علوم و تحقیقات بذر ایران
سال ششم/ شماره چهارم/ ۱۳۹۸ (۴۵۶ - ۴۴۱)

DOI: 10.22124/jms.2020.3923

اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر نشت کاتیونی و قابلیت حیات بذرهای نخود ایرانی (*Cicer arietinum*) رقم هاشم

مهدی شعبان[1*]، فرشید قادری فر[2]، حمیدرضا صادقی پور[3]، احد یامچی[4]

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۱

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر خصوصیات جوانه‌زنی، نشت الکترولیت‌ها و همچنین بررسی قدرت و قابلیت حیات بذرهای نخود زراعی تحت این دو شرایط و مقایسه این دو نوع زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۴ اجرا شد. آزمایش به‌صورت طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. تیمارها شامل ۸ سطح (انبارداری طبیعی ۲، ۴ سال، زوال مصنوعی ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ روز و شاهد) بودند. صفات مورد بررسی در این مطالعه درصد جوانه‌زنی، درصد گیاهچه عادی، سرعت جوانه‌زنی، شاخص قدرت بذر، هدایت الکتریکی، پراکسیداسیون لیپید و میزان سدیم و پتاسیم بذرها قبل و پس از آبنوشی و همچنین مقدار آن‌ها در محلول آبشویی‌شده بودند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار زوال بر همه خصوصیات جوانه‌زنی و نشت کاتیونی به جز میزان سدیم بذر قبل از آبشویی معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص قدرت بذر و درصد گیاهچه عادی در شدت‌های زوال مصنوعی ۴ و ۵ روز بیش‌تر از انبارداری طبیعی ۲ و ۴ سال بود. تولید مالون‌دی‌آلدئید، هدایت الکتریکی و نشت سدیم و پتاسیم در آب نیز با افزایش شدت زوال مصنوعی تا ۵ روز نسبت به انبارداری طبیعی افزایش بیش‌تری یافت که به‌دلیل عدم توانایی غشاها در حفظ انسجام خود بود. با افزایش شدت زوال میزان سدیم و پتاسیم باقیمانده در بافت بذری کاهش یافت. همچنین رنگ‌آمیزی بذور با تترازولیوم و نیتروبلوتترازولیوم نشان داد که افزایش شدت زوال سبب کاهش قابلیت حیات بذرها شد و این کاهش قابلیت حیات در تیمارهای زوال مصنوعی شدید، بیش‌تر از تیمارهای انبارداری طبیعی بود. پراکسیداسیون لیپید طی زوال منجر به خسارت به غشا و افزایش نشت الکترولیت‌ها می‌شود. در نتیجه قابلیت حیات بذرها کاهش یافته و منجر به کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی و کاهش درصد گیاهچه عادی تولیدی شد. این نتایج مشخص نمود که اثر انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی بر خصوصیات جوانه‌زنی، نشت کاتیونی و قابلیت حیات بذرهای نخود مشابه بوده و می‌توان از آزمون زوال مصنوعی در جهت برنامه‌های نگهداری بذرهای نخود در انبار استفاده نمود هر چند ممکن است مکانیسم‌های دخیل در این دو نوع زوال با هم متفاوت باشد.

واژه‌های کلیدی: پتاسیم، تترازولیوم، سدیم، غشا، مالون‌دی‌آلدئید، نخود

۱- دانشجوی دکتری علوم و تکنولوژی بذر، گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۲- دانشیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۳- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران
۴- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
*نویسنده مسئول: morad@yahoo.com

مقدمه

نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان خودگشن از تیره فاباسه (Fabaceae) بوده که به‌طور عمده در غرب آسیا، شمال آفریقا و مناطقی از هندوستان رشد کرده و به‌عنوان یکی از منابع اصلی در رژیم غذایی انسان‌ها اهمیت اساسی دارد (Talebi *et al*., 2008). نگه‌داری طولانی‌مدت بذرها سبب کاهش قابلیت حیات آن‌ها طی فرآیند زوال می‌گردد (Ghaderi-Far *et al*., 2014). سرعت زوال بذر به ساختار ژنتیکی، محیط تولید بذر و شرایط انبارداری بستگی دارد (Kalpana and Madhava-Rao, 1996). افزایش در میزان دما و رطوبت آن سبب کاهش قابلیت حیات بذرها می‌گردد (Lehner *et al*., 2008). از اثرات مهمی که زوال بر بذر می‌گذارد تخریب پروتئین‌های غشای سلولی می‌باشد که در نتیجه نشت الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد. طی انبارداری طبیعی تغییرات فیزیکی و شیمیایی بر پوسته بذر اثر گذاشته و سبب افزایش نفوذپذیری آن‌ها به آب و گازها و در نتیجه افزایش نشت الکترولیت‌هایی مانند یون‌های آلی و غیر آلی، قندها، اسیدهای آمینه و حتی پروتئین‌ها می‌گردد (Govender *et al*., 2008).

بذرهایی که دارای کیفیت بالاتری هستند بهتر سبز شده و در مواجه با تنش‌های محیطی درصد سبز و سرعت جوانه‌زنی بالاتری داشته و گیاهچه‌های نیرومندتری نیز تولید می‌نمایند (Jatoi *et al*., 2001). به‌دنبال زوال بذر، قدرت حیات بذر نیز کاهش یافته و کاشت این بذرها سبب کاهش درصد جوانه‌زنی و سبزشدن و همچنین عدم استقرار یکنواخت گیاهچه در مزرعه می‌گردد (Kapoor *et al*., 2010). زوال تسریع‌شده سبب کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی در بذرهای نخود شده است (Kapoor *et al*., 2010). در شرایط زوال تسریع‌شده گیاهچه‌های غیر عادی بیش‌تری نیز تشکیل می‌گردد (Veselovsky and Veselova, 2012). بذرهای گندمی که زوال یافته‌اند به‌دلیل قابلیت حیات پایین‌تر، درصد جوانه‌زنی و شاخص قدرت بذر کم‌تری نیز داشتند (Mohsen-nasab *et al*., 2010).

خسارت واردشده به غشای سلول عامل اصلی زوال بذر در انبار می‌باشد (McDonald, 1999). مهم‌ترین دلایل زوال پراکسیداسیون لیپیدها بر اثر حمله‌ی گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه آن غیرفعال شدن آنزیم‌ها و تخریب پروتئین‌هاست که سبب بر هم خوردن ساختار غشاهای سلولی می‌گردد (Bailly, 2004). اثرات کلی پراکسیداسیون لیپید کاهش سیالیت غشاست که باعث می‌شود فسفولیپیدها به راحتی بین غشای دو لایه منتقل شوند و موجب افزایش نشت مواد از غشا می‌شوند که به طور طبیعی نمی‌توانند از کانال‌های ویژه عبور کنند و به پروتئین‌های غشا آسیب می‌رسانند و غیرفعال‌شدن پذیرنده‌ها، آنزیم‌ها و کانال‌های یونی را در پی خواهند داشت (Gill and Tuteja, 2010). اتفاقی که طی نگهداری بذرها در انبار به وقوع می‌پیوندد این است که محتوی رطوبتی بذرها کاهش یافته که به‌دنبال این اتفاق کارکرد غشاهای سلولی و فعالیت‌های بیوشیمیایی سلولی نیز کاهش می‌یابد (McDonald, 1999). افزایش میزان رطوبت بذر طی انبارداری سبب تخریب غشاهای سلول به‌خصوص غشای میتوکندری و کاهش قابلیت انبارداری بذرها می‌گردد (Tatipata, 2009). تغییرات اکسیداتیو ایجادشده در فسفولیپیدها بر اثر گونه‌های فعال اکسیژن تمامیت غشای سلولی را به خطر می‌اندازد و سلول قادر نیست به فرآیندهای اسمزی پاسخ دهد و همچنین قادر به حفظ شرایط تورژسانس خود نخواهد بود در نتیجه ساختارهای غشای سلولی به هم خورده و غشاها سلامت خود را از دست داده و میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد. به هر حال بین تجمع تولیدات پراکسیداسیون لیپید و کاهش قدرت حیات بذرها همبستگی وجود دارد (Suruchi *et al*., 2012). قابلیت حیات بذر از مهم‌ترین ویژگی‌های بذر بوده و کارایی و کارکرد بذرها در مزرعه به میزان قابلیت حیات بذرها وابسته است. تحت شرایط رطوبت و دمای بالا کاهش قابلیت حیات بذرها گزارش شده است (Norden, 1981). بین قابلیت حیات بذرها و میزان رطوبت آن‌ها یک رابطه‌ی لگاریتمی وجود دارد. به عنوان نمونه در بذرهای سویا این رابطه با افزایش میزان جذب رطوبت در بذر به‌طور پیوسته وجود دارد (Ellis and Roberts, 1981).

در شرایط انبارداری طبیعی میزان دمای محیط کم بوده و علت اصلی کاهش میزان قابلیت حیات بذرها به‌دلیل تجمع تولید گونه‌های اکسیژن فعال بوده ولی در زوال مصنوعی به‌دلیل این‌که دمای محیط بالاست کاهش قابلیت حیات بذرها به‌دلیل غیرفعال شدن پروتئین‌ها تحت اثر دماهای بالا می‌باشد (Sun, 1998). اگر چه مکانیسم

دقیق از دست‌رفتن قابلیت حیات بذر هنوز مشخص نشده است ولی دلایل متعدد بیوشیمیایی و متابولیکی برای کاهش توان جوانه‌زنی بذرها عنوان شده که پراکسیداسیون لیپیدها و خسارت به غشاهای سلولی و همچنین آسیب به فرآیند سنتز RNA، تخریب DNA، رسوب و غیرفعال شدن آنزیم‌های مختلف از دلایل اصلی آن می‌باشند (Lehner *et al*., 2008). زوال تسریع‌شده سبب کاهش سرعت و درصد جوانه‌زنی شد و علت این امر را کاهش قابلیت حیات بذرها تحت تیمار زوال بیان نمودند (Jatoi *et al*., 2001). همچنین زوال تسریع‌شده سبب کاهش قابلیت حیات بذرهای گندم شده است (McDonald, 1999). آزمون تترازولیوم یکی از آزمون‌های بیوشیمیایی سریع در تعیین قابلیت حیات بذرها می‌باشد (Lakon, 1942) که بر مبنای واکنش تترازولیوم با آنزیم‌های دی‌هیدروژناز ناشی از تنفس بذر آبنوشی‌شده تولید رنگ قرمز فورمازان نموده و وجود این رنگ قرمز نشان‌دهنده زنده‌بودن بذر می‌باشد (Ghaderi-Far *et al*., 2014). چیزی که در آزمون تترازولیوم مهم می‌باشد رنگ‌پذیری جنین می‌باشد و رنگ‌پذیری سایر قسمت‌های بذر از قبیل آندوسپرم اهمیت چندانی ندارد (McDonald, 1999). با توجه به این‌که بیش‌تر مطالعات در مورد زوال بذر با استفاده از زوال مصنوعی تسریع‌شده در دما و رطوبت نسبی بالا انجام شده است، مطالعه همزمان زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی و مقایسه این دو نوع زوال می‌تواند ما را در زمینه درک بهتر فرآیند کاهش قابلیت حیات بذر طی زوال یاری نماید.

از این رو هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر خصوصیات جوانه‌زنی، نشت الکترولیت‌ها و کاتیون‌ها و همچنین بررسی قابلیت حیات آن‌ها و مقایسه دو نوع زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌منظور بررسی اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر خصوصیات جوانه‌زنی، نشت الکترولیت‌ها و کاتیون‌ها و همچنین قابلیت حیات بذور نخود زراعی در سال ۱۳۹۴ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. در این آزمایش از بذرهای نخود رقم هاشم استفاده شد. دلیل استفاده از این رقم این بود که این رقم جدید و پا بلند بوده و به‌صورت مکانیزه با کمباین برداشت می‌گردد و ضروری است که تحقیقات روی جنبه‌های مختلف این ارقام برتر انجام و اطلاعات در مورد آن‌ها کامل‌تر گردد. در این آزمایش بذرهای طبقه گواهی‌شده از موسسه تحقیقات دیم در سرارود واقع در استان کرمانشاه تهیه شدند. از بذرهای تولید سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ برای تیمار انبارداری طبیعی ۴ سال و بذرهای تولید سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰ برای تیمار انبارداری طبیعی ۲ سال انتخاب و به‌ترتیب به‌مدت چهار و دو سال در شرایط طبیعی انبار واقع در شهرستان بروجرد در استان لرستان با دمای متوسط ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۲۵ الی ۳۰ درصد نگه‌داری شدند. از بذرهای تازه برداشت‌شده از مزرعه تحقیقاتی موسسه تحقیقات دیم سرارود نیز به‌عنوان شاهد و تیمارهای زوال مصنوعی استفاده شد. این بذرها در زمان برداشت دارای ۱۲ درصد رطوبت بر اساس وزن خشک بودند که توسط روش خشک‌کردن با آون اندازه‌گیری شد. برای این کار بذرهای نخود در داخل ظروف پلاستیکی به ابعاد ۳/۵×۱۱×۱۱ سانتی‌متر که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود، قرار داده شد. سپس درب ظرف‌ها کاملاً بسته شده و در دمای ثابت ۴۳ درجه سلسیوس به‌مدت ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز در داخل انکوباتور قرار داده شد (Tahmasebi *et al*., 2015). برای انجام آزمون جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در هر تیمار زوال طبیعی و مصنوعی، ۴ تکرار ۲۵تایی از بذر شمارش و روی دو عدد کاغذ حوله‌ای به ابعاد ۴۵×۳۰ سانتی‌متر قرار گرفته و با کاغذی دیگر روی بذرها پوشانده شد و به‌مدت ۸ روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شد (ISTA, 2012). شمارش بذرها روزانه سه بار صورت می‌گرفت. معیار بذرهای جوانه‌زده خروج ریشه‌چه، به اندازه ۲ میلی‌متر یا بیش‌تر بود. در همه تیمارها، معکوس زمان تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی ($1/D_{50}$) به‌عنوان سرعت جوانه‌زنی در نظر گرفته شد (با استفاده از برنامه جرمین). در پایان آزمایش، درصد گیاهچه عادی با شمارش تعداد گیاهچه‌هایی که تمامی اجزای یک گیاهچه کامل را دارا بوده و دارای شکل ظاهری عادی بوده به گونه‌ای که امکان رشد و بقا داشته باشد شمارش و درصد آن‌ها تعیین شد (ISTA, 2013).

شاخص قدرت بذر از حاصل‌ضرب درصد جوانه‌زنی در طول گیاهچه به دست آمد که در این رابطه طول گیاهچه بر حسب سانتی‌متر می‌باشد (Agrawal, 2003):

(رابطه ۱) $SVI=GP*(SL+SR)$

که در آن SVI، شاخص قدرت بذر، GP، درصد جوانه‌زنی، SL، طول ساقه‌چه و SR، طول ریشه‌چه

برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید مقدار ۰/۲۵ گرم بافت بذری با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد در هاون چینی و سپس عصاره به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید مورد استفاده قرار گرفت. به ۲۵۰ میکرولیتر از این عصاره، ۲ میلی‌لیتر معرف TBA ۰/۲۵ درصد اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. بلافاصله لوله‌های آزمایش به‌مدت ۱۵ دقیقه در یک ظرف یخ قرار گرفتند. بعد از این مدت، محلول‌ها دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج های ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. میزان پراکسیداسیون لیپید بر اساس مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) موجود در هر عصاره طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

(رابطه ۲) $LP(nmol.ml^{-1})= LP=[[(A_{532}-A_{600})- [(A_{440}\ A_{600})(\ (MA)]]/155000] * 10^6$

در این رابطه LP مقدار مالون‌دی‌آلدئید بر حسب نانومول بر میلی‌لیتر و MA جذب مولی ساکارز در غلظت‌های ۱۰-۱ میلی‌مولار در ۵۳۲ و ۴۴۰ نانومتر است که به‌ترتیب ۸/۴ و ۱۴۷ محاسبه شد که نسبتی معادل ۰/۰۵۷۱ می‌باشد (Du and Bramlage, 1992).

برای انجام آزمون هدایت الکتریکی از هر رقم تعداد ۵۰ بذر در ۴ تکرار وزن شده و در بشرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند و پس از ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (Hampton and Tekrony, 1995).

اندازه‌گیری میزان سدیم و پتاسیم با روش فلیم فتومتری انجام شد و با روش Hamada و EL-enany انجام شد. به یک گرم از نمونه‌ها ۱۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلایسیال ۱ نرمال اضافه و پس از ۲۴ ساعت به‌مدت ۲ ساعت درون بن ماری با دمای حدود ۸۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و از کاغذ صافی واتمن عبور داده شدند و قرائت انجام شد (Hamada and EL-enany, 1994). کالیبراسیون دستگاه با آب مقطر و محلول استاندارد ۱۰۰ پی‌پی‌ام سدیم و یا پتاسیم انجام شد.

برای تعیین قابلیت حیات بذرها ابتدا آن‌ها را به‌مدت ۴ ساعت بین کاغذ صافی و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده تا آبنوشی انجام شود. سپس به‌مدت ۲ ساعت در محلول یک درصد تری فنیل تترازولیوم کلراید و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از شستشو پوسته آن‌ها حذف و از نمونه‌های بذری و جنین با استفاده از استریومیکروسکوپ (لوپ) عکسبرداری انجام شد (ISTA, 2003).

برای تعیین مکان دقیق تولید و فعالیت رادیکال سوپراکسید از روش رنگ‌آمیزی نیتروبلوتترازولیوم استفاده شد. جهت اعمال تیمار نیتروبلوتترازولیوم با استفاده با استفاده از محلول تریس HCl ۱۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷، محلول ۶ میلی‌مولار نیتروبلوتترازولیوم تهیه شد. پس از آبنوشی بذرها به‌مدت ۴ ساعت، آن‌ها را به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول فوق و در دمای اتاق قرار داده و پس از رنگ‌گیری، جنین از بذر جدا شده و با آب شستشو داده شده و در نهایت با استفاده از استریومیکروسکوپ عکسبرداری انجام شد (Oracz *et al*., 2011).

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به روش LSD با استفاده از نرم افزار SAS انجام و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excell رسم شدند.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر زوال بر خصوصیات درصد و سرعت جوانه‌زنی، درصد گیاهچه عادی، شاخص قدرت بذر، هدایت الکتریکی، مالون‌دی-آلدئید، پتاسیم بذر قبل و بعد از آبشویی، پتاسیم محلول در آب، سدیم بذر پس از آبشویی و سدیم محلول در آب معنی‌دار بود (جدول ۱).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در تیمارهای زوال مصنوعی نشان داد با افزایش تعداد روزهای زوال تا سه روز درصد جوانه‌زنی بذرها به‌میزان اندکی کاهش یافت ولی از سه روز به بعد شیب کاهش درصد جوانه‌زنی بیش‌تر شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مربوط به جوانه‌زنی و خصوصیات نشت کاتیونی بذرهای نخود تحت اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی

Table 1. Analysis of variance of germination traits and cation leakage of chickpea seeds under artificial aging and natural storage

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	درصد گیاهچه عادی Normal seedling percentage	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	شاخص قدرت بذر Seed vigor index	هدایت الکتریکی EC	محتوای مالون دی آلدئید MDA
زوال Aging	7	2556**	5049**	0.000057**	3264718**	747.2**	1441**
خطا Error	24	17	131	0.000001	38254	10.2	28.05
ضریب تغییرات (درصد) CV(%)		5.3	19	3.9	10.66	8.4	8.5

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	پتاسیم بذر قبل از آبشویی Seed K before leaching	پتاسیم بذر پس از آبشویی Seed K after leaching	پتاسیم محلول در آب K in water	سدیم بذر قبل از آبشویی Seed Na before leaching	سدیم بذر پس از آبشویی Seed Na after leaching	سدیم محلول در آب Na in water
زوال Aging	7	0.692*	20.14**	20012.5**	0.026ns	0.649**	3949.2**
خطا Error	24	0.2	0.038	191.66	0.054	0.005	9.11
ضریب تغییرات (درصد) CV(%)		2.32	1.34	2.5	10.4	4.99	4.67

*و** به‌ترتیب سطوح معنی‌داری پنج و یک درصد، ns: غیرمعنی‌دار

* and ** significant in 5% and 1% level respectively, ns: non-significant

بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی در تیمار شاهد به‌میزان ۹۶ درصد و کم‌ترین میزان جوانه‌زنی به‌میزان ۲۴ درصد در تیمار پنج روز زوال مشاهده شد. افت درصد جوانه‌زنی در تیمار انبارداری ۴ سال نسبت به انبارداری ۲ سال و شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در تیمار انبادای ۴ سال درصد جوانه‌زنی بذرها نسبت به شاهد حدود ۱۵ درصد کاهش یافت و در تیمار زوال مصنوعی ۳ روز نیز افت جوانه‌زنی بذرها به همین میزان بود. در زوال طبیعی دو و چهار سال نسبت به زوال‌های شدید چهار و پنج روز افت درصد جوانه‌زنی کم‌تر مشاهده شد (شکل۱-A).

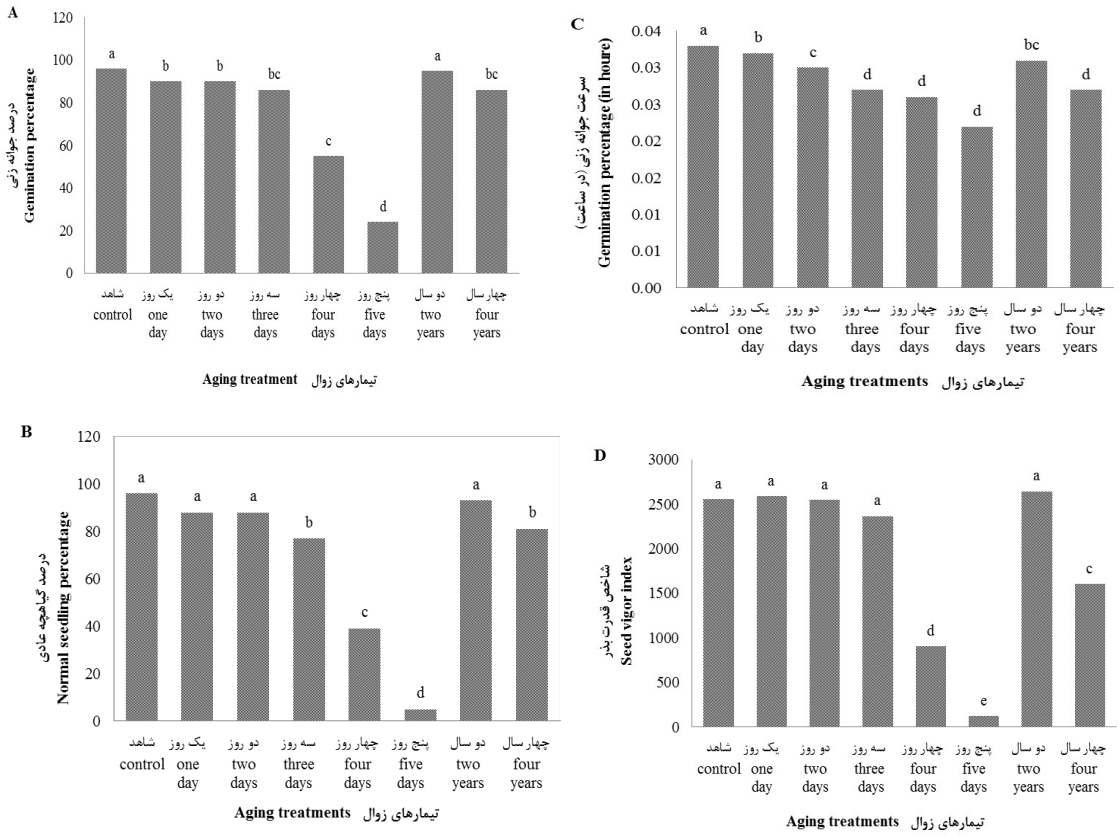
درصد گیاهچه عادی نیز تا زوال مصنوعی سه روز کاهش یافته ولی از آن به بعد تا زوال ۵ روز شیب کاهشی بیش‌تری پیدا کرد. بیش‌ترین درصد گیاهچه عادی با ۹۶ درصد در تیمار شاهد و کم‌ترین میزان آن با ۵ درصد در تیمار زوال پنج روز مشاهده شد. افزایش مدت زمان انبارداری نیز سبب کاهش درصد گیاهچه عادی شد به‌طوری‌که تیمار انبارداری چهار سال با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (شکل۱-B).

در شرایط زوال مصنوعی با افزایش تعداد روزهای زوال سرعت جوانه‌زنی بذرها به‌صورت خطی کاهش یافت. بیش‌ترین میزان سرعت جوانه‌زنی در تیمار شاهد و کم‌ترین میزان سرعت جوانه‌زنی در تیمار پنج روز زوال مشاهده شد. بذرهایی که تحت تیمار انبارداری طبیعی دو سال بودند از نظر سرعت جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری با تیمارهای زوال مصنوعی ۱ و ۲ روز نداشتند.

از طرفی تیمار انبارداری ۴ سال با تیمارهای زوال مصنوعی ۳ و ۴ روز اختلاف معنی‌داری نداشت. در تیمارهای زوال طبیعی دو و چهار سال نسبت به زوال‌های شدید چهار و پنج روز افت سرعت جوانه‌زنی کم‌تر مشاهده شد و این نشان داد که زوال مصنوعی شدید به‌مدت ۵ روز سرعت جوانه‌زنی بذرهای نخود را بیش‌تر از انبارداری طبیعی ۴ سال کاهش داده است (شکل۱-C). داده‌های مربوط به مقایسه میانگین شاخص قدرت بذر نیز نشان داد با افزایش شدت زوال مصنوعی تا ۳ روز این شاخص با شیب اندکی کاهش یافته ولی از آن به بعد و تا زوال ۵ روز شیب کاهش شاخص قدرت بذر بیش‌تر شد به‌طوری‌که در زوال ۵ روز به حداقل میزان خود رسید. کاهش شاخص قدرت بذر در تیمارهای انبارداری طبیعی ۲ و ۴ سال نسبت به زوال مصنوعی ۴ و ۵ روز بالاتر بود (شکل۱-D). تولید مالون‌دی‌آلدئید با افزایش شدت زوال مصنوعی و مدت زمان انبارداری بذرها به‌طور خطی افزایش یافت. بیش‌ترین تولید مالون‌دی‌آلدئید در تیمار زوال مصنوعی ۵ روز به‌میزان حدود ۹۰ نانومول بر گرم بود که نشانه پراکسیداسیون لیپید بیش‌تر در این تیمار می‌باشد. در تیمار انبارداری چهار سال میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید نسبت به تیمار دو سال به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود.

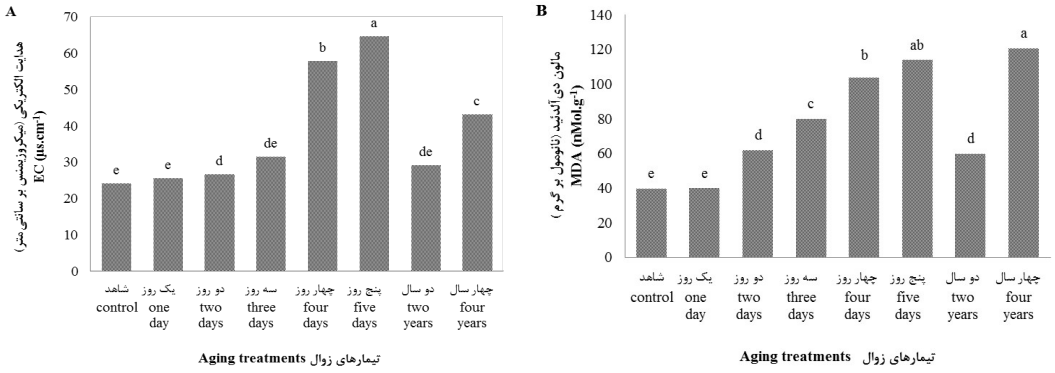
تولید مالون‌دی‌آلدئید در تیمار انبارداری چهار سال بیش‌تر از تیمارهای زوال یک تا چهار روز بود (شکل۲-A).

با افزایش شدت زوال مصنوعی و همچنین با افزایش مدت زمان انبارداری طبیعی میزان هدایت الکتریکی بذرها افزایش یافته که نتیجه خسارت بیش‌تر زوال بر غشاهای سلولی و افزایش نشت الکترولیت‌ها در این شرایط می‌باشد. در تیمار زوال مصنوعی تا سه روز زوال، هدایت الکتریکی با شیب اندکی افزایش یافته ولی از تیمار سه روز به بعد هدایت الکتریکی با شیب بیش‌تری افزایش یافت. در انبارداری دو سال میزان هدایت الکتریکی برابر با ۳۰ دسی‌زیمنس بر متر بوده که از این نظر با تیمارهای ۱و ۲ روز زوال مصنوعی اختلافی نداشت



شکل ۱- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر خصوصیات جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه نخود

Figure 1. Effect of srtificial aging and natural storage on seed germination charactristics and seedling growth of chickpea



شکل ۲- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر محتوای مالون دی‌آلدئید و هدایت الکتریکی بذرهای نخود

Figure 2. Effect of artificial aging and natural storage on MDA and EC of chickpea seeds

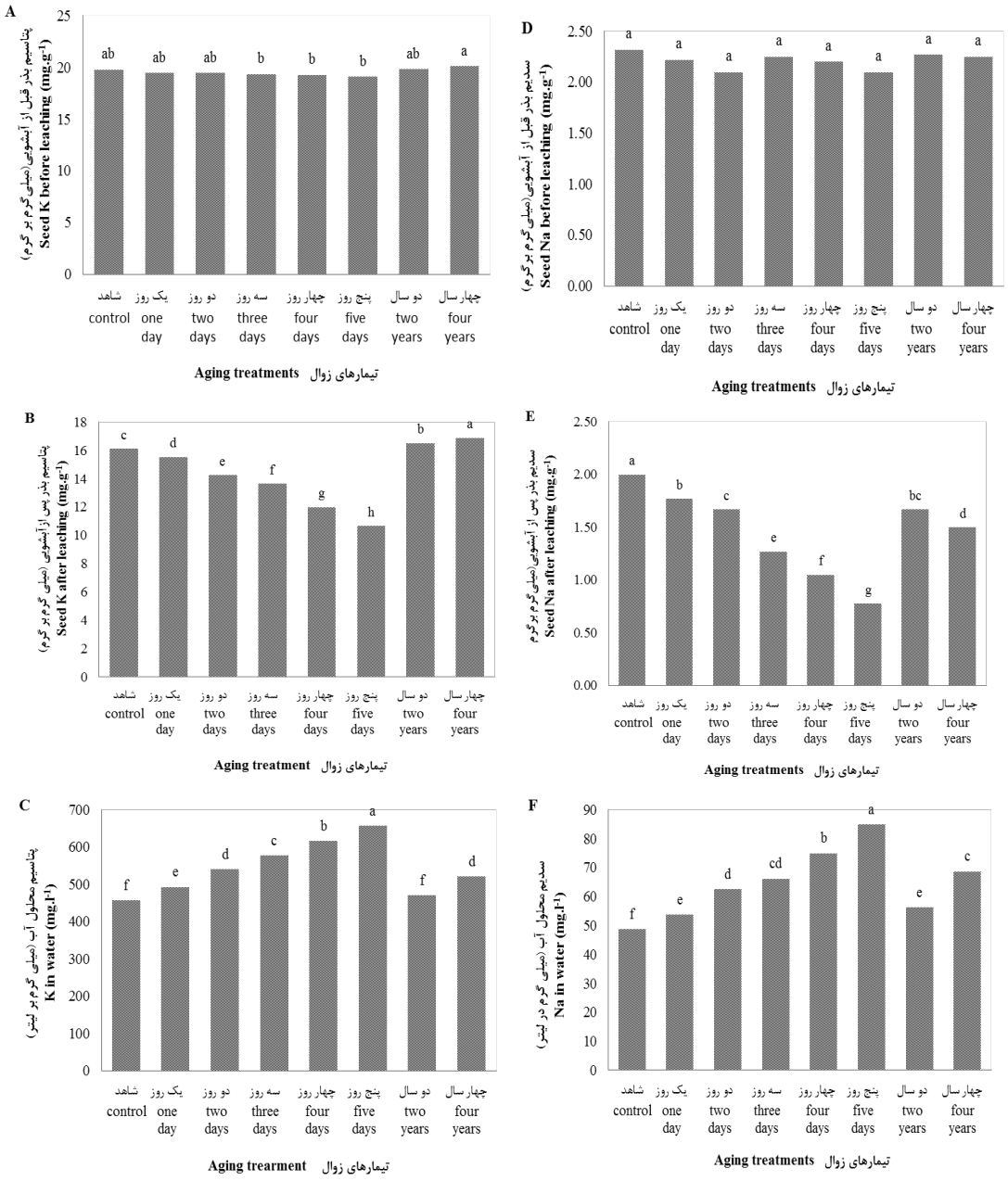
اثر تیمار انبارداری طبیعی ۴ سال بر میزان هدایت الکتریکی بیش‌تر از اثر تیمارهای یک تا سه روز زوال مصنوعی بود ولی در تیمار ۴ و ۵ روز میزان نشت الکترولیت‌ها بیش‌تر از انبارداری چهار سال بود (شکل۲-B). بیش‌ترین میزان پتاسیم بذر قبل از آبشویی (۲۰/۴ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار انبارداری ۴ سال وجود داشت و کم‌ترین میزان پتاسیم بذر (۱۹/۱میلی‌گرم بر گرم) در تیمار زوال ۵ روز حاصل شد (شکل۳-A). تیمارهای انبارداری طبیعی ۲ و ۴ سال دارای بالاترین میزان پتاسیم بذر پس از آبنوشی بودند. با افزایش مدت زمان انبارداری بذرها میزان پتاسیم باقی‌مانده در بذرها پس از آبنوشی افزایش یافت. این درحالی بود که در تیمارهای زوال مصنوعی با افزایش شدت زوال بذر میزان پتاسیم باقیمانده در بافت بذری پس از آبنوشی به‌صورت خطی کاهش یافت و کم‌ترین میزان پتاسیم بذر در بین تیمارهای زوال مصنوعی و در زوال ۵ روز (۱۰/۹ میلی‌گرم بر گرم) مشاهده شد (شکل۳-B). با افزایش شدت زوال مصنوعی میزان پتاسیم نشت‌یافته به داخل محلول به‌صورت خطی افزایش یافت. در مقایسه زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی مشخص گردید میزان نشت پتاسیم در انبارداری طبیعی چهار سال برابر با زوال مصنوعی سه روز بوده و پتاسیم نشت‌یافته در تیمارهای زوال مصنوعی چهار و پنج روز بیش‌تر از انبارداری ۴ سال بود. بیش‌ترین میزان پتاسیم نشت‌یافته به داخل محلول آب در تیمار زوال مصنوعی پنج روز (۶۶۵ میلی‌گرم بر لیتر) بود که نسبت به سایر تیمارهای زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی اختلاف معنی‌داری داشت (شکل۳-C).

میزان سدیم موجود در بافت بذرهای زوال‌یافته قبل از قرارگیری بذرها در آب به‌مدت ۲۴ ساعت در تیمارهای زوال مصنوعی و همچنین انبارداری طبیعی با هم اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل۳-D). میزان سدیم موجود در بافت بذری با قرارگیری بذرها در آب به‌مدت ۲۴ ساعت و با افزایش شدت زوال بذرها و همچنین افزایش مدت‌زمان انبارداری به‌صورت خطی کاهش یافت. بیش‌ترین میزان سدیم موجود در بافت بذرها پس از آبنوشی در تیمار شاهد (۲ میلی‌گرم بر گرم) و کم‌ترین میزان آن نیز در تیمار زوال ۵ روز (۰/۸ میلی‌گرم بر گرم) به‌دست آمد. همچنین میزان سدیم موجود در بافت بذری در انبارداری طبیعی ۴ سال نسبت به انبارداری ۲ سال کاهش یافت (شکل۳-E). با افزایش شدت زوال و همچنین مدت زمان انبارداری بذرها میزان سدیم موجود در آب پس از ۲۴ ساعت آبنوشی بذرها به‌طور خطی افزایش یافت. بیش‌ترین میزان سدیم در تیمار زوال ۵ روز (۸۸ میلی‌گرم بر گرم) و کم‌ترین میزان آن نیز در تیمار شاهد (۵۰ میلی‌گرم بر گرم) بود (شکل۳-F). نتایج آزمون تترازولیوم در بررسی سطحی بذرها نخود مشخص نمود الگوی رنگ‌پذیری سطحی بذرهای نخود در تیمارهای مختلف زوال مصنوعی و همچنین انبارداری طبیعی متفاوت می‌باشد. بیش‌ترین میزان شدت رنگ‌پذیری مربوط به تیمار شاهد بود هرچند که شدت رنگ‌پذیری در تیمارهای زوال مصنوعی یک، دو و سه روز و انبارداری دو و چهار سال تقریبا مشابه با تیمار شاهد بود ولی در تیمارهای چهار و پنج روز از میزان رنگ‌پذیری بذرها کاسته شده که نشان از کاهش قابلیت حیات این بذرها در این شرایط می‌باشد. همچنین مشاهده شده که در تیمارهای زوال چهار و پنج روز نوک ریشه‌چه که حساس‌ترین مکان جهت پیشرفت جوانه‌زنی بذر می‌باشد رنگ نگرفته که نشانگر عدم جوانه‌زنی موفق در این تیمار می‌باشد (شکل ۴).

در مدت مورد نظر تترازولیوم به حدود نصف قطر بذر نفوذ نموده و توانایی واکنش با آنزیم‌های دی‌هیدروژناز و تشکیل ماده رنگی فورمازان در این ناحیه را دارا بود. شدت رنگ‌پذیری در نیمرخ بذرها نشان داد در تیمار شاهد و زوال‌های یک، دو و سه روز تترازولیوم نفوذ زیادی داشته به‌طوری‌که شدت رنگ‌پذیری در این تیمارها تقریبا مشابه بود. در تیمارهای زوال چهار و پنج روز از میزان شدت رنگ ایجادشده کاسته شده که اوج این کاهش رنگ در تیمار زوال پنج روز مشهود بوده که نشان از کاهش شدید قابلیت حیات در این تیمار می‌باشد. همچنین در تیمارهای انبارداری دو و چهار سال قطر ناحیه رنگ‌پذیری نسبت به تیمارهای زوال مصنوعی کم‌تر بوده که در تیمار انبارداری طبیعی چهار سال با کاهش میزان رنگ‌پذیری در این ناحیه همراه می‌باشد که نشان از کاهش قابلیت حیات در این تیمارها نسبت به شاهد می‌باشد (شکل ۴).

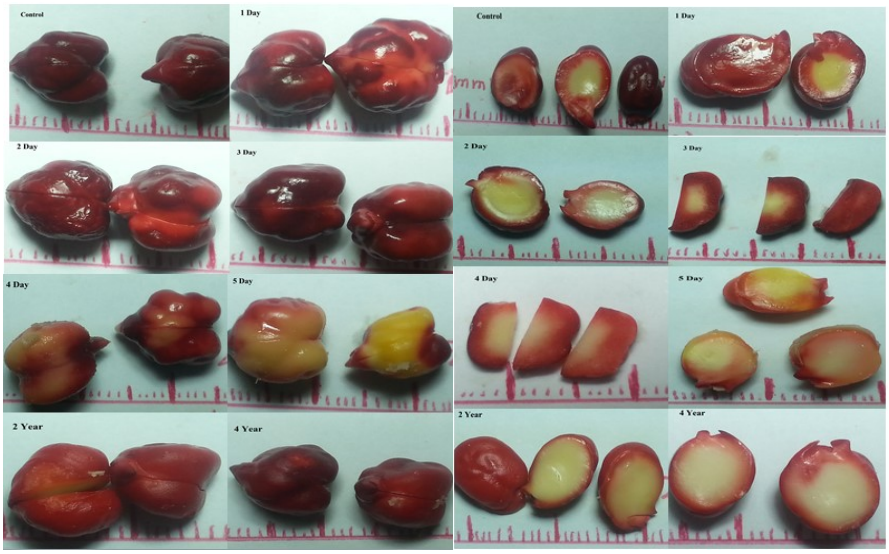
در آزمون تترازولیوم بررسی الگوی رنگ‌پذیری جنین بذر با استفاده از استریومیکروسکوپ (لوپ) اطلاعات دقیق‌تری راجع به قابلیت حیات بذر و همچنین پیش‌بینی میزان تولید گیاهچه‌های طبیعی در مزرعه به ما ارائه می‌نماید. نتایج حاصل از عکس‌برداری جنین بذرهای نخود

در این مطالعه نشان داد روند رنگ‌پذیری جنین در تیمارهای شاهد، زوال مصنوعی یک روز، زوال مصنوعی دو روز و انبارداری دو و چهار سال تقریبا مشابه بود. از تیمار زوال مصنوعی ۳ روز تا ۵ روز نیز از شدت رنگ‌پذیری جنین کاسته شده که نشان از کاهش قابلیت حیات در این تیمارهای می‌باشد. در تیمار زوال مصنوعی سه روز قسمت‌هایی از ریشه‌چه و ساقه‌چه رنگ قرمز فورمازان را به خود گرفته که در تیمار زوال مصنوعی چهار روز از این شدت کاسته شده و نوک ریشه‌چه و ساقه‌چه فاقد رنگ‌پذیری بوده که نشان‌دهنده کاهش قابلیت حیات و عدم موفقیت بذر در جوانه‌زنی بوده و یا اگر هم در بذر جوانه‌زنی اتفاق افتد، در نهایت گیاهچه‌ای تولید ننموده و یا منجر به تولید گیاهچه غیر عادی خواهد شد.



شکل ۳-اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان سدیم و پتاسیم بذر نخود و محلول قبل و پس از آبشویی

Figure 3. Effect of artificial aging and natural storage on Na and K in chickpea seeds and solution before/after leaching



شکل ۴- الگوی رنگ‌پذیری بذرهای نخود با استفاده از تری فنیل تترازولیوم کلراید

Figure 4. Dying pttern of chickpea seeds by three phenyl tetrazolium chlorid

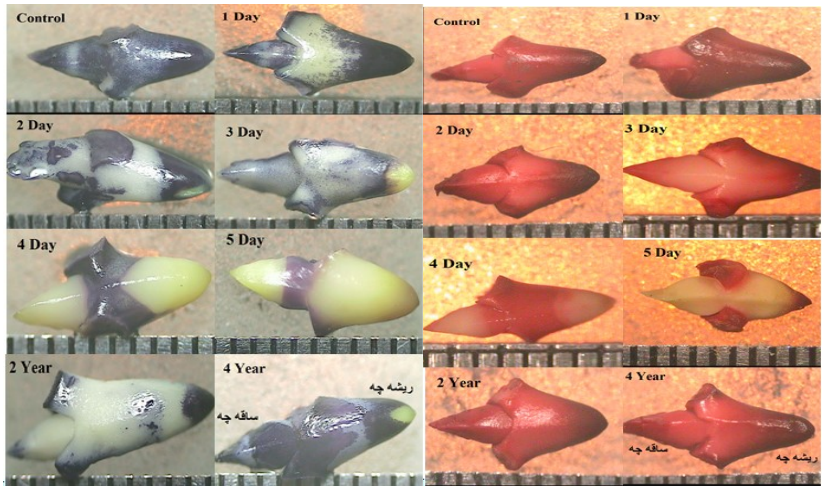
(control= شاهد، 1day= زوال یک روز، 2day= زوال دو روز، 3day= زوال سه روز، 4day= زوال چهار روز، 5day= زوال پنج روز، 2year= انبارداری دو سال و 4year= انبارداری چهار سال)

در تیمار زوال مصنوعی ۵ روز نیز مشاهده می‌گردد که ریشه‌چه و ساقه‌چه رنگ‌پذیری نداشته که نشان دهنده عدم جوانه‌زنی در این بذر می‌باشد. این نتایج نشان داد زوال مصنوعی شدید نسبت به انبارداری طبیعی دارای اثرات منفی بیشتری بر قابلیت حیات و رنگ‌پذیری فورمازان نسبت به انبارداری طبیعی دو و چهار سال می‌باشد (شکل ۵).

رنگ‌پذیری نیتروبلوتترازولیوم به‌دلیل تولید رادیکال سوپراکسید در محدوده رنگ‌پذیری می‌باشد. نتایج حاصل از عکسبرداری استریومیکروسکوپ پس از اعمال تیمار نیتروبلوترازولیوم نشان داد بیش‌ترین میزان تجمع رادیکال سوپراکسید در نوک ریشه‌چه و مکان‌های آسیب دیده جنین مانند نقاطی که از لپه برش داده شده‌اند می‌باشد. این نتایج بیان می‌دارد که در قسمت‌هایی از جنین که دارای فعالیت متابولیکی بالایی هستند میزان تولید رادیکال سوپراکسید بیش‌تر از سایر قسمت‌های بدون فعالیت یا دارای فعالیت متابولیکی اندک، می‌باشد. در تیمار شاهد و زوال یک و دو روز بیش‌ترین میزان تجمع رادیکال سوپراکسید در نوک ریشه‌چه مشاهده شد. از تیمار سه تا پنج روز زوال مصنوعی نیز از میزان رنگ آبی نوک ریشه‌چه کاسته شده و رنگ نوک ریشه‌چه به زرد گراییده شده که با افزایش شدت زوال این رنگ‌پذیری بیش‌تر شده که نشان‌دهنده خسارات جدی وارد شده به جنین می‌باشد. در تیمار انبارداری چهار سال نیز نشانی از وقوع خسارت به نوک ریشه‌چه مشاهده می‌گردد. این نتایج نشان داد زوال مصنوعی شدید نسبت به انبارداری طبیعی دارای اثرات منفی بیش‌تری بر تولید رادیکال سوپراکسید در بذرهای نخود می‌باشد (شکل ۵).

بحث

در این مطالعه درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، درصد گیاهچه غیر عادی و شاخص قدرت بذرهای نخود در تیمار زوال تسریع‌شده به‌خصوص زوال ۴ و ۵ روز نسبت به انبارداری طبیعی کاهش بیش‌تری را نشان داد به‌طوری‌که کاهش سرعت جوانه‌زنی روند خطی داشت. زوال تسریع‌شده بذرها تحت شرایط دما و رطوبت نسبی بالا منجر به کاهش قدرت و درصد جوانه‌زنی بذرها شد (Tina *et al*., 2008). انبارداری بذرها به‌مدت دو سال نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری را در درصد جوانه‌زنی نشان نداد. در شرایط مختلف زوال طبیعی و مصنوعی دما و رطوبت نسبی محیط بر میزان جوانه‌زنی بذرها اثر گذاشته و افزایش دما و رطوبت محیط نگه‌داری بذر سبب تسریع زوال بذر می‌گردد (Nkang and Umoh, 1997) و با توجه به این‌که در شرایط زوال مصنوعی رطوبت و دمای محیط بالاست میزان خسارت واردشده به بذر



شکل ۵- الگوی رنگ‌پذیری جنین بذرها نخود با استفاده از تری فنیل تترازولیوم کلراید و نیتروبلوتترازولیوم

Figure 5- Dying pttern of chickpea emberyo by three phenyl tetrazolium chlorid and nitro blue tetrazolium

(control= شاهد، 1day= زوال یک روز، 2day= زوال دو روز، 3day= زوال سه روز، 4day= زوال چهار روز، 5day = زوال پنج روز، 2year = انبارداری دو سال و 4year= انبادای چهار سال)

بیش‌تر بود و همین امر سبب نقصان درصد جوانه‌زنی بذرهای نخود گردید.

افزایش مدت زمان نگه‌داری بذرها در انبار سبب کاهش کیفیت و در نهایت سبب کاهش حداکثر درصد و سرعت جوانه‌زنی شد. قدرت بالاتر بذرها سبب افزیش سرعت جوانه‌زنی آن‌ها می‌گردد (Soltani *et al*., 2007). بذرهای دارای قدرت بالاتر کارکرد بهتری داشته و در نتیجه درصد و سرعت جوانه‌زنی آن‌ها تحت شرایط تنش‌های مختلف محیطی بیش‌تر شده و در نهایت درصد سبز و عملکرد بالاتری در مزرعه دارند (Ghasemi-golazani *et al*., 1996). بذرهای زوال‌یافته نسبت به بذرهای شاهد سرعت جوانه‌زنی کم‌تری داشته و به ازای هر روز افزایش در دوره زوال بذر این سرعت به میزان ۰/۹ درصد کاهش یافته است (Soltani *et al*., 2007). در این مطالعه شاخص قدرت بذر در تیمار زوال طبیعی نسبت به زوال‌های مصنوعی چهار و پنج روز بیش‌تر بود. افزایش مدت زمان انبارداری و همچنین شدت‌های بالاتر زوال مصنوعی سبب کاهش میزان قدرت بذر گردید. در شرایط انبارداری طبیعی مدت زمان ذخیره بذر بر میزان قدرت حیات بذر اثر گذاشته و با افزایش این مدت زمان شاخص قدرت بذر نیز کاهش یافت (Panobianco *et al*., 2007). این شرایط می‌تواند به‌دلیل بالاتربودن دما در زوال مصنوعی باشد زیرا دمای بالا در این شرایط بر آنزیم‌های هیدرولیتیک اثر منفی داشته و سبب کاهش شاخص قدرت بذر می‌گردد (Soltani *et al*., 2007).

پراکسیداسیون لیپید بالاتر مربوط به تیمارهای زوال مصنوعی شدید بود. با توجه به این‌که در حالت زوال مصنوعی میزان رطوبت محیط و بذر بالا بود، وقوع پراکسیداسیون لیپید نسبت به تیمارهای انبارداری طبیعی بیش‌تر بود. این نتایج نشان می‌دهد که وقوع پراکسیداسیون لیپید بیش‌تر با جذب رطوبت توسط بذر شدت می‌گیرد. شدت‌های بالاتر زوال مصنوعی به‌دلیل جذب بیش‌تر آب و آزادی عمل بیش‌تر گونه‌های فعال اکسیژن و خسارت بالاتر به غشاها میزان پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به تیمارهای انبارداری طبیعی افزایش یافته است. محتوای رطوبتی بذر طی ذخیره بذر و همچنین طول مدت انبارداری آن بر زوال بذر و قابلیت انبارداری آن اثر دارد (Mira *et al*., 2015). میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید در زوال ۵ روز بیش‌تر از انبارداری چهار سال بود و این نشان می‌دهد که محتوای رطوبتی بذر و محیط به همراه دمای محیط نسبت به طول مدت انبارداری محیط اثر بیش‌تری بر پراکسیداسیون لیپید دارد. میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید همراه با نشت الکترولیت‌ها بخش قابل توجهی از کاهش قابلیت جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه را توجیه می‌نماید (Goel and Sheoran 2003). افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید در بذرها نشانه شروع کاهش قابلیت حیات در آن‌ها می‌باشد و این تولید نیز با افزایش محتوای رطوبتی افزایش می‌یابد (Bailly, 2004). در شدت‌های بالای زوال مصنوعی کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت منجر به

تجمع زیاد پراکسید شده و همین امر سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌گردد (Kibinza *et al*., 2006).

تیمارهای زوال طبیعی و مصنوعی سبب کاهش کیفیت و در نهایت کارکرد طبیعی بذرها شده و بر میزان نشت الکترولیت‌های آن‌ها افزوده شد. در انبارداری چهار ساله میزان نشت الکترولیت‌ها بیش‌تر از انبارداری دو ساله بود ولی با این حال میزان نشت الکترولیت‌ها در این تیمار از زوال چهار و پنج روزه کم‌تر بود که نشان‌دهنده خسارت کم‌تر به غشاها در این تیمار نسبت به تیمارهای چهار و پنج روزه می‌باشد. با افزایش مدت زمان نگه‌داری بذرها نخود در انبار میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش یافته ولی این میزان کم‌تر از چهار و پنج روز زوال بود. این موضوع نشان می‌دهد که شرایط انبارداری طبیعی خسارت کم‌تری را نسبت به زوال تسریع‌شده چهار و پنج روز به بذر وارد می‌نماید. افزایش هدایت الکتریکی در اثر زوال بذر رخ داده و این افزایش در هدایت الکتریکی به‌دلیل افزایش پراکسیداسیون لیپید و تغییر کارکرد میتوکندری‌ها و در نتیجه کاهش میزان انرژی تولیدی می‌باشد که در نهایت سبب کاهش میزان جوانه‌زنی می‌گردد (McDonald, 1999). اثرات کلی پراکسیداسیون لیپید کاهش سیالیت غشا، افزایش نشت مواد از غشا، آسیب به پروتئین‌های غشا و در نهایت غیرفعال شدن گیرنده‌ها، آنزیم‌ها و کانال‌های یونی می‌باشد (Gill and Tuteja, 2010). تغییرات پراکسیداتیو در ترکیبات اسیدهای چرب غشاها سبب تغییر در کارکرد غشاهای سلولی شده که این‌ها خود سبب افزایش ویسکوزیته و نفوذپذیری غشاها شده که در نهایت سبب افزایش نشت الکترولیت‌ها و میزان هدایت الکتریکی می‌گردد (Priestly, 1986). طی انبارداری طبیعی محتوای آبی محیط اثر زیادی بر سرعت واکنش‌های دخیل در زوال بذر می‌گذارد. تحت این شرایط تغییرات فیزیکی و شیمیایی بر پوسته بذر اثر گذاشته و سبب افزایش نفوذپذیری آن‌ها به آب و گازها شده (Qaderi *et al*., 2003) و سبب افزایش نشت الکترولیت‌هایی مانند یون‌های آلی و غیر آلی، قندها، آمینواسیدها و حتی پروتئین‌ها می‌گردد (Govender *et al*., 2008). در شدت‌های زوال مصنوعی چهار و پنج روز مکانیسم‌های ترمیمی بذر فعال نبوده و غشاها توانایی خود را در نگه‌داری منابع ذخیره‌ای از دست داده و نشت الکترولیت‌ها به‌شدت افزایش می‌یابد (Fessel *et al*., 2006). غشای سلولی اولین قسمت از سلول است که با فاکتورهای محیطی اثرگذار برهم‌کنش داشته و عوامل اثرگذار بر غشای سلولی از قبیل اکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی سبب کاهش قدرت حیات بذر می‌گردد (Spano *et al*., 2006). نشت یون‌ها، آمینواسیدها و قندها علامت اصلی تخریب غشا بوده که منجر به افزایش نفوذپذیری غشای سلولی می‌گردد (Spano *et al*., 2006). خسارت به تمامیت غشای سلولی نیز سبب نشت الکترولیت‌ها از جمله عناصر سدیم و پتاسیم شده و به دنبال آن هدایت الکتریکی نیز افزایش می‌یابد. افزایش نشت کاتیون‌هایی نظیر سدیم و پتاسیم طی زوال بذر توسط محققین گزارش شده است (Kaewnaree *et al*., 2011). آن‌ها بیان نمودند که با افزایش روزهای زوال تا ۳۰ روز میزان نشت کاتیون‌هایی از قبیل سدیم و پتاسیم از بافت بذری به‌شدت افزایش یافته و میزان آن در بافت بذر کاهش یافته است. در این تحقیق نیز مشاهده شد که افزایش شدت زوال مصنوعی سبب افزایش میزان پتاسیم و سدیم محلول در آب و کاهش میزان سدیم و پتاسیم بافت بذری پس از آبشویی شده که با نتایج تحقیق Kaewnaree و همکاران مطابقت داشت (Kaewnaree *et al*., 2011). تفاوت در میزان نشت سدیم و پتاسیم در شرایط زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بدین دلیل است که خسارت واردشده به غشای سلولی در تیمارهای مختلف زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی سبب کاهش توانایی پروتئین‌های انتقال‌دهنده در غشای سلولی شده در نتیجه کنترل این پروتئین‌ها بر میزان نشت کاتیون‌ها کاهش می‌یابد (Kaewnaree *et al*., 2011). نشت بیش‌تر آنیون‌ها و کاتیون‌ها از خلال غشای سلولی به‌دلیل کاهش خصوصیت نفوذپذیری انتخابی چندگانه غشای پلاسمایی بوده که به‌دنبال انتقال فاز جامد غشا به فاز ژله‌ای رخ داده که این تغییر حالت بر پروتئین‌های انتقالی غشا اثر دارند (Boonsiri *et al*., 2007). به هر حال چیزی که طی زوال رخ داده و نشانه آن نشت یون‌ها از خلال غشا می‌باشد، این است که زوال سبب خسارت به غشای سلولی شده که نتیجه آن افزایش نفوذپذیری غشا می‌باشد (Spano *et al*., 2006). طی زوال و با دخالت گونه‌های فعال اکسیژن دلیل اصلی افزایش نشت الکترولیت‌ها پروتئین‌های انتقال‌دهنده می‌باشند نه غشای فسفولیپیدی دو لایه‌ای (Kaewnaree *et al*., 2011).

انجام آزمون تترازولیوم نشان داد که با افزایش شدت زوال مصنوعی تا ۴ و ۵ روز میزان رنگ‌پذیری بذر و جنین کاهش یافته که نشانه کاهش میزان قابلیت حیات در بذرها می‌باشد. شدت رنگ‌پذیری در بذرهای زوال‌یافته تا ۳ روز تقریبا مشابه با تیمار شاهد بود ولی در تیمارهای ۴ و ۵ روز از شدت رنگ کاسته شد. در تیمارهای انبارداری طبیعی نیز میزان رنگ‌پذیری بذرها مشابه با تیمار شاهد بود. Jatoi و همکاران با مطالعه خود روی بذرهای نخود بیان نمودند که زوال تسریع‌شده سبب کاهش سرعت و درصد جوانه‌زنی شد و علت این امر را کاهش قابلیت حیات بذرها تحت تیمار زوال تسریع شده بیان نمود (Jatoi *et al*., 2003). تحقیقات نشان داده که زوال تسریع‌شده سبب کاهش قابلیت حیات بذرهای گندم شده است (McDonald, 1999). رنگ‌پذیری بذرها در تیمارهای شاهد، یک، دو و سه روز تقریباً مشابه با رنگ‌پذیری تیمارهای دو و چهار سال بود. در این تیمارها همه قسمت‌های بذرها رنگ گرفته و به رنگ قرمز درآمدند. این نتایج نشان داد در این تیمارها بذرها دارای قابلیت حیات بوده و از توانایی در جوانه‌زدن برخوردار می‌باشند. در تیمار زوال ۴ روز از شدت رنگ‌پذیری بذرها نسبت به سایر تیمارها کاسته شده که نشان از کاهش قابلیت حیات و در نتیجه کاهش میزان جوانه‌زنی در این تیمار می‌باشد. همچنین در تیمار پنج روز زوال مصنوعی از میزان رنگ‌پذیری بذرها به‌شدت کاسته شده که نشان از کاهش شدید قابلیت حیات در این بذرها می‌باشد. افت جوانه‌زنی در تیمارهای زوال چهار و پنج روز به‌دلیل کاهش قابلیت حیات آن‌ها می‌باشد. در شرایط انبارداری طبیعی میزان دمای محیط کم بوده و علت اصلی کاهش میزان قابلیت حیات بذرها به‌دلیل تجمع تولید گونه‌های اکسیژن فعال بوده ولی در زوال مصنوعی به‌دلیل این‌که دمای محیط بالاست کاهش قابلیت حیات بذرها به‌دلیل غیرفعال‌شدن پروتئین‌ها تحت اثر دماهای بالاست (Sun and Leopold 1994) (شکل ۵). نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی نیتروبلوتترازولیوم نیز نشان داد رادیکال سوپراکسید در تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها با شدت بالاتری رویت گردید که نشانه فعالیت متابولیکی بالای آن‌ها بود و با افزایش شدت زوال از میزان رنگ آبی رادیکال سوپراکسید کاسته شد. با افزایش شدت زوال مصنوعی و مدت زمان انبارداری طبیعی که از شدت رنگ‌پذیری بذرها با نیتروبلوتترازولیوم کاسته شد که نشانه کاهش قابلیت حیات بذرها بود. این نتایج بیان می‌دارد که قابلیت حیات بذرها با میزان رنگ‌پذیری بذرها با نیتروبلوتترازولیوم همبستگی مثبت دارد. ماده نیتروبلوتترازولیوم می‌تواند تفاوت تیمارهای بذری که دارای اختلاف کمی در قابلیت حیات هستند را بهتر تمیز داده و درصد گیاهچه عادی تولیدی را به‌طور دقیق‌تری پیش‌بینی نماید. نیتروبلوترازولیوم در جهت تعیین مکان‌یابی گونه‌های فعال اکسیژن به‌خصوص رادیکال سوپراکسید به کار برده می‌شود (Leymarie *et al*., 2011). رنگ‌آمیزی با نیتروبلوتترازولیوم الگوی رادیکال سوپراکسید تولیدی را بیان نموده و تولید این گونه‌های فعال اکسیژن بیان‌کننده نقش‌های گوناگون آن‌ها در سیگنال‌دهی سلول طی جوانه‌زنی از قبیل تعدیل حالت ردوکس سلولی می‌باشد (Dietz *et al*., 2010). بین تولید رادیکال سوپراکسید رنگ‌آمیزی‌شده بوسیله نیتروبلوتترازولیوم و پس‌رسی بذرها و فعال‌بودن آن‌ها جهت جوانه‌زنی ارتباط نزدیکی وجود داشته (Oracz *et al*., 2011) و به‌عنوان پیامبر سلولی جهت وقوع جوانه‌زنی عمل نمود (Bailly *et al*., 1996) و سیگنال آن‌ها سبب وقوع جوانه‌زنی بذر می‌گردد (Oracz *et al*., 2011). در این مطالعه، در نمونه‌های مربوط به آزمایش رنگ‌آمیزی با نیتروبلوتترازولیوم مشاهده شد که در تیمار شاهد رنگ‌پذیری در همه قسمت‌های جنین به‌خصوص نوک ریشه‌چه که فعالیت متابولیکی بالایی دارد انجام شده است. با افزایش مدت زمان انبارداری و همچنین افزایش شدت زوال مصنوعی علاوه بر این‌که از شدت رنگ آبی کاسته شده است، مشاهده شد که از نوک ریشه‌چه به‌تدریج رنگ سفید زمینه‌ای جنین به رنگ زرد تغییر شکل داده که نشان از خسارت زوال به این منطقه می‌باشد، زیرا رنگ آبی حاکی از تولید رادیکال سوپراکسید بوده که نشان‌دهنده فعالیت متابولیک بالا در منطقه رنگ‌گیری‌شده می‌باشد (Oracz *et al*., 2011).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بذرها سبب کاهش قابلیت حیات آن‌ها شد به‌طوری‌که درصد و سرعت جوانه‌زنی و هم چنین قدرت بذر و درصد گیاهچه عادی را کاهش داد و شدت کاهش در تیمارهای زوال مصنوعی شدید بیش‌تر بود. کاهش درصد

جوانه‌زنی در اثر زوال به‌دلیل افزایش پراکسیداسیون لیپید و خسارت به غشای سلولی و در نتیجه نشت الکترولیت‌ها و کاتیون‌ها بود. دلیل از دست‌رفتن تمامیت غشا نیز کاهش قابلیت حیات بذرها بود و رنگ‌آمیزی با تترازولیوم و نیتروبلوتترازولیوم تاییدکننده این مطلب بود. با توجه به نتایج این پژوهش مشخص شد که تیمارهای زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی دارای اثرات مشابهی بر جوانه‌زنی، تولید گیاهچه عادی و خصوصیات نشت یونی در بذرهای نخود بود ولی میزان آن در این دو نوع زوال متفاوت بود و می‌توان از نتایج حاصل از آزمون زوال مصنوعی برای برنامه‌های انبارداری بذرهای نخود استفاده نمود. تفاوت در اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر قابلیت حیات بذرهای نخود ممکن است به‌دلیل تفاوت در مکانیسم‌های وقوع زوال در این دو نوع زوال می‌باشد و برای مقایسه دقیق‌تر آن‌ها نیازمند به انجام تحقیقات در زمینه مکانیسم‌های دخیل در زوال بذر تحت شرایط انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولین موسسه تحقیقات دیم سرارود تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Agrawal, R. 2003. Seed technology. Pub. Co. PVT. LTD. New Delhi. India. **(Book)**

Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research, 14:93-107. **(Journal)**

Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. and Come, D. 1996. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathionereductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. Physiologia Plantaurom, 97: 104–110. **(Journal)**

Boonsiri, K., Ketsa, S. and Van-doorn, W.G. 2007. Seed browning of hot peppers during low temprature storage. Postharvest Biology and Technology, 45: 358-365. **(Journal)**

Dietz, K., Jacquot, J. and Harris, G. 2010. Hubs and bottlenecks inplant molecular signalling networks. New Phytology, 188: 919–938. **(Journal)**

Du, Z. and Bramlage, W.J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 1566-1570. **(Journal)**

Ellis, R.H. and Roberts, E.H. 1981. The quantificatic~nof ageing and survival in orthodox seeds. Seed Science and Technology, 9:379-409. **(Journal)**

Fessel, S.A., Vieira, R.D., Cruz, M.C.P., Paula, R.C. and Panobianco, M. 2006. Electrical conductivity testing of corn seeds as influenced by temperature and period of storage. Pesqui Agropecu of Brasil, 41:1551–1559. **(Journal)**

Ghaderi-Far, F., Soltani, A. and Sadeghipour, H.R. 2014. Biochemical changes in pumpkin seeds during ageing: lipid peroxidation and membrane damages. Iranian Journal of plant biology, 6(20): 69-112. (In persion) **(Journal)**

Ghasemi-golazani, K., Salehian, M., Rahimzade-khooei, F. and Moghadam, M. 1996. Effect of seed vigor on emergence of wheat seedling and yield. Journal of Agricultural Science and Natural Resources, 2:48-54. (In persian) **(Journal)**

Gill, S.S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930. **(Journal)**

Goel, A. and Sheoran, I.S. 2003. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. Biologia Plantarum, 46: 429–434. **(Journal)**

Govender, V., Aveling, T.A.S. and Kritzinger, Q. 2008. The effect of traditional storage methods on germination and vigor of maize (*Zea mays* L.) from northern KwaZulu-Natal and southern Mozambique. Southern African Journal of Botany, 74:190–196. **(Journal)**

Hamada, A.M. and EL-enany, A.E. 1994. Effect of NaCl salinity on growth, pigment and mineral element contents, and gas exchange of broad bean and pea plants. Biologia Plantarum, 36: 75- 81. **(Journal)**

Hampton, J.G. and Tekrony, D.M. 1995. Handbook of Vigor Test Methods. The International Seed Testing Association, Zurich 117 pp. **(Handbook)**

International Seed Testing Association. 2003. Working sheets on Tetrazolium testing. Vol 1. **(Handbook)**

International Seed Testing Association. 2012. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf: International Seed Testing Association. **(Handbook)**

International Seed Testing Association. 2013. ISTA Handbook on Seedling Evaluation, 3rd Edition. **(Handbook)**

Jatoi, S.A., Afzal, M., Nasim, S. and Anwar, R. 2001. Seed deterioration study in pea, using accelerated ageing technique. Pakistan Journal of Biological Science, 4: 1490-1494. **(Journal)**

Kaewnaree, P., Vichitphan, S., Klanrit, P., Siri, B. and Vichitiphan, K. 2011. Effect of accelerated aging process on seed quality and biochemical changes in sweet pepper seeds. Biotechnology, 10(2): 175-182. **(Journal)**

Kalpana, R. and Madhava-Rao, K.V. 1996. Lipid changes during accelerated ageing of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) Millsp cultivars. Seed Science and Technology, 24: 475-483. **(Journal)**

Kapoor, N., Aria, A., Siddiqui, M.A., Amir, A. and Kumar, H. 2010. Seed deterioration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under accelerated ageing. Asian Journal of Plant Sciences, 9: 158-162. **(Journal)**

Kibinza, S., Vinel, D., Côme, D., Bailly, C. and Corbineau, F. 2006. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. Physiologia Plantaurom, 128: 496–506. **(Journal)**

Lakon, G.C. 1942. Topographicher Nachweis dier kiemfahigkeit der Getriedefruchitee durch Tetrazolium- saize. Beritish Deut Botany Gesell, 60:299-305. **(Journal)**

Lehner, A., Mamadou, N., Poels, P., Come, D., Bailly, C. and Corbineau, F. 2008. change in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activityes in the embryo during aging in wheat grains. Journal of Cereal Science, 47(3): 555-565. **(Journal)**

Leymarie, J., Vitkauskaite, G., Hoang, H.H., Gendreau, E., Chazoule, V., Meimoun, P., Corbineau, F., El-Maarouf-Bouteau, H. and Bailly, C. 2011. Role of Reactive Oxygen Species in the Regulation of Arabidopsis Seed Dormancy. Plant Cell Physiology, 53(1): 96–106. **(Journal)**

McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. Seed Science and Technology, 27: 177-237. **(Journal)**

Mira, S., Estrelles, E. and González-Benito, M.E. 2015. Effect of water content and temperature on seed longevity of seven Brassicaceae species after 5 years of storage. Plant Biology, 17: 153–162. **(Journal)**

Mohsen-nasab, F., Sharafizadeh, M. and Siadat, A. 2010. Effect of seed aging on germination and seedling growth ofwheat cultivars in laboratory condition. Journal of crop physiology, 2(7): 87-90. (In persian) **(Journal)**

Nkang, A. and Umoh, E.O. 1997. Six month storability of five soybean cultivars as influenced by stage of harvest, storage temperature and relative humidity. Seed Science and Technology, 25: 93-99. **(Journal)**

Norden, A.J. 1981. Effect of preparation and storage environment cln lifespan of shelled peanut seed. Crop Science, 21:223-231. **(Journal)**

Oracz, K., Voegele, A., Tarkowska, D., Jacquemoud, D., Kova, V.T., Urbanova, T., Strnad, M., Sliwinska, E. and Leubner-Metzger, G. 2011. Myrigalone A Inhibits Lepidium sativum Seed Germination by Interference with Gibberellin Metabolism and Apoplastic Superoxide Production Required for Embryo Extension Growth and Endosperm Rupture. Plant Cell Physiology, 53(1): 81–95. **(Journal)**

Panobianco, M., Vieira, R.D. and Perecin, D. 2007. Electrical conductivity as an indicator of pea seed aging of stored at different temperatures. Sciencia Agriculture, 64: 119–124. **(Journal)**

Priestley, D.A. 1986. Seed ageing. Cornell University Press, Ithava, New York. **(Book)**

Qaderi, M.M., Cavers, P.B. and Bernards, M.A. 2003. Pre- and post-dispersal factors regulate germination patterns and structural characteristics of Scotch thistle (*Onopordum acanthium*) cypselas. New Phytology, 159: 263–278. **(Journal)**

Soltani, A., Kamkar, B., Galeshi, S. and Akramghaderi, F. 2007. Effect of aging of genetic resource depletion and heterotrophic growth of wheat seedling. Journal of Agricultural sciences and natural resources, 15(1):68-76. (In persian) **(Journal)**

Spano, C., Buselli, R., Castiglione, M.R., Botteg, S. and Grillia, I. 2006. Rnases and nucleases in emberyous and endosperms from naturally aged wheat seeds stored in defferent conditions. Journal of plant physiology, 164: 487-495. **(Journal)**

Sun, W.Q. 1998. Glassy state and seed storage stability: the WLF kinetics of seed viability loss at T greater than T-g and the plasticization effect of water on storage stability. Annals of Botany, 79: 291–297. **(Journal)**

Sun, W.Q. and Leopold, A.C. 1994. Glassy state and seed storage stability: A viability equation analysis. Annals of Botany, 74: 601-604. **(Journal)**

Suruchi, P., Naithani, S.C. and Keshavkant, S. 2012. ROS production and lipid catabolism in desiccating shorea robusta seeds during aging. Plant Physiology and Biochemistry, 57: 261-267. **(Journal)**

Tahmasebi, B., Ghaderi-far, F., Sadeghipour, H.R. and Galeshi, S. 2015. Effect of accelerate germination traits, lipids and lipid hydroperoxide in sunflower seeds. Journal of Plant Process and Function, 4(12): 73-83. (In persion). **(Journal)**

Talebi, R., Naji, A.M. and Fayaz, F. 2008. Geographical patterns of genetic diversity in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) characterized by amplified fragment length polymorphism. Plant Soil and Environment, 54: 447–452. **(Journal)**

Tatipata, A. 2009. Effect of seed moisture content, packaging and storage period on mitochondria inner membrane of soybean seed. Journal of Agricultural Technology, 5(1): 51-64. **(Journal)**

Tina, X., Song, S. and Lei, Y. 2008. Cell death and reactive oxygen species metabolism during accelerated ageing of soybean axes. Russian Journal of Plant Physiology, 55: 33-40. **(Journal)**

Veselovsky, V.A. and Veselova, T.V. 2012. Lipid Peroxidation, Carbohydrate Hydrolysis, and Amadori– Maillard Reaction at Early Stages of Dry Seed Aging. Russian Journal of Plant Physiology, 59(6): 811–817. **(Journal)**

Effect of artificial aging and natural storage on cation leakage and viability of Iranian chickpea (*Cicer arietinum*) seeds cv. Hashem

Mahdi Shaban[1*], Farshid Ghaderifar[2], Hamidreza Sadeghipour[3], Ahad Yamchi[4]

Received: July 2, 2016 Accepted: December 11, 2016

Abstract

This study was laid out in order to evaluate the effects of artificial ageing and natural storage on seeds germination traits, cation leakage and viability of chickpea seeds under both artificial ageing and natural storage and comparison of them in Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources at 2014. The experiment was conducted in completely randomized design with four replications. Treatments were 8 ageing levels such as (2 years, 4 years natural storage, 1, 2, 3, 4, 5 days of artificial ageing and control). In the present stude some traits such as germination percentage, normal seedling percentage, germination rate, seed vigor index, electrical conductivity, lipid peroxidation and seed Na and K before and after leaching and their amounts in soluble after leaching were studied. The results of analysis of variance showed that the effect of aging treatment was significant on all traits except seed Na before leaching. The results of the mean comparison showed that the reduction of germination percentage, germination rate, seed vigor index and normal seedling percentage in 4 and 5 artificial ageing days were higher than 2 and 4 natural storage years. MDA production, electrical conductivity, Na and K lekeage in increased by increasing of artificial ageing to 5 days that was more than 2 and 4 natural storage years due to non-ability of membrane to keeping their permeability. The increasing of aging levels result to increases of amount of K and Na in seeds tissues. Seed dying by tetrazolium ans nitro blue tetrazolium showed that increasing of seed aging result to reduction of seed viability that in severe artificial aging was higher than natural storage treatments. During seed aging Lipid peroxidation damaged to cell membrane and electrolyte lekeage was increased. Then, seed viability was decreased and results to decreasing of seed germination percentage and rate and normal seedling production. These results reviled that effect of artificial ageing and natural storage on germination, cation leakage and viability of chickpea seeds was same and can uses for chickpea storing programs, whereas their mechanisms may different.

Key words: Chickpea; MDA; Membrane; Potassium; Tetrazolium; Sodium

How to cite this article

Shaban, M., Ghaderifar, F., Sadeghipour, H. and Yamchi, A. 2020. Effect of artificial aging and natural storage on cation leakage and viability of Iranian chickpea (Cicer arietinum) seeds cv. Hashem. Iranian Journal of Seed Science and Research, 6(4): 441-456. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2020.3923

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Ph.D student of Seed Science and Technology, Department of Agronomy, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Associate Professor, Department of Agronomy, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Associate Professor, Department of Biology, University of Golestan, Gorgan, Iran
4. Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

*Corresponding author: shaban.morad@yahoo.com