ارزیابی برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و مولکولی دو رقم گیاه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) در واکنش به شرایط تنش دمای پایین

اکرم قربانپور[۱]، اعظم سلیمی*[۱]، محمدعلی تاجیک‌قنبری[۲]، همت‌اله پیردشتی[۳] و علی دهستانی[٤]

[۱] گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران، [۲] گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران، [۳] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران، [٤] پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰٤/۲۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٦/۰٦/۰۵)

چکیده

گیاه گوجه‌فرنگی از جمله گیاهان حساس به تنش سرما می‌باشد و حساسیت به سرما ممکن است توزیع جغرافیایی و زمان کاشت گوجه فرنگی را محدود سازد. در این مطالعه برای شناخت رقم متحمل به سرما، پس از تولید گیاهان ۳۰ روزه دو رقم تجاری گوجه‌فرنگی، CaljN3 و Peto Meck در معرض تنش سرمای $8\ ^{o}C$ قرار داده شدند و سپس در شش زمان صفر، ۲، ۵، ۲٤، ۷۲، ۱٤٤ ساعت پس از تیمار سرما شاخص‌های رشدی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در آنها بررسی شد. نتایج نشان داد که تحت تنش سرما پارامترهای رشدی هر دو رقم تحت تیمار سرما با کاهش همراه بود و تمام این پارامترها جز وزن تر ریشه در رقم Peto Meck کاهش بیشتری مشاهده شد. همچنین شاخص Fv/Fm کاهش و محتوای مالون‌دی‌آلدهید (MDA) برگ و ریشه در هر دو رقم افزایش یافت که این افزایش در رقم Peto Meck بیشتر بود. همچنین تحت تیمار سرما درصد نشت یونی تنها در رقم Peto Meck افزایش یافت. در رقم CaljN3 تحت تنش سرما، محتوای قند محلول و نامحلول به ترتیب افزایش و کاهش یافت در حالیکه در رقم Peto Meck تغییر محسوسی در محتوای قند محلول و نامحلول مشاهده نشد. همچنین بیان فاکتور رونویسی *SlNAC1* در پنج ساعت تیماردهی، به ترتیب ۷/۵ و ۳/۵ برابر در ارقام Peto Meck وCaljN3 افزایش یافت، درحالیکه میزان بیان فاکتور رونویسی *CBF1* تنها در رقم CaljN3 افزایش یافت. نتایج و بررسی شاخص‌های مختلف و اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های فوق پیشنهاد می‌کند که رقم CaljN3 دارای مکانیسم‌های مقاومت بهتر و کارآمدتری است.

واژه‌های کلیدی: سرما، شاخص نشت الکترولیتی، محتوای مالون‌دی‌آلدهید، *CBF1*، Fv/Fm، *SlNAC1*

مقدمه

سرما از عوامل محیطی مهمی است که رشد، تولید و پراکنش محصولات کشاورزی را محدود می‌کند. هر ساله به دلیل سرماهای غیرمنتظره در فصل پاییز یا بهار خسارت‌های چشمگیری به گیاهان وارد می‌شود. گیاه گوجه‌فرنگی از جمله گیاهان حساس به تنش سرما می‌باشد و حساسیت به سرما ممکن است نه تنها توزیع جغرافیایی کشت گوجه فرنگی را محدود سازد بلکه زمان کاشت آن در مناطق معتدل را نیز محدود می‌سازد (Foolad and Lin, 2001). از این رو، گوجه فرنگی مقاوم در برابر سرما می‌تواند زودتر کاشت و برداشت

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: Salimi@khu.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]

گردد (Foolad and Lin, 2000). رقم Peto Meck و CaljN3 دو رقم استاندارد گوجه‌فرنگی مورد مطالعه در این پژوهش در کشور ایران مورد کشت قرار می‌گیرند، به طوریکه رقم CaljN3، رقم تجاری متداول برای کشت در مناطق جنوب کشور و رقم Peto Meck بیشتر در مناطق معتدله کشور کشت می‌گردد. بررسی واکنش رقم‌های مختلف گوجه‌فرنگی به تنش دمای پایین و گزینش ارقام متحمل از اهمیت بالایی، به‌ویژه برای مناطقی که دارای تنش دمایی هستند، برخوردار بوده و تاکنون تأثیر تنش سرما روی این ارقام تجاری گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار نگرفته است.

در دماهای پایین، از متابولیسم برگ به شدت ممانعت به عمل می‌آید و خسارت نوری به فتوسیستم II زیاد می‌شود، لذا اندازه گیری Fv/Fm که ماکزیمم عملکرد کوانتومی واکنش فتوشیمیایی فتوسیستم II را نشان می‌دهد، می‌تواند به‌عنوان یک روش موفقیت‌آمیز در شناسایی میزان تحمل به تنش سرما در گیاهان مختلف و مقایسه آنها با یکدیگر به کار گرفته شود (Mishra *et al.*, 2011). به طوریکه از این سنجش برای ارزیابی واریته‌های مقاوم و حساس در بسیاری از گیاهان از جمله ذرت (Fracheboud *et al.*, 1999) و گندم (Zivcak *et al.*, 2008) تحت تنش سرما استفاده نمودند. سرما بر فرایند فتوسنتز در گیاهان تأثیر مهمی گذاشته، انتقال سریع الکترون‌ها را کاهش داده و تشکیل مواد اولیه فتوسنتز را تغییر می‌دهد، از جمله بر میزان کربوهیدرات‌های گیاهان مؤثر است. کربوهیدرات‌های مرکب به کربوهیدرات‌های ساده تجزیه شده و بنابراین در اثر سرما بر میزان قندهای محلول افزوده می‌شود. تحت شرایط تنش افزایش نسبت ساکارز به نشاسته و تجزیه نشاسته، همچنین کاهش انتقال ساکارز به خارج از برگ‌ها منجر به افزایش کربوهیدرات‌های محلول می‌گردد. نقش قندهای احیاء شده مانند گلوکز و فروکتوز در این گونه مکانیزم‌ها هنوز مورد بحث است، و حتی تجمع آنها می‌تواند از چند جنبه زیان آور نیز باشد (Koster and Leopold, 1988). اما برخی از محققین عقیده دارند که نقش قندها در ایجاد تحمل نسبت به دماهای پایین می‌تواند بیشتر از سایر محافظت کننده‌های سرمایی باشد (Steponkus and Lanphear, 1967).

همچنین سرمازدگی باعث اختلال در فعالیت غشاء می‌شود که به دنبال آن الکترولیت‌های داخل سلول به خارج از آن نشت می‌کنند و به همین دلیل محققان با اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از بافت‌های گیاهی به عنوان روشی مناسب برای تخمین سلامت و تراوایی غشاء پس از تنش‌های محیطی از جمله سرما استفاده می‌کنند (Azzarello *et al.*, 2009).

تنش‌های زیستی و غیر زیستی منجر به شکل‌گیری گونه های اکسیژن واکنش‌پذیر (Reactive oxygen species) (ROS) می‌شود. تولید گونه‌های اکسیژن فعال سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، تخریب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود (Jiang and Zhang, 2001). 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). گیوو همکاران (۲۰۰۵) گزارش نمودند در گیاهچه‌های برنج در تنش سرما و کم آبی، مقادیر H_2O_2 و MDA در واریته های حساس افزایش بیشتری یافت.

در سال‌های اخیر، با دسترسی به بسیاری از اطلاعات جدید مولکولی، امکان درک بهتر عمل ژن‌های دخیل در سازگاری به سرما و پاسخ به شرایط انجماد فراهم شده است (Knight and Knight, 2012). یکی از پیشرفت‌های عمدهٔ پژوهش‌ها در زمینه تحمل به سرما، کشف فاکتورهای رونویسی است. با بررسی نقش فاکتورهای رونویسی در فعال کردن زنجیرهٔ ژن های دخیل در مقاومت به سرما و فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی، مشخص شده است که بسیاری از فاکتورهای رونویسی، از جمله DREB1/CBF (dehydration responsive element-binding factor 1/C-repeat-binding factor) وNAC (NAM, ATAF1 and CUC1/CUC2) در پاسخ به سرما در گیاهان نقش دارند (Peng *et al.*, 2015). پروتئین های CBF (عناصر متصل شونده به تکرار C) در گیاهان هنگام مواجهه با تنش‌های غیرزنده تأثیر حیاتی دارند. در آرابیدوپسیس ژن‌های *CBF1*، *CBF2* و *CBF3* بر اثر تنش سرما میزان بیان بالایی نشان دادند ولی تنش خشکی و شوری چنین تأثیری را بر این ژن‌ها نداشت (Gilmour *et al.*, Gilmour *et al.*, 2004 ;

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]

1998). این ژن‌ها پس از قرارگیری در معرض تنش سرما خیلی سریع و زودگذر از طریق مسیر غیر وابسته به آبسیزیک اسید القاء می‌شوند که محصول آنها ریگولون CBF را فعال ساخته و مقاومت به یخزدگی را افزایش می‌دهد (Agarwal *et al.*, 2006).

عوامل رونویسی NAC یکی از بزرگترین خانواده‌های تنظیم کننده رونویسی نقش مهمی در تنظیم برنامه‌ریزی مجدد مرتبط با پاسخ‌های گیاهان به تنش‌ها بازی می‌کنند (Wang *et al.*, 2013). مطالعات گسترده اخیر پروتئین NAC را در ابعاد مختلف رشد گیاه از جمله تشکیل سلول‌های مرزی مریستمی، تقسیم سلولی و توسعه، تکامل ریشه جانبی، پیری برگ، بیوسنتز دیواره سلولی ثانویه، زمان گلدهی، تشکیل جنین، رشد و توسعه مریستم ساقه، ریشه‌های فرعی، سیگنالینگ اکسین، پاسخ به تنش‌های غیرزنده و دفاع سلولی دخیل دانستند (Ricachenevsky *et al.*, 2013). محقیقین با القاء بیش بیانی ژن *MfNAC3* از *Medicago falcata* – رقم مقام به سرما – توانستند مقاوت به تنش سرما در رقم *Medicago truncatula* که حساسیت آن به سرما نسبت به رقم پیشین بیشتر است را افزایش دهند (Qu *et al.*, 2016).

از اینرو در این پژوهش تأثیر تنش سرما بر دو رقم گوجه فرنگی که در ایران کشت می‌شود، از دیدگاه اثر بر شاخص های ریختی و فیزیولوژیکی و ارتباط آنها با بیان دو فاکتور رونویسی دخیل در فرایند مقاومت در این گیاهان بررسی و ارزیابی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

شرایط رشد گیاهان: در این پژوهش بذر دو رقم گیاه گوجه فرنگی، به نام‌های CaljN3 و Peto Meck –که از رقم‌های تجاری رایج در کشور می‌باشند– از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش تحقیقات سبزی و صیفی، حبوبات آبی کرج تهیه شد. بذرها با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شده و پس از سه بار شستشو با آب مقطر، به گلدان‌های حاوی ماسه منتقل شدند. در کف گلدان‌ها یک لایه سنگ‌ریزه استریل قرار داده شد. پس از انتقال گلدان‌ها به فیتوترون با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۴ ^{o}C و رطوبت نسبی ۶۰ درصد، به مدت شش روز با محلول آب مقطر، و پس از آن به مدت هفت روز به ترتیب با محلول ۱/۴ و ۱/۲ هوگلند آبیاری و پس از این مرحله هر سه روز با محلول هوگلند کامل آبیاری شدند.

اعمال تنش و اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک: بعد از چهار هفته رشد گیاهان داخل فیتوترون، در معرض تنش دمای ۸ ^{o}C به مدت شش روز قرار گرفته و در فاصله‌های زمانی صفر، ۲، ۵، ۲۴، ۷۲، ۱۴۴ ساعت پس از شروع تنش، نمونه برداری برگ به صورت نمونه‌های تر و خشک انجام شد. صفات مورفولوژیک از قبیل ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک برگ و ریشه هر گیاه از هر واحد آزمایشی اندازه‌گیری شدند. برای تهیه نمونه‌های خشک، نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۶۸ درجه منتقل و سپس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن شدند.

اندازه‌گیری حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) : پس از اعمال تنش سرما، اندازه‌گیری پارامترهای فلورسنس کلروفیل در آخرین برگ توسعه‌یافته در فاصله‌های زمانی صفر، ۲، ۵، ۲۴، ۷۲، ۱۴۴ ساعت پس از شروع تنش با استفاده از دستگاه فلورومتر (PAM 2500-Walz, Germany) و بر اساس روش Gently و همکاران (۱۹۹۰) انجام شد. بدین منظور، برگ‌ها با استفاده از گیره‌های مخصوص (2030-B, Walz) به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. فلورسانس حداقل (Fo) با همه مراکز واکنشی باز فتوسیستم II، توسط تابش تنظیمی با شدت پایین (۰/۱ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) و فلورسانس حداکثر (Fm) با تابش پالس (۸۰۰۰$\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) به مدت یک ثانیه در برگ‌های سازگار به تاریکی تعیین شد. فرکانس تابشی برای اندازه‌گیری Fo، ۶۰۰ هرتز و برای Fm، ۲۰ کیلو هرتز بود. با استفاده از پارامترهای تعیین شده در برگ‌های سازگار شده به تاریکی، میزان Fv/Fm طبق معادله۱ محاسبه گردید: (Fv : فلورسانس متغیر)

$$Fv/Fm = (Fm - Fo)/Fm \qquad \text{معادله (۱)}$$

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]

سنجش قندهای محلول و نامحلول: حدود ۰/۱ گرم از نمونه پودر شده را در لوله سانتریفوژ ریخته، ده برابر میزان نمونه اتانول ۸۰ درصد اضافه کرده و به مدت ۵۰ ثانیه ورتکس شد. سپس لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و روشناورهای حاصل را در پتری‌دیش ریخته و عمل فوق سه یا چهار بار تکرار شد. تفاله‌های باقیمانده در ته لوله برای استخراج پلی‌ساکاریدها استفاده شد. مجموع روشناورها درون پتری دیش جلوی پنکه با دور کم تبخیر و باقیمانده ته ظرف با ٤۰ میلی‌لیتر آب مقطر نیمه‌گرم شسته و در دو لوله سانتریفوژ تقسیم شد. به هر لوله ۱۰ میلی لیتر باریم هیدروکسید ۰/۳ نرمال و ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفات روی ۵ درصد اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. مجموع روشناورها جمع‌آوری و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید و برای سنجش قندهای محلول استفاده شد (Nelson, 1944). تفاله های خشک شده حاصل از عصاره‌گیری الکلی به ارلن انتقال یافت و به آن حدود ٤۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه جوشید. پس از آن محتویات درون ارلن با کاغذ صافی صاف شد. محلول صاف‌شده به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید و از آن برای سنجش قندهای پلی‌ساکاریدی استفاده شد (Seyyednejad *et al.*, 2001). برای سنجش قندهای محلول و نامحلول از روش فنل سولفوریک‌اسید استفاده شد (Dubois *et al.*, 1956) و برای رسم منحنی استاندارد از گلوکز استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش با آب مقطر به حجم دو میلی‌لیتر رسانده و به هر لوله یک میلی‌لیتر محلول فنل پنج درصد اضافه و به خوبی مخلوط و بلافاصله به هر لوله پنج میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند، سپس جذب آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۸۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپید غشاء: اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به وسیله تست تیوباربیتوریک اسید (TBAT) با سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید انجام شد. ۰/۲ گرم بافت تر برگ و ریشه در ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک‌اسید (TCA) ۰/۱ درصد همگن شده سپس عصاره ی حاصل به فالکون انتقال یافته و به مدت ۵ دقیقه در ٦۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی ٤ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک‌اسید بود اضافه شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی گراد)، انکوبه گردیدند. سپس مخلوط حاصل بلافاصله در حمام یخ سرد شد و بعد از آن در سرعت ٦۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین و جذب ناویژه در ٦۰۰ نانومتر از آن کسر شد. غلظت مالون‌دی آلدئید (MDA) با استفاده از ضریب تصحیح $(\mu\ mol^{-1})$ $(cm^{-1}$ ۰/۱۵۵) محاسبه و براساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر $(\mu mol\ g^{-1}\ FW)$ بیان شد (Health and Packer, 1968).

اندازه‌گیری شاخص نشت الکترولیتی: اندازه‌گیری نشت یونی به روش Lutts و همکاران (۱۹۹٦) انجام شد. برای این منظور ابتدا نمونه‌های برگ با آب مقطر شستشو و سپس درون لوله‌های آزمایش حاوی ده میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شدند. لوله‌ها در دمای ^{o}C ۲۵ و به مدت ۲٤ ساعت در شیکر قرار گرفتند و پس از آن نشت یونی محلول (L1) با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری هدایت الکتریکی (EC متر) اندازه‌گیری شد. در مرحله بعدی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۱۲۰ اتوکلاو شده و در نهایت نشت یونی محلول (L2) بعد از به تعادل رسیدن با دمای محیط اندازه‌گیری شد. میزان نشت یونی(خسارت غشاءسلولی) طبق معادله (۲) محاسبه گردید: (EL : نشت الکترولیتی)

$$EL\ (\%) = \left[\frac{L1}{L1+L2}\right] \times 100$$ معادله (۲)

استخراج RNA و ساخت cDNA: RNA کل برگ‌های گیاه شاهد و گیاه تیمار شده هر دو رقم با استفاده از محلول ترایزول (شرکت Invitrogen) استخراج گردید. کیفیت RNA استخراجی با دو روش اسپکتروفتومتر و ژل آگاروز یک و نیم درصد ارزیابی شد. برای اطمینان از حذف کامل DNA ژنومی،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق.

منبع آغازگرها	طول محصول (bp)	درصد GC	طول پرایمر	دمای ذوب	توالی آغازگر (´3 → ´5)	نام آغازگر
NM_001247194.2	۱۰۸	۵۲/٤	۲۱	٦۳/۲	ACAGGGGAATCAGGAAGAGGA	F: *CBF1*
		٦۳/۲	۱۹	٦۳/۸	CCGCCATTTCAGCCGTAGG	R: *CBF1*
NM_001247553.2	۱۲۷	۵۵	۲۰	٦۱/۳	GGCAACCGGAGCTGATAAAC	F: *SlNAC1*
		۵۲/٤	۲۱	٦۲/۷	AGGCGGTACTCGTGCATAATC	R: *SlNAC1*
NM_001247874.1	۱٤۰	۵۵/٦	۱۸	٦۰/٤	CATGACCACAGTCCACTCCATC	F: *GAPDH*
		۵۷/۹	۱۹	٦۰/۷	GAACGAAGCAGCTCTTCCACC	R: *GAPDH*

نمونه‌های RNA با آنزیم DNase1 (DNaseI, RNase-free, Fermentas Cat. No: EN0525) تیمار و به عنوان الگوی واکنش PCR استفاده شد. پس از همسان‌سازی غلظت‌های RNA، cDNA مربوط به هر نمونه با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis شرکت فرمنتاز، طبق دستورالعمل کیت ساخته شد.

اندازه‌گیری الگوی بیان ژن‌های مطالعه شده: بررسی کمی بیان ژن‌ها در همه نمونه‌ها در سه تکرار تکنیکی و بیولوژیکی با استفاده از دستگاه C1000^{TM} Thermal Cycler (BioRad) و کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (فرمنتاز) انجام شد. هر واکنش PCR در حجم ده میکرولیتر شامل پنج میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۰/۳ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای رفت (Forward primer) و برگشت (Reverse primer)، دو میکرولیتر از cDNA الگو رقیق شده و آب عاری از نوکلئاز بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ده دقیقه در ^{o}C ۹۵ سپس ٤۰ چرخه (شامل ۱۵ ثانیه در ^{o}C ۹۵، ۱ دقیقه در ^{o}C ٦۰) بود. به منظور استاندارد سازی داده‌ها، نمونه‌ها بوسیله ژن خانه‌دار *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) نرمال شدند.

اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ آمده است. این آغازگرها پس از هم‌ردیف نمودن توالی‌های بدست آمده از بانک ژنی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) بوسیله نرم‌افزارهای BioEdit 7.0.9.0 و OligoExplorer V 1.4 طراحی شدند. صحت آغازگرهای طراحی شده از لحاظ عدم اتصال غیراختصاصی و تشکیل دایمر، با استفاده از Primer Blast در کل ژنوم تأیید شد. نرخ بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از فرمول $۲^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌های آماری: آزمایش، به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد، و رسم نمودارها نیز با کمک نرم‌افزار Excel انجام شد. برای آنالیز داده‌های بیان نیز از دستگاه BIORAD CFX96 Real-Time System استفاده شد.

نتایج

میزان رشد گیاه: بررسی وزن تر و خشک برگ و وزن تر ریشه و ارتفاع گیاه دو رقم CaljN3 و Peto Meck که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند، نشان داده است که هر دو رقم تحت تنش سرما با کاهش معنی‌داری همراه بودند و در تمام صفات مورد بررسی جز وزن تر ریشه در رقم Peto Meck کاهش بیشتری نسبت به رقم CaljN3 مشاهده شد (جدول ۲).

بیشینه کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (Fv/Fm): فلوئورسانس فتوسیستم II و نسبت Fv/Fm که بیشینه عملکرد کوانتومی واکنش فتوشیمیایی فتوسیستم II را نشان می‌دهد، می تواند به عنوان یک معیار مهم در تعیین شدت تنش سرما به کار رود (Baker and Rosenqvist, 2004). با افزایش سرمادهی به

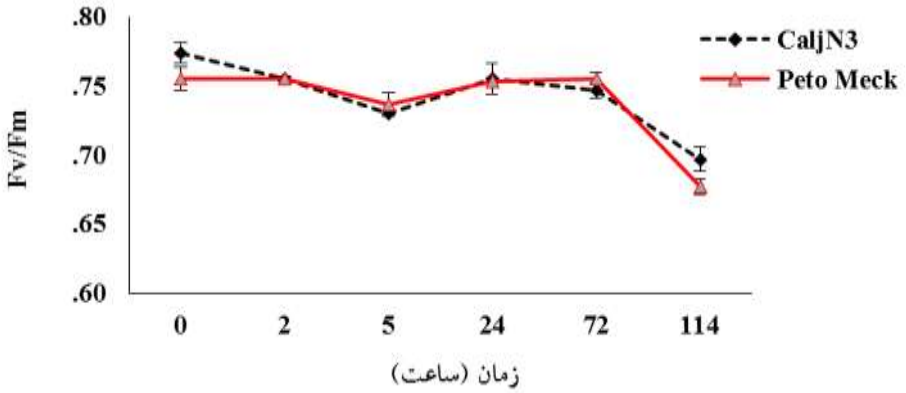
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]

جدول ۲- اثر تیمار سرما بر روی وزن تر و خشک برگ و وزن خشک ریشه و ارتفاع در دو رقم CaljN3 و Peto Meck گیاه گوجه‌فرنگی.

	CaljN3			Peto Meck		
	شاهد	سرما	درصد کاهش	شاهد	سرما	درصد کاهش
ارتفاع (cm)	۱۸/٦۷ ±۸/۸[a]	۹/۲۷ ± ۰/٦۳[b]	۵۰/٤	۱٦ ± ۱/۵۸[a]	٦/٦۷ ± ۰/٦۷[b]	۵۸/۳
وزن خشک برگ (g)	۰/۳۱ ±۰/۰۱[a]	۰/۱٤ ± ۰/۰۱[b]	۵٤/۳	۰/۲٦ ± ۰/۰٤[a]	۰/۱۷ ± ۰/۰۲[b]	٦۷/٦
وزن تر برگ (g)	۳/۰۹ ± ۰/۱۱[a]	۱/٤٤ ± ۰/۰٤[b]	۵۳/۵	۲/۵۷ ± ۰/۲۸[a]	۱/٦٦ ± ۰/۲۱[b]	٦٦/۲
وزن تر ریشه (g)	۱/۷۱ ±۰/۰۵[a]	۰/۳۵ ± ۰/۱٦[c]	۷۹/۳	۱/۱٤ ± ۰/۱۱[b]	۰/٤٤ ± ۰/۰٦[c]	٦۱/۳

حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۱- بیشینه کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (Fv/Fm) تحت تنش سرما در دو رقم CaljN3 و Peto Meck . خطوط خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

مدت شش روز (۱٤٤ ساعت) شاخص Fv/Fm در هر دو رقم شدیداً کاهش یافت (شکل ۱) و در کل تفاوت چشمگیری بین دو گونه مشاهده نشد.

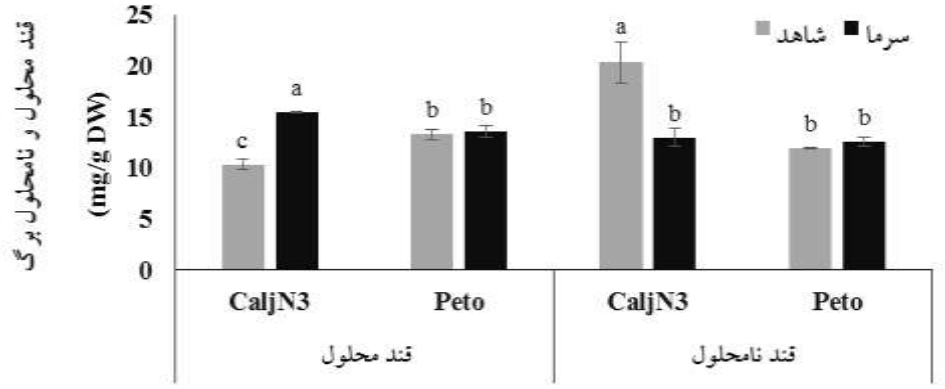
میزان قند محلول و نامحلول برگ: تحت تأثیر تیمار شش روز سرمای هشت درجه سانتی‌گراد، میزان قند محلول و نامحلول برگ در رقم CaljN3 به طور معنی‌داری به ترتیب به میزان ٤۹/۵ ٪ و۳٦ ٪ افزایش و کاهش یافت (شکل ۲). در صورتیکه در رقم Peto Meck میزان این پارامترها تحت تاثیر سرما تغییر معنی‌داری نیافت (شکل ۲).

میزان نشت یونی: در شرایط شاهد رقم Peto Meck به طور معنی‌داری نشت یونی پایین‌تری داشته که با قرار گرفتن در معرض تنش سرما به مدت شش روز به میزان معنی‌داری نشت یونی در این رقم افزایش یافت، به طوریکه تحت تنش سرما نشت یون‌های آن نزدیک به ۱۸ درصد افزایش یافت. در رقم CaljN3 نشت یونی تغییر معنی‌داری نیافت (شکل ۳).

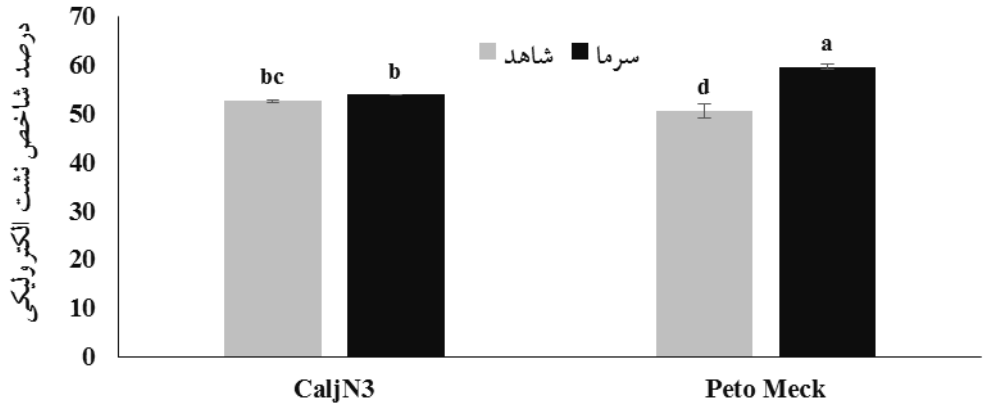
میزان پراکسیداسیون لیپید برگ و ریشه: در شکل ٤ میزان پراکسیداسیون لیپید در برگ و ریشه نشان داده شده است. میزان پراکسیداسیون لیپید برگ در هر رقم تحت تنش دمای پایین افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. به طوریکه در رقم CaljN3 به میزان ۷٤٪ و در رقم Peto Meck به میزان ۱۵٦٪ افزایش داشت. در ریشه نسبت به شاهد میزان پراکسیداسیون لیپید تنها در رقم Peto Meck به میزان ۱٦۳٪ افزایش یافت.

بررسی میزان بیان ژن‌های مربوط به فاکتورهای رونویسی: در این آزمایش میزان بیان ژن‌ها در همه نمونه‌ها در سه تکرار بیولوژیکی و تکنیکی با استفاده از دستگاه C1000^{TM} Thermal Cycler بررسی شد. نتایج به‌دست آمده از آنالیز منحنی ذوب نشان داد که تکثیر تمام ژن‌ها به صورت اختصاصی و بدون محصولات غیراختصاصی مثل دایمر در آغازگرها انجام شده است. در این آزمایش جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی

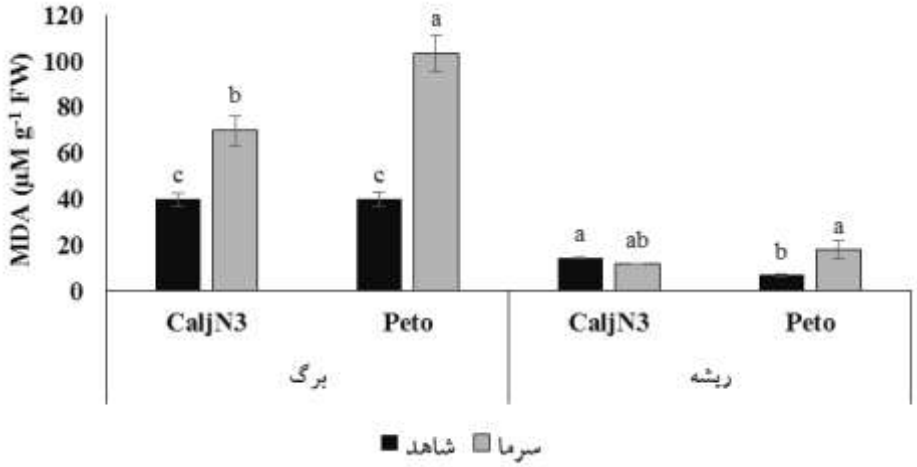
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]



شکل ۲- محتوای قند محلول و نامحلول برگ تحت تنش سرما در دو رقم CaljN3 و Peto Meck. خطوط خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است. اعداد با حروف لاتین متفاوت، نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف هستند ($P \leq 0.05$).



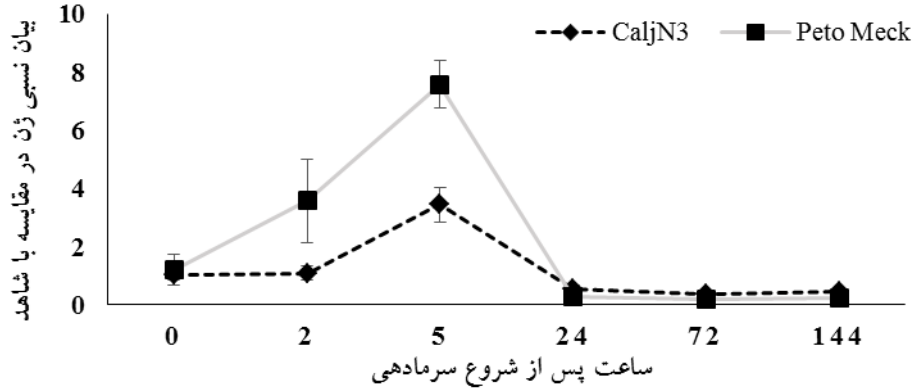
شکل ۳- درصد نشت یونی تحت تنش سرما در دو رقم CaljN3 و Peto Meck . خطوط خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است. اعداد با حروف لاتین متفاوت، نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف هستند ($P \leq 0.05$).



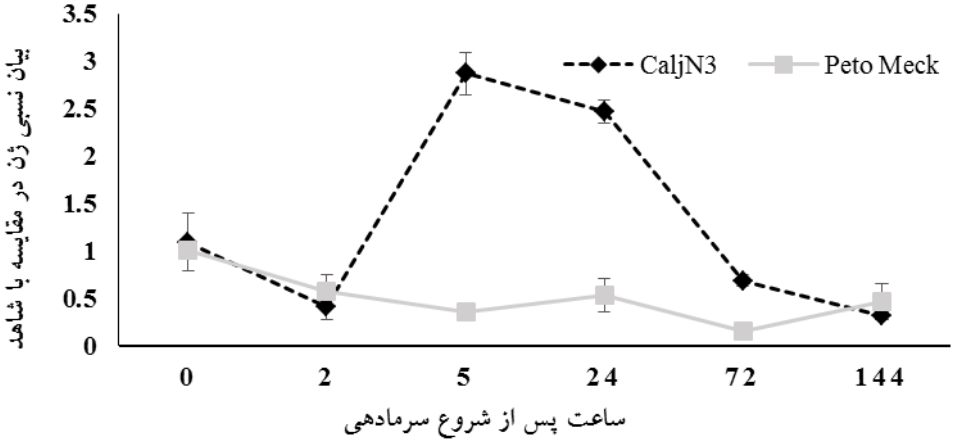
شکل ٤- میزان پراکسیداسیون لیپید برگ و ریشه در دو رقم CaljN3 و Peto Meck . خطوط خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد است. اعداد با حروف لاتین متفاوت، نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف هستند ($P \leq 0.05$).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]



شکل ۵- سطوح نسبی رونوشت ژن *SlNAC1* در مقایسه با کنترل تحت تنش سرما در دو رقم CaljN3 و Peto Meck .



شکل ٦- سطوح نسبی رونوشت ژن *CBF1* در مقایسه با کنترل تحت تنش سرما در دو رقم CaljN3 و Peto Meck.

در ترکیبات استفاده شده در واکنش از شاهد منفی استفاده شد. نرمال‌سازی داده‌های CT مربوط به نمونه‌های مختلف و نمونه شاهد با استفاده از CT ژن مرجع انجام شد (ΔCT). سپس ΔCT هر نمونه با ΔCT نمونه شاهد کالیبره شد و تغییر بیان ژن‌ها به‌صورت ΔΔCT- گزارش شد. بررسی میزان بیان عامل رونویسی *SlNAC1* نشان داد که میزان رونوشت‌های این ژن در رقم Peto Meck با افزایش مدت زمان تیمار سرما تا زمان پنج ساعت افزایش و پس از آن کاهش یافت. به طوریکه در زمان دو ساعت به میزان ۳/٦ برابر و در زمان پنج ساعت، رونوشت‌های این ژن ۷/۵ برابر افزایش یافت. در رقم CaljN3 نیز میزان رونوشت‌های این ژن در زمان پنج ساعت سرمادهی، ۳/٤ برابر بیشتر شد (شکل ۵).

بررسی میزان بیان عامل رونویسی *CBF1* نشان داد که میزان رونوشت‌های این ژن در هر دو رقم پس از دو ساعت سرمادهی حدود ۰/۵ برابر کاهش یافت، اما در رقم CaljN3 با افزایش مدت زمان تیمار سرما به مدت پنج ساعت نزدیک به سه برابر و در زمان یک روز سرما دهی به میزان ۲/۵ برابر افزایش یافت (شکل ٦). با افزایش مدت سرما دهی به بیش از یک روز منجر به کاهش رونوشت‌های این ژن گردید. در مقایسه، این ژن در رقم Peto Meck نه تنها افزایشی نداشته بلکه با افزایش مدت سرمادهی شاهد کاهش آن نسبت به زمان صفر بودیم.

بحث

اثر تنش سرما بر کاهش میزان رشد گیاه از واضح‌ترین پاسخ‌های گیاهان به سرما می‌باشد. وزن تر و خشک برگ و وزن تر ریشه و ارتفاع هر دو رقم تحت تیمار سرما با کاهش معنی‌داری همراه بوده است و در تمام صفات مورد بررسی جز وزن تر ریشه در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]

رقم Peto Meck کاهش بیشتری نسبت به رقم CaljN3 مشاهده شد (جدول ۲). مشابه این نتایج از طریق اندازه‌گیری میزان نشت یونی در این ارقام به دست آمد (شکل ٤). در پژوهش حاضر حتی در دماهای بالاتر از صفر درجه سانتیگراد در مرحله گیاهچه‌ای بر خلاف رقم CaljN3 افزایش خسارت به غشاء در رقم Peto Meck مشاهده شد که نشان‌دهنده حساسیت بالای این رقم به تنش سرما می‌باشد (شکل ٤). در بررسی اثر تنش سرما در مرحله گیاهچه‌ای در دو رقم گندم نشان داده شد که سطوح نشت یونی توسط دماهای بالاتر از صفر درجه سانتی گراد تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد در حالیکه تیمار گیاهان با دماهای زیر صفر درجه سانتی‌گراد منجر به افزایش شدیدی در نشت غشای پلاسمایی می‌شود (Apostolova *et al.*, 2006). بر اساس یافته‌ها، روند افزایش و کاهش نشت یونی با افزایش و کاهش نسخه‌های عوامل رونویسی همبستگی داشت. به طوریکه افزایش بیان ژن‌های مذکور در بیشتر موارد با خسارت کمتر غشاء همراه بود و اهمیت این ژن‌ها را به عنوان ژن‌های مؤثر در فرایند سازگاری نمایان می‌سازد.

مالون‌دی‌آلدهید محصول رایج پراکسیداسیون لیپید و یک شاخص تشخیص حساسیت نسبت به آسیب اکسیداتیو است (Janero, 1990). در این رابطه افزایش پراکسیداسیون لیپید تحت تنش‌های محیطی مختلف از جمله سرما در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (Zhang *et al.*, 2014). موافق با این یافته‌ها نتایج نشان داد که تحت تیمار دمای پایین مقدار MDA در برگ و ریشه رقم Peto Meck و برگ رقم CaljN3 افزایش یافت که البته مقدار MDA برگ و ریشه رقم Peto Meck تحت تیمار دمای پایین بیشتر از رقم CaljN3 بود که نشان دهنده مقاومت بیشتر این رقم می‌باشد (شکل ٤).

مطالعات متعددی نشان داده است که فتوسنتز پس از مدت کوتاهی (بین چند ساعت تا چند روز) تحت تأثیر دمای پایین قرار می‌گیرد (Yadeghari *et al.*, 2008). در پژوهشی که توسط Li و همکاران (۲۰۰٤) در گیاه توتون انجام شد نیز کاهش میزان Fv/Fm تحت تنش سرما مشاهده گردید. در این تحقیق اگرچه نسبت Fv/Fm در هر دو رقم در شرایط تنش سرما به مدت شش روز در مقایسه با شاهد کاهش یافت، اما بین دو رقم تفاوت چشمگیری مشاهده نشد. همچنین با مقایسه اثر تنش سرما بر گیاهان مختلف مشاهده شد که حداکثر بازده کوانتومی فتوسیستم II در گیاهان ریحان‌سبز، ریحان‌بنفش و گوجه‌فرنگی در شرایط تنش سرما به طور معنی‌داری کمتر از گیاهان شاهد است (Bruggemann and Linger, 1994).

قندها می‌توانند به روش‌های مختلف در تحمل تنش‌های اسمزی در گیاهان مؤثر باشند. عمل اصلی این ترکیبات حفاظت اسمزی، تنظیم فشار اسمزی، ذخیره کربن و حفاظت از رادیکال‌های آزاد است (Morgan, 1984). در پژوهش حاضر نیز محتوای قند محلول و نامحلول برگ در رقم CaljN3 تحت سرما به ترتیب افزایش و کاهش یافت، درصورتیکه در رقم Peto Meck تغییر معنی‌داری نداشت (شکل ۲) که می‌تواند نشان از تحمل بیشتر رقم CaljN3 باشد. مطالعات انجام شده توسط Fujimura و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که در تنش سرما ۱۲ درجه سانتی‌گراد در گوجه فرنگی، قندهای محلول برگ افزایش یافت که با نتایج ما در رقم CaljN3 مطابقت داشت. افزایش کربوهیدرات‌ها طی تنش سرما احتمالاً به علت کاهش به کارگیری و مصرف فراورده‌های کربنی است نه تولید آنها و همین امر موجب تجمع قندهای محلول و کاهش قندهای نامحلول در اندام هوائی گیاه می‌شود (Joshi *et al.*, 2007).

در بررسی نتایج میزان بیان فاکتورهای رونویسی مطالعه شده، مشخص گردید که هر دو ژن انتخاب شده در پاسخ به تنش سرما دخیل هستند و در فرآیند پاسخ، بیان ژن *SlNAC1* در هر دو رقم (شکل ٥) و بیان ژن *CBF1* تنها در رقم CaljN3 (شکل ٦)، افزایش یافته است. نتایج این پژوهش با نتایج آنالیز بیان *ZmSlNAC1* در ذرت که به شدت توسط تنش‌های دمای پایین، شوری بالا و خشکی القاء گردید، مطابقت دارد (Lu *et al.*, 2012). به طوریکه با تنش دمای چهار درجه سانتی‌گراد بیان *ZmSlNAC1* از ساعات آغازین تنش شروع به افزایش کرد و پس از ٢٤ ساعت سرمادهی، بیان تا هشت برابر افزایش یافت. افزایش بیان *ZmSlNAC1* در آرابیدوپسیس نیز منجر به حساسیت بالای آن به آبسیزیک اسید (ABA) و تنش اسمزی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]

در مرحله جوانه زنی شد و مقاومت گیاهچه‌ها را به آبگیری افزایش داد (Lu *et al.*, 2012). آنالیز بیان در بافت گوجه‌فرنگی نشان داد که *SlNAC1* عمدتاً در ریشه، گل و برگ‌های سبز گیاه بیان می‌شود. همچنین الگوی بیان این ژن تحت القاء تنش شوری در رقم مقاوم و حساس گوجه‌فرنگی متفاوت بوده و احتمالاً در مقاومت گیاه به تنش شوری نقش مهمی دارد (Yang *et al.*, 2011). محققین نشان دادند که بیش بیانی *SlNAC1* منجر به افزایش مقاومت گوجه‌فرنگی به تنش سرما از طریق حفظ حداکثری کارایی فتوسیستم II و کاهش نشت یونی و افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدهید (MDA) گردید (Ma *et al.*, 2013).

بیش بیانی *CBF1* در آرابیدوپسیس، باعث افزایش مقاومت گوجه‌فرنگی به تنش دمای پایین شد (Zhang *et al.*, 2011). بیش بیان *CBF3* در آرابیدوپسیس منجر به تجمع پروتئین‌های COR (Cold Responsive)، پرولین، قندهای محلول همانند سوکروز، رافینوز، فروکتوز و گلوکز گردید (Gilmour *et al.*, 2000). تحت تنش دمای پایین افزایش بیان *CBF1* در گیاهان تراریخت، منجر به کارایی بیشتر فتوشیمیایی فتوسیستم II (Fv/Fm) در این گیاهان نشد. همچنین در گیاهان تراریخته افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (superoxide dismutase) (SOD) و خاموشی غیرفتوشیمیایی (non photochemical quenching) (NPQ) و کاهش محتوای MDA مشاهده شد. این نتایج نشان داد که پروتئین CBF1 نقش مهمی در حفاظت فتوسیستم I و II تحت تنش دمای پایین دارد (Zhang *et al.*, 2011). در پژوهش حاضر نیز محتوای MDA در رقم CaljN3 کمتر از رقم Peto Meck بوده است که می‌توان آن را با بیان بیشتر *CBF1* در این رقم مرتبط دانست.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج این تحقیق اهمیت فرایند ماکرومولکول‌ها در پاسخ به سرما را تأیید می‌کند. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که تغییر بیان ژن‌های مختلف شامل فاکتورهای رونویسی *CBF1* و *SlNAC1* با تحمل به سرما مرتبط بوده و حداقل برخی از این ژن‌ها می‌توانند به عنوان نشانگر برای شناسایی گیاهان متحمل و یا برای دست ورزی‌های ژنتیکی استفاده شوند. نتایج بدست آمده نشان داد که رقم Peto Meck دارای محتوای قند نامحلول کمتر و بالعکس نشت یونی و محتوای MDA بیشتر در روز ششم سرمادهی بود. در ضمن رقم CaljN3 دارای مکانیسم دفاعی بهتر و کارآمدتری نسبت به رقم Peto Meck بوده است که می‌توان آن را به بیان بیشتر *CBF1* نسبت داد لذا متحمل‌تر به تنش سرما تلقی نمود.

سپاسگزاری

از مسئولین پژهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان برای حمایت‌های مالی جهت انجام این پژوهش و مرکز تحقیقات نهال و بذر کرج برای مساعدت و فراهم نمودن بذرهای گیاهی سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. and Sopory, S. K. (2006) Role of *DREB* transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant cell reports 25: 1263-1274.

Apostolova, P., Yaneva, I., Apostolova, P. and Yaneva, I. (2006) Antioxidative defence in winter wheat plants during early cold acclimation. Plant Physiology 101-108.

Azzarello, E., Mugnai, S., Pandolfi, C., Masi, E., Marone, E. and Mancuso, S. (2009) Comparing image (fractal analysis) and electrochemical (impedance spectroscopy and electrolyte leakage) techniques for the assessment of the freezing tolerance in olive. Trees 23: 159-167.

Baker, N. R. and Rosenqvist, E. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany 55: 1607-1621.

Bruggemann, W. and Linger, P. (1994) Long-term chilling of young tomato plants under low light. IV. Differential responses of chlorophyll fluorescence quenching coefficients in *Lycopersicon* species of different chilling sensitivity. Plant and Cell Physiology 35: 585-591.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]

Dubois, M., Gills, K., Hamilton, J., Rebers, P. and Smith, F. (1956) Sugar estimation by phenol-sulphuric acid method. Analytical Chemistry 26: 350.

Foolad, M. and Lin, G. (2000) Relationship between cold tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato: germplasm evaluation. Journal of the American Society for Horticultural Science 125: 79-683.

Foolad, M. and Lin, G. (2001) Relationship between cold tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato: analysis of response and correlated response to selection. Journal of the American Society for Horticultural Science 126: 216-220.

Fracheboud, Y., Haldimann, P., Leipner, J. and Stamp, P. (1999) Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). Journal of Experimental Botany 50: 1533-1540.

Fujimura, S., Suzuki, K., Nagao, M. and Okada, M. (2012) Acclimation to root chilling increases sugar concentrations in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. Scientia Horticulturae 147: 34-41.

Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J. M. and Baker, N. R. (1990) The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem 2 photochemistry in leaves. Photosynthesis Research 25: 249-257.

Gilmour, S. J., Fowler, S. G. and Thomashow, M. F. (2004) *Arabidopsis* transcriptional activators *CBF1*, *CBF2*, and *CBF3* have matching functional activities. Plant Molecular Biology 54: 767-781.

Gilmour, S. J., Sebolt, A. M., Salazar, M. P., Everard, J. D. and Thomashow, M. F. (2000) Overexpression of the *Arabidopsis CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. Plant Physiology 124: 1854-1865.

Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M. and Thomashow, M. F. (1998) Low temperature regulation of the *Arabidopsis CBF* family of *AP2* transcriptional activators as an early step in cold‐induced *COR* gene expression. The Plant Journal 16: 433-442.

Guo, Z., Tan, H., Zhu, Z., Lu, S. and Zhou, B. (2005) Effect of intermediates on ascorbic acid and oxalate biosynthesis of rice and in relation to its stress resistance. Plant Physiology and Biochemistry 43: 955-962.

Jain, M., Mathur, G., Koul, S. and Sarin, N. (2001) Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Reports 20: 463-468.

Janero, D. R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radical Biology and Medicine 9: 515-540.

Jiang, M. and Zhang, J. (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. Plant and Cell Physiology 42: 1265-1273.

Joshi, S., Chandra, S. and Palni, L. (2007) Differences in photosynthetic characteristics and accumulation of osmoprotectants in saplings of evergreen plants grown inside and outside a glasshouse during the winter season. Photosynthetica 45: 594-600.

Knight, M. R. and Knight, H. (2012) Low‐temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. New Phytologist 195: 737-751.

Koster, K. L. and Leopold, A. C. (1988) Sugars and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiology 88: 829-832.

Li, X. G., Duan, W., Meng, Q. W., Zou, Q. and Zhao, S. J. (2004) The function of chloroplastic NAD (P) H dehydrogenase in tobacco during chilling stress under low irradiance. Plant and Cell Physiology 45: 103-108.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25: 402-408.

Lu, M., Ying, S., Zhang, D. F., Shi, Y. S., Song, Y. C., Wang, T. Y. and Li, Y. (2012) A maize stress-responsive NAC transcription factor, *ZmSNAC1*, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic *Arabidopsis*. Plant cell reports 31: 1701-1711.

Lutts, S., Kinet, J. and Bouharmont, J. (1996) NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Annals of Botany 78: 389-398.

Ma, N. N., Zuo, Y. Q., Liang, X. Q., Yin, B., Wang, G. D. and Meng, Q. W. (2013) The multiple stress‐responsive transcription factor *SlNAC1* improves the chilling tolerance of tomato. Physiologia Plantarum 149: 474-486.

Mishra, A., Mishra, K. B., Hoermiller, I. I., Heyer, A. G. and Nedbal, L. (2011) Chlorophyll fluorescence emission as a reporter on cold tolerance in *Arabidopsis thaliana* accessions. Plant Signaling & Behavior 6: 301-310.

Morgan, J. M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. Annual Review of Plant Physiology 35: 299-319.

Nelson, N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry 153: 375-380.

Peng, X., Wu, Q., Teng, L., Tang, F., Pi, Z. and Shen, S. (2015) Transcriptional regulation of the paper mulberry under cold stress as revealed by a comprehensive analysis of transcription factors. BMC Plant Biology 15: 1.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]

Qu, Y., Duan, M., Zhang, Z., Dong, J. and Wang, T. (2016) Overexpression of the *Medicago falcata* NAC transcription factor *MfNAC3* enhances cold tolerance in Medicago truncatula. Environmental and Experimental Botany 129: 67-76.

Ricachenevsky, F. K., Menguer, P. K. and Sperotto, R. A. (2013) *kNACking* on heaven's door: how important are *NAC* transcription factors for leaf senescence and Fe/Zn remobilization to seeds. Frontiers in Plant Science 4: 1-7.

Seyyednejad, M., Ebrahimzadeh, H. and Talaie, A. (2001) Carbohydrate content in olive Zard cv and alternate bearing pattern. International Sugar Journal 103: 84-87.

Steponkus, P. L. and Lanphear, F. (1967) Light stimulation of cold acclimation: production of a translocatable promoter. Plant Physiology 42: 1673-1679.

Wang, N., Zheng, Y., Xin, H., Fang, L. and Li, S. (2013) Comprehensive analysis of *NAC* domain transcription factor gene family in *Vitis vinifera*. Plant Cell Reports 32: 61-75.

Yadeghari, L. Z., Heidari, R. and Carapetian, J. (2008) The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MDA), total protein and pigments contents in soybean (*Glycine max*) seedlings. Research Journal of Biological Sciences 3: 74-79.

Yang, R., Deng, C., Ouyang, B. and Ye, Z. (2011) Molecular analysis of two salt-responsive *NAC*-family genes and their expression analysis in tomato. Molecular Biology Reports 38: 857-863.

Zhang, Q., Chen, Q., Wang, S., Hong, Y. and Wang, Z. (2014) Rice and cold stress: methods for its evaluation and summary of cold tolerance-related quantitative trait loci. Rice 7: 24.

Zhang, Y. J., Yang, J. S., Guo, S. J., Meng, J. J., Zhang, Y. L., Wan, S. B., He, Q. W. and Li, X. G. (2011) Over‐expression of the *Arabidopsis CBF1* gene improves resistance of tomato leaves to low temperature under low irradiance. Plant Biology 13: 362-367.

Zivcak, M., Brestic, M., Olsovska, K. and Slamka, P. (2008) Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. Plant Soil Environment 54: 133-139.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-27]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.5.6]