

مقاله پژوهشی

ارزیابی امکان افزایش تحمل به یخ‌زدگی در نخود (*Cicer arietinum*) با پیش‌تیمار بذرمحمد محمدی^۱، رضا توکل‌افشاری^{۲*}، جعفر نباتی^{۳*}، احسان اسکوئیان^۴

چکیده مبسوط

مقدمه: از عوامل اصلی عدم ثبات عملکرد نخود بر خورد مراحل زایشی با خشکی و گرمای آخر فصل است. یکی از راهبردهای مناسب به منظور بهبود عملکرد نخود، کشت پاییزه آن است. از طرفی تنش یخ‌زدگی از عوامل محدود کننده کشت پاییزه نخود محسوب می‌گردد. اخیراً، پیش‌تیمار بذر به‌عنوان یک روش ضروری برای القای تحمل گیاهان در برابر تنش‌های مختلف توسعه یافته است. پیش‌تیمار در پاسخ‌های دفاعی گیاه به تنش منجر به واکنش سریع گیاه خواهد شد. یخ‌زدگی به‌عنوان یکی از تنش‌های محیطی، رشد و نمو بسیاری از گیاهان نقاط مختلف جهان را محدود می‌کند. مطالعات حاکی از این است که علاوه بر خوسرمایی، رویدادهای تنش‌زا کوتاه‌مدت زیستی و غیر زیستی به نام پیش‌تیمار نیز می‌توانند تحمل گیاهان به یخ‌زدگی را افزایش دهد. این فرآیند پاسخ به یخ‌زدگی را به‌طور مفید تغییر می‌دهد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده علوم گیاهی در دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۷ انجام شد. عوامل آزمایشی شامل تیمار دمایی در چهار سطح (صفر، ۱۲-، ۱۵- و ۱۷- درجه سلسیوس)، پیش‌تیمار بذر در ۱۰ سطح (شاهد (بدون پیش‌تیمار)، هیدروپرایمینگ، کلرید سدیم، اسید سالیسیلیک، نیتروپروساید سدیم، باکتری‌های حل‌کننده فسفر و پتاسیم، آمینواسید، نترات پتاسیم و سولفات روی) و ژنوتیپ‌های نخود در چهار سطح (MCC495، ILC8617، MCC505 و رقم سارال) بودند. در این آزمایش درصد بقاء، درصد نشت الکترولیت‌ها، دمای ۵۰ درصد کشندهگی بر اساس نشت و دمای ۵۰ درصد کشندهگی بر اساس بقاء مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کاربرد پیش‌تیمارهای هیدروپرایمینگ، نیتروپروساید سدیم و سولفات روی اثرات مطلوبی بر درصد بقاء و نشت الکترولیت‌ها داشتند که از این میان تیمار نیتروپروساید سدیم توانست نسبت به تیمار شاهد در دمای ۱۵- و ۱۷- درجه سلسیوس در رقم سارال، دمای ۱۵- درجه سلسیوس در ژنوتیپ ILC8617 و دمای ۱۲- و ۱۵- درجه سلسیوس در ژنوتیپ MCC495 منجر به افزایش درصد بقاء به ترتیب ۲۳، ۶۸، ۵۸، ۸۵ و ۵۵ درصد شود. همچنین تیمار مذکور نسبت به تیمار شاهد در دمای ۱۵- درجه سلسیوس در ژنوتیپ ILC8617 منجر به کاهش ۱۳ درصدی نشت الکترولیت‌ها شد. علاوه بر این تیمار مذکور نسبت به تیمار شاهد منجر به کاهش ۴۰ درصدی دمای ۵۰ درصد کشندهگی بر اساس بقاء در ژنوتیپ MCC495 گردید.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج بیانگر افزایش نشت الکترولیت‌ها و کاهش درصد بقاء تحت تنش یخ‌زدگی بود. کاربرد پیش‌تیمار با القای تحمل به یخ‌زدگی، توانست فراتر از تیمار شاهد خوسرما شده پیش‌رود و منجر به کاهش دمای ۵۰ درصد کشندهگی بر اساس بقاء و نشت الکترولیت‌ها در ژنوتیپ MCC495 گردد. علاوه بر این پاسخ پیش‌تیمار به منظور تحمل به یخ‌زدگی میان نشت الکترولیت و درصد بقاء بیشتر در حفظ بقاء مؤثر بود.

واژه‌های کلیدی: درصد بقاء، نیتروپروساید سدیم، هیدروپرایمینگ، یخ‌زدگی

جنبه‌های نوآوری:

- ۱- تأثیر پیش‌تیمارهای مختلف بر تحمل به یخ‌زدگی بذر نخود بررسی و مشخص شد.
- ۲- آستانه تحمل به یخ‌زدگی گیاهچه‌های نخود در شرایط آزمایشگاهی تحت پیش‌تیمارهای مختلف تعیین شد.
- ۳- پاسخ ژنوتیپ‌ها به پیش‌تیمارها و رفتار ژنوتیپ‌ها نسبت به همدیگر بررسی گردید.

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و تکنولوژی بذر، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

^۲ استاد گروه اگروتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی

مشهد

^۳ استادیار پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد^۴ استادیار، شعبه مشهد، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران،

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران



مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) دومین محصول مهم حبوبات پس از لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) است و یک ماده غذایی غنی از پروتئین می‌باشد که از لحاظ اقتصادی سودمند است (وارشنی^۱ و همکاران، ۲۰۱۳). نخود در ۵۰ کشور جهان تولید می‌شود که از این میان استرالیا، کانادا، ایتالیایی، هند، ایران، مکزیک، میانمار، پاکستان، ترکیه و آمریکا تولیدکنندگان اصلی هستند (دایکسیتی^۲ و همکاران، ۲۰۱۹). با این حال، بهره‌وری نخود برای برآوردن نیاز پروتئین برای افزایش جمعیت انسانی کافی نیست (چاتورودی^۳ و همکاران، ۲۰۱۸). تولید نخود به دلیل تنش‌های غیر زیستی مختلف مانند خشکی و دما با چالش‌های زیادی روبرو است (گارگ^۴ و همکاران، ۲۰۱۵). مهم‌تر از همه، تغییرات آب و هوایی غیرقابل پیش‌بینی محدودیت اصلی تولید نخود است زیرا همراه با تغییرات شدید دما می‌باشد (کادیالا^۵ و همکاران، ۲۰۱۶)؛ بنابراین، اتخاذ روشی کارآمد و پایدار به منظور رفع محدودیت‌ها در شرایط پر تنش ضروری است (دواسیرواتام و تان^۶، ۲۰۱۸). کشت پاییزه نخود به‌عنوان یک راه‌کار مهم در کاهش عملکرد ناشی از دمای بالا و تنش خشکی در زمان گلدهی کشت بهاره معرفی می‌شود. با این حال در کشت پاییزه حساسیت به یخزدگی محدودیت اصلی می‌باشد (کاظمی-شاهاندشتی^۷ و همکاران، ۲۰۱۴). از این رو ایجاد تحمل به یخزدگی با استفاده از روش‌های متداول پیش‌تیمار بذر می‌تواند اثرات یخزدگی بر کاشت پاییزه نخود را کاهش دهد و عملکرد نخود را بهبود ببخشد. پیش‌تیمار یک فرآیند فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی کم‌هزینه و مؤثر است که باعث تحریک جوانه‌زنی، افزایش ویژگی‌های مورفولوژیکی و بهبود رشد و نمو گیاه در شرایط تنش غیر زیستی می‌شود (رحمان^۸ و همکاران، ۲۰۲۰؛ تانیا^۹ و

همکاران، ۲۰۲۰). همچنین پیش‌تیمار بذر این امکان را به وجود می‌آورد تا از طریق تسریع جوانه‌زنی و تولید متابولیت‌های ثانویه شرایطی را برای استقرار زودتر گیاهچه و در نتیجه زمینه انطباق (خوگیری) با محیط و استفاده بهینه از عوامل محیطی را در اوایل رشد فراهم شود.

خوسرمایی^{۱۰} در کشت پاییزه نیز نقش مهمی در کاهش نشت الکترولیت‌های ناشی از یخزدگی زمستان ایفا می‌کند (گوپتا و دسوال^{۱۱}، ۲۰۱۴). گیاهان در فرآیند خوسرمایی با تولید پروتئین‌های ضد انجماد، توانایی تحمل یخزدگی در طول زمستان را کسب می‌کنند (گوپتا و دسوال، ۲۰۱۴). افزایش تحمل در گیاهچه‌های نخود به یخزدگی منوط به خوگیری بهینه به یخزدگی است. همچنین خوسرمایی وابسته به استقرار مناسب گیاهچه که این نیز خود وابسته به جوانه‌زنی مناسب بذر است. با توجه به مطالب ذکر شده این مطالعه باهدف ارزیابی اثر پیش‌تیمار بذر نخود بر بهبود تحمل به یخزدگی در ژنوتیپ‌های نخود انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش اثر پیش‌تیمارها بر تحمل به یخزدگی سه ژنوتیپ و یک رقم نخود کابلی (ILC8617، MCC495، MCC505 و رقم سارال) (صباغ‌پور^{۱۲} و همکاران، ۲۰۱۳)، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۷ مطالعه شد. ژنوتیپ‌های مورد استفاده از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. مشخصات ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ درج شده است.

¹ Varshney

² Dixit

³ Chaturvedi

⁴ Garg

⁵ Kadiyala

⁶ Devasirvatham and Tan

⁷ Kazemi-Shahandashti

⁸ Rhaman

⁹ Tania

¹⁰ Cold acclimation

¹¹ Gupta and Deswal

¹² Sabaghpour

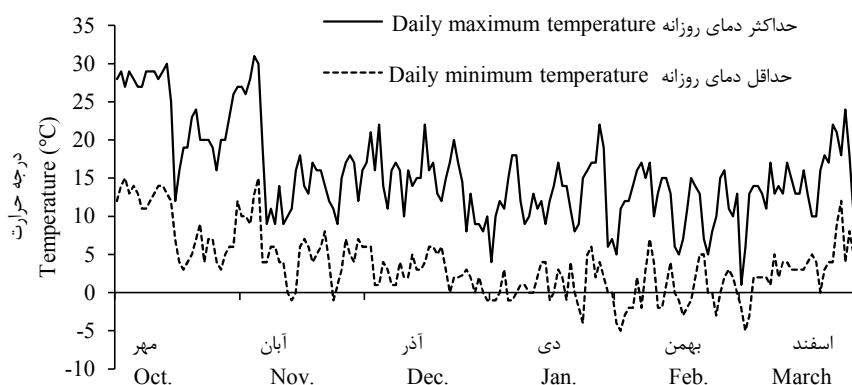
جدول ۱. مشخصات ژنوتیپ‌های نخود مورد مطالعه به همراه منشأ آن‌ها

Table 1. Characteristics of the studied chickpea genotypes along with their origin

ژنوتیپ	منشأ	شجره	نوع	واکنش به یخ‌زدگی	منبع
Genotype	Origin	Pedigree	Type	Reaction to cold	Reference
MCC†505 (ILC533)	مصر Egypt	ردیابی نشده Not traced	کابلی Kabuli	حساس Sensitive	(بهمنی ^۱ و همکاران، ۲۰۲۰)
ILC‡8617	ایکاردای ICARDA	ILC482(mutation)	کابلی Kabuli	متحمل Tolerated	(سینگ ^۲ و همکاران، ۱۹۹۵)
Sel93TH24460(سارال)	ایکاردای ICARDA	ILC3470 × ILC8617	کابلی Kabuli	مقاوم Resistant	(سعید ^۳ و همکاران، ۲۰۱۰)
MCC495	ایکاردای ICARDA	Flip93-262c	کابلی Kabuli	متوسط Medium	(بیهقی ^۴ و همکاران، ۲۰۱۰)

MCC: کلکسیون نخود مشهد،

†MCC: Mashhad Chickpea Collection, ‡‡ International Legume Chickpea



شکل ۱. حداکثر و حداقل دما روزانه طی دوره رشد نخود در سال ۱۳۹۷ در مشهد

Fig. 1. Maximum and minimum daily temperature during growth period of chickpea in 2017 in Mashhad¹ Bahmani² Singh³ Saeed⁴ Beihaghi

سانتی‌متر و ارتفاع ۱۱ سانتی‌متر و حاوی ۵۰ درصد حجمی ماسه و ۵۰ درصد حجمی خاک مزرعه کشت شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه به مدت یک هفته نگهداری و پس از سبز شدن برای خوشمایی به شرایط طبیعی (شکل ۱) به مدت دو ماه منتقل شدند. پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها، تعداد آن‌ها به پنج بوته در هر گلدان تقلیل داده شد.

به‌منظور حفظ مواد آزمایشی، گلدان‌ها در شب‌هایی با دمای کمتر از صفر درجه سلسیوس در شاسی سرد قرار گرفتند. گلدان‌ها ۲۴ ساعت قبل از اعمال تنش، آبیاری شده و سپس به منظور اعمال دماهای یخزدگی، در اواسط دی‌ماه و هم‌زمان با بروز سرماهای شدید در منطقه (بر اساس داده‌های بلندمدت هواشناسی، در شرایط آب و هوایی مشهد بروز سرماهای شدید در دی و بهمن اتفاق افتاد) به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند.

دمای فریزر در ابتدای آزمایش پنج درجه سلسیوس بوده و پس از قرار دادن نمونه‌ها با سرعت دو درجه سلسیوس در ساعت کاهش یافت. این وضعیت شرایط را برای توزیع مجدد آب به بافت‌های گیاهی و جلوگیری از تشکیل یخ در داخل سلول‌ها که در طبیعت به‌ندرت اتفاق می‌افتد، فراهم می‌کند (موری^۸ و همکاران، ۱۹۸۸). به‌منظور جلوگیری از پدیده فراسرمایی و القای یخزدگی و ایجاد هستک یخ در گیاهچه‌ها و اطمینان از اینکه راهبرد از نوع تحمل است و نه اجتناب، در دمای ۲- درجه سلسیوس محلول باکتری‌های القاکننده هستک یخ به نحوی روی گیاهان پاشیده شد که قشر نازکی از این محلول روی برگ‌ها را پوشاند. سپس دما با سرعت دو درجه در ساعت کاهش یافت تا به دمای موردنظر هر تیمار رسید. به‌منظور ایجاد تعادل در دمای محیط، گیاهچه‌ها در هر تیمار دمایی به مدت یک ساعت نگاه‌داشته شده و سپس به مدت یک شب در اتاقک سرد با دمای 5 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس نشت الکترولیت‌ها با استفاده از دستگاه EC متر مدل Jenway با استفاده از رابطه ۱ اندازه‌گیری و در مرحله بعد گلدان‌ها برای ایجاد شرایط

تیمارهای دمایی مورد استفاده شامل صفر، ۱۲-، ۱۵- و ۱۷- درجه سلسیوس بودند. پیش تیمارها شامل، شاهد (بدون پیش‌تیمار)، پیش‌تیمار بذر در آب (آب مقطر)، اسید سالیسیلیک ($C_7H_6O_3$) نیم میلی‌مولار (فرحبخش^۱، ۲۰۱۲)، اسید آمینه ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر، نیتروپروپوساید سدیم ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) ۲۰ میکرومولار (عموآقایی و نیکزاد^۲، ۲۰۱۳)، باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم و فسفات ۱۰۰ میلی‌لیتر در لیتر، نترات پتاسیم (KNO_3) ۰/۵ درصد (کاناک^۳ و همکاران، ۲۰۱۶)، سولفات روی ($ZnSO_4$) ۰/۰۵ درصد (عارف^۴ و همکاران، ۲۰۰۷) و کلرید سدیم (NaCl) ۰/۶۷ مگا پاسکال (عبادی و گلولجه^۵، ۲۰۰۹) بودند.

باکتری‌های حل‌کننده فسفات مجموعه‌ای از سویه‌های *Bacillus sp.* و باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم مجموعه‌ای از سویه‌های *Bacillus sp.* و *Enterobacter sp.* بودند که بومی ایران بوده از نقاط مختلف جمع‌آوری و تکثیر شدند. تراکم جمعیت باکتری 10^7 سلول در میلی‌لیتر مایع تلقیح بود. این باکتری‌ها توسط گروه تحقیق و توسعه شرکت خوشه پروران زیست فناوری تولید و اهداء شد.

اسید آمینه شامل پروفایل کامل اسید آمینه بود. اسید آمینه مورد استفاده از شرکت دانش‌بنیان خوشه پروران زیست فناوری (دایان) تهیه گردید.

به منظور اجرای آزمایش و اعمال تیمارها، بذرها به مدت پنج ساعت در دمای 20 ± 2 درجه سلسیوس (هیرمات^۶ و همکاران، ۲۰۲۱) پیش‌تیمار، سپس بذرها در شرایط سترون از محلول خارج و سه بار با آب مقطر شستشو شدند. آب اضافی به‌وسیله کاغذ صافی گرفته شد و سپس در دمای محیط رطوبت بذرها به سطح اولیه کاهش داده شد (خدابخش^۷ و همکاران، ۲۰۱۱). پس از آماده‌سازی بذرها تعداد ۱۰ عدد بذر در عمق یک سانتی‌متری گلدان‌های پلاستیکی با قطر هشت

¹ Farahbakhsh

² Amooaghaie and Nikzad

³ Čanak

⁴ Arif

⁵ Ebadi and Gollojeh

⁶ Hiremath

⁷ Khodabakhsh

⁸ Murray

نتایج و بحث

بررسی تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی، دوگانه و سه‌گانه بر درصد نشت الکترولیت و درصد بقاء معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که کاربرد پیش‌تیمارهای کلرید سدیم، هیدروپرایمینگ، اسید سالیسیلیک، نیتروپروپوساید سدیم، باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم، نیترات پتاسیم و سولفات روی، در ژنوتیپ MCC505 تأثیری بر نشت الکترولیت‌های برگ در مرحله گیاهچه‌ای نداشت. به عبارتی نشت الکترولیت‌ها در پیش‌تیمارهای مذکور کاملاً منطبق بر تیمار شاهد بود (شکل ۲). با این وجود کاربرد تیمار آمینواسید و باکتری حل‌کننده فسفر در دمای صفر درجه سلسیوس منجر به کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۲). همچنین کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها در تیمار آمینواسید در دمای ۱۵- درجه سلسیوس در مقایسه با تیمار شاهد نیز مشاهده شد اما با توجه به شکل ۶ که دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها را در ژنوتیپ و تیمار مذکور حدود ۳- درجه سلسیوس نشان داده است این کاهش نشت الکترولیت‌ها به علت اثرات مطلوب پیش‌تیمار آمینواسید نبوده بلکه احتمالاً دلالت بر خالی شدن محتوای سلولی و در نتیجه مرگ گیاهچه می‌باشد.

باز یافت به گلخانه منتقل شدند و پس از ۲۸ روز، درصد بقاء گیاهان با استفاده از رابطه ۲ اندازه‌گیری شد.

$$\text{رابطه (۱): } EL = ((EC_1/EC_2) * 100)$$

رابطه (۲):

$$\text{تعداد گیاهان زنده در 28 روز پس از اعمال تیمار یخ‌زدگی} \\ \text{تعداد گیاهان قبل از تیمار یخ‌زدگی} \\ \times 100 = \text{درصد بقاء}$$

در رابطه اول، EC_1 میزان هدایت الکتریکی برگ پس از نمونه‌برداری، EC_2 میزان هدایت الکتریکی پس مرگ یاخته‌ای در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار معادل دو اتمسفر به مدت ۳۰ دقیقه؛ و EL درصد نشت الکترولیت‌ها را نشان می‌دهد.

دمای کشنده برای ۵۰ درصد نمونه‌ها (LT_{50}) بر اساس درصد بقاء و نشت الکترولیت‌های هر تیمار در مقابل دمای یخ‌زدگی با استفاده از رابطه (۳) (اندرسون^۱ و همکاران، ۱۹۸۸) برازش داده شد.

رابطه (۳):

$$Y = a_0 + ((a_1 - a_0) / (1 - \exp(a_2 \times (x - a_3))))$$

در این رابطه، Y نشان دهنده میزان درصد بقاء یا نشت الکترولیت‌های پیش‌بینی شده، a_0 حداقل مقدار درصد بقاء یا نشت الکترولیت‌ها در دماهای مختلف، a_1 حداکثر مقدار درصد بقاء یا نشت الکترولیت‌ها در دماهای مختلف، a_2 سرعت افزایش شیب منحنی (این عدد بین ۰/۵-۰/۲ می‌باشد)، a_3 نقطه عطف منحنی تابع لجستیک که عبارت است از نقطه میانی بین بخش پایینی و بالایی خط مجانب منحنی، X دمای یخ‌زدگی و \exp تابع نمایی می‌باشد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها و ضرایب همبستگی با استفاده از نرم‌افزار Minitab ver. 18 و مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. برای نرمال بودن داده‌ها از آزمون آماری شاپیرو-ویلک استفاده شد. برای تعیین LT_{50} از نرم‌افزار Slid Write و به منظور ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel و GraphPad Prism 8 استفاده شد.

¹ Anderson

جدول ۲. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات درصد نشت الکترولیت‌ها و درصد بقاء ژنوتیپ‌های نخود پیش‌ تیمار شده تحت تأثیر تنش سرما

Table 2. Source of variation, degrees of freedom, and mean square of electrolyte leakage and survival percentage in the various primed chickpea genotypes under freezing stress

منابع تغییرات	S.O.V	درجه آزادی df	درصد نشت الکترولیت Electrolyte leakage percentage	درصد بقاء Survival percentage
ژنوتیپ	Genotype (G)	3	4403**	1482**
پیش تیمار	Priming (P)	9	43.9**	1207**
دما	Temperature (T)	3	97292**	218627**
ژنوتیپ × پیش تیمار	G × P	27	169**	1597**
ژنوتیپ × دما	G × T	9	2359**	404**
پیش تیمار × دما	P × T	27	48.9**	625**
ژنوتیپ × پیش تیمار × دما	G × P × T	81	60.7**	766**
خطا	Error	320	16.4	156
ضریب تغییرات (%)	C.V. (%)		5.83	20.4

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

* and ** significant at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, C.V: Coefficient of variation

منفی مشاهده شد که فقط در پیش تیمارهای هیدروپرایمینگ، کلرید سدیم و اسید سالیسیلیک معنی‌دار بود (شکل ۷). کاهش دما از صفر به ۱۲- درجه سلسیوس همراه با تغییرات شدید درصد نشت الکترولیت‌ها همراه بود اما بر درصد بقاء چندان تأثیرگذار نبود، به طوری که نشت الکترولیت‌ها در دمای ۱۲- درجه سلسیوس نسبت به صفر درجه سلسیوس در پیش تیمارهای مذکور و تیمار شاهد به ترتیب ۴۵، ۳۹، ۵۳ و ۴۸ درصد افزایش یافت، در صورتی که کاهش درصد بقاء در شرایط همسان به ترتیب ۱۶، ۱۵، ۵۱ و ۲/۵ درصد بود (شکل ۲). به عبارتی به ازای هر درجه سلسیوس کاهش دما از صفر به ۱۲- درجه سلسیوس در پیش تیمارهای مذکور به ترتیب ۳/۷۵، ۳/۲۵، ۴/۴۱ و ۴ درصد افزایش نشت الکترولیت‌ها و ۱/۳۳، ۱/۲۵، ۴/۲۵ و ۰/۲ درصد کاهش بقاء مشاهده شد (شکل ۲). در گستره دمایی ۱۲- تا ۱۵- درجه سلسیوس کاهش درصد بقاء در پیش تیمار سولفات روی حدود ۱۴ درصد بود، در حالی که در همین محدوده دمایی در تیمار شاهد حدود ۴۹ درصد مشاهده شد اما با این وجود تفاوت معنی‌داری میان آن‌ها مشاهده نشد. نتایج نشان داد که کاربرد تمام پیش تیمارها بر بذر رقم سالار اثری بر نشت الکترولیت‌های برگ در مرحله گیاهچه‌ای نداشت به

علاوه بر این تفاوتی میان پیش تیمارها (به استثنای اسید سالیسیلیک) و تیمار شاهد بر درصد بقاء نیز مشاهده نشد (شکل ۲). کاربرد پیش تیمار اسید سالیسیلیک منجر به افت درصد بقاء در دمای ۱۲- و ۱۵- درجه سلسیوس شد (شکل ۲). یکی از شروط اصلی تحمل گیاهان به تنش یخ‌زدگی، خوسرمایی در زمان مناسب می‌باشد (سوتکوویچ^۱ و همکاران، ۲۰۱۷) که ارتباط تنگاتنگی با استقرار گیاهان دارد (کروساتی^۲ و همکاران، ۲۰۰۸)، به نحوی که این مسئله موجب گردیده تا پیش تیمارها به عنوان یکی از مهم‌ترین روش‌های بهبود بنیه بذر و گیاهچه به منظور استقرار مناسب گیاهان قبل از کاشت مطرح گردد (بی‌بی^۳ و همکاران، ۲۰۱۷؛ الیاس و کاپلند^۴، ۲۰۰۱). در مطالعه حاضر نیز به نظر می‌رسد که در ژنوتیپ مذکور پس از کاربرد پیش تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد تغییری حاصل نگردیده است.

میان درصد نشت الکترولیت‌ها در ژنوتیپ MCC505 تحت پیش تیمار با درصد بقاء همبستگی

¹ Cvetkovic

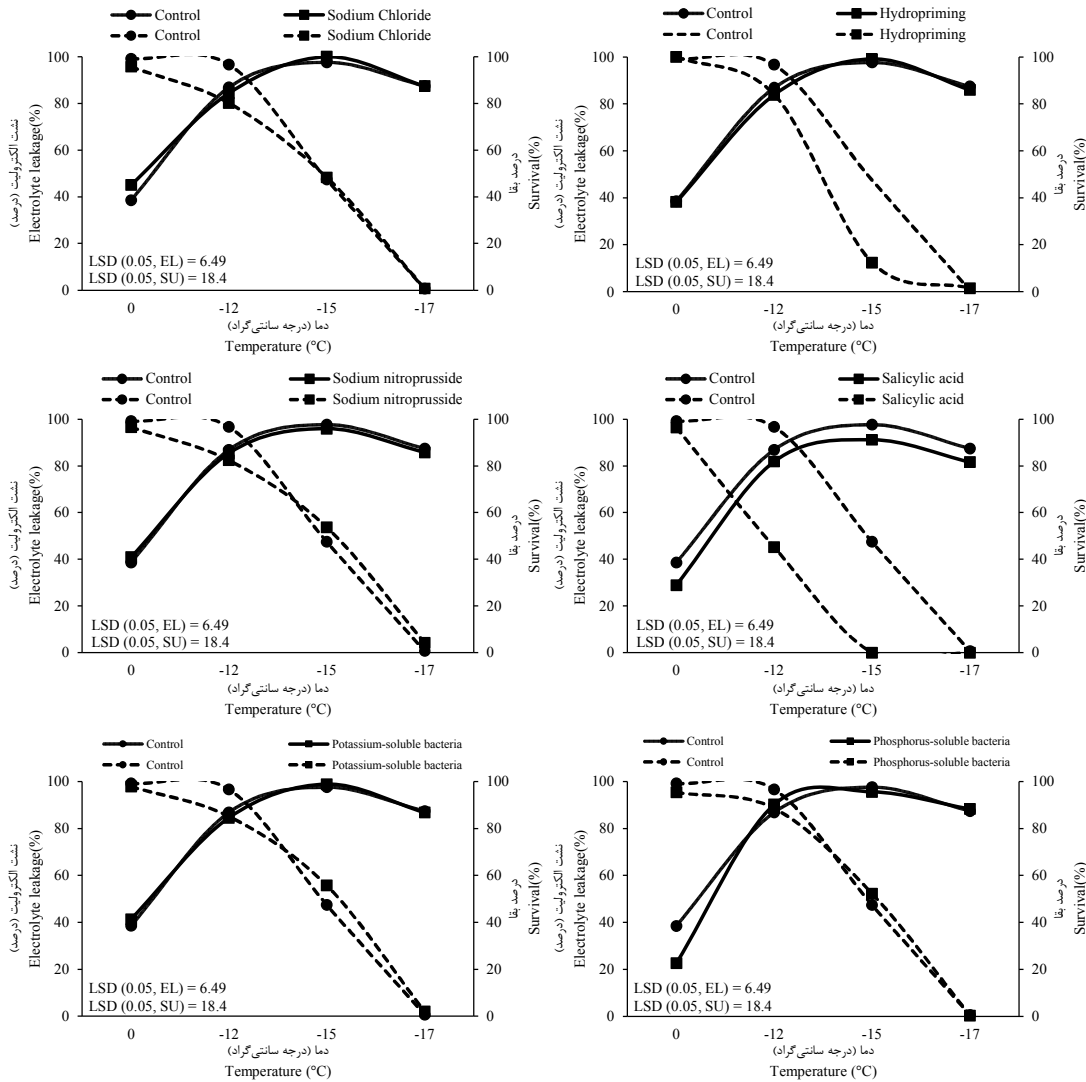
² Crosatti

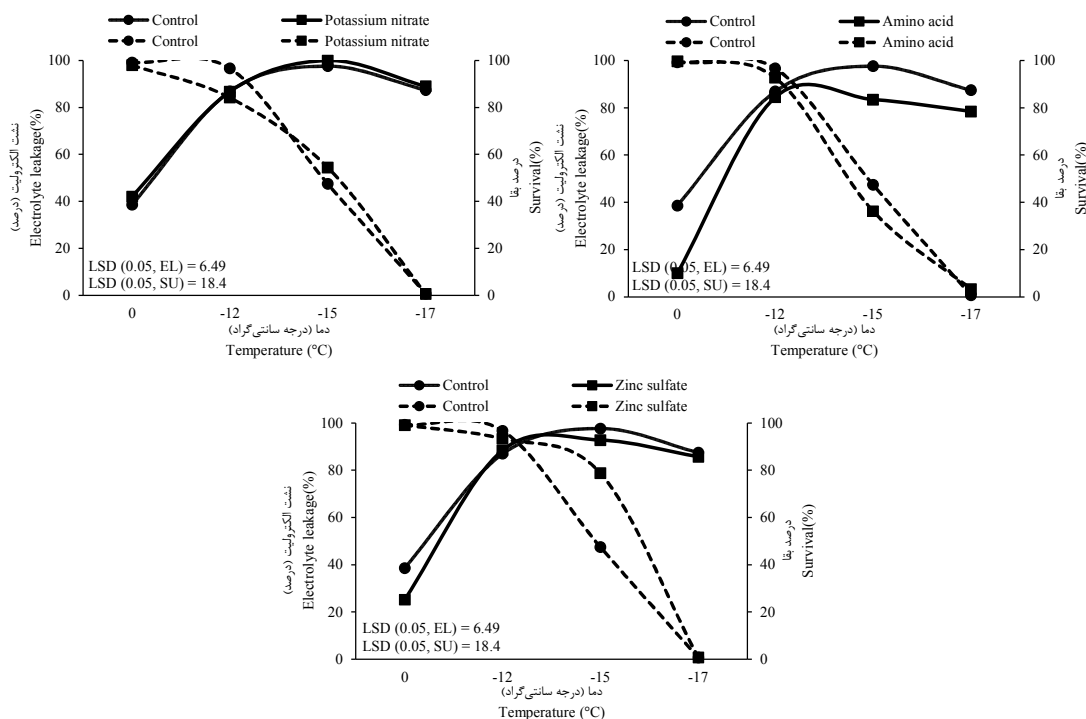
³ Bibi

⁴ Elias and Copeland

ترتیب کاهش و افزایش یافت اما شیب کاهش بقاء و شیب افزایش نشت الکترولیت‌ها در پیش‌تیمارها تحت گستره‌های دمایی، متفاوت بود که احتمالاً ناشی از تفاوت میان آن‌ها در میزان تحمل به یخ‌زدگی است. این امر بیانگر این است که تحت تنش، سرعت کاهش درصد بقاء و افزایش نشت الکترولیت‌ها در شرایط پیش‌تیمار متفاوت می‌باشد. در مطالعه حاضر، شواهد بیانگر این است که پیش‌تیمار نیتروپروساید سدیم از شیب کاهش بقاء کمتری نسبت به تیمار شاهد برخوردار است، به عبارتی سرعت کاهش درصد بقاء در این پیش‌تیمار بسیار آهسته‌تر از تیمار شاهد است (شکل ۳).

عبارتی نشت الکترولیت‌ها در پیش‌تیمارها کاملاً منطبق بر تیمار شاهد بود (شکل ۳). علاوه بر این تفاوتی میان پیش‌تیمارها (به‌استثنای هیدروپرایمینگ، باکتری حل‌کننده پتاسیم و نیتروپروساید سدیم) و تیمار شاهد بر درصد بقاء نیز مشاهده نشد (شکل ۳). کاربرد پیش‌تیمار هیدروپرایمینگ و باکتری حل‌کننده پتاسیم منجر به افت درصد بقاء در دمای ۱۵- درجه سلسیوس شد اما کاربرد پیش‌تیمار نیتروپروساید سدیم منجر به افزایش ۲۳ و ۶۸ درصدی بقاء نسبت به تیمار شاهد به ترتیب در دمای ۱۵- و ۱۷- درجه سلسیوس شد (شکل ۳). با کاهش دما، درصد بقاء و نشت الکترولیت‌ها به





شکل ۲. اثر پیش تیمار بذر بر درصد نشت الکترولیت‌های برگ (خطوط پیوسته) در مقابل درصد بقاء (خطوط منقطع) در ژنوتیپ MCC505 تحت تنش یخزدگی

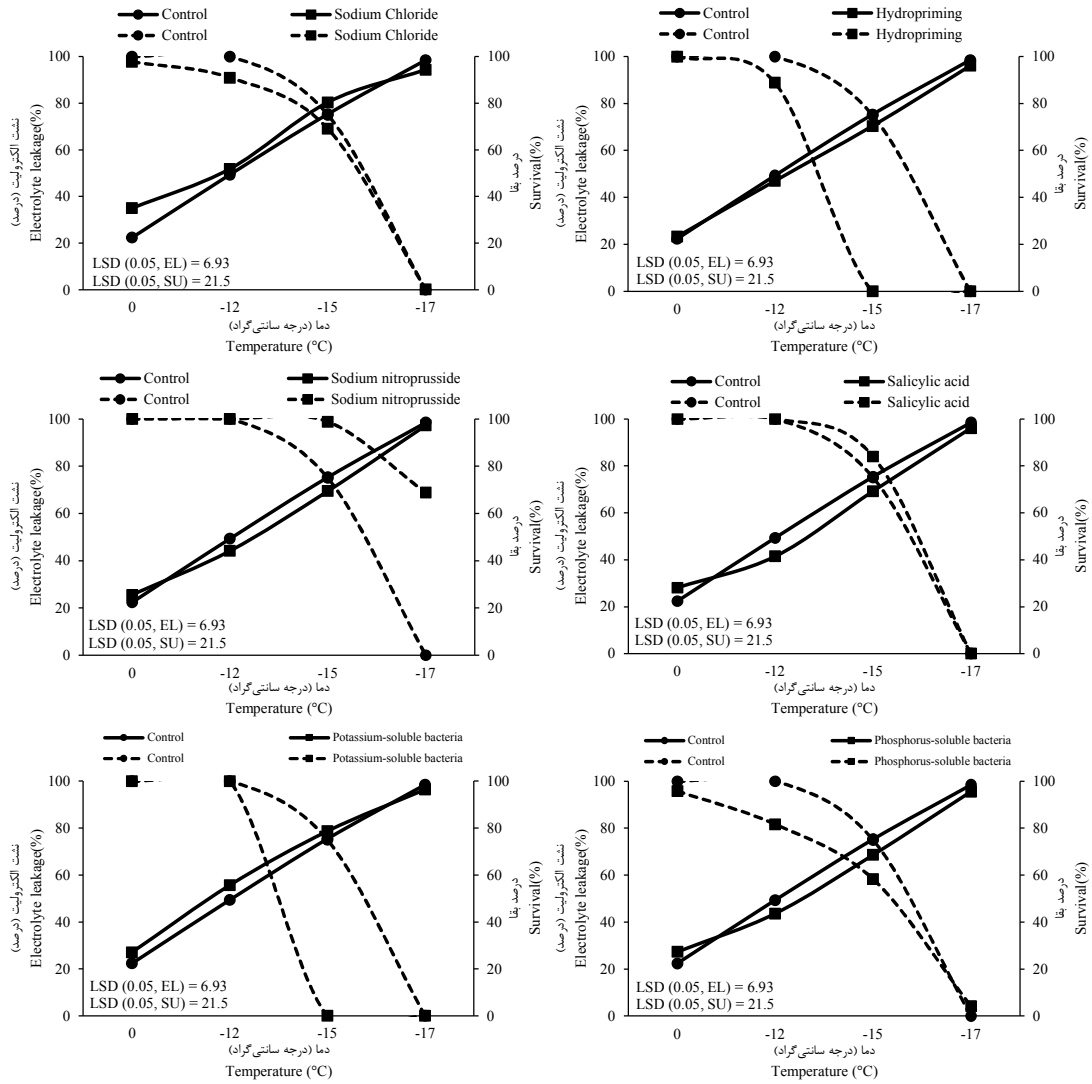
Fig. 2. Effect of seed priming on leaf electrolyte leakage (line) and survival percentage (dashed lines) in the MCC505 genotype under freezing stress

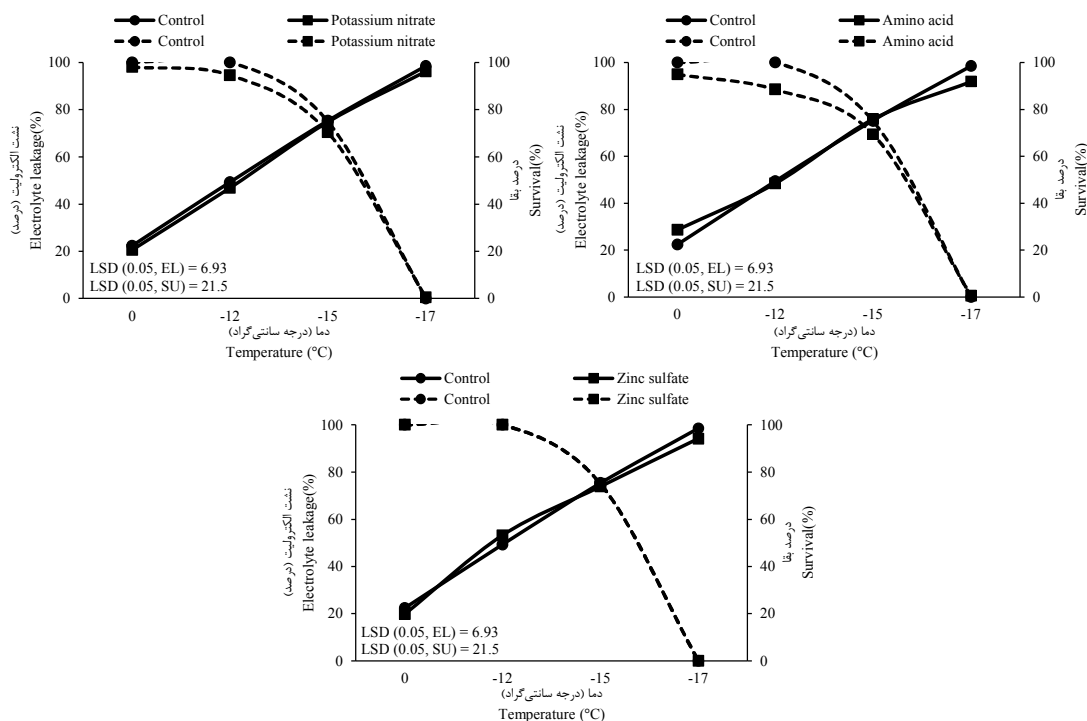
میان درصد نشت الکترولیت‌ها در رقم سارال تحت پیش تیمار با درصد بقاء همبستگی منفی و معنی داری مشاهده شد (شکل ۷). کاهش دما از صفر به -12 درجه سلسیوس همراه با تغییرات درصد نشت الکترولیت‌ها می‌باشد اما بر درصد بقاء چندان تأثیرگذار نیست، به طوری که نشت الکترولیت‌ها در دمای -12 درجه سلسیوس نسبت به صفر درجه سلسیوس در پیش تیمار نیتروپروساید سدیم و تیمار شاهد به ترتیب ۱۸ و ۲۶ درصد افزایش یافت، در صورتی که کاهش درصد بقاء در شرایط همسان $0/01$ درصد بود (شکل ۳). با کاهش شدیدتر دما از -12 به -15 درجه سلسیوس نشت الکترولیت‌ها در تیمارهای مذکور به ترتیب ۲۵ و ۲۶ درصد افزایش یافت، در صورتی که کاهش درصد بقاء در شرایط همسان به ترتیب $1/16$ و ۲۵ درصد بود (شکل ۳). به عبارتی به ازای هر درجه سلسیوس کاهش دما از صفر به -15 درجه سلسیوس در تیمارهای مذکور به ترتیب $2/9$ و $3/5$ درصد افزایش نشت الکترولیت‌ها و $0/07$ و $1/6$ درصد کاهش بقاء مشاهده شد (شکل ۳).

برای تعیین حساسیت میان پیش تیمارها می‌توان از نحوه پاسخ آن‌ها در ژنوتیپ‌های متفاوت بهره گرفت، برای این منظور، همان‌طور که در شکل ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، سرعت افزایش نشت میان ژنوتیپ MCC505 و رقم سارال متفاوت می‌باشد، به طوری که رقم سارال و ژنوتیپ MCC505 به ترتیب از شیب ملایم و تندی برخوردارند. این نتایج نشان می‌دهد که تنش یخزدگی منجر به افزایش نشت الکترولیت‌ها و احتمالاً همراه با کاهش متابولیسم سلولی در گیاهچه‌های نخود شده است (حیدروند و امیری^۱، ۲۰۱۰). بر اساس دیدگاه بسیاری از پژوهشگران، درصد نشت الکترولیت‌ها رابطه معکوسی با سلامت غشاء سلولی دارد و هرچه درصد نشت الکترولیت‌ها افزایش یابد، غشاء سلولی ناپایدارتر می‌گردد (نظامی و ناقدی‌نیا^۲، ۲۰۱۱).

¹ Heidarvand and Amiri

² Nezami and Naghedhi Nia





شکل ۳. اثر پیش تیمار بذر بر درصد نشت الکترولیت‌های برگ (خطوط پیوسته) در مقابل درصد بقاء (خطوط منقطع) در رقم سارال تحت تنش یخزدگی

Fig. 3. Effect of seed priming on leaf electrolyte leakage (line) and survival percentage (dashed lines) in the Saral cultivar under freezing stress

عبارتی نشت الکترولیت‌ها در پیش تیمارهای مذکور کاملاً منطبق بر تیمار شاهد بود (شکل ۴). با این وجود کاربرد تیمار کلرید سدیم و نیترات پتاسیم در دمای صفر درجه سلسیوس منجر به کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۴). همچنین کاهش نشت الکترولیت‌ها در تیمارهای نیتروپروساید سدیم، هیدروپرایمینگ و سولفات روی در دمای -۱۵ درجه سلسیوس در مقایسه با تیمار شاهد نیز مشاهده شد. علاوه بر این تفاوتی میان پیش تیمارها و تیمار شاهد از نظر درصد بقاء به استثنای دمای -۱۵- درجه سلسیوس مشاهده نشد (شکل ۴). کاربرد تمام پیش تیمارها به استثنای پیش تیمار باکتری حل کننده فسفات نسبت به تیمار شاهد منجر به افزایش درصد بقاء در دمای -۱۵- درجه سلسیوس شد این در حالی است که میان پیش تیمار باکتری حل کننده فسفات و تیمار شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل ۴).

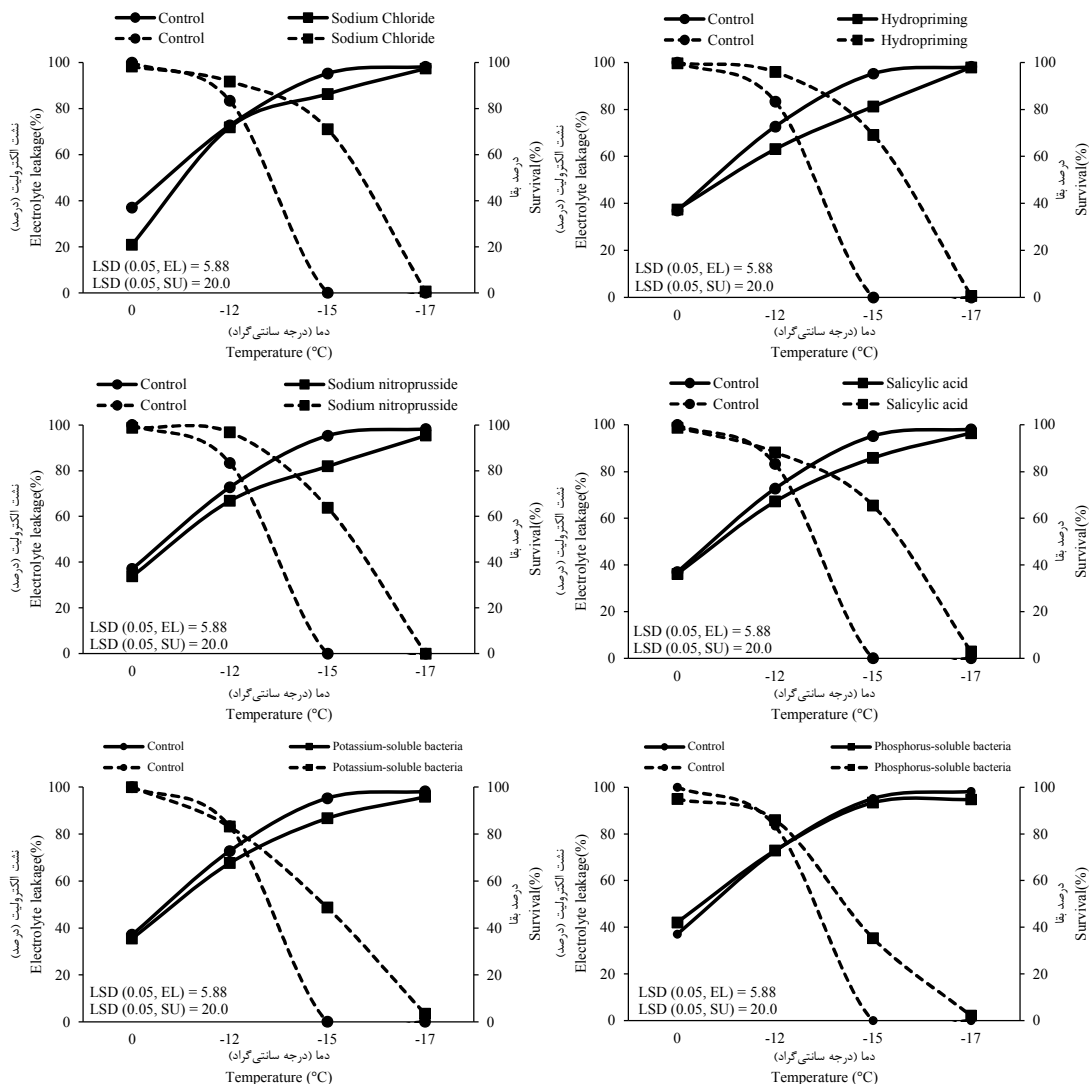
خوسرمایی یک فرآیند القایی می باشد که زمانی رخ می دهد که گیاهان در معرض دمای کم قرار گیرند (کراساتی و همکاران، ۲۰۰۸). در طبیعت، این اتفاق با

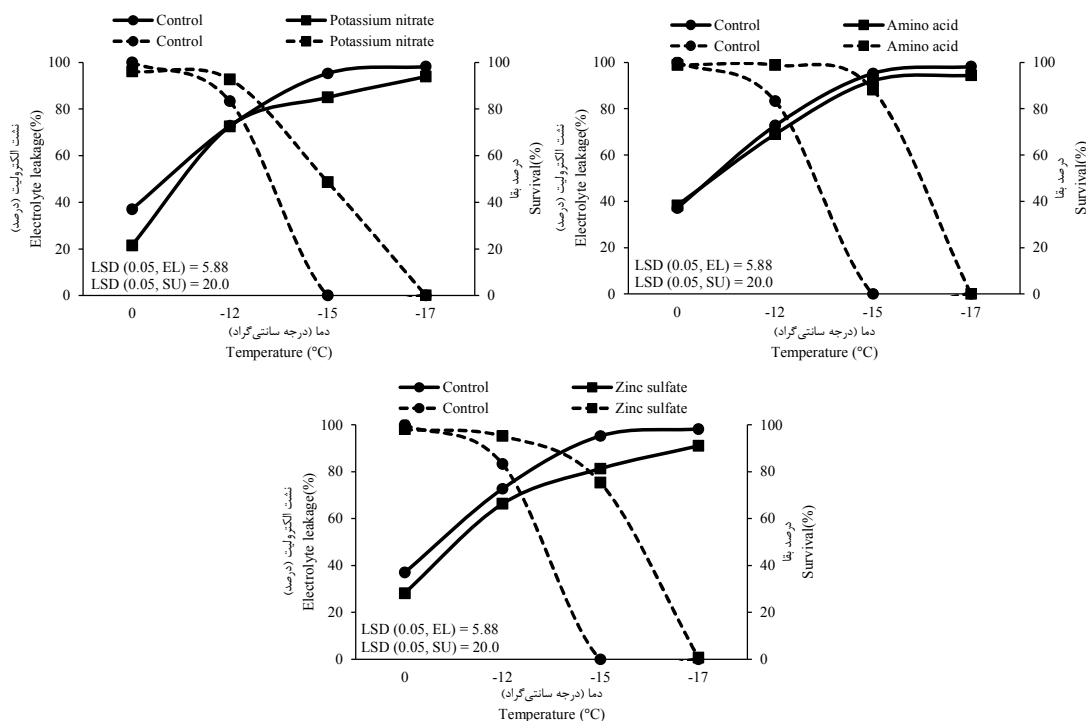
این نتایج بیانگر این است که تیمار نیتروپروساید سدیم در رقم سارال توانست از کاهش درصد بقاء ناشی از یخزدگی ممانعت کند. پژوهش‌های بسیاری در زمینه ارتباط پیش تیمار بذر و تحمل به سرمای گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است. به عنوان مثال پیش تیمار بذر با هیدروپرایمینگ، تحمل به سرمای گیاهان فلفل همکاران، (۲۰۱۱). همچنین پیش تیمار بذر در پلی اتیلن گلکول یا نمک باعث افزایش تحمل به سرما در اسفناج (*Spinacia oleracea*) و گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) شد (چن و آرورا، ۲۰۱۱).

نتایج نشان داد که کاربرد پیش تیمارهای اسید سالیسیلیک، باکتری‌های حل کننده فسفر و پتاسیم و آمینواسید بر ژنوتیپ ILC8617 تأثیری بر نشت الکترولیت‌های برگ در مرحله گیاهچه‌ای نداشت. به

¹ Yadav

² Chen and Arora





شکل ۴. اثر پیش تیمار بذر بر درصد نشت الکترولیت‌های برگ (خطوط پیوسته) در مقابل درصد بقاء (خطوط منقطع) در ژنوتیپ ILC8617 تحت تنش یخزدگی

Fig. 4. Effect of seed priming on leaf electrolyte leakage (line) and survival percentage (dashed lines) in the ILC8617 genotype under freezing stress

پایین شد (فاروق^۲ و همکاران، ۲۰۱۷؛ سالای^۳ و همکاران، ۲۰۱۶). با توجه به مطالعات گذشته و شواهد آزمایش کنونی به نظر می‌رسد کاربرد پیش تیمارهای هیدروپرایمینگ، سولفات روی و نیتروپروساید سدیم در ژنوتیپ ILC8617 احتمالاً از طریق تنظیم فعالیت مولکول‌ها در مراحل مختلف رشدی و استقرار مناسب گیاهچه منجر به سطحی از تحمل به یخزدگی گردیده‌اند.

بین درصد نشت الکترولیت‌ها در ژنوتیپ ILC8617 تحت پیش تیمار با درصد بقاء همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۷). کاهش دما از صفر به -۱۲ درجه سلسیوس همراه با تغییرات درصد نشت الکترولیت‌ها بود اما بر درصد بقاء چندان تأثیرگذار نبود، به طوری که نشت الکترولیت‌ها در دمای -۱۲ درجه سلسیوس نسبت به صفر درجه سلسیوس در

کاهش دما در اواخر پاییز یا اوایل زمستان آغاز می‌گردد. همچنین می‌توان با قرار دادن گیاهان در دمای پایین تحت شرایط آزمایشگاه و در شرایط نوری مناسب این فرآیند را تکرار کرد (شین و براوز^۱، ۲۰۰۰). علاوه بر این، پژوهشگران به وضوح نشان دادند که قدرت بذر نه تنها بر استقرار گیاهچه تأثیر می‌گذارد بلکه می‌تواند بر مقاومت و بقای گیاهچه در سرما زمستان تأثیرگذار باشد (الیاس و کاپلند، ۲۰۰۱)؛ بنابراین، کاربرد پیش تیمار بذر منجر به تجزیه سریع‌تر و تحرک بیشتر مولکول‌های ذخیره‌ای در گیاهان خواهد شد که با بهبود تحمل به سرما مرتبط است (یاداو و همکاران، ۲۰۱۱). در این رابطه مطالعات گسترده‌ای انجام گرفته است که به عنوان مثال خیساندن بذرهای ذرت (*Zea mays*) و برنج (*Oryza sativa*) در محلول اسید سالیسیلیک منجر بر ظهور گیاهچه و طول ریشه و ساقه مطلوبی در دمای

² Farooq

³ Szalai

¹ Xin and Browse

بازیافت گیاهان پس از یخ‌زدگی می‌باشد و کمتر در مسیر حفظ غشاء سلولی است.

میان درصد نشت الکترولیت‌ها در ژنوتیپ MCC495 تحت پیش‌تیمار با درصد بقاء همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد که فقط در پیش‌تیمارهای باکتری حل‌کننده پتاسیم و نیترات پتاسیم معنی‌دار نبود (شکل ۷). کاهش دما از صفر به ۱۲- درجه سلسیوس همراه با تغییرات شدید درصد نشت الکترولیت و درصد بقاء در تیمار شاهد می‌باشد اما بر درصد بقاء تحت پیش‌تیمار چندان تأثیرگذار نیست، به‌طوری‌که درصد نشت الکترولیت‌ها در دمای ۱۲- درجه سلسیوس نسبت به صفر درجه سلسیوس در پیش‌تیمارهای کلرید سدیم، نیتروپروساید سدیم و نیترات پتاسیم و تیمار شاهد به ترتیب ۶۲، ۴۷، ۶۰ و ۶۷ درصد افزایش یافت، در صورتی‌که کاهش درصد بقاء در شرایط همسان به ترتیب ۷/۷۴، ۹/۸۷، ۰/۰۱ و ۱۰۰ درصد بود (شکل ۵). به عبارتی به ازای هر درجه سلسیوس کاهش دما از صفر به ۱۲- درجه سلسیوس در پیش‌تیمارهای مذکور به ترتیب ۵/۲۲، ۳/۹۵، ۵/۰۳ و ۵/۵۸ درصد افزایش نشت الکترولیت‌ها و ۰/۶۴، ۰/۸۲، صفر و ۸/۳۳ درصد کاهش بقاء مشاهده شد (شکل ۵).

محدوده دمایی صفر تا ۱۲- درجه سلسیوس علاوه بر اینکه ابتدایی‌ترین دامنه یخ‌زدگی می‌باشد، وسیع‌ترین دامنه نیز میان تیمارهای دمایی مطالعه حاضر است، لذا تعیین افزایش نشت و کاهش درصد بقاء به ازای کاهش هر درجه سلسیوس در این محدوده این امکان را فراهم می‌آورد تا میان ژنوتیپ‌ها از نظر تحمل به یخ‌زدگی تفاوت قائل شد. با توجه به اینکه به‌طور میانگین به ازای کاهش هر درجه سلسیوس در ژنوتیپ MCC505، رقم سارال، ژنوتیپ ILC8617 و MCC495 به ترتیب ۴/۳۶، ۱/۸۶، ۲/۹۹ و ۴/۳۴ درصد افزایش نشت و ۱/۲۲، ۰/۳۵، ۰/۶۰ و ۱/۲۴ درصد کاهش بقاء می‌باشد، لذا می‌توان گفت ژنوتیپ ILC8617 از نظر تحمل به یخ‌زدگی واکنشی بینابین رقم سارال و ژنوتیپ MCC505 اما نزدیک به رقم سارال نشان داد در حالی‌که ژنوتیپ MCC495 شباهت بالایی به ژنوتیپ MCC505 داشت.

پیش‌تیمارهای هیدروپرایمینگ، نیتروپروساید سدیم، سولفات روی و تیمار شاهد به ترتیب ۲۵، ۳۳، ۳۸ و ۳۵ درصد افزایش یافت، در صورتی‌که کاهش درصد بقاء در شرایط همسان به ترتیب ۳/۷، ۲، ۲/۸ و ۱۶ درصد بود (شکل ۴). به عبارتی به ازای هر درجه سلسیوس کاهش دما از صفر به ۱۲- درجه سلسیوس در پیش‌تیمارهای مذکور به ترتیب ۲/۰۸، ۲/۷۵، ۳/۱۶ و ۲/۹ درصد افزایش نشت الکترولیت‌ها و ۰/۳۰، ۰/۱۶، ۰/۲۳ و ۱/۳۳ درصد کاهش بقاء مشاهده شد (شکل ۴).

نتایج نشان داد که کاربرد تمام پیش‌تیمارها در ژنوتیپ MCC495 اثری بر بهبود نشت الکترولیت‌های برگ در مرحله گیاهچه‌ای نداشت. به عبارتی نشت الکترولیت‌ها در پیش‌تیمارهای مذکور کاملاً منطبق بر تیمار شاهد بود، این در حالی است که پیش‌تیمارهای هیدروپرایمینگ، اسید سالیسیلیک، باکتری حل‌کننده فسفر و پتاسیم، آمینواسید و سولفات روی منجر به افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها در دمای صفر درجه سلسیوس شد (شکل ۵). علاوه بر این تفاوت معنی‌داری میان پیش‌تیمارها با تیمار شاهد از نظر درصد بقاء مشاهده شد (شکل ۵). به‌طوری‌که کاربرد تمام پیش‌تیمارها در دمای ۱۲- درجه سلسیوس و کاربرد تمام پیش‌تیمارها به‌استثنای سولفات روی در دمای ۱۵- درجه سلسیوس نسبت به تیمار شاهد منجر به افزایش درصد بقاء شد این در حالی است که تفاوت معنی‌داری میان پیش‌تیمار سولفات روی در دمای ۱۵- درجه سلسیوس نسبت به تیمار شاهد مشاهده نشد (شکل ۵).

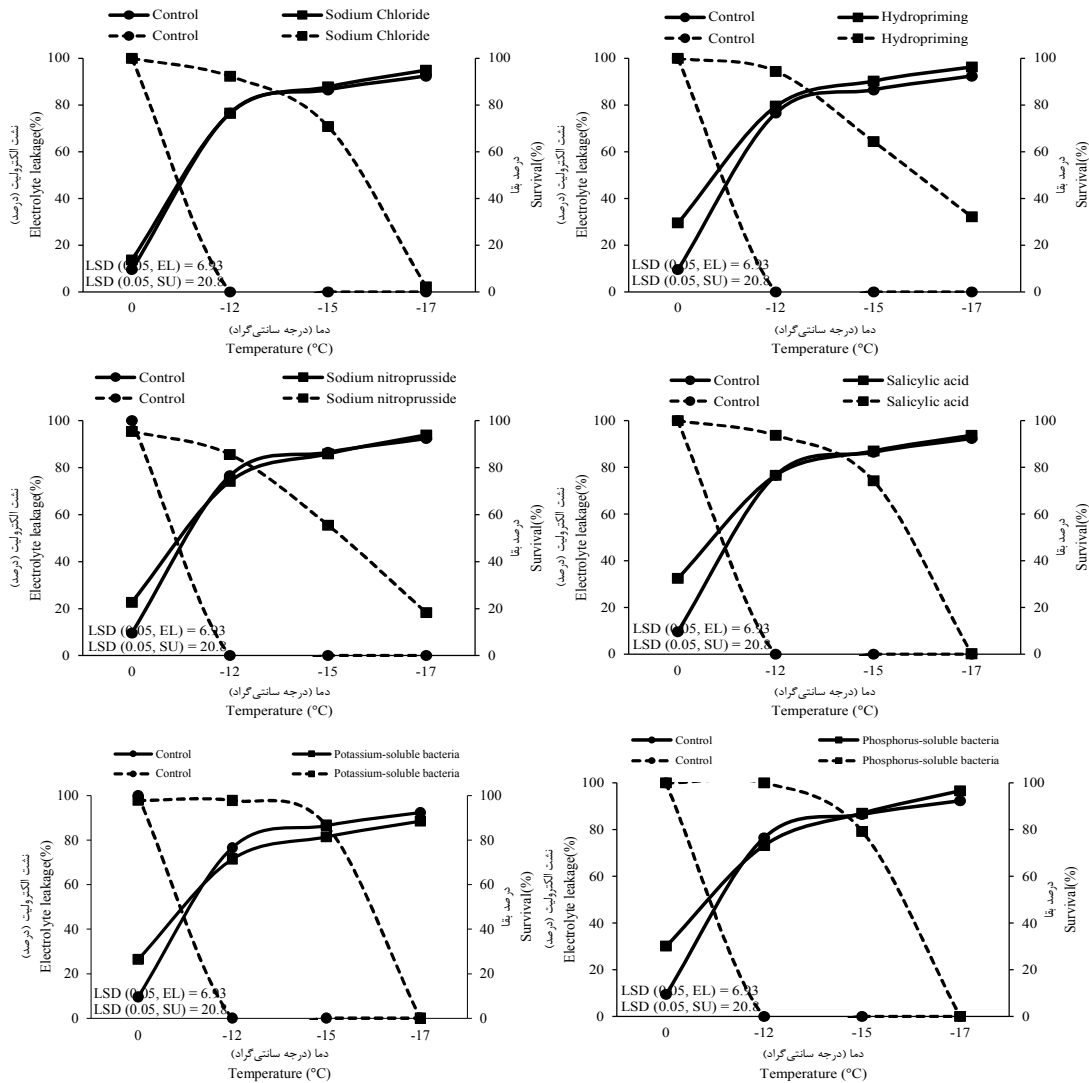
سازوکارهای انتقال اثرات پیش‌تیمار از مرحله‌ای به مرحله دیگر به‌سختی قابل‌درک است. اخیراً تغییرات آنزیم‌ها و تجمع ROSها و متابولیت‌ها در مورد انتقال اطلاعات از طریق متیلاسیون DNA مرتبط به sRNA در آندوسپرم گزارش شده است (گهرینگ و ساتیاکی^۱، ۲۰۱۷؛ وانگ^۲ و همکاران، ۲۰۱۷). با توجه به اینکه تأثیر پیش‌تیمار اغلب بر درصد بقاء گزارش گردیده است به نظر می‌رسد فعالیت تأثیر پیش‌تیمارها بیشتر در مسیر

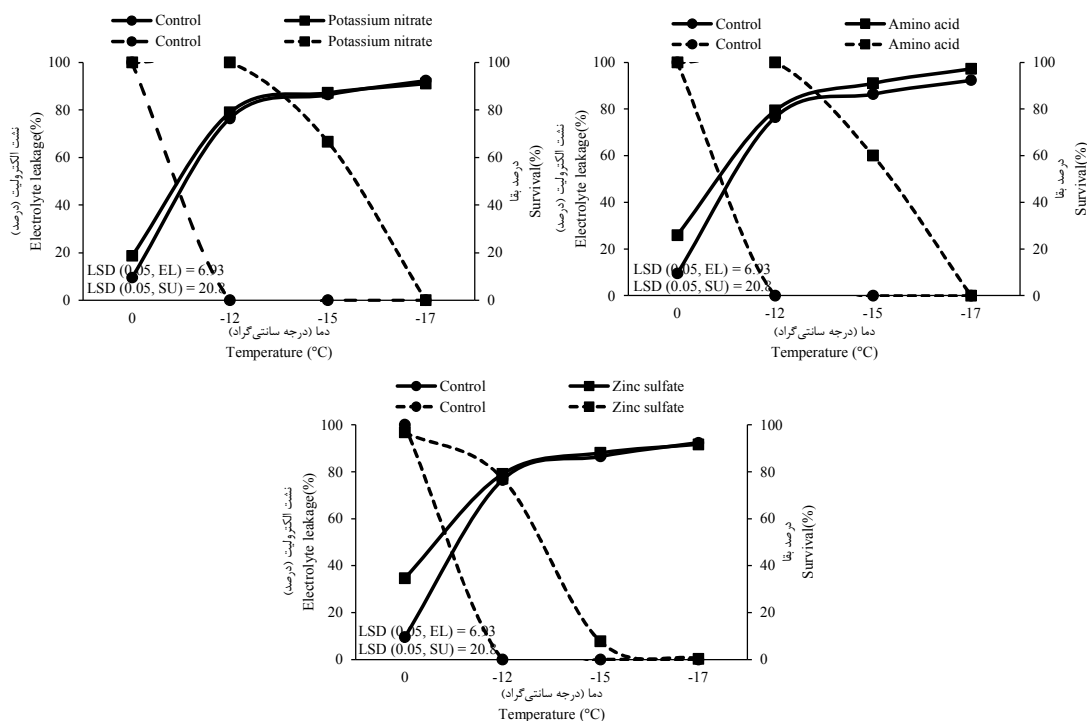
¹ Gehring and Satyaki

² Wang

اثر ژنوتیپ و پیش‌تیمار و برهمکنش آن‌ها معنی‌دار بود (جدول ۳).

بررسی تجزیه واریانس داده‌های ۵۰ درصد کشتندگی بر اساس درصد نشت الکترولیت‌ها و بقاء نشان داد که





شکل ۵. اثر پیش تیمار بذر بر درصد نشت الکترولیت‌های برگ (خطوط پیوسته) در مقابل درصد بقاء (خطوط منقطع) در ژنوتیپ MCC495 تحت تنش یخ‌زدگی.

Fig. 5. Effect of seed priming on leaf electrolyte leakage (line) and survival percentage (dashed lines) in the MCC495 genotype under freezing stress.

جدول ۳. منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها و بقاء در ژنوتیپ‌های نخود پیش تیمار شده تحت تأثیر تنش سرما

Table 3. Sources of variation, degree of freedom and mean square temperature of 50% lethality based on electrolyte leakage and survival various primed chickpea genotypes under freezing stress

منابع تغییرات	S.O.V	درجه آزادی df	دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس	
			درصد نشت الکترولیت‌ها LT _{50el}	درصد بقاء LT _{50su}
ژنوتیپ	Genotype (G)	3	101**	2.17*
پیش تیمار	Priming (P)	9	7.79**	3.91**
ژنوتیپ × پیش تیمار	G × P	27	8.99**	4.08**
خطا	Error	80	2.83	0.655
ضریب تغییرات (%)	C.V. (%)		16.2	5.49

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

* and ** significant at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, C.V: Coefficient of variation

الکترولیت‌ها به‌طور میانگین در ژنوتیپ‌های MCC505 (۸/۳۹-) و MCC495 (۹/۱۱-) مشاهده شد، که نسبت به هم تفاوت معنی‌داری نداشتند (شکل ۶). همچنین پایین‌ترین دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها نیز در ژنوتیپ ILC8617 (۱۱/۷-) و رقم سرال (۱۲/۰-) مشاهده شد، که نسبت به هم تفاوت

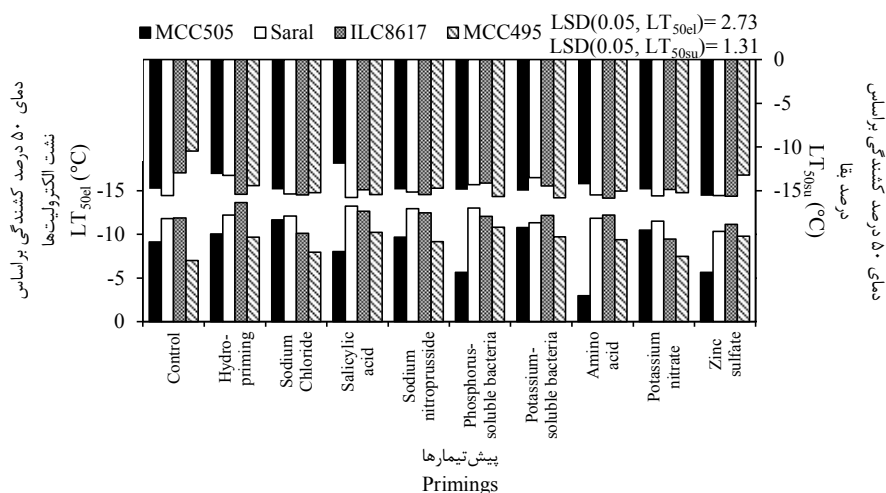
دمای ۵۰ درصد کشندگی به‌عنوان یکی از کاربردی‌ترین شاخص‌ها در ارزیابی تحمل به تنش یخ‌زدگی معرفی می‌شود (اوکیو^۱ و همکاران، ۲۰۱۱). بالاترین دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس نشت

¹ Okeyo

درصد کشتندگی بر اساس درصد بقاء در ژنوتیپ ILC8617 گردید (شکل ۶). همچنین کاربرد پیش‌تیمارهای باکتری حل‌کننده پتاسیم و فسفات، اسید سالیسیلیک، نیترات پتاسیم، کلرید سدیم، آمینواسید، نیتروپروساید سدیم و هیدروپرایمینگ به ترتیب نسبت به تیمار شاهد منجر به کاهش ۵۰/۷، ۴۹/۴، ۴۷، ۴۵/۲، ۴۵/۱، ۴۳/۴، ۴۰/۲ و ۳۷/۳ درصدی دمای ۵۰ درصد کشتندگی بر اساس درصد بقاء در ژنوتیپ MCC495 گردید (شکل ۶). این درحالی است که پیش‌تیمارهای مذکور نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار داشت اما نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. پیش‌تیمار سولفات روی در ژنوتیپ MCC495 و صفت مذکور نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۶). بررسی همبستگی میان درصد نشت الکترولیت‌ها و بقاء در سه ژنوتیپ و یک رقم نخود کابلی تحت پیش‌تیمار نشان داد که تغییرات این دو شاخص عکس هم بود، به‌گونه‌ای که با افزایش درصد نشت الکترولیت‌ها، درصد بقاء کاهش یافت (شکل ۷). به‌بیان‌دیگر، هرچه درصد نشت الکترولیت‌ها بالا باشد، درصد بقاء پایین است و برعکس؛ بنابراین، پیش‌تیمارهایی که در هر ژنوتیپ و رقم از درصد نشت الکترولیت کمتر و درصد بقاء بیشتر برخوردارند احتمالاً تحمل به تنش یخ‌زدگی بیشتری خواهند داشت.

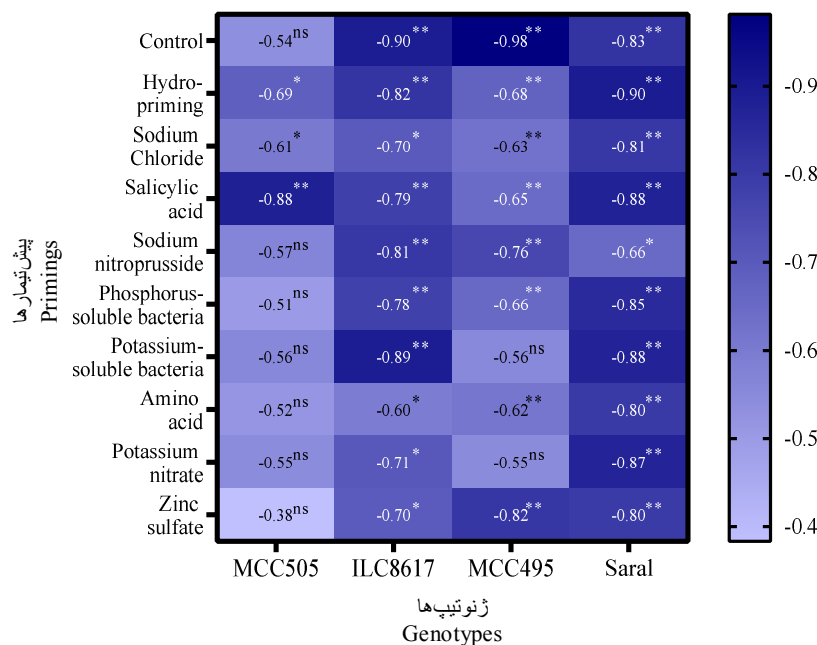
معنی‌داری نداشتند (شکل ۶). دمای ۵۰ درصد کشتندگی بر اساس درصد بقاء میان ژنوتیپ‌ها و رقم سارال تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۶). این نتایج مجدد در اثبات شباهت ژنوتیپ ILC8617 به رقم سارال و ژنوتیپ MCC495 به ژنوتیپ MCC505 تأکید دارد. از سوی دیگر، تفاوت معنی‌داری از لحاظ دمای ۵۰ درصد کشتندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها میان پیش‌تیمارها نسبت به تیمار شاهد در هر یک از ژنوتیپ‌های ILC8617 و MCC495 و رقم سارال وجود نداشت (شکل ۶). در ژنوتیپ MCC505 نیز به‌استثنای پیش‌تیمار آمینواسید، سایر پیش‌تیمارها نسبت به تیمار شاهد در صفت مذکور معنی‌دار نبودند. پیش‌تیمار آمینواسید نسبت به تیمار شاهد منجر به افزایش دمای ۵۰ درصد کشتندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها شد (شکل ۶). همچنین، تفاوت معنی‌داری از لحاظ دمای ۵۰ درصد کشتندگی بر اساس درصد بقاء میان پیش‌تیمارها نسبت به تیمار شاهد در رقم سارال وجود نداشت (شکل ۶). در ژنوتیپ MCC505 نیز به‌استثنای پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک، سایر پیش‌تیمارها نسبت به تیمار شاهد در صفت مذکور معنی‌دار نبودند (شکل ۶). پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک نسبت به تیمار شاهد منجر به افزایش دمای ۵۰ درصد کشتندگی بر اساس درصد بقاء شد (شکل ۶).

درواقع اثر مثبت کاربرد پیش‌تیمار به منظور القای تحمل به یخ‌زدگی اندام‌های هوایی در مرحله گیاهچه‌ای نخود در ژنوتیپ‌های ILC8617 و MCC495 نمایان شد. به‌طوری‌که کاربرد پیش‌تیمار آمینواسید نسبت به تیمار شاهد منجر به کاهش ۲۲ درصدی دمای ۵۰



شکل ۶. اثر پیش تیمار بر دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس نشت الکترولیت‌ها (محور چپ و پایین) و درصد بقاء (محور راست و بالا) ژنوتیپ‌های نخود تحت تنش یخ‌زدگی

Fig. 6. Effect of seed priming on 50% lethality temperature based on electrolyte leakage (left and bottom axis) and survival (right and top axis) of chickpea genotypes under cold stress



شکل ۷. ضرایب همبستگی میان درصد نشت الکترولیت‌ها با درصد بقاء در ژنوتیپ‌های نخود پیش تیمار شده

Fig. 7. Correlation coefficients between electrolyte leakage percentage and survival percentage in pre-treated chickpea genotypes

نتیجه‌گیری
در این مطالعه علاوه بر اینکه از فواید خوسرمایی به منظور افزایش تحمل گیاهان به یخ‌زدگی بهره برده شد از روش‌هایی نظیر پیش تیمار بذر نیز به منظور تحقق این هدف کمک گرفته شد. پیش تیمار علاوه بر اینکه به‌طور مستقیم از طریق جوانه‌زنی سریع، یکنواخت‌تر و استقرار مطلوب گیاهچه منجر به تحمل به یخ‌زدگی خواهد شد، همچنین به‌طور غیرمستقیم از طریق تأثیرات مطلوب پیش تیمار بر خوسرمایی نیز منجر به تحمل به یخ‌زدگی گیاهان شد؛ بنابراین، با توجه به

نتیجه‌گیری
در این مطالعه علاوه بر اینکه از فواید خوسرمایی به منظور افزایش تحمل گیاهان به یخ‌زدگی بهره برده شد از روش‌هایی نظیر پیش تیمار بذر نیز به منظور تحقق این هدف کمک گرفته شد. پیش تیمار علاوه بر اینکه

درصد شود. همچنین تیمار مذکور نسبت به تیمار شاهد در دمای ۱۵- درجه سلسیوس در ژنوتیپ ILC8617 منجر به کاهش ۱۳ درصدی نشت الکترولیت ها شد. علاوه بر این تیمار مذکور نسبت به تیمار شاهد منجر به کاهش ۴۰ درصدی دمای ۵۰ درصد کشندگی بر اساس درصد بقاء در ژنوتیپ MCC495 گردید. با توجه به اینکه کاربرد پیش تیمارها در اکثر موارد رفتاری مانند تیمار شاهد داشته و در برخی موارد منجر به پاسخی مؤثر و عالی گردیده است؛ بنابراین این عدم پاسخ در اکثر پیش تیمارها به دلیل همسو بودن کاربرد پیش تیمارها و خوسرمایی می باشد. به بیان دیگر پیش تیمار اثر هم افزایی بر خوسرمایی دارد. در نهایت می توان نتیجه گرفت که کاربرد این دو پدیده برای کاهش اثرات منفی ناشی از تنش یخزدگی بر صفات فیزیولوژیک توصیه می گردد.

کاربرد هم زمان این دو رویداد (پیش تیمار و خوسرمایی)، پاسخ های مطلوب کاربرد پیش تیمارها به منظور تحمل به یخزدگی، درون رویداد خوسرمایی نهفته است. با این وجود واکنش برخی پیش تیمارها در برخی از ژنوتیپ ها و رژیم های دمایی منجر به بهبود صفات اندازه گیری شده گردیده است. به طور کلی نتایج این آزمایش نشان داد که تنش یخزدگی باعث افزایش نشت الکترولیت ها شده و از این طریق منجر به کاهش درصد بقاء می شود اما کاربرد برخی پیش تیمارها منجر به عدم کاهش درصد بقاء شد. پیش تیمارهای هیدروپرایمینگ، نیتروپروساید سدیم و سولفات روی اثرات مطلوبی بر درصد بقاء و نشت الکترولیت ها داشتند که از میان تیمار نیتروپروساید سدیم توانست نسبت به تیمار شاهد در دمای ۱۵- و ۱۷- درجه سلسیوس در رقم سارال، دمای ۱۵- درجه سلسیوس در ژنوتیپ ILC8617، دمای ۱۲- و ۱۵- درجه سلسیوس در ژنوتیپ MCC495 منجر به افزایش درصد بقاء به ترتیب ۲۳، ۶۸، ۵۸، ۸۵ و ۵۵

منابع

- Amooaghaie, R. and Nikzad, K. 2013. The role of nitric oxide in priming-induced low-temperature tolerance in two genotypes of tomato. *Seed Science Research*, 23(2): 123-131. <https://doi.org/10.1017/S0960258513000068>
- Anderson, J., Kenna, M. and Taliaferro, C. 1988. Cold hardiness of Midiron and Tifgreen bermudagrass. *HortScience*, 23(4): 748-750. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.23.4.748>
- Arif, M., Waqas, M., Nawab, K. and Shahid, M. 2007. Effect of seed priming in Zn solutions on chickpea and wheat. *African Crop Science Society Conference*, 8: 237-240.
- Bahmani, M., Maali-Amiri, R., Javan-Nikkhah, M., Atghia, O. and Rasolnia, A. 2020. Enhanced tolerance to ascochyta blight in chickpea plants via low temperature acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 67(4): 758-766. <https://doi.org/10.1134/S1021443720040020>
- Beihaghi, M., Bagheri, A., Bahrami, A. R., Shahriari, F. and Nezami, A. 2010. The possible role of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in protein content of chickpea seeds (*Cicer arietinum* L.). *Iranian Journal of Pulses Research*, 1(1): 57-64. [In Persian with English Summary].
- Bibi, A., Majid, S., Ulfat, A., Khaton, S., Munir, A. and Javed, G. J. J. O. A. 2017. Effect of nitric oxide seed priming on chilling induced water related physiological attributes in germinating wheat. *Journal of Animal Plant Sciences*, 1: 186-191.
- Čanak, P., Miroslavljević, M., Ćirić, M., Vujošević, B., Kešelj, J., Stanisavljević, D. and Mitrović, B. 2016. Seed priming as a method for improving maize seed germination parameters at low temperatures. *Ratarstvo i Povrtarstvo/Field and Vegetable Crops Research*, 53(3): 106-110. <https://doi.org/10.5937/ratpov53-10825>
- Chaturvedi, S., Jha, S., Singh, N., Gaur, P. and Varshney, R. 2018. Technological and policy intervention for increasing chickpea production in India. *Pulse India*, 8(1): 7-12.

- Chen, K. and Arora, R. 2011. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in spinach (*Spinacia oleracea*). *Plant Science*, 180(2): 212-220. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.007>
- Crosatti, C., Pagani, D., Cattivelli, L., Stanca, A. and Rizza, F. 2008. Effects of growth stage and hardening conditions on the association between frost resistance and the expression of the cold-induced protein COR14b in barley. *Environmental Experimental Botany*, 62(2): 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.07.008>
- Cvetkovic, J., Müller, K. and Baier, M. 2017. The effect of cold priming on the fitness of *Arabidopsis thaliana* accessions under natural and controlled conditions. *Scientific Reports*, 7(1): 1-20. <https://doi.org/10.1038/srep44055>
- Devasirvatham, V. and Tan, D.K. 2018. Impact of high temperature and drought stresses on chickpea production. *Agronomy*, 8(8): 145. <https://doi.org/10.3390/agronomy8080145>
- Dixit, G., Srivastava, A. and Singh, N. 2019. Marching towards self-sufficiency in chickpea. *Current Science*, 116(2): 239-242. <https://doi.org/10.18520/cs/v116/i2/239-242>
- Ebadi, A. and Gollojeh, S. K. 2009. Effects of seed priming on growth and yield of chickpea under saline soil. *Recent Research in Science and Technology*, 1(6): 282-286.
- Elias, S.G. and Copeland, L.O. 2001. Physiological and harvest maturity of canola in relation to seed quality. *Agronomy Journal*, 93(5): 1054-1058. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.9351054x>
- Farahbakhsh, H. 2012. Germination and seedling growth in unprimed and primed seeds of fennel as affected by reduced water potential induced by NaCl. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3(4): 737-744.
- Farooq, M., Hussain, M., Nawaz, A., Lee, D. J., Alghamdi, S. S. and Siddique, K. H. 2017. Seed priming improves chilling tolerance in chickpea by modulating germination metabolism, trehalose accumulation and carbon assimilation. *Plant Physiology Biochemistry*, 111: 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.12.012>
- Garg, R., Bhattacharjee, A. and Jain, M. 2015. Genome-scale transcriptomic insights into molecular aspects of abiotic stress responses in chickpea. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(3): 388-400. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0753-x>
- Gehring, M. and Satyaki, P. 2017. Endosperm and imprinting, inextricably linked. *Plant Physiology Biochemistry*, 173(1): 143-154. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01353>
- Gupta, R. and Deswal, R. 2014. Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions. *Journal of Biosciences*, 39(5): 931-944. <https://doi.org/10.1007/s12038-014-9468-2>
- Heidarvand, L. and Amiri, R. M. 2010. What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(3): 419-431. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0451-8>
- Hiremath, U., Gowda, B., Lokesh, G. and Ganiger, B. 2021. Development of priming technology for enhanced planting value of seeds in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Applied Natural Science*, 13(2): 735-743. <https://doi.org/10.31018/jans.v13i2.2507>
- Kadiyala, M., Kumara Charyulu, D., Nedumaran, S.D Shyam, M., Gumma, M. and Bantilan, M. 2016. Agronomic management options for sustaining chickpea yield under climate change scenario. *Journal of Agrometeorology*, 18(01): 41-47. <https://doi.org/10.54386/jam.v18i1.897>
- Kazemi-Shahandashti, SS., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A. and Ramezani-pour, S.S. 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(13): 1106-1116. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.020>

- Khodabakhsh, F., Amooaghaie, R., Mostajeran, A. and Emtiazi, G. 2011. Effect of hydro and osmopriming in Two commercial chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars on germination, growth parameters and nodules number in salt stress condition. Iranian Journal of Plant Biology, 2(4): 71-86. [In Persian with English Summary].
- Murray, G., Eser, D., Gusta, L. and Eteve, G. 1988. Winterhardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. In World Crops: Cool season food legumes (pp. 831-843): Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2764-3_66
- Nezami, A. and Naghedi Nia, N. 2011. Effect of freezing stress on electrolyte leakage in six varieties of safflower. Iranian Journal of Field Crops Research, 8(6): 891-896. [In Persian with English Summary].
- Okeyo, D.O., Fry, J.D., Bremer, D., Rajashekar, C.B., Kennelly, M., Chandra, A., Genovesi, D.A. and Engelke, M. C. 2011. Freezing tolerance and seasonal color of experimental zoysiagrasses. Crop Science, 51(6): 2858-2863. <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.01.0049>
- Rhaman, M.S., Rauf, F., Tania, S.S. and Khatun, M. 2020. Seed priming methods: application in field crops and future perspectives. Asian Journal of Research in Crop Science, 5(2): 8-19. <https://doi.org/10.9734/ajrcs/2020/v5i230091>
- Sabaghpour, SH., Sadeghzadeh- Ahari, D., Mahmoodi, AA., Kanouni, H., Farayedi, Y., Sabaghpour, S., Sadeghzadeh- Ahari, D., Shahab, M., Kamel, M., Saeid, A., Mahmoodi, A., Pezeshkpour, P., Norollahi, K., Hasanpour- Hosni, M., Mahdie, M., Bahrami Kamangir, S., Mahmoodi, F., Nemati-Fard, M., Ghasemi, M. 2013. Saral, new chickpea variety to expand autumn sowing in highland cold areas of Iran. Research Achievements for Field and Horticulture Crops, 2(4): 265-276.
- Saeed, A., Darvishzadeh, R., Hovsepian, H. and Asatryan, A. 2010. Tolerance to freezing stress in cicer accessions under controlled and field conditions. African Journal of Biotechnology, 9(18): 2618-2626.
- Singh, K., Malhotra, R. and Saxena, M. 1995. Additional sources of tolerance to cold in cultivated and wild Cicer species. Crop Science, 35(5): 1491-1497. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500050037x>
- Szalai, G., Pál, M., Árendás, T. and Janda, T. 2016. Priming seed with salicylic acid increases grain yield and modifies polyamine levels in maize. Cereal Research Communications, 44(4): 537-548. <https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.038>
- Tania, S. S., Rhaman, M. S. and Hossain, M. M. 2020. Hydro-priming and halo-priming improve seed germination, yield and yield contributing characters of okra (*Abelmoschus esculentus* L.). Tropical Plant Research, 7(1): 86-93. <https://doi.org/10.22271/tpr.2020.v7.i1.012>
- Varshney, R. K., Song, C., Saxena, R. K., Azam, S., Yu, S., Sharpe, A. G., Cannon, S., Baek, J., Rosen, B. D. and Tar'an, B. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. Nature Biotechnology, 31(3): 240-246. <https://doi.org/10.1038/nbt.2491>
- Wang, Y., Tsukamoto, T., Noble, J. A., Liu, X., Mosher, R. A. and Palanivelu, R. 2017. Arabidopsis LORELEI, a maternally expressed imprinted gene, promotes early seed development. Plant Physiology, 175(2): 758-773. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00427>
- Xin, Z. and Browse, J. 2000. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. Plant, Cell Environmental Experimental Botany, 23(9): 893-902. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00611.x>
- Yadav, P., Maya, K. and Zakwan, A. 2011. Seed priming mediated germination improvement and tolerance to subsequent exposure to cold and salt stress in capsicum. Research Journal of Seed Science, 4(3): 125-136. <https://doi.org/10.3923/rjss.2011.125.136>

Research Article

Evaluating the possibility of increasing freezing tolerance in chickpeas (*Cicer arietinum*) by seed priming

Mohammad Mohammadi¹, Reza Tavakol Afshari^{2*}, Jafar Nabati^{3*}, Ehsan Oskoueian⁴

Extended Abstract

Introduction: One of the major reasons behind the unstable yield of chickpea, is the simultaneity of the reproductive stage with drought and late-season heat. Autumn sowing of chickpea is among the suitable approaches to improve chickpea yield. On the other hand, freezing stress is a limiting factor in the autumn sowing of chickpea. Recently, seed priming has been developed as an essential method to induce plant tolerance to environmental stress. The priming will result in a rapid response of the plant to stress. Freezing, as an environmental stress, limits the growth and development of many plants in different parts of the world. Studies show that in addition to acclimation, short-term biotic and abiotic stresses as pretreatment could also increase the plant's tolerance to cold stress. This process alters the freezing response positively.

Material and Methods: This experiment was conducted as a factorial in a completely randomized design with three replicates at the greenhouse of the Research Center for Plant Sciences of Ferdowsi University, Mashhad Iran, in 2018. The experimental factors consisted of various temperatures (0, -12, -15, and -17 °C), seed priming at 10 levels (control (without priming), hydropriming, priming with sodium chloride, salicylic acid, sodium nitroprusside, phosphate solubilizing bacteria and potassium solubilizing bacteria, amino acids, potassium nitrate, and zinc sulfate) and different chickpea genotypes (MCC505, ILC8617, MCC495, and Saral cultivar). In this experiment, the measured parameters included survival percentage, electrolyte leakage percentage, and lethal temperature resulting in 50% mortality according to the electrolyte leakage and survival percentage.

Results: The results showed that the application of hydropriming, priming with sodium nitroprusside and zinc sulfate had favorable effects on the survival rate and electrolyte leakage. Among these, priming with sodium nitroprusside increased the survival percentage compared to the control (23%) at the -15 and -17 °C in the Saral cultivar, at -15 °C in the ILC8617 genotype, and at -12 and -15 °C in the MCC495 genotype treatment to 68, 58, 85 and 55 percent, respectively. In addition, this treatment reduced the electrolyte leakage by 13% at -15 °C in the ILC8617 genotype compared to the control treatment. Further, the mentioned treatment resulted in a 40% reduction in lethal temperature resulting in 50% mortality according to the survival percentage. In the MCC495 genotype compared to the control treatment.

Conclusion: Overall, the cold stress in the chickpea plants resulted in an increase in electrolyte leakage and a decrease in the survival percentage. Application of sodium nitroprusside priming by improving cold stress tolerance resulted in a reduction of lethal temperature resulting in 50% mortality based on electrolyte leakage and survival percentage results. Additionally, the applied priming in improving the cold stress tolerance mainly improved the survival percentage compared to the improvement in the electrolyte leakage.

Keywords: Freezing, Hydropriming, Sodium nitroprusside, Survival percentage

Highlights:

1. The effect of different primings on the freezing tolerance of chickpeas was investigated and determined.
2. The freezing tolerance threshold of chickpea seedlings was determined at the laboratory under different primings.
3. The respondents of genotypes to priming and the behavior of genotypes towards each other were investigated.

¹ MS. Student of Seed Technology, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Professor, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³ Assistant Professor, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

⁴ Assistant Professor, Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran

*Corresponding author, E-mail: tavakolafshari@um.ac.ir
jafarnabati@ferdowsi.um.ac.ir