تأثیر پرایمینگ بذر با کیتوزان بر جوانه‌زنی، روابط یونی و خصوصیات بیوشیمیایی نخود تحت تنش شوری

Effect of Chitosan Seed Priming on Germination, Ion Relations and Biochemical Characteristics of Chickpea Under Salinity Stress

بتول مهدوی[۱*]، حسین صفری[۲] و سید علی‌محمد مدرس‌ثانوی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۰۷

چکیده

برای ارزیابی تأثیر پرایمینگ (شاهد= بدون پرایمینگ)، آب مقطر، کیتوزان ۰/۱ درصد و کیتوزان ۰/۲ درصد بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه نخود تحت تنش شوری (صفر، ۴، ۶ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر)، آزمایشی در شرایط محیطی کنترل شده انجام شد. نتایج نشان داد که تنش شوری موجب کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص ویگور، طول و وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه، میزان پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم گردید، درحالی‌که میزان سدیم، محتوای پرولین، کربوهیدرات‌های کل و مالون دی‌آلدئید را افزایش داد. پرایمینگ بذر با کیتوزان درصد و سرعت جوانه‌زنی را نسبت به سایر تیمارهای پرایمینگ افزایش داد. در تنش شوری ۸ dS/m، بذرهای پرایم شده با کیتوزان شاخص ویگور، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و وزن خشک ساقه‌چه بیشتری نسبت به شاهد داشتند. بیشترین محتوای پتاسیم در پرایم با کیتوزان ۰/۲ درصد مشاهده شد. همچنین با افزایش شوری، کیتوزان سبب کاهش میزان سدیم و مالون دی آلدئید و افزایش نسبت پتاسیم به سدیم، محتوای پرولین و کربوهیدرات کل گیاهچه‌ها گردید. به این ترتیب می‌توان اظهار داشت که تأثیر عمده پیش‌تیمار بذر نخود با کیتوزان بر رشد گیاهچه بود و تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر افزایش درصد جوانه‌زنی نداشت.

واژه‌های کلیدی: پرولین، پیش‌تیمار بذر، کربوهیدرات کل، مالون دی‌آلدئید

۱ و ۲. به ترتیب استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران
۳. استاد گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
*: نویسنده مسئول Email: b.mahdavi@vru.ac.ir

مقدمه

جوانه‌زنی بذر اولین و مهمترین مرحله در چرخه زندگی گیاهان است (*گریم و کامپبل*[1]، 1991). جوانه‌زنی بذر تحت تأثیر بسیاری از عوامل محیطی مانند دما، شوری، نور، آب و غلظت اکسیژن قرار می‌گیرد. شوری یکی از مهمترین عوامل محدودکننده جوانه‌زنی و رشد گیاه است (*خان و گلزار*[2]، 2003). تنش شوری با ایجاد اثرات اسمزی و سمیت یون‌ها سبب کاهش، تأخیر و حتی ممانعت از جوانه‌زنی می‌گردد (*خواجه*[3] و همکاران، 2003). یکی از مکانیسم‌هایی که گیاهان برای مقابله با اثرات زیان‌آور تنش شوری به‌کار می‌برند، سنتز اسمولیت‌ها ازجمله پرولین و کربوهیدرات‌های محلول می‌باشد (*تروتل*[4] و همکاران، 1996؛ *مارکزی*[5] و همکاران، 2003). گزارش‌هایی مبنی بر افزایش میزان اسیدهای آمینه پرولین برای تنظیم اسمزی درون سلولی در شرایط تنش شوری در گیاهان لوبیا سودانی (*بهام باردکار و چاوان*[6]، 2011) و لوبیا چشم بلبلی (*پیتال*[7] و همکاران، 2010) وجود دارد. همچنین *هاسگاوا*[8] و همکاران (2000) بیان داشتند که محتوای کربوهیدرات‌های کل در مراحل مختلف رشد گیاهان در واکنش به تنش شوری افزایش می‌یابد. در بسیاری از گونه‌های قرار گرفته در معرض شوری، افزایش در جذب یون Na^+ و کاهش K^+ و اختلال در توازن یونی مشاهده‌شده است (*مانز و تستر*[9]، 2008).

یکی از راهکارهای تحریک جوانه‌زنی و افزایش استقرار گیاهچه‌ها در شرایط تنش، استفاده از روش‌های مختلف پیش تیمار بذرهاست. یکی از رایج‌ترین این روش‌ها استفاده از پرایمینگ است. پرایمینگ بذر دامنه محیطی مناسب برای جوانه‌زنی را افزایش داده و سبب ظهور سریعتر و یکنواخت گیاهچه‌ها می‌گردد (*مک دولاند*[10]، 1999). همچنین پرایمینگ بذر استقرار و رشد گیاه را در شرایط تنش شوری بهبود می‌بخشد (*باسرا*[11] و همکاران، 2005).

در مطالعات اخیر، اثر مثبت پیش‌تیمار بذر با کیتوزان روی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه گیاهان مختلف ازجمله ذرت مشاهده‌شده است (*گان*[12] و همکاران، 2009). کیتوزان یک بیوپلیمر کربوهیدراتی مشتق شده از کیتین است که در پوست سخت‌پوستان، کوتیکول حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها وجود دارد. اهمیت کیتوزان به‌علت خصوصیات بیولوژیک و فیزیولوژیک منحصر به فرد این پلیمر است که سبب کاربرد زیاد آن در صنایع مختلف مانند دارویی، پزشکی و کشاورزی شده است (*باتیستا-بانز*[13] و همکاران، 2004). برای کیتوزان کاربردهای فراوانی در کشاورزی بیان شده است که تحریک جوانه‌زنی و رشد گیاه یکی از آنها است. خیساندن بذرها با کیتوزان انرژی جوانه‌زنی و درصد جوانه‌زنی را در بادام‌زمینی افزایش داد (*زیو*[14] و همکاران، 2002). گزارش شده است که پوشش بذر با کیتوزان جوانه‌زنی بذر را افزایش داده و تحمل به تنش شوری را در گیاهچه‌های برنج هیبرید افزایش می‌دهد (*ران و اکسیو*[15]، 2002). پرایمینگ بذر با دو نوع محلول مختلف کیتوزان قدرت جوانه‌زنی بذرهای ذرت را افزایش داد (*شائو*[16] و همکاران، 2005). به هرحال مکانیزم عمل کیتوزان روی جوانه‌زنی ناشناخته باقی‌مانده است؛ اما به‌نظر می‌رسد بتوان از کیتوزان به‌عنوان یک ماده امیدبخش برای تیمار بذر استفاده کرد.

نخود، در بین حبوبات سومین گیاه کشت شده در جهان است. این گیاه در طیف وسیعی از شرایط محیطی از مناطق مدیترانه‌ای غرب آسیا تا نواحی نیمه‌گرمسیری شمال استرالیا کشت می‌گردد (*ترنر*[17] و همکاران، 2001). در بین ارقام مختلف نخود تنوع مقاومت به شوری چندان زیاد نیست که بتوان گونه‌های گیاهی مناسب برای کشت در مناطق شور را در بین آنها شناسایی و معرفی کرد بنابراین باید به‌دنبال راهکارهای دیگر برای غلبه بر این مشکل بود. یکی از این راهکارها استفاده از تیمارهای مختلف پرایمینگ است. بنابراین تحقیق حاضر با هدف تعدیل اثرات شوری در این گیاه با استفاده از تیمارهای مختلف پرایمینگ انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه زراعت دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه

1. Grime and Campbell
2. Khan and Gulzar
3. Khajeh
4. Trotel
5. Murakeozy
6. Bhamburdekar and Chavan
7. Patel
8. Hasegawa
9. Munns and Tester
10. McDonald
11. Basra
12. Guan
13. Bautista-Banos
14. Zhou
15. Ruan and Xue
16. Shao
17. Turner

تکرار اجرا گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل شوری در چهار سطح (۰، ۴، ۶ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) و پرایمینگ در چهار سطح شاهد = بدون پرایمینگ)، پرایمینگ با آب مقطر، کیتوزان ۰/۱ درصد و کیتوزان ۰/۲ درصد بود. بدین منظور بذرهای نخود (*Cicer arietinum* L.) (رقم آزاد) در غلظت‌های مختلف محلول‌های کیتوزان و آب مقطر برای ۳ ساعت در دمای ۲۵°C غوطه‌ور شد. سپس بذرهای پرایم شده با آب مقطر شسته و خشک شدند. برای تمام تیمارها در هر ۳ تکرار ۲۵ عدد از بذرهای تیمار شده، به پتری‌دیش‌های استریل حاوی کاغذ صافی واتمن شماره ۱ انتقال یافت. به هر یک از پتری دیش‌ها ۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های شوری با سطح مورد نظر اضافه شد و در ژرمیناتور با دمای ۲۰°C گذاشته شد. هشت روز بعد، تعداد بذرهای جوانه‌زده شمارش و طول ریشه‌چه، ساقه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه، میزان پرولین، کربوهیدرات‌های کل، مالون دی‌آلدئید و غلظت عناصر سدیم و پتاسیم اندازه‌گیری گردید. برای خشک کردن نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰°C قرار داده شدند. درصد جوانه‌زنی با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید (*ران*[1] و همکاران، 2002):

$$GP = \frac{n}{N} \times 100 \qquad (۱)$$

که در آن n: تعداد بذرهای جوانه زده بعد از هشت روز و N: تعداد کل بذرها

سرعت جوانه‌زنی از رابطه (۲) محاسبه شد:

$$GR = \sum \left(\frac{ni}{Di} \right) \qquad (۲)$$

که در آن n: تعداد بذرهای جوانه زده در روز iام و Di: تعداد روز پس از شروع آزمایش است (*آگراوال*[2]، 2004).

بنیه گیاهچه از رابطه (۳) به‌دست می‌آید (*ابدول-باکی* و *آندرسون*[3]، 1970):

بنیه گیاهچه= (درصد جوانه‌زنی × میانگین طول گیاهچه (سانتی‌متر))/ ۱۰۰ (۳)

به‌منظور اندازه‌گیری غلظت یون‌ها، ۰/۲ گرم ماده خشک گیاهچه‌های نخود در هر تیمار در بوته چینی سائیده شده و به مدت نیم ساعت در دمای ۲۵۰°C و سپس به‌مدت دو ساعت در دمای ۵۵۰°C در کوره قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و خنک شدن کوره، نمونه‌ها خارج شدند. به نمونه حاصل، ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال اضافه شده و پس از عبور از کاغذ صافی، عصاره حاصل با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در عصاره به‌دست آمده، غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم توسط دستگاه فلیم فتومتر (Model PFP7, Germany) تعیین گردید.

برای اندازه‌گیری پرولین از روش *بیتس*[4] و همکاران (1973) استفاده شد. غلظت پرولین نمونه‌ها با استفاده از غلظت‌های مشخص پرولین خالص در منحنی استاندارد به عنوان شاهد در طول موج ۵۲۰ نانومتر بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ محاسبه گردید. اندازه‌گیری کربوهیدرات کل از روش *دابیوس*[5] و همکاران (1956) با استفاده از فنل - اسید سولفوریک و استاندارد گلوکز انجام شد. جذب استانداردها به همراه جذب کربوهیدرات کل نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار کربوهیدرات نمونه، بر مبنای میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه‌ها محاسبه گردید. مالون دی‌آلدئید به‌عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء با روش *دی‌وس*[6] و همکاران (1991) اندازه‌گیری شد. میزان مالون دی‌آلدئید نمونه‌ها با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی (ε=155 $\mu M^{-1}cm$) محاسبه گردید.

از نرم‌افزار SAS برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده و با مشاهده تفاوت معنی‌دار در آنالیز واریانس (ANOVA) مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

1. Ruan
2. Agrawal
3. Abdul-baki and Anderson
4. Bates
5. Dubois
6. De Vos

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر پرایمینگ و شوری بر خصوصیات جوانه‌زنی گیاهچه‌های نخود

Table 1: Analysis of variance of the effect of priming and salinity on germination characteristics of chickpea seedlings

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	شاخص ویگور Vigor index	طول ساقه‌چه Shoot length	طول ریشه‌چه Root length	وزن خشک ساقه‌چه Shoot dry weight	وزن خشک ریشه‌چه Root dry weight
شوری Salinity (S)	3	140^{**}	17.65^{**}	9.85^{**}	1.45^{**}	2.27^{**}	430.7^{**}	962.29^{**}
پرایمینگ بذر Seed priming (P)	3	76^{**}	68.72^{**}	3.87^{**}	0.54^{**}	0.82^{**}	252.17^{**}	280.63^{**}
S× P	9	9.62^{ns}	0.33^{ns}	0.20^{*}	0.028^{**}	0.08^{**}	9.78^{*}	30.43^{ns}
خطای آزمایشیError	32	20	1.39	0.09	0.01	0.3	4.56	38.20
ضریب تغییرات CV (%)		4.76	9.58	5.88	5.79	4.48	9.18	13.68

*، ** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵، ۰/۰۱ و غیرمعنی‌دار

*, ** and ns significant at 0.05, 0.01 probability levels and non-significant, respectively

جدول ۲: مقایسه‌ی میانگین اثرات پرایمینگ و شوری بر برخی خصوصیات جوانه‌زنی و فیزیولوژیک نخود

Table 2: Mean comparison of priming and salinity on some of germination and physiological characteristics of chickpea

	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	سرعت جوانه‌زنی (روز) Germination rate (day)	وزن خشک ریشه‌چه (میلی‌گرم) Root dry weight (mg)	غلظت پتاسیم (درصد) K (٪)
شوری (دسی‌زیمنس بر متر) Salinity (dS/m)				
0	97.33^{a}	13.58^{a}	55.58^{a}	5.12^{a}
4	96^{a}	13.03^{a}	49.41^{b}	4.73^{b}
6	92^{b}	11.66^{b}	39.83^{c}	4.35^{b}
8	90^{b}	10.94^{b}	35.92^{c}	3.86^{c}
پرایمینگ بذر Seed priming				
شاهد Control	91.33^{b}	8.88^{c}	40.08^{b}	4.02^{c}
آب مقطر Distilled water	92^{b}	12.44^{b}	42.08^{b}	4.27^{bc}
کیتوزان ۰/۱٪ 0.1% Chitosan	96^{a}	13.86^{a}	48.67^{a}	4.63^{b}
کیتوزان ۰/۲٪ 0.2% Chitosan	96^{a}	14.03^{a}	49.92^{a}	5.15^{a}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using LSD Test

نتایج و بحث

درصد و سرعت جوانه‌زنی

تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد که اثر شوری و پرایمینگ بذر بر درصد و سرعت جوانه‌زنی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود ولی اثر متقابل شوری و پرایمینگ بذر بر صفات مذکور معنی‌دار نگردید (جدول ۱). با افزایش شوری هر دو صفت روند کاهشی را نشان دادند. کمترین کاهش مربوط به شوری ۴ دسی زیمنس بر متر بود که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت و بیشترین مقدار کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی در شوری ۸ دسی زیمنس بر متر مشاهده گردید (جدول ۳). شوری بالا سبب کاهش و حتی ممانعت از جوانه‌زنی می‌گردد. این ممکن به این علت باشد که NaCl نفوذپذیری غشای پلاسمایی را تحت تأثیر قرار داده و جریان یون‌های خارجی و جریان اسمولیت‌های سیتوپلاسمی را در سلول‌های گیاه افزایش می‌دهد (*آلن*[1] و همکاران، 1995). در بین روش‌های مختلف پرایمینگ، بذرهای پرایم شده با کیتوزان ۰/۱ و ۰/۲ درصد دارای بیشترین درصد جوانه‌زنی بودند. پرایمینگ با آب مقطر و بذرهای شاهد (بدون پرایم) در رده‌های بعدی قرار گرفتند (جدول ۳). همچنین بیشترین سرعت جوانه‌زنی در بذرهای پرایم شده با کیتوزان ۰/۲ درصد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با بذرهای پرایم شده با کیتوزان ۰/۱ درصد نداشت و کمترین مقدار این صفت مربوط به شاهد بود (جدول ۳). در تحقیقی *زیو* و همکاران (2002) مشاهده کردند که خیساندن بذرهای بادام زمینی در محلول کیتوزان سبب افزایش درصد و انرژی جوانه‌زنی در این گیاه می‌گردد. با این وجود، *گان* و همکاران (2009) دریافتند که پرایمینگ بذرهای ذرت با کیتوزان اثری بر درصد جوانه‌زنی بذرهای این گیاه نداشت. در بذرهای کلم چینی (*Brassica chinensis*) خیسانده شده در کیتوزان نیز افزایش سرعت جوانه‌زنی مشاهده شده است (*اکسیو*[2] و همکاران، 2002). *زینگ*[3] و همکاران (2012) نیز گزارش کردند که پوشش بذر سویا با کیتوزان سبب تحریک جوانه‌زنی در این گیاه می‌گردد. ایشان بیان داشتند که کیتوزان یک غشای نیمه تراوا روی سطح بذر ایجاد می‌کند که این غشاء توانایی حفظ رطوبت دانه و جذب رطوبت خاک را دارد و بنابراین کیتوزان با داشتن این خاصیت می‌تواند جوانه‌زنی دانه را تحریک کند.

1. Allen
2. Xue
3. Zeng

شاخص ویگور

اثر شوری و پرایمینگ بذر بر شاخص ویگور گیاهچه در سطح ۱ درصد و اثر متقابل شوری و پرایمینگ در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). شاخص ویگور یکی از اجزای مشخص‌کننده کیفیت دانه می‌باشد (هامپتون[4]، 1995). با افزایش شوری شاخص ویگور گیاهچه‌ها کاهش یافت (شکل ۱). گزارش شده است که پرایمینگ بذرهای ذرت با کیتوزان سبب افزایش شاخص ویگور گیاهچه در این گیاه شده است. (*شائو* و همکاران 2005).

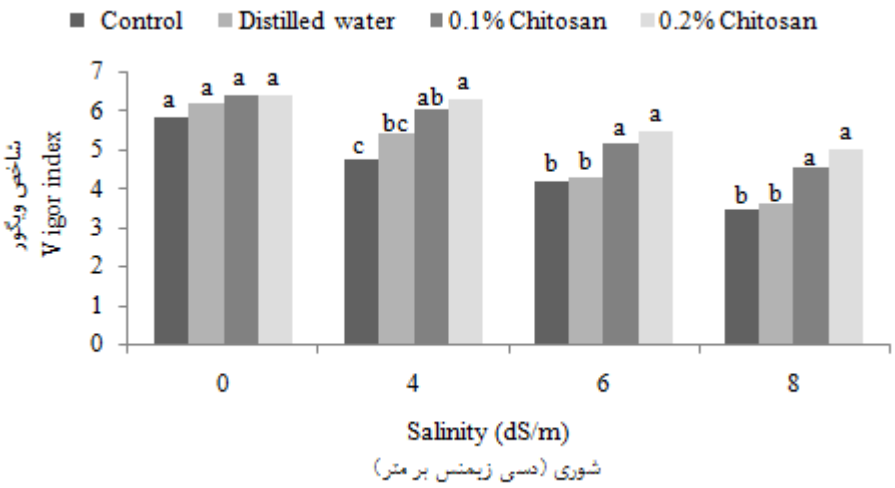
در این مطالعه در شرایط بدون تنش، با اینکه بین تیمارهای مختلف پرایمینگ از نظر شاخص ویگور گیاهچه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، اما این صفت در تیمار پرایمینگ با هر دو غلظت کیتوزان از لحاظ عددی نسبت به شاهد بیشتر بود. در شوری ۴ دسی‌زیمنس بر متر، بیشترین شاخص ویگور در تیمار کیتوزان ۰/۲ درصد مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با کیتوزان ۰/۱ درصد نداشت. در این سطح تنش شاخص ویگور در پرایم با آب مقطر اختلاف معنی‌داری با کیتوزان ۰/۱ درصد نداشت و کمترین این صفت در تیمار شاهد (بدون پرایم) بود. در سطح تنش ۶ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر، پرایمینگ با هر دو غلظت کیتوزان سبب افزایش معنی‌دار شاخص ویگور نسبت به شاهد گردید (شکل ۱).

طول ساقه‌چه و ریشه‌چه

طول ساقه‌چه و ریشه‌چه تحت تأثیر شوری و پرایمینگ بذر و اثر متقابل شوری و پرایمینگ بذر در سطح احتمال ۱ درصد قرار گرفت (جدول ۱). افزایش شوری به ۸ دسی‌زیمنس بر متر سبب کاهش طول ساقه‌چه و ریشه‌چه گردید (شکل ۲). در شرایط بدون تنش، تیمارهای مختلف پرایمینگ از نظر طول ساقه‌چه با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. در این شرایط بین پرایمینگ با کیتوزان و آب مقطر اختلاف معنی‌داری از نظر طول ریشه‌چه وجود نداشت و تیمار شاهد کمترین طول ریشه-چه را دارا بود. وقتی گیاهچه‌ها در معرض شوری ۸ dS/m قرار گرفتند، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه در بذرهای پرایم شده با کیتوزان ۰/۲ درصد بیشترین بود و کمترین این صفات در بذرهای شاهد (بدون پرایم) مشاهده گردید. (شکل ۲). این نتایج با نتایج *لیانجو*[5] و همکاران (2011) روی گیاه گندم مطابقت دارد. آنها دریافتند که پیش‌تیمار بذرها با کیتوزان

4. Hampton
5. Lianju

سبب افزایش طول ساقه‌چه و ریشه‌چه این گیاه در معرض تنش شوری ۱۵۰ میلی‌مولار گردید. همچنین پوشش بذر با کیتوزان رشد گیاهچه‌های برنج هیبرید را در شرایط تنش شوری افزایش داد (*ران و اکسیو*، 2002). درحالی‌که مکانیزم عمل کیتوزان بر رشد گیاهچه هنوز مشخص نیست، *گان* و همکاران (2009) اظهار داشتند کیتوزان فشار اسمزی سلول را کاهش داده و از طریق افزایش دسترسی و جذب آب و مواد غذایی سبب افزایش رشد گیاه می‌گردد.



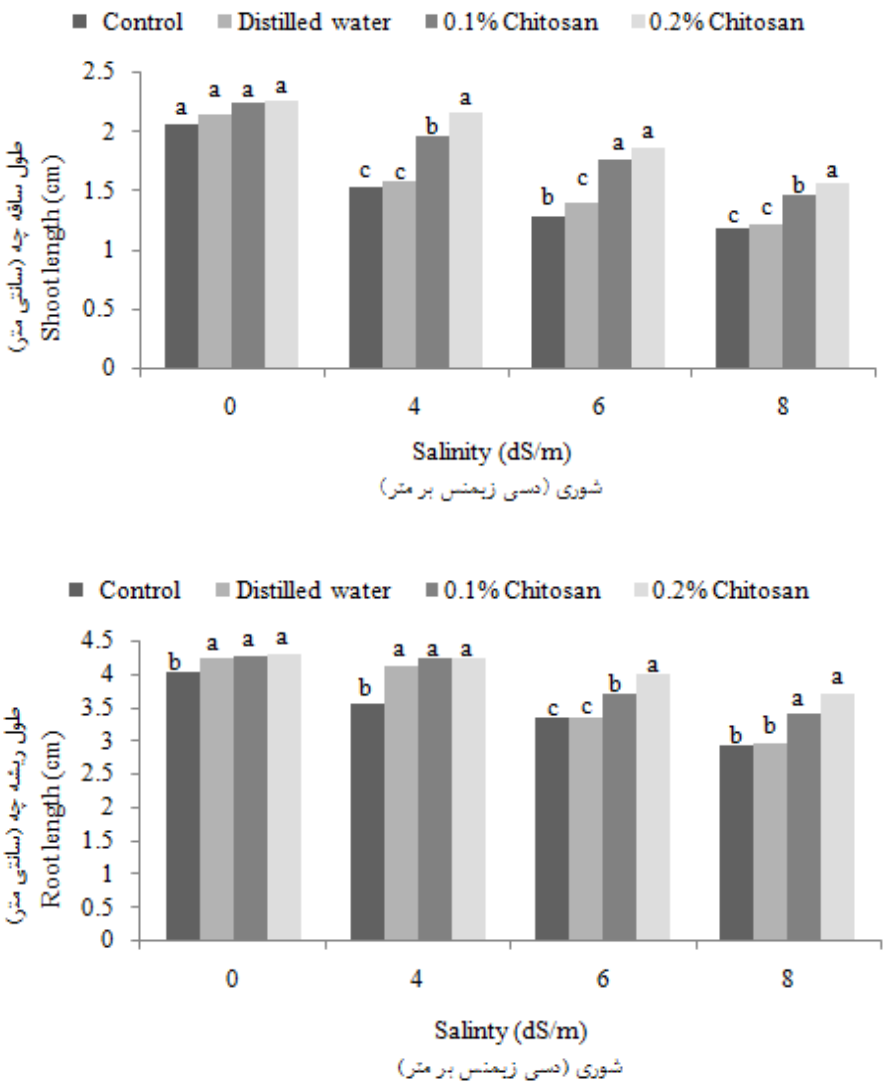
شکل ۱: اثر برهمکنش شوری و پرایمینگ بر شاخص ویگور نخود. برای هر فاکتور، در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

Fig. 1: Interaction effect of salinity and priming on vigor index of chickpea. Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using LSD Test

وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه

نتایج بیانگر اثر معنی‌دار شوری و پرایمینگ بذر بر وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه در سطح احتمال ۱ درصد بود. وزن خشک ساقه‌چه همچنین تحت تأثیر اثر متقابل شوری و پرایمینگ در سطح احتمال ۵ درصد قرار گرفت، درحالی‌که اثر متقابل شوری و پرایمینگ بر وزن خشک ریشه‌چه معنی‌دار نبود (جدول ۱). وزن خشک ساقه‌چه با افزایش شوری کاهش یافت (شکل ۳). وزن خشک ساقه‌چه هم در شرایط بدون تنش و هم در تمامی سطوح تنش شوری، در تیمار کیتوزان ۰/۲ درصد بیشترین و تیمار شاهد (بدون پرایم) کمترین مقدار را به خود اختصاص داد (شکل ۳). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش شوری وزن خشک ریشه‌چه کاهش یافت (جدول ۳). بیشترین وزن خشک ریشه‌چه در تیمار پرایمینگ با کیتوزان ۰/۲ درصد مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با کیتوزان ۰/۱ درصد نداشت. تیمار پرایمینگ با کیتوزان ۰/۲ درصد سبب افزایش ۲۴/۵۵ درصدی وزن خشک ریشه‌چه نسبت به شاهد گردید (جدول ۳). *نو*[1] و همکاران (2003) گزارش کردند که پرایمینگ بذرهای سویا با کیتوزان سبب افزایش رشد گیاهچه‌ها در این گیاه گردید. به‌طور مشابه، چو[2] و همکاران (2008) مشاهده کردند که تیمار کیتوزان وزن گیاهچه‌های آفتابگردان را نسبت به شاهد افزایش داد. در گیاه گندم نیز *لیانجو* و همکاران (2011) مشاهده کردند در شرایط تنش، کیتوزان سبب افزایش وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه گردید.

1. No
2. Cho



شکل ۲: اثر برهمکنش شوری و پرایمینگ بر طول ساقه‌چه و ریشه‌چه نخود. برای هر فاکتور، در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند

Fig. 2: Interaction effect of salinity and priming on shoot and root length of chickpea. Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using LSD Test

محتوای پتاسیم، محتوای سدیم و نسبت پتاسیم به سدیم

محتوای پتاسیم گیاهچه‌ها تحت تأثیر تنش شوری و پرایمینگ در سطح احتمال ۱ درصد قرار گرفت. همچنین اثر شوری و پرایمینگ و اثر متقابل شوری و پرایمینگ بر محتوای سدیم و نسبت پتاسیم به سدیم معنی‌دار بود (جدول ۲). محتوای سدیم پایین و پتاسیم بالا در سیتوپلاسم برای نگهداری فرایندهای آنزیمی در سیتوپلاسم لازم و ضروری است (*مانز و تستر*، 2008). در تحقیق حاضر نیز با افزایش شوری به ۸ دسی‌زیمنس بر متر محتوای پتاسیم گیاهچه‌ها کاهش یافت (جدول ۳). در بسیاری از گیاهان تنش شوری سبب جذب سدیم و ممانعت از جذب پتاسیم می‌گردد (*مانز*[1]، 2002). بذرهای نخود پرایمینگ شده با کیتوزان ۰/۲ درصد، گیاهچه‌های با بیشترین محتوای پتاسیم تولید کردند که ۲۸/۱۱ درصد محتوای پتاسیم را نسبت به تیمار شاهد (بدون پرایم) افزایش داد.

محتوای پتاسیم گیاهچه‌ها در بذرهای پرایم شده با آب مقطر و کیتوزان ۰/۱ درصد اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (جدول

1. Munns

۳). این نتایج با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (*فرانک*[1] و همکاران، 2008؛ *دیزنگ*[2] و همکاران، 2011). با افزایش شوری محتوای سدیم گیاهچه‌ها نسبت به شرایط بدون تنش افزایش یافت (شکل ۴). همچنین نتایج نشان داد که محتوای سدیم هم در شرایط بدون تنش و هم در شرایط تنش در تیمار شاهد بیشترین و در کیتوزان ۰/۲ درصد کمترین مقدار را داشت (شکل ۴). در شرایط بدون تنش و در تمامی سطوح تنش، پرایمینگ بذرها با کیتوزان سبب افزایش نسبت پتاسیم به سدیم گیاهچه‌ها نسبت به شاهد گردید (شکل ۴). بنابراین به نظر می‌رسد با افزایش شوری، کیتوزان با کاهش محتوای سدیم و افزایش نسبت پتاسیم به سدیم در گیاهچه‌های نخود توانسته پاسخ مناسبی در رویارویی با تنش شوری داشته باشد.

ویژگی‌های بیوشیمیایی (پرولین، کربوهیدرات کل و مالون دی‌آلدئید)

اثر شوری و پرایمینگ بذر بر محتوای پرولین، کربوهیدرات کل و مالون دی‌آلدئید گیاهچه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل شوری و پرایمینگ بر صفات پرولین و کربوهیدرات‌های کل به‌ترتیب در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بود. درحالی‌که اثر متقابل این صفات بر محتوای مالون دی‌آلدئید اثری نداشت (جدول ۲). محتوای پرولین و کربوهیدرات کل گیاهچه‌ها در شوری‌های بالا نسبت به شاهد بدون تنش افزایش یافت (شکل ۵). در شرایط بدون تنش، پرایمینگ بذر با هر دو غلظت کیتوزان سبب افزایش محتوای پرولین و کربوهیدرات کل گیاهچه‌ها نسبت به شاهد (بدون پرایم) و پرایم با آب مقطر گردید (شکل ۵). همچنین پیش تیمار بذرهای نخود با هر دو غلظت کیتوزان در تمامی سطوح تنش، محتوای پرولین و کربوهیدرات کل گیاهچه‌ها را نسبت به شاهد (بدون پرایم) و پرایم با آب مقطر افزایش داد (شکل ۵). در شرایط تنش شوری محتوای پرولین به‌دلیل تحریک یا فعال شدن بیوسنتز پرولین، کاهش در اکسیداسیون آن، کاهش مصرف آن در سنتز پروتئین‌ها افزایش می‌یابد (*خان*[3] و همکاران، 2010). همچنین پرولین بعنوان یک اسمولیت عمل کرده و پتانسیل اسمزی سلول را کاهش داده و یون‌های سمی را جذب می‌کند (*وون وارد و بنت*[4]، 2005) و نقش مهمی را در حفاظت گیاهان از تنش اسمزی بازی می‌کند (*خان* و همکاران، 2010). همچنین گزارش شده است که کربوهیدرات‌ها از طریق تنظیم اسمزی، نگهداری تورژسانس و همچنین پایداری غشاها و پروتئین‌ها، از سلول‌های گیاهان در شرایط تنش محافظت می‌کنند (*بانرت*[5] و همکاران، 1995). بنابراین کیتوزان ممکن است با افزایش محتوای پرولین و کربوهیدرات‌های محلول در گیاهچه‌های نخود و در نتیجه تنظیم اسمزی سلول در کاهش اثرات زیان‌بار تنش شوری روی این گیاه مؤثر واقع شود.

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش تنش شوری به ۸ دسی زیمنس بر متر، محتوای مالون دی‌آلدئید گیاهچه‌ها نسبت به شاهد ۵۲/۸۳ درصد افزایش یافت (شکل ۶). وقتی گیاهان در معرض تنش محیطی قرار می‌گیرند، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشای پلاسمایی اتفاق افتاده و سبب تولید مالون دی‌آلدئید می‌شود، این امر سبب خسارت به سیستم غشایی شده، نفوذپذیری انتخابی مختل شده و نشت الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد، بنابراین محتوای مالون دی‌آلدئید می‌تواند منعکس کننده شدت پراکسیداسیون غشا باشد (*سان*[6] و همکاران، 2001). پرایمینگ با هر دو غلظت کیتوزان سبب کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید گیاهچه‌ها نسبت به شاهد (بدون پرایم) و پرایم با آب مقطر شد (شکل ۶). *هادویگر*[7] و همکاران (2002) گزارش کردند که پرایمینگ بذرهای ذرت با کیتوزان محتوای مالون دی‌آلدئید گیاهچه‌ها را کاهش داد. کاهش مالون دی‌آلدئید توسط کیتوزان احتمالاً به این دلیل است که کیتوزان می‌تواند با کلاته‌کردن یون‌های فلزی یا ترکیب شدن با لیپیدها، اکسیداسیون لیپیدها را کاهش دهد (*اکسیو* و همکاران، 2002).

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه افزایش غلظت شوری بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده به غیر از محتوی سدیم، مالون دی‌آلدئید، پرولین و کربوهیدرات اثر کاهنده‌ای داشت. در شرایط تنش، پرایمینگ بذرها با کیتوزان اثری بر درصد جوانه‌زنی بذرها نداشت درحالی‌که اثر مثبتی بر شاخص ویگور و رشد گیاهچه‌های نخود داشت و با کاهش محتوای سدیم و مالون دی‌آلدئید و افزایش نسبت پتاسیم به سدیم، افزایش پرولین و کربوهیدرات کل گیاهچه‌ها سبب افزایش مقاومت گیاهچه‌های نخود تحت تنش شوری شده است.

پیشنهاد می‌شود برای اینکه کاربرد عملی پرایمینگ بذر با کیتوزان قابل توصیه باشد، اثر پرایمینگ بذر با سایر غلظت‌های

1. Farouk
2. Dzung
3. Khan
4. Woodward and Bennett
5. Bohnert
6. Sun
7. Hadwiger

کیتوزان در شرایط آزمایشگاه و همچنین اثر پرایمینگ بذر با کیتوزان در شرایط گلخانه و مرزعه و تا مرحله برداشت محصول مورد بررسی قرار گیرد.

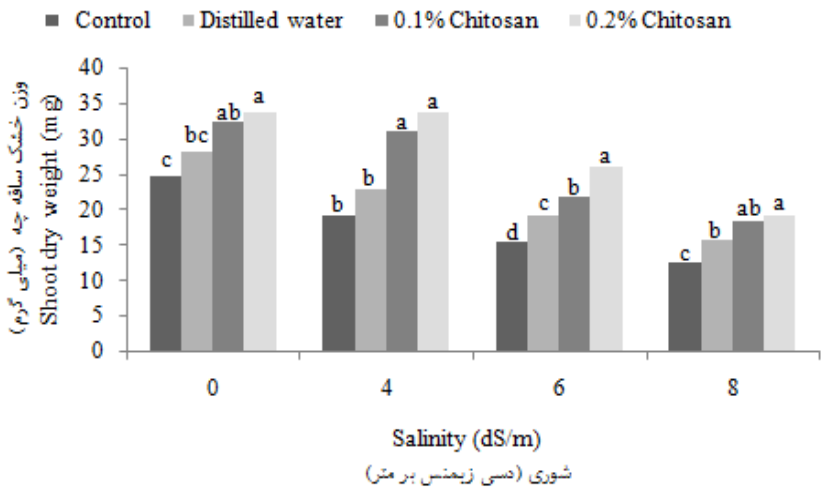
جدول ۲: تجزیهٔ واریانس اثر پرایمینگ و شوری بر روابط یونی و ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاهچه‌های نخود

Table 2: Analysis of variance of the effect of priming and salinity on ion relations and physiological characteristics of chickpea seedlings

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	غلظت پتاسیم K	غلظت سدیم Na	نسبت پتاسیم به سدیم K/Na) (Ratio	محتوای پرولین Proline content	محتوای کربوهیدرات Carbohydrates content	محتوای مالون دی آلدئید Malonialdehyde content
شوری Salinity (S)	3	3.51**	1.57**	6.58**	0.01**	5.93**	0.19**
پرایمینگ بذر Seed priming (P)	3	2.88**	0.95**	3.92**	0.02**	37.47**	0.04**
S× P	9	0.12ns	0.08**	0.70**	0.001**	1.21*	0.0007ns
خطای آزمایشی Error	32	0.22	0.03	0.17	0.0001	0.53	0.005
ضریب تغییرات CV (%)		10.35	7.23	19.13	5.63	7.58	10.78

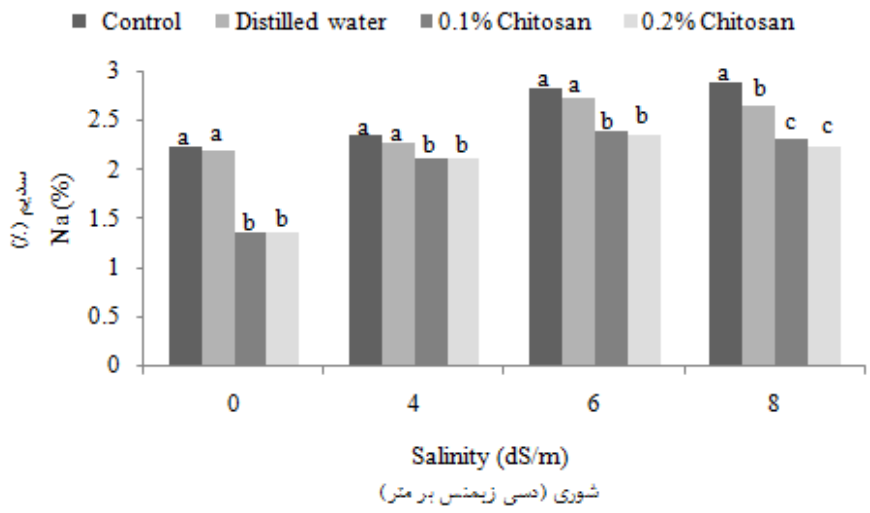
*، ** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵، ۰/۰۱ و غیرمعنی‌دار

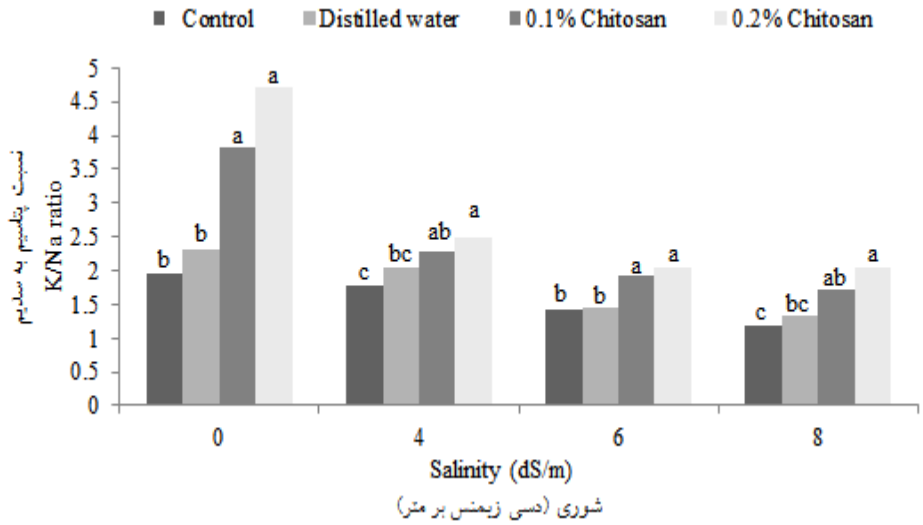
*, ** and ns significant at 0.05, 0.01 probability levels and non-significant, respectively



شکل ۳: اثر برهمکنش شوری و پرایمینگ بر وزن خشک ساقه‌چه نخود. برای هر فاکتور، در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند

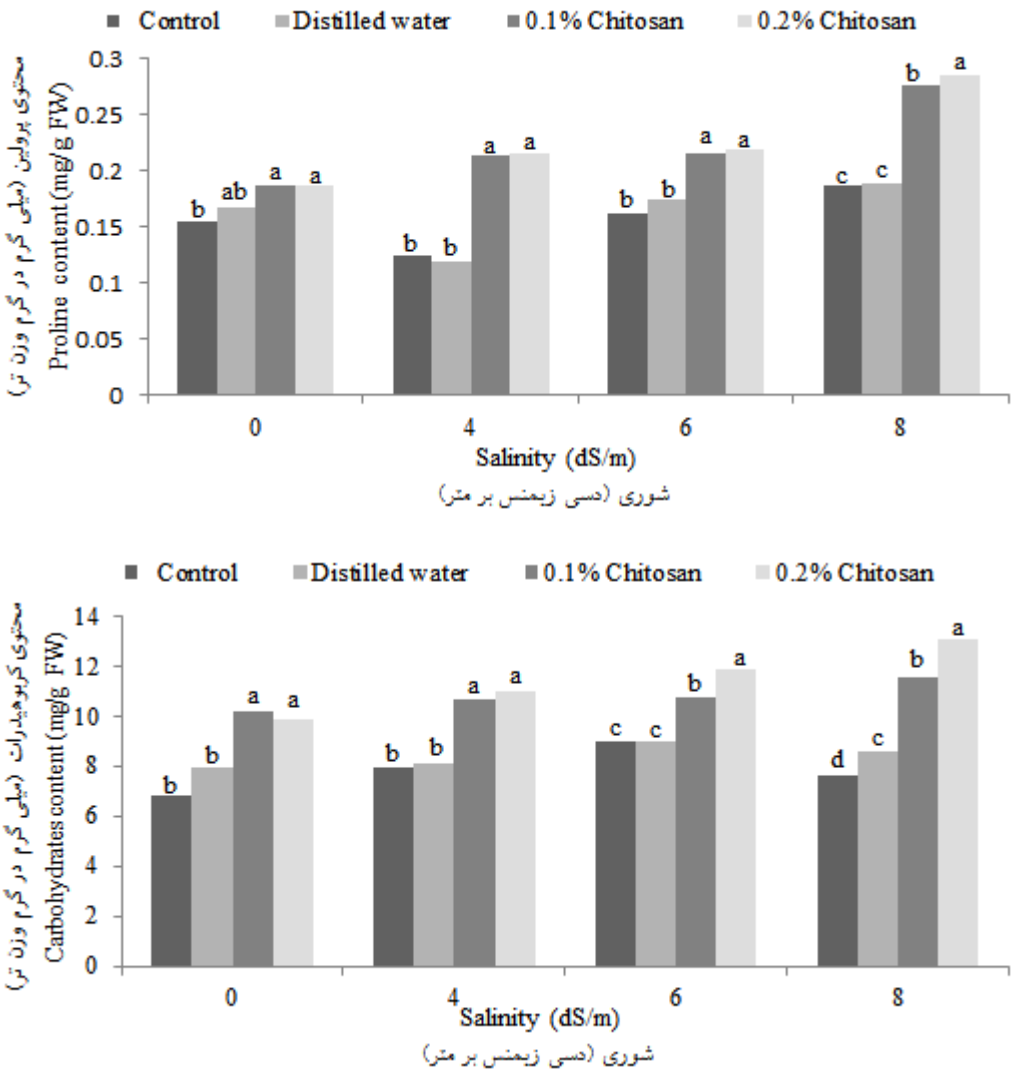
Fig. 3: Interaction effect of salinity and priming on dry shoot weight of chickpea. Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using LSD Test





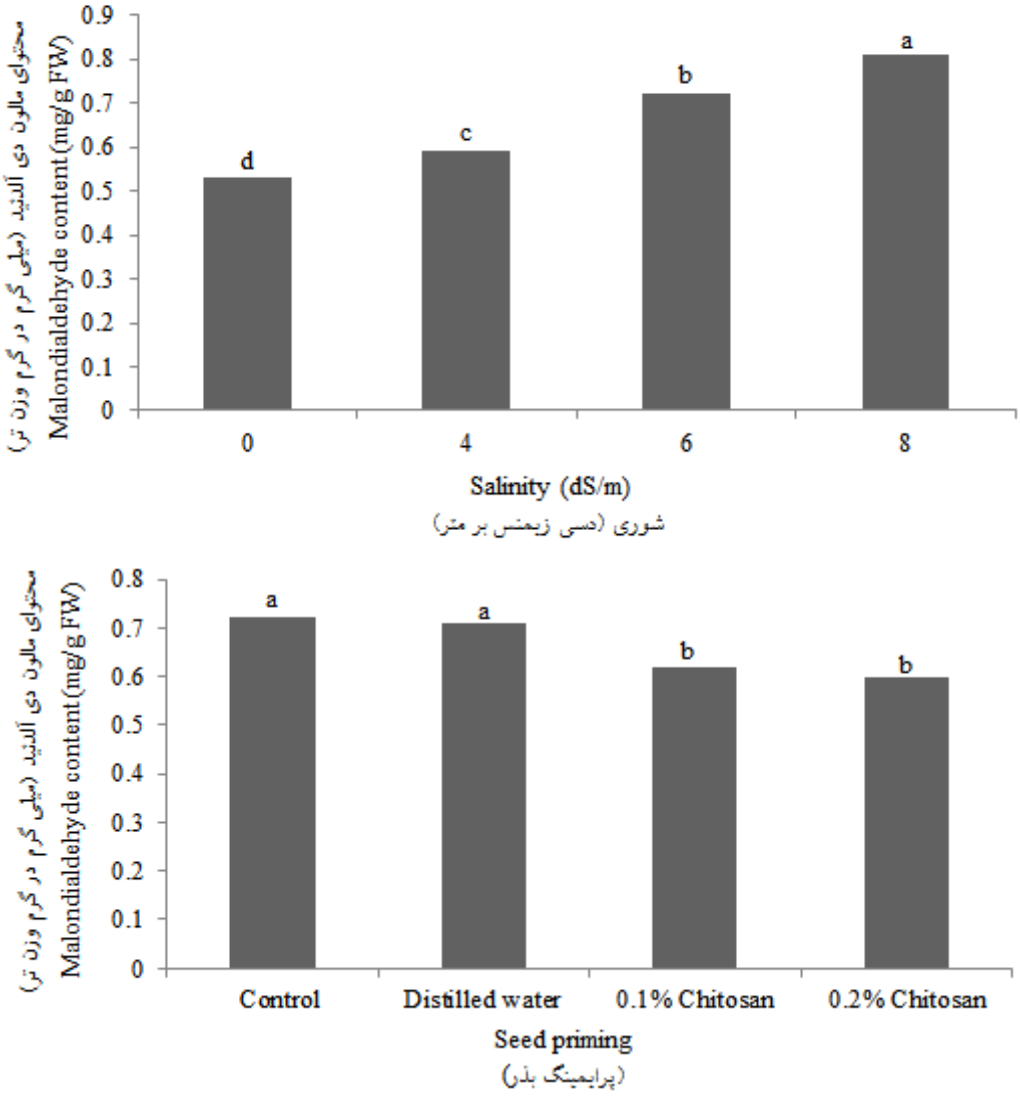
شکل ۴: اثر برهمکنش شوری و پرایمینگ بر محتوای سدیم و نسبت پتاسیم به سدیم نخود. برای هر فاکتور، در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند

Fig. 4: Interaction effect of salinity and priming on Na content and K/Na of chickpea. Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using LSD Test



شکل ۵: اثر برهمکنش شوری و پرایمینگ بر محتوای پرولین و کربوهیدرات نخود. برای هر فاکتور، در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند

Fig. 5: Interaction effect of salinity and priming on proline and carbohydrate content of chickpea. Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using LSD Test



شکل ۶: اثر شوری و پرایمینگ بر محتوای مالون دی‌آلدئید نخود. در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند

Fig. 6: Effect of salinity and priming on malondialdehyde content of chickpea. Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using LSD Test

منابع

Abdul-baki, A. A. and Anderson, J. D. 1970. Viability and leaching of sugars from germinating barely. Crop Science, 10: 31-34.

Agrawal, R. L. 2004. Seed technology. Oxford and IBH publishing Co. LTD. New Dehli, pp: 350.

Allen, G. J., Wyn Jones, R. G. and Leigh, R. A. 1995. Sodium transport measured in plasma membrane vesicles isolated from wheat genotypes with differing K^+/Na^+ discrimination traits. Plant Cell and Environment, 18: 105-115.

Basra, S. M. A., Afzal, I., Rashid, R. A. and Hameed, A. 2005. Inducing salt tolerance in wheat by seed vigor enhancement techniques. International Journal of Biology and Biotechnology, 2: 173-179.

Bates, L. S., Waldern, R. P. and Teave, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39: 205-207.

Bautista-Banos, S., Hernandez-Lopez, M. and Bosquez- Molina, E. 2004. Growth inhibition of select fungi by chitosan and plant extracts. Mexican Journal of Phytopathology, 22: 178-186.

Bhamburdekar, S. B. and Chavan, P. D. 2011. Effect of some stresses on free proline content during pigeonpea (*Cajanas cajan*) seed germination. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 7 (3): 235-241

Bohnert, K. H., Nelson, D. E. and Jensen, R. G. 1995. Adaptations to environment stresses. Plant Cell, 7: 1099-1111.

Cho, M. H., No, H. K. and Prinyawiwatkul, W. 2008. Chitosan treatments affect growth and selected quality of sunflower sprouts. Journal of Food Science, 73 (1): 570-577.

De Vos, C., Schat, H., De Waal, M., Vooijs, R. and Ernst, W. 1991. Increased to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant silene cucubalus, Plant Physiology, 82: 523-528.

Dzung, N. A. 2011. Enhancing Crop Production with Chitosan and Its Derivatives. In : Kim, S. K. eds. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives, pp: 643.

Farouk, S., Ghoneem, K. M. and Ali Abeer, A. 2008. Induction and Expression of systematic risistance to downy mildew disease in cucumber plant by elicitors. Egyptian Journal of Phytopathology, 36 (1-2): 95-111.

Grime, J. P. and Campbell, B. D. 1991. Growth rate, habitat productivity, and plant strategy as predictors of stress response. In: Mooney, H. A., Winner, W. E., Pell, E. J. and Chu, E. eds. Response of Plants to Multiple Stresses, pp. 143-159

Guan, Y. J., Hu, J., Wang, X. J. and Shao, C. X. 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: 427-433.

Hadwiger, L. A., Klosterman, S. J. and Choi, J. J. 2002. The mode of action of Chitosan and its oligomers in inducing plant promoters and developing disease resistance in plants, In: Suchiva, K., Chandrkrachang, S., Methacanon, P. and Peter M. G. eds. Advances in Chitin Science, pp. 452-457

Hampton, J. G. and Tekrony, D. M. 1995. Handbook of Vigor Test Methods. 3rd edition. The international Seed Testing Association, Zurich, Switzerland, pp: 117.

Hasegawa, P. M., Bresson, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51: 463-499.

Khajeh, M., Powell, A. A. and Bingham, I. J. 2003. The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soybean seeds. Seed Science and Technology, 31: 715-725.

Khan, M. A. and Gulzar, S. 2003. Germination responses of *Sporobolus ioclados*, a saline desert grass. Journal of Arid Environments, 55: 453-464.

Khan, M. N., Siddiqui, M. H., Mohammad, F., Naeem, M. and Khan, M. M. A. 2010. Calcium chloride and gibberellic acid protect linseed (*Linum usitatissimum* L.) from NaCl stress by inducing antioxidative defence system and osmoprotectant accumulation. Acta Physiologiae Plantarum, 32: 121-132.

Lianju, M., Yueying, L., Cuimei, Y., Yan, W., Xuemei, L., Na, L., Qiang, C. and Ning, B. 2011. Alleviation of exogenous oligochitosan on wheat seedlings growth under salt stress. Protoplasma, 249: 393-399

McDonald, M. B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. Seed Science and Technology, 27 (1): 177-237.

Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment, 25: 239-250.

Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology, 59: 651-681.

Murakeozy E. P., Nagy, Z., Duhaze, C., Bouchereau, A. and Tuba, Z. 2003. Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. Journal of Plant Physiology, 160: 395-401.

No, H. K., Lee, K. S., Kim, I. D., Park, M. J., Kim, S. D. and Meyers, S. P. 2003. Chitosan treatment affects yield, ascorbic acid content, and hardness of soybean sprouts. Journal of Food Science, 68: 680-685.

Patel, P. R., Kajal, S. S., Patel, V. R., Patel, V. J. and Khristi, S. M. 2010. Impact of salt stress on nutrient uptake and growth of cowpea. Brazilian Journal of Plant Physiology, 22 (1): 43-48.

Ruan, S. l., Xue, Q. Z. and Tylkowska, K. 2002. The influence of priming on germination of rice (*Oryza sativa* L.) seeds and seedling emergence and performance in flooded soil. Seed Science and Technology, 30: 61-67.

Ruan, S. L. and Xue, Q. Z. 2002. Effects of chitosan coating on seed germination and salt-tolerance of seedlings in hybrid rice (*Oryza sativa* L.). Acta Agronomica Sinica, 28 (6): 803-808 (in Chinese).

Shao, C. X., Hu, J., Song, W. J. and Hu, W. M. 2005. Effects of seed priming with chitosan solutions of different acidity on seed germination and physiological characteristics of maize seedling. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 31 (6): 705-708 (in Chinese).

Sun, W. Y., Wang, H. and Huang, J. C. 2001. The effect of external betaine on membrane lipid peroxidation of wheat seedling under water stress. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 21: 487-491.

Trotel, P., Bouchereau, A., Niogret, M. F. and Larher, F. 1996. The fate of osmo-accumulated proline in leaf discs of Rape (*Brassica napus* L.) incubated in a medium of low osmolarity. Plant Science, 118: 31-45.

Turner, N. C., Wright, G. C. and Siddique, K. H. M. 2001. Adaptation of grain legumes (Pulses) to water limited environments. Advances in Agronomy, 71: 193-231.

Woodward, A. J. and Bennett, I. J. 2005. The effect of salt stress and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of *in vitro* propagated shoots of Eucalyptus camaldulensis. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 82: 189-200.

Xue, Y. S., Wen Qing, Z., Wei, X. and Qing, W. 2002. Effect of chitosan as seed coating on seed germination and seedling growth and several physiological and biochemical indexes in rapeseed. Plant Physiology Communications, 38 (3): 225-227.

Zeng, D., Luo, X. and Tu, R. 2012. Application of bioactive coatings based on chitosan for soybean seed protection. International Journal of Carbohydrate Chemistry, 1-5.

Zhou, Y. G., Yang, Y. D., Qi, Y. G., Zhang, Z. M., Wang, X. J. and Hu, X. J. 2002. Effects of chitosan on some physiological activity in germinating seed of peanut. Journal of Peanut Science, 31: 22-25.

Effect of Chitosan Seed Priming on Germination, Ion Relations and Biochemical Characteristics of Chickpea Under Salinity Stress

Mahdavi[1*], B., Safari[2], H. and Modarres-Sanavy[3], S. A. M.

Abstract

In order to study the effects of priming (control (non-primed), distilled water, 0.1% chitosan and 0.2% chitosan) on seed germination and growth of chickpea seedling, under salinity stress (0, 4, 6 and 8 dS/m) an experiment was conducted in controlled-environment conditions. Results showed salinity stress reduced germination percentage and rate, vigor index, length and dry weights of shoots and roots, K concentration and K/Na ratio, whereas increased Na concentration, proline, total carbohydrate and malondialdehyde content. Seed priming with chitosan increased germination percentage and rate compared to other priming treatments.Vigor index, shoot length, root length and dry weights of shoots were higher in chitosan primed seed compared to control under salinity stress 6 dS/m. The highest K concentration was observed in seed primed with 0.2% chitosan. Also, with the increasing salinity, chitosan decreased Na concentration and malondialdehyde and increased K/Na ratio, proline and total carbohydrate content. Thus, it suggests that main effect priming the chickpea seeds with chitosan was on seedling growth and it don't effect on increasing germination percentage.

Keywords: Malondialdehyde, Proline, Seed pretreatment, Total carbohydrate

1 and 2. Assistant Professor and MSc Student Respectively, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

3. Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

※: Corresponding author Email: b.mahdavi@vru.ac.ir