نشریه زراعت دیم ایران دوره ۱۲، شماره ۲، زمستان ۱۴۰۲

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IDAJ.2023.363265.415

ارزیابی کارایی بیوشیمیایی و فتوسنتزی ژنوتیپ‌های نخود دیم تحت تنش سرما

رامین لطفی[1*]، حمید حسنیان خوشرو[1]، حسین خوشوقتی[2]

۱- موسسه تحقیقات کشاورزی دیم، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران.

۲- گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

چکیده مبسوط

مقدمه: تغییر سیستم کاشت نخود از بهار به پائیز، به دلیل افزایش طول دوره رشد، بهره‌وری مناسب از بارندگی‌های اواخر زمستان و اوایل بهار، همزمانی دوره گلدهی و غلاف‌بندی با رطوبت مناسب خاک و نهایتاً گریز از خشکی انتهای فصل، با افزایش عملکرد در اقلیم‌های مدیترانه‌ای همراه است. خویشاوندان وحشی منابع مفیدی از تنوع ژنتیکی و ژن‌های مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده هستند و هرچه پایهٔ تنوع گسترده‌تر باشد، احتمال این که به‌نژادگر بتواند ترکیب ژنتیکی مورد نظر خود را بیابد بیشتر خواهد بود.

روش شناسی: آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو تکرار به منظور ارزیابی کارایی فتوسنتزی و پاسخ بیوشیمیایی نخود دیم تحت تنش سرما در دو ژنوتیپ ILWC109 و ILWC119 به همراه دو ژنوتیپ آنا (شاهد مقاوم) و ژنوتیپ ILC533 (شاهد حساس) انتخابی از آزمایش مزرعه‌ای در محیط کنترل شده موسسه تحقیقات کشاورزی دیم انجام شد. در محیط کنترل شده سه سطح متفاوت دمایی شامل ۲۲ درجه سانتی‌گراد (بعنوان شاهد)، ۴ سانتی‌گراد و ۴- درجه سانتی‌گراد برای ارزیابی ویژگی‌های بیوشیمیایی در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهشی: نتایج بخش مزرعه نشان داد که ژنوتیپ‌های شماره ۵ (ILWC109) و ۲۳ (ILWC119) نه تنها از نظر میزان کلروفیل بیشترین مقدار را بخود اختصاص دادند بلکه از نظر شاخص ELI و میزان فعالیت آنزیم‌های CAT و PPO نیز نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها و ارقام شاهد برتری داشته و جزو ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما شناخته شدند. در بخش کنترل شده نتایج نشان داد که فلورسانس حداکثر، حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II، کارایی کمپلکس تجزیه آب در فتوسیستم II و کارایی فتوسنتزی بطور معنی‌داری در ژنوتیپ‌های مورد بررسی تحت تنش سرمای ۴- درجه سانتی‌گراد کاهش یافتند. در مقابل، در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد، میزان جذب جریان نوری در مراکز واکنشی فعال بیشتر شد. بیشترین سطح فلورسانس حداکثر و کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II و کمترین میزان جذب جریان نوری در مرکز واکنشی فعال در ژنوتیپ ILWC109 دیده شد. به نظر می‌رسد ژنوتیپ‌های آنا و لاین ILWC109 در شرایط تنش سرمای ۴- درجه سانتی‌گراد توانسته‌اند تعداد مراکز واکنشی فعال فتوسیستم II را بیشتر کرده و با جذب فوتون‌های نوری، انتقال الکترون با کارایی بهتری صورت گیرد. بهبود کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II تایید کننده همین مکانیسم عمل در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش سرما است.

واژه‌های کلیدی: تنش سرما، کشت پاییزه، آنزیم های آنتی اکسیدانت، فتوسنتز

* نگارنده مسئول: r.lotfi1988@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۱

CC BY

مقدمه

حبوبات نقش مهمی در تثبیت ازت اتمسفری در خاک و افزایش حاصلخیزی آن دارد. نخود (*Cicer arietinum* L.) عمده‌ترین محصول مورد استفاده در تناوب زراعی گندم در مناطق دیم کشور می‌باشد. براساس آخرین آمار فائو (۲۰۲۰)، سطح زیر کشت نخود در دنیا ۱۷/۸۱ میلیون هکتار، میزان کل تولید آن ۱۷/۲۰۷ میلیون تن با متوسط عملکرد ۹۶۵/۸ کیلوگرم درهکتار است. براساس آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی در سال زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۰، سطح زیرکشت نخود دیم در ایران حدود ۴۰۰ هزار هکتار با متوسط عملکرد ۴۸۴ کیلوگرم درهکتار بوده است (FAO, 2020).

بررسی‌های انجام گرفته مشخص کرده است که تغییر سیستم کاشت نخود از بهار به پائیز، به دلیل افزایش طول دوره رشد، بهره وری مناسب از بارندگی‌های اواخر زمستان و اوایل بهار، همزمانی دوره گلدهی و غلاف بندی با رطوبت مناسب خاک و نهایتاً گریز از خشکی انتهای فصل، با افزایش عملکرد عمده‌ای در اقلیم های مدیترانه‌ای می‌تواند همراه باشد. برآوردها حاکی از حداقل یک میلیون تن اضافه تولید جهانی با به کارگیری کشت نخود زمستانه می‌باشد است (Bagheri *et al.*, 1997). بدیهی است در صورت دستیابی به ارقام با قابلیت عملکرد بالا، قابل کشت به صورت پائیزه، متحمل در مقابل بیماری‌های برق-زدگی و فوزاریوم، ارتفاع بوته بلند و دارای تیپ بوته ایستاده و مناسب برای برداشت مکانیزه و نیز واجد خصوصیات بازار پسندی، کشت نخود دیم در تناوب با گندم توسعه قابل توجهی خواهد یافت. خویشاوندان وحشی منابع مفیدی از تنوع ژنتیکی و ژن‌های مقاوم به تنش‌های زنده و غیرزنده هستند و هرچه پایهٔ تنوع گسترده‌تر باشد، احتمال این که به‌نژادگر بتواند ترکیب ژنتیکی مورد نظر خود را بیابد بیشتر خواهد بود. تنش سرما اثرات متعددی در سطوح مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان دارد. دمای پایین سیستم انتقال الکترون، متابولیسم چرخه کربن و هدایت گازها را مختل می‌کند. در بین ساختارهای فتوسنتزی، فتوسیستم II بخشی است که در معرض آسیب تنش دمای پایین قرار می‌گیرد. بیش از این، دمای پایین فعالیت روزنه‌ها و آنزیم‌های متابولیسم کربن مانند آنزیم چرخه کالوین، ATP سنتاز را تحت تأثیر قرار داده و احیاء ریبولوز بی فسفات کربوکسیلاز و فتوفسفورسلاسیون را محدود می‌کند (Allen & Ort, 2001). سایر اثرات دمای پایین شامل کاهش کربن انتقالی از برگ و تجمع قند محلول در آن می‌باشد (Strand *et al.*, 2003). دمای پایین ۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت منجر به کاهش سطح کلروفیل، آسیمیلاسیون دی‌اکسید کربن و سرعت انتقال مواد فتوسنتزی می‌شود (Yordanova & Popova, 2007). فتوسنتز در دمای پایین ۱۸ درجه سانتی‌گراد کاهش پیدا می‌کند (Ramalho *et al.*, 2003) و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد عملکرد فتوسنتزی را به شدت کاهش می‌دهد (Silva *et al.*, 2004). کاهش ظرفیت فتوسنتزی در دمای پایین با کاهش کارآیی عملکرد کوانتومی فتوسیستم II و I، ATP سنتاز و آنزیم‌های استرومایی مؤثر در چرخه احیای کربن ارتباط دارد (Allen & Ort, 2001). در دمای حدود ۳ درجه سانتی‌گراد آنزیم کلروفیلاز فعال بوده و منجر به کاهش کلروفیل می‌شود (Reda & Mandoura, 2011). دمای پایین فعالیت آنزیم‌ها از جمله فعالیت آنزیم روبیسکو را کاهش می‌دهد. کاهش فعالیت کربوکسیلازی روبیسکو، باعث کاهش عملکرد چرخه کالوین می‌گردد. از آنجایی که محصولات مرحله نوری فتوسنتز از جمله NADPH در چرخه کالوین به مصرف می‌رسند، در تنش سرما این محصولات تجمع می‌یابند (Allen & Ort, 2001). در این شرایط مقدار $NADP^+$ به علت عدم مصرف NADPH کاهش می‌یابد، بنابراین انتقال الکترون‌ها از فرودوکسین به اکسیژن انجام گرفته و رادیکال‌های فعال اکسیژن تولید می‌شوند. همچنین در دمای پایین کارائی

انتقال انرژی به مرکز فتوسیستم II کاهش می‌یابد (Flexas *et al.*, 1999).

فلورسانس کلروفیل به طور گسترده به عنوان یک ابزار سریع، سودمند و غیر تخریبی جهت تشخیص تغییرات عملکردی دستگاه فتوسنتزی در شرایط وقوع تنش‌ها از قبیل دمای پایین در ذرت (Sowinski *et al.*, 2005)، برنج (Bertin *et al.*, 1997) و کلزا (Ghassemi-Golezani *et al.*, 2008)، و تنش خشکی در سویا (Ghassemi-Golezani, & Lotfi, 2012) به کار گرفته شده است. ممانعت نوری موجب کاهش کارآیی فتوشیمیایی فتوسیستم II می‌شود که با کاهش پارامتر فلورسانس متغیر(Fv)، نسبت فلورسانس متغیر به بیشینه (Fv/Fm) یا حداکثر عملکرد کوانتومی واکنش فتوشیمیایی فتوسیستمII، تثبیت دی اکسید کربن و یا آزاد سازی اکسیژن قابل تشخیص می‌باشد.

صباغ‌پور (Sabaghpour, 2005) در ارزیابی ۱۶ ژنوتیپ نخود برای مقاومت به سرما در شرایط کنترل شده (اطاقک سرد با درجه حرارت‌های صفر تا ۱۸- درجه سانتی‌گراد)، ژنوتیپ‌های Sel95TH1716 و Sel96TH11439 را به عنوان ژنوتیپ‌های مقاوم و Sel93TH24469 را به عنوان ژنوتیپ متحمل معرفی نمود. نجیب‌نیا و همکاران (Najibnia *et al.*, 2005) در بررسی ۱۵۲ نمونه نخود متحمل به سرما، تنوع قابل ملاحظه‌ای را از نظر خصوصیات فنولوژیک و مورفولوژیک (تعداد روزهای از کاشت تا سبزشدن و گلدهی و رسیدگی، ارتفاع بوته و تعداد شاخه در بوته) مشاهده کرده و اعلام نمودند که درصد بقاء (تعداد بوته باقی‌مانده)، در مورد ۶۲ درصد ژرم‌پلاسم‌های مورد بررسی، بیش از ۵۰ درصد بوده است. کانونی (Kanooni, 2004) در بررسی ۴۱ ژنوتیپ نخود زراعی ۱۶ ژنوتیپ نخود را با درجه تحمل به سرمای ۳ و کمتر از ۳ به عنوان لاین‌های متحمل به سرما گزینش کرد. با توجه به اینکه نخود گیاهی است که می‌تواند درجه حرارت‌های کمتر تا ۸ درجه زیرصفر (از مرحله رشد تا دوبرگچه‌ای شدن در سطح خاک) و ارقام مقاوم نیز تا ۱۴ درجه زیرصفر را تحمل نمایند (Banaei *et al.*, 1995) و از طرفی دیگر، اطلاعاتی در مورد رفتارهای بیوشیمیایی و فتوسنتزی ارقام و لاین‌های نخود دیم تحت تنش سرما وجود نداشت، این آزمایش به این منظور روی ژنوتیپ‌هایی انتخابی از آزمایش مزرعه ای در شرایط کنترل شده انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش در سال اول ۲۴ ژنوتیپ وحشی نخود به همراه رقم شاهد متحمل آنا و حساس ILC533 بصورت بلوک‌های کامل تصادفی با دو تکرار در فصل پاییز سال زراعی ۹۸-۱۳۹۷، در مزرعه کشت شده و از نظر تحمل به سرما در مزرعه مورد ارزیابی قرار گرفتند. عملیات کشت در نیمه دوم مهر ۹۷ و بصورت دستی و هر کرت شامل دو خط سه متری و با فاصله خطوط ۲۵ سانتی‌متر انجام شد. پس از کشت و بعد از سبز شدن بذور، از تعداد بوته سبز شده قبل از سرمای زمستان (PC1)، تعداد بوته باقی مانده پس سپری شدن سرمای زمستان (PC2)، و از میزان تحمل لاین‌ها نسبت به سرما (CT) در یک مرحله با ثبت نمره از ۱ تا ۹ نمره‌دهی به ترتیب زیر انجام-گرفت:

بسیار مقاوم(CTR=1): عدم مشاهده خسارت

مقاوم (CTR=3): خسارت جزئی،۲۰-۱۱٪ از برگچه-ها دارای علائم رنگ‌پریدگی و تا ۲۰٪ شاخه‌چه‌ها با علائم رنگ‌پریدگی وخشک شدن و عدم از بین رفتن بوته‌ها

متحمل(CTR=5): ۶۰-۴۱٪ از برگچه‌ها و ۴۰-۲۱٪ از شاخه‌چه‌ها با علائم رنگ پریدگی و خشکی و مرگ بوته‌ها تا ۲۵٪

حساس(CTR=7): ۹۹- ۸۱٪ از برگچه‌ها و ۸۰-۶۱٪ از شاخه‌چه‌ها دارای علائم رنگ‌پریدگی و خشکی و مرگ ۵۰-۲۶٪ از بوته‌ها

بسیار حساس (CTR=9): مرگ ۱۰۰٪ بوته‌ها

همچنین دو مرحله (قبل حادث شدن تنش سرما یعنی آبان ماه و بعد از وقوع تنش سرما در دی ماه در دمای ۱۶- درجه سانتیگراد) در مزرعه نمونه‌های برگی از هر ژنوتیپ برای اندازه گیری صفات قابلیت نفوذپذیری غشا سلولی گیاه (شاخص هدایت الکترولیتی ELI)، کلروفیل a، b و کارتنوئید انجام شد.

بر اساس نتایج آزمایش سال اول دو ژنوتیپ متحمل به همراه رقم شاهد متحمل آنا و حساس ILC533 جهت مطالعه پاسخ فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های متحمل و حساس به تنش سرما، آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو تکرار در محیط کنترل شده انجام شد. جهت کشت ابتدا بذور ژنوتیپ‌های با وایتکس (هیپوکلریت سدیم) ده درصد به مدت ده دقیقه ضدعفونی شد و پس از شستشو با آب مقطر روی کاغذ صافی در پتری دیش با رطوبت لازم قرار گرفت. پتری دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای ۲۳ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌ها انتقال یافت. انتقال غیرمستقیم گیاهان به خاک به دلیل اهمیت سبز شدن یکنواخت آن‌ها و اجرای دقیق تیمارهای آزمایش در نمونه‌ها بود. گلدان‌ها در اتاقک رشد موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور با نور ۵۰۰ میکرو مول بر مترمربع بر ثانیه و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب و دمای ۲۲ درجه سانتی-گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شد.

جهت بررسی پاسخ‌های گیاهی به تنش سرما، بر اساس برنامه شیب دمایی، دما کاهش یافت بطوریکه در روز بیست و یکم گیاهچه‌ها، دمای اتاقک رشد به چهار درجه سانتی گراد رسید و مولفه‌های فلورسانس کلروفیل از محل برگ توسعه یافته بوسیله دستگاه فلوریمتر[1] اندازگیری شد. بدین منظور ابتدا برگ‌ها به مدت ۲۰ دقیقه توسط کلیپس‌های مخصوص در تاریکی قرار گرفته و سپس شاخص‌های F_0، F_m، F_v و F_v/F_m اندازه گیری و محاسبه شد همچنین در این مرحله نمونه برداری برای اندازه گیری صفات فیزیولوژی در این دما نیز انجام شد. سپس بر اساس برنامه شیب دمایی طی ۴۸ ساعت دمای اتاقک رشد به ۴- درجه سانتی‌گراد رسانده شد و ضمن اندازه گیری مولفه های فلورسانس کلروفیل، نمونه برداری برای اندازه گیری صفات فیزیولوژی در این دما نیز انجام شد. لازم به ذکر است بخشی از گیاهچه ها به‌عنوان شاهد (کنترل) در اتاقک رشد با دمای ۲۲ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و ضمن اندازه گیری مولفه‌های فلورسانس کلروفیل در این نمونه‌ها، نمونه‌گیری برگی از این گیاهان برای اندازه گیری صفات فیزیولوژی نیز انجام گرفت.

اندازه‌گیری تحمل به سرما براساس قابلیت نفوذپذیری غشا سلولی گیاه (تست اندازه‌گیری هدایت الکترولیتی)[2]: تحمل به سرما براساس شاخص نشت الکترولیتی بافت‌های خسارت دیده گیاهان نخود بعد از تیمار سرما اندازه‌گیری شد (Campos *et al*. 2003). در اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیتی از برگ‌های کاملاً سالم بخش میانی ساقه استفاده شد. ۸۰ میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ده سی‌سی آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب آب برگ‌ها مکش انجام شد و لوله‌های آزمایش به مدت سی دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند سپس میزان نشت الکترولیتی نمونه‌ها (EC_1) با استفاده از دستگاه EC متر (آلمان، Inolab) اندازه‌گیری شد. سپس مجدداً آب، به درون لوله‌ها بازگردانده شد و محتوی لوله آزمایش پس از قرار گرفتن در حمام آب گرم به مدت ۱۰ دقیقه، در شیکر قرار گرفته و بلافاصله میزان نشت الکترولیتی (EC_2) تعیین شد و در نهایت مقدار شاخص خسارت براساس فرمول ذیل محاسبه شد (Popov *et al*. 2005).

$$I = \frac{Ec1}{Ec2} \times 100$$

1- Florimeter (Opti-Science, USA)

2- Electrolyte leakage index (ELI)

تست پراکسیداسیون غشا با نشانگر مالون دی آلدهید[1]: در راستای انجام این آزمایش به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم برگ از هر ژنوتیپ با مشخصاتی که برای اندازه‌گیری هدایت الکتریکی ذکر شد برداشت شد. سپس برگ‌ها در هاون چینی کاملاً له شده و ۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl به آن‌ها افزوده شد به طوری که یک مخلوط هموژن به دست آمد. سپس ۳ میلی‌لیتر از آن به همراه ۲ میلی‌لیتر از محلول TBA سرما سازگاری درون لوله آزمایش ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از آن غلظت مالون دی-آلدهید با دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzoon A-160, Japan) در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. تست پراکسیداسیون غشا با نشانگر مالون دی‌آلدئید نیز برای هر سه تیمار دمایی کنترل و تنش سرما با شرایط یکسان انجام گرفت. غلظت مالون دی‌آلدهید براساس معادله زیر محاسبه شد که D اشاره به چگالی و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر $۱/۵۶\times۱۰^{۵}$) دارد (Maali Amiri *et al*. 2007).

$$C = D/L$$

اندازه‌گیری میزان محتوای کلروفیل و کاروتنوئید: اندازه‌گیری میزان محتوای کلروفیل بر مبنای روش آرنون (Arnon ,1949) انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا ۰/۱ گرم نمونه برگی گیاهان کنترل و تنش را در هاون چینی با ۳ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد کاملاً ساییده و حجم نهایی عصاره به ۱۵ میلی‌لیتر افزایش یافت. سپس عصاره با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت $g \times ۵۰۰۰$ صاف شد. از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160) برای اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌ها استفاده شد. ابتدا دستگاه با استون ۸۰ درصد صفر شده و سپس میزان جذب عصاره استخراج شده در طول‌موج‌های ۶۴۵ نانومتر، ۶۶۳ نانومتر ، ۴۸۰ نانومتر و ۵۱۰ نانومتر قرائت شد. سپس با استفاده از روابط زیر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید محاسبه شد:

$$[(12.7\times A_{663})-(2.69\times A_{645})]\times V / 1000\times W$$

=میلی‌گرم کلروفیل a در هر گرم برگ تر

$$[(22.9\times A_{645})-(4.69\times A_{663})]\times V / 1000\times W$$

=میلی‌گرم کلروفیل b در هر گرم برگ تر

$$[(20.2\times A_{645})+(8.02\times A_{663})]\times V / 1000\times W$$

=میلی‌گرم کلروفیل کل در هر گرم برگ تر

$$7.6\times(A_{480})- 14.9 \times (A_{510}) \times V/1000\times W$$

=میلی‌گرم کاروتنوئید در هر گرم برگ تر

در روابط بالا A میزان جذب در طول‌موج موردنظر، V حجم نهایی استون ۸۰ درصد برحسب میلی‌لیتر و Wاندازه برگ تازه برحسب گرم می‌باشد.

استخراج و اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: میزان H_2O_2 بر اساس روش لورتو و ولیکوا (Loreto and Velikova, 2001) صورت گرفت. کلیه مراحل کار باید در محیط تاریک و اتاق سرد انجام شود. برای استخراج مقدار ۰/۳۵ گرم نمونه‌های گیاهی تازه با نیتروژن مایع در هاون خرد شده تا به صورت پودر درآیند. پودر تهیه شده به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده و مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول اسیدتری کلرواستیک یک درصد (محلول در حمام یخ قرار داده شود) به تیوب اضافه شد. تیوب حاوی نمونه هموژنیزه شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت $g\times ۱۲۰۰۰$ سانتریفوژ شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول روشناور به یک تیوب جدید حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار و یک میلی‌لیتر محلول یک مولار یدید پتاسیم اضافه شده و درب تیوب را بسته و با چندین مرتبه سر و ته کردن، محتوای تیوب هموژن می‌شود (در تاریکی). می‌توان تا زمان قرائت نمونه‌ها آن‌ها را درون فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری کرد. در ابتدا باید دستگاه اسپکتروفتومتر در محیط خنک و نیمه تاریک مستقر شده و سپس آن را با استفاده از محلول بلانک صفر کرد، آنگاه محتوای تیوب مربوط به هر یک از ۱۲ محلول استاندارد به اندازه کافی در کووت

1- Malondialdehyde

کوارتزی ریخته شده، سپس مقدار جذب هر نمونه را در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت کرد و ضمن تعریف معادله رگرسیون، منحنی استاندارد رسم می‌شود. در ادامه میزان جذب نمونه‌های گیاهی قرائت شده و با استفاده از معادله منحنی مقدار پراکسید هیدروژن هر نمونه محاسبه شد. واحد پراکسید هیدروژن بر حسب میکرومول بر گرم نمونه تر می‌باشد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت: کلیه مراحل استخراج در دمای ۱°C ±۴ در داخل یخ انجام شد. بعد از قرار دادن نمونه‌ها در داخل هاون چینی مقداری نیتروژن مایع روی آن‌ها ریخته شده و نمونه‌ها توسط هاون به‌خوبی سائیده شده و به حالت پودر درآمد. فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری برحسب نمونه‌ها علامت‌گذاری شده و در داخل نیتروژن مایع قرار داده شدند. ۰/۲۵ گرم از پودر حاصل با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن شده و به فالکون‌ها منتقل شد، سپس به آن ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج[۱] افزوده شد. پس از دو دقیقه ورتکس[۲] پودر نمونه‌ها و بافر استخراج، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه با g × ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. درنهایت سوپرناتانت[۳] به‌دست‌آمده در داخل تیوب‌های جداگانه ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و داخل نیتروژن مایع فریز شدند. استخراج همه نمونه‌ها در مدت کوتاهی انجام و همواره از بافر تازه استفاده شد از عصاره به‌دست‌آمده برای قرائت مقدار پروتئین کل و سنجش کمی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم CAT در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر و به روش ابی (Aebi, 1984) اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم از دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت کشور ژاپن در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر استفاده شد. محلول‌ها و مواد استفاده شده شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بوده و فعالیت آنزیم به مدت ۵ دقیقه در فواصل ۲۰ ثانیه‌ای ثبت شد.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX): فعالیت آنزیم GPX نیز همانند آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به روش توبیتو و دنیسیوسیسی (Tobita and Dionisio-Sese, 1988) اندازه‌گیری شد. نوع و میزان مواد لازم مورد برای سنجش آنزیم GPX شامل ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) ۵۰ میلی مولار، ۱۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد، ۳ میکرولیتر محلول گایاکول ۲۰۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. دستگاه اسپکتروفتومتر روی ۴۷۰ نانومتر تنظیم و با محلول شاهد که شامل همه مواد ذکرشده به‌استثنای عصاره آنزیم بود کالیبره شد. فعالیت آنزیم به مدت ۵ دقیقه و در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای ثبت گردید. میزان جذب با افزایش زمان روند افزایشی داشت.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): میزان فعالیت آنزیم با روش رانیری و همکاران (Ranieri *et al.*, 2003) سنجیده شد. در اثر واکنش بین آسکوربات پراکسیداز و اسید آسکوربیک و H_2O_2 دهیدروآسکوربات تولید می‌شود که در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر قرائت می‌شود. محیط واکنش حاوی ۶۰۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی مولار، ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۴۰۰ میکرولیتر اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار، ۴۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سنجش فعالیت آنزیم در طول ۷ دقیقه با فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای ثبت شد.

۱- Extraction buffer

۲- Vortex

۳- Supernatant

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): اندازه‌گیری فعالیت SOD طبق روش دهیندسا و همکاران (Dhindsa *et al.*, 1981) انجام شد. فعالیت این آنزیم به‌صورت فوتومتریک بررسی می‌شود. بافر اصلی واکنش شامل بافر فسفات (pH=۷/۸) ۱۰۰میلی‌مولار، متیونین ۱۲ میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار، EDTA ۱۰۰ میکرومولار و ترایتون ایکس- ۱۰۰ ۰/۰۲۵ درصد بود. از بافر اصلی به هر چاهک به میزان ۲۹۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس از بافر ریبوفلاوین ۲ میکرومولار به میزان ۵ میکرومولار به مخلوط واکنش اضافه شد و دستگاه در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر کالیبره شد. برای سنجش هر نمونه ۱۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استفاده شد. این واکنش بر اساس میزان احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم و توانایی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ممانعت از این واکنش بررسی می‌شود.

سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO): سنجش میزان فعالیت PPO با روش کار و مشیرا (Kar and Mishra, 1976) انجام شد. محیط واکنش حاوی ۵۰ میکرولیتر از پیروگالول ۱۰۰ میلی‌مولار، ۳۰۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات (pH=۷) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان فعالیت آنزیم برحسب مقادیر اکسیدشده پیروگالول در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر محاسبه شده و به‌صورت نانومول پیروگالول تغییریافته در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

تجزیه داده‌ها: داده های حاصل بر مبنای طرح آماری مورد استفاده، تجزیه واریانس صفات مورد بررسی ژنوتیپ‌ها به عمل آمده ومقایسهٔ میانگین تیمار ها با استفاده از آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار و با استفاده از برنامهٔ آماری SAS انجام شد. نهایتاً ژنوتیپ‌های با صفات برتر نسبت به ارقام شاهد و با مقاومت یا تحمل بیشتر به سرما انتخاب و جهت بررسی‌های بیشتر وارد آزمایشات بعدی شدند.

نتایج و بحث

نتایج حاکی از وجود تفاوت معنی دار از نظر صفات اندازه گیری شده قبل و بعد از وقوع تنش در سطح احتمال خطای یک درصد می‌باشد (جدول ۱). همچنین بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر کلیه صفات اندازه گیری شده درسطح احتمال یک و پنج درصد تفاوت معنی‌دار وجود داشت. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل ژنوتیپ × تنش روی صفات میزان کلروفیل a، b، کل در سطح احتمال خطای پنج درصد و کارتنوئیدها در سطح احتمال خطای یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

مقایسه میانگین‌ها داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که از نظر شاخص تحمل به سرما (CT) ژنوتیپ‌های شماره ۵، ۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۶، ۱۹، ۲۲ و ۲۳ با متوسط شاخص تحمل به سرما (CT=3) و مشاهد خسارت جزئی در بوته‌ها برتر از رقم آنا بعنوان شاهد مقاوم (CT=4) بوده و جزء ژنوتیپ‌های مقاوم شناخته شدند. ژنوتیپ‌های شماره ۳، ۲۰ و ۲۱ به همراه شاهد حساس آزمایش (ILC533) با متوسط شاخص تحمل به سرما (CT=7) بعنوان ژنوتیپ‌های حساس شناسایی شد.

تعداد بوته بعد از یخبندان (PC) شاخص خوبی برای مقاومت به سرما در آزمایش‌های نخود دیم پاییزه محسوب می شود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین (جدول ۲) اغلب ژنوتیپ‌ها بطور متوسط حدود ۶۰-۵۰ درصد بوته بعد از یخبندان را دارا بودند که در این میان ژنوتیپ‌های شماره ۵، ۱۱، ۱۶، ۱۹ و ۲۳ با متوسط بیش از ۹۰ درصد دارای بیشترین تعداد بوته بعد از آخرین یخبندان بودند (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین (جدول ۲) نشان داد که نشت الکترولیت‌های سلولی (ELI) در ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۳، ۸، ۲۰ و ۲۱ به همراه شاهد حساس ILC533 تحت شرایط قبل و بعد از وقوع تنش سرما بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود (متوسط حدود ۶۰ درصد).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورفو-فیزیولوژیکی مورد بررسی در بین ۲۶ ژنوتیپ مختلف نخود

Table 1. Analysis of varicance of the morpho-physiological treats in 26 chickpea genotypes

		MS								
SOV	df	CT	PC2	ELI	CAT	PPO	Cha	Chb	TotalCh	Cartenoid
Stress (St)	1	43.12**	886806.37**	798.3**	39.41**	0.915**	0.008**	0.008**	27.05**	8.99**
Genotype (Ge)	25	20.89**	29933.48**	425.36**	6.54**	0.483*	0.015**	0.0013**	19.73**	9.71**
St*Ge	25	3.68 n.s	6573.98n.s	26.33 n.s	16.39**	1.03**	0.0007*	0.0008*	1.59*	1.91**
Erorr	50	2.52	6182.62	15.10	0.196	0.117	0.0001	0.0001	0.494	0.076
CV (%)		2.37	10.53	8.56	3.12	8.71	7.33	14.21	8.61	5.07

**، * و ns به ترتیب اختلاف معنی دار در سطوح احتمال خطای ۱٪ ، ۵ ٪و عدم اختلاف معنی دار، CT: شاخص تحمل به سرما، PC2: تعداد بوته بعد از یخبندان، ELI: شاخص نشت الکترولیتی، CAT: آنزیم کاتالاز، PPO: آنزیم پلی فنل اکسیداز، Cha: کلروفیل a، Chb: کلروفیل b، TotalCh: کلروفیل کل و Cartenoid: کارتنوئید

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های وحشی نخود تحت تنش سرما

Table 2. Means of the physiological traits in wild genotypes of chickpea genptypes

No.	Genotype	CT	PC2	ELI	CAT	PPO	Cha	Chb	TotalCh	Cartenoid
1	ILWC112	5	55	62.71c	17.06b	4.73a	0.229b	0.108abc	0.316b	6.63c
2	ILWC117	5	74	49.86de	14.40d	3.47fgh	0.137fe	0.079def	0.215fg	4.44fgh
3	ILWC104	7	45	75.35a	11.90ef	3.10h	0.165cd	0.099bcd	0.265de	5.88d
4	ILWC108	4	85	41.92fgh	15.11cd	3.54e-h	0.126fg	0.060f	0.185g	4.22gh
5	ILWC109	3	93	33.27k	18.01a	4.34a-d	0.26a	0.126a	0.387a	7.98a
6	ILWC110	4	84	42.19fgh	10.93g	3.21gh	0.178c	0.133a	0.310bc	7.29b
7	ILWC111	3	88	37.78g-k	15.23c	4.12a-e	0.157cde	0.116ab	0.274cd	5.13e
8	ILWC114	5	69	53.13d	12.27e	4.03b-f	0.161cd	0.122ab	0.270d	4.93ef
9	ILWC115	4	84	46.47ef	15.51c	4.63ab	0.176c	0.088cde	0.264de	5.69d
10	ILWC116	3	88	37.19g-k	16.56b	4.39abc	0.127fg	0.100bcd	0.227ef	4.51fgh
11	ILWC118	3	90	36.10h-k	14.40d	3.47fgh	0.153de	0.065ef	0.203fg	4.67efg
12	1LWC120	3	89	36.49h-k	18.01a	4.34a-d	0.109g	0.062f	0.176g	4.03h
13	ILWC122	3	89	36.09h-k	15.23c	4.12a-e	0.157cde	0.116ab	0.274cd	5.13e
14	ILWC123	4	85	40.97f-i	12.27e	4.03b-f	0.161cd	0.122ab	0.270d	4.93ef
15	ILWC126	4	85	41.33fgh	15.51c	4.63ab	0.176c	0.088cde	0.264de	5.69d
16	ILWC127	3	90	38.56g-k	16.56b	4.39abc	0.165cd	0.100bcd	0.227ef	4.51fgh
17	ILWC130	4	85	40.38f-j	11.34fg	3.82c-g	0.153de	0.065ef	0.203fg	4.67efg
18	ILWC183	4	85	42.78fgh	11.79ef	3.74d-h	0.109g	0.062f	0.176g	4.03h
19	ILWC184	3	91	34.192ijk	17.06b	4.73a	0.229b	0.108abc	0.316b	6.63c
20	ILWC216	7	49	69.26b	11.34fg	3.82c-g	0.137fe	0.079def	0.215fg	4.44fgh
21	ILWC218	7	48	61.03c	11.79ef	3.74d-h	0.127fg	0.099bcd	0.265de	5.88d
22	ILWC106	3	89	38.45g-k	15.11cd	3.54e-h	0.126fg	0.060f	0.185g	4.22gh
23	ILWC119	3	91	33.924jk	11.90ef	3.10h	0.26a	0.126a	0.387a	7.98a
24	ILWC133	4	81	44.12efg	10.93g	3.21gh	0.178c	0.133a	0.310bc	7.29b
25	ILC533	7	48	61.65c	11.79ef	3.74d-h	0.109g	0.062f	0.176g	4.03h
26	ANA	4	85	40.24f-j	17.06b	4.73a	0.229b	0.108abc	0.316b	6.63c

این نتایج با یافته‌های پیشین مبنی بر اینکه ژنوتیپ-های متحمل تحت شرایط دمای طبیعی و تنش سرما نشت یونی کمتری در مقایسه با ژنوتیپ‌های حساس دارد کاملاً همخوانی دارد (Malekzadeh *et al.*, 2013). آزاد شدن ۵۰ درصد الکترولیت‌های کل از بافت گیاهان به‌عنوان شاخص مرگ سلول در نظر گرفته می‌شود (Bakht et al. 2006., Heidarvand et al. 2011). همچنین ژنوتیپ‌های شماره ۵، ۱۹ و ۲۳ دارای کمترین (کمتر از ۳۵ درصد) میزان شاخص ELI بوده که با نتایج دو شاخص PC و CT مطابقت داشت و آنها بعنوان ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما شناخته شدند. کاهش محتویات ELI در ژنوتیپ‌های مقاوم و شاهد مقاوم رقم آنا، می‌تواند دلالت بر فعال-سازی مکانیسم‌های تحمل بویژه القای سیستم‌های دفاعی و سمیت زدایی ROSها در بافت‌ها باشد. حذف و کاهش تولید ROS به وسیله مکانیسم‌های موثر ROS زدایی انجام می‌گیرد (Lotfi *et al.*, 2015).

نتایج مقایسه میانگین داده‌های بیوشیمیایی (جدول ۲) نشان داد که ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۵، ۱۲و ۱۹ به همراه شاهد مقاوم آنا، دارای بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز (بیش از ۱۷ واحد) و آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) بودند که نشان دهنده تحمل سرما این ژنوتیپ‌ها از طریق فعال شدن مکانیسم دفاعی و دفع ROSها می‌باشد.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها ژنوتیپ‌های شماره ۵ و ۲۳ با ۰/۲۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر بیشترین میزان کلروفیل a را به خود اختصاص داد. نتایج مشخص کرد که از نظر کلروفیل b ژنوتیپ‌های ۵، ۶، ۲۳ و ۲۴ با متوسط بیش از ۰/۱۲۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر، از نظر کلروفیل کل ژنوتیپ‌های ۵ و ۲۳ با متوسط ۰/۳۸۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر و از نظر میزان کارتنوئید ژنوتیپ‌های ۵ و ۲۳ با متوسط ۷/۹۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر بیشترین میزان کلروفیل را دارا بودند. براساس نتایج بدست آمده ژنوتیپ‌های شماره ۵ (ILWC109) و ۲۳ (ILWC119) نه تنها از نظر میزان کلروفیل بیشترین مقدار را بخود اختصاص دادند بلکه از نظر شاخص ELI و میزان فعالیت آنزیم‌های CAT و PPO نیز نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها و ارقام شاهد برتری داشته و جزء ژنوتیپ-های مقاوم به سرما شناخته شدند و برای ارزیابی پاسخ فیزیولوژیکی به تنش سرما در شرایط کنترل شده انتخاب گردیدند. مشخص شده است که ترکیبات پلی فنولی ناشی از سرما، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بهبود می‌بخشد و مسیر فنیل پروپانوئید ناشی از تنش سرما به مقاومت در برابر گونه‌های اکسیژن فعال ناشی از سرما کمک می‌کند (Eom *et al.*, 2022).

نتایج بخش محیط کنترل شده

براساس نتایج سال اول دو ژنوتیپ ILWC109 و ILWC119 به همراه دو ژنوتیپ آنا (بعنوان شاهد مقاوم) و ژنوتیپ ILC533 (بعنوان شاهد حساس) برای ارزیابی پاسخ فیزیولوژیکی و کارایی فتوسیستم II تحت تنش سرما انتخاب گردیدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌های عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (Fv/Fm) نشان داد (جدول ۳) که در تنش دماهای پایین بین پارامترهای فلورسانس کلروفیل ژنوتیپ-های نخود و اثر متقابل ژنوتیپ × تنش تفاوت معنی دار وجود نداشت. بین سطوح مختلف تنش سرما از نظر اکثر پارامترهای فلورسانس کلروفیل بجز پارامتر Fo در سطح احتمال خطای یک درصد تفاوت معنی دار وجود داشت (جدول ۳).

مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) نشان داد که بیشترین مقدار پارامتر Fv/Fm (حداکثر عملکرد کوانتومی یا فتوشیمیایی فتوسیستم II) مربوط به تیمار ۲۲ درجه سانتی‌گراد به میزان ۰/۷۹ و ژنوتیپ ILWC109 به میزان ۰/۶۷۲ است. همچنین نتایج نشان داد که کمترین میزان پارامتر Fv/Fm مربوط به تیمار ۴- درجه سانتی‌گراد به میزان ۰/۵۱ و ژنوتیپ ILC533

به میزان ۰/۵۹۷ می‌باشد. به عبارت دیگر این ژنوتیپ (شاهد حساس به سرما) بیشتر تحت تاثیر تنش سرما قرار گرفته و کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم دو در آن کاهش یافته است. در تیمارهای دمایی ۲۲، ۴ و ۴- درجه سانتی‌گراد عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (Fv/Fm) ژنوتیپ‌های نخود به ترتیب ۰/۷۹، ۰/۶۴ و ۰/۵۱ بود که این بیانگر تاثیر تنش دماهای پایین بر پارامتر Fv/Fm مخصوصا در دمای ۴- درجه سانتی-گراد نسبت به بقیه تیمارها است. همچنین نتایج نشان داد در تنش دمایی ۴-، ژنوتیپ ILWC109 دارای عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (Fv/Fm) بیشتری نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها است و کمتر تحت تاثیر تنش دماهای پایین قرار گرفت. این تحقیق نشان داد که پارامتر Fv/Fm یکی از مهمترین شاخص‌های انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به تنش سرما در گیاه نخود می‌باشد.

مقایسه میانگین داده های کلروفیل فلورسانس (جدول ۴) نشان می دهد که تحت تنش سرمای ۴- درجه سانتی گراد فلورسانس حداکثر، حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم دو، کارایی کمپلکس تجزیه آب در فتوسیستم دو و کارایی فتوسنتزی بطور معنی داری کاهش یافت. در مقابل در این دما (۴- درجه سانتی گراد) میزان جذب جریان نوری در مرکز واکنشی فعال و انرژی هدر روی غیر فتوشیمیایی بیشتر شد. بیشترین فلورسانس حداکثر و کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم دو و کمترین جذب جریان نوری در مرکز واکنشی فعال در ژنوتیپ ILWC109 دیده شد. در اغلب موارد بین لاین مذکور و رقم آنا اختلاف آماری معنی داری وجود نداشت. به نظر می رسد ژنوتیپ ILWC109 در شرایط تنش سرمای ۴- درجه سانتی گراد توانسته است تعداد مراکز واکنشی فعال فتوسیستم دو را بیشتر کند و با جذب فوتون های نوری، انتقال الکترون با کارایی بهتری صورت گیرد. بهبود کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم دو تایید کننده همین مکانیسم عمل در ژنوتیپ (ILWC109) متحمل به تنش سرما است.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۵) داده‌ها نشان داده است که اثر متقابل ژنوتیپ و تیمارهای دمایی از نظر صفات فیزیولوژیکی تفاوت‌های معنی داری داشتند که دلالت بر وجود تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها و نیز واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها تحت تیمارهای دمایی داشت.

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف تنش سرما بر مولفه های فلورسانس کلروفیل چهار ژنوتیپ نخود

Table 3- Analysis of variance of the different cold stress levels on chlorophyll a fluorescence in 4 chickpea genotypes

SOV	df	Fo	Fm	Fo/Fm	Fv/Fm	Fv/Fo	ABS/RC	PIabs
Stress (St)	2	$228.16^{n.s}$	886806.37**	0.157^{**}	0.157^{**}	14.78^{**}	0.542^{**}	173.18^{**}
Genotype (Ge)	3	$529.66^{n.s}$	$13233.48^{n.s}$	$0.0061^{n.s}$	$0.0061^{n.s}$	$0.172^{n.s}$	$0.0582^{n.s}$	$9.62^{n.s}$
St*Ge	6	$114.5^{n.s}$	$6573.98^{n.s}$	$0.003^{n.s}$	$0.003^{n.s}$	$0.211^{n.s}$	$0.050^{n.s}$	$4.70^{n.s}$
Erorr	12	263.58	6582.62	0.0028	0.0028	0.171	0.034	13.70
CV (%)		6.75	10.53	15.02	8.37	15.75	11.34	15.62

**، * و ns به ترتیب اختلاف معنی دار در سطوح ۱٪ ، ۵ ٪و عدم اختلاف معنی دار. Fo (فلورسانس حداقل)، Fm (فلورسانس حداکثر)، Fo/Fm (انرژی هدر روی غیر فتوشیمیایی)، Fv/Fm (حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II)، Fv/Fo (کارایی کمپلکس تجزیه آب در فتوسیستم II)، ABS/RC (جذب جریان نوری در مرکز واکنشی فعال)، PIabs (کارایی فتوسنتزی).

**, * and ns are significant at 1%, 5% and non significant, respectively

جدول ۴- میانگین مولفه های فلورسانس کلروفیل چهار ژنوتیپ نخود تحت تنش سرما

Table 4- means of chlotophyll a fluorescence in 4 chickpea genotypes

PIabs	ABS/RC	Fv/Fo	Fv/Fm	Fo/Fm	Fm	Fo	تیمار
2.75b	1.07b	1.86b	0.64b	0.36b	694.25b	244.25a	دمای ۴ C^o
0.94b	1.42a	1.06c	0.51c	0.49a	481.25c	234.25a	دمای ۴- C^o
9.75a	0.91b	3.71a	0.79a	0.21c	1134.13a	242.50a	دمای ۲۲ C^o
3.14a	1.16a	2.27a	0.672a	0.329b	830.67a	251.16a	ILWC109
5.16a	1.10a	2.28a	0.65ab	0.35ab	770ab	233.33a	ANA
5.89a	1.01a	2.31a	0.653ab	0.348ab	762.50b	231.66a	ILWC119
3.72a	1.25a	1.95a	0.597b	0.403a	716.33b	245.16a	ILC533

حروف متفاوت در ره ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است. Fo (فلورسانس حداقل)، Fm (فلورسانس حداکثر)، Fo/Fm (انرژی هدر روی غیر فتوشیمیایی)، Fv/Fm (حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II)، Fv/Fo (کارایی کمپلکس تجزیه آب در فتوسیستم II)، ABS/RC (جذب جریان نوری در مرکز واکنشی فعال)، PIabs (کارایی فتوسنتزی).

Different letters in each column show significant difference at 5% probability level.

در این پژوهش ELI و MDA بعنوان شاخص فیزیولوژیکی در تعیین خسارت غشاء در ژنوتیپ‌های نخود به کار گرفته شد. آزمون مقایسه میانگین ELI و MDA، اختلاف معنی‌داری بین تیمار های دمایی نشان داد که بیانگر تنوع بالقوه پاسخ‌های ژنوتیپ‌های نخود تحت این شرایط بود (جدول ۶). تحت دمای فیزیولوژیکی (۲۲ درجه سانتی‌گراد)، میزان ELI و MDA در دو ژنوتیپ ILWC109 و ILWC119 و رقم متحمل آنا به طور معنی‌داری کمتر از ژنوتیپ حساس (ILC533) بود که بیانگر ظرفیت ژنتیکی متمایز آنها می‌باشد. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تغییر قابل توجهی در میزان ELI و MDA مشاهده نشد ولی در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد میزان ELI و MDA در ژنوتیپ حساس افزایش معنی‌داری داشت در حالی که در سه ژنوتیپ دیگر (مخصوصا ژنوتیپ ILWC109) تغییر معنی‌داری در میزان ELI و MDA مشاهده نشد. کمترین و بیشترین میزان ELI و MDA مربوط به ژنوتیپ ILWC109 و ILC533 به ترتیب در ۲۲ و ۴- درجه سانتی‌گراد بود. به طور کلی میزان کم نشت الکترولیتی در سلول‌های برگ بیانگر تحمل گیاه به تنش سرما می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد ژنوتیپ‌های متحمل میزان ELI و MDA کمتر تحت شرایط تنش از مکانیسم های دفاعی فعالتری برخوردار بوده که سبب نوعی سازگاری سلولی در آن شده است. میزان بالاتر ELI و MDA تحت تنش سرما ناشی از تولید ROSها بوده که در نهایت منجر به تنش اکسیدآتیو می شود (Heidarvand *et al.*, 2011). بنابراین، در این پژوهش الگوی میزان H_2O_2 در تیمارهای مختلف دمایی اندازه‌گیری شد.این مولکول برخلاف سایر ROSها، نیمه عمر بیشتری داشته و قادر به انتشار مابین غشاهای زیستی می‌باشد و بعنوان مولکول پیام رسان در محلی به دور از محل تولید خود، سبب ایجاد تنش اکسیدآتیو در سلول‌های گیاهی می‌شود (Bienert *et al.*, 2007).

نتایج نشان داد که میزان افزایش H_2O_2 در ژنوتیپ‌های متحمل به ترتیب از دمای ۲۲ به ۴ و به ۴- درجه سانتی‌گراد، هرچند معنی‌دار، ولی با شیب ملایم بود در حالی که تحت چنین شرایطی میزان H_2O_2 در ژنوتیپ حساس بطور چشم‌گیری در مقایسه با شرایط کنترل شده افزایش یافت (حدود ۴۹ درصد) (جدول ۶). چنین وضعیتی ضمن نتایج ELI و MDA بیانگر توسعه تنش اکسیدآتیو تحت تنش سرما در ژنوتیپ حساس می‌باشد. بنابراین در نخود، درجه پاسخ به تنش سرما وابسته به ژنوتیپ متفاوت بود که مطالعه الگوی خسارت در شرایط تنش و کنترل نشان دهنده آن بودند.

CAT، PPO، GPX و SOD مولکول های فعال در سازکارهای دفاعی سلول تلقی شده که به ترتیب نقش مهمی در تولید و تخریب H_2O_2 دارند (Kazemi Shahandashti *et al.*, 2014). نتایج نشان داد که از نظر فعالیت آنزیمی، ژنوتیپ های مورد بررسی پاسخ‌های متفاتی به سرما نشان دادند. سطوح فعالیت CAT در دو ژنوتیپ ILWC109 و ILC533 و شاهد آنا در تیمار دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت ؛ درحالی که در تیمار ۴- درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌داری مشاهده شد. فعالیت این آنزیم در ژنوتیپ حساس، کاهشی در حدود ۲۱/۹ درصد در تیمار ۴- درجه سانتی‌گراد در مقایسه با کنترل نشان داد (جدول ۶). میزان فعالیت PPO در هر چهار ژنوتیپ مورد بررسی در تیمار دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت ولی در تیمار ۴- درجه سانتی‌گراد فعالیت آن به سطوح مشاهده شده در شرایط کنترل رسید. سطوح فعالیت SOD در ژنوتیپ حساس یک روند کاهشی را تحت شرایط تنش سرما از خود نشان داد بطوریکه به کمترین میزان فعالیت خود در تیمار ۴- درجه‌سانتی‌گراد رسید؛ در حالی که در دو ژنوتیپ ILWC109 و ILC533 و شاهد آنا افزایش تدریجی در میزان فعالیت SOD مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت SOD (حدود ۶۲ در صد) در تیمار ۴- درجه سانتی-گراد در ژنوتیپ ILWC109 بود (جدول ۶). روند میزان فعالیت GPX در تیمارهای دمایی ۲۲، ۴ و ۴- درجه سانتیگراد مشابه فعالیت SOD بود بطوریکه در تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش و مجدد در ۴- درجه سانتی‌گراد بجز ژنوتیپ حساس افزایش معنی‌داری مشاهده شد. بنابراین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مطالعه شده در این پژوهش با یکدیگر همکاری کرده به طوری که افزایش فعالیت همزمان آنها سبب کاهش میزان خسارت سلولی (ELI و MDA) و همچنین کاهش H_2O_2 به عنوان یکی از ROSهای تولیدی سلول شده است. در میتوکندری گیاهان، فرآیند انتقال الکترون، تولید ROS و در نهایت میزان ATP پیچیده می‌باشد. زیرا تحت تنش، مسیر متناوب دیگری از جریان الکترون به سمت آنزیم AOX ایجاد شده که یک نوع انعطاف پذیری بین سه فرآیند متابولیسم کربن، انتقال الکترون و تولید ATP فراهم می‌آورد (Vanlerberghe 2013). بنابراین در مرحله بعدی، فعالیت آنزیم AOX به عنوان یکی از کمپلکس های آنزیمی مهم در زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی گیاهان سنجیده شد. میزان فعالیت آنزیم AOX در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در هر چهار ژنوتیپ پس از یک کاهش معنی‌دار، در تیمار دمایی ۴- درجه سانتی‌گراد افزایش نشان داده که بیانگر نقش موثر این آنزیم در پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاه به تنش سرما بود. با این وجود میزان فعالیت AOX در دو ژنوتیپ ILWC109 و ILC533 و شاهد آنا بسیار بیشتر از ژنوتیپ حساس بود بطوری که این افزایش در ژنوتیپ ILWC109، ۱۹/۶ درصد ولی در ژنوتیپ حساس تنها هفت در صد بود. تحقیقات نشان داده که AOX تولید O_2^- را تعدیل کرده که به نوبه خود تبدیل آن به سایر گونه‌های ROS مانند H_2O_2 و OH* را کاهش می‌دهد (Rogov *et al.*, 2014). به نظر می‌رسد تحت تنش پیام رسانان تنش اکسیدآتیو و خصوصیات غشای پلاسمایی (نتایج ELI و MDA و H_2O_2) به عنوان عوامل اساسی در تنظیم فعالیت ژن‌های *aox* عمل کرده که در نهایت سبب مهار تولید ROS می شود. تحقیقات در توتون نشان داده است که انتقال گیاهان به تنش سرما باعث القای فعالیت آنزیم AOX می‌شود بطوریکه میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) بعنوان یکی از شاخص های خسارت سلولی کاهش یافت (Wang *et al.*, 2011). بنابراین، در میتوکندری تغییر در تولید ROS در اثر تغییر در ظرفیت مهار ROS سلول رخ می‌دهد. این بدان معنی است که مکانیسم‌های کنترلی تولید ROS میتوکندریایی مانند AOX می‌توانند اهمیت

جدول ۵- تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف تنش سرما بر صفات فیزیولوژکی چهار ژنوتیپ نخود

Table 5- Analysis of variance of the cold stress effects on physiological traits in 4 chickpea genotypes

		MS(میانگین مربعات)												
SOV	df	CAT	GPX	APX	PPO	SOD	MDA	ELI	H2O2	AOS	Cha	Chb	TotalCh	Cartenoid
Stress (St)	2	39.41**	3.53$^{n.s}$	143.12**	0.915**	0.024**	0.435**	395.65**	1045.72**	0.056**	0.007**	0.007**	27.05**	7.99**
Genotype (Ge)	3	6.54**	90.61**	9.89**	0.483*	0.0037**	4.98**	1150.02**	3442.28**	0.014**	0.014**	0.0012**	19.73**	8.71**
St*Ge	6	16.39**	91.96**	107.68**	1.03**	0.0035**	1.10**	43.69**	407.90**	0.172**	0.0009**	0.0007*	1.59*	1.91**
Erorr	12	0.196	2.80	0.52	0.117	0.0002	0.057	3.40	17.60	0.002	0.0001	0.0001	0.494	0.076
CV (%)		3.12	7.38	2.37	8.71	6.14	6.28	5.29	4.19	8.67	7.33	14.21	8.61	5.07

به ترتیب اختلاف معنی دار در سطوح ۱٪ ، ۵ ٪و عدم اختلاف معنی دارns و *، **

Catalase (CAT), Guaiacol Peroxidase (GPX), Polyphenol Oxidase (PPO), Ascorbate Peroxidase (APX), Superoxide Dismutase (SOD), Electrolyte leakage index (ELI), Malondialdehyde (MDA), Hydrogen Peroxide (H_2O_2) content, Allen Oxide Synthase (AOS), Chlorophyll (Ch)

جدول ۶- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف تنش سرما بر صفات فیزیولوژکی چهار ژنوتیپ نخود

Table 6- Comparion mean of the effects of cold stress on physiological treats of 4 chickpea genotypes

Stress	Genotype	CAT (nmol of H_2O_2 decomposed / (minmgprotein))	GPX (nmol of guaiacol oxidized/ (minmgprotein))	APX (nmol oxidized ascorbate/ (minmgprotein))	PPO (nmol of purpurogalin formed/ (minmgprotein))	SOD (U/ (minmg protein))	MDA (umol/g frwt)	ELI (%)	H2O2 (umol/g frwt)	AOS (ΔOD234/ (minmg protein))	Cha (mg/gfrwt)	Chb (mg/gfrwt)	TotalCh (mg/gfrwt)	Cartenoid (mg/gfrwt)
$22C^0$	ILWC109	15.51c	20.58cd	35.67b	4.73a	0.20g	2.65e	20.40j	61.35g	0.23e	0.229b	0.108abc	0.316b	6.63c
	ANA	14.40d	22.25bc	29.65d	3.47fgh	0.20g	3.88cd	28.56fg	70.96f	0.57bc	0.137fe	0.079def	0.215fg	4.44fgh
	ILWC119	18.01a	28.92a	33.67c	4.34a-d	0.23ef	3.05e	24.0i	62.91g	0.69a	0.165cd	0.099bcd	0.265de	5.88d
	ILC533	15.11cd	17.17e	25.76f	3.54e-h	0.26cd	4.23bc	42.95c	80.45f	0.35d	0.126fg	0.060f	0.185g	4.22gh
$4C^0$	ILWC109	11.90ef	18.34de	25.11f	3.10h	0.28bc	2.96e	24.83hi	67.84fg	0.65ab	0.26a	0.126a	0.387a	7.98a
	ANA	10.93g	18.18de	23.49g	3.21gh	0.21fg	3.95cd	30.7f	85.28d	0.35d	0.178c	0.133a	0.310bc	7.29b
	ILWC119	14.23d	31.48a	25.33f	4.12a-e	0.21fg	3.63cd	36.6ed	82.79d	0.506c	0.157cde	0.116ab	0.274cd	5.13e
	ILC533	12.27e	20.99cd	22.66g	4.03b-f	0.21fg	4.50b	47.9b	99.81c	0.65ab	0.161cd	0.122ab	0.270d	4.93ef
$-4C^0$	ILWC109	17.06c	24.83b	42.69a	4.63ab	0.33a	3.08e	27.4gh	74.34ef	0.72a	0.176c	0.088cde	0.264de	5.69d
	ANA	16.56b	30.36a	36.55b	4.39abc	0.29b	3.67d	34.5e	81.01ed	0.69a	0.127fg	0.100bcd	0.227ef	4.51fgh
	ILWC119	15.34c	19.46cde	33.67c	3.82c-g	0.25e	3.70d	38.43d	85.01d	0.24e	0.153de	0.065ef	0.203fg	4.67efg
	ILC533	11.79ef	19.59cde	27.65e	3.74d-h	0.15h	5.75a	61.5a	119.6a	0.73a	0.109g	0.062f	0.176g	4.03h

میانگین‌هایی که در هر ستون، حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means with at least one common letter in each column are not significantly different ($P<0.05$)

زیادی در تعیین اینکه چگونه سلول میزان ROS خود را مدیریت کرده و سطح ثابت ROS سلولی را تعیین کند، دارند (Amirsadeghi *et al*,. 2006).

نتایج مقایسه میانگین‌های داده‌های کلروفیل نشان داد که میزان محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در هر چهار ژنوتیپ تحت تنش سرما کاهش یافت ولی این کاهش در ژنوتیپ حساس بسیار مشهودتر بود (جدول ۶). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در ژنوتیپ‌های مقاوم احتمالاً تجمع ROSها، در گیاهان تحت تنش سرما توسط فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کاهش یافته و در نتیجه مانع تجزیه کلروفیل و یا منجر به تحریک سنتز آن می‌شوند. پایداری کلروفیل (کلروفیل a و b) و میزان کارتنوئید همراه با فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ممکن است دستگاه فتوسنتز را تحت تنش سرما محافظت کند یا مرحله ساخت مجدد آن را تحریک کند که احتمالاً رشد را در گیاهان تحریک می‌کند. همبستگی منفی در بین بیشتر رنگدانه‌های فتوسنتزی و شاخص‌های خسارت به‌موازات سایر نتایج بدست آمده در این تحقیق احتمالاً چنین پاسخ‌هایی را در گیاه نخود تایید می‌کند. مطالعه بهتر و دقیق‌تر مکانیسم فعالیت این آنزیم‌ها و اعضای خانواده آن و همچنین مطالعه راهکارهای افزایش بیان و فعالیت این آنزیم‌ها در نخود زراعی راهکارهای مهم در تحمل به تنش سرما در این گیاه بوده به طوریکه بکارگیری آنها کشت پاییزه این گیاه را ممکن می‌سازد.

منابع

Aebi H .1984. Catalase In: L. Packer (Ed), methods in enzymology, Academic pres, Orlando. 105:121-126

Allen DJ, Ort DR. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants. Trends in Plant Sci. 6: 36-42

Amirsadeghi, S, McDonald AE, Robson, C.A, Vanlerberghe GC .2006. Changes in plant mitochondrial electron transport alter cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signaling molecules. Plant Cell Physiology 47: 1509-1519

Arnon DT .1949. Copper enzymes in isolation chloroplast phenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24:1-5

Bagheri A, Nezami A, Ganjali A, Parsa M. 1997. Agronomy and Chickpea Breeding. Jahad Daneshgahi Mashhad. P444. (in Persian)

Banaei T, Davoodikia MA, Dad H, Noori P. 1995. Agronomy of Legum. Agriculture Minstry. Deputy Minister of Agriculture, 74/332 N. (in Persian)

Bakht J, Bano A, Dominy P .2006. The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (Cicer arietinum L.) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function. J Exp Bot. 57:3707-3715

Bienert GP, Kristiansen KA, Møller ALB 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. Journal of Biological Chemistry 282: 1183-1192

Bertin P, Bouharmont J, Kinet JM. 1997. Somaclonal variation and improvement of chilling tol-erance in rice: Changes in chilling-induced chlorophyll fluorescence. Crop Science, 37: 1727-1735

Campos PS, Quartin V, Ramalho JC, Nunes MA. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of Coffea sp. plant Journal of Plant Physiology. 160: 283-292.

Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA.1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J Exper Bot. 32:93-101

FAOSTAT. 2020. http://www.fao.org/faostat/en/#data/Accessed 18 May, 2020

Flexas J, Badger M, Chow WS, Medrano H, Osmond CB. 1999. Analysis of the relative in-crease in photosynthetic O2 uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night temperatures and/or water stress. Plant Physiology, 121:675-684

Ghassemi-Golezani K, Khomari S, Valizadeh M, Alyari H. 2008. Effects of seed vigour and the duration of cold acclimation on freezing tolerance of winter oilseed rape. Seed Science and Technology, 36: 767-775

Ghassemi-Golezani K, Lotfi R.2012. Responses of soybean leaves and grain yield to water stress at reproductive stages. International Journal of Plant, Animal Environmental Sciences, 2: 63-68

Kanooni H. 2004. Study of Cold Tolerance in Chickpea Genotypes in Fall-Sown Nurseries. Seedling and Seed Journal. 1: 89-99

Kazemi Shahandashti SS, Khazaei M, Maali-Amiri R, Ramezanpour SS, Talei AR, Zeinali H. 2014. Effect of short-term cold stress on oxidative damage and transcript accumulation of defense-related genes in chickpea seedlings. Journal of Plant Physiology 171: 1106-1116

Kar M, Mishra D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant physiology. 57:315-319

Heidarvand L, Maali Amiri R, Naghavi MR, Farayedi Y, Sadeghzadeh B, Alizadeh KH. 2011. Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. Russ J Plant Physiol. 58:157-163

Loreto F, Velikova V .2001. Isoprene production by leave protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, aquenchesozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Plant Physiol. 127:1781-1787

Maali-Amiri R, Goldenkova-Pavlova I, Pchelkin VP, Tsydendambaev VD, Vereshchagin AG, Deryabin AN, Trunova TI, Los DA, Nosov AM. 2007. Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the Δ12-desaturase gene from Cyanobacterium. Russ J Plant Physiol. 54:678-685

Najibnia S, Parsa H, Nezami A, Bagheri A. 2005. Study on phenologic and morphologic charactrestics of cold tolernace Chickpea germplas in fall-sowing conditions of Mashhad. Peas national congeres. Mashhad, 20 and 21 November 2005. (in Persian)

Popov VN, Orlova IV, Kipaikina NV, Serebriiskaya TS, Merkulova NV, Nosov AM, Trunova TI, Tsydendambaev VD, Los DA. 2005. The effect of tobacco plant transformation with a gene for acyl lipid "9-Desaturase from Synechococcus vulcanus on plant chilling tolerance. Russ. J. Plant Physiol. 52:664-667

Ramalho JC, Quartin VL, Leitão E, Campos PS, Carelli MLC, Fahl JI, Nunes MA. 2003. Cold acclimation ability and photosynthesis among species of the tropical Coffea genus. Plant Biology, 5: 631-641

Reda F, Mandoura HMH. 2011. Response of enzymes activities, photosynthetic pigments, proline to low or high temperature stressed wheat plant (*Triticum aestivum* L.) in the presence or absence of ex-ogenous proline or cysteine. International Journal of Academic Research, 3: 108-115

Rogov AG, Sukhanova EI, Uralskaya LA, Aliverdieva DA, Zvyagilskaya RA .2014. Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. Biochemistry (Moscow) 79: 1615-1634

Sabaghpour SH. 2005. Evaluation of promising lines and cultivars of chickpea for cold tolerance under controlled conditions. Peas national congeres. Mashhad, 20 and 21 November 2005. (in Persian)

Silva EA, Damatta FM, Ducatti C, Regazzi AJ, Barros RS. 2004. Seasonal changes in vegeta-tive growth and photosynthesis of Arabica coffee trees. Field Crops Research, 12: 25-34

Sowinski P, Rudzinska-Langwald A, Adamczyk J, Kubica I, Fronk J. 2005. Recovery of maize seedling growth, development and photosynthetic efficiency after initial growth at low temperature. Journal of Plant Physiology, 162: 67-80

Strand A, Foyer CH, Gustafsson P, Hurry V. 2003. Increased expression of sucrose phosphate synthase in transgenic Arabidopsis thaliana results in improved photosynthetic performance and in-creased freezing tolerance al low temperatures. Plant, Call Environment, 26: 523-535

Vanlerberghe GC .2013. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants

Wang J, Rajakulendran N, Amirsadeghi S, Vanlerberghe GC .2011. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of Nicotiana tabacum to cold temperature. Physiologia Plantarum 142: 339-351

Yordanova RY, Popova L. 2007. Effects of exogenous treatment with salicylic acid on photosyn-thetic activity and antioxidant capacity of chilled wheat plants. General and Applied Plant Physiology, 33: 155-170

Iranian Dryland Agronomy Journal, Vol 12(2), Winter 2023

DOI: 10.22092/IDAJ.2023.363265.415

Evaluation of biochemical and photosynthetic efficiency of dryland chickpea genotypes under cold stress conditions

Ramin Lotfi[1*], Hamid Hassanian-Khoshro[1], Hossein Khoshvaghti[2]

1- *Dryland Agricultural Research Institute, AREEO, Maragheh, Iran.*
2- *Department of Agricultural Science, Payame Noor University, Tehran, Iran.*

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Changing the chickpea planting system from spring to autumn, due to the increase in the length of the growing period, proper productivity from the late winter and early spring rains, the coincidence of the flowering and podding period with suitable soil moisture, and finally avoiding the dryness at the end of the season, is result in increasing the yield in Mediterranean climates. Wild relatives are useful sources of genetic diversity and resistance genes to biotic and non-biotic stresses, and the wider the base of diversity, the more likely the breeder will be able to find the desired genetic combination.

Methodology: Photosynthetic efficiency and biochemical response of dryland chickpea genotypes were evaluated as factorial experiment based on a completely randomized design with two replications under cold stress in two genotypes ILWC109 and ILWC119 along with two genotypes i.e. Ana (resistant control) and ILC533 (sensitive control). In the controlled environment, three different temperature levels including 22°C (as control), 4°C and -4°C were considered to evaluate biochemical characteristics.

Research findings: The results of the field section showed that genotypes number 5 (ILWC109) and 23 (ILWC119) not only had the highest amount in terms of chlorophyll a content, but also in terms of ELI index and activity levels of CAT and PPO enzymes. They were better than other genotypes and cultivars and were recognized as cold resistant genotypes. In the controlled part, the results showed that the maximum fluorescence, the maximum photochemical efficiency of photosystem II, the efficiency of the water split complex in photosystem II and the photosynthetic efficiency significantly decreased in the studied genotypes under cold stress of -4°C. On the other hand, at -4°C, the amount of light current absorption increased in active reaction centers. The highest level of maximum fluorescence and photochemical efficiency of photosystem II and the lowest amount of light current absorption in the active reactive center were obtained in ILWC109 genotype. It seems that Anna genotypes and ILWC109 line have been able to increase the number of photosystem II active reaction centers under cold stress conditions of -4°C, and by absorbing light photons, electron transfer could take place with better efficiency. The improvement of the photochemical efficiency of photosystem II confirms this mechanism of action in genotypes tolerant to cold stress.

Key Words: Cold stress, autumn cultivation, antioxidant enzymes, photosynthesis.

* Corresponding author: r.lotfi1988@gmail.com
Submit date: 2023/09/18 Accept date: 2024/03/01