متحمل به انجماد در تلاقی Nure x Tremois که دارای آلل‌های همزیگوت Fr-H1 و Fr-H2 بودند، اختلاف کم از لحاظ Fv/Fm مشاهده کردند که ژن‌هایی با اثرات کوچک در ناحیه دیگر کروموزومی را که هنوز در این تلاقی شناخته نشده‌اند و توسط ژنوتیپ Nure حمل می‌شوند را دلیل این عدم اختلاف معرفی کردند. شواهد نشان‌دهنده نواحی کروموزومی دیگری علاوه بر Fr-H1 و Fr-H2 در ارتباط با تحمل به انجماد می‌باشد (Tuberosa et al. 1997).

در مطالعات Rapacz et al. و Von Zitzewitz et al. (2005) (2010)، تنوع در ناحیه پروموتور Vrn-H1 (نشانگر HvBM5) را عامل مهمی در تحمل انجماد در جو معرفی کردند. همچنین به دلیل تأثیر عوامل محیطی که منجر به تفاوت در سطح سازگاری به سرما پیش از آزمون تحمل به انجماد در ژنوتیپ‌ها می‌شود، بررسی ژنوتیپ‌ها را در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی مشابه شرایط زمستان را ضروری دانستند.

این بررسی به جهت تشخیص توانایی نشانگرهای واقع در دو ناحیه روی کروموزوم ۵H که شامل Fr-H1/VRN-H1 و Fr-H2 (ژن‌های CBF) و همچنین VRN-H2 روی کروموزوم ۴H جهت گزینش غیرمستقیم ژنوتیپ‌های متحمل به انجماد بر اساس نشانگر همبسته (MAS) انجام گرفته همچنین مجموعه ۲۴ ژنوتیپ جو بر مبنای کارایی فتوسیستم II و پایداری غشای

¹ Cold regulated

(Tondelli et al. 2006). نشانگرهای پلی‌مورفیسم برای ۲۴ ژنوتیپ جو به کارگرفته شدند. ژنوتیپ‌های Nure به عنوان ال A و Tremois به عنوان ال B مبنای مقایسه بین ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. جهت اطمینان از بسط واکنشگرها آزمایش در ۳ تکرار انجام گرفت.

نتایج و بحث

تحمل به انجماد در مجموعه ژنوتیپ‌ها توسط دو روش ارزیابی غیرمستقیم (۱) کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (Fv/Fm) پس از قرارگیری در شرایط کنترل شده سرما و (۲) ارزیابی میزان تراوش یونی، مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه واریانس ساده صفات نشان داد اختلاف ارقام مورد مطالعه از نظر صفات مورد مطالعه (پایداری غشا و Fv/Fm پس از ۲۴ ساعت بازیابی) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). با توجه به عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها در اندازه‌گیری Fv/Fm پس از سازگاری، همچنین تنوع پایین در Fv/Fm بلافاصله پس از تنش بین ژنوتیپ‌ها، مقایسه ژنوتیپ‌ها بر اساس Fv/Fm پس از ۲۴ ساعت بازیابی گیاه انجام گرفته چون قبل از ظهور علائم ظاهری انجماد در گیاه، ژنوتیپ‌ها عکس‌العمل متنوعی در این صفت نشان می‌دهند (Akar et al. 2009; Rizza et al. 2001). این اختلاف بین ژنوتیپ‌ها از نظر میزان تراوشات سلولی و فلورسانس کلروفیل پس از ۲۴ ساعت بازیابی گیاه، بدین معنی است که میزان تحمل انجماد ژنوتیپ‌ها متفاوت بوده و از این حیث در میان ژنوتیپ‌ها تنوع لازم جهت انتخاب ژنوتیپ برتر وجود دارد. بررسی پلی‌مورفیسم نشانگرهای مرتبط با *Vrn-H1/Vrn-H2* چهار نوع هاپلوتاایپ را مشخص کرد، رتبه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ال‌های دو ژنوتیپ مرجع (A) Nure و (B) Tremois صورت گرفت. بر این اساس (AA) زمستانه و دارای ال‌های *vrn-H1/Vrn-H2*، (BB,BA) بهاره و به ترتیب دارای ال‌های *Vrn-H1/Vrn-H2* و (AB) بینابین و شامل ال *H1/vrn-H2* می‌باشند (Akar et al. 2009; Rizza et al. 2001). نتایج نشانگرهای مولکولی نشان داد که در مجموعه ژنوتیپ‌های مورد بررسی نوزده ژنوتیپ دارای تیپ رشد بهاره،

بیست و پنج درجه سانتی‌گراد، آزادسازی یون‌ها توسط دستگاه اندازه‌گیری هدایت الکتریکی تعیین شد (Rizza et al. 1994). ارزیابی خسارت غشا در اثر انجماد به کمک حداکثر خسارت وارده به غشا توسط اتوکلاو نمونه‌ها توسط رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$(C1-Cw)/(C2-Cw)*100$$

در این رابطه C1 هدایت الکتریکی نمونه‌ها در مرحله اول و C2 اندازه هدایت الکتریکی آن‌ها پس از اتوکلاو و Cw میزان هدایت الکتریکی آب دیونیزه می‌باشد. جهت ارزیابی ژنوتیپی از نشانگرهای (CAPS) *HvBM5A* و *HvCBF14* به ترتیب جهت شناسایی ژن‌های *VRN-H1* و *CBF14* و همچنین نشانگرهای *SNF2P* (STS), *Zcct-H* و *HvCBF3* به ترتیب جهت شناسایی ژن‌های *VRN-H2*, *VRN-H2* و *CBF3* استفاده شد (Karsai et al. 2005; Von Zitzewitz et al. 2005; Tondelli et al. 2006). نشانگرهای مربوطه بر اساس تحقیقات Francia et al. 2004; Von Zitzewitz et al. 2005; Karsai et al. 2005; Tondelli et al. 2006) روی گیاهان یک هفته‌ای در شرایط رشدی 20°C در روشی و 15°C در تاریکی اعمال شد. پس از استخراج DNA به روش CTAB از برگ گیاهان و تعیین کمیت DNA بر اساس جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نمونه‌ها در حجم نهایی ده میکرولیتر شامل بیست نانوگرم DNA الگو، بافر ۱x PCR، کلورور منیزیم یک و نیم میلی‌مولار، بیست و پنج صدم میلی‌مولار dNTPs، از هر آغازگر نیم میکرو مولار و یک واحد Tag DNA Polymerase انجام شد. برنامه تکثیر به صورت 94°C به مدت دو دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه و سپس ۳۵ چرخه به صورت 94°C به مدت سی ثانیه، 55°C به مدت سی ثانیه و 72°C به مدت یک دقیقه و در انتها مرحله بسط در دمای 72°C به مدت پنج دقیقه انجام شد و بعد از آن تفکیک قطعات در ژل آگارز یک و هشت دهم درصد انجام شد. هضم آنزیمی نشانگرهای CAPS برای *HvBM5A* و *HvCBF14* به وسیله آنزیم *NlaIII* طبق دستورالعمل برای ده میلی لیتر محصول پی سی آر به همراه دو واحد آنزیم محدود کننده، بافر ۱x واکنشگر و یک دهم میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA که به مدت یک و نیم ساعت در انکوباتور قرارگرفته بودند، انجام شد و سپس روی ژل آگارز استاندارد دو نیم درصد تفکیک شدند (Francia et al. 2004; Karsai et al. 2005; Von Zitzewitz et al. 2005).

چهار ژنوتیپ زمستانه و یک ژنوتیپ دارای تیپ رشدی بینابین است (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی بر روی ۲۴ ژنوتیپ جو مورد بررسی

منابع تغییر	درجه آزادی	میزان نشت یونی	درجه آزادی	Fv/Fm پس از سازگاری	Fv/Fm بلافاصله پس از تنش	Fv/Fm پس از ۲۴ ساعت بازیابی
تکرار	۳	۰/۰۰۸	۷	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۸
تیمار	۲۳	۰/۱۱۶**	۲۳	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۴**	۰/۱۲۵**
اشتباه	۶۹	۰/۰۰۳	۱۶۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۱۲

جدول ۲- Fv/Fm، تراوش یونی و نتایج ۵ نشانگر مورد آزمون ژنوتیپ های جو مورد مطالعه

ژنوتیپ	Fv/Fm	نشت یونی	HvBM5v	Zcct	SNF2p	HvCBF14	HvCBF3A	تیپ رشد
ارس	۰/۵۱۲±۰/۱۸۰	۰/۶۱۹±۰/۰۳	B	B	B	A	A	بهاره
استرین	۰/۵۲۳±۰/۲۲۳	۰/۵۱۴±۰/۰۹	B	A	A	A	A	بهاره
افضل	۰/۶۰۹±۰/۰۶۷	۰/۳۶۱±۰/۰۶	B	A	A	A	A	بهاره
ترش	۰/۶۷۹±۰/۰۷۲	۰/۳۰۷±۰/۰۹	B	B	B	B	A	بهاره
ترکمن	۰/۳۵۳±۰/۱۳۸	۰/۵۳۵±۰/۰۶	B	A	A	B	B	بهاره
جنوب	۰/۶۸۹±۰/۰۳۰	۰/۳۳۷±۰/۰۷	B	B	B	A	A	بهاره
دشت	۰/۷۵۰±۰/۰۱۶	۰/۲۰۳±۰/۰۳	B	A	A	A	A	بهاره
ریحان	۰/۶۰۰±۰/۰۸۸	۰/۳۲۲±۰/۰۳	B	A	A	A	A	بهاره
زرگو	۰/۶۱۰±۰/۰۶۴	۰/۳۲۱±۰/۰۳	B	A	A	A	A	بهاره
شیرین	۰/۷۵۸±۰/۰۲۶	۰/۱۱۲±۰/۰۲	B	A	A	A	A	بهاره
صحرا	۰/۴۸۴±۰/۱۳۲	۰/۵۱۷±۰/۰۴	B	A	A	A	A	بهاره
کارون	۰/۷۲۳±۰/۰۷۰	۰/۱۸۸±۰/۰۳	B	A	A	A	A	بهاره
کوبر	۰/۵۲۵±۰/۱۲۷	۰/۴۹۱±۰/۰۴	B	A	A	A	A	بهاره
گرگان	۰/۵۷۸±۰/۱۰۷	۰/۳۵۹±۰/۰۲	B	A	A	A	A	بهاره
گوهرجو	۰/۷۵۲±۰/۰۱۸	۰/۲۰۳±۰/۰۱	B	A	A	A	A	بهاره
نیمروز	۰/۵۵۸±۰/۱۲۴	۰/۴۰۲±۰/۰۸	B	B	B	A	A	بهاره
والفجر	۰/۶۷۷±۰/۰۶۹	۰/۲۳۱±۰/۰۷	B	B	B	A	A	بهاره
یوسف	۰/۴۶۳±۰/۱۹۹	۰/۴۷۷±۰/۰۷	B	A	A	A	A	بهاره
Tremois	۰/۴۶۷±۰/۱۹۰	۰/۷۴۴±۰/۰۴	B	B	B	B	B	بهاره
بهمن	۰/۷۶۴±۰/۰۱۱	۰/۲۲۶±۰/۰۲	A	A	A	A	A	زمستانه
ماکوئی	۰/۷۵۵±۰/۰۳۳	۰/۱۵۷±۰/۰۵	A	A	A	A	A	زمستانه
Nure	۰/۷۳۳±۰/۰۳۳	۰/۱۶۲±۰/۰۳	A	A	A	A	A	زمستانه
سرارود	۰/۷۰۳±۰/۱۰۳	۰/۲۱۳±۰/۰۵	A	A	A	A	A	زمستانه
سهند	۰/۷۷۹±۰/۰۱۳	۰/۱۱۳±۰/۰۲	A	B	B	A	A	بینابین
میانگین (بهاره)	۰/۵۹۵±۰/۱۱۴	۰/۳۸۱±۰/۱۶۳						
میانگین (بینابین و زمستانه)	۰/۷۴۶±۰/۰۲۹	۰/۱۷۲±۰/۰۴۵						

همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، تفاوت بسیار معنی‌داری بر اساس نتایج آزمون t استیودنت بین میانگین‌های صفات مورد بررسی گروه‌های A و B نشانگر *HvBM5A* (جدول ۲) که جهت شناسایی *vrn-H1* در ناحیه *Fr-H1/vrn-H1* قرار دارد، وجود دارد همچنین در ارتباط با QTL نوع *Fr-H2* نیز بین میانگین دو گروه مشاهده شده در نشانگر *HvCBF3* (شکل ۱) نیز تفاوت بسیار معنی‌داری در صفات *Fv/Fm* و تراوش یونی در سطح یک درصد مشاهده شد در صورتی‌که با توجه به نتایج مقایسه میانگین صفات مورد بررسی گروه‌های A و B در نشانگر *HvCBF14* (شکل ۲) اختلاف معنی‌دار در سطح کمتری مشاهده شد.

متاثر شدن کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال یک درصد بر اثر تنش انجماد نشان داد که عامل انجماد کارایی این سیستم را به دلیل بازدارندگی نوری کاهش می‌دهد. بر اساس جدول ۴ ارقام سهند، شیرین، ماکویی، گوهرجو و بهمن علاوه بر اینکه دارای بیشترین میزان *Fv/Fm* در شرایط تنش انجماد را داشتند و با توجه به اینکه بالا بودن کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II این ارقام نشان دهنده میزان بالای فتوسنتز آن‌ها در شرایط تنش می‌باشد و همچنین براساس میزان تراوش یونی در اثر تنش، رتبه‌های بالای جدول را به خود اختصاص داده و در مجموع مکان پنج ژنوتیپ برتر جدول ۴ را به خود اختصاص دادند. بررسی ژنوتیپ‌ها پس از دو هفته از اتمام آزمایش و نگهداری در شرایط محیط طبیعی رشد که منجر به بقای ژنوتیپ‌های برتر سهند، شیرین و ماکویی شده بود، نتایج ارزیابی-های *Fv/Fm* و تراوش یونی را تصدیق می‌کند.

برآورد تنش انجماد به کمک ارزیابی فلورسانس کلروفیل II امکان بررسی تعداد زیادی ژنوتیپ را بدون تخریب گیاه فراهم ساخته و علاوه بر تفکیک ژنوتیپ‌ها به گروه‌های متحمل و حساس امکان مقایسه در داخل هر گروه را نیز میسر می‌سازد. شایان ذکر است که نیاز به بهاره‌سازی و حساسیت به طول دوره روشنایی نیز نقش به سزایی در تنظیم پاسخ به دماهای پایین را بر عهده دارند (Fowler et al. 2001) اما تجزیه فنوتیپی برای این صفات نیازمند صرف زمان بسیاری می‌باشد (Fowler 2008).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که سازوکارهای احساس و دریافت سرما و عکس‌العمل گیاه نسبت به سرما در مراحل اولیه رشد در تعیین پتانسیل خوگرگفتن به سرما نقش کلیدی را بر عهده دارند (Rizza et al. 2011). نتایج تحقیقات (Rizza et al. 2011) نشان داده که بین بقای گیاه در برابر تنش زمستانه در مزرعه با شرایط محیطی و مرحله رشدی اعمال شده در این آزمایش همبستگی بالایی را در مقایسه با سایر روش‌ها (Prasil et al. 1996; Koch and Lehmann 2007) به همراه دارد. در این بررسی، ارزیابی *Fv/Fm* به عنوان شاخص خسارت وارده به برگ بعد از ۲۴ ساعت بازیابی پس از تیمار انجماد نسبت به ارزیابی این عامل بلافاصله پس از اعمال تنش به دلیل مشاهده تنوع بالای ژنتیکی سودمند تر واقع شد که این نتیجه با مطالعات (Rizza et al. 2011; Rapacz et al. 2007) و (Dai et al. 2007) مطابقت دارد. در زمان بازیابی، علاوه بر صدمات اولیه وارد شده به گیاه بلافاصله پس از تنش انجماد، صدمات دیگری که در نتیجه اختلاط محتوای سلولی پس از ایجاد شکستگی در دیواره سلولی اتفاق افتاده که منجر به دگرگونی و تخریب محیط سلولی و متعاقب آن سایر ارگان‌ها و در انتها کلروپلاست می‌شود (Clement and van Hasselt 1996).

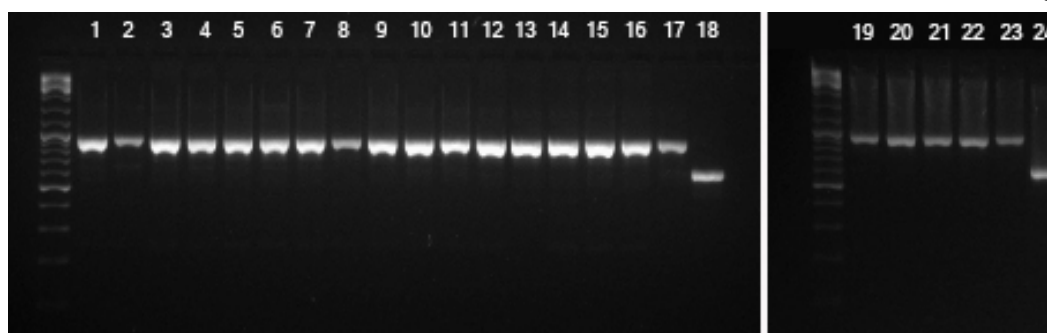
در این تحقیق از روش ترکیبی جهت ارزیابی تحمل انجماد در جو که شامل ارزیابی *Fv/Fm* و تراوش یونی به همراه تجزیه پلی‌مورفیسم نیاز به بهاره‌سازی *Vrn-H1/Vrn-H2* که براساس یافته‌های (Rizza et al. 2011) از اجزای مهم در تحمل به انجماد در جو می‌باشد بر طبق روش (Akar et al. 2009) مورد استفاده قرار گرفت. همچنین (Rizza et al. 2011) استفاده از این روش را جهت شناسایی جمعیت‌های بزرگ بسیار سودمند دانستند. اثرات تنش انجماد به وسیله تغییرات در میزان فلورسانس کلروفیل که منجر به کاهش نسبت *Fv/Fm* و پایداری غشای سیتوپلاسمی قابل برآورد می‌باشد. تشکیل کریستال‌های یخ در بافت‌ها، ایجاد حالت انقباضی در سلول و به تبع آن اثرات سمی ناشی از تجمع یون‌ها توسط غشای صدمه دیده بر اثر تنش انجماد در گیاه با افزایش صفت تراوش یونی همراه است. در بررسی انجام شده در مجموع ژنوتیپ‌ها با تیپ رشد زمستانه و بینابین با میانگین ۰/۷۴۶ برای صفت *Fv/Fm* و ۰/۱۷۲ برای تراوش یونی، تحمل انجماد بیشتری

جدول ۳- نتایج آزمون t استیودنت برای گروه های هر نشانگر در صفات مورد بررسی بر روی ۲۴ ژنوتیپ جو

	HvBM5A (sig)	ZCCT (sig)	Snf2p (sig)	HvCBF3A (sig)	HvCBF14 (sig)
Fv/Fm	(۰/۰۰۹)**۲/۸۷۷	۰/۰۹۸ (۰/۹۲۳)	۰/۰۹۸ (۰/۹۲۳)	(۰/۰۰۳)**۳/۱۳۴	(۰/۰۴۸)**۲/۰۹۹
تراوش یونی	(۰/۰۱۵)**-۲/۶۴۰	-۱/۰ (۰/۳۲۸)	-۱/۰ (۰/۳۲۸)	(۰/۰۰۶)**-۳/۰۷۷	(۰/۰۳۴)**-۲/۲۵۶

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح پنج و یک درصد

شکل ۱- نتایج نشانگر مولکولی *HvCBF3A* مربوط به ۲۴ ژنوتیپ جو. شماره ژنوتیپها: (۱) ریحان؛ (۲) ارس؛ (۳) جنوب؛ (۴) صحرا؛ (۵) دشت؛ (۶) افضل؛ (۷) زرجو؛ (۸) ترش؛ (۹) استرین؛ (۱۰) شیرین؛ (۱۱) گرگان؛ (۱۲) گوهرجو؛ (۱۳) نیمروز؛ (۱۴) کارون؛ (۱۵) کویر؛ (۱۶) والفجر؛ (۱۷) یوسف؛ (۱۸) ترکمن؛ (۱۹) سهند؛ (۲۰) ماکویی؛ (۲۱) بهمن؛ (۲۲) سرارود؛ (۲۳) Nure؛ (۲۴) Tremois.



شکل ۲- نتایج نشانگر مولکولی *HvCBF14* مربوط به ۲۴ ژنوتیپ جو. شماره ژنوتیپها: (۱) ریحان؛ (۲) ارس؛ (۳) جنوب؛ (۴) صحرا؛ (۵) دشت؛ (۶) افضل؛ (۷) زرجو؛ (۸) ترش؛ (۹) استرین؛ (۱۰) شیرین؛ (۱۱) گرگان؛ (۱۲) گوهرجو؛ (۱۳) نیمروز؛ (۱۴) کارون؛ (۱۵) کویر؛ (۱۶) والفجر؛ (۱۷) یوسف؛ (۱۸) ترکمن؛ (۱۹) سهند؛ (۲۰) ماکویی؛ (۲۱) بهمن؛ (۲۲) سرارود؛ (۲۳) Nure؛ (۲۴) Tremois.



به انجماد ارتباط تنگاتنگی با عادت رشد زمستانه دارد، اما درجاتی از تحمل انجماد که از صفات مهم در مقاوت زمستانه می باشد در نبود نیاز بهاره سازی نیز در تحقیقات گذشته گزارش شده است (Brule-Babel and Fowler 1988; Doll et al. 1989; Rizza et al. 2012). در جو تنوع در نیاز به بهاره سازی بیشتر به وسیله مکان های ژنی *VRN-H1* و *VRN-H2* ارزیابی می شود (Cockram et al. 2007) که اثرات متقابلی بین این دو مکان ژنی

را نسبت به ژنوتیپها با تیپ رشد بهاره که دارای میانگین ۰/۵۹۵ برای Fv/Fm و ۰/۳۸۱ جهت صفت تراوش یونی نشان دادند که اختلاف معنی داری در سطح یک درصد برای هر دو صفت مذکور مشاهده شد. در ژنوتیپهای زمستانه به دلیل نیاز به بهاره سازی (آلل مغلوب *vrn-H1*) و تاخیر در انتقال از فاز رویشی به زایشی که افزایش مدت زمان سازگاری با سرما را در پی داشته تحمل انجماد بیشتری مشاهده شد با وجود گسترش این نظریه که تحمل

جدول ۴- رتبه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس میزان Fv/Fm و تراوش یونی

ژنوتیپ	رتبه بر اساس Fv/Fm	رتبه بر اساس تراوش یونی	میانگین رتبه‌ها
سهند	۱	۲	۱/۵
شیرین	۳	۱	۲
ماکویی	۴	۳	۳/۵
گوهرجو	۵	۶	۵/۵
بهمن	۲	۹	۵/۵
Nure	۷	۴	۵/۵
دشت	۶	۷	۶/۵
کارون	۸	۵	۶/۵
سرارود	۹	۸	۸/۵
والفجر	۱۲	۱۰	۱۱
ترش	۱۱	۱۱	۱۱
جنوب	۱۰	۱۴	۱۲
زرگو	۱۳	۱۲	۱۲/۵
ریحان	۱۵	۱۳	۱۴
افضل	۱۴	۱۶	۱۵
گرگان	۱۶	۱۵	۱۵/۵
نیمروز	۱۷	۱۷	۱۷
کویر	۱۸	۱۹	۱۸/۵
استرین	۱۹	۲۰	۱۹/۵
یوسف	۲۳	۱۸	۲۰/۵
صحرا	۲۱	۲۱	۲۱
ارس	۲۰	۲۳	۲۱/۵
ترکمن	۲۴	۲۲	۲۳
Tremois	۲۲	۲۴	۲۳

نشان داده و وارد مرحله گلدهی می‌شود (Stokinger et al. 2007). بیان *VRN-H1* مرتبط با تنظیم منفی *VRN-H2* در گیاه می‌باشد.

به دلیل وجود بیشترین اختلاف معنی‌دار بین میانگین صفات مورد بررسی گروه‌های A و B نشانگر *HvBM5A* در این تحقیق، این نشانگر به عنوان بهترین نشانگر جهت گزینش تحمل به انجماد در بین ژنوتیپ‌ها انتخاب شد، که این نتیجه منطبق بر یافته‌های (Akar et al. 2009) نیز می‌باشد. اهمیت این ژن در تحمل به انجماد را از آن جهت می‌توان توجیه کرد که میزان رونش‌های ژن *Vrn-H1* در برگ‌های گیاه به عنوان کلید تنظیمی

مشاهده شده است. ناحیه مهم تنظیمی نیاز به بهاره‌سازی در جو *BM5A* بوده که ژن کاندید در مکان ژنی *VRN-H1* می‌باشد، این ناحیه بین ژنوتیپ‌ها با تیپ رشد زمستانه و اختیاری مشابه می‌باشند (von Zitzewitz et al. 2005). *SNF2p* و *ZCCT* ژن-های کاندید در مکان ژنی *VRN-H2* بوده، این مکان ژنی پروتئینی را تولید کرده که با ممانعت از گلدهی، تاخیر در انتقال فاز رویشی به زایش در گیاه را بر عهده دارد. تحقیقات نشان داده است که در نبود بهاره‌سازی سطح بالای رونش‌های *VRN-H2* منجر به عدم گلدهی شده و پس از بهاره‌سازی از بیان *VRN-H2* کاسته می‌شود و با این تنظیم منفی ایجاد شده، گیاه به طول روز بلند عکس‌العمل

با این حال بیش از ۱۴ HvCBF به صورت خوشه‌ای در Fr-H2 وجود دارد که در ایجاد تحمل به انجماد در جو موثر هستند ولی تحقیقات در مورد اثرگذاری مجموعه و یا هر یک از HvCBF به تنهایی و اهمیت هر یک از آن‌ها در ایجاد تحمل انجماد در جو ادامه دارد. با توجه به اینکه دو مکان ژنی اصلی مورد بررسی در کروموزوم ۵H بیشترین تنوع را جهت صفت تحمل انجماد نشان دادند و با در نظر گرفتن پیچیدگی این صفت، استفاده از نشانگرهای HvBM5A و HvCBF3 منجر به سهولت در گزینش این صفت می‌شود همچنین استفاده از این نشانگرها روی ژنوتیپ‌های مختلف در برنامه‌های اصلاحی می‌تواند مزیت استفاده از گزینش به کمک نشانگر را در مقایسه با گزینش فنوتیپی در شرایط متنوع محیطی تحت تنش نمایان کند.

منابع

- Akar T, Francia E, Tondelli A, Rizza F, Stanca AM, Pechioni N (2009) Marker-assisted characterization of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Breeding 128:381-386.
- Bhardwaj R, Singhal GS (1981) Effect of water-stress on photochemical activity of chloroplasts during greening of etiolated barley seedlings. Plant Cell Physiology 22:155-162.
- Brule-Babel AL, Fowler DB (1988) Genetic control of cold hardiness and vernalization requirement in winter wheat. Crop Science 28: 879-884.
- Cattivelli L, Baldi P, Crosatti C, Di Fonzo N, Faccioli P, Grossi M, Mastrangelo AM, Pecchioni N, Stanca AM (2002) Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticaceae*. Plant Molecular Biology 48: 649-665.
- Choi DW, Rodriguez EM, Close TJ (2002) Barley Cbf3 gene identification, expression pattern and map location. Plant Physiology 129: 1-7.
- Clement JMAM, van Hasselt PR (1996) Chlorophyll fluorescence as a parameter for frost hardiness in winterwheat. A comparison with other hardiness parameters. Phyton Annuales rei botanicae. 36:29-41.
- Cockram J, Chiapparino E, Taylor SA, Stamati K, Donini P, Laurie DA, O'Sullivan DM (2007) Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel VRN-H1 alleles and a predominant winter VRN-H1/VRN-H2 multilocus haplotype. Theoretical and Applied Genetics. 115: 993-1001.
- Dai F, Zhou M, Zhang G (2007) The changes in chlorophyll fluorescence parameters in winter barley during recovery after freezing shock and as affected by cold acclimation and irradiance. Plant Physiology Biochemistry 45:915-921.

در فعال‌سازی ژن‌های تنظیم شونده با سرما (COR) و CBF‌ها عمل کرده و افزایش تحمل به انجماد در گیاه را منجر می‌شود. ژنوتیپ‌هایی که حامل *Vrn-H1* مغلوب می‌باشند (زمستانه و بینابین)، ژن‌های CBF بیشتری را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها (بهاره) دارا می‌باشند (Akar et al. 2009). در ژنوتیپ‌های بهاره *Vrn-H1* غالب به صورت ممانعت‌کننده از بیان ژن‌های CBF در Fr-H2 عمل کرده و باعث کاهش تحمل به انجماد در گیاه می‌شوند (Stokinger et al. 2007; Galiba et al. 2009). با وجود اینکه HvBM5A مناسب‌ترین نشانگر پیش‌بینی کننده این صفت در این بررسی شناخته شد ولی کارایی لازم جهت تمایز بین ژنوتیپ‌ها برای صفت مذکور را در داخل گروه ژنوتیپ‌ها با تیپ رشد یکسان را ندارد.

با توجه به نقش مهم ژن‌های CBF در افزایش تحمل انجماد و اثرگذاری آن‌ها بر ژن‌های COR، مشاهده شد که اختلاف معنی‌دار بیشتری در آزمون مقایسه میانگین صفات بین دو گروه A و B در آلل HvCBF3 نسبت به آلل HvCBF14 در مکان ژنی Fr-H2 وجود داشت و از آن جا که فرانسیا و همکاران نیز مشاهده کردند که HvCBF3 در قله نمودار کیو تی ال مربوط به تحمل به انجماد در کروموزوم ۵H قرار دارد، کاندید مناسبی جهت توجیح تحمل ژنوتیپ‌ها در برابر انجماد باشد (Francia et al. 2004) (جدول ۳) همچنین در مکان ژنی Fr-H2 در ژنوتیپ‌ها با تیپ رشد زمستانه و بینابین، هاپلوتایپ A-A (HvCBF3)، A-A (HvCBF14) مشاهده شد. میانگین صفات مورد بررسی در این آزمایش برای ژنوتیپ‌ها با هاپلوتایپ AA برای صفت Fv/Fm به میزان ۰/۶۴۶ و برای صفت تراوش یونی ۰/۳۱۰ برآورد شد که در مقایسه با میانگین ۰/۴۱۰ برای صفت Fv/Fm و ۰/۶۳۹ مربوط به تراوش یونی در ژنوتیپ‌هایی که دارای این هاپلوتایپ نبودند در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. در ژنوتیپ‌ها با تیپ رشد بینابین و زمستانه، علاوه بر دارا بودن ژن مغلوب *Vrn-H1* که منجر به تاخیر گلدهی و نیاز به بهاره‌سازی در گیاه می‌شود، هاپلوتایپ A-A (HvCBF3, HvCBF14) می‌تواند توجیحی جهت برتری این دسته از ژنوتیپ‌ها نسبت به ژنوتیپ‌ها با تیپ رشد بهاره باشد.

- Doll H, Haahr V, Sogard B (1989) Relationship between vernalization requirement and winter hardiness in doubled haploids of barley. *Euphytica* 42:209-213.
- Elena P, Terbea M (1995) Proline content and the conductivity test as screening methods for frost tolerance of winter wheat. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 21: 3-11.
- Esenta G, Okke A, Nalbanto B (2003) Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation* 41: 231-236.
- Fowler DB (2008) Cold acclimation threshold induction temperatures in cereals. *Crop Science* 48:1147-1154.
- Fowler DB, Breton G, Limin AE, Mahfoozi S, Sarhan F (2001) Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiology* 127: 1676-1681.
- Fowler DB, Chauvin LP, Limin AE, Sarhan F (1996) The regulatory role of vernalization in the expression of low-temperature induced genes in wheat and rye. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 554-559.
- Fowler DB, Limin AE (1997) Breeding for winter hardiness in cereals. *Agronomica Hungarica* 5: 301-309.
- Fowler DB, Limin AE (2004) Interactions among factors regulating phenological development and acclimation rate determine low-temperature tolerance in wheat. *Annual Botany (London)* 94: 717-724.
- Francia E, Barabaschi D, Tondelli A, Laido` G, Rizza F, Stanca AM, Busconi M, Fogher C, Stockinger EJ, Pecchioni N (2007) Fine mapping of a HvCBF gene cluster at the frost resistance locus Fr-H2 in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 1083-1091.
- Francia E, Rizza F, Cattivelli L, Stanca AM, Galiba G, Toth B, Hayes PM, Skinner JS, Pecchioni N (2004) Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) · 'Tremois' (spring) barley map. *Theoretical and Applied Genetics* 108:670-680.
- Galiba G, Vagujfalvi A, Li C, Soltesz A, Dubcovsky J (2009) Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Science* 176: 12-19.
- Hayes PM, Castro A, Marquez-Cedillo L, Corey A, Henson C, Jones BL, Kling D, Mather D, Matus I, Rossi C, Sato K (2003) Genetic diversity for quantitatively inherited agronomic and malting quality traits. In: Von Bothmer R et al. (eds) *Diversity in barley*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Karsai I, Szucs P, Meszaros K, Filichkina T, Hayes PM, Skinner JS, Lang L, Bedo Z (2005) The Vrn-H2 locus is a major determinant of flowering time in a facultative3winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. *Theoretical and Applied Genetics* 110:1458-1466.
- Koch HD, Lehmann CO (1966) Resistenzeigenschaften im Gersten- und Weizensortiment Gatersleben. 7. Prüfung der Frostresistenz von Wintergersten im künstlichen Gefrierversuch. (In German) *Kulturpflanze* 14:263-282.
- Limin AE, Fowler DB (2006) Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization and plant development. *Planta* 224:360-366.
- Mahfoozi S, Limin AE, Fowler DB (2001) Influence of vernalization and photoperiod responses on cold hardiness in winter cereals. *Crop Science* 41: 1006-1011.
- Mahfoozi S, Roustaii M, Ansari Maleki Y (2005) Determination of low temperature tolerance in some bread wheat, durum wheat and barley genotypes. *Seed and Plant* 21: 467-483 (in Farsi).
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J (2004) CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:3985-3990.
- Palva ET, Welling A, Tahtiharju S, Puhakainen T, Makela P, Laitinen R, Li C, Helenius E, Boije M, Aspegren K, Aalto O, Heino P (2001) Cold acclimation and development of freezing and drought tolerance in plants. *Acta Horticulturae Journal* 560: 277-284.
- Pecchioni N, Cattivelli L, Delogu G, Faccioli P, Terzi V, Vale G, Stanca AM (2002) Barley: from *Hordeum spontaneum* to the modern varieties. In: VL Chopra (ed) *Evolution and adaptation of cereal crops*. Science Publisher, Enfield, NH, USA, pp 135-211
- Prasil IT, Prasilova P, Marik K (2007) Comparative study of direct and indirect evaluations of frost tolerance in barley. *Field Crops Resistance* 102:1-8.
- Rapacz M (2007) Chlorophyll a fluorescence transient during freezing and recovery in winter wheat. *Photosynthetica* 45:409-418
- Rapacz M (2002) Cold-deacclimation of oilseed rape (*Brassica napus* var. oleifera) in response to fluctuating temperatures and photoperiod. *Annual Botany* 89:543-549
- Rapacz M, Tyrka M, Gut M, Mikulski W (2010) Association of PCR markers with freezing tolerance and photosynthetic acclimation to cold in winter barley. *Euphytica* 175: 293-301.
- Rizza F, Crosatti C, Stanca AM, Cattivelli L (1994) Studies for assessing the influence of hardening on cold tolerance of barley genotypes. *Euphytica* 7: 131-138.
- Rizza f, Pagani D, Gut M, Prasil IT, Lago C, Tondelli A, Orru L, Mazzucotelli E, Francia E, Badeck FW, Crosatti C, Terzi V, Cattivelli L, Stanca AM (2011) Diversity in response to low temperature in Representative Barley Genotypes Cultivated in Europe. *Crop Science* 51: 2759-2779.
- Rizza F, Pagani D, Stanca AM, Cattivelli L (2001) Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breeding* 10: 389-396.
- Russel GT, Schilling BS, Wisniewski M, Gusta LV (2006) Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. *Springer Netherlands Pub* 131-155.
- Skinner J, Szucs P, von Zitzewitz J, Marquez-Cedillo L, Filichkin T, Stockinger EJ, Thomashow MF, Chen THH, Hayes PM (2006) Mapping of barley homologs to genes that regulate low temperature tolerance in *Arabidopsis*. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 832-842.

Stockinger EJ, Skinner JS, Gardner KG, Francia E, Pecchioni N (2007) Expression levels of barley Cbf genes at the Frost resistance-H2 locus are dependent upon alleles at Fr-H1 and Fr-H2. *Plant Journal* 51: 308-321.

Szucs P, Karsai I, von Zitzewitz J, Meszaros K, Cooper LLD, Gu YQ, Chen THH, Hayes PM, Skinner JS (2006) Positional relationships between photoperiod response QTL and photoreceptor and vernalization genes in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1277-1285.

Thomashow MF, Gilmour SJ, Stockinger EJ, Jaglo-Ottosen KR, Zarka DG (2001) Role of the Arabidopsis CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 112:171-175.

Tondelli A, Francia E, Barabaschi D, Aprile A, Skinner JS, Stockinger EJ, Stanca AM, Pecchioni N (2006) Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 445-454.

Tuberosa R, Galiba G, Sanguineti MC, Noli E, Sutka J (1997) Identification of QTL in Xuencing freezing

tolerance in barley. *Acta Agronomica Hungarica* 45: 413-417.

Von Zitzewitz J, Szucs P, Dubcovsky L, Yan L, Francia E, Pecchioni N, Casas A, Chen THH, Hayes PM, Skinner JS (2005) Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant Molecular Biology* 59:449-467.

Wulff A, Sheppard L, Leith I (1994) Evaluation of electrolyte leakage, chlorophyll fluorescence and ultra-structural techniques for detecting effects of acid mist on frost hardiness of sitka spruce shoots. *Environmental and Experimental Botany* 34: 261-273.

Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell (Suppl)* S165-S183.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of cis acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Science* 10:88-94.