

DOR: 20.1001.1.23223243.2021.19.1.29.0

واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ژرم پلاسما وحشی و زراعی نخود (*Cicer spp.*) به تنش سرما
Physiological and biochemical responses of wild and cultivated chickpea (*Cicer spp.*)
germplasm to cold stress

معروف خلیلی^۱، همایون کانونی^۲ و کامبیز بهمنی^۳

چکیده

خلیلی، م. ه.، کانونی و ک. بهمنی. ۱۴۰۲. واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ژرم پلاسما وحشی و زراعی نخود (*Cicer spp.*) به تنش سرما. نشریه علوم زراعی ایران. ۲۵ (۱): ۸۷-۷۱.

این تحقیق به منظور بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های نخود به تنش سرما و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل در شرایط مزرعه و کنترل شده اجرا شد. در این تحقیق، ۱۰ ژنوتیپ نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.)، هشت ژنوتیپ نخود وحشی (*Cicer reticulatum*) و دو شاهد حساس (لاین ILC533) و متحمل به سرما (رقم سارال) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار به مدت دو سال زراعی (۹۹-۱۳۹۸ و ۱۴۰۰-۱۳۹۹) به صورت دیم در ایستگاه تحقیقات کشاورزی سارال کردستان مورد ارزیابی قرار گرفته و صفات مورفولوژیک و فنولوژیک آنها یادداشت برداری شدند. ژنوتیپ‌های نخود مورد ارزیابی در شرایط کنترل شده در اطاقک رشد در شرایط کاهش تدریجی دما نیز کشت شده و صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک آن‌ها ثبت شدند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های نخود مورد ارزیابی از لحاظ میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، نشت الکترولیت‌ها و محتوای کلروفیل b، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند. بر اساس نتایج تجزیه مسیر، وزن ۱۰۰ دانه و پس از آن پایداری غشاء و میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، بیشترین اثر مستقیم و مثبت را بر عملکرد دانه داشتند. نتایج این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ‌های پرمحصول FLIP 11-86C (۸۸۹/۶) کیلوگرم در هکتار) و FLIP 11-03C (۷۹۵/۷ کیلوگرم در هکتار) که در آزمایش مزرعه‌ای برتر بودند، در شرایط کنترل شده نیز دارای نمره تحمل به سرما برابر با ۳ و شاخص نشت الکترولیت‌ها متوسط بوده و به عنوان ژنوتیپ‌های برتر از نظر تحمل به سرما شناخته شدند.

واژه‌های کلیدی: پایداری غشاء، عملکرد دانه، فعالیت آنزیمی، نخود زراعی و نمره تحمل به سرما

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰ این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مشترک شماره ۹۸۱۰۱۹-۰۵۳-۱۵۵۱-۳-۵۳-۳ مصوب موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور و دانشگاه پیام نور می‌باشد

۱- دانشیار دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- دانشیار مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، سنندج، ایران
(مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: hkanouni@gmail.com)

۳- محقق مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، سنندج، ایران

مقدمه

دمای محیط، تعیین کننده پراکنش جغرافیایی گیاهان زراعی بوده و بر رشد و نمو آنها اثر مستقیم دارد. گیاهان فقط قادر هستند دماهای کمی بالاتر یا کمی پایین تر از حد بهینه برای رشد خود را تحمل نمایند. از بین تنش های غیر زیستی، خشکی و سرما شایع ترین عوامل تنش در زراعت نخود در نواحی معتدل و سرد مدیترانه ای محسوب می شوند (Mahajan and Tuteja, 2005).

رتبه بندی جهانی نخود نشان می دهد که ایران رتبه چهارم از لحاظ سطح زیر کشت، رتبه نهم از نظر میزان تولید و رتبه ۵۳ را از نظر عملکرد در واحد سطح دارا است (FAOSTAT, 2021). کشت نخود در نواحی معتدل و سردسیر معمولاً در بهار و پس از بارندگی های فصلی صورت می گیرد. در این شرایط گیاه با تنش خشکی انتهای فصل مواجه شده و تا حد زیادی از عملکرد آن کاسته می شود. یکی از راه های مقابله با این مسئله، کشت نخود در پاییز است. در این صورت ژنوتیپ مناسب برای کشت پاییزه باید به سرما و بیماری برق زدگی مقاوم باشد. نخود با دارا بودن ۱۹ تا ۲۶ درصد پروتئین خام، نقش مهمی در رژیم غذایی جمعیت رو به رشد کشور ایفا می کند (Kanouni, 2020). متوسط عملکرد نخود در کشت بهاره دیم مناطق سرد و معتدل سرد کشور پایین و در حدود ۴۴۰ کیلوگرم در هکتار است (Anonymous, 2022). استان های کرمانشاه، لرستان و آذربایجان غربی بیشترین سطح زیر کشت نخود سفید (تیپ کابلی) را دارا بوده و استان کردستان قطب تولید نخود سیاه (تیپ دسی) در کشور است (Kanouni, 2020). کشاورزان این استان ها نخود را در تناوب با گندم دیم و غالباً به صورت بهاره کشت می کنند. در این مناطق کشت بهاره نخود، پس از بارش بخش اعظم نزولات بهاره انجام شده و در چنین شرایطی عملکرد دانه به میزان قابل توجهی تحت تأثیر

تنش خشکی انتهای فصل قرار گرفته و از عملکرد آن کاسته می شود. تغییر تاریخ کاشت از بهار به پاییز می تواند نقش مهمی در افزایش عملکرد نخود در شرایط دیم داشته باشد (Hasanian-Khoshrou, 2021). از طرف دیگر، وقوع تنش سرما ممکن است تا بیش از ۵۰ درصد از عملکرد دانه نخود بکاهد (Abbo et al., 2002). با توجه به اهمیت این مسئله، سازوکارهای فیزیولوژیک گیاه نخود نسبت به خسارت تنش سرما مورد مطالعه قرار گرفته است (Amandeep et al., 2022; Zeitelhofer et al., 2022).

دلایل اصلی پایین بودن عملکرد دانه نخود در کشور استفاده از ارقام محلی حساس به تنش های زیستی و غیر زیستی، عدم رعایت اصول به زراعی و اختصاص اراضی دیم و کم بازده به کشت این گیاه است (Kanouni, 2016). بر اساس نتایج بررسی های انجام شده، سالیانه حدود ۶/۴ میلیون تن بر اثر تنش های غیر زیستی و حدود ۴/۸ میلیون تن در اثر تنش های زیستی از عملکرد دانه نخود کاسته می شود (Yadav et al., 2007). به ترتیب اهمیت، تنش های خشکی، دماهای بحرانی، شوری، سمیت ناشی از عناصر و غرقاب شدن مزارع، تنش های غیر زنده عمده ای هستند که باعث ایجاد خسارت به محصول نخود می شوند. سرما در برخی از نواحی غرب آسیا و شمال افریقا اهمیت زیادی داشته و خسارت قابل توجهی به عملکرد نخود وارد می سازد. تحقیق در مورد تحمل سرما در نخود از زمانی آغاز شد که مزیت تغییر کاشت آن از بهار به پاییز آشکار شد (Singh et al., 1997).

نتایج مقایسه کشت های پاییزه و بهاره نخود نشان داده است که در کشت پاییزه، هوادهی و نفوذپذیری خاک کاهش یافته و طغیان علف های هرز اتفاق می افتد و بروز بیماری های قارچی در برخی مناطق و خسارت یخ زدگی محتمل هستند. در مقابل فنولوژی مطلوب گیاه با فصل زراعی تطابق یافته، رطوبت خاک بطور مطلوبی ذخیره شده و امکان گریز از خسارت

یکی از گونه‌های یکساله بسیار متحمل به سرما در جنس *Cicer* است. تغییر در نفوذپذیری غشاء باعث نشت آب و مواد محلول به فضای بین سلولی و تبخیر و چروکیدگی سلول شده و به دنبال آن، اثرات دیگری مانند بسته شدن روزنه‌ها و کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه‌ها صورت می‌گیرد. در صورت تداوم سرما، نکروزه شدن بافت‌ها و در نهایت مرگ گیاه اتفاق می‌افتد. بر اساس نتایج تحقیق حسنین خوشرو (Hasanian-Khoshrou, 2021) در تنش سرمای ۴- درجه سانتی گراد، ژنوتیپ ILWC109 عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (Fv/Fm) بالاتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بود و کمتر تحت تأثیر تنش قرار گرفت.

هدف از انجام این تحقیق ارزیابی ژرم پلاسما وحشی و زراعی نخود برای شناسایی لاین‌های جدید متحمل به سرما و شناسایی منابع مقاومت برای انتقال ژن یا ژن‌های تحمل سرما به ارقام زراعی در تحقیقات آتی بوده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، به منظور شناسایی لاین (های) نخود متحمل به سرما، تعداد ۱۰ ژنوتیپ نخود زراعی تیپ کابلی انتخاب شده از خزانه بین المللی نخود متحمل به سرما (Chickpea International Cold Tolerance Nursery; CICTN-2018) (Nursery; CICTN-2018) (Kanouni, 2019) همراه با هشت ژنوتیپ نخود وحشی (*Cicer reticulatum*) جمع‌آوری شده از ناحیه جنوب ترکیه و دریافت شده از مرکز ایکاردا، یک لاین شاهد حساس به سرما (ILC533) و یک شاهد متحمل به سرما (رقم سارال) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار به مدت دو سال زراعی (۱۴۰۰-۱۳۹۸) در ایستگاه سارال کردستان کشت شدند. اسامی و مشخصات لاین‌های نخود در جدول ۲ ارائه شده است. ایستگاه سارال کردستان در طول جغرافیایی ۴۷ درجه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۵ و ارتفاع ۲۲۲۰ متر از سطح دریا قرار

آفات فراهم می‌شود. در کشت بهاره، هوادهی و نفوذپذیری خاک در اثر عملیات خاک‌ورزی افزایش یافته و کنترل علف‌های هرز به‌خوبی امکان‌پذیر است، ولی از معایب عمده کشت بهاره می‌توان به کاهش عملکرد دانه در اثر تأخیر در کاشت، وقوع تنش خشکی انتهای فصل، افزایش خطر تهاجم و خسارت آفات، وارد شدن خسارت به نظام نوری ۲ فتوسنتزی و کاهش پایداری غشای کلروپلاست که باعث کاهش فتوسنتز می‌شود، اشاره کرد (Toker, 2005).

برای تغییر زمان کاشت از بهار به پاییز، در گام نخست به ارقام متحمل به سرما نیاز است. جستجو در داخل ژرم پلاسما در دسترس با هدف ارزیابی، شناسایی و معرفی ارقام جدید که در برابر تنش سرما عکس‌العمل مطلوب‌تری داشته و ضمن تولید عملکرد دانه بالاتر نسبت به ارقام موجود، از وزن ۱۰۰ دانه و ارتفاع بوته مناسبی برخوردار باشند، به افزایش تولید نخود و بهبود وضعیت معیشتی کشاورزان نخودکار کمک خواهد کرد. به‌علاوه استفاده از خویشاوندان وحشی نیز می‌تواند سهم بالایی در امکان شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرما داشته باشد (Mafakheri et al., 2020).

نخود به دلیل تنگنای ژنتیکی و از دست دادن برخی آلل‌های حیاتی در طول دوره تکامل و اهلی شدن، توانایی مقابله با سرماهای سخت را ندارد. با این وجود، آلل‌های تحمل سرمای سخت زمستان و آلل‌های نیاز به بهاره شدن هنوز در اجداد وحشی نخود زراعی مانند *C. reticulatum* Ladiz وجود دارند (Abbo et al., 2003). خویشاوندان وحشی نخود به عنوان منبع تحمل به سرما برای دهه‌های متمادی شناخته شده‌اند (Toker, 2005). گزارش شده است که گونه‌های وحشی نخود در مقایسه با ارقام متحمل به سرما، تحمل معنی‌دار بالاتری نسبت به سرما دارند (Yadav et al., 2007) (جدول ۱). سینگ و همکاران (Singh et al., 1997) گزارش دادند که *C. reticulatum*

داشته و از یک اقلیم نیمه خشک سرد برخوردار است. میانگین بارندگی، حداقل و حداکثر دمای ماهانه متوسط بارندگی بلند مدت این ایستگاه ۵۰۲ میلی‌متر، متوسط درجه حرارت سالیانه آن ۱۰ درجه سانتی‌گراد و تعداد روزهای یخبندان ۱۳۸ روز گزارش شده است. هر کرت آزمایشی شامل سه ردیف دو متری و فواصل بذور بین و روی ردیف‌ها ۱۰×۳۰ سانتی‌متر بود.

جدول ۱- مشخصات تیپ مطلوب نخود برای تحمل تنش سرما

Table 1. Ideotype chickpea for cold tolerance (Yadav *et al.*, 2007)

Physiological traits	صفات فیزیولوژیک	Morphological traits	صفات مورفولوژیک
Leaf water potential with low tension	پتانسیل آب برگ با تنش کم	Rosette type at seedling stage	تیپ روزت در مرحله گیاهچه‌ای
High chlorophyll content	محتوای کلروفیل بالا	Dark green color of foliage	شاخساره سبز تیره
Proper osmotic adjustment	تنظیم اسمزی مناسب	Tolerance to freezing at vegetative stage (up to -15 °C) without snow cover	تحمل به یخ‌زدگی در مرحله رشد رویشی (تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد بدون پوشش برف)
Pollens with high viability vigor	دانه گرده با قدرت زنده‌مانی بالا	Extremely early repining for cold avoidance	فوق العاده زودرس برای اجتناب از سرمازدگی
High fertility capacity	ظرفیت باروری بالا	Cold tolerance at flowering stage (up to -5.1 °C)	تحمل سرمازدگی در مرحله گلدهی (تا ۵/۱- درجه سانتی‌گراد)
Remobilization of assimilates	انتقال مجدد مواد پرورده	With two or more flowers in each node and multi-seed bearing pods	تشکیل دو یا چند گل در هر گره و غلاف‌های چند بذری
High malic acid content	محتوای اسید مالیک بالا	-	-

جدول ۲- اسامی و مشخصات ژنوتیپ‌های نخود مورد ارزیابی

Table 2. Name and characteristics of chickpea genotypes used in the experiment

ردیف	ژنوتیپ‌های نخود	زراعی/ غیرزراعی	مشخصات	منشاء
No.	Chickpea genotype	Cultivated/ Wild	Characteristics	Origin
1	FLIP 10-374C	Cultivated (C) زراعی	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکارد
2	FLIP 11-03C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکارد
3	FLIP 11-56C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکارد
4	FLIP 11-59C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکارد
5	FLIP 11-60C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکارد
6	FLIP 11-62C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکارد
7	FLIP 11-63C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکارد
8	FLIP 11-86C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکارد
9	FLIP 11-127C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکارد
10	FLIP 11-201C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکارد
11	ILWC 135	Wild (W) وحشی	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
12	ILWC 136	W	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
13	ILWC 137	W	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
14	ILWC 138	W	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
15	ILWC 139	W	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
16	ILWC 141	W	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
17	ILWC 182	W	Latitude: 37.57 Longitude: 40.97 (Turkey)	ترکیه
18	ILWC 216	W	Latitude: 37.37 Longitude: 40.80 (Turkey)	ترکیه
19	ILC 533-Sensitive control	شاهد حساس به سرما	Cold Susceptible check (ICARDA)	ایکارد
20	Saral-Tolerant control	شاهد متحمل به سرما	Cold Tolerant check	ایکارد

International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)

اطافک سرما در دانشگاه پیام نور مهاباد کشت شدند. ترکیب خاک گلدان‌ها یک سوم کود آلی و دو سوم خاک مزرعه با بستر لومی رسی بود. گلدان‌ها در شرایط کنترل شده و کاهش تدریجی دما قرار داده شدند. دمای اطافک سرما با گیاهچه‌های دو برگی در دمای ثابت شب و روز ۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و در هفته اول دمای آن هر روز ۳ درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد. پس از چهار برگی شدن بوته‌ها، به مدت دو هفته در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و صفات پایداری غشای سلولی، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، محتوای کلروفیل a، b و کل، میزان نشت الکترولیت‌ها و محتوای آب نسبی برگ اندازه‌گیری و ثبت شدند. در مرحله نهایی گیاهچه‌های سازش یافته همراه با شاهد‌های حساس و متحمل به سرما به مدت دو ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و مقدار دمای آستانه برای از بین رفتن ۵۰ درصد بوته‌ها (Semi-lethal temperature; LT₅₀) برای هر ژنوتیپ مشخص شد (Fowler et al., 1981). محتوای آب نسبی برگ (RWC) با استفاده از روش ریچی و همکاران (Ritchie et al., 1990) اندازه‌گیری شد.

صفات گیاهی یادداشت برداری شده در مزرعه شامل تعداد روز تا گلدهی، تعداد روز تا رسیدگی، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف، وزن ۱۰۰ دانه و عملکرد دانه بودند. برای ارزیابی تحمل سرما (Cold Tolerance Rate; CTR)، از روش مقیاس‌بندی عددی یک تا نه استفاده شد (Singh et al., 1997). در این روش ژنوتیپ‌های بسیار متحمل بدون هر گونه خسارت با نمره ۱، ژنوتیپ‌های متحمل با خسارت جزئی و ۲۰-۱۱ درصد خسارت با علائم رنگ‌پریدگی برگچه‌ها و عدم از بین رفتن بوته‌ها با عدد ۳، ژنوتیپ‌های متحمل با ۶۰-۴۱ درصد خسارت با علائم رنگ‌پریدگی برگچه‌ها و خشکی و مرگ ۲۵ درصد از بوته‌ها با عدد ۵، ژنوتیپ‌های حساس با ۸۰-۶۱ درصد خسارت با علائم رنگ‌پریدگی برگچه‌ها و خشکی و مرگ ۵۰ درصد از بوته‌ها با عدد ۷، و ژنوتیپ‌های بسیار حساس با مرگ ۱۰۰ درصد بوته‌ها با عدد ۹ مشخص می‌شوند. اعداد ۲، ۴، ۶ و ۸ نیز به عنوان حد واسطه در نظر گرفته می‌شوند. ژنوتیپ‌های نخود علاوه بر مزرعه به صورت گلدانی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در

جدول ۳- اطلاعات هواشناسی ایستگاه تحقیقات کشاورزی سارال (۱۴۰۰-۱۳۹۸)

Table 3. Meteorological information of Saral experiment station (2019-2021)

		۱۳۹۹-۱۳۹۸ 2019-2020			۱۴۰۰-۱۳۹۹ 2020-2021		
Months	ماه	دمای حداقل Min. Temp. (°C)	دمای حداکثر Max. Temp. (°C)	بارندگی Precipitation (mm)	دمای حداقل Min. Temp. (°C)	دمای حداکثر Max. Temp. (°C)	بارندگی Precipitation (mm)
Oct.	اکتبر	1.4	29.1	13.4	7.6	21.3	0
Nov.	نوامبر	-9.1	17.7	26.3	3.7	16.0	53.5
Dec.	دسامبر	-13.5	13.5	80.1	-1.7	4.2	31.5
Jan.	ژانویه	-12.5	10.3	26.1	-3.4	6.5	7.0
Feb.	فوریه	-18.1	12.7	23.4	-3.2	6.4	52
Mar.	مارس	-7.8	18.3	99.3	-0.6	8.6	17
Apr.	آوریل	-3.7	19.4	47.3	1.1	12.3	15.8
May	می	-1.6	27.0	79.4	8.1	22.0	4.0
Jun.	ژوئن	3.4	32.5	0	12.3	28.3	0
Jul.	ژوئیه	11.2	33.6	0	14.3	27.7	0
Aug.	اوت	16.3	37.5	0	19.8	29.2	0
Sep.	سپتامبر	14.7	31.1	0	18.4	27.4	1.9

Total precipitation in 2019-2020: 395.6 mm

Total precipitation of 2020-2021: 182.7 mm

مجموع نزولات سال ۱۳۹۹: ۳۹۵/۶ میلی‌متر

مجموع نزولات سال ۱۴۰۰: ۱۸۲/۷ میلی‌متر

رابطه یک به دست آمد (Hepburn *et al.*, 1986).

$$EL\% = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$
 برای تعیین میزان کلروفیل، میزان جذب محلول استون حاوی کلروفیل در طول موج‌های ۶۴۵ نانومتر (برای کلروفیل a) و ۶۶۳ نانومتر (برای کلروفیل b) در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شدند. محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل با استفاده از روابط زیر بدست آمدند (Ashraf *et al.*, 1994):

برای اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها ۲۴ ساعت پس از قرار دادن گیاهچه‌ها در معرض تنش سرما، برگ چهارم (آخرین برگ توسعه یافته) جدا شده و در بشر حاوی آب دوبار تقطیر قرار داده شده و هدایت الکتریکی آن با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری هدایت الکتریکی (EC متر) اندازه‌گیری شد (EC_1). پس از ۲۴ ساعت، مجدداً هدایت الکتریکی محلول اندازه‌گیری (EC_2) و نشت الکترولیت‌ها با استفاده از

(رابطه ۲) $V (1000 \times W) - ((\text{جذب در } 145 \text{ نانومتر}) - 2/69) = (\text{جذب در } 633 \text{ نانومتر}) (12/7) = \text{میلی گرم کلروفیل a بر گرم وزن تر}$
 (رابطه ۳) $V (1000 \times W) - ((\text{جذب در } 663 \text{ نانومتر}) - 4/69) = (\text{جذب در } 645 \text{ نانومتر}) (22/9) = \text{میلی گرم کلروفیل b بر گرم وزن تر}$
 (رابطه ۴) $V (1000 \times W) - ((\text{جذب در } 663 \text{ نانومتر}) - 8/02) - (\text{جذب در } 645 \text{ نانومتر}) (20/2) = \text{میلی گرم کلروفیل a و b بر گرم وزن تر}$

استفاده از رابطه زیر تعیین شد (Chance and Maehly, 1955).

(رابطه ۶) $\frac{\Delta A}{0.01} \times 100 = \text{فعالیت آنزیم پراکسیداز}$
 ΔA : اختلاف بیشترین و کمترین میزان جذب است.
 برای اندازه‌گیری شاخص پایداری غشاء، هدایت نهایی آب حاوی نمونه‌ها اندازه‌گیری و میزان خسارت با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Blum and Ebercon, 1981).

V: حجم نهایی نمونه استخراج شده و W: وزن تر نمونه هستند.

برای تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از روش چانس و ماهلی استفاده شد (Chance and Maehly, 1955).
 (رابطه ۵) $\frac{\Delta A}{39.4} \times 100 = \text{فعالیت آنزیم کاتالاز}$
 برای تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش چانس و ماهلی (۱۹۵۵) استفاده شده و پس از آن فعالیت پراکسیداز براساس میزان اکسید شدن گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر با

$$(\text{رابطه ۷}) \quad 1 - \left(1 - \frac{T_1}{T_2} \frac{C_1}{C_2}\right) \times 100 = \text{میزان خسارت غشای سلولی (\%)} \quad (7)$$

T و C: به ترتیب هدایت الکتریکی در تیمار تنش و شاهد بوده و اندیس‌های ۱ و ۲ به ترتیب نشان دهنده هدایت الکتریکی اولیه و نهایی هستند. محتوای پرولین با استفاده از روش بیتس و همکاران (Bates *et al.*, 1973) اندازه‌گیری شد.

تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها، همبستگی بین صفات، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزارهای STATGRAPHICS Centurion و 17.2 SAS انجام شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس آزمایش گلدانی نشان داد که ژنوتیپ‌های نخود از نظر پایداری غشاء، محتوای پرولین، محتوای آب نسبی برگ، فعالیت آنزیم کاتالاز، نشت الکترولیت‌ها، دمای آستانه برای از بین رفتن ۵۰ درصد بوته‌ها (LT_{50})، محتوای کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح احتمال پنج درصد و از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز، نمره تحمل سرما و محتوای کلروفیل a در

سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری داشتند. نتایج مقایسات گروهی برای ژنوتیپ‌های زراعی، ژنوتیپ‌های وحشی و زراعی در برابر وحشی نشان داد که در ژنوتیپ‌های زراعی از لحاظ فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، پایداری غشاء، نشت الکترولیت‌ها و محتوای کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد و از نظر میزان پرولین، LT_{50} ، محتوای کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در ژنوتیپ‌های وحشی فقط از نظر محتوای آب نسبی برگ و نشت الکترولیت‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. بین ژنوتیپ‌های زراعی و وحشی از نظر LT_{50} و کلروفیل کل در سطح احتمال پنج درصد و از لحاظ نشت الکترولیت‌ها در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. نتایج تجزیه واریانس مرکب صفات زراعی طی دو سال زراعی ۹۹-۱۳۹۸ و ۱۴۰۰-۱۳۹۹ نشان داد که تفاوت بین ژنوتیپ‌های نخود از لحاظ ارتفاع بوته، تعداد غلاف در بوته، وزن ۱۰۰ دانه و عملکرد دانه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. برهمکنش سال در ژنوتیپ فقط برای ارتفاع بوته در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. به نظر می‌رسد که اختلاف بیش از ۲۰۰ میلی‌متر بارندگی در دو سال اجرای آزمایش (جدول ۳) از دلایل اصلی این تفاوت بوده است. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در آزمایش مزرعه‌ای ژنوتیپ‌های نخود برای صفات تعداد روز از کاشت تا ۵۰ گلدهی و رسیدگی کمترین میزان تنوع را داشتند. برای تعداد روز از کاشت تا ۵۰ درصد گلدهی، ژنوتیپ‌های ۸ و ۱۲ با دو روز اختلاف به ترتیب کمترین و بیشترین تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی را داشتند. ژنوتیپ‌های ۱۷ و ۱۰ با پنج روز اختلاف به ترتیب کمترین و بیشترین تعداد روز تا رسیدگی را داشتند. از لحاظ ارتفاع بوته، ژنوتیپ ۶ (۳۲/۳ سانتی‌متر) بیشترین و ژنوتیپ ۱۶ (۱۹/۴ سانتی‌متر) کمترین ارتفاع بوته را داشتند. بین ژنوتیپ‌های نخود از نظر تعداد غلاف در بوته تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای وجود داشت (جدول ۴). رقم

سارال بیشترین (۳۴/۷) و ژنوتیپ شماره ۱۸ کمترین (۱۲/۵) تعداد غلاف در بوته را داشتند. از نظر تعداد دانه در غلاف، تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های نخود وجود نداشت. برای وزن صد دانه نیز تنوع قابل ملاحظه‌ای بین ژنوتیپ‌های نخود وجود داشت (جدول ۴). ژنوتیپ‌های ۳ بیشترین (۴۰/۵ گرم) و ۱۳ کمترین (۲۳/۹ گرم) وزن صد دانه را داشتند. از لحاظ عملکرد دانه، ژنوتیپ‌های زراعی آشکارا عملکرد بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های وحشی داشتند. علی‌رغم این موضوع، ژنوتیپ‌های کم محصول مانند ژنوتیپ شماره ۳ (FLIP 11-56C) با عملکرد ۲۸۰/۴ کیلوگرم در هکتار و ژنوتیپ‌های پر محصول مانند ژنوتیپ ۸ (FLIP 11-86C) با عملکرد ۸۸۹/۶ کیلوگرم در هکتار و ژنوتیپ ۲ (FLIP 11-03C) با عملکرد ۷۹۵/۷ کیلوگرم در هکتار، متعلق به ژنوتیپ‌های زراعی بودند. نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های نخود از لحاظ کلیه صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تنوع وجود داشت. کمترین و بیشترین میزان پایداری غشاء به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های ۳ و ۱ بود. از لحاظ محتوای پرولین، ژنوتیپ ۲ دارای بیشترین (۳۰/۵ میکرومول بر گرم وزن تر) و شاهد حساس به سرما (ILC 553) دارای کمترین (۲۰/۵ میکرومول بر گرم وزن تر) مقدار بودند. از لحاظ فعالیت آنزیم پراکسیداز، نتیجه برعکس بود و ژنوتیپ‌های ۲ (۱۸/۰ میلی‌گرم بر گرم) و ۱۹ (۳۱/۱ میلی‌گرم بر گرم) به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار فعالیت پراکسیداز را داشتند. کمترین و بیشترین محتوای آب نسبی برگ به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های ۱۶ (۴۷ درصد) و ۱۲ (۶۹ درصد) بودند. کمترین و بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های ۹ (۱۱/۷ میلی‌گرم بر گرم) و ۷ (۱۸/۰ میلی‌گرم بر گرم) بودند. از لحاظ نمره تحمل سرما ژنوتیپ وحشی ۱۱ بیشترین و ژنوتیپ ۵ کمترین تحمل سرما را داشتند (جدول ۴).

در رابطه با نشت الکترولیت‌ها، ژنوتیپ‌های ۳ و ۲ به ترتیب کمترین (۴۷/۳) و بیشترین (۸۹/۶ درصد) میزان نشت الکترولیت‌ها را داشتند. پایین

معنی دار و با تعداد دانه در غلاف مثبت و معنی دار بود (جدول ۵).

بر اساس نتایج تجزیه همبستگی، بین میزان پرولین و تعداد روز تا گلدهی رابطه مثبت و معنی داری وجود داشت. همبستگی مثبت بین محتوای پرولین و تعداد روز تا گلدهی در سایر تحقیقات نیز گزارش شده است (Tarinejad et al., 2020; Zeitelhofer et al., 2022). همبستگی بین LT_{50} و فعالیت آنزیم پراکسیداز منفی و معنی دار و همبستگی بین پایداری غشاء و تعداد غلاف در بوته منفی و معنی دار بود (جدول ۵).

عملکرد دانه با تعداد روز از کاشت تا گلدهی و فعالیت آنزیم پراکسیداز همبستگی منفی و معنی دار داشت. رابطه منفی بین عملکرد دانه و تعداد روز تا گلدهی در سایر تحقیقات نیز گزارش شده است (Yadav et al., 2007; Singh et al., Rakei et al., 2016; 1997). به علاوه عملکرد دانه با LT_{50} در سطح احتمال پنج درصد و با وزن ۱۰۰ دانه در سطح احتمال یک درصد همبستگی معنی داری داشت، بنابراین در گزینش ژنوتیپ‌های نخود متحمل به سرما می‌توان شاخص LT_{50} و فعالیت آنزیم پراکسیداز را مورد توجه قرار داد. نتایج تحقیقات نشان داده است که فعالیت آنزیمی در ارقام متحمل به سرما بیشتر است (Rakei et al., 2016; Yadav et al., 2007). بنا به گزارش مانتری و همکاران (Mantri et al., 2007) آنزیم کاتالاز نقش مهمی در تحمل سرما در گیاهان دارد. نتایج آزمایش آنان روی دو رقم نخود متحمل و حساس به سرما نشان داد که بعد از تنش سرما، فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم متحمل بیشتر از رقم حساس بود. براساس نتایج آزمایش حاضر به نظر می‌رسد که در شرایط مزرعه می‌توان از زودرسی (تعداد روز تا گلدهی) و وزن ۱۰۰ دانه جهت افزایش عملکرد دانه استفاده کرد. به علاوه فعالیت آنزیم پراکسیداز، نشت الکترولیت و محتوای کلروفیل b نیز سهم قابل توجهی در تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخود مورد بررسی داشتند (جدول ۴).

بودن میزان نشت الکترولیت‌ها نشان‌دهنده تحمل بالاتر ژنوتیپ به تنش سرما است (Arslan et al., 2018). نتایج نشان داد که ژنوتیپ ۳ (FLIP 11-56C) دارای تحمل سرما مطلوب و نشت الکترولیتی پایین (۴۷/۳ درصد) بود که نشان دهنده تحمل بالای این ژنوتیپ به تنش سرما بود. مقدار دمایی که در آن پنجاه درصد بوته‌ها بر اثر سرما از بین می‌روند، (LT_{50}) برای ژنوتیپ ۲ بالاترین مقدار (۴/۷۰- درجه سانتی گراد) و برای ژنوتیپ ۱۸ پایین‌ترین مقدار (۱۸/۹۰- درجه سانتی گراد) بود. در مورد محتوای کلروفیل a، کمترین مقدار در ژنوتیپ ۶ (۷/۸ میلی گرم) و بیشترین مقدار در ژنوتیپ ۸ (۱۱/۹ میلی گرم) به دست آمد. محتوای کلروفیل b، در محدوده ۴/۳-۶/۲ میلی گرم قرار داشت و کمترین مقدار آن در ژنوتیپ ۱۲ و بیشترین مقدار آن در ژنوتیپ ۸ مشاهده شد. میزان کلروفیل کل نیز در محدوده ۱۴/۶ میلی گرم (ژنوتیپ ۱۵) تا ۱۶/۸ میلی گرم (ژنوتیپ ۱۲) قرار داشت (جدول ۴). بر اساس نتایج تحقیقات قبلی محتوای کلروفیل a و b به شرایط تنش‌های غیرزیستی حساس بوده و در تنش سرما کاهش می‌یابند (Amini et al., 2021; Abdollahi Hesar et al., 2022).

نتایج تجزیه همبستگی نشان داد که وزن ۱۰۰ دانه با تعداد دانه در غلاف همبستگی منفی و معنی داری داشت. رابطه بین تعداد دانه در غلاف و نمره تحمل سرما منفی و معنی دار بود. رابطه تعداد غلاف در بوته با تعداد روز تا گلدهی مثبت و معنی دار و ارتفاع بوته با تعداد روز از کاشت تا رسیدگی مثبت و معنی دار بود. کلروفیل a با کلروفیل b و کلروفیل کل همبستگی مثبت و معنی داری داشت. رابطه بین کلروفیل a و نشت الکترولیتی نیز مثبت و معنی دار، ولی همبستگی آن با فعالیت آنزیم کاتالاز منفی و معنی دار بود. این موضوع در تحقیق مشابهی گزارش شده است (Croser et al., 2003). همبستگی کلروفیل b با کلروفیل کل و نشت الکترولیت‌ها مثبت و معنی دار و همبستگی آن با فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و تحمل سرما منفی و معنی دار بود. رابطه کلروفیل کل با ارتفاع بوته منفی و

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات و شاخص‌های گیاهی ژنوتیپ‌های زراعی و وحشی نخود در تیمار تنش سرما

Table 4. Mean comparison of plant traits and indices of cultivated and wild chickpea genotypes in cold stress treatment

ژنوتیپ‌های نخود Chickpea genotypes	عملکرد دانه Seed yield (kg.ha ⁻¹)	وزن ۱۰۰ دانه 100 Seed weight (g)	غلظت در بوته Pod.plant ⁻¹	ارتفاع بوته Plant ht. (cm)	کلروفیل کل Total chl. (mg.g ⁻¹ FW)	کلروفیل b Chl.b (mg.g ⁻¹ FW)	کلروفیل a Chl.a (mg.g ⁻¹ FW)	LT ₅₀ (°C)	نشت الکترولیت ELI (%)	نمره تحمل سرما CTR	کاتالاز CATL (mg/g)	محتوای آب نسبی RWC (%)	پراکسیداز PROX (mg/g)	پروлін Proline (μmol g ⁻¹ FW)	پایداری غشاء Membrane stability Index (%)
1	639.2	34.8	13.6	20.3	14.8	4.9	9.6	-13.8	72.1	3.0	14.6	50.0	29.7	26.5	68.0
2	795.7	36.7	15.0	22.9	16.6	5.8	12.0	-4.7	89.6	3.3	13.8	62.6	18.0	30.5	43.2
3	280.4	40.5	14.9	22.7	15.4	4.7	10.6	-15.8	47.3	3.0	15.1	56.6	28.3	22.8	18.4
4	729.2	37.2	15.9	23.7	14.7	5.2	10.4	-13.3	69.4	3.3	15.3	53.6	27.3	27.3	59.6
5	507.7	33.5	15.5	26.3	14.8	4.5	10.3	-10.2	64.4	8.3	11.9	58.0	22.7	20.9	71.1
6	632.9	40.0	13.4	32.3	13.7	5.2	7.8	-12.4	50.6	3.0	14.7	57.6	24.8	24.3	59.3
7	777.2	36.5	16.0	20.4	15.0	4.4	9.9	-17.0	67.6	4.0	18.0	61.0	22.5	25.2	64.5
8	889.6	38.5	14.0	22.7	16.8	6.2	11.9	-11.9	66.7	3.0	12.0	59.3	23.3	20.4	49.8
9	746.9	39.0	15.1	23.0	16.0	5.4	10.6	-12.7	81.6	5.3	11.7	69.3	24.7	25.5	39.0
10	459.5	35.5	13.6	22.9	15.2	4.6	10.5	-13.6	76.1	6.6	15.0	54.0	27.0	25.1	61.2
11	490.9	25.0	14.6	24.8	15.5	4.8	10.6	-14.0	87.3	1.6	16.0	51.6	29.7	27.8	62.6
12	440.2	24.1	14.9	21.2	16.8	4.3	10.1	-13.5	48.0	3.3	15.0	69.0	28.3	27.9	52.1
13	448.4	23.9	14.0	23.1	15.9	5.0	10.8	-14.3	77.4	2.3	14.5	63.3	28.7	25.8	57.9
14	519.1	26.8	13.6	26.5	15.9	5.3	11.1	-18.7	54.2	4.0	14.5	65.6	26.4	26.4	66.6
15	537.9	25.2	14.3	20.1	14.6	4.4	10.2	-12.4	75.2	8.3	14.8	58.3	25.8	29.6	34.2
16	529.3	25.7	12.7	19.4	16.2	5.9	10.2	-13.4	64.6	3.6	15.0	47.0	21.8	24.5	46.1
17	299.1	24.7	14.8	21.6	16.4	5.6	11.1	-16.7	87.5	2.3	14.0	63.3	24.1	22.1	52.6
18	482.2	25.5	12.5	24.2	16.4	6.0	11.0	-18.9	76.3	2.0	13.3	49.0	24.3	26.0	29.4
19	478.6	36.9	14.2	21.7	15.2	4.3	9.6	-15.2	63.9	3.0	15.1	68.6	31.1	20.5	49.5
20	529.3	33.9	34.7	21.4	15.8	5.2	10.5	-11.0	76.7	3.3	15.1	62.3	26.5	29.6	30.2
LSD _{5%}	253.8	5.3	2.7	3.7	1.6	1.18	1.58	-6.2	25.1	2.4	2.8	13.1	5.2	5.8	27.7
Min	68.7	20.1	9.4	11.3	13.2	2.75	6.61	-19.5	41.3	1.0	11.0	41.0	17.4	17.8	16.4
Max	1400	52.3	37.4	35.0	18.0	6.9	12.2	12.2	96.5	9.0	18.9	73.0	32.8	32.6	91.9
Mean±SE	562±25.8	32.19±0.69	15.3±0.46	23.09±0.43	15.6±0.15	5.1±0.11	10.4±0.15	-13.7± 0.56	70.6± 2.3	3.8± 0.29	14.52±0.26	59.03±1.25	25.7± 0.53	25.4±0.53	51.7±2.48
CV (%)	50.3	23.7	32.9	20.5	18.0	16.3	11.3	31.8	24.9	57.9	13.6	16.3	16.0	16.0	37.1

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین صفات و شاخص‌های گیاهی ژنوتیپ‌های زراعی و وحشی نخود در تیمار تنش سرما

Table 5. Correlation coefficients between plant traits and indices of cultivated and wild chickpea genotypes in cold stress treatment

صفات و شاخص‌های گیاهی Plant traits/ indices	CLPA	CLPB	CLPT	CATL	CTR	DF	DM	ELI	LT ₅₀	MSI	PHT	PPP	PROX	PROL	RWC	SPP	SW
CLPB	0.488*																
CLPT	0.763**	0.516*															
CATL	-0.362*	-0.459*	-0.329														
CTR	-0.079	-0.401*	-0.354	-0.241													
DF	-0.052	-0.199	0.116	0.245	-0.088												
DM	-0.282	-0.033	-0.287	0.276	-0.096	0.034											
ELI	0.544**	0.396*	0.319	-0.239	-0.061	-0.139	-0.170										
LT ₅₀	0.136	0.083	0.006	-0.302	0.284	0.092	0.093	0.297									
MSI	-0.211	-0.131	-0.257	0.081	0.028	-0.126	0.108	0.006	-0.171								
PHT	-0.328	0.102	-0.393*	-0.223	-0.047	-0.197	0.460*	-0.276	0.025	0.333							
PPP	0.040	-0.046	0.024	0.119	-0.021	0.463*	-0.013	0.119	0.252	-0.364*	-0.154						
PROX	-0.335	-0.537**	-0.259	0.296	-0.212	0.214	0.136	-0.266	-0.429*	0.055	-0.047	0.039					
PROL	0.109	-0.028	0.029	0.307	0.002	0.454*	0.205	0.216	0.296	-0.161	-0.149	0.332	-0.048				
RWC	0.113	-0.264	0.255	-0.143	0.061	-0.005	-0.342	-0.095	0.082	-0.150	0.007	0.201	0.061	-0.049			
SPP	0.219	0.298	0.488*	-0.077	-0.441*	-0.275	0.013	0.251	-0.195	-0.099	-0.093	0.234	0.217	0.285	0.281		
SW	-0.201	-0.019	-0.357	-0.109	0.091	-0.239	0.037	-0.143	0.328	-0.159	0.222	0.129	-0.118	-0.278	0.086	-0.484*	
YLD	0.101	0.302	-0.038	-0.164	0.073	-0.387*	-0.077	0.284	0.438*	0.189	0.041	-0.006	-0.453*	0.145	0.017	-0.037	0.496**

* and **: Significant at 5 and 1% percent probability levels, respectively

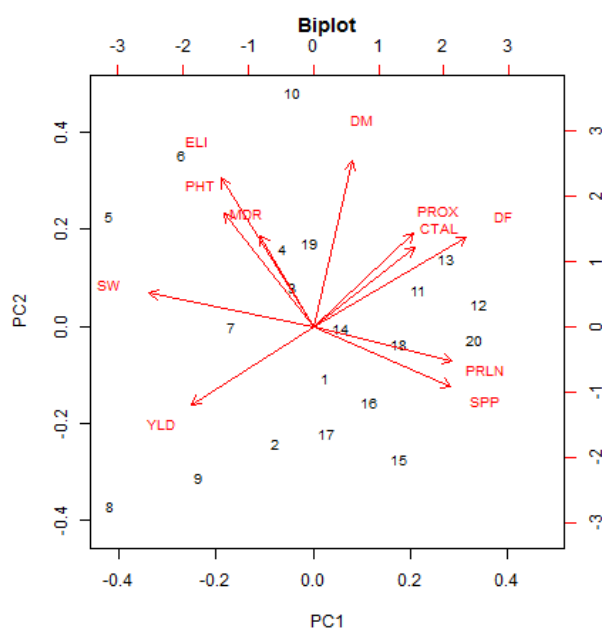
* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

CLPA: کلروفیل a، CLPB: کلروفیل b، CLPT: کلروفیل کل، CATL: کاتالاز، CTR: نمره تحمل سرما، DF: روز از کاشت تا رسیدگی، ELI: نشت الکترولیت، LT₅₀: دمای آستانه از بین رفتن ۵۰ درصد بوته‌ها، MSI: پایداری غشاء، PHT: ارتفاع بوته، PPP: تعداد غلاف در بوته، PROX: پراکسیداز، PROL: پرولین، RWC: محتوی آب نسبی برگ، SPP: تعداد دانه در غلاف، SW: وزن ۱۰۰ دانه، YLD: عملکرد دانه
CLPA: Chlorophyll a, CLPB: Chlorophyll b, CLPT: Total chlorophyll, CATL: Catalase, CTR: Cold tolerance rate, DF: Days to flowering, DM: Days to maturity, ELI: Electrolyte leakage index, LT₅₀: 50% Lethal temperature, MSI: Membrane stability index, PHT: Plant height, PPP: Pod.plant⁻¹, PROX: Peroxidase, PROL: Proline, RWC: Relative water content, SPP: Seed.pod⁻¹, SW: 100 Seed weight, YLD: Seed yield

وزنی هر کدام از متغیرها در مؤلفه های اصلی را به صورت ضرایب همبستگی نیز روی نمودار نشان داد. اولین مؤلفه اصلی ۲۷/۲۳ درصد از کل واریانس را در بر گرفته و با مقادیر فعالیت آنزیم کاتالاز، پرولین، فعالیت آنزیم پراکسیداز و همچنین با تعداد روز تا گلدهی و تعداد دانه در غلاف همبستگی مثبت و بالایی داشت. این مؤلفه با نشأت الکترولیت ها و پایداری غشاء از یک طرف و با عملکرد دانه و وزن ۱۰۰ دانه از طرف دیگر، همبستگی منفی داشت، بنابراین از این مؤلفه می توان برای تفکیک ژنوتیپ های پرمحصول از ژنوتیپ های با عملکرد پایین استفاده کرد. دومین مؤلفه اصلی، ۲۰/۶۲ درصد از تغییرات ماتریس داده ها توجیه کرده و با تعداد روز از کاشت تا رسیدگی همبستگی مثبت داشت. سمت و زاویه بین خطوط مربوط به هر متغیر، همبستگی بین آنها را نشان داده و طول خطوط، انحراف معیار هر کدام از متغیرها را نشان می دهد. این بای پلات نشان می دهد که ژنوتیپ های ۹ (FLIP 11-127C)، ۲ (FLIP 11-03C)، ۸ (FLIP 11-86C) و ۷ (FLIP 11-63C) عملکرد بالایی در شرایط تنش سرما در کشت پاییزه داشتند (شکل ۱).

ژنوتیپ ۳ (FLIP 11-56C) با دارا بودن نمره تحمل سرما برابر با ۳ و LT_{50} حدود ۱۶- درجه سانتی گراد، از خصوصیات مناسبی به عنوان ژنوتیپ متحمل به سرما و یخبندان برخوردار بود، ولی عملکرد دانه آن پایین بود (جدول ۴). بنابراین از این ژنوتیپ می توان به عنوان منبع تحمل به تنش سرما در تحقیقات آینده استفاده کرد. ژنوتیپ های پرمحصول FLIP 11-86C (با عملکرد دانه ۸۸۹/۶ کیلوگرم در هکتار) و FLIP 11-03C (با عملکرد دانه ۷۹۵/۷ کیلوگرم در هکتار) دارای نمره تحمل سرما برابر با ۳ و نشأت الکترولیتی متوسط بودند و به عنوان ژنوتیپ های برتر در این تحقیق شناخته شدند.

نمودار بای پلات روابط بین ژنوتیپ ها با متغیرهای آزمایش را در یک شکل واحد نشان می دهد. برای این- کار، ابتدا ماتریس داده های جدول ۴ به مؤلفه های اصلی آن تجزیه شد. نتایج تجزیه به مؤلفه های اصلی نشان داد که دو مؤلفه اصلی اول و دوم حدود ۴۸ درصد از تغییرات داده ها را توجیه کردند، بنابراین ترسیم بای پلات بر اساس این دو مؤلفه که نسبت به هم حالت اورتوگونال دارند (مستقل از هم هستند) انجام شد. به علاوه می توان مقادیر

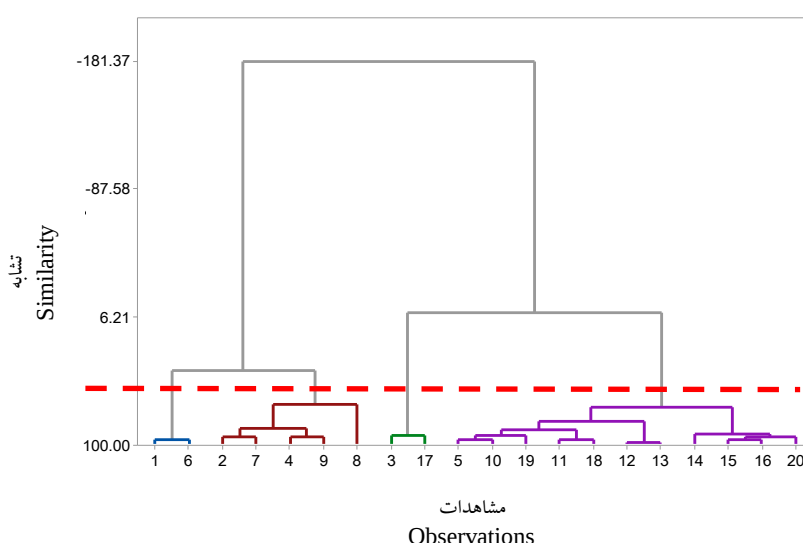


شکل ۱- بای پلات صفات و شاخص های گیاهی ژنوتیپ های نخود بر مبنای مؤلفه های اصلی اول و دوم

Fig. 1. Biplot of plant traits and indices of chickpea genotypes based on first and second principle components

بالاتر از میانگین کل بودند. در خوشه دوم، ژنوتیپ‌های ۳ و ۱۷ قرار گرفتند که علی‌رغم دارا بودن ویژگی تحمل سرما (CTR برابر ۳ و کمتر) کمترین میزان عملکرد دانه را داشتند. سایر ژنوتیپ‌ها اعم از وحشی و زراعی در خوشه سوم قرار گرفتند. در این خوشه برای صفات مربوط به وزن ۱۰۰ دانه، نشت الکترولیت‌ها و محتوای پروتئین ارزشی بالاتر از میانگین کل مشاهده شد.

به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌های نخود مورد مطالعه از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward و فاصله اقلیدسی استفاده شد (شکل ۲). بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای برای کلیه صفات و شاخص‌های گیاهی، ژنوتیپ‌های نخود در سه گروه دسته‌بندی شدند. خوشه اول شامل ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۷، ۸ و ۹ بود. این ژنوتیپ‌ها همگی جزء لاین‌های زراعی بوده و در اغلب صفات، بویژه در عملکرد دانه، دارای ارزشی



شکل ۲- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای صفات و شاخص‌های گیاهی ژنوتیپ‌های نخود بر اساس روش وارد و معیار فاصله اقلیدسی

Fig. 2. Dendrogram of cluster analysis for plant traits and indices of chickpea genotypes based on Ward's method and Euclidean distance

(جدول ۶).

به منظور تعیین دقیق‌تر سهم هر یک از صفات باقی مانده در مدل، با استفاده از تجزیه ضرایب همبستگی، اثرات مستقیم و غیرمستقیم صفات بر عملکرد دانه برآورد شدند. از بین صفات یاد شده، بیشترین اثر مستقیم و مثبت صفات بر عملکرد دانه مربوط به وزن ۱۰۰ دانه و پس از آن پایداری غشاء و فعالیت آنزیم پراکسیداز بودند (جدول ۷).

نتایج تجزیه رگرسیونی صفات و شاخص‌های گیاهی ژنوتیپ‌های نخود به روش رگرسیون نزولی نشان داد که پایداری غشاء، محتوای پروتئین، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز، نشت الکترولیت‌ها، تعداد روز از کاشت تا گلدهی، تعداد روز از کاشت تا رسیدگی، ارتفاع بوته، تعداد دانه در غلاف، و وزن ۱۰۰ دانه، در مدل رگرسیونی باقی ماندند. ضریب تبیین تصحیح شده (۹۱/۰۸) نشان داد که این صفات حدود ۹۲ درصد از تغییرات عملکرد دانه را توجیه کردند

جدول ۶- ضرایب رگرسیون و ضرایب رگرسیون ناقص استاندارد شده صفات و شاخص‌های گیاهی
ژنوتیپ‌های نخود به روش نزولی

Table 6. Regression coefficients and standardized partial regression coefficients for plant traits and indices of chickpea genotype using backward elimination

Traits/ indices remain in the model	صفات و شاخص‌های باقیمانده در مدل	ضریب رگرسیون Regression coefficient	ضریب رگرسیون ناقص استاندارد شده Standardized partial regression coefficient	سطح احتمال Probability
Membrane stability index	پایداری غشاء	7.045	0.601	0.0001
Proline	پروлін	31.339	0.582	0.0001
Peroxidase	فعالیت پراکسیداز	-19.146	-0.382	0.001
Catalase	فعالیت کاتالاز	-25.603	-0.232	0.035
Electrolyte leakage index	نشت الکترولیت	-2.661	-0.211	0.039
Days to flowering	روز تا گلدهی	-172.604	-0.563	0.0001
Days to maturity	روز تا رسیدگی	30.043	0.243	0.038
Plant height	ارتفاع بوته	-31.331	-0.567	0.001
Seed.pod ⁻¹	دانه در غلاف	3147.057	0.487	0.0001
100 Seed weight	وزن ۱۰۰ دانه	22.138	0.487	0.0001
Intercept	عرضی از مبدا	26742.597	-	0.001

بیشترین اثر مستقیم منفی مربوط به تعداد روز از کاشت تا گلدهی بود. در شرایط دیم این صفت معمولاً با عملکرد دانه ارتباط نزدیکی دارد (Sharma and Lavanya, 2002). اثرات باقیمانده در تجزیه علت زیاد نبود (۰/۱۴۸) و نشان داد که پایداری غشاء، محتوای پرولین، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز، نشت الکترولیت‌ها، تعداد روز تا گلدهی، تعداد روز تا رسیدگی، ارتفاع بوته، تعداد غلاف در بوته و وزن ۱۰۰ دانه، حدود ۹۱ درصد از تغییرات مربوط به عملکرد دانه را تبیین کردند.

جدول ۷- تجزیه ضرایب همبستگی به اثرات مستقیم و غیر مستقیم صفات و شاخص‌های گیاهی بر عملکرد دانه ژنوتیپ‌های نخود

Table 7. Correlation coefficients analysis to direct and indirect effects of plant traits and indices of chickpea genotypes

صفات و شاخص‌های گیاهی Plant traits/ indices	اثرات غیر مستقیم از طریق Indirect effect via										جمع Sum
	SW	SPP	PHT	DM	DF	ELI	CATL	PROX	PROL	MSI	
MSI	-0.136	-0.043	-0.155	0.023	0.063	-0.006	-0.014	-0.019	-0.078	(0.556)	0.189
PROL	-0.239	0.125	0.069	0.043	-0.225	0.010	-0.051	0.017	(0.385)	-0.089	0.145
PROX	-0.101	0.096	0.022	0.029	-0.106	-0.003	-0.050	(-0.339)	-0.023	0.031	0.453*
CATL	-0.094	-0.034	0.104	0.058	-0.122	0.001	(-0.168)	-0.104	0.149	0.045	-0.164
ELI	0.323	-0.158	-0.075	0.039	-0.100	(-0.025)	0.007	-0.005	-0.187	0.140	-0.041
DF	-0.205	0.121	0.091	0.073	(-0.396)	-0.005	-0.41	-0.071	0.220	-0.070	-0.387
DM	0.032	0.006	-0.214	(0.210)	-0.172	-0.005	-0.046	-0.047	0.100	0.060	-0.077
PHT	0.190	-0.041	(-0.365)	0.097	0.098	-0.004	0.037	0.017	-0.072	0.185	0.041
SPP	-0.415	(0.330)	0.043	0.003	-0.137	0.009	0.013	-0.076	0.138	-0.055	-0.037
SW	(0.858)	-0.213	0.103	0.008	0.119	-0.010	0.018	0.041	-0.135	-0.088	0.496*

*: Significant at 5% probability level

Residual effects: 0.148

R²adj.: 0.908

*: معنی دار در سطح احتمال پنج درصد

اثرات باقیمانده: ۰/۱۴۸

ضریب تبیین تصحیح شده: ۰/۹۰۸

اعداد پرنیک در قطر ماتریس نشان دهنده اثرات مستقیم صفات بر عملکرد دانه هستند

Bold figures on the matrix diameter shows direct effects of traits on seed yield

SW: وزن ۱۰۰ دانه، SPP: تعداد دانه در غلاف، PHT: ارتفاع بوته، DM: روز از کاشت تا رسیدگی، DF: روز از کاشت تا گلدهی، ELI: نشت الکترولیت، CTAL: کاتالاز، PROX: پراکسیداز، PROL: پرولین، MSI: پایداری غشاء

SW: 100 Seed weight, SPP: Seed.pod⁻¹, PHT: Plant height, DM: Days to maturity, DF: Days to flowering, ELI: Electrolyte leakage index, CTAL: Catalase, PROX: Peroxidase, PROL: Proline, MSI: Membrane stability index

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این تحقیق، بیشترین میزان عملکرد دانه مربوط به ژنوتیپ‌های ۸ (FLIP 11-86C)، ۲ (FLIP 11-03C) و ۷ (FLIP 11-63C) بود. مقایسات گروهی نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های وحشی و زراعی از لحاظ محتوای کلروفیل کل و میزان نشت الکترولیت‌ها بود. نتایج تجزیه همبستگی نشان داد که بیشترین میزان همبستگی بین عملکرد دانه و وزن ۱۰۰ دانه از یک طرف و فعالیت پراکسیداز از طرف دیگر وجود داشت. ژنوتیپ FLIP 11-56C از ویژگی‌های مناسبی به عنوان ژنوتیپ متحمل به سرما برخوردار بود، ولی عملکرد دانه آن پایین بود، بنابراین از این ژنوتیپ می‌توان به عنوان منبع تحمل به تنش به سرما در تحقیقات آینده استفاده کرد. ژنوتیپ‌های پرمحصول FLIP 11-86C (با عملکرد دانه ۸۸۹/۶ کیلوگرم در هکتار) و FLIP 11-03C (عملکرد دانه

۷۹۵/۷ کیلوگرم در هکتار) دارای نمره تحمل سرما برابر با ۳ و نشت الکترولیتی متوسط بودند و به عنوان ژنوتیپ‌های برتر نخود در این تحقیق شناخته شدند. شاخص پایداری غشاء و فعالیت آنزیم کاتالاز نیز به عنوان شاخص‌های مناسب برای به‌گزینی ژنوتیپ‌های متحمل به سرما در نخود شناخته شدند.

سپاسگزاری

از داوران محترم که در راهنمایی نگارندگان برای پربارتر شدن مقاله مساعدت کردند سپاسگزاری می‌شود. این مقاله از نتایج پروژه تحقیقاتی مشترک بین مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور و دانشگاه پیام نور به شماره ۹۸۱۰۱۹-۵۳-۱۵۵۱-۵۳-۳ استخراج شده است. نگارندگان بر خود واجب می‌دانند از کلیه افرادی که به‌نحوی در اجرای این پژوهش با مجریان طرح همکاری داشتند، تشکر و قدردانی نمایند.

References

- Abbo, S., Berger, J. and Turner, N.C. 2003. Evolution of cultivated chickpea: Four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology*, 30, pp.1081–1087. <http://doi.org/10.1071/FP03084>
- Abbo, S., Lev-Yadun, S. and Galwey, N. 2002. Vernalization response of wild chickpea. *New Phytologist*, 154, pp.695–701. <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00405.x>
- Abdollahi Hesar, A., Sofalian, O., Alizadeh, B., Asghari, A. and Zali, H. 2022. Investigation of frost stress on yield, yield components and a number of biochemical traits in rapeseed genotypes. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 15(2), pp.551-563. <http://doi.org/10.22077/escs.2021.3738.1903>
- Amandeep K., Gupta, N., Sharma, S., Singh, P. and Singh, S. 2022. Physiological and biochemical characterization of chickpea genotypes for cold tolerance at reproductive stage. *South African Journal of Botany*, 150, pp.488-499. <http://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.08.011>
- Amini, S., Maali-Amiri, R., Kazemi-Shahandashti, S. S., López-Gómez, M., Sadeghzadeh, B., Sobhani-Najafabadi A. and Kariman, K. 2021. Effect of cold stress on polyamine metabolism and antioxidant responses in chickpea. *Journal of Plant Physiology*, pp. 258-259:153387. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153387>
- Anonymous. 2022. Report of the area, production and yield of agricultural crops in the cropping year 2020-21. Center of Information and Communication Technology, Ministry of Jihad-Agriculture, [In Persian].

- Arslan, Ö., Eyidoğan, F. and Ekmekçi, Y. 2018.** Freezing tolerance of chickpea: biochemical and molecular changes at vegetative stage. *Biologia Plantarum* 62, pp.140–148. <http://doi.org/10.1007/s10535-017-0760-5>
- Ashraf, M. Y., Azim, A. R., Khan, A. H. and Ala S. A. 1994.** Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Acta Physiological Plantarum*, 16, pp.185-191.
- Bates, L. S., Walden, R. P. and Teare, I. D. 1973.** Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, pp.205-207. <http://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Blum, A. and Ebercon, A. 1981.** Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science*, 21(1), pp.43-47. <http://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100010013x>
- Chance, B. and Maehly, A.C. 1955.** Assay of catalases and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, pp.764-775. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Croser, J. S., Clarke, H. J., Siddique K. H. M. and Khan, T. N. 2003.** Low temperature stress: Implications for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. *Critical Reviews in Plant Science*, 22, pp.185–219. <http://doi.org/10.1080/713610855>
- FAOSTAT. 2021.** Crops. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/> Accessed 28, September, 2022.
- Fowler, D. B., Gusta, L. V. and Tyler, N. J. 1981.** Selection for winter hardiness in wheat. III. Screening methods. *Crop Science*, 21, pp.896-901. <http://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183X001900060005x>
- Hasanian-Khoshrou, H. 2021.** Physiological assessment and preliminary selection in annual wild *Cicer* species under cold stress. Final Report, Dryland Agricultural Research Institute, AREEO, No. 50322. [In Persian].
- Hepburn, H. A., Naylor, R. E. L. and Stokes, D. T. 1986.** Electrolyte leakage from winter barley tissue as indicator of winter hardiness. *Annals of Applied Biology*, 108, pp.164-65. <http://doi.org/10.1111/aab.1986.108.s1.164>
- Kanouni, H., Farayedi, Y., Sabaghpour, S.H. and Saeid, S. 2016.** Assessment of genotype×environment interaction effect on seed yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) lines under rainfed winter planting conditions. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 18(1), pp.63-75. [In Persian].
- Kanouni, H. 2020.** An overview of chickpea breeding in Iran. Technical bulletin, Dryland Agricultural Research Institute, AREEO, No. 55945. [In Persian].
- Kanouni, H. 2019.** Final report of research project- Chickpea International Cold Tolerance Nursery (CICTN-2018). Dryland Agricultural Research Institute, AREEO, No. 56830. [In Persian].
- Mafakheri, N., PourEsmail, M., Mansourifar, S. and Asilan, K.S. 2020.** Physiological and biochemical traits variability in *Cicer* species. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Plant Biology)*, 33(1), pp. 183-196. [In Persian].
- Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005.** Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, pp.139–158.
- Mantri, N. L., Ford, R., Coram, T. E. and Pang, E. C. K. 2007.** Transcriptional profiling of chickpea genes

- differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. *BioMed Central Genomics*, 8, pp.1-14. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-8-303>
- Rakei, A., Maali-Amiri, R., Zeinali, H. and Ranjbar, M. 2016.** DNA methylation and physio-biochemical analysis of chickpea in response to cold stress. *Protoplasma*, 253(1), pp.61-76. <http://doi.org/10.1007/s00709-015-0788-3>
- Ritchie, S. W. and Nguyen, H. T. 1990.** Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, 30, pp.105-111. <http://doi.org/10.2135/CROPSCI1990.0011183X003000010025X>
- Sharma, K. K. and Lavanya, M. 2002.** Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Work Report. pp.61-73.
- Singh, K. B., Malhotra, R. S., Saxena, M. C. and Bejiga, G. 1997.** Superiority of winter sowing over traditional spring sowing of chickpea in the Mediterranean region. *Agronomy Journal*, 89, pp.112-118. <http://doi.org/10.2134/AGRONJ1997.00021962008900010017X>
- Tarinejad, A., Tahmasebpour, B. and Mohammadi, H. 2020.** Investigation of relationships between grain yield, morphological and physiological traits in susceptible and drought tolerant cultivars of bread wheat. 8th National Conference on Applied Research in Agricultural Science, Nov. 6, 2020, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. [In Persian].
- Toker, C. 2005.** Preliminary screening and selection for cold tolerance in annual wild *Cicer* species. *Genetic Resourced and Crop Evolution*, 52, pp.1-5. <http://doi.org/10.1007/s10722-005-1743-5>
- Yadav, S. S., Redden, R. J., Chen, W. and Sharma, B. 2007.** Chickpea breeding and management. CAB, International. Wallingford, UK.
- Zeitelhofer, M., Zhou, R. and Ottosen, C. O. 2022.** Physiological responses of chickpea genotypes to cold and heat stress in flowering stage. *Agronomy*, 12(11), 2755. <http://doi.org/10.3390/agronomy 12112755>

Physiological and biochemical responses of wild and cultivated chickpea (*Cicer spp.*) germplasm to cold stress

Khalili M.¹, H. Kanouni² and K. Bahmani³

ABSTRACT

Khalili M., H. Kanouni and K. Bahmani. 2023. Physiological and biochemical responses of wild and cultivated chickpea (*Cicer spp.*) germplasm to cold stress. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 25(1): 71-87. (In Persian).

This study was conducted to investigate the physiological and biochemical responses of wild and cultivated chickpea germplasm to cold stress, and to identify cold tolerant genotypes in field and controlled conditions. Twenty chickpea genotype including; 10 of cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes, eight wild chickpea (*Cicer reticulatum*) genotypes, and two cold-sensitive ILC 533 line and cold-tolerant (cv. Saral) controls were evaluated using randomized complete block design with three replications in the dry conditions of Saral agricultural research station, Kurdistan, Iran, in two cropping seasons (2019-20 and 2020-21). Agronomic and phenological traits were measured and recorded. Meanwhile, the chickpea genotypes were subjected to a gradual decrease in temperature in the growth chamber under controlled environment, and their biochemical and physiological traits were measured and recorded. Analysis variance showed that chickpea genotypes had significant differences for physiological traits such as peroxidase activity, electrolyte leakage and chlorophyll b content. Path analysis revealed that 100 seed weight traits followed by membrane stability and peroxidase activity had the most direct and positive effect on seed yield. The results of this experiment showed that high-yielding genotypes such as FLIP 11-86C (889.62 kg.ha⁻¹) and FLIP 11-03C (795.72 kg ha⁻¹) had cold tolerance rating score of three and moderate electrolyte leakage index, and were selected as superior cold tolerant genotypes.

Key words: Chickpea, Cold tolerance rating score, Enzyme activity, Membrane stability and Seed yield

Received: February, 2023 Accepted: May, 2023

1. Associate Prof., Payam Nour University, Tehran, Iran.

2. Associate Prof., Field and Horticultural Crops Sciences Research Department, Kurdistan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sanandaj, Iran (Corresponding author) (Email: h.kanouni@areeo.ac.ir)

3. Researcher, Field and Horticultural Crops Sciences Research Department, Kurdistan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sanandaj, Iran