

تأثیر زوال بذر بر صفات فیزیولوژیک و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و اس-نیتروزیلایسیون پروتئین‌ها در دو رقم کلزا (*Brassica napus* L.)

مریم‌سادات زمانیان کاشفی^۱، رضا توکل افشاری^{۲*}، جعفر نباتی^۳، علیرضا سیفی^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و تکنولوژی بذر، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲. استاد گروه آگروتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۳. استادیار پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۴. استادیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۸)

چکیده

این مطالعه به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو عامل رقم (مودنا و اوکاپی)، سطح پیری (صفر و ۲۴ و ۷۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت اشباع) و چهار تکرار برای ارزیابی سرعت و درصد جوانه‌زنی (GP)، شاخص بنیه (SV)، هدایت الکتریکی (EC)، فعالیت کاتالاز (CAT)، آسکوربات‌پراکسیداز (APX)، گلوکاتینون‌ردوکتاز (GR) و اس-نیتروزوتیول (SNO) در سال ۱۳۹۹-۱۳۹۸ در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. تیمارهای پیری تسریع شده (AA) باعث کاهش معنی‌دار همگی صفات (به جز EC) در بذره‌های کلزا شدند. رقم مودنا در صفات جوانه‌زنی قوی‌تر و رقم اوکاپی در فعالیت‌های بیوشیمیایی برتر بود که این را می‌توان با تفاوت ژنتیکی ارقام توجیه کرد. بر اساس نتایج، در تیمارهای ۷۲ ساعت اکاپی نسبت به شاهد، GP/۸۶، CAT/۸۸، APX و ۳۶٪ SNOها کاهش یافته است. همبستگی مثبتی بین SNOها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود داشت؛ به عنوان نتیجه‌گیری، نیتریک اکسید (NO) به طور غیرمستقیم و به وسیله SNOها بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بذره‌های پیرشده کلزا تأثیر گذار است. پیری بذر با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و NO در نتیجه افزایش سرعت مرگ‌ومیر سلول‌ها، فیزیولوژی سلول را هدف قرار می‌دهد.

کلمات کلیدی: آسکوربات‌پراکسیداز، پیری، کاتالاز، گلوکاتینون‌ردوکتاز، نیتریک اکسید.

Effects of seed deterioration on physiological traits, antioxidant enzymes and S-nitrosylation of proteins in two cultivars of canola (*Brassica napus* L.)

M.S. Zamanian Kashfi¹, R. Tavakkol Afshari^{2*}, J. Nabati³, A. Seifi⁴

1. Master student in Seed Science and Technology, Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

2. Professor, Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

3. Assistant Professor of Crop Physiology, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad.

4. Assistant Professor, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

(Received: May. 19, 2022 – Accepted: Jul. 30, 2022)

Abstract

This study was conducted as a factorial experiments based on a completely randomized design with two factors cultivars (Modena and Okapi), aging level (0, 24 and 72 hours at temperature of 40°C and relative humidity of saturated) and four replications to evaluate germination rate and percentage (GP), vigor index (SV), electrical conductivity (EC), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) and S-nitrosothiol (SNO) at the Ferdowsi University of Mashhad, 2019-20. Accelerated Aging (AA) treatments made significant decline in germination indices and biochemical characteristics (except EC) of canola seeds. Also, Modena cultivar was stronger in germination traits while Okapi cultivar was better in biochemical activities, which can be explained by difference in the primary genetic of the cultivars. According to the results, in the treatments of 72 hours of AA compared to the control, GP has decreased by 86%, CAT 88%, APX 89% and SNOs 36%. On the top of that, there was a positive correlation between SNOs and enzymes. In conclusion, Nitric oxide (NO) is likely to indirectly affect the antioxidant enzymes by SNOs in aged canola seeds. Seed aging targets the cell physiology by reducing the activities of antioxidant enzymes and NO and therefore increasing the rate of cell mortality.

Key words: Aging, Ascorbate peroxidase, Catalase, Glutathione reductase, Nitric oxide.

* Email: tavakolafshari@um.ac.ir

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) از تیره شب‌بو (*Brassicaceae*) و از مهم‌ترین دانه‌های روغنی در جهان بوده که بذر آن حاوی ۴۷-۴۰٪ روغن و ۳۵-۲۵٪ پروتئین است (Omid et al., 2010). سطح زیرکشت و تولید جهانی بذر کلزا به ترتیب حدود ۳۸ میلیون هکتار و ۷۵ میلیون تن می‌باشد (FAO, 2018). بذرهای کلزا عموماً در اواخر بهار برداشت می‌شوند، بنابراین به‌ناچار در فصل تابستان انبار می‌گردند (Yin et al., 2015). طی انبارداری، زنده‌مانی و بنیه بذر به تدریج کاهش می‌یابد (Verma et al., 2003).

زوال بذر را می‌توان از دست دادن کیفیت، زنده‌مانی و بنیه به دلیل پیری و یا تأثیر عوامل محیطی نامطلوب تعریف کرد. با افزایش میزان رطوبت بذر یا دمای انبار، سرعت زوال به شدت افزایش می‌یابد (Ellis et al., 1985). بیش از شرایط انبار، سطح کیفیت بذر، بر قابلیت انبارداری بذر کلزا تأثیر می‌گذارد (Elias and Copeland, 1994). مهم‌ترین تغییراتی که ضمن زوال در بذر ایجاد می‌شود شامل: واکنش‌های اکسیداسیونی مانند تولید رادیکال‌های آزاد، دهیدروژناسیون آنزیمی و اکسیداسیون آلدئیدی پروتئین‌ها، همچنین کاهش یکپارچگی و نفوذپذیری غشاء و افزایش نشت الکترولیت از غشاء تحت تأثیر فعالیت رادیکال‌های آزاد، تغییر ساختمان مولکولی اسیدهای نوکلئیک و کاهش فعالیت آنزیم‌ها می‌باشد (Balouchi et al., 2014).

هر یک از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌توانند با انواع مولکول‌های زیستی واکنش داده و فعالیت زیستی آن‌ها را تغییر داده یا مسدود کنند. اثر زیستی ترکیبی ROSها بر روی ارگانسیم‌ها "تنش اکسیداتیو" نامیده می‌شود. برای به حداقل رساندن اثرات مخرب تنش اکسیداتیو، ارگانسیم‌ها مکانیسم‌های مختلف آنزیمی و غیر آنزیمی را توسعه دادند که بتوانند با سم‌زدایی ROSها،

تنش اکسیداتیو را کاهش دهند. از جمله این سازوکارهای دفاعی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند (Scandalios et al., 1997).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پروتئین‌هایی بوده که در اثر مجاورت با ROSها و یا محصولات جانیشان، آن‌ها را به مولکول‌های غیرسمی پایدار تغییر می‌دهند، بنابراین مهم‌ترین مکانیسم دفاعی در برابر آسیب سلولی ناشی از تنش اکسیداتیو هستند (Guillermo and Nuria, 2014). با قرارگیری بذور، تحت تنش‌های محیطی مختلف، میزان رطوبت بذر در مراحل مختلف نمو، بلوغ، پسا‌بیدگی، جوانه‌زنی، انبارداری و پیری تغییر می‌کند. با افزایش تولید ROSها و سمیت رادیکال‌های آزاد، زنجیره‌های انتقال الکترون فتوسنتزی و تنفسی میتوکندری سلول‌ها مختل می‌گردد. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی به عنوان سازوکار سم‌زدایی عمل کرده و باعث توقف رادیکال‌های مخرب طی تنش شده و از این طریق مانع از آسیب و زوال بذر می‌شود (Saisanthosh et al., 2018). توکل افشاری و همکاران (Tavakol-Afshari et al., 2007) گزارش دادند که پیری تسریع‌شده بذر ژنوتیپ‌های جو (*Hordeum vulgare*) سبب کاهش (و نه توقف) آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT و APX شده که فعالیت CAT بیش‌تر تحت تأثیر پیری بوده و بنابراین CAT در فرایند جوانه‌زنی بذر نقش کلیدی‌تری را دارد.

نیتریک اکسید (NO)، رادیکال آزاد، گازی، غیرآلی، بدون بار و چربی‌دوست است که به عنوان عنصر پیام‌رسان، می‌تواند به آسانی از غشاهای زیستی منتشر شود؛ NO با کاهش محیط سلولی منجر به تشکیل گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) می‌شود. هرچند که تولید NO در سطوح نسبتاً کم مفید بوده اما انباشت کنترل نشده‌ی آن که "تنش نیتروژن‌اتیو" نامیده می‌گردد، به عواقب مضر احتمالی در سلول‌های گیاهی منجر می‌شود. بنابراین کنترل سطوح و متابولیسم NO برای بقای سلول ضروری است (Stamler et al., 1993, Wink et al., 1998.)

مودنا و اکاپی از طبقه مادری تولید سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵ از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شد و بلافاصله در پاکت‌های کاغذی و در یخچال نگهداری گردید. تیمارهای آزمایش، پیری در سه سطح (صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت) و دو رقم کلزا (اکاپی و مودنا) بوده است.

به منظور اعمال AA، بذرها را در معرض رطوبت اشباع در دمای 40 ± 1 به مدت صفر، ۲۴ و ۷۲ ساعت گذاشته شد (Oskouei et al., 2012) و سپس ۳۰ ثانیه با محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ ضد عفونی شد و برای انجام آزمایش‌های جوانه‌زنی و بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت.

برای انجام آزمون جوانه‌زنی استاندارد، چهار تکرار ۲۵ تایی از هر تیمار در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شد (ISTA, 2015) و هر ۲۴ ساعت شمارش و پس از ۱۲ روز، گیاهچه عادی (گیاهچه‌های دارای اجزای ریخت‌شناسی کامل، سالم و نمو یافته و فاقد هرگونه تغییر شکل و پیچ‌خوردگی (ISTA, 2015)) تعیین گردید و درصد جوانه‌زنی کل با استفاده از (رابطه ۱) به دست آمد، برای محاسبه سرعت جوانه‌زنی نیز از (رابطه ۲) استفاده گردید.

رابطه ۱- درصد جوانه‌زنی (Shakirova and Sahabudinova, 2003)

$$\text{درصد جوانه‌زنی کل} = \frac{\text{کل بذور جوانه زده}}{\text{کل بذور موجود در پتری}} \times 100$$

رابطه ۲- سرعت جوانه‌زنی (Maguire, 1962)

$$GR = \sum_{i=1}^n S_i / D_i$$

GR = سرعت جوانه‌زنی (۱/روز)

S_i = تعداد بذرهاى جوانه زده در هر شمارش

D_i = تعداد روز تا شمارش n ام

(Bethke et al., 2011, Corpas and Barroso, 2015). مکان اصلی ادراک، سنتز و پاسخ NO در بذر ها لا به آلتورون می باشد (Bethke et al., 2004, Vitecka et al., 2007). نیتریک اکسید از مسیرهای آنزیمی و غیر آنزیمی مختلفی تولید شده و عملکرد فیزیولوژیکی خود را در فرآیندهای رهاسازی خواب بذر و تحمل تنش‌های زیستی و غیرزیستی، از طریق اس-نیتروزیلایون سیستین، نیترازین تیروزین و نیتروزیلایون فلزی ایفا می کند (Arc et al., 2011, Arc et al., 2013).

اس-نیتروزیلایون، پیوستگی کووالانته برگشت پذیر بخشی از مولکول NO به پسمانده لی تیتول آمینواسید سیستین (Cys) واکنش پذیر بوده که به تشکیل گروه اس-نیتروزوتیول (SNO) می انجامد (Hess et al., 2005, Stamler et al., 2001) و از مهم ترین سازوکارهای تغییرات پساترجمه (PTM) پروتئین هاست. پروتئین‌های اس-نیتروزیلایون زیاده‌ای در فرآیندهای سوخت‌وسازی مختلف از جمله جوانه‌زنی بذر دخیل اند، لذا NO در تنظیم انرژی بذر نقش دارد (Sen, 2010., Arc et al., 2013).

هدف از این پژوهش بررسی تغییر شاخص‌های جوانه‌زنی، EC، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (APX، CAT) و GR) و پروتئین‌های اس-نیتروزیلایون در سطوح مختلف AA بذرهاى ارقام مودنا و اکاپی کلزا به عنوان ارقام زمستانی رایج استان خراسان بود. هم‌چنین، تلاش شده که رابطه بین SNOها به عنوان فرآورده NO و این آنزیم‌ها در فرآیند پیام‌رسان پیری ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۹۹-۱۳۹۸ انجام گردیده است. بذور کلزا ارقام

¹ Residue

به منظور ارزیابی بنیه‌ی بذر و گیاهچه تیمارهای مورد نظر پس از پایان دوره‌ی جوانه‌زنی، تعداد ۱۰ گیاهچه نرمال از هر واحد آزمایشگاهی به طور تصادفی انتخاب گردیدند (Mohammadzadeh *et al.*, 2017) و با استفاده از این ویژگی‌ها و (رابطه ۳) شاخص بنیه طولی (SV) به دست آمد.

رابطه ۳- شاخص بنیه (بنیه طولی) (Abdul-baki and Anderson, 1973)

درصد جوانه‌زنی (%). $SV = \text{طول گیاهچه (cm)}$

در آزمون هدایت الکتریکی (EC)، ۵۰ عدد بذر از هر واحد آزمایشی شمارش و سپس وزن گردید؛ بذرها در ارلن‌هایی حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با درپوش آلومینیومی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، هدایت الکتریکی مواد تراوش شده از غشاء بذر با استفاده از EC متر خوانده شد که پس از کسر EC آب مقطر و تقسیم بر وزن بذرها شمارش یافته، EC بر حسب میکروزیمنس بر سانتی‌متر بر گرم محاسبه گردید (Hampton and Tekrony, 1995).

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بذری را با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم-فسفات (pH = 7/8) هموژنایز کرده و پس از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ دمای چهار درجه سانتی‌گراد، فاز شفاف برداشته شد.

فعالیت CAT بر اساس میزان ناپدید شدن H_2O_2 ارزیابی شد. یک میلی‌لیتر محلول واکنش CAT حاوی بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) با مقدار متناسبی از آنزیم استخراجی و پراکسید هیدروژن ۳۳ میلی‌مولار بود. کاهش میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در یک دقیقه و میکرومول H_2O_2 مصرف شده در دقیقه با ضریب خاموشی ۴۰ میلی‌مولار در سانتی‌متر، به عنوان یک واحد CAT بر حسب میکرومول بر گرم بر وزن خشک تعریف شد (Velikova *et al.*, 2000).

فعالیت APX بر مبنای کاهش اکسیداسیون آسکوربات بررسی شده است. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7)، H_2O_2 یک میلی‌مولار و آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار و فعالیت APX وابسته به کاهش میزان جذب در ۲۹۰ نانومتر آسکوربات با ضریب خاموشی ۴۰ میلی‌مولار در سانتی‌متر بود و بر حسب واحد بر وزن خشک گزارش شد (Yamaguchi *et al.*, 1995). فعالیت GR که وابسته به مقدار کاهش جذب در اکسیداسیون نیکوتینامید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADPH) در ۳۴۰ نانومتر با ضریب خاموشی ۶/۲ میلی‌مولار در سانتی‌متر بوده است. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=7/8)، EDTA دو میلی‌مولار، گلوکوتایون (GSGG) پنج میلی‌مولار و NADPH ۰/۲ میلی‌مولار با مقدار متناسبی از آنزیم استخراج شده در حجم یک میلی‌لیتر بوده که با افزودن NADPH در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آغاز گردید و بر حسب میکرومول بر گرم بر وزن خشک آورده شد (Lee and Lee, 2000).

اندازه‌گیری پروتئین‌های اس-نیتروزیلاته بر مبنای کاهش SNOها به SH در حضور آسکوربات و با سنجش گروه‌های تیول آزاد انجام شده است. پروتئین‌ها در ۵۰ میلی‌مولار HEPES (pH=8) حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۱ میلی‌مولار نئوکوپروئین، ۰/۲٪ SDS (حجمی / وزنی) و ۰/۵٪ CHAPS (حجمی / وزنی) استخراج یافته و بعد از یک ساعت واکنش با آسکوربات ۱۰۰ میلی‌مولار و افزودن DTNB در بافر فسفات ۷۵ میلی‌مولار (pH=7) در ۴۱۲ نانومتر خوانش شد و بر حسب میلی‌گرم بر وزن خشک گزارش گردید (Ma *et al.*, 2016).

تجزیه‌های آماری توسط نرم‌افزار SAS 9.4 و رسم نمودارها با Excel 2016 انجام شد. میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح ۵ درصد مقایسه گردید.

نتایج و بحث

درصد معنی دار بود؛ اما اثر اصلی پیری برای صفت سرعت جوانه زنی (GR) در سطح پنج درصد و هدایت الکتریکی (EC) در سطح یک درصد معنی دار بود و اثر اصلی رقم و نیز و برهمکنش اثرات پیری و رقم برای GR و EC معنی دار نبودند (جدول ۱).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی و متقابل پیری و رقم در صفات درصد جوانه زنی (GP) و شاخص بنیه بذر (SV) در سطح یک

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بذرهای پیر شده ارقام کلزا

Table 1- Analysis of variance (mean squares) for physiological and biochemical traits of aged seeds in canola cultivars.

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات MS							
		درصد جوانه زنی (%) Germination percent	سرعت جوانه زنی Germination rate	شاخص بنیه Vigor index	هدایت الکتریکی Electrical conductivity	کاتالاز Catalase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	گلو تاتیون ردوکتاز Glutathione reductase	پروتئین‌های اس- نیتروزویلاسه S-nitrosylated proteins
پیری Accelerated aging (AA)	2	8852**	300*	2906983**	3522**	148094**	154.3**	303.5*	13.4**
ارقام Cultivar (C)	1	6666**	13.2 ^{ns}	1560498**	15.2 ^{ns}	26368*	92.6**	50.9 ^{ns}	9.6**
پیری × ارقام AA×V	2	1148**	6.6 ^{ns}	457993**	15.9 ^{ns}	92408**	142.9**	29.9 ^{ns}	1.08 ^{ns}
خطا Error	18	133	4.8	26590	11.9	4491	1.4	53.3	0.33
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		20.9	35.4	25.7	12.0	33.6	18.9	42.2	7.73

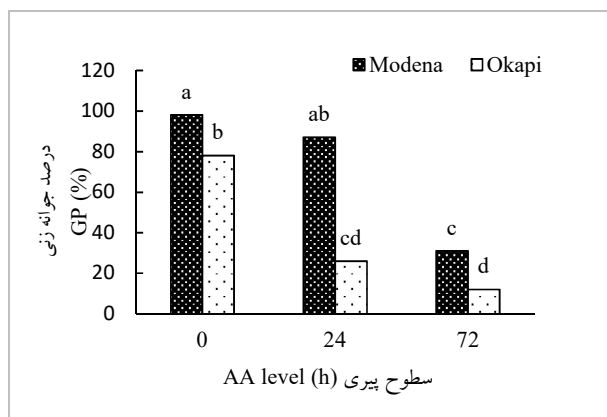
ns, * و ** به ترتیب بیانگر عدم تفاوت معنی دار، معنی دار در سطح احتمال پنج درصد، یک درصد می باشد.

ns, * and **: non-significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively

ساعت بالاتر بوده است (شکل ۲). اعمال پیری بر بذور کلزا باعث کاهش SV شده طوری که در تیمار ۷۲ ساعت اکاپی، ۳۱۰ برابر (نسبت به مودنا شاهد) کاهش یافته است (جدول ۳). هم چنین، تیمار پیری ۷۲ ساعت نسبت به شاهد در رقم مودنا، EC را ۴۴/۵ میکروزیמוש بر سانتی متر بر گرم تنزل بخشید (شکل ۴).

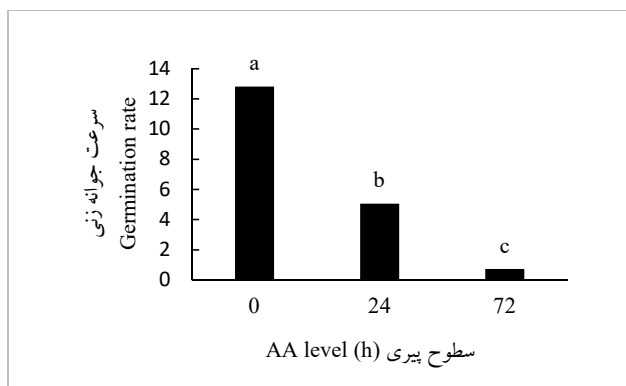
جانمحمدی و همکاران (Janmohammadi *et al.*) (2008) با بررسی شاخص‌های جوانه زنی بر روی درجات مختلف پیری تسریع شده ارقام کلزا نشان دادند که با افزایش مدت پیری، همه مؤلفه های جوانه زنی کاهش می یابد. اما حساسیت ارقام نسبت به دوره پیری متفاوت بود.

مقایسات میانگین صفات مذکور مشخص کرد که با افزایش سطح پیری، درصد و سرعت جوانه زنی و SV کاهش، اما EC به طور معنی داری افزایش یافته است. علاوه بر این، صفات فوق در رقم مودنا نسبت به اوکاپی به طور معنی داری بیش تر بوده است (شکل های ۱ تا ۴)؛ بنابراین رقم مودنا برای صفات درصد و سرعت جوانه زنی و SV تحمل بیش تری به زوال داشته است. در تیمار اثر متقابل تیمار پیری ۷۲ ساعته و رقم اوکاپی نسبت به تیمار اثر متقابل شاهد بدون اعمال پیری و رقم مودنا، GP ۸/۲ برابر کاهش یافته است (شکل ۱). بیشینه سرعت جوانه زنی در تیمار شاهد ۹۷ درصد از کمینه آن در تیمار پیری ۷۲



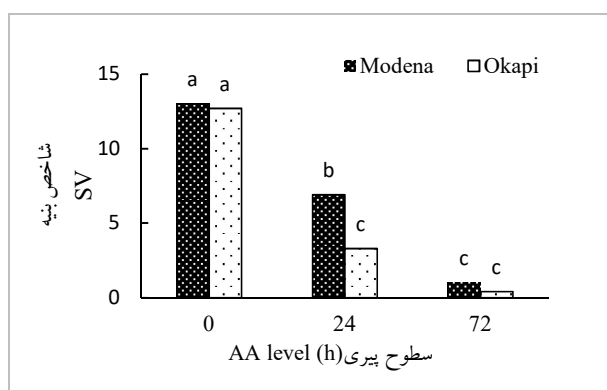
شکل ۱- مقایسه میانگین برهم کنش پیری و رقم بر درصد جوانه‌زنی بذرهای کلزا.

Fig 1- Means comparisons of interaction effect of aging and cultivar on germination percent of canola seeds.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر پیری بر سرعت جوانه‌زنی بذرهای کلزا.

Fig 2- Means comparisons of effect of aging on germination rate of canola seeds.

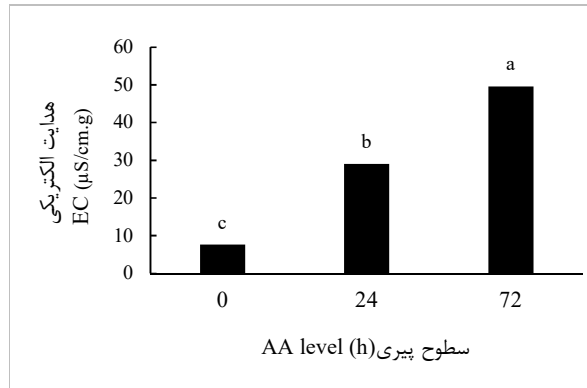


شکل ۳- مقایسه میانگین برهم کنش پیری و رقم بر شاخص بنیه در بذرهای کلزا.

Fig 3- Means comparisons of interaction effect of aging and cultivar on vigor index in canola seeds.

درصد جوانه‌زنی، شاخص بنیه و طول گیاهچه، رقم فورناکس، و حداقل آن، اکاپی بوده است. بیش‌ترین نشت مواد مربوط به رقم اکاپی و کم‌ترین آن رقم Orient که نتیجه صدمات شدید غشایی بوده است.

به طور کلی، ارقام با کیفیت بالا در شروع آزمایش (کنترل) می‌توانند این برتری را در دوره‌های مختلف پیری حفظ کنند. رقم Orient که کیفیت بالایی دارد، در برابر زوال نیز مقاوم‌تر است، در حالی که اکاپی پتانسیل فیزیولوژیکی کم‌تری دارد. در پیری ۹۶ ساعت، حداکثر

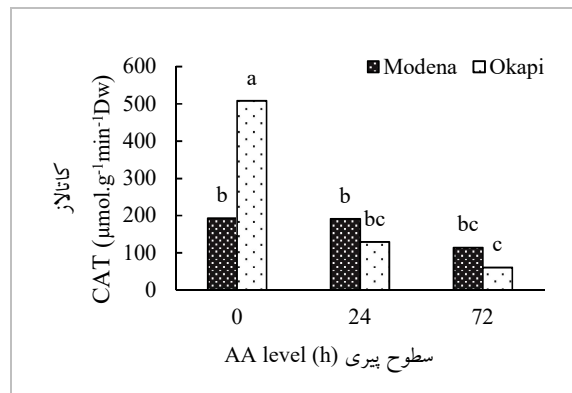


شکل ۴- مقایسه میانگین اثر پیری بر هدایت الکتریکی بذرهای کلزا.

Fig 4- Means comparisons of effect of aging on electrical conductivity of canola seeds.

(جدول ۱). هم‌چنین این نتایج در مورد گلوکوتایون ردوکتاز، معنی‌داری اثر اصلی پیری در سطح پنج درصد و غیرمعنی‌داری اثر اصلی رقم و نیز اثرات متقابل پیری و رقم را نشان می‌دهد (جدول ۱).

تجزیه واریانس داده‌ها نمایانگر آن است که اثرات اصلی ارقام کلزا در سطح پنج درصد و سطوح پیری و نیز اثرات متقابل آن‌ها بر روی کاتالاز در سطح یک درصد معنی‌دار، و نیز اثرات اصلی و متقابل رقم و پیری برای آسکوربات پراکسیداز در سطح یک درصد معنی‌دار بودند

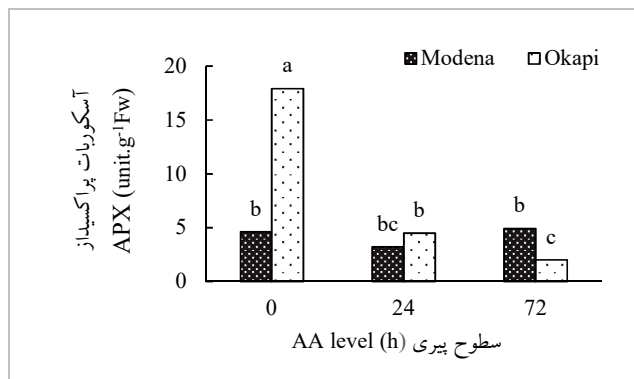


شکل ۵- مقایسه میانگین برهم‌کنش پیری و رقم بر کاتالاز در بذرهای کلزا.

Fig 5- Means comparisons of interaction effect of aging and cultivar on catalase in canola seeds.

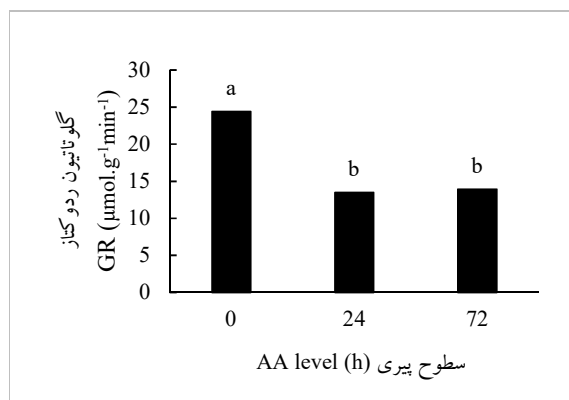
طبق نتایج مقایسات میانگین، با افزایش مدت پیری، میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، APX و GR به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (اشکال ۵ تا ۷). اساساً فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در رقم مودنا از اکاپی به طور معنی‌داری کم‌تر بوده است. در تیمار اثر متقابل تیمار پیری ۷۲ ساعت نسبت به شاهد رقم اکاپی، فعالیت CAT میزان

۴۴۷/۵ میکرومول بر گرم بر وزن خشک کاهش یافته است (شکل ۵). حداکثر فعالیت APX در تیمار شاهد اکاپی از حداقل آن در تیمار اکاپی ۷۲ ساعت پیری، نه برابر بیش‌تر بوده است (شکل ۶). هم‌چنین اعمال پیری باعث کاهش ۴۵ درصد فعالیت آنزیم GR نسبت به شاهد شده است (شکل ۷).



شکل ۶- مقایسه میانگین برهم‌کنش پیری و رقم بر آسکوربات پراکسیداز در بذره‌های کلزا.

Fig 6- Means comparisons of interaction effect of aging and cultivar on ascorbate peroxidase in canola seeds.



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر پیری بر گلو تاتیون ردوکتاز در بذره‌های کلزا.

Fig 7- Means comparisons of effect of aging on glutathione reductase of canola seeds.

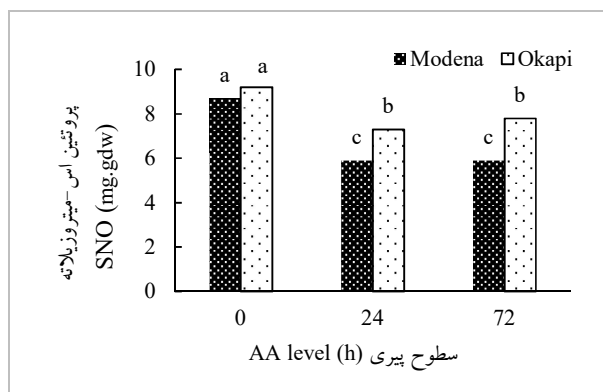
سیستم آنتی‌اکسیدانی به ویژه کاهش بیان ژن‌های APX1 و CAT1، احتمالاً علت تجمع ROSها و تبعاً از بین رفتن بنیه بذر می‌باشد. هم‌چنین، APX1 و CAT1 اصلی‌ترین آنزیم‌های پاک‌سازی‌کننده H₂O₂ در بذره‌های یولاف (*Avena sativa* L.) پیر شده هستند (Kong *et al.*, 2015).

بین و همکاران (Yin *et al.*, 2014) با ایجاد تیمارهای پیری مصنوعی بر روی ارقام برنج (*Oryza sativa* L.) مشاهده کردند که به علت افزایش قابل توجه رادیکال‌های آزاد، درصد جوانه‌زنی و سطوح آنزیم‌های APX و CAT کاهش معناداری داشته است؛ لذا نتیجه گرفتند، تنزل در

معناداری کاهش یافته است؛ لذا تیمارهای پیری، به طور قابل توجهی از فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی بذرها جلوگیری کرده و زوال بذرها را شدیدتر کرده است. هم‌چنین، بذرهای خواب برنج نسبت به انبارداری غیرمتمحمل تر هستند (Cao *et al.*, 2019).

بارتو و همکاران (Barreto *et al.*, 2017) گزارش کردند که پس از هشت روز آبنوشی بذرهای پیرشده نخل ما کاوو (*Acrocomia aculeata*)، فعالیت CAT را نسبت به شاهد (آبنوشی نشده) افزایش معناداری داشته است. میان از دست‌رفتن زنده‌مانی و آسیب غشای جنین در طی پیری تسریع شده، رابطه روشنی وجود داشته که نقش کلیدی محتوای آب‌جنین در درجه حرارت بالا بر مکانیسم‌های درگیر در زوال بذر، برجسته بوده است. فعالیت آنزیمی پس از آبنوشی نشان داده که سیستم آنتی‌اکسیدانی تا حدودی در کاهش سطح ROS در مرحله بحرانی آبنوشی بذرهای پیر مؤثر بوده است.

پژوهش‌های بسیاری نیز تایید کردند که محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بذور از جمله: CAT در گندم‌سیاه (*Fagopyrum esculentum* Moench; Paravar *et al.*, 2019) و جو (Tavakkolafshri *et al.*, 2007) و CAT و APX در پنبه (*Gossypium hirsutum* L.; Sanchouli *et al.*, 2011)، سویا (*Glycine max*; Mehravar *et al.*, 2014)، گلرنگ (*Carthamus tinctorius*; Afrosheh *et al.*, 2017) کتان (*Linum usitatissimum* L.; Balouchi *et al.*, 2016 and 2017)، با افزایش مدت زمان پیری، به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. در بذرهای پیرشده ارقام پنبه، درصد جوانه‌زنی، آنزیم‌های CAT، APX، GR، کاهش و EC افزایش معنی‌داری داشته است (Goel *et al.*, 2003). CAT و APX در حفظ کیفیت بذر، زنده‌مانی و بنیه بالا بذرهای کرنج (*Pongamia pinnata*) طی انبارداری نقش کلیدی دارد (Sahu *et al.*, 2017). با طولانی شدن زمان پیری مصنوعی بذرهای برنج، میزان CAT و APX به طور



شکل ۸- مقایسه میانگین برهم‌کنش پیری و رقم بر پروتئین‌های اس-نیتروزیلاته در بذرهای کلزا

Fig 8- Means comparisons of interaction effect of aging and cultivar on S-nitrosylated proteins in canola seeds.

کنترل‌شده (CDT) بر روی بذرهای پیاز (*Allium cepa.*, Akgün-12)، کاهش معنی‌دار GP و CAT را گزارش کردند و بر اساس همبستگی بالای کاهش SV و کاهش CAT در تیمارهای زوال، تایید کردند که CAT، رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش را پاک‌سازی می‌کند. میان از دست‌رفتن زنده‌مانی بذرهای پیرشده ارقام

بررسی همبستگی صفات نشان داد که EC، همبستگی منفی و بسیار بالایی ($r = -0.99^{**}$) با محتوای APX دارد (جدول ۲)؛ لذا می‌تواند صفت خوبی برای تشخیص آسان این آنزیم باشد. هم‌چنین، CAT از همبستگی مثبتی با GP و SV برخوردار است (جدول ۲). دمیر کایا و همکاران (Demirkaya *et al.*, 2010) با اعمال تیمارهای زوال

و کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی را نشان داد که هیچ همبستگی بین آنزیم‌ها و زنده‌مانی وجود نداشت و نتیجه گرفتند که احتمالاً عدم همبستگی به این علت بوده که تمام اندازه‌گیری‌ها در جنین‌های استخراج شده از بذرهای پیر پیش از آب‌نوشی بوده است (Lehner et al., 2008).

فلفل و EC، همبستگی منفی و CAT همبستگی مثبت وجود داشته که این هنگامی کاهش زنده‌مانی به ۶۰ درصد مشهودتر بوده است (Demirkaya, 2013). در حالی که بررسی شاخص‌های جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بذرهای زوال‌یافته گندم (*Triticum aestivum* L., cv Charger)، کاهش زنده‌مانی

جدول ۲- ضرایب همبستگی بین صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بذرهای پیر شده ارقام کلزا

Table.2- Correlation coefficients between physiological and biochemical traits of aged seeds in canola cultivars

	درصد جوانه‌زنی (%) Germination percent (A)	سرعت جوانه‌زنی Germination rate (B)	شاخص بیه Vigor index (C)	هدایت الکتریکی Electrical Conductivity (D)	کاتالاز Catalase (E)	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase (F)	گلو تاتیون ردوکتاز Glutathione reductase (G)	پروتئین‌های اس-نیتروزیلاته S-nitrosylated proteins (H)
(B)	0.003 ^{ns}	1						
(C)	0.97 ^{**}	0.04 ^{ns}	1					
(D)	-0.28 ^{ns}	-0.94 ^{**}	-0.24 ^{ns}	1				
(E)	0.47 [*]	-0.06 ^{ns}	0.43 [*]	-0.26 ^{ns}	1			
(F)	-0.21 ^{ns}	0.97 ^{**}	-0.17 ^{ns}	-0.99 ^{**}	-0.15 ^{ns}	1		
(G)	0.51 [*]	-0.08 ^{ns}	0.51 [*]	-0.28 ^{ns}	0.48 [*]	-0.2 ^{ns}	1	
(H)	-0.006 ^{ns}	0.74 ^{**}	0.08 ^{ns}	0.62 ^{**}	0.2 ^{ns}	0.68 ^{**}	0.22 ^{ns}	1

ns, * و ** به ترتیب بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، یک درصد می‌باشند

ns, * and **: non-significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively

از مهم‌ترین راهبردهای مشارکت NO در فیزیولوژی تنش بذر هاست (Begara-Morales et al., 2019). طی CDT در بذرهای نارون (*Ulmus pumila* L.)، پروتئین‌های اس-نیتروزیلاته در ابتدا افزایش و سپس کاهش یافته‌است؛ بررسی‌های بعدی نشان داد که این افزایش اس-نیتروزیلاتیون ناشی از NO بالا بوده و به این طریق NO در تنظیم زوال بذر شرکت می‌کند (He et al., 2018). آنزیم‌های APX و GR، الگوی اس-نیتروزیلاته خود را در پاسخ به پسابیدگی بذر ریکالسیترانته او پاس (*Antiaris toxicaria*) کاهش داده‌اند، از این رو با تنظیم فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، تجمع H₂O₂ را کاهش و

تجزیه واریانس داده‌های پروتئین‌های اس-نیتروزیلاته، حاکی از اختلافات معنی‌دار اثرات اصلی سطوح پیری و ارقام در سطح یک درصد بوده در حالی که اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار نشدند (جدول ۱). رقم اکایی دارای پروتئین‌های اس-نیتروزیلاته به طور معنی‌دار بیش‌تر از مودنا بوده و SNOها در تیمار ۷۲ ساعت اکایی نسبت به شاهد ۳۶ درصد کاهش یافته است (شکل ۸).

اکسیداسیون پسمانده Cys، به یک فرم اکسیده شده پایدار، SNOها را تشکیل داده که با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و دخالت در پیام‌رسان‌های مختلف دفاعی، تحمل به تنش‌های غیرزیستی را افزایش می‌دهد؛ لذا اس-نیتروزیلاتیون پروتئین‌ها

غشاء، غیرفعال شدن پروتئین‌ها و کاهش فعالیت عوامل آنتی‌اکسیدان، باعث کاهش توانایی متابولیک سلول، زنده‌مانی، بنیه و کیفیت بذر می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد افزایش تعداد روزهای پیری سبب کاهش معنی‌دار درصد و سرعت جوانه‌زنی، بنیه گیاهچه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان CAT، APX و GR و پروتئین‌های اس-نیتروزیلاته به عنوان واسطه فعالیت NO می‌شود، در حالی که به دلیل تخریب غشاء، نشت الکترونیکی افزایش یافت. هر چند که رقم مودنا در صفات درصد و سرعت جوانه‌زنی و بنیه گیاهچه قوی‌تر بود، اما رقم اکاپی مقادیر آنزیم‌های CAT، APX و پروتئین‌های اس-نیتروزیلاته بالاتر داشت که این را می‌توان در اختلاف ژنتیکی اولیه ارقام توجیه کرد. هم‌چنین همبستگی مثبتی بین SNO و APX مشاهده شد که از تعامل احتمالی آن‌ها در سیستم پیام‌رسان NO ضد ROS‌ها خبر می‌دهد.

بررسی‌های گذشته NO در ایران صرفاً مبتنی بر اعمال خارجی NO بر گیاه و سپس مقایسه صفات کیفی با شاهد بوده‌است. نویسندگان نخستین گام در پژوهش‌های بیوشیمیایی برای بررسی فرآورد عمل NO در شرایط تنش برداشته‌اند؛ بدیهی است که راه زیادی جهت تکمیل و توسعه‌ی سازوکار NO در صفات کیفی بذرهای تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانده‌است که توجهات نوین گسترده‌ای را می‌طلبد. پیشنهاد ما این است که آیندگان به فیزیولوژی بذر طی مراحل مختلف آب‌نوشی نگاه ویژه‌ای کنند.

افزایش تحمل بذر به پس‌ابش^۲ استوار گشته‌اند (Bai *et al.*, 2011). بررسی پروتئین‌های اس-نیتروزیلاته در گیاهچه‌های آفتابگردان (*Helianthus annuus*) تحت تنش شوری نشان داد که افزایش انباشت SNO، باعث افزایش اس-نیتروزوسيون پروتئین‌های سیتوسل لپه‌ها و القای اس-نیتروزوسيون در لپه‌ها می‌گردد (Jain *et al.*, 2018).

همبستگی مثبت و معناداری بین SNO و APX مشاهده گردید (جدول ۲) و هم‌چنین به نظر می‌رسد کاهش فعالیت APX طی افزایش مدت پیری، با کاهش SNO‌ها همراه است. اس-نیتروزیلاسيون APX1 در Cys، فعالیت‌های آنزیمی ضد H₂O₂ را افزایش داده و به بهبود پاسخ‌های ایمنی و مقاومت به تنش‌های اکسیداتیو آرابیدوپسیس ختم شده‌است (Yang *et al.*, 2015). ما و همکاران (Ma *et al.*, 2016) با اندازه‌گیری پروتئین‌های اس-نیتروزیلاته طی ساعات آب‌نوشی بذر جو (*Hordeum Vulgare*) مشاهده کردند که مقدار SNO‌ها ابتدا افزایش و سپس کاهش یافته‌است؛ بررسی‌های بیش‌تر نشان داد که در دو روز اول تولید فعال NO باعث نیتروزیلاسيون گروه‌های تیول (SH) شده و فرایند تنفس را به سمت تخمیر می‌برد. اما پس از خروج ریشه‌چه، احیا^۳ بیش‌تر شده و گلوتاتیون و آسکوربات اکسیده می‌شوند.

نتیجه‌گیری نهایی

طی زوال، آسیب به سازمان‌دهی سلولی، ضعیف شدن

Reference

- Abdul-Baki, A.A., and J.D. Anderson. 1973. Vigor determination in soybean by multiple criteria. *Crop Sci.* 13: 630-633.
- Afrosheh, R., H.R. Balouchi, M. Movahedi Dehnavi, and M.H. Gharineh. 2017. The effects of salicylic acid and seed deterioration on germination indices and antioxidant enzymes changes of *Carthamus tinctorius* L. cv. Soffeh seed. *Iranian J. Seed Sci. Technol.* 7(1): 53-64. (In Persian, with English Abstract)

² Dehydration

³ Reduction

- Anonymous. 2018.** FAOSTAT, food and agriculture organization of the United Nations.
- Arc, E., M. Galland, G Cueff, B. Godin, I. Lounifi, D. Job, and L. Rajjou. 2011.** Reboot the system thanks to protein post-translational modifications and proteome diversity: how quiescent seeds restart their metabolism to prepare seedling establishment. *Proteomics*. 1: 1606–1618.
- Arc, E., M. Galland, B. Godin, G. Cueff, and L. Rajjou. 2013.** Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Front. Plant Sci.* 4(346): 346.
- Bai, X., L. Yang, M. Tian, J. Chen, J. Shi, Y. Yang, and X. Hu. 2011.** Nitric Oxide Enhances Desiccation Tolerance of Recalcitrant *Antiaris toxicaria* Seeds via Protein S-Nitrosylation and Carbonylation. *J. PLoS ONE*. 6(6): e20714.
- Balouchi, H., and R. Ostadian Bidgoly. 2016.** Effect of seed deterioration on germination and antioxidant enzymes activity of oil flax (*Linum usitatissimum* L.) Red Bazrak genotype. *Iranian J. Plant Process and Function* 7(23): 205-218. (In Persian, with English Abstract)
- Balouchi, H.R., and R. Ostadian Bidgoly. 2017.** Effect of Seed Deterioration on Physiological and Biochemical Traits of Oil Flax (*Linum usitatissimum* L. Norman var) Seed. *Iranian J. Plant Prod. (Sci. J. Agric.)* 40(2): 37-53. (In Persian, with English Abstract)
- Balouchi, H., F. Bagheri, R. Kayed-Nezami, M. Movahedi-Dehnavi, and A. Yadavi, 2014.** Effect of seed aging on germination and seedling growth indices in three cultivars of *Brassica napus* L. *Iranian J. Plant Res* 26: 397-411. (In Persian)
- Barreto, L.C., and Q.G. Garcia. 2017.** Accelerated ageing and subsequent imbibition affect seed viability and the efficiency of antioxidant system in macaw palm seeds. *Acta. Physiol. Planta* 39(3): 1-8.
- Begara-Morales, J.C., M. Chaki, R. Valderrama, C. Mata-Pérez, M.N. Padilla, and J.B. Barroso. 2019.** The function of S-nitrosothiols during abiotic stress in plant. *J. Exp. Bot* 70(17): 4429–4439.
- Bethke, P.C., M.R. Badger, and R.L. Jones. 2004.** Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. *The Plant Cell* 16(2): 332-41.
- Bethke, P.C., I.G. Libourel, J. Vitecek, and R.L. Jones. 2011.** Nitric Oxide Methods in Seed Biology. *Methods in Mol. Biol* 773: 385-400.
- Cao, D., S. Chen, Y. Huang, Y. Qin, and G. Ruan. 2019.** Effects of artificial aging on physiological characteristics of rice seeds with different dormancy characteristics. *Agric. Biotechnol.* 8(1): 52-56.
- Corpas, F.J., and J.B. Barroso. 2015.** Nitric oxide from a “green” perspective. *Nitric Oxide* 45: 15-19.
- Demirkaya, M., K.J. Dietz, and S. Sivitepe. 2010.** Changes in antioxidant enzymes during ageing of onion seeds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 38(1):49-52.
- Demirkaya. 2013.** Relationships between antioxidant enzymes and physiological variations occur during ageing of pepper seeds. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 54(2): 97-102.
- Elias, S.G., and O. Copeland. 1994.** The effect of storage conditions on canola (*Brassica napus* L.). *J. Seed Technol.* 18: 21-29.
- Ellis, R. H., T.D. Hong, and E.H. Roberts. 1985.** Handbook of seed technologies for gene banks. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- Goel, A., A.K. Goel, and I.S. Sheoran. 2003.** Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *J. Plant Physiol.* 160(9): 1093-10100.
- Hampton, J.G., and D.M. Tekrony. 1995.** Handbook of vigour test methods. ISTA, Zurich, Switzerland.
- He, Y., H. Xue, Y. Li, and X. Wang. 2018.** Nitric oxide alleviates cell death through protein S-nitrosylation and transcriptional regulation during the ageing of elm seeds. *J. Exp. Bot.* 69(21): 5141–5155.
- Hess, D.T., A. Matsumoto, S.O. Kim, H.E. Marshall, and J.S. Stamble. 2005.** Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 6(2): 150-66.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2015.** International Rules for Seed Testing ISTA, Bassersdorf, Switzerland.

- Jain, P, C.V. Toerne, C Lindermayr, and S.C. Bhatla: 2018** S-nitrosylation/denitrosylation as a regulatory mechanism of salt stress sensing in sunflower seedlings: *Physiologia Plantarum* 162(1): 49-72.
- Janmohammadi, M, Y. Fallahnezhad, M. Golshan, and H. Mohammadi: 2008** Controlled ageing for storability assessment and predicting seedling early growth of canola cultivars (*Brassica napus* L.): *ARNP J Agric Biol Sci* 3(5): 22-26.
- Kong, L, H. Huo, and P. Mao: 2015** Antioxidant response and related gene expression in aged oat seed: *Front Plant Sci* 6(158): 158.
- Lee, D.H, and C.B. Lee: 2000** Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays: *Plant Sci* 159(1): 75-85.
- Lehner, A, N. Mamadou, P. Poels, D. Coˆme, C. Bailly, and F. Corbineau: 2008** Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains: *J Cereal Sci* 47(3): 555-565.
- Ma, Z, F. Marsolais, N.V. Bykova, and A.U. Igmaberdiev: 2016** Nitric oxide and reactive oxygen species mediate Metabolic changes in barley seed embryo during germination: *Front Plant Sci* 7(138): 1-13.
- Maguire, J.D: 1962** Speed of germination in selection and evaluation for seedling vigor: *Crop Sci* 2: 176-177.
- Mehrvavar, M, A. Sateai, A. Hamidi, M. Ahmadi, and M. Salehi, 2014** Accelerated aging effect on lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity of two soybean cultivars: *Iranian J Seed Sci Technol* 13(1): 17-30. (In Persian, with English Abstract)
- Mohammadzadeh, A, S. Asadi, N. Majnoun Hosseini, H. Moghadam, and M. Jamali: 2017** Effects of artificial seed ageing on germination indices, seedling establishment and yield of two red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars: *Iranian J Seed Sci Technol* 7(2): 75-94. (In Persian, with English Abstract)
- Omidi, H, Z. Tahmasebi, H.A. Naghdi Badi, H. Torabi, and M. Miransari: 2010** Fatty acid composition of canola (*Brassica napus* L.), as affected by agronomical, genotypic and environmental parameters: *C. R. Biol* 333(3): 248-254.
- Oskouei, B, Divsalar, M, Yari, L and Zareyan. A: 2012** Effect of packaging type on seed vigor of three varieties of canola stored in Qom: *Iranian J Seed Sci Technol* 2(1): 13-24. (In Persian)
- Paravar, A, S. Maleki Farahani, and S. Gholami, 2019** Effect of seed deterioration on germination, biochemical and enzymatic activity of buckwheat: *Iranian J Agroecol* 15(2): 49-57. (In Persian, with English Abstract)
- Sahu, B, A.K. Sahu, V. Thomas, and S.C. Naithani: 2017** Reactive oxygen species, lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidant enzymes in dehydrating Karanj (*Pongamia pinnata*) seeds during storage: *South Afr J Bot* 112: 383-390.
- Sanchouli, A, N. Ramezanzadeh, F. Ghaderifar, H.R. Sadeghipour, and A. Soltani: 2011** Investigating the effect of deterioration on germination and activity of catalase and peroxidase enzymes in cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) seeds: First Special Conference about Apporunity Methods for Sustainable Agriculture, Payame Nour University of Ahvaz: May 26-27. (In Persian)
- Scandalios, J.G, L. Guan, and A.N. Polidoros: 1997** Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression: Pp 343-406. In J.G. Scandalios (Ed): *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*: Cold Spring Harbor Lab Press, New York.
- Sen, S: 2010** S-Nitrosylation process acts as a regulatory switch for seed germination in wheat: *Am J Plant Physiol* 5(3): 122-132.
- Shakirova, F.M, and D.R. Sahabutdinova: 2003** Changes in the hormonal status of wheat seedling induced by salicylic acid and salinity: *Plant Sci* 164: 317-322.
- Stamler, G.S, G.S. Singel, and J. Loscalzo: 1993** Biochemistry of Nitric Oxide and its Redox-Activated forms: *Science* 258(5090): 1898-1902.
- Stamler, J.S, S. Lamas, and F.C. Fang: 2001** Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism: *Cell* 106(6): 675-83.

- Tavakol Afshari, R., F. Chasemi, N. Majnoun Hosseini, H. Alizadeh, and M.R. Bihamta: 2007.** Some effects of seed aging on germination characteristic and activities of catalase and peroxidase antioxidant enzymes in barley genotypes (*Hordeum vulgare*). Iranian J. Agric. Sci. 38(1): 337-346. (In Persian)
- Velikova, V., I. Yordanov, and A. Edreva: 2000.** Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci. 151: 59-66.
- Verma, S.S., U. Verma, and R. Tomer: 2003.** Studies on seed quality parameters in deteriorating seeds in Brassica (*Brassica campestris*). Seed Sci. Technol. 31(2): 389-396.
- Viteceka, J., V. Reinohla, and R.L. Jones: 2007.** Measuring NO Production by plant tissues and suspension cultured cells. Mol. Plant 1(2): 270-284.
- Wink, D.A., and J.B. Mitchell: 1998.** Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Curr. Topics in Cell. Regul. 25(4-5): 434-456.
- Yamaguchi, K., H. Yamaguchi, and M. Nishimura: 1995.** A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. Plant Cell Physiol. 36(6): 1157-1162.
- Yang, H., J. Mu, L. Chen, J. Feng, J. Hu, L. Li, J.M. Zhou, and J. Zuo: 2015.** S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. Plant Physiol. 167(4): 1604-1615.
- Yin, G., X. Xin, C. Song, X. Chen, J. Zhang, S. Wu, R. Li, X. Liu, and X. Lu: 2014.** Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed. Plant Physiol. Biochemist. 80: 1-9.
- Yin, X., D. He, R. Gupta, and P. Yang: 2015.** Physiological and proteomic analyses on artificially aged *Brassica napus* seed. Front. Plant Sci. 6(112): 1-11.