"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد یازدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
(ص ۴۲-۲۷)
مقاله پژوهشی

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 11, No.: 1, Spring 2022
(pp: 27-42)
DOI: 10.22034/ijsst.2021.352847.1375
Research Article

تأثیر کاربرد کودهای زیستی نیتروژن بر بهبود کیفیت بذر گیاه مادری گندم رقم چمران تحت کمبود آب

نوید عباسی[۱]، حمیدرضا بلوچی[۲*]، علیرضا یدوی[۳]، امین صالحی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و تکنولوژی بذر، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
(تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۱۱/۱۹؛ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۱/۲۱)

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر تنش کمبود آب و منابع کود نیتروژن بر خصوصیات جوانه‌زنی و بنیه بذرهای گندم رقم چمران آزمایشی در مرکز تحقیقات کشاورزی استان فارس اجرا شد. در این آزمایش ابتدا بذرهای گندم در سه سطح تنش کمبود آب (آبیاری کامل، تنش کمبود آب در مرحله شیری و تنش کمبود آب در مرحله خمیری) و چهار سطح منابع کود نیتروژن (کود اوره ۱۰۰ درصد نیاز گیاه، کود اوره ۲۵ درصد به همراه نیتروکسین و نیتراژین، کود اوره ۵۰ درصد به همراه نیتروکسین و نیتراژین، کود اوره ۷۵ درصد به همراه نیتروکسین و نیتراژین) تولید شد. سپس کیفیت و بنیه بذرهای حاصل در دو آزمایش استاندارد جوانه‌زنی و پیری تسریع شده به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر تیمارهای آزمایش بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده به‌جز درصد جوانه‌زنی معنی‌دار بود. تنش کمبود آب و منابع کود نیتروکسین و نیترازین به همراه اوره ۲۵ درصد در ابتدای زوال منجر به افزایش غلظت پروتئین (۱۲/۳۹ درصد) شد و اما کمترین میزان نشاسته (۲۰/۸۵ درصد) تحت اثر متقابل تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه ۷۵ درصد اوره در زمان ۴۸ ساعت زوال مشاهده شد. همچنین تنش کمبود آب منجر به افزایش غلظت، قندهای محلول و کاهش میزان آنزیم‌های آلفا آمیلاز دانه نیز شد. در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از تیمارهای تلفیقی کود اوره و کودهای زیستی در شرایط تنش برای تغذیه گیاه مادری، منجر به تولید بذرهایی با قوه نامیه بالاتر و متحمل‌تر به زوال شد.

واژه‌های کلیدی: بنیه بذر، تنش کمبود آب، تولید بذر، گندم، نیتروژن

Effect of Biological Nitrogen Fertilizers on Improving the Quality of Maternal Wheat Chamran Seeds under water deficit

N. Abbasi[1], H.R. Balouchi[2*], A.R. Yadavi[3], A. Salehi[3]

1. M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Yasouj
2. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Iran.
3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Iran.
(Received: Feb. 07, 2021 – Accepted: Apr. 10, 2021)

Abstract

In order to investigate the effect of water deficit stress and sources of nitrogen fertilizer on germination quality and vigor of wheat seeds of Chamran cultivar, an experiment was conducted in Agricultural Research Center of Fars province. In this experiment, wheat seeds were first treated at three levels of water deficit stress (complete irrigation, water deficit stress in milky and rough stage) and four levels of nitrogen fertilizer sources (urea fertilizer 100% plant requirement, urea fertilizer 25% Along with nitroxin and nitrogen, 50% urea fertilizer with nitroxin and nitrogen, 75% urea fertilizer with nitroxin and nitrogen were produced. Then, the quality and vigor of the seeds were tested in two standard experiments of germination and accelerated aging in a factorial design with four replications. The results showed that the effect of experimental treatments on all measured traits except germination percentage was significant. Water deficit stress and sources of nitroxin and nitrogen fertilizer with 25% urea at the beginning of decline led to an increase in protein concentration (12.39%), but the lowest amount of starch (20.85 %) under the interaction of nitroxin and nitrogen fertilizer with 75% urea in 48 hours deterioration was observed. Water deficit stress also increased the concentration of soluble sugars and decreased the grain alpha-amylase enzymes. Overall, the results of this study showed that the use of combined treatments of urea fertilizer and biofertilizers in stress conditions to feed the mother plant led to the production of seeds with higher vigor and more resistance to decay.

Keyword: Nitrogen, Seed production, Seed vigor, Water deficit stress, Wheat.

* Email: balouchi@yu.ac.ir

مقدمه

تغییر آب و هوا تهدید جدی برای بیشتر محصولات کشاورزی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان محسوب می‌گردد. بسیاری از مناطق جهان از نظر غذایی و خوراکی به زراعت گندم وابستگی دارند و این محصول در برابر تنش خشکسالی آسیب پذیر است (Sallam *et al*., 2019) بطوری که خشکی و تنش گرمای آخر فصل می‌تواند باعث کاهش ۴۸ درصدی عملکرد دانه گندم شود (Mosavian *et al*., 2020). توانایی جوانه‌زنی بذرها تحت شرایط مطلوب رطوبتی، باعث ا ستقرار بی شتر گیاه و تراکم بالاتر می‌شود که درنتیجه باعث افزایش رشد گیاه می‌گردد (Baalbaki *et al*., 1999). به‌طورمعمول سرعت جوانه‌زنی به‌صورت خطی با کاهش قابلیت د ستر سی به آب، کاهش می‌یابد (Ansari *et al.,* 2012). در اثر تنش خشکی و گرمای انتهای فصل، دانه های چروکیده و کوچکی تولید می‌شود و عملکرد در رابطه با صفات مختلفی مانند وزن هزار دانه و تعداد دانه در سنبله کاهش می‌یابد (Kadar *et al*., 2019). تنش کمبود آب با تأثیر مستقیم بر سنتز پروتئین جنین و همچنین تأثیر بر حرکت و انتقال ذ خایر بذر، جوانه‌زنی بذر را کاهش می‌دهد (Dodd and Donovan, 1999). تقریباً تمام واکنش‌های متابولیکی سلول تحت تأثیر کمبود آب قرار می‌گیرد، بنابراین تولید و میزان آنزیم‌ها و در نتیجه سنتز پروتئین کاهش و درنهایت بر رشد سلول تأثیر می‌گذارد (Farooq *et al.,* 2009).

محققان گزارش کردند که تنش های محیطی می تواند در طول دوره رشد گیاه مادری بر کیفیت بذر تولیدی مؤثر باشد. وقوع تنش کمبود آب پس از رسیدگی فیزیولوژیکی، اما قبل از برداشت می تواند باعث کاهش جوانه‌زنی و بنیه بذر شود (Hamidi *et al.,* 2016). قاسمی گلعذانی و همکاران (Ghassemi-Golezani *et al.,* 2013) کاهش جوانه‌زنی در اثر اعمال تنش کمبود آب روی گیاه مادری نخود را گزارش نمودند. تنش کمبود آب سطوح پروتئینی گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و نتایج متفاوتی را به همراه دارد، به‌طوری‌که برخی کاهش و گروهی افزایش در سطوح پروتئینی را تحت تنش کمبود آب گزارش کردند. تحقیقات پورغلام و همکاران (Pourgholam *et al.,* 2013) روی سویا نشان داد که با کاهش رطوبت خاک میزان پروتئین دانه کاهش یافت، به‌طوری‌که کمترین پروتئین دانه مربوط به قطع آبیاری در مرحله گلدهی و بیشترین پروتئین مربوط به قطع آبیاری در مرحله پر شدن دانه و آبیاری نرمال بود. درحالی که آزمایش‌های جداگانه روی ذرت و گندم نشان داد که تنش خشکی موجب افزایش در صد پروتئین دانه نسبت به شرایط مطلوب آبیاری گردید (Manivannan *et al*., 2015) قابلیت د ستر سی به عنا صر غذایی در طی ر شد گیاه و ر سیدگی دانه، کیفیت بذر و قدرت جوانه‌زنی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. کاربرد نیتروژن کافی برای گیاه مادری باعث افزایش قوه نامیه گیاه گردیده و بذرهای حاصل از این گیاهان، دارای ذخایر غذایی بیشتری بوده و به هنگام بروز تنش نسبت به سایر بذرها موفق‌تر عمل می‌نمایند (Yazdani *et al.,* 2010).

برای آغاز جوانه‌زنی بذر تک لپه‌ای‌ها، ا سید جیبرلیک بعد از سنتز در لپه به لایه آلورون منتقل شده و در آنجا باعث تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده می‌شود که مسئول هیدرولیز مواد ذخیره‌ای بذر شامل کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و ترکیبات فسفردار هستند. این ترکیبات هیدرولیز شده در مرحله جوانه‌زنی بذر مورد استفاده قرار می‌گیرند (Soltani *et al.,* 2006). ازآنجاکه عنصر نیتروژن در ساختار این آنزیم‌ها نقش مهمی به عهده دارد، لذا مصرف نیتروژن کافی بر روی گیاه مادری باعث افزایش مقدار این تنظیم کننده رشد در بذرهای حاصله و درنتیجه افزایش فاکتورهای جوانه‌زنی می‌شود (Yazdani *et al*., 2010).

محققان گزارش کردند که مصرف ۲۴۰ کیلوگرم در هکتار کود اوره در گیاه پایه مادری باعث افزایش

شاخص‌های جوانه‌زنی بذور حاصله و بهبود مقاومت به کمبود آب گندم در مرحله آغازین رشد می‌شود (Fallahi *et al.*, 2011). تلقیح بذر با باکتری‌های آزوسپریلوم و ازتوباکتر موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی می‌شود و گزارش شده است که دلیل احتمالی این موضوع با تولید هورمون‌هایی مانند جیبرلین و اکسین که محرک جوانه‌زنی و رشد هستند، توسط باکتری‌های ازتوباکتر و آزوسپریلوم در ارتباط است (Yazdani *et al.*, 2010). بذور گندم حاصل از گیاهان مادری تغذیه شده با نیتروژن کافی، به علت دارا بودن مقدار پروتئین بیشتر و درنتیجه کیفیت و قوه نامیه بالاتر، درصد و سرعت جوانه‌زنی بیشتر و متوسط زمان جوانه‌زنی کمتری را در مقایسه با بذرهای حاصل از تیمار عدم کاربرد نیتروژن دارا بودند (Yazdani *et al.*, 2010). از آنجا که تنش کمبود آب سبب بروز اختلال در جوانه‌زنی و کاهش توانایی بذر اغلب گیاهان می‌گردد و از سوی دیگر با توجه به گزارش‌هایی مبنی بر اثرات مثبت ترکیبات زیستی بر این صفات، پژوهش حاضر با هدف بررسی خصوصیات جوانه‌زنی و کیفیت بذرهای حاصل از گیاه مادری گندم رقم چمران در ارتباط با تأثیر منابع مختلف کود نیتروژن در شرایط تنش کمبود آب اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش ابتدا بذرهای گندم چمران طبقه مادری (تولیدی سال ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس) در سه سطح تنش کمبود آب (قطع آبیاری در مرحله شیری شدن بذر، قطع آبیاری در مرحله خمیری شدن بذر و آبیاری نرمال) و چهار سطح منابع کود نیتروژن (استفاده از کود زیستی نیتروکسین و نیتراژین به همراه ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد میزان مورد نیاز گیاه از کود شیمیایی اوره و استفاده از کود اوره به تنهایی به‌صورت ۱۰۰ درصد نیاز گیاه (۲۵۰ کیلوگرم در هکتار) در سال زراعی ۹۷- ۱۳۹۶ در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس (ایستگاه زرقان) تولید شد. روش استفاده از کودهای زیستی، نیتروکسین حاوی دو باکتری محرک رشد (ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم) و نیتراژین حاوی دو باکتری (سودوموناس و انتروباکتر) به غلظت 10^8 سلول زنده در هر میلی‌لیتر بود که به‌صورت بذر مال از هر دو نوع کود، هر کدام به میزان ۱ لیتر در ۱۰۰ کیلوگرم بذر گندم استفاده گردید.

آزمون خاک از عمق ۳۰ سانتی‌متری خاک برای بررسی میزان عناصر موجود در خاک انجام گردید و سپس کودهای موردنیاز (به‌غیراز نیتروژن) بر اساس آزمون خاک به مقدار کافی در اختیار خاک قرار گرفت (جدول ۱). جهت انجام این آزمایش پس از عملیات تهیه زمین و آماده‌سازی بستر بذر، بذرهای گندم رقم چمران را که برای کشت در سطح مورد نظر تهیه شده روی پلاستیک تمیز ریخته به وسیله سمپاش و با دست طبق دستورالعمل درج شده روی قوطی حاوی کود زیستی با باکتری‌ها مخلوط کرده و در سایه به مدت یک روز خشک گردید و به‌صورت نواری خطی و با دست با تراکم ۴۰۰ بذر در مترمربع در ۱۵ آذر ماه سال ۱۳۹۶ کشت گردید.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

Table 1- Soil physical and chemical characteristics of experiment site

هدایت الکتریکی Ec	اسیدیته (pH)	فسفر P	پتاسیم K	آهن Fe	روی Zn	منگنز Mn	مس Cu	ماده آلی Organic matter	نیتروژن N	اشباع Saturation	رس Clay	سیلت Silt	شن Sand
(dS/m^2)				(mg/Kg)						(%)			
0.97	7.02	12	314	7.9	0.8	7.9	1.1	1.07	0.09	54	32	54	14

کود اوره به‌صورت سرک و در سه مرحله، ابتدای پنجه‌زنی، ابتدای ساقه‌دهی و قبل از گلدهی بر اساس تیمارهای ذکر شده در اختیار گیاه قرار گرفت آبیاری نرمال بر اساس اندازه گیری نیاز آبی گیاه و ظرفیت مزرعه به‌طورمعمول با دور آبیاری ۱۵ تا ۲۰ روزه بصورت کرتی انجام شد.

بعد از برداشت و بوجاری بذر کیفیت و بنیه بذرهای حاصل در دو آزمایش استاندارد جوانه‌زنی و پیری تسریع شده به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد آزمون قرار گرفت.

در آزمون استاندارد جوانه‌زنی، بذرها (۲۵ عدد بذر در هر پتری) پس از ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد به مدت ۳۰ ثانیه، به درون پتری های ۹۰ میلی‌متری استریل شده روی کاغذ صافی منتقل گردیدند (Khayat et al., 2011). سپس آب مقطر به‌وسیله‌ی پیپت ۵ سی سی به درون هر پتری ریخته شد. در ادامه پتری‌ها به داخل ژرمیناتور با دمای ۲۰ درجه سلسیوس انتقال داده شدند (Sedghi, 2015) و به مدت ۸ روز تعداد بذرهای جوانه‌زده شمارش شدند در پایان دوره جوانه‌زنی بذرهای گندم، شاخص‌های درصد جوانه‌زنی (معادله ۱)، سرعت جوانه زنی (معادله ۲)، متوسط زمان جوانه‌زنی (معادله ۳)، شاخص وزنی بنیه بذر (معادله ۴)، شاخص طولی بنیه بذر (معادله ۵)، طول و وزن خشک ریشه چه و ساقه چه اندازه‌گیری شد.

(معادله ۱) (Maguire, 1962)

$$\text{درصد جوانه‌زنی بذر} = \frac{\text{تعداد بذرهای جوانه‌زده}}{\text{تعداد کل بذرها}} \times ۱۰۰$$

(معادله ۲) (Maguire, 1962)

$$\text{سرعت جوانه زنی} = \sum (N_i/T_i)$$

Ti: تعداد روزها از زمان شروع آزمایش Ni: تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز

(معادله ۳) (Ellis and Roberts, 1980)

$$MGT = \sum D.n/n$$

MGT: میانگین زمان جوانه‌زنی، n: تعداد بذوری که در روز D جوانه‌زده‌اند و D: تعداد روزهای پس از شروع جوانه‌زنی

(معادله ۴) (Abdul-Baki and Anderson, 1973)

$$\text{شاخص طولی بنیه گیاهچه} = \frac{\text{طول گیاهچه} \times \text{درصد جوانه‌زنی}}{۱۰۰}$$

(معادله ۵) (Abdul-Baki and Anderson, 1973)

$$\text{شاخص وزنی بنیه گیاهچه} = \frac{\text{وزن خشک گیاهچه} \times \text{درصد جوانه‌زنی}}{۱۰۰}$$

به‌منظور بررسی کیفیت بذر، آزمون پیری تسریع شده روی بذور انجام شد. مدت زمان سطوح پیری تسریع شده شامل صفر (شاهد) ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. برای ایجاد شرایط پیری تسریع شده بذرها در رطوبت نسبی ۹۸ درصد و در دمای ۴۱ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار گرفتند (Dehghanpour Farashah, 2011). برای این کار بذور (۱۰۰ گرم برای هر تیمار) روی یک توری سیمی از جنس آلومینیوم ریخته و در ظرف های خلأ جداگانه که در کف آن آب ریخته شده بود قرار داده شدند وسپس ظرف‌ها در دمای موردنظر قرار گرفتند. در پایان همه بذرها در یک زمان از انکوباتور خارج شدند (Ansari and Sharifzadeh, 2012). پس از طی زمان‌های مشخص شده فوق، میزان پروتئین، قند محلول، نشاسته و میزان آنزیم آلفا آمیلاز اندازه‌گیری شد.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان آنزیم آلفاآمیلاز از ۰/۵ گرم بذر بعد از مدت‌زمان ۱۲ ساعت (با توجه به اینکه اولین جوانه‌زنی ۱۸ ساعت بعد از کشت اتفاق افتاد) آبنوشی استفاده گردید. برای استخراج عصاره بذری از روش مکر و همکاران (Makkar *et al.,* 2008) استفاده شد. میزان آلفاآمیلاز در عصاره بذرها توسط روش بکر (Baker, 1991) و برنفد (Bernfeld, 1955) (با اندکی تغییرات) تعیین شد. میزان قندهای محلول با استفاده از روش

پاکوئین و لجاژر (Paquine and Lechasseur, 1979)، پروتئین به روش برادفورد (Bradford, 1976) و نشاسته با روش یوشیدا و همکاران (Yoshida *et al.*, 1976) اندازه‌گیری شد. درنهایت داده‌های آزمایش با نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD و برای مقایسه میانگین اثرات متقابل از رویه L.S.Means استفاده گردید. در بخش آزمایش پیری تسریع شده برای بررسی اثرات متقابل سه‌جانبه برش‌دهی برای هر سطح تنش کمبود آب صورت گرفت.

نتایج و بحث

شاخص‌های جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش جوانه‌زنی و بنیه بذرهای گندم نشان داد که در تمامی تیمارهای اعمال شده تفاوت معنی‌داری در درصد جوانه زنی مشاهده نشد (جدول ۲). اثر تنش کمبود آب بر شاخص‌های سرعت جوانه‌زنی، متوسط زمان جوانه‌زنی، طول گیاه‌چه، وزن خشک گیاه‌چه، بنیه طولی گیاه‌چه و بنیه وزنی گیاه‌چه با سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. همچنین منابع مختلف کود نیتروژن بر شاخص‌های سرعت جوانه‌زنی، متوسط زمان جوانه‌زنی، طول گیاه‌چه، وزن خشک گیاه‌چه، بنیه طولی گیاه‌چه و بنیه وزنی گیاه‌چه با سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد. برهمکنش تیمارهای تنش کمبود آب و منابع مختلف کود نیتروژن نیز بر شاخص‌های سرعت جوانه‌زنی، متوسط زمان جوانه‌زنی، طول گیاه‌چه، وزن خشک گیاه‌چه و بنیه وزنی گیاه‌چه با سطح احتمال ۱٪ و بر بنیه طولی گیاه‌چه با سطح احتمال ۵٪ از لحاظ آماری معنی‌داربود (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تیمارهای آزمایشی بر جوانه‌زنی و بنیه گندم رقم چمران

Table 2- Analysis of variance of experimental treatments on germination and vigor of wheat of Chamran cultivar

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات Mean of squares						
		درصد جوانه‌زنی Germination percentage	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	متوسط زمان جوانه‌زنی Mean germination time	طول گیاه‌چه Length of the seedling	وزن خشک گیاه‌چه Seedling dry weight	بنیه طولی گیاه‌چه Longitud vigor of seedlings	بنیه وزنی گیاه‌چه Weighting vigor of seedlings
تنش کمبود آب Water deficit stress	2	44.36 ns	88.9**	0.001**	1091.5**	2.11**	901.4**	1.76**
منابع کودی نیتروژن Nitrogen fertilizer sources	3	34.2 ns	8.5**	0.0001**	55.8**	0.82**	34.5**	0.69**
تنش کمبود آب × منابع کود نیتروژن Water deficit stress × Nitrogen fertilizer sources	6	10.5 ns	3.8*	0.00006**	6.7**	0.04**	8.4*	0.06**
خطای آزمایش error	36	16.0	1.4	0.00001	1.7	0.006	2.8	0.006
درصد ضریب تغییرات CV%		4.2	6.5	6.8	5.9	7.27	8.0	7.71

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد، ns برابر عدم تفاوت معنی‌دار.

* and ** significant at 5 and 1%, respectively, ns equal to no significant difference.

نتایج مقایسه میانگین سرعت جوانه‌زنی نشان داد که بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۲۰/۵ بذر در روز) به بذرهای تولیدی در شرایط آبیاری نرمال (شاهد) و کاربرد کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد مشاهده شد. همچنین میزان سرعت جوانه‌زنی بذرهای تولیدی با اوره ۱۰۰ درصد، ۱۸/۶ بذر در روز بود که نسبت به نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای مختلف تنش کمبود آب، منابع کودی برای شاخص‌های جوانه‌زنی

Table 3 - Comparison of the average interaction of different water deficit stress treatments, fertilizer sources for germination indices

سطوح تنش کمبود آب Water deficit stress levels	منابع کود نیتروژن Fertilizer sources	سرعت جوانه‌زنی (بذر/روز) Germination rate (seed/day)	متوسط زمان جوانه‌زنی (روز) Mean germination time (day)	طول گیاهچه (سانتی متر) Length of the seedling (cm)	وزن خشک گیاهچه (گرم) Seedling dry weight (g)	بنیه طولی گیاهچه Longitude vigor of seedlings	بنیه وزنی گیاهچه Weighting vigor of seedlings
بدون تنش کمبود آب (شاهد) No Water deficit stress (control)	نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۲۵ درصد 25% urea + nitroxin and nitrogen	20.5^{a}	0.049^{ef}	34.22^{a}	1.60^{a}	30.78^{a}	1.44^{ab}
	نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۵۰ درصد 50% urea + nitroxin and nitrogen	18.9^{abc}	0.053^{def}	31.57^{b}	1.63^{a}	29.37^{a}	1.52^{a}
	نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۷۵ درصد 75% urea + nitroxin and nitrogen	20.5^{a}	0.048^{f}	29.37^{c}	1.46^{b}	28.77^{a}	1.44^{ab}
	اوره ۱۰۰ درصد 100% urea	18.6^{bc}	0.054^{de}	31.77^{b}	1.20^{c}	29.89^{a}	1.13^{c}
تنش کمبود آب در مرحله شیری Water deficit stress in the milk stage	نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۲۵ درصد 25% urea + nitroxin and nitrogen	19.7^{ab}	0.051^{ef}	22.9^{d}	1.40^{b}	22.19^{b}	1.36^{b}
	نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۵۰ درصد 50% urea + nitroxin and nitrogen	19.9^{ab}	0.05^{ef}	18.17^{e}	1.18^{c}	17.45^{c}	1.13^{c}
	نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۷۵ درصد 75% urea + nitroxin and nitrogen	20.4^{a}	0.049^{ef}	16.75^{ef}	1.002^{d}	16.58^{cd}	0.99^{d}
	اوره ۱۰۰ درصد 100% urea	19.8^{ab}	0.51^{ef}	15.4^{f}	0.54^{ef}	14.77^{d}	0.52^{ef}
تنش کمبود آب در مرحله خمیری Water deficit stress in the dough stage	نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۲۵ درصد 25% urea + nitroxin and nitrogen	17.6^{cd}	0.057^{cd}	18.42^{e}	0.97^{d}	17.47^{c}	0.93^{d}
	نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۵۰ درصد 50% urea + nitroxin and nitrogen	16.2^{de}	0.062^{bc}	17.72^{e}	0.93^{d}	16.65^{cd}	0.87^{d}
	نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۷۵ درصد 75% urea + nitroxin and nitrogen	15.4^{e}	0.065^{b}	14.9^{f}	0.64^{e}	14.35^{d}	0.61^{e}
	اوره ۱۰۰ درصد 100% urea	13.5^{f}	0.074^{a}	15.72^{f}	0.48^{f}	14.96^{d}	0.46^{f}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس رویه LS.Means ندارند.

In each column, the means with at least one common letter are not significantly different based on the L.S.Means test

بین تیمار منابع مختلف کود نیتروژن در شرایط تنش کمبود آب در مرحله شیری تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در شرایط تنش در مرحله خمیری، تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد بهترین سرعت جوانه‌زنی را نشان داد که نسبت به سایر تیمارها در این شرایط تنشی اختلاف آماری معنی‌داری داشت (جدول ۳). همچنین کمترین میزان سرعت جوانه‌زنی(۱۳/۵ بذر در روز) نیز به تولید بذر در شرایط تیمار کود اوره ۱۰۰٪ در شرایط تنش کمبود آب در مرحله خمیری تعلق داشت.

تیمارهای کود نیتروکسین و نیتراژین به‌خوبی توانستند متوسط زمان لازم برای جوانه‌زنی بذور گندم در شرایط بدون تنش کمبود آب و هم در شرایط تنش در مرحله خمیری را کاهش دهند. کمترین متوسط زمان جوانه‌زنی (۰/۴۸ روز) در بذرهای تولید شده تحت تیمار کودی نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۷۵ در صد در شرایط آبیاری نرمال مشاهده شد که البته با بذوری تولیدی در تیمار کودی نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ و ۵۰ درصد در شرایط آبیاری نرمال (۰/۴۹ و ۰/۰۵۳ روز) تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند (جدول ۳). اما بر طبق نتایج مقایسه میانگین بیشترین متوسط زمان لازم برای جوانه‌زنی (۰/۰۷۴ روز) در بذوری که تحت تیمار کود اوره ۱۰۰ درصد و شرایط تنش در مرحله خمیری تولید شده بودند مشاهده شد که با کلیه تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری داشت (جدول ۳).

نیتروژن یک عامل کلیدی در دستیابی به عملکرد مطلوب دانه در غلات است و ازآنجایی‌که در ترکیب اکثر آنزیم های جوانه‌زنی، نیتروژن به‌عنوان یک جزء اصلی حضور دارد، لذا با فراهمی این عنصر به‌اندازه کافی برای بذرها، درصد و سرعت جوانه‌زنی تسریع می‌شود (Banziger *et al.,* 1994) نتایج مشابه توسط کخ و همکاران (Koch *et al.,* 2014)، در یک مطالعه روی کیفیت بذور تولیدی سویا در شرایط آبیاری و تنش کمبود آب مشاهده شد. تنش کمبود آب منجر به تولید بذرهایی شد که سرعت جوانه‌زنی کمتری دارند (Da Silva *et al.,* 2016). از سوی دیگر کودهای زیستی در شرایط تنش‌های کمبود آب و شوری سبب افزایش مقاومت گیاهان می‌گردند (Rivera-Cruz *et al.,* 2008). با استفاده از کودهای زیستی، جذب عناصر غذایی در شرایط تنش کمبود آب ایجاد شده برای گیاهان به سهولت انجام گرفته که در نتیجه منجر به تولید بذرهایی با بنیه بالاتر می‌شود.

بیشترین طول گیاه‌چه (۳۴/۲۲ سانتی‌متر) در بذرهایی مشاهده شد که تحت تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین و اوره ۲۵ درصد در شرایط آبیاری نرمال تولید شده بودند (جدول ۳). نتایج این پژوهش نشان داد که تنش کمبود آب در مرحله شیری و خمیری سبب کاهش طول گیاه‌چه نسبت به شرایط بدون تنش گردید. از سوی دیگر در شرایط تنش کمبود آب در مرحله شیری و مرحله خمیری طول گیاه‌چه در تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین و اوره ۲۵ درصد نسبت به اوره ۱۰۰ درصد به ترتیب ۳۲/۷۵ و ۱۴/۶۵ درصد افزایش نشان داد (جدول ۳).

بیشترین وزن خشک گیاه‌چه (۱/۶۳ گرم) در بذرهایی مشاهده شد که تحت تیمار کود زیستی نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۵۰ درصد در شرایط آبیاری نرمال تولید شده بودند که اختلاف معنی‌داری با بذوری که تحت تیمار نیتروکسین و نیتراژین و اوره ۲۵ درصد در شرایط بدون تنش کمبود آب تولید شده بودند (۱/۶۰ گرم) نداشتند (جدول ۳). همچنین نتایج نشان داد که کمترین وزن خشک گیاه چه (۰/۴۸ گرم) نیز در بذور تولید شده تحت تیمار اوره ۱۰۰ درصد در شرایط تنش در مرحله خمیری مشاهده شد که با وزن خشک گیاه‌چه حاصل از بذور تولید شده تحت تیمار اوره ۱۰۰ درصد در شرایط تنش در مرحله شیری (۰/۵۴ گرم) اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۳). کودهای زیستی نیتروژن‌دار منجر به بهبود تولید و انتقال آسمیلات‌های تولید شده به

بذور در حال رشد و نمو شده‌اند. درنتیجه بذور با قوه نامیه بالاتری تولید شده و توانسته گیاه‌چه قوی‌تری تولید نمایند؛ اما شرایط تنش منجر به ایجاد اختلال در جذب مواد توسط ریشه گیاه می شوند که این امر به‌نوبه خود منجر به اختلال در فتوسنتز و تولید آسمیلات‌ها می شود. درنتیجه بذور در مرحله نمو با کمبود مواد غذایی روبه‌رو می‌شود که درنهایت منجر به تولید بذور با بنیه ضعیف‌تری می‌شوند که این بذور در مرحله جوانه‌زنی و تولید گیاه‌چه، گیاه‌چه‌های ضعیف‌تری تولید خواهند کرد. بابانا و آنتون (Babana and Antoun, 2005)، در آزمایش‌های خود به این نتیجه رسیدند که استفاده از کودهای زیستی و میکروارگانیسم‌ها باعث افزایش ۴۴ تا ۶۰ درصدی وزن کل گیاه می‌گردد، قابل‌انتظار است که گیاه‌چه‌های حاصل از بذور تولیدی این گیاهان نیز وزن خشک بالایی داشته باشد. محدودیت آب در دسترس گیاه مادری می‌تواند با ایجاد اختلال در رسوب ذخایر تشکیل مناسب سلول‌ها و غشاها، و ایجاد صحیح سیستم آنزیمی هیدرولیتیک در بذور بنیه آنها را تحت تأثیر قرار دهد (Da Silva *et al.*, 2016).

در شرایط آبیاری نرمال (شاهد) بین بنیه طولی بذرهای تولید شده تحت تیمارهای مختلف کود نیتروژن تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). تحت شرایط تنش کمبود آب در مرحله شیری و خمیری، بهترین بنیه طولی در بین بذور تولید شده تحت تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین و اوره ۲۵ درصد (به ترتیب ۲۲/۱۹ و ۱۷/۴۷) مشاهده شد. کمترین میزان بنیه طولی در بذور تولید شده در مرحله شیری و خمیری، تحت تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۷۵ درصد و اوره ۱۰۰ درصد مشاهده شد. بنیه طولی در بذور تولید شده تحت تیمار کود اوره ۱۰۰ درصد و تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۷۵ درصد در شرایط تنش در مرحله شیری با تنش کمبود آب در مرحله خمیری تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (جدول ۲). بیش‌ترین میزان بنیه وزنی گیاه چه (۱/۵۲) در شرایط آبیاری نرمال در بذرهای تولیدی تحت تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۵۰ درصد مشاهده شد که با کود نیتروکسین و نیتراژین و اوره ۲۵ درصد و کود نیتروکسین و نیتراژین و اوره ۷۵ درصد اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش کمبود آب ایجاد شده در مرحله شیری و خمیری سبب کاهش بنیه وزنی گیاه‌چه گردیده است. از سوی دیگر در شرایط تنش کمبود آب در مرحله شیری و مرحله خمیری، بنیه وزنی گیاه چه در تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین و اوره ۲۵ درصد نسبت به اوره ۱۰۰ درصد به‌ترتیب ۶۱/۷۶ و ۵۰/۵۳ درصد افزایش نشان داد. خاکسار و همکاران (Khaksar *et al.*, 2012)، نیز در مطالعه‌ای به بررسی اثر تنش کمبود آب و آبیاری معمولی بر گیاه مادری روی ظهور و استقرار ارقام بهاره کلزا در مزرعه دریافتند که بیشترین شاخص بنیه طولی و وزنی گیاه‌چه در بذور تولید شده تحت تیمار آبیاری نرمال مشاهده شد. افشار (Afshar, 2012)، گزارش نمود شاخص وزنی بنیه گیاه‌چه در بذرهایی که تنش کمبود آب دیده بودند کاهش یافت. کودهای نیتروکسین و نیتراژین به علت اینکه حاوی باکتری‌های ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم هستند باعث تثبیت نیتروژن در محیط تنش کمبود آب می‌شود. در این محیط جذب آب و مواد مغذی در محیط تنش برای گیاه بسیار سخت می‌باشد، لذا این کودهای با در دسترس قرار دادن مواد غذایی در اختیار گیاه اثرات محیط تنش بر روی گیاه را کاهش داده و گیاه را قادر می‌سازد تا بذرهایی با بنیه وزنی و طولی بهتری تولید نمایند.

اثر تنش کمبود آب بر میزان درصد پروتئین، نشاسته، قند محلول و میزان آلفا آمیلاز بذرها با سطح احتمال ۱٪ تأثیر معنی‌داری نشان داد (جدول ۴). همچنین اثر منابع کود نیز بر کلیه صفات اندازه‌گیری شده بذور تولیدی با سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. برهمکنش تنش کمبود آب، منابع کود نیتروژن و زوال نیز بر درصد پروتئین، قند محلول و میزان آلفا آمیلاز بذور گندم تأثیر معنی‌داری در

سطح احتمال یک درصد داشت. همچنین برهمکنش منابع کود نیتروژن و زوال بر نشاسته با سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۴).

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر قند محلول، نشاسته، پروتئین و آلفا آمیلاز بذر گندم رقم چمران

Table 4- Analysis of variance of the effect of experimental treatments on soluble sugar, starch, protein and alpha-amylase of wheat seeds of Chamran cultivar

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degrees of freedom	میانگین مربعات Mean of squares			
		درصد پروتئین Percentage of protein	نشاسته Starch	قند محلول Soluble sugar	آنزیم آلفا آمیلاز Alpha amylase enzyme
تنش کمبود آب (A) Water deficit stress (A)	2	3.017**	832.00**	54.305**	0.173**
منابع کودی نیتروژن (B) Nitrogen fertilizer sources (B)	3	29.223**	209.126**	147.331**	0.190**
سطوح پیری تسریع شده (C) Aging levels are accelerated	3	320.534**	8447.223**	1408.410**	0.808**
(A)×(B)	6	4.993**	0.0000ns	16.325**	0.027**
(A)×(C)	6	1.442**	0.0000ns	21.677**	0.0026**
(B)×(C)	9	1.296**	58.929**	12.952**	0.0015ns
(A)×(B)×(C)	18	1.245**	0.0000ns	2.756**	0.00216**
خطای آزمایش Error	96	0.100	1.07	0.898	0.00084
درصد ضریب تغییرات CV%	-	3.88	2.46	5.24	1.98

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد، ns برابر عدم تفاوت معنی‌دار.

* and ** significant at 5 and 1%, respectively, ns equal to no significant difference.

درصد پروتئین

نتایج برش‌دهی برهم‌کنش منابع کودی و پیری تسریع شده برای درصد پروتئین تحت تیمار شاهد (بدون تنش) نشان داد که بیشترین درصد پروتئین (۱۱/۹۶ درصد) تحت تیمار نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد در ابتدای زوال مشاهده شد. از سوی دیگر در طی زوال از درصد پروتئین کاسته شده و کمترین درصد پروتئین (۴/۱۵۰ درصد) تحت تیمار اوره ۱۰۰ درصد و در زمان ۴۸ ساعت پس از زوال مشاهده شد (جدول ۵). همچنین نتایج برش‌دهی اثرات متقابل تحت تیمار تنش در مرحله شیری نیز نشان داد که بیشترین درصد پروتئین (۱۲/۳۹ درصد) تحت تیمار منابع کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد در شرایط بدون زوال مشاهده شد که نسبت به زوال ۴۸ ساعت افزایش ۵۶/۴۹ درصدی نشان داد (جدول ۵). همچنین کمترین درصد پروتئین (۴/۰۰۷ درصد) مشاهده شده در تنش در مرحله شیری تحت تیمار اوره ۱۰۰ درصد و در زمان ۴۸ ساعت پس از زوال مشاهده شد (جدول ۵)؛ اما نتایج مرحله خمیری نشان داد که تحت تیمار نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد در زمان صفر ساعت زوال، بیشترین درصد پروتئین (۱۲/۷۹ درصد) مشاهده شد که با درصد پروتئین (۱۲/۷۱ درصد) در تیمار نیتروکسین و نیتراژین به همراه کود اوره ۵۰ درصد در زمان صفر ساعت زوال تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (جدول ۵). کمترین درصد پروتئین (۴/۴۴۳ درصد) مشاهده شده در تنش مرحله خمیری تحت تیمار اوره ۱۰۰ درصد در زمان ۴۸ ساعت زوال مشاهده شد (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین برهمکنش، منابع کودی و پیری تسریع شده برای درصد پروتئین، قند محلول و میزان آلفا آمیلاز در شرایط مختلف تنش کمبود آب

Table 5- Mean comparison of fertilizer sources and accelerated aging interaction for protein percentage, soluble sugar and alpha-amylase under different water deficit stress conditions

منابع کود نیتروژن Nitrogen fertilizer sources	سطوح پیری تسریع شده (ساعت) Accelerated aging levels (hour)	درصد پروتئین Percentage of protein			قند محلول (میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) Soluble sugar (mg / g dry matter)			آلفا آمیلاز (میلی‌گرم مالتوز بر گرم بذر) Alpha amylase (mg maltose/g seed)		
		بدون تنش کمبود آب No water deficit stress	تنش در مرحله شیری Stress in the milk stage	تنش در مرحله خمیری Stress in the dough stage	بدون تنش کمبود آب No water deficit stress	تنش در مرحله شیری Stress in the milk stage	تنش در مرحله خمیری Stress in the dough stage	بدون تنش کمبود آب No water deficit stress	تنش در مرحله شیری Stress in the milk stage	تنش در مرحله خمیری Stress in the dough stage
نیتروکسین + نیترائین + اوره ۲۵ درصد 25% urea + nitroxin and nitrogen	0	11.96a	12.39^{a}	12.76^{a}	27.65^{a}	32.49^{a}	29.65^{a}	1.648^{b}	1.615^{bc}	1.613^{b}
	12	10.98^{bc}	9.897^{e}	11.51^{b}	24.24^{b}	25.15^{b}	21.57^{c}	1.4387^{f}	1.514^{d}	1.490^{d}
	24	7.273^{g}	7.107^{g}	7.460^{e}	17.83^{e}	17.20^{ef}	14.86^{ef}	1.353^{g}	1.416^{ef}	1.408^{f}
	48	5.087^{jk}	5.390^{i}	5.570^{g}	12.73^{i}	12.76^{hi}	11.76^{g}	1.280^{i}	1.293^{g}	1.293^{h}
نیتروکسین + نیترائین + اوره ۵۰ درصد 50% urea + nitroxin and nitrogen	0	11.33^{b}	12.21^{ab}	12.71^{a}	22.52^{c}	31.66^{a}	24.52^{b}	1.686^{a}	1.754^{a}	1.610^{b}
	12	10.04^{e}	11.74^{bc}	8.527^{d}	22.08^{c}	32.28^{c}	17.57^{d}	1.509^{e}	1.547^{cd}	1.498^{d}
	24	6.753^{h}	9.227^{f}	6.380^{f}	15.43^{g}	17.73^{de}	14.41^{fg}	1.373^{g}	1.416^{ef}	1.408^{f}
	48	5.477^{ij}	6.563^{h}	5.403^{g}	11.60^{j}	12.42^{ij}	10.63^{g}	1.285^{i}	1.290^{g}	1.326^{g}
نیتروکسین + نیترائین + اوره ۷۵ درصد 75% urea + nitroxin and nitrogen	0	10.73^{cd}	11.30^{cd}	12.63^{a}	22.27^{c}	25.27^{b}	24.27^{b}	1.684^{a}	1.632^{b}	1.686^{a}
	12	8.227^{f}	9.533^{ef}	8.397^{d}	19.33^{d}	18.52^{d}	16.69^{de}	1.591^{c}	1.493^{de}	1.534^{c}
	24	5.610^{i}	6.487^{h}	6.626^{f}	16.47^{f}	14.51^{g}	12.85^{fg}	1.501^{e}	1.343^{fg}	1.430^{e}
	48	4.927^{k}	4.567^{j}	4.790^{h}	12.15^{ij}	11.65^{j}	7.760^{h}	1.272^{g}	1.269^{g}	1.337^{g}
اوره ۱۰۰ درصد 100% urea	0	10.23^{de}	10.81^{d}	11.77^{b}	21.78^{c}	23.91^{c}	23.78^{bc}	1.653^{b}	1.662^{b}	1.517^{c}
	12	7.730^{fg}	6.663^{gh}	9.273^{c}	17.23^{ef}	16.84^{f}	16.20^{de}	1.539^{d}	1.534^{d}	1.419^{ef}
	24	5.590^{ij}	4.657^{j}	5.557^{g}	14.43^{h}	13.42^{f}	14.71^{ef}	1.433^{f}	1.408^{f}	1.304^{h}
	48	4.150^{l}	4.007^{k}	4.443^{h}	10.31^{k}	9.810^{k}	11.50^{g}	1.326^{h}	1.293^{g}	1.203^{i}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس رویه LS.Means ندارند

In each column, the means with at least one common letter are not significantly different based on the LS.Means test

نتایج بسیاری از تحقیقات نشان داد که با افزایش در زوال بذر پروتئین کل کاهش می یابد که با نتایج به‌دست‌آمده همخوانی دارد (Demir Kaya *et al.*, 2010; Seid Mohammadi *et al.* 2012; Afrosheh *et al.*, 2018). به‌طورکلی سنتز پروتئین ها در فرایند جوانه‌زنی، محور جنینی و تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده و سایر سیستم‌های سلولی انتقال‌دهنده مواد اندوخته‌ای بذر نقش مهمی را ایفا می‌کند و پیری سبب کاهش در سنتز پروتئین می‌شود (Bailly, 2004). با توجه به نتایج بدست آمده مشاهده می‌شود که با کاهش میزان کود اوره و استفاده بیشتر گیاه از کودهای زیستی نیتروکسین و نیتراژین و نیز با شدت یافتن تنش در محیط رشد گیاه بر میزان پروتئین ذخیره‌ای گیاه افزوده می‌شود. به نظر می‌رسد علت احتمالی این پدیده این است که گیاه با مواجه با شرایط تنش، تجمع مواد ذخیره بذر را به سمت ترکیبات پیچیده‌تر مثل پروتئین‌ها و ترکیبات پلی ساکارید مثل نشاسته سوق می‌دهد تا به این طریق با شرایط تنش مقابله کند. از طرفی کودهای نیتروکسین و نیتراژین نیز که حاوی باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن مثل ازتوباکتر و آزوسپیریلیوم می‌باشند در شرایط تنش با در اختیار قرار دادن نیتروژن کافی در اختیار گیاه و افزایش توانایی گیاه برای جذب این مواد شرایط را برای این امر محیا می‌کنند.

نشاسته

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که تنش کمبود آب در مرحله شیری و مرحله خمیری به ترتیب سبب افزایش ۱۷/۰۸ و ۴/۸۹ درصدی میزان نشاسته نسبت به شرایط بدون تنش گردید (جدول ۶). از سوی دیگر بیشترین میزان نشاسته (۶۰/۷۳ درصد) در بذرهای تحت تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد در زمان شروع فرایند پیری تسریع شده مشاهده شد. همچنین میزان نشاسته در بذرهای تحت تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد با سطح زوال ۴۸ ساعت سبب کاهش میزان نشاسته ۶۴/۴۱ درصدی نسبت به سطح بدون زوال گردید (جدول ۷). با افزایش میزان اوره سبب کاهش میزان نشاسته گردید، بطوری‌که کمترین میزان نشاسته (۲۰/۸۵ درصد) تحت اثر متقابل تیمار کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۷۵ در صد در زمان ۴۸ ساعت زوال مشاهده شد. میزان نشاسته در بذور تحت تیمار کود اوره ۱۰۰ درصد و بدون زوال ۵۶/۷۲ درصد بود، اما سطح زوال ۴۸ ساعت سبب کاهش میزان نشاسته به میزان ۵۷/۹۸ درصد گردید (جدول ۷). لاکشمی و همکاران (Lakshmi *et al.*, 2014)، کاهش محتوای نشاسته را طی زوال بذر بامبو گزارش کردند و علت آن را هیدرولیز نشاسته توسط آنزیم‌های آلفا و بتا آمیلاز برشمردند که نتیجه آن افزایش میزان آلفا آمیلاز و کاهش محتوای نشاسته می‌باشد.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر تیمار تنش کمبود آب بر نشاسته بذر گندم

Table 6- Mean comparison of the effect of water deficit stress treatment on wheat seed starch

تیمارهای آزمایشی Experimental treatments	نشاسته (درصد) Starch (%)
بدون تنش (شاهد) No stress (control)	38.82^{c}
تنش در مرحله شیری Stress in the milk stage	46.82^{a}
تنش در مرحله خمیری Stress in the dough stage	40.82^{b}

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD ندارند.

Means with at least one common letter were not significantly different based on LSD test.

برخی محققین نیز اظهار داشتند که تخریب بذر ممکن است به علت دناتوره شدن بیوملکول‌ها، تولید و تجمع مواد سمی و از دست دادن غشاء محافظ سلول طی فرایند زوال باشد (Basavarajappa *et al.,* 1991; Roberts *et al.,* 1972). دیپیکا (Deepika, 2012)، در طی زوال بذر گندم در آزمون پیری تسریع شده کاهش در میزان نشاسته را تا حدود ۵۰ درصد از میزان آن در شروع زوال را گزارش کرد.

قند محلول

بر اساس نتایج برش‌دهی برهم‌کنش منابع کودی و پیری تسریع شده برای قند محلول تحت تیمار بدون تنش (شاهد) مشخص شد که با افزایش پیری تسریع شده سبب کاهش معنی‌دار قند محلول گردید. بیشترین میزان قند محلول (۲۷/۶۵ میلی‌گرم) در شرایط تیمار نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد در زمان صفر ساعت زوال مشاهده شد (جدول ۵). در شرایط تیمار نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد با پیری تسریع شده ۴۸ ساعت سبب کاهش ۵۳/۹۶ درصدی قند محلول نسبت به شرایط صفر ساعت زوال گردید.

از طرف دیگر کمترین میزان قند محلول (۱۰/۳۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) بدست آمده در این پژوهش تحت تیمار اوره ۱۰۰ درصد در زمان ۴۸ ساعت پس از زوال مشاهده شد (جدول ۵).

جدول ۷- مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای منابع کود نیتروژن و پیری تسریع شده بر نشاسته بذر گندم

Table 7- Mean comparison of fertilizer sources and accelerated aging interaction on wheat seed starch

منابع کود نیتروژن Nitrogen fertilizer sources	سطوح پیری تسریع شده (ساعت) Accelerated aging levels (hour)	نشاسته (درصد) Starch (%)
نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۲۵ درصد 25% urea + nitroxin and nitrogen	0	60.73[a]
	12	53.28[d]
	24	40.87[h]
	48	21.61[l]
نیتروکسین + نیتراژین + اوره۵۰ درصد 50% urea + nitroxin and nitrogen	0	58.77[b]
	12	51.41[e]
	24	42.55[g]
	48	23.70[k]
نیتروکسین + نیتراژین + اوره ۷۵ درصد 75% urea + nitroxin and nitrogen	0	57.41[c]
	12	47.33[f]
	24	39.16[i]
	48	20.85[l]
اوره ۱۰۰ درصد 100% urea	0	56.72[c]
	12	42.93[g]
	14	33.26[j]
	48	23.83[k]

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس رویه L.S.Means ندارند.

Means with at least one common letter are not significantly different from the L.S.Means procedure

همچنین نتایج برش‌دهی اثرات متقابل تحت تیمار تنش در مرحله شیری نیز نشان داد که بیشترین میزان قند محلول (۳۲/۴۹ و ۳۱/۶۶ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) تحت تیمار منابع کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد در زمان صفر ساعت زوال بدست آمد. در حالی‌که کمترین میزان قند محلول (۹/۸۱۰ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) تحت تیمار کود اوره ۱۰۰ درصد در انتهای تیمار زوال ۴۸ ساعت مشاهده شد (جدول ۵). نتایج مرحله خمیری نشان داد که تحت تیمار نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۲۵ درصد در زمان صفر ساعت زوال بیشترین میزان قند محلول (۲۹/۶۵ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) مشاهده شد، در صورتی‌که کمترین میزان قند محلول تحت تیمار نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۵۰ درصد در زمان ۴۸ ساعت زوال (۱۰/۶۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک) مشاهده شد که با میزان قند محلول تحت تیمار اوره ۱۰۰ درصد در زمان ۴۸ ساعت زوال (۱۱/۵۰ میلی‌گرم بر گرم بذر) تفاوت معنی داری از نظر آماری نداشت (جدول ۵).

آیاپان و همکاران (Ayyappan *et al.*, 2006) علت کاهش محتوای قند محلول طی زوال را هیدرولیز مواد ذخیره‌ای طی واکنش های آمادوری و مایلارد گزارش کردند. این مطلب تأییدی بر یافته های این پژوهش در زمینه پیری تسریع شده بذور گندم می‌باشد. ثقه‌الاسلامی و همکاران (Seghatol Eslami *et al.*, 2005) با بررسی اثر تنش کمبود آب در مراحل مختلف رشد ارزن معمولی بیان کردند که تنش کمبود آب در طی رشد در مقایسه با شاهد سبب افزایش میزان قندهای محلول گردید. در واقع افزایش قند های محلول در زمان بروز تنش کمبود آب نوعی سازگاری گیاه جهت تنظیم فشار اسمزی برگ، برای جلوگیری از تعرق بیشتر و افزایش جذب آب است که عمدتاً به دلیل عدم انتقال مواد فتوسنتزی و بارگیری آن‌ها از برگ اتفاق می‌افتد.

میزان آلفا آمیلاز

با توجه به نتایج برش‌دهی برهمکنش منابع کودی و پیری تسریع شده برای میزان آلفا آمیلاز در شرایط تنش در مرحله شیری دانه گندم چمران تحت تیمار بدون تنش (شاهد) مشخص شد که بیشترین میزان آلفا آمیلاز تحت تیمار منابع مختلف کود نیتروژن در زمان صفر ساعت زوال مشاهده شد. به‌طوری‌که بیشترین میزان آلفا آمیلاز به میزان ۱/۶۴۸ میلی‌گرم مالتوز بر گرم بذر در شرایط کودهای زیستی نیتروکسین و نیتراژین و اوره ۲۵ درصد در زمان صفر ساعت زوال بدست آمد (جدول ۵). از طرف دیگر در این پژوهش، کمترین میزان آلفا آمیلاز (۱/۳۲۶ میلی‌گرم مالتوز بر گرم بذر) نیز تحت تیمار اوره ۱۰۰ درصد در زمان ۴۸ ساعت پس از زوال مشاهده شد (جدول ۵). همچنین نتایج برش‌دهی اثرات متقابل تحت تیمار تنش در مرحله شیری نیز نشان داد که بیشترین میزان آلفا آمیلاز (۱/۷۵۴ میلی‌گرم مالتوز بر گرم بذر) تحت تیمار منابع کود نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۵۰ درصد در زمان صفر ساعت زوال مشاهده شد، در حالی‌که کمترین میزان آلفا آمیلاز تحت همه تیمارهای کودی پس از زمان ۴۸ ساعت زوال مشاهده شد (جدول ۵). اما نتایج مرحله خمیری نشان داد که تحت تیمار نیتروکسین و نیتراژین به همراه اوره ۷۵ درصد در زمان صفر ساعت زوال بیشترین میزان آلفلا آمیلاز (۱/۶۸۶ میلی‌گرم مالتوز بر گرم بذر) مشاهده شد، در حالی‌که کمترین میزان آلفاآمیلاز تحت تیمار اوره ۱۰۰ درصد در زمان ۴۸ ساعت زوال (۱/۲۰۳ میلی‌گرم بر گرم بذر) مشاهده شد (جدول ۵).

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از کودهای زیستی منجر به افزایش میزان آلفا آمیلاز شدند. علت احتمالی این پدیده می‌توان به افزایش تولید هورمون ها توسط گیاه و تنظیم فعالیت‌های فیزیولوژیکی که توسط کود های زیستی به گیاهان القاء می‌شود دانست (Ahmadi and Bker, 2001). گونارتو و همکاران (Gunarto *et al.*, 1999) طی آزمایش هایی روی ذرت نشان داد که سنتز هورمون‌های اکسین، جیبرلین وسایتوکنین در شرایط فراوانی نیتروباکتر و آزوسپیریلوم

در ناحیه ریزوسفر ریشه گیاه دو برابر می‌شود. فرایند زوال نیز تأثیر کاهشی بر روی میزان آلفا آمیلاز داشت. بیشترین میزان آلفا آمیلاز در بذور بدون زوال ثبت شد، درحالی‌که با افزایش زمان زوال از میزان آلفا آمیلاز کاسته شد. کاهش در میزان آلفا آمیلاز به نسبت افزایش زمان پیری در پیری طبیعی بذور ذرت گزارش شده است (Radha *et al.,* 2014). نوراستینا و همکاران (Norastehnia *et al.,* 2007)، گزارش کردند که تجمع مشتقات آلدئیدی مخصوصاً متیل جاسمونات سبب کاهش میزان آلفا آمیلاز می‌گردد. غلظت‌های بالای متیل جاسمونات منجر به کاهش غلظت آنزیم‌های پروتئینی و همچنین بازدارنده بیوسنتز ژیبرلین می‌گردد. از سوی دیگر ترشح ژیبرلین از لایه آلئورون، سنتز آلفا آمیلاز را تحریک می‌کند.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش می‌توان چنین نتیجه گرفت که تنش کمبود آب منجر به افزایش غلظت پروتئین، قندهای محلول، نشاسته و کاهش میزان آنزیم‌های آلفا آمیلاز بذر گندم می‌شود. به نظر می‌رسد که گیاه پس از مقابله با تنش از این سازوکار برای تغلیظ آب سلول و آب میان بافتی استفاده می‌کند. از سوی دیگر کاربرد کودهای زیستی منجر به افزایش سرعت و متوسط زمان لازم برای جوانه‌زنی نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که زوال بذر منجر به کاهش میزان پروتئین به علت دناتوره شدن پروتئین‌ها و افزایش میزان آنزیم‌های پروتئاز، افزایش قندهای محلول، کاهش محتوای نشاسته و کاهش میزان آنزیم آلفا آمیلاز گردید. تیمارهای تلفیقی کود زیستی و اوره توانست مانع از تأثیر بیش از حد زوال بر بذرها نسبت به شاهد شود. به نظر می‌رسد استفاده از تیمارهای تلفیقی کودهای زیستی و کود اوره در شرایط تنش برای تغذیه گیاه مادری، منجر به تولید بذور با کیفیت و تحمل بالاتر به زوال می‌گردد.

منابع

Reference

Abdul-Baki, A.A., and J.D. Anderson. 1973. Vigour deterioration of soybean seeds by multiple criteria. Crop Sci. 13: 630-633.

Afrosheh, R., H. Balouchi, M. Movahedi Dehnavi, and M. Gharineh. 2008. The effects of salicylic acid and seed deterioration on germination indices and antioxidant enzymes changes of *Carthamus tinctorius* L. cv. Soffeh seed. Iranian J. Seed Sci. Technol. 7(1): 53-64. (In Persian, with English Abstract)

Afshar, H. 2012. Investigation of the effect of fungi and growth-promoting bacteria on germination and drought resistance indicators in soybeans. Master Thesis of Azad University. Zabol unit, Iran. (In Persian)

Ahmadi, A., and D.A. Baker. 2001. The effect of water stress on grain filling processes in wheat. J. Agric. Sci. 136: 257-269.

Ansari, O., and F. Sharifzadeh. 2012. Slow Moisture Content Reduction (SMCR) can improve some seed germination indexes in primed seeds of Mountain Rye (*Secale montanum*) under accelerated aging conditions. J. Seed Sci. Technol. 2(2): 68-76. (In Persian, with English Abstract)

Ansari, O., H.R. Chogazardi, F. Sharifzadeh, and H. Nazarli. 2012. Seed reserve utilization and seedling growth of treated seeds of mountain rye (*Seecale montanum*) as affected by drought stress. Eco Hydrol. 150(2): 43-48.

Ayyappan, V., G. Andy, S. Natesan, C. Won Choi, and M. Markandan. 2006. Changes in L-isoaspartyl Methyltransferase, storage components and Anti-oxidant enzymes activities during accelerated ageing in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds. J. Plant Sci. (3): 228-239.

Baalbaki, R.Z., R.A. Zurayk, M.M. Blelk and S.N. Tahouk. 1999. Germination and seedling development of drought tolerant and susceptible wheat under moisture stress. Seed Sci. Technol. 27: 291-302.

Babana, A.H., and H. Antoun. 2005. Biological system for improving the availability of tilemsi phosphate rock for wheat cultivated in Mali. Nutrient Cycling in Agroecosystems. 72: 147-15.

Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research, 14: 193-107.

Baker, J.E. 1991. Purification and partial characterization of alfa amylase allozymes from the lesser grain borer, Rhizopertadominica. Insect Biochem. 21: 303-311.

Banziger, M., B. Feil, and P. Stamp. 1994. Competition between nitrogen accumulative and grain growth for carbohydrates during grain filling of wheat. Crop Sci. 34: 440-446.

Basavarajappa B.S., H.S. Shetty, and H.S. Prakash. 1991. Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. Seed Sciences and Technology, 19: 279-286.

Bernfeld, P. 1955. Amylase, α and β. Methods in Enzymol. 1: 149- 151.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle dye-binding. Analytical Biochem. 38: 248-252.

Da Silva, R.T., A.B. de Oliveira, de Fatima de Queiroz Lopes, M. de Almeida, M. Guimarães and A. Dutra. 2016. Physiological quality of sesame seeds produced from plants subjected to water stress. Revista Ciência Agron. 47(4): 643-648.

Deepika, A. 2012. Accelerated Aging of Wheat Grains- A Prelude.Faculty of Agricultural & Environmental Sciences.Department of Bioresource Engineering. M. Sc. Thesis. McGill University. Canada.

Dehghanpour Farashah, H., R. Tavakkol Afshari, F. Sharifzadeh, and S. Chavoshinasab. 2011. Germination improvement and α-amylase and β-1, 3-glucanase activity in dormant and non-dormant seeds of Oregano (*Origanum vulgare*). Aust. J. Crop Sci. 5(4): 421-427.

Demir Kaya, M., K.J. Dietz, and H.O. Sivriteoe. 2010. Changes in Antioxidant Enzymes during Ageing of Onion Seeds. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 38(1): 49-52.

Dodd, G.L. and L.A. Donovan. 1999. Water potential and ionic effects on germination and seedling growth of two cold desert shrubs. Am. J. Bot. 86: 1146-1153.

Ellis, R.H. and E.H. Roberts. 1980. Towards a rational basis for testing seed quality. In Seed Production, (ed.P.D. Hebble thwaite), pp. 605-635, Butter worths, London.

Fallahi, J., P. Rezvani Moghaddam, R. Ghorbani, M.B. Amiri, and F. Fallah Pour. 2011. Effects of seed priming by biofertilizers on the growth characteristics of three wheat cultivars at the germination period under greenhouse condition. 10th Conf. Int. Soc. Seed Sci. 10(15): 286.

Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, and SMA. Basra. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agron. Sustainble Dev. 29:185–212.

Ghassemi-Golezani, K. and S. Ghassemi. 2013. Effects of water supply on seed development and quality of chickpea cultivars. Plant Breed. Seed Sci. 67: 37-44. (In Persian)

Gunarto, A., K. Adachi, and T. Senboku. 1999. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. From a subtropical island and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. Biol. Fertil. Soils. 28: 129-135.

Hamidi, A., J. Daneshian, and A. Asgharzadeh. 2016. A review of drought stress on mother plant effect on soybean seed germination and vigour improvement by some beneficial soil microorganisms treatment assessment. Iranian J. Seed Sci. Res. 3(2): 109-124. (In Persian with, English Abstract)

Kadar, R., L. Muntean, I. Racz, AD. Ona, A. Ceclan, and D. Hiriscau. 2019. The effect of genotype, climatic conditions and nitrogen fertilization on yield and grain protein content of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Notulae Botanicae Horti Agrobotanici. 7 (2): 515–521.

Khaksar K., H.R. Badrooj, A. Hamidi, A.H. Shirani RAD. 2013. Effect of drought stress and normal irrigation on mother plant of some canola spring cultivars seedling emergence and establishment in field. Crop Prod. Environ. Stress. 4(4):63-71.

Khayat, M., M. Shirin, M. Gharineh, and N. Sajedi. 2011. Effects of different concentrations of sodium hypochlorite and different times of disinfestations on wheat Chamran variety. New Findings in Agric. 5(4): 367-376. (In Persian, with English Abstract)

Koch, F., T. Pedo, E. G.Martinazo, T.Z. Aumonde, and F.A. Villela. 2014. Efeito da irrigação no desempenho fisiológico e na atividade respiratória de sementes de soja. Enciclopédia Biosfera. 10(19): 29-36.

Lakshmi, C.J., K.K. Seethalakshmi, P.K. Chandrasekhara Pillai, and V.P. Raveendran. 2014. Effect of accelerated ageing on seed viability and biochemical components of the edible bamboo *Dendrocalamus brandisii* (Munro) Kurz. Res. J. Recent Sci. 3: 15-18.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor Crop Sci. 2:176-177.

Makkar, H.P.S., J. Martínez-Herrera, and K. Becker. 2008. Variations in seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil, protein and phorbol esters in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curcas*. J. Plant Sci. 3: 260-265.

Manivannan, P., C.A. Jaleel, B. Sankar, A. Kishorekumer, R. Somasundaram, G.M.A. Lakshmanan, and R. Panneerselvam. 2015. Growth, biochemical and Surfaces, modification and proline metabolism in (*Helianthus annus* L.) as induced by drought stress. J. Plant Nutr. 59: 141-149.

Mosavian, S.N., N. Akbari, H.R. Eisvand, A. Ismaili, and A. Moshatati. 2020. Effect of different nitrogen and zinc levels on grain yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chamran under late season heat stress conditions in Ahvaz. Crop Physiol. J. 12(46): 25-44. (In Persian, with English Abstract)

Norastehnia, A., R. Sajedi, and M. Nojavan-Asghari. 2007. Inhibitory effects of methyl jasmonate on seed germination in maize (*Zea mays* L.): Effect on α-amylase activity and ethylene production. General and Appl. Plant Physiol. 33 (1-2): 13-23.

Paquine, R. and P. Lechasseur. 1979. Observations sur une methode dosage la libre dans les de plantes. Can. J. Bot. 57: 1851-1854.

Pourgholam, M., N.I. Nemati, and M. Oveysi. 2013. Effect of zinc and iron under the influence of drought on proline, protein and nitrogen leaf of rapeseed (*Brassica napus* L.). Scholars Res. Library. 4 (7): 200-203.

Radha, B.N., B.C. Channakeshava, Nagaraj Hullur, K. Bhanuprakash, K. Vishwanath, Umesha, B. Divya and G. Sarika. 2014. Change in storage enzymes activities in natural and accelerated aged seed of maize *(Zea mays* L.). Int. J. Plant Sci. 9(2): 306-311.

Rivera-Cruz, M.C., A.T. Narcıa, G.C. Ballona, J. Kohler, F. Caravaca, and A. Rold. 2008. Poultry manure and banana wastes are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. Soil Biol. Biochem. 40: 3092-3095.

Roberts, E.H. 1972. Cytological, genetical and metabolic changes associated with loss of viability, Viability of seeds, Chapman and Hall, London.

Sallam, A., A.M. Alqudah, M.F.A. Dawood, P.S. Baenziger, and A. Börner. 2019. Drought stress tolerance in wheat and barley: Advances in physiology, breeding and genetics research. Int. J. Molecular Sci. 20(13):3137.

Sedghi, M. 2015. Effect of temperature on germination and mobilization of protein reserves of three bread wheat cultivars. Iranian J. Seed Sci. Technol. 4(1): 53-60. (In Persian, with English Abstract)

Seghatol Eslami, M.J., M. Kafi, A. Majidi Hervan, G. Noor Mohamadi, and A. Darvish Fand Ghazi Zadeh. 2005. Effect of drought stress on leaf soluble sugar content, leaf rolling index and relative water content of proso millet (*Panicum miliaceum* L.) genotypes. Iranian J. Agric. Res. 3: 219-230. (In Persian, with English Abstract)

Seid Mohammadi, M., R. Tavakkola Afshari, and M. Mirab Zadeh. 2012. The effect of salicylic acid on temperature-moisture responses in aged seed of Brassica Napus. M. Sc. Thesis. University of Tehran, Iran. (In Persian)

Soltani, A., M. Gholipoor, and E. Zeinali. 2006. Seed reserve utilization and seedling of wheat as affected by drought and salinity. J. Environ. Exp. Bot. 55: 195-200.

Yazdani, R., P. Rezvani Moghaddam, A. Koocheki, M.B. Amiri, J. Fallahi, and R. Dayhimfar. 2010. Effects of seed nourished by different levels of nitrogen, different biofertilizers and drought stress on germination indices and seedling growth of wheat (*Tritium aestivum*) cv. Sayonz. Agroecol. 2(1): 266-276. (In Persian, with English Abstract)

Yoshida, S., D.A. Forno, J. Cock, and K.A. Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. The International Rice Research Institute. Third Edition. Los Baños, Laguna, Philippines.