مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۴، ۱۳۸۹ (۷۰۶-۶۹۹)

ارزیابی مقدماتی پاسخ ژنوتیپ‌های ایرانی نخود دسی در واکنش به تنش سرما

محمدرضا نظری[۱]، فاطمه حبیب‌پور مهربان[۲]، رضا معالی امیری[۳]* و حسن زینالی خانقاه[۴]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجویان کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۱۷ - تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۲۹)

چکیده

در این مطالعه پاسخ‌های القاء شده سرما در یازده ژنوتیپ نخود سیاه تحت شرایط کنترل شده به منظور انتخاب ژنوتیپ متحمل به سرما از طریق اندازه‌گیری شاخص خسارت برگ (Electrolyte Leakage Index) و اکسیداسیون چربی‌های سلولی یا مالون‌دی‌آلدهید (Malondialdehyde) بررسی شد. ژنوتیپ‌های نخود سیاه پاسخ‌های متفاوتی به تیمار دمایی ۲۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد نشان دادند. تیمار دمایی زیر صفر در ۱۵ دقیقه افزایش معنی‌دار ELI و MDA را در همه گیاهان به جز ژنوتیپ‌های ۴۷۱۵ و۴۳۲۲ نشان داد. مطالعات تکمیلی در دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد نشان داد که ژنوتیپ ۴۳۲۲ با میزان شاخص خسارت کمتر، به عنوان ژنوتیپ کاندید مقاوم به سرما جهت مطالعات بعدی بوده و دارای پتانسیل برگشت‌پذیری پس از طی دوره سرمایی می‌باشد. این در حالی است که ژنوتیپ ۴۷۱۵ به علت خسارت شدید قادر به ادامه زندگی حتی پس از برگشت به شرایط دمایی طبیعی نیست. نتایج این تحقیق اولین پاسخ های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی غشاهای‌سلولی ژنوتیپ‌های متحمل نخود سیاه تحت تنش سرما را نشان داد. شاخص‌های ELI و MDA می‌توانند به عنوان نشانگر تحمل به سرما در ارزیابی ژنوتیپ‌ها در تنش‌های کوتاه‌مدت سرما به موازات مطالعات مورفولوژیکی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: **اکسیداسیون، تحمل به سرما، شاخص‌خسارت برگ، مالون دی‌آلدهید، نخود سیاه.**

مقدمه

دما یکی از عوامل مهم محیطی است که گسترش و پراکنش موجودات زنده را تعیین می‌کند. خطرات دمایی معمولاً مربوط به نوسانات آن است که بیشترین خسارات را بر گیاهان زراعی وارد می‌سازد (Samach & Wigge, 2005) و این مسئله در ایران که با نوسانات دمایی شب و روز همراه می‌باشد، حائز اهمیت فراوان است. نخود (*Cicer arietinum* L.) به عنوان منبع مهم پروتئین (Nayyar et al., 2006)، حساس به سرما و یخزدگی بوده (Srinivasan et al., 1998; Nayyar et al., 2004) و سازگاری و تولید آن مستقیم یا غیرمستقیم به وسیله دماهای پایین ۱۵ درجه سانتی‌گراد محدود می‌شود

* نویسنده مسئول: رضا امیری معالی تلفن: ۰۲۶۱-۲۲۴۶۰۷۴ E-mail: rmamiri@ut.ac.ir

(Croser et al., 2003). در شرایط سرد این گیاه نسبت به علف‌های هرز، حشرات و بیماریها حساس‌تر می‌شود (Ryan, 1997; Reddy et al., 2004). دماهای پایین اغلب فرایندهای اکسیداسیون را در سلول‌های گیاهی القاء می‌کنند که این فرایندها به وسیله گونه‌های اکسیژن فعال[1] شروع می‌شود (Prasad et al., 1994; Xin & Browse, 2000). تنش سرما اعمال غشاءهای سلولی را به عنوان اولین جایگاه خسارت تحت تأثیر قرار داده، ویسکوزیته غشاء را افزایش می‌دهد و وضعیت مایع غشاء را به جامد تغییر می‌دهد (Los & Murata, 1988). سلول‌های گیاهی که قادر به سازگاری با این شرایط نباشند، از بین می‌روند.

اصلاح برای مقاومت به سرما در بهبود کمی و کیفی تولید نخود در کشور ما و اکثر کشورهای آسیایی قابل توجه بوده است. کشت پاییزه در صورت وجود ارقام متحمل به سرما برای فرار از خشکی و گرمای بهار و تابستان برکشت بهاره ترجیح داده می‌شود (Millan et al., 2006). شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرما به کمک روش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌تواند در دسترس‌ترین و مهم‌ترین مسیر اصلاحی باشد که منجر به فهم برخی مکانیسم‌های تحمل به سرما در جهت به کارگیری راهبردهای مولکولی در خصوص معرفی این صفات در اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی می‌شود. مشکلات در انتخاب و اصلاح برای مقاومت به سرما با کافی نبودن تنوع ژنتیکی در درون توده‌های نخود زراعی جدی‌تر احساس می‌شود (Abbo et al., 2003) و استفاده از توده‌های بومی و خویشاوند که تحمل مناسبی به تنش‌های محیطی از خود نشان داده اند می‌تواند در رفع این محدودیت‌ها مفید واقع شود. تا کنون تحقیقات فراوانی در خصوص تحمل به تنش‌های خشکی، سرما و مقاومت به آفات در نخود زراعی و وحشی انجام گرفته (Toker, 2005; Kaur et al., 2008) ولیکن در زمینه تحمل به سرما در خصوص نخود سیاه (Desi) گزارش‌های کمی دیده شده است. نخود سیاه با وجود صفات مناسب تغذیه‌ای متعدد از درصد فیبر بیشتری نسبت به نخودهای کابلی برخوردار است (Rossi et al., 1984) و تحمل ژنتیکی بیشتری به تنش‌های محیطی خشکی یا آفات نشان داده است (Yadav et al., 2006). بنابراین تحقیقات در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. ژنوتیپ‌های متحمل به سرما در نخود سیاه می‌تواند به عنوان ارقام معرفی شده جهت کشت در مناطق سرد در فصل پاییز یا مناطق مرتفع در اواخر زمستان مورد استفاده قرار گیرند که درنتیجه منجر به افزایش سطح زیرکشت و تولید می‌شود. هم اکنون نیز در تعدادی از استان‌های کشور از جمله کردستان وکرمانشاه کشت می‌گردد.

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی گیاهچه‌های نخود سیاه در دماهای زیرصفر و کوتاه‌مدت بر اساس پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به عنوان شاخص‌های مقاومت به سرما در جهت شناسایی ژنوتیپ متحمل و برخی مکانیسم‌های درگیر در آن انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

شرایط رشد گیاهان

در این پژوهش یازده ژنوتیپ نخود سیاه از کلکسیون بذر حبوبات بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران تهیه شد (جدول۱). این ژنوتیپ‌ها، ژنوتیپ‌های زراعی و متحملی هستند که در آزمایش‌های گذشته نتایج مناسبی به تنش سرما در شرایط مزرعه نشان دادند. بذور با وایتکس ده درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر بر روی کاغذ صافی در پتری‌دیش با رطوبت لازم قرار داده شدند. پتری‌دیش‌ها در شرایط بدون نور و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته (Kaur et al., 2008) و پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌ها به گلدان‌ها منتقل شدند. انتقال غیرمستقیم گیاه به خاک به دلیل اهمیت یکنواخت سبز شدن آنها و اجرای همزمان تیمار سرما در نمونه‌ها ضروری بود. گلدان‌ها در اتاقک رشد با نور ۲۰۰ میکرومول بر انیشتن و شرایط نوری ۱۶ ساعت روز و ۸ ساعت شب و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار داده شدند. نمونه‌گیری از برگ گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای انجام گرفت.

1. Reactive oxygen species

جدول ۱- نتایج آزمون دانکن تیمارهای دمایی ژنوتیپ‌های نخود سیاه*

ژنوتیپ	شاخص هدایت الکتریکی بر اساس (ELI)		اندازه‌گیری اکسیداسیون سلولی براساس (MDA)	
	تیمار دمایی ۲۳°c	تیمار دمایی -۱۰°c	تیمار دمایی ۲۳°c	تیمار دمایی -۱۰°c
کاکا	۳۰/۰۲±۲/۱۲abc	۳۴/۱±۶۵/۲۴f	۶/۷۹±۲/۱۲bcd	۱۱/۱۸±۰/۸۱a
پیروز	۲۹/۳±۲/۵۴abc	۴۲/۹±۰۷/۹۹c	۶/۷۴±۲/۱۸bcd	۷/۵۳±۷/۰۷c
۴۳۲۲	۲۵/۲۶±۳/۲۱cde	۲۹/۹±۳۲/۱۹h	۶/۶۳±۰/۶bcd	۷/۵۳±۰/۲۳c
۴۴۸۸	۲۶/۸۲±۱/۳۱bcd	۳۵/۰±۶۷/۹۵ef	۱۰/۲۶a	۱۲/۳۲±۰/۴۵a
۴۷۱۵	۳۰/۵۶±۱/۲۲ab	۳۳/۲۹ g	۵/۹۹±۱/۴۱de	۵/۳۹±۱/۴۱d
۴۲۶۷	۲۳/۷۴±۰/۶۸de	۳۳/۴±۲۸/۹۵g	۸/۲۱±۰/۱۳b	۱۰/۸۸±۰/۷۸a
۴۲۶۹	۲۶/۳۸±۳/۰۹bcd	۴۰/۰±۳۶/۲۱d	۷/۲±۷/۷۷bcd	۹/۲۴±۰/۷۷b
۴۲۹۶	۲۳/۴۶±۳/۹۹de	۳۶/۲±۲۸/۸۳e	۵/۶۲±۲/۱۲de	۸/۰۸±۰/۳۵c
۴۳۰۷	۳۳/۴۴±۰/۶۲a	۴۳/۰±۱/۱۴c	۴/۸۲±۰/۶۹e	۷/۷۶c
۴۳۲۱	۲۱/۰۲±۲/۱۲e	۴۷/۰±۳۷/۲۳a	۶/۴۴±۹/۱۹cde	۱۰/۹۱±۱/۴۴a
۴۳۴۸	۳۰/۱۸±۱/۱۳abc	۴۵/۰±۵/۱۳b	۷/۹۲±۰/۱۲bc	۸/۸bc

* حداقل یک حرف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌دار ۱ درصد است.

اندازه‌گیری تحمل به سرما براساس قابلیت نفوذپذیری غشاء سلولی گیاه

تحمل به سرما بر اساس شاخص هدایت الکتریکی[1] بافت‌های خسارت دیده نخود بعد از تیمار سرما اندازه‌گیری شد (Hepburn et al., 1986). گیاهچه‌های دو تا سه هفته از هر ژنوتیپ به دو قسمت تقسیم شده نیمی از آنها در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط فوق‌الذکر نگهداری شده و نیمی دیگر به دمای زیر صفر ۱۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. برای جلوگیری از یخ‌زدگی سلول‌ها در تیمار دمایی زیر صفر، دمای اتاقک رشد به تدریج کاهش یافت و گیاهان به مدت ۱۵ دقیقه در معرض این دما قرار گرفتند. رژیم سرمای موردنظر (ترکیب دما و دوره زمان) در آزمایشات اولیه تعیین گردید. جهت مطالعات تکمیلی و بررسی پاسخ متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها، اندازه‌گیری تحمل به سرما بر اساس شاخص هدایت الکتریکی با تیمار دمایی ۱۲- درجه سانتی‌گراد نیز انجام گرفت و سایر شرایط اعم از نحوه اعمال تیمار و اتاقک سرمادهی همانند تیمار ۱۰- درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

در اندازه‌گیری میزان هدایت الکترولیتی از برگ‌های کاملاً سالم بخش میانی ساقه استفاده شد. هشتاد میلی‌گرم برگ پس از برش افقی، به لوله آزمایش حاوی ده سی‌سی آب مقطر انتقال یافت. جهت جذب بهتر آب با استفاده از پمپ خلاء هوای درون محیط خارج شده و لوله‌های آزمایش به مدت سی دقیقه در دستگاه شیکر قرار گرفتند سپس میزان هدایت الکترولیتی نمونه‌ها (Ec_1) با استفاده از دستگاه EC متر (آلمان ,Inolab) اندازه‌گیری شد. محتوی لوله آزمایش پس از قرار گرفتن در حمام آب گرم، در دستگاه شیکر قرار گرفته و بلافاصله میزان هدایت الکترولیتی (Ec_2) تعیین شد و در نهایت مقدار شاخص خسارت بر اساس فرمول (۱) محاسبه گردید (Popov et al., 2005):

$$I = \frac{Ec_1}{Ec_2} \times 100 \qquad (۱$$

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس مالون دی آلدهید

میزان اکسیداسیون ژنوتیپ‌های نخود بر اساس تجمع مالون‌دی‌آلدهید برگ با استفاده از تیوبار بیتوریک اسید تعیین شد (Heath & Packer, 1968). ۳۰۰ میلی‌گرم نمونه برگی از بخش میانی ساقه در ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (۰/۱ مولار Tris-Hcl، pH=۷/۶ حاوی NaCl) هموژنه شده و ۳ میلی‌لیتر از این ترکیب با ۲ میلی لیتر محلول تیوبار بیتوریک اسید حاوی اسید تری کلرواستیک مخلوط شد و در حمام آب جوش به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از عبور از صافی یا سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، چگالی[2] نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر در

1. Electrolyte Leakage Index

2. Optical density

دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzoon160) تعیین شد. غلظت مالون‌دی‌آلدهید براساس فرمول (۲) محاسبه شد (Zhirov et al., 1982; Maali-Amiri et al., 2007):

$$C = \frac{D}{E} \qquad (۲$$

که در آن D اشاره به چگالی و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر ^{5}۱۰×۱/۵۶) دارد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS 10.0 مورد تجزیه و تحلیل آماری بر اساس آزمون تجزیه واریانس یک طرفه قرار گرفته و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

ژنوتیپ‌های نخود سیاه در مراحل رشد گیاهچه تحت تنش کوتاه‌مدت سرما قرار گرفتند. کشت پاییزه یا زمستانه نخود در نواحی مدیترانه‌ای گیاه را در مراحل اولیه رشد رویشی با یخبندان زمستانه مواجه می‌کند. لذا تلاش برای یافتن ژنوتیپ‌هایی که تحمل به دماهای زیر صفر داشته باشند ضروری به نظر می‌رسد. تنش کوتاه مدت روشی مؤثر در ارزیابی ژنوتیپ‌ها در شرایط کنترل شده محسوب می‌گردد و می‌تواند معیاری در برآورد تحمل به تنش‌های طولانی مدت نیز تلقی گردد (Maruyama & Nakamura, 1997; Maali Amiri et al., 2010). آزمون مقایسه میانگین t بر اساس نتایج ELI اختلاف معنی‌داری بین تیمار ۲۳ درجه سانتی‌گراد و تیمار دمایی کوتاه مدت ۱۰- درجه سانتی‌گراد نشان داد (t=-۵/۵۱۶ $p\leq$۰/۰۱) که نشان‌دهنده رابطه بین دو تیمار دمایی در ژنوتیپ‌ها است. اعمال تیمار دمایی ۱۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه توانست تفاوت‌های فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌ها را نشان دهد و در نتیجه شدت و مدت تنش به عنوان عناصر کلیدی در مطالعه تحمل به تنش سرما، در نظر گرفته شد. تجزیه داده‌ها نشان داد که تنوعی در پاسخ ژنوتیپ‌ها به دمای پایین وجود دارد و این تنوع منعکس‌کننده ساز و کارهای متمایز درونی گیاه و احتمالاً تنوع در میزان فعالیت ژن‌ها باشد و این مسئله با توجه به پاسخ‌های معنی‌دار ژنوتیپ‌ها در تجزیه ELI حتی قبل از اعمال تنش سرما قابل نتیجه‌گیری است (Maali Amiri et al., 2007; Sin'kevich et al., 2009). نتایج تجزیه ELI نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها به ترتیب در تیمار دمایی ۲۳ و دمای زیر صفر ۱۰- درجه سانتی‌گراد وجود دارد (t=۶/۴۷۹ $p\leq$۰/۰۱ و t=۲۷۹/۷۷۴ $p\leq$۰/۰۱). شاخص خسارت در ژنوتیپ‌ها از ۲۱ در نمونه ۴۳۲۲ تا ۳۰/۱۸ در نمونه ۴۳۴۸ متغیر بود (جدول ۱). میزان شاخص خسارت ۵۰ درصد بافت گیاهی به عنوان مرگ گیاه در اثر عامل تنش در نظر گرفته می‌شود (Sukumaran & Weiser, 1972). بنابراین ژنوتیپ‌های با ELI کمتر، تحمل بیشتری به شرایط تنش نشان می‌دهند. تیمار دمایی ۱۰- درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌دار ELI را در همه گیاهان به جز، ژنوتیپ ۴۳۲۲ نشان داد. مقدار کم ELI در ژنوتیپ ۴۳۲۲ ممکن است مربوط به فعالیت مکانیسم‌های تحمل به سرما باشد که با فعالیت‌های اکسیداسیونی و خصوصیات و ترکیب غشاءهای سلولی در ارتباط است (Los & Murata, 2004; Osamu & Iba, 2005).

Maali-Amiri et al. (2007) تغییر خصوصیات غشای پلاسمایی سلول را عامل مهم تحمل به سرما در گیاهان بیان کردند. بعد از کاهش دما، ساختار غشای سلولی موقتاً تغییر وضعیت داده که بر قابلیت نفوذپذیری غشاء تأثیر می‌گذارد (Simon, 1974; Leshem, 1992). تغییر موقت وضعیت غشاء منجر به تحریک مکانیسم‌هایی می‌گردد که نتیجه آن افزایش بیان ژن‌های تنظیم‌کننده در غشاءهای سلولی شده، که یکی از آنها ژن‌های دساتوراز می‌باشد که نسبت اسیدهای چرب غیراشباع را به اشباع افزایش داده و منجر به برگشت سیالیت غشاء به حالت مایع می‌شود (Los & Murata, 1988). بنابراین تحمل بیشتر در بعضی ژنوتیپ‌ها ممکن است در اثر پایداری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی غشاء باشد که باید در جزئیات بیشتر مطالعه شود. اما با این وجود در اثر پیچیدگی پاسخ‌ها به تنش سرما فرضیه‌های دیگری نیز ممکن است مطرح باشد. نتایج فوق‌الذکر اکثراً مربوط به افزایش قابلیت نفوذ پذیری در غشاء پلاسمایی در شرایط تنش سرما می‌باشد.

در مطالعه واکنش غشاء کلروپلاستی به تنش سرما از روش MDA استفاده شد. آزمون مقایسه میانگین t

داده‌های MDA، اختلاف معنی‌دار بین تیمار ۲۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد را نشان داد ($t=۱۴/۹۳۸$ $p\leq۰/۰۱$) که این مورد نیز نشان‌دهنده ارتباط تیمارهای دمایی و وجود تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها می‌باشند. تجزیه نتایج MDA در دمای ۲۳ و ۱۰- درجه سانتی‌گراد به ترتیب تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها نشان داد ($t=۸/۵۹۵$ $p\leq۰/۰۱$ و $t=۲۱/۹۲۷$ $p\leq۰/۰۱$). مقدار MDA بر حسب میکرومول در گرم وزن تر برگ در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد از ۴/۸۲ در ژنوتیپ ۴۳۰۷ تا ۱۰/۲۶ در ژنوتیپ ۴۴۸۸ متغیر بود (جدول ۱). تیمار دمایی ۱۰- درجه سانتی‌گراد در ۱۵ دقیقه سبب افزایش میزان اکسیداسیون در سلولهای برگ گردید. میزان کم اکسیداسیون چربی‌های غشایی نیز عامل مهم تحمل گیاهان به تنش‌های سرما محسوب می‌گردد (Campos et al., 2003) Leport et al. (1999) گزارش نمودند که ۸۰-۵۰ درصد کاهش در عملکرد در اثر محدودیت در فتوسنتز است. تنش سرما با آسیب به غشاءهای کلروپلاستی می‌تواند بیشترین خسارت را به فتوسنتز و راندمان تولید گیاه وارد سازد (Kingston-Smith et al., 1997). با توجه به اینکه اندام برگ به عنوان جایگاه اصلی فتوسنتز در نظر گرفته می‌شود، در این تحقیق نیز به همین منظور خسارت سرمایی در این نوع بافت مورد مطالعه قرار گرفت. تحقیقات نشان می‌دهد که تحمل بافت‌های مختلف گیاه به سرما می‌تواند متفاوت باشد (Beck et al., 2004) و این موضوع در کنار کمی بودن صفت مقاومت گیاهان به سرما که درگیری ژن‌های فراوانی را نشان می‌دهد، بهبود اصلاح برای تحمل به سرما در گیاهان را با مشکل مواجه کرده است. چالش‌های ذکر شده در صورتی قابل مطالعه و بررسی است که اثرات متقابل و همزمان یا متناوب تنش سرما از تنش‌های محیطی دیگر قابل تفکیک باشد.

شاخص اکسیداسیون چربی‌ها به عنوان مراحل آغازی خسارت غشاء تلقی شده و ممکن است بسته به شدت تنش تغییر کند اما در مقابل آن، الکترولیت‌های داخل سلول در اثر افزایش در نفوذپذیری غشاء پلاسمایی بوده و یک شاخص خسارت شدیدتر تلقی می‌گردد. بنابراین غلظت‌های داخل سلولی مولکول‌های القاء شده تحت تنش خیلی زودتر از اختلالات در غشاء پلاسمایی در سلول تجمع می‌یابند. به همین منظور اغلب تحمل به سرما براساس شاخص ELI تحت تأثیر دمای پایین‌تر یا طولانی‌تر یا تلفیقی از هر دو، مورد بررسی قرار می‌گیرد (Demin et al., 2008). با توجه به هدف این تحقیق که ارزیابی ژنوتیپ‌ها در جهت معرفی متحمل‌ترین آنها می‌باشد، یکی از دو ژنوتیپ ۴۳۲۲ و ۴۷۱۵ می‌توانند کاندیدای متحمل تلقی گردند. دلایل فوق‌الذکر اشاره می‌کند که روش ELI در این خصوص می‌تواند معیار دقیق تر تحمل به تنش سرما باشد. به همین منظور تیمار دمایی ۱۲- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه بر ژنوتیپ‌ها اعمال گردید. در ژنوتیپ ۴۳۲۲ میزان شاخص ELI حداکثر به ۴۴/۵۹ افزایش یافت در حالی که این شاخص در ژنوتیپ ۴۷۱۵ به ۵۵/۹۱ رسید. نتایج نشان می‌دهد که ژنوتیپ ۴۳۲۲ با میزان شاخص کمتر از ۵۰ دارای پتانسیل برگشت‌پذیری پس از طی دوره سرما می‌باشد در حالی که ژنوتیپ ۴۷۱۵ به علت خسارت شدید دیگر قادر به ادامه زندگی حتی پس از برگشت به شرایط دمایی طبیعی نمی‌باشد. در ارزیابی مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های نخود سیاه کلکسیون پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) کمترین خسارت سرما در این دو ژنوتیپ گزارش شد (Maleki & Chaichi, 2004). بنابراین نتایج مورفولوژیکی و تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ژنوتیپ ۴۳۲۲ و پس از آن ۴۷۱۵ به عنوان ژنوتیپ‌های کاندید متحمل به سرما در مطالعات بعدی در نظر گرفته می‌شوند.

نتایج این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ‌های نخود سیاه پاسخ‌های متفاوتی به تنش سرما داشته و تنوع بالایی در ژنوتیپ‌ها در شرایط طبیعی و تنش وجود دارد و شاخص‌های ELI و MDA می‌توانند به عنوان نشانگر تحمل به سرما محسوب گردند. همانطور که می‌دانید تنش‌های محیطی (ازجمله سرما) تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی متعددی در اندام‌های مختلف گیاه شامل برگ، ساقه، ریشه و یا در بخش‌های مختلف سلول همچون غشاء، کلروپلاست، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و غیره ایجاد می‌کند که مطالعه همه این عوامل در یک تحقیق مشکل به نظر می‌رسد و این موضوع کمی بودن صفت مقاومت گیاهان به سرما و

درگیری ژن‌های فراوان را نشان می‌دهد و در نتیجه بهبود اصلاح برای تحمل به سرما در گیاهان را با مشکل مواجه کرده است و جالب‌تر این که چالش‌های ذکر شده در صورتی قابل مطالعه و بررسی است که اثرات متقابل و همزمان یا متناوب تنش سرما از تنش‌های محیطی دیگر قابل تفکیک باشد. این مسائل لزوم تحقیقات مرحله‌ای را بیش از پیش ضروری می‌داند. در تحقیق حاضر به پایداری غشا به عنوان عامل مهم تحمل به تنش توجه شده است که به وسیله مقایسه میزان نفوذپذیری غشاء (EL) و میزان پراکسیداسیون غشاء (MDA) در شرایط دمایی نرمال و تنش انجام گرفت. در اندازه‌گیری MDA از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که همه آنها در واقع پایداری غشاء را برآورد می‌کند نه اندازه مطلق آن را. لیپیدهای ۱۸:۳ که بیشترین فراوانی را در سلول‌های برگی و بافت غشایی دارند، می‌توانند معیار مناسبی در برآورد میزان پراکسیداسیون چربی‌های غشایی باشند و بکارگیری آنها در منابع علمی متعدد خود گواه این مسئله است (Zhirov et al., 1982; Hepburn et al., 1986; Liu & Huang, 2000; Huang & Guo, 2005; Nayyar et al., 2005; Ma et al., 2009; Maali Amiri et al., 2007, 2010; Popov et al., 2010).

مطالعه در شرایط آزمایشگاهی و تحت تنش کوتاه‌مدت با حذف مشکلات محقق در شرایط مزرعه که همواره با تلفیقی از تنش‌ها رو به رو بوده و چرخه‌های یخزدگی و ذوب شدگی متعدد که به عنوان عاملی مزاحم در ارزیابی دقیق تحمل به سرما تلقی می‌گردد، می‌تواند به محققین در این زمینه کمک نماید. با این وجود مطالعات بیوشیمیایی و مولکولی دیگر نیز به موازات می‌تواند جزئیات بیشتری از مکانیسم‌های تحمل به سرما در نخود را مشخص سازد.

ژنوتیپ‌های نخود سیاه با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد مقاومت به تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده (Yadav et al., 2006; Canci & Toker, 2009) به عنوان منبع ژنتیکی غنی در برنامه‌های اصلاحی و معرفی ارقام، می‌توانند در تغییر فصل کاشت گیاه و محدوده پراکنش آن در ایران مؤثر باشند. همچنین ژنوتیپ‌های مقاوم یا حساس می‌توانند به عنوان نشانگر در ارزیابی تحمل به سرما در ارقام و جمعیت‌های نخود مورد استفاده قرار گیرند. توجه به خاستگاه جمع آوری نمونه‌های ۴۳۲۲ و ۴۷۱۵ نشان می‌دهد که آنها از منطقه سرد کشور (اردبیل) جمع آوری شده و ویژگی تحمل به سرما می‌تواند از نظر تکاملی در آنها توسعه یافته باشد که روشن شدن آن نیاز به مطالعات گسترده مولکولی دارد.

سپاسگزاری

از آقای دکتر محمدرضا چائی‌چی به جهت راهنمایی‌های ارزنده در انتخاب ژنوتیپ‌های نخود سیاه ایرانی و در اختیار نهادن اطلاعات مربوطه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abbo, S., Berger, J. & Turner, N. C. (2003). Evolution of cultivated chickpea: Four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Funct Plant Biol*, 30, 1081–1087.
2. Beck, E. H., Heim, R. & Hansen, J. (2004). Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *J Biosci*, 29, 449–459.
3. Campos, P. S., Quartin, V., Ramalho, J. C. & Nunes, M. A. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plant. *J of Plant Physiology*, 160, 283-292.
4. Canci, H. & Toker, C. (2009). Evaluation of yield criteria for drought and heat resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J Agronomy and Crop Science*, 195, 47-54.
5. Croser, J. S., Clarke, H. J., Siddique, K. H. M. & Khan, T. N. (2003). Low temperature stress: implications for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. *Critic Rev Pl Sci*, 22, 185-219.
6. Demin, I. N., Deryabin, A. N., Sinkevich, M. S. & Trunova, T. I. (2008). Insertion of cyanobacterial desA gene coding for Δ12-acyl-lipid desaturase increases potato plant resistance to oxidative stress induced by hypothermia. *Russian J of Plant Physiology*, 55, 710-720.
7. Heath, R. T. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetica and stoichoimetry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 125, 189-215.
8. Hepburn, H. A., Naylor, R. E. L. & Stokes, D. T. (1986). Electrolyte leakage from winter barley tissue as indicator of winter hardiness. *Ann Appl Biol*, 108, 164-65.

9. Huang, M. & Guo Z. (2005). Response of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. *Biologia Plantarum*, 49, 81-84.
10. Kaur, G., Kumar, S., Nayyar, H. & Upadhyaya, H. D. (2008). Cold Stress injury during the pod-filling phase in chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects on quantitative and qualitative components of seeds. *J Agronomy & Crop Science*, 194, 457–464.
11. Kingston-Smith, A. H., Harbinson, J., Williams, J. & Foyer, C. H. (1997). Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. *Plant Physiology*, 114, 1039-1046.
12. Leport, L., Turner, N. C., French, R. J., Barr, M. D., Duda, R., Davies, S. L., Tennant, D. F. & Siddique, K. H. M. (1999). Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a mediterranean-type environment. *European Journal of Agronomy*, 11, 279–291.
13. Leshem, Y. (1992). *Plant membranes: A biophysical approach to structure, development and senescence*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
14. Liu, X. & Huang, B. (2000). Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Sci*, 40, 503-510.
15. Los, D. A. & Murata, N. (1988). Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1394, 3–15.
16. Los, D. A. & Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimia et Biophysica Acta*, 1666, 142-157.
17. Ma, Y. Y., Zhang, Y. L., Shao, H. & Lu, J. (2010). Differential physio-biochemical responses to cold stress of cold-tolertant and non-tolarant grapes (Vitis L.) from China. *J Agronomy and Crop Science*, 3, 212-219.
18. Maali-Amiri, R., Goldenkova-Pavlova, I. V., Pchelkin, V. P., Tsydendambaev, V. D., Vereshchagin, A. G., Deryabin, A. N., Trunova, T. I., Los, D. A. & Nosov, A. M. (2007). Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the Δ12-desaturase gene from cyanobacterium. *Russian J Plant Physiol*, 54, 678-685.
19. Maali-Amiri, R., Yur'eva, N. O., Shimshilashvili, K. R., Goldenkova-Pavlova, I. V., Pchelkin, V. P., Kuznitsova, E. I., Tsydendambaev, V. D., Trunova, T. I., Los D. A., Salehi, G. & Nosov, A. M. (2010). Expression of acyl lipid-12-desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance of potato. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(3), (289-297).
20. Maleki Farahani, S. & Chaichi, M. R. (2004). Evaluation of freezing stress on chickpea (*Cicer arietinum* L.) ecotypes desi type). In: Proceedings of *the 8th Iranian Crop Production & Breeding Congress*, 25-27 Aug., The University of Guilan, Rasht, Iran, pp.231.
21. Maruyama, S. & Nakamura, Y. (1997). Photosynthesis, dark respiration and protein synthesis of rice leaves at low temperature analysis of ribulose-1,5- biphosphate carboxylase. *Jap J Crop Sci*, 66, 85–91.
22. Millan, T., Clarke, H.J., Siddique, K. H. M., Buhariwalla, H. K., Gaur, P. M., Kumar, J., Gil J., Kahl, G. & Winter, P. (2006). Chickpea molecular breeding: New tools and concepts. *Euphytica*, 147, 81-103.
23. Nayyar, H., Bains, T. & Kumar, S. (2004). Low temperature induced floral abortion in chickpea: *Relationship to abscisic acid and cryoprotectants in reproductive organs*. Department of Botany, Panjab University, Chandigarh 160014, India.
24. Nayyar, H., Bains, T. S. & Sanjeev K. (2005). Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany*, 54, 275-285.
25. Nayyar, H., Kaur S., Singh, S. & Upadhyaya, H. D. (2006). Differential sensitivity of desi (small-seeded) and kabuli (large-seeded) chickpea genotypes to water stress during seed filling: effects on accumulation of seed reserves and yield. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 86, 2076-2082.
26. Osamu, M. & Iba, K. (2005). Trienoic fatty acids and stress responses in higher plants. *Plant Biotechnol*, 22, 423–430.
27. Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A. & Stewart, C. R. (1994). Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6, 65–74.
28. Popov, V. N., Orlova, I. V., Kipaikina, N. V., Serebriiskaya, T. S., Merkulova, N. V., Nosov, A. M., Trunova, T. I., Tsydendambaev, V. D. & Los, D. A. (2005). The effect of tobacco plant transformation with a gene for acyl- lipid Δ9-desaturase from *Synechococcus vulcanus* on plant chilling tolerance. *Russian J Plant Physiol*, 52, 664–668.
29. Popov, V. N., Antipina, O. V., Trunova, T. I. (2010). Lipid Peroxidation during Low_Temperature Adaptation of Cold_Sensitive Tobacco Leaves and Roots. *Russian J Plant Physiology*, 57, 144–147.
30. Reddy, A. R., Chaitanya, K. V. & Vivekanandan, M. (2004). Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiol*, 161, 1189–1202.

31. Rossi, M., Germondari, I. & Casini, P. (1984). Comparison of chickpea cultivars: chemical composition, nutritional evaluation, and oligosaccharide content. *J Agri Food Chem*, 32, 811-814.
32. Ryan, J. (1997). A global perspective on pigeon pea and chickpea sustainable production systems: present status and future potential. In: *Recent Advances in Pulses Research* (Asthana, A. & M. Ali, eds) Kanpur, India: Indian Society for Pulses Research and Development, pp. 1-31.
33. Samach, A. & Wigge, P. A. (2005). Ambient temperature perception in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 483–486.
34. Simon, E. W. (1974). Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytol*, 73, 377–420.
35. Sin'kevich, M. S., Deryabin, A. N. & Trunova, T. I. (2009). Characteristics of oxidative stress in potato plants with modified carbohydrate metabolism. *Russian J Plant Physiology*, 56, 168-174.
36. Srinivasan, A., Johansen, C. & Saxena, N. P. (1998). Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): characterization of stress and genotypic variation in pod set. *Field Crops Res*, 57, 181-193.
37. Sukumaran, N. P. & Weiser, C. J. (1972). An excised leaflet test for evaluation Potato frost tolerance. *Hort Science*, 7, 467-468.
38. Toker C. (2005) Preliminary screening and selection for cold tolerance in annual wild Cicer species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 1–5.
39. Xin, Z. & Browse, J. (2000). Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ*, 23, 893–902.
40. Yadav, S. S., Kumar, J., Yadav, S. K., Singh, S., Yadav, V. S., Turner, N. C. & Redden, R. (2006). Evaluation of *Helicoverpa* and drought resistance in desi and kabuli chickpea. *Plant Genetic Resources*, 4, 198-203.
41. Zhirov, V. K., Merzlyak, M. N. & Kuznetsov, L. V. (1982). Peroxidation of membrane lipids in cold-resistant plants damaged by below-zero temperature. *Sov Plant Physiol*, 29, 1045–1052.