ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۲۹۲-۲۷۹

پاسخ‌های بیوشیمیایی و متابولیکی تحمل به سرما در نخود کابلی و دسی

Biochemical and metabolic responses involved in cold tolerance of Kabuli and Desi chickpeas

یاسین خالدیان[۱]، رضا معالی امیری*[۱]، علیرضا طالعی[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

Khaledian Y[1], Maali-Amiri R[*1], Talei A[1]

1.MSc Student, Associate Professor and Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj

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

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۰- تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

مطالعه فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با تحمل به سرما می‌تواند به‌نژادگران را در تولید ارقام متحمل به تنش‌های محیطی یاری کند. در این مطالعه محتوی H_2O_2 ، کلروفیل، کاروتنوئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان CAT، APX، GPX و SOD و برخی الگوهای آیزوزایمی در آزمایشی به صورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملا تصادفی با دو ژنوتیپ نخود (*Cicer arietinum* L.) کابلی Sel96Th11439 و دسی 4322 تحت تیمار کنترل (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، فاز سازگاری ۱۰ درجه سانتی‌گراد، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای گیاهان سازگار شده بعد از دو روز و چهار روز و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای گیاهان سازگار نشده بعد از دو روز و چهار روز بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در اکثر صفات، ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش تفاوت معنی‌داری داشته و بین ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش اثر متقابل معنی‌داری وجود داشت. با ورود گیاهان سازگار شده به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، کاتالاز (CAT) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) افزایش یافت در حالی‌که در گیاهان سازگار نشده میزان فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافت که توسط نتایج مطالعه آیزوزایمی این آنزیم‌ها تایید شد بطوری‌که تعداد باندهای آیزوزایمی حاصل، میزان جابجایی و شدت یا پهنای باندها می‌تواند به عنوان شاخصی از تغییرات مولکولی در نظر گرفته شود. تنش ۴ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید و کاهش محتوی H_2O_2 در گیاهان سازگار شده و همچنین کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید و افزایش میزان H_2O_2 در گیاهان سازگار نشده شد. بنابراین سطوح کاهش یافته خسارت سلولی و ظرفیت افزایش یافته سیستم‌های دفاع سلولی می‌تواند عامل اصلی تحمل بیشتر به سرما در ژنوتیپ کابلی در مقایسه با دسی باشد.

واژه‌های کلیدی

سرما
نخود
آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان
آیزوزایم
کلروفیل

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]

مقدمه

از آنجا که گیاهان در محل استقرار خود ثابت و بی‌تحرک هستند نیازمند مکانیسم‌های انطباقی برای زنده ماندن تحت تنش‌های محیطی هستند. گیاهان نیز از نظر میزان حساسیت به تنش‌های محیطی و بالاخص در مورد سرما درجات مختلفی از تحمل را نشان می‌دهند. تنش سرما به عنوان یکی از تنش‌های غیر زنده محیطی سبب کاهش رشد، نمو و عملکرد گیاهان و در مواردی مرگ گیاهان می‌شود. بسیاری از گونه‌های گیاهی قادر به ارتقا درجه تحمل به سرما خود طی فرآیند سازگاری[1] هستند به‌طوری‌که امروزه فرآیند سازگاری با تغییر برنامه ریزی مجدد ژنوم منجر به تغییر متابولیت‌های گیاهی و پاسخ‌های فیزیولوژیکی شده و منجر به افزایش ظرفیت ژنتیکی گیاهان تحت تنش‌های محیطی از جمله سرما می‌شود (Thomashow 2001; Nazari et al. 2011; Rakei et al. 2015). گسترش تحمل به سرما نیز می‌تواند در اثر دیگر تنش‌های اسمزی شامل دهیدراسیون، شوری و تیمار سلول‌های گیاهی با ABA رخ دهد. درجه تحمل به‌دست‌آمده طی فرآیند سرما سازگاری ثابت نیست و می‌تواند به‌طور فصلی تغییر کند و با قرار گرفتن در معرض دماهای بالاتر[2] به‌زودی از دست رود. همچنین سازگاری به سرما یک فرآیند پویا بوده و نیازمند فتوسنتز می‌باشد. بنابراین رمز موفقیت این فرآیند تطابق مجموعه دستگاه فتوسنتزی برای کارکرد در دماهای پایین بوده طوری‌که گیاه قادر به تولید انرژی و بکارگیری آن در سنتز ترکیبات دفاعی و متابولیت‌های اولیه و ثانویه فعال در تحمل باشد (Gill and Tuteja 2010).

یکی از مهمترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاهانی که در معرض تنش سرما هستند تولید مولکول‌های اکسید کننده‌ای است که مسبب اصلی خسارت در درون سلول می‌باشند که به این ترکیبات گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[3] می‌گویند. این ترکیبات باعث خسارت به ماکرومولکول‌ها و اندامک‌های سلولی می‌شوند طوری‌که فعالیت‌های تنفسی در میتوکندری و توانایی تثبیت دی‌اکسیدکربن در کلروپلاست کاهش و نشت الکترولیت‌ها از سلول افزایش می‌یابد. ROSها همچنین با اکسیداسیون آمینواسیدها در پروتئین‌ها و اکسیداسیون کوفاکتور متصل به آن‌ها موجب غیرفعال شدن بعضی از آنزیم‌های خاص می‌شوند؛ به قندها و بازهای سازنده مولکول DNA خسارت وارد کرده و باعث حذف شدن بازها، ایجاد موتاسیون و اثرات مختلف ژنتیکی می‌شوند و نهایتا با تخریب رنگ‌دانه‌ها و دیگر ماکرو مولکول‌های حیاتی گیاه و همچنین خسارت در سیستم فتوسنتزی و تنفس گیاه باعث کاهش عملکرد می‌شوند (Gill and Tuteja 2010; Huang et al. 2012). جهت حفظ تعادل سلولی و کنترل میزان ROSها گیاهان برای مقابله با این گونه‌ها دارای سازوکار دفاعی آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی هستند. شواهد فیزیولوژیکی و ژنتیکی به‌روشنی مشخص کرده‌اند که سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه یک جزء مهم از مکانیسم‌های حفاظتی در برابر تنش است (Sairame 2001; Kazemi Shahandashti et al. 2014). سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیدازها و کاتالاز) و متابولیت‌های غیر آنزیمی آنتی‌اکسیدان (اسید آسکوربیک، ترکیبات فنولیک و کاروتنوئیدها) باعث غیرفعال شدن ROS می‌شوند (Foyere 1994; Xin 2000; Kazemi Shahandashti et al. 2014). آیزوزیم‌ها شکل‌های چندگانه یک آنزیم مشخص هستند که در ترتیب اسیدهای آمینه و میزان سرعت فعالیت در یک واکنش تفاوت داشته اما واکنش شیمیایی یکسانی را تسریع می‌کنند. تحقیقات نشان داده که به موازات میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، الگوهای باندی آنزیم‌ها که مرتبط با میزان فعالیت و جایگاه فعالیت سلولی آنزیم شده فعال شده و بدین ترتیب می‌تواند در افزایش درجه تحمل به تنش‌های محیطی ایفای نقش کند. فعالیت هر کدام از این شکل‌های آنزیمی در سلول تحت تنش هم از نظر میزان بیان و هم از نظر تعداد قابل تغییر است.

شناخت فیزیولوژی و ژنتیک پاسخ گیاهان به تنش کمک شایانی به اصلاح و ایجاد ارقام متحمل می‌کند. به منظور یافتن ارقامی با تحمل به سرما و در عین حال با عملکرد بالا می‌بایست آزمایش‌های غربالگری انجام شود. همچنین به منظور اجرای برنامه به‌نژادی، درک مکانیسم‌های دخیل در تحمل به سرما از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به نقش ویژه پروتئین‌ها و آنزیم-

[1] Acclimation
[2] Deacclimation
[3] Reactive oxygen species

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]

های دفاعی در پاسخ و تحمل به تنش سرما، بررسی تغییر فعالیت آن‌ها می‌تواند دیدگاه عمیق‌تری از مجموعه پیچیده فرآیند پاسخ به تنش سرما ایجاد کند (Khazaei et al. 2011).

نخود با نام علمی *Cicer arietinum* L. گیاهی زراعی از خانواده لگومینوز (Leguminoase) و یکی از منابع تامین پروتئین و کربوهیدرات برای تغذیه انسان و دام به شمار می‌رود. 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 می‌رسد. از طرفی در کشت زود هنگام پاییزه و زمستانه گیاه به خوبی می‌تواند با دسترسی به آب بهتر، دوره زایشی طولانی‌تر و انتقال بهتر آسیمیلات‌ها از بخش‌های رویشی و بهبود میزان نیتروژن مغذی بازده محصول تا بیش از دو برابر افزایش یابد. در نتیجه استراتژی تغییر تاریخ کشت می‌تواند نه تنها در برابر تنش‌های انتهای فصل مفید باشد بلکه با استفاده از فصل رشد طولانی تر بازده تولید را تا چند برابر افزایش دهد (Habibpour et al. 2012). اما مشکل عمده در این میان حساسیت بسیاری از گونه‌های نخود زراعی به تنش سرما است (Heidarvand et al. 2013).

هدف این پژوهش شناسایی برخی مکانیسم‌های بیوشیمیایی و مولکولی تحمل به سرما در دو ژنوتیپ نخود کابلی و دسی است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ازدو ژنوتیپ نخود کابلی Sel96Th11439 و دسی 4322 فراهم شده از کلکسیون بذر حبوبات بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران و موسسه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه استفاده شد. انتخاب ژنوتیپ‌ها بر اساس مطالعات گذشته Nazari et al. (2012) در ژنوتیپ های دسی و در تحقیقی دیگر Heidarvand et al. (2011) در ژنوتیپ‌های کابلی انجام شد که نشان دادند که این دو ژنوتیپ تحمل مطلوب‌تری در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌های کابلی و دسی به تنش سرما نشان دادند. با این حال کدام یک از این ژنوتیپ‌ها تحمل بهتری نسبت به سرما دارند موضوع این تحقیق قرارگرفت. بذور با هیپوکلریت سدیم 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 دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از جوانه زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌ها انتقال یافتند. گلدان‌ها در اتاقک رشد با نور ۲۰۰ میکرومول بر انیشتن و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شد. نمونه گیری از برگ گیاهچه‌های سه هفته‌ای انجام شد. گیاهچه‌های سه هفته‌ای به دو قسمت تقسیم شدند. بخشی از آنها در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط فوق الذکر نگهداری شده و بخشی دیگر به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد جهت سرما سازگاری انتقال یافتند. به منظور سرماسازگاری، گیاهچه‌ها ده روز در این دما نگهداری شدند. سپس به دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت چهار روز انتقال یافتند. تیمارهای آزمایش شامل تیمار کنترل (۲۳ درجه سانتی‌گراد)، فاز سازگاری ۱۰ درجه سانتی‌گراد (Kazemi Shahandashti et al. 2013)، فاز سرما برای گیاهان سازگار شده بعد از دو روز و چهار روز و فاز سرما برای گیاهان سازگار نشده بعد از دو روز و چهار روز بودند.

استخراج و اندازه‌گیری H_2O_2

استخراج H_2O_2 و سنجش آن در این آزمایش بر اساس روش Loreto and Velikova (2001) صورت گرفت. کلیه مراحل کار باید در محیط تاریک و اتاق سرد انجام شود. برای استخراج، ۰/۳۵ گرم نمونه‌های گیاهی تازه با نیتروژن مایع در هاون خرد شده تا به‌صورت پودر درآیند. پودر تهیه‌شده به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده و مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول اسید تری کلرواستیک یک درصد (محلول در حمام یخ قرار داده شود) به ویال اضافه شد. ویال حاوی نمونه یکنواخت شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $g \times$ ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به یک ویال جدید حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و یک میلی‌لیتر محلول یک مولار یدید پتاسیم اضافه شد و درپوش ویال را بسته و با چندین مرتبه سر و ته کردن، محتوای ویال یکنواخت شد (در تاریکی). سپس مقدار جذب هر نمونه را در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد.

استخراج پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کلیه مراحل استخراج در نمونه‌ها بر روی یخ انجام شد. نمونه‌ها

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]

در هاون چینی، به کمک ازت مایع ساییده و پودر شدند. ۲/۵ میلی لیتر بافر استخراج[1] را به ۰/۲۵ گرم از پودر اضافه کرده و ورتکس شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $g \times$ ۱۳۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سپس، مایع رویی، عصاره آنزیمی، برای سنجش کمی آنزیم‌ها استفاده شد. غلظت پروتئینی نمونه‌ها بر اساس روش Bradford (1976) تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)

اندازه‌گیری فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز طبق روش Beyer and Fridovich (1987) انجام شد. فعالیت این آنزیم به صورت فتومتریک بررسی شد. بافر اصلی واکنش شامل بافر فسفات (pH=۷/۸) ۱۰۰ میلی‌مولار، متیونین ۱۲ میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار، EDTA ۱۰۰ میکرومولار و ترایتون ایکس- ۱۰۰ (۰/۰۲۵ درصد) بود. از بافر اصلی به هر چاهک به میزان ۲۹۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس از بافر ریبوفلاوین دو میکرومولار به میزان ۵ میکرولیتر به مخلوط واکنش اضافه شد و دستگاه روی طول موج ۵۶۰ nm کالیبره شد. برای سنجش هر نمونه ۱۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استفاده شد. این واکنش بر اساس میزان احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم و توانایی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ممانعت از این واکنش بررسی شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس واحد آنزیم در دقیقه در میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتردستگاه (Shimadzoon160) به روش Scebba et al. (1998) اندازه‌گیری شد. مواد استفاده شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۳/۴۱ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول پراکسیدهیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر به روش Ranieri et al. (2003) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم (pH=۷/۸) ۵۰ میلی‌مولار، آسکوربات ۵ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن یک میلی‌مولار و عصاره پروتئینی به میزان ۱۰ میکرولیتر بود. از آنجا که حداکثر جذب آسکوربات در طول موج ۲۹۰ nm صورت می‌گیرد، دستگاه روی این طول موج تنظیم شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز مشابه آنزیم کاتالاز، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر به روش Dionisio-Sese and Tobita (1998) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات (pH=۷) میلی‌مولار ۵۰، گایاکول ۱۰ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی بود. پس از افزودن عصاره، بلافاصله جذب در طول موج ۴۷۰nm قرائت شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول گایاکول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری اسید آسکوربیک

آزمایش براساس روش Smirnoff (1996) انجام شد. ۰/۵ گرم نمونه برگ (۱۰میلی‌لیتر از محلول استخراج‌کننده به ازای ۰/۵ گرم از نمونه برگ) توسط محلول ۵ درصد اسید متافسفریک در هاون چینی به‌طور کامل خرد شد. نمونه حاصله را با سرعت $g \times$ ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محلول شفاف بالایی جهت اندازه گیری آسکوربات به کار برده شد. برای اندازه‌گیری میزان آسکوربات کل، به ۴ میلی‌لیتر از محلول بالایی سانتریفوژ شده ۰/۵ میلی‌لیتر از DCIP[2] سه میلی-مولار اضافه شد تا اسید آسکوربیک را به اسید دهیدروآسکوربیک اکسید کند. محلول شاهد با استفاده از یک میلی‌لیتر اسید متافسفریک ۵ درصد و افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر، DCIP ۳ میلی‌مولار آماده شد. یک میلی‌لیتر تیو اوره یک درصد اضافه کرده، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه ساکن ماندند. یک میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۲۰ درصد فقط به محلول شاهد اضافه شد. اما به بقیه نمونه‌ها یک میلی‌لیتر محلول ۱۰ میلی‌مولار DNPH[3] اضافه شد تا مشتق ۲و۴

[1] Extraction buffer

[2] Dichloroindophenol

[3] Dinitrophenylhydrazine

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]

دی نیترو فنیل هیدرازین از اسید دهیدروآسکوربیک تشکیل شود. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب ۵۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام یخ قرار گرفتند. به تدریج ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۸۵ درصد به نمونه‌ها در حالی‌که در حمام یخ قرار داشتند اضافه شد. مجددا همه لوله‌ها در حمام یخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. یک میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۲۰ درصد به لوله‌ها اضافه شد، ولی به لوله شاهد یک میلی‌لیتر از محلول ۱۰ میلی‌مولار DNPH اضافه شد. میزان جذب در مقایسه با شاهد آماده شده در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی کیفی آنزیم‌ها به روش ژل بومی

استخراج پروتئین‌ها برای بررسی کیفی آنزیم‌ها (آیزوزایم‌ها) بر اساس روش استخراج پروتئین کل انجام شد. غلظت پروتئین نمونه‌ها بر اساس روش Bradford (1976) انجام شد. در بررسی بیان آیزوزایم‌های آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز از روش Laemmli (1970) استفاده شده بجز اینکه از ماده سدیم دو دسیل سولفات استفاده نشد بنابراین در این روش از الکتروفورز ژل بومی[1] استفاده شد. برای انجام آزمایش پس از تهیه بافر استخراج، به یک گرم از نمونه برگی میزان ۱۰۰ میلی‌گرم پلی وینیل پلی پیرولیدون اضافه شد و مخلوط حاصل به خوبی با نیتروژن مایع یکنواخت شد. سپس به پودر سبز رنگ حاصل ۳ میلی‌لیتر از بافر استخراج اضافه شد. محلول به خوبی توسط بافر هم زده شد تا یکنواخت شود، سپس به فالکون انتقال داده شد و عمل سانتریفیوژ با سرعت $g \times ۱۸۰۰۰$ به مدت ۲۵ دقیقه و در دمای محیط انجام شد. پس از اتمام سانتریفیوژ به میزان ۱۰۵۰ میکرولیتر از مایع را رویی برداشته شد و پس از اضافه کردن ۳۵۰ میکرولیتر گلیسرول، فالکون ورتکس شد. برای همه نمونه‌های آنزیمی میزان پروتئین استفاده شده حدود ۴۰ میکروگرم در هر چاهک بود. الکتروفورز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با تنظیمات ثابت یک وات و آمپر ثابت ۲۰ میلی آمپر انجام شد و دستگاه پس از گذشت ۲ ساعت از خروج خط آبی از انتهای ژل خاموش شد. مراحل رنگ‌آمیزی ژل و ظهور باندها به دلیل اختصاصی بودن روش و مواد مورد نیاز، کاملا متفاوت از هم انجام شد. رنگ‌آمیزی آنزیم کاتالاز بر اساس روش Robertson (1987) و رنگ‌آمیزی آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس روش Rao (1996) و رنگ‌آمیزی آنزیم گایاکول پراکسیداز بر اساس روش Hart (1971) انجام شد. در پایان رنگ‌آمیزی از باندهای ظاهر شده بر روی ژل با استفاده از صفحه نورانی که در زیر ژل قرار داده می‌شد، عکس تهیه شد.

[1] Native PAGE

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول۱) نشان داد که تیمارهای دمایی و ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر میزان H_2O_2 در سطح یک درصد تاثیر معنی‌دار داشتند. با توجه به نقش خسارت‌زایی H_2O_2 به غشا سلولی از طریق خسارت به لیپیدها (Sairam et al. 2005; Kazemi Shahandashti et al. 2014) در این تحقیق میزان H_2O_2 به عنوان شاخص خسارت سلولی اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که با انتقال گیاهان سازگار نشده به فاز سرما میزان H_2O_2 به طور معنی‌داری افزایش یافت (تا ۳۶ درصد) درحالی که در گیاهان سازگار شده با انتقال به فاز سرما میزان H_2O_2 تفاوت معنی‌داری با تیمار کنترل نداشت. به این ترتیب اثر سازگاری با ممانعت از افزایش بیش از اندازه سطوح H_2O_2 تولید شده براثر تنش سرما و احتمالا کاهش شاخص‌های آسیب غشایی همراه بود (شکل۱- الف). ژنوتیپ دسی در تمام سطوح تیماری دارای بیشترین میزان H_2O_2 بود (شکل۱- ب). بنابراین به نظر می‌رسد که ژنوتیپ دسی نسبت به ژنوتیپ کابلی دارای مکانیسم-های ضعیف‌تری در مهار تجمع H_2O_2 تحت تنش سرما می‌باشد.

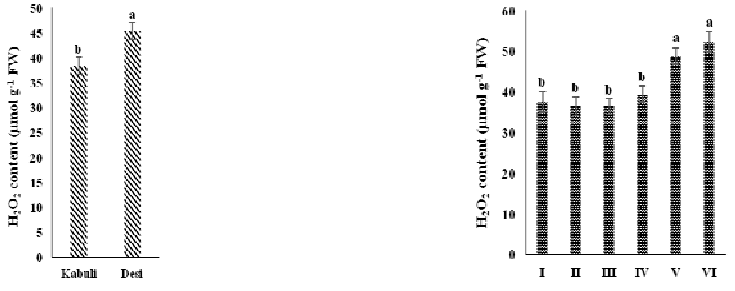
محتوای کلروفیل a و b به صورت معنی‌داری تحت تاثیر سطوح تیماری و ژنوتیپ قرار گرفت (جدول۱). محتوای کلروفیل a و b به عنوان شاخص تعیین کننده ظرفیت فتوسنتزی برگ (Hossain et al. 2003) تحت تنش سرما در گیاهان سازگار شده افزایش معنی‌داری یافت اما در گیاهان سازگار نشده میزان کلروفیل a به طور معنی‌داری کاهش یافت (تا ۳۰ درصد) (شکل ۲- الف). با مقایسه نتایج میزان کلروفیل در دو ژنوتیپ دسی و کابلی مشاهده شد که میزان کلروفیل a در ژنوتیپ کابلی نسبت به ژنوتیپ دسی بیشتر بود (شکل ۲- ب) در حالیکه محتوای کلروفیل b تحت تنش سرما پس از سازگاری پس از دو روز در هر دو ژنوتیپ

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد آزمون متأثر از سطوح مختلف تیمار دمایی در دو ژنوتیپ نخود کابلی و دسی

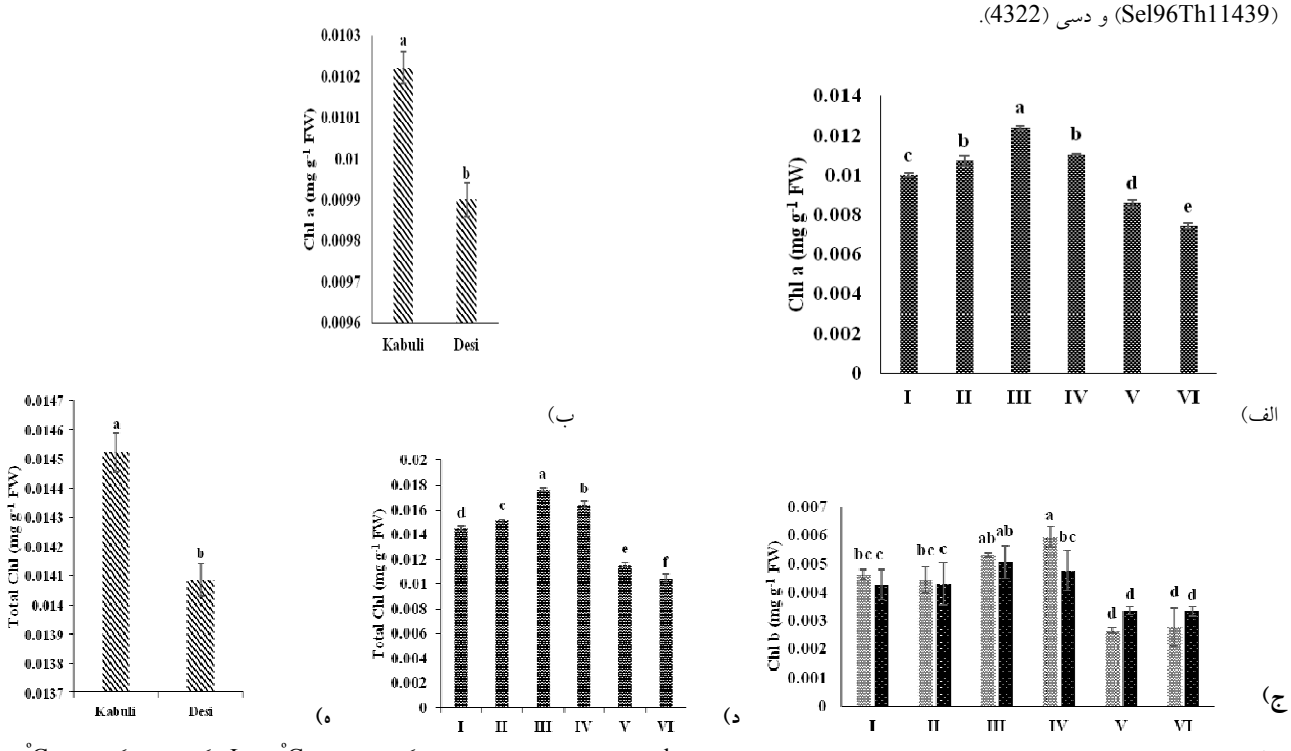
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات									
		H_2O_2	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	CAT	GPX	APX	SOD	پروتئین کل	آسکوربیک اسید
ژنوتیپ	۱	۴۳۹/۷۴**	۹/۲۴*	۱/۲۰^{ns}	۱/۷۱**	۳/۲۹^{ns}	۵/۲۷**	۰/۰۰۰۴۴**	۰/۰۱۱۱**	۰/۴۵**	۶۵/۳۷**	۱۹۹۳۳۹/۹**
تیمار	۵	۲۸۵/۷۱**	۱/۹۴**	۶/۱۴**	۴/۵۶**	۶/۵۱**	۴/۰۰**	۰/۰۰۰۶۲**	۰/۰۱۱۵**	۰/۴۲**	۶۵/۸۵**	۷۷۲۹۴/۱**
ژنوتیپ× تیمار	۵	۳/۰۴ ns	۳/۳۹^{ns}	۷/۰۵*	۴/۴۸^{ns}	۱/۹۹^{ns}	۳/۶۲*	۸/۱۶۱^{ns}	۰/۰۰۰۷^{ns}	۰/۰۲**	۱/۳۸*	۷۲۳۱/۱**
خطا	۲۴	۱۸/۶۶	۱/۳۰	۲/۶۵	۲/۱۴	۷/۹۶	۱/۰۴	۱/۰۱۳	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۲	۰/۳۶	۷۵۷/۹
ضریب تغییرات (CV)		۱۰/۳۳	۳/۵۸	۱۲/۱۵	۳/۲۳	۸/۸۵	۱۳/۸۲	۱۱/۳۱	۲۰/۰۵	۰/۷۵	۴/۴۶	۴/۸۸

ns، * و ** به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح پنج و یک درصد



ب) الف)

شکل۱- اثر تیمارهای دمایی (الف و ب) بر روی میزان H_2O_2 در گیاهان شاهد (۲۳°C) (I)، گیاهان سازگار شده (۱۰°C) (II)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما به مدت دو روز (III)، به مدت چهار روز (IV) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما به مدت دو روز(V) و به مدت چهار روز (VI) در ژنوتیپ‌های کابلی (Sel96Th11439) و دسی (4322).



ب) الف)

ه) د) ج)

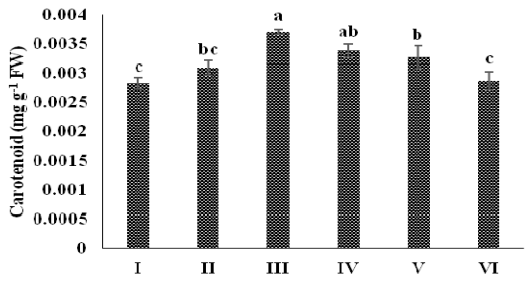
شکل ۲- اثر تیمارهای دمایی بر روی میزان کلروفیل a (الف و ب)، کلروفیل b (ج) و کلروفیل کل (د و ه) در گیاهان شاهد (۲۳°C) (I)، گیاهان سازگار شده (۱۰°C) (II)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما به مدت دو روز (III)، به مدت چهار روز (IV) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما به مدت دو روز (V) و به مدت چهار روز (VI) در ژنوتیپ‌های کابلی (Sel96Th11439) و دسی (4322).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]

افزایش معنی‌داری یافت اما در روز چهارم در ژنوتیپ کابلی همچنان افزایش و در ژنوتیپ دسی نسبت به روز دوم کاهش یافت. اما در گیاهان سازگار نشده، تحت تنش سرما میزان کلروفیل b هم در روز دوم و هم در روز چهارم کاسته شد که میزان کاهش آن در ژنوتیپ کابلی بسیار بیشتر از ژنوتیپ دسی بود (شکل۲- ج). همچنین میزان کلروفیل کل در ژنوتیپ کابلی بیشتر از ژنوتیپ دسی بود (شکل۲- ه). نتایج نشان داد که فرآیند سازگاری سبب القا سنتز کلروفیل کل تحت تنش سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد شده به طوری که تحت تنش سرما میزان کلروفیل کل در گیاهان سازگار شده به سرما بیشتر از گیاهان سازگار نشده بود (شکل۲- د). تنش‌ها باعث کاهش سرعت فتوسنتز می‌شوند که این امر با میزان کلروفیل در ارتباط می‌باشد که می‌توانند غلظت کلروفیل را از طریق جلوگیری از ساخت کلروفیل و یا تسریع تجزیه آن توسط آنزیم کلروفیلاز و فتواکسیداسیون کلروفیل توسط گونه‌های فعال اکسیژن کاهش دهند (Reddy and Vora 1986). فعالیت بیشتر مکانیسم‌های دفاعی در ژنوتیپ‌های متحمل منجر به کاهش تولید و حذف اثرات منفی ROS ها شده لذا این گیاهان با داشتن فتوسنتز و انرژی بیشتر، تحمل بیشتری تحت تنش سرما نشان می‌دهند.

کاروتنوئیدها رنگ‌دانه‌های آلی تتراترپنوئید هستند که در کلروپلاست و کروموپلاست گیاهان و دیگر موجودات فتوسنتز کننده و با حذف رادیکال‌های اکسیژن تولید شده، نقش آنتی اکسیدانی خود را بروز می‌دهند (Oncel et al. 2000). محتوای کاروتنوئید تحت تنش سرما در گیاهان سازگار شده در مقایسه با شاهد افزایش یافت درحالی‌که در گیاهان سازگار نشده تنها در روز دوم افزایش معنی‌دار در میزان کاروتنوئید در مقایسه با شاهد مشاهده شد (شکل۳). افزایش میزان کاروتنوئید تحت تنش می‌تواند ناشی از نقش حفاظتی این رنگیزه‌ها باشد. کاروتنوئیدها هم‌چنین نور جذب شده را به کلروفیل‌ها منتقل کرده و باعث افزایش کارایی کلروفیل‌ها می‌شوند (Cazzonelli 2011).

تغییر در میزان غلظت پروتئین‌های کل گیاه در اثر تخریب و یا سنتز برخی از پروتئین‌های مخصوص مقابله با تنش و متابولیسم‌های دیگر انجام می‌شود (Heidarvand and Maali-Amiri 2013). تحت تنش سرما در گیاهان سازگار شده میزان پروتئین

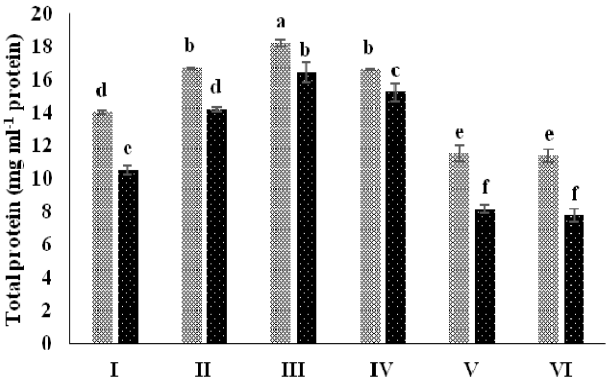


شکل۳- اثر تیمارهای دمایی بر روی میزان کاروتنوئید در گیاهان شاهد (۲۳°C) (I)، گیاهان سازگار شده (۱۰°C) (II)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما به مدت دو روز (III)، به مدت چهار روز (IV) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما به مدت دو روز(V) و به مدت چهار روز (VI).

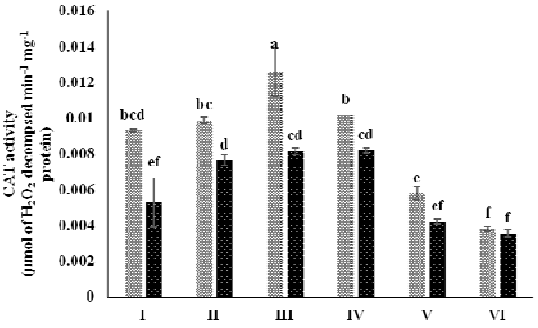
کل گیاه روند افزایشی داشت (شکل۴) به طوری‌که افزایش غلظت پروتئین‌های برگ ممکن است نشان‌دهنده فعال شدن مکانیسم‌های تحمل باشد (Kim et al. 2005). افزایش غلظت پروتئین‌های کل، تغییرات بیان ژن‌ها و تغییر در ساختار بافت‌های گیاهی را نشان می‌دهد (Lascano et al. 2001). در حالی‌که در گیاهان سازگار نشده میزان پروتئین کل گیاه کاهش یافت (شکل۴). کاهش پروتئین‌های محلول برگ به‌عنوان یکی از عوامل محدودکننده فتوسنتز گیاه محسوب شده که در این صورت تنش بر گیاه اثرگذار بوده و موجب ایجاد خسارت شده است و به نظر می‌رسد با طولانی‌تر شدن دوره تنش، افزایش شدت خسارت سبب کاهش سنتز یا افزایش تخریب در پروتئین‌ها شده است (Laino et al. 2010) زیرا میزان پروتئین کل در هر دو ژنوتیپ تحت تنش سرما ۴ درجه هم در گیاهان سازگار شده و هم سازگار نشده در روز چهارم نسبت به روز دوم با کاهش بیشتری همراه بوده است. گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو، فعالیت آنتی اکسیدانهای آنزیمی و غیر آنزیمی خود را به عنوان یک سیستم دفاعی جهت تجزیه ROS ها افزایش می‌دهند و بدین طریق از تجمع و خسارت جلوگیری می‌کنند. بنابراین احتمالا دلیل اصلی خسارت تنش اکسیداتیو، ناتوانی سیستم‌های دفاعی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد (M-Cheeseman 2007). اثر متقابل ژنوتیپ در سطوح تیماری برای آنزیم کاتالاز در سطح پنج درصد معنی‌دار شد (جدول۱). انتقال گیاهچه‌ها به دمای سازگاری سبب افزایش نسبی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در جهت تطابق نسبی سلول با شرایط دمایی در مقایسه با شرایط کنترل شد

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]

(شکل۵). با ورود گیاهان سازگار شده به دمای ۴ درجه سانتی-گراد بعد از دو روز، میزان فعالیت آنزیم سیر صعودی گرفت که به نظر می‌رسد بیانگر سنتز بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله کاتالاز در وضعیت توازن جدید سلولی گیاهان سازگار شده است که به دنبال افزایش میزان ROS ها در سلول انجام می‌گیرد. با این وجود در روز چهارم تنش سرما در گیاهان سازگار شده، فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به روز دوم کاهش یافت. ازآنجا که افزیش میزان آنزیم کاتالاز با کاهش میزان H_2O_2 در ارتباط بوده و نگهداری میزان H_2O_2 در یک سطح خاص می‌تواند از صدمه به سلول و گیاه جلوگیری کند، لذا هرچه میزان این آنزیم تحت تنش سرما دیرتر کاهش یابد از دیدگاه اصلاح نباتات با اهمیت‌تر است (Kazemi Shahandashti et al. 2012). در گیاهان سازگار نشده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در روزهای دوم و چهارم تحت تنش سرما به کمترین میزان خود رسید (شکل۵). این نتایج نشان می-دهد که در دماهای پایین افزایش فعالیت مکانیسم‌های تخریب پروتئینی از یک طرف و کاهش فعالیت مکانیسم‌های سنتز پروتئینی از طرف دیگر، سبب روند رو به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است. تحت تنش سرما میزان تولید رادیکال سوپر اکسید افزایش می‌یابد و آنزیم کاتالاز یک آنزیم حساس نسبت به آنیون سوپر اکسید است، لذا این رادیکال می‌تواند باعث غیرفعال شدن آنزیم کاتالاز شود (Cakmak et al. 2000).



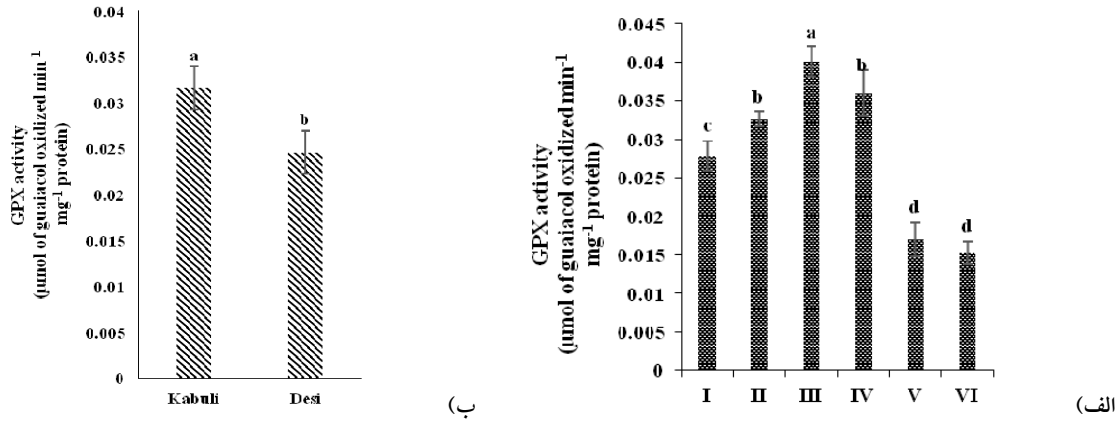
شکل۴- اثر تیمارهای دمایی بر روی میزان پروتئین کل در گیاهان شاهد (۲۳°C) (I)، گیاهان سازگار شده (۱۰°C) (II)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما به مدت دو روز (III)، به مدت چهار روز (IV) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما به مدت دو روز (V) و به مدت چهار روز (VI) در ژنوتیپ‌های کابلی (Sel96Th11439) و دسی (4322). ستون روشن وتیره به ترتیب ژنوتیپ‌های کابلی و دسی می‌باشند.



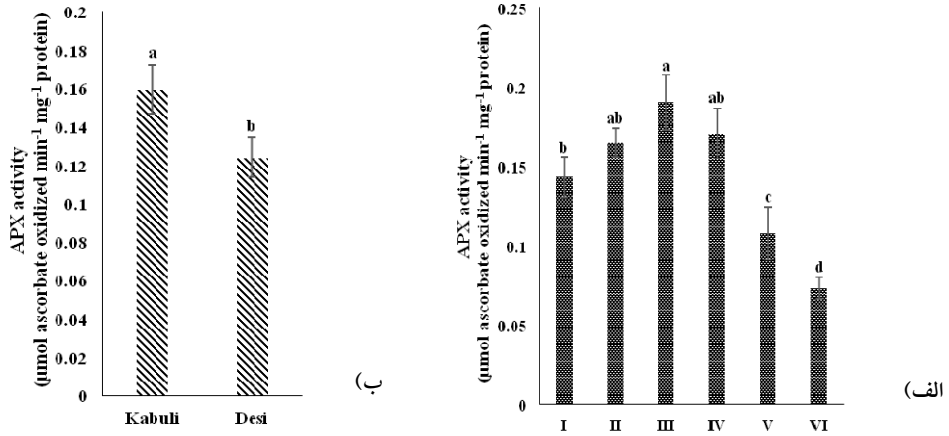
شکل۵- اثر تیمارهای دمایی بر روی میزان فعالیت آنزیم CAT در گیاهان شاهد (۲۳°C) (I)، گیاهان سازگار شده (۱۰°C) (II)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما به مدت دو روز (III)، به مدت چهار روز (IV) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما به مدت دو روز (V) و به مدت چهار روز (VI) در ژنوتیپ‌های کابلی (Sel96Th11439) و دسی (4322). ستون روشن و تیره به ترتیب ژنوتیپ‌های کابلی و دسی می‌باشند.

پراکسیدازهای گیاهی به دلیل نقشی که در حذف ROSها و فرآیندهای مهم فیزیولوژیکی نظیر لیگنینی شدن و کاتابولیسم اکسین دارند (Chaitanya et al. 2002; Gill and Tuteja 2010)، به‌عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی تحت تنش‌های محیطی استفاده می‌شوند. انتقال گیاهچه‌ها به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم GPX نسبت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد شد که می‌تواند در پاسخ به افزایش تولید ROS در سلول‌ها باشد. اما در طول دوره سازگاری، میزان فعالیت آنزیم GPX در گیاهان بعد از تطابق نسبی سلول با شرایط دمایی افزایش یافت و درنتیجه میزان خسارت سلولی به کمترین مقدار خود رسید. با ورود گیاهان سازگار شده به دمای ۴ درجه سانتی-گراد بعد از دو روز، میزان فعالیت آنزیم سیر صعودی گرفت که به نظر می‌رسد بیانگر سنتز بیشتر آنزیم GPX در وضعیت توازن جدید سلولی گیاهان سازگار شده در جهت مهار ROSها در سلول انجام می‌گیرد (شکل۶- الف). در تنش شدید رادیکال‌های سوپراکسید توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به H_2O_2 تبدیل می‌شود. افزایش فعالیت این آنزیم باعث تولید H_2O_2 بیشتری می‌شود که برای سلول سمی بوده و سریعا باید به‌وسیله سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به آب و اکسیژن تجزیه شود (Guo et al. 2006). برای این منظور گیاه برای تجزیه H_2O_2 اضافی از سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده می‌کند. بر این اساس می‌توان گفت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]



شکل۶- اثر تیمارهای دمایی (الف و ب) بر روی میزان فعالیت آنزیم GPX در گیاهان شاهد (۲۳°C) (I)، گیاهان سازگار شده (۱۰°C) (II)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما به مدت دو روز (III)، به مدت چهار روز (IV) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما به مدت دو روز (V) و به مدت چهار روز (VI) در ژنوتیپ‌های کابلی (Sel96Th11439) و دسی (4322).



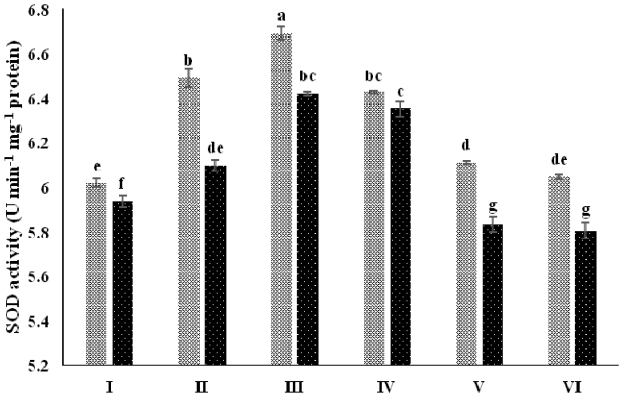
شکل۷- اثر تیمارهای دمایی بر روی میزان فعالیت آنزیم APX در گیاهان شاهد (۲۳°C) (I)، گیاهان سازگار شده (۱۰°C) (II)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما به مدت دو روز (III)، به مدت چهار روز (IV) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما به مدت دو روز (V) و به مدت چهار روز (VI) در ژنوتیپ‌های کابلی (Sel96Th11439) و دسی (4322).

یکی از دلایل افزایش فعالیت GPX در ژنوتیپ‌ها تحت تنش افزایش فعالیت SOD می‌باشد. در روز چهارم بعد از انتقال گیاهان سازگار شده به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به سبب کاهش میزان خسارت سلولی، فعالیت آنزیم GPX کاهش یافت (شکل۶- الف). کاهش فعالیت GPX در ژنوتیپ‌ها می‌تواند به دلیل افزایش میزان آسکوربات نیز باشد. از طرف دیگر ممکن است وجود مقادیر زیاد آسکوربات بر GPX اثر بازدارندگی داشته باشد. دلیل این امر استفاده از آسکوربات به‌عنوان سوبسترا به‌جای گایاکول می‌باشد (Mika and Luthje 2003). در گیاهان سازگار نشده میزان فعالیت آنزیم GPX تحت تنش سرما کاهش یافت (تا ۴۴ درصد) که در روز چهارم بعد از ۴ درجه به کمترین میزان خود رسید (شکل۶- الف). در کل میزان فعالیت آنزیم GPX در ژنوتیپ کابلی نسبت به ژنوتیپ دسی بیشتر بود (شکل۶- ب). انتقال گیاهچه‌ها به دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم APX در مقایسه با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد شد که می‌تواند در پاسخ به افزایش تولید ROS در سلول‌ها باشد. اما در طول دوره سازگاری، میزان فعالیت آنزیم APX در گیاهان بعد از تطابق نسبی سلول با شرایط دمایی افزایش یافت و در نتیجه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]

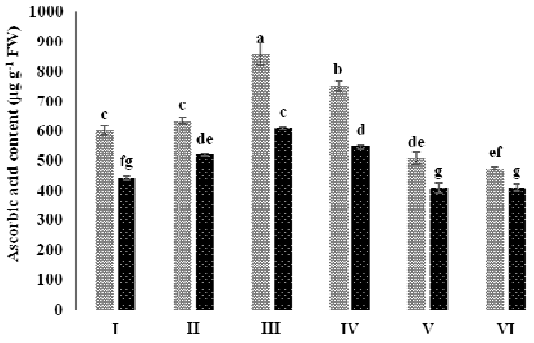
میزان خسارت سلولی به کمترین مقدار خود رسید. با ورود گیاهان سازگار شده به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بعد از دو روز، میزان فعالیت آنزیم سیر صعودی گرفت که به نظر می‌رسد بیانگر سنتز بیشتر آنزیم APX در وضعیت توازن جدید سلولی گیاهان سازگار شده است که به دنبال افزایش میزان ROSها در سلول انجام می‌گیرد (شکل۷- الف). افزایش فعالیت APX باعث تجزیه بیشتر H_2O_2 و تحمل بیشتر گیاه در برابر صدمات اکسایشی القاشده به‌وسیله تنش می‌باشد. از طرف دیگر محصول واکنش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) یعنی H_2O_2 سوبسترای فعالیت APX می‌باشد بنابراین H_2O_2 می‌تواند نقش سیگنال را برای القای APX ایفا کند (Faize et al. 2011). در روز چهارم بعد از انتقال گیاهان سازگار شده به دمای ۴ درجه سانتی-گراد فعالیت آنزیم APX قدری کاهش یافت (شکل۷- الف). کاهش فعالیت آنزیم نیز می‌تواند براثر کاهش ROS باشد که درنهایت سنتز آنزیم را کاهش داده است. هم‌چنین مشخص شده که افزایش فعالیت APX در شرایط تنش مانند SOD و GPX براثر افزایش ROSها می‌باشد که با فعال کردن مسیرهای انتقال پیام باعث افزایش بیان ژن‌های کد کننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش فعالیت آنزیم‌ها می‌شود (Mittler 2002). در گیاهان سازگار نشده میزان فعالیت آنزیم APX همانند دو آنزیم CAT و GPX در روزهای دوم و چهارم پس از انتقال به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت که در روز چهارم بعد از ۴ درجه به کمترین میزان خود رسید (شکل۷- الف). میزان فعالیت آنزیم APX نیز همانند GPX در ژنوتیپ کابلی نسبت به ژنوتیپ دسی بیشتر بود (شکل۷- ب).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیمی است که در چرخه آنتی‌اکسیدانی فعال می‌شود که افزایش آن در ارقام متحمل بیشتر می‌باشد (Chakraborty and Pradhan 2011). میزان فعالیت این آنزیم در روزهای سازگاری و تنش سرما پس از سازگاری افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. در گیاهان سازگار نشده در تنش سرما در ژنوتیپ دسی کاهش معنی داری در میزان فعالیت SOD و در ژنوتیپ کابلی افزایش ناچیزی نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۸). نتایج فعالیت آنزیم کاتالاز در پاسخ به سطوح تیماری نشان دهنده وابستگی فعالیت این آنزیم به فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بوده است. یکی از مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی که به عنوان سوبسترای اولیه در حذف ROSها به کار می‌رود آسکوربیک اسید است، که این ROSها در اثر تنش‌های محیطی از جمله سرما در سلول افزایش می‌یابد (Foyer et al. 1994). در گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما میزان آسکوربیک‌اسید در روز دوم بعد از تنش در هر دو ژنوتیپ کابلی و دسی نسبت به شاهد افزایش یافت (تا ۳۱ درصد) اما با ادامه تنش سرما در روز چهارم میزان آن کاهش معنی‌داری نشان داد اگرچه میزان آسکوربیک‌اسید از شرایط شاهد بیشتر بود. در گیاهان سازگار نشده نیز میزان آسکوربیک‌اسید هم در روز دوم و هم در روز چهارم نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۹). احتمالا کاهش آسکوربیک‌اسید در روز چهارم تنش سرما در گیاهان سازگار شده و روز دوم و چهارم گیاهان سازگار نشده به علت افزایش ترکیبات سمی و کاهش فعالیت آنزیم‌های چرخه گلوتاتیون- آسکوربات مثل CAT و APX بوده است. با توجه به معنی‌دار بودن میزان اسید آسکوربیک بین دو ژنوتیپ کابلی و دسی شاید بتوان چنین نتیجه گرفت که در گیاه نخود تحت تیمارهای آزمایش، میزان اسید آسکوربیک توانسته معیار مناسبی در تفکیک دو ژنوتیپ از نظر میزان تحمل به سرما باشد. به نظر می‌رسد که در گیاه نخود افزایش اسید آسکوربیک، می‌تواند راهکار کارآمدی برای مقابله با تنش سرما باشد.



شکل۸- اثر تیمارهای دمایی بر روی میزان فعالیت آنزیم SOD در گیاهان شاهد (۲۳°C) (I)، گیاهان سازگار شده (۱۰°C) (II)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما به مدت دو روز (III) و چهار روز (IV) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما به مدت دو روز (V) و چهار روز (VI) در ژنوتیپ‌های کابلی (Sel96Th11439) و دسی (4322). ستون روشن وتیره به ترتیب ژنوتیپ‌های کابلی و دسی می‌باشند.

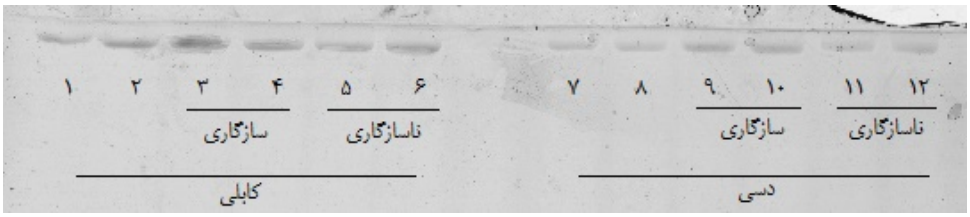
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]



شکل۹- اثر تیمارهای دمایی بر روی میزان اسید آسکوربیک در گیاهان شاهد (I) (۲۳°C)، گیاهان سازگار شده (II) (۱۰°C)، گیاهان سازگار شده تحت تنش سرما به مدت دو روز (III) و چهار روز (IV) و گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما به مدت دو روز(V) و چهار روز (VI) در ژنوتیپ‌های کابلی (Sel96Th11439) و دسی (4322). ستون روشن وتیره به ترتیب ژنوتیپ-های کابلی و دسی می‌باشند.

یکی از شاخص‌های سلولی که در مطالعه پاسخ‌های دفاعی گیاه در نظر گرفته می‌شود فعالیت کیفی آنزیم‌های آنتی اکسیدان است که بر روی ژل انجام می‌گیرد. الگوی آیزوزایمی آنزیم‌های CAT، APX و GPX نشان دادکه تحت تیمارهای دمایی در ژنوتیپ‌های کابلی و دسی تغییر کردند. برای تمامی تیمارهای دمایی تنها یک باند برای آنزیم کاتالاز مشاهده شد (شکل۱۰). همان‌طور که مشخص شده جایگاه باندها تقریبا برای تمامی تیمارها و در هر دو ژنوتیپ یکسان بود اما شدت باند در ژنوتیپ کابلی تحت تنش سرما بعد از دو روز در گیاهان سازگار شده نسبت به دیگر سطوح تیماری بیشتر بود و در روز چهارم میزان آن مقداری کمتر از روز دوم ولی از سایر سطوح تیماری بیشتر بود. در دمای سازگاری نیز به مراتب شدت باند از تیمار شاهد و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای گیاهان سازگار نشده بیشتر بود. در ژنوتیپ دسی نیز تقریبا روند باندهی آن مشابه ژنوتیپ کابلی بود. بر اساس این نتایج می‌توان قضاوت کرد که بررسی فعالیت کیفی آنزیم CAT تایید کننده نتایج بررسی فعالیت کمی این آنزیم بود.

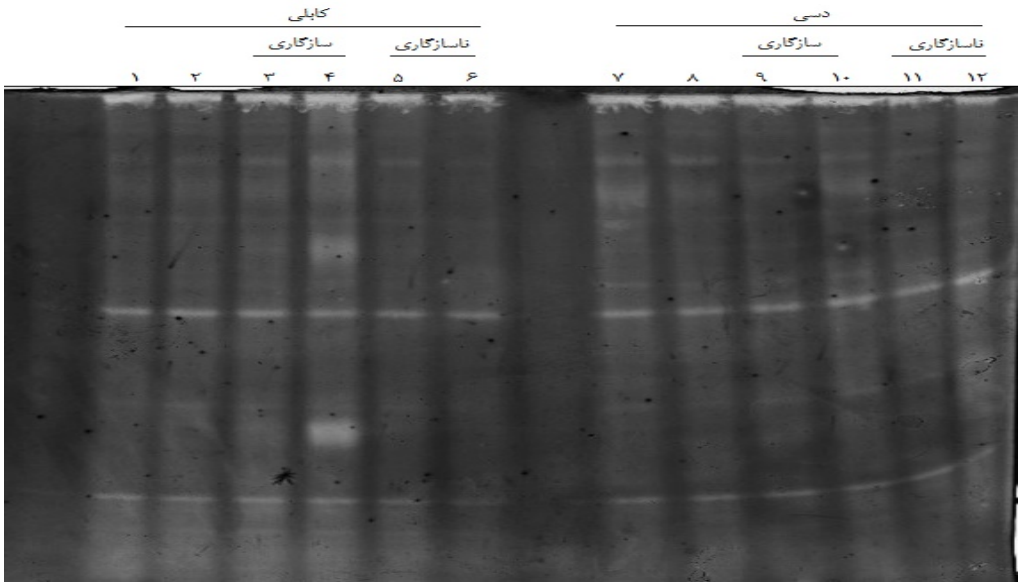
آسکوربات پراکسیداز دارای آیزوزایم‌های مختلفی است که در کلروپلاست (حداقل سه نوع tAPX، APX متصل به تیلاکوئید، APX لومنی و APX استرومایی) سیتوزول، میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها فعال می‌باشند (Anjum et al. 2011). تعداد باندهای حاصل از فعالیت آنزیم APX در دو ژنوتیپ برابر و بیشتر از باندهای آنزیم ATC بود. وجود دو باند متمایز تحت تنش سرما در گیاهان سازگار شده کابلی نشان می‌دهد که میزان فعالیت APX در ژنوتیپ کابلی بیشتر از ژنوتیپ دسی می‌باشد که این باندها در اثر سنتز القا شده برخی آیزوزایم‌های APX سلولی می‌باشد (شکل۱۱). فعالیت آنزیم APX در سطوح تیماری ۴ درجه سانتی‌گراد پس از سازگاری در هر دو ژنوتیپ کابلی و دسی بیشتر بود که نتایج فعالیت آنزیم APX به روش کمی را تایید کرد.



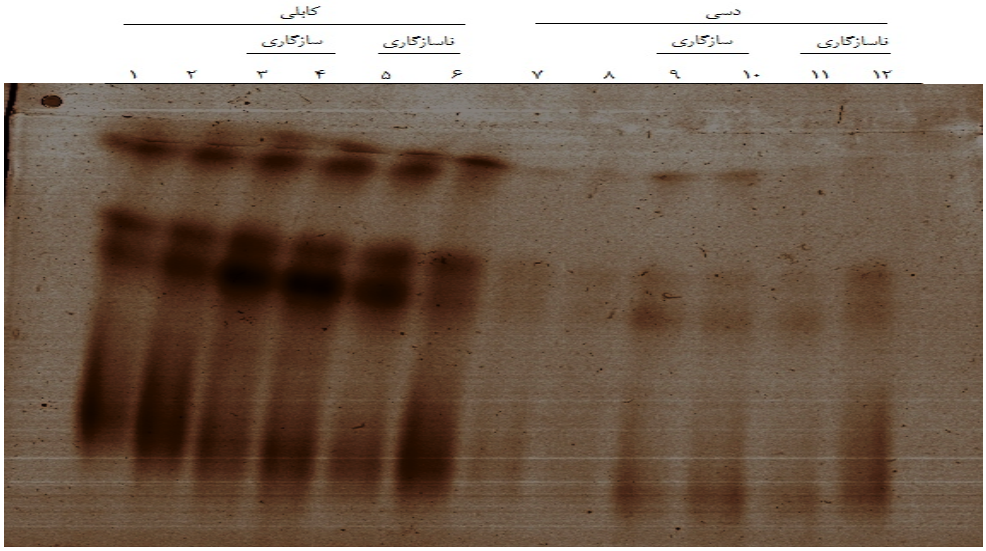
شکل۱۰- فعالیت آیزوزایمی آنزیم کاتالاز تحت تیمارهای آزمایش در ژنوتیپ های کابلی (چاهک‌های ۶-۱) و دسی (چاهک‌های ۱۲-۷). چاهک‌های ۱ و ۷) شاهد؛ ۲ و ۸) ۱۰ درجه سانتی‌گراد؛ ۳ و ۹) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار شده پس از ۲ روز؛ ۴ و ۱۰) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار شده پس از ۴ روز؛ ۵ و ۱۱) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار نشده پس از ۲ روز؛ ۶ و ۱۲) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار نشده پس از ۴ روز.

وضوح باندها تحت تیمارهای دمایی برای ژنوتیپ کابلی بیشتر از ژنوتیپ دسی بود به‌طوری‌که شدت باندها مخصوصا در شرایط سازگاری در ژنوتیپ کابلی بیشتر از ژنوتیپ دسی بود. همچنین برخی باندها مخصوصا در میانه ژل تنها برای تیمارهای دمایی ژنوتیپ کابلی مشاهده شده و در ژنوتیپ دسی این ردیف باندها در هیچ سطح تیماری مشخص نبود. این امر احتمالا بیانگر فعالیت کیفی بیشتر آنزیم GPX در ژنوتیپ کابلی نسبت به ژنوتیپ دسی می‌باشد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم GPX همانند آنزیم‌های CAT و APX مربوط به تنش سرما پس از سازگاری بود (شکل۱۲).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]



شکل۱۱- فعالیت آیزوزایمی آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تیمارهای آزمایش در ژنوتیپ‌های کابلی (چاهک‌های ۶-۱) و دسی (چاهک‌های ۱۲-۷). چاهک‌های ۱ و ۷) شاهد؛ ۲ و ۸) ۱۰ درجه سانتی‌گراد؛ ۳ و ۹) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار شده پس از ۲ روز؛ ۴ و ۱۰) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار شده پس از ۴ روز؛ ۵ و ۱۱) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار نشده پس از ۲ روز؛ ۶ و ۱۲) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار نشده پس از ۴ روز.



شکل۱۲- فعالیت آیزوزایمی آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تیمارهای آزمایش در ژنوتیپ‌های کابلی (چاهک‌های ۶-۱) و دسی (چاهک‌های ۱۲-۷). چاهک‌های ۱ و ۷) شاهد؛ ۲ و ۸) ۱۰ درجه سانتی‌گراد؛ ۳ و ۹) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار شده پس از ۲ روز؛ ۴ و ۱۰) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار شده پس از ۴ روز؛ ۵ و ۱۱) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار نشده پس از ۲ روز؛ ۶ و ۱۲) ۴ درجه سانتی‌گراد گیاهان سازگار نشده پس از ۴ روز.

نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق برخی از مکانیسم‌های بیوشیمیایی و مولکولی گیاه نخود تحت تنش سرما ارزیابی شد. با انتقال گیاهان به دمای ۱۰ درجه (سازگاری) و سپس منتقل کردن آن‌ها به فاز سرما فعالیت آنزیم‌های CAT، APX، GPX و SOD افزایش یافت درحالی‌که در گیاهان سازگار نشده تحت تنش سرما میزان فعالیت این آنزیم-ها کاهش یافت. به نظر می‌رسد تنش سرما با افزایش فعالیت مکانیسم‌های تخریب پروتئینی از یک طرف و کاهش فعالیت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]

مکانیسم‌های سنتز پروتئینی از طرف دیگر، سبب روند رو به کاهش فعالیت این آنزیم‌ها شده است. بنابراین فرآیند سازگاری با تغییر متابولیت‌های سلولی حاصل از برنامه‌ریزی مجدد ژنوم به عنوان یکی از مکانیسم‌های انطباقی مهم در گیاهان حساس به سرما مانند نخود نیز می‌تواند ایفای نقش کند. تغییر میزان ROS در گیاه احتمالا نقش انتقال سیگنال را داشته به‌طوری‌که افزایش آن باعث فعال شدن مسیرهای انتقال پیام و در نهایت افزایش بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند CAT، APX، GPX و SOD شد. ژنوتیپ کابلی با بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مطالعه شده تحمل بیشتری به سرما در مقایسه با ژنوتیپ دسی نشان داد که تغییرات میزان H_2O_2 تایید کننده نتایج فوق می‌باشد. مطالعه الگوی آیزوزایمی برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی ضمن تایید نتایج فوق نشان داد که گیاهان متحمل کابلی با القای ژن‌های دفاعی ویژه (وجود باندهای متمایز در ایزوزایم‌های APX) پاسخ-های سازگاری مطلوب‌تری به تنش سرما نشان می‌دهد که نتیجه آن کاهش بیشتر میزان ROS (H_2O_2) می‌باشد. همچنین روند کاهشی H_2O_2 می‌تواند احتمالا به واسطه کاهش فعالیت‌های بیوشیمیایی گیاهی در دماهای کم و در نهایت کاهش تولید H_2O_2 به‌عنوان ماده جانبی حاصل از این فعالیت‌های بیوشیمیایی باشد (M-Cheeseman 2007). بنابراین سازگاری گیاهان به مدت ۱۰ روز با افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، باعث کاهش سطوح H_2O_2 تولید شده تحت تنش سرما و در نتیجه کاهش شاخص‌های آسیب غشایی شد. تحت تنش سرما میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها در گیاهان سازگار شده اغلب تغییرات معنی‌داری نشان نداده در حالیکه در گیاهان سازگار نشده کاهش نشان داد که چنین تغییراتی در ژنوتیپ دسی بیشتر از کابلی بود که با فعالیت کمتر ماشین دفاعی سلول و خسارت بیشتر (H_2O_2 بیشتر) در ژنوتیپ دسی تایید می‌شود. بنابراین فعالیت مطلوب‌تر مکانیسم دفاعی در ژنوتیپ کابلی از تولید و اثرات منفی ROS جلوگیری کرده و با فعالیت فتوسنتزی و تولید انرژی که می‌تواند در تولید پاسخ‌های دفاعی سلول بکار گرفته شود، باعث افزایش تحمل نسبت به تنش سرما شود.

سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران در تامین هزینه طرح ۹۱۰۰۰۹۴۲ کمال تشکر را دارد

منابع

Anjum SA, Xie XY, Wang LC, Saleem MF, Man C, Lei W (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. African Journal of Agricultural Research 6: 2026-2032.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.

usitatissimum). Canadian Journal of Botany 49: 2129-2137.

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

Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. Molecular Biology Reports 39:969-987.

Husain S, Munns R, Condon AT (2003) Effect of sodium exclusion trait on chlorophyll retention and growth of durum wheat in saline soil. Crop and Pasture Science 54: 589-597.

Kazemi SS, Maali Amiri R, Zeinali Khaneghah H (2012) Evaluation of some cell membrane damage indexes for low temperature stress in Jam chickpea. Modern Genetics Journal 3:5-17. (in Persian).

Kazemi Shahandashti SS, Maali Amiri R, Zeinali H, Ramezanpour SS (2013) Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. Molecular Biology Reports 40: 893-903.

Kazemi-Shahandashti SS, Maali-Amiri R, Zeinali H, Khazaei M, Talei A, Ramezanpour SS (2014) Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. Journal of Plant Physiology 171: 1106-1116.

Khazaei M, Maali Amiri R (2011) Dehydrin proteins and their roles in plant tolerance to temperature stresses. Modern Genetics Journal 4:5-17. (in Persian).

Laino P, Shelton D, Finnie C, De Leonardis AM, Mastrangelo AM, Svensson B, Lafiandra D, Masci S (2010) Comparative proteome analysis of metabolic proteins from seeds of durum wheat (cv. Svevo) subjected to heat stress. Proteomics 10: 2359-2368.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lascano HR, Antonicelli GE, Luna CM, Melchiorre MN, Gómez LD, Racca RW, Trippi VS, Casano LM (2001) Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. Functional Plant Biology 28: 1095-1102.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]

Maali Amiri R, Yur'eva NO, Shimshilashvili KR, Goldenkova-Pavlova IV, Pchelkin VP, Kuznitsova EI, Tsydendambaev VD, Trunova TI, Los DA, Jouzani GS (2010) Expression of Acyl-lipid Δ12-desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance of potato. Journal of Integrative Plant Biology 52: 289-297.

M-Cheeseman J (2007) Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. Plant Stress 1: 4-15.

Mika A, Lüthje S (2003) Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. Plant Physiology 132: 1489-1498.

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

Oncel I, Keles Y, Ustun AS (2000) Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. Enviromental Pollution 107: 315-320.

Nazari MR, Maali Amiri R, Ramezanpour SS (2011) Quantitative assessment of gene expression pattern of sucrose synthase under cold stress condition in chickpea. Modern Genetics Journal 6:59-69. (in Persian).

Rakei A, Maali-Amiri R, Zeinali H, Ranjbar M (2015) DNA methylation and physio-biochemical analysis of chickpea in response to cold stress. Protoplasma doi: 10.1007/s00709-015-0788-3.

Ranieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, Mensuali Sodi A, Soldatini GF (2003) Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. Journal of Experimental Botany 54:2529-2540.

Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996) Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of Arabidopsis thaliana. Plant physiology 110: 125-136.

Reddy M, Vora A (1986) Salinity induced changes in pigment composition and chlorophyllase activity of wheat. Indian Journal of Plant Physiology 29: 331-334.

Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inzé D, Mittler R (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. Plant Journal 32: 329-342.

Robertson EF, Dannelly HK, Malloy PJ, Reeves HC (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. Analytical biochemistry 167: 290-294.

Sairam R, Srivastava G (2001) Water stress tolerance of wheat (Triticum aestivum L.): variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. Journal of Agronomy and Crop Science 186: 63-70.

Smirnoff N (1996) Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. Annual Botany 78: 661-669.

Scebba F, Sebastiani L, Vitaglianpo C (1998) Changes in activity of antioxidantive enzymes in wheat (Triticum aestivum) seedlings under cold acclimation. Physiologia Plantarum 104:747-752.

Thomashow MF (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! Plant Physiology 125: 89-93.

Xin Z, Browse J (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. Plant, Cell and Environment 23: 893-902.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.14.2]