"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد ششم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۶
(ص ۱۹۸-۱۸۵)

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 6, No.: 2, Autumn and Winter 2018
(pp: 185-198)
DOI: 10.22034/ijsst.2018.116568

بررسی اثر پرایمینگ بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بذر ذرت هیبرید سینگل کراس ۷۰٤ تحت تنش خشکی

سیده رقیه خاتمی[1*]، محمد صدقی[2]، رئوف سید شریفی[2]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته علوم وتکنولوژی بذر، دانشگاه محقق اردبیلی
۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه محقق اردبیلی
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۱۷)

چکیده

در پژوهش حاضر اثر انواع پرایمینگ برمیزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت شامل کاتالاز (CAT)،آسکوربات‌پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسمیوتاز (SOD)، مالون دی‌آلدئید (MDA) و گلوتاتیون ردکتاز (Gred) تحت تنش خشکی برای بذور ذرت هیبرید سینگل کراس ۷۰۴ بررسی شد. تیمارهای آزمایش، شامل تیمارهای خشکی در ۴ سطح (۰، ۳-، ۶-و ۹- بار) و پرایمینگ (هورمون پرایمینگ، هیدروپرایمینگ، اسموپرایمینگ، اسید آسکوربیک و شاهد) بودند. سپس صفات درصد جوانه‌زنی، بنیه گیاهچه و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که اثر متقابل تیمار خشکی و پرایمینگ بر تمامی صفات به جز درصد جوانه‌زنی معنی‌دار بود. بیشترین بنیه گیاهچه (۱۵/۹۹۶) در تیمار پرایمینگ شاهد و سطح خشکی شاهد به دست آمد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۳۵ میکرومول بر دقیقه در میلی گرم پروتئین) در پرایمینگ با اسیدآسکوربیک و سطح خشکی ۹- باردیده شد. همچنین حداکثر میزان آسکوربات پراکسیدازدر تیمار هورمون پرایمینگ و سطح خشکی ۹- بار به دست آمد در حالی که کم‌ترین فعالیت آن در سطح خشکی شاهد و تیمار اسموپرایمینگ مشاهده شد.بیشترین میزان مالون دی آلدئید در سطح خشکی ۹- بار و در پرایمینگ شاهد به دست آمد. بالاترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتازدر سطح خشکی ۹- بار بود. همچنین بیشترین میزان گلوتاتیون ردکتاز در پرایمینگ با ویتامین c و سطح خشکی ۹- بار به دست آمد.

کلمات کلیدی: پرایمینگ، خشکی، بنیه گیاهچه، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت

Study on the effect of priming on the activity of antioxidant enzymes in hybrid maize single cross 704 under drought stress

S.R. Khatami[1*], M. Sedghi[2], R. Seyed Sharifi[2]

1- Former M.Sc. student of Seed Science and Technology, University of Mohagheghardabilli, Ardabili
2-Associate Prof., Dept. of Agronomy, University of Mohaghegh Ardabili
(Received: Mar. 10, 2017 – Accepted: Jun. 07, 2017)

Abstract

In this research effect of priming types was investigated on the activity of antioxidant enzymes including Catalase (CAT), Ascorbate peroxidase (APX), Superoxide dismutase (SOD), Malone dialdehyde (MDA) and Gluthation reductase (Gred) in hybrid maize single cross 704 under drought stress. Treatments were drought at 4 levels (0, -3, -6 and -9 bar) and priming (Hormone, hydro, osmo, ascorbic and control). Germination percentage, seedling vigor and the activity of antioxidant enzymes were measured. Results showed thatinteraction of drought and priming was significant an all traits except of germination percentage. The highest seedling vigor (15.996) obtained from control condition. The highest CAT activity (35 µmol min^{-1} mg^{-1}) observed in ascorbic acid priming at -9 bar drought stress. Also, the highest APX activity was related to hormone priming and -9 bar. While the lowest activity observed in control drought and osmo-priming. The highest amount of MDA achieved in -9 bar and control priming. The highest SOD activity observed in -9 bar. The highest Gred activity obtained by ascorbic acid priming at -9 bar.

Key words: priming, drought, seedling vigor, antioxidant enzymes

* Email: agric.khatami@gmail.com

مقدمه

ذرت با نام علمی *Zea mays* از تیره غلات، گیاهی یک ساله (Movahhedi Dehnavi, 2003)، تک‌لپه و ساقه بلند است که اغلب به منظور تولید دانه زراعت می‌شود و در سطح جهانی نیز یک محصول غله‌ای مهم در تغذیه‌ی انسان به شمار می‌رود (Kazemi Arbat, 2007). کشور ما دارای آب و هوای خشک و نیمه خشک است و کمبود آب یکی از مشکلات اساسی کشاورزی ایران به شمار می‌آید. در مناطق خشک و نیمه خشک فراهم ساختن شرایط مطلوب به ویژه تامین آب کافی در دوره‌ی رشد ذرت با مشکل جدی روبرو است، بنابراین مطالعه در مورد کاهش رشد و جوانه‌زنی در شرایط تنش خشکی ضروری به نظر می‌رسد (Manochehrifar, 2013).

تنش خشکی یکی از فاکتورهای محیطی تهدید کننده (و محدود کننده) بسیار مهم در تولید محصولات کشاورزی است (Vazan *et al.*, 2002). تنش خشکی هنگامی رخ می‌دهد که بارندگی در طول یک دوره مشخص رخ ندهد و این زمان به نحوی باشد که موجب تخلیه رطوبت خاک شود و به گیاه خسارت وارد کند. طول این دوره بستگی به نوع گیاه، خصوصیات مربوط به نگهداری آب، وضعیت خاک و شرایط محیطی دارد (Moaveni and Changizi, 2007). دراین میان افزایش سرعت جوانه‌زنی اهمیت زیادی در بهبود استقرار گیاهان زراعی دارد مورگو و همکاران (Murugu *et al.*, 2003).

جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌ها در چرخه زندگی گیاه مراحل بحرانی هستند و استقرار موفق گیاه وابسته به جوانه‌زنی سریع تحت شرایط تنش بستگی دارد (Windauer, 2007). همبستگی‌های گوناگونی بین تنش کمبود آب و میزان آنتی‌اکسیدانت‌های محلول در آب درون سلولی گزارش شده است (Salin, 1991). سیرم و همکاران (Sairam *et al.*, 1997) بیان کردند که در شرایط تنش خشکی فعالیت پراکسیداز نسبت به شاهد در گندم افزایش یافت و میزان این افزایش در ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی بیشتر بود و شاخص پایداری کلروفیل بیشتری داشت و خسارت وارده بر غشای سلولی آن‌ها کم‌تر بود. پراکسیداز در مقاومت به خشکی و گرما نقش دارد (Ito *et al.*, 1991). جباری و همکاران (Jabari *et al.*, 2006) نیز در بررسی ارقام گندم تحت تنش شدید خشکی با اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانت پراکسیداز نشان دادند که با افزایش سطح تنش خشکی سطح فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد. جانگ (Jung, 2004) عنوان کرد که فعالیت پراکسیداز در برگ‌های بالغ بر اثر تنش خشکی تا ۳ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت. ماریا و همکاران (Maria *et al.*, 2002) در تحقیقی گزارش کردند که تنش خشکی موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسمیوتاز در برگ و ساقه لاین‌های خالص یونجه‌های چندساله و یونجه‌های تراریخته شده است. آن‌ها همچنین، نشان دادند که تنش خشکی در بیشتر لاین‌ها موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در برگ‌ها و کاهش فعالیت آن در ریشه‌ها می‌شود.

دولت آبادیان و همکاران (Dolatabadian *et al.*, 2009) در تحقیق خود بر روی ذرت دانه‌ای چنین بیان کردند که در شرایط تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش یافت و اسید آسکوربیک به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانتی خود از تخریب کلروفیل جلوگیری کرد و به طور غیرمستقیم سبب افزایش آن شد و اثرات مضر حاصل از تنش را کاهش داد و سبب بهبود رشد گیاه شد. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و همچنین سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش خشکی مشاهده شده است (Zhang and Kirkham, 1994). چنین به نظر می‌رسد که در شرایط تنش خشکی، افزایش غلظت پراکسید هیدروژن توسط فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز برای تجزیهٔ پراکسید هیدروژن می‌گردد (Bowler *et al.*, 1992). کاهش مواد آنتی‌اکسیدانت مانند آسکوربات بر اثر تنش در ذرت

گزارش شده است (Jiang and Huang, 2001).

پرایمینگ یکی از روش‌های افزایش سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی است. به آبگیری کنترل شده بذرها قبل از کاشت پرایمینگ گفته می‌شود که طی آن مراحل جذب آب طی می‌شود (McDonald, 2000)، و به بذرها اجازه داده می‌شود تا آب جذب کنند، به طوری که مراحل اولیه‌ی جوانه‌زنی (شامل فعال شدن آنزیم‌ها) انجام شود، ولی ریشه‌چه خارج نشود. بعد از تیمار پرایمینگ، بذرها خشکانده می‌شوند و همانند بذرهای بدون تیمار (شاهد) ذخیره و کشت می‌شوند (McDonald, 1999). چندین روش مختلف برای پرایمینگ وجود دارد که هر روش دارای نقاط قوت و ضعفی است و بسته به نوع گیاه و مرحله رشد آن، غلظت و میزان پرایمینگ، تاثیرگذاری مختلفی دارد (Ashraf and Foolad, 2005). پرایمینگ یکی از تکنیک‌های بهبود بذر است که موجب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی و افزایش سبز شدن و هم همچنین دامنه جوانه‌زدن بذرها در شرایط محیطی تنش‌زا از قبیل خشکی می‌شود (Akramgaderi *et al*., 2008). بر اساس گزارش صدقی و همکاران (Sedghi *et al*., 2012)، محلول پاشی اسید جیبرلیک بر روی بوته همیشه بهار می‌تواند موجب کاهش فعالیت آنزیم SOD شود، همچنین بیان کردند که این امر نشان دهنده این است که اسید جیبرلیک توانایی خنثی کردن شرایط تنش را دارد.کروزدوالهو (Cruzde Carvalho, 2008) مشاهده کرد که طی عمل پرایمینگ آنتی اکسیدانت‌هایی مانند اسکوربات و گلوتاتیون بذر افزایش می‌یابد و از فعالیت پراکسیدازها که موجب تخریب لیپیدها می‌شوند، جلوگیری می‌کنند.طی تنش، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت گیاهان از قبیل کاتالاز، سوپراکسید دیسمیوتاز و پلی فنول اکسیداز فعال می‌شوند که این ترکیبات آنتی اکسیدانتی، انواع اکسیژن فعال[1] را تجزیه می‌کنند، در نتیجه ظرفیت آنتی اکسیدانتی گیاهان با تحمل تنش در گیاهان، رابطه مستقیم دارند (Mittler, 2002).

قاسمعی گلعذانی و همکاران (Ghassemi-Golezani *et al*., 2008) گزارش کردند که سرعت جوانه‌زنی بذر عدس به طور معنی‌داری با اسموپرایمینگ افزایش یافت، به طوری که بذور پرایم شده با آب بیشترین درصد جوانه‌زنی را داشتند.کید و وست (Kidd and West, 1918) برای اولین بار ثابت کردند که خیساندن بذرها برای دوره‌های زمانی کوتاه بر درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها در مراحل بعدی اثر مطلوبی دارد و این اثر مثبت پس از خشک کردن مجدد بذر نیز حفظ می‌شود. این حقیقت که پرایمینگ اسمزی میزان جوانه‌زنی را افزایش می‌دهد، به خوبی ثابت شده است (Rohi *et al*., 2011). پرایمینگ بذر با ویتامین c و همچنین هیدروپرایمینگ موجب افزایش فعالیت کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز می‌گردد (Burguieres *et al*., 2007). هورمون‌های رشد گیاه، در بهبود جوانه‌زنی و به دنبال آن رشد و افزایش عملکرد در شرایط عادی و تنش، نقش چشم‌گیری دارند (Ashraf and Foolad, 2005). هدف از این مطالعه، بررسی اثر بهبود دهنده انواع پرایمینگ بر فعالیت آنزیمی بذر ذرت هیبرید سینگل کراس ۷۰۴ تحت تنش خشکی بود.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این پروژه ابتدا بذرهای ذرت از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان اردبیل در مغان که تولید سال ۱۳۹۲ بود، تهیه گردید. سپس بذور به مدت ۲۴ ساعت در محلول‌های ۵ سطح پرایمینگ (شاهد، هیدرو پرایمینگ، اسمو پرایمینگ، هورمون پرایمینگ و ویتامین پرایمینگ) و ۴ سطح تنش اسمزی حاصل از پلی اتیلن گلایکول ۶۰۰۰ (در غلظت‌های صفر، ۳-، ۶- و ۹- بار) و دمای آزمایشگاه قرار داده شد. محلول‌های اسمزی براساس فرمول میشل و کافمن (Michel and Kaufmann, 1973) تهیه شد. محلول هورمون پرایمینگ، محلول ۲۰ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین و ویتامین پرایمینگ با اسید اسکوربیک ppm ۱۰۰ بود. پس

[1] ROS

از اعمال پرایمینگ با محلول‌های مورد نظر بذور به ظروف کشت برای انجام آزمون جوانه‌زنی منتقل و سطوح تنش خشکی بر روی آن‌ها اعمال گردید. اسمو پرایمینگ با PEG 6000 انجام شد که با حل کردن ۲۵۳ گرم پلی‌اتیلن گلایکول در یک لیتر آب مقطر محلول مورد نظر بدست آمد. زمان پرایمینگ ۱۸ ساعت و بذرهای مربوط به هر تیمار تنش درون ۲۵۰ میلی لیتر محلول پرایمینگ قرار گرفتند. ۲۵ بذر پرایم شده ذرت در پتری روی یک کاغذ صافی قرار و سپس یک لایه کاغذ صافی دیگر روی آن‌ها گذاشته شد. برای آزمون رشد گیاهچه به مدت ۷ روز طبق قوانین انجمن بین المللی آزمون بذر درون ژرمیناتور (شرکت ایران خود ساز مدل IKH. R) انجام شد (Anonymous, 2010). سپس بذرهای جوانه‌زده هر روز شمارش و میزان رطوبت آنها هر ۲۴ ساعت یک بار مورد بررسی قرار گرفت. صفات مورد اندازه‌گیری شامل شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه بذر، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و میزان پراکسیداسیون لیپیدی بود. از میان بذرهای جوانه‌زده در هر پتری ۱۰ عدد گیاهچه عادی جدا گردید و داخل کیسه‌های پلاستیکی سربسته تا زمان اندازه‌گیری در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شدند.

برای به دست آوردن درصد جوانه‌زنی، ابتدا بذرها به مدت ۲۴ ساعت در محلول‌های مورد نظر خیسانده شدند، پس از طی شدن مدت زمان مورد نظر بذور از محلول‌ها خارج و چندین بار با آب مقطر شسته شدند. از هر تیمار ۲۵ عدد بذر در پتری کشت و در ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. هر روز راس ساعت ۱۰ صبح آزمایش مورد بررسی قرار گرفت و شمارش بذور جوانه‌زده به صورت روزانه تا پایان دوره‌ء آزمایش (۷ روز) از هر بستر کشت مربوط به هرتیمار به طور مجزا انجام شد. معیار جوانه‌زنی یک بذر، رشد ریشه‌چه و خروج آن به میزان ۲ میلی‌متر از پوسته بذر در نظر گرفته شد (Kafi *et al*., 2005). آب تبخیر شده از سطح پتری‌ها در طول مدت آزمایش با آب مقطر جایگزین شد. درصد جوانه‌زنی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (ISTA, 2008):

$$GP= 100. (NG/NT) \quad \text{(رابطه ۱)}$$

NG= تعداد بذور جوانه‌زده، NT= تعداد کل بذور

بنیه گیاهچه (SV) با استفاده ازاز روش عبدالباکی و آندرسون (Abdul-Baki and Anderson, 1973) از رابطه ۲ به دست آمد:

$$SV=(R+S)\times GP \quad \text{(رابطه۲)}$$

R = وزن خشک ریشه‌چه، S=وزن خشک ساقه‌چه، GP= درصد جوانه‌زنی

بعد از اتمام دوره، نمونه برداری برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پراکسیداسیون لیپیدی انجام گرفت (Kusvuran *et al*., 2013; Sevengor *et al*., 2011). برای استخراج عصاره حاوی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ۰/۵ گرم از هر گیاهچه پس از انجماد در نیتروژن مایع داخل هاون چینی که از قبل در یخچال نگهداری شده بود به خوبی ساییده شد. سپس، با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد حاوی ۰/۵ میلی‌مولار EDTA هموژنیزه گردید. هموژن‌ها به اپندورف‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و سپس، در داخل سانتریفیوژ یخچال‌دار قرارداده شد ودر ۱۵۰۰۰ دوردردقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. برای پیش‌گیری از اثر مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها، روشناور حاصل به سه قسمت تقسیم و تا زمان تعیین فعالیت آنزیم‌های فوق در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Sairam *et al*., 2002).

برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز از روش ابی (Abi, 1984) استفاده گردید. نمونه‌های آنزیمی از ترکیب کردن ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسیدهیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به دست آمد که در ادامه حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه

با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. نمونه بلانک حاوی تمام مواد استفاده شده به جز عصاره آنزیمی استخراج شده بود.میزان پراکسید هیدروژن تجزیه شده با استفاده از ضریب خاموشی (ε=۳۹/۴$Mm^{-1}cm^{-1}$) محاسبه شد. فعالیت ویژه آنزیم بر اساس میکرومول پراکسیدهیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز به روش جیانوپلیتیس و ریز (Giannopolitis and Ries, 1977) انجام گردید. اساس اندازه‌گیری این آنزیم مهار واکنش رادیکال سوپراکسید با نیتروبلوتترازولیوم و ممانعت از تشکیل سوپراکسید-نیتروبلوتترازولیوم توسط این آنزیم است. بافرهای مورد استفاده در اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز به ترتیب زیر بود:

۱: بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین ۱۳mM و نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۷۵ Mμ در pH=۷.۲: محلول ریبوفلاوین ۰/۱۲ mM

نمونه‌های آنزیمی از ترکیب کردن ۸۸۵ میکرولیتر از بافر۱، ۱۵ میکرولیتر بافر۲ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. میزان جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز ($Unit.mg^{-1}$) =

$$\frac{100\left[-\frac{(OD\ Control - OD\ Sample)}{OD\ Control} \times 100\right]}{50}$$

برای اندازه‌گیری آنزیم اسکوربات پراکسیداز، از روش ناکانو و آسدا (Nakano and Asada, 1981) با اندکی تغییر استفاده شد. ۲۵۰ میلی‌گرم بافت گیاهچه با استفاده از بافر استخراج حاوی ۱۰۰ میلی‌مول فسفات پتاسیم در pH=۷ و ۲/۲ میلی‌مول EDTA در یک هاون در ظرف یخ هموژن گردید. مخلوط هموژن به مدت ۵ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و از محلول رویی برای سنجش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بهره گرفته شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش‌گر شامل ۱۰۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم در pH=۷، ۰/۲۲ میلی‌مول آسکوربات و ۰/۳ میلی‌مول H_2O_2 و عصاره استخراج شده آنزیمی در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و کاهش میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به علت انجام فرآیند اکسیداسیونی اسیدآسکوربیک توسط H_2O_2 با استفاده از ضریب خاموشی ۲/۸ mM-1cm-1 تعیین گردید.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز طبق روش استر بائور و گریل (Esterbauer and Grill, 1978) و با اندکی تغییر انجام گرفت. مخلوط آزمایش حاوی ۱۰۰ میلی مولار Tris HCL (pH=۷/۸)، ۲ میلی‌مولار EDTA، ۰/۱ میلی‌مولار NADPH، ۰/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) و ۵۰ میکرو مول از عصاره آنزیمی تهیه شده بود که در مجموع به حجم ۲ میلی‌لیتر رسید. واکنش با اضافه کردن NADPH آغاز شد و پس از آن مقدار جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر ثبت گردید. فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز بر حسب تغییرات واحد جذب در ثانیه به ازای میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

میزان مالون دی آلدئید با استفاده از روش مک کوئی و شتی (McCue and Shetty, 2002) بدست آمد. در لوله‌های آزمایش، ۲۰۰ میلی‌لیتر از بافت هموژن با ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. ۵۰۰ میلی‌لیتر از تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰٪ با ۱ میلی‌لیتر از تیوباربیتوریک اسید ۱۰ میلی‌مولار مخلوط شد. لوله‌های آزمایش به انکوباتور ۱۰۰ درجه سانتی‌گرادبه مدت ۳۰ دقیقه منتقل شد. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مقدار جذب روشناور در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و غلظت MDA بر اساس جذب مولی و بر حسب $mmolg^{-1}FW$ بیان شد. مقدارMDA با استفاده از ضریب خاموشی $155\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه شد.

بذرهای ذرت مورد استفاده در این آزمایش ذرت رقم ۷۰۴ بود که از شرکت پاکان اصفهان بذر تهیه شد. به منظور تجزیه آماری و مقایسه میانگین‌ها پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، از نرم‌افزار SAS9.1 و SPSS18 و Excel استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون

دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌های این آزمایش نشان داد که اثر متقابل خشکی و پرایمینگ بر بنیه گیاهچه (SV) معنی‌دار بود (جدول۱). همچنین اثر متقابل تیمارها بر تمام صفات به جز درصد جوانه‌زنی معنی دار بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایش بر صفات اندازه گیری شده در ذرت

Table 1- Analysis of variance for the effects of experimental traits on the measured characteristics in Corn

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)						
		گلوتاتیون ردوکتاز Glutathione Reductase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbat peroxidase	کاتالاز Catalase	سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase	مالون دی آلدئید Malone dialdehide	بنیه گیاهچه Seedling vigor	درصد جوانه‌زنی Germination Percentage
تنش خشکی Drought Stress	3	0.0047**	24958.5**	14.24**	0.075**	0.0047**	14.63**	69.75^{ns}
پرایمینگ Priming	4	0.0005**	29479.5**	15.04**	0.037**	0.0005**	7.72**	15.4^{ns}
خشکی×پرایمینگ drought × priming	12	0.0001**	8885.2**	0.346**	0.001**	0.0001**	25.63**	34.86^{ns}
خطا Error	40	0.0003	28.1	0.08	0.0004	0.0003	2.64	50.86
ضریب تغییرات (٪) C.V.(%)		2.147	0.197	0.882	1.38	0.297	13.86	8.101

ns، *و**به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی داری در سطح احتمال ۵ درصدو ۱ درصد.

ns, *, **. Not significant, significant at 5 % and 1% probability levels, respectively.

قوی‌ترین گیاهچه‌ها (۱۵/۹۹۶) در تیمار پرایمینگ شاهد و سطح خشکی شاهد به دست آمد که با هورمون پرایمینگ و اسیدآسکوربیک تفاوتی نداشت و کم‌ترین میزان آن (۷/۰۷) در تیمار بدون پرایمینگ با سطح خشکی ۹- بار دیده شد (جدول ۲). کیفیت بذر (شامل قوه زیست و بنیه بذر) از جمله عوامل تاثیرگذار بر عملکرد گیاهان زراعی در شرایط مزرعه است، به طوری که تهیه‌ی بذرهایی با استانداردهای بالای قدرت همواره مورد نظر محققان بوده است. از طرف دیگر، ارتباط بین نتایج آزمون‌های بنیه بذر در آزمایشگاه با وضعیت سبزشدن و استقرار گیاه در مزرعه نیز مورد توجه محققان بوده است. بنیه بذر از طریق یکنواختی سبزشدن در مزرعه و همچنین، رشد گیاهچه‌ی حاصل از آن عملکرد را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Basra *et al*., 2003). گزارش‌های مختلفی مبنی بر رشد بهتر گیاهچه در بذور با قدرت بالا وجود دارد. عوامل تنش‌زای محیطی مانند کمی و زیادی رطوبت، دماهای نامناسب، عوامل بیماری‌زا و شوری، جوانه-زنی بذر و سبزشدن گیاهچه‌ها را به شدت تهدید می‌کند و تصور می‌شود که بذرهای با بنیه بالا می‌توانند با اطمینان بیشتری این مرحله را پشت سر بگذارنند (De Figueiredo *et al*., 2003). بنیه بذر بالا (مانند سرعت ظهور بالا، یکنواختی و پوشش کامل در سبزشدن) در گیاهچه‌های قوی، با توجه به کوتاه کردن زمان کاشت

تا کامل کردن پوشش زمین منجر به استقرار مناسب ساختار کانوپی و به حداقل رساندن رقابت بین گیاهی می‌شود که این امر نیز منجر به پتانسیل عملکرد دانه بالاتر و به حداکثر رساندن محصول در گندم می‌گردد (Soltani *et al*., 2001).

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر روی پراکسیداسیون لیپیدها و تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدانت گیاهچه ذرت (هیبرید سینگل کراس۷۰۴)، در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس این جدول، اثر متقابل تیمارهای خشکی و پرایمینگ بر تمام صفات اندازه‌گیری شده و مقدار مالون دی‌آلدئید معنی‌دار بود.

کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۲۹/۸۳ میکرومول بر دقیقه در میلی گرم پروتئین) در تیمار شاهد بدون پرایم و بدون تنش خشکی دیده شد و بیشترین میزان فعالیت آن (۳۵ میکرومول بر دقیقه در میلی گرم پروتئین) در پرایمینگ با اسیدآسکوربیک و سطح خشکی ۹- بار مشاهده شد (جدول ۲) .آنزیم کاتالاز (CAT) به طور مستقیم موجب تجزیه پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) در پراکسیزوم می‌شود (Kazemi Arbat, 2007). محققان معتقدند که فعالیت این آنزیم در تنش‌های شدید افزایش می‌یابد و در تنش‌های ملایم پاکسازی H_2O_2 بر عهده چرخه گلوتاتیون- آسکوربات است (Bailly, 2004). حداکثر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۲۸۰۴/۳ نانومول بر دقیقه در میلی گرم) در تیمار هورمون پرایمینگ و سطح خشکی ۹- بار به دست آمد. در حالی که کمترین فعالیت آن (۲۶۱۱/۶ نانومول بر دقیقه در میلی گرم) در سطح خشکی شاهد و تیمار اسموپرایمینگ مشاهده شد (جدول ۲). آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در چرخه گلوتاتیون آسکوربات با استفاده از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون موجب تجزیه پراکسیدهیدروژن می‌شود (Noctor and Foyer, 1998) و کاهش خسارت ناشی از پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید در طی واکنش هابر وایس می‌شوند (McDonald, 1999; Sung, 1996). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت به کاهش میزان (MDA) و خسارت تنش در سلول‌ها، به گیاهان کمک می‌کند (Murugu *et al*., 2003). حداکثر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز (۱/۷۳ واحد بر میلی گرم پروتئین) در سطح خشکی ۹- بار و تیمار اسید آسکوربیک به دست آمد و با هورمون پرایمینگ تفاوت معنی‌داری نداشت. کم‌ترین فعالیت این آنزیم در سطح خشکی شاهد و تیمار اسموپرایمینگ است (جدول ۲).

تنش خشکی علت اصلی کاهش رشد گیاهان و عملکرد آن‌ها در مناطق نیمه خشک محسوب می‌شود که موجب تحریک گیاه به یکسری پاسخ‌های دفاعی در سطوح مختلف مولکولی، سلولی و فیزیولوژیکی می‌شود. علت بهبود جوانه‌زنی در بذرهای تحت تنش خشکی طی پرایمینگ مجموعه‌ی از مکانیسم‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی می‌باشد که یکی از آنها آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است، پرایمینگ با بهبود سیستم‌های ترمیم سلولی می‌تواند با فعال کردن این آنزیم‌ها رادیکال‌های تولید شده ناشی از تنش خشکی را پاک‌سازی کند (Pérez-Amador *et al*, 2000; Ohe *et el*, 2005). تنش‌ها از جمله کمبود آب در گیاه موجب افزایش مقادیر رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) از قبیل آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل ($HO^{\cdot}$) و اکسیژن منفرد ($^1O_2$) منجر به تنش اکسیداتیو را ایجاد می‌کند (Ariano *et al*., 2005; Bohnert and Jensen, 1996). این مولکول‌های فعال موجب صدمه به ماکرومولکول‌ها و نیز ساختار سلول می‌شوند یا اینکه به عنوان مولکول منفرد موجب فعال شدن سلسله پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌گردند. گیاهان از دو سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی برای دفاع در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال استفاده می‌کنند. سیستم آنزیمی شامل آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسمیوتاز، کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز است که نقش موازی و مشابهی را در سیستم دفاعی گیاه ایفا می‌کنند (Ariano *et al*., 2005).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات سطوح تنش خشکی و پرایمینگ بر صفات مرتبط با جوانه زنی ذرت

Table 2- The mean comparison of different drought stress levels and priming on germination traits of corn

Mean میانگین							
تنش خشکی (بار) Drought stress (Bar)	پرایمینگ Priming	گلوتاتیون ردوکتاز (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) Glutathione Reductase ($\mu molmin^{-1}mgprotein$)	مالون دی آلدئید (نانومول بر میلی گرم ماده تر) Malone dialdehide (nmolmg-FW)	سوپراکسید دیسموتاز (واحد بر میلی گرم بر پروتئین) Superoxide dismutase ($Umg^{-1}protein$)	آسکوربات پراکسیداز (نانومول بر دقیقه در میلی گرم) Ascorbat peroxidase ($nmolmin^{-1}mg$)	کاتالاز (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) Catalase ($\mu molmin^{-1}mgprotein$)	بنیه گیاهچه Seedling Vigor
0	شاهد Control	0.164j	1860ij	1.43i	2630.3l	29.83i	15.996a
	هیدروپرایمینگ Hidroprimin	0.162j	1863hij	1.45ki	2684h	31.23ef	11.372def
	اسموپرایمینگ Osmopriming	0.171i	1857j	1.41i	2611.6m	30.53h	8.225f
	هورمون پرایمینگ Hormon priming	0.16 j	1863hij	1.52ghi	2709f	31.86d	15.229a
	اسید آسکوربیک Ascorbic acid	0.16j	1864hij	1.51hij	2700g	31.63de	15.165a
-3	شاهد Control	0.174hi	1872.6gh	1.45jk	2652.6j	30.63gh	9.12ef
	هیدروپرایمینگ Hidropriming	0.18gh	1871.6gh	1.52ghi	2713f	31.73d	11.82bcde
	اسموپرایمینگ Osmopriming	0.183fg	1876.3g	1.5ij	2640.6k	30.93fgh	11.536cde
	هورمون پرایمینگ Hormon priming	0.188def	1879j	1.6bcd	2765d	32.8c	9.053ef
	اسید آسکوربیک Ascorbic acid	0.191cde	1869.3ghi	1.56def	2771.3d	32.83c	14.537ab
-6	شاهد Control	0.182fg	2039.6e	1.5ij	2668i	30.96fgh	10.648ef
	هیدروپرایمینگ Hidropriming	0.195cd	2031.3e	1.56efg	2740e	32.1d	10.857def
	اسموپرایمینگ Osmopriming	0.185efg	2031e	1.53fghi	2710.3f	31.06fg	10.665ef
	هورمون پرایمینگ Hormon priming	0.197c	2015.3f	1.63b	2783c	33.5b	14.35abc
	اسید آسکوربیک Ascorbic acid	0.205b	2010.6f	1.6bc	2793.3b	33.46b	8.845ef
-9	شاهد Control	0.188def	2365.6a	1.54fgh	2684.3h	32.1d	15.079a
	هیدروپرایمینگ Hidropriming	0.203b	2346.3b	1.61bc	2770.3d	33.1bc	9.161ef
	اسموپرایمینگ Osmopriming	0.196c	2356ab	1.59cde	2746e	31.86d	13.76abcd
	هورمون پرایمینگ Hormon priming	0.217a	2278d	1.71a	2804.3a	34.7a	10.401ef
	اسید آسکوربیک Ascorbic acid	0.223a	2290.3c	1.73a	2801ab	35a	8.779ef

میانگین‌های دارای حرف مشابه در هر ستون، طبق آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح پنج درصد دارای اختلاف معنی دار نیستند.

Means in each column followed by the same letters are not significantly different at α=0.05 (Duncan's multiple-range test).

اکسیژن‌های واکنش پذیر محصول تنش یونی و اسمزی شدید هستند که موجب بهم ریختن ساختار غشا و مرگ سلول می‌شوند (Bohnert and Jensen, 1996). گیاهان در مقابله با این اکسیژن‌های واکنش‌پذیر، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت خاص از قبیل کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و سوپراکسید دیسمیوتاز، را افزایش می‌دهند (Liang, 1999). دمیرکایا و همکاران (Demir Kaya *et al*., 2006) گزارش کردند که پرایمینگ بذر می‌تواند تحت شرایط تنش‌های محیطی سبب بهبود روند واکنش‌های فیزیولوژیکی در بذر شود و در نتیجه مقاومت به تنش‌های محیطی در این بذور را به طور قابل ملاحظه‌ای ارتقا دهد.در بذور پرایم شده‌ای که در بستر خود با شرایط تنش‌زا رو برو هستند تخریب ماکرومولکول‌ها، اسیدهای هسته‌ای و واکنش‌های اکسیداتیو که منجر به تولید مواد سمی و خسارت‌زایی چون رادیکال‌های آزاد می‌شود به مراتب کمتر از بذرهای تیمار نشده است. طی تنش، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت گیاهان از قبیل کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسمیوتاز و پلی فنول اکسیداز فعال می‌شوند که این ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی، گونه‌های اکسیژن فعال را تجزیه می‌کنند، در نتیجه ظرفیت آنتی اکسیدانتی گیاهان با تحمل تنش در گیاهان، رابطه مستقیم دارند (Mittler, 2002). برای مثال موسوی و همکاران (Moosavi *et al*., 2009) نشان دادند که اسموپرایمینگ بذرهای گل همیشه بهار با پلی‌اتیلن گلایکول، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، به ویژه کاتالاز و پراکسیداز را در مقایسه با بذرهای پرایم نشده بالا برد. افزایش سنتز آنزیم‌های آنتی اکسیدانت تحت شرایط تنش توسط بولر (Bowler, 1992) و آنانیوا و همکاران (Ananeiva *et al*., 2002) نیز گزارش شده است. گیاهان در شرایط عادی نیز رادیکال‌های اکسیژن را تولید می‌کنند و SOD اولین خط دفاعی گیاه در برابر حمله این رادیکال‌هاست. این آنزیم، رادیکال سوپر اکسید را به اکسیژن و H_2O_2 تجزیه می‌کند (Bailly, 2004). در منابع گزارش‌های اندکی مبنی بر نحوه تاثیر پرایمینگ بر چگونگی تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت دیده می‌شود. بیشترین میزان مالون دی آلدئید (۲۳۶۵/۶ نانو مول بر گرم ماده تر) در سطح خشکی ۹- بار و در پرایمینگ شاهد به دست آمد. به نظر می‌رسد که با افزایش خشکی، بر میزان رادیکال‌های آزاد افزوده و تجمع این ترکیبات مضر منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی واندامک‌ها می‌شود، به طوری‌که با افزایش خشکی بر میزان مالون دی آلدئید افزوده شد. سیرم و همکاران (Sairam *et al*., 2002) معتقدند که زمانی که دفاع آنتی اکسیدانتی کاهش و یا تشکیل رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابند، تنش اکسیداتیو پدید می‌آید و می‌تواند منجر به افزایش پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، تخریب غشاهای لیپیدی و در نتیجه خروج آلدئیدهای گوناگونی از جمله مالون دی آلدئید شود. و کم‌ترین مقدار مالون درآلدئید در تیمار شاهد خشکی و پرایمینگ با مقدار ۱۸۵۷ نانو مول بر گرم ماده ترمشاهده شد (جدول ۲). بیشترین میزان گلوتاتیون ردکتاز (۰/۲۲۳ میکرو مول بر دقیقه در میلی گرم پروتئین) در پرایمینگ با ویتامین c و سطح خشکی ۹- بار و کمترین میزان آن (۰/۱۶ میکرو مول بر دقیقه در میلی گرم پروتئین) در خشکی شاهد و پرایمینگ با ویتامین c به دست آمد. سیستم آنتی اکسیدانتی شامل آنزیم‌ها و متابولیت‌های آنتی اکسیدانتی باعث حذف گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند. متابولیت‌های آنتی اکسیدانت مانند آسکوربیک اسید، گلوتاتیون (GSH)، ویتامین E و دیگر ترکیبات است که به ویژه در بذرهای خشک نقش بیشتری دارند (Chiu *et al*., 2002)، آنزیم‌های آنتی اکسیدانت شامل کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون رداکتاز و آنزیم‌های دیگر باعث حذف و غیرفعال شدن گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (McDonald, 1999; Chiu *et al*., 2002). حداد و سالک جلالی (Hadad and Salek-Jalali, 2009) فعالیت آنزیم‌های سوپر اکساید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز تحت تنش خشکی به طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان این افزایش

برای آنزیم‌های پراکسیداز در شرایط خشکی نسبت به آبی شدیدتر بود. مطالعه فعالیت آیزوزایم این آنزیم‌ها، نتایج به دست آمده را تایید کرد که از بین مجموع آنزیم‌های مورد مطالعه، آنزیم اسکوربات پراکسیداز فعالیت کمی داشته و لذا نقش کمرنگی در محافظت گیاه از تنش خشکی ایفا می‌کند، در حالیکه آنزیم پراکسیداز به عنوان یکی از آنزیم‌های مهم جهت افزایش مقاومت گیاه جو در مقابل تنش ناشی از خشکی نقش مهمی بر عهده دارد.

در جدول ۳ ضرایب همبستگی ساده بین صفات اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های ذرت آورده شده است. نتایج حاصل نشان دهنده وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار بین آنزیم‌های آنتی اکسیدانت (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسمیوتاز، گلوتاتیون ردوکتاز) و مالون دی‌آلدئید است. بین کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز همبستگی مثبت معنی‌دار (۰/۹) وجود دارد. همبستگی بین آنزیم کاتالاز با سوپراکسید دیسمیوتاز (۰/۹۲) مثبت معنی‌دار به دست آمد. بین محصول تخریب غشای سلولی (MDA) و کاتالاز، سوپراکسیددیسمیوتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز همبستگی مثبت معنی‌دار وجود دارد که با نتایج حبیبی و همکاران (Habibi *et al*., 2012) که گزارش کردند بین مالون دی‌آلدئید و آنزیم‌های سوپر اکسید دیسمیوتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز همبستگی مثبت معنی‌دار بود، مطابقت دارد. زمانی که دفاع آنتی‌اکسیدانتی کاهش می‌یابد یا تشکیل رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد، در این گونه موارد حالتی موسوم به استرس اکسیداتیو پدید می‌آید. استرس اکسیداتیو منجر به آسیب بافتی می‌شود. هنگامی که استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع افزایش می‌یابد و بر اثر حمله‌ی رادیکال‌های آزاد به لیپیدها، آلدئیدهای گوناگونی از جمله مالون دی‌آلدئید ایجاد می‌شود (Jose *et al*., 1999; Ghorbani-Ghojdi and Ladan-Moghaddam, 2005). نتایج با گزارش‌های عطایی و همکاران (Ataie Sheykh, 2004) بر روی نخود و دادنیا (Dadniya, 2005) بر روی آفتابگردان مطابقت داشت. بین بنیه گیاهچه و درصد جوانه‌زنی هم همبستگی مثبت معنی‌دار وجود دارد.

جدول ۳- ضرایب همبستگی ساده بین صفات اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های ذرت تحت تیمارهای پرایمینگ وتنش خشکی

Table 3- Correlation coefficients among studied traits in corn seeds affected by priming and drought stress

صفت	SV	GP	CAT	APX	SOD	MDA	Gred
SV	1						
GP	0.339*	1					
CAT	-0.72	-0.2	1				
APX	-0.085	-0.288	0.904**	1			
SOD	-0.083	-0.229	0.927**	0.89**	1		
MDA	-0.142	-0.294*	0.536**	0.479**	0.635**	1	
Gred	-0.239	-0.226	0.809**	0.756**	0.859**	0.703**	1

SV: Seedling vigor, GP: germination percentage, SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, APX: Peroxidase Ascorbat , MDA: Malone dialdehide, Gred: Glutathione Reductase.

نتیجه‌گیری کلی

بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در پرایمینگ با اسیدآسکوربیک و سطح خشکی ۹- باردیده شد. همچنین حداکثر میزان آسکوربات پراکسیداز در تیمار هورمون پرایمینگ و سطح خشکی ۹- بار به دست آمد، در حالی که کم‌ترین فعالیت آن در سطح خشکی شاهد و تیمار اسموپرایمینگ مشاهده شد. با افزایش خشکی فعالیت

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت افزایش یافت. بیشترین میزان مالون دی آلدئید در سطح خشکی ۹- بار و در پرایمینگ شاهد بود، با توجه به معنی‌دار نشدن صفت درصد جوانه‌زنی به نظر می‌رسد که بذرهای ذرت هیبرید سینگل کراس ۷۰۴ قادر به تحمل تنش‌های بالاتر از مقدار اعمال شده باشند در نتیجه پیشنهاد می‌شود که تنش‌های شدیدتر مورد آزمون قرار گیرد.

منابع

References

Abi, H. 1984. Catalase in vitro. Method of Enzymology, 105:121-126.

Abdul-baki, A.A., and J.D. Anderson. 1973. Vigor determination in soybean seed by multiplication. Crop Sci. 3: 630-633.

Akram Ghaderi, F., B. Kamkar, and A. Soltani. 2008. Seed Science and Technology. Publications University of Mashhad. (In Persian).

Ananeiva, D.H., C. Rusterucci, B.F. Holt, R.A. Dietrich, J.E. Parker, and J.L. Dangl. 2002. Runaway cell death, but not basal disease resistance, in Isd1 is SA- and NIM1/NPR1-dependent. Plant J. 29: 381–391.

Anonymous. 2010. International rules for seed testing. International seed testing association (ISTA).

Ariano, S., D. Bartolomeo, X. Cristos, and M. Andras. 2005. Antioxidant defenses in Olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. Functional Plant Biol. 32: 45-53.

Ashraf, M, and M.R. Foolad. 2005. Pre-sowing seed treatment a shotgun approach to improve germination growth and crop yield under saline and none-saline conditions. Adv. Agron. 88: 223-271. (In Persian, with English Abstract).

Ataie Sheikh, A. 2004. Evaluation of drought stress on some physiological characteristics and activity of antioxidant enzymes in different varieties of pea. M.Sc. Thesis. Islamic Azad University. Karaj branch.

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

Basra, S.M.A., I.A. Pannu, and I. Afzal. 2003. Evaluation of seedling vigour of hydro and matriprime wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. Int. J. Agric. Biol. 5:121- 125.

Bohnert, H.J, and R.G. Jensen. 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants.Trends in Biotechnol. 14: 89-97.

Bowler, C., M. Van Montagu, and D. Inzé. 1992. Superoxide dismutases and stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 83-116.

Burguieres, E., P. McCu, Y. Kwon, and K. Shetty. 2007. Effect of vitamin C and folic acid on seed vigour response and phenolic-linked antioxidation activity. Biores. Technol. 98: 1393-1404.

Chiu, K.Y., C.L., Chen, and J.M. Sung. 2002. Effect of priming temperature on storability of primed sh-2 sweet corn seed. Crop Sci. 42.1996-2003.

Cruzde Carvalho, M.H. 2008. Drought stress and reactive oxygen species. Plant Signal. Behav. 3: 156-165.

Dadnia, M.R. 2005. The effect of water shortage on physiological and agronomical characteristics of Sunflower varieties. PhD Thesis. Islamic Azad University. Ahvaz branch.

De Figueiredo, E., M.C., Albuquerque, and N.M. de Carvalho. 2003. Effect of the type of environmental stress on the emergence of sunflower (*Helianthus annus* L.), soybean (*Glycine max* L.) and maize (*Zea mays* L.) seeds with different levels of vigor. Seed Sci. Technol. 31:465-479.

Demir Kaya, M., O. Gamze, M. Atak, Y. Çikili. and O. Kolsarici. 2006. Seed treatment to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Eur. J. Agron. 24: 291-295.

Dolatabadian, A., S.A.M., ModarresSanavy, and M. Sharifi. 2009. Effect of Water Deficit Stress and Foliar Application of Ascorbic acid on Antioxidants Enzymes Activity and Some Biochemical's Changes in Leaves of Grain Corn (*Zea maize* L.). Iranian J. Biol. 22(3): 407-422

Esterbauer, H., and D. Grill. 1978. Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of Piceaabies. Plant Physiol. 61:119–121.

Ghasemi-Golezani, K., A.A., Aliloo, M. Valizadeh, and M. oghaddam. 2008. Effects of Hydro and Osmo-Priming on Seed Germination and Field Emergence of Lentil (*Lens culinarisMedik*.). Notulae Botanicae Horti. Agrobot. 36(1): 29-33.

Ghorbani Ghojdi, H, and A.R. Ladan-Moghaddam. 2005. Introduction to oxidative stresses and plant strains. Davavin Tehran.

Giannopolitis, C.N, and S.K. Ries. 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. J. Plant Physiol. 59: 309-314.

Habibi, D., S. Orojnia, D. Taleghani, A.R. Pazoki, and M. Davodifard. 2012. Assessment of changes in antioxidant enzymes and the performance of different genotypes of sugar beet under drought stress. J Agron. Plant Breed. 8(4): 63- 82.

Hadad, R, and M. Salek Jalali. 2009. Protein changes and antioxidant enzymes activity on barley inbred lines under water shortage. Plant Prod. Technol. 9(2): 1- 10.

International Seed Testing Association. 2008. International rules for seed testing (supplement). Seed Sci. Technol. 27: 1-333.

Ito, H., H. Nobutusgu, and A. Ohbayashi. 1991. Purification and characterization of rice peroxidase. Agric. Biol. Chem. 55(10): 2445-2454.

Jabari, F., A. Ahmadi, K. Poustini, and H. Alizadeh. 2006. Evaluation of some antioxidant enzymeeffects on chlorophyll and cell membrane in drought susceptible and tolerant wheat varieties. Iranian J. Agric. Sci. 37: 307-316.

Jiang, Y., and B. Huang. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. Crop Sci. 41: 436–442.

Jose, M, and G. Mates eristinaperez. 1999. Antioxidant Enzymes and Human Disease. Chem. Biochem. 32(8): 595 – 603.

Jung, S. 2004. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of Arabidopsis thaliana subjected to drought. Crop Sci. 166: 459-466.

Kafi, M., A. Zand, B. Kamkar, H.R. SHarifi, and M. GHoldani. 2005. Plant Physiology. Mashhad University Jehad.

Kazemi Arbat H. 2007. Private agronomy. Center Publication University. 315 p. (In Persian).

Kidd, F, and C. West. 1918. Physiological predetermination: The influence of the physiological condition of the seed upon the course of subsequent growth and upon the yield. I. The effect of the soaking seeds in water. Ann. Appl. Biol. 5: 1-10.

Kusvuran, S., S. Ellialtioglu, and Z. Polat. 2013. Antioxidative Enzyme Activity,Lipid Peroxidation, and Proline Accumulation in the Callus Tissues of Salt and Drought Tolerant and Sensitive Pumpkin Genotypes under Chilling Stress. Hortic. Environ. Biotechnol. 54(4): 319-325.

Liang, Y.C. 1999. Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. Plant Soil. 209: 217-224.

Manochehrifar, P., H. Lari Yazdi, and B. Zagi. 2013. Effect of drought stress and salicylic acid on some indicators of germination in two varieties of corn. J. Plant Ecol. 9(1-34): 3- 20.

Maria, C., R. Esther, M. González, F.R. Minchin, K. Judith, W.C. Arrese-Igor, J. Ramos, and M. Becana. 2002. Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. Physiologia Plantarum. 115: 531–540.

McCue, P, and K. Shetty. 2002. A biochemical analysis of Mungbean (*Vignaradiata*) response tomicrobial polysaccharides and potential phenolic-enhancing effects for nutraceutical applications. Food Biotechnol.16:57–79.

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

McDonald, M.B. 2000. Seed priming. (eds. M. Black and J. D. Bewley). Sheffield Academic press.

Michel, B.E, and M.R. Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiol. 51: 914-916.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Sci. 7: 405-410.

Moaveni, P., and M. CHangizi. 2007. Principles of crop physiology in dry and saline conditions. Scientific Publications Islamic Azad University Arak.

Moosavi, A., R. Tavakkol-Afshari, F. Sharif-Zadeh, and A. Aynehband. 2009. Effect of seed priming on germination characteristics, polyphenol oxidase, and peroxidase activities of four amaranth cultivars. J. Food Agric. Environ.7: 353-358.

Movahhedi Dehnavi, M., S.A. Modarres Sanavi, A. Soroshzade, and M. Jalali. 2003. Changes in proline, Soluble sugars, SPAD and Chlorophyll fluorescence in winter Safflower cultivars under drought stress and Spraying zinc and manganese. Biaban J. 9(1): 93- 110.

Murugu, F.S., P. Nyamugafata, C. Chiduza, L.J. Clark, and W.R. Whalley. 2003. Effects of seed priming, aggregate size and matric potential on emergence of cotton (*Gossypiumhirsutum* L.) and maize (*Zea mays* L.).Soil Tillage Res.74:161-168.

Nakano, Y, and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxides in Spanish chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22: 867–880.

Noctor, G, and C. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 249–279.

Ohe, M., M. Rapolu, T. Mieda, Y. Miyagawa, Y. Yabuta, K. Yoshimura, and S. Shigeoka. 2005. Decline in leaf photooxiadtive-stress tolerance with age in tobacco. Plant Sci. 168: 1487-1493.

Pérez-Amador, M., M.L. Abler, E.J. de Rocher, D.M. Thompson, A. Van Hoof, N.D. Lebrasseur, A. Lers, and P.J. Green. 2000. Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in Arabidopsis. Plant Physiol. 122: 169-179.

Rohi, A., M. Tajbakhsh, E. Bernose, M.R. Saidi, and P. Nikzad. 2010. Investigation of different pretreatments effects on seed germination and seedling traits of various chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. Agron J. (Pajouhesh and Sazandegi). 90: 1-8.

Sairam, R.K., P.S. Desmuk, and D.S., Shukla. 1997. Tolerance of drought and temperature stress inrelation to increase antioxidant enzyme activity in wheat. J. Agron. Crop Sci. 178:171-178.

Sairam, R.K., K.V. Rao, and G.C. Srivastava. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Sci. 163:1037-1046.

Salin, M.L. 1991. Chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. Free Radical Res. Commun. 12: 851-858.

Sedghi, M., R. Seyedsharifi, A. Pirzad, and B., Amanpour-Balaneji. 2012. Phytohormonal Regulation of Antioxidant systems in Petals of Drought Stressed Pot Marigold (*Calendula officinalis* L.). J. Agric. Sci. Technol. 14 (4): 869-878.

Sevengor, S., F. Yasar, S. Kusvuran, and S. Ellialaltioglu. 2011. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidative enzymes of pumpkin seedling. Afr. J. Agric. Res. 6(21): 4920-4924.

Soltani, A., E. Zeinali, S. galashi, and N. Latifi. 2001. Genetic variation for and interrelationships among seed vigor traits in wheat from the Caspian Sea Coast of Iran. Seed Sci. Technol. 29: 653-662.

Sung, J.M. 1996. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. Physiologia Plantarum. 97: 85-89.

Vazan, S., Z. Ranji, M. Hoshdar Tehrani, A. GHalavand, and M. Saneie Shariat Panahi. 2002. Drought stress effect on abscisic acid accumulation and stomatal conductivity of sugar beet. Iranian J. Crop Sci. 4(3): 176-182.

Windauer, L., A. Altuna, and R. Benech-Arnold. 2007. Hydrotime analysis of Lesqueralla fendleri seed germination response to priming treatments. Ind. Crop Prod. 25(1): 70-74.

Zhang, J.X, and M.B. Kirkham. 1994. Droughtstress- induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. Plant Cell Physiol. 35: 785–791.