مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم ـ ویژه‌نامه زراعت و اصلاح نباتات ـ ۱۳۸٤
www.magiran.com/jasnr

بررسی تأثیر خوسرمایی بر تحمل به یخزدگی در سه رقم نخود (*Cicer arietinum* L.)

فرشته مشیری[۱]، عبدالرضا باقری[۲] و عباس صفرنژاد[۳]

[۱]پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، [۲]گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه فردوسی مشهد،
[۳]مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان

تاریخ دریافت: ۸۱/۱۱/٦ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۵/۵

چکیده

در مطالعات به‌گزینی برای تحمل به درجه حرارت‌های یخزدگی، لازم است تغییرات دمایی به‌تدریج روی گیاهان اعمال شود تا امکان فعال شدن مکانیسم‌های سازگاری و بروز اثر ژن‌های مؤثر فراهم شود. در این مطالعه به‌منظور تعیین نحوهٔ اعمال این تغییرات در شرایط این‌ویترو در نخود، دو رقم ILC533 و ILC482 و یک تودهٔ بومی قزوین انتخاب و پس از کاشت در شرایط نسبتاً استریل و تولید گیاهچه، ریزنمونه‌هایی بطول یک سانتی‌متر از گره‌های دوم و سوم این گیاهچه‌ها تهیه و با انتقال به محیط این‌ویترو گیاهچه‌های مناسب برای اعمال تیمارهای خوسرمایی فراهم شد. تیمارهای خوسرمایی شامل دو تیمار ۱۰ و ۲۰ روزه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بودند. سپس گیاهچه‌های خویافته و شاهد به مدت یک ساعت در هر یک از دماهای ۰، ٤-، ۸-، ۱۲-، ۱٦- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و براساس درصد خسارت، آزمون پروبیت انجام و دمای LT_{50} در هر تیمار مشخص شد. ارزیابی تحمل به یخزدگی با توجه به نتایج LT_{50} نشان داد که تیمارهای خوسرمایی موجب افزایش تحمل به یخزدگی شد و دورهٔ خوسرمایی ۲۰ روز در افزایش تحمل به یخزدگی و زنده‌مانی گیاهچه‌ها تأثیر بهتری داشت. این افزایش در رقم ILC533 نمایان‌تر از دو رقم دیگر بود. همچنین پس از ۲۰ روز خوسرمایی، ارقام متحمل و حساس بخوبی از هم تفکیک شدند. به‌نظر می‌رسد طول دورهٔ خوسرمایی ۲۰ روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، مدت زمان مناسبی برای به‌گزینی ارقام نخود در شرایط این‌ویترو جهت جلوگیری از خسارت شدید سرما باشد و به این ترتیب بتوان با گزینش ارقام متحمل به یخزدگی امکان کشت پاییزهٔ نخود را فراهم کرد.

واژه‌های کلیدی: تحمل به یخزدگی، خوسرمایی، کشت این‌ویترو، نخود

مقدمه

درجه حرارت پایین یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که خسارت شدیدی را به بافت‌ها و سلول‌های گیاهی وارد می‌کند. گیاهان در شرایط طبیعی برای محافظت در برابر تنش یخزدگی، فرآیندهای سازگاری متعددی را در خود فعال می‌کنند که مهمترین آنها خوسرمایی[1] است. طی این فرآیند، با قرار گرفتن گیاه در حرارت‌های ۲ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد، مکانیسم‌های سلولی و بین سلولی مؤثر در تحمل به یخزدگی، فعال می‌شوند (زاین و بروز، ۲۰۰۰). این مکانیسم‌ها با تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان از جمله تغییر ترکیبات لیپیدی غشای سلول، تغییر در فعالیت آنزیم‌ها،

1-Cold acclimation

به‌وجود آوردن فرم‌های جدیدی از پروتئین‌ها، تجمع اسمولیت‌ها مانند قندهای محلول و پرولین و افزایش سطح آنتی اکسیدان‌ها همراه است که از طریق تغییر در بیان ژن‌ها در درجه حرارت پایین، سبب افزایش تحمل به یخ‌زدگی می‌شوند (پالتا و ونیس، ۱۹۹۳).

در طبیعت کاهش تدریجی دما به همراه روزهای کوتاه در فصل پاییز، شرایط ایده‌آلی را برای خوسرمایی فراهم می‌کند، زیرا علاوه‌بر کاهش سرعت رشد در ابتدای فصل کاشت، زمان کافی جهت فعال شدن مکانیسم‌های تحمل به دماهای زیر صفر در گیاهان وجود دارد. بررسی اثر خوسرمایی در بقولات از جمله یونجه (رابرتسون و گوستا، ۱۹۸٦) و لوبیا (کافی و دامغانی، ۱۳۷۹) نشان داده است که توانایی مقاومت به یخ‌زدگی با اعمال تیمار مناسب خوسرمایی افزایش می‌یابد. در غلات نتایج مشابهی در محصولات گندم زمستانه (چن و همکاران، ۱۹۸۳) و ذرت (پراساد و همکاران، ۱۹۹٤) به‌دست آمده است.

در محیط این‌ویترو نیز می‌توان نمونه‌های گیاهی را طی دورهٔ معینی در دماهای نزدیک به صفر نگهداری کرد تا با فراهم شدن امکان بروز ژن‌های مؤثر، گزینش ارقام متحمل به یخ‌زدگی به‌نحو بهتری صورت گیرد. مطالعات انجام شده در شرایط این‌ویترو در یونجه نشان داده که تجربه گیاه به دوره خوسرمایی، در تحمل ارقام به یخ‌زدگی تأثیر مثبتی داشته است (ماهاپاترا و همکاران، ۱۹۸۷). در محصولات دیگر از قبیل اسفناج (گای و هاسکل، ۱۹۸۷)، سیب‌زمینی (لنی و همکاران، ۱۹۹۲) و کلزا و شلغم (اور و همکاران، ۱۹۹۰) نیز بطریق مشابهی تحمل به یخ‌زدگی در اثر خوسرمایی افزایش یافته است.

در حال حاضر کشت نخود در کشور بصورت دیم بهاره متداول است. در این نوع کشت، به دلیل مواجه شدن گیاه با درجه حرارت بالا و کمبود رطوبت بویژه در دورهٔ زایشی، عملکرد بسیار کاهش می‌یابد. علاوه‌بر این چون گیاه از نظر واکنش به فتوپریود روز بلند است الزاماً از دوره رویشی کوتاهی برخوردار بوده و در نتیجه بیوماس گیاه در زمان گلدهی به حد مطلوبی نرسیده و سبب کاهش عملکرد می‌شود. از اینرو دستیابی به ارقام متحمل به یخ‌زدگی در نخود جهت کشت زمستانه ضروری است تا علاوه بر افزایش کارایی مصرف آب، از عوامل نامساعد محیطی در زمان گلدهی اجتناب شود (نظامی و باقری، ۱۳۸۰).

هر چند تاکنون مطالعات به‌گزینی اغلب در شرایط مزرعه صورت گرفته، ولی با محدودیت‌هایی از قبیل احتمال کم دستیابی به زمستان‌هایی با دماهای مناسب جهت گزینش برای تحمل به یخ‌زدگی، محدود بودن فرصت انتخاب در مزرعه به یک مرتبه در سال و شرایط متغییر تنش یخ‌زدگی در سال‌های متوالی و حتی در یک سال همراه است (فولر و همکاران، ۱۹۹۳). در مقابل ارزیابی تحمل به یخ‌زدگی در محیط این‌ویترو ساده، سریع، قابل تکرار و غیرمخرب است (گودلیفسون و همکاران، ۱۹۸٦). از اینرو مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر طول دورهٔ خوسرمایی بر تحمل به یخ زدگی نخود، در شرایط این‌ویترو انجام شد تا در صورت امکان، دورهٔ خوسرمایی مناسب برای به‌گزینی در شرایط این‌ویترو تعیین شود.

مواد و روش‌ها

بذور دو رقم نخود شامل ILC533 (حساس به سرما)، ILC482 (متحمل به سرما، گزارش شدهٔ خارجی) و توده بومی قزوین (متحمل به سرما، گزارش شده داخلی) (نظامی و باقری، ۱۳۸۰) پس از ۱۰ دقیقه ضد عفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و یک قطره توین ۸۰ در ماسه استریل کشت شدند. ابتدا گلدان‌ها با آب مقطر و پس از آن به‌منظور تأمین نیاز غذایی گیاهچه‌ها، با محلول غذایی هوگلند ۵۰ درصد و به‌طور روز در میان آبیاری شدند. گیاهچه‌ها تا مرحله ۳ برگی در دمای ۱±۲٤ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱٤ ساعت در گلخانه رشد کردند. به‌منظور اجتناب از تنوع سوماتیکی القا شده در محیط کشت، از قلمه‌های ساقه

استفاده شد. از اینرو قطعاتی به‌طول یک سانتی‌متر از گره‌های دوم و سوم ساقه گیاهان رشد یافته در گلخانه جدا و پس از ضدعفونی سطحی به‌طریق فوق در محفظهٔ اتاقک تمیز، هر ۳ قلمه در یک شیشه حاوی محیط کشت پایه MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP[1] و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA[2]، به اضافه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار کشت به مدت ۳ هفته در دمای ۱±۲٤ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۵۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه با فتوپریود ۱٦ ساعت در اتاقک رشد تا مرحله سه‌گره‌ای نگهداری شدند.

جهت بررسی تأثیر طول دورهٔ خوسرمایی بر تحمل به دماهای یخزدگی، تیمارهای خوسرمایی ۱۰ و ۲۰روز در دمای ۱±٤ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه با فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی در سردخانه، روی شیشه‌های کشت حاوی ساقه‌ها اعمال شدند. نمونه‌های شاهد در همان شرایط اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از سپری شدن دورهٔ خوسرمایی به‌منظور اعمال تیمار یخزدگی، کلیه نمونه‌ها به فریزر قابل برنامه‌ریزی منتقل و دماهای ۰، ٤-، ۸-، ۱۲-، ۱٦- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد روی آنها اعمال شدند. در هر دما پس از گذشت یک ساعت، تعداد ۳ نمونه (شیشه کشت) مربوط به هر یک از تیمارهای خوسرمایی و رقم برداشت شدند. به‌منظور ذوب تدریجی یخ، نمونه‌ها ابتدا به مدت ۲٤ ساعت در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به اتاقک رشد منتقل شدند. پس از گذشت یک هفته از آنجا که جهت باززایی، جوانه‌های جانبی گیاه اهمیت داشتند، میزان خسارت وارده به گیاهچه‌ها با استفاده از درجه‌بندی تعریف شده زیر تعیین و با استفاده از رابطه ۱ درصد خسارت وارده به گیاهان مشخص شد:

۱- زنده کامل، ۲- نابودی سرشاخه‌ها، ۳- دو گره سالم، ٤- یک گره سالم، ۵- قاعده گیاه سالم، ٦- مرگ کامل

رابطه۱ *: ۱۰۰ × (٦ / درجه خسارت)= درصد خسارت

*** در این رابطه درجه خسارت نشان‌دهنده تعداد گره‌های از دست رفته گیاه و عدد ٦ معرف یک گیاه کاملاً از دست رفته می‌باشد. به این ترتیب کسر داخل پرانتز نسبت خسارت وارده به یک نمونه را در شرایط یخزدگی در مقایسه با گیاه کاملاً خسارت دیده نشان می‌دهد.**

به‌منظور محاسبه نقطه LT_{50} (دمایی که در آن ۵۰ درصد نمونه‌های گیاهی آسیب می‌بینند (درجه خسارت ۳))، ابتدا عدد پروبیت معادل درصد خسارت، برای هر تیمار مشخص شد و با استفاده از نرم افزار آماری MSTATC رابطه خطی این اعداد با لگاریتم دماهای یخزدگی به‌دست آمد. پس از قرار دادن عدد پروبیت ۵ (معادل ۵۰ درصد خسارت) در هر رابطه، لگاریتم دمای LT_{50} تعیین شد که با گرفتن آنتی‌لگاریتم از آنها، دماهای LT_{50} برای هر یک از تیمارها محاسبه شد. اثر تیمارها بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با دو فاکتور تیمار خوسرمایی و رقم (هر یک در سه سطح) براساس اعداد LT_{50}، به‌کمک برنامهٔ آماری MSTATC تجزیه واریانس شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه و جهت رسم نمودارها از برنامه Excel 97 استفاده شد.

نتایج و بحث

با کشت ریزنمونه‌های به‌دست آمده از ساقه در محیط این‌ویترو ظرف کمتر از ٤ روز جوانه‌های جانبی فعال شده و تولید شاخه کردند. در دورهٔ خوسرمایی رشد شاخه‌ها کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت، در حالیکه نمونه‌های شاهد در طول این مدت به رشد خود ادامه دادند. به‌نظر می‌رسد فرآیند خوسرمایی مشابه با مکانیسم خواب در گیاهان سبب کاهش یا توقف رشد می‌شود (گای و هاسکل، ۱۹۸۷).

نتایج تجزیه واریانس، اثر تیمارهای خوسرمایی و رقم را معنی‌دار نشان داد (P <۰/۰۱) اما اثر متقابل رقم و خوسرمایی به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول ۱).

1-Benzyl Amino Purine
2-Indol Butyric Acid

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس داده‌های LT_{50} ارقام نخود در سطوح مختلف خوسرمایی.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۸	۳۹/۱۲**
خوسرمایی	۲	۶/۸۹**
رقم	۲	۳۱/۹۲**
خوسرمایی × رقم	٤	۰/۳۱$^{n.s}$
خطای آزمایش	۱۸	۰/۲۳
کل	۲٦	

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد. * معنی‌دار در سطح ۵ درصد. $^{n.s}$عدم اختلاف معنی‌دار

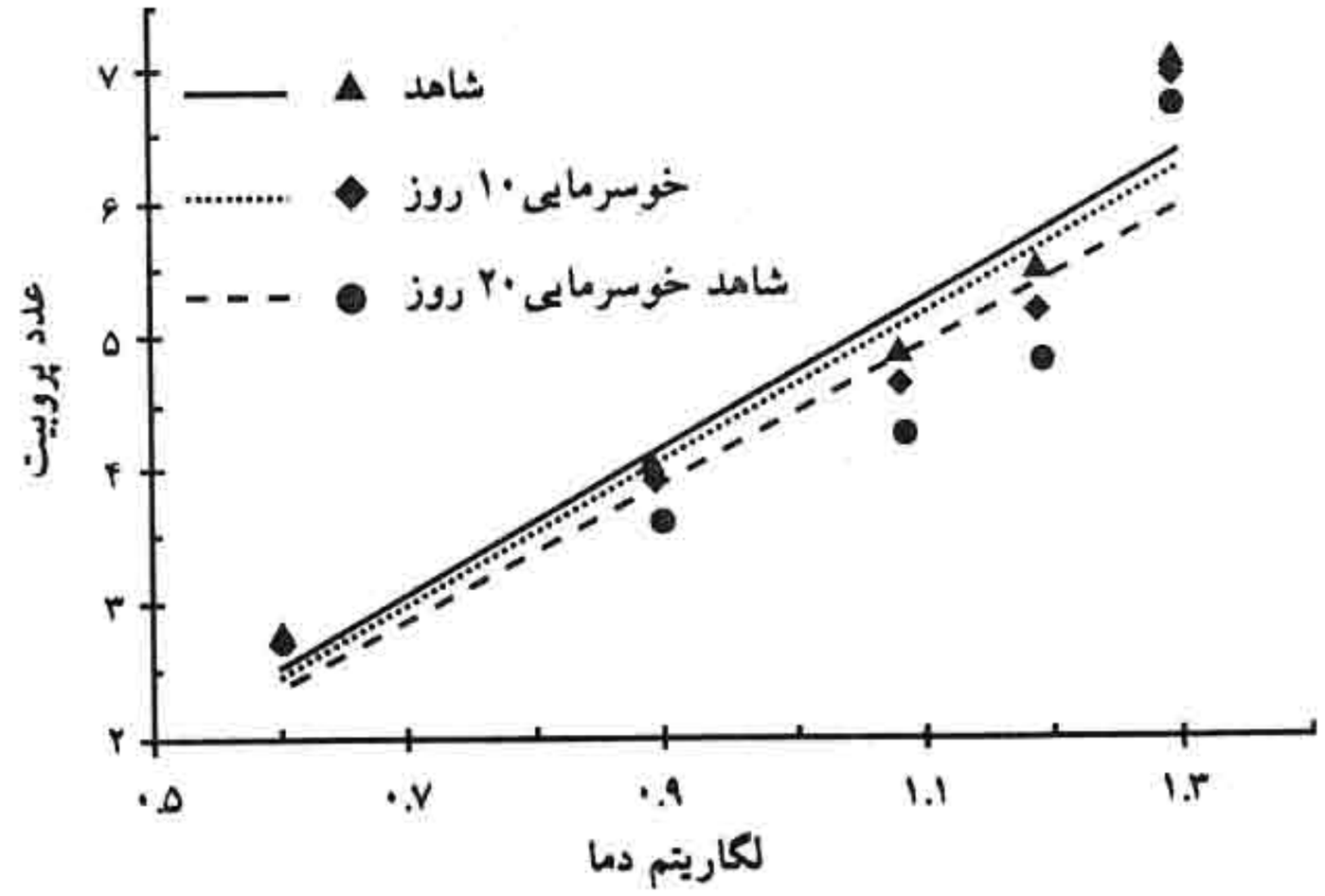
اثر سطوح خوسرمایی: پس از خوسرمایی با قرار دادن گیاهچه‌های خویافته در درجه حرارت‌های زیر صفر میزان خسارت در مقایسه با شاهد کاهش یافت. برای ارزیابی تحمل به یخزدگی در هر یک از سطوح خوسرمایی از نتایج تجزیه پروبیت استفاده شد (شکل ۱). مقایسه شیب خط رگرسیونی در گیاهچه‌های خویافته در مقایسه با خونیافته‌ها نشان‌دهنده شیب کمتر در خوسرمایی ۱۰ و ۲۰ روزه می‌باشد. شیب ملایمتر، درصد کمتر خسارت را نشان می‌دهد که با افزایش تحمل به سرما رابطه دارد. گزارش‌های دیگر نیز نشان داده که استفاده از شیب منحنی در ارزیابی تحمل به سرما معیار مهمی است و هر چه درصد خسارت بیشتر باشد، تغییرات شیب منحنی بیشتر خواهد بود (گودلیفسون و همکاران، ۱۹۸٦ و زو و لیو، ۱۹۸۷).

با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد دورهٔ خوسرمایی جهت فعال کردن مکانیسم‌های تحمل به یخزدگی ضروری است زیرا نمونه‌های خویافته با شاهد اختلاف زیادی نشان دادند. همچنین طول دورهٔ خوسرمایی در تحمل به یخزدگی اثر مثبت و معنی‌داری داشت به‌نحوی که با دو برابر شدن آن از ۱۰ به ۲۰ روز، خسارت یخزدگی بطور چشمگیری کاهش یافت. در بیشتر گونه‌های گیاهی ازجمله کلزا (اور و همکاران، ۱۹۹۰) و علف هفت‌بند (فرای و همکاران، ۱۹۹۳) نتایج مشابهی به‌دست آمده است.

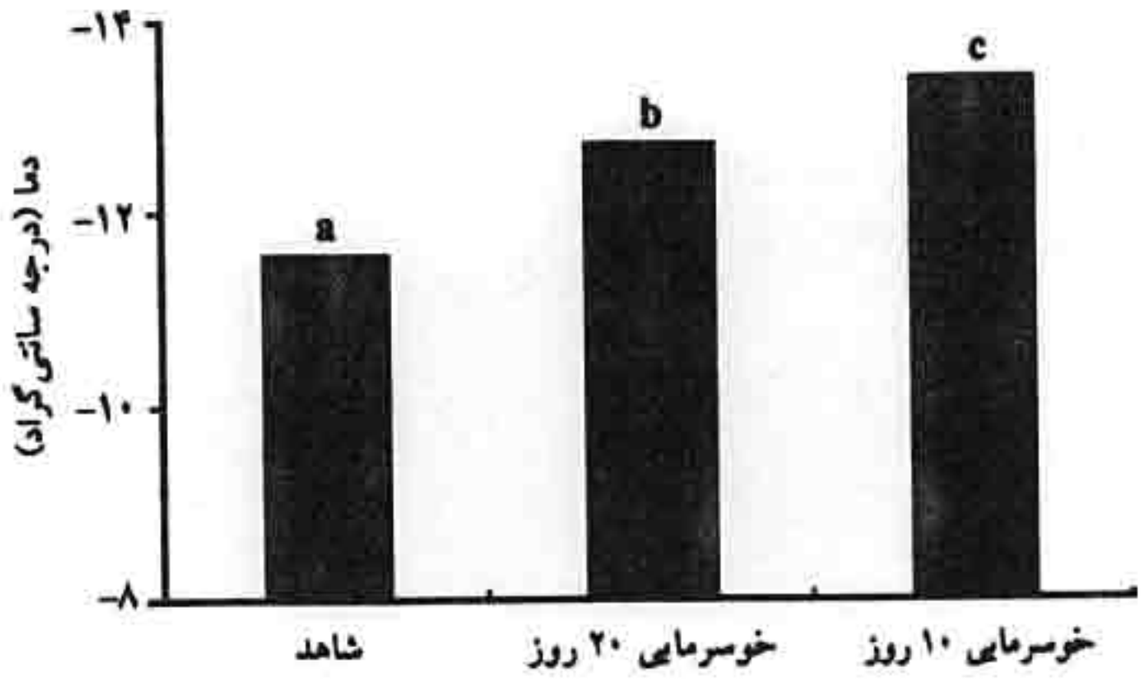
هر چند شیب منحنی در ارزیابی تحمل به یخزدگی استفاده می‌شود ولی معتبرترین و ساده‌ترین روش ارزیابی تحمل به یخزدگی، تعیین نقطه LT_{50} یا درجه حرارت بحرانی برای زنده‌مانی گیاه است. مقایسه میانگین‌ها براساس نتایج LT_{50}، اثر سطوح خوسرمایی را در سطح ۵ درصد معنی‌دار نشان داد (شکل ۲). همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده، LT_{50} گیاهچه‌های خویافته در مقایسه با شاهد (خونیافته) کاهش یافت. با افزایش دورهٔ خوسرمایی کاهش LT_{50} در مقایسه با شاهد (خونیافته) بارزتر بود. به‌نحوی که خوسرمایی ۱۰ روز توانست کمتر از ۱ درجه سانتی‌گراد LT_{50} شاهد را کاهش دهد، در حالیکه پس از ۲۰ روز خوسرمایی LT_{50} گیاهچه‌های خویافته حدود ۲ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با شاهد (خونیافته) کاهش یافت.

مطالعات در سایر گیاهان از جمله اسفناج نشان داده است که کاهش LT_{50} پس از خوسرمایی با افزایش تحمل به دماهای مختلف زیر صفر همبستگی بالایی دارد (گای و هاسکل، ۱۹۸۷). گزارش‌های مشابهی نیز در کشت‌های سوسپانسیونی سیب زمینی (لئی و همکاران،۱۹۹۲)، انگور (زانگ و راجاشکار،۱۹۹٤) و کشت‌های کالوس حاصل از جنین‌های نابالغ لاین‌های اینبرد ذرت (دانکن و ویدهولم، ۱۹۸۷) مشاهده شده است.

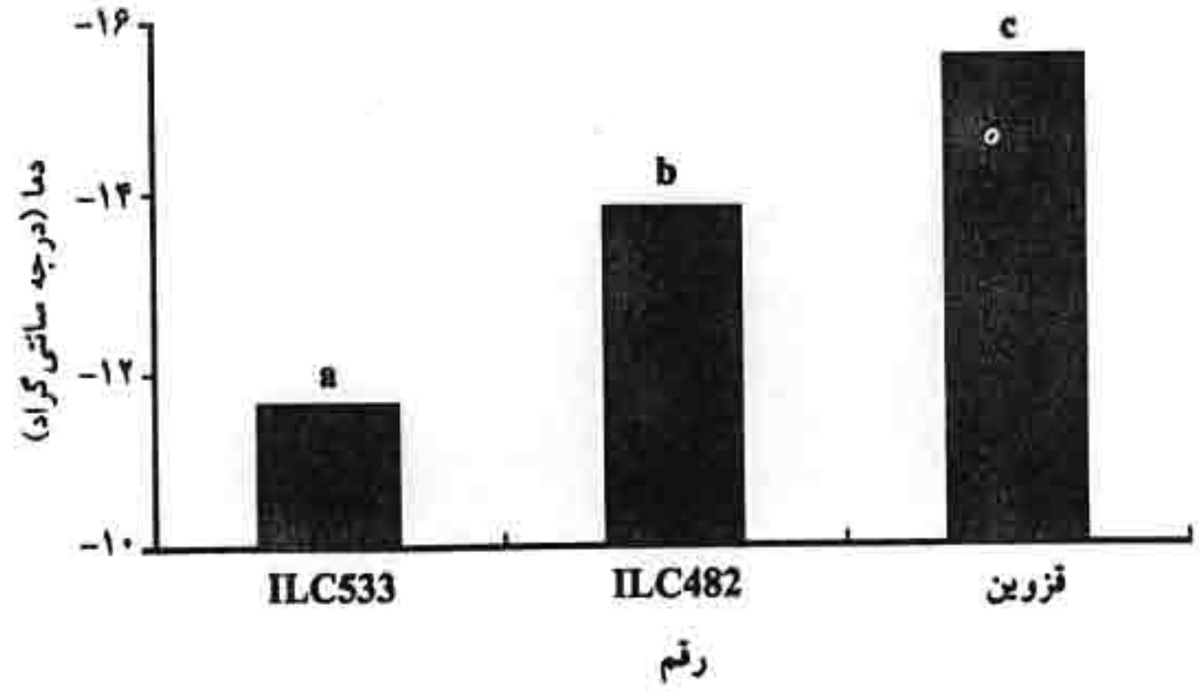
با توجه به‌نتایج به‌دست آمده، همانگونه که انتظار می‌رفت در این مطالعه در گیاه نخود نیز همانند سایر گیاهان زراعی، خوسرمایی سبب افزایش تحمل به یخزدگی در شرایط این‌ویترو شد. این افزایش بویژه در مراحل اولیه رشد مزیت مهمی دارد زیرا با قرار گرفتن در



شکل ۱ـ رابطه درصد خسارت با درجه حرارت پایین در سطوح مختلف خوسرمایی.



شکل ۲- مقایسه تحمل به سرمای در سه تیمار خوسرمایی براساس LT50.



شکل۳- مقایسه تحمل به سرمای ارقام نخود براساس LT50.

دماهای سرد (نه در حد یخزدگی)، سازگاری به دماهای پایین در گیاهچه‌ها القا شده و پس از یخزدگی، گیاه قادر خواهد بود به زندگی خود ادامه دهد.

مطالعات گذشته نشان داده است که خوسرمایی با تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول‌های گیاهی، منجر به حفظ سلول در مقابل آسیب‌های انجماد می‌شود. احتمالاً افزایش دورهٔ خوسرمایی با تغییر در بیان ژن‌ها سبب افزایش سنتز و تجمع پروتئین‌ها، قندها و سایر موادی می‌شود که هر یک به‌گونه‌ای حفاظت از بافت‌ها یا سلول‌های گیاهی را در برابر آسیب ناشی از درجه حرارت‌های سرد بر عهده دارند (زاین و بروز، ۲۰۰۰). این روند در نخود نیز دور از انتظار نیست. لازم به ذکر است که حداکثر تحمل به یخزدگی زمانی حاصل می‌شود که گیاه بتواند به‌مدت کافی تحت دماهای پایین (بین ۲ تا ۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گیرد (ماهاپاترا و همکاران، ۱۹۸۷). در مطالعه حاضر دورهٔ خوسرمایی۲۰ روز برای این گیاه عکس‌العمل بهتری در پی داشت.

تمایز ارقام: در این مطالعه اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) بین ارقام در پاسخ به درجه حرارت پایین به اثبات رسید (شکل ۳). باتوجه به نتایج LT_{50}، قابلیت تحمل به یخزدگی در رقم ILC533 نسبت به سایر ارقام کمتر بود. در حالیکه رقم ILC482 و توده بومی قزوین به دماهای زیر صفر، تحمل بالاتری نشان دادند. در مطالعه حاضر، رقم محلی قزوین بالاترین درجه تحمل را به یخزدگی داشت. نتایج به‌دست آمده، با آنچه در روش‌های مزرعه‌ای و یا در گلخانه گزارش شده بود (نظامی و باقری، ۱۳۸۰) مطابقت داشت و گویای آن بود که در شرایط این‌ویترو نیز تمایز ارقام براساس واکنش نسبت به یخزدگی امکان‌پذیر است.

براساس مطالعات گذشته، تحمل به دماهای زیر صفر در ارقام مختلف می‌تواند به عوامل متعددی از جمله ترکیب غشاء پلاسمایی بستگی داشته باشد، بطوریکه در گیاهچه‌های حساس غشای پلاسمایی سلول‌ها درجه اشباعی بیشتری داشته و پس از یخزدگی آب درون سلول‌های این ارقام، غشاء پلاسمایی آنها براحتی از هم گسیخته شده و صدمهٔ شدیدتری به این گیاهان وارد خواهد شد (کافی و دامغانی، ۱۳۷۹). در این رابطه نتایجی در برخی از گیاهان از جمله چاودار (استپونکوس، ۱۹۸٤) و برنج (برتین و همکاران، ۱۹۹٦) گزارش شده است.

در بررسی حاضر اختلاف ارقام در سطوح مختلف خوسرمایی از نظر آماری معنی‌دار نبود که نشان داد در هر یک از سطوح خوسرمایی می‌توان ارقام مختلف را از هم تفکیک کرد. همچنین با توجه به اینکه دورهٔ خوسرمایی ۲۰ روز توانست از خسارت شدید سرما روی نمونه‌های گیاهی جلوگیری نماید، احتمال می‌رود بتوان به‌گزینی ارقام را پس از اعمال دورهٔ خوسرمایی ۲۰ روز به‌نحو مطلوب‌تری انجام داد تا به این ترتیب از صدمه جبران‌ناپذیر به تعداد زیادی از نمونه‌های گیاهی اجتناب شود. این نتایج با آنچه در توت فرنگی (پالونن و بوزارد، ۱۹۹۷) و تمشک (پالونن و بوزارد، ۱۹۹۸) به‌دست آمده، مطابقت دارد. بالعکس در چغندرقند در شرایط عدم خوسرمایی به گزینی ارقام مؤثرتر بوده است (دیکس و همکاران، ۱۹۹٤).

در مجموع به‌نظر می‌رسد با توجه به انطباق نتایج حاصل با نتایج گزارش شده در شرایط مزرعه و گلخانه (نظامی و باقری، ۱۳۸۰)، و نیز سهولت، صرف زمان کمتر و امکان تثبیت شرایط آزمایش و حذف اثرات ناخواسته محیطی در شرایط این‌ویترو، بتوان در صورت بهینه نمودن این شیوه، از گزینش این‌ویترو به‌عنوان جایگزینی مناسب برای گزینش مزرعه‌ای استفاده نمود. همچنین با توجه به نتایج حاصل احتمال می‌رود بتوان به‌گزینی ارقام را پس از دوره مناسب خوسرمایی و سپس اعمال درجه حرارت‌های زیر صفر انجام داد، زیرا بطورکلی، در طبیعت تغییرات آب و هوایی و به‌دنبال آن کاهش درجه حرارت روند تدریجی دارد و دماهای زیر صفر بندرت به یکباره اتفاق می افتد. به این ترتیب ارزیابی تحمل به یخزدگی در شرایط این‌ویترو با شرایط مزرعه‌ای انطباق بیشتری داشته و به‌گزینی ارقام به‌نحو مطلوب‌تری صورت خواهد گرفت.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تأمین بودجه و از مسئولان آزمایشگاه‌های کشت بافت و بیوتکنولوژی بخاطر فراهم کردن امکانات اجرایی این مطالعه تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱.کافی، م. و دامغانی، ع. م. ۱۳۷۹. مکانیسم‌های مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۳۷۰ صفحه.

۲.نظامی، ا. و باقری، ع. ۱۳۸۰. ارزیابی کلکسیون نخود (*Cicer arietinum* L.) برای تحمل به سرما در شرایط مزرعه. مجله علوم و صنایع کشاورزی، جلد ۱۵، شمارهٔ ۲، ص. ۱۶۱-۱۵۵.

3.Bertin, P., Bouharment, J., and Kinet, J.M. 1996. Somaclonal variation and improvement in chilling tolerance in rice: changes in chilling-induced electrolyte leakage. Plant Breeding, 115:268-272.

4.Chen, T.H.H., Gusta, L.V., and Fowler, D.B. 1983. Freezing injury and root development in winter cereals. Plant Phsiol. 73:773-777.

5.Dix, P.J., Finch, I., and Bruke, J.I. 1994. Genotypic differences in cold tolerance are masked by high sucrose and cytokinin in shoot cultures of sugar beet. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 36:285-290.

6.Duncan, D.R., and Widhalm, J.M. 1987. Prolin accumulation and its implication in cold tolerance regenerable maize callus. Plant Phisiol., 83:703-708.

7.Fowler, D.B., Limin, A.E., Robertson, A.J., and Gusta, L.V. 1993. Breeding for low-temperature tolerance in field crops. International Crop Sci., 1:357-362.

8.Fry, J.D., Lang, N.S., Clifton, R.G.P., and Marrier, F.P. 1993. Freezing tolerance and carbohydrate content of low-temperature-acclimated and nonacclimated centipedegrass. Crop Sci. 33:1057-1065.

9.Gudleifson, B.E., Andrews, C.J., and Bjornsson, H. 1986. Cold hardiness and ice tolerance of pasture grasses grown and tested in controlled environments. Can. J. Plant Sci. 66:601-608.

10.Guy, C.L., and Haskell, D. 1987. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. Plant Physiol. 84:872-878.

11.Lee, S.P., Zhn, B., Chen, T.H.H., and Li, P.H. 1992. Induction of freezing tolerance in potato (*Solanum commersonii*) suspension cultured cells. Physiol. Plant. 84:41-48.

12.Mohapatra, S.S., Poole, R.L., and Dhindsa, R.S. 1987. Changes in protein patterns and translatable massenger RNA populations during cold acclimation of alfalfa. Plant Physiol. 84:1172-1176.

13.Orr, W., Johnson-Flanaga, A.M., Keller, W.A., and Singh, J. 1990. Induction of freezing tolerance in microspore derived embryos of winter Brassica napus. Plant Cell Rep. 8:579-581.

14.Palonen, P., and Buzard, D. 1997. Screening strawberry cultivars for cold hardiness in vitro. Acta Hort. 439:217-220.

15.Palonen, P., and Buzard, D. 1998. In vitro screening for cold hardiness of raspberry cultivars. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 53:213-216.

16.Palta, J.P., and Weiss, L.S. 1993. Ice formation and freezing injury: an overview on the survival mechanisems and molecular aspects of injury and cold acclimation. In P.H. Li and L. Christersson (eds.) Advances in Plant Cold Hardiness. Florida, CRC Press Inc, Boca Raton, U.S.A, 454 pp.

17.Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin. B.A., and Stewart, C.R. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and aregulatory role for hydrogen peroxide. The Plant Cell, 6:65-74.

18.Robertson, A.J., and Gusta, L.V. 1986. Abscisic acid and low temperature induced polypeptide changes in alfalfa (*Medicago sativa*) cell suspension cultures. Can. J. Bot. 64:2758-2763.

19.Steponkus, P.L. 1984. Role of the plasma memberane in freezing injury and cold acclimation. Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. 35:543-584.

20.Xin, Z., and Browse, J. 2000. Cold confort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. Plant Cell and Environment. 23:893-902.

21.Zhang, M., and Rajashekar, C.B. 1994. Selection of cold tolerant cells of grapes in suspension cultures. Plant Sci., 97:60-74.

22.Zhu, C.H., and Liu, Z.Q. 1987. Detemination of media lethal temperature using the logistical function. In P.H. Li (ed.) Plant Cold Hardiness. Alan R. Liss. Inc., New York, 570 pp.

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(5) Jan - Feb 2006
www.magiran.com/jasnr

The effect of cold acclimation on freezing tolerance of three chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars

F. Moshiri[1], A. Bagheri[2] and A. Safarnejad[3]
[1]Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, [2]College of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, [3]Agriculture and Natural Resources Research Center, Khorasan

Abstract
It is necessary to alter temperature gradually when we have an intention for screening of plants to freezing tolerance so that it allows us to make active acclimation mechanisms and reveal impression of efficient genes. In order to asses manners of applying these temperature alternations on chickpea *in vitro*, in this study seeds of two genotypes 'ILC533' and 'ILC482' and a variety of Qazvin were grown in the relatively steril condition and 1 cm explants from second and third nods of those plants were prepared and grown on an agar medium *in vitro*. Acclimation treatments were done 10 days and/or 20 days at 4°C. After acclimation, those cultures as well as control (no acclimation) were frozen at -4, -8, -12, -16 and -20°C for 1h and on the basis of peresent injury, probit analysis was accomplished to identify LT_{50} for each treatment. Evaluation of freezing tolerance by LT_{50} showed that the cold acclimation increased freezing tolerance and 20 days cold acclimation had better effect on cold hardiness and viability. Freezing tolerance of 'ILC533' induced by cold acclimation was more than other cultivars. Also acclimation for 20 days allowed satisfactory discrimination between the hardy cultivars 'ILC482' and 'Qazvin' and less cold hardy 'ILC533'. The results suggest that acclimation treatment for 20 days at 4°C can be used for *in vitro* screening of chickpea to decline freezing injury. So it seems to prepare the possibility of autumn culture by screening of tolerant chickpea.

Keywords: Freezing tolerance; Cold acclimation; *In vitro* selection; Chickpea

مجله دوازدهم - ویژه‌نامه زراعت و اصلاح نباتات
(ضمیمه آذر - دی ۱۳۸۴)