

بررسی تاثیر اسپری بتائین بر تحمل به یخ زدگی نخود (*Cicer arietinum* L.) در شرایط کنترل شده

نسرین مشتاقی^۱، عبدالرضا باقری^۱، احمد نظامی^۱، سکینه مشتاقی^۲

چکیده

بتائین به عنوان یکی از حفاظت کننده های اسمزی، نقش مهمی در تحمل گیاهان به تنش های غیرزیستی ایفا می کند. به همین منظور تاثیر کاربرد خارجی بتائین بر افزایش تحمل به سرما و یخ زدگی در گیاه نخود به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار شامل دو ژنوتیپ نخود (MCC426 و MCC505)، سه سطح بتائین (۰، ۲۰ و ۴۰ میلی مولار) و شش تیمار دمایی (۰، -۳، -۶، -۹، -۱۲ و -۱۵ درجه سانتی گراد) مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان در مرحله ۶ تا ۷ برگی با بتائین اسپری شده و جهت خوسرمایی به مدت ۱۰ روز به اتاقک سرما منتقل شدند. سپس نمونه ها به فریزر ترموگرادیان انتقال یافته و پس از اعمال تیمار یخ زدگی برای تعیین میزان خسارت آنها، درصد نشت الکترولیتی، درصد بقا و برخی اجزای رویشی آنها اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ ها از نظر درصد نشت الکترولیتی و دمای ۵۰ درصد کسندگی (LT50) بر اساس نشت الکترولیتی تفاوت معنی داری وجود دارد ($p \leq 0.05$). افزایش سطح کاربرد بتائین در ژنوتیپ متحمل سبب کاهش درصد نشت مواد و LT50 شده است ولی در ژنوتیپ حساس تاثیر نداشته است. علاوه بر این همبستگی نسبتاً بالایی بین درصد نشت مواد و LT50 ($r = -0.47$) مشاهده شده است که نشان دهنده کارایی روش اندازه گیری درصد نشت مواد برای تعیین درصد خسارت و تحمل به یخ زدگی است. ژنوتیپها از نظر دمای ۵۰ درصد کسندگی (LT50) بر اساس درصد بقا و همچنین دمای کاهنده ۵۰ درصد وزن خشک (RDMT50) با یکدیگر تفاوت معنی داری داشتند ولی سطوح مختلف بتائین از این نظر تفاوتی ایجاد نکرد. پاسخ ژنوتیپها از نظر درصد بقا و برخی اجزای رویشی با یکدیگر متفاوت بود و ژنوتیپ متحمل از توان بازیافت بیشتر و بهتری در مقایسه با ژنوتیپ حساس برخوردار بوده است.

واژه‌های کلیدی: گلاسیسین بتائین، سرما، یخ زدگی، نشت الکترولیتی، LT50 و RDMT50.

مقدمه

کمبود آب ناشی از تنش شوری، خشکی و سرما موثر هستند (۲۰). انباشتن املاح سازگار یکی از ساز و کارهای معمول برای تحمل تنش است. املاح سازگار یا اسمولیت‌ها، ترکیباتی با وزن مولکولی کم و انحلال پذیری بالا هستند که در غلظت های بالا سمی نمی باشند. این ترکیبات تأثیر حداقلی روی pH یا تعادل بار سیتوسول دارند. این املاح همچنین در میان حیوانات، باکتری‌ها، گیاهان و همچنین در گونه های مختلف گیاهی متفاوت اند. گلاسیسین بتائین در بین اسمولیتها از اهمیت خاصی در افزایش تحمل به تنش‌ها برخوردار است. بتائین یک ترکیب آمونیومی چهارگانه

تنش یخ زدگی از جمله عوامل اصلی تهدیدکننده رشد گیاهان در مناطق معتدله است. خوسرمایی موجب القای تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، مولکولی و متابولیکی متعددی در گیاهان می‌شود (۱۲). از بین این تغییرات، افزایش مقاومت به تنش کمبود آب که منجر به تحمل به یخ‌زدگی می‌شود، از مهمترین عوامل برای محافظت بافت‌های حساس در مقابل کمبود آب ناشی از یخ‌زدگی ذکر شده است (۱۵). علاوه بر این اسمولیت‌های سازگار نظیر پلیول‌ها، پرولین و بتائین نیز در افزایش تحمل اثرات

است که به صورت طبیعی در بیشتر گیاهان عالی تجمع می‌یابد. نتایج بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که کاربرد بتائین در محدوده ۲۵۰-۱۰ میلی مولار سبب افزایش عملکرد تحت تنش کمبود آب می‌شود، حتی اگرچه گیاه مورد نظر به عنوان یک گیاه تجمع دهنده آن عمل نماید (۵). در برخی گیاهان بتائین توسط یک سیستم دو آنزیمی در کلروپلاست‌ها سنتز می‌شود و جهت تنظیم فشار اسمزی در بخشهای مختلف سلولی تجمع می‌یابد و از این طریق به پایداری و تثبیت پروتئین‌ها و غشای سلولی کمک می‌نماید. نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد که بتائین سبب محافظت غشای سلولهای ریشه در مقابل واسرشتگی^۱ ناشی از گرما می‌شود (۱۶). یافته‌های اخیر نیز نشان می‌دهد که مهندسی گیاهان برای افزایش بیان این ترکیب در گیاهانی نظیر آراییدوپسیس، برنج و توتون سبب افزایش تحمل به تنش سرما و حفظ فعالیت فتوسنتزی در دماهای پایین شده است (۱۴). در مجموع علیرغم مطالعات فوق، پرننگ بودن نقش بتائین در افزایش ظرفیت گیاهان برای خوسرمایی و تحمل به یخ زدگی کاملاً مشخص نیست. به همین منظور این آزمایش با هدف بررسی تاثیر کاربرد خارجی گلايسين بتائین بر افزایش تحمل به یخ زدگی در دو ژنوتیپ نخود در شرایط کنترل شده طراحی گردید و میزان خسارت یخ زدگی به روش نشت الکترولیتی و اندازه گیری درصد بقا تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۸۶ با استفاده از دو ژنوتیپ نخود به نام‌های MCC426 (متحمل به سرما) و MCC505 (حساس به سرما) در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی اجرا شد. تعداد چهار بذر در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۰ سانتی متر (نسبت ۱:۱:۱ از خاک، ماسه و خاک برگ) کشت شدند. گیاهان تا مرحله ۶ تا ۷ برگی در شرایط گلخانه (دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود طبیعی ۱۶/۸:۱۶/۸ تاریکی/روشنایی) نگهداری شدند.

اسپری بتائین و تیمار یخبندان: در این مرحله گیاهان دو بار با فاصله ۱۲ ساعت با غلظت‌های مختلف ۰، ۲۰ و ۴۰

میلی مولار بتائین^۲ اسپری شده و بعد از ۲۴ ساعت به اتافک سرما جهت خوسرمایی در شرایط ۲/۰ درجه سانتی‌گراد (شب/روز) و طول دوره روشنایی ۹/۱۵ ساعت (تاریکی/روشنایی) و رطوبت نسبی بالا به مدت ۱۰ روز منتقل شدند. ۲۴ ساعت قبل از تیمار یخ زدگی بوته‌ها آبیاری شده و در مرحله بعد به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. دمای فریزر در شروع صفر درجه سانتی‌گراد بود که پس از گذاشتن نمونه‌ها با سرعت دو درجه سانتی‌گراد 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 بندرت اتفاق می‌افتد فراهم می‌کند (مورای و همکاران، ۱۹۸۸). اسپری گیاهچه‌ها با باکتریهای ایجاد کننده هستک یخ (INAB)^۳ در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد به منظور ایجاد هستک یخ بر روی گیاهان انجام شد و گیاهان پس از قرار گرفتن به مدت یک ساعت در دمای ۰، ۳-، ۶-، ۹-، ۱۲- و ۱۵- درجه سانتی‌گراد از فریزر خارج شده و در طول شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

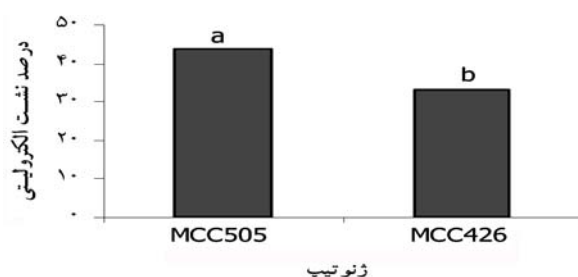
تعیین درصد نشت الکترولیتی: در مرحله بعد برای اندازه گیری نشت الکترولیتی، ۳ برگچه انتهایی از سه برگ پایینی جدا شده و در ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر شده قرار گرفت و نمونه‌ها به مدت ۶ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. سپس هدایت الکتریکی نمونه‌ها (EC_۱) با دستگاه EC متر اندازه گیری شد. به منظور اندازه گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول، ارلن‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و پس از باز شدن یخ به مدت ۶ ساعت بر روی شیکر تکان داده شدند و هدایت الکتریکی نمونه‌ها ثبت شد (EC_۲). سپس درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از فرمول

$$\% EC = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

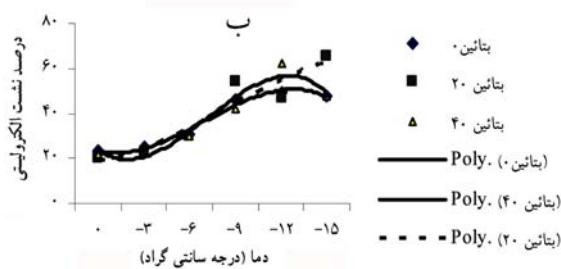
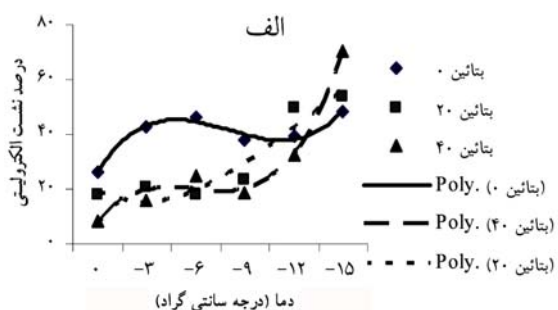
تعیین شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد که فاکتورهای آزمایشی شامل ژنوتیپ (دو ژنوتیپ نخود MCC426 متحمل به سرما و MCC505 حساس به سرما)، سه سطح بتائین (۰، ۲۰ و ۴۰

MCC426 نشان دهنده تحمل بیشتر این ژنوتیپ نسبت به شرایط یخزدگی است. متحمل بودن این ژنوتیپ به سرما قبلا نیز توسط نظامی و باقری (۳) گزارش شده است.

بررسی منحنی برازش شده نشت الکترولیت ها در سطوح مختلف بتائین نشان می دهد که افزایش سطح کاربرد بتائین در ژنوتیپ مقاوم سبب ملایم شدن شیب منحنی افزایش درصد نشت الکترولیتی شده است ولی در ژنوتیپ حساس تاثیری نداشته است (شکل ۲). کاردونا و همکاران (۶) شیب منحنی نشت الکترولیت ها را به عنوان یکی از مهمترین نشانه های احتمالی مرگ ناشی از تنش سرما در گیاهان معرفی و خاطر نشان کردند که نمودار نشت الکترولیت ها در



نمودار شکل ۱: میزان نشت الکترولیتی ژنوتیپها.



نمودار شکل ۲: الف: روند تاثیر سطوح مختلف بتائین بر درصد نشت الکترولیتی ژنوتیپ MCC426، ب- تاثیر سطوح مختلف بتائین بر درصد نشت الکترولیتی ژنوتیپ MCC505.

میلی مولار) و شش تیمار دمایی (۰، -۳، -۶، -۹، -۱۲- و ۱۵- درجه سانتی گراد) بودند. درجه حرارت کشنده برای ۵۰ درصد نمونه ها (LT₅₀)^۱ بر اساس نشت الکترولیت ها و با استفاده از رسم نمودار داده های پروبیت برای درصد نشت الکترولیت های هر تیمار در مقابل دماهای یخ زدگی تعیین گردید (۷).

درصد بقا و میزان وزن خشک: پس از تیمار سرمایی گیاهچه ها به شرایط گلخانه منتقل شدند تا میزان درصد بقای گیاهچه ها پس از ۲۱ روز از تیمار یخزدگی تعیین گردد. درصد بقا از طریق شمارش تعداد بوته زنده در هر گلدان و از طریق فرمول [۱۰۰ × تعداد گیاهان قبل از تیمار یخزدگی / تعداد گیاهان زنده سه هفته پس از تیمار یخزدگی] محاسبه شد. در ضمن وزن خشک گیاه، ساقه و شاخه ها (شاخه و برگ) و همچنین طول ساقه و شاخه ها و تعداد شاخه تولید شده در هر یک از تکرارها (یک گلدان) تعیین گردید. در مورد داده های درصدی تبدیل آماری مناسب انجام شد. درجه حرارت کشنده برای ۵۰ درصد ژنوتیپ ها (LT₅₀) و نیز درجه حرارتی که سبب ۵۰ درصد کاهش وزن خشک گیاه می شود (RDMT₅₀)^۲ نیز پس از تبدیل درصد بقای ژنوتیپها و وزن خشک آنها به داده های پروبیت محاسبه و سپس به صورت آزمون فاکتوریل تجزیه شدند. آنالیز واریانس با نرم افزار JMP انجام شد و جهت مقایسه میانگین داده ها از آزمون LSD در سطح ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

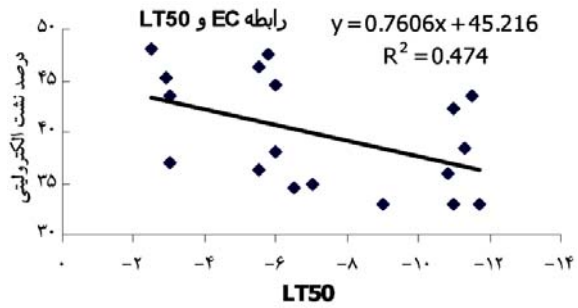
نشت الکترولیتی و LT₅₀: بر اساس نتایج بدست آمده بین ژنوتیپ های MCC426 و MCC505 از نظر درصد نشت الکترولیت ها تفاوت معنی داری (p ≤ ۰/۰۵) وجود دارد (شکل ۱). ژنوتیپ MCC505 از درصد نشت الکترولیتی بیشتری نسبت به ژنوتیپ MCC426 برخوردار بود. از آنجاییکه تنش سرما سبب اختلال در غشاهای سلولی و بدنبال آن نشت الکترولیت ها از سلول می شود، لذا اندازه گیری میزان نشت از بافت های تحت تنش سرما معیار قابل قبولی برای مقاومت به تنش سرما است (میر محمدی میدی، ۱۳۷۹) و بنابراین پایین تر بودن درصد نشت در ژنوتیپ

1- Lethal Temperature 50 (LT50)

2- Reduced dry matter temperature 50 (DMT50)

را داشتند. قابل ذکر است که پایین تر بودن LT50 در ژنوتیپ MCC426 با نشت سلولی کمتر این ژنوتیپ نسبت به ژنوتیپ دیگر در شرایط تنش یخ زدگی همراه بوده است. بررسی همبستگی بین درصد نشت الکترولیت‌ها و LT50 ژنوتیپ‌های مختلف نیز نشان می‌دهد که با کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها، دمای ۵۰ درصد کشندگی ارقام مورد بررسی کاهش یافت (شکل ۳). مطالعه پایداری غشای سیتوپلاسمی بر اساس روش هدایت الکتریکی نشان داده که همبستگی نسبتا بالایی بین میزان نشت الکترولیت‌ها و LT50 وجود دارد و این همبستگی نشان دهنده کارایی این روش در ارزیابی مقاومت به سرما است که با نتایج این آزمایش منطبق است (۱).

درصد بقا و LT50: ژنوتیپ‌ها از نظر درصد بقا و LT50 تفاوت معنی داری با یکدیگر داشتند (جدول ۱). بر اساس نتایج بدست آمده درصد بقای ژنوتیپ MCC426 در کل آزمایش برابر ۶۳/۶ درصد و برای ژنوتیپ MCC505 تنها ۵۰ درصد بوده است. درصد بقای ژنوتیپ MCC426 حدود ۲۷ درصد بیشتر از ژنوتیپ حساس بوده است ولی LT50 آنها تنها یک درجه با یکدیگر اختلاف داشته است (جدول ۱).



نمودار شکل ۳: رابطه بین درصد نشت الکترولیتی و LT50.

گونه‌های سازگار با تنش سرما از شیب کمتری برخوردار است و در مقابل در گونه‌های حساس به تنش سرما این شیب، شدیدتر است. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داده که تا دمای ۹- درجه سانتی گراد تاثیر کاربرد خارجی بتائین بر روی درصد نشت مواد معنی دار بوده است (شکل ۲) و با کاهش دما به زیر ۹- درجه سانتی گراد، درصد نشت الکترولیت‌ها در سطوح مختلف بتائین بطور معنی داری افزایش یافته است.

بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر LT50 نیز تفاوت معنی داری وجود دارد. بطوریکه ژنوتیپ MCC505 و MCC426 به ترتیب بیشتر (۵/۵-) و کمترین (۸/۹-) LT50

جدول ۱: اثرات ژنوتیپ، بتائین و ژنوتیپ × بتائین بر درصد بقا، LT50، RDMT50 و اجزای رویشی نخود سه هفته پس از بازیافت.

تیمار	درصد بقا	LT50 (درجه سانتی گراد)	RDMT50 (درجه سانتی گراد)			وزن خشک (میلی گرم)		طول (سانتی متر)		تعداد شاخه در گیاه
			گیاه	ساقه	شاخه‌ها	ساقه	شاخه‌ها	ساقه	شاخه‌ها	
ژنوتیپ										
G1= MCC426	۶۳/۶	-۱۱	-۱۲	۲۵۱	۱۸۰	۷۲	۱۴/۱	۷/۷	۰/۷	
G2=MCC505	۵۰/۱	-۱۰	-۹	۱۸۷	۱۲۸	۵۸	۱۳/۵	۶/۲	۰/۷	
LSD (۰/۰۵)	۴/۶	۰/۵	۰/۶	۲۸	۱۰	۱۲	۰/۶	۰/۹	۰/۳	
بتائین (میلی مولار)										
L1=۰	۵۶	-۱۰	-۱۱	۲۲۶	۱۶۷	۷۹	۱۲/۴	۷/۷	۰/۵	
L2=۲۰	۵۴/۱	-۱۰	-۱۱	۲۱۲	۱۶۴	۶۸	۱۱/۵	۶/۸	۰/۷	
L3=۴۰	۵۲/۵	-۱۰	-۱۱	۲۳۶	۱۷۴	۷۹/۵	۱۲/۳	۷/۸	۰/۹	
LSD (۰/۰۵)	۵/۱	۰/۶	۰/۸	۳۲	۱۲/۲	۱۳/۶	۰/۷	۱/۱	۰/۴	
ژنوتیپ × بتائین										
G1L1	۵۹/۷	-۱۰	-۱۲	۲۲۹	۱۷۰	۷۲	۱۲/۷	۸/۱	-۰/۴	
G1L2	۶۳/۶	-۱۱	-۱۱/۵	۲۲۵	۱۷۳	۵۱	۱۱/۶	۷/۲	-۰/۸	
G1L3	۶۸/۵	-۱۱	-۱۲/۵	۲۸۰	۱۸۶	۸۴	۱۳/۲	۸/۷	۱/۱	
G2L1	۶۸/۲	-۱۰/۲	-۹	۲۲۳	۱۶۵	۸۷	۱۲	۷/۳	۰/۷	
G2L2	۶۳/۶	-۱۰	-۱۰	۱۹۹	۱۵۶	۸۵	۱۱/۴	۶/۵	۰/۷	
G2L3	۶۴/۵	-۹/۶	-۹/۵	۱۹۲	۱۶۲	۷۵	۱۱/۵	۶/۸	-۰/۸	
LSD (۰/۰۵)	۶/۹	۰/۸	۱/۲	۴۱	۱۳/۸	۱۵/۱	۰/۸	۱/۳	-۰/۵	

متحمل به سرما تا دمای ۹- درجه سانتی‌گراد چندان تحت تاثیر قرار نگرفته است. درصد بقای ژنوتیپ متحمل در این دما ۸۸ درصد و حدود ۱/۴ برابر نمونه حساس بوده است. درصد بقا در ژنوتیپ حساس در فاصله دمایی صفر تا ۹- به اندازه ۲۷ درصد کاهش یافته است در حالیکه در ژنوتیپ مقاوم این کاهش تنها ۸ درصد بوده است. با وجود این در تیمار دمایی ۱۲- درجه سانتی‌گراد، درصد تلفات در ژنوتیپ حساس و ژنوتیپ مقاوم یکسان و برابر با ۹۴ درصد شده است. (جدول ۳).

بازیافت و رشد مجدد گیاه پس از تیمار یخ‌زدگی

اثر ژنوتیپ بر وزن خشک گیاه در پایان دوره بازیافت معنی دار بوده است (جدول ۱). وزن خشک گیاه در ژنوتیپ حساس ۳۴ درصد کمتر از ژنوتیپ مقاوم بوده است. ضمن اینکه RDMT50 در ژنوتیپ مقاوم برابر ۱۲- درجه سانتی‌گراد و در ژنوتیپ حساس این شاخص ۳ درجه سانتی‌گراد بیشتر از ژنوتیپ مقاوم بوده است. در مطالعه نظامی و همکاران (۴) این اختلاف دو درجه بوده است. مقایسه میانگین‌های بدست آمده از وزن خشک سایر اجزای گیاهی نیز نشان می‌دهد که وزن خشک ساقه در ژنوتیپ حساس ۲۸ درصد کمتر از ژنوتیپ مقاوم است و وزن خشک شاخه‌ها ۲۰ درصد کمتر از وزن خشک شاخه‌ها در ژنوتیپ مقاوم است. در مورد طول ساقه نیز می‌توان گفت که طول ساقه و همچنین شاخه‌ها در ژنوتیپ مقاوم نسبتاً بیشتر از ژنوتیپ حساس بوده است. طول ساقه و شاخه‌ها در ژنوتیپ حساس به ترتیب ۴ درصد و ۲۰ درصد کمتر از ژنوتیپ مقاوم بوده است. تعداد شاخه نیز در ژنوتیپ حساس ۴ درصد کمتر از ژنوتیپ مقاوم بوده است. اگرچه دو ژنوتیپ از لحاظ تعداد شاخه جانبی تولید شده با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی وزن خشک شاخه‌های تولیدی و همچنین طول آنها در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس بوده است و همین امر احتمالاً قدرت بقای بیشتر ژنوتیپ متحمل را در شرایط یخ‌زدگی تایید می‌کند. در مورد اغلب صفات مورد بررسی اثر بتائین و اثر متقابل بتائین × ژنوتیپ بر رشد مجدد گیاه پس از اعمال تیمارهای یخ‌زدگی معنی دار بوده است (جدول ۱). بر اساس میانگین داده‌های بدست آمده اثر بتائین بر LT50 و RDMT50 معنی

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که در کل کاربرد بتائین تاثیری بر درصد بقای گیاهان نداشته است و نتوانسته است میزان LT50 و یا RDMT50 را کاهش دهد (جدول ۱). لیکن اثر متقابل ژنوتیپ و سطح کاربرد بتائین نشان می‌دهد که عکس‌العمل ژنوتیپها متفاوت بوده است. به گونه‌ای که در ژنوتیپ مقاوم افزایش سطح بتائین به ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار سبب کاهش LT50 به اندازه یک درجه سانتی‌گراد شده است و RDMT50 را به اندازه ۱/۵ درجه سانتی‌گراد کاهش داده است ولی تاثیر آن در ژنوتیپ حساس بارز نبوده است. در بررسی آلود و همکاران (۵) کاربرد خارجی بتائین در گندم به مقدار ۲۵۰ میلی‌مولار سبب کاهش LT50 به اندازه ۵ درجه سانتی‌گراد در گیاهان خوش‌رمایی یافته و خو نیافته شده است.

اثر تیمار یخ‌زدگی نیز بر درصد بقای گیاهان معنی دار بود (جدول ۲). با کاهش دما به کمتر از ۹- درجه سانتی‌گراد درصد بقای گیاهان کاهش معنی‌داری داشته است. کاهش درصد بقای گیاهان بین دمای صفر تا ۹- درجه سانتی‌گراد ۳/۴ درصد به ازای کاهش هر درجه سانتی‌گراد دما بود، در حالیکه این کاهش در دمای بین ۹- تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد ۱۳/۳ درصد به ازای هر درجه سانتی‌گراد رسید (جدول ۴). بنابراین اثر منفی درجه حرارت‌های کمتر از ۹- درجه سانتی‌گراد روی درصد بقای گیاهان شدیدتر از درجه حرارت‌های بالاتر از این دما بوده است. نظامی و همکاران (۴) نیز به نتیجه مشابهی در این زمینه دست یافتند و کاهش درصد بقای گیاهان را در دمای بین ۸- تا ۱۲- درجه سانتی‌گراد در حدود ۱۰/۴ درصد به ازای کاهش هر درجه سانتی‌گراد تخمین زدند.

اثر متقابل دما × سطح بتائین نیز بر درصد بقای گیاهان معنی دار بود (جدول ۲). نتایج بدست آمده نشان داد که سطح کاربرد بتائین تاثیری مثبت بر افزایش درصد بقای گیاهان نداشته است. حتی با کاربرد سطح ۴۰ میلی‌مولار بتائین اندکی درصد بقا نسبت به عدم کاربرد بتائین کاهش داشته است. درصد بقا در ۳- درجه سانتی‌گراد در عدم کاربرد بتائین ۹۵ درصد و با کاربرد ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار بتائین به ۸۳ و ۸۶ درصد کاهش یافته است. در دمای ۶- و ۹- نیز می‌توان این تفاوت اندک را مشاهده نمود (جدول ۲). بررسی اثر متقابل دما × ژنوتیپ نیز نشان داد که بقای ژنوتیپ

جدول ۲: تاثیر متقابل دما × سطح بتائین بر درصد بقا و ویژگیهای رشدی گیاه نخود (میانگین هر تکرار یا گلدان) سه هفته پس از بازیافت در شرایط گلخانه.

تیمار دمای یخ زدگی (درجه سانتی گراد)	درصد بقا	وزن خشک (میلی گرم)			طول (سانتی متر)		تعداد شاخه در گیاه
		گیاه	ساقه	شاخه ها	ساقه	شاخه ها	
صفر	۹۸	۳۱۳	۲۱۸	۹۶	۱۶/۴	۱۰/۳	۱/۳
-۳	۸۸	۲۸۲	۱۸۸	۹۳	۱۶/۸	۱۱/۷	۱
-۶	۷۷	۲۸۹	۱۹۵	۹۳	۱۹/۳	۹/۷	۱/۲
-۹	۷۴/۵	۲۱۷	۱۲۷	۸۹	۱۲/۱	۱۰	۱/۱
-۱۲	۶	۷۴	۶۲	۰	۴/۵	۰	۰
-۱۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
LSD (۰/۰۵)	۶/۹	۴۱	۱۳/۸	۱۵/۱	۰/۸	۱/۳	۰/۵
دما × سطح بتائین							
بتائین صفر							
صفر	۱۰۰	۳۵۰	۲۱۵	۱۴۰	۱۷/۵	۱۲/۵	۰/۵
-۳	۹۵	۳۳۶	۱۹۶	۱۴۰	۱۷/۲	۱۲/۷	۰/۵
-۶	۸۰	۲۷۵	۲۰۰	۷۵	۱۸	۸/۵	۰/۸
-۹	۷۸	۳۰۷	۱۹۵	۱۱۲	۱۷/۷	۱۲/۵	۱/۳
-۱۲	۴/۸	۷۲	۶۰	۰	۴/۶	۰	۰
-۱۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
LSD (۰/۰۵)	۷/۱	۴۳	۱۴/۱	۱۵/۷	۰/۹	۱/۴	۰/۶
بتائین ۲۰ میلی مولار							
صفر	۹۵	۲۷۲	۱۹۶	۷۵	۱۳/۸	۱۰/۸	۱/۵
-۳	۸۳	۲۶۵	۲۰۰	۶۵	۱۵/۸	۱۰	۱
-۶	۷۵	۳۰۴	۲۱۴	۹۰	۱۹/۷	۸	۱/۳
-۹	۷۰/۶	۱۲۸	۱۰۳	۲۵	۸/۵	۳/۵	۰/۵
-۱۲	۱۰	۹۰	۸۰	۰	۴/۵	۰	۰
-۱۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
LSD (۰/۰۵)	۷/۱	۴۳	۱۴/۱	۱۵/۷	۰/۹	۱/۴	۰/۶
بتائین ۴۰ میلی مولار							
صفر	۹۹	۳۱۶	۲۴۵	۷۳	۱۸	۱۲	۱/۸
-۳	۸۶	۲۴۳	۱۷۰	۷۵	۱۷/۳	۱۲/۵	۱/۳
-۶	۷۶	۲۶۷	۱۵۲	۱۱۵	۱۶/۷	۱۲/۵	۱/۳
-۹	۷۵	۲۱۷	۸۵	۱۳۱	۱۰	۱۴/۱	۱/۳
-۱۲	۵	۵۹	۴۷	۰	۴/۵	۰	۰
-۱۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
LSD (۰/۰۵)	۷/۱	۴۳	۱۴/۱	۱۵/۷	۰/۹	۱/۴	۰/۶

شده است که این کاهش معنی دار نبوده است. طول ساقه و شاخه‌ها و همچنین تعداد شاخه در ژنوتیپ حساس تفاوت معنی داری نداشته است ولی در ژنوتیپ متحمل طول شاخه‌ها با افزایش کاربرد بتائین تغییری نکرده است، اما طول ساقه و تعداد شاخه افزایش یافته است (جدول ۱).

دماهای یخ‌زدگی نیز اثر معنی داری بر رشد مجدد گیاه داشتند (جدول ۲). با کاهش دما به زیر صفر درجه اغلب اجزای رشدی کاهش نشان دادند ولی در دمای ۹- درجه سانتی گراد با افت شدیدی مواجه شدند. به طوریکه وزن

دار نبوده است و عملاً تفاوتی بین سطوح مختلف کاربرد بتائین مشاهده نشد. اما تاثیر کاربرد بتائین بر وزن خشک در ژنوتیپهای مختلف متفاوت بوده است به گونه‌ای که در ژنوتیپ متحمل افزایش سطح بتائین تا ۴۰ میلی مولار نسبت به عدم کاربرد آن سبب افزایش ۲۲ درصدی در وزن خشک گیاه، افزایش ۹ درصدی در وزن خشک ساقه و افزایش ۱۶ درصدی در وزن خشک شاخه‌ها شده است ولی در ژنوتیپ حساس این روند برعکس بوده است. افزایش سطح بتائین در ژنوتیپ حساس سبب ۱۳ درصد کاهش در وزن خشک گیاه

جدول ۳: اثر متقابل ژنوتیپ × دمای یخ زدگی بر درصد بقا و اجزای رویشی نخود (میانگین هر تکرار) سه هفته پس از بازیافت.

تعداد شاخه در گیاه	طول (سانتی متر)		وزن خشک (میلی گرم)			درصد بقا	تیمار دمای یخ زدگی (درجه سانتی گراد)
	شاخه ها	ساقه	شاخه ها	ساقه	گیاه		
MCC426							
۰/۹	۹/۶	۱۴	۶۹	۳۰۴	۳۷۳	۹۶	صفر
۰/۹	۱۱/۵	۱۶	۷۴	۲۲۳	۲۹۷	۹۲	-۳
۱/۳	۱۲/۶	۲۲/۵	۷۵	۲۱۵	۲۹۰	۹۴	-۶
۱/۴	۱۲/۳	۱۲/۸	۲۹	۱۱۸	۲۴۵	۸۸	-۹
۰	۰	۵/۱	۱۵	۵۷	۷۲	۶/۵	-۱۲
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	-۱۵
۰/۶	۱/۴	۰/۹	۱۵/۵	۱۳/۹	۴۲	۷	LSD (۰/۰۵)
MCC505							
۱/۶	۱۰/۸	۱۸/۹	۱۱۹	۲۳۳	۳۵۲	۸۸	صفر
۱	۱۲	۱۷	۱۱۰	۱۵۵	۲۶۵	۷۴	-۳
۱	۶/۷	۱۶/۱	۶۰	۱۷۵	۲۳۵	۶۷	-۶
۰/۷	۷/۷	۱۱/۳	۵۳	۱۳۶	۱۸۹	۶۴	-۹
۰	۰	۴	۸	۶۷	۷۵	۶	-۱۲
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	-۱۵
۰/۶	۱/۴	۰/۹	۱۵/۵	۱۳/۹	۴۲	۷	LSD (۰/۰۵)

درصد در دمای صفر درجه سانتی گراد به ۴۱ درصد در دمای ۹- درجه سانتی گراد رسیده است. در سطح ۲۰ میلی مولار بتائین و عدم کاربرد آن سهم وزن خشک شاخه‌ها از وزن خشک کل گیاه با کاهش دماهای یخ‌زدگی، کاهش یافته است ولی میزان این کاهش در عدم کاربرد بتائین بیشتر از کاربرد ۲۰ میلی مولار بتائین بوده است و از ۴۰ درصد در دمای صفر درجه به ۳۶ درصد در دمای ۹- درجه سانتی گراد رسیده است. در سطح کاربرد ۲۰ میلی مولار بتائین نیز سهم وزن خشک شاخه‌ها از وزن خشک کل گیاه روند کاهشی داشته است و از ۲۷ درصد در دمای صفر درجه سانتی گراد به ۱۹ درصد در دمای ۹- درجه سانتی گراد رسیده است. ولی با کاربرد ۴۰ میلی مولار بتائین سهم وزن خشک شاخه‌ها از وزن خشک کل گیاه افزایش یافته است و از ۲۳ درصد در دمای صفر درجه سانتی گراد به ۶۰ درصد در دمای ۹- درجه سانتی گراد رسیده است.

اثر متقابل ژنوتیپ × دما نیز بر خصوصیات رشدی گیاه معنی دار بوده است (جدول ۳). در ژنوتیپ حساس با کاهش دما از صفر به ۹- درجه سانتی گراد وزن خشک گیاه، وزن خشک ساقه، وزن خشک شاخه‌ها و طول آنها به ترتیب ۴۶،

خشک ساقه و شاخه‌ها در فاصله دمایی صفر تا ۹- درجه سانتی گراد به ترتیب ۴/۵ و ۰/۸ درصد به ازای هر درجه سانتی گراد کاهش دما، کاهش داشته است. در حالیکه این مقادیر در فاصله دمایی ۹- تا ۱۵- درجه سانتی گراد حدود ۱۲/۲ و ۱۴/۸ درصد به ازای کاهش هر درجه سانتی گراد کاهش یافته است. این وضعیت در ارتباط با طول ساقه و شاخه‌ها نیز از روند مشابهی پیروی می‌کند. به گونه‌ای که در فاصله دمایی صفر تا ۹- درجه سانتی گراد، طول ساقه و شاخه‌ها به ترتیب ۲/۹ و ۰/۲ درصد به ازای کاهش هر درجه سانتی گراد، کاهش یافته است در حالیکه در فاصله بین ۹- تا ۱۵- درجه سانتی گراد این مقادیر ۱۰/۹ و ۶/۷ درصد به ازای کاهش هر درجه سانتی گراد کاهش یافته است (جدول ۴). چن و همکاران با اعمال تیمارهای یخ‌زدگی در شرایط کنترل شده بر روی گندم مشاهده کردند که کاهش دماهای یخ‌زدگی از ۵- به ۱۰- درجه سانتی گراد سبب کاهش ۲۰ درصدی رشد مجدد اندامهای هوایی گندم نسبت به تیمار عدم یخ‌زدگی شده است (۷).

سهم وزن خشک شاخه‌ها از وزن خشک کل گیاه در کل با کاهش دماهای یخ‌زدگی افزایش یافته است و از ۳۰

جدول ۴: درصد و مقدار کاهش اجزای رشدی گیاه نخود (میانگین دو ژنوتیپ) به ازای هر درجه سانتی گراد کاهش دما در محدوده دماهای آزمایش.

کاهش طول				کاهش وزن خشک					محدوده دمایی	
شاخه ها		ساقه		شاخه ها		ساقه		گیاه		
سانتی متر	درصد	سانتی متر	درصد	میلی گرم	درصد	میلی گرم	درصد	میلی گرم	درصد	
۰/۰۲	۰/۲	۰/۵	۲/۹	۰/۹	۰/۸	۱۰/۱	۴/۵	۱۰/۶	۳/۴	۰ تا -۹
۱/۶	۱۶/۷	۱/۳	۱۰/۹	۱۳/۳	۱۴/۸	۱۵/۵	۱۲/۲	۲۹/۲	۱۳/۴	-۹ تا -۱۵

گزارش‌های مختلف حاکی از این است که پدیده خوسرمایی سبب کاهش درصد نشت مواد (۵) و افزایش درصد بقا در ژنوتیپ‌های نخود شده است (۴). اگرچه در برخی مطالعات کاربرد خارجی بتائین سبب افزایش مقدار داخلی بتائین و افزایش بقای گیاهان در تنش سرما و یخ‌زدگی شده است ولی میزان این افزایش تحمل در برابر تنش یخ‌زدگی نسبت به سایر تنشها کمتر بوده است (۸). در برخی مطالعات نیز کاربرد توام خوسرمایی و بتائین توانسته تحمل گیاهان را در برابر این تنشها افزایش دهد. مطالعه مشابهی نیز بر روی گندم و جو صورت گرفته و نشان داده است که خوسرمایی به تنهایی نمی‌تواند به اندازه کاربرد توام این دو عامل موثر باشد، زیرا در شرایط خوسرمایی، مقدار بتائین داخلی عامل محدود کننده‌ای برای تحمل می‌باشد و کاربرد خارجی آن می‌تواند این محدودیت را برطرف نماید (۴). البته در گندم مقدار کاربرد بتائین در حد ۲۵۰ میلی مولار مناسب تشخیص داده شده (۴) و بنظر می‌رسد که در این مطالعه نیز برای افزایش مقاومت به تنش یخ‌زدگی در ژنوتیپ حساس، نیاز به غلظتهای بالاتری از بتائین است. کیشیتانی و همکاران (۱۷) توانستند در گیاه جو همبستگی بین مقدار تجمع بتائین در طول فرایند خوسرمایی را با میزان تحمل به یخ‌زدگی به اثبات برسانند. علاوه بر این افزایش تجمع بتائین در آراییدو سیس تراریخته با ژن *CodA* سبب افزایش تحمل تنش سرما زدگی شده ولی در افزایش تحمل به یخ‌زدگی موثر نبوده است (۱۳؛ ۹). کاربرد خارجی بتائین در برنج و برخی گیاهان نظیر باقلا، گوجه فرنگی و گندم نیز باعث افزایش تحمل در برابر تنش شوری و خشکی شده است (۱۳، ۱۱، ۱۸، ۱۰، ۸).

۴۱، ۵۵، ۴۰ و ۲۹ درصد کاهش یافته است و همچنین تعداد شاخه نیز در این فاصله دمایی ۵۸ درصد کاهش یافته است (جدول ۳). بنابراین تمام اجزای رشدی در ژنوتیپ حساس با کاهش دما کاهش یافته است. در ژنوتیپ متحمل نیز وزن خشک گیاه، وزن خشک ساقه و شاخه‌ها با کاهش دما به ترتیب ۳۴، ۶۱ و ۵۷ درصد کاهش یافته است اما تغییر در طول متفاوت بوده است. طول ساقه و شاخه‌ها در ژنوتیپ متحمل تا دمای ۶- درجه سانتی گراد روندی افزایشی داشته و میزان این افزایش ۶۰ درصد بوده است در حالیکه پس از آن کاهش یافته است. تعداد شاخه نیز تا دمای ۹- درجه سانتی گراد ۵۹ درصد افزایش داشته است و پس از آن کاهش یافته است. در مجموع بازیافت ژنوتیپ متحمل به سرما بهتر از ژنوتیپ حساس بوده است (جدول ۳).

در مجموع می‌توان گفت که در این آزمایش LT50 بر اساس درصد بقا در ژنوتیپ حساس یک درجه بیشتر از ژنوتیپ متحمل است در حالیکه RDMT50 سه درجه بیشتر از ژنوتیپ متحمل می‌باشد. افزایش کاربرد بتائین تاثیر مثبتی بر افزایش درصد بقا، LT50 و RDMT50 نداشته است. ضریب همبستگی بین LT50 و RDMT50 در این آزمایش ۰/۹ بود که نشان دهنده کارایی این شاخص در تخمین میزان خسارت سرما به گیاه می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد علاوه بر شاخص LT50، بتوان از این شاخص نیز برای ارزیابی میزان خسارت سرما به گیاه و بازیافت و رشد مجدد آن استفاده کرد. نتایج آزمایش‌های اخیر نشان می‌دهد اگرچه افزایش سطح بتائین سبب مقاومت بیشتر ژنوتیپ متحمل در شرایط یخ‌زدگی شده است ولی در ژنوتیپ حساس تاثیر نداشته است. البته نقش خوسرمایی را نمی‌توان دور از نظر داشت.

منابع

- ۱- بیرامی زاده، ا.، ی. ارشد، ب. یزدی صمدی و م.ر. قنادها. ۱۳۸۱. بررسی ژنتیک پایداری غشای سیتوپلاسمی در گندم. «چکیده مقالات سومین همایش کاهش ضایعات ناشی از سرما و یخ زدگی گیاهان زراعی و باغی کشور». صفحات ۶۵ تا ۶۸.
- ۲- میرمحمدی میدی، ع.م. ۱۳۷۹. جنبه‌های فیزیولوژی و به نژادی تنش‌های سرما و یخ‌زدگی گیاهان زراعی. انتشارات گلبن، اصفهان.
- ۳- نظامی، ا.، ع. باقری. ۱۳۸۰. ارزیابی کلکسیون نخود مشهد برای تحمل به سرما در شرایط مزرعه، مجله علوم و صنایع کشاورزی ۱۵: ۱۶۲-۱۵۶.
- ۴- نظامی، ا.، باقری، ع.، رحیمیان، ح.، کافی، م. و نصیری، م. ۱۳۸۵. ارزیابی تحمل به یخ زدگی ژنوتیپهای نخود (*Cicer arietinum* L.) در شرایط کنترل شده. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۴ (الف): ۲۵۷-۲۶۸.
- 5-Allard, F., Houde, M., Krol, M., Ivanov, A., Norman, P.A. and F. Sarhan. 1998. Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol.* 39:1194-1202.
- 6-Cardona, C.A., R.R. Duncan, and O. Lindstrom. 1997. Low temperature tolerance assessment in paspalm. *Crop Sci.* 37: 1283-1291.
- 7-Chen, T.H., Gusta, L.V. and Fowler, D.B. 1983. Freezing injury and root development in winter cereals. *Plant Physiol.* 73,773-777.
- 8-Demiral, T. and Turkan, I. 2006. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. *Environmental and Experimental Botany* 56: 72-79.
- 9-Deshnium, P., Gombos, Z., Nishiyama, Y. and Murata, N. 1997. The action in vivo of glycine betaine in enhancement of tolerance of *Synechococcus* sp. strain PCC7942 to low temperature. *J. Bacteriol.* 179,339-344.
- 10-Diaz-Zorita, M., Fernandez-Canigia, M.V., Grosso, G.A. 2001. Applications of foliar fertilizers containing glycinebetaine improve wheat yields. *J. Agron. Crop Sci.* 186, 209-215.
- 11-Gadallah, M.A.A., 1999. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt-stress. *Biol. Plant.* 42, 249-257.
- 12-Guy, C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:187-223.
- 13-Harinasut, P., Tsutsui, K., Takabe, T., Nomura, M., Takabe, T. and Kishitani, S., 1996. Exogenous glycinebetaine accumulation and increased salt-tolerance in rice seedlings. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 366-368.
- 14-Hayashi, H., Alia Mustardy, L., Deshnum, P., Ida, M. And N. Murata. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* 12:133-142.
- 15-Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberte, S. and F. Sarhan. 1995. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J.* 8:583-593.
- 16-Jolivet, Y., Larher, F. and J. Hamelin. 1982. Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effect of glycine betaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Sci. Lett.* 25:193-201.
- 17-Kishitani, S., Watanabe, K., Yasuda, S., Arakawa, K. and Takabe, T. 1994. Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant Cell Environ.* 17, 89-95.
- 18-Makela, P., Karkkainen, J. and Somersalo, S. 2000. Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grown under drought or salinity. *Biol. Plant.* 43, 471-475.
- 19-Murry, G.A., Eser, D., Gusta, L.V. and G. Eteve. 1988. Winter hardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. In R.J. Summerfield (Ed.) *World Crops: Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. P. 831-843.
- 20-Rhodes, D. and A.D. Hanson. 1993. Quaternary ammonium and quaternary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:357-384.

Investigation of betaine spray on freezing tolerance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in controlled conditions

N. Moshtaghi, A. Bagheri, A. Nezami, S. Moshtaghi¹

Abstract

Betaine as an osmoprotectant has an important role in plant tolerance in abiotic stresses. Therefore, the effect of exogenous application of betaine on increasing tolerance to cold and freezing tolerance of two chickpea genotypes were studied. Electrolyte leakage was used in this study for determination of injury percentage. This experiment carried out in factorial experiment based on complete randomized design with three replications containing two genotypes of chickpea (MCC426 and MCC505), three levels of betaine (0, 20 and 40 mM) and six temperature treatments (0, -3, -6, -9, -12 and -15 °C). The plants were sprayed with betaine in 6-7 leaves stage and transferred to cold room for cold acclimation. Then the plants were transferred to thermo-gradient freezer and determined the electrolyte leakage percentage (as freeze injury index), survival percent and some vegetative details in each temperature. The results showed that there was a significant difference ($p \leq 0.05$) between genotypes in electrolyte leakage and LT50. Increasing of betaine in tolerant genotype caused decrease of electrolyte leakage but was not effective in sensitive genotype. In addition, there was relative high correlation between electrolyte leakage and LT50 ($r=0.47$). This indicates that electrolyte leakage has high efficiency for determination of injury percent and freezing tolerance. There was a significant difference between genotypes for LT50 and RDMT50 but no difference among betaine levels so it is necessary to use high levels of betaine for exogenous application. Response of genotypes for survival percent and some vegetative details was different but finally tolerant genotype had better recovery ability in comparison with sensitive genotype.

Keywords: Betaine, cold, freezing, electrolyte leakage, LT50, RDMT50.