

## روند تغییرات صفات مورفوفیزیولوژیک ژنوتیپ‌های نخود (*Cicer arietinum* L.) در پاسخ به تنش شوری ناشی از کلرید سدیم

محمد عارفیان<sup>۱\*</sup>، سعیدرضا وصال<sup>۲</sup>، عبدالرضا باقری<sup>۳</sup> و علی گنجعلی<sup>۴</sup>

- \*۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد  
۲- عضو هیئت علمی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد  
۳- عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد  
۴- عضو هیئت علمی دانشکده علوم و پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۰۱

### چکیده

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی در حال گسترش بوده که علاوه بر اثرات سمی و تغذیه‌ای، توانایی گیاه برای جذب آب را کاهش می‌دهد. در مواجهه با تنش شوری، مجموعه‌ای از واکنش‌های مورفوفیزیولوژیک در گیاهان ایجاد می‌شود. عملکرد نخود به دلیل حساسیت بالا به این تنش و به دنبال برخی پاسخ‌های قابل توجه در خصوصیات فیزیولوژیک و مورفولوژیک، به شدت کاهش می‌یابد. در این تحقیق، پیامدهای غلظت‌های مختلف تنش شوری شامل صفر، ۸ و  $12 \text{ dS.m}^{-1}$  بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک ژنوتیپ‌های حساس و متحمل نخود در مراحل اولیه رشد و نمو گیاه به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و چهار نمونه برداری با فاصله زمانی یک هفته مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس داده‌های حاصل، با افزایش غلظت کلرید سدیم و گذشت زمان (هفته چهارم)، ژنوتیپ‌های MCC760 و MCC806 به ترتیب از کمترین و بیشترین آسیب بر اساس شاخص‌های وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی ( $0.18$  و  $2$  برابر کاهش) و وزن خشک ریشه ( $1/7$  و  $4$  برابر کاهش) برخوردار بودند. در شدت بالای تنش ( $12 \text{ dS.m}^{-1}$ )، ژنوتیپ MCC760 نه تنها مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی (شامل کلروفیل‌های a، b و کارتنوئیدها) بیشتری داشت، بلکه شدت کاهش رنگدانه‌های این ژنوتیپ، کمتر و در مقابل، ضریب پایداری کلروفیل آن (۷۵ درصد) به صورت معنی‌داری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود، به طوری که تفاوت آن با ژنوتیپ MCC806 بیش از ۳۰ درصد بود. درصد رطوبت نسبی در همه ژنوتیپ‌ها کاهش یافت و در هفته سوم، این دو ژنوتیپ به ترتیب با کاهش  $1/8$  و  $3/4$  برابر نسبت به شاهد، کمترین و بیشترین تغییرات را نشان دادند. بنابراین در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ژنوتیپ MCC760 به عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ به تنش شوری معرفی شد و زمان مناسب جهت ارزیابی تحمل به این صفت بر مبنای خصوصیات مورفولوژیک، هفته چهارم و بر مبنای صفات فیزیولوژیک، هفته سوم تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: اندام هوایی، رنگدانه‌های فتوسنتزی، ریشه، شوری، محتوای آب نسبی، نخود

### مقدمه

حذف اثرات سمیت یون‌ها تقسیم کرد (Yokoi *et al.*, 2002).  
باین حال، شوری علاوه بر تأخیر در جوانه‌زنی و اختلال در بافت‌ها و اندام‌های تولیدمثلی، نکروزه شدن حاشیه برگ‌ها به ویژه برگ‌های پیرتر و کاهش توانایی تثبیت نیتروژن عملکرد و کیفیت محصول را حتی در ارقام نخود متحمل، کاهش دهد (Dhingra, 2007).

متوسط عملکرد نخود (حدوداً  $800 \text{ Kg.ha}^{-1}$ ) بسیار کمتر از توان بالقوه تولید آن ( $4000 \text{ Kg.ha}^{-1}$ ) (Millan *et al.*, 2006; Singh, 1987; *al.*, 2006) بوده و ضریب تغییرات آن پایدار نیست (بیش از ۱۰ درصد) که از مهم‌ترین عوامل آن می‌توان به

تنش شوری که در زمره مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی قرار می‌گیرد. به دلیل پاره‌ای از عوامل، آثار سوئی بر رشد و نمو گیاهان دارد که می‌توان به تنش آبی (کاهش پتانسیل اسمزی خاک<sup>۱</sup>)، عدم تعادل یونی<sup>۲</sup>، افزایش غلظت یون‌ها (شوری) و ترکیبی از این موارد اشاره کرد (Ashraf & Harris, 2004; Toker *et al.*, 2007). بنابراین فرآیندهای گیاه را در برابر تنش شوری می‌توان به دو دسته فرآیندهای کاهش‌دهنده اثرات تنش اسمزی و فرآیندهای حفظ تعادل یونی سلول و

\* نویسنده مسئول: arefian.m@gmail.com

<sup>1</sup> Low osmotic potential of soil solution

<sup>2</sup> Nutrient ion imbalance

<sup>3</sup> Coefficient of variation

گلدان‌های یک‌لیتری حاوی ماسه و خاک مزرعه (با نسبت ۲:۱، w/w) کشت و در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $50 \pm 5$  درصد تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (شدت نور  $270 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$ ) در اتاقک رشد، نگهداری و یک‌روز در میان به صورت کاملاً یکسان آبیاری شدند. در هر گلدان، دو بوته رشد یافتند که پس از گذشت دو هفته از کاشت، ارقام در سه سطح NaCl (صفر، ۸ و  $12 \text{ dS.m}^{-1}$ ) تیمار شدند و در طول چهار هفته متوالی، نمونه برداری‌ها انجام شد. در این آزمایش تأثیر تنش شوری ناشی از کلرید سدیم به صورت آبی بر پارامترهای مورفوفیزیولوژیک پنج ژنوتیپ نخود تا چهار هفته متوالی (گیاهچه‌های دو تا شش هفته) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تیمارها با سه تکرار بررسی شد.

کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها با استفاده از استون ۸۰ درصد استخراج و توسط اسپکتروفتومتر OPTIMA مدل sp-3000 plus در طول موج‌های ۶۴۳، ۶۴۷ و ۴۷۰ نانومتر قرائت و به کمک فرمول زیر مقدار آن‌ها تعیین شد (Lichtenthaler & Buschmann, 2001). ضریب پایداری کلروفیل نیز از نسبت میزان کلروفیل کل در شرایط تنش به میزان کلروفیل کل در شرایط بدون تنش محاسبه گردید (Terzi & Kadioglu, 2006).

$$c_a (\mu\text{g/ml}) = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$c_b (\mu\text{g/ml}) = 21.50 A_{646.8} - 5.10 A_{663.2}$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.82 c_a - 85.02 c_b) / 198$$

درصد آب نسبی برگ (RWC) طبق معادله زیر به دست آمد که در آن FW وزن تر برگ، DW وزن خشک برگ (۴۸ ساعت در آون ۸۰ درجه سلسیوس) و TW وزن تورم برگ (۲۴ ساعت شناور در آب مقطر) است (de Silva *et al.*, 1996).  $RWC(\%) = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100$

به منظور تعیین معیاری جهت رشد گیاه، ارتفاع آن یعنی فاصله بین طوقه و رأس ساقه اصلی اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه‌ها، در هر نمونه برداری، چهار گیاه به طور جداگانه در آون ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و سپس با ترازوی دیجیتالی توزین شد. جهت محاسبات آماری و رسم نمودارها در این مطالعه از نرم‌افزارهای SAS 6.12 و Excel 2013 استفاده شد. داده‌های درصدی به آرک‌سینوس و داده‌های نسبتی به روش جذری تبدیل شد. میانگین‌ها به روش دانکن مقایسه و سطح احتمال به کاررفته در کلیه تجزیه تحلیل‌ها ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

### نتایج و بحث

یکی از اثرات بارز تنش شوری و خشکی بر گیاهان، کاهش ارتفاع و رشد اندام هوایی است که از دلایل اصلی آن

تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی اشاره کرد که از لحاظ اقتصادی خسارت قابل توجهی را بدنبال دارد (Singh, 1993). شناسایی ارقامی که در شرایط شوری از رشد مناسبی برخوردار بوده و آستانه کاهش عملکرد آن‌ها بالا باشد، می‌تواند علاوه بر افزایش کلی تولید محصول، در زمینه‌سازی برای برنامه‌های به‌نژادی و همچنین کمک به تبیین مکانیزم تحمل به شوری بسیار مؤثر باشد (Munns & Tester, 2008). اگرچه دامنه تنوع ژنتیکی بین ارقام نخود کم است (Dhingra, 2007)، اما مطالعات نشان داده است که گزینش ارقام مختلف نخود به شوری با موفقیت خوبی همراه بوده است (Chauhan, 1987; Maliro *et al.*, 2004; Vadez *et al.*, 2007). از سوی دیگر مؤثرترین روش مقابله با تنش‌هایی مانند خشکی و شوری دستیابی به ژنوتیپ‌های متحمل می‌باشد. لذا بکارگیری معیارهای مناسب برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به این تنش ضروری است (Ganjeali & Kafi, 2007).

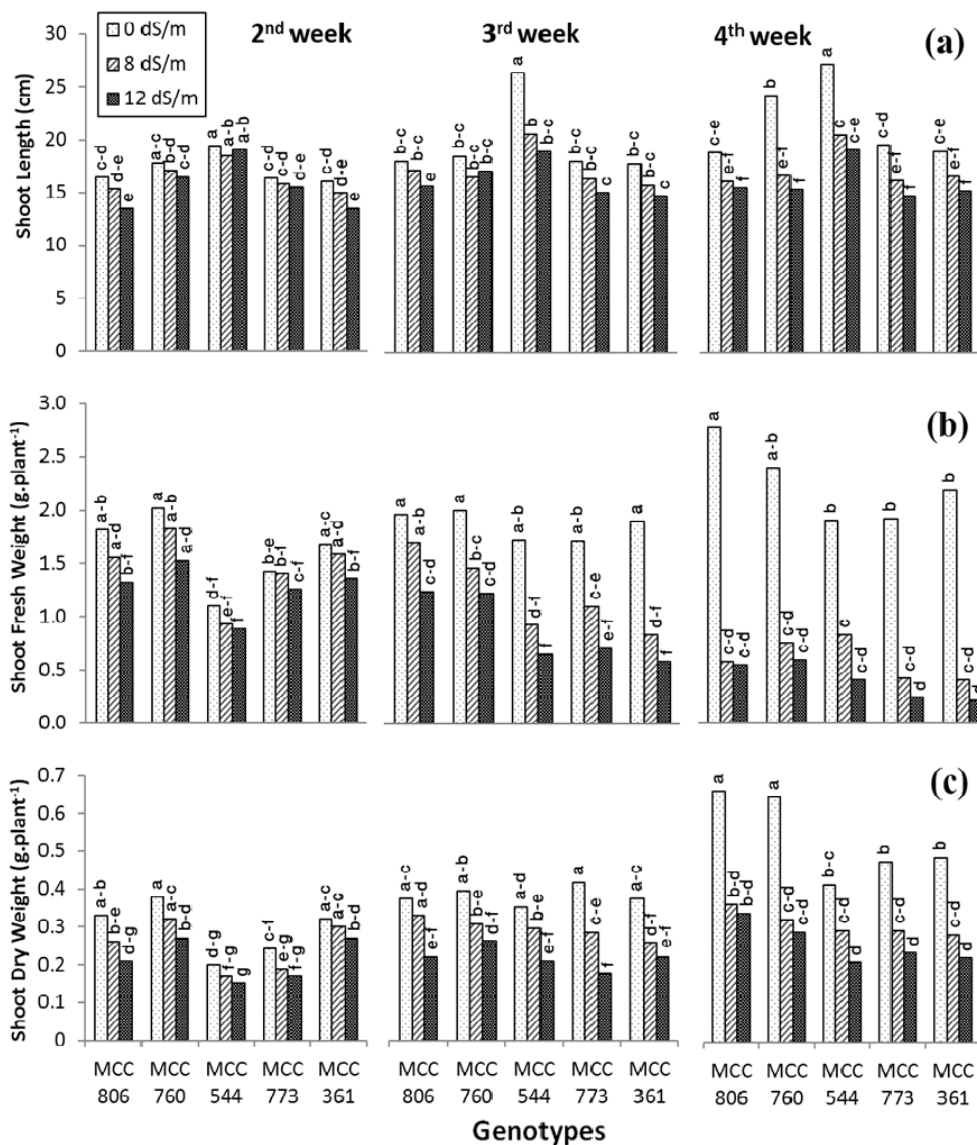
علاوه بر این که بیش از ۱۰ درصد از زمین‌های کشور دچار شوری است (Szabolcs, 1989)، کمبودهای روزافزون آب مناسب برای آبیاری نیز از مهم‌ترین دلایل ایجاد و گسترش تنش شوری می‌باشد. با این حال، مطالعات اندکی در زمینه غربالگری ژنوتیپ‌های نخود در مقابل تنش شوری انجام شده است. مطالعه انجام شده در این زمینه مربوط به (Kafi *et al.*, 2011) می‌باشد. آنها در مطالعه خود که در شرایط کنترل شده به صورت هیدروپونیک انجام شده است، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را بر اساس عکس‌العمل آن‌ها به شوری به ژنوتیپ‌های حساس و متحمل تقسیم کردند. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی دقیق‌تر ژنوتیپ‌های نخود کاندید حساس و متحمل به شوری قبلی، تحت شرایط کاملاً کنترل شده صورت گرفت تا با تعیین دقیق متحمل‌ترین و حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها به غلظت‌های مختلف شوری بتوان با ارزیابی بیشتر ژنوتیپ‌ها در سطح بیوشیمیایی و تعیین مناسب‌ترین شرایط آزمایشی، از نتایج به دست آمده جهت مطالعات دقیق‌تر مولکولی چون پروتئومیکس استفاده نمود.

### مواد و روش‌ها

بر اساس نتایج مطالعات شوری و خشکی انجام شده (Saxena *et al.*, 2011; Ganjeali *et al.*, 2011; *al.*, 1993) ژنوتیپ‌های MCC544، MCC760، MCC806، MCC361 و MCC773 انتخاب و بذور آن‌ها از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی تهیه گردید. ابتدا بذور با هیپوکلرید سدیم ۳ درصد و اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و در پتری‌دیش به مدت ۲۴ ساعت جوانه‌دار شدند. سپس در

می‌توان به کاهش ترشح هورمون‌های رشد و افزایش مواد بازدارنده رشد در شرایط تنش اشاره کرد ( Bayoumi *et al.*, 2010).

مشابه با دیگر تحقیقات انجام شده ( Ahmed *et al.*, Bray, 1997; Gunes, 2002; Bayoumi *et al.*, 2010;



شکل ۱- مقایسه برخی پارامترهای مورفولوژیک نخود تحت تنش شوری NaCl در غلظت‌های صفر، ۸ و  $12 \text{ dS.m}^{-1}$  در هفته دوم، سوم و چهارم. a: طول گیاهچه؛ b: وزن تر اندام هوایی؛ c: وزن خشک اندام هوایی. ( $p \leq 0.05$ )

Fig. 1. Comparison of some morphological parameters of chickpea under NaCl salinity stress (0, 8 and  $12 \text{ dS.m}^{-1}$ ) in 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> weeks after sowing. a: Shoot length; b: Shoot fresh weight; c: Shoot dry weight, ( $p \leq 0.05$ )

نشده است. در ژنوتیپ‌های MCC544 و MCC760 کاهش معنی‌داری در هفته چهارم نمونه‌گیری (۹/۲ و ۸/۱ سانتی‌متر کاهش) به‌ویژه در غلظت  $12 \text{ dS.m}^{-1}$  مشاهده شد.

از آن‌جا که نمونه‌گیری اول همزمان با اعمال تنش بود و در ژنوتیپ‌های مختلف قبل از تنش اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (به‌جز این‌که ذکر شده باشد)، داده‌های آن ارائه

از هفته دوم به بعد، در شرایط تنش، رشد ریشه تقریباً در همه ژنوتیپ‌ها متوقف شد، اما بیشترین شدت کاهش نسبت به شاهد مربوط به ژنوتیپ MCC806 بود و کمترین مقدار کاهش در ژنوتیپ MCC760 مشاهده شد (شکل ۲-ب).

از آنجاکه یکی از پاسخ‌های ژنوتیپ‌های متحمل به تنش، افزایش نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی است (Kumaga et al., Ganjeali & Kafi, 2007; 2003)، بنابراین با توجه به این پارامتر می‌توان ژنوتیپ MCC760 را متحمل‌ترین و ژنوتیپ MCC806 را حساس‌ترین ژنوتیپ به شوری در بین ارقام مورد مطالعه به شوری در نظر گرفت.

در هفته چهارم و در غلظت متوسط ( $8 \text{ dS.m}^{-1}$ )، اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف تنش در ژنوتیپ MCC544 مشاهده نشد و این ژنوتیپ با ۱/۵ برابر کاهش نسبت به شاهد در وزن خشک اندام هوایی، کمترین آسیب‌دیدگی را داشت. از سوی دیگر، میانگین وزن خشک ریشه آن با افزایش شدت تنش، زیاده‌تر نیز شد (شکل ۲-ب)، براین اساس، همانند ژنوتیپ MCC760، این ژنوتیپ نیز از تحمل بهتری به تنش شوری برخوردار بود. در گیاهان دیگر مانند لوبیا و گندم کاهش وزن خشک اندام هوایی در اثر تنش‌های شوری و خشکی گزارش شده است (Bayoumi et al., 2010; Tawfik, 2008).

سیستم ریشه‌ای به دلیل تماس مستقیم با محلول خاک، به‌عنوان اولین حسگر تنش آبی محسوب می‌شود، لذا در ایجاد مقاومت نسبت به تنش شوری و خشکی نقش مهمی دارد (Okçu et al., 2005). در بررسی وزن خشک ریشه‌ها مشخص شد که ژنوتیپ‌های MCC806 و MCC760 سیستم ریشه‌ای توسعه‌یافته‌تری داشته و وزن تر و وزن خشک آن‌ها به‌صورت معنی‌داری بیشتر از سایر موارد بود (شکل‌های ۲-ا، b و ۵-ب و c).

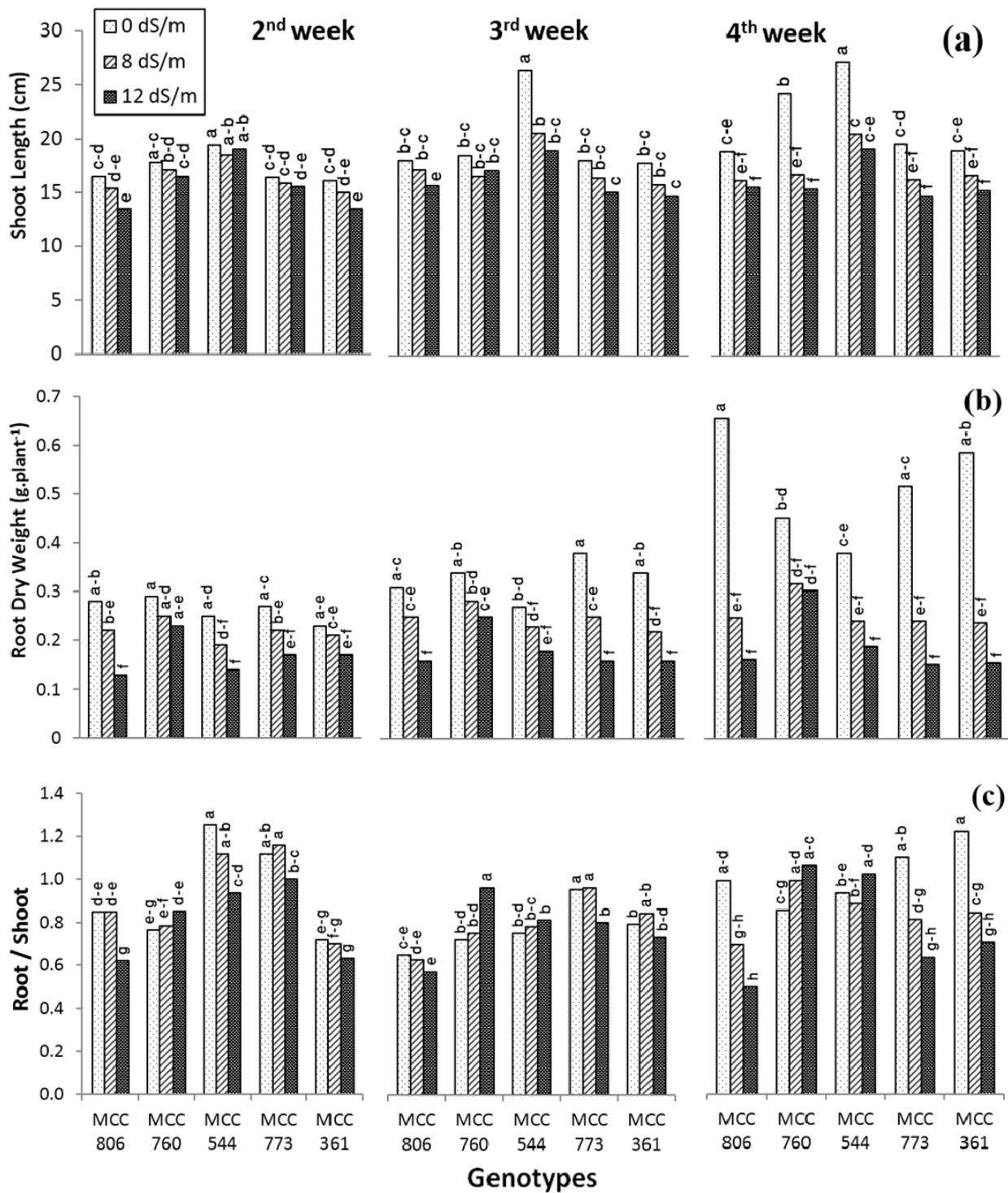
با افزایش زمان و غلظت نمک، به‌ویژه در هفته چهارم، کاهش معنی‌دار چهاربرابر نسبت به شاهد در ژنوتیپ MCC806 مشاهده شد، اما ژنوتیپ MCC760 کمترین میزان کاهش وزن خشک ریشه نسبت به شاهد (۱/۷ برابر) را داشت و تفاوتی در غلظت‌های  $12 \text{ dS.m}^{-1}$  و  $8 \text{ dS.m}^{-1}$  مشاهده نشد که بنظر می‌رسد به حد آستانه خود رسیده باشد. از طرفی در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها، این حد آستانه بیشترین وزن تر و خشک ریشه را به‌خود اختصاص داده است.

ژنوتیپ MCC544 که یک ژنوتیپ بومی ایرانی است، از نظر سرعت جوانه‌زنی بهتر و از لحاظ رشد طولی ساقه اصلی، برتری معنی‌داری (با اختلاف ۱۰ سانتی‌متری در هفته سوم) نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها داشت که تا حدی به عادت رشدی گیاه بازمی‌گردد.

این ژنوتیپ در چهار زمان نمونه‌گیری (هفته اول نشان داده نشده است) و در هر سه غلظت، بیشترین ارتفاع گیاه را به‌خود اختصاص داد، اما وزن تر و خشک آن به‌خصوص در هفته دوم نمونه‌گیری، کمتر از بقیه بود (شکل‌های ۱-ب و ۵-ا)؛ چراکه جوانه‌های جانبی نداشت، اما با توسعه بافت‌های هوایی از قبل تولیدشده، این کاهش وزن را در هفته‌های سوم و چهارم جبران کرد. ارتفاع بیشتر این ژنوتیپ و گنجایش بیشتر ساقه آن را می‌توان به عنوان منبع ثانویه ذخیره مواد فتوسنتزی و انتقال مجدد مواد فتوسنتزی به دانه‌ها در نظر گرفت که خود می‌تواند به‌عنوان یک راهکار در راستای مقاومت به تنش مطرح باشد (Ganjeali & Kafi, 2007).

با افزایش شدت تنش، وزن تر همه ژنوتیپ‌ها کاهش یافت و با افزایش مدت زمان تنش، شدت کاهش وزن، بیشتر نیز شد، به‌طوری‌که در هفته سوم در ژنوتیپ‌های MCC544 و MCC361 و هفته چهارم در دیگر ژنوتیپ‌ها کاهش معنی‌داری در وزن تر اندام هوایی مشاهده شد. ژنوتیپ MCC806 اگرچه بیشترین وزن تر در هفته سوم را داشت، اما به‌همراه ژنوتیپ MCC361 بیشترین درصد (بیش از ۵ برابر) افت وزن تر نسبت به شاهد را در هفته چهارم به خود اختصاص داد که حساسیت این ژنوتیپ نسبت به شوری را نشان می‌دهد. در هفته چهارم و در غلظت  $8 \text{ dS.m}^{-1}$  از نظر وزن تر، ژنوتیپ‌های MCC544 و MCC760 کمترین درصد افت (به ترتیب ۲ و ۳ برابر) و بیشترین میانگین پارامتر را نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها داشتند که بیانگر جذب آب بیشتر و سازگاری بهتر با تنش بود.

اگرچه با افزایش سن، وزن تر گیاهچه‌های تحت تنش کاهش یافت، اما بر وزن خشک آن‌ها افزوده شد (شکل ۱-ب و c). با این‌که ژنوتیپ MCC760 افت شدیدی (تقریباً ۲ برابر) در وزن خشک هفته چهارم داشت، اما با بررسی وزن خشک ریشه (شکل‌های ۲-ب و ۵-ب) مشخص می‌شود با افزایش نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک ساقه، مکانیزم مقاومت این ژنوتیپ نسبت به تنش شوری همچنان ادامه دارد. این روند به‌ویژه در هفته سوم و چهارم و در غلظت‌های بالاتر برای این ژنوتیپ بیشتر مشاهده می‌شود.



شکل ۲- برخی تغییرات پارامترهای مورفولوژیک ریشه نخود تحت تنش شوری NaCl در سطوح صفر، ۸ و ۱۲ dS.m<sup>-1</sup> طی سه هفته متوالی.

a: وزن تر ریشه؛ b: وزن خشک ریشه؛ c: نسبت وزن خشک ریشه به نسبت وزن خشک اندام هوایی، ( $p \leq 0.05$ )

Fig. 2. Some changes in morphological parameters of chickpea roots under NaCl salinity (0, 8 and 12 dS.m<sup>-1</sup>) during three consecutive weeks. a: Root fresh weight; b: Root dry weight; c: Root dry weight to shoot dry weight ratio, ( $p \leq 0.05$ )

از آن‌جا که یکی از پاسخ‌های گیاهان متحمل به تنش شوری و خشکی، افزایش رشد ریشه جهت ذخیره ماده خشک و یا انتقال از اندام هوایی به ریشه (Bibi *et al.*, 2009) و جذب آب بیشتر است (Ganjeali & Kafi, 2007)، ژنوتیپ MCC760 تحمل بیشتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها به‌ویژه MCC806 در برابر تنش شوری دارد.

جدول ۱- تغییرات میزان کلروفیل a، b و کارتنوئید (mg/gFW) تحت تنش شوری (صفر، ۸ و ۱۲ dS.m<sup>-1</sup>) در هفته‌های دوم و سوم پس از تنش

Table 1. Changes of chlorophyll a, b and carotenoid (mg/gFW) under salinity (0, 8 and 12 dS.m<sup>-1</sup>) during two weeks

ژنوتیپ‌ها Genotypes	نوع کلروفیل Chlorophyll type	شدت‌های تنش شوری در هفته دوم Levels of salinity in 2 <sup>nd</sup> week			شدت‌های تنش شوری در هفته سوم Levels of salinity in 3 <sup>rd</sup> week		
		0 dS/m	8 dS/m	12 dS/m	0 dS/m	8 dS/m	12 dS/m
MCC 806	Chlorophyll a	26.58±0.4	24.21±1.2	18.39±0.5	23.63±0.8	16.56±0.7	10.91±1.3
	Chlorophyll b	09.74±0.3	08.62±0.4	07.66±0.2	09.27±0.0	06.59±0.3	03.72±0.2
	Carotenoid	05.11±0.7	04.86±0.2	05.31±0.3	04.94±0.3	04.45±0.5	03.61±0.4
MCC 760	Chlorophyll a	24.75±1.3	23.14±0.8	19.78±1.1	20.23±0.2	14.28±1.5	15.37±1.7
	Chlorophyll b	09.28±0.4	09.48±0.4	08.84±0.4	08.04±0.9	05.44±0.4	05.93±0.6
	Carotenoid	05.60±0.4	05.56±0.3	05.24±0.4	04.60±0.3	04.11±0.5	04.11±0.5
MCC 544	Chlorophyll a	27.39±1.2	22.34±1.1	20.08±1.1	26.43±1.5	18.26±1.1	10.61±0.7
	Chlorophyll b	09.47±0.4	08.79±0.4	08.04±0.4	09.74±0.4	07.78±0.2	04.79±0.5
	Carotenoid	05.83±0.3	04.72±0.1	05.36±0.2	05.35±0.5	04.62±0.3	03.19±0.2
MCC 733	Chlorophyll a	25.35±0.5	23.24±0.6	19.27±1.0	19.13±1.7	13.78±0.6	10.13±0.5
	Chlorophyll b	09.37±0.5	08.69±0.3	07.77±0.3	07.35±0.7	05.37±0.3	04.93±0.3
	Carotenoid	05.42±0.3	04.91±0.3	05.10±0.1	04.47±0.5	03.91±0.3	03.02±0.2
MCC 361	Chlorophyll a	24.66±0.6	21.20±0.4	18.59±0.5	23.49±1.1	15.87±0.6	11.49±0.8
	Chlorophyll b	09.39±0.4	08.66±0.2	07.64±0.4	09.13±0.2	06.54±0.5	05.44±0.7
	Carotenoid	04.78±0.4	04.52±0.2	04.93±0.4	05.02±0.3	04.11±0.2	03.34±0.3

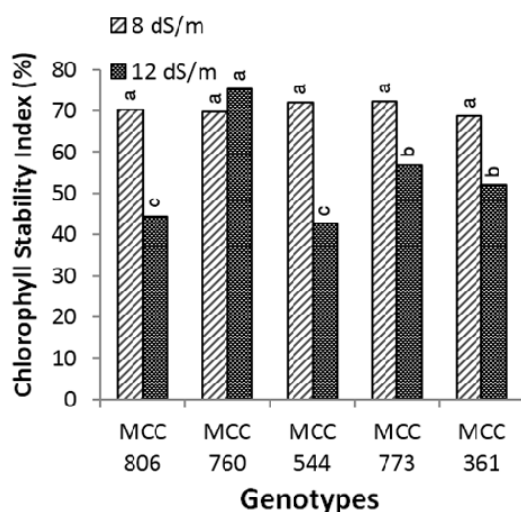
ژنوتیپ‌های MCC544 و MCC760 بر خلاف سه ژنوتیپ دیگر، در هفته‌های سوم و چهارم نه تنها نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک ساقه آن‌ها کاهش نیافت (شکل ۲)، بلکه با افزایش شدت تنش، بیشتر نیز شد. در گیاهان متحمل به تنش شوری و خشکی، کاهش رشد بخش ساقه‌ای و در مواردی افزایش رشد ریشه‌ای مشاهده شده است (Mensah *et al.*, 2009 ; Kalefetoglu Macar *et al.*, 2009). نتایج حاصل از این تحقیق نیز افزایش نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی در ژنوتیپ‌های متحمل یعنی MCC760 و MCC544 را در شرایط تنش شوری تأیید می‌کند.

(Data are mean ± s.e.).

(داده‌ها شامل میانگین ± خطای معیار).

افزایش غلظت کلریدسديم باعث کاهش میزان کلروفیل‌های a و b در ژنوتیپ‌های نخود شد و با افزایش مدت زمان، شدت کاهش نیز زیادتر شد (جدول ۱). ژنوتیپ MCC760 در هفته سوم دارای بیشترین مقادیر کلروفیل‌های a و b در بالاترین سطح تنش بوده و بر خلاف دیگر ژنوتیپ‌ها با افزایش شدت تنش از ۸ dS.m<sup>-1</sup> به ۱۲ dS.m<sup>-1</sup> نه تنها میانگین آن کاهش نیافت، بلکه افزایش نیز داشت و دارای بیشترین میانگین کلروفیل کل بود. علاوه بر این، این

مقدار کلروفیل و رنگدانه‌های فتوسنتزی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در ظرفیت فتوسنتزی گیاهان هستند، چراکه به‌طور مستقیم بر سرعت و میزان فتوسنتز و تولید زیست‌توده مؤثر هستند (Kafi *et al.*, 2011). تأثیر تنش شوری و خشکی بر میزان کلروفیل‌ها وابسته به شدت و مدت تنش و نوع گونه گیاهی می‌باشد (Guerfel *et al.*, 2009). منطبق با دیگر گزارش‌های ارائه شده (Mudgal *et al.*, 1999; Soussi *et al.*, 2009)، در آزمایش حاضر نیز



شکل ۳- اثر شوری (NaCl) بر درصد ضریب پایداری کلروفیل ژنوتیپ‌های نخود در هفته سوم، ( $p \leq 0.05$ )

Fig. 3. Impact of salinity (NaCl) on chlorophyll stability Index (%) of chickpea genotypes in 3<sup>rd</sup> week, ( $p \leq 0.05$ )

حفظ آب برگ و کاهش تبخیر و تعرق، یک مکانیسم مهم اجتناب از تنش شوری است و محتوای آب نسبی برگ به‌عنوان نشانگر جهت تعیین میزان تحمل ژنوتیپ‌های گیاهی نسبت به تنش شوری و خشکی معرفی شده است (Terzi & Kadioglu, 2006). در این آزمایش در همه مراحل نمونه‌گیری، میزان آب نسبی برگ تمام ژنوتیپ‌ها در اثر تنش شوری کاهش داشت و این روند به مرور زمان بیشتر نیز شد و نهایتاً در هفته چهارم تا حد آستانه کاهش یافت، به طوری که با افزایش غلظت، کاهش معنی‌داری مشاهده نشد. در غلظت  $12 \text{ dS.m}^{-1}$  کمترین و بیشترین میزان کاهش نسبت به شاهد در هفته دوم به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های MCC544 (۱/۱۸ برابر کاهش) و MCC806 (۱/۹۲ برابر کاهش) بود. در هفته سوم و چهارم ژنوتیپ‌های MCC760 (۱/۸۵ و ۳/۱ برابر) و MCC806 (۳/۴۱ و ۴/۶ برابر) به ترتیب کمترین و بیشترین میزان کاهش نسبت به شاهد را داشتند. بنابراین ژنوتیپ‌های MCC760 و MCC544 (برخلاف ژنوتیپ MCC806) به‌دنبال توانایی بیشتر در حفظ آب تحت شرایط شوری، بیشترین تحمل را به تنش داشتند (شکل‌های ۴ و ۵).

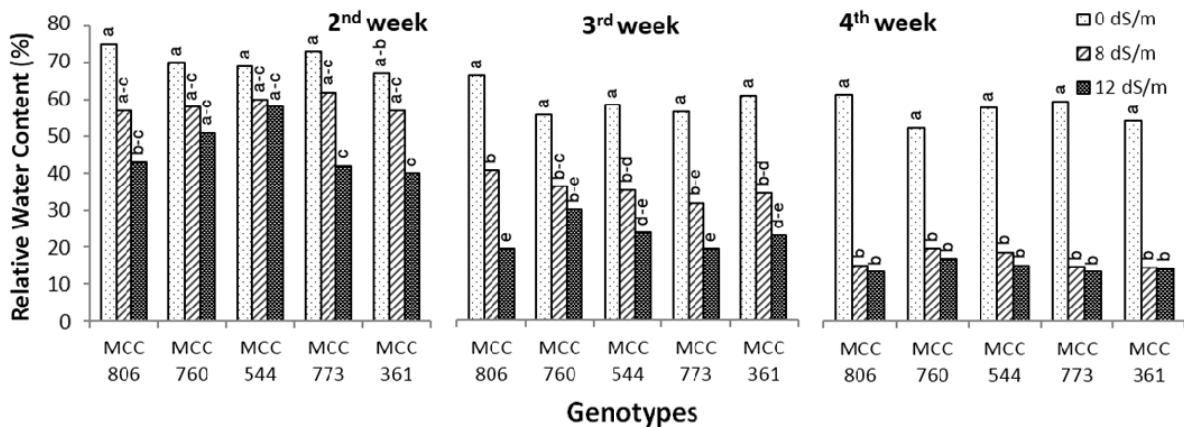
تفاوت ژنوتیپ‌ها از نظر میزان نسبی آب برگ به تفاوت آنها در میزان جذب آب از خاک و نیز توانایی آنها در افزایش کارایی سیستم ریشه‌ای و قدرت کنترل هدرروی آب از طریق روزنه‌ها و تبخیر سطحی یا تعرق کمتر مربوط می‌شود (Farooq et al., 2009; Beck et al., 2007).

ژنوتیپ بیشترین ضریب پایداری کلروفیل (CSI) را به‌خود اختصاص داد (شکل ۳).

ژنوتیپ MCC544 در شدت متوسط تنش ( $8 \text{ dS.m}^{-1}$ ) و هفته سوم، دارای بیشترین میزان کلروفیل‌های a و b بود ( $26/05$  میلی‌گرم کلروفیل کل در یک گرم بافت تر برگ)، اما در شدت تنش بالاتر ( $12 \text{ dS.m}^{-1}$ ) افت شدیدی در رنگدانه‌های این ژنوتیپ مشاهده شد، به طوری که در غلظت  $12 \text{ dS.m}^{-1}$  به‌همراه ژنوتیپ MCC806 بیشترین آسیب در رنگدانه‌ها را داشتند ( $15/4$  و  $14/6$  میلی‌گرم کلروفیل کل در یک گرم بافت تر برگ و ضریب پایداری کلروفیل  $42\%$  و  $44\%$  به ترتیب برای ژنوتیپ‌های MCC544 و MCC806؛ شکل ۳). از آنجا که کاهش میزان کلروفیل گیاهچه‌های تحت تنش، با پیری برگ در ارتباط است (Guerfel et al., 2008; Lage-Pinto et al., 2009)، یکی از دلایل احتمالی کاهش شدید رنگدانه‌های فتوسنتزی این ژنوتیپ را می‌توان به عادت رشدی آن نسبت داد، چراکه از یک سو وزن خشک و زیست‌توده کمتری داشت و از سوی دیگر، شاخه‌های جانبی و در نتیجه برگ‌های جوان تولید نکرد و در نتیجه ضریب پایداری این ژنوتیپ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. ژنوتیپ MCC806 علاوه بر کاهش شدید در ضریب پایداری کلروفیل، دارای کمترین کلروفیل b در هفته سوم بود و در شدت تنش بالا ( $12 \text{ dS.m}^{-1}$ ) اختلاف معنی‌داری با ژنوتیپ MCC760 داشت.

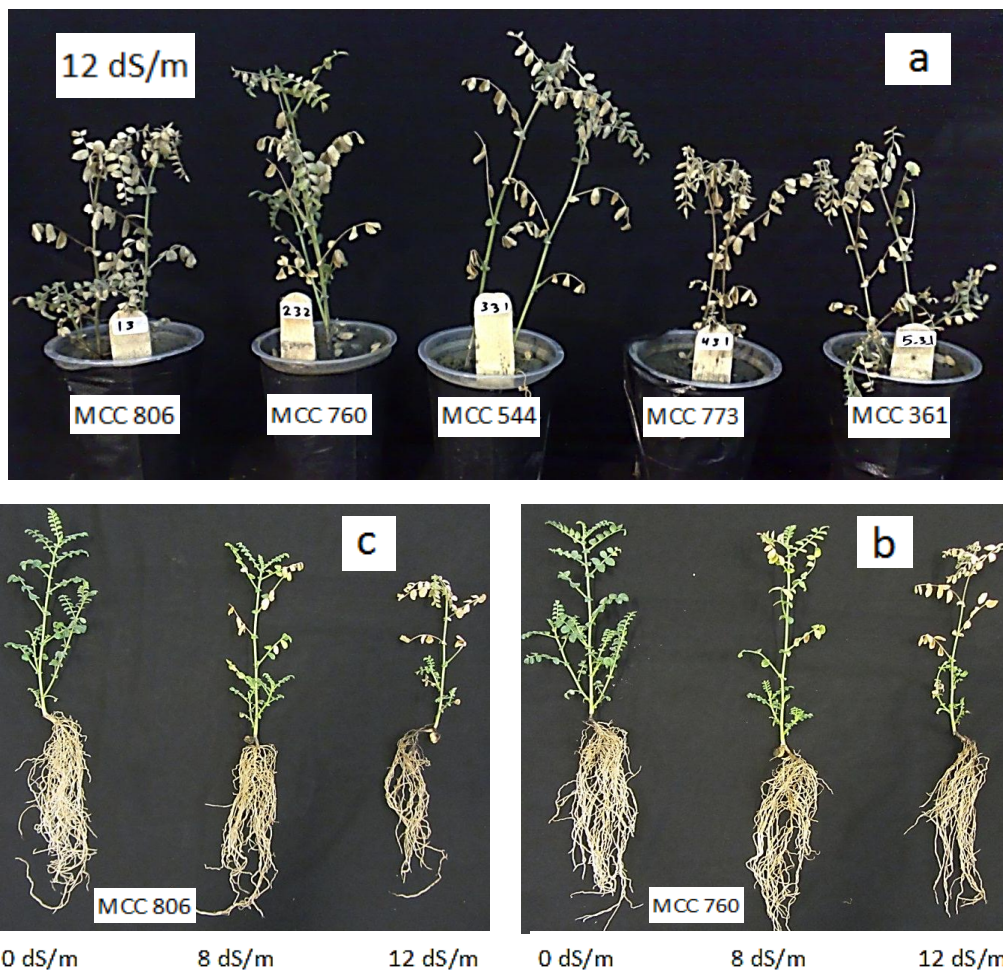
کاروتنوئیدها یکی از رنگدانه‌های کلیدی و مهم سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌باشند که گروه بزرگی از مولکول‌های ایزوپرنوئید را تشکیل می‌دهند و به تخریب اکسیداتیو نیز حساس می‌باشند (Simkin et al., 2008). در مطالعه حاضر، با افزایش شدت تنش، میزان کاروتنوئید نیز کاهش یافت (جدول ۱). کمترین کاهش، مربوط به ژنوتیپ MCC760 بود، به طوری که در سطوح تنش متوسط ( $8 \text{ dS.m}^{-1}$ ) و بالا ( $12 \text{ dS.m}^{-1}$ ) تغییری در میانگین آن مشاهده نشد. بنابراین ممکن است این ژنوتیپ توانایی بیشتری در کاهش تنش اکسیداتیو ایجاد شده در اثر شوری به کمک کاروتنوئیدها داشته (Prochazkova et al., 2001) و لذا موجب تحمل بیشتر آن نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها شده است.

کاهش میزان کلروفیل کل و کاروتنوئید نخود در اثر تنش شوری در مطالعات دیگران نیز (Mudgal et al., 2009; Soussi et al., 1999) تأیید شده است.



شکل ۴- تأثیر سه غلظت NaCl (صفر، ۸ و  $12 \text{ dS.m}^{-1}$ ) بر درصد تغییرات مقدار آب نسبی در ژنوتیپ‌های نخود در طول سه هفته متوالی، ( $p \leq 0.05$ )

Fig. 4. Effects of NaCl levels ( $0, 8, 12 \text{ dS.m}^{-1}$ ) on relative water content in chickpea genotypes during three consecutive weeks, ( $p \leq 0.05$ )



شکل ۵- تأثیر کلرید سدیم بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و رشد و نمو ژنوتیپ‌های نخود. (a) اثر غلظت شوری  $12 \text{ dS.m}^{-1}$  بر پنج ژنوتیپ نخود در هفته چهارم. اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر ژنوتیپ MCC760 (b) و ژنوتیپ MCC806 (c) در هفته دوم

Fig. 5. NaCl impact on morphology and growth of chickpea genotypes. (a) Effect of  $12 \text{ dS.m}^{-1}$  salinity level on five genotypes of chickpea in 4<sup>th</sup> week. Effect of NaCl salinity levels on MCC760 (b) and MCC806 (c) in 2<sup>nd</sup> week



مشابه با نتایج آزمایش حاضر، در مطالعات دیگر که روی گندم، سویا و ذرت انجام شده است، ژنوتیپ‌های متحمل میزان نسبی آب برگ بالاتری داشتند ( Bayoumi *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2001; Galle *et al.*, 2002; Moussa & Abdel-Aziz, 2008; Sairam *et al.*, 2005). به‌طور کلی، نتایج مبین آن بود که ارزیابی تحمل به تنش شوری بر اساس خصوصیات فیزیولوژیک در هفته سوم و بر مبنای ویژگی‌های مورفولوژیک در هفته چهارم مناسب‌تر می‌باشد، اما جهت تشخیص دقیق‌تر، بررسی نشانگرهای بیوشیمیایی به‌ویژه در گیاهچه‌های دو یا سه هفتگی ضروری به‌نظر می‌رسد، چراکه طبق گزارش‌های مختلف، نخود در مرحله گلدهی حساسیت بیشتری داشته و اختلافات بین ژنوتیپ‌ها بیشتر نمایان خواهد شد ( Ganjeali & Kafi, 2007).

ژنوتیپ‌های MCC760 و MCC544 علاوه بر توانایی بیشتر در جذب و حفظ آب، متابولیت‌های تولیدی و ذخیره‌ای بیشتری داشته و احتمالاً از سازگاری اسمزی بالاتر و تحمل بیشتری نسبت به شوری ( Bayoumi *et al.*, 2010) برخوردار بودند. از سوی دیگر ژنوتیپ MCC806 به‌دلیل بیشترین آسیب، حساس‌تر از چهار ژنوتیپ دیگر ارزیابی شد. از سوی دیگر اگرچه مطالعات ( Kafi *et al.*, 2011) و Mehrjerdi *et al.*, (2011) در محیط هیدروپونیک و با حذف اثر خاک انجام گرفته است، اما با نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش تا حدودی مطابقت دارد.

#### منابع

- Ahmed, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y., and Sakuratani, T. 2002. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Science* 163: 117-123.
- Ashraf, M., and Harris, P. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.
- Bayoumi, T., Eid, M.H., and Metwali, E. 2010. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology* 7: 2341-2352.
- Beck, E.H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., and Bhattarai, T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences* 32: 501-510.
- Bibi, N., Hameed, A., Ali, H., Iqbal, N., Haq, M., Atta, B., Shah, T., and Alam, S. 2009. Water stress induced variations in protein profiles of germinating cotyledons from seedlings of chickpea genotypes. *Pakistan Journal of Botany* 41: 731-736.
- Bray, E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2: 48-54.
- Chauhan, Y. 1987. Screening for tolerance to salinity and waterlogging: case studies with pigeonpea and chickpea. In: Consultants' Workshop: Adaptation of Chickpea and Pigeonpea to Abiotic Stresses, 19-21 Dec 1984, ICRISAT, India.
- de Silva, M., Purcell, L.C., and King, C.A. 1996. Soybean petiole ureide response to water deficits and decreased transpiration. *Crop Science* 36: 611-616.
- Dhingra, H.R. 2007. Salinity mediated changes in yield and nutritive value of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Indian Journal of Plant Physiology* 12: 271-275.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., and Basra, S. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable Agriculture* 29(1): 153-188.
- Figueiredo, M.V.B., Bezerra-Neto, E., and Burity, H.A. 2001. Water stress response on the enzymatic activity in cowpea nodules. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 195-200.
- Galle, A., Csiszár, J., Tari, I., and Erdei, L. 2002. Changes in water and chlorophyll fluorescence parameters under osmotic stress in wheat cultivars. *Acta Biologica Szegediensis* 46: 85-86.
- Ganjeali, A., and Kafi, M. 2007. Genotypic differences for allometric relationships between root and shoot characteristics in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Pakistan Journal of Botany* 39: 1523-1531.
- Ganjeali, A., Porsa, H., and Bagheri, A. 2011. Assessment of Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasms for drought tolerance. *Agricultural Water Management* 98: 1477-1484.
- Guerfel, M., Baccouri, O., Boujnah, D., Chaïbi, W., and Zarrouk, M. 2009. Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 119: 257-263.

16. Gunes, A., Cicek, N., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Guneri, E., and Guzelordu, T. 2006. Genotypic response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars to drought stress implemented at pre-and post-anthesis stages and its relations with nutrient uptake and efficiency. *Plant Soil and Environment* 52: 368-376.
17. Kafi, M., Bagheri, A., Nabati, J., Zare Mehrjerdi, M., and Masomi, A. 2011. Effect of salinity on some physiological variables of 11 chickpea genotypes under hydroponic conditions. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture-Isfahan University of Technology* 1: 55-70.
18. Kalefetoglu Macar, T., Turan, O., and Ekmekci, Y. 2009. Effect of water deficit induced by PEG and NaCl on chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivar and lines at early seedling stage. *Gazi University Journal of Science* 22: 5-14.
19. Kumaga, F., Adiku, S., and Ofori, K. 2003. Effect of post-flowering water stress on dry matter and yield of three tropical grain legumes. *International Journal of Agriculture and Biology* 4: 405-407.
20. Lage-Pinto, F., Oliveira, J.G., Da Cunha, M., Souza, C.M.M., Rezende, C.E., Azevedo, R.A., and Vitória, A.P. 2008. Chlorophyll *a* fluorescence and ultrastructural changes in chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress. *Environmental and Experimental Botany* 64: 307-313.
21. Lichtenthaler, H.K., and Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. pp. F4.3.1-F4.3.8). New York John Wiley and Sons.
22. Maliro, M.F.A., McNeil, D., Kollmorgen, J., Pittock, C., and Redden, R. 2004. Screening chickpea (*Cicer arietinum* L.) and wild relatives germplasm from diverse country sources for salt tolerance. The 4<sup>th</sup> International Crop, Science Congress, Brisbane, Queensland, Australia.
23. Mehrjerdi, M.Z., Nabati, J., Masomi, A., Bagheri, A., and Kafi, M. 2011. Evaluation of tolerance to salinity based on root and shoot growth of 11 drought tolerant and sensitive chickpea genotypes at hydroponics conditions. *Iranian Journal of Pulses Research* 2: 83-96.
24. Mensah, J., Obadoni, B., Eruotor, P., and Onome-Irieguna, F. 2009. Simulated flooding and drought effects on germination, growth, and yield parameters of sesame (*Sesamum indicum* L.). *African Journal of Biotechnology* 5: 1249-1253.
25. Millan, T., Clarke, H.J., Siddique, K.H.M., Buhariwalla, H.K., Gaur, P.M., Kumar, J., Gil, J., Kahl, G., and Winter, P. 2006. Chickpea molecular breeding: New tools and concepts. *Euphytica* 147: 81-103.
26. Moussa, H.R., and Abdel-Aziz, S.M. 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Science* 1: 31-36.
27. Mudgal, V., Madaan, N., Mudgal, A., and Mishra, S. 2009. Changes in growth and metabolic profile of chickpea under salt stress. *Journal of Applied Biosciences* 23: 1436-1446.
28. Munns, R., and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651-681.
29. Okçu, G., Kaya, M.D., and Atak, M. 2005. Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29: 237-242.
30. Prochazkova, D., Sairam, R., Srivastava, G., and Singh, D. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science* 161: 765-771.
31. Sairam, R., Srivastava, G., Agarwal, S., and Meena, R. 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum* 49: 85-91.
32. Saxena, N.P., Krishnamurthy, L., and Johansen, C. 1993. Registration of a drought-resistant chickpea germplasm. *Crop Science* 33: 1424-1424.
33. Simkin, A.J., Moreau, H., Kuntz, M., Pagny, G., Lin, C., Tanksley, S., and McCarthy, J. 2008. An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *Journal of Plant Physiology* 165: 1087-1106.
34. Singh, K. 1987. Chickpea Breeding, In: M.C. Saxena and K.B Singh (Eds). *The Chickpea*. CAB International, Wallingford, UK. p. 127-162.
35. Singh, K. 1993. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research* 53: 161-170.
36. Soussi, M., Lluch, C., Ocana, A., and Norero, A. 1999. Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. *Journal of Experimental Botany* 50: 1701-1708.
37. Szabolcs, I. 1989. Salt-affected Soils. CRC Press (Boca Raton, Fla.). p. 274.
38. Tawfik, K. 2008. Effect of water stress in addition to potassiomag application on mungbean. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2: 42-52.
39. Terzi, R., and Kadioglu, A. 2006. Drought stress tolerance and the antioxidant enzyme system. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48: 89-96.

40. Toker, C., Lluch, C., Tejera, N.A., Serraj, R., and Siddique, K.H.M. 2007. Abiotic stresses. In: S.S. Yadav, R. Redden, W. Chen, and B. Sharma (Eds.). Chickpea Breeding and Management pp. 474-496. CABI, Wallingford, UK.
41. Vadez, V., Krishnamurthy, L., Serraj, R., Gaur, P., Upadhyaya, H., Hoisington, D., Varshney, R., Turner, N., and Siddique, K. 2007. Large variation in salinity tolerance in chickpea is explained by differences in sensitivity at the reproductive stage. *Field Crops Research* 104: 123-129.
42. Yokoi, S., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. 2002. Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report* 23: 25-33.

## Trend of changes for morpho-physiological characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under salinity stress (NaCl) condition

Arefian<sup>1\*</sup>, M., Vessal<sup>2</sup>, S., Bagheri<sup>3</sup>, A. and Ganjeali<sup>4</sup>, A.

1. MSc. Department of Biotechnology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2. Contribution from Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3. Department of Biotechnology, College of Agriculture, & Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
4. Department of Biology, College of Sciences, & Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Received: 29 December 2012  
Accepted: 23 August 2013

### Abstract

Salinity is one of the most important widespread abiotic stresses which causes toxic and nutritional effects as well as loss of water absorption ability by plants. Plants respond to salinity with morphological changes. Due to high susceptibility of chickpea to salt stress, some physiological and morphological responses occur following the stress in this plant. Thus, different concentrations of salt stress (0, 8, 12 dS.m<sup>-1</sup>) impacts on morphophysiological characteristics were studied in candidate chickpea genotypes; a factorial experiment in a completely randomized design was performed with three replications and four sampling times of one week interval. The results indicated that the most tolerant and susceptible genotype to salinity were MCC760 and MCC806, respectively. By increasing the concentration of sodium chloride at week 4, root dry weight to shoot dry weight ratio increased 0.8 and 2 folds in these genotypes but root dry weight decreased 1.7 and 4 folds. At high stress level (12 dS.m<sup>-1</sup>), MCC760 genotype had not only the more photosynthetic pigments (including chlorophyll a, b and carotenoids) but also the rate was less in which its chlorophyll stability index (75%) was significantly higher than the others, indicating more than 30% significant differences compared with MCC806. The third week determined as more appropriate time to compare the physiological parameters in which MCC760 and MCC806 genotypes with 1.8 and 3.4 folds had significant difference and lowest relative water content. Overall, the data showed that MCC760 was the most tolerant genotype in response to salinity in this study and also the appropriate time for tolerant assessment were 4<sup>th</sup> and 3<sup>rd</sup> weeks after sowing based on Morphological and physiological parameters, respectively.

**Key words:** Chickpea, Pigments, Relative water content, Root, Salinity, Shoot

---

\*Corresponding Author: arefian.m@gmail.com