"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹
(ص ۷۰-۵۷)
*مقاله پژوهشی*

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 9, No.: 1, Spring 2020
(pp: 57-70)
DOI: 10.22034/ijsst.2018.116566.1149
*Research Article*

# بررسی اثر پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پراکسیداسیون چربی در بذور زوال یافته سویا (*Glycine max* (L.) Merrill, William variety)

**رکسانا نظری[۱]، سهیل پارسا[۲*]، رضا توکل افشاری[۳]، سهراب محمودی[۴]**

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و تکنولوژی بذر، دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.
۲و۴. استادیار و دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.
۳. استاد گروه اگروتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(تاریخ دریافت:۱۳۹۶/۰۹/۱۸؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۰۹/۰۳)

**چکیده**

به منظور بررسی اثر پرایمینگ بر بهبود شاخص‌های فیزیولوژیکی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بذور زوال یافته سویا، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. فاکتورهای مورد مطالعه عبارت بودند از دو سطح زوال (۴۸ و ۷۲ ساعت)، سه سطوح مختلف هورمون اسید سالیسیلیک (صفر، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار) و سه زمان کاربرد اسید سالیسیلیک (قبل زوال، بعدزوال و قبل و بعد زوال) بود. صفات مورد اندازه‌گیری شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (گلوتاتیون رداکتاز، سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون پراکسیداز، پراکسیداسیون غشایی یا مالون دی آلدهید) بود. نتایج نشان داد با افزایش سطح زوال فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش و پراکسیداسیون غشایی افزایش یافته است و پرایمینگ بذر سویا با هورمون اسید سالیسیلیک موجب بازیابی بذور زوال یافته و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح ۷۲ ساعت زوال با زمان کاربرد اسید سالسیلیک به صورت قبل و بعد زوال با غلظت ۳۰۰ میکرومولار میزان ۶/۹۸ در میلی‌گرم پروتئین بافت مشاهده شد.کاهش میزان نشت مالون دی‌آلدهید در زمان کاربرد توام اسیدسالسیلیک با غلظت ۳۰۰ میکرومولار به میزان ۱/۴۵ میکرومول بر گرم بافت مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد که پرایم در زمان توام بهبود خصوصیات شیمیایی بذر را در شرایط وجور زوال به همراه دارد.

**کلمات کلیدی:** آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پیری تسریع شده، رادیکال آزاد، کاتالاز.

# The effect of seed priming with Salicylic acid on the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in deteriorated seeds soybean (*Glycine max* (L.) Merrill, William variety)

**R. Nazari[1], S. Parsa[2*], R. Tavakkol Afshari[3], S. Mahmoodi[4]**

1, 2, 4. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.
3. Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
(Received: Dec. 09, 2017 – Accepted: Nov. 24, 2018)

**Abstract**

In order to investigate the effect of priming on the improvement of physiological indices of antioxidant enzymes in soybean seeds, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications at the Seed Science and Technology Laboratory of Tehran University in 2017. The factors studied included two levels of deterioration (48 and 72 hours), three levels of salicylic acid (0, 300, 600 µM) and three times the salicylic acid application (before decay, post-fall, before and after deterioration). The traits measured included antioxidant enzymes (glutathione redactase, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, glutathione peroxidase, membrane peroxidation or malondialdehyde). The results showed that deterioration level increasing, decrease the antioxidant enzymes activity and increase membrane peroxidation and soybean seed priming with salicylic acid hormone restore the decayed seeds and increase the activity of antioxidant enzymes. The highest activity of ascorbate peroxidase activity was observed at 72 hours with the time of salicylic acid application before and after deterioration at a concentration of 300 µm and 6.98. Reduction of malondialdehyde leakage rate when combined with 300 µM concentration of salicylic acid was observed at 1.45. The results also showed that the priming at the same time improves the chemical properties of the seeds in the deterioration.

**Keywords:** antioxidant enzymes, accelerated aging, free radicals, Catalase.

* Email: sparsa@birjand.ac.ir

## مقدمه

سویا با نام علمی *Glycine max* (L.) Merrill گیاهی است یکساله از تیره لگومینوز[1] که به صورت بوته‌ای استوار و نسبتاً پر شاخ و برگ رشد می‌کند جوانه‌زنی به‌عنوان اولین مرحله رشد گیاه، یکی از مراحل مهم و حساس در چرخه زندگی گیاهان و یک فرایند کلیدی در سبزشدن گیاهچه است. این مرحله از رشد به شدت تحت تاثیر عوامل محیطی بویژه دما و رطوبت خاک قرار می‌گیرد (Soltani *et al.*, 2006). جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌ها از مراحل بحرانی چرخه زندگی گیاه بوده و استقرار موفق گیاه نه تنها وابسته به جوانه‌زنی سریع و یکنواخت بذر بلکه وابسته به توانایی بذر در جوانه‌زنی تحت شرایط تنش است (Windauer *et al.*, 2007).

پرایمینگ[2] یکی از روش‌های ساده‌ای که قدرت و استقرار مناسب بذور کشت شده و در نتیجه کارآئی گیاه را بهبود می‌بخشد (Yarniya *et al.*, 2008). نقش مهمی در بهبود کارکرد بذر و افزایش کیفیت بذر به ویژه در شرایط نامساعد محیطی می باشد (Basra *et al.*, 2004). پرایم کردن بذر با برخی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از جمله اسید سالیسیلیک می‌تواند کیفیت فیزیولوژیک بذرهای را بهبود بخشد. اسید سالیسیلیک[3] به عنوان یک ماده شبه هورمون شناخته می‌شود که نقش مهمی در تنظیم تعدادی از فرآیندهای فیزیولوژیکی ایفا کرده و از گیاهان در مقابل تنش‌های زیستی و غیرزیستی حفاظت می‌کند (He *et al.*, 2005).

زوال بذر موجب افزایش فعالیت مولکول‌های اکسیژن واکنشگر می‌گردند و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نقش کلیدی در مقابله با تنش‌های اکسیداتیو ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد دارند اسید سالیسیلیک یک ترکیب فنلی شبه هورمون می‌باشد که به عنوان یک تنظیم کننده داخلی نقش مهمی را در مکانیسم‌های دفاع در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده بازی می‌کند (Szalai *et al.*, 2000). همچنین آنزیم‌های پراکسیداز[4] و پلی فنل اکسیداز[5]، آنزیم‌های مسئول برای اکسیداسیون ترکیبات فنلی هستند (Sheen and Calvert, 1969). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت[6] می‌تواند ناشی از افزایش القای رونویسی ژن و سنتز پروتئین آنزیم و یا بواسطه تغییرات پس از ترجمه[7] پروتئین‌های آنزیم‌های موجود باشد (Vitoria *et al.*, 2001). کیبینزا و همکاران (Kibinza *et al.*, 2011) گزارش کردند که پرایمینگ بذر، میزان غلظت پراکسید هیدروژن را که یکی از گونه‌های فعال اکسیزن می‌باشد، در گیاه آفتابگردان کاهش داد. گیاهان در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده، پروتئین‌هایی را تولید می‌کنند. تولید تعدادی از این پروتئین‌ها به وسیله پیش تیمار بذر القا می‌شود (Jin *et al.*, 2000). در طی زوال بذر تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون چربی باعث آسیب به غشا سلولی، DNA و پروتئین‌های بذری می‌گردد که خود باعث تولید ترکیبات جانبی سمی در بذر می‌شود. این تغییرات اغلب به گونه‌های فعال اکسیژن نسبت داده می‌شود (Hendry, 1993). کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بر اثر پیری بذر به دلایل متعددی مانند آسیب رسیدن به سنتز RNA و همچنین حمله گونه‌های فعال اکسیژن به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که در شرایط پیری بذر افزایش یافته و موجب تخریب آنزیم‌ها می‌شود (Bailly *et al.*, 2000). هدف از انجام این تحقیق، بررسی تأثیر اعمال زوال روی بذر سویا (رقم ویلیامز) و امکان استفاده از اسید سالیسیلیک به صورت پرایمینگ هورمونی بذر جهت کاهش اثرات پیری تسریع شده و رادیکال‌های آزاد بود.

---
[1] Fabaceae
[2] Priming
[3] Salicylic acid
[4] peroxidase
[5] polyphenol oxidase
[6] Antioxidant enzymes
[7] Post translation

## مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر غلظت و زمان پرایمینگ بذور زوال یافته سویا (پایه مادری رقم ویلیامز تهیه شده از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در سال ۱۳۹۵) با اسید سالیسیلیک بر بازیابی و بهبود خصوصیات کیفی و شاخص‌های رشدی گیاهچه، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران انجام شد. عامل‌های آزمایش شامل زوال بذور (روش پیری تسریع شده) در دو سطح (۴۸ (D1) و ۷۲ (D2) ساعت)، پرایمینگ با اسید سالیسیلیک ساخت شرکت مرک آلمان در ۳ سطح (صفر (S1)، ۳۰۰ (S2)، ۶۰۰ (S3) میکرومولار)، و زمان های مختلف پرایمینگ با اسید سالیسیلیک روی بذور شامل قبل زوال (T1)، بعد زوال (T2)، قبل و بعد زوال (T3) (از این پس به جای کاربرد عبارت قبل و بعداز زوال از کلمه توام استفاده می‌گردد) بود.

به منظور اعمال تیماری پیری تسریع شده، پس از شمارش تعداد بذور مورد نیاز، آنها در جعبه‌های پلاستیکی (۱۵×۱۱×۶ سانتی‌متر) گذاشته و سپس در اتاقک تسریع پیری در دمای ۴۱ درجه سانتیگراد و در رطوبت اشباع (حدود ۱۰۰ درصد) قرار داده شد (Baraani-Dastjerdi *et al.*, 2013). برای اعمال تیمارهای پرایمینگ با اسید سالیسیلیک، پس از تهیه محلول‌های مورد نظر، بذور به مدت زمان هشت ساعت در دمای اتاق مورد آبنوشی قرار گرفتند. پس از اعمال تیمارهای آبنوشی، بذور به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق تا رسیدن به وزن اولیه خشک شدند.

برای انجام آزمون جوانه‌زنی، ۲۰ عدد بذر در پتری‌هایی ضد عفونی شده با قطر دهانه ۹ سانتی‌متر حاوی یک لایه کاغذ صافی واتمن قرار داده شد. در نهایت به هر پتری ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس دهانه پتری با پارافیلم برای کاهش میزان تبخیر درزگیری شد. پتری ها به ژرمیناتور با دمای متناوب ۲۵/۱۵ درجه سانتیگراد (روز/شب) و تناوب نوری ۱۲ ساعت منتقل شد. برای اندازه گیری سرعت جوانه‌زنی (Pagter et al., 2005) شمارش بذور جوانه‌زده در هر روز براساس خروج ۲ میلی‌متر ریشه‌چه صورت گرفت. در روز چهارهم نیز آزمایش جوانه‌زنی به اتمام رسید. در پایان دوره آزمایش صفاتی شامل: درصد جوانه زنی، میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید (MDA) براساس روش هیس و پیکر (Heath and Packer, 1968)، فعالیت آنزیم پراکسیداز (Koroi, 1989)، کاتالاز (Kar and Mishra, 1976)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (Beauchamp *et al.*, 1983)، گلوتاتیون رداکتاز (Foyer and Halliwell, 1976)، آسکوربات پراکسیداز (Nakano and Asada, 1981)، گلوتاتیون پراکسیداز (Maehly and Chance, 1954) از بذر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. مقایسه میانگین نیز با استفاده از آزمون FLSD[1] در سطح احتمال ۵ درصد بود.

## نتایج و بحث

### درصد جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که درصد جوانه‌زنی تحت تاثیر اثر ساده زوال بذر، کاربرد اسیدسالسیلیک و زمان کاربرد اسیدسالسیلیک قرار گرفته است. اثرات دوگانه متقابل زوال با زمان اعمال هورمون، زوال با غلظت هورمون و غلظت هورمون با زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود، و همچنین اثر متقابل سه گانه زوال با غلظت هورمون و زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود(جدول ۲). اثرمتقابل سه گانه نشان داد زوال باعث کاهش درصدجوانه‌زنی می‌شود. پرایمینگ بذرور با هورمون اسید سالیسیلیک به صورت توام موجب بازیابی بذور زوال یافته و افزایش درصد جوانه زنی شد. بیشترین درصد جوانه‌زنی در زمان کاربرد اسیدسالسیلیک به

[1] Fisher's Least Significant Difference Test

صورت توام مشاهده شد و بیشترکمترین در زمان کاربرد عدم اسیدسالسیلیک و زمان بعد از زوال مشاهده شد. بیشترین میزان درصد جوانه زنی در زوال ۷۲ ساعت با مصرف اسید سالسیلیک به صورت توام و غلظت ۳۰۰ میکرومولار و کمترین میزان درصدجوانه زنس در زمان ۷۲ ساعت زوال با عدم مصرف اسیدسالسیلیک مشاهده شد

علت کاهش درصد جوانه‌زنی را می‌توان مربوط به تاثیر فرسودگی بذر بر نفوذپذیری غشاء، افزایش تنفس بذر و کاهش انرژی اولیه مورد نیاز بذر برای جوانه‌زنی دانست. پرایمینگ باعث افزایش درصد جوانه‌زنی می‌شود و به طور مختصر می‌توان اثرات مطلوب پیش تیمار بذرها در جوانه‌زنی را به تغییراتی از جمله: ۱-افزایش متابولیسم پروتئین‌ها و RNA در بذرها پیش تیمار شده (Khan *et al.*, 2003). افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مثل ایتروئاز، فسفاتاز و فسفوگلیسرید دهیدروژناز که باعث متابولیسم مواد ذخیره‌ای بذر مثل کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها گشته و در نهایت باعث افزایش جوانه‌زنی می‌گردد. افزایش سنتز پروتئین در جنین که این نیز منجر به افزایش جوانه‌زنی می‌شود مربوط دانست (Siviritepe and Dourado, 1995). کاهش درصد جوانه‌زنی بر اثر زوال در اکثر تحقیقات مشاهده شده است که از دلایل اصلی آن می‌توان به پراکسیداسیون چربی‌ها، خسارت به غشای سلولی، آسیب به فرایند سنتز RNA، تخریب DNA، رسوب و غیرفعال شدن آنزیم‌ها اشاره کرد (Lehher *et a*l., 2008). بویلی و بلک (Bewly and Black, 1994) گزارش کردند که پرایمینگ باعث افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانت از قبیل گلوتاتیون و آسکوربات در بذر می‌گردد که این آنزیم‌ها فعالیت پراکسیداسیون لیپد را در طی جوانه‌زنی کاهش می‌دهند و در نتیجه باعث افزایش درصد جوانه‌زنی می‌شوند. ال-طیب (El-Tayeb, 2005) گزارش کرده است که درصد جوانه‌زنی بذرهای جو در محلول ۱ میلی‌مول اسید سالیسیلیک در pH=۵/۵ نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد.

## سرعت جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که سرعت جوانه‌زنی تحت تاثیر اثر ساده زوال بذر، کاربرد اسیدسالسیلیک و زمان کاربرد اسیدسالسیلیک قرار گرفته است. اثرات دوگانه متقابل زوال با زمان اعمال هورمون، زوال با غلظت هورمون و غلظت هورمون با زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود، و همچنین اثر متقابل سه گانه زوال با غلظت هورمون و زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود(جدول ۲). اثرمتقابل سه گانه حاکی از آن بود که زوال باعث کاهش سرعت جوانه زنی می‌شود. پرایمینگ بذرور با هورمون اسید سالیسیلیک به صورت توام و قبل از زوال موجب بازیابی بذور زوال یافته و افزایش سرعت جوانه‌زنی شد. بیشترین درصد جوانه‌زنی در زمان کاربرد اسیدسالسیلیک به صورت توام مشاهده شد. بیشترین میزان سرعت جوانه زنی با مصرف اسید سالسیلیک به صورت توام و غلظت ۳۰۰ میکرومولار مشاهده شد

بذور برای انجام فعالیت‌های حیاتی و شروع جوانه‌زنی احتیاج به آب کافی دارند. چنانچه جذب آب دچار اختلال شود یا به کندی صورت پذیرد، فعالیت‌های داخل بذر نیز به کندی صورت گرفته و مدت زمان خروج ریشه چه از بذر افزایش می‌یابد و به عبارتی سرعت جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. بطور کلی، علت تسریع جوانه‌زنی در بذور پرایم شده می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده‌ای مثل آلفا - آمیلاز، افزایش سطح انرژی زیستی در قالب افزایش ATP، افزایش سنتز RNA و DNA، افزایش تعداد و در عین حال ارتقاء عملکرد میتوکندری (Afzal *et al.*, 2002) و بازسازی قسمت‌های آسیب دیده بذر و رشد سریعتر جنین در مقایسه با بذرهای شاهد گزارش شده است. بر مبنای یافته‌های قبلی فرسودگی بذر ناشی از صدمات وارده بر غشاءها، مختل شدن فعالیت آنزیم‌ها و آسیب رسیدن به ساختارهای ریز سلولی می‌باشد (Roberts and Osei-Bonsu, 1998). با

افزایش فرسودگی و زوال بذر، درصد جوانه‌زنی کمتر شده و طول عمر بذرها کاهش می‌یابد. با توجه به نقش مثبت هورمون اسید سالیسیلیک، دور از انتظار نیست که بذور پرایم شده با اسید سالیسیلیک بنیه بالاتری داشته باشند. نتیجه بدست آمده با نتایج کار ابوطالبیان (Aboutalebian, 2005) که افزایش سرعت سبز شدن و درصد نهایی سبز شدن گیاهچه را در بیشتر ارقام گندم پرایم شده گزارش کردند، مطابقت دارد. چوجنوسکی و کومی (Chojnowski and Come, 1997) گزارش کردند که پرایمینگ بذور آفتابگردان به مدت ۳ الی ۵ ساعت باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی و بهبود رشد گیاهچه می‌شود. این محققان افزایش در فعالیت‌های تنفسی و در نتیجه تولید ATP، تحریک فعالیت‌های RNA و پروتئین سازی در بذور پرایمینگ شده را دلیل چنین واکنشی ذکر کردند. بیومت و همکاران (Burnett *et al.*, 2005) بیان کردند که اگر جذب آب توسط بذر دچار اختلال گردد، فعالیت‌های متابولیکی جوانه‌زنی در داخل بذر به آرامی صورت خواهد گرفت، در نتیجه زمان خروج ریشه‌چه از بذر افزایش و از این رو سرعت جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. هورلی و همکاران (Hurly *et al.*, 1991) بیان نمودند که پرایمینگ سبب ایجاد برخی تغییرات فیزیولوژیکی از قبیل تغییر در مقدار قند و ترکیبات آلی و یون‌های تجمع یافته در بذر، ریشه و حتی برگ‌های گیاه می‌شود که باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی و مقاومت بیشتر آن به شرایط نامساعد می‌گردد. از آنجا که شرایط تسریع پیری نوع استرس و صدمه محسوب می‌شود، افزایش متوسط زمان جوانه‌زنی احتمالاً به دلیل وقفه‌ای است که در شروع جوانه‌زنی در بذرهای فرسوده ایجاد می‌شود. علت احتمالی وقفه ایجاد شده این است که بذر برای ترمیم خسارت‌های وارد شده به غشاء و دیگر قسمت‌های سلول و همچنین آغاز مجدد سیستم آنتی‌اکسیدانی و جلوگیری از بروز تنش اکسیداتیو به زمان نیاز دارد و ترمیم این خسارت‌ها فقط پس از پرایمینگ امکان پذیر است، بنابراین مدت زمان لازم برای تکمیل فرایند جوانه‌زنی در بذرهای فرسوده افزایش می‌یابد که نتیجه آن افزایش متوسط زمان جوانه‌زنی یا کاهش سرعت جوانه‌زنی است (Bailly et al., 2000).

### گلوتاتیون رداکتاز[1] (GR)

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که آنزیم گلوتاتیون رداکتاز تحت تاثیر اثر ساده زوال بذر، کاربرد اسیدسالسیلیک و زمان کاربرد اسیدسالسیلیک قرار گرفته است. اثرات دوگانه متقابل زوال با زمان اعمال هورمون، زوال با غلظت هورمون و غلظت هورمون با زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود، و همچنین اثر متقابل سه گانه زوال با غلظت هورمون و زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود(جدول ۲). اثرمتقابل سه گانه نشان داد زوال باعث کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون رداکتاز می‌شود. پرایمینگ بذور با هورمون اسید سالیسیلیک موجب بازیابی بذور زوال یافته و افزایش فعالیت این آنزیم شد. کمترین فعالیت در زمان کاربرد بعد از زوال مشاهده می‌شود و بیشترین میزان فعالیت در زمان کاربرد به صورت توام مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در زوال ۷۲ ساعت با مصرف ۳۰۰ میکرومولار اسید سالسیلیک در زمان توام به میزان ۰/۰۵ مشاهده شد که نسبت به زمانی که اسیدسالسیک مصرف نشده با اعمال زوال ۷۲ ساعت افزایش ۱۵۸/۶۲ درصدی داشته است.

گلوتاتیون رداکتاز از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شناخته می‌شود، ولی این آنزیم بطور مستقیم دارای خواص آنتی اکسیدانی نمی‌باشد. این آنزیم موجب تسریع واکنش معکوس واکنش گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد. در واقع این آنزیم سبب تبدیل گلوتاتیون دی‌سولفید به گلوتاتیون می‌شود که این عمل آن با مصرف NADPH همراه است (Hossain et al., 2011). در واقع این آنزیم موجب تداوم چرخه گلوتاتیون شده و از این طریق به صورت غیرمستقیم در تجزیه هیدروژن پراکسید نقش ایفا می‌کند. این آنزیم همانند دیگر آنزیم‌ها در طی تنش‌های

[1] Glutation Reductase

اکسیداتیو و با تخریب DNA فعالیت آن کم می‌شود، همچنین کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز که تولید کننده سوبسترای لازم برای فعالیت این آنزیم است شاید موجب کاهش فعالیت آن نیز شود. نشان داده شده که در گیاهان تراژن، افزایش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز باعث مقاومت به تنش می‌شود و کاهش فعالیت این آنزیم حساسیت گیاه را به تنش اکسیداتیو افزایش می‌دهد (Mittler, 2004).

### سوپر اکسید دیسموتاز[1] (SOD)

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که سوپر اکسید دیسموتاز تحت تاثیر اثر ساده زوال بذر، کاربرد اسیدسالسیلیک و زمان کاربرد اسیدسالسیلیک قرار گرفته است. اثرات دوگانه متقابل زوال با زمان اعمال هورمون، زوال با غلظت هورمون و غلظت هورمون با زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود، و همچنین اثر متقابل سه گانه زوال با غلظت هورمون و زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود(جدول ۲). اثرمتقابل سه گانه حاکی از آن بود بیشترین فعالیت آنزیم در سطح زوال ۷۲ ساعت و کاربرد توام و غلظت ۳۰۰ میکرومولار مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در زمان کاربرد سالسیلیک توام مشاهده شد وکمترین میزان فعالیت این آنزیم در زمان کاربرد سالسیلیک بعد از زوال مشاهده شد.

یکی از آنزیم‌های دفاعی که در گیاهان تحت تنش تولید می‌شود، سوپراکسید دیسموتاز است. این آنتی‌اکسیدانت آنزیمی یک آنزیم فلزی (متالوآنزیم) است که یون سوپراکسید را تجزیه می‌کند. سوپراکسید به عنوان یکی از گونه‌های اصلی اکسیزن واکنشگر در سلول، شناخته شده است که سبب تغییر ماهیت آنزیم‌ها، اکسیداسیون لیپیدها و متلاشی شدن DNA می‌شود. تنظیم میزان سوپراکسیددیسموتاز در تعدیل اثرهای مخرب تنش اکسیداتیو بسیار مهم است. بنابراین سوپراکسید دیسموتاز یکی از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های دفاعی در مقابل گونه‌های اکسیژن واکنشگر[2] (ROS) است، در واقع این آنزیم به عنوان آنتی‌اکسیدان و حفاظت‌کننده اجزای سلولی عمل می‌کند و همچنین سوپراکسید دیسموتاز باعث تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی می‌شود (Allen, 2008).

در طی زوال فعالیت RNA اکسیداز با افزایش میزان هیدروژن پراکسیداز کاهش پیدا می‌کند، در نتیجه افزایش هیدروژن پراکسیداز و رادیکال‌های آزاد در سیتوپلاسم سلول‌ها در طی زوال میزان تولید هیدروژن در میتوکندری افزایش و منجر به غیرفعال شدن فعالیت‌های فتوسنتتیک و ایجاد غیر تعادل بین رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌های دفاعی شده و همچنین کاهش پیوستگی پروتئین‌ها در طی آن باعث افزایش حساسیت پروتئین‌ها به آنزیم‌های پروتئولیز کننده و منجر به کاهش قوه نامیه بذور می‌شود (Berlett and Stadtman, 1997). در پژوهشی دیگر نیز به کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در طی زوال گزارش شده است (Goel et al., 2003).

### آنزیم کاتالاز[3] (CAT)

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که آنزیم کاتالاز تحت تاثیر اثر ساده کاربرد اسیدسالسیلیک و زمان کاربرد اسیدسالسیلیک قرار گرفته است. اثرات دوگانه متقابل زوال با زمان اعمال هورمون، زوال با غلظت هورمون و غلظت هورمون با زمان اعمال هورمون نیز معنی‌دار بود، و همچنین اثر متقابل سه گانه زوال با غلظت هورمون و زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود(جدول ۲). اثرمتقابل سه گانه نشان داد زوال باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود. پرایمینگ بذور با هورمون اسید سالیسیلیک به صورت توام موجب بازیابی بذور زوال یافته و افزایش فعالیت این آنزیم شد. بیشترین میزان فعالیت در زمان کاربرد به صورت توام و زمان مصرف سالسیلیک قبل زوال مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در

[1] Superoxid dismutase
[2] Reactive oxygen species
[3] Catalase

زوال ۷۲ ساعت با مصرف ۳۰۰ میکرومولار اسید سالسیلیک در زمان توام به میزان ۲۵/۰۸ مشاهده شد. مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه بیشترین میزان کاتالاز را در سطح ۷۲ ساعت زوال با زمان بعد از اعمال هورمون با ۶۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک بدست آمد.

یکی از آنزیم‌های دفاعی موثر کاتالاز است که در همه موجودات زنده تحت تنش تولید می‌شود. این آنزیم با اثر مستقیم بر پراکسیداسیون هیدروژن، سبب کاهش اثرهای سمی آن می‌شود. هیدروژن پراکسید ماده‌ای سمی است که طی بسیاری از مکانیسم‌ها و واکنش‌های طبیعی سلول ایجاد می‌شود. تجمع این ماده برای سلول‌ها و بافت-ها بسیار آسیب‌رسان است و باید بلافاصله تجزیه شود. در واقع کاتالاز از پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و با تجزیه سریع این ماده اثرهای مخرب آن را مهار می‌کند. پراکسید هیدروژن برای سلول‌های گیاهی و بویژه برای کلروپلاست‌ها بسیار سمی است، چرا که در غلظت‌های پایین باعث مهار فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین بویژه آنزیم‌های دارای گروه سولفیدریل مثل گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز و فروکتوز ۱ و ۶ بیس فسفات می‌شود. کاتالاز فقط در پراکسیزوم وجود دارد، بنابراین دامنه فعالیت آن محدود است و زمانی که مقدار ROS تحت تنش، افزایش می‌یابد، در سم‌زدایی شرکت می‌کند (Apel and Hirt, 2004). بررسی تغییرات میزان فعالیت کاتالاز در زمان پرایمینگ نشان داده که این آنزیم در طی پزایمینگ در سیتوزول سلولی تجمع پیدا می‌کند که این مرحله همزمان با ایکولیزیشن هیدروژن پراکسیداز است. پرایمینگ موجب افزایش پروتئین بذر و سنتز نوکلئیک اسید شده و اجازه انجام فرآیندهای متابولیکی مختلف موثر در رونوشت برداری از DNA یا سنتز اتیلن را می‌دهد (Bray, 1995). که در نهایت موجب بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و افزایش درصد جوانه‌زنی نیز می‌شود. برای مثال گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده خربزه در مقایسه با گیاهچه‌های رشد یافته از بذرهای پرایم نشده، فعالیت کاتالاز بیشتری را نشان دادند (Farhoudi *et al*., 2011). نتایج دیگر محققان نیز نشان داد که افزایش در دوره پیری تسریع شده سبب کاهش در فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز شد و چنین نتیجه‌گیری شد که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در جوانه‌زنی بذر بعد از پیری اثرگذار بود و بذرهای با فعالیت آنزیمی بالاتر دارای درصد جوانه‌زنی بیشتری بودند، همچنین می‌توان تغییرات در آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی خصوصاً کاتالاز را مهمترین رخداد در بذرهای پیر شده دانست (Ansari and Sharif-Zadeh, 2013). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در بذور زوال یافته ذرت (Bernal *et al*., 2000) و پنبه (Goel *et al*., 2003) گزارش شد که با نتایج این بررسی مطابقت دارد.

### آنزیم پراکسیداز[1]

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که آنزیم پراکسیداز تحت تاثیر اثر ساده زوال بذر، کاربرد اسیدسالسیلیک و زمان کاربرد اسیدسالسیلیک قرار گرفته است. اثرات دوگانه متقابل زوال با زمان اعمال هورمون، زوال با غلظت هورمون و غلظت هورمون با زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود، و همچنین اثر متقابل سه گانه زوال با غلظت هورمون و زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود(جدول ۲). اثرمتقابل سه گانه نشان داد زوال باعث کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌شود. پرایمینگ بذور با هورمون اسید سالیسیلیک موجب بازیابی بذور زوال یافته و افزایش فعالیت این آنزیم شد. کمترین فعالیت در زمان کاربرد بعد از زوال مشاهده می‌شود. بیشترین میزان فعالیت در زمان مصرف اسیدسالسیلک با غلظت ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار مشاهده شد.

پراکسیدها گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی هستند که در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی تولید می‌شوند. پراکسیدازها معمولاً واکنش اکسیداسیون و احیاء را بین پراکسید هیدروژن به عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوبستراها مثل مواد فنلی،

[1] Peroxidase

جدول ۱-تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف زوال و غلظت اسیدسالیسیلیک وزمان پرایمینگ با اسید سالیسیلیک بر صفات مورد بررسی

Table 1- Variance analysis of various rates of deterioration and hormone concentration and time of application of hormone on studied traits

| منابع تغییرات S.O.V | درجه آزادی df | درصد جوانه‌زنی Germination percentage | سرعت جوانه‌زنی Germination rate | گلوتاتیون پراکسیداز Glutation Peroxidase | آسکوربات پراکسیداز Ascorba peroxidase | آنزیم پراکسیداز peroxidase | کاتالاز Catalase | سوپر اکسید دیسموتاز Superoxid dismutase | گلوتاتیون ردوکتاز Glutation Reductase | مالون دی آلدهید MAD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| زوال (D) Deteriorated | 1 | 174.852** | 0.833** | 5.3518** | 2.184** | 10.1313** | 0.14ns | 0.0011** | 3.9185** | 19.2843** |
| غلظت اسید سالیسیلیک (S) Salicylic acid | 2 | 6326.01** | 47.203** | 0.0011** | 36.502** | 419.6752** | 386.85** | 0.0087** | 0.0016** | 627.549** |
| زمان کاربرد اسید سالیسیلیک (T) Application time | 2 | 1103.305** | 14.175** | 0.00051** | 13.54** | 129.101** | 163.26** | 0.001** | 0.00042** | 195.829** |
| T×D | 2 | 9.393** | 0.386** | 3.3518** | 0.0322 ns | 2.9519** | 4.76611** | 0.00011** | 2.0351** | 6.3733** |
| S×D | 2 | 316.356** | 1.374** | 1.5574** | 0.8811** | 14.2734** | 3.1043** | 5.45** | 7.9685** | 42.5585** |
| T×S | 4 | 95.0915** | 1.755** | 7.7824** | 1.7785** | 11.0988** | 18.4664** | 0.00025** | 3.2046** | 18.8829** |
| T×S×D | 4 | 55.8432** | 0.307** | 1.999** | 0.1806** | 6.841** | 7.6637** | 7.7472** | 1.5268** | 6.7026** |
| خطا (Error) | 36 | 0.362 | 0.0155 | 4.4444 | 0.1236 | 0.09157 | 0.052 | 5.0925** | 7.2222 | 0.2111 |
| c.v | | 0.84 | 1.84 | 3.8257 | 2.29 | 1.829 | 1.35 | 11.29 | 2.36 | 4.31 |

ns، * و ** به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد می باشد

ns, * and ** Accordingly, there is no significant difference at the level of 5% and 1% respectively

اسید اسکوربیک، آمین‌های آروماتیک و سیتوکروم C کاتالیز می‌کنند و به عنوان آنزیم‌های سم‌زدای گونه‌های اکسیژن واکنشگر عمل می‌کنند. آنزیم پراکسیداز موجب شکسته شدن هیدروژن پراکسید در سلول می‌شود و بدین شکل از تولید ROSها جلوگیری می‌کند و بنابراین با بالا رفتن سطوح فعالیت این آنزیم، گیاه کمتر مورد تهاجم ROSها قرار می‌گیرد و همچنین این گروه از آنزیم‌ها در سیتوزول، واکوئل، کلروپلاست و آپوپلاست وجود دارند (Blokina et al., 2003). پراکسیداز در اثر تنش‌های اکسیداتیو کاهش پیدا می‌کند، کاهش فعالیت آن را نیز می‌توان به کاهش رونوشت برداری و آسیب در ساختمان DNA در طی زوال مرتبط دانست (Bray, 1995). مک‌دونالد (McDonald, 1999) اعلام کرد که در طی زوال فعالیت ایزوآنزیم‌های پراکسیداز کاهش پیدا می‌کند که این امر موجب تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی متعددی می‌شود. تجمع ایزوآنزیم‌های پراکسیداز در واکوئل و دیواره سلولی سبب چوبی شدن این قسمت‌ها می‌شود و از این طریق موجب محافظت سلول در طی تنش می‌شود (Gaspar *et al*., 2001).

طبق نتایج مشاهده می‌شود که زوال باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شده است، ولی افزایشی که پرایمینگ ایجاد کرده است نسبت به افزایشی که در زوال ایجاد شده است بطور معنی‌داری بیشتر است. در طی تنش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گیاهان از قبیل (کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و پلی فنول اکسیداز) فعال می‌شوند که این ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی، گونه‌های را تجزیه می‌کنند در نتیجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان با تحمل تنش در (ROS) اکسیژن فعال گیاهان، رابطه مستقیم دارند (Mittler, 2004). برای مثال اشرف و علی (Ashraf and Ali, 2008) دریافتند که فعالیت آنزیم‌های

آنتی اکسیدانی مثل کاتالاز و پراکسیداز در برگ‌های کلزا تحت شرایط شوری افزایش می‌یابد. همچنین موسوی و همکاران (Moosavi *et al.*, 2009) نشان دادند که اسموپرایمینگ بذرهای گل همیشه بهار با پلی اتیلن گلایکول، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، مخصوصاً کاتالاز و پراکسیداز را در مقایسه با بذرهای پرایم نشده، بالا می‌برد. واریر و همکاران (Varier *et al.*, 2010) گزارش کردند که پرایمینگ باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در پنبه شده است مهار فعالیت پراکسیداز در نخودفرنگی تحت تیمار سالیسیلیک اسید توسط سریواستاوا (Srivasta, 2001) گزارش شد.

**آنزیم آسکوربات پراکسیداز[1] (APX)**

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر اثر ساده زوال بذر، کاربرد اسیدسالسیلیک و زمان کاربرد اسیدسالسیلیک قرار گرفته است. اثرات دوگانه متقابل زوال با غلظت هورمون و غلظت هورمون با زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود، و همچنین اثر متقابل سه گانه زوال با غلظت هورمون و زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود(جدول ۲). اثرمتقابل سه گانه حاکی از آن بود زوال باعث کاهش فعالیت این آنزیم شد. پرایمینگ بذور با هورمون اسید سالیسیلیک موجب بازیابی بذور زوال یافته و افزایش فعالیت این آنزیم شد. کمترین فعالیت در زمان کاربرد بعد از زوال مشاهده می‌شود و بیشترین میزان فعالیت در زمان کاربرد به صورت توام و قبل زوال مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در زوال ۷۲ ساعت با مصرف ۳۰۰ میکرومولار اسید سالسیلیک در زمان توام به میزان ۶/۹۸ و در زوال ۴۸ ساعت با مصرف ۳۰۰ میکرومولار اسید سالسیلیک در زمان توام به میزان ۶/۹۶ مشاهده شد که نسبت به زمانی که اسیدسالسیک مصرف نشده با اعمال زوال ۷۲ ساعت افزایش فعالیت آنزیم مشاهده شد.

آسکوربات پراکسیداز نقش چشمگیری در تعدیل میزان ROS تولید شده طی تنش در سلول دارد. این آنزیم از آسکوربات به عنوان عامل احیا کننده استفاده می‌کند، آب اکسیژنه را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کنند و نقش مهمی در سمیت‌زدایی پراکسید هیدروژن به عهده دارد. در عمل این آنزیم الکترون اضافی موجود در هیدروژن پراکسید به دی هیدروآسکوربات منتقل شده و موجب تولید آب نیز می‌شود. این آنزیم نقش کلیدی در چرخه گلوتاتیون-آسکوربات دارد (Raven, 2000; Noctor and Foyer, 1998). در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون با فعالیت آنزیم APX، آسکوربات به مونودهیدروآسکوربات اکسیده می‌شود و برای ادامه چرخه تولید دوباره آسکوربات لازم است. به همین منظور در این‌چرخه آنزیم‌های مونودهیدروآسکوربات ردکتاز[2]، دهیدروآسکوربات ردوکتاز[3] و گلوتاتیون ردوکتاز فعالیت می‌کنند و با استفاده از NADPH و گلوتاتیون، آسکوربات را احیا می‌کنند (Hare and Cress, 2007).

**گلوتاتیون پراکسیداز[4] (GP)**

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که گلوتاتیون پراکسیداز تحت تاثیر اثر ساده زوال بذر، کاربرد اسیدسالسیلیک و زمان کاربرد اسیدسالسیلیک قرار گرفته است. اثرات دوگانه متقابل زوال با زمان اعمال هورمون، زوال با غلظت هورمون و غلظت هورمون با زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود، و همچنین اثر متقابل سه گانه زوال با غلظت هورمون و زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود(جدول ۲). اثرمتقابل سه گانه حاکی از آن بود زوال باعث کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌شود و پرایمینگ بذور با هورمون اسید سالیسیلیک به صورت مصرف توام موجب بازیابی بذور زوال یافته و افزایش فعالیت این آنزیم شد. کمترین فعالیت در زمان عدم استفاده از اسیدسالسیلیک مشاهده می‌شود و بیشترین میزان فعالیت در زمان کاربرد به صورت توام مشاهده شد.

[1] Ascorba peroxidase
[2] MAHAR
[3] DHAR
[4] Glutation Peroxidase

گلوتاتیون پراکسیداز، فسفولیپید هیدروپراکسید گلوتاتیون پراکسیداز (PHGPX) نیز نامیده می‌شود که آنزیمی کلیدی در حفاظت غشاهایی است که در معرض تنش اکسیداتیو قرار دارند. تولید این آنزیم طی تنش‌ها القاء می‌شود. این آنزیم تولید دوباره اسیدهای چرب غیر اشباع از فسفولیپید هیدروپراکسید را کاتالیز می‌کند (Lewitt, 2009). همچنین به عنوان کاتالیزور سبب تبدیل گلوتاتیون به گلوتاتیون دی سولفید شده و از این طریق الکترون اضافه‌ی موجود در هیدروژن پراکسید را دریافت و موجب تبدیل آن به آب می‌شود و سبب انتقال الکترون اضافه از هیدروژن پراکسید به آب و هیدروژن پراکسید به آب می‌گردد (Hossain et al., 2011). گلوتاتیون بر فعالیت آنزیم دی آسکوربات رداکتاز که موجب تبدیل دی هیدروآسکوربات به آسکوربات می‌شود تاثیرگذار است که می‌توان همبستگی و تاثیر پذیری آن بر یک دیگر را مربوط به این مورد دانست (Krishna and Mugesh, 2010). زوال می‌تواند با ایجاد اختلال در پروتئین و آنزیم‌ها سبب کاهش کارکرد این چرخه و همچنین کاهش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با آن شوند (Berlett and Stadtman, 1997).

### مالون دی آلدهید (MAD)

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که مالون دی آلدهید تحت تاثیر اثر ساده زوال بذر، کاربرد اسیدسالسیلیک و زمان کاربرد اسیدسالسیلیک قرار گرفته است. اثرات دوگانه متقابل زوال با زمان اعمال هورمون، زوال با غلظت هورمون و غلظت هورمون با زمان اعمال هورمون نیز معنی دار بود، و همچنین اثر متقابل سه گانه زوال با غلظت هورمون و زمان اعمال هورمون نیز معنی‌دار بود (جدول ۲). اثرمتقابل سه گانه نشان داد زوال باعث افزایش نشت مالون دی آلدهید می‌شود. پرایمینگ بذرور با هورمون اسید سالیسیلیک به صورت توام موجب بازیابی بذور زوال یافته و کاهش فعالیت مالون دی آلدهید شد. کمترین فعالیت در زمان کاربرد اسیدسالسیلیک به صورت توام مشاهده شد و بیشترین میزان فعالیت در زمان کاربرد عدم اسیدسالسیلیک و زمان بعد از زوال مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در زوال ۷۲ ساعت با عدم مصرف اسید سالسیلیک مشاهده شد و کمترین میزان نشت در زمان ۷۲ ساعت زوال با غلظت ۳۰۰ میکرومولار در زمان توام مشاهده شد.

پراکسیداسیون چربی‌های غشاء از جمله عوامل اصلی است که باعث می‌شود ساختارهای غشاء سلول بهم خورده و نشت الکترولیت‌ها افزایش یابد. در شرایط تنش به دلیل تولید انواع اکسیژن فعال[1] (ROS) میزان مالون دی آلدئید و تخریب غشای سلولی بالا می‌رود (Munns and James, 2003). باسرا و همکاران (Basra et al., 2003) نشان داده‌اند پیری بذر باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن افزایش پراکسیداسیون لیپید و تجزیه غشاء فسفولیپیدی می‌شود. همچنین اسویندتار و همکاران (Sveinsdottir *et al*., 2009) گزارش دادند که با افزایش سطوح فرسودگی، فعالیت‌های آنزیمی در بذر مانند کاتالاز، پراکسیداز سوپراکسیددیسموتاز، اسکوربات پراکسیداز و ATPآز کاهش می‌یابد نتایج بدست آمده این محققان نشان داد که افزایش حجم خزانه و نسبت احیا به اکسید این آنتی‌اکسیدان‌ها، ضمن برطرف نمودن محدودیت‌های مکانیسم‌های دفاعی، پتانسیل ردوکس سلول را افزایش می‌دهند (Dewir *et al*., 2006). بعلاوه آنتی اکسیدان‌های اسکوربات و گلوتاتیون توانایی واکنش مستقیم با رادیکال سوپراکسید و سایر فرم‌های فعال اکسیژن را دارند که می‌توانند شدت آسیب را کاهش دهند (Israr and Sahi, 2006).

گیاهان از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت برای افزایش تحمل در برابر تنش اکسیداتیو استفاده می‌کنند افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به کاهش میزان MDA و خسارت تنش در سلول‌ها، به گیاهان کمک می‌کند (Bandeoglu et al., 2004). کاهش تولید مالون دی آلدئید به واسطه استفاده از پیش تیمار هالوپرایمینگ با نیترات پتاسیم مشاهده شده است (Gue *et al*., 2012).

[1] Reactive oxygen spicies

هیوس و همکاران (Hus et al., 2003) در مطالعه تاثیر زوال تسریع شده بر پراکسیداسیون چربی‌های کدوی تلخ و تاثیر پرایمینگ و خیساندن بذر با آب گرم نشان دادند که در طی زوال فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز کاهش یافت که در طی پرایمینگ و خیساندن بذور با آب گرم افزایش پیدا کرد.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه زوال بذر×غلظت سالیسیلیک اسید×زمان پرایم بر صفات مورد بررسی

Table 2- Treatments with the same letter don't have significant difference

| تیمارها Treatments | مالون دی آلدهید MAD | گلوتاتیون پراکسیداز Glutathione peroxidase | آسکوربات پراکسیداز Ascorba peroxidase | آنزیم پراکسیداز peroxidase | کاتالاز Catalase | سوپراکسید دیسموتاز Superoxid dismutase | گلوتاتیون رداکتاز Glutation reductase | سرعت جوانه‌زنی Germination rate | درصد جوانه‌زنی Germination percentage |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (میکرومول بر گرم) (Mg/g) | (جذب در میلی‌گرم پروتئین) (Unit/ Mg Protein) | | | | | | (بذر در روز) (seed/day) | |
| D1T1S1 | 15.51$^{c}$ | 0.009333$^{k}$ | 3.73$^{h}$ | 12.362$^{l}$ | 12.03$^{n}$ | 0.013$^{ghi}$ | 0.028$^{j}$ | 5.44$^{j}$ | 56.5$^{l}$ |
| D1T1S2 | 15.45$^{c}$ | 0.008333$^{kl}$ | 3.28$^{i}$ | 12.21$^{m}$ | 11.02$^{o}$ | 0.012$^{ghi}$ | 0.026$^{k}$ | 5.08$^{k}$ | 52.21$^{m}$ |
| D1T1S3 | 14.27$^{d}$ | 0.011667$^{j}$ | 3.95$^{g}$ | 13.62$^{k}$ | 13.03$^{m}$ | 0.012$^{ghi}$ | 0.029$^{j}$ | 5.52$^{j}$ | 60.6$^{k}$ |
| D1T2S1 | 6.42$^{j}$ | 0.022667$^{e}$ | 5.74$^{b}$ | 19.42$^{e}$ | 20.06$^{f}$ | 0.021$^{e}$ | 0.041$^{e}$ | 7.71$^{e}$ | 83.15$^{e}$ |
| D1T2S2 | 12.58$^{e}$ | 0.013667$^{i}$ | 4.58$^{e}$ | 15.61$^{i}$ | 15.06$^{k}$ | 0.014$^{fgh}$ | 0.033$^{i}$ | 6.57$^{h}$ | 70.62$^{i}$ |
| D1T2S3 | 4.62$^{l}$ | 0.028$^{c}$ | 6.93$^{a}$ | 21.51$^{c}$ | 22.06$^{d}$ | 0.029$^{cd}$ | 0.045$^{c}$ | 8.61$^{c}$ | 90.05$^{c}$ |
| D1T3S1 | 7.55$^{i}$ | 0.021333$^{f}$ | 5.38$^{c}$ | 18.73$^{f}$ | 19.05$^{g}$ | 0.017$^{f}$ | 0.041$^{ef}$ | 7.53$^{e}$ | 79.89$^{f}$ |
| D1T3S2 | 10.51$^{g}$ | 0.016333$^{h}$ | 4.90$^{d}$ | 17.48$^{g}$ | 17.03$^{i}$ | 0.015$^{fg}$ | 0.038$^{g}$ | 6.79$^{g}$ | 75.7$^{g}$ |
| D1T3S3 | 3.46$^{m}$ | 0.028333$^{bc}$ | 6.93$^{a}$ | 22.82$^{b}$ | 23.06$^{c}$ | 0.031$^{c}$ | 0.046$^{c}$ | 8.81$^{c}$ | 90.55$^{c}$ |
| D2T1S1 | 18.97$^{b}$ | 0.007$^{mn}$ | 2.79$^{j}$ | 9.8$^{o}$ | 11.07$^{o}$ | 0.011$^{hi}$ | 0.021$^{l}$ | 4.41$^{m}$ | 43.18$^{o}$ |
| D2T1S2 | 22.18$^{a}$ | 0.006$^{n}$ | 2.55$^{k}$ | 8.3$^{p}$ | 10$^{p}$ | 0.010$^{i}$ | 0.019$^{m}$ | 4.15$^{n}$ | 40.75$^{p}$ |
| D2T1S3 | 18.31$^{b}$ | 0.008$^{lm}$ | 2.91$^{j}$ | 10.53$^{n}$ | 12.05$^{n}$ | 0.012$^{ghi}$ | 0.025$^{k}$ | 4.82$^{l}$ | 45.6$^{n}$ |
| D2T2S1 | 8.48$^{h}$ | 0.018667$^{g}$ | 5.30$^{c}$ | 17.75$^{g}$ | 18.04$^{h}$ | 0.017$^{f}$ | 0.04$^{f}$ | 7.15$^{f}$ | 78.89$^{f}$ |
| D2T2S2 | 11.51$^{f}$ | 0.015333$^{h}$ | 4.78$^{d}$ | 16.47$^{h}$ | 16.04$^{j}$ | 0.015$^{fg}$ | 0.036$^{h}$ | 6.66$^{gh}$ | 74.67$^{h}$ |
| D2T2S3 | 1.45$^{o}$ | 0.031667$^{a}$ | 6.98$^{a}$ | 24.06$^{a}$ | 25.08$^{a}$ | 0.048$^{a}$ | 0.05$^{a}$ | 9.32$^{a}$ | 95.64$^{a}$ |
| D2T3S1 | 5.57$^{k}$ | 0.025$^{d}$ | 5.29$^{c}$ | 20.64$^{d}$ | 21.06$^{e}$ | 0.025$^{d}$ | 0.042$^{d}$ | 7.94$^{d}$ | 85.92$^{d}$ |
| D2T3S2 | 12.02$^{ef}$ | 0.013$^{i}$ | 4.25$^{f}$ | 14.38$^{j}$ | 14.05$^{l}$ | 0.013$^{ghi}$ | 0.033$^{i}$ | 6.3$^{i}$ | 68.4$^{j}$ |
| D2T3S3 | 2.63$^{n}$ | 0.029333$^{b}$ | 6.95$^{a}$ | 23.04$^{b}$ | 24.07$^{b}$ | 0.038$^{b}$ | 0.048$^{b}$ | 9.08$^{b}$ | 93.83$^{b}$ |

شامل پرایمینگ با اسید سالیسیلیک با غلظت های صفر، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرمولار S1 ,S2 و S3 و زوال بذر شامل ۴۸ و ۷۲ ساعت D1 و D2 و زمان کاربرد اسید سالیسیلیک قبل زوال، بعد زوال، قبل و بعد زوال (توام) T1, T2, T3بود. عدم وجود حروف مشترک در هر ستون نشان از اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون FLSD می باشد.

Includes priming with salicylic acid at concentrations of 0, 300 and 600 µmolars S1, S2, S3 and seed deterioration 48 and 72 hours of D1 and D2 and the time of salicylic acid application before decaying and after deterioration was T3, T2, T1. The lack of common letters in each column indicates a significant difference at the 5% probability level based on the FLSD test.

## نتیجه‌گیری کلی

بطورکلی نتایج نشان داد در شرایط عدم وجود زوال بذر، پرایم بذور قبل از کشت به علت ارزان بودن و قابلیت اجرا در شرایط مختلف راهکار مطلوبی در جهت بهبود رشد گیاه سویا است این در حالی است که در شرایط وجود زوال بذر، پرایم با غلظت‌های مناسب می‌تواند راهبردی مطلوب برای افزایش توان بذور برای تولید گیاهچه‌هاب قوی تر باشد. کاربرد اسیدسالسیلیک به صورت قبل و بعد زوال (توام) بهترین راهکار برای کاهش اثرات زوال بود.

## Reference منابع

**Aboutalebian, M. 2005.** Osmotic priming of seeds of some wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) in warm, temperate and cold regions of Iran a means of enhancing seed vigour under unsuitable conditions. Thesis of Ph.D., Tehran University. (In Persian, with English Abstract)

**Afzal, I., N. Ahmad, S.M.A. Basra, R. Ahmadand, and A. Iqbal. 2002.** Effect of different seed vigor enhancement techniques on hybrid maize (*Zea mays* L.). J. Agric. Sci. 39: 109-112

**Allen, R. D. 2008.** Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiol. 107: 1049–1054.

**Ansari, O. and F. Sharif-Zadeh. 2013.** Improving germination of primed mountain rye seeds with heat shock treatment. Bra. J. Plant Physiol. 25.

**Apel, K. and H. Hirt. 2004.** Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Plant Biol. 55: 373-399.

**Ashraf, M. and Q. Ali. 2008.** Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). Environ. Exp. Bot. 63: 266-273.

**Bailly, C. 2004.** Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci. Res. 14: 93-107.

**Bailly, C., A. Benamar, F. Corbineau, and D. Come. 2000.** Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. Seed Sci. Res. 10: 35–42.

**Bandeoglu, E. F., Y. M. Eyidogan, and H.A. Oktem. 2004**. Antioxidant response of shoots and roots of lentil to NaCl Salinity stress. Plant Growth Regul. 42: 69-77.

**Baraani-Dastjerdi, M., M. Rafieiolhossaini, and A. R. Danesh-Shahraki. 2013**. Effects of drought stress and foliar application of zinc and manganese on seed quality of red bean during the accelerated aging test. EJCP. 7(2): 77-95. (In Persian, with English Abstract)

**Basra, M.A.S., M. Ashraf, N. Iqbal, A. Khaliq, and R. Ahmad. 2004.** Physiological and biochemical aspects of pre-sowing heat stress on cottonseed. Seed Sci. Technol. 32: 765-774.

**Basra, S.M.A., N. Ahmad, M.M. Khan, N. Iqbal, and M.A. Cheema. 2003.** Assessment of cotton seed deterioration during accelerated ageing. Seed Sci. Technol. 31: 531 –540.

**Beauchamp, C.O., S.L. Gonias, D.P. Menapace, S.V. Pizzo. 1983.** A new procedure for the synthesis of polyethylene glycol-protein adducts; effects on function, receptor recognition, and clearance of superoxide dismutase, lactoferrin, and alpha 2-macroglobulin. Ann. Biochem. 131: 25-33.

**Berlett, B.S. and E.R. Stadtman. 1997.** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, J. Bio. Che. 272: 20313-20316.

**Bernal, L., A. Camacho, and A.Carballo. 2000.** Effect of seed aging on the enzymic antioxidant system of maize cultivars. Pp. 157-160. In: M. Black, K.J. Bradford, and J. Vazqez-Ramos (eds). The Biology of seeds. CABI publishing, UK.

**Bewly, J.D., and M. Black. 1994.** Seeds: physiology of development and germination. Ed 2. Plenum Press, New York.

**Blokina, O., E. virolainen, K. fagersted. 2003.** Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress. Ann. Bot. 91: 179-194.

**Bray, C.M. 1995.** Biochemical processes during the osmo priming of seeds, in; Seed Development and Germination, (Eds. Kigel, Y. and Galili, G.). PP. 767-789. Marcel Dekker, New York.

**Bray, C.M., P.A. Davison, M. Ashraf, and R.M. Taylor. 1989.** Biochemical events during osmopriming of leek seed. Ann. Appl. Biol. 102: 185-193.

**Burnett, S., P., Thomas, and M. Van Iersel. 2005.** Post germination drenches with PEG-8000 reduce growth of salvia and marigolds. Hortic. Sci. 40(3): 675-679.

**Chojnowski, F.C. and D. Come. 1997.** Physiology and biochemical changes induced in sunflower seeds by osmopriming and drying, storage and aging. Seed Sci. Res. 7: 323-331.

**Dewir, Y.H., D. Chakrabarty, M.B. Ali, E.J. Hahn, and K.Y. Paek. 2006.** Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of Euphorbia millii hyperhydric shoots. Environ Exp. Bot. 58: 93-99.

**El-Tayeb, M.A. 2005.** Response of barley grain to the interactive effect of salinity and salicylic acid. J. Plant G. Regul. 42(3): 215-224.

**Farhoudi, R., S. Saeedipour, and D. mohammadreza. 2011.** The effect of NaCl seed priming on salt tolerance, antioxidant enzyme activity, and proline and carbohydrate accumulation of Muskmelon (*Cucumis melo* L.) under saline condition. Afr. J. Agric. Res. 6: 1363-1370.

**Foyer, C.H. and B. Halliwell. 1976.** The presence of glutathione and glutathione reeducates in chloroplasts a proposed role in ascorbic acid metabolism. Plantarom. 133: 21-25.

**Gaspar, T., C. Penel, F.J. Castillo, and H. Greppin. 2001.** A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. Plant Physiol. 64: 418-423.

**Ghaderi far, F. and Soltani, A. 2009.** Seed testing and control. Jahad Daneshgahi Mashhad Press, Mashhad, Iran. (In Persian)

**Goel, A. and I. Sheoran. 2003.** Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. Biol. Plantarum. 46: 429-434.

**Goel, A., A.K. Goel, and I.S. Sheoran. 2003.** Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. J. Plant Physiol. 160: 1093–110.

**Gue, S.J., Y.C. Wang, and W.S. Wang. 2012.** Effects of priming treatments on germination and biochemical characteristics of Pinus bungeana seeds. For. Stud. China. 14(3): 200-204.

**Hare, P.D. and W.A. Cress. 2007.** Metabolic implications of stress-induced accumulation in plants. Plant Growth Regul. 21:79–103.

**He, Y.L., Y.L. Liu, W.X. Cao, M.F., Huai, B.G. Xu, and B. Huang. 2005.** Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. Crop Sci. 45:988–995.

**Heath, R.L. and L. Packer. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189-198.

**Hendry, G.A.F. 1993.** Oxygen, free radical processes and seed longevity. Seed Sci. Res. 3: 141-153.

**Hossain, M.A., J.A.T. Silva, and M. Fujita. 2011.** Glyoxalase system and reactive oxygen species detoxification system in plant abiotic stress response and tolerance: an intimate relationship, in Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations, A.k. Shanker and B. Venkateswarlu, Eds., pp. 235-266. INTECH-Open Access Publisher, Rijeka, Croatia.

**Hurly, R.F., J. Van Staden, and M.T. Smith. 1991.** Improved germination in seeds of guayule (*Parthenium argentatum*) following polyethylene glycol and gibberellin acid pretreatments. Ann. Appl. Biol. 118(1): 175-184.

**Hus, C.C., C.I. Chen, J.I. Chen, and J.M. Sung. 2003.** Accelerated aging-enhanced lipid peroxidation in bitter gourd seeds and effects of priming and hot water soaking treatment. Sci Horti. 98:201-212.

**Israr, M. and S.V. Sahi. 2006.** Antioxidative responses to mercury in the cell cultures of Sesbania drummondii. Plant Physiol. Biochem. 44: 590-595.

**Jin, S., C.C.S. Chen, and A.L. Plant. 2000.** Regulation by ABA of osmotic stress-induced changes in protein synthesis in tomato roots. Plant Cell. Cel Environ. 23: 51-60.

**Kar, M. and D. Mishra. 1976.** Catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol. 57: 315-319.

**Khan, M., M. Qasim, M. Javid Iqbal, A. Naeem, and M. Abbas. 2003.** Effect of seed humidification on germinability, vigor and lrakage in Cockscomb (Celosia avgentea. Var. cristata L.). Int. J. Agric. Biol. 5: 499-503.

**Kibinza, S., J. Bazin, Ch. Bailly, J.M. Farrant, F. Corbineau, and H.El-Maarouf-Bouteau. 2011.** Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. Plant Sci. 181: 309-315.

**Koroi, S. 1989.** Gel electrophoresis tissue and spectrophotometrscho unter uchungen zomeinfiuss der temperature auf struktur der amylase and peroxidase isoenzyme. Physiol. Rev. 20: 15-23.

**Krishna, P. and B.G. Mugesh. 2010.** Functional Mimics of Glutathione Peroxidase: Bio inspired Synthetic Antioxidants. Acc. Chem. Res. 43: 1408-1419.

**Lehher, A., N. Mamadou, P. Poels, D. Come, C. Bailly, and F. Corbineau. 2008**. Change in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during aging in wheat grains. J. Cereal Sci. 47(3): 555-565.

**Lewitt, J. 2009.** Response of plant to environmental stress. Academic .New York. 2: 283-364.

**Maehly, B., and Chance, A. 1954.** Assay of catalase and peroxidase. Methods of Biochem. Analysis. 1: 357-424.

**McDonald, M.B. 1999.** Seed deterioration: physiology, repair and assessment. Seed Sci. Technol. 27: 177-237.

**Mittler, R. 2004.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Sci. 7: 405-410.

**Moosavi, A., R. Tavakkol Afshari, F. Sharifzadeh, and A. Aynehband. 2009.** Effect of seed priming on germination characteristics, polyphenoloxidase, and peroxidase activities of four Amaranth cultivars. J. Food.Agric. Environ. 7: 353-358.

**Munns, R. and R. A. James. 2003.** Screening methods for alkalinity tolerance: a case study with tetrapod wheat. Plant Soil. 253: 201-218.

**Nakano, Y. and K. Asada. 1981.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. P. Cell Physiol. 22: 867-880.

**Noctor, G. and C.H. Foyer. 1998.** Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under Control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 249-279.

**Pagter, M., C. Bragato, and H. Brix. 2005**. Tolerance and physiological responses of Phragmites australis to water deficit. Aquat. Bot. 81(4):285–299.

**Raven, E. L. 2000.** Peroxidase-catalyzed oxidation of ascorbate, Structural, spectroscopic and mechanistic correlations in asscorbate peroxidase. Su. Cell. Biochem. 35: 317-349.

**Roberts, E. H. and K. Osei-Bonsu. 1988.** Seed and seedling vigour. In World crops: Cool season food legumes. Sprin. Net. 897-910.

**Sairam, R. and A. Tyagi. 2004.** Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Sci. 86(3):406-421.

**Sheen, S.J. and J. Calvert. 1969.** Studies on polyphenol content activities and isoenzymes of polyphenol oxidase, and peroxidase during air-curing in three tobacco types. Plant Physiol. 44:199-204.

**Sivritepe, H.O. and A.M. Dourado. 1995.** The effect of priming treatments on the viability and accumulation of chromosomal damage in aged pea seeds. Ann. Bot. 75(2): 165-171.

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

**Srivasta, K. 2001.** Shoot regeneration from immature cotyledons of Cicer aretinum. Bio. Plantarum. 44:333-337.

**Sung, J.M. and T.I. Jeng. 1994.** Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. Physiol. Plantarum. 914:51-55.

**Sveinsdottir, H., F. Yan, and Y. Zhu. 2009.** Seed ageing-induced inhibition of germination and post-germination root growth is related to lower activity of plasma membrane H+- ATPase in maize roots. J. Plant Physiol. 166: 128-135.

**Szalai, G., T. Janda, and E. Paldi. 2000.** Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in ACC and MACC contents in maize during chilling. Biol. Plant, 43:637-640.

T**una, A., C. Kaya, M. Dikilitas, D. Higgas. 2008.** The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional states in maize plants. Environ. Exp. Bot. 62:1-9.

**Varier, A., A. Kariakose, and M. Dadlanl. 2010.** The subcellular basis of seed priming. Curr. Sci. 99(4): 450-456.

**Vitoria, A. P., P.J. Lea, R.A. Azevedo. 2001.** Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. Phytochemistry. 57:701-710.

**Windauer, L., A. Altuna, and R. Benech-Arnold. 2007**. Hydrotime analysis of Lesquerella fendleri seed germination responses to priming treatments. Ind. Crop Prod. 25: 70-74.

**Yarniya, M., V. Ahmadzadeh, A. Farajzadeh Memari Tabrizi and N. Noori. 2008**. Effect of priming and seed size and pigweed extract on germination and growth of soybean. In: Proceedings of the First National Conference on Seed Science and Technology of Iran. University of Agricultural Sciences and Natural Resources of Gorgan, Gorgan, Iran. (In Persian)