

## کاربرد تکنیک فلورسانس کلروفیل برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرمای هوا و آب در گیاه برنج (*Oryza sativa* L.)

زبیده حسنی M.Sc. Student<sup>۱</sup>، همت‌اله پیردشتی Ph.D.\*<sup>۲</sup>، یاسر یعقوبیان Ph.D. Student<sup>۳</sup>، محمد زمان نوری Ph.D.<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
  - ۲- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، گروه زراعت و اصلاح نباتات، ساری، ایران
  - ۳- دانشجوی دکتری زراعت، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران
  - ۴- موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران (آمل)، آمل، ایران
- \* پست الکترونیک نویسنده مسئول: h.pirdashti@sanru.ac.ir و pirdasht@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۲۳

### چکیده

**هدف:** پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تنش سرمای هوا و آب بر پارامترهای فلورسانس کلروفیلی در ژنوتیپ‌های مختلف برنج اجرا گردید.

**مواد و روش‌ها:** شش ژنوتیپ برنج شامل ارقام کوهسار، شیروودی، طارم هاشمی و لاین‌های IR752 و RI96، PSB44 در شرایط هیدروپونیک کشت شدند و پس از دو هفته، به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمارهای شاهد (۲۸ درجه سانتی‌گراد)، هوای سرد (۸ درجه سانتی‌گراد) و آب سرد (۸ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و سپس پارامترهای فلورسانس کلروفیل اندازه‌گیری گردید.

**نتایج:** تنش هوای سرد در تمامی پارامترهای مورد بررسی موثر بود و موجب کاهش فلورسانس متغیر (Fv)، حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm)، کارایی کوانتومی فتوشیمیایی موثر فتوسیستم II [Y(II)], ضریب خاموشی فتوشیمیایی (qP) و سرعت انتقال الکترون (ETR) شد در حالی که کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم‌شده فتوسیستم II [Y(NPQ)], کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم‌نشده فتوسیستم II [Y(NO)], خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) و ضریب خاموشی غیرفتوشیمیایی (qN) را افزایش داد. تنش سرمای آب تنها بر پارامترهای فلورسانس حداقل (Fo)، فلورسانس حداکثر (Fm)، Fv و ETR اثر معنی‌داری داشت. در شرایط تنش هوای سرد لاین PB44 و رقم طارم هاشمی و در تنش آب سرد ژنوتیپ‌های RI752 و PB44 کمترین تغییرات را در پارامترهای فلورسانس نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** تنش هوای سرد اثر بیشتری نسبت به تنش آب سرد داشت. در شرایط تنش هوای سرد لاین PB44 و رقم طارم هاشمی به‌عنوان متحمل‌ترین و ژنوتیپ‌های RI96، IR752 و رقم شیروودی حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها شناخته شدند. در تنش آب سرد نیز ژنوتیپ‌های RI752 و PB44 متحمل‌ترین و ژنوتیپ‌های IR96 و شیروودی حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها بودند.

**واژگان کلیدی:** برنج، تنش سرما، فلورسانس کلروفیلی، هیدروپونیک

## مقدمه

با توجه به تغییر آب و هوای جهانی، تنش‌های دمایی به نگرانی عمده‌ای برای گیاه‌شناسان در سراسر جهان تبدیل شده است (۱). دمای پایین با تاثیر بر ویژگی‌های مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی بسیاری از گیاهان زراعی یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی محدودکننده رشد گیاهان محسوب می‌شود (۲ و ۳). بررسی آمار چهل ساله هواشناسی شمال ایران نشان می‌دهد که شالیزارهای این ناحیه همواره در معرض خطر بروز تنش سرما قرار دارند و این تنش یکی از عوامل محدودکننده رشد گیاه برنج در این نواحی محسوب می‌شود و سالانه موجب بروز خسارت به زراعت برنج خصوصا در خزانه و مراحل ابتدایی رشد می‌گردد (۴). تنش سرما با اختلال در فرآیندهای مختلف گیاه از جمله تقسیم سلولی، انتقال آب و فتوسنتز باعث نقصان رشد می‌گردد که در نهایت کاهش عمل کرد را به دنبال دارد (۵). دمای پایین با تاثیر بر بخش‌های مختلف سیستم فتوسنتزی، از جمله تنظیم قطر منافذ روزنه‌ها، سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت فتوسیستم‌های I و II، تثبیت دی‌اکسید کربن را با مشکل مواجه می‌سازد و فعالیت فتوسنتزی را کاهش می‌دهد (۶).

برنج (*Oryza sativa* L.) از مهم‌ترین محصولات زراعی جهان است که مبداء آن مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌باشد و برخلاف سایر غلات از جمله گندم، جو و چاودار به آب و هوای سرد سازگار نیست و در دمای کمتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد آسیب می‌بیند (۷ و ۸). در همین راستا قربانی و همکاران (۹) در پژوهشی نشان دادند که بیشتر وارپته‌های برنج کشور در فصل خزانه‌گیری تحمل سرما را ندارند و در صورت کاهش دمای محیط آسیب می‌بینند. در گیاه برنج آسیب به فرآیندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی در اثر تنش سرما می‌تواند برگشت‌ناپذیر باشد و از طریق افزایش نفوذپذیری غشا و بازدارندگی سنتز کلروفیل، منجر به کاهش فتوسنتز و در نهایت کاهش رشد و عملکرد گیاه گردد (۱۰ و ۱۱). علاوه بر موارد فوق، مشکل سرما در ارتفاعات شمال کشور ناشی از آبیاری با آب سرد می‌اشد، همچنین حدود پنجاه درصد از شالیزارهای استان مازندران از آب سرد چاه آبیاری می‌شوند و در ۲۰ تا ۳۰ درصد از ابتدای زمین با تنش آب سرد مواجه هستند. در کشت زود هنگام برنج به‌منظور برداشت رتون یا احیانا دوبار کشت برنج که در سطح قابل توجهی در استان‌های شمالی کشور انجام می‌شود، سرمای ابتدای کشت به‌عنوان عامل محدودکننده می‌باشند. لذا

دستیابی به ارقام متحمل در این خصوص به‌عنوان یک راهکار مناسب ذکر شده است (۱۲). دمای آب بر فرآیندهای مختلف رشد برنج تاثیر می‌گذارد که نوع و میزان تاثیر آن با توجه به مرحله رشدی گیاه متفاوت می‌باشد. طی مرحله رویشی، تنش سرمای آب سرعت پنجه‌زنی، پیدایش و رشد برگ‌ها را کاهش می‌دهد و در بعضی مواقع با زرد شدن برگ‌ها همراه می‌شود (۱۳ و ۱۴).

از نشانه‌های اصلی حساسیت به دمای پایین، آسیب به سیستم فتوسنتزی گیاه است به‌طوری‌که میزان کلروفیل و فتوسنتز برگ تحت تنش سرما کاهش می‌یابد که علت آن تخریب اجزای پروتئینی و لیپیدی غشای تیلاکوئیدی در اثر تنش می‌باشد (۱۵ و ۱۶). در این میان، فتوسیستم II که نقش مهمی در واکنش‌های فتوسنتزی گیاهان به تنش‌های محیطی دارد اولین بخش در دستگاه فتوسنتزی است که به این تنش‌ها عکس‌العمل نشان می‌دهد (۱۷ و ۱۸). در همین راستا، Apostolova و همکاران (۱۹) بیان داشته‌اند که در زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی، فتوسیستم II نسبت به فتوسیستم I به تنش‌های محیطی حساس‌تر است که یکی از دلایل این حساسیت بیشتر، وجود کمپلکس تجزیه‌کننده آب در فتوسیستم II می‌باشد.

انرژی حاصل از نور بعد از جذب به‌وسیله مولکول‌های کلروفیل برگ، در طول زنجیره انتقال الکترون منتقل می‌شود و برای اجرای فرایند فتوسنتز (فرآیند فتوشیمیایی) مصرف می‌گردد و انرژی اضافی یا به‌صورت گرما هدر می‌رود (فرایند غیرفتوشیمیایی) یا به‌صورت نور قرمز بازتاب داده می‌شود که فلورسانس کلرفیل نامیده می‌شود (۲۰). این سه فرآیند به‌صورت رقابتی اتفاق می‌افتند، بنابراین از طریق اندازه‌گیری عمل کرد فلورسانس کلروفیلی، می‌توان اطلاعاتی در مورد تغییرات در کارایی فتوشیمیایی و هدر رفت گرمایی به‌دست آورد (۲۱). تنش‌های غیر زنده از جمله تنش سرما از طریق آسیب به فتوسیستم II و سایر اجزای زنجیره انتقال الکترون سبب بازدارندگی یا کاهش شدید انتقال الکترون فتوسنتزی می‌شوند که در این صورت سهم بیشتری از انرژی نورانی جذبی، به‌صورت گرما و فلورسانس هدر خواهد رفت (۲۲). بر اساس پژوهش‌های انجام شده، جریان الکترون در فتوسنتز، شاخصی برای میزان کلی فتوسنتز می‌باشد به‌طوری‌که اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیلی، تخمین میزان جریان الکترون و نحوه‌ی عمل فتوسنتز را امکان‌پذیر می‌سازد (۲۳). از سوی دیگر، فلورسانس کلروفیلی

موسسه تحقیقات برنج کشور - معاونت مازندران (آمل) تهیه گردید. ابتدا بذرها با هیپوکلرید سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و سپس به مدت ۵ روز در ژرمیناتور با دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد جوانه‌دار شدند. بذرها را جوانه‌دار به محیط کشت هیدروپونیک و در ظرف‌هایی با حجم چهار لیتر (به ابعاد ۱۳×۲۱×۲۷ سانتی‌متر) انتقال یافتند. تا دو روز بعد از انتقال، از آب مقطر استفاده شد و سپس گیاهچه‌ها به مدت یک هفته در محلول غذایی یوشیدا ۵۰ درصد رشد نمودند و پس از آن محلول یوشیدا کامل به ظرف‌ها اضافه شد و هر هفت روز تعویض گردید (۴۶). شرایط گلخانه با فتوپریود ۱۶/۸ (شب/روز) ساعت و دمای ۲۸/۲۵ (شب/روز) تنظیم و دو هفته پس از کاشت، تیمارهای دمایی اعمال شد. به منظور اعمال تنش هوای سرد، گیاهچه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در اتاقک رشد با دمای ۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و برای اعمال تنش آب سرد از دستگاه سردکننده (CL Series Water Chiller-CL600, China) استفاده گردید. گیاهچه‌های شاهد نیز در شرایط گلخانه با دمای ۲۸/۲۵ (شب/روز) نگهداری شدند.

جدول ۱: اسامی و کد اختصاری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	کد اختصاری
۱	کوهسار	-
۲	شیرودی	-
۳	طارم هاشمی	-
۴	RI 1812084- 96-1-1	RI96
۵	IR75482-149-1-1	IR752
۶	IR75481-104-2-3	PSB44

پس از اعمال تنش سرما اندازه‌گیری پارامترهای فلورسانس کلروفیلی در آخرین برگ توسعه یافته با استفاده از دستگاه فلورومتر (PAM 2500-Walz, Germany) و بر اساس روش Genty و همکاران (۴۷) صورت گرفت. بدین منظور، برگ‌ها با استفاده از گیره‌های مخصوص برگ (2030-B, Walz) به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. فلورسانس حداقل (Fo) با همی مراکز واکنشی باز فتوسیستم II، توسط نور مدوله شده‌ای با شدت پایین ( $0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) و فلورسانس حداکثر (Fm) با تابش پالس اشباع نوری ( $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) به مدت یک ثانیه در برگ‌های سازگار به تاریکی تعیین شد. در مرحله بعد نور مرئی سفید رنگ ( $685 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) به صورت متوالی به برگ تابانیده شد و بعد از آن میزان فلورسانس پایدار (Ft) ثبت و مجدداً پالس اشباع نوری ( $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) اعمال و میزان فلورسانس حداکثر (Fm') در برگ‌های سازگار به روشنایی

به‌عنوان بازتاب واکنش‌های اولیه فتوسنتز (۲۴)، یک شاخص فیزیولوژیک معتبر برای مشخص نمودن تغییرات القایی در دستگاه فتوسنتزی می‌باشد که عملیات ارزیابی آن، بدون تخریب بافت گیاهی و در کمترین زمان صورت می‌گیرد (۲۵). تاکنون از فلورسانس کلروفیلی برای مطالعه‌ی واکنش گیاهان در شرایط تنش‌های مختلف از جمله شوری (۲۶ و ۲۷)، خشکی (۲۸) و سرما (۲۹، ۳۰ و ۳۱) استفاده گردیده است.

تغییر در مقدار فلورسانس کلروفیل سیستمی برای شناخت و ارزیابی تحمل تنش برای درجه‌بندی گیاهان نیز می‌باشد (۳۲). امروزه برای غربالگری و شناسایی ژنوتیپ‌های حساس و متحمل گونه‌های زراعی از روش‌های بیوشیمیایی در گیاهانی چون سیب‌زمینی (۳۳)، گندم (۳۴) و کلزا (۳۵)، روش‌های مولکولی در ژنوتیپ‌های گیاهان گندم (۳۶)، سیب‌زمینی (۳۷)، برنج (۳۸) و گوجه‌فرنگی (۳۹) و همچنین از روش‌های فیزیولوژیک در گیاهانی نظیر نخود (۴۰) و نیشکر (۴۱) تحت تنش‌های محیطی مختلف استفاده شده است. با این وجود، این روش‌ها نیازمند زمان زیاد و شرایط خاص آزمایشگاهی هستند در نتیجه روش فلورسانس کلروفیل به‌عنوان روشی سریع و غیر تخریبی برای غربالگری ژنوتیپ‌های مختلف در تحمل به تنش‌های محیطی از جمله تنش سرما پیشنهاد شده است (۲۴ و ۴۲). به طوری که از این تکنیک برای مقایسه ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان زراعی چون ذرت (۴۳ و ۴۴)، سویا (۳۱) و یولاف (۴۵) در مقاومت به تنش‌های محیطی از جمله تنش سرما استفاده شده است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تنش سرمای هوا و آب بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در ژنوتیپ‌های مختلف برنج و همچنین به‌کارگیری این روش برای شناسایی ژنوتیپ‌های حساس و متحمل برنج به این تنش‌ها در مرحله‌ی گیاهچه‌ای اجرا گردید.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در پاییز ۱۳۹۱ در گلخانه‌ی تحقیقاتی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در شرایط هیدروپونیک و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل و با سه تکرار به اجرا در آمد. تیمارهای آزمایشی شامل سه تیمار دمایی [شاهد (دمای ۲۸/۲۵ (شب/روز))، هوای سرد (۸ درجه سانتی‌گراد) و آب سرد (۸ درجه سانتی‌گراد)] و ۶ ژنوتیپ برنج (جدول ۱) بود که از

$Y(II) = (Fm' - Ft) / Fm'$	معادله (۳)	تعیین شد. سپس پرتو نوری مرئی قطع و با تابش نور قرمز دور
$Y(NPQ) = (Ft / Fm') - (Ft / Fm)$	معادله (۴)	فلورسانس حداقل در مرحله روشنایی ( $Fo'$ ) ثبت گردید.
$Y(NO) = Ft / Fm$	معادله (۵)	فرکانس نوری برای اندازه‌گیری $Fo$ و $Fo'$ ۶۰۰ هرتز و برای
$NPQ = Fm - Fm' / Fm'$	معادله (۶)	$Fm$ و $Fm'$ ۲۰ کیلوهرتز بود. با استفاده از پارامترهای تعیین
$qP = (Fm' - Ft) / (Fm' - Fo')$	معادله (۷)	شده در برگ‌های سازگار به تاریکی و روشنایی، میزان فلورسانس
$qN = 1 - (Fm' - Fo') / (Fm - Fo)$	معادله (۸)	متغیر (Variable fluorescence = $Fv$ )، حداکثر کارایی
$ETR = Y(II) \times PFDa \times (0.5)$	معادله (۹)	کوانتومی فتوسیستم II (Maximum photochemical )

داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه گردید و میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

### نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر پارامترهای  $Fv$ ،  $Fm$ ،  $Fo$ ،  $Fv/Fm$  و  $qP$  در سطح احتمال یک درصد ( $P < 0.01$ ) تفاوت معنی‌داری داشتند. تمامی پارامترهای مورد مطالعه نیز در اثر تنش سرما اختلاف معنی‌داری را نشان دادند به طوری که این معنی‌دار شدن در  $Fo'$ ،  $NPQ$  و  $qP$  در سطح احتمال پنج درصد و در سایر پارامترها در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد. اثر متقابل تنش سرما و ژنوتیپ نیز در پارامترهای  $Fo$ ،  $Y(II)$ ،  $Fv$ ،  $Fv/Fm$  و  $qP$  در سطح احتمال یک درصد و همچنین  $Fm$ ،  $Y(NPQ)$  و  $ETR$  در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار گردید.

کوانتومی فتوسیستم II (Maximum photochemical )  $Y(II)$  (quantum yield of photosystem II =  $Fv/Fm$ ) کارایی کوانتومی فتوشیمیایی موثر فتوسیستم II Effective photochemical quantum yield of [photosystem II =  $Y(II)$ ]، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم شده فتوسیستم II Quantum yield of regulated [ II ]، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II Quantum yield of [ II ] non-photochemical =  $Y(NPQ)$ ، کارایی کوانتومی غیر-فتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II Quantum yield of [ II ] non-regulated non-photochemical =  $Y(NO)$  و خاموشی غیرفتوشیمیایی (Non-photochemical quenching =  $NPQ$ )، ضریب خاموشی فتوشیمیایی (Photochemical quenching coefficient =  $qP$ )، ضریب خاموشی غیرفتوشیمیایی (Non-photochemical quenching coefficient =  $qN$ ) و سرعت انتقال الکترون (Electron transport rate =  $ETR$ ) براساس معادلات ۱ تا ۹ محاسبه گردید (۴۸ و ۴۹).

معادله (۱)  $Fv = Fm - Fo$   
 معادله (۲)  $Fv/Fm = (Fm - Fo) / Fm$

جدول ۲: میانگین مربعات اثر تنش سرما بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در ژنوتیپ‌های برنج

منابع تغییر	ژنوتیپ (A)	تنش سرما (B)	A×B	خطای	ضریب تغییرات (درصد)
درجه آزادی	۵	۲	۱۰	۳۶	
$Fo$	۰/۰۴۲**	۰/۰۲۸**	۰/۰۲۶**	۰/۰۰۵	۶/۲۶
$Fm$	۰/۰۷۹**	۴/۹۶۳**	۰/۵۰۱*	۰/۱۸۸	۱۰/۷۱
$Fv$	۰/۵۷۲**	۵/۵۶۱**	۰/۳۸۱**	۰/۱۲۴	۱۲/۰۵
$Fv/Fm$	۰/۰۰۲**	۰/۰۴۴**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۰۳	۲/۴۶
$Fo'$	۰/۰۱۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۳۴*	۰/۰۱۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۷	۱۱/۹۶
$Fm'$	۰/۱۰۰ <sup>ns</sup>	۱/۰۰۲**	۰/۰۸۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۶۱	۱۸/۰۶
$Y(II)$	۰/۰۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۹۰**	۰/۰۰۷**	۰/۰۰۲	۸/۵۰
$Y(NPQ)$	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۴۱**	۰/۰۰۴*	۰/۰۰۱	۱۶/۷۹
$Y(NO)$	۰/۰۰۰۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۴**	۰/۰۰۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۳	۱۵/۰۲
$NPQ$	۰/۰۰۲۶ <sup>ns</sup>	۰/۸۳۱*	۰/۱۴۸ <sup>ns</sup>	۰/۱۸۶	۲۱/۷۸
$qN$	۰/۰۰۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۴**	۰/۰۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۲	۶/۶۷
$qP$	۰/۰۰۶**	۰/۰۵۱*	۰/۰۴۱**	۰/۰۱۱	۸/۰۰
$ETR$	<sup>ns</sup> ۱/۰۶۵	**۲۰/۰۹۳	*۳/۱۱۵	۱/۱۵۴	۱۲/۷۰

\* و \*\* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، <sup>ns</sup> غیر معنی‌دار

تنش سرمای هوا، فلورسانس متغیر (Fv) و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسنتز II (Fv/Fm) را در تمام ژنوتیپ‌های مورد بررسی به جز PSB44، به شدت کاهش داد. از بین شش ژنوتیپ مورد مطالعه کمترین میزان هر دو پارامتر Fv/Fm و Fv در ژنوتیپ شیرودی مشاهده گردید که نسبت به تیمار شاهد نیز بیشترین کاهش (به ترتیب ۴۲ و ۱۹ درصد) را داشت (جدول ۳). با این وجود Fv تنها در ژنوتیپ IR752 نسبت به تیمار شاهد با ۲۵/۲۶ درصد کاهش، تفاوت معنی‌داری نشان داد. تنش سرمای آب نیز بر Fv تاثیر معنی‌داری داشت. همچنین بین ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش سرمای آب از نظر حداکثر کارایی کوانتومی فتوسنتز II تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳).

مقایسه میانگین اثر متقابل تنش سرما و ژنوتیپ (جدول ۳) نشان داد که تنش هوای سرد باعث افزایش فلورسانس حداقل در ژنوتیپ‌های RI96 (۲۵/۶۶ درصد) و PSB44 (۱۲/۵۰ درصد) نسبت به تیمار شاهد گردید ولی در سایر ژنوتیپ‌ها اثر معنی‌داری نداشت. در تنش سرمای آب نیز میزان فلورسانس حداقل در ژنوتیپ‌های PSB44 و طارم هاشمی (به ترتیب ۱۵/۶۲ و ۱۱/۹۲ درصد) به صورت معنی‌داری افزایش ولی در ژنوتیپ IR752 (۱۸/۱۱ درصد) کاهش یافت (جدول ۳). تنش سرمای هوا به جز ژنوتیپ PSB44 در تمامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه باعث کاهش معنی‌دار میزان فلورسانس حداکثر (Fm) گردید که بیشترین کاهش در ژنوتیپ IR752 (۳۱/۰۱ درصد) مشاهده شد. تنش آب سرد تنها در ژنوتیپ IR752 کاهش معنی‌داری در Fm ایجاد کرد (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میانگین اثر متقابل تنش سرما × ژنوتیپ بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه برنج

ژنوتیپ						تنش سرما
RI96	IR752	PSB44	طارم هاشمی	شیرودی	کوهسار	
فلورسانس حداقل (Fo)						
۱/۱۳ <sup>c-g</sup>	۱/۲۷ <sup>b</sup>	۰/۹۶ <sup>h</sup>	۱/۰۹ <sup>e-g</sup>	۱/۰۷ <sup>f-h</sup>	۱/۱۰ <sup>d-g</sup>	شاهد
۱/۴۲ <sup>a</sup>	۱/۲۰ <sup>b-e</sup>	۱/۰۸ <sup>f-g</sup>	۱/۰۶ <sup>f-h</sup>	۱/۱۶ <sup>b-f</sup>	۱/۱۷ <sup>b-f</sup>	هوای سرد
(+۲۵/۶۶)	(-۵/۵۲)	(+۱۲/۵)	(+۲/۷۶)	(+۸/۴۱)	(+۶/۳۶)	
۱/۲۱ <sup>b-d</sup>	۱/۰۴ <sup>g-h</sup>	۱/۱۱ <sup>c-g</sup>	۱/۲۲ <sup>b-c</sup>	۱/۰۸ <sup>e-g</sup>	۱/۱۵ <sup>c-g</sup>	آب سرد
(-۷/۰۷)	(-۱۸/۱۱)	(+۱۵/۶۲)	(+۱۱/۹۲)	(+۰/۹۳)	(+۴/۵۴)	
فلورسانس حداکثر (Fm)						
۴/۵۲ <sup>a-c</sup>	۵/۰۳ <sup>a</sup>	۳/۶۴ <sup>e-g</sup>	۴/۵۱ <sup>a-c</sup>	۴/۱۳ <sup>c-f</sup>	۴/۴۶ <sup>a-d</sup>	شاهد
۳/۵۱ <sup>e-g</sup>	۳/۴۷ <sup>f-g</sup>	۳/۷۶ <sup>d-f</sup>	۳/۵۹ <sup>e-g</sup>	۲/۹۴ <sup>g</sup>	۳/۴۳ <sup>f-g</sup>	هوای سرد
(-۲۲/۳۴)	(-۳۱/۰۱)	(+۳/۲۹)	(-۲۰/۳۹)	(-۲۸/۸۱)	(-۲۳/۰۹)	
۵/۰۳ <sup>a</sup>	۳/۸۵ <sup>c-f</sup>	۴/۱۹ <sup>b-e</sup>	۳/۵۹ <sup>e-g</sup>	۳/۶۴ <sup>e-g</sup>	۳/۴۳ <sup>f-g</sup>	آب سرد
(+۱۸/۳۵)	(-۲۲/۴۵)	(+۱۵/۱۰)	(+۸/۲۰)	(-۱۱/۸۶)	(-۱/۳۴)	
فلورسانس متغیر (Fv)						
۳/۳۸ <sup>a-d</sup>	۳/۷۶ <sup>a</sup>	۲/۶۷ <sup>g-h</sup>	۳/۴۱ <sup>a-c</sup>	۳/۰۶ <sup>c-f</sup>	۳/۳۶ <sup>a-d</sup>	شاهد
۲/۱۹ <sup>h-i</sup>	۲/۲۶ <sup>g-i</sup>	۲/۶۷ <sup>g-h</sup>	۲/۵۲ <sup>f-h</sup>	۱/۷۷ <sup>i</sup>	۲/۲۵ <sup>g-i</sup>	هوای سرد
(-۳۵/۲۰)	(-۳۹/۸۹)	(۰/۰۰)	(-۲۶/۰۹)	(-۴۲/۱۵)	(-۳۳/۰۳)	
۳/۸۱ <sup>a</sup>	۲/۸۱ <sup>d-g</sup>	۳/۰۸ <sup>b-f</sup>	۳/۶۵ <sup>ab</sup>	۲/۶۴ <sup>f-h</sup>	۳/۲۵ <sup>a-e</sup>	آب سرد
(+۱۲/۷۲)	(-۲۵/۲۶)	(+۱۵/۳۵)	(+۷/۰۳)	(-۱۲/۷۲)	(-۳/۲۷)	
حداکثر کارایی کوانتومی فتوسنتز II (Fv/Fm)						
۰/۷۴۷ <sup>ab</sup>	۰/۷۴۷ <sup>ab</sup>	۰/۷۳۴ <sup>a-c</sup>	۰/۷۵۶ <sup>a</sup>	۰/۷۴۰ <sup>ab</sup>	۰/۷۵۳ <sup>a</sup>	شاهد
۰/۶۲۱ <sup>f-g</sup>	۰/۶۴۷ <sup>ef</sup>	۰/۷۱۰ <sup>cd</sup>	۰/۷۰۳ <sup>d</sup>	۰/۶۰۳ <sup>g</sup>	۰/۶۵۷ <sup>e</sup>	هوای سرد
(-۱۶/۲۱)	(-۱۳/۵۱)	(-۲/۷۳)	(-۶/۶۶)	(-۱۸/۹۱)	(-۱۳/۳۳)	
۰/۷۵۷ <sup>a</sup>	۰/۷۲۹ <sup>a-d</sup>	۰/۷۳۴ <sup>a-c</sup>	۰/۷۴۸ <sup>ab</sup>	۰/۷۲۴ <sup>b-d</sup>	۰/۷۳۸ <sup>a-c</sup>	آب سرد
(+۱/۳۵)	(-۱/۳۵)	(۰/۰۰)	(-۱/۳۳)	(-۲/۷۰)	(-۲/۶۶)	

برای هر پارامتر در هر ستون و ردیف میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. اعداد داخل پارانتر بیانگر درصد افزایش (+) و کاهش (-) نسبت به شاهد است.

فتوسیستم II [Y(NO)]، خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) و ضریب خاموشی غیرفتوشیمیایی (qN) در شرایط هوای سرد نسبت به شاهد به ترتیب به میزان ۱۷، ۲۵ و ۸ درصد افزایش نشان دادند ولی تنش آب سرد اثر معنی‌داری بر این پارامترها نداشت (جدول ۴).

باتوجه به نتایج جدول ۴، تنش هوای سرد سبب کاهش فلورسانس حداقل (Fo') و فلورسانس حداکثر (Fm') در شرایط سازگار به روشنایی گردید که این کاهش نسبت به تیمار شاهد به ترتیب حدود ۱۰ و ۳۰ درصد بود. تنش آب سرد نیز سبب کاهش این پارامترها گردید هرچند تفاوت آن با تیمار شاهد معنی‌دار نبود. کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده -

جدول ۴: اثر ساده تنش سرما بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه برنج

تنش سرما	Fo'	Fm'	Y(NO)	NPQ	qN
شاهد	۰/۷۵ <sup>a</sup>	۱/۵۴ <sup>a</sup>	۰/۱۲ <sup>b</sup>	۱/۷۸ <sup>b</sup>	۰/۷۵ <sup>b</sup>
هوای سرد	۰/۶۷ <sup>a</sup>	۱/۱۰ <sup>b</sup>	۰/۱۴ <sup>a</sup>	۲/۲۱ <sup>a</sup>	۰/۸۱ <sup>a</sup>
	(-۱۰/۶۶)	(-۲۸/۵۷)	(+۱۶/۶۶)	(+۲۴/۱۵)	(+۸/۰۰)
آب سرد	۰/۷۴ <sup>a</sup>	۱/۴۷ <sup>a</sup>	۰/۱۲ <sup>b</sup>	۱/۹۵ <sup>ab</sup>	۰/۷۷ <sup>b</sup>
	(-۱/۳۳)	(-۴/۵۴)	(۰/۰۰)	(+۹/۵۵)	(+۲/۶۶)

در هر ستون میانگین‌های دارای حرف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول ۵: برهم‌کنش تنش سرما و ژنوتیپ از نظر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه برنج

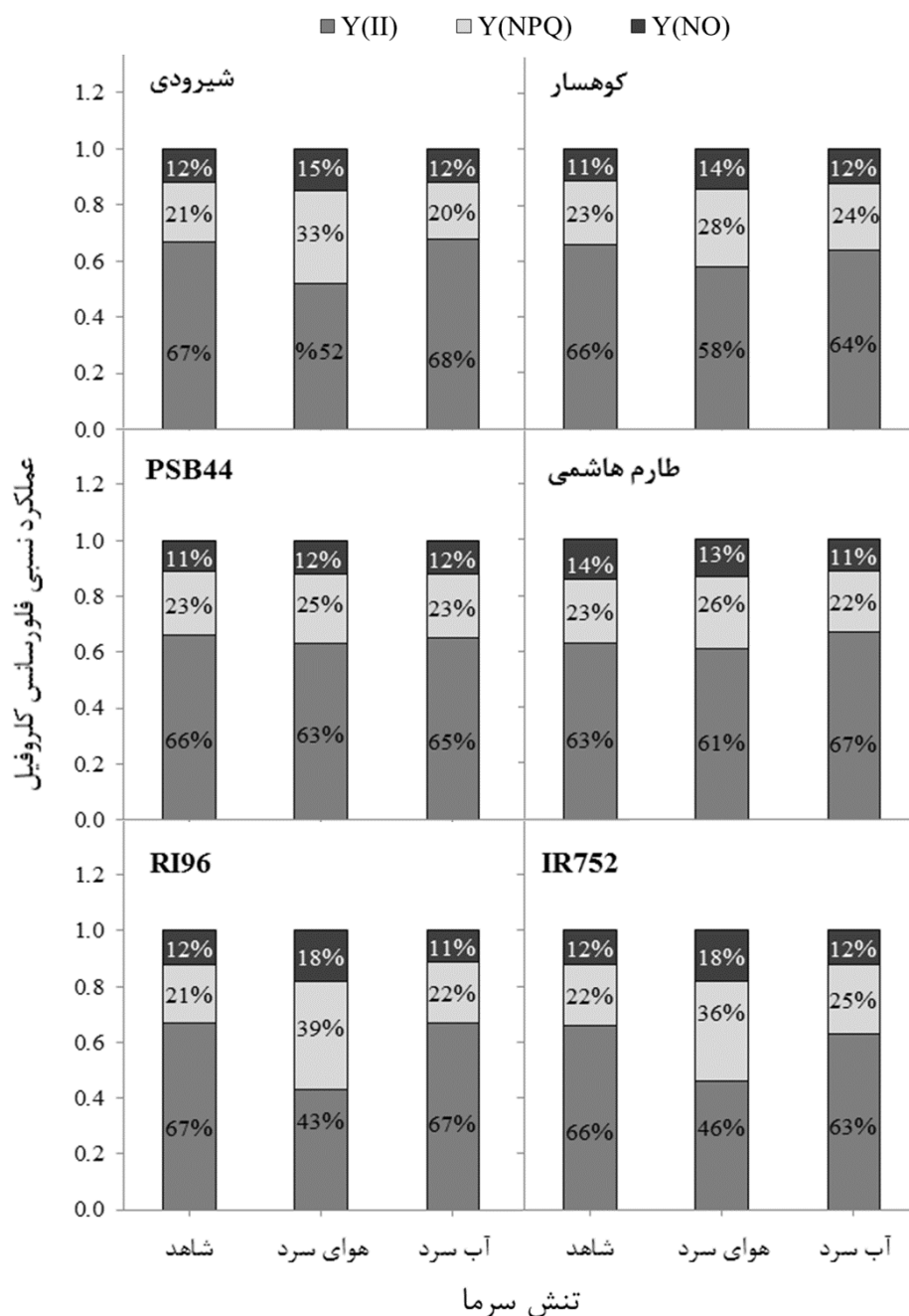
ژنوتیپ	تنش سرما				
	کوهسار	شیرودی	طارم هاشمی	PSB44	IR752
	ضریب خاموشی فتوشیمیایی (qP)				
شاهد	۱/۲۲ <sup>d-e</sup>	۱/۳۱ <sup>c-e</sup>	۱/۱۸ <sup>ef</sup>	۱/۴۱ <sup>bc</sup>	۱/۲۵ <sup>c-e</sup>
هوای سرد	۱/۵۲ <sup>ab</sup>	۱/۶۵ <sup>a</sup>	۱/۴۰ <sup>bc</sup>	۱/۴۰ <sup>bc</sup>	۱/۰۶ <sup>f</sup>
	(+۲۴/۵۹)	(+۲۵/۹۵)	(+۱۸/۶۴)	(-۰/۷۰)	(-۱۵/۲)
آب سرد	۱/۳۶ <sup>b-d</sup>	۱/۳۸ <sup>b-d</sup>	۱/۳۳ <sup>c-e</sup>	۱/۳۳ <sup>c-e</sup>	۱/۳۱ <sup>c-e</sup>
	(+۱۱/۴۷)	(+۵/۳۴)	(+۱۲/۷۱)	(-۵/۶۷)	(+۴/۸)
	سرعت انتقال الکترون (ETR)				
شاهد	۱۰/۶۶ <sup>a</sup>	۸/۰۰ <sup>c-f</sup>	۹/۳۳ <sup>a-c</sup>	۹/۳۳ <sup>a-c</sup>	۹/۲۵ <sup>a-c</sup>
هوای سرد	۸/۰۰ <sup>c-f</sup>	۶/۸۳ <sup>e-g</sup>	۷/۳۳ <sup>d-g</sup>	۸/۶۶ <sup>b-d</sup>	۶/۵۰ <sup>f-g</sup>
	(-۲۴/۹۵)	(-۱۴/۶۲)	(-۲۱/۴۳)	(-۷/۱۸)	(-۲۹/۷۲)
آب سرد	۸/۰۰ <sup>c-f</sup>	۱۰/۰۰ <sup>ab</sup>	۸/۳۳ <sup>b-e</sup>	۸/۶۶ <sup>b-d</sup>	۸/۵۰ <sup>b-e</sup>
	(-۲۴/۹۵)	(+۲۵/۰۰)	(-۱۰/۷۱)	(-۷/۱۸)	(-۸/۱۰)

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. اعداد داخل پرانتز بیانگر درصد تغییرات نسبت به شاهد است.

شیرودی و PSB44، RI96 و IR752 افزایش ولی در ژنوتیپ طارم هاشمی کاهش یافت. کاهش Y(II) در ژنوتیپ‌های شیرودی (۲۲ درصد)، IR752 (۳۰ درصد) و RI96 (۳۶ درصد) محسوس‌تر بود (شکل ۱). بیشترین افزایش Y(NPQ) در ژنوتیپ‌های شیرودی، IR752 و RI96 (به ترتیب حدود ۵۷، ۶۴ و ۸۶ درصد) و Y(NO) در ژنوتیپ‌های IR752 (۵۰ درصد) و RI96 (۵۰ درصد) مشاهده شد (شکل ۱). تنش سرمای آب تنها

در پژوهش حاضر کارایی کوانتومی موثر فتوسیستم II [Y(II)]، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم شده فتوسیستم II [Y(NPQ)] و کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NO)] تحت تاثیر تنش سرمای هوا قرار گرفتند (شکل ۱). بر اساس یافته‌ها، در تنش سرمای هوا و در تمامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، Y(II) کاهش و Y(NPQ) افزایش یافت. با این وجود، Y(NO) در ژنوتیپ‌های کوهسار،

در پارامتر  $Y(NO)$  و در رقم طارم هاشمی اثر معنی‌داری داشت و نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱: تغییرات مکمل پارامترهای  $Y(NO)$ ،  $Y(NPQ)$ ،  $Y(II)$  در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تحت تنش سرمای آب، هوا و شاهد.

تمامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شد که بیشترین کاهش در ژنوتیپ‌های IR752 و RI96 (به ترتیب حدود ۲۹ و ۲۸ درصد) مشاهده گردید. همچنین سرعت انتقال الکترون در شرایط تنش آب سرد در ژنوتیپ‌های RI96 و شیرودی افزایش و در سایر ژنوتیپ‌ها کاهش یافت (جدول ۵). دو ژنوتیپ شیرودی و کوهسار از نظر سرعت انتقال الکترون (ETR) به طور کاملاً متفاوتی تحت تاثیر تنش آب سرد قرار گرفتند به این صورت که در رقم

پارامتر ضریب خاموشی فتوشیمیایی (qP) در شرایط تنش سرمای هوا در سه رقم شیرودی، کوهسار و طارم هاشمی به ترتیب حدود ۲۶، ۲۵ و ۱۹ درصد نسبت به شاهد افزایش ولی در ژنوتیپ IR752 کاهش یافت. تنش سرمای آب تنها در ژنوتیپ PSB44 (۵/۶ درصد) سبب کاهش qP گردید (جدول ۵).

تنش هوای سرد سبب کاهش سرعت انتقال الکترون (ETR) در

گیاه بین ۰/۵ تا ۳/۵ می‌باشد. افزایش این پارامتر بیانگر ظرفیت بالای چرخه گزانتوفیل و توانایی گیاه در دفع تنش از طریق هدر دادن انرژی به‌صورت گرما می‌باشد (۲۳، ۴۲ و ۵۵). Demmig-Adams و همکاران (۵۶) پیشنهاد کردند که NPQ یک شاخص خوب برای ارزیابی میزان "انرژی نوری اضافی" است که به‌طور عمده به‌وسیله چرخه گزانتوفیل اتلاف می‌شود. در شرایط تنش، فعالیت چرخه گزانتوفیل سبب افزایش اتلاف انرژی به‌صورت گرما و ازدیاد خاموشی غیر فتوشیمیایی (NPQ) می‌شود ولی با افزایش بیشتر سطوح تنش، ممکن است افزایش در NPQ برای مصرف انرژی مازاد و حفظ اکسیداسیون پذیرنده‌های الکترون فتوسیستم II ناکافی باشد (۵۷). Li و همکاران (۵۴) در گیاه توتون تحت تنش سرما و Abdeshahian و همکاران (۵۸) در گیاه گندم تحت تنش شوری، افزایش NPQ را گزارش نمودند.

براساس پژوهش Kramer و همکاران (۵۹) جریان انرژی برانگیختگی در فتوسیستم II در سه مسیر اصلی متفاوت قرار می‌گیرد که عبارتند از کاربرد فتوشیمیایی، هدر رفت گرمایی تنظیم شده که یک فرایند اتلافی برای حفاظت فتوسیستم II محسوب می‌شود و هدر رفت گرمایی تنظیم نشده که یک فرایند اتلافی است که موجب غیر فعال شدن فتوسیستم II می‌شود. این سه جریان به‌ترتیب به‌عنوان عمل کردهای کوانتومی Y(II)، Y(NPQ) و Y(NO) شناخته می‌شوند. Y(II) نسبت نور استفاده شده در فرآیند فتوسنتز به کل نور جذب شده به‌وسیله کلروفیل مربوط به فتوسیستم II را نشان می‌دهد که به‌طور مستقیم به‌سرعت اسیمیلاسیون CO<sub>2</sub> در برگ وابسته است (۴۷ و ۴۹). میزان این پارامتر در ژنوتیپ‌های موجود در پژوهش حاضر در اثر تنش سرمای هوا کاهش یافت (شکل ۱) که احتمال می‌رود این کاهش بیانگر کاهش سرعت فرآیند فتوسنتزی و اسیمیلاسیون CO<sub>2</sub> در اثر تنش سرمای هوا در این ژنوتیپ‌ها - باشد. یامان و همکاران (۲۷) نیز در گیاه برنج تحت تنش شوری به نتایج مشابهی دست یافتند. Y(NPQ) هدر رفت گرمایی مربوط به سیستم حفاظت نوری و Y(NO) نیز سایر اجزای غیرمرتبط با حفاظت نوری است (۶۰). افزایش پارامتر Y(NPQ) در شرایط تنش سرما در گیاه ذرت (۴۴) و در تنش خشکی در گیاهچه‌های خیار (۴۹) گزارش شده است که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. در دمای پایین فعالیت آنزیم روبیسکو و به‌دنبال آن عمل کرد چرخه کالوین و تثبیت CO<sub>2</sub> و در نتیجه مصرف NADPH, H<sup>+</sup> به‌عنوان یکی از محصولات مرحله نوری

شیرودی تنش سرمای آب باعث افزایش ولی در رقم کوهسار کاهش ETR را به‌دنبال داشت.

## بحث

هنگامی که نور در سطح متوسط باشد، بخش غالب آن در فعالیت‌های فتوشیمیایی به مصرف فتوسنتز می‌رسد و بخش کمی از انرژی نورانی به‌صورت فلورسانس ساطع می‌گردد که به‌عنوان فلورسانس حداقل (Fo) شناخته می‌شود (۲۲). در مطالعه حاضر میزان Fo در بیشتر ژنوتیپ‌های مورد بررسی در شرایط هوا و آب سرد افزایش یافت (جدول ۳). افزایش Fo نشان از آسیب به زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II در اثر کاهش ظرفیت کوئینون آ (QA) و عدم اکسیداسیون کامل آن به‌دلیل جریان کند الکترون در طول مسیر فتوسیستم II و در مجموع غیرفعال شدن فتوسیستم II دارد (۵۰). افزایش میزان Fo در اثر تنش سرما در ریحان بنفش و کاهو (۵۱) و در اثر تنش خشکی در گیاه ذرت (۵۲) نیز گزارش شده است.

نتایج مندرج در جدول ۳ نشان می‌دهد که تنش هوای سرد، Fm را در تمامی ژنوتیپ‌ها به‌غیر از PSB44 کاهش داد. یامان و همکاران (۲۷) نیز کاهش Fm را در گیاه برنج تحت تنش شوری گزارش کردند. افت Fm ممکن است با کاهش فعالیت کمپلکس آنزیم تجزیه‌کننده آب و همچنین چرخه انتقال الکترون در درون یا اطراف فتوسیستم II مرتبط باشد (۲۸).

فلورسانس متغیر (Fv) که از اختلاف فلورسانس حداکثر (Fm) با فلورسانس حداقل (Fo) به‌دست می‌آید وضعیت جریان الکترون از بخش فتوسیستم به QA را نشان می‌دهد (۵۳). Fv/Fm نیز که حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II برای تبدیل نور جذبی به انرژی شیمیایی را نشان می‌دهد، به‌طورگسترده‌ای به‌عنوان شاخصی معتبر برای نشان دادن اختلال ناشی از تنش در مراکز فتوشیمیایی و بازدارندگی نوری استفاده شده است (۴۹ و ۴۲). کاهش Fv/Fm بیانگر کاهش حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II است (۴۲). نتایج حاصل از این آزمایش نیز حاکی از کاهش Fv/Fm و Fv/Fm بود (جدول ۳). در پژوهشی که توسط Li و همکاران (۵۴) در گیاه توتون صورت گرفت نیز کاهش میزان Fv/Fm تحت تنش سرما مشاهده گردید.

تنش هوای سرد افزایش معنی‌دار خاموشی غیر فتوشیمیایی (NPQ) را به‌دنبال داشت (جدول ۴). NPQ در واقع شاخص مربوط به هدر رفت گرمایی است و گسترده‌ی معمول آن برای



کلاستر صفات رویشی و همچنین تجزیه بای پلات با استفاده از شاخص‌های مقاومت (داده‌ها نشان داده نشده است) همخوانی دارد. از سوی دیگر مطالعات قبلی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی (داده‌ها نشان داده نشده است) و فیزیولوژیک (۶۵) در همین پژوهش نیز موید این مسئله می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج حاضر به نظر می‌رسد می‌توان از این روش به‌عنوان روشی سریع، غیر تخریبی و کم‌هزینه جهت گزینش ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به تنش سرمای هوا و سرمای آب استفاده کرد. همچنین این روش می‌تواند تایید یا حتی جایگزینی برای سایر روش‌های مورد استفاده در این زمینه باشد. نتایج Strauss و همکاران (۳۱) در اثر تنش سرمای تاریکی روی دو رقم سویا و Fracheboud و همکاران (۴۴) در غربالگری ژنوتیپ‌های ذرت تحت تنش سرما نیز تاییدی بر نتایج این آزمایش می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج بیانگر حساسیت بیشتر پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگی گیاهچه‌های برنج به تنش هوای سرد نسبت به آب سرد می‌باشد که می‌تواند به دلیل تماس مستقیم برگ‌ها با سرما در تنش سرمای هوا و اثر تخریبی بیشتر آن نسبت به تنش آب سرد روی سیستم فتوسنتزی گیاه باشد و از آنجایی که رشد رویشی گیاه برآیندی از میزان فتوسنتز گیاه و اسیمیلاسیون  $CO_2$  می‌باشد، در دراز مدت با توجه به اثر کاهشی شدیدتر تنش سرمای هوا نسبت به تنش سرمای آب، رشد رویشی گیاه نیز بیشتر تحت تاثیر تنش سرمای هوا قرار خواهد گرفت. از میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، لاین PBS44 کمترین تغییرات را در پارامترهای فلورسانس در قبال تنش هوای سرد نشان داد به طوری که به جز افزایش محسوس  $F_o$ ، در سایر پارامترها تفاوت معنی‌داری نشان نداد و پس از آن رقم طارم هاشمی بود که نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها حساسیت کمتری به تنش هوای سرد نشان داد، به طوری که در این ژنوتیپ کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II [Y(II)] و ضریب خاموشی فتوشیمیایی (qp) در سطح بالایی حفظ شد و حداکثر کارایی کوانتومی فتوشیمیایی فتوسیستم II (Fv/Fm) نیز نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها (به جز PBS44) کاهش کمتری داشت. بنابراین می‌توان از لاین PBS44 و پس از آن رقم طارم هاشمی به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها نسبت به تنش هوای سرد نام برد. حال آنکه لاین‌های RI96 و IR752 و رقم شیرودی در میزان Fv، Y(II)، Fv/Fm بیشترین کاهش و در Y(NPQ) و Y(NO)

فتوسنتز، کاهش می‌یابد. کاهش مصرف  $NADPH, H^+$  باعث تجمع آن و کاهش نسبت  $NADPH, H^+$  به  $NADP^+$  می‌گردد. در این حالت الکترون از فرودوکسین به اکسیژن منتقل شده و رادیکال آزاد اکسیژن تولید می‌شود که در نهایت منجر به آسیب به اجزای زنجیره انتقال الکترون و ایجاد بازدارندگی نوری خواهد شد. وقوع بازدارندگی نوری باعث افزایش Y(NO) و کاهش Y(II) می‌گردد (۱۱). ضریب خاموشی فتوشیمیایی (qp) تحت تنش سرمای هوا در ژنوتیپ IR752 و تحت تنش سرمای آب در ژنوتیپ PSB44 کاهش یافت (جدول ۵). با توجه به اینکه qp نسبت مراکز واکنشی باز فتوسیستم II را نشان می‌دهد (۲۳) پس توانایی حفظ کوئینون‌های پذیرنده فتوسیستم II به صورت اکسید یا به‌طور کلی "باز بودن" مراکز واکنشی فتوسیستم II، با qp ارزیابی می‌شود. qp به‌طور مستقیم به سرعت مصرف  $NADPH, H^+$  و ATP تولیدی زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی وابسته است (۵۷). کاهش سرعت مصرف  $NADPH, H^+$  و ATP می‌تواند در نتیجه افزایش خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) در آنتن‌های گیرنده فتوسیستم II باشد (۴۹). در گیاهانی که مقاومت بیشتری به تنش دارند میزان qp و Y(II) بیشتر است و کمترین میزان هدر رفت انرژی (qN) وجود دارد، در حالی که قسمت اصلی خاموشی در برگ‌های تحت تنش، در اثر فرآیند برگشت پذیر qN است، بنابراین  $Q_A$  در طول خاموشی در وضعیت احیای شدید نگه‌داشته می‌شود (۶۱). در گیاه برنج (۶۲) و ذرت (۶۳) تحت تنش شوری و در گیاه ذرت (۴۴) تحت تنش سرما نیز مشاهده شد که با افزایش تنش، میزان ضریب خاموشی فتوشیمیایی کاهش یافت.

در بعضی از ژنوتیپ‌های مورد بررسی سرعت انتقال الکترون افزایش یافت که Hajiboland و همکاران (۶۴) نیز افزایش سرعت انتقال الکترون را در اثر تنش سرما روی گیاه کلم قرمز (*Brassica oleracea* L.) گزارش کردند. Li و همکاران (۵۴) اظهار کردند که میزان ETR در شرایط تنش سرما کاهش می‌یابد. با کاهش سرعت فعالیت فتوسنتزی و تثبیت دی‌اکسید کربن، میزان انرژی مورد نیاز نیز کاهش می‌یابد و این خود می‌تواند دلیلی برای کاهش سرعت انتقال الکترون در زنجیره باشد (۲۸). بنابراین ژنوتیپ‌هایی که کاهش کمتری در سرعت انتقال الکترون دارند سرعت فتوسنتزی بالاتر و در نتیجه مقاومت بیشتری نسبت به سرما نشان می‌دهند.

نتایج این آزمایش تا حد زیادی با نتایج به‌دست آمده از تجزیه

6. Paezi M, Shariati M. [Effect of cold stress on PSII efficiency of *dunaliella salina* using chlorophyll fluorescence kinetics]. J. Cell Tissue. 2012; 2(4): 395-405. Persian
7. Kuroki M, Saito K, Matsuba S, Yakogami N, et al. A quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 8. Theor. Appl. Genet. 2007; 115: 593-600.
8. Morsy MR, Jouvel L, Hausman JF, Hoffmann L, et al. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. J. Plant. Physiol. 2007; 164(2): 157-167.
9. Ghorbani A, Zarinkamar F, Fallah A. Effect of cold stress on anatomical and morphological traits of two tolerance and sensitive rice (*Oryza sativa* L.) cultivars at germination stage. J. Cell Tissue. 2011; 2(3): 235-244. Persian
10. Guo-li W, Zhen-fei G. Effects of chilling stress on photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence parameter in seedling of two rice cultivars differing in cold tolerance. Rice Sci. 2005; 12(3): 187-191.
11. Allen DJ, Ort DR. Impact of chilling temperature on photosynthesis in warm climate plants. Trends Plant Sci. 2001; 6(1): 36-42.
12. Karbalaei MY. [Evaluation of cold stress tolerance among different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars in germination stage]. Final Report. Rice Research Institute of Iran, Deputy of Mazandaran (Amol). 2004; 55 p. Persian.
13. Shimono H, Hasegawa T, Kazuto I. Response of growth and grain yield in paddy rice to cool water at different growth stages. Field Crops Res. 2002; 73(1): 67-76.
14. Zhao GZ, Liu JX, Yang SJ, Yea JD, et al. Effect of cold-water irrigation on grain quality traits in Japonica rice varieties from Yunnan province of China. Rice Sci. 2009; 16(3): 201-209.
15. Hu WH, Zhou YH, Du YS, Xia XJ, et al. Differential response of photosynthesis in greenhouse and field ecotypes of tomato to long-term chilling under low light. J. Plant Physiol. 2006; 163: 1236-1246.
16. Mohsenzadeh S, Karimi Andani J, Mohabatkar H. [Study of the physiological response and sequencing of a responsive gene to cold stress in four susceptible and resistant wheat cultivars]. Iranian J. Field Crop Sci. 2010; 41(3): 613-621. Persian.
17. Baker NR. A possible role for photosystem II in environmental perturbation of photosynthesis. Physiol. Plant. 1991; 81: 563-570.

بیشترین افزایش را داشتند و در مجموع ژنوتیپ‌های حساس به تنش سرمای هوا بودند. اثر تنش سرمای آب بر پارامترهای  $F_o$ ،  $F_v$ ،  $F_m$  و  $ETR$  معنی‌دار بود ولی با توجه به اینکه اثر آن بر  $F_v/F_m$ ،  $Y(II)$ ،  $Y(NPQ)$  و  $Y(NO)$  معنی‌دار نبود، بنابراین در مورد ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به این نوع تنش نمی‌توان قضاوت قطعی انجام داد، با این حال براساس پارامترهای  $F_o$ ،  $F_v$ ،  $F_m$  و  $ETR$  می‌توان ژنوتیپ‌های  $RI752$  و  $PBS44$  را به‌عنوان متحمل‌ترین و ژنوتیپ‌های  $IR96$  و شیروودی را حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها نسبت به تنش سرمای آب معرفی نمود. ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر تحمل به تنش سرمای آب و سرمای هوا عکس‌العمل نسبتاً مشابهی داشتند با این تفاوت که  $RI752$  که به تنش سرمای هوا تحمل بالایی نشان داده بود در تنش سرمای آب به‌عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ شناخته شد. همچنین در نهایت می‌توان این روش را به‌عنوان روشی سریع، غیر تخریبی و کم‌هزینه جهت ارزیابی تحمل ژنوتیپ‌های برنج به تنش سرمای هوا و سرمای آب توصیه نمود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان به‌خاطر حمایت‌های مالی جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع

1. Shah F, Huang J, Cui K, Nie L, et al. Impact of high-temperature stress on rice plant and its traits related to tolerance. J. Agric. Sci. 2011; 149(5): 545-556.
2. Pan Y, Wang W, Zhao X, Zhu L, et al. DNA methylation alterations of rice in response to cold stress. Plant Omics J. 2011. 4(7): 364-369.
3. Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Kang KY, et al. An approach to identify cold-induced low-abundant proteins in rice leaf. C. R. Biol. 2007; 330: 215-225.
4. Hassibi P, Moradi F, Nabipour M. Screening of rice genotypes for low temperature by chlorophyll fluorescence. Iran J. Crop Sci. 2007; 9: 14-31.
5. Hasanuzzaman, M, Nahar, K, Fujita, M. Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In Vahdati K, Leslie CH, (eds) Abiotic stress - Plant responses and applications in agriculture. InTech, Croatia; 2013; 169-205.

18. Terzaghi WB, Fork DC, Berry JA, Field CB. Low and high temperature limits PSII. *Plant Physiol.* 1989; 91:1494- 1500.
19. Apostolova EL, Dobrikova AG, Ivanova PI, Petkanchin IB, et al. Relationship between the organization of the supercomplex and functions of the photosynthetic apparatus. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2006; 83(2): 114-122.
20. Baker NR. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008; 59: 89-113.
21. Lazár, D. Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. 1412; 1-28.
22. Roháček K, Soukupová J, Barták M. Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. In Schoefs B, (eds). *Plant Cell Compartments - Selected Topics. Research Signpost, Kerala, India, 2008; 41-104.*
23. Maxwell K, Johnson GN. Chlorophyll fluorescence— a practical guide. *J. Exp. Bot.* 2000; 51: 659-668.
24. Sayed OH. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica.* 2003; 41(3): 321-330.
25. Mehata P, Jajoo A, Mathur S, Bharti S. Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 2010; 48(1): 16-20.
26. Bo SH, Jing J, Wei Dong Y, Ye yang F, et al. QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in rice seedling under salt stress. *Chin. J. Rice. Sci.* 2009; 23(3): 319-322.
27. Yaman K, Kawasaki M, Taniguchi M, Miyake H. Correlation between chloroplast ultrastructure and chlorophyll fluorescence characteristics in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.) grown under salinity. *Plant Prod. Sci.* 2008; 11(1): 139 - 145.
28. Zlatev Z. Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence of young wheat plants. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 2009; 23(4): 438-441.
29. Bertin P, Kinet JM, Bouharmont Y. Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. *Euphytica.* 1996; 89(2): 201-210.
30. Schapendonk AHCM, Dolstra O, Van Kooten O. The use of chlorophyll fluorescence as a screening method for cold tolerance in maize. *Photosynth. Res.* 1989; 20: 235-247.
31. Strauss AJ, Kruger GHJ, Strasser RJ, Van Heerden PDR. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. *Environ. Exp. Bot.* 2006; 56: 147-157.
32. Hakam P, Khanizade S, Deell JR, Richr C. Assessing chilling tolerance in roses using chlorophyll fluorescence. *Hort. Sci.* 2000; 35: 184-186.
33. Wegener ChB, Jansen G. Antioxidants in different potato genotypes: Effect of drought and wounding stress. *Agric.* 2013; 3: 131-146.
34. Sairam RK, Saxena DC. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes possible mechanism of water stress tolerance. *J. Agron. Crop Sci.* 2000; 184: 55-61.
35. Heydari M, Mesri F, Keykha Z. [Effects of salinity stress on nucleic acid metabolism, antioxidants enzyme activity, chlorophyll fluorescence and osmotic adjustment in five canola genotypes]. *Iran. J. Field Crop Sci.* 2010; 41(3): 491-502. Persian.
36. Huseynova IM, Rustamova SM. Screening for drought stress tolerance in wheat genotypes using molecular markers. *Proc. ANAS (Biological Sciences).* 2010; 65(5-6): 132-139.
37. Nasiruddin KM, Yasmin S, Toma SM, Crescenzi A. Screening of potato germplasm against abiotic stress and molecular characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Acta hortic.* 2005; 684: 143-150.
38. Amini Nasab R, Ebrahimi MA, Ebadi AA, Ghodsi M. [Study of genetic variation in Iranian rice (*Oryza sativa* L.) varieties by using molecular markers linked with drought resistance genes]. *Crop Biotech.* 2012; 2(2): 15-25. Persian.
39. Liu H, Ouyang B, Zhang J, Wang T, et al. Differential modulation of photosynthesis, signaling, and transcriptional regulation between tolerant and sensitive tomato genotypes under cold stress. *PLoS ONE.* 2012; 7(11): e50785.
40. Kafi M, Bagheri AR, Nabati J, Zare Mehrjerdi Z, et al. [Effect of salinity on some physiological variables of 11 chickpea genotypes under hydroponic conditions]. *J. Greenhouse Culture Sci. Technol.* 2011; 1(4): 55-69. Persian.
41. Silva MA, Jifon JL, Silva JAGD, Sharma V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Braz. J. Plant Physiol.* 2007; 19(3): 193-201.
42. Baker NR, Rosenqvist E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 2004; 55(403): 1607-1621.
43. Janowiak, F, Adamczyk, J, Krolkowski, Z. Differentiation of chilling tolerance among Polish

- maize Lines as measured by chlorophyll fluorescence method. – In: Proc. 3<sup>th</sup> Int. Congress Ecophysiological Aspects of Plant Responses to Stress Factors. Kraków; 2000.
44. Fracheboud Y, Haldimann P, Leipner J, Stamp P. Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). J. Exp. Bot. 1999; 50: 1533-1540.
45. Herzog H, Olszewski A. A rapid method for measuring freezing resistance in crop plants. J. Agron. Crop. Sci. 1998; 181: 71-79.
46. Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA. Laboratory manual for physiological studies of rice, International Rice Research Institute. Los Banos. Philippines. 1976; 83.
47. Genty B, Briantais JM, Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. Biochim. Biophys. Acta. 1989; 990: 87-92.
48. Klughammer C, Schreiber U. Complementary PSII quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. PAM Application Notes. 2008; 1: 27-35.
49. Li GM, Liu BB, Wu Y, Zou ZR. Interactive effects of drought stresses and elevated CO<sub>2</sub> concentration on photochemistry efficiency of cucumber seedlings. J. Integr. Plant Biol. 2008; 50(10): 1307-1317.
50. Zlatev Z, Yordanov T. Effect of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. Bulg. J. Plant Physiol. 2004; 30(3-4):3-18.
51. Roosta HR, Sajjadinia A. Studying the effect of cold stress on green basil, violet basil, tomato and lettuce using chlorophyll fluorescence technique. Environ. Stresses Crop Sci. 2010; 3(1): 1-8.
52. Darvish Balouchi M, Paknejad F, Kashani A, Ardakani MR, et al. [Effect of water stress and foliar spraying of trace elements on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content, relative water content, membrane stability and yield of corn]. Iranian J. Field Crop Sci. 2010; 41(3): 531-543. Persian.
53. Xia A, Li Y, Zou D. Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements. Aquat. Bot. 2004; 8: 129-137.
54. Li XG, Duan W, Meng QW, Zou Q, et al. The function of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco during chilling stress under low irradiance. Plant Cell Physiol. 2004; 45(1): 103-108.
55. Chaves M, Flaxes J, Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress regulation mechanism from whole plant to cell. Ann. Bot. 2009; 103: 551-556.
56. Demmig-Adams B, Adams WWIII. Xanthophyll cycle and light stress in nature, uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. Planta. 1996; 198: 460-470.
57. Ort DR, Baker NR. A photoprotective role for O<sub>2</sub> as an alternative electron sink in photosynthesis. Curr. Opin. Plant Biol. 2002; 5: 193-198.
58. Abdeshahian M, Nabipour M, Meskarbashee M. Chlorophyll fluorescence as criterion for the diagnosis salt stress in wheat (*Triticum aestivum*) plants. Int. J. Chem. Biol. Eng. 2010; 3(4): 184-186.
59. Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. Photosynth. Res. 2004; 79: 209-218.
60. Misra AN, Misra M, Singh R. Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology, Biophysics, A.N. Misra (Ed), Biophysics, InTech, 2012: 171-194.
61. Baker N.R, Horton P. Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. In: Photoinhibition (D.J. Kyle, C.B. Osmond, C.J. Arntzen, (eds.) Elsevier Scientific Publisher, Amsterdam; 1987; 85-94.
62. Moradi F, Ismail AM. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging system to salt stress during seedling and reproductive stage in rice. Ann. Bot. 2007; 99(6): 1161- 1173.
63. Hasan R, Kawasaki M, Taniguchi M, Miyake V. Salinity stress induces granal development in bundle sheath chloroplast of maize, an NADP-malic enzyme-type C4 plant. Plant Prod. 2006; 9: 256-265.
64. Hajiboland R, Amirzad F. [Photochemistry and gas exchange in cold conditions in Zn-deficient red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*) plants]. Folia Hort. 2012; 24(1): 3-11.
65. Hasani Z, Pirdashti H, Yaghoubian Y, Nouri MZ. Effect of Cold Air and Water Temperature on some Morphological Parameters of Rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes. Caspian J. Appl. Sci. Res. 2013; press.

## Application of Chlorophyll Fluorescence Technique to Evaluate the Tolerance of Rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes to Cold Temperature and Water Stresses

Hasani Z, M.Sc. Student.<sup>1</sup>, Pirdashti H, Ph.D.<sup>2\*</sup>, Yaghoobian Y, Ph.D. Student.<sup>3</sup>,  
Zaman Nouri M, Ph.D.<sup>4</sup>

1. M.Sc. Student of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

2. Agronomy Department, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

3. Student of Agronomy, Ramin University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Ahvaz, Iran

4. Rice Research Institute of Iran in Mazandaran, Amol, Iran

\* Email corresponding author: pirdasht@yahoo.com & h.pirdashti@sanru.ac.ir

Received: 14 Aug. 2013

Accepted: 16 Feb. 2014

---

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to investigate the effect of cold temperature and cold water stresses on chlorophyll fluorescence parameters in different rice genotypes.

**Material and Methods:** Six rice genotypes including Koohsar, Shiroodi and Tarom Hashemi cultivars as well as PSB44, RI96 and IR752 lines were grown under hydroponic conditions. After two weeks, plants were kept as control (28 °C), cold temperature stress (8 °C) and cold water stress (8 °C) then chlorophyll fluorescence parameters were measured.

**Results:** Cold temperature stress significantly reduced some of the measured parameters including variable fluorescence (Fv), maximum photochemical quantum yield of photosystem II (Fv/Fm), effective photochemical quantum yield of photosystem II [Y(II)], photochemical quenching coefficient (qP) and electron transport rate (ETR); while significantly increased quantum yield of regulated non-photochemical [Y(NPQ)], quantum yield of non-regulated non-photochemical[Y(NO)], non-photochemical quenching (NPQ) and Non-photochemical quenching coefficient (qN). Whereas cold water stress had significantly affected minimum fluorescence (Fo), maximum fluorescence (Fm), Fv and ETR. In addition PB44 line and Tarom Hashemi cultivar in cold temperature stress and RI752 and PB44 lines in cold water stress had the minimum change in fluorescence parameters.

**Conclusion:** cold temperature stress was more effective than cold water stress. In cold temperature stress, PB44 and Tarom Hashemi were most tolerant genotypes while RI96, IR752 and Shiroodi were the most susceptible genotypes. In cold water condition, RI752 and PB44 were the most tolerant genotypes while IR96 and Shiroodi genotypes were the most susceptible genotypes.

**Keywords:** Cold Temperature stress, Chlorophyll fluorescence, Rice, cold Water stress