Cereal Biotechnology and Biochemistry
Online ISSN: 2783-5170
Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

Changes in proline and fructan concentration in leaves of bread wheat cultivars under the occurrence of cold stress at the beginning of the reproductive growth stage

Mohammad Allahabadi[1], Reza Qoli Mirfakhrai[2] & Reza Darvishzadeh[3]

[1] MSc. student, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran.

[2] Assistant Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran.

[3] Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia.

Corresponding author. E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Wheat is the third most important grain in the world after rice and maize. Proline and fructan are especially important for cold stress tolerance. Different wheat cultivars produce different levels of fructan and proline in response to cold stress. In this regard, this research was conducted to identify cold-resistant cultivars by examining the production concentration of fructan and proline during cold stress.

Materials and methods: In the present study, the amount of osmolites; proline and fructan were investigated in 70 bread wheat genotypes. For this purpose, cultivars were cultivated in a completely random design with three replications in the greenhouse. Cultivars in the reproductive stage (Zadox code 48-60) were treated with +8 °C -2 °C temperatures. To apply temperature treatments, the temperature was gradually decreased by 2 °C every hour from 24 °C to the desired temperature, then the plants were stopped at that temperature level for 2 hours and after applying the temperature treatment, the temperature was increased to 24 °C. Then, after 24 hours, sampling was done. Proline and fructan concentrations in the leaves of 70 cultivars were measured by Carillo and Gibon (2011) and Jermyn (1956) methods, respectively.

Results: Analysis of variance showed significant differences among genotypes and temperature levels for proline and fructan content in the leaves. Also, the interaction effect of cultivar × temperature was significant in the case of both studied traits. The significance of the interaction effect shows that the reaction of genotypes is not the same from one temperature level to another. In the following, slicing of the interaction effect was done for the studied traits and based on separate mean comparison results, the highest and lowest values of the traits at each temperature level were determined. At the temperature levels of +8°C and -2°C, the highest amount of proline was observed in Golden and Gombad 2 cultivars, respectively, and the lowest amount of proline at the mentioned temperature level was observed in Tirgan and Shiroudi cultivars, respectively. At the temperature levels of +8°C and -2°C, the highest amount of fructan was observed in Azadi and Shahpasand cultivars, respectively, and the lowest amount of fructan at the same temperature level was observed in Brat and Dez cultivars, respectively. Based on the results, no regular changes were observed for the amount of fructan in the 70 cultivars studied.

Conclusion: The results of this research showed the different reactions of wheat cultivars in terms of the studied traits in each of the temperature levels. This variability can be used in the breeding programs to produce cold-resistant cultivars.

Keywords: Cool season cereals, Genetic diversity, Low temperature stress, Osmolites.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 25 Dec 2023, **Revised:** 18 Jan 2024, **Accepted:** 27 Jan 2024, **Published online:** 27 Mar 2024

Cite this article: Allahabadi, M., Qoli Mirfakhrai, R. & Darvishzadeh, R. (2024). Changes in proline and fructan concentration in leaves of bread wheat cultivars under the occurrence of cold stress at the beginning of the reproductive growth stage. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, *3*(1), 1-14. DOI: 10.22126/cbb.2024.10783.1073

© The Author(s).
10.22126/cbb.2024.10783.1073

Publisher: Razi University

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

تغییرات محتوای پرولین و فروکتان برگ‌های ارقام گندم نان در شرایط وقوع تنش سرما در ابتدای رشد زایشی

محمد اله‌آبادی[۱]، سید رضا قلی میرفخرایی[۲]✉ و رضا درویش‌زاده[۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

[۲] استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

[۳] نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه.

✉نویسنده مسئول. رایانامه: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

چکیده

مقدمه: گندم سومین غله حیاتی جهان پس از برنج و ذرت است و با توجه به نرخ رو به افزایش جمعیت جهان از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. پرولین و فروکتان در تحمل به تنش سرما اهمیت ویژه‌ای دارند. ارقام مختلف گندم در مقابله با تنش سرما سطوح مختلفی از فروکتان و پرولین را تولید می‌کنند. در همین راستا این تحقیق با هدف بررسی تنوع در محتوای فروکتان و پرولین ژنوتیپ‌های گندم تحت تنش سرما انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر مقدار سازگارسازهای پرولین و فروکتان در ۷۰ رقم گندم نان بررسی شد. بدین منظور کشت ارقام در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه انجام شد. ارقام در مرحله زایشی (کد زادوکس ۴۸ تا ۶۰) در شرایط دمایی ۸+ درجه سانتی‌گراد و دمای ۲- درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. جهت اعمال تیمار دمایی، دما از ۲۴ درجه سانتی‌گراد تا سطح دمای مورد نظر هر یک ساعت دو درجه سانتی‌گراد کاهش یافت، سپس گیاهان به مدت دو ساعت در آن سطح دمایی متوقف شده و بعد از اعمال تنش، دما به ۲۴ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد و پس از ۲۴ ساعت نمونه‌برداری از آن‌ها انجام گرفت. اندازه‌گیری غلظت پرولین و فروکتان در برگ‌های ۷۰ رقم گندم نان به ترتیب توسط روش کاریلو و گیبسون (Carillo and Gibon, 2011) و جرمین (Jermyn, 1956) انجام شد.

یافته‌ها: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین ارقام و بین سطوح مختلف دما از لحاظ میزان پرولین و فروکتان در برگ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. همچنین اثر مقابل رقم × دما بر غلظت این صفات معنی‌دار بود. معنی‌دار بودن اثر متقابل دما و رقم نشان می‌دهد رتبه‌بندی (واکنش) ژنوتیپ‌ها از سطحی به سطح دیگر دما یکسان نمی‌باشد، به عبارتی ارقام مختلف سازوکارهای مقابله متفاوتی در هر یک از سطوح تنش دمایی دارند. در ادامه برش‌دهی اثر متقابل برای این صفات انجام گرفت و بر اساس نتایج مقایسه میانگین جداگانه، بیشترین و کمترین مقدار صفات در سطوح مختلف تنش دمایی در ارقام مورد مطالعه مشخص گردید. در سطوح دمایی ۸+ درجه سانتی‌گراد و ۲- درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار پرولین به ترتیب در ارقام طلایی و گنبد ۲ و کمترین میزان پرولین در همین سطوح دمایی به‌ترتیب در ارقام تیرگان و شیرودی مشاهده شد. در سطوح دمایی ۸+ درجه سانتی‌گراد و ۲- درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار فروکتان به ترتیب در ارقام آزادی و شاهپسند و کمترین میزان فروکتان در همین سطوح دمایی به‌ترتیب در ارقام برات و دز مشاهده شد. بر اساس نتایج، روند تغییرات منظمی برای میزان فروکتان در ۷۰ رقم مورد مطالعه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتیجه این بررسی نشان می‌دهد ارقامی در این نوع از تنش مطلوب‌ترند که در سطوح پایین دمایی، پرولین و فروکتان بیشتری را حفظ می‌کنند. در این پژوهش ارقام گنبد۲ و شاهپسند توانستند به‌ترتیب میزان بالایی از پرولین و فروکتان را در سطح دمایی ۲- درجه سانتی‌گراد حفظ نمایند که می‌توان از آن‌ها به عنوان رقم متحمل به تنش سرمای دیررس بهاره نام برد. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده واکنش متفاوت ارقام گندم از لحاظ صفات مورد بررسی در هریک از سطوح دمایی می باشد. از این تنوع می‌توان در فرایند به‌نژادی تولید ارقام مقاوم به سرما استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تنش دمای پایین، تنوع ژنتیکی، سازگارسازها، غلات سردسیری.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۴ **اصلاح:** ۱۴۰۲/۱۰/۲۸ **پذیرش:** ۱۴۰۲/۱۱/۰۷، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۳/۰۱/۰۸

استناد: اله‌آبادی، م.، قلی میرفخرایی، ر. و درویش‌زاده، ر. (۱۴۰۳). تغییرات محتوای پرولین و فروکتان برگ‌های ارقام گندم نان در شرایط وقوع تنش سرما در ابتدای رشد زایشی. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۳(۱)، ۱-۱۴. DOI: 10.22126/cbb.2024.10783.1073

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) سومین غله حیاتی جهان پس از برنج و ذرت است. تقریباً ۶۰ درصد از گندم تولید شده در سطح جهان به‌عنوان غذا مصرف می‌شود و انتظار می‌رود تقاضا برای گندم در سطح جهان با افزایش جمعیت انسانی در چند دهه آینده (۲۰۵۰-۲۰۲۰) تا حدود ۷۰ درصد افزایش یابد (Abedi *et al.*, 2020). تیره گندمیان شامل ۱۵ جنس و ۳۰۰ گونه است و مبدأ آن جنوب غربی آسیا می‌باشد (Sakamura, 1918). گندم نان یک گونه آلوهگزاپلوئید مهم از خانواده Gramineae و جنس Triticum با تعداد 2n = 6x = 42 کروموزوم و مشتمل بر سه نوع ژنوم متفاوت A، B و D می‌باشد و هر ژنوم از هفت کروموزوم تشکیل شده است (Poehlman & Sleper, 1995).

گیاهان در طول چرخه زندگی خود در معرض تنش‌های غیر زیستی مختلفی مانند شوری، خشکسالی، دماهای بالا/پایین، سمیت فلزات سنگین، سیل، اشعه UV-B و اوزون قرار می‌گیرند که اثرات نامطلوبی بر رشد، بهره‌وری و کیفیت آن‌ها دارد (Gull *et al.*, 2019). پدیده سرما به آسیب ناشی از کم شدن ناگهانی دما یا تغییر شدید دما بعد از مراحل کشت اشاره دارد. در مرحله تمایز سنبله‌های جوان اگر سرمای دیررس بهاره اتفاق بیفتد، تمایز سنبله‌های جوان متوقف شده و یک پرچم و مادگی ناقص تشکیل می‌دهند و این امر باعث کاهش قابل‌توجه عملکرد گندم می‌شود. سرمازدگی معمولاً در محدوده دمایی صفر تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد و انجماد در دماهای کمتر از صفر درجه سانتی‌گراداتفاق می‌افتد (Tarkowski *et al.*, 2015). وقتی گیاه با تنش روبرو شود، تغییرات فیزیولوژیک، مورفولوژیک و بیوشیمیایی زیادی جهت سازگار شدن با تنش در آن اتفاق می‌افتد (Karimzadeh *et al.*, 2005). در طول مرحله سازگاری با سرما، گندم زمستانه با کمک کربوهیدرات‌هایی مانند ساکارز، گلوکز و فروکتوز نقطه انجماد سلول را کاهش داده و امکان زنده ماندن گیاه را در دمای انجماد بالا می‌برد. این ذخایر کربوهیدراتی در حالی که فتوسنتز به دلیل دمای سرد و کمبود نور کاهش می‌یابد، انرژی را برای گیاه فراهم می‌کنند. فروکتان‌ها پلیمرهای فروکتوز با درجات مختلف پلیمریزاسیون هستند. فروکتان‌ها در واکوئل قرار دارند و نشان داده شده است که سهم آن‌ها در تثبیت غشاء ممکن است به تونوپلاست محدود شود (Tarkowski *et al.*, 2015). تصور می‌شود که فروکتان‌های موجود در واکوئل‌ها فشار اسمزی سلول‌ها را تنظیم کنند (Yoshida, 2021). پرولین اسیدآمینه‌ای بسیار آب‌دوست است و می‌تواند کلوئیدهای پروتوپلاست و فرآیندهای متابولیک گیاهان در بافت‌ها را تثبیت کند. محتوای پرولین تا حدی نشان‌دهنده مقاومت به سرما است (Zheng *et al.*, 2020). بیوسنتز پرولین در کلروپلاست و سیتوپلاسم اتفاق می‌افتد و تخریب پرولین در میتوکندری انجام می‌شود. نقش پرولین در متابولیسم‌های گیاهی، به‌ویژه پاسخ‌های دفاع به چندین نوع از تنش‌های زیستی و غیر زیستی به روشنی محرز شده است. پرولین نه‌تنها به‌عنوان یک آنزیم

غیرآنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند، ممکن است با فلزات سنگین کمپلکس تشکیل دهد یا می‌تواند یک سیگنال مولکولی به راه بیندازد (Liang *et al.*, 2013). انباشت پرولین را می‌توان به‌عنوان پیامد تنش در نظر گرفت و میزان آن به درجه و مدت تنش و همچنین مرحله رشد و نموی گیاهان بستگی دارد (Kumar *et al.*, 2009; Ben Rejeb *et al.*, 2015). پرولین همچنین در متابولیسم اولیه به شکل اسیدهای آمینه آزاد و به‌عنوان بخشی از پروتئین نقش اساسی دارد. پرولین بدون آسیب رساندن به سلول در سیتوزول تجمع می‌یابد. پرولین می‌تواند ثبات پروتئین را با اتصال به پیوندهای هیدروژنی بهبود بخشد و از یکپارچگی غشاها محافظت نماید. پرولین ممکن است با افزایش پتانسیل جذب آب و تسهیل فعال‌سازی آنزیم‌ها از سلول‌ها محافظت کند. با وجود این که به‌عنوان یک اسمولیت عمل می‌کند، پرولین همچنین به‌عنوان یک مولکول دفاعی آنتی‌اکسیدانی قوی، در نظر گرفته می‌شود. پرولین یک تثبیت کننده پروتئین، یک روبنده گونه‌های فعال اکسیژن و یک مهارکننده مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده نیز است (Hosseinifard *et al.*, 2022). در پژوهشی مشابه میزان پرولین و فروکتان در تعداد ارقام گندم کمتر ولی در سطوح تنش سرمای بیشتری مورد بررسی قرار گرفت (Nadi *et al.*, 2019). در این تحقیق بالاترین میزان پرولین در تنش ۲- °C متعلق در رقم مغان ۲ و کمترین مقدار آن در رقم گلستان مشاهده شد. در رابطه با قند فروکتان بالاترین مقدار در تنش شدید ۲- درجه سانتی‌گراد در رقم اوحدی و کمترین مقدار آن در رقم دز مشاهده شد (Nadi *et al.*, 2019). محققین مشاهده کردند که یک روند تغییرات منظم برای میزان فروکتان در ارقام بررسی شده مشاهده نمی‌شود و هر رقم واکنش و روند تغییرات خاصی را ارایه می‌نماید. با توجه به دستاوردهای تحقیق ساسانی و همکاران (Sasani *et al.*, 2013)استنباط می‌شود که صفات نموی از قبیل طول دوره بهاره‌سازی و انتقال از مرحله رویشی به زایشی، از طریق تأثیر بر طول دوره رویش، مدت زمان تحمل انجماد و انباشت اسمولیت‌ها و متابولیت‌های محافظ در برابر سرما را تحت تأثیر قرار داده و زمینه افزایش تحمل در برابر انجماد در گیاه را فراهم می‌آورند.

با توجه به نقش ارزنده دو ترکیب پرولین و فروکتان در تحمل تنش سرما، در این مطالعه مقدار این سازگارسازها در ارقام مختلف گندم نان تحت شرایط دمایی مختلف بررسی گردید. نتایج این تحقیق می‌تواند برای به‌نژادگران در زمینه تولید ارقام مقاوم به سرما مفید باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ۷۰ رقم گندم نان بودند که از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند. ابتدا بذور هر رقم به مدت پنج دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم (NaClO) پنج درصد ضدعفونی شدند. سپس دو تا سه بار بذور در آب استریل شست‌وشو داده شده و بعد به روی کاغذهای صافی اتوکلاو شده، داخل پتری‌دیش‌ها منتقل شدند. بذور به مدت چهار روز در دستگاه جوانه‌زنی با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد در تاریکی قرار گرفتند. بعد از این که طول ساقه‌های گندم

به اندازه دو سانتی‌متر رسیدند، پتری‌دیش‌های ارقام پاییزه به مدت شش هفته در دمای یک تا سه درجه سانتی‌گراد جهت بهاره‌سازی در یخچال قرار گرفتند (Mafoozi & Ssani, 2008). سپس گلدان‌ها از خاک مزرعه، کود دامی و خاک برگ با نسبت ۱:۱:۱ پُر شدند. گلدان‌ها به ابعاد قطر دهانه ۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر انتخاب شدند. تعداد پنج گیاهچه از هر رقم به هر گلدان انتقال یافت. گیاهچه‌ها در عمق سه سانتی‌متر کشت شدند. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد شب و با طول روز ۱۶ ساعت و شب هشت ساعت تا مرحله رشد زایشی در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند. زمانی که بوته‌های گندم به اوایل ظهور سنبله (کد زادوکس ۵۰) رسیدند (Zadoks et al., 1974)، شش گلدان هر رقم به دو قسمت تقسیم شد. تعداد سه گلدان از هر رقم معادل سه تکرار به دمای ۸+ درجه سانتی‌گراد و تعداد سه گلدان دیگر به دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در اتاقک سرما منتقل شدند. جهت اعمال تیمار دمایی، دما از ۲۴ درجه سانتی‌گراد تا سطح دمای مورد نظر هر یک ساعت دو درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. سپس گیاهان به مدت دو ساعت در آن سطح دمایی متوقف شده و بعد از اعمال تنش، دما به ۲۴ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد و پس از ۲۴ ساعت نمونه‌برداری از آن‌ها انجام گرفت (Jahanbakhsh *et al.*, 2009). نمونه‌های برگی هر تیمار بعد از انتقال به فلاسک ازت مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) به آزمایشگاه منتقل شده و در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیولوژیک نگه‌داری شدند. سپس میزان اسید آمینه پرولین و قند فروکتان در نمونه‌های برگی مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت.

جهت اندازه‌گیری پرولین از روش (Carillo & Gibon, 2011) استفاده شد. ابتدا برای تهیه عصاره گیاهی ۵۰ میلی‌گرم برگ پرچم پودر شده به کمک ازت مایع درون میکروتیوب دو میلی‌لیتر قرار داده شد و یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد و ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، روشناور به میکروتیوب جدید منتقل شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با ۲۰۰ میکرولیتر محلول واکنش به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و ۱۵۰ µl از آن به میکروپلیت منتقل شد و جذب نور با دستگاه نانودراپ BioTek مدل Epoch در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. برای تهیه ۴۰ میلی‌لیتر از محلول واکنش ابتدا ۲۴ ml اسید استیک سرد و ۸/۳۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۸ درصد به ۰/۴ گرم نایِن‌هیدرین اضافه و به حجم رسانده شد. محلول به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگه‌داری شد. برای تهیه استانداردهای پرولین، با استفاده از پرولین جامد و بر اساس وزن مولکولی آن، ۰/۰۱۱ گرم پرولین خالص در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حل شده و سپس یک محلول با غلظت ۱۰۰۰ بخش در میلیون (ppm) به‌عنوان محلول مادر تهیه شد. از این

محلول غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ بخش در میلیون (ppm) پرولین خالص تهیه گردید، سپس ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰،۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر از استانداردها برداشته شده و با اتانول ۷۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. جذب نوری استانداردهای تهیه‌شده پرولین از غلظت کم به زیاد در دستگاه قرائت شد. با استفاده از اعداد مربوط به مقدار غلظت‌های مختلف استاندارد و اعداد جذب آن‌ها، معادله رگرسیونی خطی به دست آمد و با قرار دادن اعداد مقدار جذب نمونه‌های مجهول، مقدار پرولین برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر ($\mu g\ ml^{-1}$) تعیین گردید.

سپس اعداد به دست آمده جهت تعیین مقدار کمی پرولین در فرمول زیر قرار داده شد.

$$(\mu mol\ g^{-1}\ FW) = (A520–Blank)/Slope*Volextract/Volaliquot*1/FW$$ رابطه (۱)

در این رابطه، $\mu mol.mg^{-1}FW$: میکرومول پرولین در میلی‌گرم برگ، Slope: شیب (به صورت جذب بر میکرومول (μmol^{-1}) بیان می‌شود) که با رگرسیون خطی تعیین می‌شود، Volextract: حجم کل عصاره، Volaliquot: حجم مورد استفاده در سنجش و FW (بیان شده بر حسب میلی‌گرم) مقدار مواد گیاهی استخراج شده می‌باشد.

برای سنجش فروکتان از نمونه‌های برگی که در فریزر در دمای $-80^{\circ}C$ نگه‌داری می‌شدند، مقدار ۰/۲ گرم برای هر نمونه برداشته شده و با ۳ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار سائیده شد. سپس محلول حاصل درون فالکون ۱۵ میلی‌لیتر انتقال داده شد و در دستگاه سانتریفیوژ (مدل Eppendorf 5810R)، ۳۸۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از محلول به دست آمده به ۲/۵ میلی‌لیتر معرف آنترون (آنترون ۰/۰۲ درصد که در اسیدسولفوریک ۷۰ درصد مخلوط می‌گردد) اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه در بن‌ماری با دمای $100^{\circ}C$ به‌مدت ۷/۵ دقیقه قرار داده شد. بعد از سرد شدن نمونه‌ها، جذب آن‌ها در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر (nm) قرائت گردید. برای سنجش فروکتان از استاندارد اینولین با غلظت‌های ۰-۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (Jermyn, 1956).

برای تهیه بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار دو محلول A و B به شرح زیر تهیه شدند: محلول A: ۲/۴ گرم از $NaH_2PO_4.H_2O$ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد (محلول ۰/۲ مولار). محلول B: ۲/۸ گرم از $Na_2HPO_4.7H_2O$ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد (محلول ۰/۲ مولار). حجم‌های ۴۹ میلی‌لیتر از محلول A و ۵۱ میلی‌لیتر از محلول B باهم ترکیب شدند. این بافر یک مولار با pH=۶/۸ می‌باشد که از آن بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار تهیه شد (بافر استوک در یخچال نگه‌داری می‌شود).

برای بررسی همگنی واریانس‌ها از آزمون بارتلت و نرمال بودن توزیع خطاهای آزمایشی از آزمون شاپیرو- ویلک

(Shapiro-Wilk) استفاده شد. تجزیه واریانس صفات فنوتیپی، مقایسه میانگین داده‌ها (آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد) با استفاده از نرم‌افزار SPSS V.26 انجام گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس برای پرولین نشان داد که بین ارقام و بین سطوح مختلف دما در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۱). همچنین اثر مقابل رقم × دما معنی‌دار بود. معنی‌دار بودن اثر متقابل دما و رقم نشان می‌دهد رتبه‌بندی (واکنش) ژنوتیپ‌ها از سطحی به سطح دیگر دما یکسان نمی‌باشد. به عبارتی ارقام مختلف سازوکارهای مقابله متفاوتی در هر یک از سطوح تنش دمایی دارند (جدول ۲). در ادامه برش‌دهی اثر متقابل برای این صفت انجام گرفت و بر اساس نتایج مقایسه میانگین جداگانه، بیشترین و کمترین غلظت پرولین در سطوح مختلف تنش دمایی در ارقام مورد مطالعه مشخص گردید (جدول ۲). در سطوح دمایی ۸+ درجه سانتی‌گراد و ۲- درجه سانتی‌گراد بیشترین غلظت پرولین به ترتیب مربوط به ارقام طلایی و گنبد ۲ و کمترین غلظت پرولین در همین سطوح دمایی به‌ترتیب مربوط به رقم تیرگان و شیرودی می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج، رقم شیرودی در برنامه‌های تولید برای مناطقی که وقوع سرمای بهاره مورد انتظار است توصیه نمی‌شود.

جدول ۱- تجزیه واریانس غلظت پرولین برگ‌ها در ارقام گندم نان تحت تاثیر سطوح مختلف دما

Table 1. Analysis of variance for proline concentration in leaves of bread wheat cultivars under different temperature levels

میانگین مربعات Mean squares	درجه آزادی df	منابع تغییرات Sources of variations
17.68**	69	ژنوتیپ Genotype
138.63**	1	دما Temperature
15.26**	69	ژنوتیپ × دما Genotype ×Temperature
0.38	280	خطا Error
9.56		ضریب تغییرات (%) Coefficient of Variation(%)

**: معنی دار در سطح احتمال ۱٪

**: Significance at the 1% probability level

جدول ۲- مقایسه میانگین ارقام گندم برای صفت پرولین برگ‌ها در هر یک از سطوح دمایی ($\mu g\ ml^{-1}$)

Table 2. Mean Comparison of leaves of wheat cultivars for the proline trait in each of the temperature levels ($\mu g\ ml^{-1}$)

رقم Cultivar	۸+ درجه سانتی‌گراد	۲- درجه سانتی‌گراد	رقم Cultivar	۸+ درجه سانتی‌گراد	۲- درجه سانتی‌گراد
افلاک (Aflak)	4.444	8.615	مرودشت (Marvdasht)	3.943	4.113
الموت (Almot)	8.775	6.411	مهرگان (Mehrgan)	6.913	4.293
الوند (Alvand)	6.809	5.522	معراج (Meraj)	6.459	4.823
ارگ (Arg)	3.783	5.664	میهن (Mihan)	10.090	8.312
ارتا (Arta)	8.520	6.723	مغان۲ (Moghan 2)	5.201	5.853
اترک (Atrak)	8.879	6.742	مروارید (Morvarid)	9.872	4.870
آزادی (Azadi)	3.858	12.908	نارین (Narin)	4.463	8.378
آذر۲ (Azar 2)	8.615	5.560	نیشابور (Neishabour)	5.655	4.199
بهار (Bahar)	5.976	6.534	نیکنژاد (Niknejad)	2.865	5.532
بهاران (Baharan)	9.702	7.461	افق (Ofogh)	6.563	6.988
بم (Bam)	5.040	6.619	اوحدی (Ohadi)	8.463	4.993
برات (Barat)	3.556	4.435	امید (Omid)	4.861	5.286
برزگر (Barzegar)	4.908	8.690	پارسی (Parsi)	2.298	7.385
بیات (Bayat)	3.064	10.033	پیشتاز (Pishtaz)	6.402	4.567
روشن (Roshan)	5.040	5.702	رخشان (Rakhshan)	5.797	5.626
بزوستایا (Bezostaya)	3.678	10.506	رصد (Rasad)	3.631	5.163
کاسکوژن (Cascogene)	8.359	9.901	رسول (Rasoul)	9.390	4.813
چمران (Chamran)	6.648	4.359	سبلان (Sabalan)	4.236	5.258
چمران۲ (Chamran 2)	7.612	6.440	سیوند (Sivand)	6.317	5.797
دریا (Darya)	9.267	5.740	سارنگ (Sarang)	2.913	5.617
دز (Dez)	5.021	7.811	ستاره (Setareh)	3.726	5.608
احسان (Ehsan)	4.312	8.586	شاهپسند (Shahpasand)	4.539	5.485
گاسپارد (Gaspard)	3.253	11.433	شهریار (Shahryar)	10.288	8.435
قدس (Ghods)	2.544	7.792	شاوور (Shavoor)	3.603	8.586
گلستان (Golestan)	8.492	10.969	شیرودی (Shiroudi)	4.076	3.962
گنبد (Gonbad)	6.534	8.359	شوش (Shoosh)	7.130	9.693
گنبد۲ (Gonbad 2)	8.397	13.248	سایسون (Saison)	8.775	13.002
حیدری (Heydari)	4.331	8.624	سیروان (Sirvan)	4.113	8.000
کلاته (Kalate)	7.470	10.118	سپاهان (Sepahan)	7.262	8.965
کرج۱ (Karaj 1)	9.428	9.797	طلایی (Talaeai)	10.960	4.426
کرج۲ (Karaj 2)	3.404	7.461	تیرگان (Tirgan)	1.494	5.409
کرج۳ (Karaj 3)	5.466	4.388	ترابی (Torabi)	3.234	7.641
کویر (Kavir)	5.324	11.470	زلرع (Zare)	6.449	5.078
خلیل (Khalil)	5.400	5.069	زرین (Zarin)	4.898	5.674
مهدوی (Mahdavi)	3.376	4.208	زرینه (Zarineh)	7.697	8.567
حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD, 0.05)	1.05	0.94		1.05	0.94

اعمال تیمار سرما در گندم منجر به بروز واکنش‌های فیزیولوژیک از جمله افزایش غلظت قندهای محلول، اسیدهای‌آمینه و پروتئین‌های محلول می‌شود. این مواد محلول در ایجاد مقاومت به سرما در گیاه نقش کلیدی ایفا می‌کنند (MohsenZadeh *et al.*, 2010). افزایش غلظت پرولین از سازوکارهای دفاعی گیاه در مواجه با تنش‌های اسمزی مانند خشکی، شوری و سرما است. در بیان علل تغییرات غلظت پرولین با اعمال تنش سرما می‌توان بیان کرد که پرولین علاوه بر نقش اسمزی، به‌عنوان یک محافظت‌کننده در برابر تنش عمل می‌کند. به این‌ترتیب که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با ماکرومولکول‌ها اثر متقابل داشته و به حفظ شکل و ساختار طبیعی آن‌ها تحت شرایط تنش کمک می‌کند (Zeinali Yadegari *et al.*, 2010). پرولین در مقایسه با سایر اسمولیت‌های سازگارکننده به‌ویژه قندهای معمولی و قندهای محلول در الکل، از کارآیی بالاتری جهت حفاظت در برابر تنش برخوردار است. این ماده با اثر مستقیم در ثبات بخشیدن به ماکرومولکول‌ها و لایه‌های هیدراسیونی آن‌ها، به‌علت خواص آنتی‌اکسیدانی خود، اثر حفاظتی نیز نشان می‌دهد (Lui *et al.*, 2013). نقش آنتی‌اکسیدانی پرولین در توانایی آن برای غیرفعال‌کردن رادیکال‌های هیدروکسیل و سایر ترکیبات دارای فعالیت بالا که تحت شرایط تنش تولید می شود و سبب اختلال در انتقال الکترون در کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها می‌گردد، شناخته شده است و از این طریق پروتئین‌ها و غشاها را در برابر آسیب محافظت می‌نماید (Yuanyuan *et al.*, 2009; Azimi *et al.*, 2012). در فیزیولوژی تنش‌های گیاهی، عموماً پرولین به عنوان یک سازگارساز جهت حفظ تعادل اسمزی سلول مطرح است (Valliyodan & Nguyen, 2006). تجمع پرولین در سلول باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، حفاظت آنزیم‌ها از تجزیه شدن، تنظیم فشار اسمزی سلول و حفظ حالت طبیعی غشاء می‌شود (Lui *et al.*, 2013). در نهایت می‌توان به این نتیجه رسید که گیاهان با تجمع پرولین، حجم آسیب‌های سرمازدگی را کاهش می‌دهند، اما همه آن‌ها به ترتیبی که در نتایج این آزمایش نیز مشاهده شد این توانایی را ندارند.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های فروکتان نشان می‌دهد که بین ارقام و سطوح تنش سرما اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. همچنین اثر متقابل رقم × تنش سرما نیز معنی‌دار بود (جدول ۳).

گیاهان با افزایش غلظت قندهای محلول به نوعی خود را در برابر سرما محافظت می‌کنند. به‌طور کلی قندها در کاهش دمای انجماد آب سلولی، تأمین انرژی قابل‌دسترس و محافظت از ساختمان و نحوه عمل پروتئین‌ها تحت تنش سرما نقش عمده‌ای دارند (Atici *et al.*, 2003). قندها همچنین باعث کاهش پسابیدگی سلول‌ها در مقابل تشکیل یخ‌های بین‌سلولی می‌گردند. به‌طور کلی افزایش میزان قند برگ و طوقه را می‌توان به‌عنوان یک شاخص فیزیولوژیک مناسب برای تحمل به سرما در نظر گرفت (Kerepesi *et al.*, 2004).

جدول ۳- تجزیه واریانس غلظت فروکتان برگ‌های ارقام گندم نان تحت تنش سرما

Table 3. Analysis of variance of Fructan concentration in leaves of bread wheat cultivars under cold stress

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares
ژنوتیپ Genotype	69	0.27**
دما Temperature	1	0.81**
ژنوتیپ × دما Genotype ×Temperature	69	0.13**
خطا Error	280	0.001
ضریب تغییرات (%) Coefficient of (%) Variation		5.37

**: معنی دار در سطح احتمال

**: Significance at the 1% probability level

با توجه به اثر متقابل معنی‌دار بین ارقام مورد مطالعه و سطوح مختلف تنش دمایی مشخص شد که ارقام مختلف سازوکارهای مقابله متفاوتی در مقابل هر سطح تنش دمایی دارند. بیشترین و کمترین غلظت فروکتان در سطوح مختلف تنش دمایی در جدول ۴ ارائه شده است. با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها، رقم آزادی با تیپ بهاره در سطح دمایی ۸+ درجه سانتی‌گراد از تمام ارقام پاییزه غلظت فروکتان بالاتری نشان داد و رقم شاه‌پسند هم با تیپ پاییزه در سطح تنش ۲- درجه سانتی‌گراد بیشترین غلظت فروکتان در برگ‌ها را به خود اختصاص داد. کمترین غلظت فروکتان در همین دو سطح دما؛ ۸+ درجه سانتی‌گراد و ۲- درجه سانتی‌گراد ، به ترتیب مربوط به ارقام بهاره‌ی برات و دز بود. یکی از دلایل اساسی در کاهش فروکتان در دمای ۲- درجه سانتی‌گراد در گیاهان، ممکن است به‌دلیل دپلیمریزه‌شدن فروکتان به قندهای ساده در برگ‌ها باشد که این فرآیند، انرژی مورد نیاز را در اختیار گیاه قرار می‌دهد (Dionne *et al.*, 2001).

جدول ۴- مقایسه میانگین ارقام گندم برای غلظت فروکتان برگ‌ها در هر یک از سطوح تنش دمایی ($\mu g\ ml^{-1}$)

Table 4. Average comparison of wheat cultivars for leaves fructan concentration in each of the temperature stress levels ($\mu g\ ml^{-1}$).

رقم Cultivar	۸+ درجه سانتی‌گراد	۲- درجه سانتی‌گراد	رقم Cultivar	۸+ درجه سانتی‌گراد	۲- درجه سانتی‌گراد
افلاک (Aflak)	0.831	0.940	مرودشت (Marvdasht)	0.756	0.576
الموت (Almot)	0.705	1.305	مهرگان (Mehrgan)	0.49	0.439
الوند (Alvand)	0.657	1.139	معراج (Meraj)	0.646	0.455
ارگ (Arg)	0.611	0.94	میهن (Mihan)	0.472	1.102
ارتا (Arta)	0.970	1.093	مغان۲ (Moghan 2)	0.563	1.094
اترک (Atrak)	0.693	0.787	مروارید (Morvarid)	1.398	0.437
آزادی (Azadi)	1.513	1.257	نارین (Narin)	0.874	0.579
آذر۲ (Azar 2)	0.938	1.119	نیشابور (Neishabour)	0.675	0.521
بهار (Bahar)	0.716	0.519	نیکنژاد (Niknejad)	0.49	0.92
بهاران (Baharan)	0.600	0.544	افق (Ofogh)	0.431	0.656
بم (Bam)	0.751	0.688	اوحدی (Ohadi)	0.887	0.619
برات (Barat)	0.355	0.750	امید (Omid)	0.664	0.517
برزگر (Barzegar)	0.77	1.074	پارسی (Parsi)	0.533	0.808
بیات (Bayat)	0.552	0.827	پیشتاز (Pishtaz)	0.765	0.990
روشن (Roshan)	0.635	0.486	رخشان (Rakhshan)	0.409	0.574
بزوستایا (Bezostaya)	0.807	0.820	رصد (Rasad)	0.470	0.773
کاسکوژن (Cascogene)	0.925	1.102	رسول (Rasoul)	0.440	0.722
چمران (Chamran)	0.849	1.192	سبلان (Sabalan)	0.568	0.680
چمران۲ (Chamran 2)	0.982	1.247	سیوند (Sivand)	0.841	0.717
دریا (Darya)	1.165	1.323	سارنگ (Sarang)	0.740	1.183
دز (Dez)	0.582	0.344	ستاره (Setareh)	0.658	0.565
احسان (Ehsan)	1.290	1.471	شاهپسند (Shahpasand)	0.568	1.474
گاسپارد (Gaspard)	0.862	0.804	شهریار (Shahryar)	0.771	0.858
قدس (Ghods)	0.853	0.953	شاوور (Shavoor)	0.619	0.521
گلستان (Golestan)	0.467	0.371	شیرودی (Shiroudi)	0.864	1.093
گنبد (Gonbad)	0.849	1.253	شوش (Shoosh)	0.725	0.490
گنبد۲ (Gonbad 2)	0.746	0.797	سایسون (Saison)	0.853	0.934
حیدری (Heydari)	0.555	0.433	سیروان (Sirvan)	0.581	0.638
کلاته (Kalate)	0.868	1.085	سپاهان (Sepahan)	0.761	1.051
کرج۱ (Karaj 1)	0.567	1.229	طلایی (Talaeai)	0.880	0.768
کرج۲ (Karaj 2)	0.653	0.571	تیرگان (Tirgan)	0.636	0.704
کرج۳ (Karaj 3)	1.175	0.541	ترابی (Torabi)	0.985	1.124
کویر (Kavir)	0.712	0.493	زارع (Zare)	0.867	0.942
خلیل (Khalil)	0.398	0.718	زرین (Zarin)	0.387	0.429
مهدوی (Mahdavi)	0.827	0.832	زرینه (Zarineh)	0.857	0.738
حداقل اختلاف (LSD, 0.05) معنی‌دار	0.06	0.07		0.06	0.07

خطر آسیب‌های سرمازدگی بهاره، زمانی که گندم در اوایل بهار شروع به رشد می‌کند، خیلی بیشتر است. سرمای بهاره پتانسیل کاهش عملکرد بالایی دارد (Asadi *et al.*, 2018). پرولین در محافظت از غشاهای تیلاکوئیدی کلروپلاست در برابر رادیکال‌های آزاد ناشی از آسیب‌های نوری نیز نقش دارد (Ashraf & Foolad, 2007). فروکتان منبع انرژی در گیاهان زمستان‌گذران است؛ زیرا در شرایط سرمایی دیپلیمریزه می‌شوند و انرژی مورد نیاز را در اختیار گیاه قرار می‌دهند، همچنین می‌تواند به عنوان وسیله‌ای برای جلوگیری از پلاسمولیز سلولی باشد (Yuanyuan *et al.*, 2009). نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که میزان تجمع فروکتان در ارقام، رابطه مستقیم و منظمی با کاهش دما نشان نمی‌دهند و توانایی تولید فروکتان آنها در سطوح مختلف تنش سرما کاملاً متفاوت و بستگی به نوع رقم از یکسو و از سوی دیگر به مدت و شدت تنش دارد. روند تغییرات مقادیر فروکتان در بین ۷۰ ژنوتیپ در سطوح دمایی ۸+ درجه سانتی‌گراد تا ۲- درجه سانتی‌گراد نشان داد که تقریباً عکس‌العمل عموم ارقام، افزایش میزان این فرآورده فیزیولوژیک می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که با کاهش ناگهانی دما، گیاه وارد شرایط جدیدی می‌شود و به دنبال برطرف کردن نیاز خود، واکنش ژنوتیپ‌ها تغییر می‌نماید.

نتیجه‌گیری

کربوهیدرات‌ها رابطه مستقیمی با فرآیندهای فیزیولوژیک مانند فتوسنتز، انتقال و تنفس دارند و تجمع آنها یکی از مهم‌ترین مشخصات گیاهان در شرایط تنش می‌باشد به طوری که با بالا بردن غلظت درون‌سلولی، مانع از یخزدن سلول‌ها در اثر سرما می‌شوند. با افزایش غلظت قندهای ساده و به تبع آن افزایش فشار اسمزی داخل سلول، از یخزدگی سلول جلوگیری می‌گردد. نتیجه این بررسی نشان می‌دهد ارقام مورد مطالعه در سطوح پایین دمایی ۸+ درجه سانتی‌گراد تا ۲- درجه سانتی‌گراد، تنوع قابل ملاحظه‌ای برای میزان پرولین و فروکتان نشان می‌دهند. در این پژوهش در ارقام گنبد ۲ و شاه‌پسند در سطح دمایی ۲- درجه سانتی‌گراد به ترتیب میزان بالایی از پرولین و فروکتان مشاهده شد که می‌توان از آن‌ها به عنوان رقم متحمل به تنش سرمای دیررس بهاره نام برد و از این تنوع می‌توان در پروسه به‌نژادی تولید ارقام مقاوم به سرما استفاده نمود

References

Abedi, T. & Mojiri, A. 2020. Cadmium uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.): An overview. Plants, 9(4), 500-514. doi: 10.3390/plants9040500.

Asadi, A., Askary Kelestani, A. R., Mirfakhraii, R., Abasi, A., & Khodadadi, M. 2018. Genetic variation of bread wheat geneotypes for some important physiological traits under chiling stress. Environmental Stresses in Crop Sciences, 11(1), 171-183. [In Persian] doi.org/10.22077/escs.2017.195.1049

Ashraf, M., Foolad, M., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 59, 206-216. doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006

Atici, O. & Nalbantoglu, B. 2003. Antifreeze proteins in higher plants. Phytochemistry, 64(7), 1187-1196. doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00420-5

Azimi, S., Sofalian, O., Jahanbakhsh G. S. & Khomari, S. 2012. Effect of chilling stress on Soluble Protein, sugar and Prolin accumulation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genotypes. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 4(12), 825-830

Ben Rejeb, K., Lefebvre-De Vos, D., Le Disquet, I., Leprince, A. S., Bordenave, M., Maldiney, R., Jdey, A., Abdelly, C., & Savouré, A. 2015. Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in Arabidopsis thaliana. New Phytologist, 208(4), 1138-1148. doi: 10.1111/nph.13550

Carillo, P. & Gibon, Y. 2011. Protocol: Extraction and determination of proline. PrometheusWiki, 1-5.

Dionne, J., Castonguay, Y., Nadeau, P. & Desjardins, Y. 2001. Freezing tolerance and carbohydrate changes during cold acclimation of green-type annual bluegrass (*Poa annua* L.) ecotypes. Crop Science, 41(2), 443-451. doi.org/10.2135/cropsci2001.412443x

Gull, A., Ahmad Lone, A. and Ul Islam Wani N. 2019. Biotic and Abiotic Stresses in Plants [Internet]. Abiotic and Biotic Stress in Plants. IntechOpen. Available from: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85832.

Hosseinifard, M., Stefaniak, S., Ghorbani Javid, M., Soltani, E., Wojtyla, Ł., & Garnczarska, M. 2022. Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: A review. International Journal of Molecular Sciences, 23(9), 5186. doi.org/10.3390/ijms23095186

Jahanbakhsh, S., Karimzadeh, Qasim, Rostgar Jezi, F., Mahfovi, Siros, and Hosseini Salekdeh, S.G. 2009. The effect of localization on some physiological characteristics and cold tolerance in two sensitive and tolerant varieties of bread wheat. Electronic Journal of Crop Production, 2(3), 85-106. [In Persian]

Jermyn, M. A., 1956. A new method for determining ketohexoses in the presence of aldo-hexoses. Nature, 177(4497), 38-39. doi.org/10.1038/177038a0

Karimzadeh, G., Darvishzadeh R., Jalali-Javaran, M. & Dehghani, H. 2005. Cold-induced accumulation of protein in the leaves of spring and winter barley cultivars. Acta Biologica Hungarica, 56 (1-2), 83-96. doi.org/10.1556/abiol.56.2005.1-2.9

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(1), 131-133. doi.org/10.1078/0176-1617-00766

Kumar, V., & Yadav, S. K. 2009. Proline and betaine provide protection to antioxidant and methylglyoxal detoxification systems during cold stress in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Acta Physiologiae Plantarum, 31, 261-269. doi.org/10.1007/s11738-008-0227-6

Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. 2013. Proline mechanisms of stress survival. Antioxidants & Redox signaling, 19(9), 998-1011. doi: 10.1089/ars.2012.5074

Lui, W., Yu, K., He, T., Li, F., Zhang, D. and Liu, J. 2013. The low temperature induced physiological responses of *Avena nuda* L., a cold-tolerant plant species. The Scientific World Journal, 1-7. doi: 10.1155/2013/658793

Mafoozi, S., & Sasani, S. 2008. Vernalization requirement of some wheat and barley genotypes and its relationship with expression of cold tolerance under field and controlled

conditions. Iranian Journal of Field Crop Science, 39(1), 114-126. [In Persian] 20.1001.1.20084811.1387.39.1.11.6

MohsenZadeh, S., Karimi Andeani, J. & Mohabat Kar, H. 2010. Physiological responses and partial gene isolation of responsive gene to cold stress in four sensitive vs. resistant wheat cultivars. Iranian Journal of Field Crop Science, 14(3), 611-619. [In Persian] 20.1001.1.20084811.1389.41.3.18.1

Nadi, S., Mirfakhraii, R., & Abbasi, A. 2019. Genetic diversity of bread wheat cultivars using ssr marker and relationship analysis for two traits prolin and fructan under spring chilling stress. Iranian Journal of Field Crop Science, 49(4), 87-96. [In Persian] 10.22059/ijfcs.2017.231050.654304

Poehlman, J. M., & Sleper, D. A. 1995. Breeding Field Crops. Ames: Iowa State University Press.

Sakamura, T. 1918. Kurze Mitteilung ueber die Chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhältnisse der Triticum-arten. Shokubutsugaku Zasshi, 32(379), 150-153. doi.org/10.15281/jplantres1887.32.379_150

Sasani, S., Tavakol Afshari, R., & Mahfoozi, S. 2013. Low-temperature acclimation and the correlation of vernalization requirement with accumulation of some compatible solutes and physiological mechanisms in bread wheat. Iranian Journal of Field Crop Science, 44(2), 327-345. [In Persian] 10.22059/ijfcs.2013.35121

Tarkowski, Ł. P., & Van den Ende, W. 2015. Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. Frontiers in Plant Science, 6, 203. doi.org/10.3389/fpls.2015.00203

Valliyodan, B. & Nguyen H. T. 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. Current Opinion in Plant Biology, 9, 189-95. doi: 10.1016/j.pbi.2006.01.019

Yoshida, M. 2021. Fructan structure and metabolism in overwintering plants. Plants, 10(5), 933. doi: 10.3390/plants10050933

Yuanyuan, M., Yali, Z., Jiang, L. U. & Hongbo, S. H. 2009. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress (Review). African Journal of Biotechnology, 8 (10), 2004-2010.

Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research, 14(6), 415-421. doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x

Zeinali Yadegari, L., Heidari, R., & Karapetian, J. 2010. The effect of cold pretreatment on respiration rates and the contents of proline and photosynthetic pigments in soybean seedlings (*Glicine max* cv. l17). Iranian Journal of Biology, 23(3), 409-417. [In Persian]

Zheng, J., Liu, T., Zheng, Q., Li, J., Qian, Y., Li, J., & Zhan, Q. 2020. Identification of cold tolerance and analysis of genetic diversity for major wheat varieties in Jianghuai region of China. Pakistan Journal of Botany, 52(3), 839-849. doi:10.30848/PJB2020-3(23)