"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲
(ص ۹۶-۷۹)
مقاله پژوهشی

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 12, No.: 2, Summer 2023
(pp: 79-96)
DOI: 10.22092/ijsst.2021.355620.1405
Research Article

اثر پیش‌تیمار بذر بر بهبود تحمل به سرما در مرحله جوانه‌زنی برخی ژنوتیپ‌های نخود (*Cicer arietinum* L.)

محمد محمدی[1]، رضا توکل‌افشاری[2*]، جعفر نباتی[3]، احسان اسکوئیان[4]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و تکنولوژی بذر، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۲. استادگروه اگروتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
۳. استادیار پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۴. استادیار موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی واحد ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، مشهد.
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۴)

چکیده

شناسایی پیش‌تیمارهای القا کننده متابولیت‌های ثانویه به‌منظور تحمل به تنش سرما می‌تواند در استقرار و عملکرد گیاهان زراعی موثر باشد. جهت ارزیابی اثر پیش‌تیمار بذر بر تحمل سرما سه ژنوتیپ و یک رقم نخود کابلی در مرحله جوانه‌زنی پژوهشی در سال ۱۳۹۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل دمای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درجه سلسیوس، ژنوتیپ‌ها MCC505، ILC8617، MCC495 و رقم سارال و پیش‌تیمارها شاهد (بدون پیش‌تیمار)، هیدروپرایمینگ، کلرید سدیم، اسید سالیسیلیک، نیتروپروساید سدیم، باکتری حل‌کننده فسفر و پتاسیم، طیف کامل ۲۰ آمینواسید ضروری، نیترات پتاسیم و سولفات روی بودند. نتایج نشان داد که تیمارهای سدیم‌نیتروپروساید، هیدروپرایمینگ، اسید سالیسیلیک و سولفات روی با کاهش دما از توقف فعالیت جوانه‌زنی جلوگیری کردند و از میان آن‌ها، تیمار نیتروپروساید سدیم توانست درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، پراکسید هیدروژن و کاتالاز با کاهش دما به ۵ درجه سلسیوس نسبت به شاهد به ترتیب ۵/۷، ۱۹، ۴ و ۱۵ درصد بهبود دهد. علاوه بر آن، تیمار مذکور در شرایط دمای ۲۰ درجه سلسیوس نیز در صفات آلفاآمیلاز و پراکسید هیدروژن به ترتیب منجر به بهبود ۲ و ۴/۷ درصدی نسبت به شاهد شد. درمجموع، اثر پیش‌تیمارها بر تحمل به سرما در مرحله جوانه‌زنی، مشخص کرد که تنش سرما باعث کاهش جوانه‌زنی بذر و سرعت جوانه‌زنی می‌شود و اثر منفی بر شاخص‌های جوانه‌زنی، فعالیت آنزیمی و بیوشیمیایی دارد. اما کاربرد پیش‌تیمارها به‌ویژه نیتروپروساید سدیم اثر تنش سرمایی را تعدیل کرد و باعث بهبود ویژگی‌های بذر تحت تنش سرما شد.

کلمات کلیدی: پراکسید هیدروژن، اسید سالیسیلیک، نیتروپروساید سدیم، هیدروپرایمینگ

The effects of seed priming on improvement of cold tolerance in germination stage of some in pea genotypes

M. Mohammadi[1], R. Tavakol Afshari[2*], J. Nabati[3], E. Oskoueian[4]

1. MS. Graduate on Seed Technology, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad.
2. Member of faculty, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
3. Member of staff, Ferdowsi University of Mashhad, Research Center for Plant Sciences.
4. Member of staff, Mashhad Branch Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Mashhad.
(Received: Aug. 09, 2022 – Accepted: Nov. 24, 2022)

Abstract

Identification of primings that induce secondary metabolites in order to withstand cold stress can be effective in the establishment and yield of crops. This experiment was conducted in the laboratory conditions as a completely randomized design with three replications to evaluate the effect of seed priming on cold tolerace of three genotypes and one cultivar of chickpea during germination stage in 2020. Treatments include temperatures of 5, 10, 15 and 20 ° C, genotypes of MCC505, ILC8617, MCC495 and Saral cultivar and primings included control (non-primed), hydropriming, sodium chloride, acid salicylic, sodium nitroprusside, phosphorus and potassium soluble bacteria, Full spectrum of 20 essential amino acids, potassium nitrate, zinc sulfate. Results indicated that the treatments of sodium nitroprusside, hydropriming, acid salicylic and zinc sulfate prevented the germination activity from stopping due to the decrease in temperature and among them, sodium nitroprusside treatment was able to improve germination percentage, germination rate, hydrogen peroxide and catalase under 5 ° C compared to the control by 5.7, 19, 4 and 15%, respectively. In addition, the above treatmens under 20 ° C resulted in 2 and 4.7% improvement in alpha-amylase and hydrogen peroxide, respectively. Generally, the effect of priming on cold tolerance at the germination stage showed that cold stress reduces seed germination and germination rate and has a negative effect on germination indices, enzymatic and biochemical activity. However, the use of primings, especially sodium nitroprusside, moderated the effect of cold stress and improved seed characteristics under cold stress.

Keywords: Hydrogen peroxide, Acid salicylic, Sodium nitroprusside, Hydropriming.

* Email: tavakolafshar@um.ac.ir

مقدمه

حبوبات به‌ویژه نخود (*Cicer arietinum* L.) در زمره گیاهانی قرار دارند که باوجود فواید بسیاری که در زراعت و کشاورزی دارا هستند اما به دلیل محدودیت‌های محیطی ازجمله تنش‌های زیستی و غیر زیستی در نظام‌های زراعی ایران کمتر موردتوجه قرار می‌گیرند. سطح زیر کشت و تولید نخود در ایران به ترتیب حدود ۴۵۶ هزار هکتار و ۲۰۰ هزار تن در سال می باشد (FAO, 2019). ایران یازدهمین کشور جهان ازلحاظ تولید نخود پس از کشورهای هند، ترکیه، روسیه، میانمار، پاکستان، اتیوپی، آمریکا، استرالیا، کانادا و مکزیک است (FAO, 2019). در مقایسه عملکرد نخود میان سال‌های ۲۰۱۶ و ۲۰۱۹ مشخص گردید که به ترتیب از ۵۴۰ کیلوگرم در هکتار به ۴۴۰ کیلوگرم در هکتار رسیده است (FAO, 2019). دلیل این امر را می‌توان به حساسیت این گیاه به تنش‌های زیستی و محیطی نسبت داد.

گیاهان از سازوکارهای متعددی جهت مقابله با تنش‌های محیطی بهره می‌گیرند و با تحریک یا فعال سازی متابولیت های ثانویه سعی بر انطباق بر محیط دارند و بنابراین درجات مختلفی از تحمل را نشان می‌دهند (Ghasemi et al., 2017). سرما یکی از تنش‌های محیطی می‌باشد که از طریق اختلال در ساختمان سلول‌ها موجب ازهم گسیختگی غشا می‌شود. همچنین با کاهش جذب آب و فعالیت مولکول‌ها در تنش سرما، در واکنش‌های شیمیایی اخلال ایجاد می‌گردد (Achard et al., 2008). انباشته شدن املاح سازگار یکی از مکانیسم‌های رایج برای تحمل تنش است. املاح سازگار یا اسمولیت‌ها، ترکیب‌هایی با حلالیت بالا و وزن مولکولی کم و غیرسمی هستند. این املاح یا به صورت مستقیم از طریق محلول‌پاشی یا ریشه به گیاهان اعمال می‌شود یا به‌وسیله تحریک گیاه از طریق پیام‌رسان‌های ثانویه تولید می‌شود. پیش‌تیمار کردن بذر علاوه بر مزایایی که در فعالیت‌های ترمیمی، بهبود سرعت جوانه‌زنی (Taylor and Harman, 1990) و تسریع در استقرار و یکنواختی (Basra et al., 2005) در مزرعه دارد ، توانایی گیاه چه را در جذب سریع‌تر آب و عناصر غذایی بالا می‌برد. همچنین گیاهانی که دارای املاح سازگار بالایی هستند می‌توانند فتوسنتز بالاتری داشته باشد و همچنین در زمان وقوع یخبندان به دلیل غلظت بالای شیره سلولی سطحی از تحمل به سرما را از خود بروز دهند (Finch-Savage et al., 2004). از راهکارهای افزایش تولید املاح سازگار استفاده از روش پیش تیمار بذر می‌باشد.

پیش‌تیمار شامل فرآیندی است که در نتیجه آن تا مرحله دوم جوانه‌زنی اجازه جذب آب به بذر داده می‌شود ولی از ورود به مرحله سوم جوانه‌زنی به دلیل ممانعت از خروج ریشه‌چه جلوگیری می‌شود (Ghaderi far et al., 2008). نتایج تحقیقات گسترده درباره اثرات پیش‌تیمار روی بذور مختلف نشان داده که اعمال پیش‌تیمار موجب تسهیل فرآیندهای مرتبط با جوانه‌زنی و القای مقاومت سیستماتیک بذرهای نخود و عدس (*Lens culinaris* L.)، لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna radiate* L.) و یونجه (*Medicago sativa* L.) می شود (Ghassemi-Golezani et al., 2008). پژوهش‌ها روی ترکیب‌های مورد استفاده به عنوان پیش‌تیمار نشان داده است که باکتری‌های تحریک کننده رشد گیاه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) با دو جنبه فیزیولوژیکی (آبگیری بذر) و زیستی (تلقیح بذر با موجودات زنده مفید) منجر به افزایش فراهمی عناصر غذایی از طریق محلول کردن آن‌ها و تولید متابولیت‌های باکتریایی مانند سیدروفورها به ترتیب نقش مهمی در تغذیه گیاه و مقاومت سیستمیک در گیاهان دارد (Singh et al., 2016). پیش‌تیمار با محلول‌های نمکی نیز از طریق جذب کنترل شده و آهسته (Halmer, 2004) و محدود کردن خسارت اکسیداتیو (Randhir and Shetty, 2005) و فعال‌سازی سیستم پیام‌رسانی (Mahakham et al., 2017) تاثیرات مثبتی در رشد و نمو و مقاومت گیاهان ایجاد می‌کند.

با توجه به کشت دیم نخود در ایران تنش خشکی از مهم‌ترین عوامل کاهش عملکرد در گیاهان زراعی به‌ویژه نخود است. جهت کاهش اثرات تنش خشکی تطبیق زمان رشد گیاه با شرایط مطلوب جوی یک راهکار مناسب می باشد. برای این منظور کشت پاییزه نخود جهت بهره‌برداری از شرایط بارندگی ها می‌تواند از برخورد مراحل انتهایی رشد با تنش خشکی جلوگیری نماید. علی‌رغم تمام ویژگی‌های مثبت کشت پاییزه تنش سرما عامل اصلی استقرار ضعیف گیاهان که نتیجه آن عملکرد ضعیف است (Galandari, 2015). علاوه بر این رطوبت نامطلوب هنگام کشت نیز موجب جوانه‌زنی و استقرار ضعیف می‌گردد.

از آنجا که کشت پاییزه نخود با مسائلی از قبیل سرما و خشکی ناشی از سرما مواجه است لذا برطرف نمودن مسائل مربوطه در جوانه‌زنی بذر قدمی نخست در پیش‌اندازی استقرار گیاهچه است. بنابراین این مطالعه به‌منظور بررسی اثر پیش‌تیمارهای مختلف در دماهای متفاوت جهت بهبود افزایش تحمل به سرما بر جوانه‌زنی بذر نخود انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش اثر پیش‌تیمارها بر تحمل به سرما در مرحله جوانه‌زنی بذر سه ژنوتیپ و یک رقم نخود کابلی (ILC8617، MCC495، MCC505 و رقم سارال)، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. بذرهای مورداستفاده در سال زراعی ۱۳۹۷ تولید و در بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد نگهداری و تهیه شدند. به منظور بررسی واکنش نخود کابلی به پیش‌تیمارها و دماهای مختلف از بذرهای با مشخصات متفاوت استفاده شد. ویژگی‌های ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

تیمارهای دمایی مورداستفاده شامل ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درجه سلسیوس بودند. پیش تیمارها شامل ۱۰ سطح، شاهد (بدون پیش‌تیمار)، پیش‌تیمار بذر در آب (آب مقطر)، اسید سالیسیلیک ($C_7H_6O_3$) نیم میلی مولار (Farahbakhsh, 2012)،طیف کامل ۲۰ اسیدآمینه ضروری ۲۰ سی‌سی در لیتر، نیتروپروساید سدیم ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) ۲۰ میکرومولار (Amooaghaie and Nikzad, 2013)، باکتری حل‌کننده پتاسیم و فسفات ۱۰۰ سی سی در لیتر، نیترات پتاسیم (KNO_3) ۰/۵ درصد (Čanak et al., 2016)، سولفات روی ($ZnSO_4$) ۰/۰۵ درصد (Arif et al., 2007) و کلرید سدیم ($NaCl$) ۰/۶۷ مگا پاسکال (Ebadi and Gollojeh, 2009) بودند.

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های نخود موردمطالعه به همراه منشأ آن‌ها

Table 1- Characteristics of the studied chickpea genotypes along with their origin

ژنوتیپ Genotype	منشأ Origin	شجره Pedigree	نوع Type	واکنش به سرما Reaction to cold	منبع Reference
MCC†505 (ILC533)	مصر Egypt	ردیابی نشده Not traced	کابلی Kabuli	حساس Sensitive	(Bahmani et al., 2020)
ILC‡8617	ایکاردا ICARDA	ILC482 (mutation)	کابلی Kabuli	متحمل Tolerated	(Singh et al., 1995)
Sel93TH24460 (سارال)	ایکاردا ICARDA	ILC3470 × ILC8617	کابلی Kabuli	مقاوم Resistant	(Saeed et al., 2010)
MCC495	ایکاردا ICARDA	Flip93-262c	کابلی Kabuli	متوسط Medium	(Beihaghi et al., 2010)

MCC: کلکسیون نخود مشهد،

†MCC: Mashhad Chickpea Collection, †† International Legume Chickpea.

باکتری‌های حل‌کننده فسفات مجموعه‌ای از سویه‌های *Bacillus* sp؛ و *Pseudomonas* sp؛ و باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم مجموعه‌ای از سویه‌های Bacillus sp؛ و Pseudomonas بودند که بومی ایران بوده از نقاط مختلف جمع‌آوری و تکثیر شدند. تراکم جمعیت باکتری 10^7 سلول در میلی‌لیتر مایع تلقیح بود. اسیدآمینه شامل پروفایل کامل اسیدآمینه بود. به عبارتی طیف کاملی از ۲۰ اسیدآمینه ضروری را شامل می‌شد. باکتری‌ها و اسیدآمینه مورداستفاده از شرکت دانش‌بنیان خوشه پروران زیست فناور (دایان) تهیه گردید.

جهت اجرای آزمایش و اعمال تیمارها، بذرها به مدت پنج ساعت در دمای ۲±۲۰ درجه سلسیوس (Hiremath et al., 2021) پیش‌تیمار، سپس بذرها در شرایط استریل از محلول خارج و سه بار با آب مقطر شستشو شدند. آب اضافی به‌وسیله کاغذ صافی گرفته شد و سپس در دمای محیط رطوبت بذرها به سطح اولیه کاهش داده شد (Khodabakhsh et al., 2011). در مرحله بعد تعداد ۲۵ عدد بذر از هر تیمار در حوله کاغذی قرار گرفته به ژرمیناتور (گروک) در دماهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. شمارش بذرها به‌صورت روزانه انجام گرفت و بذرهای با خروج بیشتر از دو میلی‌متر ریشه‌چه جوانه‌زده محسوب شد (Cheng et al., 2013).

درصد جوانه‌زنی نهایی (FGP) (Ellis and Roberts, 1980) و سرعت جوانه‌زنی (GR)(Agrawal, 2003) با استفاده از معادله‌های شماره ۱ و ۲ اندازه‌گیری شد.

$$FGP=(Ni/N)\times 100 \quad \text{معادله (۱)}$$

$$GR=\sum(n/t) \quad \text{معادله (۲)}$$

در این معادله N_i تعداد کل بذرهای جوانه‌زده در روز آخر، N تعداد کل بذرها، n تعداد تجمعی بذرهای جوانه‌زده در t روز است.

اندازه‌گیری ویژگی‌های بیوشیمیایی شامل فعالیت H_2O_2 (Sergiev et al., 1997) و کاتالاز (Dhindsa et al., 1981) نیز در انتهای آزمایش روی بافت برگی انجام شد. آنزیم آلفا آمیلاز (Xiao et al., 2006) به دلیل فعالیت بالای آن در جنین، ۱۲ ساعت پس از انکوباسیون و قبل از اینکه ریشه‌چه‌ای خارج شود، در بافت بذری اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab ver. 18 و مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود تمامی اثرات ساده و دوگانه ازنظر درصد و سرعت جوانه‌زنی معنی‌دار بود.

نتایج نشان داد در ژنوتیپ MCC495 بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار نیتروپروساید سدیم بود که با تیمار شاهد (بدون پیش‌تیمار) چهار درصد تفاوت داشت (جدول ۳)؛ اما در ژنوتیپ ILC8617 و رقم سارال اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و نیتروپروساید سدیم مشاهده نشد (جدول ۳). درواقع در رقم سارال همه تیمارها (به‌استثنای تیمار باکتری حل‌کننده پتاسیم) و در ژنوتیپ ILC8617 نیز همه تیمارها اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند (جدول ۳).

بیشترین درصد جوانه‌زنی تحت تأثیر ژنوتیپ و دما در ژنوتیپ ILC8617 و رقم سارال در دمای ۲۰ درجه سلسیوس حاصل شد که با تیمارهای ژنوتیپ MCC505 و MCC495 با دمای ۲۰ درجه سلسیوس تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۴). با کاهش دما به پنج درجه سلسیوس درصد جوانه‌زنی در تمام ژنوتیپ‌ها کاهش پیدا کرد که این کاهش در ژنوتیپ‌های MCC505 و MCC495 بیشتر بود (جدول ۴). این نتایج نشان می‌دهد که ژنوتیپ ILC8617 و رقم سارال نسبت به دو ژنوتیپ دیگر سرمادوست‌تر هستند که می‌توان برای کشت در مناطق سرد از آن‌ها استفاده کرد.

جدول ۲- منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی نخود پیش‌تیمار شده تحت تأثیر دما

Table 2- Sources of variation, degree of freedom and mean squares of germination percentage and germination rate in priming chickpeas under temperature

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	درصد جوانه‌زنی FGP	سرعت جوانه‌زنی GR
ژنوتیپ Genotype (G)	3	554**	8.67**
پیش تیمار Priming (P)	9	282**	4.40**
دما Temperature (T)	3	101792**	1590**
ژنوتیپ × پیش‌تیمار G × P	27	8.69*	0.136*
ژنوتیپ × دما G × T	9	75.2**	1.17**
پیش تیمار × دما P× T	27	53.1**	0.831**
ژنوتیپ×پیش‌تیمار×دما G ×P×T	81	5.17ns	0.081ns
خطا Error	320	5.53	0.086
ضریب تغییرات (٪) C.V. (%)		3.73	3.72

ns، *، ** به ترتیب غیر معنی‌دار سطح احتمال پنج درصد، معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد. C.V: ضریب تغییرات

ns, *, ** non-significant of 5 percent probability, significance of 5 and 1 percent of probability, C.V: Coefficient of variation, respectively.

جدول ۳- اثر پیش تیمار و ژنوتیپ‌های نخود بر درصد جوانه‌زنی

Table 3 - Effect of priming and chickpea genotypes on germination percentage

پیش تیمار Priming	ژنوتیپ Genotype			رقم Cultivar
	MCC505	ILC8617	MCC495	Saral
شاهد Control	62.3e-k	64.6a-g	60.6h-m	65.6a-f
هیدروپرایمینگ Hydropriming	64.6a-g	68.0a	63.0d-j	67.6ab
کلرید سدیم Sodium Chloride	58.0l-n	63.0d-j	58.0l-n	62.6d-k
اسید سالیسیلیک Salicylic acid	63.0d-j	65.0a-g	61.6g-l	66.0a-e
نیتروپروساید سدیم Sodium nitroprusside	65.6a-f	67.6ab	64.6a-g	68.3a
باکتری‌های حل‌کننده فسفر Phosphorus-soluble bacteria	59.0k-n	63.3c-j	59.0k-n	62.0f-k
باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم Potassium-soluble bacteria	59.6j-m	62.3e-k	55.3n	61.6g-l
اسیدآمینه Amino acid	62.0f-k	62.0f-k	57.6mn	62.6d-k
نیترات پتاسیم Potassium nitrate	62.6d-k	65.3a-g	60.3i-m	64.3b-h
سولفات روی Zinc sulfate	64.3b-h	67.0a-c	63.6c-i	66.3a-d

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

جدول ۴- اثر ژنوتیپ و دما بر درصد جوانه‌زنی بذر نخود

Table 4 - Effect of genotype and temperature on germination percentage of chickpea

دما Temperature (°C)	ژنوتیپ Genotype			رقم Cultivar
	MCC505	ILC8617	MCC495	Saral
20	99.7a	100a	99.8a	100a
15	67.2c	71.3b	63.3d	71.2b
10	52.8f	55.8e	50.2g	55.4e
5	28.8i	32.1h	28.1i	32.2h

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level.

بیشترین درصد جوانه‌زنی تحت تأثیر پیش‌تیمار و دما در پیش‌تیمارهای هیدروپرایمینگ و نیتروپروساید سدیم و دمای ۲۰ درجه سلسیوس حاصل شد که با بقیه پیش‌تیمارها با دمای ۲۰ درجه سلسیوس تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۵). در دمای ۲۰ درجه سلسیوس مشخص گردید که تفاوت معنی‌داری در درصد جوانه‌زنی بین تیمارها وجود ندارد (جدول ۵). همچنین در دمای ۱۵ درجه سلسیوس بالاترین درصد جوانه‌زنی در تیمارهای شاهد، هیدروپرایمینگ، کلرید سدیم، اسید سالیسیلیک، نیتروپروساید سدیم، نیترات پتاسیم و سولفات روی بود این در حالی است که بین این تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۵).

جدول ۵- اثر پیش تیمار و دما بر درصد جوانه‌زنی بذر نخود

Table 5 - The effect of seed priming and temperature on the germination percentage of chickpea

پیش تیمار Priming	دما Temperature (°C)			
	20	15	10	5
شاهد Control	100a	69.6b-d	54.3h-j	29.3mn
هیدروپرایمینگ Hydropriming	100a	72.3bc	58.3fg	32.6lm
کلرید سدیم Sodium Chloride	99a	68.6cd	49.3k	24.6o
اسید سالیسیلیک Salicylic acid	100a	69.6b-d	55.0g-i	31.0mn
نیتروپروساید سدیم Sodium nitroprusside	100a	73.3b	58.0f-h	35.0l
باکتری‌های حل‌کننده فسفر Phosphorus-soluble bacteria	100a	64.3e	51.0jk	28.0no
باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم Potassium-soluble bacteria	100a	61.3ef	49.6k	28.0no
اسیدآمینه Amino acid	100a	63.3e	51.0jk	30.0mn
نیترات پتاسیم Potassium nitrate	100a	68.3d	52.3i-k	32.0lm
سولفات روی Zinc sulfate	100a	71.6b-d	57.0gh	32.6lm

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

در دمای ۱۰ درجه سلسیوس بالاترین درصد جوانه‌زنی در پیش‌تیمار هیدروپرایمینگ حاصل گردید به‌طوری‌که چهار درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ولی نسبت به تیمارهای اسید سالیسیلیک، نیتروپروساید سدیم و سولفات روی تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۵). با کاهش دما به پنج درجه سلسیوس درصد جوانه‌زنی بذرهای تیمار شده با نیتروپرو ساید سدیم نسبت به شاهد افزایش ۵/۷ درصدی پیدا کرده است ولی بین تیمار شاهد با تیمارهای هیدروپرایمینگ، نیترات پتاسیم و سولفات روی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۵). این امر نشان می‌دهد که تیمار نیتروپروساید سدیم باعث بهبود درصد جوانه‌زنی در دماهای پایین در بذر نخود می‌شود.

پژوهش‌های گذشته بیانگر این است که اکسید نیتروژن از طریق تحریک مسیرهای انتقال پیام تنش، موجب پاسخ سلول‌های گیاه شده که منجر به افزایش سنتز هورمون‌های جیبرلین و اتیلن می‌شود که به دلیل نقش مهم این هورمون‌ها در فرآیند جوانه‌زنی موجب افزایش درصد جوانه‌زنی می‌شود (Širová et al., 2011). در مطالعه‌ای، افزایش درصد جوانه‌زنی بذر بادام‌زمینی (*Arachis hypogaea*) و آفتاب‌گردان (*Helianthus annuus* L.) درنتیجه کاربرد نیتروپروساید سدیم را به علت نقش اکسید نیتروژن در کاتابولیسم هورمون آبسیزیک اسید و تحریک مسیر پیام‌رسانی هورمون اتیلن ذکر کرده‌اند که سبب افزایش تولید پیش ساز هورمون اتیلن شده و به‌تبع آن جوانه‌زنی تحت شرایط تنش افزایش یافت (Arc et al., 2013). همچنین بررسی‌ها نشان داده است که پیش تیمار نیتروپروساید سدیم در بذرهای گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) قادر است درصد جوانه‌زنی را به علت فعال‌سازی آنزیم بتا دی گلوکاناز و تحریک مسیر بیوسنتزی هورمون جیبرلین افزایش دهد (Hayat et al., 2014). علاوه بر این کاربرد اکسید نیتروژن به صورت نیتروپرو ساید سدیم به وسیله افزایش آنزیم‌های هیدرولیز کننده نشاسته موجب افزایش ساکارز به عنوان ماده غذایی اصلی جنین می شود که اثر مستقیمی بر درصد جوانه‌زنی بذور دارد (Bialecka and Kepczynski, 2010). همچنین کاربرد اکسید نیتروژن به صورت نیتروپروساید سدیم موجب افزایش ظرفیت بذر و افزایش جذب آب در فرآیند آبنوشی می‌شود (Liu et al., 2007).

بررسی تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهمکنش ژنوتیپ و پیش‌تیمار، ژنوتیپ و دما، پیش‌تیمار و دما بر سرعت جوانه‌زنی معنی‌دار بود (جدول ۲). به‌طوری‌که در ژنوتیپ‌های MCC495 بیشترین و کمترین سرعت جوانه‌زنی به ترتیب مربوط به تیمار نیتروپروساید سدیم و باکتری حل‌کننده پتاسیم بود که با تیمار شاهد (بدون پیش‌تیمار) ۶/۵ و ۹/۶ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند؛ اما در ژنوتیپ های ILC8617 و MCC505 و رقم سارال تفاوت معنی‌داری بین تیمار شاهد و نیتروپروساید سدیم مشاهده نشد (جدول ۶).

بیشترین سرعت جوانه‌زنی تحت تأثیر ژنوتیپ و دما در ژنوتیپ ILC8617 و رقم سارال و دمای ۲۰ درجه سلسیوس حاصل شد که با ژنوتیپ MCC505 و MCC495 در دمای ۲۰ درجه سلسیوس تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۷). با کاهش دما به پنج درجه سلسیوس سرعت جوانه‌زنی در تمام ژنوتیپ‌ها کاهش پیدا کرد که این کاهش در ژنوتیپ‌های MCC505 و MCC495 بیشتر بود (جدول ۷).

در دمای ۲۰ درجه سلسیوس تفاوت معنی‌داری در سرعت جوانه‌زنی بین تیمارها وجود نداشت (جدول ۸). همچنین در دمای ۱۵ درجه سلسیوس بالاترین سرعت جوانه‌زنی در تیمارهای شاهد، هیدروپرایمینگ، کلرید سدیم، اسید سالیسیلیک، نیتروپروساید سدیم، نیترات پتاسیم و سولفات روی بود این در حالی است که بین این تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در دمای ۱۰ درجه سلسیوس بالاترین سرعت جوانه‌زنی در تیمار هیدروپرایمینگ حاصل گردید به‌طوری‌که هفت درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ولی نسبت به تیمارهای

اسید سالیسیلیک، نیتروپروساید سدیم و سولفات روی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین سرعت جوانه‌زنی در دمای پنج درجه سلسیوس در تیمار نیتروپروساید سدیم حاصل گردید که نسبت به تیمار شاهد ۱۹ درصد افزایش یافت ولی نسبت به تیمارهای هیدروپرایمینگ، نیترات پتاسیم و سولفات روی تفاوت معنی‌داری نداشت.

جدول ۶- اثر پیش تیمار و ژنوتیپ بر سرعت جوانه‌زنی بذر نخود

Table 6 - Effect of seed priming and genotype on chickpea germination rate

پیش تیمار Priming	ژنوتیپ Genotype		رقم Cultivar	
	MCC505	ILC8617	MCC495	Saral
شاهد Control	7.79e-k	8.08a-g	7.58h-m	8.20a-f
هیدروپرایمینگ Hydropriming	8.08a-g	8.50ab	7.87d-j	8.45ab
کلرید سدیم Sodium Chloride	7.25l-n	7.87d-j	7.25l-n	7.83d-k
اسید سالیسیلیک Salicylic acid	7.87d-j	8.12a-g	7.70g-l	8.25a-e
نیتروپروساید سدیم Sodium nitroprusside	8.20a-f	8.45ab	8.08a-g	8.54a
باکتری‌های حل‌کننده فسفر Phosphorus-soluble bacteria	7.37k-n	7.91c-j	7.37k-n	7.75f-k
باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم Potassium-soluble bacteria	7.45j-m	7.79e-k	6.91n	7.70g-l
اسیدآمینه Amino acid	7.75f-k	7.75f-k	7.20mn	7.83d-k
نیترات پتاسیم Potassium nitrate	7.83d-k	8.16a-g	7.54i-m	8.04b-h
سولفات روی Zinc sulfate	8.04b-h	8.37a-c	7.95c-i	8.29a-d

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

جدول ۷- اثر ژنوتیپ و دما بر سرعت جوانه‌زنی بذر نخود

Table 7- Effect of genotype and temperature on chickpea germination rate

دما Temperature (°C)	ژنوتیپ Genotype		رقم Cultivar	
	MCC505	ILC8617	MCC495	Saral
20	12.4a	12.5a	12.4a	12.5a
15	8.40c	8.91b	7.91d	8.90b
10	6.60f	6.98e	6.28g	6.93e
5	3.60i	4.01h	3.51i	4.03h

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

جدول ۸- تأثیر پیش تیمار و دما بر سرعت جوانه‌زنی بذر نخود

Table 8- Effect of seed priming and temperature on chickpea germination rate

پیش تیمار Priming	دما Temperature (°C)			
	20	15	10	5
شاهد Control	12.5a	8.70b-d	6.79h-j	3.66mn
هیدروپرایمینگ Hydropriming	12.5a	9.04bc	7.29fg	4.08lm
کلرید سدیم Sodium Chloride	12.3a	8.58cd	6.16k	3.08o
اسید سالیسیلیک Salicylic acid	12.5a	8.70b-d	6.87g-i	3.87mn
نیتروپروساید سدیم Sodium nitroprusside	12.5a	9.16b	7.25f-h	4.37l
باکتری‌های حل‌کننده فسفر Phosphorus-soluble bacteria	12.5a	8.04e	6.37jk	3.50no
باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم Potassium-soluble bacteria	12.5a	7.66ef	6.20k	3.50no
اسیدآمینه Amino acid	12.5a	7.91e	6.37jk	3.75mn
نیترات پتاسیم Potassium nitrate	12.5a	8.54d	6.54i-k	4.00lm
سولفات روی Zinc sulfate	12.5a	8.95b-d	7.12gh	4.08lm

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

یکی از رایج‌ترین خسارت‌های تنش دمای پایین افزایش رادیکال‌های فعال آزاد اکسیژن مانند رادیکال هیدروکسیل و سوپر اکسید می‌باشد. این رادیکال‌های فعال موجب آسیب رسیدن به DNA سلول‌ها و درنتیجه باعث کاهش شاخص‌های جوانه‌زنی می‌شود (Hasegawa et al., 2000). جذب آب در تیمار کلرید سدیم احتمالا درنتیجه ریز بودن مولکول‌های کلرید سدیم منجر به حلالیت بالای آن شده است که این امر باعث می‌شود یون‌های کلرید سدیم به سلول نفوذ کرده و سمیت سلولی ناشی از کلرید سدیم را باعث شده است (Moynihan et al., 1995) و درنهایت منجر به کاهش سرعت جوانه‌زنی شده است به‌طوری‌که در تیمار ذکر شده نسبت به شاهد با کاهش دما از ۱۵ درجه سلسیوس، مقدار سرعت جوانه‌زنی در دماهای ۱۰ و پنج درجه سلسیوس به ترتیب ۱۰ و ۱۸ درصد تفاوت معنی‌دار شده است.

بررسی تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش ژنوتیپ و پیش‌تیمار، ژنوتیپ و دما، پیش‌تیمار و دما بر فعالیت نسبی آنزیم آلفاآمیلاز معنی‌دار بود (جدول ۹).

بر اساس نتایج این پژوهش، تیمارهای نیتروپروساید سدیم، سولفات روی، هیدروپرایمینگ و اسید سالیسیلیک در ژنوتیپ MCC505، تیمارهای نیتروپروساید سدیم و هیدروپرایمینگ در ژنوتیپ ILC8617 و تیمارهای نیتروپروساید سدیم و سولفات روی در ژنوتیپ MCC495 نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار داشتند (جدول ۱۰). در رقم سارال به‌استثنای تیمار باکتری حل‌کننده پتاسیم، در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد (جدول ۱۰).

جدول ۹- منابع تغییر، درجه آزادی و میانگین مربعات آلفاآمیلاز، پراکسید هیدروژن و کاتالاز ژنوتیپ‌های نخود پیش‌تیمار شده تحت تأثیر دما

Table 9- Sources of variation, degree of freedom and mean squares of α-amylase, hydrogen peroxide and catalase in seed priming chickpeas under temperature

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	آلفاآمیلاز α-amylase	پراکسید هیدروژن H_2O_2	کاتالاز Catalase
ژنوتیپ Genotype (G)	3	84.1**	0.033**	0.00**
پیش تیمار Priming (P)	9	45.4**	0.096**	0.00**
دما Temperature (T)	3	11296**	74.1**	0.064**
ژنوتیپ × پیش‌تیمار G × P	27	1.50**	0.001ns	0.00ns
ژنوتیپ × دما G × T	9	3.10**	0.002ns	0.00**
پیش تیمار × دما P× T	27	1.60**	0.015**	0.00**
ژنوتیپ×پیش‌تیمار×دما G ×P×T	81	0.400ns	0.001ns	0.00ns
خطا Error	320	0.600	0.001	0.00
ضریب تغییرات (٪) C.V. (%)		1.01	1.27	6.34

سطح احتمال پنج درصد، معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد. C.V: ضریب تغییرات

ns, *, ** Respectively non-significant of 5 percent probability, significance of 5 and 1 percent of probability, C.V: Coefficient of variation.

جدول ۱۰- تأثیر پیش تیمار بذر و ژنوتیپ‌های نخود بر فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز (واحد بر گرم وزن بذر)

Table 10- The effect of seed priming and genotype on the activity of α-amylase enzyme (units per gram of seed weight) of chickpea

پیش تیمار Priming	ژنوتیپ Genotype			رقم Cultivar
	MCC505	ILC8617	MCC495	Saral
شاهد Control	74.6o-s	76.4d-l	74.9m-s	76.9a-j
هیدروپرایمینگ Hydropriming	76.4e-l	78.1a	75.8h-o	77.7a-d
کلرید سدیم Sodium Chloride	73.7st	75.5k-r	73.7st	75.6j-q
اسید سالیسیلیک Salicylic acid	75.9g-n	76.7c-k	75.5k-r	77.1a-h
نیتروپروساید سدیم Sodium nitroprusside	77.2a-g	77.9abc	76.8b-k	78.0ab
باکتری‌های حل کننده فسفر Phosphorus-soluble bacteria	74.5p-t	76.1f-m	74.2rst	75.6j-q
باکتری‌های حل کننده پتاسیم Potassium-soluble bacteria	74.6n-s	75.8i-p	73.3t	75.6k-q
اسیدآمینه Amino acid	75.7i-p	75.6j-q	74.4q-t	76.1e-m
نیترات پتاسیم Potassium nitrate	75.9g-o	77.0a-i	75.1l-r	76.7c-k
سولفات روی Zinc sulfate	76.4d-l	77.4a-e	76.3e-l	77.4a-f

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

فعالیت نسبی آنزیم آلفاآمیلاز تحت تأثیر ژنوتیپ و دما نشان داد که با کاهش دما میزان فعالیت آنزیم در ژنوتیپ ها کاهش یافت (جدول ۱۱). به‌نحوی که رفتار ژنوتیپ ILC8617 با رقم سارال و همچنین دو ژنوتیپ MCC505 و MCC495 در هریک از دماها مشابه بود این بدان معنی است که تفاوت معنی‌داری میان آن‌ها مشاهده نشد (جدول ۱۱)؛ و فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز به‌طور میانگین میان ژنوتیپ های مشابه در دمای پنج درجه سلسیوس نسبت به دمای ۲۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۳۵ و ۳۴ درصد کاهش یافت (جدول ۱۱). از سوی دیگر بیشترین میزان فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز مربوط به ژنوتیپ ILC8617 و رقم سارال می‌باشد (جدول ۱۱).

جدول ۱۱- اثر ژنوتیپ‌های نخود و دما بر فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز (واحد بر گرم وزن بذر)

Table 11- The effect of genotype and temperature on the activity of α-amylase enzyme (units per gram of seed weight) of chickpea seeds

دما Temperature (° C)	ژنوتیپ Genotype			رقم Cultivar
	MCC505	ILC8617	MCC495	Saral
20	87.7b	89.0a	87.3b	89.2a
15	77.7d	79.3c	76.8e	79.2c
10	71.2g	72.1f	70.7g	72.1f
5	65.4i	66.1h	65.2i	66.1h

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

جدول ۱۲- اثر پیش تیمار بذر و دما بر فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز (واحد بر گرم وزن بذر) نخود

Table 12- Effect of seed priming and temperature on the activity of α-amylase enzyme (units per gram of seed weight) chickpea seeds

پیش تیمار Priming	دما Temperature (°C)			
	20	15	10	5
شاهد Control	87.5de	78.3hi	71.5lm	65.5o-q
هیدروپرایمینگ Hydropriming	89.5ab	79.7fg	72.6kl	66.2op
کلرید سدیم Sodium Chloride	87.1e	76.9j	70.0n	64.5q
اسید سالیسیلیک Salicylic acid	88.8a-c	78.7gh	71.8k-m	65.9op
نیتروپروساید سدیم Sodium nitroprusside	89.9a	80.3f	72.9k	66.7o
باکتری‌های حل کننده فسفر Phosphorus-soluble bacteria	87.5de	77.0j	70.8mn	65.2pq
باکتری‌های حل کننده پتاسیم Potassium-soluble bacteria	87.1e	76.4j	70.6mn	65.2pq
اسیدآمینه Amino acid	87.9cde	77.2ij	71.1mn	65.6o-q
نیترات پتاسیم Potassium nitrate	88.5b-d	78.5g-i	71.6lm	66.1op
سولفات روی Zinc sulfate	89.4ab	79.5f-h	72.4kl	66.2op

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش پیش تیمار و دما نیز حاکی از کاهش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز درنتیجه کاهش دما بود (جدول ۱۲). به‌طوری‌که در دمای ۲۰ درجه سلسیوس تیمارهای نیتروپروساید سدیم، هیدروپرایمینگ، سولفات روی و اسید سالیسیلیک نسبت به هم تفاوت معنی‌داری نداشتند و به‌طور میانگین نسبت به شاهد سبب افزایش معنی‌دار دو درصدی میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز شد و در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت شاهد مشاهده نشد (جدول ۱۲). در دمای ۱۵ درجه سلسیوس تیمارهای نیتروپروساید سدیم و هیدروپرایمینگ نسبت به همدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند و به‌طور میانگین نسبت به شاهد نیز سبب افزایش معنی‌دار دو درصدی میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز شد ولی میان تیمارهای سولفات روی، نیترات پتاسیم، آمینواسید و اسید سالیسیلیک تفاوت معنی‌داری نسبت شاهد مشاهده نشد (جدول ۱۲). در دمای ۱۰ درجه سلسیوس تنها تیمار نیتروپروساید سدیم سبب تحریک معنی‌دار فعالیت آلفا آمیلاز بذر در مقایسه با سایر تیمارها شد و نسبت به تیمار شاهد حدود دو درصد افزایش یافت اما سایر تیمارها به‌استثنای کلرید سدیم تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند (جدول ۱۲). درنهایت در دمای پنج درجه سلسیوس تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد در هیچ‌یک از تیمارها مشاهده نشد (جدول ۱۲).

نیتروژن اکسید به منظور شرکت در فرآیندهای فیزیولوژیکی متفاوت، نقش‌های گوناگونی در گیاهان ایفا می‌کند که شامل فرآیندهای جوانه‌زنی، سنتز اتیلن، فعالیت روزنه و پاسخ به تنش‌های مختلف زنده و غیرزنده می‌باشد (Delledonne, 2005). سرما باعث القای سنتز هورمون جیبرلین در بذر می شود و این هورمون اثر آنتاگونیستی بر هورمون اسید آبسیزیک دارد که تنش سرما منجر به کاهش این هورمون می‌گردد. هورمون جیبرلین موجب فعال‌سازی و تحریک سنتز آنزیم‌های هیدرولیز کننده نشاسته ازجمله آنزیم آلفا آمیلاز می‌گردد. این آنزیم در تجزیه نشاسته و تولید قند ساکارز فعالیت دارد. علاوه بر این در فرآیند جوانه‌زنی که همراه با افزایش هورمون جیبرلین می‌باشد، آنزیم‌هایی نظیر پروتئولیتیک‌ها نیز در شل شدگی دیواره سلولی به کار می‌روند که منجر به سست شدن دیواره سلولی می‌شود (Copeland and McDonald, 1995). البته ترکیب نیتروپرو ساید سدیم در غلظت پایین‌تر اثر بهتری را نشان داده است زیرا میزان زیاد NO ممکن است با رادیکال اکسیژن ترکیب شود و پروکسی نیتریت را تشکیل دهد که موجب آسیب به گیاه می‌شود (Neill et al., 2002).

بررسی تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهمکنش پیش‌تیمار و دما بر محتوای پراکسید هیدروژن معنی‌دار بود (جدول ۹).

داده‌های حاصل از تأثیر سرما بر مقدار H_2O_2 نشان داد که تیمار سرما موجب افزایش معنی‌دار مقدار H_2O_2 شد (جدول ۱۳) که نشان‌دهنده بروز تنش ثانویه اکسیداتیو می‌باشد که باعث اثرات جبران ناپذیر غشا از جمله پراکسیداسیون لیپیدها شود (Khorshidi and Nojavan, 2006). پیش تیمار بذر با نیتروپروساید سدیم به‌طور مستمر با کاهش دما تأثیر معنی‌داری در کاهش مقدار H_2O_2 تحت شرایط تنش سرما داشت (جدول ۱۳). کاربرد نیتروپروساید سدیم به‌صورت پیش تیمار بذور محتوای پراکسید هیدروژن را در دماهای ۲۰، ۱۵، ۱۰ و پنج درجه سلسیوس به ترتیب ۴/۷، ۸/۱ و ۸/۲ چهار درصد نسبت به شاهد کاهش داد (جدول ۱۳). علاوه بر تیمار نیتروپروساید سدیم، تیمارهای اسید سالیسیلیک در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، تیمارهای هیدروپرایمینگ، اسید سالیسیلیک، باکتری حل‌کننده فسفر، نیترات پتاسیم و سولفات روی در دمای ۱۵ درجه سلسیوس، تیمارهای هیدروپرایمینگ، اسید سالیسیلیک، نیترات پتاسیم، سولفات روی و آمینواسید در دمای ۱۰ درجه سلسیوس و تیمارهای هیدروپرایمینگ، نیترات پتاسیم و سولفات روی در دمای پنج درجه سلسیوس نیز توانستند به‌طور معنی‌داری مقدار پراکسید هیدروژن را نسبت به شاهد کاهش دهند (جدول ۱۳).

جدول ۱۳- اثر پیش تیمار بذر و دما بر محتوای پراکسید هیدروژن (میکرومول بر گرم وزن‌تر) نخود

Table 13- Effect of seed priming and temperature on hydrogen peroxide content (micromoles per gram of fresh weight) of chickpeas

پیش تیمار Priming	دما Temperature (°C)			
	20	15	10	5
شاهد Control	1.75n	2.12j	2.77d	3.56a
هیدروپرایمینگ Hydropriming	1.74n	2.03kl	2.67fg	3.44bc
کلرید سدیم Sodium Chloride	1.73no	2.11j	2.76d	3.55a
اسید سالیسیلیک Salicylic acid	1.67o	2.02k-m	2.65fg	3.50ab
نیتروپروساید سدیم Sodium nitroprusside	1.67o	1.96m	2.56hi	3.42c
باکتری‌های حل‌کننده فسفر Phosphorus-soluble bacteria	1.69no	1.98lm	2.71d-f	3.53a
باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم Potassium-soluble bacteria	1.70no	2.08jk	2.73de	3.53a
اسیدآمینه Amino acid	1.71no	2.08jk	2.68e-g	3.53a
نیترات پتاسیم Potassium nitrate	1.70no	2.03kl	2.63gh	3.44bc
سولفات روی Zinc sulfate	1.72no	2.04kl	2.55i	3.43bc

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

جدول ۱۴- تأثیر ژنوتیپ‌های نخود و دما بر فعالیت آنزیم کاتالاز (واحد بر گرم وزن تر)

Table 14- Effect of genotype and temperature on enzyme activity of catalase (units per gram fresh weight) of chickpea seeds

دما Temperature (° C)	ژنوتیپ Genotype			رقم Cultivar
	MCC505	ILC8617	MCC495	Saral
20	0.030f	0.030f	0.030f	0.031f
15	0.034e	0.035e	0.034e	0.035e
10	0.050d	0.053c	0.050d	0.053c
5	0.081ab	0.083a	0.079b	0.082a

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

پراکسید هیدروژن در اندام‌های مختلفی ازجمله کلروپلاست‌ها، پراکسی‌زوم‌ها، میتوکندری‌ها و غشا پلاسمایی به ترتیب توسط واکنش‌های مهلر، تنفس نوری، مسیر انتقال الکترون و پراکسیدازها و NADPH اکسیدازها تولید می‌شود (Hung et al., 2005). در مطالعه حاضر احتمال می‌رود که کاهش دما با افزایش تولید گونه‌های فعال و آزاد اکسیژن ازجمله آنیون سوپراکسید منجر به تشکیل H_2O_2 می‌شود. افزایش H_2O_2 در اثر کاهش دما را می‌توان به فعالیت کم آنزیم‌های تجزیه‌کننده H_2O_2 نیز نسبت داد.

پژوهشگران اظهار نمودند که در نتیجه افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، کاربرد نیتروپرو ساید سدیم منجر به کاهش آنها شده است که این امر در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد (Li et al., 2008). نیتریک اکساید نیز به عنوان یک رادیکال فعال با دیگر رادیکال‌های سلولی وارد واکنش شده و تولید ماده‌ای با سمیت کمتری به نام پراکسی نیتریت می‌کند و از این طریق موجب کاهش خسارت‌های سلولی می‌شود (Scheel, 1998). کاتالاز با تجزیه پراکسید هیدروژن به مولکول‌های آب و اکسیژن، از اثرات زیان‌آور جلوگیری می‌کند و مانع خسارت به سلول‌های گیاهی به ویژه کلروپلاست که نقش مهمی در فتوسنتز دارد، می‌شود (Mittler, 2002).

بررسی تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهمکنش ژنوتیپ‌های نخود و دما، پیش‌تیمار و دما بر فعالیت آنزیم کاتالاز معنی‌دار بود (جدول ۹).

جدول ۱۵- اثر پیش تیمار و دما بر فعالیت آنزیم کاتالاز (واحد بر گرم وزن تر) نخود

Table 15- Effect of seed priming and temperature on enzyme activity of catalase (units per gram of fresh weight) of chickpeas

پیش تیمار Priming	دما Temperature (°C)			
	20	15	10	5
شاهد Control	0.028o	0.031l-o	0.043h	0.075c
هیدروپرایمینگ Hydropriming	0.028o	0.036i-k	0.052e-g	0.085a
کلرید سدیم Sodium Chloride	0.029no	0.031l-o	0.044h	0.075c
اسید سالیسیلیک Salicylic acid	0.032l-o	0.036i-k	0.053ef	0.084ab
نیتروپروساید سدیم Sodium nitroprusside	0.032l-n	0.038i	0.057d	0.088a
باکتری‌های حل‌کننده فسفر Phosphorus-soluble bacteria	0.031l-o	0.034kl	0.050g	0.076c
باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم Potassium-soluble bacteria	0.030m-o	0.034kl	0.048g	0.076c
اسیدآمینه Amino acid	0.030m-o	0.034k-m	0.051fg	0.081b
نیترات پتاسیم Potassium nitrate	0.031l-o	0.034j-l	0.055de	0.084ab
سولفات روی Zinc sulfate	0.030no	0.038ij	0.058d	0.087a

میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون LSD در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter are not significantly different at the P < 0.05 level of Least Significant Difference.

مقایسه میانگین داده‌های آنزیم کاتالاز نشان داد که در شرایط بدون تنش (دمای ۲۰ درجه سلسیوس) فعالیت این آنزیم در تمام تیمارها (جدول ۱۵) و ژنوتیپ‌ها (جدول ۱۴) کمتر از شرایط تنش‌زا (دمای کمتر از ۲۰ درجه سلسیوس) بود. به‌طوری‌که دمای پنج درجه سلسیوس فعالیت کاتالاز را در ژنوتیپ‌های MCC505، ILC8617 و MCC495 و رقم سارال به ترتیب ۲/۶، ۲/۷، ۲/۶ و ۲/۶ برابر نسبت به دمای ۲۰ درجه سلسیوس افزایش داد (جدول ۱۴).

در دمای ۲۰ درجه سلسیوس کمترین فعالیت کاتالاز در بذور پیش تیمار نشده (شاهد) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با مقدار حاصل از کاربرد نیتروپروساید سدیم داشت اما با سایر تیمارهای آبنوشی تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱۵). بیشترین فعالیت کاتالاز در دمای پنج درجه سلسیوس و پیش تیمار نیتروپروساید سدیم و هیدروپرایمینگ ثبت شد که به‌طور میانگین توانست فعالیت کاتالاز را ۱۵ درصد نسبت به شاهد افزایش دهد این در حالی است که با تیمارهای اسید سالیسیلیک، نیترات پتاسیم و سولفات روی تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱۵). در دمای ۱۰ درجه سلسیوس تمام تیمارها (به‌استثنای تیمار کلرید سدیم) ازلحاظ آماری نسبت به شاهد برتر بودند (جدول ۱۵). این در حالی بود که بین تیمار کلرید سدیم و شاهد تفاوت معنی‌داری ثبت نشد و بیشترین فعالیت کاتالاز در دمای مذکور در تیمار نیتروپرو ساید سدیم و سولفات روی حاصل شد (جدول ۱۵). در دمای ۱۵ درجه سلسیوس اگرچه بیشترین فعالیت کاتالاز در تیمار نیتروپروساید سدیم حاصل شد اما تفاوت معنی‌داری با تیمارهای اسید سالیسیلیک، هیدروپرایمینگ و سولفات روی از خود نشان نداد (جدول ۱۵).

پژوهش‌ها نشان داده کاربرد نیتروپروساید سدیم به‌صورت پیش‌تیمار، منجر به القای بیان ژن‌های کد کننده کاتالاز می‌شود (Qiao et al., 2014). کاتالاز به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی در تجزیه پراکسید هیدروژن نقش مهمی را ایفا می‌کند که منجر به حذف ترکیب‌های مخرب‌کننده سلول می‌شود و از این طریق شرایطی را برای افزایش راندمان سلول فراهم می‌کند (Šírová et al., 2011). برخی پژوهشگران بیان داشته‌اند اکسید نیتروژن با حذف گونه های فعال اکسیژن، موجب بهبود ظرفیت تحمل به تنش در گیاهان می‌گردد (Qiao et al., 2014; Šírová et al., 2011). در این مطالعه بر نقش آنزیم کاتالاز در حذف H_2O_2 تحت تنش اکسیداتیو ناشی از سرما تأکید شده است.

در این مطالعه، به نظر می‌رسد اعمال پیش‌تیمارها روی بذور نخود منجر به ایجاد تنش خفیفی ناشی از پیش‌تیمار در بذر می‌شود که باعث بروز پیامدهایی از قبیل افزایش پراکسید هیدروژن می‌گردد که نهایتاً به‌واسطه این تنش پاسخی متقابلاً از سوی بذر جهت رفع پیامدهای ایجادشده مانند افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز داده می‌شود. بر همین اساس، تنش سرما منجر به تشدید افزایش پراکسید هیدروژن و تخفیف فعالیت آنزیم کاتالاز می‌گردد که نتیجه نهایی آن کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص ویگور، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاه‌چه می‌باشد. از سوی دیگر، برخی از پیش‌تیمارهای اعمال شده مانند نیتروپروساید سدیم و هیدروپرایمینگ توانستند با القای افزایش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز محتوای کربوهیدرات‌های محلول را افزایش دهند. کربوهیدرات‌های محلول به‌واسطه افزایش غلظت شیره سلولی منجر به دشوار کردن اثر سرما بر فرآیندهای جوانه‌زنی می‌شوند. همچنین، کربوهیدرات‌های محلول به‌واسطه نقشی که در تغذیه جنین دارند شرایط رشد و نمو را فراهم می‌کنند. درمجموع، کاربرد پیش‌تیمارها به‌ویژه نیتروپروساید سدیم از طریق افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و آلفاآمیلاز به ترتیب نقش مهمی در مدیریت کنترل پراکسید هیدروژن و

کربوهیدرات‌های محلول تحت تأثیر تنش سرما دارند و از این طریق شرایط مساعدی را نسبت به تیمار شاهد بر شاخص‌های جوانه‌زنی اعم از درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، شاخص ویگور، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و گیاه‌چه فراهم می‌آورند. این نتایج همان‌طور که در طی مقاله آورده شده در راستای پژوهش‌های گذشته قرار می‌گیرد اما با این تفاوت که در این مطالعه بینش همراه با آگاهی، دانش همراه با دانایی و راهکار همراه با توانایی همسو قرار می‌گیرند و شکاف دانشی در رابطه با راهکارهای مقابله با تنش سرما در مرحله جوانه‌زنی نخود را به‌وسیله کاربرد روشی نو پر کرده‌اند.

نتیجه‌گیری

درمجموع، اثر پیش‌تیمارها بر تحمل به سرما در مرحله جوانه‌زنی، مشخص کرد که تنش سرما باعث کاهش جوانه‌زنی بذر و سرعت جوانه‌زنی می‌شود و اثر منفی بر شاخص‌های جوانه‌زنی، فعالیت آنزیمی و بیوشیمیایی دارد. کاربرد پیش تیمارها اثر تنش سرمایی را تعدیل کرد و باعث بهبود عملکرد بذر تحت تنش سرما شد. پیش تیمار نیتروپروساید سدیم از مؤثرترین پیش‌تیمارها و رقم سارال نیز رقم برتر در این پژوهش بود.

منابع

Reference

Achard, P., F. Gong, S. Cheminant, M. Alioua, P. Hedden, and P. Genschik. 2008. The cold-inducible CBF1 factor–dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. Plant Cell. 20(8):2117-2129.

Agrawal, R. L. 2003. Seed technology. Publication. Co. PVT. LTD. New Delhi India. 64:229-236.

Amooaghaie, R., and K. Nikzad. 2013. The role of nitric oxide in priming-induced low-temperature tolerance in two genotypes of tomato. Seed Science Res. 23(2):123-131.

Arc, E., J. Sechet, F. Corbineau, L. Rajjou, and A. Marion-Poll. 2013. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. Front. Plant Sci. 4(63): 1-19.

Arif, M., M. Waqas, K. Nawab, and M. Shahid. 2007. Effect of seed priming in Zn solutions on chickpea and wheat. Afr Crop Sci Conf Proc. 8:237-240.

Cheng, X.Y., Y. Wu, J.P. Guo, B. Du, R.Z. Chen, L.L. Zhu, and G.C. He. 2013. A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination. Plant J. 76:687-698.

Bahmani, M., R. Maali-Amiri, M. Javan-Nikkhah, O. Atghia, and A.J.R. Rasolnia. 2020. Enhanced Tolerance to Ascochyta Blight in Chickpea Plants via Low Temperature Acclimation. Rus J. Plant Physiol. 67(4):758-766.

Basra, S. M.A., M. Farooq, R. Tabassam, and N. Ahmad. 2005. Physiological and biochemical aspects of pre-sowing seed treatments in fine rice (*Oryza sativa* L.). Seed Sci. Technol. 33(3):623-628.

Beihaghi, M., A. Bagheri, A.R. Bahrami, F. Shahriari, and A. Nezami. 2010. The possible role of Phosphoenolpyrovate Carboxykinase (PEPCK) in protein content of chickpea seeds (*Cicer arietinum* L.). Iranian J. Pulses Res. 1(1):57-64.

Bialecka, B., and J. Kepczynski. 2010. Germination, alpha-, beta-amylase and total dehydrogenase activities of Amaranthus caudatus seeds under water stress in the presence of ethephon or gibberellin A3. Acta Biol Cracoviensia S. Botanica. 52(1):7-12.

Čanak, P., M. Mirosavljević, M. Ćirić, B. Vujošević, J. Kešelj, D. Stanisavljević, and B. Mitrović. 2016. Seed priming as a method for improving maize seed germination parameters at low temperatures. Ratarstvo i povrtarstvo. 53(3):106-110.

Copeland, L., and M. McDonald. 1995. Principals of seed science and technology. Chapman and Hall.

Delledonne, M. 2005. NO news is good news for plants. Curr. Opin. plant Biol. 8(4):390-396.

Dhindsa, R. S., P. Plumb-Dhindsa, and T.A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Exp. Bot. 32(1):93-101.

Ebadi, A., and S.K. Gollojeh. 2009. Effects of seed priming on growth and yield of chickpea under saline soil. Rec. Res. Sci. Technol. 1(6): 282-286.

Ellis, R., and E. Roberts. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. Ann. Bot. 45(1):13-30.

FAO. 2019. FAO Year Book [Online]. Available at http:/faostat.fao.org/site/.

Farahbakhsh, H. 2012. Germination and seedling growth in unprimed and primed seeds of fennel as affected by reduced water potential induced by NaCl. Int. Res J. Appl. Basic Sci. 3(4):737-744.

Finch-Savage, W., K. Dent, and L. Clark. 2004. Soak conditions and temperature following sowing influence the response of maize (*Zea mays* L.) seeds to on-farm priming (pre-sowing seed soak). Field Crops Res. 90(2-3):361-374.

Galandari, S. 2015. seed priming. Int. conf. Res. Sci. Technol Kualalumpur -malaysia. 14th December 2015.

Ghaderi far, A., E. Soltani, A. Soltani, and A.A. MIRI. 2008. Effect of priming on response of germination to temperature in cotton. J. Agric Sci. Nat. Res. 15(3):44-51.

Ghasemi , R., A. Bagheri, N. Moshtaghi, and F. Shokouhi. 2017. The pattern of CBF and P5CS genes expression under freezing stress and effects of cold acclimation on free proline changes in chickpea (*Cicer arietinum*). Iranian J. Pulses Res. 8(2):31-43.

Ghassemi-Golezani, K., A.A. Aliloo, M. Valizadeh, and M. Moghaddam. 2008. Effects of different priming techniques on seed invigoration and seedling establishment of lentil (*Lens culinaris Medik*). J. Food Agric. 6(2):222.

Halmer, P. 2004. Methods to improve seed performance in the field. Pp 125-166. *In* R.L. Benech-Arnold and R.A. Sanchez(eds.)Handbook of seed physiology: applications to agricultures. Food Product Press, New York.

Hasegawa, P. M., R.A. Bressan, J.K. Zhu, and H.J. Bohnert. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Ann. Rev. Plant Biol. 51(1):463-499.

Hayat, S., S. Yadav, M. Alyemeni, and A. Ahmad. 2014. Effect of sodium nitroprusside on the germination and antioxidant activities of tomato (*Lycopersicon esculentum Mill*). Bulg J. Agric Sci. 20(1):140-144.

Hiremath, U., B. Gowda, G. Lokesh, and B. Ganiger. 2021. Development of priming technology for enhanced planting value of seeds in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). J. Appl Nat Sci. 13(2):735-743.

Hung, S.H., Y. Chih-Wen, and C.H. Lin. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. Bot Bull Acad Sinica. 46.

Khodabakhsh, F., R. Amooaghaie, A. Mostajeran, and G. Emtiazi. 2011. Effect of hydro and osmopriming in Two commercial chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars on germination, growth parameters and nodules number in salt stress condition. Iranian J. Plant Biol. 2(4):71-86.(In Persian)

Khorshidi, M., and A. Nojavan. 2006. The effects of abscisic acid and CaCl2 on the activities of antioxidant enzymes under cold stress in maize seedlings in the dark. Pakistan J. Biol Sci. 9:54-59.

Li, H., H.B. Niu, J. Yin, M.B. Wang, H.B. Shao, D.Z. Deng, X. Chen, J.P. Ren, and Y.C. Li. 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). Colloids Surfaces B: Biointerfaces. 65(2):220-225.

Liu, H.Y., X. Yu, D.Y. Cui, M.H. Sun, W.N. Sun, Z.C. Tang, S. Kwak, and W.A. Su. 2007. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. Cell Res. 17(7):638-649.

Mahakham, W., A.K. Sarmah, S. Maensiri, and P. Theerakulpisut. 2017. Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. Sci Rep. 7:8263-8272.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trend. Plant Sci. 7(9):405-410.

Moynihan, M.R., A. Ordentlich, and I. Raskin. 1995. Chilling-induced heat evolution in plants. Plant Physiol. 108(3):995-999.

Neill, S.J., R. Desikan, A. Clarke, and J.T. Hancock. 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. Plant Physiol. 128(1):13-16.

Qiao, W., C. Li, and L.M. Fan. 2014. Cross-talk between nitric oxide and hydrogen peroxide in plant responses to abiotic stresses. Environ. Exp. Bot. 100:84-93.

Randhir, R., and K. Shetty. 2005. Developmental stimulation of total phenolics and related antioxidant activity in light- and dark-germinated corn by natural elicitors. Process Biochem. 40:1721–1732.

Saeed, A., R. Darvishzadeh, H. Hovsepyan, and A.J. Asatryan. 2010. Tolerance to freezing stress in Cicer accessions under controlled and field conditions. Afr. J. Biotechnol. 9(18):2618-2626.

Scheel, D. 1998. Resistance response physiology and signal transduction. Curr. Opin Plant Biol. 1(4):305-310.

Sergiev, I., V. Alexieva, and E. Karanov. 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 51(3):121-124.

Singh, A., R. Gupta, and R. Pandey. 2016. Rice seed priming with picomolarrutin enhances rhiospheric Bacillus subtilis CIM colonization and plant growth. PLoS One. 11(1):e0146013.

Singh, K., R. Malhotra, and M.J. Saxena. 1995. Additional sources of tolerance to cold in cultivated and wild Cicer species. Crop Sci. 35(5):1491-1497.

Šírová, J., M. Sedlářová, J. Piterková, L. Luhová, and M. Petřivalský. 2011. The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. Plant Sci. 181(5):560-572.

Tabatabaei, S.A., and O. Ansari. 2018. Quantification of safflower (*Carthamus tinctorius*) seed germination response to water potential and priming: hydro time models on the basis of normal, weibull and gumbel distributions. Environ. Stresses Crop Sci. 11(2):327-340.

Taylor, A., and G. Harman. 1990. Concepts and technologies of selected seed treatments. Ann. Rev. Phytopathol. 28(1):321-339.

Xiao, Z., R. Storms, and A. Tsang. 2006. A quantitative starch? Iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. Analytical Biochem. 351(1):146-148.