نشریه پژوهش‌های گندم
دوره دوم. شماره یکم. بهار و تابستان ۱۳۹۸
دانشگاه کردستان
Journal of Wheat Research
Volume 2. Issue 1. 2019

کنترل نموی تحمل به سرما در گندم نان (*Triticum aestivum*)

سیروس محفوظی*[۱]، محمد مجدی [۲]، محسن جانمحمدی[۳]، شهریار ساسانی[۴]، الهام سرحدی[۵]، رضا توکل افشاری[۶] و قاسم حسینی سالکده[۵]

*۱. نویسنده مسئول، دانشیار بازنشسته موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران
۲. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۳. گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، ایران
۴. مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه، ایران
۵. پژوهشگاه بیوتکنو لوژی کشاورزی، کرج، ایران
۶. گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
پست الکترونیکی نویسنده مسئول: siroosmahfoozi@yahoo.com

دریافت: ۱۰/ ۰۴/ ۱۳۹۸ پذیرش: ۱۲/ ۰۶/ ۱۳۹۸

چکیده

آنالیزهای فنولوژیکی، مولکولی و متابولیتی در طی بهاره‌سازی نشان می‌دهد که رابطه نزدیکی بین زمان تکمیل بهاره‌سازی و کاهش تجمع متابولیت‌ها و بیان پروتئین‌های سرما القایی وجود دارد. در این مقاله تعداد زیادی از متابولیت‌های محافظتی و پروتئین‌های سرما القایی در ژنوتیپ‌های حساس و متحمل گندم نان تشریح می‌شوند. بر اساس مطالعات مختلف ژ نوتیپ‌های زمستانه دوره عادت‌دهی طولانی تری به سرما دارند و در نتیجه مدت زمان بیان پروتئین‌های مرتبط با تحمل به سرما و تجمع متابولیت‌ها بیشتر است. نتایج نشان می‌دهد که الگوی بیان پروتئین‌های مرتبط با سرما و برخی متابولیت‌ها با روند فاکتورهای نموی که اثرات تنظیمی روی پروتئوم و متابولوم دارد، مطابق است. علاوه بر این دماهای زیر صفر در طول فصول پاییز و زمستان در شرایط مزرعه بر تعداد، میزان و الگوی بیان پروتئین‌های مرتبط با تحمل به سرما تاثیر بیشتری در مقایسه با گیاهان عادت داده شده به سرما در دمای پایین ولی بالای صفر درجه سانتیگراد در شرایط کنترل شده دارند. مطالعه حاضر بینش جدیدی را برای روشن سازی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در سازگاری به سرما در گندم مهیا می‌کند که برای اصلاح گندم در تحمل به سرما می‌تواند مفید واقع شود.

کلمات : *گندم نان، سرما، بهاره‌سازی، پروتئومیکس*

مقدمه

سرما یکی از عوامل مهم ایجاد خسارت به محصولات زراعی در دنیا و ایران می‌باشد. در ایران به دلیل قرار گیری حدود ۶۶ درصد از اراضی گندم در مناطق معتدل سرد و وقوع سرمای زودرس پاییزه، سرمای سخت زمستان و یا سرمای دیررس بهاره سالانه خسارت‌های زیادی به محصول گندم وارد می‌شود (Mahfoozi *et al.*, 2006). از مهم‌ترین مراحل نمو گیاه، مرحله ی القای گلدهی است که این فرایند در بسیاری از گونه‌های گیاهی بر اساس پاسخ به تغییرات فصلی ناشی از محیط اطراف رخ می‌دهد. مکانیسم تحمل به سرما در گندم پاییزه ارتباطی اساسی با میزان نیاز بهاره‌سازی دارد که این امر سبب تأخیر در انتقال از مرحله رویشی به زایشی شده و نتیجه آن مقاومت به سرما می‌باشد (Mahfoozi *et al.*, 2006; Fowler *et al.*, 1999). شکل‌گیری آغازه‌های برگ تعیین کنندهٔ تعداد نهایی برگ روی ساقهٔ اصلی می‌باشد (Hay and Ellis, 1998) که از نیاز به بهاره‌سازی، طول روز، فیلوکرون، طول دوره رویشی و زمان گلدهی متاثر می‌شود. گیاهانی که نیاز به بهاره‌سازی دارند چنانچه در معرض دمای پایین قرار گیرند تعداد نهایی برگ آن‌ها تا رسیدن به نقطهٔ تکمیل بهاره‌سازی کاهش می‌یابد و بعد از آن به تعداد ثابت خود می‌رسد (Mahfoozi *et al.*, 2001; Fowler *et al.*, 1996) در کروموزوم گروه پنج گندم نان با مکان‌یابی صفات کمی، همولوگ‌های متعدد تحمل به سرما (*Fr-1*) در مکان‌های ژنی *Fr-A1*، *Fr-D1* و *Fr-B1* به ترتیب با فواصل ۲، ۱۰ و ۴۰ سانتی‌مورگان از همولوگ ژن *Vrn-1* مکان‌یابی شده‌اند (Galiba *et al.*, 1995; Toth *et al.*, 2003). همچنین دومین ژن تحمل به سرما (*Fr-A2*) در کروموزوم شماره پنج گندم گزارش شده‌است(Vagujfalvi *et al.*, 2003). ژن *Fr-A2* روی کروموزوم 5A با فاصله ۳۰ سانتی‌مورگان از ژن بهاره‌سازی *Vrn-A1* از پیوستگی با این ژن برخوردار است. وجود اثر پلیوتروپیک مکان ژنی بهاره‌سازی با تحمل به سرما و تیپ رشد، صرف نظر از پیوستگی ژن تحمل به سرما با مکان ژنی بهاره‌سازی *Vrn-1*، توسط محققین دیگری گزارش شده است (Brule-Babel and Fowler, 1998). طبق گزارش شوتکا (۱۹۸۱) کروموزوم‌های گروه پنج گندم (5A, 5B) که حائز ژن‌های بهاره‌سازی می‌باشند نقش مهمی در بیان تحمل به سرما دارند(Shutka, 1981) . پیشتر نیز گزارش شده است که کروموزوم گروه 5A بر بیان تحمل به انجماد و نیز در بیان پروتئین‌های WSC120 نقش دارد. (Houde *et al.*, 1992; Fowler *et al.*, 1996) درک مکانیسم‌های تحمل به سرما در ارقام مختلف غلات می‌تواند در طراحی برنامه‌های اصلاحی و سیستم‌های تولیدی برای مناطق سرد مفید باشد. با وجود انجام برخی مطالعات در رابطه با ارتباط صفات نموی با تحمل به سرما در گندم زمستانه نورستار تحت شرایط کنترل شده (Mahfoozi *et al.*, 2000; Fowler and Limin, 2004; Jahanbakhsh *et al.*, 2009) اما به‌نظر می‌رسد نتایج بدست آمده شدیداً تحت تأثیر شرایط آزمایشی بوده و در مقایسه با نتایج مزرعه‌ای متفاوت باشند. زیرا در شرایط مزرعه‌ای گیاهان ممکن‌است با مجموعه‌ای از دماهای مطلوب برای سازگاری (کمتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد)، دمای پایین تر از انجماد (Herman *et al.*, 2006) و یا دماهای نامطلوب که منجر به از بین رفتن سازگاری می‌گردد مواجه باشند. علاوه بر آن به نظر می‌رسد دماهای پایین‌تر از انجماد، شدت نور، چرخه گرم و سرد در شرایط مزرعه‌ای و تأثیر آن روی بیان برخی از ژن‌ها، افت ناگهانی دما در اطراف ریشه و کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه‌ها در شرایط کنترل شده و سایر عوامل اکولوژیکی نظیر پوشش برف و سوزش باد در شرایط مزرعه‌ای می‌توانند در حصول نتایج متفاوت بین مزرعه و شرایط کنترل شده تأثیرگذار باشند (Gusta *et al.*, 2005). عادت‌دهی گندم با دماهای زیر صفر (۳- درجه سانتی‌گراد) در مقایسه با عادت‌دهی با دماهای بالای صفر در شرایط کنترل شده می‌تواند تحمل به سرما را حدود ۵-۳ درجه بهبوددهد. با توجه به افت دما در برخی از نقاط سرد کشور در اوایل دوره رویشی به پایین‌تر از صفر درجه به نظر می‌رسد گیاهان کشت شده در این مناطق فرایند سازگاری را با دماهای زیر صفر تکمیل می‌نمایند.

تغییرات زیادی از نظر صفات مور فولوژیک، فنولوژیک (نموی) و فیزیولوژیک از قبیل انباشت پرولین، قندها، کربوهیدرات‌ها، آنزیم‌های آنتی اکسیدان‌ها. پروتئین‌های القایی مرتبط با سرما، اسیدهای امینه و دیگر متابولیت‌های محافظت کننده در دوره عادت‌دهی به سرما در غلات صورت می‌گیرد. یکی از مکانیسم‌هایی که در مقابل تنش سرمایی

عمل می‌کند، افزایش تولید پرولین آزاد است (Matysik *et al.*, 2002). تجمع آن در سلول باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، حلالیت پروتئین‌های مختلف و همچنین حفاظت آنزیم‌ها از تجزیه شدن، تنظیم اسمزی و حفظ حالت طبیعی غشاء می‌شود. در تعدادی از گیاهان، تحت شرایط تنش تا ۱۰۰ برابر شرایط نرمال غلظت پرولین افزایش می‌یابد. یکی دیگر از مهم ترین واکنشهای گیاهان در شرایط تنش، افزایش تجمع کربوهیدرات‌ها می‌باشد، کربوهیدرات‌ها با بالا بردن غلظت درون سلولی، مانع یخ زدن آن در اثر سرما می‌شوند (Galiba *et al.*, 1997) و آنها از غشای پلاسمایی و پروتئین‌ها در برابر خسارت‌های تنش سرمایی محافظت می‌کنند (Sasaki *et al.*, 1998).

در ارتباط با نقش متابولیت‌ها، بسیاری محققین از وجود یک همبستگی مثبت بین نوع قند ذخیره‌ای و میزان تحمل تنش‌های غیر زیستی در گیاهان خبر می‌دهند، بدین منوال که افزایش محتوای قند به ارتقای تحمل در برابر این تنش‌ها منجر خواهد شد (Suzuki, 1989; Al-Hakimi *et al.*, 1995) از فرایند تجمع قندهای محلول در آب در بافت‌های رویشی گیاه که در زمره گروه حل شونده‌های سازگار قرار می‌گیرند به عنوان پاسخ بسیاری از گونه‌های گیاهی در مواجه با تنش‌های متنوع غیرزیستی یاد شده است. تیمار سرما افزایش قابل ملاحظه‌ای در محتوای قند محلول در آب سلول را سبب میشود که این امر با به تعادل رساندن پتانسیل آب برون سلولی همراه است چرا که به تنظیم فشار اسمزی در سلول کمک می‌کند (Morgan, 1992).

نقش پروتیئن‌های مختلف در تحمل به سرما معنی‌دار می‌باشد. بهره‌گیری از تجزیه پروتئوم به عنوان ابزاری سودمند در درک مکانیزم‌های تحمل به تنش‌های محیطی غیر زنده در شناسایی پروتئین‌های القا شده بر اثر تنش‌های محیطی توسط بسیاری از محققین گزارش شده است (Sarhadi *et al.*, 2010). آنالیز پروتئوم رویکردی دیگر برای کشف ژن‌ها و مسیرهای کلیدی در پاسخ به تنش‌های غیرزنده را ارایه می‌نماید. با وجودی که بررسی عکس‌العمل گیاهان در برابر تنش سرمایی در سطح DNA و RNA (ژنومیکس و ترانسکریپتومیکس) اطلاعات مهمی را در زمینه‌های فرآیندهای دفاعی فراهم آورده‌اند (Seki *et al.*, 2001; Fowler and Thomashow, 2002)، ولی مشخص شده‌است که سطوح رونوشت‌ها و پروتئین‌ها با هم همبستگی بالایی ندارند و این بدان معناست که لزوماً تمامی رونوشت‌ها به پروتئین ترجمه نمی‌شوند و برخی از آنها پیش از رسیدن به ریبوزوم تجزیه می‌شوند. به علاوه بسیاری از پروتئین‌ها از طریق تغییرات پس از ترجمه نظیر فسفریلاسیون، گلیکوزیله شدن، یوبی‌کویتینه شدن و سایر موارد دچار تغییر و تحول می‌شوند. شناخت تمام پروتئین‌های بیان شده (پروتئوم) در یک بافت یا اندام در یک دوره زمانی جهت درک بیولوژی سلولی یا اندام ضروری می‌باشد. پروتئوم وضعیت واقعی سلول یا اندام را منعکس می‌نماید و در واقع بعنوان پل ارتباطی مابین ترنسکریپتوم و متابولوم می‌باشد. پروتئین‌ها بصورت مستقیم در فرآیندهای بیوشیمیایی وارد عمل می‌شوند و از این رو مطالعه آنها در مقایسه با نشانگرهای DNA به کارکرد سلولی و خصوصیات فنوتیپی نزدیکتر می‌باشند.

به منظور بررسی ارتباط بین صفات نموی، صفات فیزیولوژیک، انباشت متابولیت‌های بیوشیمیایی، بیان ژن‌های بهاره‌سازی و پروتئین‌های سرما القایی ارقام زمستانه، بینابین و بهاره در حین دوره‌های عادت‌دهی، قبل و بعد از تکمیل بهاره‌سازی و اوایل دوره زایشی گیاه آزمایشات مختلفی تحت شرایط مزرعه‌ای در مناطق سرد زنجان و معتدل کرج و نیز شرایط کنترل شده صورت گرفت که نتایج آن که به شرح زیر است.

الف- ارتباط نیاز بهاره‌سازی با تحمل به سرما و تجزیه پروتئوم برگ گندم سازگار شده به سرما در دمای پایین در شرایط کنترل شده: به منظور بررسی سازوکار نموی و تحمل به تنش سرما در گندم، در تحقیقی تغییر الگوی بیان پروتئین‌ها، تعیین روابط بین بهاره‌سازی و ژن‌های القاء شده تحت تاثیر دمای پایین ولی بالای صفر درجه سانتیگراد دمای ۲ درجه سانتی‌گراد) با استفاده از پروتئومیکس در ارقام متحمل نورستار و نیمه متحمل آذر۲ انجام پذیرفت. ارقام مورد مطالعه در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد در طول یک دوره ۸۹ روزه به سرما سازگار شدند و تحمل به سرما با استفاده از روش LT_{50} (دمایی که در آن ۵۰٪ بوته‌ها بر اثر آن دما از بین می‌روند) اندازه‌گیری شد. همچنین تکمیل دوره بهاره‌سازی با شمارش تعداد برگ‌های انتهایی در فاصله بین

دوره سازگاری به سرما تخمین زده شد. ارقام نورستار و آذر ۲ تحت تاثیر دمای پایین، کاهش قابل توجه تعداد برگ‌های انتهایی را در پاسخ به بهاره‌سازی نشان دادند. میزان LT_{50} رقم آذر ۲ با تیپ رشد بینابین پس از ۲۸ روز تکمیل بهاره‌سازی حدود ۸- درجه سانتی‌گراد شد. در صورتی که در رقم زمستانه نورستار با نیاز بهاره‌سازی طولانی حداکثر تحمل به سرما در زمان تکمیل بهاره‌سازی (بین روز ۴۲-۳۵) به ۱۸/۷- درجه سانتی‌گراد،۳۵ روز دوره بهاره‌سازی وارد فاز زایشی می‌گردد). حداکثر بیان تحمل به سرما در زمان تکمیل بهاره‌سازی بوده و بعد از آن میزان بیان تحمل به سرما کاهش می‌یابد. در هر دو رقم متحمل و نیمه متحمل بعد از اعمال تیمار دوره‌های متفاوت عادت‌دهی به سرما تعدادی از پروتئین‌ها افزایش بیان و تعدادی نیز کاهش بیان نشان دادند. پروتئین‌های شناسایی شده به پروتئین‌های تنظیم کننده سرما، پروتئین‌های ضدیخ، پاسخ‌های دفاعی تنش اکسیداتیو، تثبیت کربن، تنظیم کننده‌های پس از رونویسی، پروتئین‌های کلروپلاستی، متابولیسمی و سنتزی گروه بندی شدند.

پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش سرما در شرایط کنترل شده:

شواهد قوی وجود دارد که نشان می‌دهد ژن *Cor/Lea* می‌تواند در تحمل به یخ زدگی کمک کنند. در تحقیق ما تعداد ۱۵ پروتئین COR/LEA شناسایی گردیدند که شامل پروتئین‌های سازگار به سرما WCS19، WCOR719، پروتئین COR وابسته به LEA/RAB پروتئین‌های پاسخ دهنده به سرما (لکه ۱۲۵، ۱۳۹ و۱۴۱)، پروتئین‌های تنظیم کننده سرما، پروتئین‌های سازگار به سرما WCOR615، WCOR14c پروتئین پاسخ دهنده به تنش سرما و WCOR14a می‌باشند. نتایج مشاهدات نشان داد که سطح بیان پروتئین COR/LEA در بالاترین سطح تحمل به دمای پایین در رقم نورستار بیان شده ولی سطح بیان آن در رقم آذر۲ پایین بود. WCS19 در رقم نورستار و آذر۲ تحت شرایط تنش افزایش بیان نشان دادند در رقم نورستار لکه پروتئینی شماره ۱۱۱ هیچ گونه تغییری را نشان نداد اما در رقم آذر۲ در هر چهار دوره عادت‌دهی به سرما نسبت به تیمار شاهد (۲۰°C) تغییرات معنی‌دار مشاهده شد. لکه پروتئینی شماره ۱۱۲ در رقم متحمل نورستار در ۴۲ و ۵۶ روز عادت‌دهی به سرما نسبت به تیمار شاهد بیان‌شان تغییر کرده بود در حالی که در رقم نیمه متحمل آذر۲ در تمامی مراحل نمونه‌برداری نسبت به تیمار شاهد تغییرات معنی‌دار بود. بیان پروتئین‌های مرتبط با تحمل به سرما مانند Wcor18 (۱۲۶) اگر چه در دو ژنوتیپ بسیار متحمل و نیمه متحمل بیان شدند ولی سطح بیان و مدت زمان بیان در رقم نورستار بیشتر بود. نتایج این تحقیق ثابت کرد تنش سرما باعث القاء بیان CBFها (C-repeat binding factor) یا همان DREB1ها (Dehydration-responsive element-binding protein) می‌شود که این عامل می‌تواند به سیس المنت ژن‌های *Cor* متصل گردیده و بیان آن‌ها را القاء نماید و نهایتا فعال شدن این ژن‌ها منجر به افزایش تحمل به سرما می‌گردد. همچنین ژن‌های *Cbf* مشابه با این فاکتور در گندم نان به عنوان فاکتورهای رونویسی ژن‌های *Cor/Lea* دخیل در ایجاد مقاومت به سرما در این گیاه عمل می‌کنند. ژنوتیپ‌های با تیپ رشدی زمستانه (آلل *vrn-1*)، سطوح پایین‌تری از رونوشت *VRN-1* و میزان بالاتری از بیان ژن‌های *Cbf* خاص را تا زمان انجام بهاره‌سازی نشان می‌دهند. ژنوتیپ‌های زمستانه که آلل *vrn-1* را حمل می‌کنند پس از بهاره شدن نسبت به زمان قبل از بهاره‌سازی سطوح پایین‌تری از رونوشت *Cbf* را نشان دادند(Sarhadi *et al*., 2010). تحقیق حاضر افزایش بیان تعداد زیادی از ژن‌های *Cor/Lea* را در ژنوتیپ متحمل نورستار نشان داد که احتمالا تحت تاثیر تکمیل بهاره‌سازی است. انتظار می‌رود که چندین ژن *Cbf* و *Cor* در پاسخ به سطوح بالای *VRN-1* بعد از تکمیل بهاره‌سازی کاهش بیان پیدا کنند. به هر حال کاهش معنی‌داری در تجمع پروتئین‌های COR/LEA در روز ۵۶ از دوره عادت‌دهی به سرما مشاهده نشد. عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار در روز ۵۶ ممکن است به علت تاخیر زمان بین تکمیل بهاره‌سازی (زمانی که میزان پروتئین VRN-1 افزایش یافته) و اثر کامل این افزایش بر کاهش بیان پروتئین‌های COR/LEA باشد. علاوه بر این پیشنهاد شده که مکانیسم فعال شده در اثر *VRN-1* ممکن است در تنظیم بیان ژن‌های خاصی که در پاسخ به سرما فعال شده‌اند دخالت داشته باشند و از طرف دیگر حضور

رونوشت *VRN-1* برای کاهش بیان ژن‌های *Cor* لازم است اما کافی نیست (Dillon *et al.*, 2010).

همچنین ۳ پروتئین دیگر متعلق به گروه پروتئین‌های LEAشناسایی شدند که شامل Wcor14a و لکه‌های پروتئینی ۸۴۸، ۸۴۹ و۸۵۰ بودند که تنها در رقم متحمل نورستار مشاهده شدند. پروتئین Wcor14a پروتئین هدف کلروپلاستی است که تحت شرایط دمای پایین و روشنایی بیان می‌شود (Takumi *et al.*, 2003; Crosatti *et al.*, 1995). در تحقیق ما همچنین مشاهده شد که در گروه پروتئینی WCOR، انباشت اکثر لکه‌های پروتئینی القاء شده بر اثر تنش سرما در مرحله رویشی صورت گرفته و مدتی قبل از تکمیل دوره بهاره‌سازی به حداکثر رسیده ولی بعد از تکمیل بهاره‌سازی در هر دو رقم نوستار و آذر۲ کاهش معنی‌دار در بیان پروتئین‌ها مشاهده شد. کاهش بیان اکثر پروتئین‌ها در رقم آذر۲، زودتر از رقم نورستار صورت گرفت، هر چند برخی لکه‌های پروتئینی نیز تظاهر یافتند که بیان آن‌ها از قاعده بالا پیروی نکردند. نتایج به دست آمده نظریه کنترل نموی (Developmental Regulation) و کاهش مقاومت پس از انتقال از مرحله رویشی به زایشی، پیشنهادی محفوظی و همکاران ۲۰۰۱ و ۲۰۰۰، فولر و همکاران ۲۰۰۱ و ۱۹۹۹ را تایید می‌نماید. طبق نظریه کنترل نموی تحمل به سرما، ژن‌های نموی نظیر ژن‌های فتوپریود، بهاره‌سازی و افزایش تعداد برگ، طول مدت بیان ژن‌های ساختمانی را تنظیم می‌نمایند. در مکان یابی ژن‌های مرتبط با مقاومت به سرما اثرات پلیوتروپیک بهاره‌سازی روی نمو و بیان ژن‌های مقاومت به سرما گزارش شد.

پروتئین‌های ضدیخ حفاظت کننده در برابر یخ زدگی در شرایط کنترل شده:

پروتئین‌های ضدیخ گیاهی همولوگ(Pathogenesis-related) PR پروتئین‌ها هستند و شامل β -۱و۳ گلوکاناز، کیتینازها، پروتئین‌های شبه تائوماتین و پروتئین‌های بازدارنده پلی گالاکتوریناز می‌باشند(Sarhadi *et al.*, 2010).

پروتئین PR-4 تنها در رقم متحمل نورستار شناسایی شد و β -۱و۳ گلوکاناز در هر دو ژنوتیپ تنها در دوره سازگاری به سرما مشاهده شد. بیان پروتئین شبه تائوماتین در رقم نورستار در طول دوره سازگاری به سرما در محدوده تکمیل بهاره‌سازی (۴۲ و ۵۶ روز) مشاهده شد. اما هیچ تغییری در بیان این پروتئین در رقم آذر۲ دیده نشد. یکی از β -۱و۳ گلوکانازها تنها در رقم متحمل نورستار در ۲۸، ۴۲ و ۵۶ روز عادت‌دهی به سرما مشاهده شد. کیتیناز نیز در ۲۸، ۴۲ و ۵۶ روز تیمار عادت‌دهی نسبت به سرما تغییرات معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد اما در رقم آذر ۲ هیچ گونه تغییری مشاهده نشد. شواهد علمی نشان داده‌اند که در گیاهان، بتا ۱و۳ گلوکانازها در چندین فرایند فیزیولوژیکی شامل پاسخ به تنش‌های غیر زنده دخالت دارند (Torabi *et al.*, 2009; Yaish *et al.*, 2006). پروتئین‌های PR در پاسخ به حمله پاتوژن‌ها، تنش‌های محیطی، ترکیبات شیمیایی و زخم شدگی در گیاهان بیان می‌شوند (Van Loon *et al.*, 1997).

پروتئین‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو:

اکثر تنش‌های محیطی از جمله سرما، با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) در درون سلول و بروز واکنش‌های اکسیداتیو موجب اثرات سوء بر سلول و متابولیسم سلولی می‌شوند (Torabi et al., 2009). پروتئین‌های دخیل در تنش اکسیداتیو گزارش شده‌اند. همه ۳ پروتئین SOD (Superoxide dismutase) شناسایی شده در رقم نورستار افزایش بیان داشتند در صورتی که در آذر ۲، مقدارCu/Zn superoxide dismutase کاهش بیان داشت و بیان Mg superoxide dismutase هیچ تغییر معنی‌داری را نشان نداد و Cu/Zn superoxide dismutase نیز تنها در تیمار ۵۶ روز عادت‌دهی به سرما افزایش بیان داشت. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسیداز دیسموتاز از مهم‌ترین آنزیم‌ها در برابر حذف اکسیژن فعال مولکولی (ROS; Reactive Oxygen Species) می‌باشند که در تبدیل رادیکال‌های سوپر اکسید به اکسیژن مولکولی دخالت دارند و سوپر اکسید را به مولکول‌های پراکسید هیدروژن که سمیت کمتری دارند تبدیل می‌کنند، این آنزیم‌ها در انواع تنش‌های غیر زنده گزارش شده‌اند (Gazanchian *et al.*, 2007). در تحقیق حاضر بیان پراکسی ردوکسین (لکه پروتئینی ۱۷۷) در طول دوره سازگاری به سرما تنها در رقم آذر۲ در تیمارهای

سرما دهی ۲۸،۴۲ و ۵۶ روز نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود در حالی که در رقم نورستار با بهاره‌سازی طولانی (لکه پروتئینی ۴۸۶) در تمامی مراحل نمونه‌برداری نسبت به شاهد افزایش بیان داشت ولی هیچ تغییری در رقم آذر ۲ با بهاره‌سازی متوسط دیده نشد. از دیگر پروتئین‌های دخیل در دفاع اکسیداتیو که در این تحقیق شناسایی شد گلوتاتیون ترانسفراز (۵۰۸) و S-like RNase (۴۸۲) بود که در رقم نورستار افزایش بیان داشت ولی در رقم آذر۲ تغییری برای این پروتئین دیده نشد. گلوتاتیون ترانسفرازها از آنزیم‌های درگیر در مسیرهای مختلف متابولیسم گیاهان می‌باشند که در سیتوسول‌ها به وفور یافت می‌شوند و در هدایت بسیاری از واکنش‌های مهم سلولی نقش دارند. یکی از اعمال مهم گلوتاتیون ترانسفراز سم زدایی ترکیبات سمی حاصل از اکسیژن فعال است که نقش مهمی در کاهش اثرات تنش اکسیداتیو و افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی ایفا می‌نماید (Galle *et al.*, 2005).

پروتئین‌های درگیر در فتوسنتز و متابولیسم کربن:

کلروپلاست به عنوان مهم‌ترین و اصلی‌ترین اندام فتوسنتزی گیاه، یکی از محل‌های عمده تولید ROSها به هنگام تنش هستند. از اینرو، سرما با تاثیر بر ساختار کلروپلاست و کاهش و یا از بین بردن رنگیزه‌های گیاهی از جمله کلروفیل و نیز غیرفعال نمودن تعدادی از آنزیم‌های مهم شرکت‌کننده در فرایند فتوسنتز، دارای اثرات نامطلوب بر این فرایند مهم حیاتی می‌باشد. نتایج حاصل از تحقیق ما نشان می‌دهد اعمال تنش سرما با تأثیر بر افزایش بیان تعدادی از پروتئین‌ها و آنزیم‌های شرکت‌کننده در ساختار کلروپلاست و واکنش‌های نوری و نیز آنزیم‌های مهم چرخه کالوین نقش مهمی در حفظ فرایند فتوسنتز و در نتیجه بقاء گیاه در شرایط تنش سرما بر عهده دارد.

پروتئین‌های شناسایی شده به ۳ زیر گروه تقسیم بندی شدند که گروه ۱ پروتئین‌هایی هستند که در واکنش‌های مرحله نوری فتوسنتز دخیل می‌باشند. پروتئین‌های گروه دوم مربوط به چرخه کالوین می‌باشد و گروه سوم پروتئین‌های تنظیم کننده دستگاه فتوسنتزی است. لکه‌های پروتئینی با عنوان پروتئین Oxygen – evolving enhancer protein1، پروتئین‌های با عنوان Oxygen – evolving enhancer protein2 و پلاستوسیانین پروتئین‌های گروه ۱ می‌باشند که در پایداری فتوسیستم II نقش دارند و جزئی از کمپلکس فتوسیستم II می‌باشند. فتوسیستم II به عنوان یکی از مراکز واکنش نوری فتوسنتز در غشای تیلاکوئید قرار دارد که در فرایند اکسیداسیون آب و آزاد سازی پروتون در چرخه انتقال الکترون و پروتون فرایند فتوسنتز نقش دارد. در تحقیق ما پروتئین‌های مربوط به گروه ۱ به جزء پلاستوسیانین در رقم متحمل نورستار افزایش بیان داشتند در حالی که در رقم آذر۲ پلاستوسیانین تغییرات معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان دادند.

از جمله پروتئین‌های دیگری که در پاسخ به تنش سرما تغییرات معنی‌داری را نشان دادند زیر واحدهای کوچک آنزیم روبیسکو می‌باشند. نتایج ما نشان می‌دهد که تنش سرما تجزیه اجزا یا به عبارتی دستگاه فتوسنتز را در رقم آذر۲ که نسبت به رقم نورستار حساس‌تر می‌باشدُ تشدید کرده است. در تحقیقات مختلفی از بین رفتن جزئی فتوسنتز در تنش‌های غیر زنده مانند تنش سرما و تحت تنش‌های خشکی گزارش شده است. نتایج تحقیقات حاضر اشاره دارد که تغییرات در بیان پروتئین‌های فتوسنتزی در طی سازگاری به سرما اتفاق می‌افتد اما مطالعات بیشتری برای درک تغییرات بالا در سازگاری به سرما در گندم لازم است. تیوردوکسین‌ها (Trx) هم یکی از آنزیم‌های بسیار مهم شرکت‌کننده در اکثر فرایندهای متابولیک سلول‌ها می‌باشند (Balmer *et al.*, 2004). تیوردوکسین‌ها در تعدادی از فرایندهای بیوشیمیایی مانند نقل و انتقال پروتئین و نشاسته در زمان جوانه‌زنی بذور غلات و تنظیم فعالیت آنزیم‌های درگیر در متابولیسم کربوهیدرات‌ها نیز دخالت دارند (Balmer *et al.*, 2004). همچنین این آنزیم‌ها از آنزیم‌های مهم در مسیرهای متابولیک و تنظیمی دیگر همچون چرخه کالوین، متابولیسم انرژی، فتوسنتز، پیچش پروتئین‌ها و سنتز آمینواسیدها محسوب می‌گردند. علاوه بر این، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، تیوردوکسین‌ها باعث محافظت سلول‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو حاصل از تنش‌ها می‌شود و از طریق حذف H_2O_2 و برخی رادیکال‌های آزاد، در فرایند سم‌زدایی این ترکیبات شرکت می‌نمایند.

از نتایج حاصل از تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد که رقم نورستار متحمل به سرما از نظر کمی، تعداد بیشتری از پروتئین‌های القاء شده بر اثر سرما را به مدت طولانی‌تر در مقایسه با رقم نیمه متحمل آذر ۲ بیان می‌کند. در تحقیق حاضر ارتباط نزدیکی بین بیان تحمل به سرما و زمان تکمیل بهاره‌سازی در ارقام متحمل و نیمه متحمل و کاهش میزان تحمل، بعد از تکمیل بهاره‌سازی مشاهده شد. نقش صفات نموی نظیر بهاره‌سازی و تاثیر آن در بیان تحمل به سرما در گزارشات علمی قبلا نشان داده شده است (Mahfoozi *et al.*, 2000; Limin and Fowler, 2006). ولی تحقیق حاضر این ارتباط را بسیار دقیق‌تر و در سطح پروتئین (پروتئوم) به خوبی نشان می‌دهد. نتایج بررسی ما در شرایط کنترل شده نشان داد اگرچه در تعداد و الگوی بیان ژن‌های القاء شده در دمای پایین در دو ژنوتیپ اختلاف وجود دارد ولی به نظر می‌رسد تنظیم کننده‌های عمومی، کنترل بیان این ژن‌ها را در هر دو ژنوتیپ بر عهده دارند.

ب –انتقال از مرحله رویشی به زایشی و تجزیه پروتئوم برگ ارقام گندم بهاره و پاییزه سازگار شده به سرما در دماهای زیر صفر درجه سانتیگراد در شرایط مزرعه:

به منظور بررسی ارتباط بین صفات نموی، صفات فیزیولوژیک و تحمل به سرمای رقم زمستانه و متحمل (نورستار) و رقم بهاره و حساس (پیشتاز) در حین دوره عادت‌دهی، قبل و بعد از تکمیل بهاره‌سازی و اوایل دوره زایشی گیاه آزمایشی تحت شرایط مزرعه‌ای در منطقه سرد زنجان صورت گرفت. بررسی روند تحمل به سرما در تاریخ‌های نمونه‌برداری حاکی از آن بود که با افزایش دوره عادت‌دهی به سرما در شرایط مزرعه میزان تحمل به سرما افزایش می‌یابد به طوری که این روند افزایشی تا ۳۰ آذر ماه ادامه داشت. شیب و روند تحمل به سرما به گونه‌ای بود که گندم زمستانه نورستار و بهاره به طور معنی‌داری متفاوت بود. در اولین تاریخ نمونه‌برداری رقم زمستانه نورستار در توانست تحمل به سرما خود را تا $-۴\ ^{o}C$ افزایش دهند در حالیکه تحمل به سرما در رقم بهاره در مقایسه با شاهد (بدون عادت‌دهی) تغییر معنی‌داری نداشت. چنین تفاوتی در تحمل به سرما در بین ارقام را می‌توان به پایین بودن آستانه دمایی برای تحریک شروع فرایند عادت‌دهی و تفاوت در سرعت آغازین عادت‌دهی به سرما در ارقام زمستانه و تأمین دماهای مطلوب برای شروع این فرایند در منطقه زنجان نسبت داد. پیش‌تر فولر (۲۰۰۸) دریافت که ارقام مقاوم گندم در مقایسه با ارقام حساس به سرما قادرند فرایند عادت‌دهی خود را با دماهای بالاتر آغاز نمایند و دامنه دمایی تحریک کننده سازگاری به سرما در آنها گسترده‌تر می‌باشد.

بررسی اثر متقابل ژنوتیپ و محیط:

تغییرات نموی: ارتباط تغییرات نموی با روند تحمل به سرما در ارقام گندم MV17 و شهریار درمنطقه معتدل سرد (کرج) و منطقه سرد (زنجان) در سال زراعی ۸۹-۸۸ بررسی شدند. بیشترین کاهش در تعداد نهایی برگ رقم MV17 بعد از ۷۹ روز پس از کاشت (۸ دی ماه) در زنجان مشاهده گردید، روند نسبتا مشابهی درکرج مشاهده شد. ادامه نمونه‌برداری‌های در زمان‌های بعدی حاکی از ثبات تعداد نهایی برگ در هر دو منطقه بود که این بدان نکته اشاره دارد که احتمالاً مابین ۷۹ تا ۱۰۰ روز پس از کاشت (۸ دی تا ۴ بهمن) زمان تکمیل نیاز بهاره‌سازی می‌باشد. تکمیل بهاره‌سازی رقم شهریار زودتر از رقم MV17 و در هر دو منطقه حدود ۵۸ روز پس از کاشت (۲۱ آذر ماه) بود، ولی تعداد کاهش برگ نیز در اقلیم سرد زنجان بیشتر از اقلیم معتدل سرد کرج بود. تغییرات نموی ارقام MV17 و شهریار در سال ۱۳۸۸ نشان داد که نمو فنولوژیکی ارقام تحت تاثیر شرایط اقلیمی سرد و یا معتدل سرد قرار گرفت. هر دورقم MV17 و شهریار پس از ۷۵ روز پس از کاشت به ترتیب با تولید ۴/۳ و ۵/۳ برگ در روی ساقه اصلی در مرحله فیزیکی رشد رویشی بودند. در ۲۳ دی ماه (۹۰ روز پس از کاشت) در زنجان، ارقام MV17 و شهریار به ترتیب در مرحله ۵ و ۶ برگی ولی در کرج رقم MV17 در مرحله ۶ برگی و رقم شهریار با ۶/۵ برگ در شروع مرحله برجستگی دو گانه قرار داشت. حدود ۱۰۱ روز پس از کاشت در زنجان ارقام MV17 و شهریار با تولید به ترتیب ۵/۵ و ۶/۵ برگ درانتهای مرحله رویشی ولی در کرج رقم MV17 با تعداد ۶/۳ برگ روی ساقه اصلی در مرحله طویل شدن مریستم انتهایی و رقم شهریار با ۷/۳ برگ در مرحله تشکیل برجستگی دو گانه بود. در ۴ اسفند ماه (۱۳۱ روز پس از کاشت) در زنجان، رقم MV17 با ۶ برگ در مرحله شروع

برجستگی دوگانه و در کرج در مرحله تکمیل برجستگی دو گانه بود. در همان زمان رقم شهریار در زنجان با ۷/۵ برگ در مرحله برجستگی دو گانه و در کرج در مرحله تشکیل آغازین گلوم بود. در نمونه‌های ۴ اسفند ماه که مدت ده روز در گلخانه نگهداری شده بودند رقم MV17 از زنجان و کرج به ترتیب در مرحله برجستگی دو گانه و تشکیل سنبلچه انتهایی ولی رقم شهریار جمع آوری شده از زنجان و کرج به ترتیب در مراحل آغازین گلوم- لما و در مرحله پیشرفته نمو مریستم انتهایی قرار داشتند. تشکیل برجستگی‌های دوگانه یکی از روش‌های تعیین مراحل نمو و انتقال به مرحله زایشی ارقام مختلف غلات است چرا که در این مرحله با وجودی‌که ظاهرا گیاه درمرحله رویشی می‌باشد ولی پیام‌های مورد نیاز برای شروع رشد زایشی دریافت شده‌اند (Danyluk *et al.*, 2003). تغییر مراحل نموی ارقام در شرایط اقلیم معتدل سرد بیشتر از اقلیم سرد بود. در عوض دمای پایین در اقلیم سرد باعث تاخیر در انتقال از مرحله رویشی به زایشی و تاخیر در نمو شد و این تاخیر به نظر می‌رسد باعث شد که تحمل رقم پاییزه در اقلیم سرد افزایش یابد.

روند تحمل به سرما:

رقم پاییزه MV17 بعد از قرارگرفتن در دمای سرد شروع به عادت به سرما کرد. منحنی روند تحمل به سرما ابتدا با شیبی تند شروع و سپس این شیب کندتر شد تا اینکه در تقریبا در محدوده تکمیل بهاره‌سازی به حداکثر مقدار خود رسید. حداکثر تحمل ارقام MV17 و شهریار در زنجان به ترتیب LT_{50}= -19ºC و LT_{50}= -16ºC و در کرج حداکثر میزان تحمل به ترتیب LT_{50}= -12ºC و LT_{50}= -8ºC بودند. دمای پایین در زنجان باعث تاخیر در چرخه نموی ارقام در زنجان شد و مدت زمان بیان و میزان تحمل به سرما درهر دو رقم در اقلیم سرد، بیشتر از تحمل ارقام رشد یافته در اقلیم معتدل سرد بود که بیانگر اثر متقابل دما و نمو گیاه بر تحمل به سرما می‌باشد. ارقام گندم مورد بررسی، حداکثر تحمل خود را در شرایط مزرعه در زمان تکمیل بهاره‌سازی بدست آوردند. از این نتایج چنین استنباط می‌شود محیطی که گیاه در آن عادت‌دهی به سرما می‌کند و صفات نموی نظیر نیاز بهاره‌سازی و تغییرات فنولوژیکی بر میزان و روند تحمل به سرما تاثیر دارند.

ت- آنالیز متابولیت‌های مرتبط با تحمل به سرما در ژنوتیپ‌های دارای صفات نموی متفاوت

در این پژوهش ابتدا پاسخ تیمارهای خوگیری به سرما با طول دوره‌های متفاوت سرمادهی در ارقام گندم نان که واجد نیازهای متفاوت بهاره‌سازی (از زمستانه تا بهاره) بودند در مزرعه و نیز شرایط محیط تحت کنترل در دوره‌های متفاوت سرمادهی، مورد بررسی قرار گرفت تا در راستای تحمل به سرما، به تشخیص رابطه نیاز بهاره‌سازی با روند نمو گیاه، تجمع برخی ترکیبات بیوشیمیایی محافظ گیاه در برابر سرما و ارزیابی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک مرتبط با این فرایند پرداخته شود.

روند تغییرات محتوای قند:

توان خوگیری ارقام مورد ارزیابی طی دوره سرمادهی و آنگاه روند تحلیل رفتن این توانایی، با مراحل نموی گیاهان از همبستگی قابل ملاحظه‌ای برخوردار بود، به‌طوری‌که دماهای پایین موجب ارتقای مقاومت به سرما در ارقام بینابین و زمستانه گردید. تغییرات قند در مزرعه در ارقام زمستانه و بینابین محتوای قند کل در هر دو بافت برگ و طوقه طی فصل پاییز رو به افزایش نهاد به طوری که بیشترین میزان ثبت شده در ارقام الوند و شهریار برای هر یک از بافت‌های طوقه و برگ در اواخر پاییز و اوایل زمستان رقم خورد، اما این روند تزایدی برای رقم زمستانه نورستار تا نیمه زمستان در خصوص بافت طوقه تداوم یافت. در رقم بهاره کویر، تغییری معنی‌دار در محتوای قند طوقه ملاحظه نگردید اما در بافت برگ، روند تغییر تا اواخر پاییز و اوایل زمستان افزایشی بود و پس از آن تنزل یافت. در شرایط محیط کنترل شده، روند تغییرات محتوای قند در هر دو بافت مشابه بود. با افزایش مدت‌زمان استقرار در اتاق سرد، محتوای قند طوقه در همه ارقام افزایش یافت، در رقم بهاره کویر بیشترین سطوح تجمع قند پس از ۱۴ روز استقرار در اتاق رشد سرد و برای دیگر ارقام این وضعیت پس از ۲۱ روز اتفاق افتاد. بیشترین سطوح میزان قند در بافت برگ پس از استقرار به مدت ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۲۸ روز استقرار در اتاق سرد، به‌ترتیب در ارقام کویر، الوند، شهریار و نورستار ثبت گردید.

تغییرات در محتوای قند همسو با روند تحمل به سرما در شرایط مزرعه بود. در رقم بهاره کویر میزان گلوکز طی فصل پاییز تغییری نیافت اما بتدریج در فصل زمستان رو به افزایش نهاد. میزان فروکتوز در طول فصل پاییز از روندی مشابه با گلوکز تبعیت نمود. اما در فصل پاییز با تغییراتی مواجه بود. تجمع ساکارز در فصل پاییز رو به کاستی نهاد اما به میزان قابل ملاحظه‌ای در فصل زمستان بر سطوح آن افزوده شد. میزان فروکتان در طول پاییز تغییر چندانی نیافت اما با پیشرفت فصل زمستان در حد معنی‌داری از میزان آن کاسته شد. در رقم الوند با نیاز کوتاه‌مدت بهاره‌سازی محتوای گلوکز در فصل پاییز تغییری نیافت، به‌طوری‌که این ثبات وضعیت تا نیمه‌های زمستان نیز تداوم یافت اما پس از آن با روندی افزایشی مواجه شد. محتوای فروکتوز در حد معنی‌داری در فصل پاییز افزایش یافت آنگاه با شروع زمستان به تدریج کاهش یافت و این کاهش به صورتی معنی‌دار در نیمه زمستان تظاهر یافت. محتوای ساکارز در فصل پاییز از تغییری قابل ملاحظه برخوردار نبود اما در طول زمستان به تدریج روندی افزایشی را دنبال کرد. فروکتان نیز طی پاییز به میزانی معنی‌دار افزایش یافت ولی در زمستان به‌تدریج با روندی کاهشی روبرو شد.

در رقم شهریار با نیاز بهاره‌سازی متوسط از سطوح گلوکز در پاییز کاسته شد اما در زمستان رو به فزونی نهاد، محتوای فروکتوز در پاییز افزایش یافت که این روند افزایشی تا نیمه زمستان تداوم یافته وسپس رو به افول نهاد. تغییر محتوای ساکارز در پاییز چندان معنی‌دار نبود اما در زمستان افزایش یافت و محتوای قند فروکتان طی پاییز تا نیمه زمستان از روندی افزایشی برخوردار بود و آنگاه رو به کاهش نهاد. در رقم نورستار محتوای گلوکز در پاییز با روندی رو به نقصان و معنی‌دار توأم بود، این کاهش تا نیمه زمستان تداوم یافت آنگاه شروع به رشد نمود. تغییرات محتوای فروکتوز طی پاییز تا نیمه زمستان از روندی افزایشی برخوردار بود سپس با کاهشی ناگهانی مواجه گشت. محتوای ساکارز در طول پاییز تغییر معنی‌داری نداشت اما با شروع زمستان افزایش یافت که این روند افزایشی تا نیمه‌های زمستان تداوم یافت، درخصوص فروکتان مقدار آن در طول پاییز به‌سرعت افزایش یافت که این روند سریع افزایشی تا نیمه‌های زمستان ادامه یافت سپس نزول مقادیر آن آغاز گردید.

در شرایط کنترل‌شده با توسعه دوره استقرار بوته‌های رقم بهاره کویر در اتاق سرد میزان گلوکز با روندی کاهشی مواجه گردید، سطوح فروکتوز ابتدا با کاهش مواجه شد سپس بدون تغییر باقی ماند، میزان ساکارز از روندی نزولی مشابه با گلوکز پیروی کرد و محتوای فروکتان تا ۱۴ روز استقرار در اتاق سرد از رشدی نسبی برخوردار بود و آنگاه تا پایان دوره نسبتاً بدون تغییر ماند. در رقم بینابین الوند با تداوم دوره سرمادهی میزان گلوکز تا ۱۴ روز استقرار در اتاق سرد (۱±۳ درجه سانتی‌گراد) کاهش یافت سپس بدون تغییر باقی ماند، سطوح فروکتوز نیز طی دو هفته نخست استقرار در اتاق سرد از روندی کاهشی برخوردار بود و آنگاه با افزایشی جزئی مواجه گردید و در ادامه بدون تغییر باقی ماند. محتوی ساکارز نیز طی دو هفته نخست از روندی کاهشی برخوردار بود و سپس بدون تغییر ماند. روند افزایش در میزان فروکتان تا سه هفته تیمار سرمادهی تداوم یافت و پس از آن بدون تغییر باقی ماند. در رقم شهریار طی دو هفته نخست استقرار در اتاق سرد محتوای گلوکز کاهش یافت آنگاه بدون تغییری معنی‌دار نسبتاً ثابت ماند. از میزان فروکتوز طی دو هفته نخست استقرار در اتاق سرد کاسته شد تا هفته سوم تقریباً ثابت ماند، آن‌گاه مجدداً روند کاهشی آن آغاز گردید. محتوای ساکارز نیز طی دو هفته نخست دچار کاهش شد آنگاه با اندکی افزایش مواجه شد و پس از آن نسبتاً بدون تغییر باقی ماند. محتوای فروکتان طی چهار هفته نخست استقرار بوته‌ها در اتاق سرد به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. در رقم نورستار میزان گلوکز طی دو هفته نخست نقصان یافت سپس تا هفته سوم با افزایشی ناچیز مواجه گردید و آن‌گاه ثابت ماند. کاهشی ناگهانی در سطوح فروکتوز طی دو هفته نخست استقرار در اتاق سرد مشاهده شد، متعاقب آن کاهشی جزئی در آن به وقوع پیوست و سپس بدون تغییر باقی ماند. میزان ساکارز در دو هفته آغازین اعمال تیمار سرما به سرعت کاهش یافت آنگاه تا هفته سوم با افزایش مواجه بود و پس از آن بدون تغییر ماند. محتوای قند فروکتان از روندی تزایدی برخوردار بود که این روند از هفته سوم به بعد از شتابی چشمگیر برخوردار گشت.

روند تحمل به سرما:

در مزرعه تغییرات حاصل در میزان تحمل رقم بهاره کویر چندان قابل ملاحظه نبود، به‌طوری‌که شاخص LT_{50} در این رقم طی پاییز رو به تنزل تدریجی اما نه چندان معنی‌دار نهاد، آن‌گاه پس از افزایشی جزئی، این شاخص طی نیمه دوم پاییز تا اواخر زمستان تقریباً ثابت ماند. در رقم بینابین الوند و نیز در ارقام زمستانه شهریار (با نیاز بهره سازی متوسط) و نورستار (با نیاز بهاره‌سازی طولانی) این شاخص در پاییز رو به افول نهاد که به مثابه افزایش میزان تحمل می‌باشد، به‌نحوی‌که در انتهای پاییز به کمترین مقدار خود رسید اما در طول زمستان با روندی تدریجی رو به فزونی نهاد، در مجموع پایین‌ترین حد شاخص LT_{50} در ارقام نورستار، شهریار، الوند و کویر به ترتیب ۱۸/۷-، ۹/۳-، ۶/۷- و ۳/۷- درجه سانتیگراد به ترتیب بین ۲۳-۱۶ دسامبر، ۱۶-۵ دسامبر و ۱۶-۵ دسامبر به ثبت رسید که تقریباً مصادف با محدوده‌های تکمیل بهاره‌سازی این ارقام بود. در محیط کنترل شده نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد، وضعیت شاخص LT_{50} برای رقم بهاره کویر بدون تغییر معنی‌دار قریب به ۲- درجه سانتیگراد طی دوره تیمارهای انطباق با سرما در اتاق سرد باقی ماند، اما در ارقام دیگر این شاخص از روز دوم استقرار در اتاق سرد رو به افول نهاد (افزایش میزان تحمل) به‌طوری‌که مقادیر ۱۸/۳-، ۸/۳- و ۶/۳- درجه سانتیگراد برای ارقام نورستار، شهریار و الوند به ترتیب در ۵۶، ۲۸ و ۲۸ روز اعمال تیمار بهاره‌سازی به ثبت رسید. نقش بهاره‌سازی در کنترل انباشت قندها در این پژوهش به‌خوبی نمود یافت، به‌گونه‌ای‌که روند انباشت فروکتان در طوقه ارقام، هماهنگ با روند تکمیل بهاره‌سازی و افزایش تحمل به سرما بود و با توسعه نیاز بهاره‌سازی و افزایش تحمل انجماد، میزان انباشت فروکتان نیز افزایش یافت. با توجه به طول دوره بهاره‌سازی بیشترین انباشت در رقم نورستار محقق گردید که قریب به چهار برابر بیش از میزان تجمع آن در اوج انباشت این قند در رقم کویر بود. این موضوع از همبستگی بالای انباشت این ترکیب با بیان مقاومت به سرما و تحمل به سرما در ارقام حکایت دارد. وضعیت انباشت و تحلیل در محتوای قند فروکتوز نیز بیان‌گر وضعیتی مشابه با قند فروکتان در شرایط مزرعه بود. انباشت ساکارز در مزرعه در ارقام زمستانه و بینابین همسو با تکمیل نیاز بهاره‌سازی افزایش یافت که در رقم زمستانه نورستار این وضعیت پس از تکمیل نیاز بهاره‌سازی رو به افول نهاد اما در ارقام شهریار و الوند با شروع مرحله زایشی، این قند رو به فزونی نهاد. در همه ارقام گلوکز پس از تکمیل نیاز بهاره‌سازی در مزرعه از روندی صعودی تبعیت نمود. ساساکی و همکاران (۱۹۹۶) گزارش دادند که با اعمال تیمار سرما طی سه روز، بر میزان ساکارز، فروکتوز و گلوکز به ترتیب دو، سه و شش برابر افزوده می‌شود، با گذشت یک هفته از اعمال تیمار سرما، میزان گلوکز و فروکتوز به سطح پایداری می‌رسد و با تداوم اعمال تیمار از روز دهم میزان ساکارز رو به کاستی می‌نهد. در پژوهش ایشان، به وجود همبستگی مثبت و معنی‌داری بین میزان کل کربوهیدرات‌ها مشتمل بر گلوکز، فروکتوز و ساکارز با درجه تحمل به انجماد اشاره شده‌است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ارقام حساس و متحمل به سرما ترکیبات محافظت کننده مشابهی طی دوره خوگیری به سرما در بافت‌های خود انباشت می‌کنند و تفاوت این دو گروه در این زمینه به میزان و مدت زمان انباشت این ترکیبات باز می‌گردد به طوری‌که شدت و مدت زمان انباشت این ترکیبات در ارقام متحمل به دلیل تأثیر دوره‌های متفاوت نیاز بهاره‌سازی طولانی‌تر است. نتایج این پژوهش در تأیید فرضیه‌ای است که اذعان می‌دارد بهاره‌سازی و راه‌های خوگیری به سرما دو فرایند همبسته و همسو در غلات هستند و تأخیر در نمو زایشی تا سرآغاز بهار رویدادی حیاتی است که زمینه انطباق مناسب با دمای پایین را طی فصل سرما برای این گروه از گیاهان فراهم می‌آورد.

ارزیابی تغییرات محتوای پرولین

با انجام مقایسه میانگین محتوای پرولین ارقام در شرایط مزرعه محرز گردیدرقم نورستار با ۱۲/۶ مایکرومول در گرم برگ تازه از بیشترین میزان محتوای پرولین بهره می‌برد آنگاه رقم شهریار با ۱۰ مایکرومول در گرم برگ تازه در جایگاه دوم قرار داشت، الوند با هشت مایکرومول در گرم برگ تازه در مرتبه بعدی مستقر بود و کویر با ۵/۶ مایکرومول در گرم برگ تازه از جایگاه آخر برخوردار بود. مقایسه میانگین روند تغییرات محتوای پرولین ارقام در شرایط مزرعه نیز حکایت از برتری محتوای پرولین به ترتیب در ارقام زمستانه، بینابین و بهاره داشت. روند تغییرات محتوای پرولین در تمامی ارقام در

طول پاییز و زمستان از رویه‌ای مشابه تبعیت نمود به‌طوری‌که بیشترین میزان تجمع پرولین در کلیه ارقام در ماه نخست زمستان محقق گردید که به ترتیب معادل ۳۶، ۲۶/۵، ۲۲ و ۱۴/۷ مایکرومول در گرم برگ تازه در ارقام نورستار، شهریار، الوند و کویر بود. مقایسه میانگین محتوای پرولین ارقام به روش دانکن در دو شرایط محیط کنترل‌شده نرمال و اتاق سرد از وجود تفاوتی بسیار معنی‌دار در بین دو محیط حکایت داشت به‌طوری‌که میانگین تجمع پرولین ارقام در شرایط اتاق سرد حدود شش برابر بیشتر از متوسط آن در شرایط نرمال بود. مقایسه میانگین محتوای پرولین تجمع یافته در ارقام به روش دانکن در شرایط اتاق سرد از وجود وضعیتی مشابه با شرایط مزرعه حکایت داشت به‌طوری‌که وجود تفاوت معنی‌دار بین همگی ارقام خودنمایی می‌کرد و جایگاه ارقام از مرتبه برتر به بدتر به ترتیب عبارت بود از نورستار، شهریار، الوند و کویر درحالی‌که در شرایط نرمال همه ارقام از وضعیتی مشابه بهره می‌بردند. روند تغییرات تجمع پرولین در ارقام در شرایط اتاق سرد با شروع اعمال تیمار خوگیری از وضعیتی صعودی برخوردار بود به‌طوری‌که این روند افزایشی در ارقام زمستانه و بینابین تا سه هفته و در رقم بهاره تا دو هفته اعمال تیمار خوگیری تداوم داشت به‌طوری‌که بیشینه تجمع پرولین در ارقام نورستار، شهریار، الوند و کویر به ترتیب معادل ۲۱، ۱۵، ۱۰ و ۷ مایکرومول در گرم برگ تازه بود و آنگاه از رویه‌ای نزولی تبعیت نمود.

ارزیابی تغییرات تجمع پراکسیدهیدروژن:

ارزیابی وضعیت تجمع پراکسیدهیدروژن ارقام در شرایط مزرعه نشان از فزونی مقادیر آن به ترتیب در ارقام بهاره و بینابین بود به‌طوری‌که با بررسی مقایسه میانگین ارقام در شرایط مزرعه، بیشترین میزان تجمع پراکسیدهیدروژن در رقم بهاره کویر (۴۰/۴ مایکرومول در گرم برگ تازه) از بیشترین میزان برخوردار بود و آنگاه در مرتبه بعدی رقم بینابین الوند (۳۱/۶ مایکرومول در گرم برگ تازه) قرار داشت و ارقام زمستانه شهریار و نورستار به ترتیب با مقادیر ۲۳/۶ و ۱۶/۶ مایکرومول در گرم برگ تازه در رتبه‌های بعد قرار گرفتند. روند تغییرات محتوای پراکسیدهیدروژن در شرایط مزرعه از وضعیتی نسبتاً مشابه برخوردار بود، هرچند که در طول پاییز و زمستان وجود تفاوت معنی‌دار بین ارقام تداوم داشت با روند تجمعی در تمامی ارقام طی پاییز رویه‌ای فزونی را دنبال کرد به‌طوری‌که در اوایل زمستان به بیشترین میزان خود رسید، بیشترین میزان تجمع پراکسیدهیدروژن در رقم بهاره کویر در اوایل زمستان (۵۳/۷ مایکرومول در گرم برگ تازه) رقم خورد و در همین موعد زمانی ارقام الوند، شهریار و نورستار به ترتیب با مقادیر ۳۹، ۲۹ و ۲۲ مایکرومول در گرم برگ تازه در مرتبه‌های بعدی قرار داشتند. با گسترش زمستان از مقادیر پراکسیدهیدروژن تجمعی در برگ ارقام نیز کاسته شد. در شرایط محیط کنترل شده تفاوتی ناچیز اما معنی‌دار بین میانگین محتوای پراکسیدهیدروژن ارقام در شرایط نرمال و اتاق سرد وجود داشت (۸/۹ مایکرومول در گرم برگ تازه در شرایط اتاق سرد در مقایسه با ۷/۸ مایکرومول در گرم برگ تازه در شرایط نرمال). در شرایط اتاق سرد، مقایسه میانگین تجمع پراکسیدهیدروژن به روش دانکن در ارقام از وجود تفاوت معنی‌دار بین ارقام بهاره، بینابین و زمستانه حکایت داشت، بیشترین میزان تجمع مربوط به رقم کویر (۱۴/۲ مایکرومول در گرم برگ تازه) بود در مرتبه بعد رقم الوند (۸/۹ مایکرومول در گرم برگ تازه) قرار داشت بین محتوای پراکسیدهیدروژن ارقام زمستانه نورستار و شهریار تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. روند تغییرات میزان پراکسیدهیدروژن تجمعی در برگ ارقام متأثر از تیمار خوگیری به سرما در اتاق سرد حکایت از وجود روندی فزاینده تزایدی در رقم بهاره کویر طی دو هفته نخست اعمال تیمار بود و و پس از آن از شرایط نسبتاً پایدار برخوردار بود، در خصوص رقم بینابین الوند طی دو روز نخست اعمال تیمار، این روند از وضعیتی صعودی برخوردار بود و آنگاه کم و بیش ثابت ماند. در رقم شهریار نیز ابتدا طی دو روز نخست با کمی افزایش مواجه شد آنگاه از ثباتی نسبی تا سه هفته اعمال تیمار خوگیری به سرما برخوردار بود و سپس رو به افول نهاد. محتوای پراکسید هیدروژن طی دو هفته تحت اعمال تیمار سرما بر رقم زمستانه نورستار نسبتاً ثابت بود سپس از هفته دوم رو به افول نهاد.

ارزیابی تغییرات تجمع مالون‌دی‌آلدهاید:
مقایسه میانگین محتوای مالون‌دی‌آلدهاید تجمع یافته در ارقام در شرایط مزرعه طی پاییز و زمستان گویای آن بود که تجمع مالون‌دی‌آلدهاید در رقم بهاره دو برابر بیشتر از رقم بینابین و حدود ۷-۴ برابر بیشتر از ارقام زمستانه بود. بیشترین میزان تجمع در رقم بهاره کویر (۳۷/۵ نانومول در گرم برگ تازه) در رقم بعدی رقم الوند با ۱۹/۸ نانومول در گرم برگ تازه قرار داشت، ارقام شهریار و نورستار نیز به ترتیب با ۱۰ و ۵ نانومول در گرم برگ تازه در مرتبه‌های بعدی قرار داشتند. روند تغییرات محتوای مالون‌دی‌آلدهاید طی فصل‌های پاییز و زمستان در رقم زمستانه نورستار در کمترین میزان قرار داشت و از رویه‌ای نسبتاً ثابت برخوردار بود، رقم شهریار نیز کم و بیش از وضعیتی مشابه با نورستار در این مدت پیروی نمود، در رقم بینابین الوند روندی افزایشی نه چندان شدید اما قابل ملاحظه تا اوایل زمستان ملاحظه گردید و آنگاه به تدریج این تجمع روند رو به کاهشی نشان داد اما در رقم بهاره کویر این روند طی پاییز تا اوایل زمستان از رویه‌ای صعودی با سرعت فزاینده برخوردار بود و آنگاه رو به افول نهاد. مقایسه میانگین مقادیر تجمع ماون‌دی‌آلدهاید به روش دانکن در دو محیط نرمال و اتاق سرد از وجود تفاوتی نه چندان زیاد اما معنی‌دار بین دو محیط حکایت داشت به طوری‌که متوسط مقادیر در اتاق سرد (۲/۲ نانومول در گرم برگ تازه) در جایگاه برتر و این محتوی در شرایط نرمال (۱/۳ نانومول در گرم برگ تازه) در مرتبه پایین‌تر قرار داشت.

بررسی بیان ژن‌های بهاره‌سازی:
پاسخ فیزیولولوژیک و مولکولی بهاره‌سازی در بذرهای جو (*Hordeum vulgare* L.) و گندم (*Triticum aestivum* L.) در دو فاز، طی آزمایشی دیگر مورد بررسی قرار گرفت، به طوری‌که از یک سو بذرهای مرطوب به منظور بهاره‌سازی، در محیطی تاریک در معرض سرما قرار گرفتند و از دیگر سوی تسریع نمو و ورود به فاز زایشی به عنوان فرایندی متأخر نسبت به بهاره‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان ژن *VERNALIZATION1* (*HvVRN1*) در مریستم انتهایی و برگ‌های در حال رشد به‌تدریج طی دوره تکمیل بهاره‌سازی در گیاهچه‌ها افزایش یافت. این افزایش بیان ژن در شرایط تاریک و مستقل از بیان ژن *VERNALIZATION2*(*HvVRN2*) صورت گرفت که همسو با فرضیه افزایش بیان ژن *HvVRN1* در تداوم سرما و مستقل از مسیرهای پاسخ گلدهی به طول روز بود. بیان ژن *HvVRN1* پس از دوره تکمیل بهاره‌سازی نیز در مریستم انتهایی ساقه و برگ‌ها همچنان تداوم یافت که این امر با تسریع القای گل‌دهی و کاهش بیان ژن *HvVRN2* در برگ‌ها همراه بود. افزایش سطح بیان ژن *HvVRN1* در گیاهان بهاره‌سازی‌شده با طول دوره بهاره‌سازی بذرها همبستگی داشت. طول روز تأثیری بر سطح بیان ژن *HvVRN1* در مریستم انتهایی و همچنین در برگ‌ها نداشت، بااینحال در برگ گیاهانی که تیمار اشباع بهاره‌سازی بر بذرشان اعمال شده بود بیان ژن *HvVRN1* در طول روزهای بلند افزون‌تر بود. ژن *HvFT1* در طول روز بلند تنها در برگ گیاهان بیان گردید که ممکن است این امر مرتبط با افزایش بیان ژن *HvVRN1* باشد. افزایش بیان ناشی از روزهای بلند در ژن *HvVRN1* ضرورتی جهت القای فاز زایشی در گیاهان نداشت هر چند که ممکن است به عنوان عاملی تاثیرگذار در مراحل نموی متأخر در فاز زایشی موثر باشد (Sasani *et al.*, 2009). این پژوهش در همین راستا به پاسخی مشابه در مورد گندم نان (*Triticum aestivum* L.) نیز دست یافت. به طور کلی نتایج این پژوهش در تأیید فرضیه‌ایست که بیان می‌دارد القای بیان ژن *VRN1* در سرمای زمستان، منجر به گلدهی غلات نیازمند به بهاره‌سازی در فصل بهار می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی:
تحمل به سرما در گندم روند تجمعی است که حداکثر مقدار آن در زمان انتقال از مرحله رویشی به زایشی حاصل می‌شود و بعد از آغاز مرحله زایشی تحمل گیاه کاهش می‌یابد، بنابر این شناسایی عوامل موثر در کنترل مرحله رویشی به زایشی مهم است. تحقیقات انجام شده در این مقاله پیچیدگی اثرات متقابل ژنوتیپ، محیط و مرحله نموی گندم، مسیرهای متابولیک و پروسه‌های ملکولی سازگاری به سرما را مورد تاکید قرار می‌دهد. شناسایی پروتئین‌های مرتبط با سرعت آغازین عادت‌دهی به سرما که با شیب تند در رقم بسیار متحمل در مقایسه با ارقام حساس بیان می‌شوند و نیز شناسایی پروتئین‌هایی که در مرحله زایشی بیان میشوند

کمک میکنند تا به شناسایی ژن‌های درگیر در تحمل به سرما دست یابیم. یافته‌های ما بیانگر آن است که مدت زمان بیان پروتئین‌های سرما القایی در ژنوتیپهای زمستانه با ژن‌های نموی نظیر بهاره‌سازی و دیگر ژن‌های موثر در انتقال از مرحله رویشی به زایشی کنترل می‌شوند.

گروه پروتئین‌های عمده شناسایی شده در تحقیقات ما پروتئین‌های سرما القایی، ضد یخ، آنتی اکسیدان‌های دفاعی، فتوسنتز، متابولیسم، پروتئین‌های موثر در رونویسی و انتقال و حمل یونی بودند. شایان ذکر است که در مراحل اولیه عادت‌دهی به سرما در شرایط مزرعه در هر دو اقلیم سرد و معتدل سرد تعدادی از پروتئین‌ها از جمله پروتئین‌های putative AP2 domain transcription factor، Cytochrome P450-like و glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase تغییرات افزایشی محسوسی را نشان دادند و در زمان تکمیل بهاره‌سازی که گیاهان در مزرعه به حداکثر میزان تحمل به سرما رسیدند افزایش بیان چاپرون‌های شوک حرارتی و زیر واحد بتا آنزیم روبیسکو که نقش آنها پیش تر در تنش‌های محیطی نمایان شدهٔ بیشتر بود. با انتقال از مرحله رویشی به زایشی بیان تعداد زیادی از پروتئین‌ها از جمله transporter، cell-autonomous heat shock cognate protein 70، CDK activating kinase و ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activase کاهش نشان دادند.

سطح بیان و نیز تعداد پروتئین‌های بیان شده درگیاهان رشد یافته در شرایط مزرعه که دوره‌های عادت‌دهی به سرما دردماهای زیر صفر را تجربه میکنند نسبت به گیاهان عادت یافته به سرما در دمای پایین ولی بالای صفر (شرایط کنترل شده) بسیار بیشتر بوده و از مقاومت بالایی بر خوردار هستند. با توجه به دستاوردهای این تحقیق می‌توان چنین استنباط نمود که صفات نموی از طریق تأثیر بر طول دوره رویش، مدت زمان بیان تحمل به سرما، انباشت اسمولیت‌ها و متابولیت‌های محافظُ گیاه در برابر سرما را تحت تأثیر قرار داده و زمینه افزایش تحمل در برابر سرما را در گیاه فراهم می‌آورند. محدوده تکمیل نیاز بهاره‌سازی به عنوان نقطه عطفی در بیان تحمل به سرما، و انباشت متابولیت‌های حفاظت‌کننده گیاه در برابر سرما مطرح است که پس از این محدوده کاهشی قابل ملاحظه در بیان تحمل به سرمای رقم می‌خورد. سطح انباشت متابولیت‌های بیوشیمیایی محافظت کننده گیاه نیز در برابر تنش در شرایط مزرعه بیشتر از شرایط کنترل شده بود که نقش دماهای عادت‌دهی به زیر صفر را در افزایش تحمل نشان می‌دهند.

منابع

Al-Hakimi, A., Monneveux, P. and Galiba, G. 1995. Soluble sugars, proline and relative water content (RWC) as traits for improving drought tolerance and divergent selection for RWC from *T. polonicum* into *T. durum*. Journal of Genetics and Breeding, 49: 237–244.

Brule-Babel, A.L. and Fowler, D.B. 1988. Genetic control of cold hardiness and vernalization requirement in winter wheat. Crop Science, 28: 879-884.

Balmer, Y., W. H. Vensel, C. K., Tanaka, W. J., Hukman, Gelhaye, E., Rouhier, J. P., Jacquot, W., Manieri, P., Schurmann, M., Droux, and Buchanan, B. B. 2004. Thioredoxin linksredox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. Proceeding of National Academic Science USA. 101: 2642-2647.

Crosatti, C., Soncini, C., Stanca, A. M., Cattivelli, L. 1995. The accumulation of a cold-regulated chloroplastic protein is light-dependent. Planta, 196: 458–463.

Danyluk, J., Kane, N.A., Breton, G., Limin, A.E., Fowler D.B. and Sarhan. F. 2003. *Tav RT-1* a ductative transcription factor associated with vegetative reproductiv transition in cereals. Plant Physiology, 132 : 1849 – 1860.

Dhillon, T., Pearce, S. P., Stockinger, E. J., Distelfeld, A., Li, C., Knox, A. K., Vashegyi, I., Vagujfalvi, A., Galiba, G., Dubcovsky, J. 2010. Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: The VRN-1 connection. Plant Physiology, 153: 1846–1858.

Fowler, D. B. and A. E. Limin. 2004. Interactions among factors regulating phenological development and acclimation rate determine low-temperature tolerance in wheat. Annals of Botany, 94: 717 - 724.

Fowler, D. B., Limin, A. E. and Ritchie. J. T. 1999. Low-temperature tolerance in cereals: model and genetic interpretation. Crop Science. 39:626-633.

Fowler, D. B., A. E. Limin, S. Y. Wang, and R. W. Ward. 1996. Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. Canadian Journal of Plant Science. 76:37-42.

Fowler, S., and M.F. Thomashow. 2002. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in additionto the CBF cold response pathway. Plant Cell. 14: 1675–1690.

Galle, A., Csiszár, J., Secenji, M., Tari, I., Györgyey, J. and Dudits. D.2005. Changes of glutathione S-transferase activities and gene expression in Triticum aestivum during polyethylene-glycol induced osmotic stress. Acta Biologica Szegediensis. 49: 95-96.

Gazanchian, A., Hajheidari, M., Sima, N. K., Salekdeh, G. H. 2007. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. Journal of Experimental Botany. 58*:* 291–300.

Galiba, G., Kerepesi, I., Snape, J.W. and Sutka, J. 1997. Location of a gene regulating cold-induced carbohydrate production on chromosome 5 of wheat. Theoretical Applied Genetics. 95: 265-270.

Galiba, G., Quarrie, S. A., Sutka, J., Morgounov, A. and Snape. J. W. 1995. RFLP mapping of the vernalization (Vrn1) and frost resistance (Fr1) genes on chromosome 5A of wheat. Theoretical Applied Genetics. 90:1174-1179.

Hay, R. K. M. and Ellis, R. P. 1998. The control of flowering in wheat and barley: what recent advances in molecular genetics can reveal. Annals of Botany. 82:541-554.

Gusta, L.V., Trischuk, R., and Weiser, C.J. 2005. Plant cold acclimation: The role of abscisic acid. Journal of Plant Growth Regulator, 24:308–318

Herman, E.M., Rotter, K., Premakumar, R., Elwinger, G., Bae, R., Ehler-King, L., Chen, S., and Livingston, D. P. 2006. Additional freeze hardiness in wheat acquired by exposure to -3 °C is associated with extensive physiological, morphological, and molecular changes. Journal of Experimental Botany, 57: 3601–3618.

Jahanbakhsh-Godehkahriz, S., Karimzadeh, G., Rastgar-Jazii, F., Mahfoozi, S. and Hosseini-Salekdeh, G. 2009. Influence of vernalization on some physiological characteristics and cold tolerance in two susceptible and tolerant cultivars of bread wheat. Electronic Journal of Crop Production, 2: 85-106.

Houde, M., Dhindsa, S. and Sarhan. F. 1992. A molecular marker to select for freezing tolerance in Gramineae. Molecular Genomics and Genetics. 234:43-48.

Limin A.E. and Fowler. D.B. 2006. Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): responses to photoperiod, vernalization and plant development. Planta. 224: 360-366.

Mahfoozi, S., Limin, A.E., Ahakpaz, F. and Fowler. D.B. 2006. Phenological development and expression of freezing resistance in spring and winter wheat under field conditions in north-west Iran. Field Crop Research.97: 182-187.

Mahfoozi. S., Limin, A. E. and Fowler. D. B. 2001. Developmental regulation of low-temperature tolerance in winter wheat. Annals of Botany. 87:751-757.

Mahfoozi. S., Limin, A. E., Hayes, P. M., Hucl, P. and Fowler. D. B. 2000. Influence of photoperiod response in the expression of cold hardiness in wheat and barley. Canadian Journal of Plant Science. 80: 721-724.

Matysik, J., Bhalu, A.B. and Mohnty, P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science. 82: 525-532.

Morgan, J.M. 1992. Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat. Australian Journal of Plant Physiol. 19: 67–76.

Sarhadi E., Mahfoozi, S., Hosseini S. A. and Hosseni-Salekdeh. G.2010. Cold acclimation proteom analysis reveals close link between up-regulation of low-temperature associated proteins and vernalization fulfilment. Journal of Proteome Research. 9:5658-5667.

Sasaki, H., Ichimura, K., Okada, K. and Oda, M. 1998. Freezing tolerance and soluble sugar contents affected by water stress during cold-acclimation and de-acclimation in cabbage seedling. Scientica Horticulturae 76: 161-169.

Sasani, S., Hemming M.H., Oliver, S.N., Greenup, A., Tavakkol-Afshari, R., Mahfoozi S., Poustini, K., Sharifi, H.R., Dennis, E.S., Peacock, W.J. and Trevaskis, B. 2009. The influence of vernalization and daylength on expression of flowering-time genes in the shoot apex and leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Experimental Botany, 60: 2169–2178.

Seki, M., Narusaka, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki. K. 2001. *Arabidopsis* encyclopaedia using full-length cDNA s and its application. Plant Physiology and Biochemistry. 39: 211-220.

Sutka, J. 1981. Genetic studies of frost resistance in wheat. Theoretical and Applied Genetics. 59: 145–152.

Suzuki, M. 1989. Fructans in forage grasses with varying degrees of cold hardiness. Journal of Plant Physiology. 134: 224–231.

Toth, B., Galiba, G., Feher, E., Sutka, J. and Snape. J.W. 2003. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B in wheat. Theoretical Applied Genetics. 107:509-514.

Takumi, S., Koike, A., Nakata, M., Kume, S., Ohno, R., Nakamura. 2003. Cold-specific and light-stimulated expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) Cor gene Wcor15 encoding a chloroplasttargeted protein. Journal of Experimental Botany. 54: 2265–2274.

Torabi, S., Wissuwa, M., Heidari, M., Naghavi, M. R., Gilany, K., Hajirezaei, M. R., Omidi, M.; Yazdi-Samadi, B.; Ismail, A. M., Salekdeh, G. H. 2009. A comparative proteome approach to decipher the mechanism of rice adaptation to phosphorous deficiency. Proteomics. 9:159-70.

Va´gu´jfalvi, A., Galiba, G., Cattivelli, L. and Dubcovsky, J. 2003. The coldregulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost tolerance locus Fr-A2 on wheat chromosome 5A. Molecular Genetics and Genomics. 269:60–67.

Vagujfalvi, A., Kerepesi, I., Galiba, G., Tischner, T. and Sutka, J. 1999. Frost hardiness depending on carbohydratechanges during cold acclimation in wheat. Plant Science. 144: 85-92.

Van Loon, LC. 1997. Induced resistance in plants the role of pathogenesis related proteins. European Journal of Plant Pathology, 103: 753-765.

Yaish, M. W. F., Doxey, A. C., McConkey, B. J., Moffatt, B. A., Griffith, M. 2006. Cold-active winter rye glucanases with ice-binding capacity. Plant Physiology, 141: 1459–1472.

Developmental control of cold tolerance in wheat (*Triticum aestivum*)

Siroos Mahfoozi[1*], Mohammad Majdi[2]Mohsen Janmohammadi[3], Shahryar Sasani[4], Elham Sarhadi[5], Reza Tavakol-Afshari[6] & Ghasem Hosseini-Salekdeh[5]

[*]1. Corresponding author, Department of Cereals Research, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3. Department of Production Engineering and Plant Genetics, Agriculture Faculty, Maragheh University, Iran
4. Agriculture Research Center, Kermanshah
5. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran
6. Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Iran
Email: siroosmahfoozi@yahoo.com

Received: 2019/ 07/ 01 **Accepted:** 2019/ 09/ 03

Abstract

Phenological, molecular and metabolite analysis during vernalization in wheat show that there is a tight relationship between vernalizatio fulfillment/reproductive transition with decrease in the accumulation of some metabolites and expression of cold-induced genes/proteins. In the present review, we will describe a number of similar protective metabolites and cold related proteins which are present or expressed in both sensitive and tolerant wheat genotypes. Based on several studies duration of cold acclimation in winter genotypes is quite higher which is influenced by developmental genes and consequently the level and duration of expression of cold-lnduced proteins is longer when compared with spring genotypes. Also, the initial rate of cold acclimation in cold tolerant winter wheat is higher than the cold sensitive genotypes. Our results show that the expression patterns of cold related proteins and metabolites are consistent with the trend of the developmental factors that have regulatory effects on proteome/metabolome. In addition, sub-zero acclimation of plants in field conditions during autumn/winter seasons has significant effects on numbers, levels and patterns of cold associated proteins in compared with plants acclimated in controlled condition at low temperature but above zero temperature. This present work, provide a novel insight to uncover the molecular mechanisms behind cold adaptation in wheat and pave the way to breed wheat for cold tolerance.

Key words: *Wheat*, *Cold*, *Vernalization*, *Proteomics*, *Metabolites*