Photoprotection Mechanisms in wheat Plants under High Light and Cold Temperature Conditions

Ghader Habibi *, Nasrin Servatian and Masumeh Abedini

Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Iran

Abstract

High light damages photosynthetic machinery, primarily photosystem II (PSII), and causes photoinhibition that can limit plant photosynthetic activity, growth and productivity. To address this issue, we investigated the basic photoprotection mechanisms including ROS scavenging activity and phenolic compounds production in wheat (*Triticum aestivum* L.), as a C_3 plant, after treatment with low temperature (4°C) and high irradiance (450 and 850 µmol m^{-2} s^{-1}). Results indicated that wheat plants showed more tolerance to low temperature. Increased tolerance in cold-treated plants was achieved through enhancement in antioxidant system activity. Plants treated with light intensity at 850 µmol m^{-2} s^{-1} showed the highest level of stress leading to lower maximal quantum yield of photosystem II (PSII) (F_v/F_m) values. In contrast, the light intensity at 450 µmol m^{-2} s^{-1} did not reduce significantly the maximal quantum yield of PSII. This may be attributed to the enhancement of catalase (CAT) activity and anthocyanin synthesis (screening of photoradiation in epidermis cells), and consequently further protection of PSII from photodamage.

Keywords: Photodamage, Photoprotection, Maximal Quantum Yield of Photosystem II, Cold Stress, ROS Scavenging System.

* Corresponding Author: gader.habibi@gmail.com

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال نهم، شماره سی و یکم، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۷۲-۵۹
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۲۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۱۱/۰۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۱۱/۱۳

بررسی سازوکارهای حفاظت نوری در گندم در شرایط سرما و نور شدید

قادر حبیبی *، نسرین ثروتیان و معصومه عابدینی
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

نور شدید به دستگاه فتوسنتزی به‌ویژه فتوسیستم II آسیب می‌رساند و ظهور پدیدهٔ مهار نوری را باعث می‌شود. پدیدهٔ مهار نوری می‌تواند فعالیت فتوسنتزی، رشد و محصول‌دهی گیاهان را کاهش دهد. در پژوهش حاضر، سازوکارهای حفاظت نوری فتوسیستم II شامل فعالیت سیستم جاروب کنندهٔ گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) و متابولیسم فنلی در گندم (*Triticum aestivum* L.) از دستهٔ گیاهان C_3، پس از تیمار با دمای اندک (۴ درجهٔ سانتیگراد) و شدت نور زیاد (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) بررسی شدند. مقایسهٔ گیاهان تیمارشده با سرما با گیاهان شاهد (در دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) نشان داد که گندم به‌علت فعالیت کارآمد سیستم آنتی‌اکسیدان، مقاومت بیشتری به تنش دمای اندک دارد. نتایج نشان داد که با افزایش شدت نور به ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، بیشینهٔ عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) کاهش یافت و پدیدهٔ مهار نوری را باعث شد. در مقابل، گندم در شدت نور ۴۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه با افزایش مؤثر سازوکارهای حفاظت نوری شامل فعالیت آنزیم کاتالاز (سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی) و مقدار آنتوسیانین برگ‌ها (جاذب‌های نور اضافی و فیلترهای نوری در اپیدرم) توانست فتوسیستم‌ها را دربرابر آسیب نوری حفاظت کند و از کاهش F_v/F_m ممانعت کند.

واژه‌های کلیدی: آسیب نوری، حفاظت نوری، بیشینهٔ عملکرد فتوسیستم II، تنش سرما، سیستم جاروب‌کنندهٔ ROS.

مقدمه

فتوسنتز ازجمله فرایندهایی است که نور شدید (Azzabi *et al*., 2012) و دمای اندک (Yamori *et al*., 2011) به‌شدت بر آن اثر می‌گذارد. با افزایش شدت نور، ظرفیت زنجیرهٔ انتقال الکترونی تکمیل می‌شود و احتمال اکسیداسیون نوری افزایش می‌یابد. اکسیداسیون نوری به آسیب و تجزیهٔ پروتئین‌ها و مهار نوری منجر می‌شود (Azzabi *et al*., 2012). کاهش

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: habibi@pnu.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۱۳۷۸۲۸۰۵۵

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

دما، تثبیت دی‌اکسیدکربن را در گیاهان محدود می‌کند (Yamori *et al*., 2010). در بسیاری از پژوهش‌های پیشین، پدیدهٔ مهار نوری در تیمار هم‌زمان سرما و شدت نور زیاد و متوسط گزارش شده است (Scheller and Haldrup, 2005; Ivanov *et al*., 2012). گزارش‌ها نشان می‌دهد که شدت نور زیاد، تخریب پروتئین D1 موجود در فتوسیستم II و نیز افزایش انباشت گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) را در کلروپلاست موجب می‌شود (Takahashi and Badger, 2011). از سوی دیگر، سرما به‌تنهایی نیز افزایش شکل‌گیری ROS را باعث می‌شود. وقتی تنش نور شدید با تنش سرما همراه می‌شود، تشدید شکل‌گیری گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن را سبب می‌شود (Pospiŝl, 2012). انباشت ROS به پراکسیداسیون لیپیدهای غشای تیلاکوئید، مهار سنتز پروتئین D1 و درنهایت مهار بازسازی فتوسیستم II منجر می‌شود (Chen *et al*., 2012). در این شرایط، گیاه با افزایش فروکشی غیر فتوشیمیایی (NPQ)، جریان انتقال الکترون چرخه‌ای و همچنین سایر سازوکارهای حفاظت نوری می‌تواند با تداوم مهار نوری (ایجاد کنندهٔ آسیب نوری) مقابله کند (Takahashi and Badger, 2011). یکی از مهم‌ترین سازوکارهای حفاظت نوری در گیاهان، فعالیت سیستم جاروب‌کنندهٔ ROS است. گیاهان دو سازوکار آنتی‌اکسیدانی شامل سازوکار آنزیمی (آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز و ...) و غیرآنزیمی (آسکوربیک اسید، گلوتاتیون احیاءشده، توکوفرول و ...) در پاسخ به ROS دارند (Habibi, 2014). همچنین گیاهان در شدت‌های زیاد نور با جابه‌جایی کلروپلاست‌ها، از شدت صدمه‌های نوری می‌کاهند. محل کلروپلاست‌ها در گیاهان، سرخس‌ها، خزه‌ها و جلبک‌های سبز به گونه‌ای تغییر می‌کنند که شدت نور بهینه را جذب کنند (Suetsugu and Wada, 2007). کلروپلاست‌ها هنگام تابش نور ضعیف، موازی با راستای نور قرار می‌گیرند که نور موثر را جذب کنند و در نور شدید، عمود بر راستای نور قرار می‌گیرند که از جذب مضاعف نور جلوگیری کنند (Tholen, 2008). گیاهان به‌طور اجتناب‌ناپذیری در معرض تابش نور مرئی و اشعهٔ فرابنفش قرار می‌گیرند که این تابش‌ها علاوه‌بر DNA و پروتئین‌ها به فتوسیستم I و II نیز آسیب می‌زنند (Takahashi, 2010; Pourakbar and Abedzadeh, 2014). برای مقابله با چنین آسیب‌هایی، گیاهان مولکول‌های فیلترکننده و جاذب پرتوی فرابنفش را از جمله ترکیبات فنلی یا فنولیک‌ها (مانند فنل‌ها و آنتوسیانین‌ها) در سیتوپلاسم می‌سازند و در واکوئل انباشته می‌کنند (Winkel-Shirley, 2002). مولکول‌های فیلترکننده و جاذب پرتوی فرابنفش در نور شدید و فرابنفش افزایش می‌یابد و از تجزیهٔ پروتئین D1 و آسیب به فتوسیستم II جلوگیری می‌کند.

بسیاری از گیاهان می‌توانند با فرایند عادت به سرما، تحمل به سرما و انجماد را در خود افزایش دهند (Zamani *et al*., 2012). بررسی‌ها نشان می‌دهند که ارقام پاییزه و حتی بیشتر ارقام بهارهٔ گندم می‌توانند سرمای ۴ درجهٔ سانتیگراد را تحمل کنند (Winfield *et al*., 2010; Wang *et al*., 2015). ازآنجاکه در ماه‌های اول فصل بهار، شاهد تابش نور نسبتا شدید با سرما هستیم، در بررسی حاضر، از تیمارهای هم‌زمان سرما و شدت‌های مختلف نور استفاده شد. از سوی دیگر،

بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد که تیمار سرما هنگام تابش نور می‌تواند تشدید مهار نوری را حتی در شدت نورهای اندک سبب شود (Takahashi and Badger, 2011). تاکنون پژوهشی دربارهٔ آثار هم‌زمان سرما و شدت‌های مختلف نور در گیاه گندم، برای تعیین سازوکارهای حفاظت نوری این گیاه انجام نشده است. بنابراین در پژوهش حاضر تلاش شده است ضمن بررسی آثار هم‌زمان سرما و شدت‌های مختلف نور بر گیاه گندم، با اندازه‌گیری فعالیت فتوشیمیایی فتوسنتز، سیستم جاروب‌کنندهٔ ROS و متابولیسم فنلی، سازوکارهای حفاظت نوری گندم را بررسی شود.

مواد و روش‌ها

بذر گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.)، رقم بهارهٔ آرتا تهیه‌شده از مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان غربی استفاده شد. بذرها به‌مدت ۵ تا ۷ دقیقه با سدیم هیپوکلریت تجاری ۵ درصد، ضدعفونی و سپس به دفعات با آب مقطر شستشو شدند. گیاهان در گلخانه با دورهٔ روشنایی ۱۰/۱۴ ساعت، رطوبت ۵۰/۶۰ درصد و دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد در دورهٔ روشنایی و ۱۹ درجهٔ سانتیگراد در دورهٔ تاریکی و شدت نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، تامین‌شده با لامپ‌های فلورسنت، رشد کردند. پس از رشد به‌مدت سه هفته در شرایط پیش‌تیمار، برای افزایش آثار شدت نور و بازسازی شرایط طبیعت در فصل بهار، گیاهان به مدت ۴ روز در تیمارهای نوری با شدت های مختلف شامل ۲۰۰، ۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند. در روز چهارم، نصف گیاهان هر گروه، در تیمار سرمای ۴ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند و بلافاصله گیاهان برداشت شدند. سنجش پارامترهای فلوئورسانس کلروفیل بر سومین برگ جوان و قبل از برداشت و توزین گیاهان انجام شد. سنجش رنگیزه‌ها و متابولیت‌ها بر نمونه‌های تازه‌برداشت‌شده یا نگهداری‌شده در ازت مایع، انجام شد.

سنجش شاخص‌های فلوئورسانس کلروفیل: برای تعیین فلوئورسانس کلروفیل، از دستگاه فلوئورسانس‌سنج (مدل Pocket PEA، شرکت Hansatech، انگلستان) استفاده شد. پارامترهای فلوئورسانس کلروفیل در برگ‌های سازش‌یافته با تاریکی (به‌مدت حداقل ۲۰ دقیقه) شامل F_0 (فلوئورسانس پایه) و F_m (فلوئورسانس بیشینه) اندازه‌گیری شدند. برای ارزیابی پدیدهٔ مهار نوری، از شاخص بیشینهٔ عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m)، استفاده شد (Strasser and Strasser *et al.*, 1995; Azzabi *et al.*, 2012).

سنجش رنگیزه‌های برگ: برای سنجش مقدار رنگیزه‌ها، نمونه‌های گیاهی با آب دوبار تقطیر شستشو و روی کاغذ صافی خشک شدند. پس از اندازه‌گیری وزن تر (تقریباً ۲۰۰ میلی‌گرم)، نمونه‌ها داخل ورقهٔ آلومینیومی قرار گرفته و در ازت مایع تا زمان سنجش نگهداری شدند. استخراج مادهٔ مد نظر، با استون، روی یخ و با هاون چینی سرد انجام شد. غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها با اسپکتروفتومتر (مدل UV-VIS Scanning UV-3100PC، شرکت Mapada، تایلند)، پس از ۲۴ ساعت استخراج در استون ۱۰۰ درصد تعیین شد. جذب در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت کلروفیل a، b،

کلروفیل کل و کاروتنوئیدها با رابطه‌های ۱ تا ۳ محاسبه شدند (Lichtenthaler and Wellburn, 1985).

رابطهٔ ۱ $Chl\ a=11.75\ A_{662} - 2.350\ A_{645}$

رابطهٔ ۲ $Chl\ b=18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}$

رابطهٔ ۳ $Total\ carotenoids=1000\ A_{470} - 2.270\ Chl\ a - 81.4\ Chl\ b/227$

سنجش فعالیت آنزیم‌ها: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز موجود در عصاره، براساس درصد ممانعت از احیاء نیترو بلو تترازولیوم به ترکیب ارغوانی‌رنگ دی‌فورمازان با رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) حاصل از تجزیهٔ نوری ریبوفلاوین اندازه‌گیری شد (Giannopolitis and Ries, 1977). نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت، در ازت مایع پودر شدند و عصارهٔ آنزیمی در بافر ۲۵ mM از هیدروکسی اتیل پیپرازین اتان سولفونیک اسید با pH=۷/۸ و حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار استخراج شد. عصاره‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند و روشناور برای سنجش فعالیت استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل هیدروکسی اتیل پیپرازین اتان سولفونیک اسید ۲۵ میلی‌مولار با pH=۷/۶، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۱ میلی‌مولار، سدیم کربنات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۱۰/۲)، L–متیونین ۱۲ میلی‌مولار، نیترو بلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار و ریبوفلاوین ۱ میکرومولار اضافه شد و مخلوط حاصل به‌مدت ۲۰ دقیقه در شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه برای انجام واکنش قرار گرفت. برای تهیهٔ نمونه‌های شاهد، مخلوط یادشده، بدون افزودن عصارهٔ آنزیمی تهیه و جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم براساس غلظت پروتئین آنزیمی لازم برای القاء ۵۰ درصد ممانعت از احیاء نیترو بلو تترازولیوم نسبت به نمونه‌های شاهد بدون عصارهٔ آنزیمی محاسبه و به‌صورت واحد فعالیت بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز مطابق روش Simon و همکاران (۱۹۷۴)، براساس کاهش جذب هیدروژن پراکسید در ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. عصارهٔ آنزیمی پس از پودرشدن نمونه‌ها در ازت مایع، در بافر فسفات با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و pH=۷ استخراج و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. برای سنجش فعالیت آنزیم، غلظت مناسبی از عصاره به محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) و هیدروژن پراکسید ۱۰ میلی‌مولار افزوده و تغییرات جذب به‌مدت دو دقیقه با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. درنهایت، فعالیت آنزیم براساس ضریب خاموشی هیدروژن پراکسید (۰/۰۴۱ بر میلی‌مولار بر سانتی‌متر) برحسب میکرومول هیدروژن پراکسید بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه محاسبه شد.

سنجش متابولیت‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدان: سنجش مالون‌دی‌آلدهید که معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها است براساس روش Boominathan و Doran (۲۰۰۲) انجام شد. عصارهٔ برگ در محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید استخراج و به‌مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. نسبت ۱ به ۴ از روشناور حاصل، با محلول ۲۰ درصد از تری کلرواستیک اسید حاوی ۰/۵ درصد تیو باربیتوریک اسید در لولهٔ آزمایش با هم مخلوط شدند و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای

۹۵ درجهٔ سانتیگراد قرار گرفتند؛ سپس لوله‌ها به‌سرعت در یخ، سرد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. هم‌زمان با عصاره‌های برگ، محلول‌های استاندارد در محدودهٔ صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۱،۳،۳- تترا اتوکسی پروپان تهیه و جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند. در نهایت، غلظت مالون‌دی‌آلدهید نمونه‌ها برحسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

غلظت هیدروژن پراکسید براساس روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) به دست آمد. محلول استخراج برگ‌ها محلول تری کلرواستیک اسید (۰/۱ درصد وزنی به حجمی) بود. عصاره‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ و روشناور حاصل استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل بافر پتاسیم فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و پتاسیم یدید یک مولار اضافه شد و مخلوط حاصل به‌مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی برای انجام واکنش قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر، بر اساس نمودار استاندارد هیدروژن پراکسید در محدودهٔ صفر تا ۵۰ نانومول محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز: فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز مطابق روش Zucker (۱۹۶۵) اندازه‌گیری شد. عصارهٔ آنزیمی در بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۸، حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید با غلظت ۲ میلی‌مولار، مرکاپتواتانول ۱۸ میلی‌مولار و تریتون X-100 ۰/۱ درصد استخراج شد. عصاره‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند و روشناور برای سنجش فعالیت استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل بافر سدیم بورات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸/۸) و L-فنیل‌آلانین ۵ میلی‌مولار اضافه شد و مخلوط حاصل به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجهٔ سانتیگراد برای انجام واکنش قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۲۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند. یک واحد فعالیت آنزیم براساس غلظت پروتئین آنزیمی لازم برای تولید یک نانومول سینامیک اسید محاسبه شد.

سنجش فنل کل: ازآنجاکه بیشترین ترکیبات فنلی گیاهان از نوع پلی‌فنل‌ها هستند، از روش معرف فنلی فولین سیو کالتئو (Mavi *et al.*, 2004) برای سنجش فنل کل استفاده شد؛ به‌این‌منظور ۵ گرم برگ، پس از پودرشدن با هاون در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌مدت ۳۰ دقیقه جوشانده و با کاغذ واتمن شمارهٔ ۴۲ صاف شد. غلظت ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین سیو کالتئو با ۲۵ میکرولیتر عصاره و ۵۰۰ میکرولیتر محلول آبی سدیم کربنات ۲۰ درصد مخلوط شد. نمونه‌های شاهد، بدون عصاره بودند. پس از قراردادن نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه به‌مدت ۳۰ دقیقه، جذب آن‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت فنل کل براساس نمودار استاندارد گالیک اسید به دست آمد. این سنجش برای هر عصاره ۴ بار تکرار شد و میانگین فنل‌کل موجود در عصارهٔ تیمارها به‌صورت میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم بافت بیان شد.

سنجش فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها: برای سنجش غلظت فلاونوئیدها، نمونه‌های برگ در متانول حاوی آلومینیوم کلراید دو درصد استخراج شد و پس از سانتریفیوژ، روشناور برداشت و جذب آن در طول موج

۴۱۵ نانومتر خوانده شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر تا ۱۶ میلی‌گرم بر لیتر) برای نمونهٔ استاندارد استفاده و غلظت فلاونوئیدها براساس واحد میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر محاسبه شد (Simon *et al.*, 1974). برای سنجش آنتوسیانین‌ها، همگنای حاصل از استخراج در حلال متانول: هیدروکلریک اسید (۹۸:۲ v/v) به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول روشناور با ۴۹/۵ میلی‌لیتر از بافر یک میلی‌مولار ۲- ان - مورفولینو اتان سولفونیک اسید با pHهای ۱ و ۴/۵ در بالن ژوژه‌های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و پس از ۳۰ دقیقه، جذب در ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت آنتوسیانین‌ها براساس واحد میلی‌گرم سیانیدین-۳-گلوکوزید بر گرم وزن‌تر گزارش شد (Munns *et al.*, 2006).

اندازه‌گیری پروتئین کل: عصارهٔ پروتئینی در بافر سدیم فسفات با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و pH=۶/۸ استخراج و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. از روشناور حاصل برای سنجش پروتئین کل با روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد.

تحلیل آماری: آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. تحلیل داده‌ها با نرم افزار سیگما استات (نسخهٔ ۳/۵) با آزمون توکی در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج

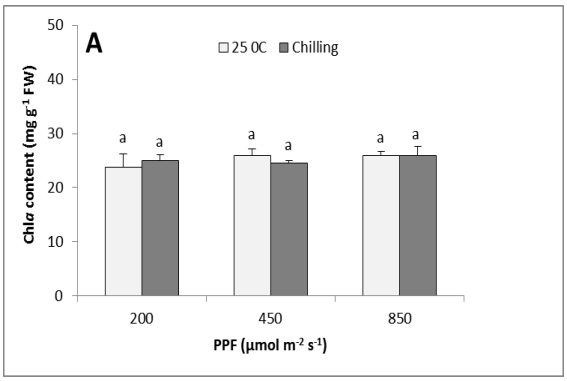
بررسی نتایج تأثیر سرما و شدت های مختلف نور بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که هیچ‌یک از این تیمارها به‌تنهایی یا با هم نتوانستند تغییر معنی‌داری در میزان رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کاروتنوئید برگ‌ها ایجاد کنند (شکل‌های ۱-A تا C). بررسی شاخص‌های فلورسانس کلروفیل نشان داد که بیشینهٔ عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) با افزایش شدت نور به ۸۵۰، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. تیمار سرما به‌تنهایی بر این شاخص تاثیر نگذاشت (شکل ۲).

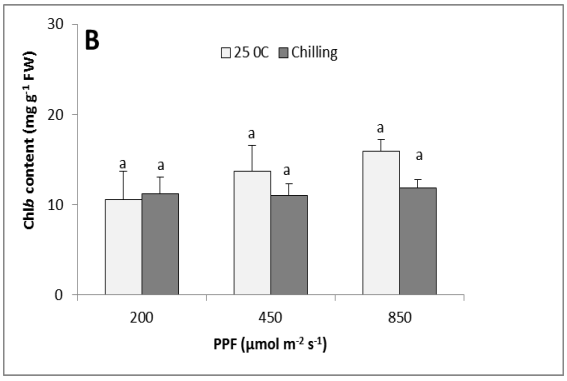
با افزایش شدت نور، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تغییر نکرد؛ در حالی که سرما در شدت نور ۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه افزایش فعالیت آنزیم را نسبت به گروه شاهد (شدت نور ۲۰۰ و دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد) باعث شد (شکل ۳-A). بررسی اثر شدت‌های مختلف نور و سرما بر فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که سرما فعالیت این آنزیم را در شدت نور ۴۵۰ به‌طور معنی‌دار افزایش داد؛ ولی با افزایش شدت نور به ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، سرما بر فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور معنی‌دار تاثیر نگذاشت. به‌عبارت‌دیگر، فعالیت آنزیم کاتالاز بر اثر سرما، تنها در شدت نور ۴۵۰ نسبت به شاهد، افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۳-B).

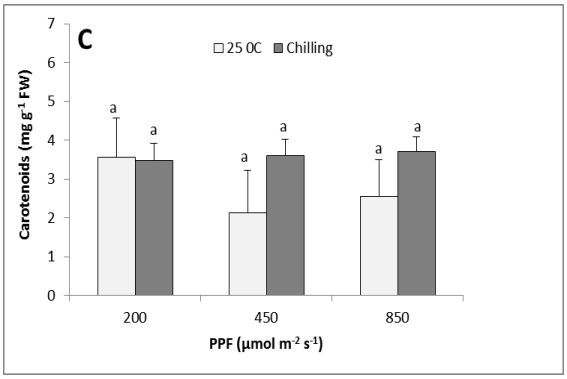
هیچ‌یک از تیمارهای سرما و شدت‌های مختلف نور تغییر معنی‌داری در مقدار انباشت پراکسید هیدروژن در برگ‌های گیاه گندم، ایجاد نکردند (شکل ۴-A). بررسی مقدار مالون‌دی‌آلدهید برگ‌ها (شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در برگ ها) نشان داد که تیمار سرما به‌تنهایی تأثیری بر مقدار مالون‌دی‌آلدهید نداشت و تنها زمانی‌که با شدت نور زیاد همراه بود، افزایش معنی‌دار مقدار مالون‌دی‌آلدهید را موجب شد؛ به‌این‌دلیل‌که شدت نور ۸۵۰ به‌تنهایی نیز مالون‌دی‌آلدهید را در برگ‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش داد (شکل ۴-B). بررسی مقدار پروتئین محلول در برگ های گیاه گندم

هنگام اعمال تیمار سرما و نور شدید، به‌تنهایی و هم‌زمان نشان داد که هیچ‌یک از تیمارها تغییر معنی‌داری در مقدار پروتئین برگ‌ها ایجاد نکردند (شکل ۵).

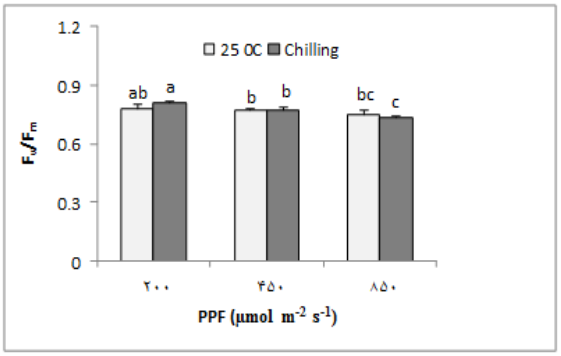
باتوجه‌به تغییرنکردن مقدار فنل در تیمارهای مختلف اعمال‌شده در این آزمایش، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز نیز در هیچ‌یک از تیمارها تغییر معنی‌داری نشان نداد (شکل ۶-A). بررسی متابولیسم فنل‌ها در این آزمایش نشان داد که هیچ‌یک از تیمارهای سرما و شدت نور نتوانستند تغییر معنی داری در مقدار فنل کل ایجاد کنند (شکل ۶-B). بررسی مقدار آنتوسیانین تیمارهای مختلف اعمال‌شده در این آزمایش نشان داد که شدت نور ۴۵۰ به‌تنهایی و با سرما، افزایش معنی‌دار آنتوسیانین را در برگ‌ها سبب شد (شکل ۷-A). همچنین سرما کاهش معنی‌دار مقدار فلاونوئید در همهٔ شدت‌های نور را شامل ۲۰۰، ۴۵۰ و ۸۵۰ باعث شد (شکل ۷-B).



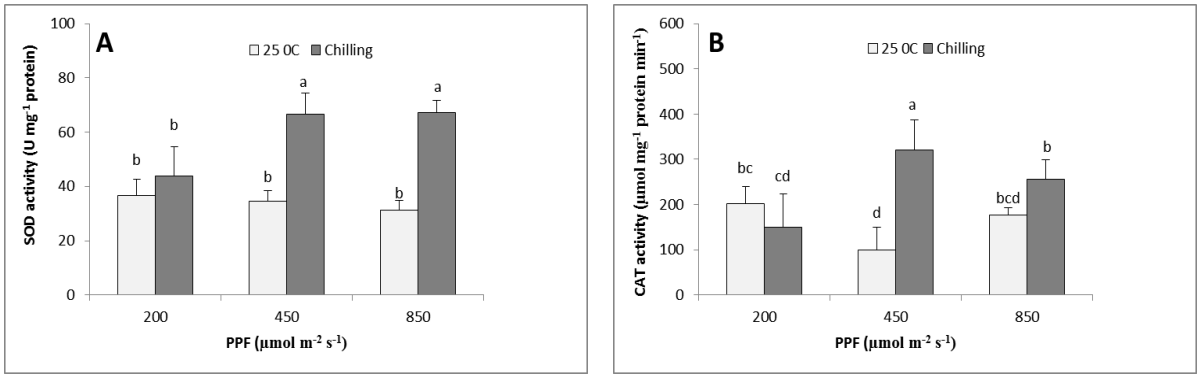




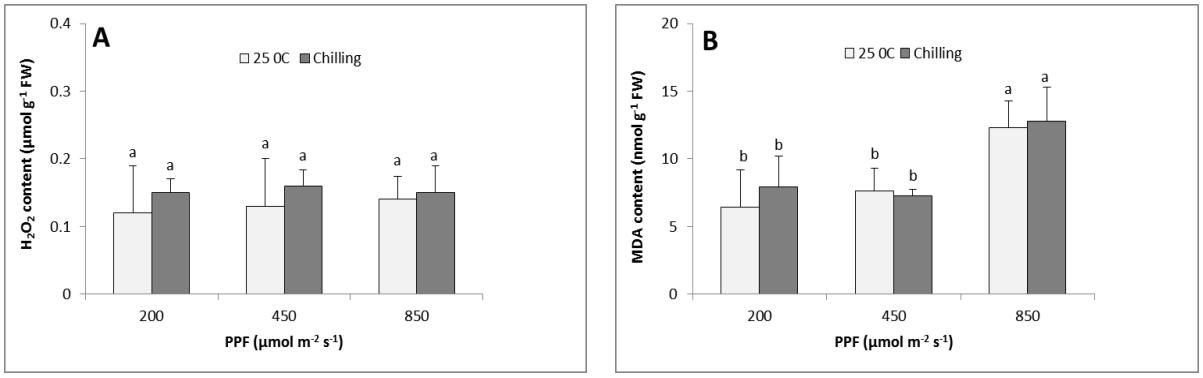
شکل ۱- میزان رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کاروتنوئید (میلی‌گرم/گرم وزن تر) در گندم در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه به‌مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۱۲ ساعت)- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± StD است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.



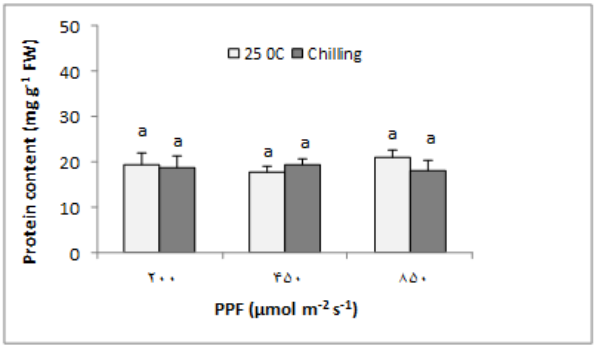
شکل ۲- تغییرات بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) در گندم در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه به‌مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۱۲ ساعت)- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± StD است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.



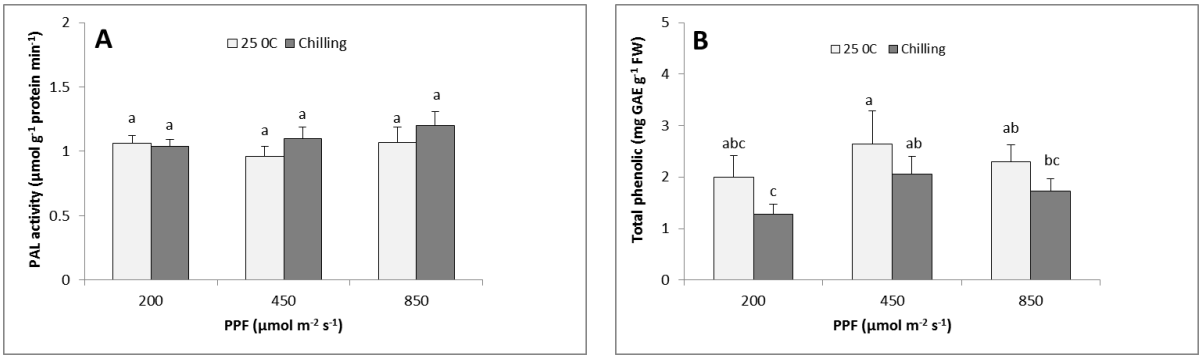
شکل ۳- فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در گندم در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه به‌مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۱۲ ساعت)- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± StD است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.



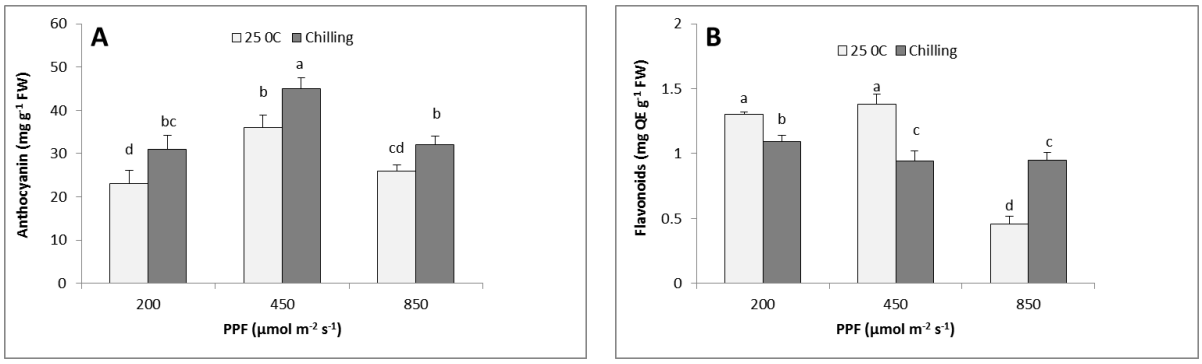
شکل ۴- مقدار انباشت هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و مالون‌دی‌آلدهید (MDA) در برگ‌های گیاه گندم در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه به‌مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۱۲ ساعت)- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± StD است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۵ است.



شکل ۵- مقدار پروتئین محلول در برگ‌های گیاه گندم در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه به‌مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۱۲ ساعت)- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± StD است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.



شکل ۶- مقدار فنل و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) در گندم در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه به‌مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۱۲ ساعت)- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± StD است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.



شکل ۷- مقدار آنتوسیانین و فلاونوئید در برگ‌های گیاه گندم در شرایط شاهد (دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد و شدت نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و شدت‌های مختلف نوری (۴۵۰ و ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه به‌مدت چهار روز) و دمای پایین (۴ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۱۲ ساعت)- مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± StD است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

بحث

گندم گیاهی مقاوم به سرما به شمار می‌رود (Winfield *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015). شاخص F_v/F_m یکی از شاخص‌های مهم برای تعیین مقاومت به انواع تنش‌ها ازجمله پاتوژن‌ها (Rousseau *et al.*, 2013)، خشکی (Woo *et al.*, 2008)، سرما (Ehlert and Hincha, 2008) و دما (Xu *et al.*, 2014) است و تعیین F_v/F_m در برگ‌های گندم، شاخص مهمی برای ارزیابی مقاومت این گیاه به سرما است. در پژوهش حاضر، تغییرنکردن F_v/F_m (شاخص عملکرد فتوسیستم II) و همچنین داده‌های مالون‌دی‌آلدهید (شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء) بر اثر سرمای اعمال‌شده نشان داد که گیاه گندم به این دما مقاوم است. همچنین همبستگی بین تحمل به سرما و مقدار F_v/F_m در گیاه آرابیدوپسیس (Ehlert and Hincha, 2008) و انگور (Jiang and Howell, 2002) نشان داده شده است.

یکی از سازوکارهای مهم حفاظت نوری در گیاهان، فعال‌شدن سیستم جاروب‌کنندهٔ مولکول‌های

ROS است (Telfer, 2014). در واقع با افزایش شدت نور، به‌علت اشباع ظرفیت زنجیرهٔ انتقال الکترونی، احتمال اکسیداسیون نوری افزایش می‌یابد و اکسیداسیون نوری، آسیب و تجزیهٔ پروتئین کمپلکس فتوسیستم II یعنی پروتئین D1 را باعث می‌شود. گیاه در این شرایط، با افزایش سنتز پروتئین D1 و فعال‌کردن چرخهٔ بازسازی فتوسیستم II، ترمیم مجدد فتوسیستم II را سبب می‌شود (Takahashi and Badger, 2011)؛ ولی با تداوم شدت نور، تولید ROS در هردو فتوسیستم افزایش می‌یابد. انباشت ROS مهار سنتز پروتئین D1 و مهار چرخهٔ بازسازی فتوسیستم II را موجب می‌شود و پدیدهٔ مهار نوری را تشدید می‌کند (Asada, 2006). گیاهان برای کاهش مهار نوری، سیستم آنتی‌اکسیدانی خود را فعال می‌کنند تا با جاروب‌کردن ROS اثر آن‌ها را در مهار سنتز پروتئین D1 و بازسازی فتوسیستم II کاهش دهند (Takahashi and Badger, 2011). در پژوهش حاضر، مشخص شد که فعال‌شدن سیستم آنتی‌اکسیدان و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز (جاروب‌کنندهٔ هیدروژن پراکسید) سازوکار حفاظت نوری گندم در شدت نور ۴۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه است. از دیگر سازوکارهای حفاظت نوری در گیاهان، انباشت جاذب‌های نوری ازجمله فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در اپیدرم برگ‌ها است (Takahashi and Badger, 2011). در پژوهش حاضر، با افزایش شدت نور به ۴۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، اگرچه مقدار فلاونوئیدهای برگ تغییر نکرد، سازوکار دیگر حفاظت نوری یعنی افزایش مقدار آنتوسیانین برگ‌ها در این شدت نور عمل کرد. بنابراین در شدت نور ۴۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز (جاروب‌کنندهٔ هیدروژن پراکسید) و افزایش آنتوسیانین برگ‌ها که یکی از انواع سازوکارهای حفاظت نوری گندم است از افت F_v/F_m و مهار نوری فتوسیستم‌ها جلوگیری کردند. افزایش کاروتنوئیدها در نور شدید نیز نقش مهمی در حفاظت فتوسیستم‌ها ایفا می‌کند. افزایش کاروتنوئیدها با فعال‌کردن چرخهٔ ویولاگزانتین/زئاگزانتین و فروکشی غیرفتوشیمیایی، کاهش آسیب‌های ناشی از شدت نور زیاد را در گیاهان باعث می‌شوند (Cazzonelli and Pogson, 2010). با این‌حال در بررسی حاضر، شدت‌های مختلف نوری و سرما بر میزان کلروفیل و کاروتنوئید سنجش‌شده در برگ‌های گندم تاثیر نگذاشتند.

در پژوهش حاضر، با افزایش شدت نور به ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، کاهش معنی‌دار F_v/F_m و درنتیجه، مهار نوری در فتوسیستم II گندم مشاهده شد. در شدت نور زیاد، از یک سو، اکسیداسیون نوری، آسیب و تجزیهٔ پروتئین کمپلکس فتوسیستم II یعنی پروتئین D1 را سبب می‌شود و از سوی دیگر، به‌علت انباشت ROS، سنتز پروتئین D1 و چرخهٔ بازسازی فتوسیستم II مهار می‌شود و درنتیجه، پدیدهٔ مهار نوری تشدید می‌شود (Fischer *et al.*, 2013). در بررسی حاضر، هرچند گیاه گندم با افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز (جاروب‌کنندهٔ هیدروژن پراکسید) در شدت نور ۴۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه از وقوع آسیب نوری ممانعت کرد؛ ولی با افزایش شدت نور به ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه به‌علت افزایش‌نیافتن معنی‌دار فعالیت آنزیم مهم کاتالاز عملاً سازوکار حفاظت نوری اول یعنی فعالیت

سیستم جاروب‌کنندهٔ ROS نتوانست عملکرد مناسبی داشته باشد. همچنین سازوکار حفاظت نوری دیگر یعنی توان فیلترکردن نور شدید در سلول‌های اپیدرم برگ‌های تیمارشده با شدت نور ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه نیز به‌طور مؤثری عمل نکرد؛ به‌این‌ترتیب‌که در شدت نور ۸۵۰، میزان فلاونوئید کل در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌دار یافت؛ درنتیجه، میزان زیادی از انرژی نور شدید بر فتوسیستم‌ها تأثیر گذاشت (Takahashi and Badger, 2011) و پدیدهٔ مهار نوری تشدید شد.

جمع‌بندی

بررسی شاخص‌هایی ازقبیل میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، توان سیستم آنتی‌اکسیدان، متابولیسم فنلی و شاخص‌های فلورسانس کلروفیل در گیاه گندم تیمارشده با سرمای تنها نشان داد که گندم در برابر سرما مقاوم است و سرمای ۴ درجهٔ سانتیگراد، مهار نوری و آسیب نوری را در این گیاه باعث نشد و میزان پراکسیداسیون لیپیدها را افزایش نداد. نتایج این بررسی نشان داد که بررسی هم‌زمان F_v/F_m با شاخص پراکسیداسیون لیپیدها (مالون‌دی‌آلدهید) روش مناسبی برای ارزیابی رخداد مهار و آسیب نوری در گیاهان است و با سنجش این دو شاخص می‌توان تحمل گندم را به شدت‌های نور زیاد، ارزیابی کرد.

گندم در شدت نور ۴۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه با افزایش مؤثر سازوکارهای حفاظت نوری شامل فعالیت آنزیم کاتالاز (سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی)، حفظ فلاونوئیدها و افزایش آنتوسیانین برگ‌ها (از انواع جاذب‌های نور اضافی و فیلترهای نوری در اپیدرم) از افزایش مالون‌دی‌آلدهید (شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء) و کاهش F_v/F_m ممانعت کرد؛ ولی در شدت نور زیاد (۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) به‌علت افزایش‌نیافتن معنی‌دار فعالیت کاتالاز و کاهش معنی‌دار مقدار فلاونوئیدهای برگ نسبت به شاهد، مقدار مالون‌دی‌آلدهید افزایش و F_v/F_m کاهش یافت. در نهایت، آسیب نوری در شدت نور ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه رخ داد.

سپاسگزاری

نگارندگان از سرکار خانم سمیه مسئول محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی ملکان سروری بابت همکاری صمیمانه در انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology 141: 391-396.

Azzabi, G., Pinnola, A., Betterle, N., Bassi, R. and Alboresi, A. (2012) Enhancement of non-photochemical quenching in the *Bryophyte physcomitrella patens* during acclimation to salt and osmotic stress. Plant Cell Physiology 53: 1815-1825.

Boominathan, R. and Doran, P. M. (2002) Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumlator, *Alyssum bertoloni*. New Phytologist 156: 202-205.

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

Cazzonelli, C. I. and Pogson, B. J. (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. Trends in Plant Science 15: 266-274.

Chen, L., Jia, H., Tian, Q., Du, L. and Gao, Y. (2012) Protecting effect of phosphorylation on oxidative damage of D1 protein by down-regulating the production of superoxide anion in photosystem II membranes under high light. Photosynthesis Research 112: 141-148.

Ehlert, B. and Hincha, D. K. (2008) Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in *Arabidopsis* leaves. Plant Methods 4(1): 4-12.

Fischer, B. B., Hideg, E. and Krieger-Liszkay, A. (2013) Production, detection and redox signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. Antioxidants Redox Signaling 18: 2145-2162.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase: occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

Habibi, G. (2014) Hydrogen peroxide (H_2O_2) generation, scavenging and signaling in plants. In: Oxidative damage to plants: antioxidant networks and signaling (Ed. Ahmad, P.) 557-574. Elsevier, San Diego.

Ivanov, A. G., Allakhverdiev, S. I., Huner, N. P. A. and Murata, N. (2012) Genetic decrease in fatty acid unsaturation of phosphatidylglycerol increased photoinhibition of photosystem I at low temperature in tobacco leaves. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics 1817: 1374-1379.

Jiang, H. and Howell, G. S. (2002) Applying chlorophyll fluorescence technique to cold hardiness studies of grapevines. American Journal of Enology and Viticulture 53(3): 210-217.

Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1985) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. Biochemical Society Transactions 11: 591-592.

Mavi, A., Terzi, Z. and Ozgen, U. (2004) Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. Verum (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). Biological and Pharmaceutical Bulletin 27: 702-705.

Pospiŝl, P. (2012) Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics 1817: 218-231.

Pourakbar, L. and Abedzadeh, M. (2014) Effects of UV-B and UV-C radiation on antioxidative enzymes activity of *Melissa officinalis* and influences of salicylic acid in UV-stress ameliorations. Iranian Journal of Plant Biology 21: 23-34 (in Persian).

Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F. and Berruyer, R. (2013) High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. Plant Methods 9: 3-17.

Scheller, H. and Haldrup, A. (2005) Photoinhibition of photosystem I. Planta 221: 5-8.

Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E. and Matkovics, B. (1974) Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. Biochemie und Physiologie der Pflanzen 166: 387-392.

Suetsugu, N. and Wada, M. (2007) Chloroplast photorelocation movement mediated by phototropin family proteins in green plants. Biological Chemistry 388: 927-935.

Takahashi, S. (2010) The solar action spectrum of photosystem II damage. Plant Physiology 153: 988-993.

Takahashi, S. and Badger, M. R. (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. Trends in Plant Science 16: 1-10.

Telfer, A. (2014) Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of b-Carotene. Plant and Cell Physiology 55(7): 1216-1223.

Tholen, D. (2008) The chloroplast avoidance response decreases internal conductance to CO2 diffusion in *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant and Cell Environment 31: 1688-1700.

Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants-protective role of exogenous polyamines. Plant Science 151: 59-66.

Wang, X., Xu, C., Cang, J., Zeng, Y., Yu, J., Liu, L., Zhang, D. and Wang, J. (2015) Effects of exogenous GA_3 on wheat cold tolerance. Journal of Agricultural Science and Technology 17: 921-934.

Winfield, M. O., Lu, C., Wilson, I. D., Coghil, J. A. and Edwards, K. J. (2010) Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. Plant Biotechnology Journal 8: 749-771.

Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current Opinion in Plant Biology 5: 18-223.

Woo, N. S., Badger, M. R. and Pogson, B. J. (2008) A rapid, non-invasive procedure for quantitative assessment of drought survival using chlorophyll fluorescence. Plant Methods 4(1): 911-921.

Xu, H. G., Liu, G. J., Liu, G. T., Yan, B. F., Duan, W. and Wang L. J. (2014) Comparison of investigation methods of heat injury in grapevine (*Vitis*) and assessment to heat tolerance in different cultivars and species. BMC Plant Biology 14: 156-163.

Yamori, W., Evans, J. R. and von Caemmerer, S. (2010) Effects of growth and measurement light intensities on temperature dependence of Co2 assimilation rate in tobacco leaves. Plant, Cell and Environment 33: 332-343.

Yamori, W., Sakata, N., Suzuki, Y., Shikanai, T. and Makino, A. (2011) Cyclic electron flow around photosystem I via chloroplast NAD(P)H dehydrogenase (NDH) complex performs a significant physiological role during photosynthesis and plant growth at low temperature in rice. The Plant Journal 68: 966-976.

Zamani, E., Rezanejad, F. and Sasan, H. (2012) Effects of cold and short day treatments on dehydrin gene expression in seedlings and regenerated shoots of pistachio (*Pistacia vera* L.). Iranian Journal of Plant Biology 14: 35-48 (in Persian).

Zucker, M. (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light, its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Physiologia Plantarum 40: 779-784.