نشریه تولید گیاهان زراعی
جلد یازدهم، شماره پنجم، بهار ۹۷
۵۱-۷۱
http://ejcp.gau.ac.ir
DOI:

بررسی جوانه‌زنی و فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی کلیدی دخیل در زوال بذر نخود در طی انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی

*مهدی شعبان[۱]، فرشید قادری‌فر[۲]، حمیدرضا صادقی‌پور[۳] و احد یامچی[۴]

[۱]دانش‌آموخته دکتری علوم و تکنولوژی بذر، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران،
[۳]دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان، [۴]استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۱/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲٤

چکیده

سابقه و هدف: شرایط نامناسب محیطی و همچنین شرایط انبارداری بذر می‌تواند زمینه‌ساز وقوع برخی تنش‌ها از قبیل تنش اکسیداتیو با تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بذور و سایر بافت‌های گیاهی گردد. شبکه دفاعی گونه‌های فعال اکسیژن مشتمل بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی و آنزیم‌های دخیل در تولید گونه‌های فعال اکسیژن بوده که مسئول نگه‌داری این گونه‌های فعال اکسیژن در حد بسیار اندکی بوده و غیرخسارت‌زا می‌باشند. در گیاهان، آنتی‌اکسیدانت‌ها غیرآنزیمی از قبیل پرولین و آسکوربیک اسید و همچنین آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، پروکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پروکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز به‌عنوان یک تیم دفاعی در این زمینه شناخته شده‌اند که با همکاری هم سلول‌های گیاهی را از خسارت اکسیداتیو محافظت می‌کنند. از این‌رو، این تحقیق به‌منظور بررسی اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر کارکرد سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی بذور نخود اجرا شد.

مواد و روش‌ها: این آزمایش به‌منظور بررسی اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی بذور نخود در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹٤ انجام شد. آزمایش به‌صورت طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. تیمارها شامل انبارداری طبیعی به‌مدت دو و چهار سال و زوال مصنوعی یک تا پنج روزه از طریق آزمون پیری تسریع شده به‌همراه تیمار شاهد بودند. برای انجام آزمون تسریع پیری بذرها درون جعبه‌های پلاستیکی و روی توری سیمی قرار گرفته و در شرایط دمای ٤۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد به‌مدت یک تا پنج روز قرار گرفتند. برای تیمارهای زوال طبیعی نیز از بذوری که به‌مدت دو و چهار سال در شرایط طبیعی انبار نگه‌داری شده بودند استفاده گردید. پس از اعمال تیمارها، آزمون جوانه‌زنی انجام و فعالیت آنتی‌کسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری داده‌ها نیز با نرم‌افزار SAS انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد در شرایط زوال مصنوعی با افزایش تعداد روزهای زوال درصد جوانه‌زنی بذور کاهش و پراکسیداسیون لیپید و همچنین تولید پراکسید هیدروژن و هدایت الکتریکی افزایش یافت. درصد جوانه‌زنی در زوال

*مسئول مکاتبه: shaaban.mehdi@gmail.com

تسریع شده نسبت به انبارداری طبیعی کاهش بیشتری داشت. در شدت‌های پایین زوال مصنوعی تا سه روز تجمع پرولین بیشتر از نمونه‌های مربوط به تیمار انبارداری طبیعی بود ولی میزان تجمع آن در انبارداری طبیعی بیشتر از تیمارهای زوال مصنوعی ٤ و ٥ روز زوال بود. تولید پرولین در تیمار انبارداری طبیعی با افزایش مدت زمان انبارداری افزایش یافته ولی تولید آسکوربیک اسید در این تیمار کاهش یافت. زوال سبب تغییر در کارکرد آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پروکسیداز، سوپراکسیدیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز شد. با افزایش شدت زوال مصنوعی تا سه روز فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیدیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز افزایش یافت. فعالیت آنزیم پروکسیداز و آسکوربات پروکسیداز نیز در زوال‌های کمتر افزایش یافت ولی با ادامه شدت زوال میزان فعالیت آن‌ها کاهش یافت. در تیمارهای انبارداری طبیعی با افزایش مدت زمان انبارداری از میزان فعالیت این آنزیم‌ها کاسته شد.

نتیجه‌گیری: با مقایسه زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی نتایج نشان داد که شدت‌های کمتر زوال مصنوعی نسبت به انبارداری طبیعی خسارت کمتری را به سامانه آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی وارد می‌کند ولی با افزایش شدت زوال مصنوعی تا ٥ روز تجمع گونه‌های فعال اکسیژن بر این سامانه‌ها غلبه نموده و قادر به پالایش آن‌ها نبوده و خسارت به بذور در این تیمارها بیشتر از تیمارهای انبارداری طبیعی بود. در شرایط انبارداری طبیعی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز نسبت به شرایط زوال مصنوعی ٤ و ٥ روز فعالیت بیشتری داشته و نقش مهم‌تری نسبت به سه آنزیم دیگر در سمیت‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن و تخفیف زوال بذور دارند. در شرایط زوال مصنوعی ٤ و ٥ روز فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نسبت به انبارداری طبیعی بیشتر بوده و نقش آن‌ها در این زمینه پررنگ‌تر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: انبارداری، جوانه‌زنی، گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی

مقدمه

نگه‌داری طولانی‌مدت بذرها سبب کاهش قابلیت حیات آنها طی فرآیند زوال می‌گردد (١١). سرعت زوال بذر به ساختار ژنتیکی، محیط تولید بذر و شرایط انبارداری بستگی دارد (٢٣). با توجه به این‌که زوال بذر بستگی به دما، محتوای رطوبت بذر و طول مدت انبارداری دارد (٤٥)، افزایش در میزان دما و رطوبت آن سبب کاهش قابلیت حیات بذرها می‌گردد و این امر ثابت می‌کند که از مهمترین عوامل اثرگذار بر طول عمر بذور دمای انبارداری و رطوبت بذرها طی انبارداری می‌باشد (٢٨). در شرایط زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی تغییراتی در متابولیسم سلولی و خصوصیات بیوشیمیایی بذور از قبیل پراکسیداسیون لیپیدی، غیر فعال شدن آنزیمی، خسارت به DNA و اختلال در نفوذپذیری غشاء رخ می‌دهد (٢١). از اثرات مهمی که زوال بر بذر می‌گذارد تخریب پروتئین‌های غشای سلولی می‌باشد که در نتیجه نشت الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد. هرچه میزان هدایت الکتریکی و نشت‌پذیری سلولی بیشتر باشد درصد جوانه‌زنی بذور نیز کاهش خواهد یافت (٤٢). تغییرات پراکسیداتیو در ترکیبات اسیدهای چرب غشاها سبب تغییر در کارکرد غشاهای سلولی شده که اینها خود سبب کاهش ویسکوزیته و افزایش نفوذپذیری غشاها شده و در نهایت سبب افزایش نشت الکترولیت‌ها و میزان هدایت الکتریکی می‌گردد (٤٠). طی انبارداری طبیعی محتوای آبی محیط اثر زیادی بر سرعت واکنش‌های دخیل در زوال بذر می‌گذارد. تحت این شرایط تغییرات فیزیکی و

شیمیایی بر پوسته بذر اثر گذاشته و سبب افزایش نفوذپذیری آن‌ها به آب و گازها شده (٤١) در نتیجه سبب افزایش نشت الکترولیت‌هایی مانند یون‌های آلی و غیر آلی، قندها، آمینواسیدها و حتی پروتئین‌ها می‌گردد (١٧). اثرات کلی پراکسیداسیون لیپید کاهش سیالیت غشا، افزایش نشت مواد از غشا، آسیب به پروتئین‌های غشا و در نهایت غیرفعال شدن گیرنده‌ها، آنزیم‌ها و کانال‌های یونی می‌باشد (١٤). اگر چه سازوکار دقیق زوال بذر هنوز مشخص نشده است ولی تجمع برخی گونه‌های فعال اکسیژن[1] (ROS) از قبیل رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن از دلایل عمده دخیل در زوال بذر می‌باشند (٢٨).

گیاه برای مقابله و کاهش خسارات ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن از سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی برخوردار بوده که پالایش این گونه‌های فعال اکسیژن را بر عهده دارند. سامانه آنتی‌اکسیدانی گیاهان شامل آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از قبیل پرولین، آسکوربیک اسید، آلفا توکوفرول و برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز هستند که وظیفه پالایش گونه‌های فعال اکسیژن را در شرایط مختلف بر عهده دارند (٣٢). در اثر وقوع تنش در گیاهان تولید برخی متابولیت‌های با وزن مولکولی کم که نقش اسمولیتی حفاظتی بر عهده دارند از قبیل پرولین افزایش می‌یابد (٢٠). به عقیده الیویرا و همکاران (٢٠١٢) آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی سبب کاهش میزان گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (٣٨).

عدم توانایی بذور زوال یافته در تولید برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ضروری از پیامدهای آنزیم‌سازی ناقص و ناکارا در این بذور می‌باشد (٥٠). زوال شدید سبب کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شده است (١٦). کاهش فعالیت کاتالاز در تیمارهای زوال شدید سبب تجمع پراکسید هیدروژن شده و همین امر سبب خسارت مستقیم و یا به واسطه تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل به بذر و عدم جوانه‌زنی مناسب آن می‌گردد (١٦). سانگ و چیو (١٩٩٥) در تحقیق که روی بذور زوال یافته سویا انجام دادند به این نتیجه رسیدند که زوال بذور سبب کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل پروکسیداز و آسکوربات پروکسیداز شد (٤٧). کونگ و همکاران (٢٠١٥) نیز بیان نمودند که محتوای رطوبتی بذر و همچنین طول مدت انبارداری بذور به‌مدت ٦ و ١٢ ماه بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل سوپراکسید دیسموتاز اثر گذاشت (٢٦).

در اکثر تحقیقات برای مطالعه اثر زوال بر جوانه‌زنی بذرها از آزمون تسریع پیری استفاده می‌کنند. آزمون تسریع پیری بذر تحت شرایط دما و رطوبت نسبی بالا منجر به کاهش قدرت بذر شده و برآوردی از نقصان خسارت به بذر طی انبارداری طبیعی را به ما ارائه می‌دهد (٥١). در این آزمون بذرها تحت شرایط دمااهای بالا (٤٠-٤٣ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت نسبی (١٠٠ درصد) به‌مدت چند روز قرار گرفته و در این شرایط زوال را تجربه می‌کنند. با توجه به اینکه محققان مختلف تغییرات بیوشیمیایی دخیل در زوال را اندازه‌گیری کرده‌اند این سوال وجود دارد که آیا سازوکارهای مطالعه شده در آزمون تسریع پیری مشابه با انبارداری طبیعی است یا نه، زیرا زوال در انبارداری طبیعی به شدت آزمون تسریع پیری نمی‌باشد و زوال با شدت زیاد و طی چند روز صورت نمی‌گیرد. از این رو شاید سازوکار زوال در آزمون تسریع پیری متفاوت از انبارداری طبیعی باشد.

1- Reactive Oxygen Species

در این مورد کارهای زیادی انجام شده و مقایسه دو سازوکار زوال در این دو سامانه بررسی شده است. از آنجا که یکی از سازوکازهای زوال تجمع گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد این سوال پیش می‌آید که آیا در هر دو سامانه زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی روند تولید و اثر گونه‌های فعال اکسیژن مشابه می‌باشد. از این رو هدف از اجرای این تحقیق بررسی فعالیت و کارایی سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی و برخی صفات بیوشیمیایی در بذور نخود زراعی تحت شرایط زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به‌منظور بررسی اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر متابولیسم آنتی‌اکسیدانت و تغییر در صفات بیوشیمیایی بذور نخود زراعی در سال ۱۳۹۳ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گردید. در این آزمایش بذور نخود رقم هاشم که به‌مدت دو و چهار سال در شرایط طبیعی انبار با دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت محیط نگهداری شده بودند به‌عنوان بذور دارای زوال طبیعی در نظر گرفته شدند. از بذور تازه برداشت شده به‌عنوان شاهد و همچنین برای بذور دارای زوال مصنوعی استفاده گردید. برای این کار بذرهای نخود در داخل ظروف پلاستیکی به ابعاد ۳/۵×۱۱×۱۱ سانتی‌متر که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود، بر روی یک توری سیمی قرار داده شدند به‌طوری‌که بذور در تماس مستقیم با آب قرار نداشتند. سپس درب ظرف‌ها کاملا بسته شده و در دمای ثابت ۴۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد. در طول آزمایش رطوبت نسبی داخل ظرف‌های پلاستیکی ۱۰۰ درصد بود.

برای انجام آزمون جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در هر تیمار زوال طبیعی و مصنوعی، ٤ تکرار ۲۵ تایی از بذر شمارش و روی دو عدد کاغذ حوله‌ای به ابعاد ۴۵×۳۰ سانتی‌متر قرار گرفته و با کاغذی دیگر روی بذرها پوشانده شد و طبق دستورالعمل ایستا به‌مدت ۸ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۲۲). معیار جوانه‌زنی نیز خروج ریشه به میزان ۲ میلی‌متر در نظر گرفته شد (٤٤).

برای اندازه‌گیری همه صفات مورد مطالعه از بذور خشک استفاده شد. برای انجام آزمایش هدایت الکتریکی از هر رقم تعداد ۵۰ بذر در ٤ تکرار وزن شده و در بشرهای ۵۰۰ میلی لیتری قرار داده شدند و ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر (به‌منظور هم‌دمایی آب مقطر ۲٤ ساعت قبل در انکوباتور ۲۰ درجه قرار داده شده بود) به آن‌ها اضافه شد و بشرها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از این مدت هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری و نتایج به‌صورت میکروزیمنس بر سانتی‌متر بر گرم محاسبه شد (۱۸).

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید به روش دو و براملگ (۱۹۹۲) همراه با تغیراتی انجام شد (۹). در این روش میزان پراکسیداسیون لیپید براساس مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) موجود در هر عصاره طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$LP=[[(A_{532}-A_{600})-[(A_{440}-A_{600})(MA)]]/157000] * 10^6$$

که در این رابطه LP مقدار مالون دی‌آلدئید بر حسب نانومول بر میلی‌لیتر و MA نسبت جذب مولی ساکارز در غلظت‌های ۱۰-۱ میلی‌مولار در ۵۳۲ و ٤٤۰ نانومتر است که به‌ترتیب ۸/٤ و ۱٤۷ محاسبه شد که نسبتی معادل ۰/۰۵۷۱ می‌باشد (۹). در نهایت میزان پراکسیداسیون لیپید بر اساس نانومول MDA موجود با ازای هر گرم بذر بیان گردید.

برای اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن از بذور نخود به میزان ۰/۳ گرم بافت بذری با ۱/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی بر روی یخ هموژنیزه و پس از انتقال به میکروتیوب به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و از عصاره حاصله برای اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن در طول موج ۳۹۰ نانومتر استفاده گردید. در نهایت میزان پراکسید هیدروژن بر حسب نانومول بر گرم بیان گردید (۱۳).

برای اندازه‌گیری محتوای پرولین مقدار ۰/۵ گرم از نمونه بذری را توزین و پودر نموده و سپس آن‌ها را به لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری منتقل کرده و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳/۳ درصد به آن‌ها اضافه شد. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ و از محلول‌های حاصل جهت اندازه‌گیری میزان پرولین به روش بیتس و همکاران (۱۹۷۳) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد و در پایان میزان پرولین نمونه‌های بذری بر حسب میکرومول بر گرم بیان شد (۵).

برای اندازه‌گیری اسیدآسکوربیک ۰/۲ گرم بافت بذری با ۲ میلی‌لیتر اسیدپرکلریک ۰/۵ میلی‌مولار در هاون چینی بر روی یخ ساییده شده و سپس در میکروتیوب ریخته و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷۳۵ نانومتر قرائت شد و میزان آسکوربیک اسید نمونه‌های بذری بر حسب میلی‌گرم بر گرم بیان شد (٥٤).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز یک گرم از بافت بذری با ۳ میلی‌لیتر با فر استخراج در هاون چینی بر روی یخ ساییده شده و پس از عبور از دو لایه پارچه ململ در میکروتیوب ریخته و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و تغییرات جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر به‌مدت دو دقیقه اندازه‌گیری و از یک دقیقه اول آن برای محاسبه فعالیت کاتالاز استفاده گردید. برای محاسبه فعالیت آنزیم کاتالاز از ضریب خاموشی ۰/۰۳۹٤ بر میلی‌مول بر سانتی‌متر استفاده گردید (۷).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز ۲ گرم از بافت بذری با ٤ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون چینی بر روی یخ ساییده شده و پس از عبور از دو لایه پارچه ململ در میکروتیوب ریخته و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و تغییرات جذب در طول موج ٤۷۰ نانومتر به‌مدت ٤ دقیقه اندازه‌گیری و از یک دقیقه اول آن برای محاسبه فعالیت پراکسیداز استفاده گردید. برای محاسبه فعالیت آنزیم پراکسیداز از ضریب خاموشی ۲/٤۷ بر میلی‌مول بر سانتی‌متر استفاده گردید (۷).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۰/۳ گرم از بافت بذری با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون چینی بر روی یخ ساییده شده و پس از عبور از دو لایه پارچه ململ در میکروتیوب ریخته و به‌مدت ۳۰ دقیقه (دو زمان ۱۵ دقیقه‌ای) در ۱۵۰۰۰ دور و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به‌مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری و از یک دقیقه اول آن برای محاسبه فعالیت آسکوربات پراکسیداز استفاده گردید. برای محاسبه فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از ضریب خاموشی ۲/۸ بر میلی‌مول بر سانتی‌متر استفاده گردید (۳۵).

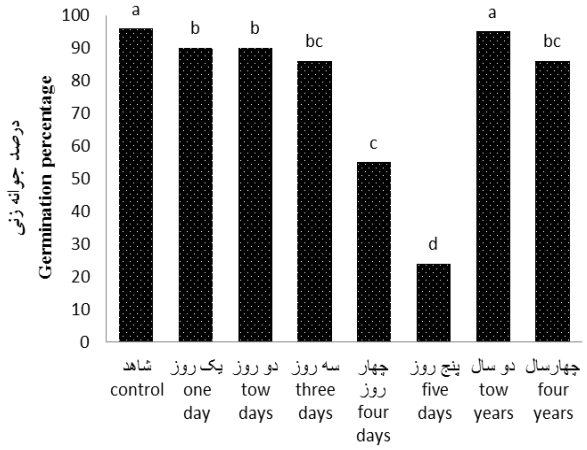
سنجش سوپر اکسید دیسموتاز بر اساس تغییر شیمیائی نیتروبلوتترازولیوم و طبق روش مینامی و یوشیکاوا (۱۹۷۹) انجام شد (۳۰). بدین منظور محلول واکنش شامل ۰/۰۵۵ مول نیتروبلوتترازولیوم، ۱/٤۲ درصد ترایتون X-100، EDTA 0.1 mM، ۱٦ میلی‌مول پیروگالول بود که پس از اضافه کردن عصاره نمونه بافت تغییر جذب در اسپکتروفتومتر در طول موج ٥٦۰ نانو متر ارزیابی گردید.

سنجش فعالیت گلوتاتین ردوکتاز با روش زقرای و همکاران (۱۹۹٤) انجام شد (٤۳). بدین منظور ۲ گرم از بافت موردنظر در بافر با pH=7 حاوی ۱۰۰ میلی‌مول فسفات پتاسیم، ۱ میلی‌مول EDTA و ۰/۲ پلی وینیل فسفات در مجاورت یخ با دستگاه هموژن شد سپس در ۱۸۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. محلول‌رویی جهت سنجش فعالیت گلوتاتین ردوکتاز مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور محلول واکنش شامل ۲۰۰ میلی‌مول فسفات پتاسیم (pH=7.5)، ۲ میلی‌مول EDTA، یک و نیم میلی‌مول کلرور منیزیم، ۰/۵ میلی‌مول اکسید گلوتاتیون، ۵۰ میکرومول NADH ساخته شد ابتدا جذب در ۳٤۰ نانومتر قرائت گردید و به ۱ میلی‌لیتر از این محلول به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده از بافت گیاه اضافه شد بعد از یک دقیقه مجددا جذب قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد آنزیم، فعالیت نمونه استخراجی تعیین گردید.

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسات میانگین با آزمون LSD در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج

نتایج این مطالعه نشان داد در شرایط زوال مصنوعی با افزایش تعداد روزهای زوال درصد جوانه‌زنی بذور کاهش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان جوانه‌زنی در تیمار شاهد به میزان ۹٦ درصد و کمترین میزان جوانه‌زنی به میزان ۲٤ درصد در تیمار پنج روز زوال مشاهده شد (شکل ۱). با توجه به افت درصد جوانه‌زنی در بذور نخود مشاهده شد که در تیمار سه روز زوال درصد جوانه‌زنی بذور نسبت به شاهد حدود ۱۵ درصد کاهش یافته و در تیمار چهار سال انبارداری نیز افت جوانه‌زنی بذور به همین میزان بود. در زوال طبیعی دو و چهار سال نسبت به زوال‌های شدید چهار و پنج روز افت درصد جوانه‌زنی کمتر مشاهده شد. بین تیمار سه روز زوال مصنوعی با تیمار چهار سال انبارداری طبیعی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.



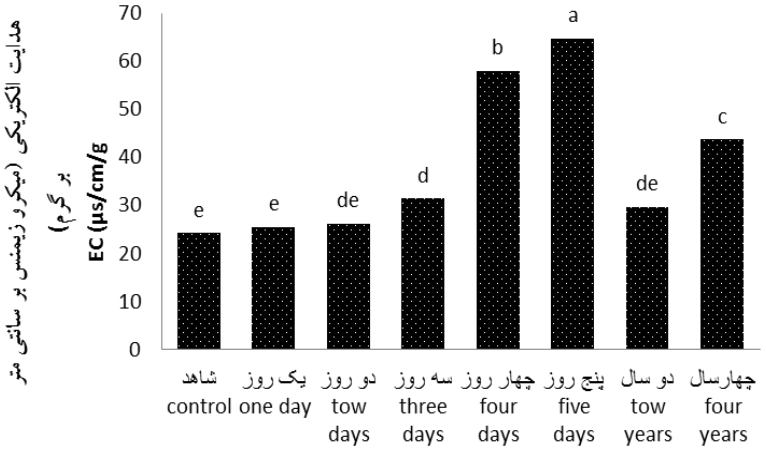
شکل ۱- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر درصد جوانه‌زنی بذور نخود ایرانی.

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 1. Effect of accelerated ageing and natural storage on germination percentage of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

با افزایش شدت زوال مصنوعی و همچنین با افزایش مدت زمان انبارداری طبیعی میزان هدایت الکتریکی بذور افزایش یافته و این نتیجه خسارت بیشتر زوال بر غشاهای سلولی و افزایش نشت

الکترولیت‌ها در این شرایط می‌باشد (شکل ۲). در تیمار زوال سه روز و همچنین انبارداری دو سال میزان هدایت الکتریکی برابر با ۳۰ دسی زیمنس بر متر بوده که از نظر وارد آمدن خسارت به غشا مشابه می‌باشند. نتایج نشان داد اثر تیمار انباراری طبیعی ٤ سال بر میزان هدایت الکتریکی بیشتر از اثر تیمارهای یک تا سه روز زوال مصنوعی بود ولی در تیمار ٤ و ۵ روز میزان نشت الکترولیت‌ها بیشتر از انبارداری چهار سال بود (شکل ۲).

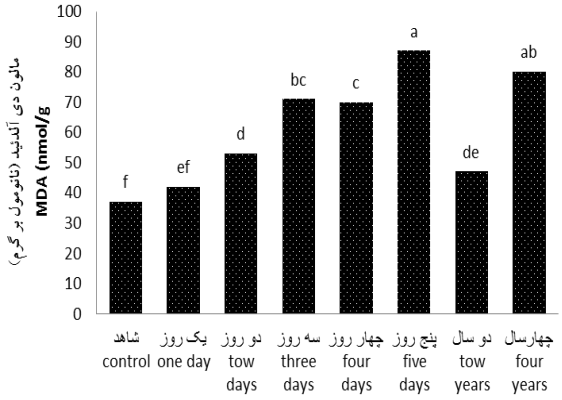


شکل ۲- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر هدایت الکتریکی بذور نخود ایرانی

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 2. Effect of accelerated ageing and natural storage on electrolyte leakage of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

تولید مالون‌دی‌آلدئید که نشانه وقوع پراکسیداسیون لیپید در بذور است در تیمارهای زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی با افزایش شدت زوال و مدت زمان انبارداری بذور روند افزایشی داشت. بیشترین تولید مالون‌دی‌آلدئید در تیمار زوال مصنوعی ۵ روز به میزان حدود ۹۰ نانومول برگرم بود که نشانه پراکسیداسیون لیپید بیشتر در این تیمار می‌باشد. در تیمار انبارداری چهار سال نیز میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید نسبت به تیمار دو سال بیشتر و اختلاف بین آن‌ها هم معنی‌دار بود. در تیمار انبارداری چهار سال تولید مالون‌دی‌آلدئید بیشتر از تیمارهای زوال یک تا چهار روز بود ولی با تیمار پنج روز از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت. بین تیمار دو روز زوال و انبارداری دو سال نیز از این نظر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۳).

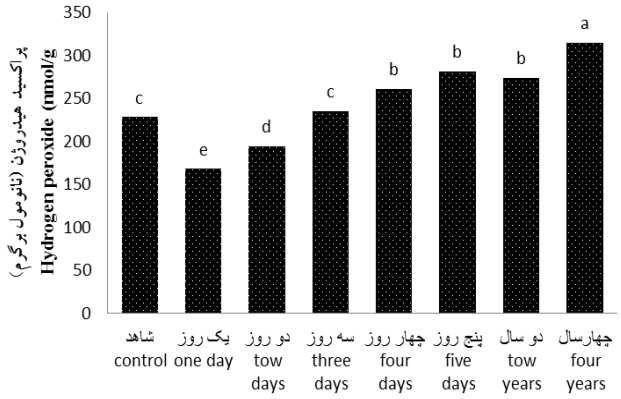


شکل ۳- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان مالون‌دی‌آلدئید بذور نخود ایرانی.

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 3. Effect of accelerated ageing and natural storage on MDA content of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

نتایج نشان داد تولید پراکسید هیدروژن با افزایش زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی افزایش یافت. بیشترین میزان تولید پراکسید هیدروژن مربوط به تیمار انبارداری ٤ سال به میزان ۳۰۵ نانومول برگرم بود و کمترین میزان تولید پراکسید هیدروژن در تیمار زوال مصنوعی یک روز به میزان ۱۷۵ نانومول برگرم به‌دست آمد. بین انبارداری دو سال و زوال چهار و پنج روز از این نظر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ٤).



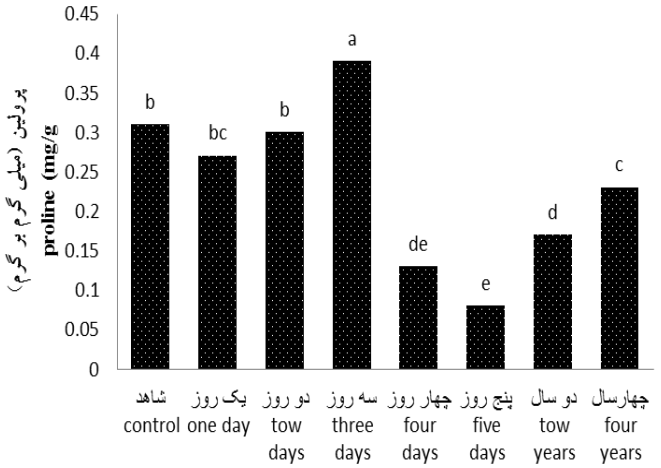
شکل ٤- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان پراکسید هیدروژن بذور نخود ایرانی.

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 4. Effect of accelerated ageing and natural storage on hydrogen peroxide content of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

پرولین یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی بوده که در شرایط وقوع تنش‌های محیطی در بافت‌های مختلف گیاهی تولید آن افزایش می‌یابد. در این تحقیق مشاهده شد که تولید پرولین در تیمار یک روز زوال کمتر از شاهد بوده ولی با افزایش زوال تا سه روز میزان آن نیز افزایش یافت به‌طوری‌که تولید پرولین در تیمار سه روز بیشتر از شاهد بود. در تیمار ٤ و ٥ روز زوال میزان تولید آن دوباره روند کاهشی داشت. در انبارداری طبیعی با افزایش مدت زمان انبارداری میزان تولید پرولین روند افزایشی داشت.

تولید پرولین در همه تیمارهای زوال مصنوعی به‌جز ٤ و ٥ روز زوال بیشتر از تیمارهای انبارداری طبیعی دو و چهار سال بود. در تیمار شاهد نیز میزان تجمع پرولین بیشتر از انبارداری ۲ و ٤ سال بود (شکل ٥).

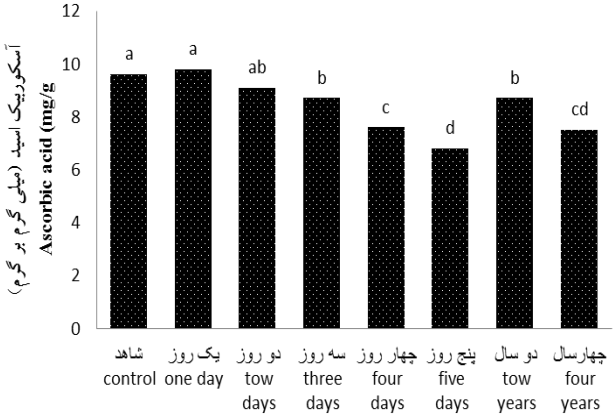


شکل ٥- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان پرولین بذور نخود ایرانی.

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 5. Effect of accelerated ageing and natural storage on proline content of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

اسید آسکوربیک یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی می‌باشد که تولید آن در زوال یک روز نسبت به شاهد افزایش یافته ولی اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار نبود و با افزایش شدت زوال تا ٥ روز تولید آن روند نزولی داشت به‌طوری‌که کمترین میزان تولید آسکوربیک اسید یه میزان ٦ میلی‌گرم برگرم در تیمار ٥ روز زوال مشاهده شد. در تیمارهای انبارداری طبیعی نیز روند تولید آسکوربیک اسید با افزایش مدت زمان انبارداری کاهشی بود و تولید آسکوربیک اسید در آن‌ها کمتر از تیمار شاهد و زوال یک و دو روز بود (شکل ٦).

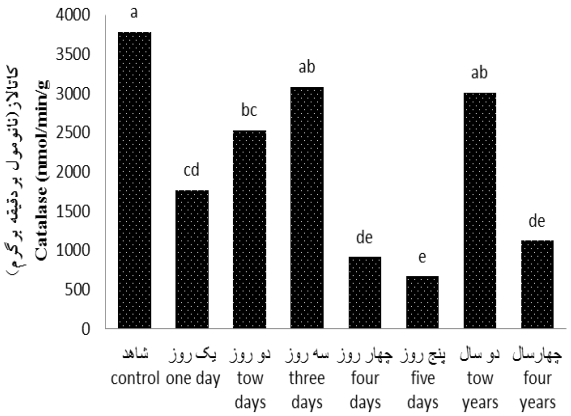


شکل ٦- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان آسکوربیک اسید بذور نخود ایرانی.

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 6. Effect of accelerated ageing and natural storage on ascorbic acid of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

نتایج نشان داد فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار شاهد بیشترین میزان بود. با افزایش شدت زوال از یک تا سه روز روند فعالیت آنزیم کاتالاز افزایشی بوده و تیمار سه روز زوال پس از تیمار شاهد دارای بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به میزان ۳۱۰۰ نانومول بر دقیقه بر گرم بود. از تیمار ٤ تا ٥ روز نیز روند فعالیت آنزیم کاتالاز کاهشی بود و کمترین میزان فعالیت کاتالاز مربوط به تیمار زوال ٥ روز به میزان ۷۰۰ نانومول بر دقیقه بر گرم بود. در تیمارهای انبارداری طبیعی نیز با افزایش مدت زمان انبارداری فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. بین انبارداری دو سال و زوال مصنوعی سه روز از این نظر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و فعالیت آنزیم کاتالاز در این دو تیمار با هم برابر بود و با تیمار شاهد نیز اختلاف معنی‌دار داشتند (شکل ۷).

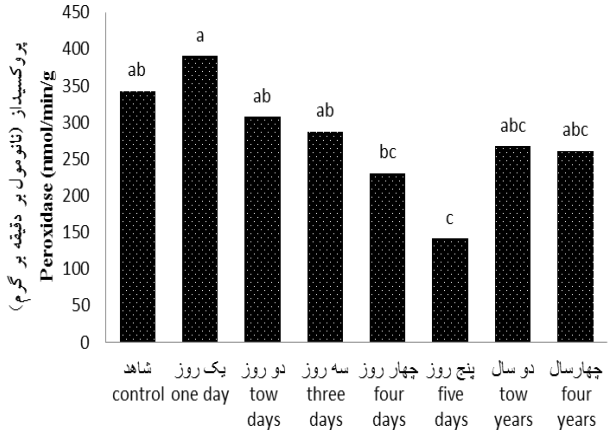


شکل ۷- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بذور نخود ایرانی.

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 7. Effect of accelerated ageing and natural storage on catalase enzyme activity of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم پروکسیداز مربوط به تیمار زوال یک روز به میزان ۳۸۵ نانومول بر دقیقه بر گرم بود و پس از آن تیمار شاهد دارای بالاترین میزان فعالیت آنزیمی بود. از تیمار یک تا ٥ روز زوال مصنوعی روند فعالیت آنزیم پروکسیداز کاهشی بود به‌طوری‌که کمترین میزان فعالیت آنزیمی در تیمار ٥ روز زوال به میزان ۱۷۵ نانومول بر دقیقه بر گرم حاصل شد. در تیمارهای انبارداری طبیعی نیز با افزایش مدت زمان انبارداری از ۲ تا ٤ سال میزان فعالیت آنزیم به میزان ناچیزی کاهش یافت و اختلاف بین این دو تیمار معنی‌دار نشد. به هر حال زوال مصنوعی ٤ و ٥ روز فعالیت آنزیم پروکسیداز را بیشتر از تیمارهای انبارداری طبیعی کاهش داد ولی اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار نبود (شکل ۸).

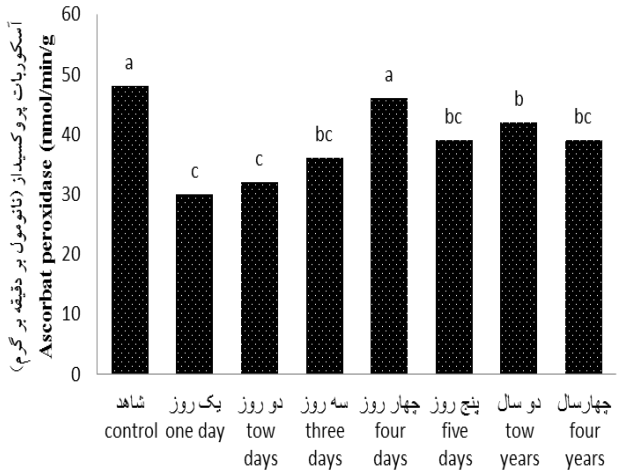


شکل ۸- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان فعالیت آنزیم پروکسیداز بذور نخود ایرانی.

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 8. Effect of accelerated ageing and natural storage on peroxidase activity of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز در تیمار شاهد و زوال مصنوعی چهار روز و به میزان ۵۰ نانومول بر دقیقه بر گرم در تیمار شاهد به‌دست آمد و در نمونه‌های زوال مصنوعی با افزایش شدت زوال از یک تا ٤ روز بر میزان فعالیت آنزیمی افزوده شده و در تیمار ۵ روز دوباره کاهش یافته است ولی در تیمارهای انبارداری طبیعی با افزایش مدت زمان انبارداری از فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز نسبت به شاهد کاسته شد. در تیمارهای زوال مصنوعی یک و دو روز میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز کمتر از تیمارهای انبارداری طبیعی دو و چهار سال بود ولی اختلاف بین آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۹).

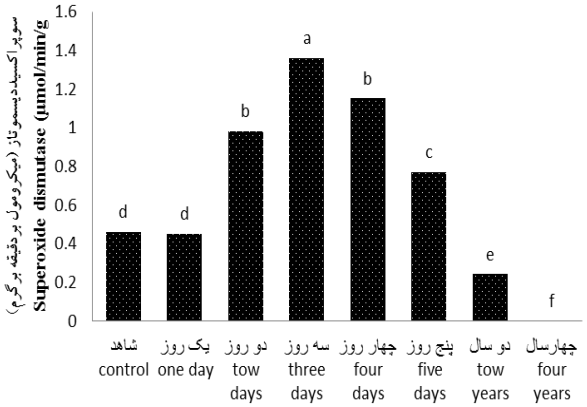


شکل ۹- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز بذور نخود ایرانی.

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 9. Effect of accelerated ageing and natural storage on peroxidase enzyme activity of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

با افزایش زوال تا ۳ روز میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت و در تیمارهای ٤ تا ٥ روز دوباره فعالیت این آنزیم کاهش یافت. فعالیت این آنزیم در تیمارهای انبارداری طبیعی روند نزولی داشت به‌طوری‌که میزان فعالیت این آنزیم در انبارداری ٤ سال صفر بود. اثر منفی انبارداری طبیعی تا چهار سال بسیار بیشتر از زوال مصنوعی بوده به‌طوری‌که با افزایش مدت زمان انبارداری میزان فعالیت این آنزیم رفته رفته کاهش یافته تا در نهایت پس از چهار سال میزان فعالیت آن در بذور به صفر رسیده است (شکل ۱۰).

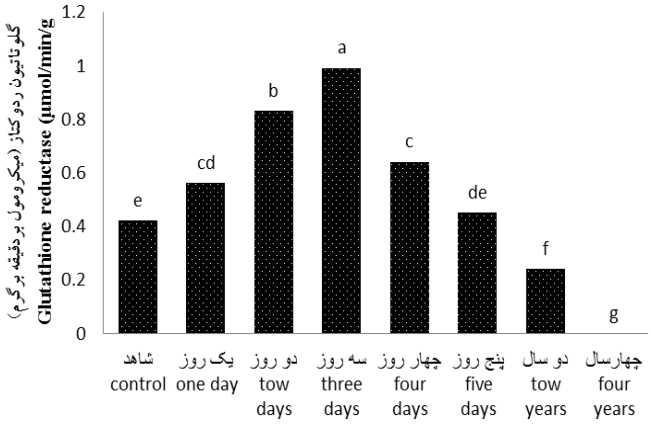


شکل ۱۰- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بذور نخود.

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 10. Effect of accelerated ageing and natural storage on superoxide dismutase enzyme activity of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

در این مطالعه مشخص شد که فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز با افزایش شدت زوال مصنوعی تا ۳ روز افزایش داشته و از آن به بعد در تیمارهای ٤ و ٥ روز روند کاهشی بود و بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در بین نمونه‌های زوال مصنوعی مربوط به تیمار زوال سه روز به میزان یک میکرومول بر دقیقه بر گرم وزن تازه بذر بود. در تیمارهای انبارداری طبیعی نیز با افزایش مدت زمان انبارداری بذور از میزان فعالیت این آنزیم کاسته شد به‌طوری‌که در تیمار انبارداری ٤ سال فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز صفر بود. حتی در تیمار انبارداری دو سال میزان فعالیت این آنزیم کمتر از همه تیمارهای زوال مصنوعی بود و این نشان می‌دهد که در این حالت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز با افزایش ماندگاری بذور در انبار خسارت بیشتری دیده و در تیمار ٤ سال انبارداری طبیعی به صفر رسیده است (شکل ۱۱).



شکل ۱۱- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز بذور نخود.

ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند.

Figure 11. Effect of accelerated ageing and natural storage on glutathione reductase enzyme activity of chickpea seeds. Column with at least one same letter had no significant difference.

بحث

در این مطالعه درصد جوانه‌زنی در زوال تسریع شده نسبت به انبارداری طبیعی کاهش بیشتری را نشان داد. در شرایط مختلف زوال طبیعی و مصنوعی دما و رطوبت نسبی محیط بر میزان جوانه‌زنی بذور اثر گذاشته و افزایش دما و رطوبت محیط نگه‌داری بذر سبب تسریع زوال بذر می‌گردد (۳۷). در شرایط زوال مصنوعی رطوبت و دمای محیط بالاست و میزان خسارت وارد شده به بذر بیشتر بوده و همین امر سبب نقصان بیشتر درصد جوانه‌زنی بذور نخود نسبت به انبارداری طبیعی گردید. به‌نظر اختر و همکاران (۱۹۹۲) افزایش طولانی مدت بذور در انبار سبب افت جوانه‌زنی بذور می‌گردد (۱). شدت بیشتر زوال در زوال‌های مصنوعی و انبارداری طبیعی سبب کاهش کیفیت و در نهایت کاهش حداکثر میزان جوانه‌زنی شد و شدت‌های زوال چهار و پنج روز سبب افت بیشتر درصد جوانه‌زنی نسبت به زوال طبیعی شد. در هر دو شرایط زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی جوانه‌زنی بذور با وقفه‌ای شروع شده که در مورد زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی با هم متفاوت بوده و علت این وقفه این است که بذور برای تعمیر خسارت‌های وارد شده به غشاء و دیگر قسمت‌های سلولی و آغاز مجدد فعالیت سامانه آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و مهار تنش اکسیداتیو به زمان نیاز داشته به‌طوری‌که تعمیر این خسارت‌ها فقط پس از جذب آب توسط بذر امکان‌پذیر می‌باشد (۵۳). بنابراین مدت زمان لازم برای تکمیل فرآیند جوانه‌زنی بذر افزایش و سرعت جونه‌زنی کاهش و در نتیجه سبب افت در میزان جوانه‌زنی بذور می‌گردد (۳). در شرایط زوال مصنوعی شدید به‌دلیل کاهش شدید قدرت حیات بذر جوانه زنی‌کاهش یافته است چون در این شرایط بذر به‌مدت بیشتری در تماس با رطوبت بالا می‌باشد (٤) ولی در انبارداری طبیعی به‌دلیل پایین بودن رطوبت محیط قابلیت حیات بذور دیرتر کاهش یافته و درصد جوانه‌زنی بذور بالاتر از زوال مصنوعی ٤ و ۵ روز می‌باشد. این یافته‌ها با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (۳۹ و ٤۸).

زوال در سطح سلولی سبب ایجاد تغییراتی در نفوذپذیری غشایی، کاهش متابولیسم انرژی و همچنین عدم جفت شدن رشته‌های RNA و پروتئین‌سازی می‌گردد (۲۹). در این مطالعه زوال‌های طبیعی و مصنوعی سبب کاهش کیفیت و در نهایت

کارکرد طبیعی بذرها شده و میزان نشت الکترولیت‌ها در آن‌ها افزایش یافت. در انبارداری چهار سال میزان نشت الکترولیت‌ها بیشتر از انبارداری دو ساله بود ولی با این حال میزان نشت الکترولیت‌ها در این تیمار از زوال چهار و پنج روز کمتر بود که نشان‌دهنده خسارت کمتر به غشاها نسبت به تیمارهای زوال چهار و پنج روز می‌باشد. انبارداری طبیعی سبب تغییرات فیزیکی و شیمیایی در پوشش‌های بذر می‌گردد (۳۳). شرایط انبارداری طبیعی خسارت کمتری را نسبت به زوال تسریع شده چهار و پنج روز به بذر وارد می‌نماید. افزایش هدایت الکتریکی به‌دلیل افزایش پراکسیداسیون لیپید و تغییر کارکرد میتوکندری‌ها و در نتیجه کاهش میزان انرژی تولیدی می‌باشد که در نهایت سبب کاهش میزان جوانه‌زنی می‌گردد (۲۹). در شرایط انبارداری طبیعی که محتوای آبی بالا نیست پراکسیداسیون لیپید با سرعت کمتری سبب زوال بذر شده ولی با افزایش محتوای رطوبتی پراکسیداسیون لیپید و همچنین هیدرولیز قندها شدت می‌گیرد (۳٦). در نتیجه در شرایط زوال مصنوعی چهار و پنج روز میزان خسارت به غشاها افزایش یافته و نشت الکترولیت‌ها نیز بیشتر از شرایط انبارداری طبیعی بود. کاهش نشت الکترولیت‌ها در زوال‌های مصنوعی یک تا سه روز نسبت به انبارداری طبیعی چهار ساله به‌این دلیل است که سرعت پراکسیداسیون لیپید در این شرایط به دلیل محتوای آبی بالای بذر کم می‌باشد، چون آب خود به عنوان بافر بین رادیکال‌های آزاد تولیدی در شرایط زوال و اهداف مولکولی عمل نموده و سبب متوقف شدن خودبه‌خودی زنجیره‌های فعال حین پراکسیداسیون لیپید می‌گردد (۲۹). در طول دوره انبارداری بذر درحالی‌که محتوی رطوبتی بذور پایین است اکسیداسیون خود به خود لیپیدها موجب تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد (۳ و ۲۹). علاوه‌بر محتوای آبی، دمای انبار نیز بر این رخدادها به‌طور متفاوتی اثر دارد. در گیاه ماش در دماهای ۳۰-۵۰ درجه پراکسیداسیون لیپید افزایش یافته و به دنبال آن نشت الکترولیت‌ها نیز افزایش یافته است (۳٤). این در حالی است که در شرایط انبارداری طبیعی بذور، رطوبت نسبی اندکی وجود داشته و بذور در یک حالت کریستالی قرار دارند که تحت این شرایط می‌توانند این حالت را برای مدت طولانی حفظ نمایند و میزان خسارت وارد شده به غشای آنها کاهش یافته و در نتیجه دوره انبارداری آن‌ها افزایش می‌یابد (٤٦). در شدت‌های چهار و پنج روز زوال مصنوعی مکانیسم‌های ترمیمی بذر فعال نبوده و غشاها توانایی خود را در نگه‌داری منابع ذخیره‌ای از دست داده و نشت الکترولیت‌ها نیز افزایش می‌یابد (۱۰). بذوری که در شرایط زوال مصنوعی شدید قرار گرفته‌اند نسبت به بذوری که در شرایط انباداری طبیعی قرار گرفته‌اند با جذب آب ساختار غشایی آن‌ها بیشتر در هم ریخته شده و نشت الکترولیت در آنها بیشتر شده است.

پراکسیداسیون لیپید بالاتر مربوط به تیمارهای زوال مصنوعی شدید بود. با توجه به این‌که در حالت زوال مصنوعی میزان رطوبت محیط و بذر بالا بود، وقوع پراکسیداسیون لیپید نسبت به تیمارهای انبارداری طبیعی بیشتر بود. این نتایج نشان می‌دهد که وقوع پراکسیداسیون لیپید بیشتر با جذب رطوبت توسط بذر شدت می‌گیرد. در این مطالعه نیز مشاهده شد که شدت‌های بالاتر زوال مصنوعی به دلیل جذب بیشتر آب و آزادی عمل بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن و خسارت بالاتر به غشاها میزان پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به تیمارهای انبارداری طبیعی افزایش یافته است. میرا و همکاران (۲۰۱۵) نیز بیان نمودند

محتوای رطوبتی بذر طی ذخیره بذر و همچنین طول مدت انبارداری آن بر زوال بذر و قابلیت انبارداری آن اثر دارد (۳۱). میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید در زوال ۵ روز بیشتر از انبارداری چهار سال بود و این نشان می‌دهد که محتوای رطوبتی بذر و محیط به‌همراه دمای محیط نسبت به طول مدت انبارداری محیط اثر بیشتری بر پراکسیداسیون لیپید دارد. همچنین نتایج مشابهی توسط زانگ و همکاران (۲۰۱۰) به‌دست آمد (٥٤). به گفته گوئل و شئورون (۲۰۰۳) افزایش میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید همراه با نشت الکترولیت‌ها بخش قابل توجهی از کاهش قابلیت جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه را توجیه می‌نماید (۱۵). افزایش میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بذر بوده که می‌تواند ناشی از ضعف سامانه آنتی‌اکسیدانت باشد (۳). بیلی و همکاران (۱۹۹٦) بیان نمودند که افزایش تولید مالون‌دی آلدئید در بذور نشانه شروع کاهش قابلیت حیات در آن‌ها می‌باشد و این تولید نیز با افزایش محتوای رطوبتی افزایش می‌یابد (٤). در شدت‌های بالای زوال مصنوعی کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت منجر به تجمع زیاد پراکسید شده و همین امر سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌گردد (٤ و ۲۳).

وجتیلا و همکاران (۲۰۰٦) بیان نمودند که قابلیت جوانه‌زنی بذور با تجمع گونه‌های فعال اکسیژن کاهش می‌یابد (۵۲). افزایش شدت زوال مصنوعی که سبب کاهش قابلیت جوانه‌زنی بذور شد سبب افزایش تولید پراکسید هیدروژن گردید. بذور در شرایط انبارداری طبیعی میزان بیشتری پراکسید هیدروژن نسبت به زوال مصنوعی تولید نمودند. با افزایش مدت زمان انبارداری طبیعی میزان تولید پراکسید هیدروژن افزایش یافت. مک دونالد (۱۹۹۹) گزارش نمود که افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن طی تنش اکسیداتیو سبب تسریع در زوال بذر می‌گردد (۲۹). بیلی و همکاران (۱۹۹٦) بیان نمودد که تجمع پراکسید هیدروژن سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و به دنبال آن افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید شده که در نهایت سبب کاهش قابلیت حیات بذور می‌گردد (٤). کاهش قابلیت جوانه‌زنی بذور طی زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی همگام با افزایش میزان تولید پراکسید هیدروژن بود. افزایش تعداد روزهای زوال مصنوعی به دلیل بالا بودن دما و رطوبت محیط سبب افزایش تولید پراکسید هیدروژن شده و قابلیت جوانه‌زنی نیز کاهش یافته است. کیبینزا و همکاران (۲۰۰٦) در گیاه پنبه و بیلی و همکاران (۱۹۹٦) در آفتابگردان نیز گزارش نمودند که با افزایش محتوای رطوبتی بذور قدرت حیات آن‌ها نیز کاهش یافت (۲٤ و ٤).

با توجه به این‌که در بذور خشک سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی نسبت به آنزیمی فعال‌تر است در نتیجه در شدت‌های بالاتر زوال مصنوعی تا سه روز و انبارداری طبیعی ٤ سال میزان تولید پرولین افزایش یافت. متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی طی زوال بذر تجمع یافته و سبب حذف گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردند. نقش این متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانت در بذور خشک نسبت به بذوری که جذب آب نموده‌اند مشهودتر است (۳). پرولین نیز یکی از این متابولیت‌هاست که در این مطالعه تولید آن در زوال‌های مصنوعی تا سه روز افزایش و از آن به بعد کاهش یافت ولی تولید آن در زوال ٤ و ۵ روز کمتر از انبارداری طبیعی بود. در تیمارهای انبارداری طبیعی نیز با افزایش مدت زمان انبارداری تولید پرولین افزایش یافت. با افزایش شدت زوال تا یک روز میزان تولید آسکوربیک اسید به‌طور غیرمعنی‌داری افزایش و از آن به بعد تا ۵ روز کاهش یافت. همچنین در تیمار انبارداری طبیعی با افزایش مدت زمان انبارداری تولید

آسکوربیک اسید کاهش یافت. آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی سبب کاهش میزان گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (۳۸). تولید پرولین در حالت انبارداری طبیعی با افزایش مدت زمان انبارداری افزایش یافته ولی تولید آسکوربیک اسید در این حالت کاهش یافت. این یافته‌ها نشان می‌دهد که در حالت انبارداری طبیعی اگر تولید یکی از این آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی کاهش یابد تولید دیگری افزایش یافته و کمبود آنرا جبران می‌نماید. به گفته هوکسترا و همکاران (۲۰۰۱) در اثر وقوع تنش در گیاهان تولید برخی متابولیت‌های با وزن مولکولی کم که نقش اسمولیتی حفاظتی بر عهده دارند از قبیل پرولین افزایش می‌یابد (۲۰). در این زمینه کیشور و دنگ (۱۹۹۰) در تحقیق خود عنوان نمودند که پرولین از عملکرد طبیعی سلولی با استفاده از سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌نماید (۲۵). کونگ و همکاران (۲۰۱۵) نیز در تحقیق خود بیان نمودند که افزایش شدت زوال بذر همگام با افزایش محتوای رطوبتی بذور سبب افزایش محتوای پرولین در بذور زوال یافته می‌گردد و پرولین از مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول جلوگیری می‌نماید (۲٦).

نتایج این آزمایش مشخص نمود که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت وابسته به محتوای رطوبتی بذر و همچنین طول دوره انبارداری بذور می‌باشد. زوال بذر سبب کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شده است ولی با افزایش شدت زوال تا سه روز میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافته و از آن به بعد دوباره روند کاهش داشته است. لهنر و همکاران (۲۰۰۸) نیز در تحقیق خود نشان دادند که در بذور گندمی که تحت زوال مصنوعی در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد قرار گرفتند زوال مصنوعی سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شده که در نهایت قابلیت حیات بذور گندم نیز کاهش یافت (۲۸). این در حالی بود که بذوری که در شرایط رطوبت ۷۵ درصد و دمای ۳۰ درجه نگهداری شده بودند کاهش فعالیت آنزیمی و افزایش تولید پراکسید هیدروژن را نشان ندادند. در نمونه‌های زوال مصنوعی افزایش محتوای رطوبتی بذر سبب افزایش اکسیداسیون آنزیمی در این بذور شده و سبب تسریع خسارات سلولی شده است. این وقایع منجر به کاهش قابلیت حیات بذر می‌گردد (١٤). کک مک و همکاران (۲۰۱۰) نیز بیان نمودند که زوال در بذور یونجه سبب کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شده است (٦). چیو و همکارارن (۱۹۹۵) و گوئل و همکارارن (۲۰۰۳) بیان نمودند که معمولا در شرایط زوال تسریع شده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش می‌یابد (۸ و ١٦). با شروع زوال مصنوعی در بذور میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز نیز شروع به افزایش نمود به‌طوری‌که میزان فعالیت آن‌ها از تیمار شاهد بیشتر شد ولی در مورد دو آنزیم کاتالاز و آسکوربات پروکسیداز این‌گونه نبود. این در حالی است که فعالیت همه آنزیم‌ها در تیمار شاهد بیشتر از تیمار چهار سال انبارداری بود. با توجه به نقش مشترک کاتالاز و آسکوربات پروکسیداز در پالایش پراکسید هیدروژن و کاهش میزان فعالیت آن‌ها در شرایط زوال شدید مشاهده شد که میزان پراکسید هیدروژن در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپید و همچنین افزایش هدایت الکتریکی با افزایش شدت زوال مصنوعی و مدت زمان انبارداری طبیعی افزایش یافت. این در حالی بود که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت موردنظر در این آزمایش نیز با افزایش شدت زوال تا حدی افزایش یافت و از آن به بعد کاهش یافت. افزایش در شدت زوال تا ۵ روز سبب تولید بیشتر پراکسید هیدروژن در بذور شد ولی در

این شدت از زوال تجمع پرکسید هیدروژن و سایر گونه‌های فعال اکسیژن با اثر سیمت خود سبب غلبه آن‌ها بر فعالیت سامانه آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پروکسیداز، آسکوربات پروکسیداز، سوپراکسیدیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز شد (۲۷). آنزیم کاتالاز از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بوده که با افزایش فعالیت در طی زوال بذر می‌تواند خسارت‌های ناشی از زوال را کاهش دهد. با کاهش کارایی این آنزیم‌های پالاینده، تجمع گونه‌های فعال اکسیژن طی زوال بذر افزاش یافته و سبب افزایش خسارت از طریق افزایش وقوع واکنش‌های آمادوری و مایلارد می‌گردد (۱۲). در صورت وجود زمان و شرایط مناسب برای وقوع مکانیسم‌های ترمیمی در بذور زوال یافته ممکن است این بذر توانایی ایجاد یک گیاهچه طبیعی را داشته باشد (۵۰). توکل افشاری و همکاران (۲۰۰۸) بیان نمودند که با آبگیری بذور میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور چشمگیری افزایش یافت. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از جمله مکانیسم‌هایی هستند که میتوانند در پروسه ترمیمی بذور دخالت داشته و با تأثیر رویدادهای زوالگر در بذور مقابله نماید (۵۰). قادری‌فر و همکاران (۲۰۱٤) بیان نمودند که طی زوال بذر کدو تخم کاغذی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد کاهش یافته که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت (۱۱).

در شرایط زوال ۵ روز میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز صفر بوده و نشانه عدم توانایی این بذور در ترمیم صحیح ساختارهای ضروری جهت ادامه رشد می‌باشد. زوال شدید سبب کاهش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بذور زوال یافته سویا شده است (٤۷). در این آزمایش افزایش مدت زمان انبارداری طبیعی و همچنین زوال مصنوعی سبب تغییر در فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز شد. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در انبارداری طبیعی با افزایش مدت زمان انبارداری کاهش یافت. تانیگوچی و همکاران (۱۹۹۰) بیان داشتند که گلیکاسیون غیرآنزیمی در مرحله اول از سری واکنش‌های آمادوری و مایلارد منجر به کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌شود (٤۹). میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پروکسیداز و آسکوربات پروکسیداز در شرایط زوال شدید ٤ و ۵ روز نسبت به انبارداری طبیعی ۲ و ٤ سال کاهش بیشتری داشته است ولی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز در انبارداری ۲ و ٤ سال کمتر از همه تیمارهای زوال مصنوعی بود. این نشان می‌دهد که انبارداری طبیعی سبب وقوع اثرات منفی بیشتری بر فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز شده است. این در حالی است که در مورد آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز این گونه نبوده و در شدت‌های ٤ و ۵ روز زوال مصنوعی میزان فعالیت آنها نسبت به انبارداری طبیعی کاهش بیشتری یافته است. دلیل این اختلاف حساسیت کمتر آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز به دماهای بالا می‌باشد (٤). در شرایط زوال مصنوعی ٤ و ۵ روز به دلیل بالا بودن دمای محیط نسبت به انبارداری طبیعی و به‌دلیل حساسیت بیشتر آنزیم کاتالاز میزان فعالیت این آنزیم تحت این شرایط نسبت به انبارداری طبیعی کاهش بیشتری یافته در حالی‌که در مورد آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بر عکس می‌باشد. فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار شاهد بالاتر از تیمارهای زوال بود زیرا این آنزیم به دماهای بالا در شرایط زوال حساس بوده و دمای بالا سبب کاهش میزان فالیت این آنزیم می‌گردد ولی در مورد آنزیم سوپرکسیددیسموتاز

فعالیت آنزیمی در تیمار شاهد کمتر از تیمارهای زوال ۱، ۲ و ۳ روز بود و این نتایج حساسیت کمتر این آنزیم به دمای بالا را نسبت به آنزیم کاتالاز توجیه می‌نماید. کاهش میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در تیمارهای انبارداری طبیعی نیز به احتمال زیاد به‌دلیل کاهش سطوح گلوتاتیون احیا شده که یک فاکتور مهم در جلوگیری از خسارت اکسیداتیو می‌باشد (۲). به‌نظر می‌رسد در شرایط انبارداری طبیعی میزان گلوتاتیون احیا شده نسبت به زوال مصنوعی یک تا پنج روز کاهش بیشتری داشته و در نتیجه میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در تیمارهای انبارداری طبیعی نسبت به همه تیمارهای زوال مصنوعی کاهش بیشتری داشته است. در شرایط انبارداری طبیعی میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز کمتر از شرایط زوال مصنوعی ۱ تا ۵ روز بود. به هر حال نتایج این مطالعه نشان داد که در شرایط زوال مصنوعی شدید که میزان پراکسیداسیون لیپید و تولید گونه‌های فعال اکسیژن زیاد است کارایی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاهش یافته و در نهایت منجر به کاهش قابلیت حیات بذور می‌گردد. کاهش بیشتر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در شرایط زوال تسریع شده به دلیل دناتوره شدن آن‌ها در دماهای بالای اعمال شده می‌باشد (٤). این نتایج همچنین نشان داد در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در بذور نخود سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز نسبت به سه آنزیم دیگر حساسیت کمتری نسبت به دماهای بالا دارند ولی سه آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و آسوربات پروکسیداز با توجه با دناتوره شدنشان در دماهای بالاتر میزان فعالیت کمتری در شرایط زوال مصنوعی شدید نسبت به انبارداری طبیعی دارند. نتایج این تحقیق مشخص نمود که فعالیت بیشتر دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز طی انبارداری طبیعی و همچنین فعالیت بالای سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز طی زوال مصنوعی حاکی از متفاوت بودن مکانیسم‌های فعالیت آنزیمی در این دو شرایط می‌باشد. با توجه به نقش آنزیم‌های پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در پالایش گونه‌های فعال اکسیژن مشاهده شد که با قرارگیری بذور در معرض تیمار زوال مصنوعی میزان تولید پراکسید هیدروژن در تیمارهای زوال مصنوعی ۱ و ۲ روز نسبت به شاهد کاهش یافته است که این کاهش را می‌توان به افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز تحت این شرایط نسبت داد که سبب پالایش پراکسید هیدروژن شده‌اند. در نتیجه به‌نظر می‌رسد که در شرایط زوال مصنوعی دو آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون و همچنین در شرایط انبارداری طبیعی دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز نقش مهمتری در پالایش گونه‌های فعال اکسیژن دارند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد کاهش درصد جوانه‌زنی بذور نخود طی انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید، هدایت الکتریکی و تولید پراکسید هیدروژن همراه می‌باشد. همچنین زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی سبب تغییر در کارکرد آنتی اکسیدانت‌های غیرآنزیمی و آنزیمی شد. در شرایط زوال ٤ و ۵ روز علاوه‌بر آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی از میزان تولید پرولین و آسکوربیک اسید کاسته شد و این‌ها نشان داد که در شرایط زوال شدید هر دو سامانه آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی بر اثر تجمع گونه‌های فعال اکسیژن آسیب می‌بینند. در سامانه زوال مصنوعی افزایش شدت زوال مصنوعی تا ۵ روز سبب تجمع تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده

و این تجمع سبب غلبه آنها بر سامانه آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شد. آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز در تیمارهای زوال مصنوعی و شاهد نسبت به انبارداری طبیعی فعالیت بیشتری داشته و نقش کلیدی‌تری نسبت به سه آنزیم دیگر در سمیت‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن و تخفیف زوال بذور در این شرایط دارند. این در حالی است که در شرایط انبارداری طبیعی نسبت به زوال مصنوعی ٤ و ۵ روز فعالیت دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز بیشتر بود. این نتایج نشان داد که مکانیسم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت طی زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی متفاوت بوده و به دنبال آن آنزیم‌های کلیدی دخیل در پالایش گونه‌های فعال اکسیژن نیز متفاوت می‌باشند.

منابع

1. Akhter, F.N., Kabir, G., Mannan, M.A., and Shaheen, N.N. 1992. Aging effect of wheat and barley seeds upon germination mitotic index and chromosomal damage. J. Islamic Acad. Sci., 5: 44-48.
2. Alscher, R.G. 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. Plant physiol., 77: 457-464.
3. Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci. Res., 14: 93-107.
4. 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. Physiol. Planta., 97: 104–110.
5. Bates, L.S., Walden, R.P., and Teave, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant. Soil., 39: 205-207.
6. Cakmak, T., Atici, O., Agar, G., and Sunar, S. 2010. Natural aging-related biochemical changes in alfalfa (*Medicago Sativa* L.) seeds stored for 42 years. Int. Res. J. Plant Sci., 1(1): 1-6.
7. Chance, B., and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalase and peroxidases. Methods Enzymol., 2: 764-775.
8. Chiu, K.Y., Wang, C.S., and Sung, J.M. 1995. Lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes associated with accelerated aging and hydration of watermelon seeds differing in ploidy. Physiol. Plant., 94: 441–446.
9. Du, Z., and Bramlage, W.J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. J. Agric. Food Chem., 40: 1566-1570.
10. Fessel, S.A., Vieira, R.D., Cruz, M.C.P., Paula, R.C., and Panobianco, M. 2006. Electrical conductivity testing of corn seeds as influenced by temperature and period of storage. Pesqui. Agropecu. Brasil., 41: 1551–1559.
11. Ghaderi-far, F., Soltani, A., and Sadeghipour, H.R. 2014a. Biochemical changes in pumpkin seeds during ageing: lipid peroxidation and membrane damages. J. Plant Biol., 6(20): 69-112. (In persion)
12. Ghaderi-far, F., Soltani, A., and Sadeghipour, H.R. 2014b. Changes in soluble carbohydrates and reactive oxygen species scavenger enzymes activity in pumpkin seeds during storage in different temperatures and seed humilities. J. Plant Produc., 7(1): 157-179. (In persion)
13. Ghiazdowska, A., Krasuska, U., and Bogatek, R. 2010. Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. Plant. 232: 1397-1407.
14. Gill, S.S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem., 48: 909-930.

15.Goel, A. and Sheoran, I.S. 2003. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. Biologia Planta., 46: 429–434.
16.Goel, A., Coel, A.K., and Sheoran, I.S. 2003. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. J. Plant Physiol., 160: 1093-1100.
17.Govender, V., Aveling, T.A.S., and Kritzinger, Q. 2008. The effect of traditional storage methods on germination and vigor of maize (*Zea mays* L.) from northern KwaZulu-Natal and southern Mozambique. Sout. Afric. J. Bot., 74: 190–196.
18.Hampton, J.G., and Tekrony, D.M. 1995. Handbook of Vigor Test Methods. The International Seed Testing Association, Zurich, 117p.
19.Heath, R.L., and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast: kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Biochem. Biophys., 12: 189-198.
20.Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., and Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends in Plant Sci., 6: 431–438.
21.Hu, D., Ma, G., Wang, Q., Yao, J.H., Wang, Y., and Pritchard, H. 2012. Spatial and temporal nature of reactive oxygen species production and programmed cell death in elm (*Ulmus pumila L.*) seeds during controlled deterioration. Plant Cell. Envi., 35: 2045–2059.
22.ISTA. 2012. International Rules for Seed Testing, Bassersdorf: International Seed Testing Association.
23.Kalpana, R., and Madhava-Rao, K.V. 1996. Lipid changes during accelerated ageing of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) Millsp cultivars. Seed Sci. Technol., 24: 475-483.
24.Kibinza, S., Vinel, D., Côme, D., Bailly, C., and Corbineau, F. 2006. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. Physiol. Planta., 128: 496–506.
25.Kishor, P.B.K. and Dange, V. 1990. Sucrose metabolism in callus-cultures of cotton during growth. Indian J. Exp. Bot., 28: 352–355.
26.Kong, L., Huo, H., and Moa, P. 2015. Antioxidant response and related gene expression in aged oat seed. Frontiers. Plant Sci., 6: 1-9.
27.Kong, Q., Mao, P.S., Yu, X.D., and Xia, F.S. 2014. Physiological changes in oat seeds aged at different moisture contents. Seed Sci. Technol., 42: 190–201.
28.Lehner, A., Mamadou, N., Poels, P., Come, D., Bailly, C., and Corbineau, F. 2008. Change in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activityes in the embryo during aging in wheat grains. J. Cereal Sci., 47(3): 555-565.
29.McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. Seed Sci. Technol., 27: 177-237.
30.Minami, M., and Yoshikawa, H. 1979. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. Clin. Chim. Acta., 92: 337–342.
31.Mira, S., Estrelles, E., and González-Benito, M.E. 2015. Effect of water content and temperature on seed longevity of seven Brassicaceae species after 5 years of storage. Plant Biol., 17: 153–162.
32.Moller, I.M., Jensen, P.E., and Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Ann. Rev. Plant Biol., 58: 459–481.
33.Morrison, D.A., Auld, T.D., Rish, S., Porter, C., and McClay, K. 1992. Patterns of testa-imposed seed dormancy in native Australian legumes. Ann. Botany., 70: 157-163.
34.Murthy, U.M.N., Kumar, P.P., and Sun, W.Q. 2003. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiate* (L.)Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. J. Exp. Bot., 54: 1057-1067.
35.Nakano, Y., and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiol., 22: 867-880.
36.Narayana, U.M., and Wendell, Q.S. 2000. Protein modification by amadori and maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. J. Exp. Bot., 348: 1221-1228.

37.Nkang, A., and Umoh, E.O. 1997. Six month storability of five soybean cultivars as influenced by stage of harvest, storage temperature and relative humidity. Seed Sci. Technol., 25: 93-99.
38.Oliveira, J.T.A., Andrade, N.C., Martins-Miranda, A.S., Soares, A.A., Gondim, D.M.F., and Araujo, J.H. 2012. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Physiol. Biochem., 51: 145–152.
39.Poori, K., Akbari, F., and Ghaderi-far, F. 2013. Response of cotton aged seeds to salinity in germination and seedling growth stages. J. Plant Produc., 2(19): 53-97. (In persion)
40.Priestley, D.A. 1986. Seed ageing. Cornell University Press, Ithava, New York.
41.Qaderi, M.M., Cavers, P.B., and Bernards, M.A. 2003. Pre- and post-dispersal factors regulate germination patterns and structural characteristics of Scotch thistle (*Onopordum acanthium*) cypselas. New Phytol., 159: 263–278.
42.Roozrokh, M., and Ghasemigolezani, K. 1999. Effect of seed ageing on emergence, yield and yield components in tow chickpea cultivars under complete and limited irrigation. M.Sc. thesis in agronomy. Tabriz University. Tabriz, Iran. (In persion)
43.Sgherri, C.L.M., Liggini, B., Puliga, S., and Navari-Izzo, F. 1994. Antioxidant system in Sporoblus stapfianus. Changes in response to desiccation and rehydration, Phytochem. 35: 61-565.
44.Soltani, A., Gholipoor, M., and Zeinali, E. 2006. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. Env. Exp. Bot., 55: 195-200.
45.Spanò, C., Castiglione, M.R., Bottega, S., and Grilli, I. 2004. Natural ageing of wheat seeds. Current Top. Plant Biol., 5: 89–94.
46.Sun, W.Q., and Leopold, A.C. 1994. Glassy state and seed storage stability: A viability equation analysis. Ann. Bot., 74: 601-604.
47.Sung, J.M., and Chiu, C.C. 1995. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. Plant Sci., 110: 45-52.
48.Tahmasebi, B., Ghaderi-far, F., Sadeghipour, H.R., and Galeshi, S. 2015. Effect of accelerate germination traits, lipids and lipid hydroperoxide in sunflower seeds. J. Plant Proc. Func., 4(12): 73-83. (In persion)
49.Taniguchi, N., Kinoshita, N., Arai, K., Iizuka, S., Usui, M., and Naito, T. 1989. Inactivation of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase through non-enzymatic glycosylation. Prog. Clinic. Boil. Res., 304: 277-290
50.Tavakolafshari, R., Ghasem, F., Majnoonhosseini, N., Alizadeh, H., and Bihamta, M.R. 2008. Effect of seed ageing on germination traits and catalase and peroxidase antioxidant activity in barley genotypes. J. Iranian Agric. Sci., 37(2): 337-346. (In persion)
51.Tina, X., Song, S., and Lei, Y. 2008. Cell death and reactive oxygen species metabolism during accelerated ageing of soybean axes. Russ. J. Plant Physiol., 55: 33-40.
52.Wojtyla, Ł., Garnczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L., and Jurga, S. 2006. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. J.Plant Physiol., 163: 1207–1220.
53.Zamani, A., Sadatnoori, S.A., Tavakolafshari, R., Irannejad, H., Akbari. Gh.A., and Tavakoli, A. 2011. Atudy on lipid peroxidation and activity of some antioxidant enzymes in safflower seeds under accelerated and natural ageing. Iranian J. Crop Sci., 41(3): 545-555. (In persion)
54.Zhang, M., Zhuo, J.J., Wang, X., Wu, S., and Wang, X.F. 2010. Optimizing seed water content: relevance to storage stability and molecular mobility. J. Integ. Plant Boil., 52: 324–33.