

تغییرات شاخص‌های جوانه‌زنی و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی بذرهای پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) طی زوال

امید سنچولی^۱، فرشید قادری فر^{۱*}، حمیدرضا صادقی پور^۲

^۱گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲۱

چکیده

بذرهای در طی انبارداری زوال یافته و پیر می‌شوند به طوری که سرعت این فرآیند به دما و رطوبت بذر در طی انبارداری بستگی دارد. این آزمایش به منظور مطالعه فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی در بذرهای پنبه رقم ارمغان در طی زوال صورت گرفت. برای ایجاد سطوح مختلف زوال از آزمون تسریع پیری استفاده شد. بذرهای پنبه به مدت ۰، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد قرار گرفتند. نتایج نشان داد با افزایش دوره زوال هدایت الکتریکی غشاء، پراکسیداسیون لیپید و پراکسید هیدروژن افزایش یافت. افزایش پراکسید هیدروژن همراه با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و مقدار اسید آسکوربیک بود که نشان‌دهنده تاثیر کاهنده دوره زوال بر فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به آنزیم پراکسیداز و اسید آسکوربیک بود. همچنین با افزایش دوره زوال درصد، سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی کاهش یافت. به طور کلی نتایج این تحقیق بیانگر این مطلب است که یکی از دلایل اصلی زوال بذر در بذرهای پنبه، تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع گونه‌های اکسیژن فعال و کاهش کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: انبارداری بذر، پیری، قدرت بذر، تنش اکسیداتیو، گونه‌های اکسیژن فعال.

مقدمه

آنزیم‌های هیدرولیز کننده، تجمع محصولات آمادوری و مایلارد و افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال^۲ (ROS) می‌باشد (Bailly et al., 2008; Hussain et al., 2003; Murthy et al., 2015). اما با این وجود، یکی از دلایل اصلی زوال بذر، تولید و تجمع بیش از حد ROS در سطح سلول می‌باشد. میتوکندری به همراه سیتوزول مسئول تولید انرژی برای متابولیسم بذر و همچنین مکان اصلی تولید ROS می‌باشد. بذرهای نیز همانند تمام موجودات تنفس انجام می‌دهند و حتی در رطوبت‌های بسیار کم نیز تنفس توسط بذر صورت می‌گیرد. از این‌رو در

زوال بذر یک فرآیند اجتناب‌ناپذیر است و در کلیه بذرهای گیاهان رخ می‌دهد به طوری که شدت آن به کیفیت اولیه بذر، دما و رطوبت بذر در طی انبارداری بستگی دارد. هر چه رطوبت بذر و دما در طی انبارداری بالا باشد، بذرهای سریع‌تر زوال می‌یابند و کاهش این عوامل، باعث افزایش دوره انبارداری بذرهای می‌گردد (Basra et al., 2003).

مکانیزم‌های مختلفی برای علل زوال توسط محققین گزارش شده است که شامل غیر فعال شدن آنزیم‌های دخیل در جوانه‌زنی، افزایش فعالیت

مواد از بذرها و تغییرات DNA می‌گردد و پیامد نهایی آن کاهش قابلیت حیات و قدرت بذر می‌باشد (Kranter et al., 2011; Mao et al., 2018; Zhang et al., 2017).

گزارشات مختلف حاکی از آن است که در طی زوال، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی دستخوش تغییر شده و منجر به تجمع زیاد ROS در بذرها می‌گردد. در مطالعه‌ای روی بذرها یولاف زراعی مشاهده شد زوال منجر به کاهش فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز گردید اما بین تیمارهای شاهد و بذرها زوال یافته از لحاظ فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، مونودی هیدرو آسکوربات ردوکتاز و دی هیدرو آسکوربات ردوکتاز اختلافی وجود نداشت (Mao et al., 2018). Zhang و همکاران (۲۰۱۷) بیان داشتند که در طی انبارداری بذرها گندم، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و دی هیدروژناز کاهش می‌یابد، که این کاهش با افت چشمگیر درصد جوانه‌زنی همراه بود. همچنین در بذرها زوال یافته نخود ایرانی نیز کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در طی زوال گزارش شده است (Shaaban et al., 2017). در مطالعه ای دیگر، Bailly و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که با افزایش دوره زوال، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون ردوکتاز در بذرها آفتابگردان کاهش می‌یابد.

پنبه یکی از گیاهان دومانظوره می‌باشد که از لیاف آن در صنعت نساجی و از بذرها آن در روغن‌کشی استفاده می‌شود. بذرها پنبه حدود ۲۰ درصد روغن دارد که بیشتر اسید چرب آن را اسید اولئیک، اسید لینولئیک، اسید پالمیتیک و اسید استئاریک تشکیل می‌دهد (Dowd et al., 2010; Sawan et al., 2006). نظر به اینکه بذرها روغنی مستعد پراکسیداسیون لیپید ناشی از تولید گونه‌های اکسیژن فعال در طی انبارداری می‌باشند، هدف این مطالعه بررسی سیستم

بذرها زنده نیز تولید ROS در هر شرایط رطوبتی و دمایی صورت می‌گیرد (Xia et al., 2015).

گزارشات حاکی از آن است که ROS باعث خسارت به بذر و در نتیجه باعث کاهش کارایی بذر می‌گردد (Lehner et al., 2008; Pukacka and Ratajczak, 2005). در مقابل جلوگیری از این خسارت، بذرها دارای یک سیستم دفاعی به نام آنتی‌اکسیدانت می‌باشند (Ghaderi-Far et al., 2014; Kibinza et al., 2011). در بذرها دو گروه سیستم آنتی‌اکسیدانت وجود دارد که اولی سیستم آنتی‌اکسیدانت غیر آنزیمی و دومی سیستم آنتی‌اکسیدانت آنزیمی است (Bailly, 2004). این دو سیستم به کمک هم از خسارت احتمالی ROS در بذرها جلوگیری می‌کنند. سیستم آنتی‌اکسیدانت غیر آنزیمی شامل اسید آسکوربیک، اسید آمینه پرولین و گلوکاتایون و آنتی‌اکسیدان محلول در فاز لیپیدی همچون توکوفرول است. این سیستم بیشتر در رطوبت‌های پایین در طی انبارداری فعال هستند و از خسارت ROS جلوگیری می‌کنند. اما در رطوبت‌های بالا، هم سیستم غیر آنزیمی و هم سیستم آنزیمی مسئولیت پالایش و سم‌زدایی ROS را به عهده دارند (McDonald, 1999). در سیستم آنزیمی، آنزیم‌هایی از قبیل کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و سوپر اکسید دیسموتاز فعالیت دارند (Asada, 1992; Bowler et al., 1992). از این رو در شرایط مطلوب انبارداری، سیستم آنتی‌اکسیدانت موجود در بذر، صدمات ROS را کاهش می‌دهد. اما اگر شرایط انبارداری نامناسب باشد و دما و رطوبت بذر در طی انبارداری بالا باشد، تولید ROS در بذرها به دلیل مختل شدن ساختار و عمل میتوکندری، افزایش می‌یابد و در این شرایط سیستم دفاعی قادر به پالایش آنها نمی‌باشد و در نتیجه منجر به خسارت به غشاء سلول‌ها و مختل شدن ساختار غشاء، افزایش نشت

آنتی‌اکسیدانت غیرآزیمی و آنزیمی بذره‌های پنبه در طی انبارداری و ارتباط آن با کاهش شاخص‌های جوانه‌زنی بود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از بذره‌های پنبه رقم ارمغان استفاده شد. بذره‌های این رقم از موسسه تحقیقات پنبه کشور تهیه گردید و کلیه آزمایش‌ها در آزمایشگاه بذر گروه زراعت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۰ اجرا شد. به منظور بررسی مکانیزم‌های زوال در بذره‌های این رقم از آزمون تسریع پیری استفاده شد. برای این کار بذره‌های پنبه در داخل ظروف پلاستیکی به ابعاد ۱۱×۱۱×۳/۵ سانتی‌متر که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود، قرار داده شد. سپس درب ظرف‌ها کاملاً بسته شده و در دمای ثابت ۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۰، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد. در طول آزمایش رطوبت نسبی داخل ظرف‌های پلاستیکی ۱۰۰ درصد بود. پس از گذشت زمان‌های مورد نظر، بذرها از ظرف‌ها خارج شده و در محیط آزمایشگاه خشک شده و آزمون‌های جوانه‌زنی، آزمون هدایت الکتریکی و آزمایشات بیوشیمیایی انجام شد.

آزمون جوانه‌زنی: برای انجام آزمون جوانه‌زنی در هر دما، ۳ تکرار ۵۰ تایی از بذر شمارش و روی دو عدد کاغذ حوله‌ای به ابعاد ۳۰×۴۵ سانتی‌متر قرار گرفته و با کاغذی دیگر روی بذرها پوشانده شد (روش ساندویچ). برای جلوگیری از تبخیر رطوبت، حوله‌های کاغذی درون پلاستیک گذاشته شد. شمارش بذرها روزانه سه بار صورت می‌گرفت. معیار جوانه‌زنی خروج ریشه‌چه، به اندازه ۲ میلی‌متر یا بیشتر بود (Tahmasebi et al., 2015).

برای محاسبه درصد، سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی از برنامه germin استفاده شد (Soltani and

Maddah, 2010). این برنامه از طریق درون‌یابی خطی درصد جوانه‌زنی تجمعی در مقابل زمان، صدک‌های مختلف جوانه‌زنی را محاسبه می‌کند. پس از محاسبه صدک‌های مختلف جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی از معکوس زمان تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی (1/D50) محاسبه شد. یکنواختی جوانه‌زنی نیز از تفاضل زمان تا ۹۰ درصد جوانه‌زنی (D90) از زمان تا ۱۰ درصد جوانه‌زنی (D10) حاصل شد (GU=D90-D10).

آزمون رشد گیاهچه و قدرت گیاهچه: برای انجام آزمون رشد گیاهچه ۳ تکرار ۱۰ تایی از بذر شمارش و بر روی دو عدد کاغذ حوله‌ای به ابعاد ۳۰×۴۵ سانتی‌متر قرار گرفته و با کاغذی دیگر روی بذرها پوشانده شد (روش ساندویچ). برای جلوگیری از کاهش رطوبت، کاغذهای حوله‌ای درون پلاستیک گذاشته و سپس در داخل انکوباتور و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز قرار گرفتند. در روز هفتم، طول و وزن خشک گیاهچه‌های طبیعی اندازه‌گیری شد. شاخص قدرت گیاهچه با کمک فرمول زیر محاسبه شد (Verma et al., 2003):

فرمول (۱)

درصد جوانه‌زنی × وزن خشک گیاهچه

(گرم) = شاخص قدرت گیاهچه

آزمون هدایت الکتریکی: برای انجام آزمون هدایت الکتریکی از هر رقم تعداد ۵۰ بذر در ۳ تکرار پس از توزین در بشرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری قرار گرفتند و ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر (به منظور هم‌دمایی آب مقطر ۲۴ ساعت قبل در انکوباتور ۲۰ درجه قرار داده شده بود) به آن‌ها اضافه شد و بشرها با فویل بسته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از این مدت هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری و نتایج به صورت میکروزیمنس بر

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن به روش Velicova و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. برای این کار، ۰/۲ گرم بذر پوست کنده پنبه با ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد در هاون چینی سرد ساییده و هموژنیزه گردید و عصاره حاصل به میکروتیوپ‌ها منتقل شد. میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از عصاره حاصل برای اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن استفاده شد.

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و محتوای اسید آسکوربیک: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و میزان اسید آسکوربیک در بذرهای پنبه در تیمارهای مختلف زوال صورت گرفت. برای استخراج آنزیم کاتالاز از روش Mishra و Kar (۱۹۷۶) استفاده شد. برای استخراج آنزیم کاتالاز یک گرم بذر پوست کنده پنبه با ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون چینی درون ظرف یخ ساییده و عصاره حاصل در میکروتیوپ ریخته شد. میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شده و فاز میانی در زیر لایه لیپیدی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Luck (۱۹۶۲) استفاده شد. سپس تغییرات جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای مدت زمان ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس آب اکسیژنه تجزیه شده در هر دقیقه به ازای هر گرم وزن تر بیان شد.

استخراج آنزیم پراکسیداز به روش Murthy و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد. برای استخراج آنزیم پراکسیداز یک گرم بذر پوست کنده پنبه با ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون چینی درون ظرف یخ ساییده و هموژنیزه و عصاره حاصل پس از انتقال به

سانتی‌متر بر گرم محاسبه شد (Hampton and TeKrony, 1995).

اندازه‌گیری لیپید هیدروپراکسیدها: به‌منظور برآورد میزان لیپید هیدروپراکسیدها، از روش استفاده شده توسط Griffiths و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. ۰/۲ گرم بذر با ۱ میلی‌لیتر اسید استیک ۰/۱۵ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۵ میلی‌لیتر متانول به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ عصاره‌گیری شد. هاون و دسته هاون پس از انتقال عصاره به دست آمده به لوله آزمایش، با ۲/۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو شد. این محلول نیز به عصاره قبلی اضافه گردید. عصاره به دست آمده با سرعت پائین و حدود ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی را دور ریخته و از فاز پائینی که در تاریکی و داخل یخ نگه داشته شده بود، برای اندازه‌گیری میزان لیپید هیدروپراکسید استفاده شد. در دو لوله آزمایش میزان ۱۰۰ میکرولیتر، یا مقادیر بیشتر (معمولاً یک میلی‌لیتر بسته به نمونه گیاهی) از فاز پائینی را به کمک گاز نیتروژن تبخیر کرده و بقایای به جا مانده در لوله شماره ۱ با ۱۰۰ میکرولیتر متانول و در لوله شماره ۲ با ۵۰ میکرولیتر متانول و ۵۰ میکرولیتر محلول تری‌فنیل فسفین (TPP) ۲۵ میلی‌مولار مجدداً حل شد. هر دو لوله به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگه‌داری شد و پس از این مدت به هر دو لوله مقدار ۹۰۰ میکرولیتر معرف فاکس اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه که لوله‌ها در تاریکی و دمای اتاق قرار گرفتند میزان جذب نور هر کدام در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر مدل (UV-1800 240V) قرائت شد. محلول بلانک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم است که پس از تبخیر و اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر متانول تیمارهای بعدی روی آن انجام شد. نتایج به صورت میکرومول بر گرم وزن تر بذر گزارش شد.

لوله‌های حاوی نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شد و سپس جذب نور در طول موج ۷۳۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد (Soltani, 2007).

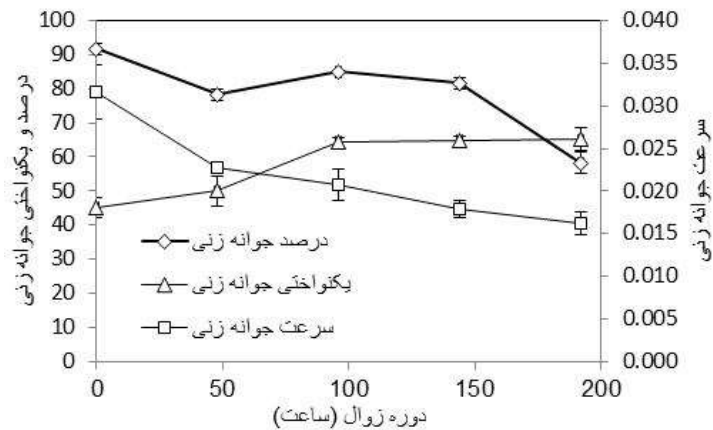
نتایج

در شکل ۱، واکنش مولفه‌های جوانه‌زنی بذرهای پنبه رقم ارمغان در پاسخ به دوره‌های زوال ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش دوره زوال درصد و سرعت جوانه‌زنی کاهش یافت که درصد کاهش در سرعت جوانه‌زنی بذرهای بیشتر از کاهش درصد جوانه‌زنی بود. به طوری که این کاهش برای درصد جوانه‌زنی در دوره‌های ۴۸، ۹۶، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت زوال نسبت به شاهد به ترتیب ۱۵، ۷، ۱۱ و ۳۶ درصد و برای سرعت جوانه‌زنی به ترتیب ۲۸، ۳۵، ۴۴ و ۴۹ درصد بود. یکنواختی جوانه‌زنی نیز یکی از مولفه‌های جوانه‌زنی می‌باشد و هر چه مقدار عددی آن کوچکتر باشد، نشاندهنده جوانه‌زنی یکنواخت محموله بذری مورد نظر می‌باشد. با افزایش شدت زوال، یکنواختی جوانه‌زنی کاهش یافت که این کاهش در تیمارهای ۹۶، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت مشهودتر بود و درصد کاهش یکنواختی در این تیمارها نسبت به شاهد در حدود ۳۰ درصد بود (شکل ۱).

میکروتیوب، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، فاز میانی در زیر لایه لیپیدی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش Resenda و همکاران (۲۰۰۲) با اندکی تغییرات انجام شد. تغییرات جذب نور در اثر تولید پورپوروگالین از پیروگالول در طول موج ۴۲۰ نانومتر برای مدت زمان ۲ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با روش ارائه شده توسط Murthy و همکاران (۲۰۰۲) صورت گرفت. برای این کار مقدار ۰/۲ گرم بذر با ۲ میلی‌متر بافر استخراج در هاون چینی سرد ساییده و هموژنیزه و عصاره حاصل پس از انتقال به میکروتیوب، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و عصاره حاصل برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز استفاده شد. تغییرات جذب نور ر طول موج ۲۹۰ نانومتر برای مدت زمان ۳ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

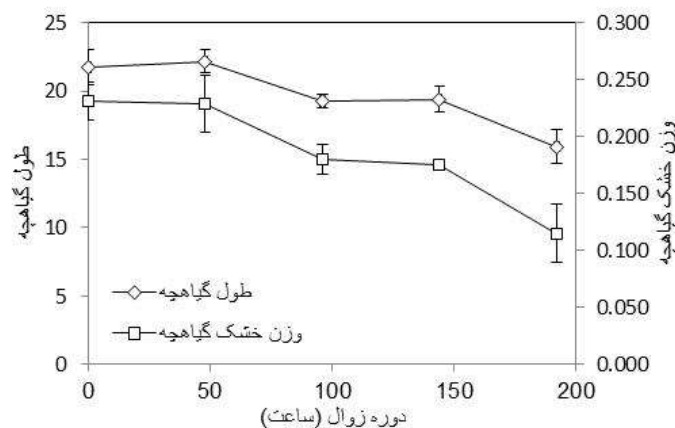
اندازه‌گیری میزان اسید آسکوربیک به روش ارائه شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۹) همراه با تغییراتی صورت گرفت. برای این کار ۰/۲ گرم بذر با ۲ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۰/۵ میلی‌مولار در هاون سرد ساییده و در لوله‌های اپندروف ریخته و در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و از فاز بالایی برای تجزیه مقدار اسید آسکوربیک استفاده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول حاوی عصاره درون لوله آزمایش ریخته و به آن مقادیر ۱ میلی‌لیتر کلرید آهن و ۱ میلی‌لیتر سیانید آهن پتاسیم اضافه شد. سپس حجم آن را با آب مقطر به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد و



شکل ۱: اثرات دوره زوال بر درصد، یکتواختی (ساعت) و سرعت جوانه زنی بذرهای پنبه. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار هر تیمار می‌باشد.

گیاهیچه بود. درصد کاهش طول گیاهیچه و وزن خشک گیاهیچه در تیمار زوال شدید (۱۹۲ ساعت زوال) نسبت به شاهد به ترتیب ۲۷ و ۵۰ درصد بود.

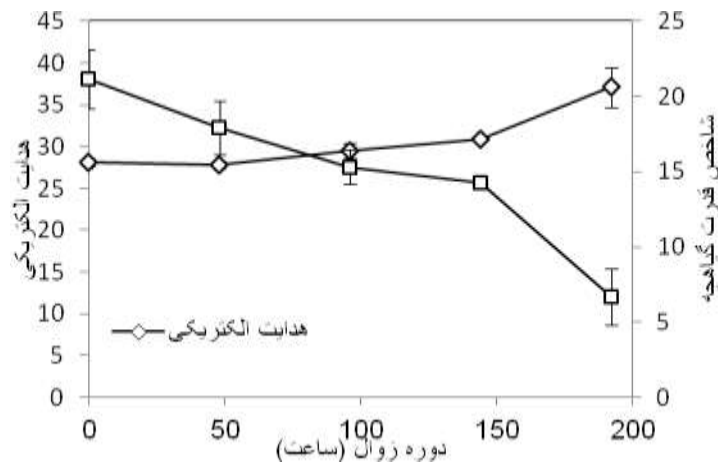
طول و وزن خشک گیاهیچه نیز تحت تاثیر دوره زوال قرار گرفت (شکل ۲). با افزایش دوره زوال هم طول و هم وزن خشک گیاهیچه کاهش یافت که درصد کاهش در وزن خشک گیاهیچه بیشتر از طول



شکل ۲: اثرات دوره زوال بر طول (سانتی متر) و وزن خشک (گرم) گیاهیچه بذرهای پنبه. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار هر تیمار می‌باشد.

زوال قرار گرفت. با افزایش دوره زوال هدایت الکتریکی بذرهای که نشان‌دهنده آسیب به غشاءها است، افزایش یافت (شکل ۳). مقدار عددی این شاخص در تیمار ۰، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت زوال به ترتیب ۲۸/۰، ۲۷/۸، ۲۹/۵، ۳۰/۹ و ۳۷/۱ میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم بذر بود.

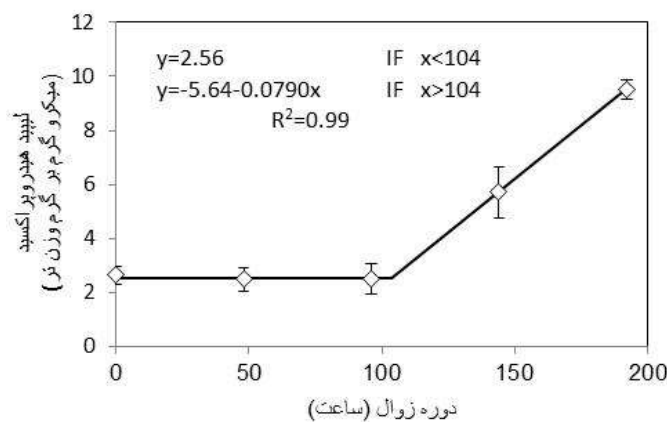
شاخص قدرت گیاهیچه و آزمون هدایت الکتریکی از پارامترهای مهم قدرت بذر می‌باشد. با افزایش دوره زوال، شاخص قدرت گیاهیچه کاهش یافت (شکل ۳). این کاهش در دوره‌های ۴۸، ۹۶، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت زوال نسبت به شاهد به ترتیب ۱۵، ۲۸، ۳۲ و ۶۸ درصد بود. هدایت الکتریکی نیز تحت تاثیر



شکل ۳: اثرات دوره زوال بر هدایت الکتریکی (میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم) و شاخص قدرت گیاهیچه بذره‌های پنبه. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار هر تیمار می باشد.

نگرفت اما با افزایش بیشتر دوره زوال، مقدار لیپید هیدروپراکسید در بذره‌های پنبه به صورت خطی افزایش یافت.

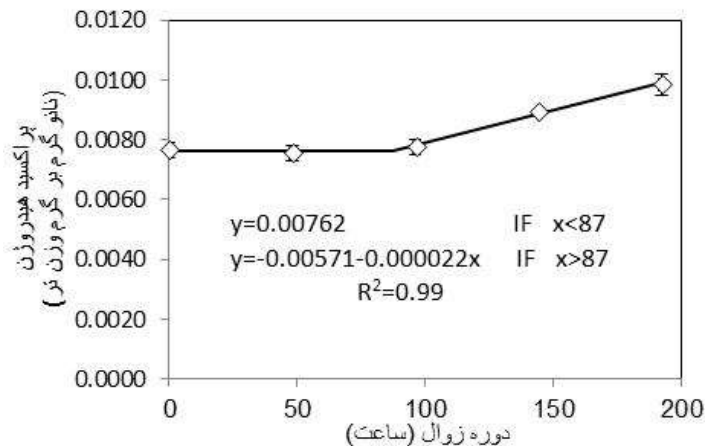
لیپید هیدروپراکسیدها که شاخصی از پراکسیداسیون لیپید می‌باشد نیز تحت تاثیر دوره زوال قرار گرفت (شکل ۴). با افزایش دوره زوال از صفر تا ۱۰۴ ساعت زوال، این پارامتر تحت تاثیر زوال قرار



شکل ۴: اثرات دوره زوال بر مقدار لیپید هیدروپراکسید بذره‌های پنبه. به داده‌های مقدار لیپید هیدروپراکسید در مقابل دوره زوال مدل دو تکه‌ای برازش داده شد. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار هر تیمار می باشد.

پراکسید هیدروژن در بذرها ثابت بود و با افزایش دوره زوال از ۸۷ به ۱۹۲ ساعت، تولید آن به صورت خطی افزایش یافت.

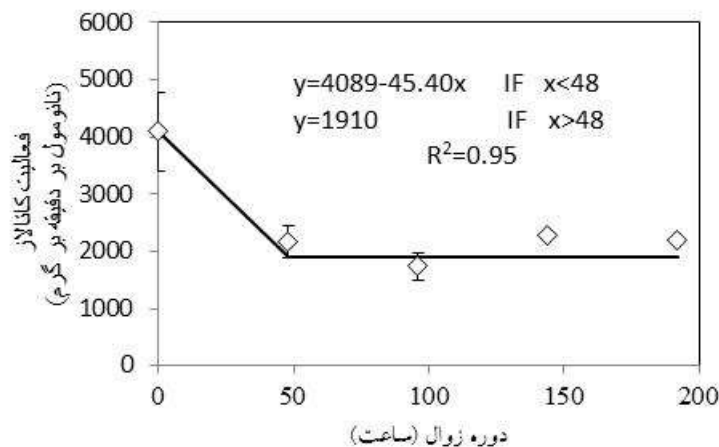
همانند لیپید هیدروپراکسیدها، پراکسید هیدروژن نیز در طی زوال دستخوش تغییر شد که الگوی تغییر پراکسید هیدروژن مشابه لیپید هیدروپراکسیدها بود (شکل ۵). با افزایش دوره زوال تا ۸۷ ساعت، تولید



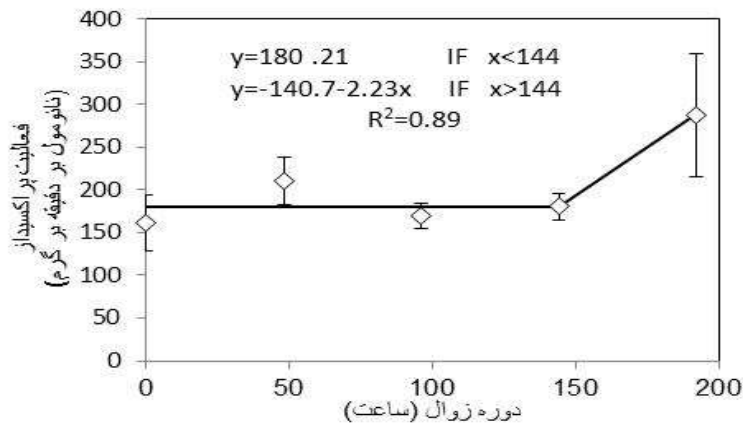
شکل ۵: اثرات دوره زوال بر مقدار پراکسید هیدروژن بذرهای پنبه. به داده‌های مقدار پراکسید هیدروژن در مقابل دوره زوال مدل دو تکه ای برازش داده شد. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار هر تیمار می باشد.

پراکسیداز برعکس بوده و فعالیت این آنزیم یک روند افزایشی داشت. به طوری که تا ۱۴۴ ساعت زوال، فعالیت این آنزیم ثابت بود و با افزایش بیشتر دوره زوال (۱۹۲ ساعت)، فعالیت این آنزیم به شدت افزایش یافت. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز در تیمارهای مختلف قابل اندازه‌گیری نبود که بیانگر فعالیت بسیار پایین این آنزیم در بذرهای خشک بود.

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در بذرهای پنبه در دوره‌های مختلف زوال اندازه‌گیری شد (شکل های ۶ و ۷). فعالیت آنزیم کاتالاز در پاسخ به دوره‌های زوال کاهش بود (شکل ۶). با افزایش دوره زوال تا ۴۸ ساعت، فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت و با افزایش بیشتر دوره زوال، تغییری در فعالیت این آنزیم مشاهده نشد و از یک الگوی ثابت تبعیت کرد. در حالی این الگو در آنزیم



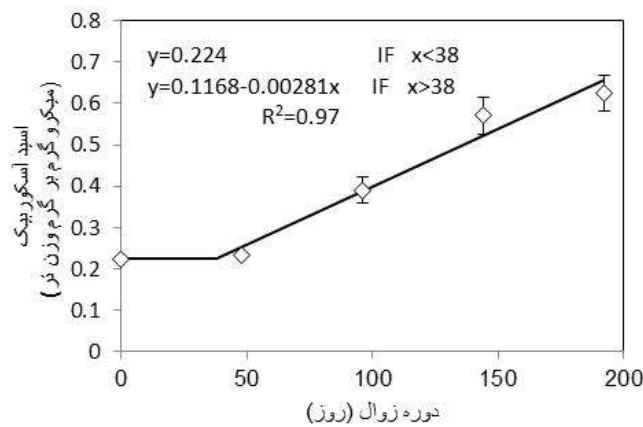
شکل ۶: اثرات دوره زوال بر فعالیت آنزیم کاتالاز بذرهای پنبه. به داده‌های فعالیت آنزیم در مقابل دوره زوال مدل دو تکه‌ای برازش داده شد. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار هر تیمار می باشد.



شکل ۷: اثرات دوره زوال بر فعالیت آنزیم پراکسیداز بذرهای پنبه. به داده‌های فعالیت آنزیم پراکسیداز (نانومول بر دقیقه بر گرم) در مقابل دوره زوال مدل دو تکه‌ای برازش داده شد. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار هر تیمار می‌باشد.

ساعت، مقدار اسید آسکوربیک به صورت خطی افزایش یافت. به طوری که مقدار این ترکیب در بذرهای شاهد و ۱۹۲ ساعت زوال به ترتیب ۲/۶۴۱ و ۹/۵۱۵ میکرو گرم بر گرم وزن تر بود.

مقدار اسید آسکوربیک در بذرهای پنبه در طی زوال دستخوش تغییر شد (شکل ۸). با افزایش دوره زوال تا ۳۸ ساعت، مقدار این ترکیب در بذرهای ثابت بود و با افزایش تدریجی دوره زوال از ۳۸ به ۱۹۲



شکل ۸: اثرات دوره زوال بر مقدار اسید آسکوربیک بذرهای پنبه. به داده‌های مقدار اسید آسکوربیک در مقابل دوره زوال مدل دو تکه‌ای برازش داده شد. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار هر تیمار می‌باشد.

پنبه از قبیل درصد، سرعت و یکنواختی با افزایش دوره زوال کاهش یافت (شکل ۱). کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی در بذرهای گیاهان مختلف نیز گزارش شده است (Bao et al., 2011; Corbineau et al., 2002). درصد کاهش مولفه‌های جوانه‌زنی با کاهش طول و وزن خشک گیاهچه نیز همراه بود

پیری بذر فرآیندی اجتناب‌ناپذیر است و در بذرهای همه گونه‌های گیاهی و در هر شرایط نگهداری رخ می‌دهد و سرعت آن بسته به محوله بذری و شرایط انبارداری متفاوت می‌باشد. در این مطالعه مشاهده شد که مولفه‌های جوانه‌زنی بذرهای

بحث

(شکل ۲). علت کاهش رشد گیاهچه‌های ناشی از بذره‌های زوال یافته را می‌توان در وهله اول به کاهش انتقال ذخایر از لپه‌ها به محور جنینی و در وهله دوم به کاهش کارایی تبدیل ذخایر به تولید گیاهچه نسبت داد (Soltani et al., 2006) و Shaaban. بیان داشتند که زوال منجر به کاهش انتقال (۲۰۱۶) ذخایر و کارایی استفاده از ذخایر در بذره‌های نخود می‌گردد. این کاهش انتقال ذخایر و کارایی استفاده از ذخایر را می‌توان به کاهش فعالیت‌های آنزیم‌های دخیل در شکستن ذخایر و جوانه‌زنی نسبت داد.

شاخص قدرت گیاهچه نیز تحت تاثیر زوال قرار گرفت (شکل ۳). در واقع این شاخص از حاصل ضرب درصد جوانه زنی در وزن خشک گیاهچه‌های تولید شده در تیمارهای مختلف زوال به دست می‌آید. با افزایش دوره زوال، این شاخص کاهش یافت، که درصد کاهش این شاخص در مقایسه با مولفه‌های جوانه‌زنی در تیمارهای زوال شدید بیشتر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در بذره‌های پنبه، قدرت بذر بیشتر از قابلیت حیات بذر تحت تاثیر زوال قرار می‌گیرند و قدرت بذر اولین مولفه‌ای است که تحت تاثیر زوال قرار می‌گیرد.

هدایت الکتریکی بذره‌های زوال یافته نیز دستخوش تغییر شد (شکل ۳). همگام با کاهش درصد جوانه‌زنی و قدرت بذر، هدایت الکتریکی بذرها افزایش یافت. افزایش هدایت الکتریکی نشان‌دهنده نشت بیشتر مواد از بذرها و کاهش قدرت بذر می‌باشد. افزایش هدایت الکتریکی در بذره‌های مختلف طی انبارداری گزارش شده است (Tahmasebi et al., 2015). در واقع افزایش هدایت الکتریکی نشان‌دهنده خسارت به غشاء‌ها در اثر تولید و تجمع ROS و پراکسیداسیون لیپید می‌باشد (Pukacka and Ratajczak, 2005). برای روشن شدن این موضوع در این تحقیق لیپید هیدروپراکسیدها که یکی از

محصولات پراکسیداسیون لیپید می‌باشد، اندازه‌گیری شد. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در طی زوال بذره‌های پنبه مقدار این ترکیب افزایش یافت به طوری که این افزایش با افزایش هدایت الکتریکی بذرها همراه بود. اکثر محققان برای بررسی خسارت به غشاء در اثر پراکسیداسیون لیپید، مالون دی آلدئید^۱ را اندازه‌گیری می‌کنند (Sung and Jeng, 1994). اما در برخی گزارشات حاکی از آن است که با اینکه بذرها در طی زوال آسیب می‌بینند و هدایت الکتریکی آنها افزایش می‌یابد، اما مقدار مالون دی آلدئید افزایش نمی‌یابد و از این رو پراکسیداسیون لیپید را در طی زوال گزارش نمی‌کنند (De Paula et al., 1996; Mira et al., 2011). عدم ارتباط زوال با پراکسیداسیون لیپید را می‌توان با نوع ترکیبات اسیدهای چرب بذرها ارتباط داد. در واقع، مالون دی آلدئید تنها از اسیدهای چرب با ۳ یا تعداد بیشتری پیوند دوگانه شکل می‌گیرد در صورتی که بذره‌های پنبه اغلب دارای سطوح بالایی از اسیدهای چرب با ۲ پیوند دوگانه یا کمتر می‌باشند (Dowd et al., 2010; Griffiths et al., 2000; Sawan et al., 2006). بنابراین در این مطالعه برای درک بهتر مکانیزم زوال در بذره‌های پنبه، لیپید هیدروپراکسیدها اندازه‌گیری شد.

یکی از دلایل اصلی زوال بذرها، تولید و تجمع ROS می‌باشد. پراکسیداسیون لیپید در نتیجه افزایش ROS رخ می‌دهد. علت این امر را می‌توان به واکنش ROS ها با مولکول‌های از قبیل پروتئین‌ها، لیپیدها و نوکلئیک اسید ارتباط داد، که منجر به آسیب به غشاء شده و باعث افزایش هدایت الکتریکی بذره‌های زوال یافته می‌گردد (McDonald, 1999). یکی از انواع ROS، پراکسید هیدروژن می‌باشد. زنجیره تنفس میتوکندریایی یکی از مهم‌ترین منابع تولید ROS است بطوری که نشت الکترون از این زنجیره سبب تولید

1. Malondialdehyde

رادیکال سوپراکسید شده و پس از آن پراکسید هیدروژن از متابولیسم رادیکال سوپراکسید تولید می‌شود (Moller, 2001). همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود زوال منجر به افزایش پراکسید هیدروژن در بذره‌های پنبه شد که این افزایش با افزایش و تجمع لیپید هیدروپراکسیدها و افزایش هدایت الکتریکی بذرها همراه بود. در واقع می‌توان گفت در طی زوال بذره‌های پنبه ROS با تجمع بیش از حد در سلول‌ها منجر به خسارت به غشاءها شده و کارایی سلول را کاهش می‌دهند. این نتایج با نتایج محققان دیگر همخوانی داشت. Kibinza و همکاران (۲۰۱۱) و Xia و همکاران (۲۰۱۵) بیان داشتند که در طی انبارداری نامناسب کیفیت بذره‌های گیاهان آفتابگردان و یولاف کاهش می‌یابد، که این کاهش با تجمع گونه‌های اکسیژن فعال همراه بود.

افزایش و تجمع گونه‌های اکسیژن فعال (در این تحقیق پراکسید هیدروژن) و افزایش هدایت الکتریکی و لیپید هیدروپراکسیدها همراه با کاهش قابلیت حیات و قدرت بذر، نشان‌دهنده کاهش کارایی سیستم آنتی‌اکسیدان در بذره‌های پنبه می‌باشد. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش دوره زوال، کاهش یافت. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در طی زوال توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است (Kong et al., 2015; Lehner et al., 2008). همانند آنزیم کاتالاز، فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز تحت تاثیر دوره زوال قرار گرفت (شکل ۷). فعالیت این آنزیم با افزایش دوره زوال تا ۱۴۴ ساعت ثابت بود اما با افزایش بیشتر دوره زوال تا ۱۹۲ ساعت، فعالیت این آنزیم به صورت خطی افزایش یافت. آنزیم پراکسیداز یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهم در گیاهان می‌باشد که می‌تواند با اکسید کردن آسکورات، پراکسید هیدروژن را غیرسمی و آن را به آب تبدیل کنند. این آنزیم توانایی

واکنش مستقیم با رادیکال سوپراکسید و سایر ROS را نیز دارند که می‌تواند شدت آسیب را کاهش دهد (Foyer and Noctor, 2011). Verma et al. (2003) گزارش کردند که با افزایش دوره زوال فعالیت آنزیم پراکسیداز در بذره‌های کلزا کاهش می‌یابد. پراکسیداز آنزیمی است که در شرایط تنش‌زا (همچون زوال بذر) می‌تواند القاء شود و چه بسا افزایش فعالیت پراکسیداز در اواخر دوره زوال بذره‌های پنبه پاسخی به تنش‌های اکسایشی و یا پاتوژنی موجود در بذر باشد (Golubenko et al., 2007). در این مطالعه فعالیت این آنزیم قابل اندازه‌گیری نبود. این امر بیانگر این مطلب است که در بذره‌های خشک پنبه فعالیت این آنزیم بسیار پایین است و شاید بتوان گفت با توجه به محتوای رطوبتی بذر احتمال انجام واکنش این آنزیم بسیار اندک باشد (Murthy and Sun, 2000).

در این مطالعه از میان آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی، اسید آسکوربیک اندازه‌گیری شد زیرا این ترکیب مستقیماً در مسیر Asada-Halliwell شرکت دارد و نقش مهمی در حذف ROS بازی می‌کند (Pukacka and Ratajczak, 2005). با افزایش دوره زوال مقدار اسید آسکوربیک در بذره‌های پنبه افزایش یافت (شکل ۸). توانایی اسید آسکوربیک برای اعطای الکترون در محدوده وسیعی از واکنش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی، آن را به مهم‌ترین ترکیب سم‌زدای ROS در فاز آبی تبدیل کرده است و می‌تواند به طور مستقیم $O_2^{\bullet-}$ ، HO^{\bullet} و 1O_2 را پالایش کند و H_2O_2 را از طریق واکنش با آسکورات پراکسیداز به H_2O تبدیل کند (Foyer and Noctor, 2011).

با افزایش دوره زوال در بذره‌های پنبه، فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش و فعالیت آنزیم پراکسیداز به همراه اسید آسکوربیک افزایش یافت و فعالیت آنزیم آسکورات پراکسیداز نیز قابل اندازه‌گیری نبود.

مربوط به انباشته شدن فرم اکسیدی آن باشد که در پالایش و سم زدایی ROS نقش کمی دارد. در بخش سوم می توان به این نکته اشاره کرد که با این که اسید آسکوربیک دارای نقش مثبت به صورت مکانیزم دفاعی آنتی اکسیدانت دارد اما ممکن است دارای اثرات منفی نیز باشد. نظر به اینکه در این تحقیق بذرها خشک هستند در این شرایط ممکن است اسید آسکوربیک با یون های آهن واکنش نشان دهد (واکنش فتون^۱) و باعث آزاد شدن یون هیدروکسیل گردد (De Tulio and Arrigoni, 2003). با توجه به این سه مورد می توان گفت که کارایی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت بذره‌های پنبه در طی زوال کاهش یافته است که این کاهش با کاهش کیفیت بذر همراه بود.

نتیجه گیری نهایی

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که زوال منجر به افزایش هدایت الکتریکی و پراکسیداسیون لیپید در بذره‌های پنبه شد. افزایش هدایت الکتریکی و پراکسیداسیون لیپید با تجمع ROS همراه بود. تجمع ROS نشاندهنده عدم کارایی سیستم آنتی اکسیدانتی در طی زوال می باشد. به عبارت دیگر به علت مختل شدن سیستم آنتی اکسیدانتی در بذره‌های پنبه، این سیستم قادر به پالایش و سم زدایی ROS نبوده و در نتیجه منجر به کاهش کیفیت بذره‌های پنبه در طی زوال می گردد. از این رو می توان مکانیزم اصلی زوال در بذره‌های پنبه را افزایش تولید ROS و اختلال در سیستم آنتی اکسیدانتی بذر نسبت داد. برای روشن شدن بهتر این مکانیزم، لازم است که بذره‌های زوال یافته پنبه، تحت تیمار پرایمینگ (به عنوان یکی از تیمارهای افزایش دهنده سیستم آنتی اکسیدانتی) قرار گیرند و سپس کیفیت بذر به همراه میزان ROS و فعالیت سیستم آنتی اکسیدانت آنزیمی و غیر آنزیمی اندازه گیری شود.

کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان بر اثر زوال بذر به کاهش سنتز پروتئین ها و همچنین نامحلول و غیرفعال شدن آنزیم ها نسبت داده شده است (Basra et al., 2003; Priestley, 1986). سوالی که پیش می آید این است که چرا با وجود بالا بودن فعالیت آنزیم پراکسیداز و اسید آسکوربیک در شدت زوال های بالا، پیری بذره‌های پنبه رخ می دهد. جواب این سوال را می توان در سه بخش پاسخ داد. در بخش اول، کاتالاز یکی از آنتی اکسیدان های آنزیمی مؤثر در سیستم دفاعی در مقابله با تنش های غیرزنده است. این آنزیم می تواند به طور مستقیم پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل کند و سمیت آن را خنثی نماید (Sarvajeet and Narendra, 2010). این آنزیم یکی از سریع ترین آنتی اکسیدان های شناخته شده است که می تواند در کمتر از یک دقیقه شش میلیون مولکول پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل نماید (Azpilicueta et al., 2007). Kibinza و همکاران (۲۰۱۱) بیان داشتند که آنزیم کاتالاز آنزیمی کلیدی برای ترمیم خسارت وارده در اثر فعالیت گونه های اکسیژن فعال است و کاهش فعالیت این آنزیم به واسطه عدم ترمیم خسارت وارد به بذر، باعث کاهش قابلیت حیات بذر می گردد. در بخش دوم، با آن که میزان اسید آسکوربیک افزایش یافت اما این ترکیب به کمک آنزیم آسکوربات پراکسیداز موجب تجزیه و احیاء پراکسید هیدروژن به آب می گردد (Foyer and Noctor, 2011) و با حذف پراکسید هیدروژن علاوه بر کاهش خسارت ناشی از آن مانع تشکیل رادیکال خطرناک هیدروکسیل از پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید در طی واکنش هابر- وایس می گردد (McDonald, 1999; Sung and Jeng, 1994). نظر به اینکه در بذره‌های زوال یافته و خشک پنبه فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز پایین می باشد و در نتیجه ممکن است کارایی اسید آسکوربیک کاهش یابد و افزایش مقدار آن در بذره‌های زوال یافته احتمالاً

References

- Asada, K. (1992).** Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. 85: 235-241.
- Azpilicueta, C.E., Benavides, M.P., Tomaro, M.L. and Gallego, S.M. (2007).** Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45: 589-595.
- Bailly, C. (2004).** Active oxygen species and anti-oxidants in seed biology. *Seed Science Research*. 14: 93-107.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. and Come, D. (1996).** Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*. 97: 104-110.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H. and Corbineau, F. (2008).** From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*. 331: 806-814.
- Bao, J., Sha, S. and Zhang, S. (2011).** Changes in germinability, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activities in pear stock (*Pyrus betulaefolia* Bge.) seeds during room- and low temperature storage. *Acta Physiological Plantarum*. 33: 2035-2040.
- Basra, S.M.A., Ahmad, N., Khan, M.M., Iqbal, N. and Cheema, M.A. (2003).** Assessment of cottonseed deterioration during accelerated ageing. *Seed Science and Technology*. 31: 531-540.
- Bowler, C., Van Montagu, M. and Inze, D. (1992).** Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43: 83-116.
- Corbineau, F., Gay-Mathieu, C., Vinel, D. and Come, D. (2002).** Decrease in sunflower seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. *Physiologia Plantarum*. 116: 489-496.
- De Paula, M., Perez-Otaola, M., Darder, M., Torres, M., Frutos, G. and Martinez-Honduvilla, C.J. (1996).** Function of the ascorbate-glutathione cycle in aged sunflower seeds. *Physiologia Plantarum*. 96: 543-550.
- De Tulio, M.C. and Arrigoni, O. (2003).** The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Science Research*. 13: 249-260.
- Dowd, M.K., Boykin, D.L., Meredith, W.R., Campbell, B.T., Bourland, F.M., Gannaway, J.R., Glass, K.M. and Zhang, J. (2010).** Fatty acid profiles of cottonseed genotypes from the national cotton variety trials. *The Journal of Cotton Science*. 14: 64-73.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2011).** Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*. 155: 12-18.
- Ghaderifar, F., Soltani, A. and Sadeghipour, H.H. (2014).** Changes in soluble carbohydrates and the activity of enzymes for purifying active oxygen species in pumpkin seeds during storage at different temperatures and seed moisture content. *Crop Production Publication*. 7 (1): 157-179. (In persian with english abstract)
- Golubenko, Z., Akhunov, A., Khashimova, N., Bresneva, Y., Mustakimova, E., Ibragimov, F., Abdurashidova, N. and Stipanovic, R. (2007).** Induction of peroxidase as a disease resistance response in resistant (*Hibiscus trionum*) and susceptible (*Althea armeniaca*) species in the family Malvaceae. *Phytopathology*. 35: 401-413.
- Griffiths, G., Leverentz, M., Silkowski, H., Gill, N. and Sanchez-serrano, J.J. (2000).** Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *Journal of Experimental Botany*. 55: 555-558.
- Hampton, J.G. and TeKrony, D.M. (1995).** Handbook of Vigor Test Methods. The International Seed Testing Association, Zurich.
- Hussain, S., Zheng, M., Khan, F., Khaliq, A., Fahad, S., Peng, S., Huang, J., Cui, K. and Nie, L. (2015).** Benefits of rice seed priming are offset permanently by

- prolonged storage and the storage conditions. *Science Reports*. 5: 1-12.
- Kar, M. and Mishra, D. (1976).** Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*. 57: 315-319.
- Kibinza, S., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J.M. and Corbineau, F. (2011).** Catalase is an enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science*. 181: 309-315.
- Kong, L., Huo, H. and Moa, P. (2015).** Antioxidant response and related gene expression in aged oat seed. *Frontiers in Plant Science*. 6: 1-9.
- Kranner, I., Chen, H., Pritchard, H.W., Pearce, S.R. and Birtic, S. (2011).** Inter-nucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. *Plant Growth Regulation*. 63: 63-72.
- Lehner, A., Mamadou, N., Poels, P., Come, D., Bailly, C. and Corbineau, F. (2008).** Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during aging in wheat grains. *Journal Cereal Science*. 47: 555-565.
- Luck, H. (1962).** Methods of enzymatic analysis. E.D. By H.U. Bergmeyer (1st edition), Verlag Chemie Weinheim, pp: 885-894.
- Mao, C., Zhu, Y., Cheng, H., Yan, H., Zhao, L., Tang, J., Ma, X. and Mao, P. (2018).** Nitric oxide regulates seedling growth and mitochondrial responses in aged oat seeds. *International Journal of Molecular Sciences*. 19: 1-18.
- McDonald, M.B. (1999).** Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*. 27: 177-237.
- Mira, S., Estrelles, E., Gonzalez-Benito, M.E. and Corbineau, F. (2011).** Biochemical changes induced in seeds of *Brassicaceae* wild species during aging. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33: 1803-1809.
- Moller, I.M. (2001).** Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 561-591.
- Murthy U.M.N. and W.Q. Sun. (2000).** Protein modification by the Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1221-1228.
- Murthy U.M.N., Kumar, P.P. and Sun, W.Q. (2003).** Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: Lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *Journal of Experimental Botany*. 54: 1057-1067.
- Murthy U.M.N., Liang, Y., Kumar, P.P. and Sun, W.Q. (2002).** Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiata*. *Physiologia Plantarum*. 115: 213-220.
- Noctor, G. and Foyer, C. (1998).** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 249-279.
- Priestley, D.A. (1986).** Seed ageing. Ithaca, New York: Cornell University press. Pp:304.
- Pukacka, S. and Ratajczak, E. (2005).** Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. *Journal of Plant Physiology*. 162: 873-885.
- Resenda, M.L.V., Nojosa, G.B.A., Cavalcanti, L.S., Aguilar, M.A.G., Silva, L.H.C.P., Perez, J.O., Andrade, G.C.G., Carvalho, G.A. and Castro, R.M. (2002).** Induction of resistance in cocoa against *crinipellis pernicioso* and *verticillium dahliae* by acibenzolar-s-methyl (ASM). *Plant Pathology*. 51: 621-628.
- Sarvajeet, S.G. and Narendra, T. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in a biotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 3: 1-22.
- Sawan, Z.M., Hafez, S.A., Basyony, A.E. and Alkassas, A.R. (2006).** Cotton seed, protein, oil yields and oil properties as affected by nitrogen

- fertilization and foliar application of potassium and a plant growth retardant. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2: 56-65.
- Shaaban, M., Ghaderi-Far, F., Sadeghipour, H.R. and Yamchi, A. (2016).** Effect of Accelerated Ageing and Natural Storage on Germination, Seedling Growth and Reserves Depletion of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seeds. *Iranian Journal of Seed Research*. 3(2): 89-103. (In persian with english abstract)
- Shaaban, M., Ghaderi-Far, F., Sadeghipour, H. and Yamchi, A. (2017).** The effect of natural storage and accelerated ageing on quantitative and qualitative changes of storage proteins and catalase enzymes in chickpea seeds. *Plant Process Function*. 6 (21): 323-339. (In persian with english abstract)
- Soltani, A. (2010).** Application of SAS software in statistical analysis. Mashhad University press of Jihad. (In persian)
- Soltani, A., Gholipoor, M. and Zeinali, E. (2006).** Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany*. 55: 195-200.
- Sung, J.M. and T.L. Jeng. (1994).** Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiologia Plantarum*. 91: 51-55.
- Tahmasebi, B., Ghaderifar, F., Sadeghipour, H. R. and Gallic, Q. (2015).** Effect of accelerated ageing on germination parameters, fatty acids and lipid hydroperoxides of sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.). *Process and Plant Function*. 4 (12): 73-83. (In persian with english abstract)
- Velicova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000).** Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated plants. *Plant Science*. 151: 59-66.
- Verma, S.S., Verma, U. and Tomer, R.P.S. (2003).** Studies on seed quality parameters in deteriorating seeds in Brassica (*Brassica campestris*). *Seed Science and Technology*. 31: 389-396.
- Xia, F., Wang, X., Li, M. and Mao, P. (2015).** Mitochondrial structural and antioxidant system response to aging in oat (*Avena sativa* L.) seeds with different moisture contents. *Plant Physiology and Biochemistry*. 94: 122-129.
- Xin, X., Tian, Q., Yin, G., Chen, X., Zhang, J., Ng, S. and Lu, X. (2014).** Reduced mitochondrial and ascorbate-glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. *Journal of Plant Physiology*. 171: 140-147.
- Zhang, H., Jing, L., Kui, W., Xinzheng, D. and Quanmin, L. (2009).** A simple and sensitive assay for ascorbate using potassium ferricyanide as spectroscopic probe reagent. *Analytical Biochemistry*. 388: 40-46
- Zhang, S.B., Lv, Y.Y., Wang, Y.L., Jia, F., Wang, J.S. and Hu, Y.S. (2017).** Physicochemical changes in wheat of different hardnesses during storage. *Journal of Stored Products Research*. 72: 161-167