هجدهمین کنگره ملی و چهارمین کنگره بین‌المللی
علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران
18th Iranian National & 4th International Crop Sciences Congress
Ferdowsi University of Mashhad, Iran
Sept. 10 – 12th , 2024
دانشگاه فردوسی مشهد
۲۲ – ۲۰ شهریورماه ۱۴۰۳

ارزیابی سیستم آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ‌های منتخب نخود (*Cicer arietinum* L.) تحت تنش یخزدگی

جعفر نباتی*۱، زهرا نعمتی۲، علیرضا حسن فرد۳

۱-- استادیار، گروه اگرواکولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد/ ۲- دکتری باغبانی، گروه باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد/ ۳- دکتری علوم علف‌های هرز، گروه گرواکولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*- نویسنده مسئول: Email: jafarnabati@uam.ac.ir

ارائه‌دهنده: جعفر نباتی

نحوه ارجاع به مقاله:

نباتی، ج.، نعمتی، ز.، حسن فرد، ع. (۱۴۰۳). ارزیابی سیستم آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ‌های منتخب نخود (*Cicer arietinum* L.) تحت تنش یخزدگی. هجدهمین کنگره ملی و چهارمین کنگره بین‌المللی علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران . ۲۰-۲۲ شهریور ۱۴۰۳، دانشگاه فردوسی مشهد.

چکیده:

این مطالعه با هدف بررسی تحمل به تنش یخزدگی و غربالگری دقیق ژنوتیپ‌های نخود متحمل به یخزدگی با استفاده از فاکتورهای فیزیولوژیکی و مولکولی انجام شد. آزمایش در شرایط کنترل شده در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و آزمایشگاه فیزیولوژی تنش‌های محیطی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار روی هشت ژنوتیپ نخود از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی (MCC194، MCC605، MCC 607، MCC 613، MCC 885، MCC 901، MCC 911 و کاکا) در طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۴۰۱ اجرا شد. برای ایجاد خوسرمایی، گیاهان در محیط طبیعی رشد داده شدند و سپس برای اعمال دماهای یخزدگی به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند و در معرض پنج دما (صفر، ۶-، ۱۰-، ۱۲- و ۱۴- درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اثر دما، ژنوتیپ‌ها و تعامل آن‌ها بر شاخص‌های فیزیولوژیکی پرولین، کربوهیدرات محلول، رنگ‌دانه کل و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد و بر کلروفیل a، پتانسیل اسمزی، فنل کل و فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. بیان ژن‌های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز نیز تحت تأثیر دما، ژنوتیپ و تعامل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیشترین همبستگی را با میزان ماده خشک تحت شرایط تنش نشان داد و به عنوان بهترین شاخص‌ها برای دستیابی به ارقام پرمحصول و مقاوم به یخزدگی شناخته شدند. همچنین، همبستگی مثبتی بین میزان بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برگ و وزن خشک مشاهده شد. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های MCC194، MCC901 و MCC911 بیشترین مقدار وزن خشک و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را داشتند، در حالی که ژنوتیپ حساس کاکا کمترین مقدار را نشان داد. بیشترین میزان نشت الکترولیت‌ها نیز در ژنوتیپ حساس کاکا و کمترین میزان در ژنوتیپ‌های MCC194، MCC901 و MCC911 مشاهده شد.

مقدمه و بیان مسئله:

نخود (*Cicer arietinum* L.) یک محصول حبوباتی مهم است که در بیش از ۵۰ کشور کشت می‌شود (Kumari et al., 2020). تغییرات آب و هوایی چالش بزرگی برای تولید نخود ایجاد کرده است. این گیاه به‌عنوان یک حبوبات فصل سرد طبقه‌بندی می‌شود و تولید آن تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی مانند سرما و گرما قرار می‌گیرد (Kumari et al., 2020). سرمازدگی و یخزدگی میزان تولید نخود را کاهش می‌دهند و یکی از موانع اصلی تولید آن هستند (Nabati et al. 2020). این تنش‌ها در سطح سلولی باعث آسیب به غشاء، افزایش تولید ROS، دناتوره شدن پروتئین‌ها و عدم تعادل هورمونی می‌شوند (Heidarvand and Maali-Amiri, 2013). بیان برخی ژن‌ها تحت تنش سرما تغییر می‌کند؛ برای مثال، بیان ژن سوکروز سینتاز در شرایط یخزدگی کاهش و ژن‌های *CaCAT*، *CaSOD*، *CaSDH* و *CaAOX* افزایش می‌یابند (Kazemi-Shahandashti et al., 2014). ژن‌های POD، CAT و دیگر ژن‌های آنتی‌اکسیدانی نیز در ژنوتیپ‌های متحمل به سرما افزایش بیان نشان داده‌اند (Karimzadeh et al., 2021). بررسی این ژن‌ها می‌تواند به شناسایی مکانیسم‌های تحمل به سرما و گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم کمک کند.

در ایران و مناطق مدیترانه‌ای، نخود به‌عنوان محصولی مقاوم به خشکی در زمستان کشت می‌شود و در طول رشد با دمای پایین و تنش یخزدگی مواجه می‌شود. این تنش‌ها باعث کاهش رشد رویشی و زایشی، تأخیر در فنولوژی و افزایش کلروز و نکروز برگ می‌شوند. برای تحمل به سرما، تنوع قابل‌توجهی در صفات

مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی وجود دارد. با این حال، مکانیسم‌های تحمل به سرما در نخود هنوز تا حد زیادی ناشناخته هستند و نیاز به روش‌های غربالگری دقیق برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به سرما وجود دارد (Sharma e al., 2021). این مطالعه به منظور بررسی روش‌های غربالگری دقیق مبتنی بر فاکتورهای فیزیولوژیکی و مولکولی به منظور گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به سرما و مقایسه آنها با ژنوتیپ‌های حساس نخود صورت گرفت.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار روی هشت ژنوتیپ نخود از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی (MCC194، MCC605، MCC607، MCC613، MCC885، MCC901، MCC911 و کاکا) در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و آزمایشگاه فیزیولوژی تنش‌های محیطی پژوهشکده علوم گیاهی طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۴۰۱ انجام شد. برای ارزیابی تحمل به یخزدگی و بررسی بیان ژن، گیاهچه‌های هشت هفته‌ای به فریزر ترموگرادیان با شرایط تاریکی و دمای پنج درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. دما به تدریج و با سرعت دو درجه سانتی‌گراد در ساعت کاهش یافت و گیاهچه‌ها به مدت یک ساعت در دماهای مورد نظر (صفر، ۶-، ۱۰-، ۱۲- درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. سپس گیاهان به اتاقک سرد با دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰-۸۰ درصد و فتوپریود ۱۶ ساعته منتقل شدند.

پس از اتمام تنش سرما، از جوان‌ترین برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته برای اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها، محتوای کربوهیدرات‌های محلول برگ، فنل کل، مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH، محتوای رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز نمونه‌برداری شد. همچنین برای بررسی بیان ژن، از بافت برگ نمونه‌برداری و RNA استخراج شد. استخراج RNA با استفاده از کیت پارس توس (A101231) و ساخت cDNA با کیت شرکت پارس توس (A101161) طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. برای بررسی بیان ژن، روش qRT-PCR با دستگاه Real-Time مدل Roche Light Cycler 96 استفاده شد. ژن Actin1(NM_001278957.1) به عنوان ژن مرجع و ژن‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (XM_004500820.3)، پراکسیداز (XM_004496386.3) و آسکوربات پراکسیداز (XM_004501278.3) مورد مطالعه قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16.0 صورت گرفت.

نتایج و بحث:

دما، ژنوتیپ و اثر متقابل آن‌ها به‌طور معنی‌داری بر نشت الکترولیت‌ها برگ تأثیر گذاشتند. با کاهش دما، نشت الکترولیت‌ها برگ در تمامی ژنوتیپ‌ها روند افزایشی نشان داد (شکل ۱a). اثر دما، ژنوتیپ‌ها و تعامل آن‌ها بر میزان پرولین، کربوهیدرات‌های محلول، رنگ‌دانه کل، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در سطح پنج درصد و کلروفیلa ، پتانسیل اسمزی، فنل کل و فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح یک درصد معنی‌دار بود. پیش از شروع تنش انجماد، محتوای پرولین، کربوهیدرات‌های محلول، رنگدانه کل برگ، و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، کاتالاز، کلروفیلa ، پتانسیل اسمزی و فنل کل در ژنوتیپ‌ها تفاوتی نداشت. با این حال، هنگام مواجهه با دماهای انجماد، این مقادیر افزایش یافت (جدول ۱). بیان ژن‌های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر دما، ژنوتیپ و تعامل آن‌ها قرار گرفت. نتایج نشان داد که در ژنوتیپ‌های متحمل به سرما، با کاهش دما، بیان ژن‌های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز افزایش می‌یابد (جدول ۲).

همبستگی مثبتی بین میزان فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز در برگ با وزن خشک مشاهده شد (شکل ۱b). بیشترین فعالیت این آنزیم‌ها در ژنوتیپ‌های MCC911، MCC901 و MCC194 کمترین میزان در ژنوتیپ حساس کاکا دیده شد. افزایش فعالیت کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به دلیل تنش یخزدگی در نخود در مطالعات مختلف گزارش شده است (Karimzadeh, et al., 2021; Heidarvand and Maali-Amiri, 2013؛ Sharma, e al. 2021). همچنین نتایج نشان داد که بین بیان ژن‌های آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز و میزان فعالیت این آنزیم‌ها در برگ همبستگی مثبتی وجود دارد (شکل ۱b). در تعداد محدودی از مطالعات، تغییر بیان ژن‌های گیاهی ناشی از تنش یخزدگی، از جمله بررسی بیان ژن‌های CAT و POD در نخود تحت این شرایط، مورد بررسی قرار گرفته است (Karimzadeh, et al., 2021). این مطالعات ارتباط بین تحمل به تنش یخزدگی و سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمد را نشان می‌دهد.

جدول ۱: تجزیه واریانس شاخص‌های فیزیولوژیکی تحت تنش دماهای پایین

منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	نسبت کلروفیل a/b	کاروتنوئیدها	رنگ‌دانه کل کل	DPPH	فلاونوئیدها
ژنوتیپ	۷	۰/۰۳۱**	۰/۰۰۱۸**	۰/۲۲۴**	۰/۰۰۱۸**	۰/۰۶۳**	۰/۱۲۵**	۱۲۳/۹**
دما	۵	۰/۰۸۷**	۰/۰۰۵۲**	۰/۴۵۵**	۰/۰۰۸۸**	۰/۲۱۱**	۰/۳۱۹**	۵۱۷/۳**
ژنوتیپ × دما	۳۵	۰/۰۰۴۱**	۰/۰۰۰۳^{ns}	۰/۰۰۸۸^{ns}	۰/۰۰۰۳۳^{ns}	۰/۰۰۶۶*	۰/۰۳۷^{ns}	۱۶/۱۳^{ns}
خطا	۹۶	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۰۶	۰/۰۴۷	۰/۰۰۰۸۶	۰/۰۰۴۳	۰/۰۳۳	۲۵/۱

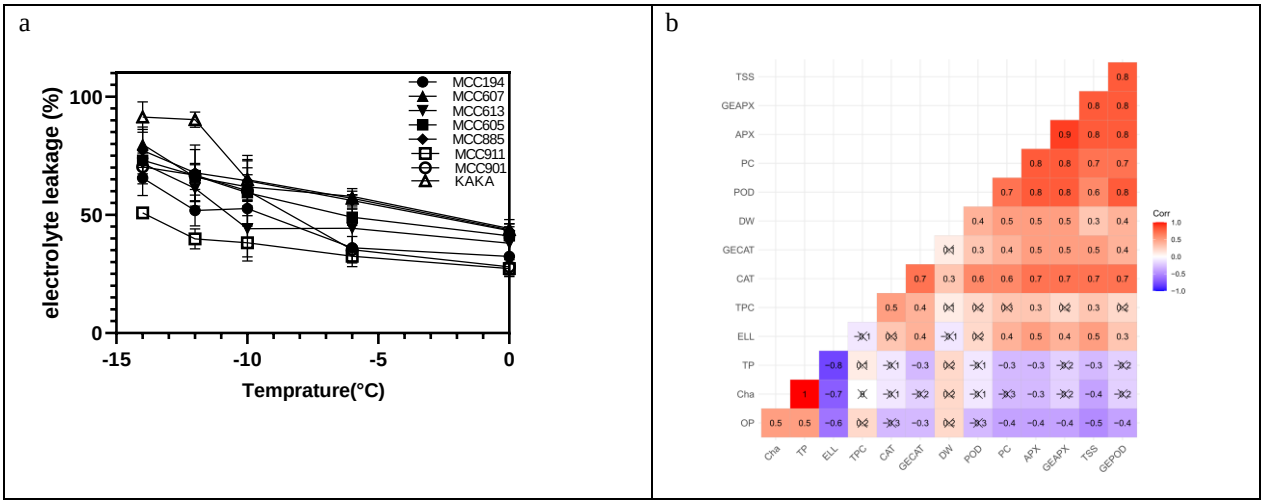
منابع تغییرات	درجه آزادی	پرولین	کربوهیدرات‌های محلول	فنل کل	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	پراکسیداز	پتانسیل اسمزی
ژنوتیپ	۷	۰/۰۸۱**	۰/۶۸۹**	۱۷۲/۴**	۹۶۹**	۰/۸۰۶**	۱۸/۰۸**	۰/۰۴۱**
دما	۵	۱/۳۱۹**	۵/۶۰**	۵۳۳/۹**	۱۶۶۸۲/۴**	۰/۴۴**	۴۵/۳۴**	۰/۳۷۸**
ژنوتیپ × دما	۳۵	۰/۰۳۳*	۰/۱۴۹*	۸۴/۸۵**	۲۶۶/۴*	۰/۱۳۸**	۱/۷۳*	۰/۰۴۳**
خطا	۹۶	۰/۰۲۱	۰/۰۹۵	۳۲/۵۵	۱۶۵/۴	۰/۰۵۳	۱/۱۱	۰/۰۰۷۴

**، *، ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد، ۵ درصد و غیرمعنی‌دار.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر دماهای پایین بر بیان سه ژن بر ژنوتیپ‌های مختلف نخود

منابع تغییرات	درجه آزادی	ژن آسکوربات پراکسیداز	ژن کاتالاز	ژن پراکسیداز
ژنوتیپ	۷	۵۶/۸۵**	۶۳/۱۳**	۷۳/۸۰**
دما	۵	۵۲۸/۲۹**	۱۶۳/۱۳**	۳۳۵/۲۹**
ژنوتیپ × دما	۳۵	۱۱/۲۷*	۱۷/۶۸*	۱۷/۲۵**
خطا	۹۶	۲/۷۹	۰/۹۴۵	۲/۱۳

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.



شکل ۱.a : نشت الکترولیت‌ها در ژنوتیپ‌های نخود در دماهای مختلف یخزدگی. b: ماتریس همبستگی محتوای پرولین (PC)، کربوهیدرات‌های محلول (TSS)، رنگ‌دانه کل (TP)،آسکوربات پراکسیداز (APX) و پراکسیداز (POD)،کاتالاز (CAT)، کلروفیل a (Cha)، پتانسیل اسمزی (OP)، فنل کل (TPC)، وزن خشک گیاه (DW)، نشت الکترولیت‌ها (ELL)، بیان ژن‌های آسکوربات پراکسیداز (*GEAPX*) و پراکسیداز (*GEPOD*) و کاتالاز (*GECAT*).

مهمترین یافته‌ها:

۱- بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان وزن خشک همبستگی مثبت وجود دارد.

۲- ژنوتیپ‌های متحمل به سرما MCC194، MCC901 و MCC911 برای کشت پاییزه نخود مناسب هستند.

۳- بین بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان وزن خشک همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد.

واژگان کلیدی:

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بیان ژن، شاخص‌های فیزیولوژیکی، سرما

Evaluation of the antioxidant system in selected chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under frost stress

Abstract

This study aimed to evaluate the frost stress tolerance and accurately screen cold-resistant chickpea genotypes using physiological and molecular factors. The experiment was conducted under controlled conditions in the greenhouse of the Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, and the Plant

Sciences Research Institute Laboratory. It was designed as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications on eight chickpea genotypes (MCC194, MCC605, MCC607, MCC613, MCC885, MCC901, MCC911, and Kaka). To induce cold acclimation, the plants were grown in natural conditions and then transferred to a thermogradient freezer for freezing temperature exposure at five different temperatures (0, -6, -10, -12, and -14 °C). The results showed that the effects of temperature and genotype and their interaction on physiological indices such as proline, soluble carbohydrate, total pigment, ascorbate peroxidase, and peroxidase enzyme activities were significant at a 1% probability level. In contrast, chlorophyll a, osmotic potential, total phenol, and catalase enzyme activity were significant at a 5% probability level. The expression of ascorbate, peroxidase, and catalase genes was also significantly affected by temperature, genotype, and their interaction at a 1% probability level. The activity levels of antioxidant enzymes showed the highest correlation with dry weight (DW) under stress conditions, indicating that they are the best indicators for identifying high-yield and frost-tolerant cultivars. Additionally, a positive correlation was observed between the expression levels of antioxidant enzymes in leaves and dry weight (DW). The results indicated that the genotypes MCC194, MCC901, and MCC911 had the highest dry weight and antioxidant enzyme activities, while the sensitive genotype Kaka showed the lowest levels. The highest electrolyte leakage was observed in the sensitive genotype Kaka and the lowest in the genotypes MCC194, MCC901, and MCC911.

Keywords: Antioxidant enzyme, Gene expression, Physiological indices, Cold

منابع:

Nezami, A., Boroumand Rezazadeh, E., Azari, S. J., & Mohammadi, M. (2020). Evaluation of Freezing tolerance of deci-type chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) in Mashhad climate conditions. *Journal of Crop Production*, 12(4), 121-136. *https://doi.org/10.22069/ejcp.2020.16281.2212*

Kumari, P., Rastogi, A., & Yadav, S. (2020). Effects of Heat stress and molecular mitigation approaches in orphan legume, Chickpea. *Molecular Biology Reports*, 47(6), 4659-4670. *https://doi.org/10.1007/s11033-020-05358-x*

Heidarvand, L., & Maali-Amiri, R. (2013). Physio-biochemical and proteome analysis of chickpea in early phases of cold stress. *Journal of plant physiology*, 170(5), 459-469. *https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.11.021*

Karimzadeh Soureshjani, H., Nezami, A., Nabati, J., Oskoueian, E., & Ahmadi-Lahijani, M. J. (2022). The physiological, biochemical, and molecular modifications of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings under freezing stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-16. *https://doi.org/10.1007/s00344-021-10369-4*

Kazemi-Shahandashti, S. S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A., & Ramezanpour, 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*

Sharma, K. D., Patil, G., & Kiran, A. (2021). Characterization and differential expression of sucrose and starch metabolism genes in contrasting chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under low temperature. *Journal of Genetics*, 100(2), 71. *https://doi.org/10.1007/s12041-021-01317-y*