مقاله پژوهشی

اثر تنش سرما بر برخی صفات فیزیولوژیک و سیستم آنتی‌اکسیدانی برخی اکوتیپ‌های گیاه خلر (*Lathyrus sativus* L.)

آزاده سادات جعفری نسب[۱]، شهاب مداح حسینی[۲*] و آرمان آذری[۲]

[۱] گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، رفسنجان، ایران

[۲] گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، ایران

(تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۲/۰۳، تاریخ پذیرش نهایی:۱۴۰۱/۰۵/۰۱)

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر تنش سرما بر برخی صفات فیزیولوژیک نه اکوتیپ خلر، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در اتاقک رشد اجرا شد. عامل اول سرما در دو سطح (۲۵ و ۳- درجه سلسیوس) و عامل دوم اکوتیپ در نه سطح، گردآوری شده از مناطق مختلف به نام‌های بم، سیرجان، تربت حیدریه، بافت۱ (منطقه کیسکان)، بافت۲ (منطقه بیدگردوئیه)، شیراز، کوهبنان، رابر و بردسیر بود. صفات اندازه‌گیری‌شده در این آزمایش شامل محتوای قندهای محلول، پرولین، نشاسته، کلروفیل a، b و کل و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بودند. نتایج نشان داد در تمام اکوتیپ‌ها با کاهش دما از ۲۵ به ۳- درجه سلسیوس محتوای قندهای محلول، پرولین، نشت یونی و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز افزایش و محتوای نشاسته و کلروفیل a، b و کل کاهش یافت. تنوع قابل توجهی بین اکوتیپ‌ها از نظر تحمل تنش سرما مشاهده شد. در اکوتیپ‌های بافت۲ و بردسیر محتوای پرولین زیادتر از سایر اکوتیپ‌ها بود. همچنین بیشترین محتوای قند محلول مربوط به اکوتیپ بافت۲ و بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به اکوتیپ بردسیر بود. در ضمن اکوتیپ‌های بافت۲ و بردسیر شاخص زنده‌مانی بالاتری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها داشتند. براساس نتایج شاخص زنده‌مانی، اکوتیپ‌های بافت۲ و بردسیر بیشترین مقاومت به تنش سرما و اکوتیپ‌های بم، شیراز و سیرجان کمترین مقاومت را نشان دادند.

کلمات کلیدی: پرولین، شاخص زنده‌مانی، قندهای محلول، نشاسته

مقدمه

گیاهان علوفه‌ای به‌ویژه گیاهان خانواده بقولات جایگاه ویژه‌ای در تولید پروتئین موردنیاز دام و انسان دارند. علاوه بر آن نقش بسیار مهمی در حفاظت و جلوگیری از فرسایش خاک ایفا می‌کنند. خلر (*Lathyrus sativus* L.) گیاهی یک‌ساله از خانواده Fabaceae است که دارای ویژگی‌های مطلوبی مانند ارزش غذایی بالا، توانایی تثبیت نیتروژن (Campbell, 1994) است و همچنین تحمل قابل قبولی به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند خشکی، سرما، pH و غرقابی خاک دارد (Calderon *et al*., 2012). این ویژگی‌ها گیاه خلر را به جایگزینی برای سایر حبوبات با پروتئین بالا مانند نخود یا لوبیا که به شرایط رشد بهتری نیاز دارند، تبدیل می‌کند (Piwowarczyk *et al*., 2016). خلر به دلیل دانه غنی از پروتئین (۳۲-۲۰ درصد) به دو هدف برای مصرف انسان و

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: shahab.mhoseini@vru.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

علوفه به‌عنوان خوراک دام کشت می‌شود (Grela *et al.*, 2001). همچنین کشت خلر در یک فصل زراعی به‌طور تقریبی معادل اضافه کردن ۶۷ کیلوگرم در هکتار نیتروژن به خاک است (Wang *et al.*, 2000). علاوه بر آن خلر تأثیرات مثبتی بر ساختار خاک دارد زیرا ریشه عمیق آن از فشردگی خاک جلوگیری می‌کند (Lazanyi, 2000). خلر به‌عنوان یک کود سبز نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد و بدین ترتیب مواد مغذی را به خاک باز می‌گرداند و ماده آلی آن را افزایش می‌دهد (Lazanyi, 2000). وسعت دامنه تحمل اکولوژیک خلر به آن اجازه رشد قابل اطمینان را در شرایط غیرمناسب برای دیگر لگوم‌های دانه‌ای را فراهم می‌آورد.

دما از مهم‌ترین عوامل محیطی است که بر پراکنش موجودات زنده تأثیر می‌گذارد. نوسانات دمایی خسارت عمده‌ای را به گیاهان زراعی وارد می‌کنند. دماهای پایین کاهش فعالیت بیوسنتزی، اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی و آسیب‌های دائمی به گیاه را در پی دارند (Kazemi shahandashti *et al.*, 2014). آسیبی که تنش سرما به گیاه وارد می‌کند، علاوه بر تحمل ذاتی گیاه به سرما با خوپذیری آن به سرما نیز ارتباط دارد. بیان ژن‌های ویژه پاسخ‌های فیزیولوژیک و تجمع ترکیبات سازگار می‌توانند به القاء خوپذیری در گیاهان کمک کنند (Hekneby *et al.*, 2006). قرار گرفتن گیاهان در معرض دمای پایین باعث تجمع گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن، اکسیژن یکتایی و سوپراکسید و درنهایت آسیب اکسیداتیو می‌شوند (Awasthi *et al.*, 2015). از سازوکارهای مهم حفاظتی گیاه در مقابل تنش‌های غیرزیستی مقابله با تجمع رادیکال‌های آزاد جهت حفظ تعادل سلولی سیستم آنتی‌اکسیدانی است. این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیدازها و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند کاروتنوئیدها است (Kazemi shahandashti *et al.*, 2014). در بسیاری از گیاهان همبستگی مثبتی بین تجمع کربوهیدرات‌ها و تحمل به سرما وجود دارد و تجمع کربوهیدرات‌ها نقش مثبتی در گیاهان تحت تنش سرما ایفا می‌کند. کربوهیدرات‌ها با افزایش غلظت سلولی از یخ زدن آن جلوگیری می‌کنند (Kerepesi *et al.*, 2004). به نظر می‌رسد پرولین نیز در بسیاری از گیاهان در تنش‌های محیطی انباشته می‌شود همچنین در گیاهانی که نسبت به دماهای پایین متحمل هستند در شرایط تنش سرما تجمع می‌یابد (Apostolova *et al.*, 2008). برای نمونه در گیاه نخود (Thakur *et al.*, 2020) و سویا (زینالی یادگاری و همکاران، ۱۳۸۹) محتوای پرولین در اثر سرما افزایش‌یافته و در مرحله بهبودی از میزان آن کاسته شد. از سوی دیگر کاهش دما بر خصوصیات مرتبط با غشاء به دلیل سیالیت و نفوذپذیری آن تأثیر می‌گذارد و این امر موجب نشت محتویات سلولی به بیرون می‌شود درنتیجه هدایت الکتریکی محیط افزایش می‌یابد (Los *et al.*, 2013). نفوذپذیری غشای سلولی در بافت‌های آسیب‌دیده در تنش سرما توسط شاخص نشت یونی ارزیابی می‌شود (نظری و همکاران، ۱۳۸۹).

خلر از دیرباز به‌صورت گیاه حاشیه‌ای در مزارع و باغات مناطق شرقی و جنوبی ایران به‌ویژه استان کرمان کشت می‌شده است و مصرف خوراکی (همانند باقلا) دارد. با این حال کشت بهاره آن در این نواحی گیاه را در شرایط تنش خشکی و گرمای آخر فصل قرار می‌دهد. تغییر تاریخ کاشت به پاییزه و زمستانه می‌تواند گیاه را در برابر تنش‌های انتهای فصل محافظت کند و همچنین فصل رشد طولانی‌تر می‌تواند تولید گیاه را افزایش دهد. اگرچه به‌طور کلی خلر گیاهی است بهاره و بهترین رشد خود را در دمای ۲۵-۱۰ درجه سلسیوس انجام می‌دهد (Muehlbauer and Tullu, 1997) اما در برخی منابع خلر به‌عنوان گیاه زمستانه و مقاوم به سرما نیز معرفی شده است (Singh *et al.*, 2013). اطلاعاتی از میزان تحمل گونه‌های مختلف خلر به سرما در دست نیست و شناسایی اکوتیپ‌های متحمل به سرما در جهت پایداری عملکرد آن دارای اهمیت است. در ایران علی‌رغم پراکندگی وسیع خلر در اقلیم‌های مختلف، اطلاعات اندکی درزمینه تنوع اکوتیپی آن وجود دارد. پژوهش حاضر با هدف یافتن پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اکوتیپ‌های مختلف خلر در واکنش به تنش سرما انجام شد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

جدول ۱- ویژگی‌های اصلی جغرافیایی و اقلیمی مناطق جمع‌آوری اکوتیپ‌ها

منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع	میانگین بارش سالانه (mm)	میانگین دما سالانه (°C)	آب و هوای بلندمدت
بافت۱(بیدکردوئیه†)	۵۶°۲۲′۵۸″E	۲۹°۱۸′۱۴″N	۲۴۳۱	۲۵۳	۱۴/۲	معتدل (سرد)
بافت۲ (کیسکان††)	۵۶°۳۸′۰۰″E	۲۹°۲۲′۵۶″N	۲۶۳۳	۲۵۳	۱۴/۲	معتدل (سرد)
بردسیر	۵۶°۳۴′۲۰″E	۲۹°۵۵′۳۹″N	۲۰۴۳	۱۷۱	۱۴/۶	معتدل (سرد)
ده‌بکری	۵۷°۵۹′۴۱″E	۲۹°۰۲′۵۸″N	۲۰۸۰	۲۲۰	–	معتدل (سرد)
کوهبنان	۵۶°۱۶′۵۴″E	۳۱°۲۴′۴۴″N	۱۹۹۴	۱۴۵	۱۴/۱	خشک
سیرجان	۵۵°۴۰′۵۳″E	۲۹°۲۷′۰۷″N	۱۷۳۰	۱۶۸	۱۶/۷	گرم و خشک
رابر	۵۶°۹۰′۸۹″E	۲۹°۲۸′۹۷″N	۲۳۴۳	۲۶۷	۱۵	معتدل (سرد)
شیراز	۵۲°۳۳′۳۳″E	۲۹°۳۹′۴۰″N	۱۸۲۹	۳۳۷	۱۸	معتدل (گرم)
تربت‌حیدریه	۵۹°۱۳′۳۲″E	۳۵°۱۵′۰۳″N	۱۳۲۵	۲۷۲	۲۱	معتدل

†و†† به‌ترتیب در ۲۰ کیلومتری شمال غرب و ۱۷ کیلومتری شمال شهرستان بافت

جدول ۲- مشخصات فیزیکی و شیمیایی اصلی خاک گلدان‌ها

بافت	وزن مخصوص ظاهری (g/cm^3)	وزن مخصوص حقیقی (g/cm^3)	رس	سیلت	شن	pH	EC (ms/cm)	N(٪)	P	K
			(٪)						(mg/kg)	
شنی لومی	۱/۶	۲/۶	۱۷/۵	۲۱	۶۱/۵	۷/۹۵	۲/۸۸	۰/۰۶	۷/۲	۳۱۱

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در چارچوب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در اتاقک رشد با قابلیت تنظیم گام‌به‌گام دما در دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان انجام شد. عامل اول اکوتیپ در نه سطح (شامل اکوتیپ‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق: بم، تربت‌حیدریه، سیرجان، بافت۱ (منطقه کیسکان)، بافت۲ (منطقه بیدگردوئیه)، شیراز، کوهبنان، رابر و بردسیر) و عامل دوم دما در دو سطح (۲۵ و ۳- درجه سلسیوس) و عامل سوم زمان نمونه‌برداری (صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش سرما) بود. بذرها از فروشگاه‌های عطاری محلی خریداری شدند و در گلدان‌هایی با ارتفاع ۱۸ و قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر پر شده با خاک مزرعه و در اتاق رشد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، شدت نور ۱۲۰۰۰ لوکس و دوره روشنایی ۱۶ ساعته کاشته شدند. برخی مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در جدول ۲ و مشخصات جغرافیایی و شاخص‌های اقلیمی عمده مناطق گردآوری بذر در جدول ۱ آورده شده است. پس از ورود گیاهان به مرحله ۱۰ برگی (مرحله رشد رویشی) اعمال تنش سرما آغاز شد. بدین منظور ابتدا دمای اتاقک رشد به میزان یک درجه در ساعت کاهش یافت تا به ۱۵ درجه سلسیوس رسید و به‌مدت پنج ساعت در این دما ثابت ماند. سپس دما دوباره به ازای یک درجه در ساعت کاهش یافت تا به ۵ درجه سلسیوس رسید و مجدداً به‌مدت پنج ساعت در این دما باقی ماند. در نهایت دما به میزان یک درجه در ساعت کاهش‌یافت تا به ۳- درجه سلسیوس رسید و یک ساعت در این دما ثابت ماند. پس از این مدت، دما به میزان یک درجه سلسیوس در ساعت افزایش یافت تا به ۲۵ درجه سلسیوس رسید و در این دما به‌مدت ۲۴ ساعت ثابت ماند (Apostolova *et al.*, 2008). در مدت اعمال سرما، گیاهان تیمار شاهد در دمای ثابت ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری محتوای قندهای محلول، نشاسته، پرولین، کلروفیل a، b و کل، کاروتنوئیدها و نشت یونی سه بار

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

نمونه‌برداری در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از پایان تنش سرما (پس از بازگشت دما به ۲۵ درجه سلسیوس)، از برگ‌ها انجام شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز یک بار و ۲۴ ساعت پس از پایان تنش انجام شد. به‌منظور طبقه‌بندی اکوتیپ‌ها بر-اساس واکنش کلی آن‌ها به تنش سرما، از روش نمره‌دهی استفاده شد. در این روش گیاهان پیش از اعمال سرما و پس از ۲۱ روز از بعد از تنش سرما براساس صفت‌هایی مانند رنگ برگ، آویختگی دمبرگ و شادابی بوته بین ۱ تا ۱۰ نمره‌دهی شدند. نمره‌های بالاتر مبین وضعیت ظاهری بهتر بودند (Heidarvand *et al.*, 2011).

صفات مورد بررسی: نشت یونی براساس روش Campos و همکاران (۲۰۰۳) اندازه‌گیری شد. پنج دیسک برگی به مساحت ۰/۵ سانتی‌متر مربع به‌مدت ۲۲ ساعت در ۱۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر در دمای محیط شناور شدند و سپس هدایت الکتریکی محلول اندازه‌گیری شد (EC_1). پس از آن به‌مدت دو ساعت در دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و مجدداً هدایت الکتریکی اندازه‌گیری شد (EC_2). در آخر نشت یونی به‌صورت درصد با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد.

معادله ۱:

$$I = EC1/EC2 \times 100$$

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها، از نمونه‌های برگی انتخاب‌شده به‌صورت تصادفی از کل برگ‌های بوته عصاره‌گیری با استون انجام شد و محلول حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شد سپس میزان جذب محلول در طول‌موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵، ۶۵۲ و ۶۶۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Halo DB-20 Spectrophotometer, Yumpu, Switzerland) خوانده شد و با استفاده از فرمول‌های موجود در رفرنس ارائه‌شده، اعداد بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ به‌دست آمد (Arnon, 1949).

برای اندازه‌گیری محتوای پرولین برگ از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. برای استخراج پرولین ۰/۵ گرم از نمونه‌های برگی با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد (حجمی/حجمی) ساییده شد. پس از سانتریفیوژ، عصاره الکلی با معرف ناین‌هیدرین (مخلوط ۱/۲۵ گرم ناین‌هیدرین در ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلایسال و ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار) مخلوط و پس از افزودن ۵ میلی‌لیتر استیک اسید گلایسال به آن و هم زدن، به‌مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم ۹۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از خنک شدن ۵ میلی‌لیتر بنزن به محلول اضافه شد. درنهایت فاز بالایی محلول جدا شده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب در طول‌موج ۵۱۵ نانومتر خوانده شد. با جای‌گذاری داده‌های جذب در معادله منحنی استاندارد غلظت نمونه برحسب میلی‌گرم در لیتر محاسبه و برای تبدیل غلظت از واحد ppm به میکرومول بر گرم وزن تر از رابطه زیر استفاده شد.

µM proline/g Fw = [(mg prolin/Lit × ml benzene)/ 115.5 µg/µmole] / [g sample)/5]

به‌منظور تعیین قند محلول ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره الکلی که قبلاً برای پرولین تهیه شده بود با ۳ میلی‌لیتر آنترون مخلوط شد. سپس در حمام آب گرم قرار داده شد تا واکنش انجام و رنگ محلول تشکیل شود. میزان جذب نوری محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. محلول‌های استاندارد با استفاده از گلوکز خالص در غلظت‌های صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۲۵۰ و ۲۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شدند و میزان جذب آن‌ها اندازه‌گیری شد. میزان قند برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد (Irigoyen *et al.*, 1992).

نشاسته با استفاده از رسوب باقی‌مانده از اندازه‌گیری قندهای محلول اندازه‌گیری شد (Sheligl, 1986). به رسوب‌های باقی‌مانده ۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۶/۵ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ۵۲ درصد اضافه شد و ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. سپس ۲۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر به آن اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و ۲/۵ میلی‌لیتر از آن به ۱۰ میلی‌لیتر محلول آنترون (۲ در هزار حجمی/حجمی در اسید سولفوریک) اضافه شده و به‌مدت ۷/۵ دقیقه در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. در پایان میزان جذب

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

برای استخراج عصاره پروتئینی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز، ۰/۵ گرم نمونه برگی با بافر استخراج (۰/۶۰۷ گرم تریس با ۰/۰۵ گرم پلی‌وینین پیرولیدون (PVP) در ۹۰ میلی‌لیتر در آب‌مقطر حل شده و pH محلول در ۸ تنظیم شد و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) ساییده شده و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فعالیت آنزیم کاتالاز براساس روش Aebi (۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد. بافر پتاسیم فسفات (pH=۷)، پراکسید هیدروژن و عصاره آنزیمی مخلوط شده و درنهایت کاهش در جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز با مخلوط یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر EDTA، یک میلی‌لیتر گایاکول، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن و ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی انجام شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر به‌مدت یک دقیقه خوانده شد (Tang and Newton, 2005).

فعالیت آنزیم SOD براساس روش Giannopolitis و Ries (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی استخراج شده و ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش که شامل ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم (pH=۷/۸)، ۷۵ میکرومول NBT، ۱۳ میلی‌مول ال- متیونین، ۰/۱ میلی‌مول EDTA و ۲ میکرومول ریبوفلاوین بود، به لوله آزمایش منتقل شد. برای تهیه نمونه شاهد ۲۰ میکرولیتر آب‌مقطر و ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش در لوله‌های مربوطه ریخته و لوله‌های آزمایش به‌مدت ۱۰ دقیقه در روشنایی حاصل از نور مصنوعی در یک اتاقک قرار داده شدند. سپس در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نمونه‌ها خوانده شد.

محتوای پروتئین‌های محلول برگ به روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی و ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره (۰/۱ گرم کوماسی بریلیانت بلو G250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حجمی/حجمی به مدت یک ساعت حل و بعد از آن ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد حجمی/حجی به آرامی به آن افزوده شد و محلول نهایی به حجم یک لیتر رسانده شد). مخلوط و ورتکس شد و درنهایت میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین برحسب میلی‌گرم بر گرم بافت تر برگ با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

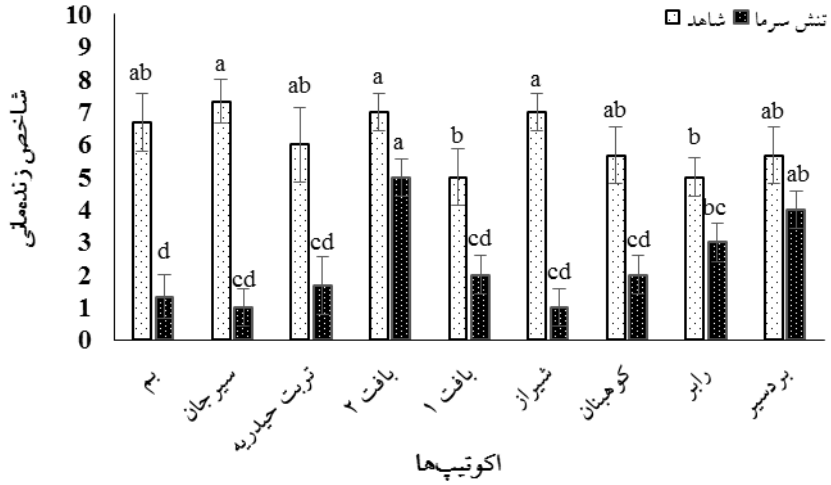
تجزیه واریانس برای صفات، شاخص زنده‌مانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی که در یک زمان اندازه‌گیری شده‌اند به‌صورت فاکتوریل دو عاملی بود. در پایان، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSMEANS در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج

شاخص زنده‌مانی گیاه: براساس نتایج تجزیه واریانس اثر برهمکنش تنش و اکوتیپ بر شاخص زنده‌مانی معنی‌دار شد. مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ در تیمار نشان‌داد که در همه اکوتیپ‌ها زنده‌مانی پس از تیمار سرما کاهش یافت (شکل ۱). اکوتیپ‌های بافت۲ و بردسیر با دریافت بالاترین نمره‌ها بیشترین زنده‌مانی و اکوتیپ‌های بم، شیراز و سیرجان کمترین شاخص زنده‌مانی را پس از تنش سرما نشان دادند.

نشت یونی: براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) اثر برهمکنش "دما × زمان" و "دما × اکوتیپ" بر نشت یونی معنی‌دار بود. در تمام اکوتیپ‌ها نشت یونی در تیمار سرما (-۳°C) به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد (۲۵°C) بود (جدول ۵) با این حال از این لحاظ تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها وجود داشت. در همه زمان‌ها پس از رفع تنش (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) نشت یونی در تیمار سرما بطور قابل توجهی بیش از شاهد بود با این حال در طی زمان به‌تدریج کاهش یافت درحالی‌که نشت یونی در دمای شاهد تغییر چندانی در طی زمان نداشت (شکل ۲). در بین اکوتیپ‌ها، اکوتیپ‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]



جدول ۳- خلاصه نتایج تجزیه واریانس محتوای نشاسته، قند، پرولین، کلروفیل a، b و کل و کارتونئیدهای برگ و نشت یونی خلر در دو تیمار دمایی

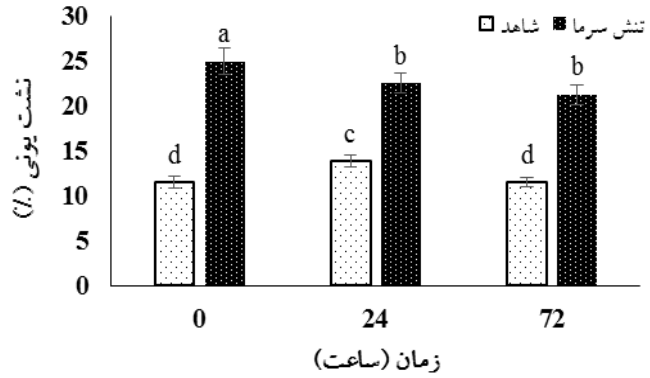
منبع تغییر	درجه آزادی	نشت یونی	نشاسته	قند محلول	پرولین	کارتنوئید	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل
اکوتیپ	۸	۹۰/۵**	۲۶۲/۵**	۱۶۴۷۴۴/۸**	۱۳۱/۶**	۰/۰۳۸**	۰/۱۷**	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۱۹*
دما	۱	۴۵۶۹/۸**	۱۰۶۶۷/۸**	۱۳۷۸۹۲۹**	۱۱۴۲/۷**	۰/۰۹**	۳/۲۳**	۰/۲۴**	۵/۳۹**
اکوتیپ×دما	۸	۸۴/۶**	۸۱/۷**	۳۴۸۲۷/۶**	۹۶/۰۳**	۰/۰۷**	۰/۰۴^{ns}	۰/۰۱^{ns}	۰/۱^{ns}
خطا a †	۱۸	۱۵/۰۸^{ns}	۱۶/۷^{ns}	۱۳۲۶۳/۰۵^{ns}	۱/۴^{ns}	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۵^{ns}	۰/۰۱^{ns}	۰/۱^{ns}
زمان	۲	۶۲/۶*	۲۷۴/۰۳**	۵۹۳۷۳۰**	۲۳۳/۸**	۰/۰۰۳^{ns}	۰/۱۳*	۰/۰۹**	۰/۳۴*
اکوتیپ×زمان	۱۶	۱۹/۰۴^{ns}	۳۲/۹*	۲۴۰۴۷/۹**	۱۷/۵**	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۰۸^{ns}	۰/۰۲^{ns}	۰/۰۴^{ns}
دما×زمان	۲	۸۳/۸۹*	۳۲۳/۴**	۷۳۲۸۱۵**	۱۳۸/۵**	۰/۰۳^{ns}	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۷^{ns}
دما×اکوتیپ×زمان	۱۶	۲۴/۰۴^{ns}	۴۶/۷^{ns}	۲۱۵۱۰/۸**	۱۵/۷**	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۲^{ns}	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۵^{ns}
خطا	۹۰	۱۹/۵	۲۸/۶	۸۸۵۴/۷	۵/۳۳	۰/۰۱۲	۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۰۸
ضریب تغییرات	-	۲۵/۱	۱۸/۴	۱۰/۶	۲۳/۶	۱۶/۳۲	۱۸/۳	۲۸/۶	۱۹/۲

**، * به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد و ^{ns} غیرمعنی‌دار. اعداد درون جدول میانگین مربعات هستند. †: تکرار×اکوتیپ×دما

کوهبنان و رابر بیشترین و اکوتیپ‌های تربت، بم و سیرجان کمترین افزایش نشت یونی در تیمار سرما نسبت به شاهد را داشتند (به‌ترتیب ۳۷/۳، ۳۸/۶ و ۳۹/۸ درصد افزایش نسبت به شاهد). نشت یونی همچنین تحت تأثیر برهمکنش زمان و تیمار نیز قرار گرفت (جدول ۳).

محتوای نشاسته: براساس نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل تنش × اکوتیپ × زمان بر محتوای نشاسته معنی‌دار بود (جدول ۳). در تمام اکوتیپ‌ها و در هر سه زمان نمونه‌برداری محتوای نشاسته در اثر سرما به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۴). در تیمار شاهد تغییرات محتوای نشاسته برگ بین ۲۴ تا ۷۲ ساعت پس از رفع تنش روند مشخصی نشان ندارد و در بیشتر موارد تفاوت‌ها معنی‌دار نبود. در مقابل در تیمار سرما محتوای نشاسته ۷۲ ساعت پس از رفع تنش به‌طور معنی‌داری بیش از ۲۴ ساعت پس از تنش بود (به‌جز در اکوتیپ‌های بم و کوهبنان).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]



شکل ۲- تغییرات نشت یونی (درصد) خلر در سه زمان پس از رفع تنش در دو تیمار دمایی. میانگین‌های با یک حرف مشترک تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (LSMEANS, α=0.05).

جدول ۴- تغییر محتوای نشاسته برگ (میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک)، قندهای محلول (میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) پرولین برگ (میکرومول بر گرم وزن تر برگ) نه اکوتیپ خلر در دو تیمار دمایی و سه زمان پس از پایان سرما

		نشاسته			قندهای محلول			پرولین		
		زمان (ساعت)			زمان (ساعت)			زمان (ساعت)		
دما	اکوتیپ	۰	۲۴	۷۲	۰	۲۴	۷۲	۰	۲۴	۷۲
۲۵°C	بم	۳۵/۷^{bc}	۳۵/۳^{abc}	۳۱/۸$^{b-f}$	۶۱۷/۹^{g}	۶۳۶/۵^{g}	۶۵۴/۵^{c}	۳/۴۴^{h}	۳/۶۱^{ef}	۳/۵۴^{hi}
	سیرجان	۴۰/۱^{ab}	۳۶/۰۴^{abc}	۳۳/۶$^{b-f}$	۷۵۴/۶^{efg}	۷۹۱/۵$^{c-g}$	۸۴۸/۲^{abc}	۲/۸۴^{h}	۳/۱۹^{e}	۳/۲۷^{i}
	تربت‌حیدریه	۴۰/۸^{ab}	۳۵/۹^{abc}	۴۱/۷^{ab}	۷۲۳/۴^{efg}	۷۸۵/۱$^{c-g}$	۷۴۴/۲^{bc}	۶/۰۹^{gh}	۴/۷^{ef}	۳/۹۹^{ghi}
	بافت ۲	۴۱/۵^{ab}	۴۳/۲^{a}	۳۶/۹$^{a-d}$	۹۴۱/۵^{cd}	۸۹۴/۹^{cd}	۹۸۰/۳^{a}	۵/۶۴^{gh}	۵/۷۶^{ef}	۳/۲^{i}
	بافت ۱	۳۰/۱^{cd}	۲۷/۸^{cde}	۳۹/۲^{abc}	۸۰۵/۹$^{c-g}$	۸۸۰/۵^{cd}	۸۴۰/۳^{abc}	۷/۳۱^{gh}	۷/۹۷^{e}	۷/۰۴^{ef}
	شیراز	۳۷/۲^{bc}	۳۵/۴^{abc}	۳۴/۹$^{a-f}$	۷۶۰$^{d-g}$	۷۸۵/۱$^{c-g}$	۸۴۶/۱^{abc}	۷/۲۱^{gh}	۷/۶۴^{ef}	۶/۶۷^{ef}
	کوهبنان	۳۰/۴^{cd}	۳۱/۲^{bcd}	۳۱/۰۹$^{c-f}$	۶۸۳/۲^{fg}	۶۹۹^{efg}	۷۲۴/۱^{bc}	۵/۳۵^{gh}	۵/۰۳^{ef}	۶/۲۱^{efg}
	رابر	۴۵/۲^{a}	۴۵/۳^{a}	۴۳/۹^{a}	۸۷۲/۶$^{c-f}$	۶۶۱/۶^{fg}	۷۳۳/۴^{bc}	۱۲/۱۴^{def}	۱۳/۷۷^{bc}	۶/۹۹^{ef}
	بردسیر	۳۴/۴^{bc}	۴۱/۹^{ab}	۳۸/۲$^{a-d}$	۸۵۵/۴$^{c-f}$	۹۲۱/۴^{abc}	۸۶۹/۸^{ab}	۱۴/۵۸^{cde}	۱۳/۳^{bc}	۱۱/۹۹^{ab}
-۳°C	بم	۲۳/۹^{de}	۱۹/۵^{ef}	۲۶/۲^{ef}	۹۰۴/۹^{cde}	۸۲۵/۳$^{c-f}$	۶۹۸/۲^{bc}	۹/۹۴^{efg}	۱۴/۵^{bc}	۹/۴۶^{cd}
	سیرجان	۱۲/۷^{f}	۹/۶^{f}	۲۴/۸^{f}	۱۲۱۷/۱^{b}	۱۰۷۸/۶^{a}	۸۱۸/۸^{abc}	۹/۶۷^{fg}	۷/۷^{ef}	۵/۶۷^{fgh}
	تربت‌حیدریه	۱۹/۸^{ef}	۲۴/۹^{cde}	۲۵/۶^{ef}	۹۷۵/۳^{c}	۷۲۹/۱$^{d-g}$	۶۵۱/۶^{c}	۱۲/۶۴^{def}	۸/۱۶^{de}	۸/۴۵^{de}
	بافت ۲	۱۶/۷^{ef}	۲۳/۲^{de}	۳۰/۵$^{c-f}$	۱۶۷۴/۳^{a}	۹۱۷/۱^{abc}	۸۵۶/۸^{ab}	۱۸/۹^{abc}	۲۳/۵^{a}	۱۰/۷^{bc}
	بافت ۱	۱۶/۷^{ef}	۱۹/۹^{def}	۲۶/۱^{ef}	۱۱۷۲/۶^{b}	۹۴۱/۵^{abc}	۸۷۶/۲^{ab}	۱۴/۲۹^{def}	۱۲/۴۱^{cd}	۵/۹۶^{fg}
	شیراز	۱۵/۰۶^{f}	۲۰/۹^{de}	۳۵/۳$^{a-e}$	۱۲۲۰/۷^{b}	۸۵۱/۸^{cde}	۷۸۸/۷^{abc}	۱۶^{bcd}	۱۷/۰۶^{b}	۱۰/۴^{bcd}
	کوهبنان	۱۳/۶^{f}	۹/۷^{f}	۹/۷۱^{g}	۱۳۲۸/۴^{b}	۱۰۶۷/۱^{ab}	۷۹۶/۶^{abc}	۲۲/۹^{a}	۱۴/۵^{bc}	۵/۳۸$^{f-i}$
	رابر	۱۸/۳^{ef}	۱۹/۹^{def}	۲۸/۱^{def}	۱۱۸۳/۴^{b}	۸۸۸/۴^{cd}	۷۵۵/۷^{bc}	۱۴/۸۱^{cd}	۱۴/۰۲^{bc}	۱۳/۰۷^{a}
	بردسیر	۱۹/۱^{ef}	۲۱/۹^{de}	۲۸/۶^{def}	۱۲۹۴/۶^{b}	۹۰۶^{bc}	۸۶۴/۷^{ab}	۲۰/۰۳^{ab}	۱۲/۳^{cd}	۱۰/۹^{abc}

در هر ستون میانگین‌های با یک حرف مشترک تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (Duncan, α=0.05).

محتوای قندهای محلول: براساس نتایج جدول تجزیه واریانس برهمکنش سه‌گانه دما × اکوتیپ × زمان بر محتوای قندهای محلول اکوتیپ‌های خلر معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در دمای شاهد به‌جز در اکوتیپ

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

رابر در هیچ یک از اکوتیپ‌ها تفاوت بین زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت معنی‌دار نبود (جدول ۴). به بیان دیگر، محتوای قندهای محلول در طی سه روز پس از رفع تنش سرما در تیمار شاهد تغییری نداشت اما در تیمار سرما در تمام اکوتیپ‌ها بین زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌دار بود. به بیان دیگر در تمام اکوتیپ‌ها روند کاهشی محتوای قندهای محلول در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش دیده می‌شود. در مقایسه بین اکوتیپ‌ها، بافت ۲ بیشترین و بم کمترین میزان قند محلول را ۲۴ ساعت پس از تنش نشان دادند. بیشترین درصد افزایش قند محلول در تنش سرما در ۲۴ ساعت اول مربوط به اکوتیپ کوهبنان با ۴۸ درصد افزایش نسبت به شاهد و کمترین درصد متعلق به اکوتیپ تربت حیدریه با ۲۵ درصد افزایش نسبت به شاهد بود.

محتوای پرولین: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر برهمکنش سه‌گانه دما × اکوتیپ × زمان بر محتوای پرولین معنی‌دار بود (جدول ۳). در همه اکوتیپ‌ها محتوای پرولین در تیمار سرما (۳°C-) بیشتر از شاهد بود اگرچه بین اکوتیپ‌ها از نظر میزان افزایش تفاوت قابل‌توجهی مشاهده شد (جدول ۴). ۲۴ ساعت پس از پایان تنش سرما، بیشترین افزایش در محتوای پرولین مربوط به اکوتیپ‌های کوهبنان سیرجان و بافت ۲ به‌ترتیب با ۳۳۰، ۲۴۰ و ۲۳۶ درصد در مقایسه با شاهد بود (به‌ترتیب ۲۲/۹۹ و ۱۸/۹۷ و ۹/۶۷ در مقابل ۵/۳۵ و ۵/۶۴ و ۲/۸۴ میکرومول بر گرم وزن تر). کمترین افزایش هم به اکوتیپ‌های رابر و بم با ۳۷ و ۲۲ تعلق داشت (جدول ۴). همچنین ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از پایان تنش، محتوای پرولین اکوتیپ بافت۲ از دیگر اکوتیپ‌ها بیشتر بود. در تیمار شاهد (۲۵°C) به‌جز در اکوتیپ بافت ۲ و رابر در هیچ یک از اکوتیپ‌ها تفاوت قابل‌توجهی از نظر محتوای پرولین بین زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از رفع تنش وجود نداشت. اما در تیمار سرما (۳°C-) کمترین محتوای پرولین در همه اکوتیپ‌ها به ۷۲ ساعت پس از رفع تنش تعلق داشت. در مورد ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش در ۶ اکوتیپ محتوای پرولین ۲۴ ساعت پس از تنش و در مورد بقیه ۴۸ ساعت پس از تنش بیشترین مقدار بود.

محتوای کاروتنوئیدهای برگ: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش دما × اکوتیپ اثر معنی‌دار بر محتوای کاروتنوئیدهای برگ داشت (جدول ۳). تنش سرما فقط در اکوتیپ بردسیر سبب افزایش معنی‌دار محتوای کاروتنوئید شد درحالی‌که در اکوتیپ‌های بم، تربت و کوهبنان تغییر قابل‌توجهی ایجاد نکرد و در اکوتیپ‌های سیرجان، بافت۱، بافت۲، شیراز و رابر سبب کاهش معنی‌دار محتوای کاروتنوئیدهای برگ شد (جدول ۵). به‌طورکلی تفاوت بین اکوتیپ‌ها از نظر محتوای کاروتنوئیدهای برگ در شرایط سرما چندان زیاد نبود ولی در شرایط شاهد اکوتیپ بم حدود ۴۲ درصد محتوای کاروتنوئید بیشتری از بردسیر داشت (۰/۸۴ در برابر ۰/۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) (جدول ۵).

محتوای کلروفیل a، b و کل: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی اکوتیپ، زمان و دما بر محتوای کلروفیل a، b و کل معنی‌دار بود (جدول ۳). کاهش دما به ۳°C- سبب کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل a، b و کل شد. همچنین پس از رفع تنش سرما محتوای کلروفیل a، b و کل برگ روند کاهشی داشت و ۷۲ ساعت پس از رفع سرما به کمترین میزان رسید (جدول ۶). از نظر محتوای کلرفیل b تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها دیده نشد. اما از نظر محتوای کلروفیل a و کل اکوتیپ‌های بم و بردسیر به‌ترتیب بیشترین و کمترین محتوای کلروفیل a و کل را به خود اختصاص دادند. با این‌حال تفاوت بین دیگر اکوتیپ‌ها از این نظر قابل توجه نبود (جدول ۶).

فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز: فعالیت هر سه آنزیم تحت تأثیر برهمکنش اکوتیپ × دما قرار گرفت (جدول ۷). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شش اکوتیپ از نه اکوتیپ مورد بررسی (بم، سیرجان، تربت، بافت۲، کوهبنان و بردسیر) در اثر سرما به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین افزایش در فعالیت این آنزیم در اثر سرما در اکوتیپ‌های کوهبنان و سیرجان و رابر مشاهده شد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

جدول ۵- تغییرات فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX) (واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین محلول برگ)، نشت یونی (درصد) و محتوای کاروتنوئیدها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) نه اکوتیپ خلر در دو تیمار دمایی

	SOD		CAT		POX		نشت یونی		کاروتنوئیدها	
اکوتیپ	سرما	شاهد	سرما	شاهد	سرما	شاهد	سرما	شاهد	سرما	شاهد
بم	۴۴^{bcd}	۲۸/۶^{c}	۰/۰۰۹^{bcd}	۰/۰۰۵^{cd}	۰/۰۴۲^{ab}	۰/۰۲۶^{abc}	۱۸/۶^{e}	۱۱/۴۳^{ab}	۰/۶۵^{a}	۰/۸۴^{a}
سیرجان	۴۴^{bcd}	۲۶^{c}	۰/۰۰۸^{cd}	۰/۰۰۸^{b}	۰/۰۳۷^{b}	۰/۰۲۱^{cd}	۱۸/۱^{e}	۱۰/۸۹^{b}	۰/۶۹^{a}	۰/۷۲^{b}
تربت حیدریه	۴۶^{abc}	۳۲^{abc}	۰/۰۱^{bc}	۰/۰۰۴^{cd}	۰/۰۲۷^{c}	۰/۰۲۴^{bc}	۲۴/۲^{bc}	۱۵/۱۸^{a}	۰/۵۱^{b}	۰/۶۸^{b}
بافت ۲	۵۸^{a}	۴۲/۶^{a}	۰/۰۰۷^{de}	۰/۰۰۴^{cd}	۰/۰۳۷^{b}	۰/۰۲۶^{abc}	۲۱/۰^{cde}	۱۱/۳۴^{ab}	۰/۷^{a}	۰/۶۷^{b}
بافت ۱	۳۲/۶^{de}	۴۱/۳^{ab}	۰/۰۰۵^{e}	۰/۰۰۵^{cd}	۰/۰۲۹^{c}	۰/۰۳^{a}	۲۳/۶^{cd}	۱۱/۴۹^{ab}	۰/۷۱^{a}	۰/۶۸^{b}
شیراز	۳۴/۶^{cde}	۳۰/۶^{abc}	۰/۰۰۸^{cd}	۰/۰۰۶^{bc}	۰/۰۲۷^{c}	۰/۰۲۳^{bc}	۲۰/۱^{de}	۱۴/۳۲^{ab}	۰/۷۱^{a}	۰/۶۹^{b}
کوهبنان	۴۹/۳^{ab}	۲۵/۳^{c}	۰/۰۱۱^{b}	۰/۰۰۳^{d}	۰/۰۲۸^{c}	۰/۰۱۷^{d}	۳۰/۳^{a}	۱۱/۴۸^{ab}	۰/۴۹^{b}	۰/۷۴^{ab}
رابر	۳۰/۶^{e}	۲۴/۶^{d}	۰/۰۰۸^{cd}	۰/۰۰۳^{d}	۰/۰۴۵^{a}	۰/۰۲۸^{ab}	۲۸/۱^{ab}	۱۲/۱^{ab}	۰/۶۷^{a}	۰/۷۱^{b}
بردسیر	۴۶/۶^{abc}	۲۹/۳^{bc}	۰/۰۱۹^{a}	۰/۰۱۲^{a}	۰/۰۴۳^{a}	۰/۰۱۷^{d}	۲۱/۸^{cde}	۱۲/۲۹^{ab}	۰/۷۵^{a}	۰/۵۹^{b}

در هر ستون میانگین‌های دارای یک حرف مشترک از لحاظ آماری تفاوتی با یکدیگر ندارند (LSMEANS, α =0.05). شاهد (۲۵°C) و سرما (۳-°C).

جدول ۶- تغییرات کلروفیل a، b و کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) ۹ اکوتیپ خلر و دو تیمار دمایی و سه زمان

		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل
اکوتیپ	بم	۱/۲۳^{a}	-†	۱/۶۹^{a}
	سیرجان	۱/۰۶^{bcd}	-	۱/۵۱^{abc}
	تربت حیدریه	۰/۹۷^{cd}	-	۱/۴۵^{bc}
	بافت ۲	۱/۱۸^{ab}	-	۱/۶۵^{a}
	بافت ۱	۱/۱۵^{ab}	-	۱/۶۶^{a}
	شیراز	۱/۰۷^{bc}	-	۱/۵۳^{abc}
	کوهبنان	۱/۰۴۸^{bcd}	-	۱/۴۹^{abc}
	رابر	۱/۱۱^{abc}	-	۱/۵۸^{ab}
	بردسیر	۰/۹۲^{d}	-	۱/۳۷^{c}
زمان	۰	۱/۱۲^{a}	۰/۵۲^{a}	۱/۶۳^{a}
	۲۴	۱/۱^{ab}	۰/۴۵^{b}	۱/۵۳^{ab}
	۷۲	۱/۰۳^{b}	۰/۴۴^{b}	۱/۴۸^{b}
دما	شاهد (۲۵ °C)	۱/۲۲^{a}	۰/۵۱^{a}	۱/۷۳^{a}
	تنش (۳- °C)	۰/۹۴^{b}	۰/۴۳^{b}	۱/۳۶^{b}

در هر ستون و در هر عامل (اکوتیپ، زمان و دما) میانگین‌های دارای یک حرف مشترک از لحاظ آماری تفاوتی با یکدیگر ندارند (LSMEANS, α =0.05). †: برای کلروفیل b اثر اصلی اکوتیپ معنی‌دار نبود.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

جدول ۷- خلاصه نتایج تجزیه واریانس شاخص زنده‌مانی و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) خلر در دو تیمار دمایی

منبع تغییر	درجه آزادی	شاخص زنده‌مانی	SOD	POX	CAT
دما	۱	۲۰۴/۲**	۱۸۴۹/۱**	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۰۲**
اکوتیپ	۸	۳/۰۸^{ns}	۲۱۹/۹**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۰۰۵**
دما × اکوتیپ	۸	۴/۶۷*	۱۴۲/۶*	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۰۰۱**
خطا	۳۶	۱/۵۷	۵۶/۲	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۰۲
ضریب تغییرات	-	۲۹/۳	۲۰/۲	۱۱/۵	۱۸/۳

**، * به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و ns غیرمعنی‌دار. اعداد درون جدول میانگین مربعات هستند.

اگر چه بیشترین فعالیت این آنزیم چه در شرایط شاهد و چه در شرایط سرما به اکوتیپ بافت ۲ تعلق داشت (جدول ۵). فعالیت آنزیم پراکسیداز در شش اکوتیپ از نه اکوتیپ مورد مطالعه (بم، سیرجان، بافت۲، کوهبنان، رابر و بردسیر) تحت تنش سرما (۳°C-) بطور معنی‌داری بیش از شاهد بود (جدول ۵). اکوتیپ‌های بردسیر، رابر و بم بیشترین فعالیت این آنزیم را در تیمار سرما نسبت به سایر اکوتیپ‌ها نشان دادند. همچنین بردسیر بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز را در تیمار سرما نشان داد.

فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر سرما (۳°C-) در همه اکوتیپ‌ها بجز سیرجان و بافت۱ بطور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین افزایش در اکوتیپ کوهبنان مشاهده شد (۷۰ درصد) در مقابل اکوتیپ بردسیر بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز چه در شرایط شاهد و چه در تیمار سرما را بخود اختصاص داد که این نتیجه مشابه فعالیت آنزیم پراکسیداز بود. (جدول ۵).

بحث

براساس نتایج شاخص زنده‌مانی بافت۲ و بردسیر به‌عنوان اکوتیپ‌های برتر، رابر به‌عنوان اکوتیپ متوسط و اکوتیپ‌های کوهبنان، بافت۱، تربت، بم، سیرجان و شیراز به‌عنوان اکوتیپ‌های ضعیف از نظر شاخص‌های عمومی تحمل به تنش سرما شناسایی شدند. در این رتبه‌بندی تعداد بوته زنده‌مانده، رنگ‌پریدگی و آویختگی برگ، خمیدگی ساقه و نمود عمومی اندام هوایی به‌عنوان شاخص آسیب از تنش در نظر گرفته شدند. ممکن است خوپذیری به سرما (با استفاده با محاسبه درصد زنده‌مانی) پس از سرما در یونجه نشان داد که تحمل به سرما با تغییرات برخی صفات فیزیولوژیکی مانند محتوای پرولین، نشاسته و قندهای محلول (Hekneby *et al.*, 2006) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ارتباط داشته باشد که در ادامه سعی می‌کنیم این ارتباط را بررسی کنیم.

یکی از مهمترین شاخص‌های فیزیولوژیک مرتبط با تحمل سرما میزان پایداری غشا در برابر کاهش دما است و معمولاً یکی از آسیب‌های اولیه تنش سرما، تغییر سیالیت غشا و افزایش نفوذپذیری آن است (Kazemi-Shahandashti *et al.*, 2014). بنابراین تحمل سرما، معمولاً با کاهش گسیختگی ناشی از یخزدگی همراه است و ممکن است از این نظر تفاوت ژنوتیپی در گونه‌های گیاهی وجود داشته باشد (Thakur *et al.*, 2020). در این پژوهش ما در همه اکوتیپ‌ها میزان خسارت غشایی براساس صفت نشت یونی در دمای پایین (۳°C-) نسبت به شاهد (۲۵°C) بطور معنی‌داری بیشتر بود. با این حال تنوع اکوتیپی قابل‌توجهی از نظر میزان نشت یونی در اثر تنش سرما مشاهده شد به‌گونه‌ای که اکوتیپ کوهبنان بیشترین (۶۲ درصد) و شیراز کمترین (۲۸ درصد) افزایش در نشت یونی نسبت به تیمار شاهد را نشان دادند. با اینحال از نظر درصد زنده‌مانی پس از تنش سرما (جدول ۳) تفاوت معنی‌داری بین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

این دو اکوتیپ وجود نداشت. به بیان دیگر در شرایط این آزمایش میزان نشت یونی ارتباط نزدیکی با تحمل به سرما نداشت. برخی پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که آسیب غشای پلاسمایی سلول، شاخص مهم برآورد تحمل به سرما در گیاهان محسوب می‌شود (Liu *et al*., 2013; Nayyar and Chander, 2004). امینی و همکاران (۱۳۹۷) نشان دادند که میزان نشت الکترولیتی در دو ژنوتیپ نخود تحت تیمار سرما در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش معنی‌داری یافت. همچنین در ده ژنوتیپ از یازده ژنوتیپ نخود سیاه (desi) تنش کوتاه مدت سرما (۱۰°C-) سبب افزایش معنی‌دار نشت یونی شد (نظری و همکاران، ۱۳۸۹). بنابراین تنوع ژنوتیپی از نظر شدت آسیب سرما به ساختارهای غشا وجود دارد. نتایج آزمایش ما نشان داد که با این حال به نظر می‌رسد در شرایط آزمایش ما نشت یونی به تنهایی ارتباط مستقیمی با تحمل به سرما نداشته است و احتمالاً دیگر صفات فیزیولوژیک در این امر دخیل هستند. بررسی نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً یکی از صفات مهم در تحمل به سرمای خلر محتوای قندهای محلول است. محتوای قندهای محلول اندام هوایی بلافاصله پس از پایان تیمار سرما در همه اکوتیپ‌ها بطور قابل توجهی افزایش یافت. همچنین تفاوت قابل توجهی بین اکوتیپ‌ها از این نظر وجود داشت به گونه‌ای بافت ۲ بیشترین و بم کمترین محتوای قند محلول را نشان دادند. با اینحال با گذشت زمان تا ۷۲ ساعت پس از پایان تنش تفاوت بین شاهد و سرما کاهش یافت و در بیشتر اکوتیپ‌ها این تفاوت معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد که افزایش در غلظت قندهای محلول در طی دمای پایین، نوعی مکانیسم برای افزایش غلظت شیره سلولی و تحمل در برابر یخزدگی بوده است. کاهش تدریجی محتوای قندهای محلول در طی ۷۲ ساعت احتمالاً به سبب مصرف آن در متابولیسم برای بازیابی رشد پس از رفع تنش سرما بوده است. با بررسی داده‌های رتبه‌دهی زنده‌مانی، می‌توان دریافت که اکوتیپ۲ بافت بالاترین رتبه زنده‌مانی پس از سرما را نیزداشته است. بنابراین تحمل سرما در خلر احتمالاً با تجمع قندهای محلول ارتباط نزدیکی دارد. گزارش شده است که از سازوکارهای مهم در ارتباط با تحمل سرما، تجمع قندهای محلول است که سبب کاهش دمای انجماد شیره سلولی گشته و از آسیب سرما به غشای پلاسمایی و پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند (Liu *et al.*, 2013). تجمع سطوح بالاتری از کربوهیدرات‌های محلول از جمله ساکارز، گلوکز، فروکتوز، استاکیوز، رافینوز و مانیتول در طی زمستان در گندم (Kerepesi *et al.*, 2004) و نخود (Nayyar *et al*, 2005) (Bhandari *et al.*, 2017) مشاهده شده است. گزارش شده محتوای قندهای غیراحیایی ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما نخود تحت تنش سرمایی افزایش یافت. در مقابل در ژنوتیپ حساس به سرما متابولیسم کربوهیدرات‌ها به ویژه قندهای احیا و نشاسته مختل شد. همچنین گل‌هایی که در این آزمایش در اثر تنش سرما از بین نرفتند محتوای ساکارز، گلوکز و فروکتوز بالاتری نسبت به گل‌های از بین رفته داشتند (Kiran *et al*., 2021).

تجمع قندهای محلول به‌طور معمول در ارتباط با شکسته شدن (هیدرولیز) نشاسته است و ممکن است با تغییرات محتوای نشاسته در ارتباط باشد. نتایج ما نشان داد برخلاف قندهای محلول، محتوای نشاسته اندام هوایی اکوتیپ‌های خلر مورد بررسی در این آزمایش در اثر سرما کاهش قابل توجهی داشت اما با گذشت زمان تا ۷۲ ساعت پس از از پایان تنش میزان آن بجز در اکوتیپ کوهبنان افزایش یافت نتایج پژوهش Oliver و همکاران (۲۰۰۵) بر روی برنج نیز نشان داد که تنش سرما موجب کاهش میزان نشاسته و افزایش غلظت قندهای محلول نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین اکوتیپ‌های رابر و بافت ۲ (به‌ترتیب دارای تحمل متوسط و خوب به سرما از نظر رتبه زنده‌مانی)، بیشترین مقدار نشاسته را در میانگین سه زمان پس از تنش سرما در تیمار شاهد بخود اختصاص دادند (۴۴/۸۲ و ۴۰/۵۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر). بدین ترتیب به نظر می‌رسد توان تولید کربوهیدرات در گیاه در شرایط طبیعی تا حدی با تحمل سرمای گیاه در ارتباط است. کاهش محتوای نشاسته در شرایط تنش سرما می‌تواند به سبب هیدرولیز آن باشد که منجر به تجمع قندهای آزاد مانند ساکارز، کاهش پتانسیل اسمزی سلول و القاء اثرات محافظتی در دمای

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

پایین می‌شود (Pearce and Fuller, 2001). نشان داده شده است که در دمای پایین متابولیسم کربن مجدد برنامه‌ریزی می‌شود که منجر به تغییر در تخصیص کربن تازه تثبیت‌شده به ساکارز به جای نشاسته می‌شود (Hekneby *et al*., 2006).

برخلاف قندهای محلول و نشاسته، رنگیزه‌های اصلی برگ خلر در این آزمایش یعنی کلروفیل و کاروتنوئیدها واکنش متفاوتی به تنش سرما نشان دادند. محتوای کلروفیل (a، b و کل) برگ در اثر سرما بطور معنی‌داری کمتر از شاهد بود. اگر چه که تنوع اکوتیپی از نظر محتوای کلروفیل مشاهده شد ولی ارتباط مشخصی بین میزان کلروفیل و تحمل به سرما وجود نداشت برای نمونه محتوای کلروفیل اکوتیپ بردسیر که از نظر شاخص زنده‌مانی پس از سرما جز اکوتیپ‌های برتر بود بطور معنی‌داری کمتر از اکوتیپ بم بود که جز اکوتیپ‌های حساس به سرما رتبه‌بندی شده بود. تغییرات محتوای کلروفیل در اثر سرما می‌تواند بسته به شدت و دوام تنش و همچنین گونه گیاهی متفاوت باشد. برای نمونه در پژوهشی بر روی بوته‌های پنج هفته‌ای خلر که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، محتوای کلروفیل a وb با قرارگرفتن به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس کاهش داشته و سپس تا ۳۶ ساعت در شرایط تنش افزایش یافت و به سطح اولیه نزدیک شد (Chattopadhyay *et al*., 2011). همچنین نتایج پژوهش‌های دیگری بر روی گیاه آفتابگردان (Allinne *et al*., 2009) و جو دوسر (Liu *et al*., 2013) نشان داده که در تنش کوتاه مدت سرما، کلروفیل تغییر معنی‌داری نداشته اما در تنش طولانی مدت و قرار گرفتن گیاه به‌مدت ۱۰ و ۷ روز در شرایط تنش سرما تفاوت معنی‌داری در محتوای کلروفیل گیاهان دیده شد. تخریب کلروفیل در اثر سرما ممکن است به‌دلیل اکسیداسیون نوری یا مهار سنتز آن صورت گیرد (Thakur *et al*., 2020). گزارش شده است که در نخود، تنش سرما در مراحل مختلف رشد سبب کاهش محتوای کلروفیل شده است (Thakur *et al*., 2020; Turan and Ekmekci, 2014; Kaur *et al*., 2008).

واکنش محتوای کاروتنوئیدها به دمای پایین در اکوتیپ‌ها بسیار متفاوت بود. در اکوتیپ‌های سیرجان، بافت۱، بافت۲، شیراز و رابر تفاوت معنی‌داری در مقدار کاروتنوئیدها بین شاهد و تیمار سرما دیده نشد در مقابل در اکوتیپ بردسیر سرما سبب افزایش معنی‌دار محتوای کاروتنوئیدهای برگ شد. در اکوتیپ‌های بم، تربت و کوهبنان، که نمره زنده‌مانی پایینی گرفته بودند، محتوای کاروتنوئیدها بطور معنی‌داری در تیمار سرما نسبت به تیمار شاهد کمتر بود. به‌نظر می‌رسد یکی از دلایل احتمالی حساسیت این اکوتیپ‌ها به سرما تخریب کاروتنوئیدها بوده است. گزارش شده است که در تیمار سرما محتوای کاروتنوئیدهای برگ گیاه نخود همانند فعالیت آنزیم‌های مهارکننده گونه‌های فعال اکسیژن، به‌منظور تخفیف اثرات تنش و به‌عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه افزایش یافت (Kaur *et al*., 2009). به همین ترتیب، در گیاهچه‌های ذرت تحت تیمار سرما نیز افزایش بیان ژن‌های درگیر در ساخت کاروتنوئیدها گزارش شده است (Mao *et al*., 2017). نتیجه پژوهشی دیگر نشان داد که میزان کاروتنوئیدهای گیاهچه‌های گندم تحت تیمار سرما (دمای ۱۰°C–) کاهش یافت (Berova *et al*., 2002). در مقابل در گیاهچه‌های خلر تحت تنش سرما در ابتدای تنش کاهش کاروتنوئیدها و سپس افزایش آن مشاهده شد (Chattopadhyay *et al*., 2011).

در کنار قندهای محلول، یکی از شناخته‌شده‌ترین مواد محلول سازگار برای کاهش اثرات تنش، پرولین است. پرولین به‌عنوان اسمولیت، روبش‌گر ROS و چپرون مولکولی که ساختار پروتئین‌ها را تثبیت می‌کند، در نظر گرفته می‌شود و از سلول‌ها در برابر آسیب ناشی از تنش محافظت می‌کند (Krasensky and Jonak, 2012). افزایش سطوح مختلف پرولین تحت تیمارهای متفاوت سرما در برخی گونه‌های لگوم مانند سویا (Yadegari *et al*., 2008)، نخود (Kumar *et al*., 2010) و یونجه گزارش شده است (Zhang *et al*., 2011) و افزایش آن همبستگی مثبتی با تحمل به سرما داشته است. در پژوهش ما در همه اکوتیپ‌ها بجز اکوتیپ رابر، سرما سبب افزایش معنی‌دار محتوای پرولین شد اگر چه محتوای آن ۷۲ ساعت پس از پایان تنش کمتر از زمان بلافاصله پس از پایان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

تنش بود. به‌نظر می‌رسد پس از رفع تنش احتمالاً سنتز پرولین کاهش و تخریب آن افزایش یافته است. همچنین در اکوتیپ‌های بافت۲، بردسیر و کوهبنان سطح پرولین نسبت به دیگر اکوتیپ بالاتر بود. بافت۲ و بردسیر بالاترین رتبه زنده‌مانی را پس از رفع تنش به‌خود اختصاص دادند و ممکن است تحمل سرما در این اکوتیپ‌ها با افزایش تجمع پرولین در ارتباط باشد.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یکی از سازوکارهای اصلی تحمل به تنش‌های محیطی به شمار می‌روند (Awasthi *et al*., 2015). تنش سرما با افزایش سطوح درون‌زاد گونه‌های مختلف اکسیژن فعال (ROS)، تغییر پتانسیل احیایی و اختلال در بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدان‌های مختلف سبب ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (Thakur *et al*., 2020). در این آزمایش ما فعالیت هر سه آنزیم اندازه‌گیری شده یعنی کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در اثر سرما افزایش یافت. بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در اثر سرما در اکوتیپ بردسیر مشاهده شد. این اکوتیپ همچنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را هم به خود اختصاص داد و همراه با اکوتیپ بافت۲ بیشترین رتبه زنده‌مانی پس از سرما را نیز نشان داد. در مورد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز هم بیشترین فعالیت در تیمار سرما در اکوتیپ بافت۲ دیده شد. در مجموع به‌نظر می‌رسد فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز ارتباط نزدیکی با تحمل به سرما در خلر داشته باشد.

افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در برگ‌های تحت تنش سرما نیز برای گیاهانی مانند سویا (Borowski and Michalek, 2014)، برنج (Guo *et al*., 2006) و گندم گزارش شده است (Li *et al*., 2014). نه تنها تحمل سرما، بلکه سازگاری به سرما در نخود نیز با فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و فعالیت پراکسیداز در برگ‌ها همراه بود (Turan and Ekmekci, 2011). Li و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که فعالیت بیشتر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوبات پراکسیداز در گیاهان مقاوم نسبت به گیاهان حساس منجر به افزایش سم‌زدایی ROS در کلروپلاست‌ها و میتوکندری شد و آسیب به غشاها، کلروفیل و عملکرد فتوسنتزی را کاهش داد.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که تحمل به سرما در خلر ارتباط چندانی با تغییر محتوای رنگیزه‌های اصلی فتوسنتزی یعنی کلروفیل و کاروتنوئید و همچنین نشت یونی نداشت. اکوتیپ بافت۲ که بالاترین زنده‌مانی پس از پایان تنش را داشت بالاترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، بالاترین محتوای قند محلول پس از پایان تنش و همچنین بیشترین محتوای پرولین در ۴۸ ساعت اول پس از پایان تنش را نشان داد. اکوتیپ‌های بردسیر و رابر که پس از بافت۲ بیشترین تحمل به سرما را نشان دادند، در مجموع از نظر صفات فوق کم و بیش پس از بافت۲ قرار گرفتند. به‌نظر می‌رسد توان فتوسنتزی در تولید نشاسته در شرایط نرمال و تبدیل آن به قند محلول در شرایط سرما، سنتز و تجمع پرولین و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (بسته به اکوتیپ) در تحمل سرما در خلر مهم‌ترین نقش را دارند.

منابع

امینی، س. و معالی امیری، ر. (۱۳۹۷) تأثیر سازگاری کوتاه‌مدت در تحمل به تنش سرما در نخودهای کابلی و دسی ایران. ژنتیک نوین ۱۳: ۴۵-۵۴.

زینالی یادگاری، ل.، حیدری، ر. و کاراپتیان، ژ. (۱۳۸۹) اثر پیش‌تیمار سرما بر میزان تنفس و مقادیر پرولین و رنگیزه‌های فتوسنتزی در دانه رست‌های گیاه سویا (*Glicine max* L. cv. L17). زیست‌شناسی ایران ۲۳: ۴۰۹-۴۱۷.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

نظری، م.، حبیب پورمهربان، ف.، معالی امیری، ر. و زینالی خانقاه، ح. (۱۳۸۹) ارزیابی مقدماتی پاسخ ژنوتیپ‌های ایرانی نخود دسی در واکنش به تنش سرما. مجله علوم گیاهان زراعی ایران (علوم کشاورزی ایران) ۴۱: ۶۹۹-۷۰۶.

Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. Method of Enzymology 105: 121-126.

Allinne, C., Maury, P., Sarrafi, A. and Grieu, P. (2009) Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions. Plant Science 177: 349-359.

Apostolova, P., Yordanova, R. and Popova, L. (2008) Response of antioxidative defence system to low temperature stress in two wheat cultivars. General and Applied Plant Physiology 3-4: 281-294.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1.

Awasthi, R., Bhandari, K. and Nayyar, H. (2015) Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. Frontiers in Environmental Science 3: 11.

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Berova, M., Zlatev, Z. and Stoeva, N. (2002) Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. Bulgarian Journal of Plant Physiology 28: 75-84.

Bhandari, K., Sharma, K. D., Hanumantha Rao, B., Siddique, K. H., Gaur, P., Agrawal, S. K., Nair, R. M. and Nayyar, H. (2017) Temperature sensitivity of food legumes: A physiological insight. Acta Physiologiae Plantarum 39: 1-22.

Borowski, E. and Michalek, S. (2014) The effect of chilling temperature on germination and early growth of domestic and Canadian soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus 13: 31-43.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Calderon, F., Vigil, M., Nielsen, D., Benjamin, J. and Poss, D. (2012) Water use and yields of no-till managed dryland grass pea and yellow pea under different planting configurations. Field Crops Research 125: 179-185.

Campbell, C., Mehra, R., Agrawal, S., Chen, Y., Moneim, A. A., Khawaja, H., Yadov, C., Tay, J. and Araya, W. (1994) Current status and future strategy in breeding grass pea (*Lathyrus sativus*). Expanding the production and use of cool season food legumes. Springer 617-630.

Campos, P. S., nia Quartin, V., chicho Ramalho, J. and Nunes, M. A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of Coffea sp. plants. Journal of Plant Physiology 160: 283-292.

Chattopadhyay, A., Subba, P., Pandey, A., Bhushan, D., Kumar, R., Datta, A., Chakraborty, S. and Chakraborty, N. (2011) Analysis of the grasspea proteome and identification of stress-responsive proteins upon exposure to high salinity, low temperature, and abscisic acid treatment. Phytochemistry 72: 1293-1307.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1997) Superoxide dismutases I. occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-14.

Grela, E., Studzinski, T. and Matras, J. (2001) Antinutritional factors in seeds of *Lathyrus sativus* cultivated in Poland. Lathyrus Lathyrism Newsletter 2: 101-104.

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

Heidarvand, L., Maali Amiri, R., Naghavi, M. R., Farayedi, Y., Sadeghzadeh, B. and Alizadeh, K. (2011) Physiological and morphological characteristics of chickpea accessions under low temperature stress. Russian Journal of Plant Physiology 58: 157-163.

Hekneby, M., Antolin, M. C. and Sanchez-Diaz, M. (2006) Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. Environmental and Experimental Botany 55: 305-314.

Irigoyen, J., Einerich, D. and Sanchez-Diaz, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiologia Plantarum 84: 55-60.

Kaur, G., Kumar, S., Nayyar, H. and Upadhyaya, H. (2008) Cold stress injury during the pod-filling phase in chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects on quantitative and qualitative components of seeds. Journal of Agronomy and Crop Science 194: 457-464.

Kaur, S., Gupta, A., Kaur, N., Sandhu, J. and Gupta, S. (2009) Antioxidative enzymes and sucrose synthase contribute to cold stress tolerance in chickpea. Journal of Agronomy and Crop Science 195: 393-397.

Kazemi-Shahandashti, S. S., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Khazaei, M., Talei, A. and 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: 1106-1116.

Kerepesi, I., Banyai-Stefanovits, E. and Galiba, G. (2004) Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. Journal of Plant Physiology 161: 131-133

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

Kiran, A., Sharma, P., Awasthi, R., Nayyar, H., Seth, R., Chandel, S. S., Siddique, K. H., Zinta, G. and Sharma, K. D. (2021) Disruption of carbohydrate and proline metabolism in anthers under low temperature causes pollen sterility in chickpea. Environmental and Experimental Botany 188: 104500.

Krasensky, J. and Jonak, C. (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. Journal of Experimental Botany 63: 1593-1608.

Kumar, S., Nayyar, H., Bhanwara, R. K. and Upadhyaya, H. D. (2010) Chilling stress effects on reproductive biology of chickpea. Journal of SAT Agricultural Research 8: 1-14.

Lazanyi, J. (2000) Grass pea and green manure effects in the Great Hungarian Plain. Lathyrus Lathyrism Newsletter 1: 28-30.

Li, X., Cai, J., Liu, F., Dai, T., Cao, W. and Jiang, D. (2014) Cold priming drives the subcellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. Plant Physiology and Biochemistry 82: 34-43.

Liu, W., Yu, K., He, T., Li, F., Zhang, D. and Liu, J. (2013) The low temperature induced physiological responses of *Avena nuda* L., a cold-tolerant plant species. The Scientific World Journal 2013: 658793.

Los, D. A., Mironov, K. S. and Allakhverdiev, S. I. (2013) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. Photosynthesis Res 116: 489-509.

Mao, J., Yu, Y., Yang, J., Li, G., Li, C., Qi, X., Wen, T. and Hu, J. (2017) Comparative transcriptome analysis of sweet corn seedlings under low-temperature stress. The Crop Journal 5: 396-406.

Muehlbauer, F. and Tullu, A. (1997) *Lathyrus sativus* L. New Crop Fact Sheet.

Nayyar, H. and Chander, S. (2004) Protective effects of polyamines against oxidative stress induced by water and cold stress in chickpea. Journal of Agronomy and Crop Science 190: 355-365.

Nayyar, H., Bains, T. and Kumar, S. (2005) Chilling stressed chickpea seedlings: Effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Environmental and Experimental Botany 54: 275-285.

Oliver, S. N., Van Dongen, J. T., Alfred, S. C., Mamun, E. A., Zhao, X., Saini, H. S., Fernandes, S. F., Blanchard, C. L., Sutton, B. G. and Geigenberger, P. (2005) Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4 is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. Plant Cell Environment 28: 1534-1551.

Pearce, R. S. and Fuller, M. P. (2001) Freezing of barley studied by infrared video thermography. Plant Physiology 125: 227-240.

Piwowarczyk, B., Tokarz, K. and Kaminska, I. (2016) Responses of grass pea seedlings to salinity stress in in vitro culture conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 124: 227-240.

Sheligl, H. Q. (1986) Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. Planta Journal 47-51.

Singh, M., Upadhyaya, H. D. and Bisht, I. S. (2013) Genetic and genomic resources of grain legume improvement. Elsevier 269-292.

Tang, W. and Newton, R. J. (2005) Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. Journal of Plant Physiology and Biochemistry 43: 730-769.

Thakur, A., Sharma, K. D., Siddique, K. H. and Nayyar, H. (2020) Cold priming the chickpea seeds imparts reproductive cold tolerance by reprogramming the turnover of carbohydrates, osmo-protectants and redox components in leaves. Scientia Horticulturae 261: 108929.

Turan, O. and Ekmekci, Y. (2011) Activities of photosystem II and antioxidant enzymes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars exposed to chilling temperatures. Acta Physiolgiae Plantarum 33: 67-78.

Turan, O. and Ekmekci, Y. (2014) Chilling tolerance of *Cicer arietinum* L. lines evaluated by photosystem II and antioxidant activities. Turkish Journal of Botany 38: 499-510.

Wang, F., Chen, X., Chen, Q., Qin, X. and Li, Z. (2000) Determination of neurotoxin 3-N-oxalyl 2, 3-diaminopropionic acid and non-protein amino acids in *Lathyrus sativus* by precolumn derivatization with 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene. Journal of Chromatography A 883: 113-118.

Yadegari, L. Z., Heidari, R. and Carapetian, J. (2008) Chilling pre-treatment causes some changes in respiration, membrane permeability and some other factors in soybean seedlings. Research Journal of Biological Science 3: 1054-1059

Zhang, L. L., Zhao, M. G., Tian, Q. Y. and Zhang, W. H. (2011) Comparative studies on tolerance of *Medicago truncatula* and *Medicago falcata* to freezing. Planta 234: 445-457.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]

Cold stress effect on some physiological characteristics and antioxidant systems in some grass pea (*Lathyrus sativus*) ecotypes

Azadeh Jafarinasab [1], Shahab Madahhosseini [2]*, Arman Azari [2]

[1] Department of Genetics and Plant Production, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
[2] Department of Genetics and Plant Production, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
(Received: 23/04/2022, Accepted: 23/07/2022)

Abstract

In order to study the effect of cold stress on some physiological characteristics of nine ecotypes of grass pea, a factorial split plot experiment based on completely randomized design with two factors and four replications was carried out in growth chamber. The first factor was cold treatment at two levels (25 and -3˚C) and the second factor was ecotype at nine levels collected from local areas named Bam, Sirjan, Torbat Heydariyeh, Baft 1 (Kiskan area), Baft 2 (Bidgerdoyeh area), Shiraz, Kuhbanan, Rabar and Bardsir. Traits measured in this experiment included content of soluble sugars, proline, starch, chlorophyll a, b and total chlorophyll, as well as the activity of antioxidant enzymes. The results showed that in all ecotypes with decreasing temperature from 25 to -3 degrees the content of soluble sugars, proline, ion leakage and the activity of catalase and peroxidase enzymes increased whereas the content of starch and chlorophyll a, b and total decreased. Significant variation was observed between ecotypes in terms of cold stress tolerance. In Baft 2 and Bardsir ecotypes, proline content was higher than other ecotypes. Also, the highest soluble sugar content was related to Baft 2 ecotype and the highest catalase activity was related to Bardsir ecotype. In addition, these ecotypes had higher survival score. Based on the results of survival score, Baft2 and Bardsir ecotypes showed the highest resistance to cold stress and Bam, Shiraz and Sirjan ecotypes showed the lowest resistance.

Keywords: Proline, Survival score, Soluble sugars, Starch

Corresponding author, Email: shahab.mhosseini@vru.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.53.19.7]