اثر تنش سرما بر خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سه هیبرید ذرت (*Zea mays* L.) در مرحله گیاهچه‌ای

محسن طریق الاسلامی[۱]، محمد کافی[۱*]، احمد نظامی[۱] و رضا ضرغامی[۲]

[۱] مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۲] کرج، پژوهشکده بیوتکنولوژی (ابری)

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱

چکیده

این آزمایش به‌منظور بررسی تأثیر تنش سرما و عدم تنش بر خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سه هیبرید ذرت (سینگل کراس‌های ۷۰۴، ۴۰۰، ۲۶۰) در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. برای اعمال تنش سرما گیاهچه‌های چهار برگی ذرت به مدت ۱۲ ساعت در معرض دمای پنج درجه سانتیگراد قرار گرفتند. کلیه نمونه‌برداری‌ها ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش سرما انجام شد. تنش سرما در دو رقم سینگل کراس ۲۶۰ و رقم سینگل کراس ۷۰۴ منجر به افزایش مالون دی آلدئید شد، در صورتی‌که در سینگل کراس ۴۰۰ در شرایط مشابه میزان آن کاهش یافت. غلظت دی تیروزین در سینگل کراس ۷۰۴ نسبت به دو رقم سینگل کراس ۲۶۰ و ۴۰۰ حدود ۴۰ درصد بیشتر بود. غلظت سوپراکسیددیسموتاز در رقم سینگل کراس ۲۶۰ به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو هیبرید سینگل کراس ۴۰۰ و ۷۰۴ بود. تأثیر تنش سرما بر میزان گلوتاتیون پراکسیداز در ارقام ذرت معنی‌دار بود، به‌طوری‌که در رقم سینگل کراس ۲۶۰ تنش سرما منجر به کاهش ۳۹ درصدی ترکیب مذکور شد. تنش سرما به‌طور معنی‌داری سبب کاهش ۲۰ درصدی آنزیم کاتالاز نسبت به شرایط عدم تنش شد. به‌نحوی‌که بیشترین میزان آنزیم کاتالاز نیز در رقم سینگل کراس ۲۶۰ مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری از دو رقم دیگر بیشتر بود. هر چند که به لحاظ مورفولوژی تنش سرما اثر بارزی بر ارقام ذرت نداشت، ولی قرار گرفتن گیاه در معرض تنش سرما سبب تغییر بیوشیمیایی در فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی و پایداری غشاء گیاه ذرت شد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پرولین، سینگل کراس، ذرت، نشت الکترولیت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱-۳۸۸۳۶۰۱۰ ، پست الکترونیکی: m.kafi@ferdowsi.um.ac.ir

مقدمه

ذرت دانه ای (*Zea mays* L.) به عنوان منبع اصلی تأمین انرژی در تغذیه طیور از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشد. به همین دلیل توسعه سطح زیر کشت و افزایش تولید این محصول از اولویت خاصی برخوردار است. در مناطق معتدل به دلیل برخورد زمان برداشت گیاه با سرمای زودرس پاییز گیاه دچار خسارت می شود، به همین علت کاشت زودهنگام ذرت به عنوان یکی از راهکارهای احتمالی بهبود تولید این گیاه ذکر شده است (۶). در این وضعیت نیز تنش سرما در ابتدای فصل ممکن است رشد گیاه را تحت تأثیر قرار دهد. به همین دلیل اطلاع از واکنش ارقام ذرت به تنش سرما در این مرحله از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۴).

بسیاری از گونه های گیاهی به ویژه گونه های مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری ازجمله ذرت، زمانیکه در معرض سرمازدگی قرار می گیرند آسیب می بینند و ضایعاتی در سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌هایشان ایجاد می‌شود.

تحقیقات نشان داده است که با تغییر خصوصیات غشاء در زمان تنش سرما، تعادل متابولیسمی بهم خورده و با افزایش متابولیتهای سمی، آسیبهای ثانوی در گیاه ایجاد می شود (۲۳). در دمای پائین کارایی انتقال انرژی به مرکز فتوسیستم دو کاهش می یابد (۲۸). علاوه بر این، دمای پائین علت اصلی تشکیل رادیکال های فعال اکسیژن می باشد. همچنین کاهش دما در حضور نور، به دلیل عدم تعادل بین دریافت نور ومیزان انجام فتوسنتز، خطر اکسیداسیون نوری را افزایش می دهد (۱۴). در این مورد القاء تنش اکسیداتیو بر اثر سرما در نهالهای ذرت گزارش شده است (۲۸). در گیاهان مقاوم به تنش سرما تشکیل رادیکالهای فعال اکسیژن کنترل شده و تعدیل می گردد. زیرا انواع رادیکالهای فعال اکسیژن با تأثیر بر لیپیدها، رنگدانه ها، پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک سبب وارد شدن آسیب جدی به سلول می شوند (۲۸). در برخی از گیاهانی که قادر به خوگیری به سرما هستند، ترکیبات آنتی اکسیدان می توانند با خنثی کردن و یا از بین بردن رادیکالهای آزاد، با این ترکیبات سمی مقابله کنند (۳۳،۳۱). دمای پائین همچنین فعالیت آنزیمها از جمله فعالیت آنزیم روبیسکو را کاهش می‌دهد (۲۳). ایلکر و همکاران، کندی رشد ذرت در سرما را به دلیل کاهش ساخت کلروفیل اعلام کردند و این پدیده در کلروز برگ ها قابل رؤیت است (۲۹). مقدار پرولین آزاد در بسیاری از گیاهان در واکنش به تنشهای محیطی مانند تنش سرمازدگی به مقدار زیادی افزایش می یابد و سبب تثبیت غشا در هنگام تنش سرما می شود (۴۴). وقتی بافت های گیاهی در معرض سرما قرار می گیرند تولید مولکول های گونه های فعال اکسیژن در آنها افزایش می یابد. این مولکول ها می توانند باعث تخریب پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک سلول ها و در نهایت غشاهای زیستی شوند. سلول های گیاهی برای کاهش اثرات تخریبی این مولکول ها، فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی خود از جمله آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) را افزایش می دهند (۳۴). وقتی که تنش رخ می دهد پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در لیپیدها افزایش می‌یابد. در اثر حمله رادیکالهای آزاد به لیپیدها، آلدئیدهای گو ناگونی از جمله مالون دی آلدئید ایجاد می‌شوند (۱۲). افزایش غلظت مالون دی آلدئید ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها و دی تیروزین حاصل از تخریب DNA، دلالت بر ایجاد رادیکالهای آزاد در بافت دارد. افزایش این دو بیومارکر می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز باشد (۱۸).

در افزایش میزان نشت الکترولیت ها، هم میزان کاهش درجه حرارت و هم مدت زمانی که گیاهان در معرض سرما قرار می گیرند (۳۶) مؤثر می باشد. این یافته ها به وضوح نشان می دهد که نشت الکترولیت ها احتمالاً معیار مناسبی برای ارزیابی میزان خسارت سرما در گیاهان و یافتن ارقام متحمل، در جهت فعالیت های به‌نژادی می باشد. آزمون نشت الکترولیت ها از بافت های گیاهی به عنوان روشی مناسب برای ارزیابی تراوایی غشاء در ارتباط با اثر تنش های محیطی از جمله سرما بر گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۹). به طور کلی هنگامی که بافت های گیاه در اثر سرما آسیب می بینند، فعالیت غشاء مختل شده و الکترولیت های داخل سلول به خارج از آن نشت می کنند (۲۶). کاهش آماس سلولی و افزایش نشت الکترولیت ها از بافت های گیاهی به دنبال بروز تنش های سرما و یخ زدگی، نقش غشاء سلولی را در حفاظت گیاه از خسارت تنش سرما به خوبی نشان داده است و در همین مورد معتبرترین دیدگاه مطرح شده در مورد اثر تنش سرما و یخ زدگی، نظریه خسارت غشاء سلولی می باشد (۳۷). با توجه به موارد ذکر شده، این آزمایش به منظور بررسی تأثیر تنش سرما زدگی در سه هیبرید ذرت با اندازه گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک در شرایط کنترل شده اجرا شده است.

مواد و روشها

این آزمایش در سال ۱۳۹۳ به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی

دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد و طی آن اثر تنش سرما در دو سطح عدم تنش (شاهد) و تنش سرما (دمای پنج درجه سانتی گراد) در مرحله سه تا چهار برگی بر سه هیبرید ذرت (سینگل کراس ۷۰۴ (Sc704)، سینگل کراس ۴۰۰ (Sc400) و سینگل کراس ۲۶۰ (Sc260)) مورد بررسی قرار گرفتند. در تاریخ ۹۳/۲/۱ دو عدد بذر در گلدان های کاغذی حاوی مخلوطی از ماسه، پرلیت، خاک مزرعه و خاکبرگ به نسبت مساوی و در عمق پنج سانتیمتری کشت شد و تا زمان استقرار کامل گیاه آبیاری به صورتی که سطح خاک گلدان ها رطوبت مورد نیاز را حفظ کند، انجام شد. تا مرحله چهار برگی گیاهچه-ها در شرایط گلخانه (طول دوره روشنایی ۱۴ ساعت و طول دوره تاریکی ۱۰ ساعت و پوشش گلخانه UPV بود) قرار داشتند و در این مرحله برای اعمال تنش سرما گیاهچه های ذرت به داخل اطاقک سرد انتقال داده شدند. دمای اطاقک در شروع آزمایش ۲۰ درجه سانتیگراد بود و پس از قرار دادن نمونه ها با سرعت دو درجه سانتی گراد در ساعت کاهش یافت و در دمای پنج درجه به مدت ۱۲ ساعت باقی ماند. سپس گیاهان از اطاقک سرد خارج شده و به گلخانه منتقل شدند.

فعالیت کلیه آنزیم‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160A, Japan) اندازه گیری گردید. سنجش مالون دی آلدئید (MDA)، به روش گو و همکاران (۲۳)، در طول موج ۵۳۲ نانومتر انجام شد و محتوای آن برحسب میکرومول بر گرم برگ تازه محاسبه گردید. بیو مارکر دی تیروزین با استفاده از روش اورهنل و همکاران (۴۰) سنجش و مقدار آن برحسب میکرومول بر گرم برگ تازه اندازه‌گیری شد. همچنین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (EC 1.15.1.1) بر اساس تغییر شیمیایی نیترو بلو تترازولیوم در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از روش مینامیا و یوشیکاوا (۳۸) ارزیابی و برحسب فعالیت ویژه آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (EC 1.11.1.9) با استفاده از روش پاگلیا (۴۱)، در طول موج ۳۴۰ نانومتر و آنزیم کاتالاز (EC 1.11.1.6) بر اساس میزان تجزیه آب اکسیژنه به روش آبی (۱۱) در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجش شدند. برای اندازه گیری محتوای پرولین به روش بیتس و همکاران (۱۶)، به این ترتیب عمل شد که به ۱۰۰ میلی گرم از پودر برگ ۱۰ میلی لیتر از محلول اسید سولفو سالسیلیک ۳ درصد اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت این محلول بمدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. از محلول رویی ۲ میلی لیتر برداشت و به آن نین هیدرین به مقدار ۲ میلی لیتر اضافه شد، سپس ۱ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه گردید و لوله ها بمدت ۱ ساعت در بن ماری آب جوش قرار گرفتند. پس از سرد شدن بر روی هر لوله ۴ میلی لیتر تولوئن اضافه شد تا دو فاز تشکیل گردد، سپس فاز رویی برداشت شد و در طول موج ۵۲۰ نانو متر جذب آن قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد، با استفاده از پرولین خالص، محلول هایی با غلظت های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار تهیه و تمام مراحل ذکر شده در بالا روی آن انجام گردید. سپس منحنی استاندارد پرولین رسم شد (Y=۸۸/۵۱۳ X+۰/۳۶) و مقدار پرولین بر اساس معادله ۱ بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر بافت گیاهی بدست آمد.

معادله (۱) $X = [(A.B)/C]/ (D/5)$

در فرمول بالا، X مقدار پرولین در بافت بر حسب میکرومول در گرم بافت تر، A مقدار پرولین به دست آمده از نمودار استاندارد بر حسب میکرومول بر میلی‌لیتر، B حجم تولوئن استفاده شده بر حسب میلی لیتر، C عدد مولکولی پرولین و D وزن تر نمونه گیاهی استفاده شده بر حسب گرم است.

برداشت نمونه های گیاهی برای انجام سنجش‌های بیوشیمیایی ذکر شده در بالا، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش سرما انجام شد.

بیست و چهار ساعت پس از تنش سرما، محتوای آب نسبی جوانترین برگ کاملا توسعه یافته (چهارمین برگ) با

استفاده از دو دیسک هم اندازه دو سانتیمتری برگ اندازه گیری شد. محتوای آب نسبی برگ از طریق معادله ۲ محاسبه شد (۴۵).

معادله (۲)

$$RWC\% = ((WW-DW) / (Wsw-Dw)) \times 100$$

W_w= وزن تر برگ، D_W = وزن خشک برگ، Wsw = وزن برگ در حالت اشباع

به منظور تعیین درصد نشت الکترولیت ها، ۲۴ ساعت پس از تنش سرما جوانترین برگ کاملاً توسعه یافته (چهارمین برگ) از بوته جدا و در ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از قرار گیری نمونه ها در دمای آزمایشگاه، هدایت الکتریکی با استفاده از دستگاه EC متر (Jenway-Conductive meter 4510- England) اندازه گیری شد. با استفاده از معادله ۳ درصد نشت الکترولیت ها محاسبه شد (۴۶).

معادله (۳) $EL\% = (EC_1 / EC_2) \times 100$

اندازه گیری شاخص کلروفیل برگ با استفاده از دستگاه کلروفیل سنج دستی (Spad Konica Minolta, Spad-502- Japon) در دو زمان (۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تنش سرما) انجام شد. به این منظور عدد دستگاه اسپد هر برگ در گیاهچه ذرت اندازه گیری شد و میانگین آنها ثبت گردید.

همچنین پس از خروج گیاهان از اطاقک سرما، خسارت سرما با توجه به ظاهر گیاه در طول یک هفته با توجه به تغییر رنگ و یا نکروزه شدن آنها درجه بندی گردید. به این صورت که گیاهچه کاملاً سالم درجه یک، کلروز نوک برگها درجه دو، کلروز برگها و پایین ساقه درجه سه، تغییر رنگ و نکروزه شدن درجه چهار و گیاه کاملاً نکروزه درجه پنج در نظر گرفته شد (۶). تجزیه آماری داده ها با استفاده از نرم افزار MSTATC (Version 1.4) انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار EXCEL استفاده شد. میانگین ها نیز با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

اثر متقابل سرما و رقم بر میزان مالون دی آلدئید معنی‌دار بود (جدول ۱)، به نحوی که در دو رقم سینگل کراس ۲۶۰ و رقم سینگل کراس ۷۰۴ تنش سرما به ترتیب سبب افزایش ۳۳ و ۱۳ درصدی مالون دی الدئید نسبت به شرایط عدم تنش سرما شد، در صورتی‌که در رقم سینگل کراس ۴۰۰ در شرایط مشابه میزان آن ۲۶ درصد کاهش یافت (شکل ۱). در این پژوهش، اثر تنش سرما و رقم بر میزان دی تیروزین معنی دار بود (جدول ۱). تنش سرما زدگی باعث افزایش ۷۹ درصدی فعالیت دی تیروزین نسبت به شاهد شد (شکل ۱). همچنین غلظت دی تیروزین در سینگل کراس ۷۰۴ نسبت به دو رقم سینگل کراس ۲۶۰ و ۴۰۰ حدود ۴۰ درصد بیشتر بود (شکل ۱)، به علاوه اینکه بین مقادیر دی تیروزین و مالون دی آلدئید همبستگی معنی داری (r^2=۰/۴۶**) مشاهده شد (جدول ۳)، از این‌رو به نظر می رسد که آسیب وارده به غشا سلول‌ها تحت تأثیر تنش سرما موجب افزایش مالون دی آلدئید در گیاه شده و به دنبال آن مقادیر دی تیروزین افزایش یافته است.

غلظت سوپراکسیددیسموتاز در رقم سینگل کراس ۲۶۰ به طور معنی داری بیشتر از دو هیبرید سینگل کراس ۴۰۰ و ۷۰۴ (به ترتیب ۲۶/۱ و ۵۲/۶ درصد) بود (جدول ۳). در این پژوهش تأثیر تنش سرما بر میزان گلوتاتیون پراکسیداز در ارقام ذرت معنی‌دار (جدول ۱) بود. در رقم سینگل کراس ۲۶۰ تنش سرما منجر به کاهش ۳۹ درصدی ترکیب مذکور شد، در صورتی که دو رقم دیگر تفاوتی از این نظر نداشتند (شکل ۱). نتایج این بررسی دال بر آن بود که تنش سرما به طور معنی داری (جدول ۱) سبب کاهش ۲۰ درصدی آنزیم کاتالاز نسبت به شرایط عدم تنش می‌شود (جدول ۲).

جدول ۱- منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات اثر تنش سرمازدگی و ارقام ذرت بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، پرولین، نشت الکترولیت‌ها، محتوای آب نسبی و شاخص کلروفیل

منابع تغییر	درجه آزادی	مالون دی آلدهید	دی تیروزین	سوپراکسید دیسموتاز	گلوتاتیون پراکسیداز	کاتالاز	پرولین	محتوای آب نسبی	نشت الکترولیت‌ها	عدد کلروفیل متر ۱	عدد کلروفیل متر ۲	خسارت سرما
تنش سرما	۱	۲۲/۴۴۵۰**	۶۵۶/۴۲۷۲**	۰/۰۱۱۲ns	۱/۰۱۲۹ns	۱/۶۰۸۰*	۵۶۶/۷۲۲۲**	۵/۲۲۷ns	۲۸۰/۰۵۶**	۱۰/۸۵۸ns	۲۶/۶۴۵**	۱۲/۵۰۰**
ارقام	۲	۳۴۳/۳۶۱۶**	۱۰۵/۸۷۱۶**	۵/۵۲۰۲**	۲/۴۶۶۷*	۴/۱۰۹۱**	۳۹۳/۴۰۱۶**	۳۴۸/۶۹۴۰**	۷۴/۱۴۴**	۱۵/۶۹۴**	۸۳/۲۱۱**	۰/۰۰۱ns
اثر متقابل سرما*ارقام	۲	۱۱۶/۱۸۱۶*	۱/۸۹۳۸ns	۰/۸۷۰۳ns	۱/۷۸۰۷*	۰/۰۰۵۳ns	۱۱۹/۷۲۰۵*	۱۹۲/۰۰۲**	۲۹/۳۳۴ns	۲/۸۶۶ns	۰/۰۸۲ns	۰/۰۰۱ns
خطای آزمایش	۱۲	۱۹/۹۹۶۱	۵/۹۳۳۸	۰/۲۴۳۴	۰/۴۰۶۳	۰/۱۹۹۶	۱۷/۵۳۴۴	۱۵/۲۷۷	۱۰/۵۶۱	۲/۳۰۷	۲/۱۵۷	۰/۱۶۷
ضریب تغییرات	-	۱۲/۲۴	۱۱/۴۰	۱۰/۳۹	۱۴/۶۵	۱۳/۷۱	۱۰/۳۳	۵/۱۰	۵/۴۳	۶/۸۰	۷/۷۷	۱۸/۲۷

ns،*،**: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح یک و پنج درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تنش سرما و ارقام ذرت بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، پرولین، نشت الکترولیت، محتوای آب نسبی و میزان کلروفیل، در شرایط کنترل‌شده

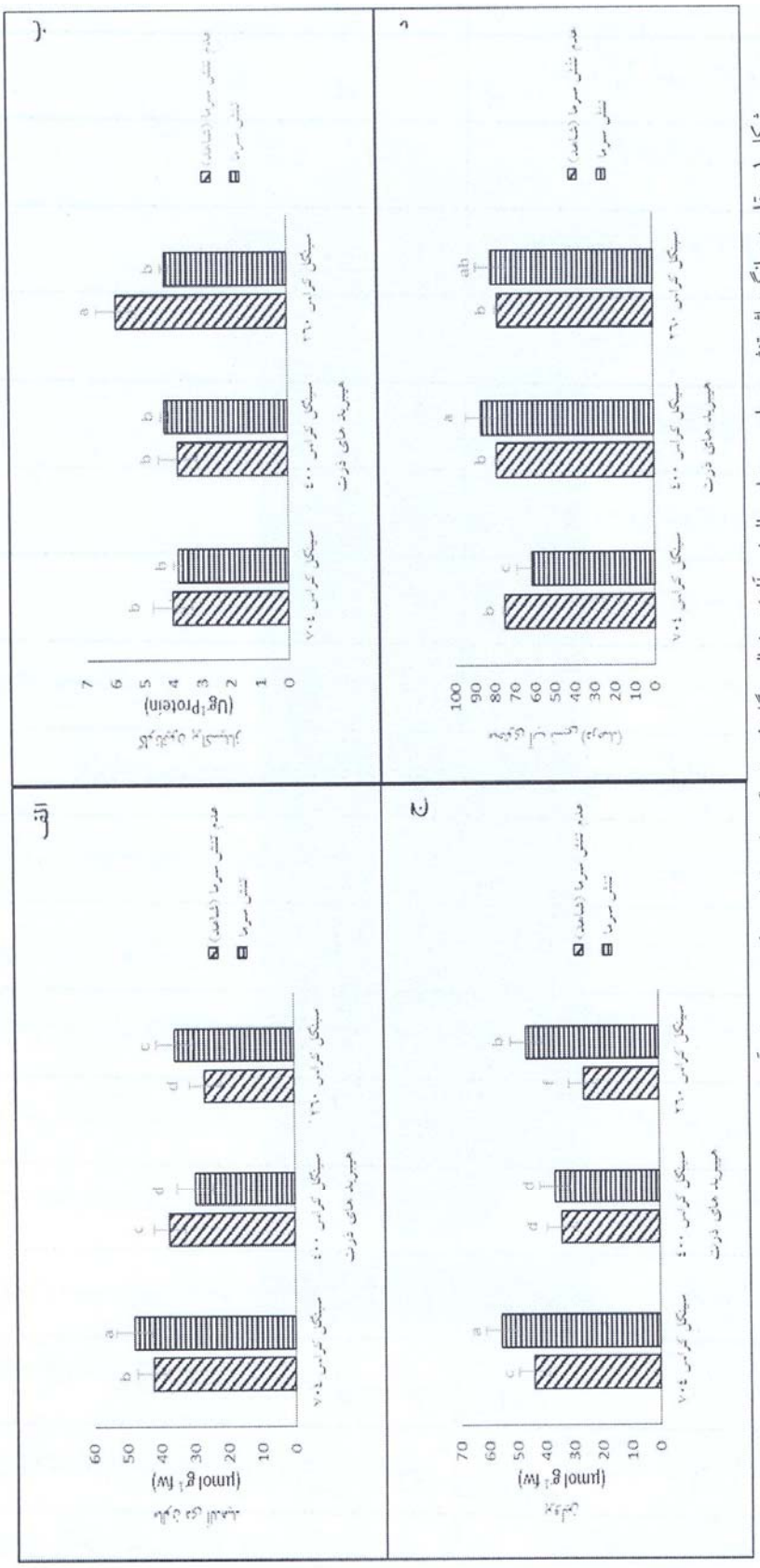
تیمار	مالون دی آلدهید ($\mu mol\ g^{-1}\ fw$)	دی تیروزین ($nmol\ g^{-1} fw$)	سوپراکسیددیسموتاز ($Umg^{-1}Protein$)	گلوتاتیون پراکسیداز ($Umg^{-1}Protein$)	کاتالاز ($Umg^{-1}Protein$)	پرولین ($\mu mol\ g^{-1}\ fw$)	محتوای آب نسبی (درصد)	نشت الکترولیت‌ها (درصد)	عدد کلروفیل متر ۱	عدد کلروفیل متر ۲	خسارت سرما
تنش سرما (Cold Stress) (۵ درجه سانتیگراد)											
عدم تنش سرما (شاهد)	۳۴/۹ b	۱۵/۳ b	۴/۸ a	۴/۵۹ a	۳/۵۶ a	۳۴/۹ b	۷۷/۲ a	۵۵/۹ b	۲۳/۱ a	۲۰/۱ a	۱/۰۰ a
تنش سرما	۴۶/۱ a	۲۷/۴ a	۴/۷ a	۴/۱۱ a	۲/۹۶ b	۴۶/۱ a	۷۶/۱ a	۶۳/۸ a	۲۱/۶ a	۱۷/۷ b	۲/۶۷ b
ارقام (Cultivar)											
هیبرید سینگل کراس ۷۰۴	۴۵/۱ a	۲۶/۲ a	۳/۸ c	۳/۹۲ b	۲/۴۵ c	۴۹/۸ a	۶۸/۰ b	۵۸/۵ b	۲۷/۶ a	۲۰/۸ a	۱/۸۳ a
هیبرید سینگل کراس ۴۰۰	۳۳/۵ b	۱۸/۹ b	۴/۶ b	۴/۰۴ b	۳/۲۱ b	۳۵/۴ b	۸۲/۵ a	۵۷/۳ b	۱۷/۴ c	۱۵/۴ c	۱/۸۳ a
هیبرید سینگل کراس ۲۶۰	۳۰/۹ b	۱۸/۸ b	۵/۸ a	۵/۰۹ a	۴/۱۱ a	۳۶/۳ b	۷۹/۴ a	۶۳/۹ a	۲۱/۹ b	۱۸/۵ b	۱/۸۳ a

هر عدد میانگین سه تکرار (Mean±SE) می‌باشد. داده‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد باهم تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۳- همبستگی بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، محتوای پرولین، نشت الکترولیت، محتوای آب نسبی و مقدار کلروفیل در هیبریدهای ذرت در شرایط کنترل‌شده

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۱- مالون دی آلدهید	۱/۰۰										
۲- دی تیروزین	۰/۴۶**	۱/۰۰									
۳- سوپراکسیددیسموتاز	-۰/۴۹**	-۰/۳۹*	۱/۰۰								
۴- گلوتاتیون پراکسیداز	-۰/۴۲**	-۰/۳۳*	۰/۲۷*	۱/۰۰							
۵- کاتالاز	-۰/۶۹**	-۰/۶۲**	۰/۶۸**	۰/۳۹*	۱/۰۰						
۶- پرولین	۰/۷۸**	۰/۸۲**	-۰/۴۲**	-۰/۴۹**	-۰/۶۱**	۱/۰۰					
۷- محتوای آب نسبی	-۰/۵۸**	-۰/۴۸**	۰/۴۲**	۰/۲۳*	۰/۴۰**	-۰/۵۷**	۱/۰۰				
۸- نشت الکترولیت	-۰/۰۶	۰/۵۸**	۰/۴۱**	۰/۰۱	۰/۱۳	۰/۴۲**	-۰/۱۱	۱/۰۰			
۹- محتوای کلروفیل ۱	۰/۵۴**	-۰/۲۱*	-۰/۳۴*	-۰/۰۱	-۰/۳۷*	۰/۳۹*	-۰/۶۶**	-۰/۱۳	۱/۰۰		
۱۰- محتوای کلروفیل ۲	۰/۴۹**	۰/۰۳۱	-۰/۲۹*	-۰/۰۵	-۰/۲۹*	۰/۲۸*	-۰/۵۳**	-۰/۲۱*	۰/۹۵**	۱/۰۰	
۱۱- خسارت سرما	۰/۱۷*	۰/۶۳**	-۰/۱۸*	-۰/۱۹*	-۰/۱۹*	۰/۳۵*	۰/۲۷*	۰/۶۵*	-۰/۴۰**	-۰/۵۳**	۱/۰۰

محتوای کلروفیل ۱ (۲۴ ساعت پس از تنش سرما)، محتوای کلروفیل ۲ (۷۲ ساعت پس از تنش سرما)



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر تنش سرما بر محتوای مالوندی‌آلدئید، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز، مقدار پرولین و محتوای آب نسبی در هیبریدهای ذرت در شرایط کنترل‌شده

هر عدد میانگین سه تکرار (Mean±SE) می‌باشد. داده‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد باهم تفاوت معنی‌داری ندارند.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در رقم سینگل کراس ۲۶۰ مشاهده شد که به طور معنی داری از دو رقم دیگر بیشتر بود (شکل ۱). به‌طوری‌که بین تغییرات فعالیت سوپراکسیددیسموتاز و محتوای دی تیروزین و مالون دی آلدئید همبستگی منفی (به ترتیب r^2= -۰/۳۹* و -۰/۴۹** r^2=) مشاهده شد (جدول ۳). مقایسه تغییرات میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز و همچنین فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز همبستگی مثبت و معنی داری (به ترتیب r^2=۰/۲۷* و r^2=۰/۳۹*) را آشکار کرد (جدول ۳).

در این پژوهش اثر متقابل تنش سرما و رقم بر پرولین معنی دار بود (جدول ۱). در شرایط تنش سرما میزان پرولین در رقم سینگل کراس ۴۰۰ افزایش ۶/۷ درصدی نسبت به عدم تنش سرما داشت، در صورتی که در دو رقم سینگل کراس ۷۰۴ و سینگل کراس ۲۶۰ این افزایش به ترتیب ۲۵/۵ و ۷۶/۴ درصد بود (شکل ۱). البته بین مقادیر پرولین و فعالیت کاتالاز همبستگی منفی و معنی‌داری (r^2=-۰/۶۱**) وجود داشت (جدول ۴).

در بررسی پیش رو، محتوای آب نسبی برگ ارقام ذرت به طور معنی داری تحت تأثیر تنش سرما قرار گرفت (جدول ۱). محتوای آب نسبی رقم سینگل کراس ۷۰۴ در شرایط عدم تنش سرما ۱۴ درصد بیشتر از شرایط تنش سرما بود. اما محتوای آب نسبی دو رقم سینگل کراس ۴۰۰ و ۲۶۰ در شرایط تنش سرما نسبت به شرایط عدم تنش به ترتیب ۸ و ۳ درصد بیشتر بود (شکل ۱). همبستگی مثبت و معنی داری بین محتوای آب نسبی و میزان خسارت سرما (نکروزه شدن برگ‌ها) وجود داشت (r^2= ۰/۲۷*). همچنین بین مقادیر محتوای آب نسبی و پرولین همبستگی منفی و معنی داری (r^2=-۰/۵۷**) وجود داشت (جدول ۴).

اثر تنش سرما بر درصد نشت الکترولیت ها معنی دار بود (جدول۱)، به طوری که بر اثر سرما، درصد نشت الکترولیت ۱۴ درصد نسبت به تیمار عدم تنش (شاهد) افزایش یافت (جدول ۲). در این بررسی نیز ارقام ذرت از نظر درصد نشت الکترولیت ها با یکدیگر تفاوت معنی داری (جدول ۱) داشتند و درصد نشت الکترولیت ها در هیبرید سینگل کراس ۲۶۰ بیشتر از دو رقم دیگر بود (جدول ۲). در این مطالعه همبستگی معنی داری (r^2= -۰/۶۵**) بین درصد نشت الکترولیت ها و میزان خسارت (نکروزه شدن برگ‌ها) گیاهان وجود داشت (جدول ۳). در این مطالعه برای ارزیابی نشت الکترولیت ها از برگ گیاهان ۲۴ ساعت پس از سرما استفاده شد و تأثیر تنش سرما زدگی بر وضعیت ظاهری گیاهان پس از یک هفته مورد ارزیابی قرار گرفت. بنابراین همبستگی بین دو پارامتر ذکر شده نشان دهنده این است که احتمالاً استفاده از شاخص نشت الکترولیت ها در تخمین تحمل به سرما این گیاه از اعتبار نسبی برخوردار باشد.

مطالعه پیش رو نشان داد که سه روز پس از اعمال تنش سرما، عدد اسپد به طور معنی داری تحت تأثیر تنش سرما زدگی قرار می‌گیرد (جدول ۱). به طوری که تنش سرما سبب کاهش ۱۳/۵ درصدی این شاخص شد (جدول ۲). در هر دو مرحله اندازه‌گیری عدد اسپد (۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تنش سرما) بیشترین و کمترین عدد اسپد را به ترتیب سینگل کراس ۷۰۴ و سینگل کراس ۴۰۰ داشتند (جدول ۲). همبستگی معنی داری بین محتوای کلروفیل (عدد اسپد) در ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از تنش سرما با شدت خسارت سرما (نکروزه شدن برگ‌ها) در گیاهان وجود داشت (جدول ۳).

بحث

پراکسیداسیون لیپیدها که منجر به تخریب غشاهای بیولوژیکی می گردد، نمایانگر تنش‌های اکسیداتیو در گیاهان می باشد که تحت تنش‌های مختلفی مانند تنش سرما ایجاد می‌شود. مالون دی آلدهید به عنوان یک نشانگر برای مشخص کردن شدت صدمات اکسیداتیو به لیپیدها بکار می‌رود (۲۴). یادگاری و همکاران (۲۰۰۸) گزارش

کردند که در گیاه سویا (*Glycine max*) تنش سرما (۴ درجه سانتی گراد) سبب افزایش مالون دی آلدهید شد. مهمترین بخش از خسارتهای ناشی از تنش، تولید رادیکالهای آزاد مربوط به پر اکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که باعث تولید مالون دی آلدئید می‌شود (۴۹). مالون دی آلدئید همانند نشت یونی به عنوان شاخص آسیب غشایی برای اندازه‌گیری غیرمستقیم انسجام سلولی مورد توجه قرار گرفت و می‌تواند کاهش انسجام غشای سلولی و وقوع آسیب سرمازدگی را در محصولات نشان دهد(۴). گو و همکاران (۲۴) با بررسی گیاهچه‌های برنج مشاهده کردند که تنش سرما افزایش مالون دی آلدهید را در واریته‌های حساس به دنبال داشت، در صورتی که در ارقام متحمل به سرما این وضعیت مشاهده نشد. در زمان بروز تنش های محیطی آزاد شدن رادیکالهای آزاد، باعث تخریب پروتئین ها می شود. در این حالت اسیدهای آمینه آزاد شده و از اتصال دو اسید آمینه تیروزین و دی تیروزین ایجاد می شود. افزایش این ترکیب نشان دهنده اثرات مخرب تنش های محیطی، ازجمله تنش خشکی، بر پروتئین ها می باشد (۲۱).

در بررسی هولا و همکاران (۲۰۰۷) بر روی ارقام ذرت نیز مشاهده شد که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز تحت تأثیر تنش سرما قرار نگرفت، درصورتی که بین ارقام تفاوت معنی داری از این نظر وجود داشت (۲۸). در بررسی سایر محققان مشاهده شده است که در گیاهان تحت تنش سرما میزان گلوتاتیون پراکسیداز نسبت به شاهد (عدم سرما) کاهش داشته است (۲۲ و ۲۹). نتایج مشابهی مبنی بر کاهش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان از جمله گلوتاتیون پراکسیداز در دمای پایین گزارش شده است (۲۵). گائو و همکاران (۲۴) گزارش کردند که تنش سرما باعث کاهش آنزیم کاتالاز شد. در بررسی وانگ و همکاران (۴۷) مشاهده شد که در رقم مقاوم به سرمای یونجه فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتر از رقم حساس بود.

گیاهان وقتی تحت تأثیر تنش سرما قرار می گیرند نشانه‌های تنش آبی در آنها ظاهر می شود که با بسته شدن روزنه ها و کاهش تعرق همراه است. تجمع موادی که در تنظیم فشار اسمزی نقش دارند مانند قندهای محلول، آمینو اسیدها، اسیدهای آلی و یونها در شرایط تنش افزایش می یابد که تجمع این مواد محلول سازگار، باعث افزایش اسمولاریته سلول شده و می تواند جریان آبی را هدایت و میزان خروج آن را کاهش دهد. این پدیده ایجاد تورگر می‌کند که وجود آن در گسترش و توسعه سلولی ضروریست. پرولین از مهمترین ترکیبات حل شونده سازگار است که تحت استرس سرما به مقدار زیادی سنتز آن افزایش می یابد (۶ و ۳۲). تحقیقات حسیبی و همکاران (۱۳۸۹) بر روی برنج نشان داد که در شرایط تنش سرما بیشترین میزان پرولین برگ مشاهده شد (۲). تجمع پرولین به عنوان یک سازوکار مقاومت در برابر تنش سرمازدگی در گیاهان مطرح می باشد. در گیاهان پرولین تجمع یافته در پاسخ به تنش سرمازدگی نقش مهمی در سم زدایی رادیکال‌های آزاد و حفظ انسجام غشای سلولی ایفا می کند (۴۹). آپوستولوا و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده کردند که سرما باعث افزایش پرولین در گندم بهاره شد (۱۵). سلیمانی اقدم و اصغری گزارش کردند که میزان پرولین گوجه فرنگی در شرایط سرما افزایش یافته است (۳). افزایش محتوای نسبی آب برگ به معنای توانایی برگ در حفظ مقادیر بیشتری آب در شرایط تنش است که از طریق قابلیت تنظیم اسمزی و یا توانایی ریشه در جذب آب حاصل می شود (۳۲).

در بررسی سایر محققان نیز تنش سرما سبب اختلال در غشای سلولی و به دنبال آن نشت الکترولیت ها از سلول شده است (۴۸). راب و سالتویت (۴۳) بیان کردند که تنش سرما موجب افزایش نشت الکترولیت ها می شود و غلظت انواع واکنش گر اکسیژن افزایش می یابد. تجمع این ترکیبات سمی ممکن است منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشا سلولی و اندامک ها شود که در نهایت موجب اختلالات فیزیولوژیکی و بروز صدمات تنش سرما در

گیاهان می‌گردد (۴۲). در آزمایشی دیگر نیز بر روی گیاهچه ذرت در شرایط تنش سرما میزان نشت الکترولیت افزایش یافت (۲). نظامی و همکاران (۱۰) نیز در مطالعه خود بر روی کلزا نتیجه گرفتند که میزان نشت الکترولیت ها با کاهش دما افزایش یافت. البته نتایج مشابهی نیز در مطالعه بر روی ارقام گلرنگ گزارش شده است (۹).

تاکاک (۲۰۰۴) در تحقیقی روی دو رقم ذرت مشاهده کرد که بعد از دو روز تنش سرما میزان نشت یونی در رقم حساس به سرما دو برابر افزایش داشته است، در صورتی که در رقم متحمل به سرما این افزایش ناچیز بوده است (۴۲). گائو و همکاران (۲۴) نیز در آزمایشی بر روی چهار رقم برنج دریافتند که تنش سرما سبب افزایش نشت یونی در رقم های حساس به سرما شد، در حالی که در رقم های متحمل به سرما تغییر چندانی نکرد.

در آزمایشهای دیگران نیز نشت الکترولیت ها همبستگی معنی داری با بروز خسارتهای قابل مشاهده در گیاه داشته است. وانگشیر و همکاران (۴۸) گزارش کردند که نشت الکترولیت با بروز لکه های سیاه در برگهای پیرلیمو (*Citrus limon*) همبستگی داشت. کانسلون و همکاران (۱۹) نیز گزارش کردند که بین آثار ظاهری تنش سرما روی میوه های بادنجان (*Solanum melongena*) و نشت الکترولیت ها همبستگی وجود داشت.

در آزمایشی دیگر بر روی گیاهچه های ذرت، محتوای کلروفیل گیاه در شرایط تنش سرما کاهش پیدا کرده است (۵). ساخت و تخریب کلروفیل از فرایندهای حساس به دما می‌باشند و از آنجایی‌که نخستین مکان اثر تنش سرما احتمالاً فتوسیستم دو می‌باشد (۱۱)، از این‌رو تنش سرما سبب اختلال در جذب نور توسط مولکول‌های کلروفیل می‌شود (۳۳ و ۳۹). کاهش فتوسنتز همچنین ممکن است به علت اختلال در تولید کلروفیل و از بین رفتن ساختار کلروپلاست‌ها باشد. با نزول دما فرایند ساخت کلروفیل متوقف می شود و رنگ برگ‌ها به زردی می‌گراید که نشان‌دهنده کمبود کلروفیل است (۱۳).

نتیجه‌گیری

هر چند که به لحاظ ظاهری تنش سرما اثر بارزی بر ارقام ذرت نداشت، ولی قرار گرفتن گیاه در معرض تنش سرما سبب اختلال در فعالیت های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه ذرت شد. تنش سرما افزایش مقادیر مالون دی آلدهید و دی تیروزین را به دنبال داشت. در این حالت و احتمالا به دلیل افزایش فعالیت‌های اکسیداتیو تجمع آنزیم‌های آنتی اکیسدان (سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز) در گیاه ذرت افزایش یافت. این پاسخ‌های بیوشیمیایی احتمالاً دلیل عدم مشاهده خسارت بارز بوده است. تنش سرما باعث افزایش نشت الکترولیت ها شد، درحالی که مقادیر کلروفیل گیاه را در مراحل ابتدایی پس از اعمال تنش کاهش داد. همبستگی معنی داری بین صفات مورد مطالعه وجود داشت که این همبستگی بین بیومارکرها و آنتی اکسیدانت به صورت منفی و معنی دار بود. برای ارزیابی اثرات سرمای دیررس بهاره بر سایر ارقام ذرت کشور، تداوم اینگونه مطالعات سودمند خواهد بود. به‌طوری‌که مطالعه اثرات شدت و مدت تنش سرما بر خصوصیات رشدی و عملکرد گیاه ذرت در شرایط مزرعه نیز اطلاعات کامل‌تری را از اثرات بلند مدت تنش سرما بر این گیاه فراهم خواهد کرد.

منابع

۱- احمدی، ع.، احسان زاده، پ. و جباری، ف. (۱۳۸۳). مقدمه ای بر فیزیولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران .۴۵۵ صفحه.

۲- حسیبی، پ.، نبی پور، م.، بهدانی، م. و مرادی ، ف. (۱۳۸۹). بررسی نقش برخی محافظت کننده های سرمایی در القای تحمل تنش دمای پایین به گیاهچه های برنج (*Oryza sativa* L.). مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی. ۱ (۳): ۵۶-۳۹.

۳- سلیمانی اقدم، م. و اصغری، (۱۳۹۳). کاهش سرمازدگی پس از برداشت میوه گوجه فرنگی با تیمار براسینواستروئید. مجله پژوهشهای گیاهی (زیست شناسی ایران). ۲۷ (۳): ۴۳۸-۴۲۷.

۴- سلیمانی اقدم، م.، اصغری، م.، خرسندی، ا.، مراد بیگی، ه.، محمد خانی، ن.، مهیجی، م. و حسن پور اقدم ، م. (۱۳۹۳). سازوکارهای احتمالی تأثیر اسید سالیسیلیک بر کاهش سرمازدگی پس از برداشت میوه گوجه فرنگی. مجله پژوهشهای گیاهی (زیست شناسی ایران). ۲۷ (۲): ۲۲۷-۲۱۶.

۵- علی، س.، اسلامی، س.، بهدانی، م. و جامی الاحمدی ، م. (۱۳۸۹). تأثیر کاربرد خارجی گلایسین بتائین در افزایش تحمل به سرما در گیاهچه های ذرت. مجله نشریه پژوهشهای زراعی ایران. ۶ (۸): ۹۴۵-۹۳۹.

۶- کافی، م.، برزوئی، ا.، صالحی، م.، کمندی، ع.، معصومی، ع. و نباتی، ج. (۱۳۸۳). فیزیولوژی تنشهای محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۵۰۲ صفحه.

۷- وزارت جهاد کشاورزی معاونت امور تولیدات گیاهی دفتر محصولات اساسی غلات، حبوبات و نباتات علوفه ای. (۱۳۹۱)، دستورالعمل فنی ذرت (دانه ای و سیلویی).

۸- نظامی، ا.، صداقت خواه، ح.، پرسا، ح.، پارسا، م. و باقری، ع. (۱۳۸۹). ارزیابی کشت پاییزه ژنوتیپهای نخود متحمل به سرما در شرایط آبیاری تکمیلی در مشهد. مجله پژوهشهای زراعی ایران. ۸ (۳): ۴۲۳-۴۱۵.

۹- نظامی، ا.، برزویی، ا.، جهانی کندری، م.، عزیزی، م. و شریف، ع. (۱۳۸۶). نشت الکترولیتها به عنوان شاخصی از خسارت یخ زدگی در کلز ا .مجله پژوهشهای زراعی ایران، ۵ (۱): ۱۶۷-۱۷۵.

۱۰- نظامی، ا. و ناقدی نیا، ن. (۱۳۸۹). اثر تنش یخ زدگی بر نشت الکترولیت ها در چند رقم گلرنگ. مجله پژوهشهای زراعی ایران، ۸ (۱): ۸۹۱-۸۹۶

localized drought stress. Environmental and Experimental Botany. 45: 105-114.

19- Concellon, A., Anon, M.C. and Chaves, A.R. (2007). Effect of low temperature storage on physical and physiological characteristics of eggplant fruit (*Solanum melongena* L.). LWT-Food Science and Technology. 40: 389-396.

20- Demiral, T. and Türkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Enviromental and Experimental Botany. 53: 247–257.

21- Dhindsa, R.S., Dhindsa, P.P. and Thorpe, T.A. (1980). Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid-peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany. 32: 93-101.

22- Eugenia, M., Nunes, S. and Ray Smith, G. (2003). Electrolyte leakage assay capable of quantifying freezing resistance in rose clover. Crop Science. 43: 1349-1357.

23- 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.

24- Guo, Z., Ou, W., Lu, S. and Zhong, Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars

11- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology, 105: 121-126.

12- Aghdassi, E. and Johane, P. (2000). Breath alkaned as a marker of oxidative stress in difference clinical conditions. Free radical Boilogy and Medicin, 28:880-886.

13- Alia, P. and Saradhi, P. (1991). Proline accumulation under heavy metal stress. Journal of Plant Physiology. 138: 554-558.

14- Arvin, M.J., and Donnelly, D.J. (2008). Screening potato cultivars and wild species to abiotic stresses using an electrolyte leakage bioassay. Journal of Agricultural Science Technology. 10:33-42.

15- Apostolova, P., Yordanova, R. and Popova, L. (2008). Response of antioixidative defence system to lowtemperature stress in two wheat ultivar. General and Applied Plant Physiology, Special Issue. 34(3-4):281-294.

16- Bates, L.S, Waldern, R.P. and Tear, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and soil. 39: 205-207.

17- Boguszewska, D., Grudkowska, M. and Zagdanska, B. (2010). Drought responsive antioxidant enzymes in potato (*Solanum tuberosum* L.). American Journal of Potato Research. 53: 373-382.

18- Fu, J. and Huang, B. (2001). Involvementof antioxidant and lipid peroxidation in theadoption of two cool season grasses to

differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 44: 828-836.

25- Hassan, F.A.S. and Mahfouz, S.A. (2012) Effect of 1- methylcyclopropene (1-MCP) on the postharvest senescence of coriander leaves during storage and its relation to antioxidant enzyme activity. Scientia Horticulturae 141: 69–75.

26- Hausladen, A. and Alscher, R.G. (1993). Glutathione In antioxidants in Higher Plants, (Alscher, R.G. and Hess, J.L, Ed.), 1-30.CRC Press, USA.

27- Havaux M. and Niyogi, K.K. (1999). The Violaxanthin cycle protects from photooxidative damage by more than ohe mechanism. Plant Biology. 96:8762-8767.

28- Hola, D., Kocova, M., Rothova, O., Wilhelmova, N. and Benesova, M. (2007). Recovery of maize (*Zea mays* L.) inbreds and hybrids from chilling stress of various duration: Photosynthesis and antioxidant enzymes. Journal of Plant Physiology 164:868-877.

29- Ilker, R., Breidenbach, R.W. and Lyons, J.M. (1979). Sequence of Ultrastructural Changes in Tomat Cotyledons Durin Short Periods of Chilling. In: Low Temperature Stress in Crop Plants: The Role of Membrane, (Lyons, J.M., Graham, D. and Raison, J. K., Ed.), 97-114. Academic Press, New York,

30- Jin, E.S., Yokthongwattana, K., Polle, J.E.W., and Melis, A. (2003). Role of the reversible xanthophyll cycle in the photosystem II damage and in *Dunaliella salina*. Plant physiology. 132:325-364.

31- Joshi, S.C., S. Chandra and L.M.S. Palni. (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(4): 594-600.

32- Kiara D.V., and Roy, D.N. (1999). Oxidative stress and antioxidative defense with an emphasis on plants antioxidants. Environmental Reviews. 7:31-51.

33- Lichtenthaler, H.K. (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. Journal of Plant Physiology. 148: 4-14.

34- Luo, Z., Wu, X., Xie, Y., Chen, C. (2012) Alleviation of chilling injury and browning of postharvest bamboo shoot by salicylic acid treatment. Food Chemistry 131 (3): 456-461.

35- Mao, L., Pang, H., Wang, G. and Chenggang Zhu, C. (2007). Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. Postharvest Biology and Technology. 44: 42-47.

36- McKersie, B.D., and Leshem, Y.Y. (1994). Stress and Stress Cropping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers. p. 77, Netherlands.

37- Mellerd, A. and Mcwilliam, J.R. (1968). Studies on a maize mutant sensitive to low temperature. Plant Physiology. 43:1967.

38- Minami, M., and Yoshikawa, H. (1979). A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. Clinica Chimical Acta .92: 337–342.

39- Nayyar, H., Bains, T.S. and Kumar, S. (2005). Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Environmental and Experimental Botany. 54: 275-285.

40- Orhanl, H., Vermeulen, N.P.E., Tump, C., Zappey, H., Meerman, J.H.N., (2004). Simultaneous determination of tyrosine, phenylalanine and deoxyguanosine oxidation products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry as non-invasive biomarkers for oxidative damage Journal of Chromatography. 799: 245–254.

41- Paglia, D. (1997). Studies on the quantitative and qualitative characterization of glutathione peroxidase. Journal of Medical Lab Technology. 70:158–165.

42- Takac, T. (2004). The relationship of antioxdidant enzymes and some physiological parameters in maize during chilling. Journal of Plant Soil and Environment. 50: 27-32.

43- Rab, A. and Saltveit, M.E. (1996). Differential chilling sensitivity in cucumber seedling. Plant Physiology, 96: 375- 382.

44- Ranney, T.G., Bassuk, N.L. and Whitlow. T.H. (1991). Osmotic adjustment and solute constituents in leaves and roots of- water stressed cherry trees. The American Society for Horticultural Science 116: 684-688.

45- Schlemmer, M.R, Francis, D.D., Shanahan, J.F., and Schepers, J.S. (2005). Remotely measuring chlorophyll content in corn leaves with differing nitrogen levels and relative water content. Agronomy Journal, 97:106-112.

46- Vanstone, D.E. and Stobbe, E.H. (1977). Electrolytic conductivity a rapid measure of herbicide injury. Weed Science. 25:352–354.

47- Wang, W.B., Kim, Y.H., Lee, H.S., Yong Kim, K., Deng, X. and Kwak, S. (2009). Analysis of antioxidant ezyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 47: 570-577.

48- Wongsheree, T., Ketsa, S. and Van Doorn, W.G. (2008). The relationship between chilling injury and membrane damage in lemon basil (*Ocimum×citriodourum*) leaves. Postharvest Biology and Technology. 51:91-96.

49- Yadeghari. L.Z., Heidari, R. and Carapetian, J. (2008).The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyd (MDA), Total protein and pigments contents in soybean (*Glycine max*) seedlings. Research Journal of Biological Sciences. 3(1): 74-79.

Effects of chilling stress on physiological and biochemical traits of three-hybrid Corn (*Zea mays* L.) in seedling stage

Tarighaleslami M.[1], Kafi M.[1], Nezami A.[1] and Zarghami R.[2]

[1] Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

[2] Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

This research was performed to study the effects of chilling stress on physiological and biochemical traits (both chilling stress and non-stress control levels) of three-hybrid corn (*Zea mays L.*) seedlings (single-cross 704, 400, 260) in factorial in a completely randomized design in the research greenhouse of Ferdowsi University of Mashhad, Iran. To apply chilling stress, the four-leaf seedlings have been treated in a room at five degrees Celsius for 12 hours. The chilling stress in two levels of single-cross 260 and single-cross 704 led in malondialdehyde increase, while it decreases in single-cross 400 in the same situation. The concentration of Di-tyrosine was shown 40% higher in single-cross 704 compered to single-cross 260 and 400. In addition, the concentration of superoxide dismutase enzyme in single-cross 260 was significantly higher than two single-cross 700 and 400 hybrids. Glutathione peroxidase represented asignificant effect in different corn hybrids in the presence of chilling stress, which in single-cross 260 chilling stress caused a 39% reduction in glutathione peroxidase while other two hybrids have shown no significant change. Chilling stress caused significantly 20% reduction of catalase enzyme compared to non-chilling condition. The highest amount of catalase enzymes were measured in single-cross 260 which is significantly higher than two other hybrids. Although, chilling stress has no significant morphological effect on corn plants, but the plants exposed to the chilling stress has shown biochemical changes in their antioxidant system and plant cell membrane stability.

Key words: Antioxidant, Proline, Single-cross, Corn, Electrolytes leakage