نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۹، شماره ۳ ، سال ۱۳۹۰، ص ۵۲۴-۵۱۴

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 9, No. 3, 2011, p. 514-524

اثرات تنش سرما در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و برخی صفات فیزیولوژیکی در نخود (*Cicer arietinum*)

سمیه ونایی[۱] - عادل سی و سه مرده[۲*] - غلامرضا حیدری[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۱۱

چکیده

به منظور بررسی اثرات تنش سرما بر آنزیم‌های آنتی اکسیدان و برخی صفات فیزیولوژیکی در نخود، دو آزمایش جداگانه در مراحل رشدی جوانه زنی و گیاهچه ای انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی با استفاده از فاکتور دما در شش سطح (۱۵°C= (تیمار شاهد)T۱، ۵°C= T۲، ۰°C= T۳، -۵°C= T۴، -۱۰°C= T۵، -۱۵°C= T۶) و رقم (پیروز = V۱، ILC۴۸۲ = V۲، بیونیج = V۳)، در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۸۸ در شرایط کنترل شده در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان اجرا گردید. نتایج نشان داد که اثر تنش سرما بر کلیه صفات از جمله فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز، درصد خسارت به غشاء و میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تأثیر معنی دار داشت، به گونه‌ای که کلیه ویژگی‌های ذکر شده با کاهش دما افزایش نشان دادند. در کل در مقایسه تیمارهای دمایی مورد بررسی، دمای ۵- درجه سانتی گراد بیشترین تأثیر را بر صفات فوق الذکر داشت. در مرحله جوانه زنی رقم ILC۴۸۲ به عنوان رقم متحمل شناخته شد و رقم پیروز بیشترین حساسیت را نشان داد. در این آزمایش بین میزان H_2O_2 با آنزیم‌های کاتالاز ($r= ۰/۹۸^{**}$) و پراکسیداز ($r= ۰/۸۹^{**}$) در مرحله جوانه زنی همبستگی مثبت و معنی داری مشاهده شد، اما فعالیت آنزیم پراکسیداز ۱۰ برابر بیشتر از کاتالاز بود. نتایج این آزمایش نشان داد که تنش سرما سبب افزایش گونه های فعال اکسیژن می شود و این ترکیبات نیز سبب آسیب و تخریب غشای سلول می شوند.

واژه های کلیدی: تحمل به سرما، پراکسیداز، پراکسید هیدروژن، خسارت به غشاء، کاتالاز

مقدمه

نخود از جمله گیاهان زراعی است که در مراحلی از رشد تحت تأثیر سرما قرار می گیرد. در حال حاضر کشت نخود در کشور به صورت دیم بهاره متداول است. در این نوع کشت، به دلیل مواجه‌شدن گیاه با درجه حرارت بالا و کمبود رطوبت به ویژه در دوره زایشی، عملکرد به شدت کاهش می‌یابد. علاوه بر این، از آنجائی‌که نخود از نظر واکنش به فتوپریود روز بلند است، در صورت کشت بهاره از دوره رویشی کوتاهی برخوردار است و در نتیجه بیوماس گیاه در زمان گلدهی به حد مطلوبی نمی‌رسد و عملکرد مناسبی تولید نمی‌شود (۵)، لذا دستیابی به ارقامی از نخود که متحمل به سرما باشند جهت کشت پاییزه ضروری است تا علاوه بر استفاده بهینه از آب در دسترس در اوایل بهار و استفاده از فصل رشد، از عوامل نامساعد محیطی در زمان گلدهی اجتناب شود.

یکی از مهمترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان که تحت تنش‌های سرما و یخبندان ایجاد می‌شود تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[۴]) مانند سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) در کلروپلاست و میتوکندری‌ها است (۸، ۲۶). گونه‌های فعال اکسیژن شکل‌های فعالی از اکسیژن هستند که در مراحل حیاتی مانند تنفس نوری، فتوسنتز و تنفس تولید می‌شوند. رادیکال سوپراکسید در طی فتوسنتز در صورت اختلال در تجزیه آب در واکنش هیل و عدم انتقال الکترون به فتوسیستم II تشکیل می‌شود (۹). ROS ها می‌توانند شدیداً با بیومولکول های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و پراکسیداسیون

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد زراعت و استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه کردستان
(*- نویسنده مسئول: (Email: a33@uok.ac.ir

4 - Reactive Oxigen Species

لیپید، دناتوره شدن پروتئین و جهش در DNA را سبب شوند که این امر به مختل شدن متابولیسم طبیعی گیاه و در نهایت مرگ سلول ها منجر می‌شود (۱۲،۲۵). گیاهان مکانیزم های حفاظتی مختلفی را برای دفع یا کاهشROS دارند که در سطوح مختلف تنش مؤثر است. سیستم های آنزیمی آنتی اکسیدان یکی از این مکانیزم‌های حفاظتی است. گیاهانی که از سطوح بالاتری از آنتی اکسیدان‌ها برخوردار هستند، مقاومت بیشتری به آسیب‌های اکسیداتیو نشان می دهند. دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز از مهمترین آنتی اکسیدان‌ها می‌باشند که باعث شکسته شدن H_2O_2 به آب و مولکول اکسیژن می‌گردند (۱۵،۳،۱،۳۱).

بهبود تحمل به تنش سرما در نخود ممکن است با ظرفیت سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت از جمله فعالیت بیشتر آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات و پراکسیداز در این گیاه مرتبط باشد (۱۶). نایار و همکاران (۲۳) با بررسی گیاهچه های ۱۴ روزه نخود تحت تنش سرما مشاهده کردند که کاهش دما به ۴ درجه سانتیگراد باعث ۵۰ درصد تراوش یونی گردید، در حالیکه تطابق با دمای پایین به میزان ۱۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶ روز، با کاهش تولید پراکسید هیدروژن، LT50 را به ۲ درجه سانتیگراد کاهش داد. کومار و همکاران (۱۸) مشاهده کردند که دو رقم نخود حساس به سرما دارای تراوش یونی و میزان پراکسید هیدروژن بیشتری در مقایسه با دو رقم مقاوم بودند. ارقام مقاوم میزان پرولین و آسکوربیک اسید و فعالیت آنزیمی سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بیشتری داشتند. با توجه به آنچه ذکر گردید در این بررسی اثر تنش سرما بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و ویژگی‌های آنتی اکسیدانی سه رقم عمده نخود کشت شده در ایران مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق در سال‌های ۸۸- ۱۳۸۷ در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان اجرا گردید. تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار به اجرا گذاشته شد و طی آن دو فاکتور دما و رقم در دو مرحله رشدی به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای آزمایشی عبارت بودند از دما در شش سطح شامل (T ۱ =۱۵°C به عنوان تیمار دمایی شاهد، T۲ =۵°C، T۳ =۰°C، T۴ =-۵°C، T۵ =-۱۰°C، T۶ =-۱۵°C) و رقم در سه سطح شامل (پیروز=V۱، V۲=ILC۴۸۲ و بیونیج=V۳) و مراحل رشدی نیز شامل جوانه زنی (گیاهچه ۷ روزه) و رشد اولیه (گیاهچه ۱۶ روزه دارای دو برگ مرکب) بودند. رقم ILC۴۸۲ به عنوان یک رقم مقاوم به سرما گزارش شده است (۴) و رقم پیروز به ویژه در مراحل اولیه رشد به تنش سرما حساس می باشد (۲).

اجرای آزمایش در مرحله جوانه زنی

به منظور اجرای آزمایش در مرحله جوانه زنی، قبل از کشت تمامی بذر ها ضد عفونی شده و به هر پتری دیش حاوی ۱۰ عدد بذر، ۱۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید. هر۱۰پتری دیش به عنوان یک واحد آزمایشی (۱۰ پتری دیش در هر تکرار) در نظر گرفته شد. تمامی پتری دیشها ابتدا به مدت هفت روز در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد قرارداده شدند تا جوانه زنی صورت گیرد و تیمارهای دمایی از آن پس اعمال گردید. تیمارهای دمایی در اتاقک رشد مدل SANYO MLR 351 Hاعمال گردید، شدت نور در حد ۲۵۰ میکرو مول بر مترمربع بر ثانیه تنظیم گردید و طول شب و روز به ترتیب ۱۰ و ۱۴ ساعت در نظر گرفته شد. تیمارهای دمایی ۵ درجه سانتیگراد و بالاتر از آن به مدت ۳ روز بر روی گیاهچه های ۷ روزه اعمال گردید. در تیمارهای دمایی صفر و کمتر از صفر قبل از قرار دادن گیاهچه های ۷ روزه تحت تیمار دمایی، پتری دیش ها به مدت ۷ روز در دمای ۵+ درجه قرار داده شده تا خوسرمایی در آنها صورت گیرد. سپس به تدریج دما با آهنگ ۴ درجه سانتی گراد در روز کاهش داده شد تا به تیمار دمایی مورد نظر برسد (۲۳). در این حالت نیز مدت اعمال تیمارها پس از خوسرمایی ۳ روز بود. خوسرمایی با تغییرات بیوشیمیایی از جمله تقویت سیستم دفاعی آنتی اکسیداتیو همراه است (۲۴) و اعمال آن قبل از اعمال تیمارهای سرمایی ضروری می باشد. در پایان آزمایش نمونه های ساقه چه جهت اندازه‌گیری صفات مورد نظر در فریزر و در دمای ۴۲- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اجرای آزمایش در مرحله گیاهچه ای

در این آزمایش بذور پس از ضدعفونی، در گلدان‌های پلاستیکی حاوی ۱۵۰ گرم خاک شامل شن، خاک برگ و خاک معمولی به نسبت مساوی در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. در هر گلدان چهار عدد بذر در عمق یک سانتی‌متری کشت شد و پس از سبز شدن یک بوته حذف و سه بوته حفظ شد. شرایط رشد مانند آزمایش جوانه زنی بود. در هر تکرار ۱۰ گلدان در نظر گرفته شد. ۱۶ روز پس از کاشت هنگامی که گیاهان دارای دو برگ مرکب بودند، ابتدا خوسرمایی با همان روند ذکر شده در قسمت قبل صورت گرفت و سپس اعمال تیمارها همانند مرحله جوانه زنی انجام گرفت. سپس برگ‌های مرکب بریده شده و نمونه ها برای انجام آزمایش‌های مربوطه در فریزر و در دمای ۴۲- درجه نگهداری شدند.

صفات مورد بررسی

ارزیابی خسارت به غشای سلولی

در مرحله جوانه‌زنی ارزیابی درصد خسارت ساقه‌چه صورت گرفت

و در مرحله رشد اولیه برگ‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. اندازه گیری نشت یونی به روش لوتس و همکاران (۲۰) انجام شد. به این منظور ابتدا نمونه‌های ساقه چه و یا برگ به میزان ۰/۳ گرم توزین شده و با آب مقطر شستشو داده شد. سپس درون لوله های آزمایش حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر قرار داده شدند. لوله ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت توسط یک شیکر تکان داده شدند و پس از آن نشت یونی محلول (L_1) اندازه گیری شد. در مرحله بعد به نمونه ها ۲۰ سی سی آب مقطر اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو شدند و در نهایت نشت یونی محلول(L_2) بعد از به تعادل رسیدن با دمای محیط اندازه گیری شد و میزان نشت یونی (خسارت به غشاء سلولی) از رابطه زیر محاسبه گردید:

نشت یونی[1] (EL):

$$EL(\%)=(L1/(L1+L2))*100$$

نشت یونی با استفاده از دستگاه اندازه گیری هدایت الکتریکی (EC متر) در محلول آبی محتوی قطعات برگ اندازه گیری شد که میزان مواد محلول را در محلول آبی نشان داده و معیاری از آسیب وارد شده به غشاء سلول و خروج مواد محلول از غشاء سلولی به محلول آبی است (۲۰).

تعیین میزان پراکسید هیدروژن

به منظور اندازه گیری میزان پراکسید هیدروژن در مرحله جوانه‌زنی ساقه چه و در مرحله رشد اولیه برگها مورد استفاده قرارگرفتند. اندازه گیری پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به روش لورتو و ولیکوا (۱۹) صورت گرفت. به این منظور ۰/۳ گرم نمونه از هر یک از مراحل جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای در ۳ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید(TCA) ۱٪ هموژن گردید. سپس نمونه ها به لوله‌های سانتریفوژ منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از آن به ۰/۷۵ میلی لیتر از محلول روشناور، ۰/۷۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم۱۰ میلی مولار با pH معادل۷ و ۱/۵ میلی لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه شد. غلظت پراکسید هیدروژن نمونه‌ها به وسیله مقایسه جذب آنها در طول موج ۳۹۰ نانومتر و منحنی استاندارد آن در طیفی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومول بر میلی‌لیتر محاسبه شد. در نهایت غلظت پراکسید هیدروژن با توجه به محتوای آب نمونه ها و درصد ماده خشک به صورت میکرومول برگرم وزن خشک بیان شد.

ارزیابی فعالیت آنزیمی

به منظور ارزیابی فعالیت‌های آنزیمی ابتدا استخراج پروتئین صورت گرفت. به این منظور ۰/۵ گرم از نمونه های ساقه چه مرحله جوانه زنی و یا برگ مرحله گیاهچه ای در هاون حاوی ۵ میلی لیتر بافر تریس- HCl ۰/۱ نرمال با pH معادل ۷/۴ و ۱۰٪ گلیسرول در یک بستر یخی هموژن گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ محلول روشناور مربوط به هر واحد آزمایشی در چند ویال جداگانه نگهداری شدند. در این تحقیق به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نمونه های پروتئینی استخراج شده، H_2O_2 به عنوان سوبسترا و بر اساس فرآیند تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن بوسیله آنزیم های فوق استفاده شد.

- آنزیم پراکسیداز

سنجش فعالیت این آنزیم به روش مک آدام و همکاران (۲۱) صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل ۰/۸۱ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات۵۰ میلی مولار با pH=۶/۶، ۲۰ میکرو لیتر پروتئین محلول نمونه و ۹۰ میکرولیتر گوئیکول ۱٪ به عنوان الکترون دهنده مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش در کووت ریخته شد و قبل از اندازه گیری سرعت واکنش، ۹۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد به عنوان پذیرنده الکترون به مخلوط واکنش اضافه شد و مقدار جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه در ۲۵ درجه سانتیگراد با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. تغییرات آنزیمی بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد و با شاهد که همان مخلوط واکنش قبل از اضافه کردن پراکسید هیدروژن است، مقایسه شد.

- آنزیم کاتالاز

برای اندازه گیری آنزیم کاتالاز از روش چنس و ماهلی (۱۱) استفاده شد. به این منظور مخلوط واکنش شامل ۰/۷۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار با pH=۷ ، ۲۰ میکرو لیتر پروتئین محلول و ۱۵۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به کووت کوارتز اضافه شد و به هنگام اندازه گیری آنزیم ۷۵۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی مولار به مخلوط واکنش اضافه گردید. تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه در ۲۵ درجه سانتیگراد با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد. تغییرات آنزیمی بر حسب تغییرات در جذب در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین بیان شد. کووت شاهد نیز شامل ۰/۷۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات و ۲۰ میکرو لیتر پروتئین محلول بود.

در نهایت داده ها با استفاده از برنامه آماری SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها نیز توسط آزمون حداقل اختلاف معنی (LSD) در سطح ۵ درصد انجام گرفت. نمودارها نیز با

1- Electrolyte Leakage

استفاده از نرم افزار Excel تهیه گردید.

نتایج و بحث

درصد خسارت به غشاء سلولی

در هر دو مرحله رشدی میزان خسارت به غشاء سلولی به صورت معنی داری تحت تأثیر دما و رقم قرار گرفت (جداول ۱ و ۲) و با کاهش دما میزان نشت یونی افزایش پیدا کرد (نمودارهای ۱ و ۲). مقادیر بالای نشت یونی نشان دهنده عدم توانایی غشاء در حفظ ترکیبات درون سلولی، خروج بیشتر الکترولیت ها از غشاء و خسارت به غشاء سلولی می‌باشد. در هر دو مرحله جوانه زنی و گیاهچه ای بیشترین میزان نشت یونی به دماهای ۵- ، ۱۰- و ۱۵- درجه سانتی‌گراد مربوط بود و این سه تیمار دمایی تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. بنابراین می‌توان اظهار داشت که با کاهش دما، پایداری غشاء کاهش پیدا می‌کند ولی در دماهای پایین‌تر از ۵- درجه سانتیگراد، کاهش دما اثر معنی داری بر افزایش نشت یونی ندارد، زیرا در این طیف دمایی میزان نشت یونی و خسارت به غشاء به حداکثر میزان ممکن یعنی نزدیک ۱۰۰ درصد رسیده است (نمودارهای ۱ و ۲). مطالعات نشان می دهد که اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشاء سلولی در سیالیت غشاء بسیار مهم می‌باشند. درجه حرارت پایین باعث تغییر سیالیت غشاء این اسیدهای چرب از حالت نیمه مایع به حالت کریستالی می‌شود (۲۲) و بدنبال آن نشت یونی افزایش می یابد. گونه های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده در شرایط تنش سرما می‌توانند با اسیدهای چرب واکنش دهند و سبب پراکسیداسیون لیپیدهای اصلی غشاء و بدنبال آن نشت محتوای سلولی و خشکی سریع و مرگ سلول شوند (۲۸). این تغییرات سبب ظهور سایر اثرات سرما زدگی در سطح سلول و گیاه می‌شود (۱۰).

آپوستولوا و همکاران (۶) در بررسی اثر تنش سرما در مرحله گیاهچه ای روی دو رقم گندم گزارش کردند که سطوح نشت یونی توسط دماهای بالاتر از صفر درجه سانتیگراد تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد در حالی که تیمار گیاهان با دماهای زیر صفر افزایش شدیدی را در نشت غشای پلاسمایی منجر می‌شود. اما در آزمایش حاضر مشاهده شد که حتی دماهای بالاتر از صفر درجه سانتیگراد در مرحله جوانه‌زنی خسارت به غشاء را در نخود افزایش می دهند که نشان دهنده حساسیت بیشتر نخود در مقایسه با گندم به تنش سرما می باشد.

در مرحله جوانه زنی، ۵۰ درصد خسارت به غشاء سلولی (LT50) در رقم بیونیج در دمای ۴/۵ درجه سانتیگراد مشاهده شد، اما ارقام پیروز و ILC۴۸۲ ۵۰ درصد خسارت به غشاء را در دمای ۳ درجه سانتیگراد نشان دادند. این واکنش ارقام نخود با نتایج نایار و همکاران (۲۳) نزدیک است. در همین مرحله رشدی رقم ILC۴۸۲ در تیمارهای صفر درجه سانتی‌گراد و کمتر از آن در مقایسه با ارقام دیگر خسارت کمتری دیده است که این نکته مؤید برتری این رقم در شرایط دمایی کمتر از صفر درجه سانتیگراد است. رقم پیروز و بیونیج حساسیت مشابهی را نشان دادند (نمودار۱). در آزمایش دوم (مرحله گیاهچه‌ای) نیز مشاهده شد که رقم ILC۴۸۲ در بین ارقام مورد بررسی دارای بیشترین مقاومت به یخ زدگی است. (نمودار۲). تاکاک (۲۸) در تحقیقی روی دو رقم ذرت مشاهده کرد که بعد از دو روز تنش سرما میزان نشت یونی در رقم حساس به سرما دو برابر و در رقم مقاوم تنها کمی افزایش پیدا می کند. گائو و همکاران (۱۳) نیز در آزمایشی بر روی چهار رقم برنج دریافتند که میزان نشت یونی در رقم های حساس به سرما افزایش می یابد در حالی که در رقم‌های مقاوم تغییر چندانی پیدا نمی کند.

پراکسید هیدروژن

نتایج تجزیه واریانس (جداول۱و ۲) نشان داد که در هر دو مرحله رشدی تیمارهای دمایی و ارقام مورد بررسی بر میزان پراکسید هیدروژن در سطح ۱٪ تأثیر معنی دار داشتند.

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد آزمون در مرحله جوانه زنی متأثر از سطوح مختلف تیمار دمایی در سه رقم نخود

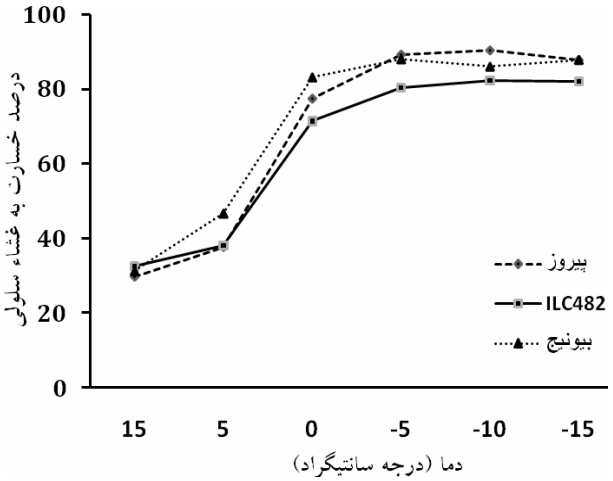
		میانگین مربعات (MS)			
منابع تغییرات	درجه آزادی	خسارت به غشاء	پراکسید هیدروژن(H_2O_2)	پراکسیداز	کاتالاز
بلوک	۲	۱۴/۸۲	۰/۰۰۶۷	۰/۰۱۹	۰/۰۰۰۱۵
دما	۵	۵۶۵۷/۶۵**	۳۰/۵۰۶**	۱/۵۳**	۰/۰۱۴۹**
رقم	۲	۱۶۷/۹۷**	۱/۲۴**	۰/۱۷۱**	۰/۰۰۳۲**
دما × رقم	۱۰	۳۲/۶۷**	۰/۳۵ ns	۰/۰۸۹**	۰/۰۰۱۱**
اشتباه	۳۴	۱۱/۲۳	۰/۲۳۱	۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۲۸
ضریب تغییرات (CV%)		۴/۹۳	۱۴/۰۳	۱۴/۱۵	۱۷/۳۷

n.s، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و وجود اختلاف معنی دار در سطوح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می باشد.

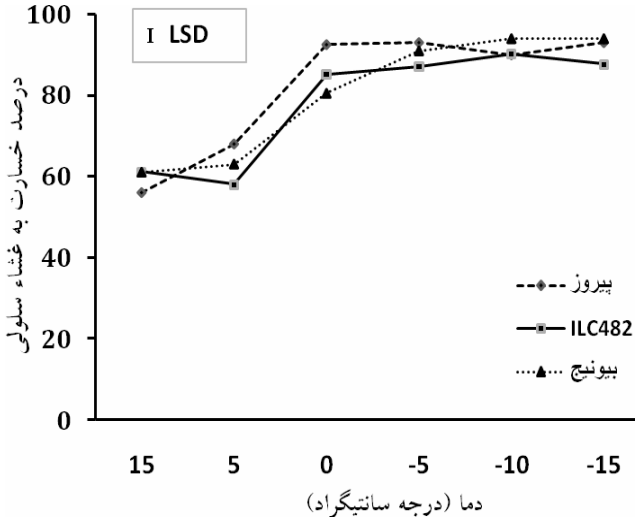
جدول۲- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد آزمون در مرحله گیاهچه ای متأثر از سطوح مختلف تیمار دمایی در سه رقم نخود

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)			
		خسارت به غشاء	پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)	پراکسیداز	کاتالاز
بلوک	۲	۰/۳۲۲	۱/۱۷	۰/۳۶	۰/۰۰۰۷
دما	۵	۲۰۱۶/۹۵**	۴/۶۹**	۵/۵۳**	۰/۰۱۸**
رقم	۲	۱۰۷/۵۴**	۱۱/۱۸**	۰/۳۰۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۱۷ ^{ns}
دما × رقم	۱۰	۷۵/۱۶**	۱/۷۳*	۱/۳۳**	۰/۰۰۱۵**
اشتباه	۳۴	۱۱/۶۷	۰/۶۱۶	۰/۱۶	۰/۰۰۰۳
ضریب تغییرات (CV%)		۴/۳۴	۱۳/۰۸	۱۶/۵۲	۱۳/۸۴

n.s، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و وجود اختلاف معنی دار در سطوح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می باشد.



نمودار ۱- تأثیر دما بر نشت الکترولیت‌ها (درصد خسارت به غشاء سلولی) در سه رقم نخود طی مرحله جوانه زنی



نمودار ۲- تأثیر دما بر نشت الکترولیت‌ها (درصد خسارت به غشاء سلولی) در سه رقم نخود طی مرحله گیاهچه ای

در آزمایش اول در مرحله جوانه زنی با کاهش دما مقدار H_2O_2 افزایش یافت و بیشترین میزان این افزایش در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد بود. افزایش H_2O_2 در گیاه دلالت بر تنش اکسیداتیو دارد که پراکسیداسیون لیپیدها و دیگر اثرات زیانبخش بر غشاها را سبب

می شود (۱۷). آپوستولوا و همکاران (۶) گزارش کردند که تحت تنش سرما میزان پراکسید هیدروژن در برگ های گندم زمستانه ۴۰٪ و در برگ های گندم بهاره تا ۱۰۰٪ افزایش پیدا کرد. حسین و همکاران (۱۴) اعلام کردند که تنش سرما سبب افزایش آسیب اکسیداتیو به‌صورت تولید H_2O_2 در عدس شد.

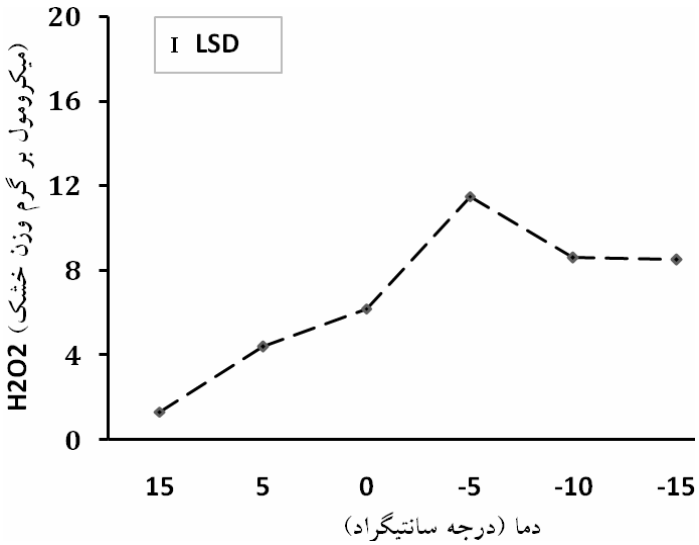
در آزمایش حاضر با کاهش دما به کمتر از ۵- درجه سانتیگراد در مرحله جوانه زنی میزان پراکسید هیدروژن کاهش یافت (نمودار۳) که می تواند به دلیل فعال شدن سیستم آنتی اکسیدانت و در نتیجه تجزیه H_2O_2 باشد (۳۲). البته کاهش H_2O_2 در دماهای کمتر از ۵- درجه ممکن است به واسطه کاهش فعالیت های بیوشیمیایی گیاهی در دماهای کم و در کل کاهش تولید H_2O_2 به عنوان ماده جانبی حاصل از این فعالیت های بیوشیمیایی باشد. با افزایش سن گیاه حتی در شرایط بدون تنش نیز با افزایش فعالیت‌های بیوشیمیایی میزان پراکسید هیدروژن افزایش یافته است و از کمتر از یک میکرو مول بر گرم وزن خشک در مرحله جوانه زنی به ۵ میکرو مول بر گرم وزن خشک در مرحله گیاهچه ای در شرایط شاهد رسیده است.

در مرحله گیاهچه ای در اغلب تیمارهای دمایی رقم پیروز دارای بیشترین میزان H_2O_2 بود و دو رقم دیگر تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. در تیمار دمایی ۵- درجه سانتی‌گراد هر سه رقم افزایش قابل توجه ای از نظر میزان پراکسید هیدروژن نشان دادند، اما رقم پیروز از بیشترین افزایش برخوردار بود (نمودار ۴). بنابراین، می‌توان اظهار داشت که رقم پیروز نسبت به ارقام دیگر دارای حساسیت بیشتری به سرما از حیث تجمع H_2O_2 تحت این تنش می باشد. وانگ و همکاران (۳۰) طی انجام یک تحقیق روی دو رقم یونجه و نیز گائو و همکاران(۱۳) در بررسی روی برنج گزارش کردند که رقم‌های متحمل به سرما، تجمع کمتری از پراکسید هیدروژن را نشان می‌دهند.

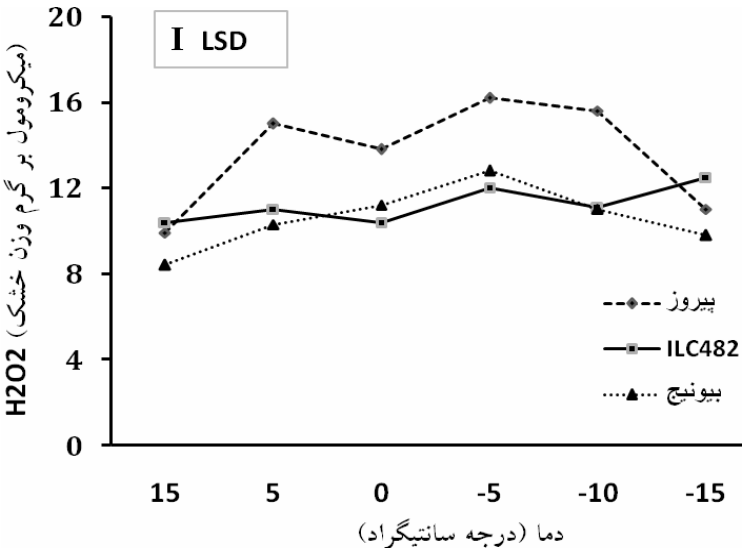
نتایج این آزمایش همبستگی مثبت و معنی داری را بین غلظت H_2O_2 و آسیب به غشاء در مرحله جوانه زنی ($r= ۰/۹۲^{**}$) و گیاهچه ای ($r= ۰/۶۶^{*}$) نشان می دهد (جداول ۳ و ۴). بنابراین می‌توان گفت با افزایش H_2O_2 نشت یونی افزایش پیدا کرده، در نتیجه پایداری غشاء کاهش یافته است و می توان چنین برداشت کرد که تولید بیشتر پراکسید هیدروژن باعث پراکسیداسیون غشاء سلولی و کاهش پایداری غشاء می‌گردد.

آنزیم کاتالاز

در مرحله جوانه زنی با کاهش دما به کمتر از ۵ درجه سانتیگراد، فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام ILC۴۸۲ و بیونیج افزایش یافت ولی در رقم پیروز فعالیت این آنزیم با کاهش دما به کمتر از ۵- درجه سانتیگراد افزایش نشان نداد (نمودار ۵). این امر نشان می دهد که فعالیت زیاد آنزیم در دو رقم فوق می تواند سبب تجزیه گونه های فعال اکسیژن شود. اشرف و علی (۷) در بررسی دو رقم کلزا گزارش کردند که در رقم مقاوم به شوری میزان فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز بیشتر از رقم حساس بود. وانگ و همکاران (۳۰) نیز در بررسی اثر تنش سرما روی یونجه اعلام کردند که رقم مقاوم فعالیت آنزیمی بیشتری را در ساقه و ریشه نسبت به رقم حساس نشان داد.



نمودار ۳- تأثیر دما بر میزان پراکسید هیدروژن در سه رقم نخود طی مرحله جوانه زنی

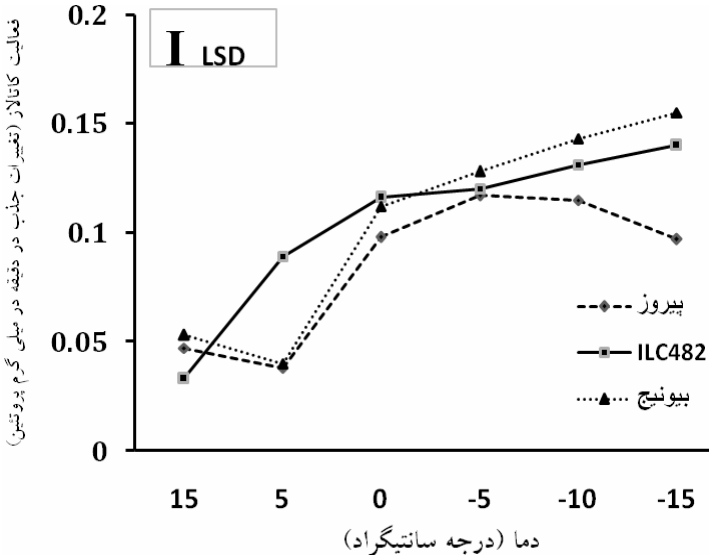


نمودار ٤- تأثیر دما بر میزان پراکسید هیدروژن در سه رقم نخود طی مرحله گیاهچه ای

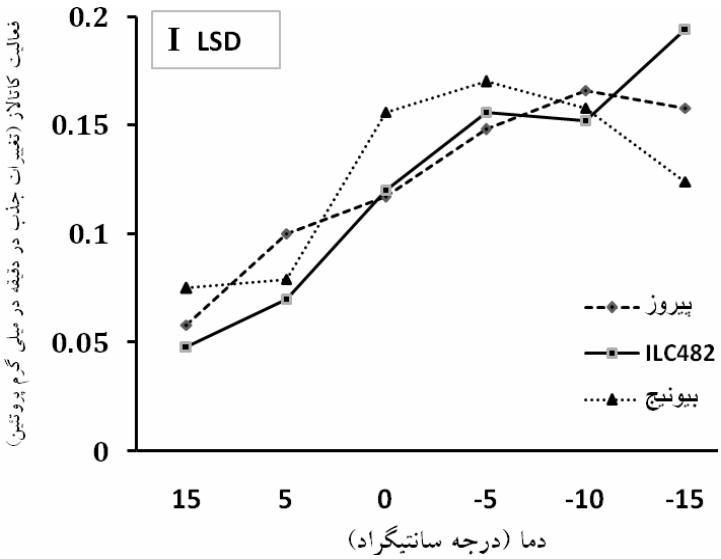
در مرحله گیاهچه ای ارقام مورد بررسی در شدت های متوسط تنش سرما با یکدیگر اختلاف معنی داری نشان ندادند، اما در پایینترین دمای مورد مطالعه، رقم ILC۴۸۲ بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را دارا بود (نمودار۶). محققین بر نقش آنزیم کاتالاز در حذف H_2O_2 تحت تنش اکسیداتیو ناشی از سرما تاکید کرده اند (۱۷).

آنزیم پراکسیداز

در هر دو مرحله رشدی به تدریج با کاهش دما تا ۵- درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش پیدا کرد ولی از آن پس با کاهش بیشتر دما میزان فعالیت آنزیم تغییر معنی داری نشان نداد. در طی کاهش دما، فعالیت آنزیم پراکسیداز به منظور جلوگیری از آسیب های وارد شده به گیاه و حفظ همئوستازی افزایش می یابد (۳۲). با توجه به عدم افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در دماهای کمتر از ۵- درجه سانتی‌گراد و نیز عدم افزایش غلظت H_2O_2 در دماهای کمتر از این محدوده و همچنین نقش اصلی آنزیم پراکسیداز در تجزیه H_2O_2 می‌توان گفت که در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد، تولید و تجزیه H_2O_2 حداکثر می‌باشد و در دماهای کمتر از آن به‌واسطه کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی اصولاً H_2O_2 بیشتری تشکیل نشده و نیازی به تجزیه آن از طریق افزایش فعالیت آنزیمی نمی‌باشد.



نمودار ٥- تأثیر دما بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سه رقم نخود طی مرحله جوانه زنی



نمودار ٦- تأثیر دما بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سه رقم نخود طی مرحله گیاهچه ای

یانگ و همکاران (۳۱) گزارش کردند که فعالیت آنزیم پراکسیداز در دو رقم توت فرنگی تحت تأثیر تنش سرما در ابتدا به شدت افزایش پیدا کرد، اما با کاهش بیشتر دما، افزایش فعالیت پراکسیداز به آرامی صورت گرفت. تاسگین و همکاران (۲۹) نیز اعلام کردند که تیمار سرما موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در این گیاه می‌شود.

نتایج این آزمایش نشان داد که در مرحله جوانه زنی ارقام ILC۴۸۲ و بیونیج در تیمارهایی دمایی ۵-، ۱۰- و ۱۵- درجه سانتی گراد دارای میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بیشتری نسبت به دماهای صفر و ۱۵ درجه سانتی گراد بودند (نمودار۷). در مرحله گیاهچه ای نیز هر چند در شدت های بالای تنش یخ زدگی اختلاف معنی داری بین ارقام مورد بررسی مشاهده نشد ولی در تیمار سرمایی صفر درجه سانتی گراد ارقام ILC۴۸۲ و بیونیج دارای بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز بودند (نمودار۸).

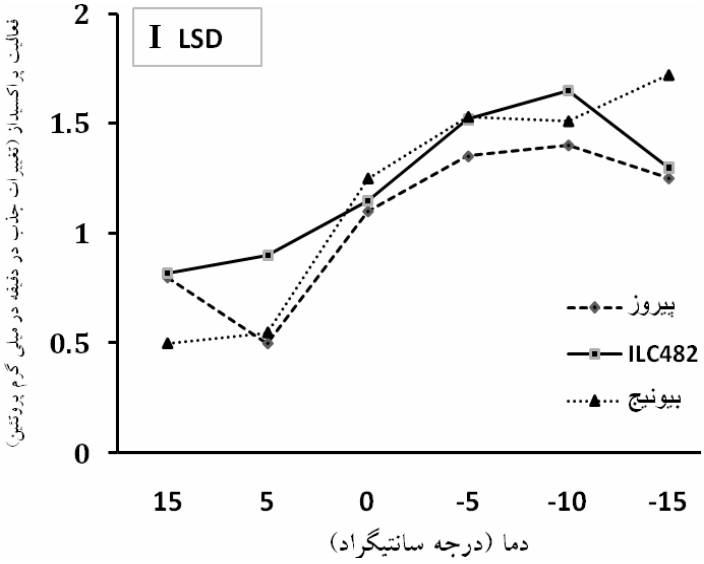
در کل فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو مرحله رشدی نخود حدود ده برابر بیشتر از آنزیم کاتالاز بود. بنابراین احتمالاً آنزیم پراکسیداز نقش بیشتری را در کاهش خسارات اکسیداسیونی و تجزیه پراکسید هیدروژن بویژه در شرایط تنش سرما و یخ زدگی ایفا می‌کند. سایرام و سریواستاوا (۲۷) نیز بیان داشته اند که کاتالاز کارایی کمتری در مقایسه با پراکسیداز در زدودن پراکسید هیدروژن دارد.

نتایج آزمایش حاکی از رابطه مثبت و معنی دار مقدار H_2O_2 با آنزیم‌های کاتالاز ($r= ۰/۹۸^{**}$) و پراکسیداز ($r= ۰/۸۹^{**}$) است (جدول ۳)، که نشان می‌دهد با افزایش H_2O_2 مقدار این آنزیم‌ها به منظور تجزیه H_2O_2 افزایش می‌یابد، همچنین بین فعالیت آنزیم پراکسیداز وآسیب به غشاء همبستگی مثبت و معنی داری ($r= ۰/۹۰^{**}$) وجود داشت (جدول۳). بنابراین، می‌توان چنین برداشت کرد که تولید بیشتر پراکسید هیدروژن در اثر تنش باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی و در نتیجه کاهش پایداری غشاء می‌گردد که در نتیجه آن فعالیت آنزیم پراکسیداز جهت تجزیه پراکسید هیدروزن افزایش می یابد.

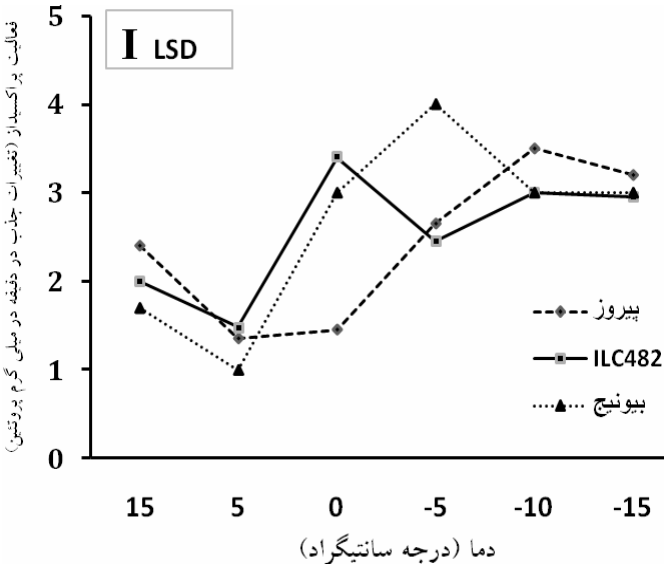
جدول ۳- ضرایب همبستگی ساده بین صفات اندازه گیری شده در مرحله جوانه زنی در نخود

	خسارت به غشاء	پراکسید هیدروژن	پراکسیداز
پراکسیدهیدروژن(H_2O_2)	۰/۹۲**	۱/۰۰	
پراکسیداز	۰/۹۰**	۰/۸۷**	۱/۰۰
کاتالاز	۰/۸۷**	۰/۸۶**	۰/۷۷*

n.s، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و وجود اختلاف معنی دار در سطوح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می باشد.



نمودار ۷- تأثیر دما بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سه رقم نخود طی مرحله جوانه زنی



نمودار ۸ - تأثیر دما بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سه رقم نخود طی مرحله گیاهچه ای

جدول ٤- ضرایب همبستگی ساده بین صفات اندازه گیری شده در مرحله گیاهچه ای در نخود

	خسارت به غشاء	پراکسید هیدروژن	پراکسیداز
پراکسیدهیدروژن(H_2O_2)	۰/۶۶*	۱/۰۰	
پراکسیداز	۰/۴۵ns	۰/۵۵ns	۱/۰۰
کاتالاز	۰/۸۳**	۰/۹۰**	۰/۵۹ns

n.s، * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و وجود اختلاف معنی دار در سطوح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می باشد

جمع بندی

با توجه به نتایج این آزمایش می توان چنین اظهار داشت که تنش سرما پایداری غشاء سلولی را کاهش می دهد، اما تیمارهای یخبندان (۵- تا ۱۵- در جه سانتیگراد) تفاوت آشکاری با یکدیگر از لحاظ تأثیر بر پایداری غشاء نشان ندادند، به نظر می رسد که دمای ۵- درجه سانتی‌گراد حد نهایی پایداری غشاء سلولی به تنش سرما می باشد و میزان آسیب به غشاء سلولی در این دما به حداکثر مقدار ممکن رسیده و تفاوتی بین دمای ۵- درجه سانتیگراد و دماهای پایینتر مشاهده نمی شود. در کل رقم ILC۴۸۲ پایداری غشاء بیشتری در هر دو مرحله رشدی تحت تیمارهای سرما و یخبندان داشت. این رقم به‌طور معنی داری H_2O_2 کمتری را نیز در هر دو مرحله رشدی دارا بود. تنش دمایی میزان H_2O_2 را افزاش داد و بیشترین میزان آن در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، با توجه به افزایش همزمان میزان H_2O_2 و نشت یونی می توان بخشی از نشت یونی حادث شده در طی تنش سرما را به افزایش H_2O_2 ناشی از این تنش نسبت داد. طی تنش‌های دمایی مورد بررسی میزان آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز تا ۵- درجه سانتیگراد افزایش یافت و میزان آین آنزیم‌ها با غلظت H_2O_2 رابطه مثبت و معنی داری داشت که نشان‌دهنده نقش این آنزیم‌ها در تجزیه H_2O_2 در صورت افزایش این ترکیب است. فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم حساس پیروز کمتر از دو رقم دیگر افزایش نشان داد. در کل فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو مرحله رشدی حدود ۱۰ برابر بیشتر از آنزیم کاتالاز بود که نقش اصلی این آنزیم را در کاهش خسارت اکسیداتیوی در نخود نشان می دهد.

منابع

۱- جباری ف.، ع. احمدی، ک. پوستینی و ه. علیزاده. ۱۳۸۵. بررسی ارتباط فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت با پایداری غشای سلولی و کلروفیل در ارقام گندم نان مقاوم و حساس به تنش خشکی مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۱۶– ۳۰۷ :۳۷

۲- چائی چی م. ر. و س. ملکی فراهانی. ۱۳۸۶. اثر تنش سرمازدگی در مراحل مختلف فنولوژیک بر رشد و عملکرد نخود سیاه. مجله علمی کشاورزی. ۲۴-۱۳ :۳۰

۳- قربانلی م.، آ. ساطعی و ا. مقیسه. ۱۳۸۲. اثر مقادیر متفاوت شوری بر فعالیت آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز، و نیترات ردوکتاز در ریشه و برگهای ارقام کلزا. مجله پژوهش و سازندگی. ۴۳-۳۹ :۵۸

۴- مشیری ف.، ع. باقری و ع. صفرنژاد. ۱۳۸۴. بررسی تأثیر خوسرمایی بر تحمل به یخ زدگی در سه رقم نخود. علوم کشاورزی و منابع طبیعی. سال دوازدهم، ویژه نامه زراعت و اصلاح نباتات. ۱۶۰-۱۵۳.

۵- نظامی ا.، و ع. ر. باقری. ۱۳۸۰. ارزیابی کلکسیون نخود (*Cicer arietinum* L.) برای تحمل به سرما در شرایط مزرعه. مجله علوم و صنایع کشاورزی. ۱۶۱-۱۵۵ :۱۵

6- Apostolova, P., and I. Yaneva. 2006. Antioxidative defence in winter wheat plants during early cold acclimation. Journal of Plant Physiology, especial Issue, 101-108.

7- Ashraf, M., and Q. Ali. 2008. Relative memberane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola. Journal of Environmental and Experimental Botany, 63: 266-273.

8- Bakalova, S., A. Nikolova and D. Nedeva. 2004. Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. Journal of Plant Physiology, 30: 64-77.

9- Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Role in stress, senescence and signal transduction in plants. Journal of Current Science, 89: 1113-1121.

10- Blum, A. 1988. Plant breeding for stress environments. Boca Raton. Florida: CRC Press. Pp:223

11- Chance, B., and A. C. Maehly. 1995. Assay of catalase and peroxidase. In: Colowick S. P., and N. D. Kaplan. (eds). Methods in Enzymology. Academic Press. New York, 2: 764-791.

12- Esfandiari, E., F. Shekari and M. Esfandiari. 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. Journal of Notulae Botanicae Horti Agribotanici Cluj-Napoca, 35: 48-56.

13- Guo, Z., W. Ou, S. Lu and Q. Zhong. 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 44: 828-836.

14- Huseyin, A. O., E. Fusun, D. Didem, B. A. Tahir, O. Tufan, O. Ebru, S. Feyza and Y. Mera. 2008. Antioxidant responses of lentil to cold and drought stress. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 17: 56-64.

15- Janda, T., E. L. Kosa, G. Szalai and E. Paldi. 2005. Investigatin of antioxidant activity of maize during low temperature stress. Journal of Plant Physiology, 49: 53-54.

16- Kaur, S., A. K. Gupta, N. Kaur, J. S. Sandhu and S. K. Gupta. 2009. Antioxidative Enzymes and Sucrose

Synthase Contribute to Cold Stress Tolerance in Chickpea Journal of Agronomy and Crop Science Volume 195, Issue 5, pages 393–397.
17- Khorshidi, M., and A. M. Nojavan. 2006. The effects of Abscisic Acid and CaCl2 on the activities of antioxidant enzymes under cold stress in maize seedlings in the dark. Journal of Biological Sciences, 9: 54-59.
18- Kumar, S., J. Malik, P. Thakur, S. Kaistha, K. D. Sharma, H. D. Upadhyaya, J. D. Berger and H. Nayyar. 2010. Growth and metabolic responses of contrasting chickpea (*Cicer arientinum* L.) genotypes to chilling stress at reproductive phase. Acta Phisiol Plant. 33 (3): 779-787.
19- Loreto, F., and V. Velikova. 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. Journal of Plant Physiology, 127: 1781-1787.
20- Lutts, S., J. M. Kinet and J. Bouharmont. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. Journal of Ann. Botany, 78: 389-398.
21- Mac Adam, J.W., C. J. Nelson and R. E. Sharp. 1992. Peroxidase Activity in the leaf elongation zone of tallfescue. Plant Physiology, 99:872-878.
22- Mahajan, S. h., and N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stress: An Overveiw. Journal of Biochemistry and Biophysics, 446: 139-158.
23- Nayyar, H., T. S. Bains and S. Kumar. 2005. Chilling stressed chickpea seedling: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Journal of Environmental and Exprimental Botany, 54: 275-285.
24- Palva, T. E., S. T. Htiharju, I. Tamminen, T. Pahakainen, R. Laitinen, J. Svensson, E. Helenius and P. Heino. 2002. Biological mechanisms of low temperature stress response: cold acclimation and development of freezing tolerance in plants. Jiracas Working Report, 9-15.
25- Pennycooke, J. C., S. Cox and C. Stushnoff. 2004. Relatioship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerace in petunia (*Petinia hybrida*). Journal of Environmental and Experimental Botany, 53: 225-232.
26- Rahimizadeh, M., D. Habibi, H. Madani, H. Mohammadi, A. Mehraban and A. M. Sabet. 2007. The effect of micronutrients on antioxidant enzymes metabolism in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. Journal of Helia, 47: 167-174.
27- Sairam, R. K., and G. C. Srivastava. 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Journal of Plant Science, 162: 897-904.
28- Takac, T. 2004. The relationship of antioxdidant enzymes and some physiological parameters in maize during chilling. Journal of Plant Soil and Environment,50: 27-32.
29- Tasgin, E., O. Atici, B. Nalbantoglu and L. Petrova. 2006. Effects of salicylic acid and cold treatment on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. Journal of Phytochemistry, 67: 710-715.
30- Wang, W. B., Y. H. Kim, H. S. Lee, K. Yong Kim, X. Deng and S. Kwak. 2009. Analysis of antioxidant ezyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 47: 570-577.
31- Yong, Z., T. Hao-Ru and L. Ya. 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawbreey cultivars with short-term low temperature stress. Journal of Agricultural Sciences, 4: 456-462.
32- Yong Kim, S., J. H. Lim, M. R. Park, Y. Kim, Y. Won Seo, K. G. Choi and S. J. Yun. 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barely roots under saline stress. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 38: 218-224.