اثر پرایمینگ بذر بر پارامترهای جوانه‌زنی/ بذر یونجه یکساله (*Medicago scutellata* L.) در شرایط تنش سرما

الهام یوسفی تنها و سیف اله فلاح*

شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۶

چکیده

تنش سرما هنگام جوانه‌زنی بذر اغلب گیاهان موجب اختلال در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و در نهایت ممانعت از خروج ریشه‌چه و کاهش درصد جوانه‌زنی می‌گردد. در این راستا، اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر پارامترهای جوانه‌زنی بذر در یونجه یکساله در شرایط تنش سرما به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل پرایمینگ‌های متفاوت (هیدروپرایم، هالوپرایم، اسموپرایم و عدم پرایم) و پنج سطح دما (۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد) بودند. نتایج نشان داد با کاهش دما سرعت جوانه‌زنی تحت تیمارهای هیدروپرایم و اسموپرایم به‌صورت خطی کاهش یافت، اما تیمار هالوپرایم درصد جوانه‌زنی تحت تنش سرما را بهبود بخشید. بیشترین وزن خشک ریشه‌چه تحت تیمار هیدروپرایم مشاهده شد. به‌طوری‌که با کاهش دما مقدار پرولین تحت کلیه تیمارهای پرایمینگ افزایش یافت. علاوه بر این تیمار اسموپرایم موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد شد. به‌طور کلی نتیجه‌گیری می‌شود که تیمار هیدروپرایم برای بهبود سرعت و درصد جوانه‌زنی و استقرار بهتر گیاه یونجه یکساله در شرایط تنش سرما مفید می‌باشد که این امر می‌تواند در افزایش پتانسیل قرارگیری این گیاه به‌عنوان کود سبز در مناطق معتدل و سرد کشور مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، سرمادهی، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، نیترات پتاسیم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸-۳۲۳۲۴۴۰۵، پست الکترونیکی: falah1357@yahoo.com

مقدمه

تنش سرما، در اغلب مواقع سبب بروز خسارت‌های شدید در گیاهان می‌شود، این تنش از نظر فیزیولوژیکی باعث اختلال در فتوسنتز، تنفس، فعالیت آنزیم‌ها، سنتز ATP، تولید سموم (در فرایندهای فیزیولوژیک گیاه) و شکسته شدن پروتئین‌ها می‌شود (۳۶). علاوه بر این تنش سرما در گونه‌های حساس موجب کاهش سیالیت و تغییر در خصوصیات به ویژه فعالیت نیمه تراوایی غشاء می‌گردد. به‌طور معمول، لیپیدها در غشاء در یک فاز مایع یا مایع کریستالی هستند اما در رطوبت پایین یا دمای پایین، آنها بیشتر فاز ژله‌ای سخت تشکیل می‌دهند. هنگامی‌که لیپیدهای غشاء در فاز ژله‌ای حبس شده‌اند، اگر جذب مجدد آب اتفاق نیفتد به‌علت قرار گرفتن در معرض دماهای پایین، نمی‌توانند بازسازی کنند و آنها نشت می‌کنند و از کار می‌افتند (۳۹). این حالت با افزایش انرژی آنزیم‌های غشایی و عدم تعادل متابولیسمی ادامه یافته و با افزایش متابولیت‌های سمی، آسیب‌های ثانویه را در گیاه ایجاد می‌کند (۴۴) و طی دوره جوانه‌زنی می‌تواند سبب کاهش درصد جوانه‌زنی و اختلال در خروج ریشه‌چه بذر در گونه‌های مختلف و ارقام زراعی گردد (۴۰).

تأثیرات نامطلوب کودها بر محیط زیست منجر به توجه و استفاده بیشتر از روش‌های جایگزین برای کودهای شیمیایی شده است (۲۴). یکی از مهمترین نهاده‌های جایگزین این کودها، بکارگیری گیاهان کود سبز است (۲). این گیاهان فاقد اثرات جانبی کودهای شیمیایی بوده (۱۵) و ریشه آنها با نفوذ در خاک‌های فشرده و سنگین (۴۸)، در بهبود ساختمان خاک و تشدید فعالیت ریز جانداران مفید ریزوسفر (۴۷)، کاهش فرسایش خاک و آبشویی عناصر غذایی مؤثرند (۳۳). در بین گیاهان مناسب برای کود سبز زمستانه می‌توان به یونجه یکساله (*Medicago scutellata* L.) اشاره کرد. گیاهان به‌عنوان کود سبز یکساله زمستانه باید در اواخر تابستان یا اوایل پاییز کشت شوند، تا قبل از زمستان استقرار یابند و در بهار حداکثر زیست توده را داشته باشند (۴۳). این در حالی است که به‌دلیل محدودیت منابع آب کشور و رقابت محصولات زراعی در پاییز ممکن است امکان آبیاری برای گیاه کود سبز فراهم نگردد، از این رو تأمین رطوبت لازم برای جوانه‌زنی و سبز شدن بذر یونجه یکساله به وقوع بارش‌های پاییزه سپرده می‌شود که در این شرایط وقوع تنش دمای پایین محتمل است.

تنش سرما علاوه بر کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی و استقرار نامناسب گیاهچه‌ها موجب یکسری تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان تحت تنش شده که از جمله این تغییرات می‌توان به تولید انواع اکسیژن فعال در کلروپلاست و میتوکندری سلول‌های گیاه اشاره کرد که طی آن الکترون‌هایی که از زنجیره انتقال الکترون نشت کرده‌اند، در جریان یک واکنش هوازی، با اکسیژن محیط واکنش داده و گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) را تولید می‌کنند (۱۹). گونه‌های اکسیژن فعال می‌توانند شدیداً با بیومولکول‌های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و پراکسیداسیون لیپید، دناتوره شدن پروتئین و جهش در DNA را سبب شوند که این امر به مختل شدن متابولیسم طبیعی گیاه و در نهایت منجر به مرگ سلول‌ها می‌شود (۴۱). گیاهان سازوکارهای حفاظتی مختلفی را برای دفع یا کاهش ROSها دارند که در سطوح مختلف تنش مؤثر است. سامانه‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان یکی از این سازوکارهای حفاظتی است. گیاهانی که سطوح بالاتری از آنتی‌اکسیدان‌ها را دارند، مقاومت بیشتری به آسیب‌های اکسیداتیو نشان می‌دهند. دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند که باعث شکسته شدن آب اکسیژنه به آب و مولکول اکسیژن می‌شوند (۵۲). بنابراین استفاده از تکنیکی که بتواند در شرایط تنش سرما به جوانه‌زنی مطلوب و استقرار مناسب بذر گیاه یونجه یکساله کمک کند، می‌تواند در توسعه کشت این قبیل گیاهان و در نتیجه تقویت مواد آلی خاک مؤثر باشد.

در این ارتباط پرایمینگ بذر، به‌عنوان یک روش معمول به‌منظور افزایش سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی در مزرعه، افزایش بنیه (Vigor Vigor) و ظهور گیاهان مقاوم (۱۰) و در نتیجه رسیدن گیاهان پاییزه به درجه‌ای از تحمل به سرما قبل از وقوع یخبندان محسوب می‌شود (۲۳). پرایمینگ به تیمارهای خاصی گفته می‌شود که برای افزایش درصد و یکنواختی جوانه‌زنی بذر و بهبود رشد گیاهچه‌ها و شاخص‌های بنیه بذر در برابر تنش‌های محیطی به‌کار گرفته می‌شود (۸) و شامل فرایندی است که طی آن تا اندازه‌ای به بذر اجازه جذب آب داده می‌شود که فعالیت‌های فیزیولوژیکی جوانه‌زنی شروع شود ولی خروج ریشه‌چه رخ ندهد (۱). تأثیرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی پرایمینگ بر روی بذرهای مختلف از جمله بذر یونجه معمولی (*Medicago sativa*)، لوبیا چشم بلبلی (*Vigna radiata* L.)، نخود (*Cicer arietinum*) و عدس (*Lens culinaris*) مورد بررسی قرار گرفته است که در این آزمایش‌ها تیمار پرایمینگ قادر به بهبود فرایند جوانه‌زنی و ایجاد مقاومت در شرایط تنش سرما و شوری بوده است (۲۵ و۴۲).

از آنجا که یونجه یکساله (*Medicago scutellata* L.) یکی از گیاهان کود سبز ارزشمند است، در سامانه کشاورزی

پایدار با به‌کارگیری این گیاه به‌عنوان یک رهیافت بوم شناختی می‌توان به نظام‌های کشاورزی پایدار با هدف کاهش مصرف کودهای شیمیایی و افزایش بهره‌وری نهاده‌ها و پایداری تولید محصولات زراعی دست یافت. با توجه به اولویت آبیاری غلات در پاییز و همچنین محدودیت منابع آب قابل دسترس، در مناطق سرد کشور که دارای بارندگی مناسب هستند، کشت گیاهان کود سبز به‌صورت دیم توجیه پذیر است. این در حالی است که تأخیر در شروع بارندگی‌های پاییزه مراحل جوانه‌زنی و سبز شدن این قبیل گیاهان را با تنش سرما مواجه می‌کند. بنابراین این مطالعه با هدف، بررسی اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بر جوانه‌زنی بذر یونجه یکساله برای کشت در شرایط تنش سرما اجرا شد.

مواد و روشها

این آزمایش به‌منظور بررسی پارامترهای جوانه‌زنی بذر گیاه یونجه یکساله در شرایط تنش سرما در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد در سال ۱۳۹۲ انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار اجرا شد. تیمارهای مختلف پرایمینگ (هیدروپرایم، هالوپرایم، اسموپرایم و شاهد (عدم پرایم)) به عنوان فاکتور اول و دماهای مختلف (۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد) به عنوان فاکتور دوم مورد بررسی قرار گرفتند. بذر گیاه یونجه یکساله از خانه بذر اهواز تهیه شد. قبل از شروع آزمایش اصلی یک آزمایش اولیه به‌منظور تعیین بهترین غلظت محلول و مدت زمان پرایمینگ بذر انجام شد که بر اساس این آزمایش، هیدروپرایم به مدت ۸ ساعت، هالوپرایم با غلظت ۰/۳ مگاپاسکال به مدت ۱۲ ساعت و اسموپرایم با غلظت ۱/۱ مگاپاسکال به مدت ۲۴ ساعت تعیین گردید. به‌منظور تهیه پتانسیل‌های مورد نظر، مقادیر (Poly Ethylene Glycol 6000) PEG6000 با استفاده از معادله میچل و کافمن (۳۷) و نیترات پتاسیم با استفاده از معادله وانت هف محاسبه شد (۴۶).

محلول‌های مورد نظر در آب مقطر تهیه شدند. به‌منظور پرایمینگ، بذرها را پس از ضدعفونی در پتری دیش‌های ۹ سانتی‌متری ریخته و به هر پتری دیش ۸ میلی‌لیتر از محلول‌های مورد نظر تهیه شده، اضافه شد و در نهایت پتری دیش‌ها در شرایط تاریکی و در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد در ژرمیناتور (مدل JAL TEB LAB EQUIPMEAT JG 500 ml) قرار گرفتند (۶).

پس از سپری شدن زمان‌های مورد نظر پرایمینگ، بذرهای پرایم شده را چندین مرتبه با آب مقطر شست و شو داده به گونه‌ای که مواد موجود در سطح بذرها کاملاً شسته شوند و به‌منظور خشک کردن، بذرهای یونجه یکساله به مدت ۱۸ ساعت در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفتند. پس از خشک کردن بذرها، ۵۰ عدد بذر پرایم شده در پتری دیش‌های ۹ سانتی‌متری روی دو لایه کاغذ صافی واتمن کشت شد و به هر پتری دیش ۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به‌منظور جلوگیری از تبخیر آب موجود در پتری دیش‌ها دور هر پتری چند لایه پارافیلم کشیده شد. در نهایت پتری دیش‌ها به ژرمیناتور انتقال داده شدند و به‌مدت ۱۰ روز در دماهای ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند (۲۹). جوانه‌زنی هر ۲۴ ساعت بر مبنای خروج ریشه‌چه به اندازه ۲ میلی‌متر ثبت گردید (۲۹). در طول اجرای آزمایش بر حسب نیاز ۵-۳ میلی‌لیتر آب مقطر به هر پتری دیش اضافه شد. پس از ۱۰ روز ابتدا پارامترهای سرعت جوانه‌زنی و درصد جوانه‌زنی در هر دما به‌صورت جداگانه با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید (۳۱ و ۲۸):

$$GR = \Sigma (Gt / Dt) \quad (۱)$$

GR = سرعت جوانه‌زنی، Gt = تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز t ام، Dt = زمان پس از کاشت مرتبط با Gt بر حسب روز.

$$GP = (GS / ST) \times 100 \quad (۲)$$

GP = درصد جوانه زنی، GS = تعداد بذرهای جوانه زده، ST = کل بذرها

سپس از هر پتری دیش ۲۰ گیاهچه به‌طور تصادفی انتخاب شد و وزن خشک ریشه‌چه، ساقه‌چه و گیاهچه با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ پس از خشک شدن نمونه‌ها در آون در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد (۵۱).

شاخص بنیه بذر از رابطه زیر محاسبه شد (۳۱):

$$VI = SG\ (\%) \times SDW\ (mg) \qquad (۳)$$

VI = شاخص بنیه بذر، SG = درصد جوانه‌زنی استاندارد، SDW = وزن خشک گیاهچه (mg)

در نهایت از هر پتری دیش مقدار ۰/۵ گرم گیاهچه وزن شد و مقدار پرولین، مقدار پروتئین محلول و میزان فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در چهار سطح دمایی ۳، ۶، ۹ و ۱۲ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد.

پرولین: مقدار پرولین به روش بتس (۱۴) اندازه‌گیری شد. بدین منظور به عصاره گیاهی سانتریفیوژ شده مقدار ۲ میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد و به‌خوبی مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها در حمام آب گرم به مدت ۱ ساعت حرارت داده شدند و درون حمام یخ قرار گرفتند. در نهایت مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محلول‌های حاصل اضافه کرده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. در نهایت میزان جذب نور در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید.

پروتئین محلول: برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین محلول به روش برادفورد(۱۶)، ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی مورد نظر به ۳ میلی‌لیتر محلول برادفورد اضافه گردید و پس از اختلاط کامل، بلافاصله میزان جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.

آنزیم گایاکول پراکسیداز: برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به روش مک آدام و همکاران (۳۵) پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر عصاره گیاهی به محلول حاوی بافر فسفات، گایاکول و پراکسید هیدروژن میزان جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد.

آنزیم کاتالاز: به‌منظور اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به روش ابی (۷) نیز پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر عصاره گیاهی به محلول حاوی بافر فسفات، آب مقطر و آب اکسیژنه میزان جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد.

در پایان آزمایش، داده‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به وسیله نرم افزار SAS مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. همچنین تجزیه و تحلیل رگرسیونی برای میانگین‌های معنی‌دار حاصل از تجزیه واریانس انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر مقدار پرولین، مقدار پروتئین محلول، میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر دما نیز بر کلیه پارامترهای اندازه‌گیری شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. علاوه بر این اثر متقابل پرایمینگ بذر با دما نیز برای کلیه صفات بررسی شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

نتایج تجزیه رگرسیونی بیانگر آن است که برای مقدار پرولین، مقدار پروتئین محلول، میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تیمارهای مختلف در دماهای مختلف دارای اختلاف آماری معنی‌داری بودند (جدول ۲). معادلات مربوط به روابط رگرسیونی در جدول ۵ ذکر شده است.

پرولین: همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود با کاهش دما روند تغییرات مقدار پرولین در کلیه تیمارها به‌صورت درجه دو مقعر بود. با این تفاوت که شیب تغییرات در تیمار هالوپرایم بیشتر از سایر تیمارها بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثرات پرایمینگ بذر بر مقدار پرولین، مقدار پروتئین محلول، میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه یونجه یکساله در تنش سرما

منبع تغییر	درجه آزادی	پرولین	پروتئین محلول	گایاکول پراکسیداز	کاتالاز
پرایمینگ	۳	۴/۲**	۰/۰۰۰۵۸**	۰/۰۳۸۴**	۰/۰۰۰۰۵**
دما	۳	۱۵۴/۲۴**	۰/۰۰۰۳۳**	۰/۰۶۴۳**	۰/۰۰۰۰۶**
پرایمینگ × دما	۹	۲**	۰/۰۰۰۶۱**	۰/۱۳۱**	۰/۰۰۰۰۶۴**
خطای آزمایشی	۴۸	۰/۳۱	۰/۰۰۰۰۰۸۷	۰/۰۰۰۴۱	۰/۰۰۰۰۰۰۶
ضریب تغییرات (٪)		۵/۳۱	۱۵/۲۱	۵	۱۳/۷۵

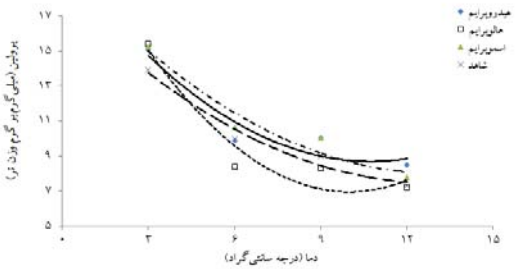
**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

به‌گونه‌ای که تیمار هالوپرایم که تا دمای ۶ درجه سانتی‌گراد کمترین مقدار پرولین را نشان داد، در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد با تیمارهای هیدروپرایم و اسموپرایم هم‌سطح شد و در سطح بالاتری نسبت به تیمار شاهد قرار گرفت. در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد تیمار هیدروپرایم بیشترین مقدار پرولین را نشان داد، در حالی‌که در دمای ۹ درجه سانتی‌گراد تیمار هیدروپرایم با تیمار اسموپرایم هم‌سطح شد و برتر از تیمارهای هالوپرایم و شاهد بود. با کاهش دما به ۶ درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار پرولین در تیمار اسموپرایم مشاهده شد و تیمارهای هیدروپرایم و شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار و برتر از تیمار هالوپرایم بودند. در دمای۳ درجه سانتی‌گراد کمترین مقدار پرولین مربوط به تیمار شاهد بود، در حالی‌که بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

جدول ۲- نتایج تجزیه رگرسیونی اثر تنش سرما بر مقدار پرولین، مقدار پروتئین محلول، میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه یونجه یکساله تحت تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر

شاخص	هیدروپرایم		هالوپرایم		اسموپرایم		شاهد	
	خطی	درجه دو	خطی	درجه دو	خطی	درجه دو	خطی	درجه دو
پرولین	<۰/۰۰۰۱*	۰/۰۰۰۳	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۷	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۴۲۶
پروتئین محلول	۰/۰۰۱۵	۰/۸۲۱۷	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲
گایاکول پراکسیداز	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۸۳۱	۰/۱۱۲۲	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
کاتالاز	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۰۳	۰/۲۸۱۰	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۳

* : مقادیر جدول بیانگر سطح احتمال است.

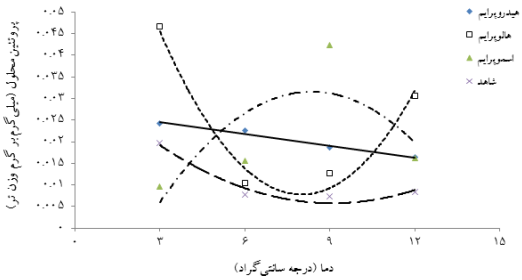


شکل ۱- پاسخ مقدار پرولین بذرهای پرایم شده یونجه یکساله به تنش سرما

(—— هیدروپرایم، - - - هالوپرایم، -·-· اسموپرایم و — — شاهد).

پروتئین محلول: روند تغییرات مقدار پروتئین محلول در تیمارهای هالوپرایم، اسموپرایم و شاهد به‌صورت درجه دو بود. با این تفاوت که در تیمارهای هالوپرایم و شاهد برخلاف تیمار اسموپرایم کاهش دما باعث تغییرات در مقدار پروتئین محلول به‌صورت درجه دو مقعر شد. به‌گونه‌ای که شیب تغییرات در تیمار هالوپرایم بیشتر از

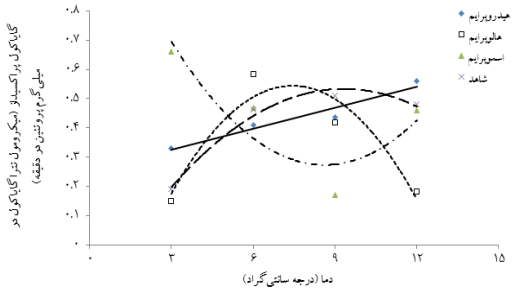
شاهد بود. این در حالی است که با کاهش دما مقدار پروتئین محلول تحت تیمار هیدروپرایم به‌صورت خطی افزایش یافت. تیمار هالوپرایم که در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار پروتئین محلول را نشان داد و برتر از سایر تیمارها بود با کاهش دما تا ۶ درجه سانتی‌گراد با وجود برتری نسبت به تیمار شاهد در سطح پایین‌تری نسبت به تیمارهای هیدروپرایم و اسموپرایم قرار گرفت. در صورتی‌که در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد همانند دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار پروتئین محلول مربوط به تیمار هالوپرایم بود. با وجود اینکه تیمار اسموپرایم و هیدروپرایم در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد هم‌سطح بودند، اما در دمای ۹ درجه سانتی‌گراد تیمار اسموپرایم برتر از تیمار هیدروپرایم بود و بیشترین مقدار پروتئین محلول را نشان داد اما با کاهش دما تا ۳ درجه سانتی‌گراد تیمار اسموپرایم در سطح پایین‌تری نسبت به تیمار هیدروپرایم قرار گرفت، به‌گونه‌ای که در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد کمترین مقدار پروتئین محلول مربوط به تیمار اسموپرایم بود. تیمار هیدروپرایم در کلیه دماها برتر از تیمار شاهد بود و در دمای ۶ درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار پروتئین محلول را به خود اختصاص داد (شکل ۲).



شکل ۲- پاسخ مقدار پروتئین محلول بذرهای پرایم شده یونجه یکساله به تنش سرما

(—— هیدروپرایم، - - - هالوپرایم، -·-· اسموپرایم و — — شاهد).

گایاکول پراکسیداز: شکل ۳ بیانگر آن است که پاسخ میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به کاهش دما تحت تیمارهای هالوپرایم، اسموپرایم و شاهد برخلاف تیمار هیدروپرایم به‌صورت درجه دو بود. در تیمارهای هالوپرایم و شاهد برخلاف تیمار اسموپرایم کاهش دما باعث تغییر در میزان فعالیت این آنزیم به‌صورت درجه دو محدب شد. تیمار هالوپرایم که در دماهای ۳ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد کمترین میزان فعالیت را نشان داد در دمای ۹ درجه سانتی‌گراد با تیمار هیدروپرایم هم‌سطح شد و برتر از تیمار اسموپرایم بود. این در حالی است که در دمای ۶ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز مربوط به تیمار هالوپرایم بود. در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد تیمار هیدروپرایم در سطح بالاتری نسبت به سایر تیمارها قرار گرفت. در صورتی‌که در دمای ۶ درجه سانتی‌گراد کمترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در این تیمار مشاهده شد اما با کاهش دما به ۳ درجه سانتی‌گراد تیمار هیدروپرایم برتر از تیمارهای هالوپرایم و شاهد بود. تیمار اسموپرایم که در دماهای ۶ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت، اما در دمای ۹ درجه سانتی‌گراد در پایین‌ترین سطح نسبت به سایر تیمارها قرار گرفت، در حالی‌که با کاهش دما به ۳ درجه سانتی‌گراد تیمار اسموپرایم بیشترین میزان فعالیت را نشان داد و برتر از سایر تیمارها بود.



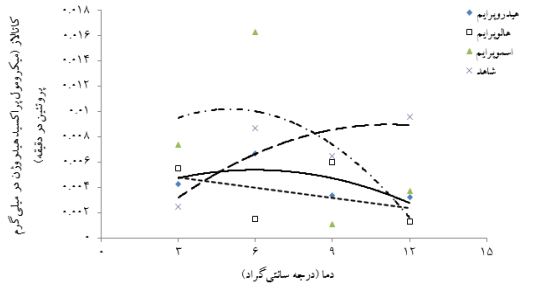
شکل ۳- پاسخ میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بذرهای پرایم شده یونجه یکساله به تنش سرما

(—— هیدروپرایم، - - - هالوپرایم، -·-· اسموپرایم و — — شاهد).

کاتالاز: روند تغییرات میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار هالوپرایم برخلاف سایر تیمارها به‌صورت خطی بود. تیمار هالوپرایم که در دماهای ۶ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد کمترین میزان فعالیت را نشان داد در دمای ۹ درجه

سانتی‌گراد در سطح بالاتری نسبت به تیمارهای هیدروپرایم و اسموپرایم قرار گرفت و با شاهد هم‌سطح شد. علاوه بر این، تیمار هالوپرایم در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد پس از تیمار اسموپرایم بیشترین میزان فعالیت را داشت. کاهش دما باعث تغییر در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمارهای هیدروپرایم، اسموپرایم و شاهد به‌صورت درجه دو محدب شد. با این تفاوت که روند تغییرات با کاهش دما در تیمار شاهد برخلاف تیمار اسموپرایم به‌صورت کاهشی بود، به‌گونه‌ای که تیمار اسموپرایم تا دمای ۹ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت کمتری نسبت به تیمار شاهد داشت و در دمای ۹ درجه سانتی‌گراد در پایین‌ترین سطح قرار گرفت اما با کاهش دما تا ۳ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان فعالیت را نشان داد. تیمار شاهد که تا دمای ۶ درجه سانتی‌گراد برتر از تیمارهای هیدروپرایم و هالوپرایم بود، در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد در پایین‌ترین سطح نسبت به سایر تیمارها قرار گرفت (شکل ۴).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و شاخص بنیه بذر در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر دما نیز بر کلیه پارامترهای اندازه‌گیری شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. علاوه بر این، اثر متقابل پرایمینگ بذر با دما نیز برای کلیه صفات بررسی شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).



شکل ۴- پاسخ میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بذرهای پرایم شده یونجه یکساله به تنش سرما

(—— هیدروپرایم، - - - هالوپرایم، -·-· اسموپرایم و — — شاهد).

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثرات پرایمینگ بذر بر سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و شاخص بنیه بذر گیاه یونجه یکساله در تنش سرما

منبع تغییر	درجه آزادی	سرعت جوانه‌زنی	درصد جوانه‌زنی	وزن خشک ریشه‌چه	وزن خشک ساقه‌چه	شاخص بنیه بذر
پرایمینگ	۳	۲۶۷/۳**	۹۹/۶۵**	۰/۰۸۳**	۰/۲۳**	۳۰۸۲**
دما	۴	۱۱۹۶**	۴۶۴/۷**	۰/۰۱۰۲**	۰/۲۵**	۷۹۱۱**
پرایمینگ × دما	۱۲	۶۷/۳**	۳۴/۸**	۰/۰۲**	۰/۰۴۶**	۳۳۳/۷**
خطای آزمایشی	۶۰	۲/۶۳	۱۲/۹۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۹۳	۸۰/۲۳
ضریب تغییرات (٪)		۸	۳/۹	۸/۱	۶/۷	۵/۲۵

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

نتایج تجزیه و تحلیل رگرسیونی نشان داد که برای سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و شاخص بنیه بذر تیمارهای مختلف پرایمینگ در دماهای مختلف دارای اختلاف آماری معنی‌داری بودند (جدول ۴).

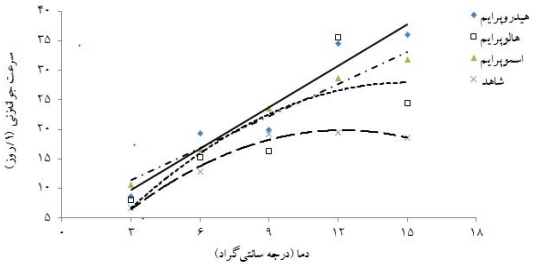
سرعت جوانه‌زنی: با کاهش دما سرعت جوانه‌زنی در تیمارهای هیدروپرایم و اسموپرایم به‌صورت خطی و با شیب نسبتاً تندی کاهش یافت. به‌گونه‌ای که تیمار هیدروپرایم در دماهای ۶، ۱۲ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد (جز در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد که با تیمار هالوپرایم هم‌سطح بود) نسبت به تیمار اسموپرایم و سایر تیمارها برتری داشت اما در دماهای ۳ و ۹ درجه سانتی‌گراد تیمار اسموپرایم در سطح بالاتری نسبت به تیمار هیدروپرایم و سایر تیمارها قرار گرفت و به‌ترتیب باعث افزایش ۵۸/۴ و

۲۲/۳ درصدی سرعت جوانه‌زنی نسبت به شاهد شد (شکل۵). روند تغییرات در تیمار هالوپرایم و شاهد مشابه و به‌صورت درجه دو محدب بود. تیمار شاهد جز در دمای ۹ درجه سانتی‌گراد که در سطح بالاتری نسبت به تیمار هالوپرایم قرار گرفت، در سایر دماها پایین‌ترین سرعت جوانه‌زنی را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد (شکل ۵).

جدول ۴- نتایج تجزیه رگرسیونی اثر تنش سرما بر سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و شاخص بنیه بذر گیاه یونجه یکساله در تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر

شاخص	هیدروپرایم		هالوپرایم		اسموپرایم		شاهد	
	خطی	درجه دو	خطی	درجه دو	خطی	درجه دو	خطی	درجه دو
سرعت جوانه‌زنی	<۰/۰۰۰۱*	۰/۶۵۸۷	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۹۵۳	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
درصد جوانه‌زنی	۰/۸۶۸۹	۰/۱۵۷۴	۰/۰۴۰۲	۰/۰۱۵۲	۰/۰۲۷۹	۰/۹۲۳۵	۰/۲۵۶۳	۰/۰۲۰۶
وزن خشک ریشه‌چه	۰/۰۰۴۱	۰/۴۰۱۷	۰/۹۳۶۵	۰/۱۸۸۲	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۹۷	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۶۷
وزن خشک ساقه‌چه	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۲	<۰/۰۰۰۱	۰/۱۵۴۰	۰/۶۸۹۷	۰/۰۸۸۹	۰/۲۸۰۳	۰/۷۴۱۹
شاخص بنیه بذر	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۹۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۸۳	۰/۰۱۷۳	۰/۷۳۸۷

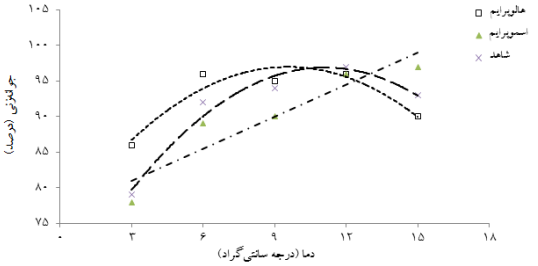
*: مقادیر جدول بیانگر سطح احتمال است.



شکل ۵- پاسخ سرعت جوانه‌زنی بذرهای پرایم شده یونجه یکساله به تنش سرما

(—— هیدروپرایم، - - - هالوپرایم، -·-· اسموپرایم و — — شاهد).

درصد جوانه‌زنی: همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود درصد جوانه‌زنی تحت تیمار هیدروپرایم در شرایط سرما روند خاصی را نشان نداد. روند تغییرات در تیمار شاهد به‌صورت درجه دو محدب بود. در حالی‌که کاهش دما باعث کاهش خطی درصد جوانه‌زنی تحت تیمارهای هالوپرایم و اسموپرایم گردید. با این تفاوت که شیب تغییرات در تیمار اسموپرایم بیشتر از هالوپرایم بود. به‌گونه‌ای که تیمار هالوپرایم در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد کمترین درصد جوانه‌زنی (۹۰ درصد) را نشان داد و در سطح پایین‌تری نسبت به اسموپرایم قرار گرفت و در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد با تیمار اسموپرایم هم‌سطح شد و پس از آن با کاهش دما تا ۳ درجه سانتی‌گراد تیمار هالوپرایم درصد جوانه‌زنی بیشتری نسبت به تیمار اسموپرایم داشت. علاوه بر این تیمار اسموپرایم که در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد درصد جوانه‌زنی بیشتری نسبت به شاهد داشت با کاهش دما تا ۳ درجه سانتی‌گراد نه تنها جوانه‌زنی را بهبود نبخشید بلکه به‌موازات و پایین‌تر از شاهد قرار گرفت (شکل ۶). پایین بودن درصد جوانه‌زنی تحت تیمار اسموپرایم با وجود بالا بودن سرعت جوانه‌زنی تحت این تیمار به این علت بود که در روزهای ابتدایی دوره جوانه‌زنی (۱۰ روزه) تعداد بذرهای جوانه‌زده بیشتر بوده اما با گذشت زمان تعداد بذرهای جوانه‌زده تحت این تیمار در مقایسه با سایر تیمارها کمتر شد و در انتهای روز دهم کمترین تعداد بذر جوانه‌زده مربوط به این تیمار بود.



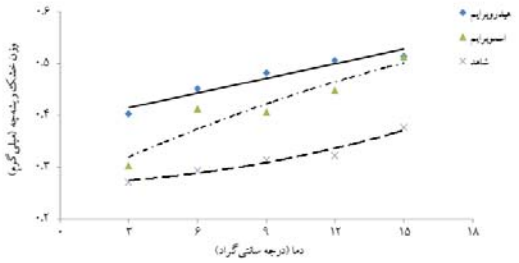
شکل ۶- پاسخ درصد جوانه‌زنی بذرهای پرایم شده یونجه یکساله به تنش سرما

جدول ۵- معادله خط و ضریب تبیین روابط رگرسیونی پارامترهای اندازه‌گیری شده گیاهچه یونجه یکساله تحت پرایمنگ‌های مختلف و تنش سرما

صفت/ تیمار	هیدروپرایم	هالوپرایم	اسموپرایم	شاهد
سرعت جوانه‌زنی	$Y=۲/۳۳۴۳X+۲/۷۱۵$ $R^2=۰/۹۲۴۷$	$Y=-۰/۱۴۷۴X^2+۴/۴۲۶۵X-۵/۳۱۴$ $R^2=۰/۶۹۴۳$	$Y=۱/۸۱۷X+۵/۹۲۱$ $R^2=۰/۹۸۴۹$	$Y=-۰/۱۵۸۵X^2+۳/۸۶۶۵X-۳/۷۴$ $R^2=۰/۹۸۳۱$
درصد جوانه‌زنی	-	$Y=-۰/۲۳۸۱X^2+۴/۵۵۲۴X+۷۵/۲$ $R^2=۰/۸۹۲۵$	$Y=۱/۵X+۷۶/۵$ $R^2=۰/۸۸۰۴$	$Y=-۰/۲۶۱۹X^2+۵/۸۱۴۳X+۶۴/۶$ $R^2=۰/۹۶۲۳$
وزن خشک ریشه‌چه	$Y=۰/۰۰۹۳X+۰/۳۸۷۶$ $R^2=۰/۹۳۶۱$	-	$Y=-۰/۰۰۰۳X^2+۰/۰۲۱X+۰/۲۵۹۶$ $R^2=۰/۸۹۳۳$	$Y=۰/۰۰۰۴X^2+۰/۰۰۱X+۰/۲۶۸۲$ $R^2=۰/۹۵۲۲$
وزن خشک ساقه‌چه	$Y=-۰/۰۰۴۹X^2+۰/۱۱۹۲X+۰/۸$ $R^2=۰/۸۷۹۱$	$Y=۰/۰۴۴۷X+۱/۰۰۶$ $R^2=۰/۹۵۴۷$	-	-
بنیه بذر	$Y=-۰/۷۰۰۶X^2+۱۷/۵۲۹X+۸۹/۱۷۴$ $R^2=۰/۹۴۰۴$	$Y=-۰/۳۴۸۳X^2+۹/۵۲۵۲X+۱۱۶/۵۴$ $R^2=۰/۹۲۱۳$	$Y=-۰/۲۰۸۳X^2+۸/۹۲۵X+۱۲۲/۴۸$ $R^2=۰/۷۴۵۶$	$Y=۳/۶۷۹۳X+۱۲۱/۰۱$ $R^2=۰/۸۰۲۱$
پرولین	$Y=۰/۱۰۰۸X^2-۲/۱۶۵۵X+۲۰/۳۱۸$ $R^2=۰/۹۰۱$	$Y=۰/۱۶۵X^2-۳/۲۹۷۷X+۲۳/۴۳۵$ $R^2=۰/۹۲۷۱$	$Y=۰/۰۶۸۶X^2-۱/۷۹۸۲X+۱۹/۷۸۸$ $R^2=۰/۹۴۳۸$	$Y=۰/۰۶۲۸X^2-۱/۶۳۷X+۱۸/۱۰۵$ $R^2=۰/۹۷۲۳$
پروتئین محلول	$Y=-۰/۰۰۰۹X+۰/۰۲۷۳$ $R^2=۰/۹۷۶۹$	$Y=۰/۰۰۱۵X^2-۰/۰۲۴۱X+۰/۱۰۴۳$ $R^2=۰/۹۷۱۴$	$Y=-۰/۰۰۰۹X^2+۰/۰۱۴۹X-۰/۰۳۰۶$ $R^2=۰/۵۶۹۲$	$Y=۰/۰۰۰۴X^2-۰/۰۰۶۶X+۰/۰۳۵۷$ $R^2=۰/۹۵۱۵$
گاباکول پراکسیداز	$Y=۰/۰۲۳۸X+۰/۲۵۵۵$ $R^2=۰/۹۳۶۴$	$Y=-۰/۰۱۸۷X^2+۰/۲۷۷۷X-۰/۴۸۹$ $R^2=۰/۸۹۱۸$	$Y=۰/۰۱۳۴X^2-۰/۲۳۰۳X+۱/۲۶۵۸$ $R^2=۰/۷۹۹۷$	$Y=-۰/۰۰۸۴X^2+۰/۱۵۶۹X-۰/۱۹۷۷$ $R^2=۰/۹۸۴۶$
کاتالاز	$Y=-۷E-۰۵X^2+۰/۰۰۰۹X+۰/۰۰۲۸$ $R^2=۰/۴۹۹۷$	$Y=-۰/۰۰۰۳X+۰/۰۰۵۶$ $R^2=۰/۱۷۲۰$	$Y=-۰/۰۰۰۲X^2+۰/۰۰۱۷X+۰/۰۰۵۸$ $R^2=۰/۳۳۶۴$	$Y=-۹E-۰۵X^2+۰/۰۰۱۹X-۰/۰۰۱۸$ $R^2=۰/۶۸۷۵$

(—— هیدروپرایم، - - - هالوپرایم، -·-· اسموپرایم و — — شاهد).

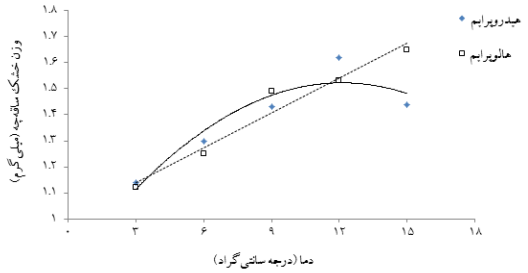
وزن خشک ریشه‌چه: وزن خشک ریشه‌چه تحت تیمار هالوپرایم در شرایط سرما روند خاصی را نشان نداد (جدول۴). همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود در تیمار شاهد برخلاف تیمار اسموپرایم کاهش دما باعث تغییر در وزن خشک ریشه‌چه به‌صورت درجه دو مقعر شد. این در حالی است که روند تغییرات وزن خشک ریشه‌چه تحت تیمار هیدروپرایم خطی بود و با کاهش دما، وزن خشک ریشه‌چه تحت این تیمار به‌صورت خطی کاهش یافت. تیمار اسموپرایم در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد با تیمار هیدروپرایم اختلاف معنی‌داری نداشت اما با کاهش دما تا ۳ درجه سانتی‌گراد تیمار اسموپرایم پایین‌تر از تیمار هیدروپرایم و در سطح بالاتری نسبت به تیمار شاهد قرار گرفت.



شکل ۷- پاسخ وزن خشک ریشه‌چه بذرهای پرایم شده یونجه یکساله به تنش سرما

(—— هیدروپرایم، - - - هالوپرایم، -·-· اسموپرایم و — — شاهد).

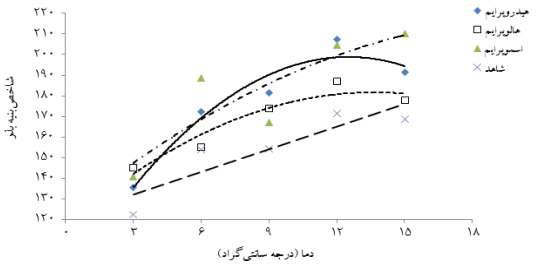
وزن خشک ساقه‌چه: همان‌گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود وزن خشک ساقه‌چه تحت تیمارهای اسموپرایم و شاهد در شرایط سرما روند خاصی را نشان نداد. این در حالی است که با کاهش دما وزن خشک ساقه‌چه تحت تیمار هالوپرایم به‌صورت خطی کاهش یافت. با کاهش دما روند تغییرات وزن خشک ساقه‌چه تحت تیمار هیدروپرایم به‌صورت درجه دو محدب بود، به‌گونه‌ای که تیمار هالوپرایم که در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین وزن خشک ساقه‌چه را نشان داد، در سایر دماها اختلاف معنی‌داری با تیمار هیدروپرایم نداشت (شکل ۸).



شکل ۸- پاسخ وزن خشک ساقه‌چه بذرهای پرایم شده یونجه یکساله به تنش سرما

(—— هیدروپرایم، - - - هالوپرایم، -·-· اسموپرایم و — — شاهد).

شاخص بنیه بذر: با کاهش دما روند تغییرات شاخص بنیه بذر تحت تیمارهای هیدروپرایم، هالوپرایم و اسموپرایم به‌صورت درجه دو محدب بود. این در حالی است که کاهش دما باعث کاهش خطی شاخص بنیه بذر تحت تیمار شاهد گردید (جدول ۴)، به گونه‌ای که کمترین شاخص بنیه بذر در کلیه دماها مربوط به تیمار شاهد (عدم پرایم) بود. تیمار اسموپرایم در دماهای ۶ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد برتر از سایر تیمارها بوده، در حالی‌که در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد با تیمار هیدروپرایم هم‌سطح شد. در دمای ۹ درجه سانتی‌گراد بیشترین شاخص بنیه بذر در تیمار هیدروپرایم مشاهده شد. تیمار هالوپرایم که تا دمای ۶ درجه سانتی‌گراد در سطح پایین‌تری نسبت به تیمار هیدروپرایم قرار گرفت در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد بیشترین شاخص بنیه بذر را به خود اختصاص داد (شکل ۹). اما در دماهای ۶، ۱۲ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد تیمار هالوپرایم در سطح پایین‌تری نسبت به تیمارهای هیدروپرایم و اسموپرایم قرار داشت.



شکل ۹- پاسخ شاخص بنیه بذر بذرهای پرایم شده یونجه یکساله به تنش سرما

(—— هیدروپرایم، - - - هالوپرایم، -·-· اسموپرایم و — — شاهد).

بحث

پس از جذب آب، هورمون جیبرلین از جنین ترشح شده و به لایه آلئورون (خارجی‌ترین لایه آندوسپرم) انتقال می‌یابد این لایه هم به‌عنوان بافت ذخیره‌ای و هم به‌عنوان ترشح کننده آنزیم‌های هیدرولیتیکی عمل می‌کند. در نهایت این آنزیم‌ها به لپه‌ها انتقال یافته و موجب هیدرولیز ترکیبات ذخیره‌ای لپه‌ها از جمله پروتئین‌ها و تولید اسید آمینه پرولین طی جوانه‌زنی می‌شوند (۱). تجمع پرولین در شرایط تنش ممکن است به‌علت کاهش اکسیداسیون پرولین یا تحریک سنتز آن از گلوتامات یا افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز باشد (۴۵) که منجر به افزایش اسمولیته سلول شده و فشار لازم را برای توسعه بافت سلولی فراهم می‌آورد. در نتیجه یکپارچگی غشاء برای جلوگیری از تجزیه پروتئین‌ها حفظ می‌شود. یوسفی تنها و همکاران (۶) گزارش کردند که پرایمینگ بذر موجب افزایش مقدار پرولین در گیاهچه‌های نخودفرنگی و ماشک گل‌خوشه‌ای تحت تنش سرما شد. نتایج اشرفی و رزمجو (۱۱) نیز نشان داد که محتوای پرولین در قسمت‌های رویشی گلرنگ در بذرهای هیدروپرایم شده در شرایط تنش و غیرتنش، افزایش یافت. بنابراین افزایش تجمع پرولین در گیاهان تیمار شده باعث رشد بهتر این گیاهان می‌شود. احتمالاً تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در طی چرخه نمو گیاه باعث این تغییرات می‌شوند (۳۲). در شرایط تنش سرما مکانیسم‌های فیزیولوژیکی متفاوتی مانند تجمع فسفولیپیدهای با ثبات در درون غشاها، تجمع کربوهیدرات‌های محلول، آمینواسیدها از جمله پرولین و پروتئین‌های تنشی برای افزایش تحمل به سرما رخ می‌دهد (۶). پروتئین‌های تنشی می‌توانند طی تنش سرما، باعث بیان ژن‌های ثبات دهنده به غشاها شده و موجب تولید پروتئین‌های ساختمانی شوند. در نتیجه با حفظ پایداری غشای سلولی از نشت الکترولیت‌ها و مرگ سلول‌ها ممانعت می‌شود (۳۴). میقاتی و ابراهیم زاده (۵) گزارش کردند که سنتز پروتئین‌ها در پاسخ به تنش‌های محیطی نظیر شوک گرمایی، تنش سرما، تنش خشکی و شوری تغییر می‌کند. چنین تنش‌هایی سبب افزایش سنتز برخی از پروتئین‌ها و کاهش سنتز عده‌ای دیگر از آنها می‌شود. علاوه بر این، قربانی جاوید و همکاران (۳) بیان کردند که غلظت پروتئین‌های محلول در سطوح مختلف تنش خشکی در ژنوتیپ متحمل یونجه، تقریباً ثابت بوده که به‌نظر می‌رسد در حفظ ساختار گیاه و انجام فعالیت‌های گیاهی مطلوب بوده است، در حالی‌که در ژنوتیپ حساس با افزایش شدت تنش، غلظت پروتئین های محلول به‌شدت کاهش یافت که می‌تواند ناشی از کاهش فراوانی پیش‌ماده‌های تولید کننده پروتئین‌ها (مواد معدنی و آلی) و کاهش تظاهر ژن‌ها یا مبدأ تظاهر آنها باشد.

با توجه به عدم افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در تیمار اسموپرایم نسبت به تیمار هیدروپرایم تا دمای ۹ درجه سانتی‌گراد، می‌توان گفت که میزان تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2) حداقل بوده یا به دلیل کفایت میزان آنزیم‌های لازم برای تجزیه H_2O_2 تولید شده، نیازی به تجزیه آن از طریق افزایش فعالیت آنزیمی نمی‌باشد. اما با کاهش بیشتر دما تا ۳ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به‌منظور جلوگیری از آسیب‌های وارد شده به گیاهچه و حفظ همئوستازی افزایش یافت (۶). در تیمار هیدروپرایمینگ چون آب بدون هیچ‌گونه محدودیتی (پتانسیل منفی ناشی از حل شدن مواد) در اختیار بذر قرار گرفت واکنش‌های بیوشیمیای با سرعت بیشتری انجام می‌شود. در نتیجه میزان پراکسید هیدروژن بیشتری تولید گردید و به‌دنبال آن میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تا دمای ۹ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت، اما با کاهش بیشتر دما سرعت جذب آب و به دنبال آن سرعت فعالیت‌های بیوشیمیایی، میزان تولید پراکسید هیدروژن و میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز کاهش یافت. اما در کل میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد تحت تیمار

اسموپرایم بیشتر از آنزیم کاتالاز بود. بنابراین، احتمالاً آنزیم گایاکول پراکسیداز نقش بیشتری را در کاهش خسارتهای اکسیداسیونی و تجزیه پراکسید هیدروژن به‌ویژه در شرایط تنش سرما ایفا می‌کند. حسین و همکاران (۲۷) اعلام کردند که تنش سرما سبب افزایش آسیب اکسیداتیو به‌صورت تولید پراکسید هیدروژن در عدس شد. تولید بیشتر پراکسید هیدروژن در اثر تنش باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی و در نتیجه کاهش پایداری غشاء می‌گردد که در نتیجه آن فعالیت آنزیم پراکسیداز برای تجزیه پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد. وانگ و همکاران (۵۰) نیز طی انجام آزمایشی روی دو رقم یونجه گزارش کردند که رقم‌های متحمل به سرما، تجمع کمتری از پراکسید هیدروژن را نشان می‌دهند و رقم مقاوم فعالیت آنزیمی بیشتری را در ساقه و ریشه نسبت به رقم حساس نشان داد. علاوه بر این، موسوی و همکاران (۳۸) نشان دادند که اسموپرایمینگ بذرهای گل همیشه‌بهار با پلی‌اتیلن‌گلایکول، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، مخصوصاً کاتالاز و پراکسیداز را در مقایسه با بذرهای پرایم نشده، بالا می‌برد.

افزایش سرعت جوانه‌زنی بذرهای هیدروپرایم شده احتمالاً به‌علت جذب سریع‌تر آب و شروع زودتر فعالیت‌های متابولیسمی در هنگام جذب آب مثل همانندسازی DNA (۳۰)، تحریک فعالیت RNA و در نتیجه پروتئین‌سازی (۲۰)، ترمیم غشای سلولی و افزایش غلظت هورمون‌های محرک جوانه‌زنی از جمله اتیلن (۱۸) می‌باشد که مجموعه این عوامل مقدمات جوانه‌زنی را فراهم می‌آورند و باعث می‌شوند زمانی که این بذرها تیمار شده در شرایط دمای پایین قرار می‌گیرند قبل از آسیب دیدن غشاء و نشت الکترولیت‌ها در مقایسه با شاهد جوانه بزنند و استقرار یابند. علاوه بر این، اسموپرایمینگ بدون حضور یون‌ها موجب افزایش یکنواختی، تسریع آبگیری و همچنین رونویسی پروتئین‌ها می‌شود که به یکنواختی و سرعت بیشتر جوانه‌زنی می‌انجامد (۲۱). زنگ و همکاران (۵۳) نیز گزارش کردند که بذرهای اسموپرایم شده برنج در دمای پایین (۵ درجه سانتی‌گراد) جوانه‌زنی سریع‌تری نسبت به بذرهای شاهد داشتند. این در حالی است که کاپرون و همکاران (۱۷) گزارش کردند که سطوح بالای پتانسیل اسمزی محلول‌های پلی‌اتیلن‌گلایکول موجب آسیب دیدن پروتئین‌های LEA (Late Embryogenesis Abundant) شده و موجب کاهش درصد جوانه‌زنی می‌گردد. علاوه بر این، مرادی دزفولی و همکاران (۴) نیز با اسموپرایمینگ بذرهای لاین‌های مختلف ذرت دریافتند که افزایش مدت زمان و پتانسیل اسمزی محلول‌های حاوی پلی‌اتیلن‌گلایکول موجب کاهش درصد جوانه‌زنی شده است. این در حالی است که هالوپرایمینگ از طریق افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل گلوتاتیون و آسکوربات در بذر باعث می‌شود که این آنزیم‌ها فعالیت پراکسیداسیون لیپید را در طی جوانه‌زنی کاهش دهند، در نتیجه باعث افزایش درصد جوانه‌زنی نسبت به شاهد می‌شوند (۲۶). تنش‌های محیطی علاوه بر اینکه سبب کاهش در شاخص‌های جوانه‌زنی می‌شوند، در روند مصرف مواد ذخیره‌ای و کاهش در وزن خشک ریشه‌چه، ساقه‌چه و در نهایت گیاهچه نیز اثرگذارند (۹). اثر پیش‌تیمارهای مختلف بر روی بذر چاودار کوهی در شرایط تنش خشکی نشان داد که استفاده از روش‌های مختلف پرایمینگ علاوه بر افزایش شاخص‌های جوانه‌زنی سبب افزایش در مصرف مواد ذخیره‌ای بذر و در نتیجه افزایش در وزن خشک گیاهچه می‌شود (۹). یون نیترات نمک نیترات پتاسیم در سنتز آنزیم‌ها و رونویسی DNA و RNA نقش دارد و یون پتاسیم قابلیت نفوذ پذیری دیواره سلولی را افزایش می‌دهد (۲۲) که موجب سهولت پویایی اندوخته‌های غذایی بذر از آندوسپرم به‌سمت محور جنینی، سنتز پروتئین‌ها، نوکلئوتیدها و به‌دنبال آن رشد بیشتر جنین (۴۹) و در نتیجه افزایش بنیه بذر در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد می‌گردد. این در حالی است که پایین بودن شاخص بنیه بذر در دماهای ۶، ۱۲ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد تحت تیمار

هالوپرایم احتمالاً به‌علت اثر سمیت نمک نیترات پتاسیم می‌باشد. بسرا و همکاران (۱۲ و ۱۳) نیز گزارش کردند که با افزایش پتانسیل اسمزی محلول‌های پرایمینگ با نمک نیترات پتاسیم، بنیه گیاهچه در برنج کاهش می‌یابد که این امر ممکن است بر اثر ایجاد تنش و سمیت در محلول‌های مورد استفاده باشد.

نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از آن است که پرایم کردن بذرهای یونجه یکساله با آب مقطر و پلی‌اتیلن‌گلایکول از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در گیاه، توانایی گیاه برای خنثی‌سازی اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پراکسیده کردن لیپیدها، پروتئین‌ها و حتی اسیدهای نوکلئیک را افزایش می‌دهد و از کاهش سرعت و درصد جوانه‌زنی بذرهای این گیاه در دمای پایین جلوگیری می‌کند. علاوه بر این تیمارهای هیدروپرایم و اسموپرایم با افزایش رشد طولی ریشه‌چه و در نتیجه افزایش وزن خشک ریشه‌چه، پس از جوانه‌زنی امکان استقرار بهتر این گیاه در شرایط تنش سرما را فراهم می‌کند. بنابراین هیدروپرایمینگ و در مرحله بعد اسموپرایمینگ بذرهای یونجه یکساله می‌تواند در توسعه کشت این گیاه و در نتیجه تقویت ماده آلی و اصلاح خاک‌های زراعی مؤثر واقع شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مساعدت مالی دانشگاه شهرکرد در اجرای این پژوهش قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. اکرم قادری، ف، کامکار، ب، سلطانی، ا، ۱۳۸۷. علوم و تکنولوژی بذر (ترجمه)، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۵۱۲ صفحه.

۲. عبدی، س، تاج بخش، م، عبدالهی مندولکانی، ب، رسولی صدقیانی، م ح، ۱۳۹۱. بررسی تأثیر گیاهان مختلف کود سبز بر میزان ماده آلی و نیتروژن خاک در شرایط شور، مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، ۱۹(۱): ۱۴۴ – ۱۲۷.

۳. قربانی جاوید، م، مرادی، ف، اکبری، غ ع، اله دادی، ا، ۱۳۸۶. نقش برخی متابولیت‌ها در مکانیسم تنظیم اسمزی *Medicago laciniata* L. (mill) تحت تنش خشکی، مجله علوم زراعی ایران، ۸: ۱۰۵– ۹۰.

۴. مرادی دزفولی، پ، شریف‌زاده، ف، بانکه‌ساز، ا، جان‌محمدی، م، ۱۳۸۷. اثر تیمار پرایمینگ و تاریخ کاشت بر همزمانی مراحل نموی و عملکرد لاین‌های اینبرد ذرت برای تولید بذر هیبرید، مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی، ۱(۴): ۹۸ – ۷۹.

۵. میقاتی، ف، ابراهیم‌زاده، ح، ۱۳۸۲. پاسخ پروتئین‌های برگ دو رقم گندم به تنش شوری، مجله رستنی‌ها، جلد ۴.

۶. یوسفی تنها، ا، فلاح، س، تدین، ع، ۱۳۹۳. اثر پرایمینگ بذر بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی مؤثر بر جوانه‌زنی بذر نخودفرنگی (*Pisum sativum* L.) تحت تنش سرما. مجله کارکرد و فرآیند گیاهی، تحت چاپ

7. Abei, H. 1984. Catalase invitro methods in enzymology. 105:121-126.
8. Ansari, O., and Sharifzadeh, F. 2012. Osmo and hydro priming mediated germination improvment under cold stress conditions in mountain rye (*Secale montanum*). Cercetări Agronomice in Moldova. 3(151):53-62.
9. Ansari, O., Choghazardi, H. R., Sharifzadeh, F., and Nazarli, H. 2012. Seed reserve utilization and seedling growth of treated seeds of mountain rye (*Secale montanum*) as affected by drought stress. Cercetări Agronomice în Moldova. 2 (150): 43-48.
10. Ashraf, M., and Foolad, M. R. 2005. Pre-sowing seed treatment a shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and nonsaline conditions. Advances in Agronomy. 88:223.
11. Ashrafi, A., and Razmjou, Kh. 2010. Evaluation of hydropriming effect on safflower physiological and biochemical characteristics under drought stress. Journal of Crop Ecophysiology. 1(1):34-44.
12. Basra, S. M. A., Farooq, M. and Khaliq, A. 2003. Comparative study of pre-sowing seed enhancement treatments in India rice (*Oryza sativa* L.). Pakistan Journal of Life and Social Sciences. 1:5-9.
13. Basra, S. M. A., Farooq, M., Tabassum, R., and Ahmad, N. 2005. Physiological and biochemical

aspects of seed vigor enhancement treatments in fine rice (*Oryza sativa* L.). Seed Science and Technology. 33:623-628.
14. Bates, L. S., Waldern, R. P., and Tear, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39:205-207.
15. Benjawan, C. H., Chutichudet, P., and Kaewsit, S. 2007. Effects of green manures on growth, yield and quality of green okra (*Abelmoschus esculentus* L.) harlium cultivar. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10: 1028-1035.
16. Bradford, M. 1976. Arapid and sensitive method for thequantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Reviwe Biochemistry. 72:248-254.
17. Capron, I., Corbineau, F. F., Dacher, C., Come, D., and Job, D. 2000. Sugar beet seed priming: effects of priming conditions on germination, solubilization of I-S globulin and accumulation of LEA proteins. Scientia Research. 10:243-254.
18. Chojnowski, F. C., and Come, D. 1997. Physiological and biochemical changes inducedin sunflower seeds by osmopriming and subsent drying, storage and aging. Seed Science Research. 7:323-331.
19. Davey, M. W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J., and Swennen, R. I. 2005. High throughput of malondialdehyde in plant. Analytical Biochemistry. 347: 201-207.
20. Davison, P. A., Taylor, R. M., and Bray, C. M. 1991. Changes in ribosomal RNA integrity in leek (*Allium porrum* L.) seeds during osmopriming and drying osmopriming and drying-bak treatments. Seed Sciensie Research. 1:37-44.
21. El-Araby, M. M., and Hegazi, A. Z. 2004. Responses of tomato seeds to hydro- and osmo-priming and possible relations of some antioxidant enzymes and endogenus polymine fractions. Egyptian Journal of Biology. 6:81-93.
22. El-Bassiony, A. M. 2006 Effect of potassium fertillization on growth, yeild and quality of onion plant. Applied Science Research. 2(10):780-785.
23. Finch-Savage, W. E., Dent, K. C., and Clark, L. J. 2004. Soak conditions and temperature following sowing influence the response of maize (*Zea maize* L.) seeds to on-farm priming (pre sowing seed soak). Field Crops Research. 90:361-374.
24. Food and Agricultural Organization of the United Nation (FAO). 2004. Disponivelem:http://faostas.fao.org/faostat/collections.subset=Agriculture. Acessoem: 8 novembro.
25. Hu, J., Xie, X. J., Wang, Z. F., and Song, W. J. 2006. Sand priming improves alfalfa germination under high-salt concentration stress. Seed Science and Technology. 34:199-204.
26. Hus, J. L., and Sung, J. M. 1997. Antioxidant role of glutathione associated with accelerated aging and hydration of triploid Waremelon seeds. Physiologiae Plantrum. 100:967- 974.
27. Huseyin, A. O., Fusun, E., Didem, D., Tahir, B. A., Tufan, O., Ebru, O., Feyza, S., and Mera, Y. 2008. Antioxidant responses of lentil to cold and drought stress. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 17:56-64.
28. Ikic, I., Maric evic, M., Tomasovic, S., Gunjaca, J., Atovic, Z. S., and Arcevic, H. S. 2012. The effect of germination temperature on seed dormancy in Croatian-grown winter wheats. Euphytica. 188:25-34.
29. ISTA (International Seed Testing Association). 2009. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
30. Jaap, G. V. P., Groot, S. P. C., Kraak, H. L., Bergervoet, J. H. U., and Bino, R. J. 1996. Effects of pre-storage hydration treatments on germination performance, moisture content, DNA synthesis and controlled deterioration tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*) seeds. Seed Science Research. 6:57.
31. Karta, K. K., and Bekele, A. 2012. Influence of seed priming on seed germination and vigor traits of *Vicia villosa ssp*. dasycarpa (Ten.). African Journal of Agricultural Research. 7(21):3202-3208.
32. Kaur, S. A., Gupte, K., and Kaur, N. 2000. Seed priming increases crop yield possibly by modulating enzymes of sucrose metabolism in chickpea. Journal of Agronomy and Crop Science. 191:81-87.
33. Komi, A., Fritz, S., Agbéko Kodjo, T., Manuele, T., and Stefan, V. 2013. The effect of leguminous cover crops and cowpea planted as border rows on maize ear borers with special reference to Mussidia nigrivenella Ragonot (*Lepidoptera Pyralidae*). Crop Protection. 43:72-78.
34. Larcher, W. 2003. Physiological plant ecology, ecophysiology and stress, physiology of functional crops. Further edition. Springer. Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 513p.
35. Mac Adam, J. W., Nelson, C. J., and Sharp, R. E. 1992. Peroxidase Activity in the leaf elongation zone of tallfescue. Plant Physiology. 99:872-878.
36. Mahajan, S. h., and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stress: An Overveiw. Journal of Biochemistry and Biophysics. 446:139-158.

37. Michel, B. E., and Kaufmann, M. R. 1973. The Osmotic potential of Polyethylene Glycol 6000. Plant Physiology. 51:914-916.
38. Moosavi, A., Tavakkol-Afshari, R., Sharif-Zadeh, F., and Aynehband, A. 2009. Effect of seed priming on germination characteristics, polyphenol oxidase, and peroxidase activities of four amaranth cultivars. Journal of Food, Agriculture and Environment. 7:353-358.
39. Parvaiz, A., and Prasad, M. N. V. 2012. Abiotic stress responses in plants, metabolism, productivity and sustainability. Springer Science+Business Media, LLC.
40. Pennycooke, J. C., Cox, S., and Stushnoff, C. 2004. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerace in petunia (*Petinia hybrida*). Journal of Environmental and Experimental Botany. 53:225-232.
41. Posmyk, M. M., and Janas, K. M. 2007. Effects of seed hydropriming in presence of exogenous proline on chilling injury limitation in *Vigna radiata* L. seedlings. Acta Physiologiae Plantarum. 25:326-328.
42. Pullaro, T. C., Marino, P. C., Jackson, D. M., Harrison, H. F., and Keinath, A. P. 2006. Effects of killed cover crop mulch on weeds,weed seeds, and herbivores. Agriculture, Ecosystems and Environment. 115:97-104.
43. Seppanen, M. M. 2000. Charactezia of freezing tolerance in *Solanum commersonii* (dun) with special reference of the relationship between and oxidative stress. University of Helsinki, department of plant production, section of crop husbandry, faculty of agriculture and forestry.
44. Sharma, K. D., and Kuhad, M. S. 2006 Influence of Potassium level and soil moisture regime on biochemical metabolites of *Brassica* Species. Brassica Journal 8:71-74.
45. Siebert, E. T., and Richardson, M. D. 2002. Effects of osmopriming on bermudagrass germination and establishment. Horticultural Studies, AAES Research Series. 506:36-38.
46. Steenwerth, K., and Belina, K. N. 2008. Cover crops enhance soil organic matter, carbon dynamics and microbiological function in a vineyard agroecosystem. Applied Soil Ecology. 40:359-369.
47. Sullivan, p. 2003. Overview of cover crops and green manures fundamentals of sustainable agriculture appropriate technology and transfer for rural areas. Pp:1-18.
48. Umair, A., Ali, S., Bashir, K., and Hussain, S. 2010. Evaluation of different seed priming techniques in mung bean (*Vigna radiate*). Soil and Environment. 29:181-186.
49. Wang, W. B., Kim, Y. H., Lee, H. S., Yong Kim, K., Deng, X., and Kwak, S. 2009. Analysis of antioxidant ezyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. Journal of Plant Physiology and Biochemistry. 47:570-577.
50. Yadav, P.V., Kumari, M., and Ahmed, Z. 2011. Seed priming mediated germination improvement and tolerance to subsequent exposure to cold and salt stress in capsicum. Research Journal of Seed Science. 4(3):125-136.
51. Ya-jing, G., Jin, H., Xian-ju, W., and Chen-xia, S. 2009. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. Journal of Zhejiang University Science B. 10(6):427-433.
52. Yong, Z., Hao-Ru, T., and Ya, L. 2008. Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. World Journal of Agricultural Sciences. 4(4):458-462.
53. Zhang, S., Hu, J., Liu, N., and Zhu, Z. 2006. Presowing seed hydration treatment enhances the cold tolerance of direct-sown rice. Seed Science and Technology. 34:593-601.

The effect of seed priming on germination parameters of annual medic (*Medicago scutellata* L.) seed under chilling stress conditions

Abstract

The chilling stress during seed germination of most plants cause disorder in many phisiological processes, prevention of radicle exit and decrease germination percentage. So, the effect of different seed priming treatments on seed germination parameters changes of annual medic plant under chilling stress was evaluated as a factorial experiment in completely randomized design with four replications. Treatments were consisted of different primings (hydropriming, halopriming, osmopriming and no priming) and five levels of temperature (3, 6, 9, 12 and 15 ˚C). Results showed that reduction of temperature caused linearly reduction of germination rate in seeds treated with hydroprime and osmoprime, but halopriming treatment was improvement germination percentage under chilling stress. The maximum radicle weight was observed in hydropriming treatment. Reducing of temperature increased amount of proline in all priming treatments. Moreover, osmopriming treatment caused increase activity of catalase and guaiacol peroxidase enzymes at temperature of 3˚C. In conclusion, hydropriming treatment is suitable for germination rate and percentage improvement and better establishment of annual medic plant under chilling stress conditions that this can appropriate for increase the exposure potential of this plant as green manure in cold and mild regions of the country.

Keywords: Catalase, Guaiacol peroxidase, Potassium nitrate, Proline, Stratification