# The restoring influence of priming treatments on germination of Smooth vetch (*Vicia dasycarpa*) under drought stress and maintaining this advantage following aging by using post priming heat shock treatment

**Amin Namdari [1*], Farzad Sharifzade [2]**
[1] Dryland Agricultural Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Gachsaran, Iran
[2] Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Sciences and engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

## Abstract
Seed priming often promotes germination and seedling growth under environmental stresses yet as main negative aspect, primed seeds are vulnerable to aging process. In this regard, the current study was carried out to examine the influence of priming treatments (with water and ascorbic acid) on germination of smooth vetch (*Vicia dasycarpa*) seeds under osmotic stress (-0.9 MPa). In addition, we examined whether or not post priming heat shock treatment may maintain this possible advantage by reducing primed seeds deterioration during artificial aging. Treatments included: hydro priming, hydro priming plus heat shock, priming with ascorbic acid, priming with ascorbic acid plus heat shock, control or non-primed seeds. Primed seeds after partial drying faced heat shock at 40 $^{0}$C for 3h. Following heat shock treatment seeds were exposed to accelerated aging for 0, 2, 4, 6 and 8 days. Priming particularly with ascorbic acid substantially increased germination under osmotic stress. Heat shock treatment significantly improved germination ability of both aged-primed seeds with water and ascorbic acid. The difference between HS treated and non-HS treated primed seeds were more considerable following longer terms (6, 8 days) of artificial aging. The results showed that the restoring effect of heat shock was accompanied with lower lipid peroxidation (assayed as malondialdehyde content), electrolyte leakage and enhanced antioxidant activities including catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase.
**Keywords**: Ascorbate peroxidase, Catalase, Heat shock, Osmotic stress, Peroxidase, Seed aging, Seed priming

* Corresponding Author: namdari@ut.ac.ir

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دهم، شمارهٔ سی و هفتم، پاییز ۱۳۹۷، صفحهٔ ۴۱-۵۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۲۲
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۷/۰۷

# تأثیر تیمارهای پرایمینگ در بهبود جوانه‌زنی بذور ماشک (*Vicia dasycarpa*) در تنش خشکی و اثر شوک گرمایی در حفظ توانایی جوانه‌زنی بذرهای پرایم‌شده پس از پیری تسریع‌شده

**امین نامداری [1*]، فرزاد شریف زاده [2]**
[1] مؤسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی؛ گچساران؛ ایران
[2] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

**چکیده**
پرایمینگ بذر، بیشتر با افزایش جوانه‌زنی و رشد ابتدایی گیاهچه به‌ویژه در شرایط تنش‌زای محیطی همراه است؛ اما درعین‌حال بذرهای پرایم‌شده نسبت به زوال و پیری بسیار حساس‌اند؛ بنابراین، آزمایش حاضر با هدف بررسی تأثیر تیمارهای پرایمینگ با آب و آسکوربیک اسید در افزایش توانایی جوانه‌زنی بذرهای *Vicia dasycarpa* در شرایط تنش اسمزی ۰/۹- مگاپاسگال و نیز اثر تیمار شوک گرمایی بر حفظ این توانایی، هنگام مواجه‌شدن با پیری تسریع‌شده، انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل ترکیب تیمارهای پرایمینگ و پس از پرایمینگ (شوک گرمایی) بذر به پنج شکل بودند که عبارتند از: ۱- هیدروپرایمینگ؛ ۲- هیدروپرایمینگ و همراه آن شوک گرمایی؛ ۳- پرایمینگ با آسکوربیک اسید؛ ۴- پرایمینگ با آسکوربیک اسید و همراه آن شوک گرمایی و ۵- تیمار شاهد یا بدون پرایمینگ. پس از اعمال این تیمارها، بذرها به‌مدت‌های صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ روز در شرایط پیری تسریع‌شده قرار گرفتند. پرایمینگ بذر به‌ویژه با آسکوربیک اسید با افزایش چشمگیر جوانه‌زنی در تنش اسمزی همراه بود. افزون‌براین، اعمال شوک گرمایی در مقایسه با اعمال‌نشدن آن در هریک از تیمارهای پرایمینگ، حفظ آثار مثبت پرایمینگ را در بهبود جوانه‌زنی در تنش خشکی در بذرهای پیرشده موجب شد. اثر شوک گرمایی در کاهش زوال بذور پرایم‌شده با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، حفظ یکپارچگی غشا و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پراکسیداز (POX) همراه بود.

**واژه‌های کلیدی:** آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، پرایمینگ، پیری بذر، تنش اسمزی، شوک گرمایی، کاتالاز

* نگارندهٔ مسئول: نشانی پست الکترونیک: namdari@ut.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۷۴۳۲۳۴۳۳۴۳

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

**مقدمه**

جوانه‌زنی بذر، مرحلهٔ پیچیده و پویایی از رشد گیاه است و با آثاری که بر استقرار گیاهچه دارد، ممکن است بر عملکرد تأثیر بگذارد (Kaur *et al*., 2015). درعین‌حال، عوامل محیطی مانند آب، خاک، شوری، خشکی، عمق کاشت و کیفیت یا زوال بذر در جوانه‌زنی و استقرار گیاهچهٔ محصولات زراعی تأثیرگذارند. پرایمینگ بذر، روشی فیزیولوژیک است که افزایش توانایی جوانه‌زنی و یکنواختی در رویش بذور را به‌ویژه در شرایط تنش‌های محیطی موجب می‌شود (Anosheh *et al*., 2011). باوجوداین، مهم‌ترین جنبهٔ منفی پرایمینگ، کاهش عمر و توانایی انبارداری بذرهای پرایم‌شده است؛ به‌طوری‌که برای بهره‌مندشدن از مزایای پرایمینگ پیشنهاد می‌شود بذرهای پرایم‌شده در کمترین فاصلهٔ زمانی کشت شوند (Butler *et al*., 2009). گزارش شده است پرایمینگ بذرهای دارای بنیهٔ کم، به‌دلیل نیازمندی این بذرها به فرایندهای ترمیمی پیش از جوانه‌زنی، افزایش مدت عمر این بذرها را باعث می‌شود؛ درحالی‌که در بذرهای دارای بنیهٔ زیاد، این اثر معکوس است (Tammela *et al*., 2005). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن بر اثر برهم‌خوردن تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن، غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها تخریب غشاهای زیستی را در دوران ذخیرهٔ بذر موجب می‌شود (Pukacka and Ratajczak, 2007) که به نوبهٔ خود زمینه‌ساز کاهش جوانه‌زنی، استقرار گیاهچه و درنهایت، عملکرد گیاه زراعی خواهد شد (McDonald, 1999). سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، نقش حیاتی در محافظت از غشاها و سایر اجزاء سلولی دربرابر آسیب ایجادشده با گونه‌های فعال اکسیژن دارند. حفظ یکپارچگی غشاهای زیستی در مدت ذخیره، اهمیتی حیاتی در زنده‌مانی و حفظ توانایی جوانه‌زنی بذر دارد؛ زیرا غشاهای زیستی نخستین اجزاء سلولی هستند که از پیری بذر تأثیر می‌گیرند. این آسیب از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و به‌دنبال آن تخریب فسفولیپیدهای غشایی ناشی می‌شود (Lehner *et al*., 2008). بذرها برای تنظیم زوال ناشی از آسیب اکسیداتیو، سازوکارهای پاک‌کردن رادیکال‌های آزاد دارند. این سیستم سم‌زدایی شامل تعدادی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) است (Varghese *et al*., 2008). در صورت آسیب‌دیدن این آنزیم‌ها در مدت ذخیرهٔ بذر، توانایی سم‌زدایی بذرها به‌شدت کاهش می‌یابد که این موضوع به کاهش چشمگیر بنیهٔ بذر منجر می‌شود. کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مدت ذخیره از مهم‌ترین دلایل تخریب غشاهای زیستی و به‌دنبال‌آن زوال بذر است (Goel *et al*., 2003)؛ بنابراین تیمارهایی که حفظ فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی را در بذر موجب می‌شوند به کاهش در سرعت زوال و حفظ توانایی رویش بذر منجر می‌شوند.

یکی از روش‌های رایج برای پیش‌بینی کاهش عمر بذر در مدت انبارداری، آزمون جوانه‌زنی بذر پس از روبه‌روشدن با شرایط نامناسبی است که

تسریع پیری بذر را موجب می‌شوند. باوجود حساسیت زیاد بذرهای پرایم‌شده به زوال در مدت پیری، پیشنهاد شده است کاربرد برخی تیمارها پس از پرایمینگ مانند مواجه‌شدن با تنش خشکی و دمای زیاد در زنده‌مانی و حفظ توانایی جوانه‌زنی بذرهای پرایم‌شده در مدت مواجه‌شدن با پیری مؤثر است (Butler *et al*., 2009).

ماشک‌ها از گیاهان علوفه‌ای متعلق به خانوادهٔ Fabaceae و جنس *Vicia spp* هستند. در این جنس حدود ۱۵۰ گونه وجود دارند که تنها اندکی از آنها زراعی هستند و از گیاهان مرغوب علوفه‌ای و چندمنظوره به شمار می‌روند که در بیشتر شرایط آب‌وهوایی به‌صورت دیم و آبی کشت می‌شوند (Asghari Meidani and Karimi, 2013). بذور *Vicia dasycarpa* استفاده‌شده در آزمایش حاضر توانایی جوانه‌زنی کامل در شرایط بهینهٔ محیطی دارند. درعین‌حال بر اثر تنش خشکی جوانه‌زنی و رویش گیاهچهٔ بذور این گیاه به‌شدت کاهش می‌یابد. کشت این نوع ماشک بیشتر به‌صورت دیم انجام می‌شود و مرحلهٔ جوانه‌زنی و رشد ابتدایی، بیشتر، از خشکی تأثیر می‌گیرد؛ بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، بررسی امکان استفاده از تیمارهای پرایمینگ برای ارتقاء جوانه‌زنی بذرهای *V. dasycarpa* در شرایط تنش خشکی بود. افزون‌براین، باتوجه‌به‌اینکه بذرهای پرایم‌شده عمر کوتاهی دارند و به‌سرعت توانایی جوانه‌زنی خود را از دست می‌دهند، امکان استفاده از تیمار شوک گرمایی برای بهبود مدت عمر بذرهای پرایم‌شده و نیز تأثیر این تیمار در آسیب اکسیداتیو و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بذر ارزیابی شدند.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار در دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. بذرهای ماشک (*V. dasycarpa*) با قوهٔ نامیهٔ ۱۰۰ درصد از مؤسسهٔ تحقیقات دیم تهیه شدند. برای پرایمینگ بذور از دو ترکیب آب و آسکوربیک اسید استفاده شد. معیار گزینش بهترین غلظت آسکوربیک اسید، درصد جوانه‌زنی در شرایط خشکی (پتانسیل ۰/۹- مگاپاسگال) بود و براین‌اساس، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربات برگزیده شد. برای تعیین بهترین تیمار پرایمینگ ازنظر مدت، دما و غلظت محلول پرایمینگ (برای تیمار آسکوربیک اسید) پیش‌آزمایشی انجام شد و براین‌اساس، مدت ۳۶ ساعت، دمای ۱۵ درجهٔ سانتی‌گراد و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید برگزیده شدند. برای تیمار هیدروپرایمینگ، پرایمینگ با آب دیونیزه انجام شد. برای اعمال تیمار شوک گرمایی، بذرهای پرایم‌شده پس از اینکه ۱۰ درصد رطوبت خود را از دست دادند، به‌مدت ۳ ساعت درون ظرف‌های آلومینیومی درب‌بسته در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از اعمال تیمارهای پرایمینگ و شوک گرمایی، بذرها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۹ درجهٔ سانتی‌گراد) خشک شدند؛ سپس در معرض آزمون پیری تسریع‌شده به‌مدت صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ روز، قرار گرفتند. برای انجام آزمون پیری تسریع‌شده، از هرکدام از تیمارهای مربوطه ۱۰۰ عدد بذر درون

ظرف‌های ویژهٔ حاوی ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر (رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد) قرار گرفتند و درب ظرف‌ها به‌طور کامل مسدود شد و بذرها برای مدت‌های یادشده در دمای ۴۱ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از اعمال پیری تسریع‌شده، بذرها در پتری‌دیش‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفتند و جوانه‌زنی آنها در شرایط بهینه (دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد و محیط حاوی آب مقطر) و تنش اسمزی (پتانسیل ۰/۹- مگاپاسگال ایجادشده با پلی اتیلن گلایکول و دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد) ارزیابی شد. پتانسیل ۰/۹- مگاپاسگال برای کاهش میزان جوانه‌زنی بذر شاهد انتخاب شد.

برای تعیین میزان نشت الکترولیت‌ها از بذرهای پیرشده، ۲۵ بذر در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت قراردادن نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد، هدایت الکتریکی محلول اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976). اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی شامل تعیین محتوای مالون‌دی‌آلدهید و تعیین فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز پس از اعمال پیری انجام شدند و برای هر نمونه ۳ بار تکرار شدند.

تعیین محتوای مالون‌دی‌آلدهید با روش Heath و Parker (۱۹۶۸) انجام شد. بدین‌منظور ۰/۵ گرم بذر در هاون چینی به‌طور کامل پودر شد و ۴ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱ درصد به آن افزوده و پس از همگن‌کردن، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (مدل 5702R، شرکت Eppendorf، آلمان) و روشناور جدا شد؛ سپس به آن ۴ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد تیوباربیتوریک اسید حاوی تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد اضافه شد. مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد در حمام آب گرم و سپس بلافاصله در حمام یخ قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ دوباره به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه روشناور جدا شد؛ سپس تفاضل میزان جذب در طول‌موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر برای تعیین محتوای مالون‌دی‌آلدهید استفاده و محتوای آن به‌صورت میکرومول در گرم وزن خشک بذر گزارش شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برمبنای فعالیت در میلی‌گرم پروتئین بیان شد و محتوای پروتئین محلول با روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین شد.

فعالیت کاتالاز با روش Aebi (۱۹۸۴) انجام شد. ۰/۵ گرم نمونهٔ بذر با نیتروژن مایع به‌طور کامل پودر شد و ۱ میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار سدیم فسفات حاوی ۲ میلی‌مول EDTA به آن افزوده شد. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه روشناور به‌دست‌آمده جدا و برای تعیین فعالیت کاتالاز استفاده شد. مخلوط واکنش برای تعیین فعالیت کاتالاز شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ۱۵ میلی‌مول هیدروژن پراکسید و ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ استخراج‌شده بود. پس از افزودن عصاره میزان جذب در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه ثبت شد و فعالیت آنزیم به‌صورت میکرومول هیدروژن پراکسید تجزیه‌شده در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان شد. تعیین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با روش Nakano and Asada (۱۹۸۱) انجام شد. ۰/۱ گرم نمونهٔ بذری با نیتروژن مایع به‌طور کامل پودر شد. ۱ میلی‌لیتر بافر

پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۱ میلی‌مولار، پلی‌وینیل پیرولیدین (PVP) ۱ درصد، تریتون ایکس-۱۰۰ (Triton X-100) ۰/۱ درصد و آسکوربات ۵ میلی‌مولار به آن اضافه شد و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه روشناور به‌دست‌آمده جدا شد. مخلوط واکنش برای تعیین فعالیت آسکوربات پراکسیداز شامل بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میلی‌مول آسکوربات، ۱ میلی‌مول هیدروژن پراکسید و ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی بود. پس از افزودن عصارهٔ آنزیمی میزان جذب در طول‌موج ۲۶۵ نانومتر به‌مدت ۳۰ ثانیه ثبت شد و فعالیت آنزیم به‌صورت میکرومول آسکوربات مصرف‌شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد. تعیین فعالیت پراکسیداز با روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) انجام شد. بدین‌منظور ۰/۲ گرم نمونهٔ بذر در نیتروژن مایع به‌طور کامل پودر شد و در بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۲ مولار (pH= ۶/۸) در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد عصاره‌گیری شد؛ سپس همگن به‌دست‌آمده با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و روشناور به‌دست‌آمده برای تعیین فعالیت پراکسیداز استفاده شد. مخلوط واکنش برای فعالیت پراکسیداز شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، گایاکول ۱۰ میلی‌مولار، هیدروژن پراکسید ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی بود. میزان جذب در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر UV-Vis (مدل UV2100، شرکت Unico، آمریکا) خوانده شد و فعالیت آنزیم به‌صورت میکرومول تتراگایاکول ایجادشده در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بیان شد.

**تحلیل آماری:** تجزیهٔ واریانس داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سطح احتمال P≤۰/۰۵ انجام شد و میانگین داده‌ها در نمودارهای ستونی به نمایش گذاشته شد. برای رسم نمودارها و محاسبهٔ انحراف معیار (n = ۳) از نرم‌افزار Excel نسخهٔ ۲۰۱۳ استفاده شد.

## نتایج و بحث

**جوانه‌زنی در شرایط بهینه و تنش خشکی:** پیری تسریع‌شده، جوانه‌زنی بذور پرایم‌شده را در هردو تیمار پرایمینگ به‌طور چشمگیری کاهش داد. با افزایش دورهٔ مواجه‌شدن بذور با پیری تسریع‌شده، کاهش جوانه‌زنی نیز افزایش یافت (شکل ۱). برخلاف بذور پرایم‌شده، جوانه‌زنی بذور پرایم‌نشده پس از ۲ شبانه‌روز مواجه‌شدن با پیری تسریع‌شده به‌طور معنی‌داری تغییر کرد. در تیمارهای ۲، ۴، ۶ و ۸ روزه، شوک گرمایی به‌ترتیب افزایش ۳/۵، ۲۲/۵، ۸۰ و ۱۰۷ درصد را در جوانه‌زنی بذور پرایم‌شده با آب موجب شد (شکل ۱)؛ بنابراین با افزایش مدت پیری بذر و به‌دنبال‌آن افزایش آسیب ناشی از زوال، بذرهای تیمارشده با شوک گرمایی تحمل بیشتری نسبت به بذرهای شاهد (بدون کاربرد شوک گرمایی) دربرابر زوال نشان می‌دهند. درصد تغییرات در جوانه‌زنی بذرهای پرایم‌شده با آسکوربیک اسید پس از اعمال شوک گرمایی به‌ترتیب صفر، ۱۲/۵، ۴۶ و ۲۸ درصد برای مدت‌های ۲ تا ۸ شبانه‌روز پیری بود (شکل ۱). در این مورد هم مشاهده می‌شود با افزایش مدت پیری بجز پیری ۸ شبانه‌روزی، اثر شوک گرمایی چشمگیرتر خواهد بود. تأثیر شوک گرمایی در حفظ توانایی جوانه‌زنی بذرهای پرایم‌شده با آب و

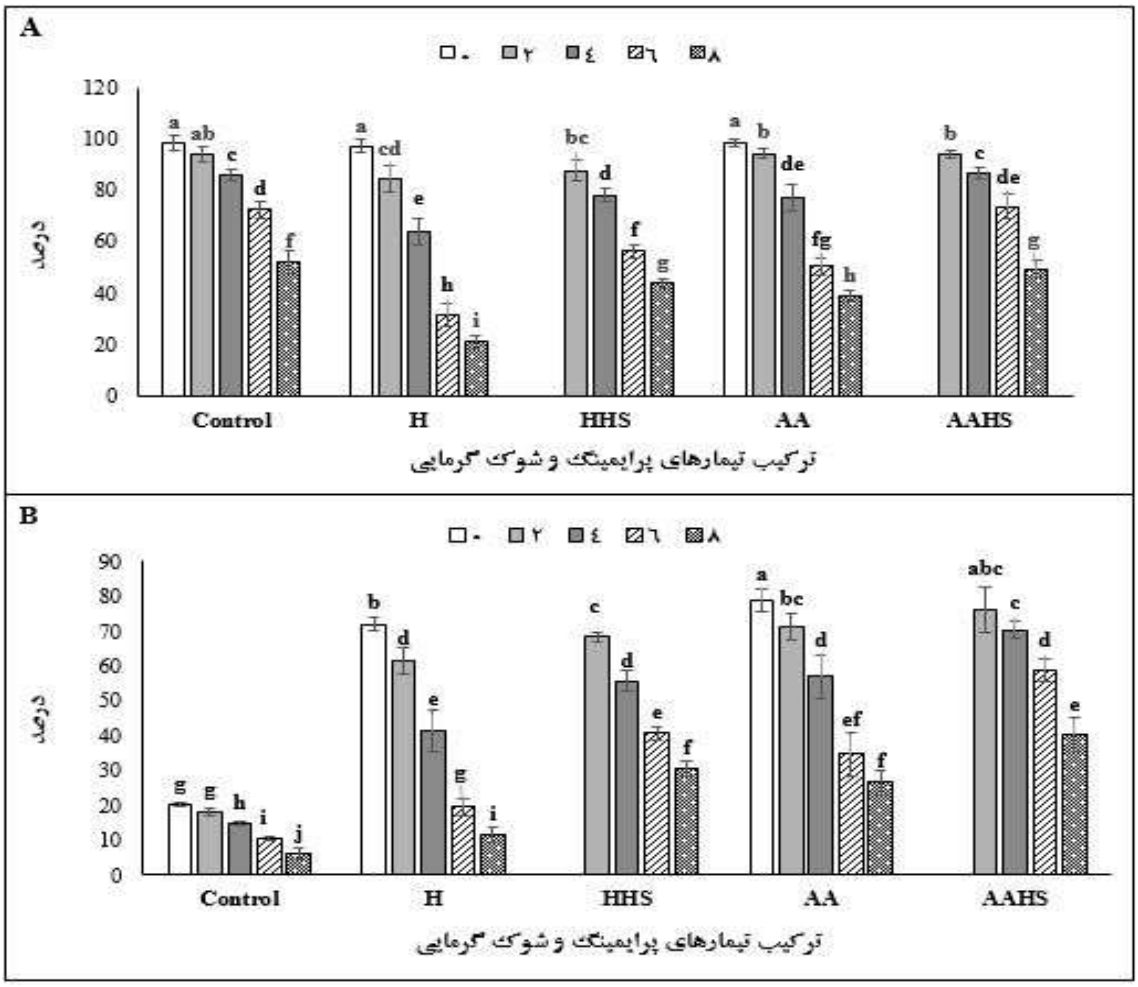
آسکوربیک اسید بر پایهٔ شاخص $T_{50}$ در جدول ۱ نمایش داده شده است. شاخص $T_{50}$ در اینجا نشان‌دهندهٔ مدتی است که طول می‌کشد توانایی جوانه‌زنی بذر در مدت پیری به ۵۰ درصد کاهش یابد.

جدول ۱- شاخص $T_{50}$ در ترکیب تیمارهای پرایمینگ و شوک گرمایی

| $T_{50}$ (روز) | تیمار |
|---|---|
| ۹/۴۷ ± ۰/۳۲ [a] | بذور پرایم‌نشده |
| ۴/۹۳ ± ۰/۱۱ [d] | هیدروپرایمینگ |
| ۷/۱۳ ± ۰/۱ [b] | شوک گرمایی + هیدروپرایمینگ |
| ۶/۶ ± ۰/۱۲ [c] | پرایمینگ با آسکوربیک اسید |
| ۹/۴ ± ۰/۱۶ [a] | شوک گرمایی + پرایمینگ با آسکوربیک اسید |

مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq ۰/۰۵$ هستند.

تأثیر شوک گرمایی در حفظ توانایی جوانه‌زنی بذرهای پرایم‌شده دلایل مختلفی دارد؛ ازجمله مواجه‌شدن بذرهای پرایم‌شده با دمای زیاد به‌مدت کوتاه، تنش اکسیداتیو با شدت متوسط ایجاد می‌کند و این تنش کوتاه‌مدت ممکن است تحمل را به تنش اکسیداتیو ناشی از دوران ذخیره و پیری بذر افزایش دهد. افزون‌براین گزارش‌هایی وجود دارند مبنی بر اینکه کاربرد تیمار شوک گرمایی در بذرهای پرایم‌شده تحریک بیان ژن پروتئین‌های شوک گرمایی را موجب می‌شود. برخی پروتئین‌های شوک گرمایی، چپرون‌های مولکولی هستند که در حفظ ساختار پروتئین‌ها اهمیت دارند (Gurusinghe and Bradford, 2001). در همین زمینه گزارش شده است تیمار دمای زیاد پس از پرایمینگ و خشک‌کردن آهستهٔ بذر افزایش عمر بذر را سبب می‌شود (Demir Kaya *et al*., 2006). خشک‌کردن آهستهٔ بذر پس از پرایمینگ، ساخت پروتئین‌های LEA القاء می‌کند؛ درحالی‌که تیمار دمای زیاد، پروتئین‌های شوک گرمایی را القاء می‌کند و کاربرد هردو تیمار افزایش عمر بذر پرایم‌شده را موجب می‌شود (Demir Kaya *et al*., 2006; Gurusinghe *et al*., 2002). پیشنهاد شده است سازوکارهای دخیل در افزایش تحمل بذر به تنش گرما، در افزایش عمر بذر پس از کاربرد شوک گرمایی هم مؤثر باشند (Sung, 1996). اثر شوک گرمایی در حفظ توانایی جوانه‌زنی بذرهای پرایم‌شده با آب و آسکوربیک اسید، در شرایط تنش خشکی هم پابرجا بود. همان‌طورکه در جدول ۲ نشان داده شده است اعمال شوک گرمایی، افزایش این نسبت جوانه‌زنی را در بذرهای پرایم‌شده با آب و آسکوربیک اسید موجب شد. در بذرهای پرایم‌نشده، تنش خشکی کاهش شدید جوانه‌زنی را موجب و پس از مواجه‌شدن با پیری تسریع‌شده به‌مدت ۸ روز، نسبت جوانه‌زنی در شرایط تنش خشکی به شرایط بدون تنش، تنها ۰/۱۲ بود (جدول ۲). گزارش‌های دیگری هم به تأثیر پرایمینگ بذر در افزایش توانایی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در شرایط تنش خشکی اشاره کرده‌اند (Anosheh *et al*., 2011; Demir Kaya *et al*., 2006).




شکل ۱- درصد جوانه‌زنی بذرهای پرایم‌شده و شاهد پس از مدت‌های مختلف پیری تسریع‌شده در شرایط بهینه (A) و در پتانسیل ۰/۹- مگاپاسگال (B): هیدروپرایمینگ (H)، هیدروپرایمینگ + شوک گرمایی (HHS)، پرایمینگ با آسکوربیک اسید (AA)، پرایمینگ با آسکوربیک اسید + شوک گرمایی (AAHS) و تیمار شاهد یا بذرهای پرایم‌نشده (Control)- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ هستند.

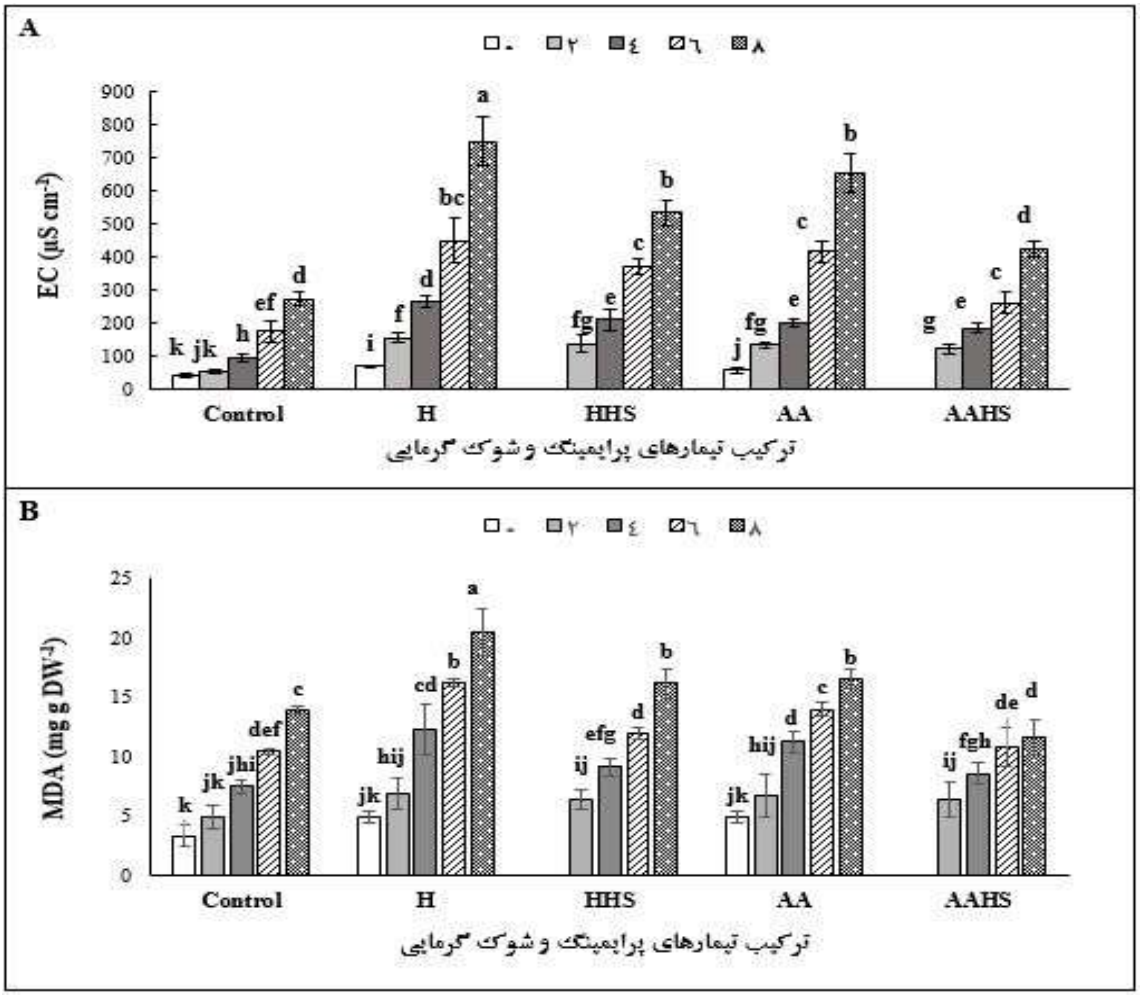
جدول ۲- نسبت جوانه‌زنی در پتانسیل ۰/۹- مگاپاسگال به جوانه‌زنی در شرایط بهینه پس از مدت‌های مختلف پیری تسریع‌شده: هیدروپرایمینگ (H)، هیدروپرایمینگ + شوک گرمایی (HHS)، پرایمینگ با آسکوربیک اسید (AA)، پرایمینگ با آسکوربیک اسید + شوک گرمایی (AAHS) و تیمار شاهد یا بذرهای پرایم‌نشده (Control)

| | ۰ | ۲ روز | ۴ روز | ۶ روز | ۸ روز |
|---|---|---|---|---|---|
| H | ۰/۷۴± ۰/۰۱۸ $^{b}$ | ۰/۷۴± ۰/۰۱۱ $^{b}$ | ۰/۶۵ ±۰/۰۲۲ $^{c}$ | ۰/۰/۶±۰/۰۲۱ $^{d}$ | ۰/۵۲ ±۰/۰۲۴ $^{d}$ |
| HHS | | ۰/۷۹ ±۰/۰۲۳ $^{a}$ | ۰/۷۱ ±۰/۰۲ $^{b}$ | ۰/۷۲ ±۰/۰۱۹ $^{b}$ | ۰/۷ ±۰/۰۳۱ $^{b}$ |
| AA | ۰/۸ ± ۰/۰۱۳ $^{a}$ | ۰/۷۵± ۰/۰۱۸ $^{ab}$ | ۰/۷۴ ±۰/۰۱۶ $^{b}$ | ۰/۶۷ ±۰/۰۱۸ $^{c}$ | ۰/۶۷ ±۰/۰۲۸ $^{c}$ |
| AAHS | | ۰/۸ ±۰/۰۱۱ $^{a}$ | ۰/۸۱ ±۰/۰۲۵ $^{a}$ | ۰/۸ ±۰/۰۲۷ $^{a}$ | ۰/۸۱ ±۰/۰۱۷ $^{a}$ |
| بذور پرایم‌نشده | ۰/۲۱ ±۰/۰۱۹ $^{c}$ | ۱۹ ± ۰/۰۰۹ $^{c}$ | ۰/۱۷ ±۰/۰۱۳ $^{d}$ | ۰/۱۵ ±۰/۰۱۱ $^{e}$ | ۰/۱۲ ±۰/۰۱۵ $^{e}$ |

مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ هستند.

**نشت الکترولیت‌ها و محتوای مالون‌دی‌آلدهید:** پیری تسریع‌شده افزایش معنی‌دار نشت الکترولیت را از بذر موجب شد و مقدار این نشت با افزایش مدت پیری به‌طور چشمگیری افزایش یافت. همان‌طورکه در شکل ۲- A نشان داده شده است کاربرد شوک گرمایی به‌طور معنی‌داری نشت الکترولیت را از هردو تیمار پرایمینگ یعنی پرایمینگ با آب یا آسکوربیک اسید کاهش داد و هرچه مدت اعمال پیری افزایش یافت، اثر شوک گرمایی در کاهش نشت الکترولیت مشهودتر بود. بذور پرایم‌شده در همهٔ زمان‌های پیری، نشت الکترولیت بیشتری در مقایسه با بذور شاهد نشان دادند. پرایمینگ بذور با آسکوربیک اسید با کاربرد شوک گرمایی پیش از مواجه‌شدن با پیری، بهترین نتیجه را در زمینهٔ کاهش نشت الکترولیت از بذر و درنتیجه، افزایش یکپارچگی غشاء نشان داد. همان‌طورکه در شکل ۲- B نشان داده شده است محتوای مالون‌دی‌آلدهید هنگام پیری تسریع‌شده به‌طور مداوم افزایش یافت که نشان‌دهندهٔ افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در مدت پیری بذر است. شوک گرمایی کاهش معنی‌دار محتوای مالون‌دی‌آلدهید بذور پرایم‌شده را موجب شد. باتوجه‌به همبستگی منفی ($r = -۰/۸۹$) بین محتوای مالودن‌دی‌آلدهید و توانایی جوانه‌زنی بذر پس از پیری، به نظر می‌رسد کاهش پراکسیداسیون لیپیدها بر اثر اعمال شوک گرمایی نقش مهمی در کاهش آسیب واردشده به بذرهای پرایم‌شده در مدت مواجه‌شدن با پیری تسریع‌شده داشته است. اثر شوک گرمایی در کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، در بذرهای پرایم‌شده با آب چشمگیرتر بود و اعمال شوک گرمایی، تجمع مالون‌دی‌آلدهید را در این بذور پس از دوره‌های مختلف پیری تسریع‌شده بیشتر کاهش داد. آسکوربیک اسید ویژگی آنتی‌اکسیدانی دارد و باتوجه‌به مواجه‌شدن بذر در مدت پیری با تنش اکسیداتیو، پرایمینگ بذر با آسکوربیک اسید ممکن است در کاهش آسیب ناشی از تنش اکسیداتیو و به‌ویژه پراکسیداسیون لیپیدها مؤثر باشد. باتوجه‌به آثار مثبت شوک گرمایی و آسکوربیک اسید در کاهش آسیب اکسیداتیو واردشده به بذر نتیجه‌گیری می‌شود این دو تیمار بر کاهش آسیب اکسیداتیو اثر افزایشی دارند؛ به‌طوری‌که کاربرد هم‌زمان این دو تیمار به بروز کمترین میزان پراکسیداسیون لیپیدها منجر شد (شکل ۲). پژوهش‌های فراوانی دربارهٔ نقش پراکسیداسیون لیپیدها در کاهش توانایی حیات و جوانه‌زنی بذر گونه‌های مختلف انجام شده‌اند و نتایج به‌دست‌آمده در گونه‌های مختلف و بر اثر سایر تیمارها متفاوت بوده‌اند. اگرچه نقش پراکسیداسیون لیپیدها در زوال بذر های سویا (Sung, 1996) در مدت پیری تأیید شده است، در گندم (Girard and LeMeste, 1992) و ذرت (Lin and Pearce, 1990) رابطهٔ مستقیمی میان پراکسیداسیون لیپیدها و زوال بذر گزارش نشده است. در مدت زوال بذر تولید گونه‌های فعال اکسیژن و به‌دنبال‌آن پراکسیداسیون لیپیدها تغییر در ویژگی نفوذپذیری انتخابی غشاها و درنتیجه، افزایش نشت الکترولیت را از بذر موجب می‌شود. همان‌طورکه پیشتر هم اشاره شد شوک گرمایی، کاهش نشت الکترولیت را از بذور پیرشده موجب شد؛ ازاین‌رو به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر این

اثر شوک گرمایی با کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی همراه بوده است؛ البته لیپیدهای غشایی تنها اجزاء غشاء نیستند که هدف حملهٔ ROS قرار می‌گیرند؛ بلکه پروتئین‌های غشایی هم هدف مهم دیگری در غشاء هستند که واردشدن آسیب به آنها با ROS افزایش نشت الکترولیت و کاهش نفوذپذیری انتخابی غشاء را موجب می‌شود (Mirra *et al*., 2011). در پژوهش حاضر، رابطهٔ نزدیکی میان میزان انباشت مالون‌دی‌آلدهید و میزان نشت الکترولیت‌ها (r=۰/۹۸) از بذر وجود داشت و این موضوع نشان می‌دهد یکی از دلایل اصلی کاهش یکپارچگی غشاء و جوانه‌زنی بذرهای پیرشده پراکسیداسیون لیپیدها است. کاهش در انباشت مالون‌دی‌آلدهید و پراکسیداسیون لیپیدها در بذرهای تیمارشده با شوک گرمایی از افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در این بذرها ناشی می‌شود که به کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌انجامد.

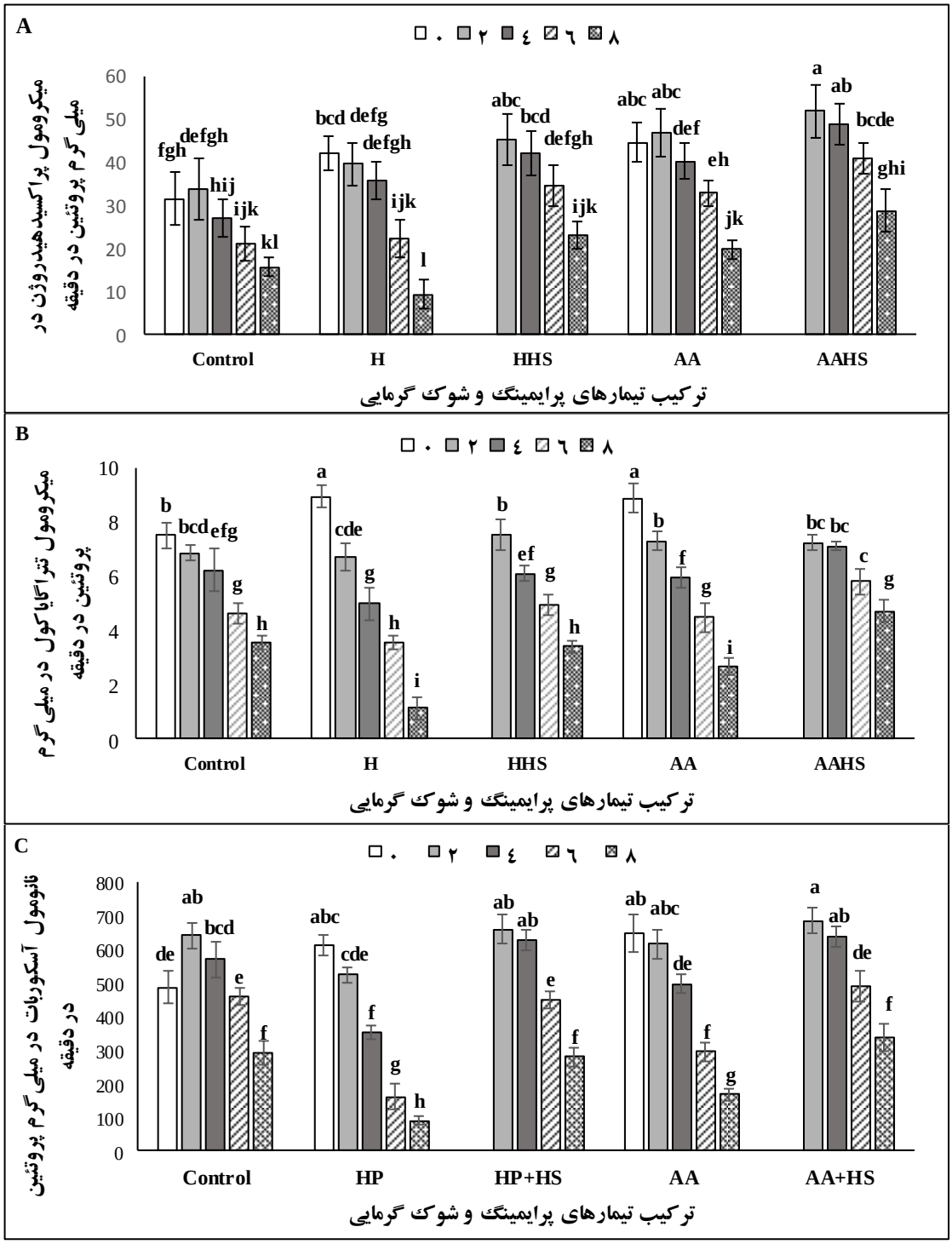



شکل ۲- نشت الکترولیت‌ها (A) و محتوای مالون‌دی‌آلدهید (B) بذرهای پرایم‌شده و شاهد پس از مدت‌های مختلف پیری تسریع‌شده: هیدروپرایمینگ (H)، هیدروپرایمینگ + شوک گرمایی (HHS)، پرایمینگ با آسکوربیک اسید (AA)، پرایمینگ با آسکوربیک اسید + شوک گرمایی (AAHS) و تیمار شاهد یا بذرهای پرایم‌نشده (Control)- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ هستند.

**فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان:** با افزایش مدت پیری، فعالیت کاتالاز در همهٔ تیمارهای پرایمینگ کاهش یافت و در تیمار ۸ روز پیری به کمترین میزان رسید. شوک گرمایی به‌طور معنی‌داری فعالیت کاتالاز را در بذور پیرشده افزایش داد (شکل ۳- A). سرعت کاهش فعالیت کاتالاز در مدت پیری در بذور پرایم‌شده از بذور شاهد بیشتر بود. بذور پرایم‌شده با آب ازنظر فعالیت کاتالاز پس از دوره‌های ۲ و ۴ روزهٔ پیری تفاوت معنی‌داری با بذور پرایم‌شده با آسکوربیک اسید نداشتند؛ اما در دوره‌های ۶ و ۸ روزهٔ پیری فعالیت کاتالاز در بذور پرایم‌شده با آسکوربیک اسید به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. شوک گرمایی اثر تقریباً یکسانی در بهبود فعالیت کاتالاز در هریک از این دو تیمار پرایمنگ داشت. کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی بذر پس از روبه‌روشدن با پیری ممکن است توانایی جوانه‌زنی و بنیهٔ بذر را کاهش دهد. کاربرد تیمار شوک گرمایی ممکن است با بهبود فعالیت کاتالاز در دوران پیری بذر در کاهش آسیب اکسیداتیو ایجادشده با گونه‌های فعال اکسیژن و درنتیجه، کاهش زوال بذر نقش داشته باشد.

بررسی روند تغییرات فعالیت پراکسیداز در مدت پیری بذر نشان داد با افزایش مدت پیری، فعالیت پراکسیداز هم به‌طور مداوم کاهش می‌یابد (شکل ۳- B). در بذور پرایم نشده، فعالیت پراکسیداز پس از مواجه‌شدن با تیمارهای ۲ و ۴ شبانه‌روزی پیری تسریع‌شده افزایش یافت؛ اما با افزایش مدت پیری از ۴ شبانه‌روز روند کاهشی داشت. در هردو تیمار پرایمینگ، فعالیت پراکسیداز پس از ۲ شبانه‌روز پیری به‌طور معنی‌داری تغییر نکرد؛ اما در مدت‌های طولانی‌تر پیری، فعالیت این آنزیم کاهش یافت. مقدار کاهش فعالیت پراکسیداز در مدت پیری به نوع پرایمینگ و اعمال تیمار شوک گرمایی وابسته بود. بذور پرایم‌شده با آسکوربیک اسید فعالیت بیشتر آنزیم پراکسیداز را نسبت به بذور پرایم‌شده با آب نشان دادند. شوک گرمایی، فعالیت پراکسیداز را در هردو تیمار پرایمینگ افزایش داد؛ اما نسبت این افزایش در بذور پرایم‌شده با آب بیشتر بود؛ به‌عبارت دیگر باتوجه‌به کاهش سریع‌تر فعالیت پراکسیداز در مدت پیری بذرهای پرایم‌شده با آب، اعمال شوک گرمایی، بیشتر، بازیابی فعالیت پراکسیداز را در بذرهای پیرشده موجب شد. بیشترین میزان فعالیت پراکسیداز به‌ویژه در پیری طولانی‌مدت بذر در ترکیب پرایمینگ با آسکوربیک اسید و اعمال شوک گرمایی دیده شد (شکل ۳- B). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با افزایش مدت پیری بذر کاهش یافت. شوک گرمایی افزایش معنی‌دار فعالیت آسکوربات پراکسیداز را در هردو تیمار پرایمینگ موجب شد. در بذرهای پرایم‌شده با آب اعمال شوک گرمایی با افزایش چشمگیرتر فعالیت آسکوربات پراکسیداز همراه بود. فعالیت آسکوربات پراکسیداز در بذرهای پرایم‌نشده حتی پس از ۶ روز پیری کاهش معنی‌داری یافت؛ اما با افزایش مدت پیری به ۸ روز کاهش محسوسی در فعالیت این آنزیم مشاهده شد (شکل ۳- C). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به حضور سوبسترای آن، آسکوربیک اسید، وابسته است؛ بنابراین احتمالاً پرایمینگ بذر با آسکوربیک اسید با افزایش

دسترسی آنزیم به سوبسترا بر افزایش فعالیت این آنزیم مؤثر است. همان‌طورکه در شکل ۳- C مشاهده می‌شود میزان کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیداز هنگام مواجه‌شدن با زوال ناشی از پیری در بذرهای پرایم‌شده با آسکوربیک اسید کمتر از بذرهای پرایم‌شده با آب بود. در پژوهش‌های گوناگون، تنش اکسیداتیو عامل اصلی مؤثر در زوال بذرهای انبارشده معرفی شده است؛ ازجمله گزارش شده است تولید گونه‌های فعال اکسیژن و انباشت آنها در بذرهای صنوبر سیاه ذخیره‌شده در دو سال تا اندازه‌ای است که فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مربوط به چرخهٔ آسکوربات - گلوتاتیون آن را جبران نمی‌کند؛ بنابراین به کاهش چشمگیر توانایی جوانه‌زنی این بذرها منجر می‌شود (Kalemba and Suszka Ratajczak, 2015). برخی بررسی‌ها پیشنهاد کرده‌اند فاکتورهای رونویسی مربوط به پروتئین‌های شوک گرمایی در حس‌کردن گونه‌های فعال اکسیژن دخیل هستند. در همین زمینه گزارش شده است در پروموتور ژن رمزکنندهٔ آنزیم آسکوربات پراکسیداز، یک توالی متصل‌شونده به یکی از پروتئین‌های شوک گرمایی وجود دارد. گیاهان تراریخت آرابیدوپسیس که در آنها ژن این پروتئین بیش‌بیان شده بود، نسبت به گیاهان وحشی فعالیت بیشتر آسکوربات پراکسیداز را در رویارویی با تنش گرما نشان دادند (Panchuk *et al*., 2002; Kaur *et al*., 2015). پروتئین‌های شوک گرمایی همچنین در افزایش مقاومت گیاهچه دربرابر سایر عوامل ایجاد تنش اکسیداتیو نیز نقش مهمی دارند. گزارش شده است بیش‌بیان ژن این پروتئین‌ها به افزایش تحمل گیاهچه‌های آفتابگردان در برابر آسیب اکسیداتیو القاشده به‌وسیلهٔ تنش خشکی منجر می‌شود (Personat *et al*., 2014). همچنین Kaur و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند پروتئین‌های شوک گرمایی کوچک (HSPs) با کاهش انباشت گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی در افزایش بقای بذر در شرایط پیری تسریع‌شده دارند. کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بر اثر پیری بذر به‌دلایل متعددی مانند آسیب‌رسیدن به ساخت نوکلئیک اسیدها که درنهایت در ساخت پروتئین اختلال ایجاد می‌کند، کاهش ساخت پروتئین‌ها ازجمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و رسوب‌کردن و غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها نسبت داده می‌شود (McDonald, 1999). علاوه‌براین، افزوده‌شدن قندهای احیاکننده به پروتئین‌ها که به واکنش میلارد (Maillard) موسوم است نیز غیرفعال‌شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در مدت پیری بذر موجب می‌شود (Murthy *et al*., 2003). از دیگر دلایلی که برای کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مدت پیری بیان شده‌اند، حملهٔ گونه‌های فعال اکسیژن به این آنزیم‌هاست که به تخریب آنها منجر می‌شود (Soeda *et al*., 2005). بین همهٔ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، میزان فعالیت آنزیم های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز، نشانگر کلیدی در تعیین بنیهٔ بذور برنج پیرشده معرفی شده است (Yin *et al*., 2014).




شکل ۳- فعالیت کاتالاز (A)، پراکسیداز (B) و آسکوربات پراکسیداز (C) بذرهای پرایم‌شده و شاهد پس از مدت‌های مختلف پیری تسریع‌شده: هیدروپرایمینگ (H)، هیدروپرایمینگ + شوک گرمایی (HHS)، پرایمینگ با آسکوربیک اسید (AA)، پرایمینگ با آسکوربیک اسید + شوک گرمایی (AAHS) و تیمار شاهد یا بذرهای پرایم‌نشده (Control)- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ هستند.

## جمع‌بندی

پرایمینگ بذر ماشک با افزایش چشمگیر توانایی جوانه‌زنی در تنش خشکی همراه است؛ اما درعین‌حال مواجه‌شدن بذور پرایم‌شدهٔ ماشک با شرایط پیری تسریع‌شده، توانایی جوانه‌زنی این بذور را به‌سرعت کاهش می‌دهد. همچنین فراوری بذور پرایم‌شده با اعمال شوک‌گرمایی، اثر چشمگیری در حفظ توانایی جوانه‌زنی و رشد گیاهچهٔ این بذرها دارد. با افزایش مدت پیری و به‌دنبال‌آن افزایش زوال و آسیب ناشی از آن به ساختارهای حیاتی بذر، تأثیر احیاکنندهٔ شوک گرمایی در حفظ تونایی جوانه‌زنی بذور پرایم‌شده مشهودتر می‌شود. آثار مثبت شوک گرمایی در مدت عمر بذرهای پرایم‌شده، با افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون غشایی همراه هستند.

## سپاسگزاری

نگارندگان از کارشناس محترم آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهان زراعی و تکنولوزی بذر پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران بابت همکاری در انجام پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند.

## منابع

Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology 105: 121-126.

Anosheh, H. P., Sadeghi, H. and Emam, Y. (2011) Chemical priming with urea and $KNO_3$ enhances maize hybrids (*Zea mays* L.) seed viability under abiotic stress. Journal of Crop Science and Biotechnology 14(4): 289-295.

Asghari Meidani, J. and Karimi, E. (2013) The effect of sowing depth on forage yield vetch (*Vicia spp*.) in rainfed conditions in Maragheh. Iranian Journal of Field Crops Research 11(3): 430-436 (in Persian).

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Butler, L. H., Hay, F. R., Ellis, R. H., Smith, R. D. and Murray, T. B. (2009) Priming and re-drying improve the survival of mature seeds of *Digitalis purpurea* during storage. Annals of Botany 103: 1261-1270.

Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalases and peroxidase. Methods in Enzymology 2: 764-775.

Demir Kaya, M., Okcu, G., Atak, M., Cikili, Y. and Kolsarıc, O. (2006) Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). European Journal of Agronomy 24: 291-295.

Girard, J. and LeMeste, M. (1992) Lack of relationship between free radical levels determined by ESR technique and viability of wheat seeds. Proceedings of the Academy of sciences 3: 417-422.

Goel, A., Goel, A. K. and Sheoran, I. S. (2003) Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. Journal of Plant Physiology 160: 1093-1100.

Gurusinghe, S. H. and Bradford, K. J. (2001) Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. Seed Science Research 11: 121-133.

Gurusinghe, S., Powell, L. T. and Bradford, J. (2002) Enhanced expression of BiP is associated with treatments that extend storage longevity of primed tomato seeds. Journal of American Society for Horticulture Science 127(4): 528-534.

Heath, R. L. and Parker, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archive of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Kalemba, E. M. and Suszka Ratajczak, J. (2015) The role of oxidative stress in determining the level of viability of black poplar (*Populus nigra*) seeds stored at different temperatures. Functional Plant Biology 42(7): 630-642.

Kaur, H., Petla, B., Kamble, N., Singh, A., Rao, V., Salvi, P., Goosch, S. and Majee, M. (2015) Differentially expressed seed aging responsive heat shock protein OsHSP18.2 implicates in seed vigor, longevity and improves germination and seedling establishment under abiotic stress. Frontiers in Plant Science 6: 713-723.

Lehner, A., Mamadou, N., Poels, P., Come, D., Bailly, C. and Corbineau, F. (2008) Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation andantioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. Journal of Cereal Science 47: 555-565.

Lin, S. S. and Pearce, R. S. (1990) Changes in lipids of bean seeds (*Phaseolus vulgaris*) and corn caryopses (*Zea mays*) aged in contrasting environments. Annals of Botany 65: 451-456.

McDonald, M. B. (1999) Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. Seed Science and Technology 27: 177-237.

Mirra, S., Strelles, E., Benito, M. and Corbineau, F. (2011) Biochemical changes induced in seeds of Brassicaceae wild species during ageing. Acta Physiologia Plantarum 33: 1803-1809.

Murthy, U. M. N., Kumar, P. P. and Sun, W. Q. (2003) Mechanisms of seed aging under different storage conditions for Vigna radiate (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. Journal of Exprimental Botany 54: 1057-1067.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22(5): 867-880.

Panchuk, I. I., Volkov, R. A. and Schoffl, F. (2002) Heat stress and heatshock transcription factor dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. Plant Physiology 129: 838-853.

Personat, J. M., Tejedor-Cano, J., Prieto-Dapena, P., Almoguera, C. and Jordano, J. (2014) Co-overexpression of two Heat Shock Factors results in enhanced seed longevity and in synergistic effects on seedling tolerance to severe dehydration and oxidative stress. BMC Plant Biology 14: 56-68.

Pukacka, S. and Ratajczak, E. (2007) Age-related biochemical changes during storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. Seed Science Research 17: 45-53.

Soeda, Y., Konings, C. J. M. and Vorst, O. (2005) Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. Plant Physiology 137: 354-368.

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

Tammela, P., Vaananen, P. S., Lakso, I., Hopia, A., Vourela, H. and Nygrem, M. (2005) Tocopherols, tocoterienols and fatty acids as indicators of natural ageing in *Pinus syluestris* seeds. Scandinavian Journal of Forest Research 20: 378-384.

Varghese, B., Chandra, S. and Naithani, C. (2008) Oxidative metabolism-related changes in cryogenically stored neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. Journal of Plant Physiology 165: 755-765.

Yin, G., Xin, X., Song, C., Chen, X., Zhang, J., Wu, S., Li, R., Liu, X. and Lu, X. (2014) Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed. Plant Physiology and Biochemistry 80: 1-9.