تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد پانزدهم، شماره سوم، پائیز ۱۴۰۱

http://dx.doi.org/10.22077/escs.2021.3919.1937

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر تنش سرما بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی رقم تجاری نیشکر CP69-1062 با گونه *Saccharum spontaneum* در مرحله‌ی گیاهچه‌ای

ماجده نیسی[1*]، براتعلی فاخری[2]، اسماعیل ابراهیمی[3]، عباسعلی امام‌جمعه[4]، جواد ظهیری[5]، مسعود پرویزی آلمانی[6]

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۲. استاد پژوهشی، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۳. دانشیار پژوهشی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز
۴. دانشیار پژوهشی، آزمایشگاه بیوتکنولوژی محاسباتی و بیوانفورماتیک (CBB)، گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۵. استادیار پژوهشی، آزمایشگاه بیوانفورماتیک و علم محاسبات (BioCOOL)، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران
۶. استادیار سابق گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر، شرکت توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان، اهواز

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
آنتی‌اکسیدانت‌ها
پرولین
تحمل به سرما
کربوهیدرات‌های محلول در آب
مالون دی‌آلدئید
نشت الکترولیت

تاریخ دریافت:
۱۳۹۹/۰۹/۰۴

تاریخ پذیرش:
۱۳۹۹/۱۰/۲۱

تاریخ انتشار:
پائیز ۱۴۰۱

۱۵(۳): ۷۶۵-۷۷۹

چکیده

این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه کشت بافت و گلخانه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات نیشکر خوزستان و اتاقک سرما، به‌منظور بررسی اثر تنش سرما بر شاخص‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی رقم تجاری حساس (*Saccharum officinarum* واریته CP69-1062) و گونه متحمل (*Saccharum spontaneum*) نیشکر در شرایط کنترل‌شده طی سال زراعی ۱۳۹۹ - ۱۳۹۸ انجام شد. جهت اعمال تنش سرما، گیاهچه‌های هشت‌هفته‌ای نیشکر به مدت ۲۴ ساعت در معرض دماهای صفر و ۴- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تنش سرما به‌طور معنی‌داری باعث کاهش کلروفیل برگ، افزایش نشت الکترولیت و افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در رقم تجاری حساس و گونه متحمل و به‌ویژه در رقم حساس شد. میزان پرولین و کل کربوهیدرات‌های محلول برگ نیز تحت تنش سرما در رقم حساس و گونه متحمل و به‌ویژه در گونه متحمل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. تنش سرما همچنین به‌طور معنی‌داری باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد شد. فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در اثر سرما نسبت به شاهد بیشتر شد که میزان آن در گونه متحمل به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم حساس بود. علاوه بر این تنش سرما به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌ویژه در گونه متحمل شد. شدت این تغییرات در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد به علت تشکیل کریستال‌های یخ و متوقف شدن فعالیت‌های متابولیکی سلول کمتر بود. ازلحاظ ظاهری نیز ارقام تحت تنش سرما، در دمای صفر درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای شاهد تغییر چندانی نداشتند و کمی زرد و پژمرده شدند ولی در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد آثار تخریبی گیاهچه‌ها به‌وضوح مشاهده شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد گونه *S. spontaneum* دارای مکانیسم دفاعی بهتر و کارآمدتری نسبت به رقم تجاری CP69-1062 بوده و درنتیجه به تنش سرما متحمل‌تر است.

مقدمه

نیشکر (*Saccharum* spp.) گیاهی تک‌لپه و چندساله متعلق به خانواده گرامینه و تیره آندروپوگونه است. این گیاه از گیاهان مهم صنعتی است که حدود ۷۰٪ شکر جهان را تولید می‌کند؛ بنابراین نقش مهمی در اقتصاد جهانی ایفا می‌کند (Henry and Kole, 2010). این گیاه به دلیل قابلیت تولید بیش از ۶۳ میلیون تن تولید جهانی شکر، در سال‌های اخیر

* نگارنده پاسخگو: ماجده نیسی. پست الکترونیک: mneisi.ag@gmail.com

نه‌تنها به‌عنوان منبع شکر بلکه در تولید اتانول و سوخت‌های زیستی بسیار موردتوجه قرار گرفته است (Tew and Cobill, 2008). نیشکر به‌عنوان گیاهی C_4، یکی از کارآمدترین گیاهان در تبدیل انرژی خورشیدی به انرژی شیمیایی در طی فتوسنتز است (Aragón et al., 2009; Rae et al., 2009). این گیاه در حال حاضر دارای بزرگ‌ترین مقیاس تولید بیوماس یا زیست‌توده جهانی در هرسال برداشت در بین گیاهان زراعی نیز هست؛ بنابراین تأثیر آن بر اقتصاد جهانی شفاف و واقعیتی انکارناپذیر است (Azevedo et al., 2011; Manner and Casu, 2011; Park et al., 2015).

سرما یکی از مهم‌ترین و ابتدایی‌ترین عوامل محدودکننده رشد گیاهان به‌ویژه گیاهان گرمسیری و نیمه‌گرمسیری مانند نیشکر است. سرما به علت اثرات محدودکننده مستقیم و غیرمستقیمی که به‌ترتیب بر واکنش‌های متابولیکی و کاهش نسبت آن‌ها در گیاه، جذب آب و مواد غذایی، سیالیت غشاء، ساختار فضایی اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها، تنش اسمزی ناشی از عدم جذب آب در سرما و دهیدراته شدن غشای سلولی در یخبندان و تنش اکسیداتیو و سایر تنش‌ها و تغییر در بیان ژن‌ها دارد، باعث اختلال در پراکنش، رشد و توسعه گیاه و درنتیجه کاهش بهره‌وری و عملکرد محصول می‌شود (Chinnusamy et al., 2007; Zhang et al., 2016). علاوه بر این، سرما فنوتیپ گیاه را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. از علائم فنوتیپی مختلف در برابر سرما می‌توان به جوانه‌زنی ضعیف، کوتولگی نهال‌ها، زردی برگ‌ها (کلروز)، کاهش سطح برگ‌ها، پژمردگی و مرگ بافت‌ها در حالت انجماد (نکروز) اشاره کرد (Yadav, 2010; Rihan et al., 2017).

آمار بلندمدت هواشناسی استان خوزستان در سال‌های گذشته، نشان می‌دهد که تقریباً بیشتر سال‌ها دمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد در کشت و صنعت‌های نیشکری اتفاق می‌افتد. در اثر این دما جوانه انتهایی معمولاً آسیب دیده و از بین می‌رود و درنتیجه رشد جوانه‌های جانبی افزایش و با مصرف ساکارز ذخیره‌شده توسط این جوانه‌ها درصد خلوص شربت نیشکر به دلیل تشکیل قندهای احیایی از قبیل گلوکز و فروکتوز کاهش یافته و این عامل در کاهش استحصال شکر و همچنین کاهش درآمد نهایی اثر مستقیم دارد؛ به‌طوری‌که در گزارشی از شرکت‌های نیشکری در سال ۱۳۹۷، مشاهده شده که سرما خسارت هنگفتی به محصول نیشکر وارد کرده است.

گزارش‌های زیادی از آثار تخریبی و خسارت سرما در گیاهان مختلف در دسترس است که از این جمله می‌توان به گزارش‌های لانگو و همکاران (Longo et al., 2017) در گیاه جو بهاره، دی فریتاز و همکاران (de Freitas et al., 2019)، کیم و تای (Kim and Tai, 2011)، بریاح و همکاران (Baruah et al., 2009) و گو و همکاران (Guo et al., 2006) در گیاه برنج، لی و همکاران (Li et al., 2018) در گیاه علف چمنی، دوتا و همکاران (Dutta et al., 2009)، کرمی معلم و همکاران (Karami-Moalem et al., 2018) و حیدروند و همکاران (Heidarvand et al., 2011) در گیاه نخود، آزارلو و همکاران (Azzarello et al., 2009) در نهال‌های زیتون، ولی زاده کامران و همکاران (Valizadeh-Kamran et al., 2018) در گیاه جو، یادگاری و همکاران (Yadeghari et al., 2008) در گیاه سویا، برار و همکاران (Brar et al., 2018) و رشید و همکاران (Rasheed et al., 2010) در گیاه نیشکر، لیو و همکاران (Liu et al., 2013) در گیاه جو دو سر، دورفیلینگ و همکاران (Dorffling et al., 2009) در گیاه گندم زمستانه، آپوستولوا و همکاران (Apostolova et al. 2008) در گیاه گندم، چانگ کوان و روی چانگ (Chang-Quan and Rui-Chang, 2008) در گیاه تریفولیوم اشاره نمود. ولی تاکنون گزارش جامعی از بررسی اثر تنش سرما بر ارقام نیشکر در دسترس نیست. از بین ارقام تجاری نیشکر رقم CP69-1062 از عملکرد بالایی برخوردار بوده و شکر بالایی تولید می‌کند ولی مشکل عمده این رقم حساسیت آن به سرما و رویارویی با این تنش است که ممکن است باعث کاهش عملکرد و محتوای شکر استحصالی از آن گردد؛ در مقابل گونه *S. spontaneum* یک‌گونه وحشی با محتوای بالای ساکارز و مقاوم به تنش‌های زیستی و غیر زیستی ازجمله تنش سرما است. لذا نظر به مطالب ذکرشده، این پژوهش به‌منظور بررسی مقایسه‌ای اثر تنش سرما بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی رقم تجاری حساس و گونه متحمل نیشکر در شرایط کنترل‌شده و با هدف شناسایی و معرفی صفات بیشتر تأثیر پذیرفته و صفات پایدار در شرایط تنش و عدم تنش، بررسی علت متحمل بودن گونه متحمل نسبت به گونه حساس در برابر یخبندان، بررسی میزان حساسیت و شدت تخریب رقم تجاری CP69-1062 هنگام رویارویی با تنش سرما در مقایسه با گونه متحمل و استفاده از این مشاهدات جهت برنامه‌های آتی به‌زراعی و به‌نژادی (تصمیم‌گیری برای افزایش یا کاهش تولید

این رقم پربازده در شرکت‌های نیشکری و همچنین تنظیم زمان برداشت آن تا قبل از سرد شدن هوا)، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه کشت بافت و گلخانه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات نیشکر خوزستان و اتاقک سرما انجام شد و طی آن اثر تنش سرما در شرایط عدم تنش سرما (شاهد ۲۵ درجه سانتی‌گراد)، سرما (دمای صفر درجه سانتی‌گراد) و یخبندان (دمای ۴- درجه سانتی‌گراد) در مرحله گیاهچه‌ای بر دو رقم تجاری حساس CP69-1062 و گونه متحمل *S. spontaneum* نیشکر موردبررسی قرار گرفت. بدین منظور جهت داشتن گیاهانی با شرایط رشدی و ساختار ژنتیکی یکسان، از گیاهچه‌های هشت‌هفته‌ای حاصل از کشت بافت دو رقم حساس و متحمل نیشکر جهت اعمال تنش سرما استفاده شد.

کشت بافت نیشکر

در این مطالعه، گیاهچه‌ها از کشت بافت و باززایی جوانه‌های جانبی به دست آمدند. بدین منظور ابتدا جوانه‌ها به روش حرارت درمانی و آب‌درمانی به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس‌ازآن به مدت ۷۲ ساعت در آب قرار داده شدند. سپس با کلرید جیوه ۰/۷ درصد به همراه دو قطره توییین ۸۰ ضدعفونی و با کاغذ صافی استریل خشک شدند و پس از آن به لوله‌های آزمایشگاهی حاوی محیط کشت استقرار (MS[1] بدون هورمون) منتقل شده (Murashige and Skoog, 1962) و به مدت سه هفته در اتاق رشد تحت شرایط نور با شدت ۵۰۰۰ لوکس، ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای مطلوب بین ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت سه هفته اولین سرشاخه‌ها ظاهر شدند. سپس تک شاخه‌های حاوی پرایموردیای تشکیل ریشه، جهت ریشه‌دار شدن به محیط کشت ریشه‌زایی (MS + ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA) منتقل شدند. پس از سه هفته گیاهچه‌ها ریشه‌دار شدند. درنهایت گیاهچه‌های ریشه‌دار پس از رسیدن به رشد و ارتفاع مناسب جهت طی نمودن مراحل سازگاری به گلخانه و گلدان‌های حاوی خاک و فیلترکیک به نسبت ۲ به ۱ منتقل و پس از دو هفته جهت اعمال تنش سرما استفاده شدند.

اعمال تنش سرما

قبل از اعمال تنش، گیاهچه‌های موجود در گلخانه به مدت ۳ روز در دمای ۲۷-۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس ازآن‌جهت اعمال تنش سرمازدگی، گیاهچه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در اتاقک سرما در دمای صفر و ۴- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس بلافاصله نمونه‌های برگی از هر دو رقم حساس و متحمل نیشکر در شرایط قبل و بعد از تنش جمع‌آوری شدند و شاخص‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن‌ها با آنالیزهای مختلف از قبیل اندازه‌گیری محتوای مالون دی آلدئید[2](MDA)، نشت الکترولیت (EL[3])، رنگ‌دانه‌های برگ، کاتالاز (CAT[4])، پراکسیداز (POD[5])، آسکوربات پراکسیداز (APX[6])، سوپراکسید دیسموتاز (SOD[7])، پرولین و کل قندهای محلول برگ (Wsc[8]) بررسی شد.

بررسی تغییرات مورفولوژیکی

۲۴ ساعت پس از اعمال تنش سرما، گیاهچه‌های تنش یافته رقم تجاری حساس و گونه متحمل به‌صورت چشمی ازلحاظ ویژگی‌های ظاهری مانند آثار یخزدگی روی شکل، پهنک، رنگ و نکروزه شدن برگ نسبت به همدیگر در تیمارهای دمایی مختلف و نسبت به گیاهچه‌های شاهد بررسی شدند.

اندازه‌گیری میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها به روش آرنون (Arnon, 1967) و در طول‌موج‌های ۶۶۴ نانومتر برای کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۶۷۰ برای کارتنوئیدها برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه انجام شد. اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت بر اساس روش لوتس و همکاران (Lutts et al., 1996) صورت گرفت.

غلظت مالون دی آلدئید و سایر آلدئیدهای حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها به روش داوی و همکاران (Davey et al., 2005) و در دو طول‌موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر برحسب میلی‌مول در گرم وزن تر گیاه اندازه‌گیری شد. مالون

[1] Murashige and Skoog
[2] Malondialdehyde
[3] Electrolyte leakage
[4] Catalase
[5] peroxidase
[6] Ascorbate peroxidase
[7] Superoxide dismutase
[8] Water soluble carbohydrates

دی آلدئید در واکنش با تیوباربیتوریک اسید تشکیل کمپلکس رنگی MDA-TBA داده که می‌توان با کمک اسپکتروفتومتری غلظت آن را اندازه‌گیری کرد.

میزان پرولین با استفاده از روش بتس و همکاران (Bates et al., 1973) و در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر از جدول استاندارد به دست آمد. اندازه‌گیری میزان کل قندهای محلول برگ به روش اشلیگل (Sheligl et al., 1986) و در طول‌موج ۴۸۸ نانومتر برحسب میلی‌گرم گلوکز در گرم وزن تر نمونه انجام شد.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت محتوای کل پروتئین به روش برادفورد (Bradford, 1976) و برحسب میلی‌گرم در لیتر وزن تر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به روش آبی (Aebi, 1984) و در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین صورت گرفت. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش مک آدام و همکاران (MacAdam et al., 1992) و در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش مسایاسو و هیروشی (Masayasu and Hiroshi, 1979) و بر اساس تغییر شیمیایی نیترو بلو تترازولیوم در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر انجام شد. میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش ناکانو و اسدا (Nakano and Asada, 1989) و در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین اندازه‌گیری شد.

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (Version 9.0) صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند. ضریب همبستگی (r) نیز با استفاده از روش پیرسون (Pearson) به دست آمد.

نتایج و بحث

نتایج بررسی تغییرات مورفولوژیکی

در دمای صفر درجه سانتی‌گراد برگ‌های گونه متحمل *S. spontaneum* ازلحاظ ظاهری تغییر چندانی نسبت به شاهد نشان ندادند فقط کمی تیره و خشک شدند درصورتی‌که در رقم تجاری حساس CP69-1062 برگ‌ها کمی تیره و پژمرده و برگ میانی تیره و لوله‌ای شد.

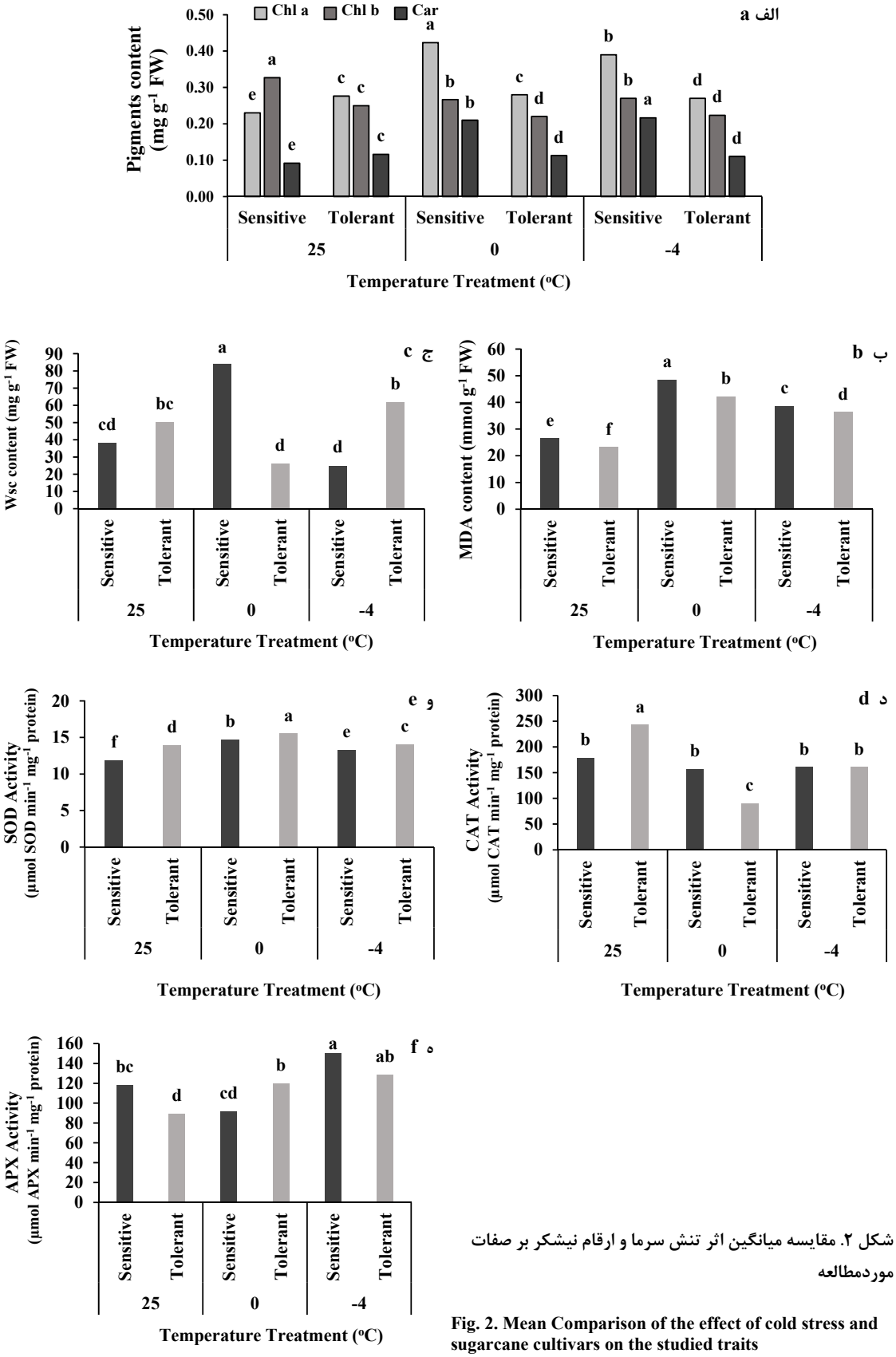
در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد در رقم متحمل پس از ۲۴ ساعت تنش، برگ‌ها نسبت به شاهد کمی تیره و خشک شدند ولی در رقم حساس اکثر برگ‌ها به رنگ سبز تیره تغییر رنگ دادند و علاوه بر برگ میانی عمده آن‌ها نیز لوله‌ای و پژمرده شدند و حالت افتادگی پیدا کردند و آثار یخ‌زدگی و کلروز نیز به‌صورت خط سفیدرنگی در رگبرگ میانی آن‌ها مشاهده شد (شکل ۱). ساقه گیاه نیز نسبت به شاهد خشک و تیره شد. این نتایج با نتایج لیو و همکاران (Liu et al., 2013) در گیاه جو دوسر مطابقت داشت.

شکل ۱. اثر تنش سرما بر روی برگ‌های نیشکر در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد

Fig. 1. Effect of cold stress on sugarcane leaves at -4°C

نتایج اندازه‌گیری میزان رنگ‌دانه‌های برگ

نتایج این مطالعه نشان داد که ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش سرما، محتوای رنگ‌دانه‌های برگ (کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئیدها) به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش سرما قرار گرفت و اثر متقابل سرما و رقم بر میزان رنگ‌دانه‌های برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، به‌گونه‌ای که کلروفیل a و کاروتنوئیدها در هر دو تیمار دمایی صفر و ۴- درجه سانتی‌گراد، هم در رقم تجاری حساس CP69-1062 و هم در گونه متحمل *S. spontaneum* نسبت به شاهد افزایش یافت. میزان این افزایش در رقم حساس بیشتر مشاهده شد (شکل ۲. الف).



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر تنش سرما و ارقام نیشکر بر صفات موردمطالعه

Fig. 2. Mean Comparison of the effect of cold stress and sugarcane cultivars on the studied traits

این‌گونه به نظر می‌رسد که طولانی‌تر شدن دوره سرمادهی، باعث کاهش بیشتر محتوای آب نسبی برگ و درنتیجه افزایش تدریجی غلظت کلروفیل در سلول‌های برگ شده است. این روند می‌تواند ناشی از کند شدن رشد گیاهچه تنش دیده و کاهش تقسیم سلولی باشد که منجر به افزایش میزان کلروفیل در برگ شده است (Chen et al., 2006). افزایش محتوای کلروفیل a و کارتنوئیدها می‌تواند ناشی از نقش حفاظتی و شبه آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نیز باشد. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین تغییرات کارتنوئیدها با فعالیت آنزیم‌های SOD، POD و APX این نتیجه را تأیید می‌کند. علاوه بر این، بین تغییرات کلروفیل a و کاروتنوئیدها با پرولین همبستگی مثبت (به ترتیب r^2=۰/۱۶۷ و r^2=/۲۴۰) مشاهده شد (جدول ۳). این نتایج با نتایج لانگو و همکاران (Longo et al., 2017) در گیاه جو بهاره و احمدی و همکاران (Ahmadi et al., 2005) در گیاه گندم مطابقت داشت. محتوای کلروفیل b در هر دو تیمار دمایی، هم در رقم تجاری حساس و هم در گونه متحمل نسبت به شاهد کاهش یافت. میزان این کاهش در رقم حساس بیشتر مشاهده شد (شکل ۲. الف). ازلحاظ تخریب رنگ سبز برگ‌ها، بیشترین کاهش و تغییر رنگ مربوط به رقم حساس و تیمار دمایی ۴- درجه سانتی‌گراد بود. این نشان می‌دهد گونه متحمل تحت تنش سرما توانسته است مقدار کلروفیل خود را حفظ کرده و با استفاده از مکانیسم دفاعی بهتری نسبت به رقم حساس از تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) جلوگیری کند و با داشتن فتوسنتز و انرژی بیشتری نسبت به رقم حساس باعث افزایش تحمل نسبت به تنش سرما شود. به‌طورکلی با کاهش دما ساخت کلروفیل متوقف‌شده و برگ‌ها زرد می‌شوند که این نشان‌دهنده کمبود کلروفیل است (Dutta et al., 2009). در گزارش‌هایی از دی فریتاز و همکاران (de Freitas et al., 2019) و بریاح و همکاران (Baruah et al., 2009) در گیاه برنج، لی و همکاران (Li et al., 2018) در گیاه علف چمنی، لانگو و همکاران (Longo et al., 2017) در گیاه جو بهاره، نادری و همکاران (Naderi et al., 2020) در گیاه برنج و دوتا و همکاران (Dutta et al., 2009) در گیاه نخود نتایجی مشابه با نتایج پژوهش حاضر حاصل شده است. همچنین در گزارشی از علی و همکاران (Ali et al., 2010) نیز کاهش میزان کلروفیل برگ در گیاهچه‌های ذرت تحت تنش سرما گزارش شده است.

نتایج اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت (یون)ها

نتایج این بررسی نشان داد که اثر متقابل سرما و رقم بر میزان نشت الکترولیت‌ها معنی‌دار نبود، ولی اثر تنش سرما بر میزان نشت الکترولیت‌ها در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). به‌طوری‌که تنش سرما در دوره زمانی ۲۴ ساعته باعث افزایش معنی‌داری در میزان نشت الکترولیت‌ها در رقم تجاری حساس CP69-1062 و گونه متحمل *S. spontaneum* نسبت به شاهد شد.

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر تنش سرما و ارقام نیشکر بر صفات موردمطالعه

Table 1. Variation analysis of the effect of cold stress and sugarcane cultivars on the studied traits

منابع تغییرات Source	درجه آزادی df	کلروفیل a Chl a	کلروفیل b Chl b	کاروتنوئید Carotenoide	پرولین Proline	مالون دی‌آلدئید Malondialdehyde	نشت الکترولیت Electrolyte leakage
تکرار Replication	2	0.00002	0.00004	0.00000	0.00004	1.760	0.888
تیمار دمایی Treatment	2	0.01602**	0.00377**	0.00662**	0.00027*	636.592**	17.690*
رقم Cultivar	1	0.02347**	0.01445**	0.01502**	0.0012**	68.864**	70.726**
تیمار × رقم Treatment * Cultivar	2	0.01610**	0.00045**	0.00871**	0.00002 ns	6.996*	0.778 ns
اشتباه آزمایشی Error	10	0.00001	0.00003	0.00001	0.00004	1.016	2.421
ضریب تغییرات CV (%)	-	*1.01463*	*2.18793*	*2.54755*	*1.22143*	*2.814*	*1.836*

Table 1. Continued **جدول ۱. ادامه**

Source منابع تغییرات	درجه آزادی df	قندهای محلول در آب Water soluble carbohydrates	کاتالاز Catalase	سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide dismutase	پراکسیداز Peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
Replication تکرار	2	89.055	3233.389	0.001	0.054	64.889
Treatment تیمار دمایی	2	250.888 ^{ns}	11596.222**	7.505**	0.895**	2447.722**
Cultivar رقم	1	43.555 ^{ns}	8.000 ^{ns}	6.504**	1.100**	249.388 ^{ns}
Treatment * Cultivar تیمار × رقم	2	3617.555**	6536.000**	0.802**	0.019 ^{ns}	1435.388*
Error اشتباه آزمایشی	10	94.389	438.055	0.003	0.061	207.689
CV (%)	-	20.430	12.693	0.386	1.650	12.382

علائم ns، * و ** به ترتیب نشان دهنده تفاوت غیر معنی دار و معنی دار در سطوح پنج و یک درصد می‌باشند.

The ns, * and ** symbols show non significant and significant different at the 5% and 1% probability level, respectively.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر تنش سرما و ارقام نیشکر بر صفات مورد مطالعه

Table 2. Mean Comparison o the effect of cold stress and sugarcane cultivars on the studied traits

Stress تنش	T(°C) دما	Cultivar رقم	Chl a کلروفیل a	Chl b کلروفیل b	Carotenoide کارتنوئید	Proline پرولین	Malondialdehyde مالون دی‌آلدئید	Electrolyte leakage نشت الکترولیت
			----------mg g^{-1} FW----------				Mmol.g^{-1} FW	(%)
Cold stress تنش سرما	0°C	*S. officinarum* (CP69-1062)	0.42 ^{a}	0.27 ^{b}	0.21 ^{b}	0.51 ^{cd}	48.40 ^{a}	89.01 ^{a}
		S. spontaneum	0.28 ^{a}	0.22 ^{d}	0.11 ^{d}	0.52 ^{ab}	42.08 ^{b}	84.28 ^{bcd}
	-4°C	*S. officinarum* (CP69-1062)	0.39 ^{b}	0.27 ^{b}	0.22 ^{a}	0.51 ^{bc}	38.45 ^{c}	86.18 ^{ab}
		S. spontaneum	0.27 ^{d}	0.22 ^{d}	0.11 ^{d}	0.52 ^{a}	36.30 ^{d}	82.32 ^{cd}
Control شاهد	25°C	*S. officinarum* (CP69-1062)	0.23 ^{e}	0.33 ^{a}	0.09 ^{e}	0.49 ^{d}	26.45 ^{e}	84.97 ^{bc}
		S. spontaneum	0.28 ^{c}	0.25 ^{c}	0.12 ^{c}	0.51 ^{abc}	23.18 ^{f}	81.67 ^{d}

Table 2. Continued **جدول ۲. ادامه**

Stress تنش	T(°C) دما	Cultivar رقم	قندهای محلول در آب Water soluble carbohydrates	کاتالاز Catalase	سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide dismutase	پراکسیداز Peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
			(mg g^{-1} FW)	----------U mg-^{1} protein----------			
Cold stress تنش سرما	0°C	*S. officinarum* (CP69-1062)	84.11 ^{a}	157.14 ^{b}	14.71 ^{b}	15.09 ^{ab}	91.84 ^{cd}
		S. spontaneum	26.09 ^{d}	89.29 ^{c}	15.50 ^{a}	15.47 ^{a}	119.90 ^{b}
	-4°C	*S. officinarum* (CP69-1062)	25.00 ^{d}	160.71 ^{b}	13.30 ^{e}	14.87 ^{b}	150.00 ^{a}
		S. spontaneum	61.94 ^{b}	160.71 ^{b}	14.07 ^{c}	15.48 ^{a}	128.57 ^{ab}
Control شاهد	25°C	*S. officinarum* (CP69-1062)	38.42 ^{cd}	178.57 ^{b}	11.88 ^{f}	14.32 ^{c}	118.20 ^{bc}
		S. spontaneum	50.45 ^{bc}	242.86 ^{a}	13.92 ^{d}	14.81 ^{b}	89.29 ^{d}

هر عدد میانگین سه تکرار (Mean± SE) می‌باشد. داده‌های هر ستون که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد باهم تفاوت معنی داری ندارند.

Each number is the average of three repetitions (SE ± Mean). The data in each column, which have at least one common letter, are not significantly different at the 5% probability level based on the LSD test.

میزان EL هم در رقم تجاری حساس و هم در گونه متحمل در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد کمتر بود (جدول ۲)؛ زیرا در این دما تمام فعالیت‌های متابولیکی سلول به علت یخ بستن سلول متوقف شده است (Pearce, 2001; Rihan et al., 2017). در این بررسی ارقام نیشکر نیز ازنظر میزان نشت الکترولیت‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد داشتند (جدول ۱)، به‌نحوی‌که میزان افزایش نشت الکترولیت‌ها تحت تنش سرما در رقم تجاری حساس CP69-1062 بیشتر از گونه متحمل *S. spontaneum* بود (جدول ۲). این نتایج با نتایج کانسلون و همکاران (Concellon et al., 2007) و تاکاک و همکاران (Takac et al., 2004) مطابقت داشت. گزارش‌های مشابهی در خصوص افزایش نشت الکترولیت‌ها در گیاهان تحت تنش سرما و یخزدگی در دسترس است که تأییدکننده نتایج این مطالعه می‌باشند (Liu et al., 2013; Valizadeh-Kamran et al., 2018). وانگشر و همکاران (Wongsheree et al., 2008) در مطالعه‌ای، افزایش اختلال در غشای سلولی و به دنبال آن نشت الکترولیت‌ها از سلول تحت تنش سرما را گزارش کردند. همچنین آزارلو و همکاران (Azzarello et al., 2009) طی پژوهشی گزارش کردند که تنش سرما موجب سرعت بخشیدن به تخریب غشاء و افزایش نشت الکترولیت در نهال‌های زیتون شده است. لی و همکاران (Li et al., 2018) نیز در گیاه زویژا یا علف چمنی در مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که تحت تنش سرما در هر دو رقم حساس و متحمل نشت الکترولیت نسبت به شاهد افزایش یافت و این افزایش در رقم حساس بیشتر بود. به‌طورکلی زمانی که گیاه تحت تنش سرما قرار می‌گیرد بافت‌های آن آسیب دیده، فعالیت غشاء سلولی مختل شده و الکترولیت‌های درون سلول به خارج از آن نشت می‌کنند. هراندازه گیاه نسبت به تنش حساس‌تر باشد میزان این تخریب بیشتر و به‌تبع آن نشت الکترولیت نیز بیشتر خواهد بود (Hausladen and Alscher, 1993). به عبارتی افزایش بیش از ۵۰ درصدی شاخص EL_1، خسارت شدیدی به گیاه وارد کرده و ممکن است منجر به مرگ گیاه شود (Takac, 2004; Concellon et al., 2007; Heidarvand et al., 2011; Liu et al., 2013; Karami-Moalem et al., 2018; Kazemi-Shahandashti and Maali-Amiri, 2018; Valizadeh-Kamran et al., 2018). افزایش نشت یونی تحت تنش سرما را می‌توان به افزایش میزان MDA و کاهش شاخص پایداری غشاء (MSI) نیز نسبت داد. به‌گونه‌ای که بین مقادیر نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدئید همبستگی مثبت و معنی‌داری (r^2=۰/۶۴۴**) وجود داشت (جدول ۳).

نتایج اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید

اثر متقابل سرما و رقم بر میزان مالون دی آلدئید در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، به‌نحوی‌که در رقم تجاری حساس CP69-1062 و گونه متحمل *S. spontaneum* تنش سرما باعث افزایش میزان MDA برگ نسبت به شاهد شد. میزان این افزایش در رقم تجاری حساس CP69-1062 بیشتر بود (شکل ۲. ب). این نتایج با نتایج یادگاری و همکاران در گیاه سویا مطابقت داشت. گو و همکاران و همچنین کیم و تای نیز در مطالعات خود به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۶ و ۲۰۱۱ گزارش کردند که میزان MDA تحت تنش سرما در واریته‌های حساس برنج افزایش یافته است. طی مقایسه‌ای که بین دو رقم حساس و متحمل جو تحت تنش سرما توسط ولی زاده کامران و همکاران در سال ۲۰۱۸ صورت گرفت نتایج مشابهی با تحقیق حاضر حاصل شد، به‌گونه‌ای که میزان MDA در هر دو رقم حساس و متحمل نسبت به شاهد افزایش یافت، میزان این افزایش در رقم حساس بیشتر بوده است (Guo et al., 2006; Yadeghari et al., 2008; Kim and Tai, 2011; Valizadeh-Kamran et al., 2018). با کاهش دما از صفر به ۴- درجه سانتی‌گراد، میزان MDA در هر دو رقم کاهش یافت ولی مقدار آن همچنان نسبت به شاهد بیشتر بود. میزان این کاهش در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد در رقم تجاری حساس بیشتر از گونه متحمل بوده است. این ممکن است به علت مختل شدن فعالیت‌های گیاه ناشی از یخزدگی درون‌سلولی رقم حساس یا فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سم‌زدایی و درنتیجه دفاع بهتر گونه متحمل در برابر تنش سرما اتفاق افتاده باشد (Pearce, 2001; Rihan et al., 2017). به‌طوری‌که بین تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، POD و APX و میزان MDA همبستگی مثبت مشاهده شد (به ترتیب r^2=۰/۶۳۰**، r^2=۰/۵۴۸* و r^2=۰/۱۲۴) (جدول ۳). زمانی که گیاه در معرض تنش سرما قرار می‌گیرد پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع لیپیدها افزایش‌یافته و مالون دی آلدئید تولید می‌شود بنابراین مالون دی آلدئید

به‌عنوان یک نشانگر جهت مشخص کردن شدت آسیب‌های اکسیداتیو به لیپیدها به کار می‌رود.

نتایج اندازه‌گیری میزان پرولین

نتیجه این بررسی دال بر این بود که اثر متقابل سرما و رقم بر میزان پرولین معنی‌دار نبود، ولی اثر تنش سرما بر میزان آن در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، به‌طوری‌که تنش سرما در دوره زمانی ۲۴ ساعته باعث افزایش میزان پرولین در رقم تجاری حساس CP69-1062 و گونه متحمل *S. spontaneum* نسبت به شاهد شد. علاوه بر این همبستگی مثبتی بین تجمع پرولین و تحمل به سرما به‌ویژه در گونه متحمل وجود داشت. در اثر سرما میزان پرولین در هر دو رقم حساس و متحمل در دماهای صفر و ۴- درجه سانتی‌گراد نسبت به شاهد افزایش یافت ولی در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد به علت یخ بستن و متوقف شدن فعالیت‌های متابولیکی سلول (Pearce, 2001; Rihan et al., 2017)، میزان پرولین نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد ثابت ماند و تغییری نکرد ولی همچنان نسبت به شاهد بیشتر بود (جدول ۲). بین این افزایش بیشتر پرولین در گونه متحمل و تغییر فعالیت آنزیم‌های SOD، APX و POD همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد که این نتیجه نقش محافظتی پرولین در کاهش آسیب سلولی را تأیید می‌کرد (جدول ۳). در این بررسی ارقام نیشکر نیز ازنظر میزان پرولین با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد داشتند (جدول ۱)، به‌نحوی‌که میزان افزایش ترکیب مذکور تحت تنش سرما در گونه متحمل *S. spontaneum* بیشتر از رقم تجاری حساس CP69-1062 بود (جدول ۲). این نتایج با نتایج دی فریتاز و همکاران (de Freitas et al., 2019) و کیم و تای (Kim and Tai, 2011) در گیاه برنج، برار و همکاران (Brar et al., 2018) و رشید و همکاران (Rasheed et al., 2010) در گیاه نیشکر، لیو و همکاران (Liu et al., 2013) در گیاه جو دو سر، دورفیلینگ و همکاران (Dorffling et al., 2009) در گیاه گندم زمستانه، آپوستولوا و همکاران (Apostolova et al., 2008) و نادری و همکاران (Naderi et al., 2020) در گیاه گندم و جوشی و همکاران (Joshi et al., 2007) در گیاهان همیشه‌سبز مطابقت داشت. حسیبی و همکاران (Hasibi et al., 2010) نیز طی مطالعه‌ای در سال ۱۳۸۹ بر روی گیاه برنج، نتایج مشابهی با تحقیق حاضر را گزارش کردند. پرولین یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی است که افزایش آن در شرایط تنش، یکی از شاخص‌های تحمل گیاه است. این آنتی‌اکسیدان تنش اسمزی ناشی از وقوع تنش سرما در گیاه را کنترل کرده و با برهم‌کنش با آنزیم‌ها باعث پایداری و حفظ ساختار پروتئین‌ها و فعالیت‌های مربوط به آن‌ها می‌شود. پرولین با از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن، غشاهای سلولی، ساختارهای سلولی و عملکرد سلول به‌ویژه فعالیت فتوسنتزی گیاه را حفظ می‌کند. پرولین همچنین باعث حفظ غشاهای تیلاکوئیدی کلروپلاست در برابر رادیکال‌های آزاد ناشی از آسیب‌های نوری می‌شود (Joshi et al., 2007). از محتمل‌ترین نقش‌های پرولین می‌توان به تنظیم اسیدیته سیتوزول، تثبیت نسبت $NAD^+/NADH$، افزایش فعالیت فتوشیمیایی فتوسیستم II در غشای تیلاکوئید و کاهش پراکسیداسیون لیپیدها اشاره کرد (Theocharis et al., 2012).

نتایج اندازه‌گیری میزان کل قندهای محلول

نتایج این مطالعه نشان داد که اثر متقابل سرما و رقم بر میزان کل قندهای محلول برگ در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، به‌گونه‌ای که در رقم تجاری حساس CP69-062 تحت تنش سرما پس از ۲۴ ساعت، در دمای صفر درجه سانتی‌گراد میزان قند نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. ولی در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد اگرچه مقدار آن کاهش‌یافته ولی ازلحاظ آماری تفاوتی با شاهد نداشت (شکل ۲. ج). افزایش تجمع قندهای محلول در رقم حساس، می‌تواند به علت متوقف شدن مسیرهای انتقال قند در شرایط تنش باشد. چنین به نظر می‌رسد که این رقم تا رسیدن دما به صفر درجه سانتی‌گراد، قصد افزایش مکانیسم تحمل با افزایش تجمع قند را داشته است ولی با توجه به اینکه در این شرایط میزان MDA و EL کاهش نداشته است پس مکانیسم مؤثری برای القای تحمل نبوده است. در گونه متحمل *S. spontaneum* در شرایط تنش سرما در دمای صفر درجه سانتی‌گراد میزان قند نسبت به شاهد کاهش یافت ولی در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد اگرچه مقدار آن نسبت به شاهد بیشتر شده است ولی ازلحاظ آماری تفاوتی با آن نداشت (شکل ۲. ج). کاهش قند محلول در گونه متحمل احتمالاً به‌این‌علت بوده است که سایر مسیرهای فتوسنتزی سعی کرده‌اند به‌جای تجمع قندها، آن‌ها را صرف بیوسنتز سایر مسیرهای آنزیمی اکسیدانی و غیر اکسیدانی کنند تا مکانیسم دفاعی را فعال کنند. در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد قند

محلول هم در رقم تجاری حساس و هم در گونه متحمل تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشته است زیرا در این دما کل فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول متوقف‌شده و گیاه فرصتی برای فعال کردن مکانیسم‌های القای تحمل به‌واسطه قندهای محلول را نداشته است (Pearce, 2001; Rihan et al., 2017). این نتایج با نتایج دی فریتاز و همکاران (de Freitas et al., 2019) در گیاه برنج، برار و همکاران (Brar et al., 2018) در گیاه نیشکر، لی و همکاران (Li et al., 2018) در گیاه زویژا یا علف چمنی و دورفیلینگ و همکاران (Dorffling et al., 2009) در گیاه گندم زمستانه مطابقت داشت.

جدول ۳. همبستگی بین صفات موردمطالعه در شرایط کنترل‌شده

Table 2. Correlation between studied traits in controlled conditions

	صفات Traits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	کلروفیل a Chl a(1)	1										
2	کلروفیل b Chl b(2)	-.055	1									
3	کاروتنوئید Car(3)	.979**	.026	1								
4	پرولین Pro(4)	.240	-.86**	.167	1							
5	مالون دی‌آلدئید MDA(5)	.711**	-.351	.617**	.157	1						
6	نشت الکترولیت EL(6)	.702**	.325	.650**	-.580*	.644**	1					
7	قندهای محلول در آب WSC(7)	.328	-.040	.205	-.101	.263	.236	1				
8	کاتالاز CAT(8)	-.102	.273	-.058	-.186	-.63**	-.228	.218	1			
9	سوپراکسید دیسموتاز SOD(9)	.316	-.84**	.186	.605**	.630**	.049	.202	-.44	1		
10	پراکسیداز POD(10)	.142	-.82**	.056	.684**	.548*	-.159	.188	-.43	.770**	1	
11	آسکوربات پراکسیداز APX(11)	.012	-.012	.144	.235	.124	-.078	-.519*	-.30	-.219	.031	1

علائم * و ** به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطوح پنج و یک درصد می‌باشند.

The * and ** symbols significant different at the 5% and 1% probability level, respectively.

افزایش محتوای قند را می‌توان به‌عنوان یک شاخص فیزیولوژیکی مناسب جهت تحمل به سرما در نظر گرفت و از آن به‌عنوان معیاری برای ارزیابی ژنوتیپ‌های متحمل به سرما استفاده کرد (Yuanyuan et al., 2010). در دماهای پایین متابولیسم کربوهیدرات‌ها نسبت به سایر ترکیبات فتوسنتزی از حساسیت بیشتری برخوردار است. تحت تنش سرما میزان تجمع قندهای محلول در گیاه به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی جهت مواجه‌شدن با شرایط نامساعد افزایش می‌یابد. این تغییر غلظت در القای تحمل به سرما در گیاهان مهم است؛ زیرا قندها به‌طور مستقیم با واکنش‌های فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، انتقال مواد فتوسنتزی و تنفس در ارتباط هستند (Ball et al., 2002). به عبارتی، قندها با از بین بردن ROSها باعث افزایش ثبات و پایداری غشاهای سلولی می‌شوند. علاوه بر این، قندها با جایگزین کردن مولکول‌های آب در تشکیل پیوندهای هیدروژنی، در حفظ غشاهای سلولی در هنگام دهیدراسیون ناشی از تنش سرما نقش دارند (Theocharis et al., 2012). قندهای محلول همچنین نقش مهمی در تنظیم اسمزی دارند. به‌گونه‌ای که با تجمع آن‌ها درون سلول و کاهش محتوی آب، پتانسیل اسمزی منفی‌تر شده و درنتیجه نقطه انجماد مایع درون سلول پایین‌تر رفته و میزان تحمل به سرما افزایش می‌یابد (Kerepesi et al., 2004)؛ بنابراین قندها با کاهش دمای انجماد آب

سلولی، تأمین انرژی قابل‌دسترس و محافظت از ساختمان و عملکرد پروتئین‌ها نقش عمده‌ای در ایجاد تحمل به سرما دارند (Yuanyuan et al., 2010). به‌عبارتی‌دیگر، قندها به‌عنوان اسمولایت سازگار باعث حفظ آب سلولی گیاه و درنتیجه کاهش آب قابل‌دسترس برای تشکیل هسته‌های یخی در آپوپلاست و پسابیدگی سلول‌ها می‌گردند (Theocharis et al., 2012).

نتایج اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج این بررسی نشان داد که اثر متقابل سرما و رقم بر میزان فعالیت آنزیم CAT در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، به‌گونه‌ای که تنش سرما طی ۲۴ ساعت باعث کاهش فعالیت این آنزیم در رقم تجاری حساس CP69-1062 و گونه متحمل *S. spontaneum* نسبت به شاهد شد (شکل ۲. د). میزان این کاهش در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری در گونه متحمل بیشتر بود. این امر می‌تواند به علت افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی باشد. به‌گونه‌ای که مقایسه تغییرات، همبستگی منفی و معنی‌داری بین میزان فعالیت کاتالاز و میزان فعالیت آنزیم‌های APX، POD، SOD و محتوای پرولین را آشکار می‌کند (به ترتیب r^2= -۰/۳۰۶، r_2=-۰/۴۳۶ ، r^2=-۰/۴۴۴ و r^2= -۰/۱۸۶) (جدول ۳). در رقم حساس اگرچه میزان فعالیت این آنزیم در دماهای صفر و ۴- درجه سانتی‌گراد به‌طور ناچیزی کاهش‌یافته ولی ازلحاظ آماری تفاوتی با شاهد نداشت. ولی در گونه متحمل در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد میزان CAT به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافته است. به نظر می‌رسد با توجه به اینکه نمونه‌برداری بلافاصله پس از پایان مدت تنش انجام شده است، این آنزیم فرصت کافی برای تغییر نداشته است. همچنین کاهش فعالیت CAT می‌تواند به علت یخ بستن و متوقف شدن فعالیت‌های فیزیولوژیک و بیولوژیک سلول تحت تنش یخ‌زدگی در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد باشد (Javadian et al., 2010). نتایج تحقیق حاضر با نتایج طریق الاسلامی و همکاران (Tarighaleslami et al., 2016) در گیاه ذرت و نادری و همکاران (Naderi et al., 2020) در گیاه گندم مطابقت داشت. در گزارشی از گو و همکاران (Guo et al., 2006) نیز، تنش سرما باعث کاهش فعالیت آنزیم CAT شده است.

نتایج اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

اثر متقابل سرما و رقم بر میزان فعالیت آنزیم POD معنی‌دار نبود، ولی اثر تنش سرما بر میزان فعالیت این آنزیم در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، به‌طوری‌که تنش سرما طی ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد شد (جدول ۲). در این بررسی ارقام نیشکر نیز ازنظر میزان فعالیت آنزیم POD با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد داشتند (جدول ۱)، به‌نحوی‌که میزان فعالیت این آنزیم در گونه متحمل *S. spontaneum* بیشتر از رقم تجاری حساس CP69-1062 بود (جدول ۲). این نتایج با نتایج ولی زاده کامران و همکاران (Valizadeh-Kamran et al., 2018) در گیاه جو و لیو و همکاران (Liu et al., 2013) در گیاه جو دو سر مطابقت داشت. ارتباط معقولی بین افزایش فعالیت آنزیم POD و تحمل به سرما در ارقام متحمل وجود دارد. زمانی که گیاه در معرض سرما قرار می‌گیرد تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در آن افزایش می‌یابد. این مولکول‌ها باعث تخریب پروتئین‌ها، اسیدهای‌نوکلئیک و غشاهای سلولی می‌شوند. لذا سلول‌ها برای کاهش اثرات تخریبی این مولکول‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ازجمله POD، APX و SOD را افزایش می‌دهند (Luo et al., 2012).

نتایج اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

نتایج این مطالعه دال بر این بود که اثر متقابل سرما و رقم بر میزان فعالیت آنزیم SOD در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، به‌گونه‌ای که تنش سرما طی ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD در رقم تجاری حساس CP69-1062 و گونه متحمل *S. spontaneum* نسبت به شاهد شد ولی میزان این افزایش در گونه متحمل به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم حساس بود؛ که این می‌تواند نشان‌دهنده کارایی آنزیم SOD در ایجاد تحمل به سرما در شرایط تنش باشد. در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم SOD در هر دو رقم تنش یافته به علت یخ بستن سلول و مختل شدن فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن، کمتر از دمای صفر درجه سانتی‌گراد بوده است حال‌آنکه میزان آن همچنان از شاهد بیشتر است (شکل ۲؛ و). این نتایج با نتایج چانگ کوان و روی چانگ (Chang-Quan and Rui-Chang, 2008) در گیاه تریفولیوم، آپوستولوا و همکاران (Apostolova et al., 2008) در گیاه گندم و چن و

همکاران (Chen et al., 2006) مطابقت داشت. لیو و همکاران (Liu et al., 2013) نیز طی مطالعه‌ای نتایج مشابهی دال بر افزایش میزان فعالیت SOD تحت تنش سرما در گیاه جو دو سر را گزارش نمودند. به‌طورکلی آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در تحمل به سرما ایفا می‌کنند. بین میزان آنتی‌اکسیدان‌ها و تحمل گیاه به تنش سرما ارتباط و همبستگی نزدیکی وجود دارد. به‌گونه‌ای که میزان آن‌ها در گیاهان متحمل بیشتر از گیاهان حساس است (Caverzan et al., 2012; Baek and skinner, 2012).

نتایج اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

اثر متقابل سرما و رقم بر میزان فعالیت آنزیم APX در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱)، به‌گونه‌ای که تنش سرما طی ۲۴ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم APX در رقم تجاری حساس CP69-1062 و گونه متحمل *S. spontaneum* نسبت به شاهد شد (شکل ۲. ه)؛ به‌گونه‌ای که در گونه متحمل در هر دو تیمار دمایی پس از ۲۴ ساعت میزان فعالیت این آنزیم به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و این افزایش نسبی در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای صفر درجه سانتی‌گراد بود. درحالی‌که در رقم حساس، در دمای صفر درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت APX نسبت به شاهد کاهش و در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافته است (شکل ۲. ه). علاوه بر اینکه افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی APX در شرایط تنش کاملاً معقول است، شاید بتوان این افزایش را به کاهش میزان فعالیت آنزیم CAT در شرایط مشابه نیز نسبت داد؛ زیرا بین فعالیت این دو آنزیم همبستگی منفی (r^2=-۰/۳۰۶) مشاهده شد (جدول ۳). این نتایج با نتایج نادری و همکاران (Naderi et al., 2020) در گیاه گندم مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که رقم تجاری حساس و گونه متحمل نیشکر پاسخ‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متفاوتی در شرایط تنش سرما نسبت به شاهد نشان دادند که این مورد نشان‌دهنده ساختار ژنومی، ظرفیت ژنتیکی متفاوت و ویژگی‌های دیگر آن‌ها در تحمل به سرما است؛ که این امر می‌تواند از میزان تغییرات در برخی شاخص‌های دفاعی معمول مانند میزان مالون دی آلدئید، کربوهیدرات، نشت الکترولیت و پرولین استنباط شود که با از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن و مقابله با تنش اکسیداتیو، بخشی از تحمل به سرما را در گونه متحمل فراهم می‌کند. تنش سرما باعث افزایش نشت الکترولیت، میزان مالون دی آلدئید و کاهش کلروفیل برگ به‌ویژه در رقم حساس و افزایش کربوهیدرات و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی به‌ویژه در گونه متحمل شد. ازنظر ظاهری نیز ارقام نیشکر در دمای صفر درجه سانتی‌گراد آثار تخریبی چندانی نسبت به شاهد نشان ندادند به‌طوری‌که اکثر گیاهچه‌ها پس از اتمام دوره تنش و بازگشت از تنش سرما به رشد عادی خود بازگشتند ولی در دمای ۴- سانتی‌گراد اغلب برگ‌ها علائم تخریبی مانند زردی، لهیدگی، جمع شدن و لوله‌ای شدن، خشکی و تشکیل بلورهای یخی نشان دادند؛ که شدت این علائم در رقم تجاری حساس بیشتر از گونه متحمل بود و گونه متحمل مکانیسم دفاعی بهتری نسبت به رقم حساس نشان داد. مجموعه این تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به وجود آمده در رقم تجاری حساس و گونه متحمل نیشکر تحت تنش سرما، در جهت حفظ بقاء و عملکرد است.

منابع

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods of Enzymology. 105, 121–6.

Ahmadi, A., Yazdi Samadi, B., Netaj, J., 2005. Physiological response of wheat seedling to low temperatures. The Journal of Agriculturale Science. 15, 27-44.

Ali, S., Islami, S.V., Behdani, M., M. Jami Al-Ahmadi., 2010. Effect of Glycine Betaine's External Use in Increasing Cold Tolerance in Corn Plants. Iranian Journal of Agricultural Research. 6, 939-945. [In Persianwith English summary].

Apostolova, P., Yordanova, R., Popova, L., 2008. Response of antioixidative defence system to low temperature stress in two wheat ultivar. General and Applied Plant Physiology, Special Issue. 34, 281-294.

Aragón, C., Carvalho, L.C., González, J., Escalona, M., Amanicio, S., 2009. Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrid) propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develops improved anti-oxidative response. Tropical Plant Biology. 2, 38–50.

Arnon, A.N., 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal. 112, 121-23.

Azevedo, R.A., Carvalho, R.F., Cia, M.C., Gratão, P.L., 2011. Sugarcane under pressure: an overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. Tropical Plant Biology. 4, 42-51.

Azzarello, E., Mugnai, S., Pandolfi, C., Masi, E., Marone, E., 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.

Baek, K.H., Skinner, D.Z., 2012. Production of reactive oxygen species by freezing stress and the protective roles of antioxidant enzymes in plants. Journal of Agricultural Chemistry and Environment. 1, 34–40.

Ball, S., Qian, Y., Stushnoff, C., 2002. Soluble carbohydrates in two buffalo grass cultivars with contrasting freezing tolerance. Journal of the American Society for Horticultural Science. 127, 45-49.

Baruah, A.R., Ishigo-Oka, N., Adachi, M., Oguma, Y., Tokizono, Y., Onishi, K., Sano, Y., 2009. Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. Euphytica. 165, 459-70.

Bates, S., Waldern, R. P., Teare, E. D., 1973. Rapide determination of free proline for water stress studies, Plant and Soil. 39, 205-207.

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

Brar, A.S., Sandhu, S.K, Sharma, S., 2018. Physiological and biochemical traits as indicators for cold tolerance in sugarcane (*Saccharum species*). Agricultural Research Journal. 55, 210-218.

Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, SB. Ribeiro, CW., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M., 2012. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. Genetics and molecular biology. 35, 1011-1019.

Chang-Quan, W., Rui-Chang, L., 2008. Enhancement of superoxide dismutase activity in the leaves of white clover (*Trifolium repens* L.) in response to polyethylene glycol-induced water stress. Acta Physiologiae Plantarum. 30, 841–847.

Chen, T.H.H., Uemura, M., Fujikawa, S., 2006. Cold Hardiness in Plants. CABI Publishing, 269p.

Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K., 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends in Plant Science. 12, 444-451.

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

Davey, M.W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J., Swennen, R.L., 2005. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. Analytical Biochemistry. 347, 201-207.

de Freitas, G.M., Thomas, J., Liyanage, R., Lay, J.O., Basu, S., Ramegowda, V., do Amaral, M.N., Benitez, L.C., Braga, E.J., Pereira, A., 2019. Cold tolerance response mechanisms revealed through comparative analysis of gene and protein expression in multiple rice genotypes. PLoS ONE. 14, e0218019.

Dorffling, K., Dorffling, H., Luck, E., 2009. Improved frost tolerance and winter hardiness in proline overaccumulating winter wheat mutants obtained by in vitro-selection is associated with increased carbohydrate, soluble protein and abscisic acid (ABA) level. Euphytica. 165, 545-556.

Dutta, S., Mohanty, S., Tripathy, B.C., 2009. Role of temperature stress on chloroplast biogenesis and protein import in Pea. Plant Physiology. 150, 1050–1061.

Guo, Z., Ou, W., Lu, S. Zhong, Q., 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 44, 828-836.

Hasibi, P., Nabipour, M., Behdani, M., and Moradi, F., 2010. Investigation of the role of some cold protectors in inducing low temperature stress tolerance to rice plants. (*Oryza sativa* L.) Electronic Journal of Crop

Production. 1, 56-39. [In Persian with English summary].

Hausladen, A., Alscher, R.G., 1993. In: Alscher, R.G., Hess, J.L., (eds.). Glutathione In Antioxidants in Higher Plants. CRC Press. USA. pp. 1-30.

Heidarvand, L., Amiri, R.M., Naghavi, M.R., Farayedi, Y., Sadeghzadeh, B., Alizadeh, K.H., 2011. Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. Russian Journal of Plant Physiology. 58, 157-63.

Henry, R.J., Kole, C., 2010. Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Javadian, N., Karimzadeh, G., Mahfoozi, S., and Ghanati, F., 2010. Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. Russian Journal of Plant Physiology. 57, 540-547.

Joshi, S.C., Chandra, S., Palni, L.M.S., 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.

Karami-Moalem, S., Maali-Amiri, R., Kazemi-Shahandashti, S.S., 2018. Effect of cold stress on oxidative damage and mitochondrial respiratory properties in chickpea. Plant Physiology and Biochemistry. 122, 31-39.

Kazemi-Shahandashti, S.S., Maali-Amiri, R., 2018. Global insights of protein responses to cold stress in plants: Signaling, defence, and degradation. Journal of Plant Physiology. 226, 123-135.

Kerepesi, I., Bányai-Stefanovits, É., Galiba, G., 2004. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. Journal of Plant Physiology. 161, 131-133.

Kim, S.I., Tai, T.H., 2011. Evaluation of seedling cold tolerance in rice cultivars: A comparison of visual ratings and quantitative indicators of physiological changes. Euphytica. 178, 437–447.

Li, S., Yang, Y., Zhang, Q., Liu, N., Xu, Q., Hu, L., 2018. Differential physiological and metabolic response to low temperature in two zoysiagrass genotypes native to high and low latitude. PloS ONE. 13, e0198885.

Liu, W., Yu, K., He, T., Li, F., Zhang, D., Liu, J., 2013. The low temperature induced physiological responses of *Avena nuda* L., a cold-tolerant plant species. The Scientific World Journal. vol. 2013, Article ID 658793.

Longo, V., Kamran, R.V., Michaletti, A., Toorchi, M., Zolla, L., Rinalducci, S., 2017. Proteomic and physiological response of spring barley leaves to cold stress. International Journal of Plant Biology & Research. 5(1), 1061

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, 456-461.

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

MacAdam, J.W., Nelson, C.J., and Sharp, R.E., 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue I. Spatial distribution of ionically bound peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. Plant Physiology. 99, 872–8.

Manners, J.M, Casu, R.E., 2011. Transcriptome analysis and functional genomics of sugarcane. Tropical Plant Biology. 4, 9-21.

Masayasu, M., Hiroshi, Y., 1979. A simplified assay method of superoxide 462 dismutase activity for clinical use. Clinica Chimica Acta. 92, 337-342.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15, 473-97.

Naderi, S., Fakheri, B.A., Maali-Amiri, R., Mahdinezhad, N., 2020. Tolerance responses in wheat landrace Bolani are related to enhanced metabolic adjustments under drought stress. Plant Physiology and Biochemistry. 150, 244-253.

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. 22, 867-880.

Park, J.W., Benatti, T.R., Marconi, T., Yu, Q., Solis-Gracia, N., Mora, V., da Silva, J.A., 2015. Cold Responsive Gene Expression Profiling of Sugarcane and Saccharum spontaneum with Functional Analysis of a Cold Inducible Saccharum Homolog of NOD26- Like Intrinsic

Protein to Salt and Water Stress. PloS one. 10, e0125810.

Pearce, R.S., 2001. Plant freezing and damage. Annals of Botany. 87, 417-424.

Rae, A.L., Jackson, M.A., Nguyen, C.H., Bonnett, G.D., 2009. Functional specialization of vacuoles in sugarcane leaf and stem. Tropical Plant Biology. 2, 13-22.

Rasheed, R., Wahid, A.B., Ashraf, M.U., Basra, S.M., 2010. Role of proline and glycinebetaine in improving chilling stress tolerance in sugarcane buds at sprouting. International Journal of Agriculture and Biology. 12, 1–8.

Rihan, H.Z., Al-Issawi, M., Fuller, M.P., 2017. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance. Journal of Plant Interactions. 12, 143-157.

Sheligl, H. Q., 1986. Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. Planta Journal. 47, 51p.

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.

Tarighaleslami, M., Kafi, M., Nezami, A., Zarghami, R., 2016. Effects of chilling stress on physiological and biochemical traits of three-hybrid Corn (*Zea mays* L.) in seedling stage. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 29. [In Persian with English Summary].

Tew, T., Cobill, R., 2008. Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum* spp.) as an energy crop. In: Vermerris, W. (ed,), Genetic Improvement of Bioenergy Crops. Springer, New York, NY. pp. 273–294. https://doi.org/10.1007/978-0-387-70805-8_9

Theocharis, A., Clément, C., Barka, E.A., 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. Planta. 235, 1091-1105.

Valizadeh-Kamran, R., Toorchi, M., Mogadam, M., Mohammadi, H., Pessarakli, M., 2018. Effects of freeze and cold stress on certain physiological and biochemical traits in sensitive and tolerant barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. Journal of Plant Nutrition. 41, 102-111.

Wongsheree, T., Ketsa, S., 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.

Yadav, S.K., 2010. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. Agronomy for sustainable development. 30, 515-527.

Yadeghari, L.Z., Heidari, R., 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, 74-79.

Yuanyuan, M., Yali, Z., Jiang, L., Hongbo, S., 2010. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. African Journal of Biotechnology. 8, 2004–2010.

Zhang, L., Ren, J., Li, T., Wang, A., Tan, D., 2016. De novo transcriptome sequencing of cold-treated Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis*) and analysis of the genes involved in cold tolerance. Journal of Horticulture. 31, 1-9.