

(*Oryza sativa* L.)

**Effect of low temperature on antioxidant mechanisms in sensitive and tolerance
(*Oryza sativa* L.) genotypes in seedling stage**

IRCTN34 IRCTN33
(-) / ()
()
IRCTN33
(MDA)
IRCTN34 H2O2

اکسیداتیو ناشی از تنش شوری بوده است. گیو و همکاران (Guo *et al.*, 2005) گزارش نمودند در گیاهچه‌های برنج در تنش سرما و کم آبی، مقادیر H_2O_2 و MDA در وارته‌های حساس افزایش بیشتری یافت. بررسی سازوکارهای تحمل به سرما در گیاهان، نیازمند توجه ویژه به ساختمان و عمل غشاء دارد (Raison and Lyons *et al.*, 1979; Nishida and Chapman, 1976; Murata, 1996).

بخشی از حضور ROS می‌تواند به عنوان تنظیم کننده سازوکاری عمل کرده و به عنوان پیام رسان ثانویه، تولید آنتی اکسیدان‌ها را در سلول افزایش دهد (Francois and Mass, 1994). سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)^۳ زداينده اصلی سوپر اکسید بوده که در نتیجه فعالیت آن، سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و O_2 تبدیل می‌گردد (Dionisio-Sese and Tobita, 1998). پس از آن H_2O_2 توسط زداينده‌های غیر آنزیمی، از جمله آسکوربیک اسید (ویتامین C) و آلفاتوکوفرول (ویتامین E) و پاره‌ای از زداينده‌های آنزیمی مانند کاتالاز، اسکوربیک اسید پراکسیداز و غیره از محیط حذف می‌شود (Chance and Maehly, 1955; Lee and Lin, 1995). امروزه آلفاتوکوفرول بیشتر به عنوان یک آنتی اکسیدان اصلی محلول در لیپیدهای گیاهی و جانوری محسوب می‌شود (Fryer, 1992). آنتی اکسیدان‌هایی مانند آلفاتوکوفرول جزء تفکیک ناپذیر سازوکار دفاعی گیاهان و جانوران در برابر تنش اکسیداتیو بوده (Packer and Landvik, 1989) و وظیفه اصلی آنها حذف رادیکال‌های هیدروکسیل (که سبب پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شوند) است (Burton and Ingold, 1989). علاوه بر آن آلفاتوکوفرول توان احیاء سایر گونه‌های اکسیژن فعال مانند سوپراکسید و سینگلت اکسیژن^۴ (اکسیژن یک تایی) را نیز دارد (Liebler, 1998). ساختمان شیمیایی آلفاتوکوفرول

یکی از تغییراتی که در زمان مواجهه گیاهان با شرایط تنش زای محیط حادث می‌شود، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)^۱ است. الکترون‌هایی که در اثر فلئورسانس کلروفیل از زنجیره انتقال الکترون نشت کرده‌اند (Hassibi *et al.*, 2007)، با اکسیژن درون سلول واکنش کرده و گونه‌های فعال اکسیژن، نظیر سوپر اکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، سینگلت اکسیژن و رادیکال هیدروکسیل (OH)، را تولید می‌نمایند (Davies, 1987). این مواد بسیار واکنش‌گر و برای سلول سمی بوده و در صورت عدم کارایی برخی سازوکارهای محافظ، اختلال جدی در ساختار و سوخت و ساز گیاه ایجاد می‌کند. اختلال عمدتاً از طریق اکسیداسیون لیپیدهای غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ایجاد می‌شود (Davies, 1987; Fridovich, 1986).

گیاهان متحمل به سرما، دارای سازوکارهای آنتی اکسیدانی کارآمد تری نسبت به گیاهان حساس به سرما هستند و توان تولید آنتی اکسیدان‌هایی را دارند که می‌تواند آنها را در برابر اثرات مخرب گونه‌های اکسیژن فعال محافظت نمایند (Walker and McKersic, 1993; Dipierro and Leonardis, 1997; Dionisio-Sese *et al.*, 1998). امروزه پذیرفته شده است که میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن، بازتابی از شدت تنش در سطح سلولی است (Jain *et al.*, 2001). بنابراین از میزان MDA^۲ که ناشی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء است، به عنوان شاخصی برای تعیین میزان خسارت اکسیداتیو استفاده می‌شود (Jain *et al.*, 2001). دمیگل و تورکان (Demirel and Turkan, 2005) اعلام داشتند پایین بودن میزان MDA تولید شده در ریشه برنج تحت تنش شوری، نشان دهنده حفاظت بهتر گیاه در برابر تنش

1- Reactive Oxygen Species
3- Super Oxide Dismutase

2- Malondialdehyd
4- Singlet oxygen

...

و کلروپلاست ها قرار دارد (Foyer and Lelandais, 1996). توان بالای آسکوربیک اسید در دادن الکترون، آن را به یک مولکول بسیار مهم در سم زدایی ROS تبدیل نموده است.

آسکوربیک اسید می تواند مستقیماً سوپر اکسید، رادیکال های آزاد هیدروکسیل و اکسیژن سینگلت را زدوده و با احیای H_2O_2 آن را به آب تبدیل نماید (Noctor and Foyer, 1998). در کلروپلاست، آسکوربیک اسید به عنوان یک کوفاکتور برای آنزیم *Violaxanthin de-epoxidase* عمل نموده و باعث پشتیبانی چرخه زانتوفیل در حذف مازاد انرژی برانگیختگی می شود (Smirnoff, 2000). آسکوربیک اسید می تواند از رادیکال های توکوفروکسیل^۱، آلفاتوکوفرول تولید نماید (Thomas *et al.*, 1992). همچنین آسکوربیک اسید عهده دار برخی وظایف غیر آنتی اکسیدانی در سلول، مانند تنظیم تقسیم سلولی (Smirnoff, 1996) و طولی شدن سلول نیز هست (De Tullio *et al.*, 1999). گزارش شده است که نسبت آنتی اکسیدان های احیاء به اکسید می تواند به عنوان یک پیام برای تنظیم سازوکارهای زدودن ROS عمل نماید (Karpinski, 1997; Mittler, 2002).

به منظور تعیین اثر تنش دمایی بر میزان آنتی اکسیدان ها و تعیین تاثیرات خسارت اکسیداتیو ناشی از آنها در گیاهچه های سه ژنوتیپ برنج این تحقیق انجام شد.

مواد و روش ها

در این آزمایش که در سال ۱۳۸۵ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام گردید، دو ژنوتیپ برنج متحمل به سرما تحت شماره های IRCTN33 و IRCTN34 از سری خزانه بین المللی ارقام برنج متحمل به تنش سرما (IRCTN)^۳ سال ۲۰۰۵^۴ از ابری (IRRI)

به گونه ای است که در داخل غشاء های فسفولیپیدی جای گرفته و می تواند از پراکسیداسیون اسیدهای چرب جلوگیری نماید (Burton and Ingold, 1989). این عمل توسط زنجیره فیتیل^۱ در مولکول آلفاتوکوفرول صورت گرفته که به اسید های چرب آزاد متصل شده و از هم گسیختگی آنها در غشاء را به حداقل می رساند (Kagan, 1989). آلفاتوکوفرول نفوذ پذیری غشاء را نسبت به یون های کوچک که در حضور اسیدهای چرب غیر اشباع انجام می شود، کاهش داده و سبب پایداری غشاء می شوند (Quinn, 1998). همچنین ویتامین E، باعث ثبات غشاء در زمان گذار از مرحله کریستال-مایع به جامد-ژل، ناشی از تغییرات دما می شود (Wassal *et al.*, 1986). افزایش مقدار آلفاتوکوفرول، در واکنش گیاه به تنش های خشکی (Munne-Bosch *et al.*, 1999) و سرمزدگی (Wildi and Lutz, 1996) به خاطر نقش آنتی اکسیدانی آن گزارش شده است.

تیمار گیاهچه های برنج با آسکوربیک اسید (ویتامین C، محلول در آب)، باعث کاهش سطح تولید H_2O_2 و MDA در تنش سرما شده است (Guo *et al.*, 2005). آسکوربیک اسید در بخش آبی اغلب سلول های گیاهی، اندامک ها و آپوپلاست وجود داشته و تحقیقات زیادی بر روی نقش آنتی اکسیدانی آن صورت گرفته است (Arrigonic and De-Tullio, 2000; Horemans *et al.*, 2000; Tullio, 2000; Noctor and Foyer, 1998). آنتی اکسیدان هایی مانند آسکوربیک اسید در غلظت های زیاد (مثلاً ۲۰ mM در سیتوزول و ۲۰-۳۰۰ mM در استرومای کلروپلاست) و گلوتاتیون (۱-۵ میلی مولار) در کلروپلاست و دیگر اجزای سلولی یافت می شوند که برای دفاع گیاه در برابر تنش اکسیداتیو بسیار مهم و ضروری می باشند (Mittler, 2002; Noctor and Foyer, 1998). حدود ۹۰ درصد آسکوربیک اسید اغلب به شکل احیاء در برگ ها

1- Tocopheroxyl

3- IRCTN 2005= International Rice Cold Tolerant Nursery

2- Phytol

4- International Rice Research Institute

اساس روش اشرف و همکاران (Ashraf *et al.*, 1994) در طول موج های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر، و با دستگاه اسپکتروفتومتر (VARIAN, Australia) قرائت گردید. اندازه گیری آسکوربات کل، اکسید و احیاء شده در برگ و ریشه با روش متافسفریک اسید و قرائت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر بر اساس روش سمیرنوف (Smirnoff, 1996) صورت گرفت. اندازه گیری غلظت H_2O_2 با روش تری کلرو استیک اسید (Hung *et al.*, 2005) و قرائت در طول موج ۳۹۰ نانومتر انجام شد. میزان MDA (مالون دی آلدهاید)، با روش تیو باریتیوریک اسید (Stewart and Bewley, 1980; Davey *et al.*, 2005) و در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. همچنین آلفاتو کوفرول با استفاده از روش بوتسوگلو و همکاران (Botsoglou *et al.*, 1998) از ریشه و برگ هر سه ژنوتیپ استخراج، و با استفاده از دستگاه HPLC^۱ (Knuer, Germany) با ستون C_{18} در دمای محیط ($25^{\circ}C$) و فاز متحرک متانول- استونیتریل (۵۰:۵۰) با جریان یک میلی لیتر بر دقیقه با دکتور فلئورسانس در دو طول موج تابشی ۲۸۸ و بازتابشی ۳۲۹ تعیین گردید.

نتایج و بحث

در این آزمایش اثر تنش سرما بر روی وزن خشک اندام هوایی معنی داری بود، ولی در این مورد اثر متقابلی بین ژنوتیپ ها و دما دیده نشد (جدول ۱)، درحالیکه در خصوص ریشه علاوه بر تیمار دما اثر متقابل ژنوتیپ × دما نیز معنی دار شد (جدول ۲). در بین ژنوتیپ های مورد بررسی ژنوتیپ هویره بیشترین میزان وزن خشک اندام هوایی و ریشه را داشت که عمدتاً بخاطر پایداری بودن ژنوتیپ و رشد رویشی زیاد آن بود. لازم به ذکر است که در پایان دوره آزمایش، سطح سبز این ژنوتیپ از بین رفت و وزن خشک ارائه شده تنها میزان ماده خشک

که طی بررسی های مقدماتی برتر از سایر ارقام شناخته شدند به همراه برنج هویره حساس به سرما (Hassibi *et al.*, 2007)، مورد مطالعه قرار گرفتند. عوامل مورد مطالعه شامل دمای پایین، در دو سطح (شاهد و تنش سرما) و سه ژنوتیپ بود که به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. بذور ارقام ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر خیسانده شده و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای $32^{\circ}C$ درجه سانتیگراد، چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی با شدت ۷۵ میکرو مول فوتون بر متر مربع در ثانیه و رطوبت نسبی ۷۵ درصد در ژرminatور جوانه دار شدند. کاشت بذور بر اساس روش گریگوریو و همکاران (Gregorio *et al.*, 1997) انجام شدند، بطوریکه بذور جوانه دار به مدت سه روز در ظروف ۱۹ لیتری حاوی آب مقطر کاشته شدند، و پس از این مدت آب مقطر با محلول یوشیدا (Yoshida, 1981) جایگزین شد. سپس ظروف به فیتوترون با دمای ۲۹/۲۲ (شب/روز) با رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد و طول روز ۱۲ ساعت شب/روز، با شدت تشعشع 400 ± 50 میکرو مول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، منتقل شدند. در تیمار شاهد، کلیه بوته ها به مدت ۲۸ روز در این شرایط نگهداری شدند، درحالیکه در تیمار تنش سرما، پس از ۱۴ روز، دمای فیتوترون به مدت دو هفته تا $15/13^{\circ}C$ درجه سانتیگراد (شب/روز) کاهش داده شد. پس از ۲۸ روز نمونه برداری از آخرین برگ توسعه یافته (برگی که زبانک آن مشخص شده بود) و ریشه ها انجام گرفت. برگ ها و ریشه ها پس از برداشت بلافاصله توسط نیتروژن مایع منجمد و به فریزر $-80^{\circ}C$ درجه سانتیگراد منتقل گردیدند. همچنین جهت تعیین وزن خشک کل اندام هوایی و ریشه، مقداری از نمونه ها در آون با دمای $70^{\circ}C$ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. میزان کلروفیل a و b با استفاده از استون ۸۰ درصد بر

جدول ۱ - تجزیه واریانس وزن خشک اندام هوایی، میزان کلروفیل a و b و میزان های آسکوربات کل، آسکوربات اکسید، آسکوربات احیاء، H_2O_2 ، MDA، آلفاتوکوفرول در برگ سه ژنوتیپ برنج تحت تنش سرما.

Table 1. Analysis of variance for shoot dry weight, chlorophyll a and b contents (Chl. a & b), total ascorbate (AsA_t), ascorbate oxide (AsA_o) and ascorbate reduced (AsA_r), H_2O_2 , Malondialdehyde (MDA), α -tocopherol contents in leaf of three rice genotypes under low temperature stress conditions.

S. O. V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df	وزن خشک گیاهچه Leaf dry weight	کلروفیل a Chl. a	کلروفیل b Chl. b	آسکوربات کل AsA_t	آسکوربات اکسید AsA_o	آسکوربات احیاء AsA_r	پراکسید هیدروژن H_2O_2	مالون دی آلدهاید MDA	آلفاتوکوفرول α -tocopherol
Temperature (T)	دما	1	1445504**	0.897*	0.288 ^{ns}	1056**	599.8**	64.19**	132016**	6479.1**	7.26**
Genotype (G)	ژنوتیپ	2	112866**	0.50 ^{ns}	0.156 ^{ns}	5.15 ^{ns}	1.091 ^{ns}	3.52 ^{ns}	113004**	718.1**	6.41**
T × G	دما × ژنوتیپ	2	75116 ^{ns}	2.13 ^{ns}	0.981 ^{ns}	6.79 ^{ns}	1.143 ^{ns}	4.67 ^{ns}	113004**	155.3 ^{ns}	2.67*
Error	خطا	18	80062	1.39	0.391	11.04	8.225	1.84	9868	82.4	0.753

* و **: Significant at the $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively. ns: Non-significant

جدول ۲ - تجزیه واریانس وزن خشک ریشه و میزان های آسکوربات کل، آسکوربات اکسید، آسکوربات احیاء، H_2O_2 ، MDA، آلفاتوکوفرول در ریشه سه ژنوتیپ برنج تحت تنش سرما.

Table 2. Analysis of variance of root dry weight, total ascorbate (AsA_t), ascorbate oxide (AsA_o) and ascorbate reduced (AsA_r), H_2O_2 , Malondialdehyde (MDA), α -tocopherol contents in root of three rice genotypes under low temperature stress conditions.

S. O. V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df	وزن خشک ریشه Root dry weight	آسکوربات کل AsA_t	آسکوربات اکسید AsA_o	آسکوربات احیاء AsA_r	پراکسید هیدروژن H_2O_2	مالون دی آلدهاید MDA	آلفاتوکوفرول α -tocopherol
Temperature (T)	دما	1	112067**	16.90**	1.54**	8.28**	411602**	186.7**	0.006*
Genotype (G)	ژنوتیپ	2	8600 ^{ns}	0.748 ^{ns}	0.194*	0.878 ^{ns}	107085*	2.55 ^{ns}	0.00001 ^{ns}
T × G	دما × ژنوتیپ	2	19017*	0.21 ^{ns}	0.185*	0.442 ^{ns}	129523*	11.5 ^{ns}	0.00001 ^{ns}
Error	خطا	18	5072	0.574	0.039	0.416	24594	3.75	0.00001

* و **: Significant at the $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively. ns: Non-significant

باقی مانده می باشد (جدول ۳ و ۴). وزن کمتر ژنوتیپ‌های متحمل عمدتاً بخاطر کند تر بودن رشد آنها بود (Hassibi et al., 2007).

نتایج تجزیه واریانس آسکوربات کل (ASA_t)^۱ در برگ و ریشه نشانگر وجود اختلاف معنی دار در تیمارهای دمایی بود، ولی بین ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل آنها با دما تفاوت معنی داری مشاهده نشد (جدول ۱ و ۲). در برگ و ریشه تنش دمای پایین به طور کاملاً معنی داری مقدار آسکوربات کل را نسبت به شاهد افزایش داد (جدول ۳ و ۴). بیشترین مقدار ASA_t برگ در رقم حساس هویزه به میزان ۱۵/۳ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط تنش و کمترین مقدار آن نیز در همین ژنوتیپ به میزان ۰/۶۱ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد بود (جدول ۳). در ریشه میزان ASA_t به مراتب کمتر از برگ بود و در تنش دمای پایین نیز میزان آن به اندازه برگ افزایش نیافت. بیشترین مقدار ASA_t ریشه، در ژنوتیپ متحمل ۳۳ به میزان ۲/۲۶ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط تنش، و در ژنوتیپ ۳۳ به مقدار ۰/۳۳ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد دیده شد (جدول ۴). این نتایج نشان داد که احتمالاً ASA_t ریشه در مقایسه با ASA_t برگ همبستگی بیشتری با تحمل به تنش سرما داشت، چون در برگ ژنوتیپ حساس بیشترین میزان ASA_t ، و در ریشه ژنوتیپ‌های متحمل بیشترین مقدار ASA_t مشاهده گردید.

داده های مربوط به آسکوربات فرم اکسید (ASA_o)^۲ در برگ نشان داد که هرچند اختلاف معنی داری بین تیمارهای دمایی وجود داشت، ولی بین ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل آنها با دما این امر صادق نبود (جدول ۱). در این مطالعه تنش دمای پایین، ASA_o را به طور معنی داری افزایش داد (جدول ۳) و در تیمار شاهد بیشترین مقدار ASA_o برگ، در ژنوتیپ ۳۳ به مقدار ۰/۵۸ میلی مول بر

گرم وزن تر و در شرایط تنش به میزان ۱۱/۴ میلی مول بر گرم وزن تر در ژنوتیپ ۳۴ اندازه گیری شد (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس براساس ASA_o در ریشه نشان داد که اختلاف معنی داری بین ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل ژنوتیپ × دما از نظر میزان تولید ASA_o وجود داشت (جدول ۲). بیشترین مقدار ASA_o ریشه به ترتیب در ژنوتیپ شماره ۳۳ به میزان ۰/۸۸ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط تنش و ژنوتیپ شماره ۳۴ به مقدار ۰/۱۲ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد بود، در حالیکه کمترین مقدار این ماده در ژنوتیپ هویزه به مقدار ۰/۰۶ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد دیده شد (جدول ۴).

اطلاعات حاصله نشان داد که مقدار آسکوربات فرم احیاء (ASA_r)^۳ در ریشه و برگ ارقام مورد بررسی دارای اختلاف معنی داری در تیمار دما بود، ولی بین ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل ژنوتیپ × دما تفاوت معنی داری دیده نشد (جدول ۱ و ۲). تنش دمای پایین مقدار ASA_r را در برگ ژنوتیپ‌های برنج به طور معنی داری افزایش داد (جدول ۳). بیشترین مقدار ASA_r برگ به ترتیب در ژنوتیپ هویزه به میزان ۵/۱۰ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط تنش و ژنوتیپ ۳۳ به مقدار ۰/۳۲ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد بود (جدول ۳). بیشترین مقدار ASA_r ریشه در ژنوتیپ شماره ۳۴ دیده شد، بطوریکه میزان ASA_r آن در تیمار تنش به میزان ۱/۸۴ میلی مول بر گرم وزن تر و در تیمار شاهد ۰/۲ میلی مول بر گرم وزن تر بود. این در حالی است که کمترین مقدار این ماده در ژنوتیپ هویزه به میزان ۰/۰۲ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد دیده شد (جدول ۳). این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً ASA_t و ASA_r ریشه در مقایسه با ASA_t و ASA_r برگ همبستگی بیشتری با تحمل به تنش سرما درد، چون در برگ ژنوتیپ حساس بیشترین میزان ASA_t و ASA_r ، و در ریشه ژنوتیپ‌های

1- Total ascorbic acid
3- Ascorbic acid reduced form

2- Ascorbic acid oxide form

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات میزان کلروفیل a، میزان کلروفیل b و میزان های وزن خشک اندام هوایی و میزان های آسکوربات کل، آسکوربات اکسید، آسکوربات احیاء، H₂O₂، مالون دی الددید، آلفاتوفرویل در برگ سه ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی.

Table 3. Mean comparison of chlorophyll a and b contents (Chl. a & b), shoot dry weight (SDW), total ascorbate (AsA_t), ascorbate oxide (AsA_o) and ascorbate reduced (AsA_r), H₂O₂, Malondialdehyde (MDA), α-tocopherol contents in leaves of three rice genotypes under control (C) low temperature stress (S) conditions.

ژنوتیپ Genotype	آلفاتوکوفرویل برگ (میلی گرم بر گرم وزن خشک) α-tocopherol mg g ⁻¹ dwt		مالون دی الددید (میلی مول بر گرم وزن تر) MDA mmol g ⁻¹ fwt		H ₂ O ₂ (میکرومول بر گرم وزن تر) H ₂ O ₂ mmol g ⁻¹ fwt		آسکوربات احیاء (میلی مول بر گرم وزن تر) Leaf AsA _r mmol g ⁻¹ fwt		آسکوربات اکسید (میلی مول بر گرم وزن تر) Leaf AsA _o mmol g ⁻¹ fwt		آسکوربات کل (میلی مول بر گرم وزن تر) Leaf AsA _t mmol g ⁻¹ fwt		وزن خشک اندام هوای (میلی گرم بر بوته) SDW mg plant ⁻¹		کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر) Chl. a mg. g ⁻¹ fwt		کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر) Chl. b mg. g ⁻¹ fwt	
	تنش	شاهد	تنش	شاهد	تنش	شاهد	تنش	شاهد	تنش	شاهد	تنش	شاهد	تنش	شاهد	تنش	شاهد	تنش	شاهد
S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	
No.33	3.42	3.14	35.6	7.98	22.5	0.0001	2.17	0.32	9.93	0.58	12.1	0.90	1838	2080	3.86	3.85	1.82	1.98
No.34	2.90	2.30	47.3	19.4	0.0001	0.0001	3.38	0.30	11.4	0.54	14.7	0.85	1510	1768	3.67	4.05	1.78	1.98
هویزه Hovaizeh	5.58	3.16	62.1	19.1	422.5	0.0001	5.01	0.13	10.3	0.48	15.3	0.61	1993	2465	2.64	4.2	1.14	2.16
LSD 5%	1.29		13.49		147.6		2.01		4.261		4.936		420.3		1.744		0.9289	
S _x ⁻	0.43		4.54		49.67		0.68		1.434		1.661		141.5		0.5869		0.3126	

LSD5% are for comparing genotypes for each traits.

LSD%5 برای مقایسه ژنوتیپ ها برای هر صفت می باشند.

جدول ۴. مقایسه میانگین صفات میزان وزن خشک ریشه و میزان های آسکوربات کل، آسکوربات اکسید، آسکوربات احیاء، H₂O₂، مالون دی الدیید، آلفاتوفرویل در ریشه سه ژنوتیپ برنج در تیمارهای مختلف دمایی.

Table 4. Mean comparison root dry weight (RDW), total ascorbate (AsA_t), ascorbate oxide (AsA_o) and ascorbate reduced (AsA_r), H₂O₂, Malondialdehyde (MDA),

α -tocopherol contents in roots of three rice genotypes under control (C) low temperature stress (S) conditions

ژنوتیپ Genotype	آلفاتوکوفرول ریشه (میلی گرم بر گرم وزن خشک) α -tocopherol mg g ⁻¹ dwt		مالون دی الدیید (میلی مول بر گرم وزن تر) MDA mmol g ⁻¹ fwt		H ₂ O ₂ (میکرومول بر گرم وزن تر) H ₂ O ₂ mmol g ⁻¹ fwt		آسکوربات احیاء (میلی مول بر گرم وزن تر) AsAr mmol g ⁻¹ fwt		آسکوربات اکسید (میلی مول بر گرم وزن تر) AsA _o mmol g ⁻¹ fwt		آسکوربات کل (میلی مول بر گرم وزن تر) AsAt mmol g ⁻¹ fwt		وزن خشک ریشه (میلی گرم بر بوته) RDW mg plant ⁻¹	
	تنش S	شاهد C	تنش S	شاهد C	تنش S	شاهد C	تنش S	شاهد C	تنش S	شاهد C	تنش S	شاهد C	تنش S	شاهد C
	No. 33	0.10	0.03	16.4	10.0	173	190	1.38	0.18	0.88	0.14	2.26	0.33	312
No. 34	0.05	0.02	17.9	10.5	650	168	1.84	0.20	0.28	0.12	2.11	0.32	297	332
Hovaizeh هویزه	0.05	0.02	14.6	11.8	494	173.5	0.71	0.02	0.67	0.06	1.38	0.07	285	325
LSD5%	0.0047		2.875		233		0.958		0.2934		1.126		105.8	
S _x ⁻	0.0016		0.968		78.41		0.323		0.0987		0.3788		35.61	

LSD5% are for comparing genotypes for each traits.

LSD%5 برای مقایسه ژنوتیپ ها برای هر صفت می باشند.

متحمل بیشترین مقدار ASA_t و ASA_f مشاهده شد.

تنش دمای پایین میزان آسکوربات کل، اکسید و احیاء در برگ و ریشه را بطور معنی داری افزایش داد. بطور مثال ASA_t برگ از کمتر از ۱ میلی مول بر گرم وزن تر به حدود ۱۵ میلی مول بر گرم وزن تر رسید، هر چند اختلاف معنی داری از این نظر بین ژنوتیپ ها دیده نشد (جدول ۳). ناکتور و فویر (Noctor and Foyer, 1998) در بررسی تغییرات آسکوربات اکسید در گیاهان زراعی، نیز دامنه آسکوربات را در سلول های گیاهی ۲۰-۵ میلی مول بر گرم وزن تر گزارش نمودند. آسکوربات فرم احیاء ($AsAr$) پس از واکنش با H_2O_2 به آسکوربات فرم اکسید (ASA_o) تبدیل می گردد، سپس این نوع از آسکوربات در چرخه گلوکاتایون-آسکوربیک اسید باز سازی و دوباره به شکل احیاء تبدیل می گردد. در شرایط تنش، باز سازی و احیاء آسکوربیک اسید نیاز به سازوکار بسیار کارآمدی دارد، زیرا در غیر اینصورت تمامی ذخیره آسکوربات موجود در گیاه در کمتر از چند دقیقه مصرف خواهد شد (Foyer and Lelandais, 1996).

اثر دما و اثر متقابل ژنوتیپ \times دما، بر میزان کلروفیل a معنی داری بود ولی بین ژنوتیپ ها از این نظر تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. همچنین همچنین هیچ یک از این عوامل اثر معنی داری بر میزان کلروفیل b نداشتند (جدول ۱).

تنش سرما بر روی میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) برگ و ریشه اثر معنی داری داشت و از این نظر تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ ها و اثر متقابل آنها با دما مشاهده گردید (جدول ۲). مقدار H_2O_2 در تنش دمای پایین به طور معنی داری بیشتر از شاهد بود (جدول ۳). جالب توجه آنکه بیشترین میزان H_2O_2 برگ به ترتیب در رقم حساس هویزه به میزان ۴۲۲/۵ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط تنش دیده شد، در حالی که کمترین مقدار این ماده در ژنوتیپ متحمل شماره ۳۴ به مقدار

...

۰/۰۰۰۱ میلی مول بر گرم وزن تر در همان شرایط دیده شد. مقدار این ماده در نمونه های شاهد هر سه ژنوتیپ ناچیز و برابر ۰/۰۰۰۱ میلی مول بر گرم وزن تر بود (جدول ۳). بیشترین و کمترین مقدار H_2O_2 ریشه در ژنوتیپ متحمل شماره ۳۴ به ترتیب به میزان ۶۵۰ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط تنش و ۱۶۸ میلی مول بر گرم وزن تر در شاهد دیده شد (جدول ۳). این نشان می دهد که این شاخص فقط در اندام هوایی معیار مناسبی جهت انتخاب ژنوتیپ متحمل است.

میزان MDA (مالون دی آلدهاید) برگ در اثر سطوح مختلف دمای پایین و بین ژنوتیپ بطور معنی داری افزایش یافت، ولی اثر متقابل دما \times ژنوتیپ بر میزان MDA معنی دار نبود (جدول ۱). در ریشه نیز تنش سرما میزان MDA را بطور معنی داری افزایش داد، درحالیکه تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ ها و اثر متقابل ژنوتیپ و دما دیده نشد (جدول ۲ و ۳). بیشترین مقدار MDA برگ به ترتیب در رقم هویزه به میزان ۶۲/۱ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط تنش، و کمترین مقدار آن در ژنوتیپ شماره ۳۳ به میزان ۸ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط شاهد دیده شد (جدول ۳).

شرایط تنش و کمترین مقدار آن نیز در همین ژنوتیپ به میزان ۰/۶۱ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد بود (جدول ۳). در ریشه میزان ASA_t به مراتب کمتر از برگ بود و در تنش دمای پایین نیز میزان آن به اندازه برگ افزایش نیافت. بیشترین مقدار ASA_t ریشه، در ژنوتیپ متحمل ۳۳ به میزان ۲/۲۶ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط تنش، و در ژنوتیپ ۳۳ به مقدار ۰/۳۳ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد دیده شد (جدول ۴). این نتایج نشان داد که احتمالاً ASA_t ریشه در مقایسه با ASA_t برگ همبستگی بیشتری با تحمل به تنش سرما داشت، چون در برگ ژنوتیپ حساس بیشترین میزان ASA_t و در ریشه ژنوتیپ های متحمل بیشترین مقدار ASA_t مشاهده گردید.

داده های مربوط به آسکوربات فرم اکسید (ASA_o)

(جدول ۳). این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً ASA_t و ASA_r ریشه در مقایسه با ASA_t و ASA_r برگ همبستگی بیشتری با تحمل به تنش سرما درد، چون در برگ ژنوتیپ حساس بیشترین میزان ASA_t و ASA_r ، و در ریشه ژنوتیپ‌های متحمل بیشترین مقدار ASA_t و ASA_r مشاهده شد.

تنش دمای پایین میزان آسکوربات کل، اکسید و احیاء در برگ و ریشه را بطور معنی داری افزایش داد. بطور مثال ASA_t برگ از کمتر از ۱ میلی مول بر گرم میزان آلفاتوکوفرول برگ، در تمامی تیمارها شامل سطوح دما، ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل ژنوتیپ × دما، تفاوت معنی داری داشت (جدول ۱). درحالی‌که در ریشه، تنها اثر دما بر این ماده معنی دار بود (جدول ۲ و ۳). بیشترین میزان آلفاتوکوفرول برگ، در رقم هویزه به میزان ۵/۵۸ میکرو گرم بر گرم وزن خشک در تیمار تنش، و کمترین مقدار آن در ژنوتیپ شماره ۳۴ به میزان ۲/۳ میکرو گرم بر گرم وزن خشک در تیمار شاهد دیده شد (جدول ۳). بطور کلی میزان آلفاتوکوفرول ریشه به مراتب کمتر از اندام هوایی بود، بطوریکه بیشترین میزان آلفاتوکوفرول ریشه، در ژنوتیپ شماره ۳۳ به مقدار ۰/۱ میکرو گرم بر گرم وزن خشک در شرایط تنش و به میزان ۰/۰۳ میکرو گرم بر گرم وزن خشک در شاهد بود (جدول ۳).

ضرایب همبستگی صفات در شرایط تنش در جدول ۵ نشان داده شده است. اطلاعات مندرج در این جدول نشان می‌دهد که وزن خشک اندام هوایی دارای همبستگی منفی و معنی داری با میزان MDA برگ بود و با افزایش مقدار MDA، وزن خشک اندام هوایی کاهش یافت. پراکسید هیدروژن برگ دارای همبستگی منفی و معنی داری با مقدار کلروفیل a و b برگ داشت و با افزایش میزان H_2O_2 برگ، مقدار کلروفیل برگ کاهش معنی داری یافت. جالب توجه آنکه آنتی اکسیدان بسیار قوی مانند آلفاتوکوفرول برگ نیز مانند H_2O_2 همبستگی منفی و معنی داری با مقدار کلروفیل a و b

در برگ نشان داد که هرچند اختلاف معنی داری بین تیمارهای دمایی وجود داشت، ولی بین ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل آنها با دما این امر صادق نبود (جدول ۱). در این مطالعه تنش دمای پایین، ASA_0 را به طور معنی داری افزایش داد (جدول ۳) و در تیمار شاهد بیشترین مقدار ASA_0 برگ، در ژنوتیپ شماره ۳۳ به مقدار ۰/۵۸ میلی مول بر گرم وزن تر و در شرایط تنش به میزان ۱۱/۴ میلی مول بر گرم وزن تر در ژنوتیپ شماره ۳۴ اندازه گیری شد (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس براساس ASA_0 در ریشه نشان داد که اختلاف معنی داری بین ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل ژنوتیپ × دما از نظر میزان تولید ASA_0 وجود داشت (جدول ۲). بیشترین مقدار ASA_0 ریشه به ترتیب در ژنوتیپ شماره ۳۳ به میزان ۰/۸۸ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط تنش و ژنوتیپ شماره ۳۴ به مقدار ۰/۱۲ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد بود، در حالی‌که کمترین مقدار این ماده در ژنوتیپ هویزه به مقدار ۰/۰۶ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد دیده شد (جدول ۴). اطلاعات حاصله نشان داد که مقدار آسکوربات فرم احیاء (ASA_r) در ریشه و برگ ارقام مورد بررسی دارای اختلاف معنی داری در تیمار دما بود، ولی بین ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل ژنوتیپ × دما تفاوت معنی داری دیده نشد (جدول ۱ و ۲). تنش دمای پایین مقدار ASA_r را در برگ ژنوتیپ‌های برنج به طور معنی داری افزایش داد (جدول ۳). بیشترین مقدار ASA_r برگ به ترتیب در ژنوتیپ هویزه به میزان ۵/۱۰ میلی مول بر گرم وزن تر در شرایط تنش و ژنوتیپ شماره ۳۳ به مقدار ۰/۳۲ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد بود (جدول ۳). بیشترین مقدار ASA_r ریشه در ژنوتیپ شماره ۳۴ دیده شد، بطوریکه میزان ASA_r آن در تیمار تنش به میزان ۱/۸۴ میلی مول بر گرم وزن تر و در تیمار شاهد ۰/۲ میلی مول بر گرم وزن تر بود. این درحالی است که کمترین مقدار این ماده در ژنوتیپ هویزه به میزان ۰/۰۲ میلی مول بر گرم وزن تر در تیمار شاهد دیده شد

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین صفات وزن خشک برگ، وزن خشک ریشه، میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل، میزان های و آسکوربات کل، آسکوربات اکسید، آسکوربات احياء، H2O2، مالون دی الدیید، آلفاتوکوفرول ریشه و برگ سه ژنوتیپ برنج در شرایط دمایی پایین.

Table 5. Correlations coefficients between shoot dry weight (SDW), root dry weight (RDW), chlorophyll a and b contents (Chl a and Chl b), total Chlorophyll, total ascorbate (AsAt), ascorbate oxide (AsAo) and ascorbate reduced (AsAr), H2O2, Malondialdehyde (MDA) and α -tocopherol contents in leaf and roots of three rice genotypes under low temperature stress.

Traits	صفات	وزن خشک گیاهچه Shoot	وزن خشک ریشه Root	کلروفیل a Chla	کلروفیل b Chlb	کلروفیل کل (ab) Chl	آسکوربات کل برگ AsAt	آسکوربات اکسید برگ AsAo	آسکوربات احياء برگ AsAr	H ₂ O ₂ برگ H ₂ O ₂	MDA برگ MDA	آلفاتوکوفرول برگ a-tocopherol	آسکوربات کل ریشه AsAt	آسکوربات اکسید ریشه AsAo	آسکوربات احياء ریشه AsAr	H ₂ O ₂ ریشه H ₂ O ₂	MDA ریشه MDA	آلفاتوکوفرول ریشه a-tocopherol	
Shoot dwt	وزن خشک بوته	1																	
Root dwt	وزن خشک ریشه	0.83**	1.00																
Chl a	کلروفیل a	-0.38 ^{ns}	-0.03 ^{ns}	1.00															
Chl b	کلروفیل b	-0.51 ^{ns}	-0.20 ^{ns}	0.97**	1.00														
Chl total (ab)	کلروفیل کل (ab)	-0.43 ^{ns}	-0.12 ^{ns}	0.99**	0.99**	1.00													
Leaf AsAt	آسکوربات کل برگ	0.93**	-0.04 ^{ns}	-0.29 ^{ns}	-0.15 ^{ns}	-0.22 ^{ns}	1.00												
Leaf AsAo	آسکوربات اکسید برگ	-0.15 ^{ns}	0.12 ^{ns}	-0.07 ^{ns}	0.01 ^{ns}	-0.03 ^{ns}	0.42 ^{ns}	1.00											
Leaf AsAr	آسکوربات احياء برگ	0.23 ^{ns}	0.96**	-0.16 ^{ns}	-0.12 ^{ns}	-0.15 ^{ns}	0.37 ^{ns}	-0.69*	1.00										
Leaf H ₂ O ₂	برگ H ₂ O ₂	0.82**	0.58*	-0.63*	-0.70**	-0.68*	0.40 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.28 ^{ns}	1.00									
Leaf MDA	برگ MDA	-0.58*	0.36 ^{ns}	-0.28 ^{ns}	-0.37 ^{ns}	-0.33 ^{ns}	0.37 ^{ns}	-0.20 ^{ns}	0.75**	0.80**	1.00								
Leaf a-tocopherol	آلفاتوکوفرول برگ	0.65*	0.33 ^{ns}	-0.64*	-0.69*	-0.67*	0.32 ^{ns}	-0.33 ^{ns}	0.59*	0.80**	0.58*	1.00							
Root AsAt	آسکوربات کل ریشه	-0.43 ^{ns}	-0.50 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.26 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.26 ^{ns}	-0.12 ^{ns}	0.33 ^{ns}	-0.4 ⁰ ^{ns}	-0.18 ^{ns}	-0.95**	1.00						
Root AsAo	آسکوربات اکسید ریشه	0.22 ^{ns}	-0.03 ^{ns}	-0.59*	-0.578*	-0.58*	0.25 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.24 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.41 ^{ns}	1.00					
Root AsAr	آسکوربات احياء ریشه	-0.56*	0.53 ^{ns}	0.35 ^{ns}	0.50 ^{ns}	0.43 ^{ns}	0.19 ^{ns}	-0.15 ^{ns}	0.30 ^{ns}	-0.48 ^{ns}	-0.20 ^{ns}	-0.22 ^{ns}	0.94*	0.07 ^{ns}	1.00				
Root H ₂ O ₂	ریشه H ₂ O ₂	0.11 ^{ns}	-0.04 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.15 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.04 ^{ns}	-0.13 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.42 ^{ns}	0.08 ^{ns}	-0.16 ^{ns}	-0.54 ^{ns}	0.03 ^{ns}	1.00			
Root MDA	ریشه MDA	0.66*	-0.74**	0.29 ^{ns}	0.50 ^{ns}	0.39 ^{ns}	0.44 ^{ns}	0.31 ^{ns}	0.03 ^{ns}	-0.44 ^{ns}	-0.23 ^{ns}	-0.28 ^{ns}	0.55 ^{ns}	-0.20 ^{ns}	-0.67*	0.26 ^{ns}	1.00		
Root a-tocopherol	آلفاتوکوفرول ریشه	-0.04 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.41 ^{ns}	0.30 ^{ns}	0.36 ^{ns}	-0.58*	-0.37 ^{ns}	-0.08 ^{ns}	-0.38 ^{ns}	-0.22 ^{ns}	-0.41 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.21 ^{ns}	0.20 ^{ns}	-0.24 ^{ns}	-0.34 ^{ns}	1.00	

* and **: Significant at the P<0.05 and P<0.01 levels, respectively.
ns: Non-significant

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد
ns: غیر معنی دار

برگ داشته و با کاهش میزان کلروفیل، مقدار آلفاتوکوفرول بطور معنی داری افزایش یافت (جدول ۵). آلفاتوکوفرول برگ همچنین همبستگی مثبت و معنی داری با آسکوربات احیاء و H_2O_2 برگ داشته و با افزایش آنها مقدار آلفاتوکوفرول برگ نیز افزایش یافت (جدول ۵). آسکوربات اکسید در برگ گیاهچه های برنج تحت تنش سرما همبستگی منفی و معنی داری با مقدار آسکوربات احیاء نشان داد (جدول ۵). همچنین مقدار MDA برگ نیز همبستگی مثبت و بسیار معنی داری با مقدار H_2O_2 برگ داشت (جدول ۵).

نتایج این آزمایش نشان داد که در تنش دمای پایین، مقدار پراکسید هیدروژن، MDA، آسکوربات (کل، اکسید و احیاء؛ محلول در آب) و آلفا توکوفرول (محلول در چربی) در ژنوتیپ های مورد بررسی افزایش معنی داری داشتند. پراکسید هیدروژن به عنوان یکی از مخربترین گونه های اکسیژن فعال (ROS) و بسیار واکنش گر بوده و علاوه بر داشتن اثر سمی در سطح سلولی، در صورت عدم کارایی برخی سازوکارهای محافظت آنتی اکسیدانی نظیر حضور آسکوربات و آلفاتوکوفرول، خسارت های جدی و جبران ناپذیر به لیپیدهای غشاء، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک وارد می آورد. استنباط می شود که افزایش میزان H_2O_2 در تنش دمای پایین، همسو با افزایش تولید آلفاتوکوفرول و آسکوربیک اسید به عنوان مهمترین آنتی اکسیدان های گیاه در هنگام تنش سرما می باشد. این نتایج نشان می دهند گونه های فعال و مخرب اکسیژن نظیر H_2O_2 ، توانسته اند علاوه بر تنظیمات متابولیکی، نقش پیام رسان ثانویه را نیز بازی نموده و سبب افزایش تولید آنتی اکسیدان های فوق گردد. افزایش میزان آنتی اکسیدان ها در گیاهچه های برنج (Dionisio-Sese *et al.*, 1998) و تعدادی دیگر از گیاهان زراعی (Francois and Maas,)

1994) در تنش شوری، در بررسی تاثیر رادیکال های اکسیژن به پروتئین های گیاه برنج (Davis, 1987) و یا در زمان مطالعه اثرات بیولوژیکی رادیکال سوپر اکسید در گیاهان زراعی (Fridovich, 1986) قبلاً نیز گزارش شده است.

در زمان بروز تنش سرما انتقال الکترون از فتوسیستم II به I و گیرنده اصلی الکترون ($NADP^+$) مختل شده و الکترون به مولکول اکسیژن منتقل می شود (Hassibi *et al.*, 2007) و در این زمان بالا بودن میزان کلروفیل تنها سطح ROS را بالا می برد. یکی از راهکارهای کاهش تولید ROS همان کاهش میزان کلروفیل برگ خصوصاً کلروفیل b است که معمولاً در گیاهان با افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز صورت می گیرد (Guo, *et al.*, 2005). این آنزیم، زنجیره خطی کلروفیل را از قسمت حلقوی آن جدا می نماید که این زنجیره خطی همان فیتول¹ است که پیش ماده آلفاتوکوفرول می باشد. احتمالاً در این بررسی گیاهان مورد مطالعه توانستند با استفاده از این پیش ماده هم سطح آلفاتوکوفرول را افزایش داده و هم میزان کلروفیل را که در شرایط تنش می تواند مضر باشد کاهش دهند. از طرف دیگر، یادآوری می شود که آلفاتوکوفرول در گیاه، دارای مسیر زیست ساختی Doxy بوده که مسیری مشترک با برخی دیگر از مسیرهای مهم متابولیکی مانند مسیر زیست ساخت کاروتنوئیدها، کلروفیل و پلاستوکینول است (Shewmaker *et al.*, 1999). در این تحقیق مواجهه گیاه با تنش دمای پایین، نیاز به تولید آلفاتوکوفرول در گیاه افزایش یافت و احتمالاً ترکیب ژرانیل ژرانیل دی فسفات که یک ترکیب حد واسط برای زیست ساخت کلروفیل و کاروتنوئیدها می باشد، صرف تولید آلفاتوکوفرول شد و سطح تولید این دو ماده را کاهش داد.

میتلر (Mittler, 2002) در بررسی مسیر زیست ساختی

آسکوربات احیاء همبستگی مثبت و معنی داری با H_2O_2 داشته، به عنوان یک پیام رسان عمل نموده و میزان آسکوربات گیاه را همانند آلفاتوکوفرول افزایش داد. یاد آوری می شود که شکل آسکوربیک اسید احیاء پس از واکنش با H_2O_2 به شکل آسکوربیک اسید اکسید در آمده که شکل اکسید در چرخه گلوکاتیون-آسکوربیک اسید دوباره به شکل احیاء تبدیل می گردد. در شرایط تنش، باز سازی و احیاء آسکوربیک اسید نیاز به چرخه قدرتمندی دارد، زیرا گزارش شده است که در صورت عدم کارایی این سازوکار تمامی ذخیره آسکوربات موجود در برگ حتی در شرایط عادی در کمتر از چند دقیقه حتی در شرایط طبیعی مصرف می شود (Foyer and Lelandais, 1996).

همبستگی منفی و معنی دار آسکوربات اکسید با آسکوربات احیاء نشان دهنده آن است که با افزایش سطح تنش و تولید رادیکال های اکسیژن سرعت مصرف آسکوربات احیاء کمتر باز سازی آن در برگ و ریشه گیاهچه ها بود (جدول ۵) و شاید این امر می تواند دلیلی برای افزایش میزان MDA در شرایط تنش سرما بوده باشد (جدول ۳ و ۴). با این حال باید توجه داشت که اگر آسکوربات در حذف رادیکال های اکسیژن کارایی لازم را نداشت، کل بوته ها در همان چند ساعت اول تنش از بین می رفتند که با نتایج آزمایش سمیرنوف (Smirnoff, 2000) مطابقت داشت. هرچند در ژنوتیپ حساس در تنش سرما میزان تولید آسکوربات کل افزایش یافت، ولی به هر حال سطح بالای تولید H_2O_2 به همراه مقدار زیاد آسکوربات در ژنوتیپ حساس به سرمای هویزه نشان دهنده عدم کارایی چرخه حذف و غربال رادیکال های اکسیژن در این ژنوتیپ بود که نهایتاً سبب مرگ آن شد.

اریگونیک و دی تولیو (Arrigonic and De-Tullio, 2000) در آزمایش نقش آسکوربیک اسید در متابولیسم

ایزوپرنوئید 1-deoxy-D-xylolose-5-phosphate در گیاهان و شیومیکر و همکاران (Shewmaker et al., 1999) در آزمایش بررسی افزایش کاروتنوئیدها در دانه در شرایط تنش سرما، نتایج مشابهی گزارش نموده و اعلام داشتند که وظیفه اصلی آلفاتوکوفرول به عنوان یک آنتی اکسیدان محلول در چربی، حذف رادیکال هیدروکسیل است. این رادیکال می تواند باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلول شود (Burton and Landvick, 1989). در این آزمایش با افزایش سطح تولید MDA به عنوان شاخصی برای خسارت اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء (Jain et al., 2001) به طور معنی داری افزایش یافت (جدول ۳). سطح پایین MDA در ریشه و برگ ژنوتیپ های متحمل، نشان دهنده آن است که این گیاهان حفاظت بهتری در برابر اکسیداسیون ناشی از تنش دمای پایین داشتند. این نتایج با یافته های دمیرل و ترکان (Demiral and Turkan., 2005) در مطالعه و مقایسه پراکسیداسیون لیپیدها و سازوکار آنتی اکسیدان ها در برنج، مطابقت دارد. گو و همکاران (Guo et al., 2005) در بررسی گیاهچه های برنج در تنش سرما و کم آبی، افزایش تولید H_2O_2 و MDA را در واریته های حساس گزارش نمودند. افزایش سطح آلفاتوکوفرول در سلول های گیاهی تحت تنش، صرف نظر از نقش آنتی اکسیدانی آن می تواند به ثبات غشاء کمک نماید (Foyer and Lelandais, 1996). زنجیره فیتیل آلفاتوکوفرول می تواند به اسیدهای چرب آزاد متصل شده، از هم گسیختگی آن ها را به حداقل برساند و نشأت سلولی را کاهش دهد (Kagan, 1989). این آنتی اکسیدان علاوه بر برگ در ریشه گیاهچه های برنج نیز دیده شد و در شرایط تنش سطح تولید آن در ریشه نیز افزایش نشان داده است (Hess, 1993). نتایج ارایه شده در جدول ۵ نشان می دهد که

چرخه کالوین کاهش یافت. این امر باعث کاهش سرعت انتقال الکترون (ETR)^۱ و کاهش مقدار Fv:Fm (به ویژه در ارقام حساس) گردید (Hassibi *et al.*, 2007). به دلیل کاهش تولید ATP، حفره لومن در تایلاکوئید به شدت اسیدی شده و باعث افزایش اختلاف الکتروشیمیایی در دو طرف غشای تایلاکوئید شد، در نتیجه NPQ^۲ افزایش یافت، زیرا با اسیدی شدن حفره لومن فعالیت آنزیم دی اپوکسیداز افزایش یافت. به دنبال آن Fv:Fm در ژنوتیپ های حساس کاهش پیدا کرد و باعث بازداری کوئینون از پذیرش الکترون شد (Hassibi *et al.*, 2007). در ژنوتیپ های مورد مطالعه با افزایش شدت تنش، NPQ دیگر قادر به حذف مازاد انرژی الکترون های برانگیخته نبود در نتیجه مولکول اکسیژن به عنوان پذیرنده جایگزین برای الکترون وارد عمل گردید و با تولید سوپر اکسید و تبدیل آن به H₂O₂ توسط سوپر اکسید دیس موتاز (SOD)، موجب افزایش معنی دار سطح پراکسید هیدروژن در ژنوتیپ های مورد بررسی در شرایط تنش دمایی پایین شد. در ژنوتیپ های متحمل مورد بررسی افزایش سطح آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش، پراکسید هیدروژن (H₂O₂) را در چرخه آب - آب به آب تبدیل نمود. از طرفی آسکوربات پراکسیداز موجب افزایش NPQ گردید. در صورتیکه افزایش آسکوربات در ژنوتیپ حساس به سرمای هویزه نتوانست در چرخه آب - آب نسبت به پاکسازی گونه های اکسیژن فعال نقش موثری ایفا نماید. در مجموع وارسته هویزه برنج دارای ظرفیت حفاظتی آنتی اکسیدانی ضعیفی در مقایسه با ژنوتیپ های مورد مطالعه بود اما ژنوتیپ های متحمل به دمایی پایین شماره ۳۳ و ۳۴ نیز واکنش های متفاوتی را نسبت به سازوکارهای آنتی اکسیدانی که می توانست تحمل در برابر خسارت اکسیداتیو را القاء نماید به نمایش گذاشتند. نتایج بررسی آنتی اکسیدان ها

سلول های گیاهی و سمیرنوف (Smirnov, 2000) در بررسی نقش آسکوربیک اسید در گیاهان نیز نتایج مشابهی گزارش کردند.

آسکوربات احیاء همبستگی مثبت معنی داری با آلفاتوکوفرول برگ نشان داد (جدول ۵). این موضوع نشان دهنده همسو بودن تاثیر این دو آنتی اکسیدان مهم است. یا آوری می شود که بازسازی و احیاء آلفاتوکوفرول فقط در حضور اسکوربات احیاء امکان پذیر است (Eitenmiller and Landen, 1994). توماس و همکاران (Thomas *et al.*, 1992) گزارش کردند که آسکوربیک اسید می تواند از رادیکال های توکوفرولی که در تولید آلفاتوکوفرول نقش دارند، محافظت نماید.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان آنتی اکسیدان آلفاتوکوفرول در شرایط تنش دمایی پایین به طور معنی داری افزایش داشت، همچنین این آنتی اکسیدان دارای همبستگی منفی و معنی داری با مقدار کلروفیل بود. توضیح این مسئله که آیا منشاء تولید آلفاتوکوفرول تجزیه کلروفیل و شرکت فیتول آزاد شده از آن در زیست ساخت آلفاتوکوفرول بوده یا منشاء آن ژرانیل ژرانیل دی فسفات، که یک ترکیب حد واسط برای ساخت کلروفیل می باشد، است نیاز به انجام تحقیقات بیشتر دارد و چنانچه چرخه مربوط به هر یک از این واکنش ها به طور جداگانه از کار انداخته شود می توان با اطمینان منشاء آن را شناسایی نمود. در شرایط تنش دمایی پایین، افزایش فلئورسانس کلروفیل سبب کاهش فتوسنتز گردید، در نتیجه باعث کاهش کارایی کربوکسیلاسیون، کاهش سرعت دوباره سازی RUBP، کاهش فراهمی دی اکسید کربن از روزنه و کاهش انتقال کربوهیدرات ها به خارج از سلول مزوفیل گردید و به دنبال آن سرعت مصرف NADPH و ATP در

کلروفیل تولید گردد.

در برگ و ریشه نشان داد که آلفاتوکوفرول در برگ و آسکوربات در ریشه گیاهچه های برنج می توانند بهترین معیارهای انتخاب لاین های متحمل به دمای پایین باشند. در شرایط تنش سرما با کاهش مقدار کلروفیل در برگ، میزان آنتی اکسیدان آلفاتوکوفرول افزایش می یابد زیرا آلفاتوکوفرول می تواند از تجزیه کلروفیل و یا تغییر مسیر زیست ساخت

تشکر و سپاسگزاری

نگارندگان بدینوسیله از مدیریت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج به ویژه بخش فیزیولوژی به خاطر همکاری ها و مساعدت هایشان در مراحل اجرایی این تحقیق تشکر و سپاسگزاری می کنند.

References

- Arrigonic, O. and M. C. De-Tullio. 2000.** The role of ascorbic acid in cell metabolism between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *J. Plant Physiol.* 157: 481-488.
- Asada, K. 1999.** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639
- Ashraf, M. Y., A. R. Azmi, A. H. Khan and S. A. Ala. 1994.** Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat. *Acta Physiologiae Plantarum.* 16 (3): 185-190.
- Botsoglou, N., D. Fletouris, I. Psomas and A. Mantis. 1998.** Rapid gas chromatographic method for simultaneous determination of cholesterol and tocopherol in eggs. *AOAC Intern.* 8: 1177-1183.
- Bowers, M. C. 1994.** Environmental effects of cold on plants. *In: Plant-Environment Interactions.* R. E. Wilkinson (Ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 391-411.
- Burton, G.W. and K. U. Ingold. 1989.** Vitamin E as an *in vivo* and *in vitro* antioxidant. *In Vitamin E: biochemistry and health implications.* Diplock, A.T (Ed.) *Ann. NY Acad. Sci.* 57: 7-22.
- Chance, B. and C. Maehly. 1955.** Assay of catalase and peroxidase, *Meth. Enzymol.* 11: 764-775.
- Davey, M. W., E. Stals, B. Panis, J. Keulemans and R. L. Swennen. 2005.** High throughput of malondialdehyde in plant tissues. *Analytic. Biochem.* 347: 201-207.
- Davies, K. J. A. 1987.** Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
- Demiral, T. and I. Türkan. 2005.** Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Department of Biology, Science Faculty, Ege University, 35100 Bornova-Izmir, Turkey. *Env. Expt. Bot.* 53: 247-257.
- De-Tullio, M. C., C. Paciolla, F. Dalla-Vecchia, N. Rascio, D. E. S. Emerico, L. R. De Garal and O. Arrigeni. 1999.** Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta.* 209: 424-434.
- Dionisio- Sese, M. L. and S. Tobita. 1998.** Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135: 1-9.

- " "
- Dipierro, S. and S. D. Leonardis. 1997.** The ascorbate system and lipid peroxidation in stored potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *J. Expt. Bot.* 48: 779–783.
- Eitenmiller, R. R. and W. O. Jr. Landen. 1994.** Vitamin E: tocopherols and tocotrienols. *In* Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. R. R. Eitenmiller and W. O. Jr. Landen (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL. Pp. 123-142.
- Foyer, C. H. and M. A. Lelandais. 1996.** A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylacoid, chloroplast and plasmalema membranes of pea leaves mesophyll cells. *J. Plant Physiol.* 148: 391-398.
- Francois, L. E., and E.V. Maas. 1994.** Crop response and management on salt-affected soils, *In: Handbook of Plant and Crop Stress*, M. Pessarakli (Ed.), Marcel Dekker, New York. Pp. 149–181.
- Fridovich, I. 1986.** Biological effects of the superoxide radical, *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1–11.
- Fryer, M. J. 1992.** The antioxidant effects of thylakoid vitamin E. *Plant Cell Environ.* 15: 381-392.
- Gregorio, G. B., D. Senenadhira and R. Mendoza. 1997.** Screening rice for salinity tolerance. IRRI Discussion Paper Series Number 22. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. 27 p.
- Guo, Z., H. Tan, Z. Zhu, S. Lu and B. Zhou. 2005.** Effect of intermediates on ascorbic acid and oxalate biosynthesis of rice and in relation to its stress resistance. Biotechnology Laboratory for Turfgrass and Forages, College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 955–962.
- Hassibi, P., F. Moradi and M. Nabipour. 2007.** Screening of rice genotypes for low temperature stress-using chlorophyll fluorescence. *Iranian J. Crop Sci.* 9(1): 14-31.
- Hess, J. L. 1993.** Vitamin E, α -Tocopherol. *In: Antioxidants in Higher Plants*. R.G. Alshera and J. L. Hess (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL. Lichtenthaler, H. K. The 1-Deoxy-D-xylose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999. 50: 47-65.
- Horemans, N., C. H. Foyer, G. Potters and H. Asard. 2000.** Ascorbate functions and associated transport systems in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 38:531-540.
- Hung, S-H., C-W. Yu and C. H. Lin. 2005.** Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Studies Bull. Academic J.* 46: 1-10.
- Jain, M., G. Mathur, S. Koul and N. B. Sarin. 2001.** Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 463–468.
- Kagan, V. E. 1989.** Tocopherol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acids, and lysophospholipids. *In* Vitamin E: biochemistry and health implications. A.T. Diplock (Ed.). *Ann. NY Acad. Sci.* 570: 121-135.
- Karpinski, S. 1997.** Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell.* 9: 624–640.

- Lee, T. M. and Y. H. Lin. 1995.** Changes in soluble and cell wall bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and roots. *Plant Sci.* 106:1–7.
- Liebler, D. C. 1998.** Antioxidant chemistry of α -tocopherol in biological systems: roles of redox cycles and metabolism. *In: Subcellular Biochemistry. Volume 30: fat soluble vitamins.* P. Quinn and V.E. Kagan (Eds.). Plenum Press, New York. Pp. 97-115.
- Lyons, J. M., J. K. Raison, and P. L. Steponkus. 1979.** The plant membrane in response to low temperature: an overview. *In: Low Temperature Stress in Crop Plants: The Role of the Membrane.* J. M. Lyons, D. Graham and J. K. Raison (Eds.). Academic Press, London, Pp. 1–24.
- Mittler, R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 9 -15.
- Munne-Bosch, S., K. Schwarz and L. Alegre. 1999.** Enhanced formation of α -tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. *Plant Physiol.* 121: 1047-1052.
- Nishida, I. and N. Murata. 1996.** Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipid. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 541–568.
- Noctor, G. and C. H. Foyer. 1998.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
- Packer, L. and S. Landvik. 1989.** Vitamin E: introduction to biochemistry and health benefits. *In: Vitamin E: biochemistry and health implications.* , A.T. Diplock (Ed.). NY. Acad. Sci, 570: 7-22.
- Quinn, P. J. 1998.** Localization of vitamin E in membranes. *In: Subcellular Biochemistry. Volume 30: fat soluble vitamins.* Quinn, P. and V. E. Kagan (Eds.). Plenum Press, New York. Pp. 231-239.
- Raison, J. K. and E. A. Chapman. 1976.** Membrane phase changes in chilling sensitive *Vigna radiata* and their significance to growth. *Aust. J. Plant Physiol.* 3: 291–299
- Schulze-Siebert, D., R. Homeyer, J. Soll and G. Shultz. 1987.** Synthesis of Plastoquinone-9, α -tocopherol, and phylloquinone (Vitamin K) and its integration in chloroplast carbon metabolism of higher plants. *In: Metabolism, Structure, and Function of Plant Lipids.* P. K. Stumpf, J. B. Mudd and W. D. Nes (Eds.). Plenum Press, New York. Pp. 23-59.
- Shewmaker, C. K., J. A. Sheehy, M. Daley, S. Holburn and D. Y. Ke. 1999.** Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *The Plant J.* 20: 401-412.
- Smirnoff, N. 1996.** The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* 78: 661-669
- Smirnoff, N. 2000.** Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinions Plant Biol.* 3: 229-235.
- Stewart, R. C. T. and J. D. Bewley. 1980.** Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 65: 245-248
- Thomas C. E., L. R. Mclean, R. A. Parker and D. F. Ohlweiler. 1992.** Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids.* 27: 543-550.

- " "
- Walker M. A. and B. D. McKersie. 1993.** Role of ascorbateglutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *J. Plant Physiol.* 141: 234–239.
- Wassal, S. R., L. Wang, R. C. McCabe, W. D. Ehringer, W. Stillwell and N. M. R. Deuterium. 1986.** Study of the interaction of alpha-tocopherol with a phospholipid model membrane. *Biochem.* 25: 319-326.
- Wildi, B. and C. Lutz. 1996.** Antioxidant compositions of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant Cell Environ.* 19:138-146.
- Yoshida, S. 1981.** Fundamentals of rice crop science. Los Banos, Philippines. pp. 243.

" ... "

Effect of low temperature on antioxidant mechanisms in sensitive and tolerance (*Oryza sativa* L.) genotypes in seedling stage

Hassibi P.¹, F. Moradi² and M. Nabipour³

ABSTRACT

Hassibi, P., F. Moradi and M. Nabipour. 2008. Effect of low temperature on antioxidant mechanisms in sensitive and tolerance (*Oryza sativa* L.) genotypes in seedling stage. **Iranian Journal of Crop Sciences. 10(3): 262-280 (in Persian).**

In order to study of oxidative stress caused by low temperature stress on three rice (*Oryza sativa* L.) genotypes, 2-week-old rice seedlings were subjected to 13/15°C and 22/29°C as control (night/day, respectively) in phytotrone for 14 days. This experiment was conducted as factorial using completely randomized design with four replications. Low temperature stress caused significant increases in ascorbate (total, oxide and reduce) and α -tocopherol levels in both roots and leaves. Both roots and leaves of cold tolerant genotype IRCTN33, ascorbate oxide was significantly higher than other genotypes. Leaf hydrogen peroxide in sensitive genotype Hoveizeh had significant increase, which had negative correlation with amount of chlorophylls content. Significant increase in MDA (malondialdehyde) in Hoveizeh leaves showed severe membrane phospholipids peroxidation. In leaves the lowest amount of H₂O₂ was detected in cold tolerant genotype IRCTN34. Root ascorbate oxide form in IRCTN34 was significantly less than other genotypes. However, Hoveizeh had weak antioxidant mechanism among studied genotypes, while it was highly efficient in low temperature tolerant genotypes (IRCTN33 and IRCTN34). Therefore, it is possible to suggest them as low temperature tolerant parents to be used in rice breeding programs.

Key words: α -tocopherol, Ascorbic acid, H₂O₂, Low temperature stress, Rice.

Received: October, 2007.

1 - Assistant prof., Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran.

2 - Assistant prof., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII) Karaj, Iran (Corresponding author)

3 - Associated prof., Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran.