



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY
E-ISSN: 2322-2204
Vol. 13, Issue, No. 3, Autumn 2021
Document Type: Research Paper
Received: 09/12/2021 Accepted: 10/05/2022

The effect of priming with sodium hydrosulfide and salicylic acid on early stages of growth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) under salt stress

Mahtab Zeinivand, Maryam Nasr Esfahani*

Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khoramabbad, Iran

Abstract

Gaseous molecules hydrogen sulfide (H_2S) and salicylic acid (SA) enhance plant acclimation to environmental stresses such as salt stress. In the current study, the effects of priming of alfalfa seeds with sodium hydrosulfide (NaHS) (0.75 mM) as H_2S -donor or SA (0.75 mM) on the improvement of germination indicators and the growth of seedlings under salt stress (0, 25, 50 and 100 mM) and also the decline of oxidative damages caused by salt stress (0 and 50 mM) were evaluated. The results showed that under unprimed conditions, salt stress had negative effects on different indicators of alfalfa seed germination and also on the growth of alfalfa seedlings. In addition, under unprimed conditions, the accumulation of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) significantly increased under salt stress. NaHS-priming and SA-priming showed positive effects on germination indicators and root length significantly increased in the seedlings obtained from NaHS- or SA-primed seeds. NaHS-priming and SA-priming decreased the accumulation of MDA and H_2O_2 under salt stress conditions showing the effect of priming treatments in decreasing oxidative stress. In addition, in response to salt stress, NaHS-priming and SA-priming significantly increased the levels of total sugars (especially 1 and 3 days after germination), when compared with their levels under unprimed conditions. Therefore, NaHS-priming and SA-priming treatments enhance plant responses in the first days after germination against salinity by reducing oxidative damages through activation of the antioxidant defense systems.

Keywords: Alfalfa, Sodium hydrosulfide, Priming, Salicylic acid, Malondialdehyde, Seed germination, Total antioxidant capacity

* Corresponding Author: esfahani_nm@yahoo.com
2322- 2204/ © 2021 University of Isfahan



اثر پرایمینگ با اسید سالیسیلیک و سدیم هیدروسولفید بر روی مراحل اولیه رشد یونجه (*Medicago sativa* L.) تحت تنش شوری

مهتاب زینی‌وند، مریم نصر اصفهانی*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

چکیده

مولکول گازی سولفید هیدروژن (H_2S) و اسید سالیسیلیک (SA) سازش گیاهان به شرایط تنش‌زای محیطی مانند شوری را افزایش می‌دهند. در پژوهش حاضر، اثر پرایمینگ بذرهای یونجه با SA (۰/۷۵ میلی‌مولار) و سدیم هیدروسولفید (NaHS) (۰/۷۵ میلی‌مولار) به‌عنوان دهنده H_2S بر بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه‌های یونجه در شرایط شوری (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) و نیز کاهش تنش اکسیداتیو ایجادشده توسط تنش شوری (۰ و ۵۰ میلی‌مولار) ارزیابی شد. نتایج نشان داد که در شوری، دو مولکول پرایمینگ SA و NaHS توانستند کاهش جوانه‌زنی بذرهای یونجه و رشد اولیه گیاهچه‌ها را بهبود دهند. علاوه بر این، در شرایط بدون پرایم، تجمع درخور ملاحظه‌ای از مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن در پاسخ به شوری مشاهده شد. پرایمینگ SA و NaHS تأثیرات مثبتی روی شاخص‌های مختلف جوانه‌زنی در بذرهای یونجه تحت شوری داشتند و همچنین تیمارهای پرایمینگ طول ریشه گیاهچه‌های تحت شوری را به میزان معنی‌داری افزایش داد. پرایمینگ با NaHS و SA تجمع مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن را در شرایط شوری در مقایسه با شرایط بدون پرایمینگ کاهش داد که نشان دهنده تأثیر پرایمینگ با NaHS یا SA در کاهش تنش اکسیداتیو است. همچنین، در پاسخ به شوری، پرایمینگ با NaHS یا SA سطح قند کل را به‌ویژه در روزهای اول و سوم پس از جوانه‌زنی به میزان معنی‌داری در مقایسه با شرایط بدون پرایمینگ افزایش داد. بنابراین، پرایمینگ NaHA یا SA پاسخ‌های گیاه در نخستین روزهای پس از جوانه‌زنی را در مقابل شوری از طریق کاهش آسیب‌های ناشی از تنش با فعال کردن سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: یونجه، پرایمینگ، سدیم هیدروسولفید، اسید سالیسیلیک، مالون‌دی‌آلدئید، جوانه‌زنی بذر، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل



مقدمه

شوری خاک و آب یکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی است که در بیشتر مناطق خشک، نیمه‌خشک و ساحلی رایج است. به‌علت مدیریت نامناسب آبیاری و زهکشی، بارندگی کم، بخار زیاد و آبیاری با آب شور، شور شدن خاک‌ها و آب‌ها در حال گسترش است و پیش‌بینی می‌شود که پنجاه درصد از اراضی قابل کشت تا اواسط قرن ۲۱ از بین می‌رود (Munns and Tester, 2008; Shrivastava and Kumar, 2015). در بسیاری از گونه‌های گیاهی، فرآیند جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه‌ها مهمترین و حساس‌ترین مراحل در چرخه زندگی گیاه هستند که تحت تأثیر تنش‌های محیطی به‌ویژه شوری خاک و آب قرار می‌گیرند. تنش شوری از طریق کاهش سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی، باعث استقرار نامناسب و کاهش تراکم گیاهچه‌ها شده و در نتیجه به کاهش چشمگیر رشد و نمو و همچنین میزان تولید محصول در اکثر گیاهان به‌ویژه گیاهان زراعی و علوفه‌ای منجر خواهد شد (Ansari and Sharif-Zadeh 2012; Javed et al., 2022). با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان و نیز شوری خاک و آب در اکثر نقاط جهان به واسطه تغییرات آب و هوایی، بشر تا سال ۲۰۵۰ با مشکل جدی کمبود غذا روبه‌رو خواهد شد. بنابراین، استفاده از تکنیک‌هایی به‌منظور بهبود بنیه بذر در شرایط تنش شوری می‌تواند به افزایش عملکرد تولید محصول منجر گردد (Jisha et al., 2013). شوری فرآیند جوانه‌زنی را از طریق اختلال در جذب آب به واسطه کاهش پتانسیل اسمزی و از طریق تجمع

سمی یون‌های سدیم و کلرید بقاء جنین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Daszkowska-Golec, 2011). همچنین، شوری تعادل و توازن هورمون‌های گیاهی را تغییر می‌دهد. افزایش شوری با کاهش اکسین، سیتوکینین، جبرلین‌ها و اسید سالیسیلیک (SA) و افزایش اسید آبسزیک و جاسمونات‌ها در بافت‌های گیاهی همراه می‌شود (Miransari and Smith, 2014; Yu et al., 2020). به‌این ترتیب، شوری از طریق مسیرهای متعددی مانند محدود کردن قابلیت دسترسی به آب، آسیب به ساختمان سازمان‌یافته پروتئین‌ها و اختلال قابلیت دسترسی به ذخایر غذایی ذخیره‌شده در بذر به فرآیند جوانه‌زنی آسیب وارد می‌کند (Machado et al., 2004; Zhao et al., 2020).

تکنیک‌های متعددی می‌توانند ظهور و استقرار گیاهچه‌ها را در شرایط تنش شوری بهبود دهند که پرایمینگ بذر یکی از رایج‌ترین این تکنیک‌ها است (Ibrahim, 2016). در پرایمینگ یا پیش‌تیمار بذر پیش از کاشت، به بذر اجازه داده می‌شود تا سطح معینی آبیاری را انجام دهد و باعث فعال شدن فعالیت‌های متابولیک پیش از جوانه‌زنی شود (فاز ۱) ولی در فاز ۲ جوانه‌زنی متوقف شده و از خروج ریشه‌چه از پوشش بذر جلوگیری می‌کند (فاز ۳) (Paparella et al., 2015). پرایمینگ می‌تواند با آب، ترکیبات شیمیایی مختلف (نیترات پتاسیم، کلرید پتاسیم، فسفات پتاسیم و سولفات منیزیم)، یون‌ها، هورمون‌ها (اسید آبسزیک، جبرلیک اسید و SA)، ترکیبات تولیدکننده گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و گونه‌های فعال نیتروژن مانند نیتریک اسید (NO) انجام گیرد

است (Mostofa *et al.*, 2015). SA، تنظیم‌کننده رشد گیاهی است که به گروهی از ترکیبات فنلی تعلق دارد و در تنظیم برخی از فرآیندهای فیزیولوژیک مانند فتوسنتز، تنفس، تعرق و انتقال یون‌ها در گیاهان و نیز در بهبود تحمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی مانند فلزات سنگین، شوری، گرما و تنش خشکی نقش دارد (Rhaman *et al.*, 2020).

یونجه یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای بومی ایران است که سطح بسیار وسیعی از مراتع و مزارع را به خود اختصاص داده است. این گیاه اهمیت زیادی در تغذیه دام و افزایش فرآورده‌های دامی بازی می‌کند. اهمیت این گیاه همچنین، به علت همزیستی آن با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در خاک است که به ورود نیتروژن به خاک کمک می‌کند (Vasileva and Pachev 2015). به‌رحال، این گیاه نیاز آبی بالایی دارد و تنش خشکی و شوری به‌عنوان مهمترین عوامل بازدارنده جوانه‌زنی و رشد گیاه به‌ویژه در مراحل نخستین رشد گیاهچه‌ها شناخته شده‌اند که استقرار مناسب گیاهچه‌های یونجه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در مطالعاتی تأثیر مثبت پرایمینگ بذرهای یونجه با ترکیباتی مانند ملاتونین (Yu *et al.*, 2021) و اسید جیبرلیک (Younesi and Moradi, 2014) برای افزایش تحمل به شوری و با ترکیباتی مانند اسید آسکوربیک و پلی‌اتیلن گلیکول برای افزایش تحمل به تنش خشکی (Salemi *et al.*, 2019) بررسی شده است. با توجه به اینکه، پرایمینگ یک فناوری ارزان و پایدار است و پتانسیل بالایی برای افزایش

(Jisha *et al.*, 2013). از جمله اهداف پرایمینگ می‌توان به افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر، خروج یکنواخت و سریع‌تر گیاهچه‌ها، بالا بردن مقاومت بذر برای جوانه‌زنی تحت شرایط نامساعد محیطی، اصلاح سلول‌های آسیب دیده، ضعیف کردن موانع رشد جنین، مقابله با آفات و بیماری‌ها، بهبود کیفیت محصول و غیره اشاره کرد (Hussian *et al.*, 2014). تأثیرات مثبت پرایمینگ روی شاخص‌های مختلف جوانه‌زنی و استقرار مناسب گیاهچه‌ها تحت شرایط تنش شوری در گونه‌های مختلف زراعی مانند گوجه‌فرنگی (Pradhan *et al.*, 2014)، گندم (Feghhenabi *et al.*, 2020) و ذرت (Tabatabaei, 2014) گزارش شده است.

فیتوهورمون‌ها و مولکول‌های علامتی به‌عنوان ابزار قدرتمندی برای تغییر دادن توانایی سازشی گیاه در مقابل تأثیرات مخرب تنش‌های محیطی پیشنهاد شده است. سولفید هیدروژن (H_2S) یک گاز فعال زیستی کوچک است که در سیستم‌های گیاهی به‌علت ارتباط با پاسخ‌های سازشی گیاه در مقابل تنش‌های محیطی شناسایی شده است (Toit, 2015). در مطالعات اخیر نشان داده شده است که پرایمینگ گیاه با سدیم هیدروسولفید (NaHS) به‌عنوان تولیدکننده H_2S باعث افزایش درخورد توجه تحمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی مانند شوری، خشکی و فلزات سنگین می‌شود (Shi *et al.*, 2013; Antoniou *et al.*, 2020; Valivand *et al.*, 2019). تأثیرات مثبت H_2S در کاهش دادن اثرات مخرب تنش‌های محیطی با بهبود دادن عملکرد چندین سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان مرتبط

پرایمینگ، بذرها چندین بار با آب مقطر شستشو داده شده و با دستمال کاغذی آبیگری شدند و تا رسیدن به وزن اولیه در دمای آزمایشگاه در تاریکی خشک شدند.

اعمال تنش شوری بر بذرهاى پرایم شده و پرایم نشده

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. فاکتور اول شامل تیمارهای مختلف پرایمینگ (بدون پرایم، پرایم با آب، پرایم با NaHS و پرایم با SA) و فاکتور دوم سطوح مختلف شوری (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) بود. ۱۶ گروه تیمار در این مطالعه بررسی شد (جدول ۱).

برای بررسی تأثیر پرایمینگ با آب، NaHS یا SA بر شاخص‌های جوانه‌زنی و مراحل نخستین رشد گیاهچه‌ها تحت شرایط تنش شوری، در مقایسه با بذرهاى پرایم نشده، بذرها در داخل پتری‌دیش (با قطر ۹ سانتی‌متر) دارای دو لایه کاغذ صافی قرار داده شدند و روزانه ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۲۵، ۵۰ یا ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم به پتری‌دیش‌ها اضافه شد. کاغذ صافی پتری‌دیش‌های آبیاری شده با محلول‌های کلرید سدیم یک روز در میان تعویض شدند تا از افزایش غلظت کلرید سدیم جلوگیری شود. پتری‌دیش‌ها در دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. برای تعیین شاخص‌های جوانه‌زنی، تعداد بذر جوانه‌زده به‌طور روزانه در طی ۱۲ روز بررسی شد و ظهور ریشه‌چه به طول ۲ میلی‌متر به‌عنوان معیار جوانه‌زنی در نظر گرفته شد. شاخص‌های درصد نهایی جوانه‌زنی، میانگین زمان جوانه‌زنی و میانگین سرعت جوانه‌زنی

تحمل به تنش‌های محیطی و افزایش بهره‌وری محصول دارد، بنابراین لازم است پرایمینگ بذر با ترکیبات مختلف برای کاهش اثرات نامطلوب تنش‌های محیطی بر عملکرد گیاه مورد آزمایش قرار گیرد و مؤثرترین ترکیب پرایمینگ انتخاب شود. در این پژوهش، تأثیر پرایمینگ بذرهاى یونجه با سدیم هیدروسولفید (NaHS)، SA یا آب در افزایش تحمل و بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد تحت شرایط تنش شوری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

شرایط و مراحل انجام پرایمینگ بذرهاى یونجه

این پژوهش روی بذر یونجه رقم اصفهانی تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان انجام گرفت. در ابتدا، به‌منظور انتخاب بهترین غلظت NaHS و SA برای پرایمینگ بذور، در یک آزمایش مقدماتی بذرهاى یونجه رقم اصفهانی با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی مولار NaHS یا SA برای مدت ۴، ۶ و ۹ ساعت پرایم شدند و در نهایت بر اساس شاخص‌های جوانه‌زنی و عوامل رشد، غلظت ۰/۷۵ میلی مولار برای NaHS و SA و مدت زمان ۴ ساعت برای پرایمینگ بذور انتخاب شد. به‌منظور انجام پرایمینگ، ابتدا بذور سالم یونجه با قارچ‌کش ویتاواکس (۰/۲ درصد) به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس بذرها پس از شستشو با آب مقطر در پتری‌دیش‌های دارای دو لایه کاغذ صافی قرار داده شده و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر یا NaHS با غلظت ۰/۷۵ میلی مولار یا SA با غلظت ۰/۷۵ میلی مولار به پتری‌دیش‌ها اضافه شد. پتری‌دیش‌ها به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و در تاریکی قرار داده شدند. پس از پایان زمان

نیز محاسبه شد (Ranal and Santana 2006). سرعت جوانه‌زنی توسط شاخص تیمسون (نسبت درصد جوانه‌زنی در هر روز آزمایش به تعداد کل روزهای آزمایش) تخمین زده شد (Pérez-Fernández *et al.*, 2006). پس از اتمام زمان جوانه‌زنی، از هر پتری‌دیش ۱۰ گیاهچه دوازده روزه به‌طور تصادفی انتخاب شدند و در آون با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت قرار گرفتند. سپس وزن خشک گیاهچه توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- تیمارهای مختلف پرایمینگ و سطوح مختلف شوری

Table 1- Different treatments of priming and different levels of salinity

تیمارها	
۱	بذرهای پرایم نشده و آبیاری شده با آب مقطر
۲	بذرهای پرایم نشده آبیاری شده با ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم
۳	بذرهای پرایم نشده آبیاری شده با ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم
۴	بذرهای پرایم نشده آبیاری شده با ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم
۵	بذرهای پرایم شده با آب مقطر و آبیاری شده با آب مقطر
۶	بذرهای پرایم شده با آب مقطر و آبیاری شده با ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم
۷	بذرهای پرایم شده با آب مقطر و آبیاری شده با ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم
۸	بذرهای پرایم شده با آب مقطر و آبیاری شده با ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم
۹	بذرهای پرایم شده با NaHS و آبیاری شده با آب مقطر
۱۰	بذرهای پرایم شده با NaHS و آبیاری شده با ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم
۱۱	بذرهای پرایم شده با NaHS و آبیاری شده با ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم
۱۲	بذرهای پرایم شده با NaHS و آبیاری شده با ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم
۱۳	بذرهای پرایم شده با SA و آبیاری شده با آب مقطر
۱۴	بذرهای پرایم شده با SA و آبیاری شده با ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم
۱۵	بذرهای پرایم شده با SA و آبیاری شده با ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم
۱۶	بذرهای پرایم شده با SA و آبیاری شده با ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید

بذرهای پرایم نشده به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. برداشت بذرها تحت تیمارهای مختلف در روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ پس از جوانه‌زنی انجام شد و برای آزمایش‌های بعدی در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری میزان قند کل و قند احیاکننده

بافت تازه گیاهچه (۰/۱ گرم) با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ در

برای اندازه‌گیری برخی شاخص‌های بیوشیمیایی (قند کل، قندهای احیاکننده، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در اولین، سومین، ششمین و دهمین روز پس از جوانه‌زنی، آزمایشی مجزا طراحی شد. در این آزمایش بذرها پرایم نشده و بذرهای پرایم شده با آب، SA یا NaHS تحت تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار NaCl قرار داده شدند و

(۲۰۰۰) میزان پراکسید هیدروژن با استفاده از ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌لیتر با اسیدیت ۷ و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای H_2O_2 با استفاده از منحنی استاندارد تهیه‌شده از غلظت‌های مختلف H_2O_2 محاسبه شد و بر اساس میکرومول H_2O_2 در گرم بافت تازه گیاهیچه گزارش شد.

میزان MDA در نمونه‌ها مطابق روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۰/۱ گرم از بافت تازه گیاهیچه با ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) سائیده و به مدت ۱۵ دقیقه توسط سانتریفیوژ با دور 14000rpm سانتریفیوژ شد. عصاره رویی (۰/۵ میلی‌لیتر) به ۱ میلی‌لیتر تیوباربتوریک اسید ۰/۵ درصد (وزنی/حجمی) در تری‌کلرو استیک اسید ۲۰ درصد (وزنی/حجمی) اضافه شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد حرارت داده و سپس در وان یخ سرد شد. پس از سانتریفیوژ محلول به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت 10000rpm ، جذب روشن‌آور حاصل آن در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت و محتوای MDA با ضریب خاموشی $155\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل

به منظور اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها از روش مهار رادیکال‌های آزاد ۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده شد

هاون سائیده و به مدت ۲۰ دقیقه توسط سانتریفیوژ با سرعت 14000rpm در دمای محیط سانتریفیوژ شد. محلول روشن‌آور برای اندازه‌گیری قند کل و قند احیاکننده محلول استفاده شد.

برای اندازه‌گیری قند کل از روش اسید سولفوریک استفاده شد. به این صورت، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی به ۳۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک غلیظ (۹۸ درصد مرک) مخلوط گردید و پس از ۳۰ ثانیه ورتکس سریعاً در حمام آب یخ قرار گرفت. سپس جذب محلول در طول موج ۳۱۵ نانومتر قرائت شد و به کمک منحنی استاندارد گلوکز میزان قند کل محاسبه شد (Albalasmeh *et al.*, 2013).

برای اندازه‌گیری قند احیاکننده، ابتدا معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید (۱ گرم دی‌نیترو سالیسیلیک اسید و ۳۰ گرم تارتارات سدیم-پتاسیم) تهیه شد. ۰/۴ میلی‌لیتر معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و با کمک منحنی استاندارد مربوط میزان قند احیاکننده (گلوکز) محاسبه شد (Dubois *et al.*, 1956).

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

بافت تازه گیاهیچه (۰/۵ گرم) MDA میلی‌لیتر $\frac{A532 - A600}{155}$ تری‌کلرید سالیسیلیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) سائیده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت 14000 rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. در روش Velikova و همکاران

۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به ترتیب ۲۴/۹ و ۳۱/۹ درصد در مقایسه با بذره‌های شاهد (بذره‌های پرایم نشده و جوانه زده در شرایط غیر تنش شوری) کاهش نشان داد. درصد جوانه‌زنی بذره‌های پرایم شده با آب، SA و NaHS در شرایط تنش شوری (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) تفاوت معنی‌داری با درصد جوانه‌زنی در بذره‌های پرایم نشده تحت شرایط غیر تنش شوری نشان ندادند (شکل ۱ و جدول ۳). میانگین زمان جوانه‌زنی در بذره‌های پرایم نشده تحت تنش‌های شوری به میزان قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با شاهد بیشتر بود، در حالی که میانگین زمان جوانه‌زنی در بذره‌های پرایم شده با آب، SA و NaHS در مقایسه با بذره‌های پرایم نشده کاهش معنی‌داری را تحت تنش شوری نشان دادند (جدول ۳). نتایج نشان داد که تنش‌های شوری باعث کاهش معنی‌دار شاخص تیمسون، میانگین سرعت جوانه‌زنی، ضریب جوانه‌زنی و شاخص بُنیه در بذره‌های پرایم نشده در مقایسه با شاهد شدند (جدول ۳). نتایج تیمارهای پرایمینگ با آب، SA و NaHS نشان داد که در بذره‌های پرایم شده سطح کاهش یافته ضریب تیمسون، میانگین سرعت جوانه‌زنی، ضریب جوانه‌زنی و شاخص بُنیه در شرایط تنش شوری به میزان قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با بذره‌های پرایم نشده تحت تنش شوری افزایش پیدا کرد. بیشترین تأثیر تیمارهای پرایمینگ در بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی تحت تنش شوری در بذره‌های پرایم شده با NaHS و SA مشاهده شد (جدول ۳).

(Vongsak *et al.*, 2013). بدین منظور، به ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های تهیه شده ۹۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شدند (Bakhshi and Arakawa 2006). سپس میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH محاسبه شد (Vongsak *et al.*, 2013).

تحلیل داده‌ها

برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری ۵ درصد ($P \leq 0.05$) و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

پاسخ جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها به تنش شوری در بذره‌های پرایم نشده و پرایم شده با آب، NaHS یا SA

جدول آنالیز واریانس نشان داد که تیمارهای پرایمینگ و تنش شوری بر شاخص‌های درصد نهایی جوانه‌زنی، میانگین زمان جوانه‌زنی، شاخص بُنیه، ضریب تیمسون و میانگین سرعت جوانه‌زنی تأثیر معنی‌داری داشتند (جدول ۲). نتایج بررسی تأثیر تیمارهای پرایمینگ آب، SA و NaHS بر شاخص‌های جوانه‌زنی در یونجه رقم اصفهانی تحت شرایط تنش شوری نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذره‌های پرایم نشده در تیمارهای ۵۰ و

جدول ۲- تجزیه آنالیز واریانس میانگین تأثیر سطوح مختلف تنش شوری و تیمارهای مختلف پرایمینگ بر شاخص‌های جوانه‌زنی، رشد گیاهچه‌ها، قند احیاکننده، قند کل، H_2O_2 ، مالون‌دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل

Table 2- The analysis of variance of effects of salinity levels and priming treatments and interactions on germination indicators, seedling growth, reducing sugars, total sugars, H_2O_2 , malondialdehyde and total antioxidant capacity

صفات	خطا	پرایمینگ	تنش شوری	تنش شوری × پرایمینگ
طول گیاهچه	۰/۰۸۲	۵۹/۶ **	۶/۵ **	۷/۳۵ **
وزن خشک ساقه‌چه	۰/۰۰۰۰۱۴	۰/۰۰۰۰۲۸ **	۰/۰۰۰۰۸۲	۰/۰۰۰۰۰۵۷
وزن خشک ریشه‌چه	۰/۰۰۰۰۰۰۶۷	۰/۰۰۰۰۰۱۰	۰/۰۰۰۰۰۸۹ **	۰/۰۰۰۰۰۱۲
درصد جوانه‌زنی	۵۲/۴	۵۴۴/۵ ***	۱۱۶۷/۹ ***	۱۷۴/۴ **
میانگین زمان جوانه‌زنی	۰/۰۱۱	۱/۳ ***	۶/۲۴ ***	۰/۰۳۸ **
میانگین سرعت جوانه‌زنی	۰/۰۰۵	۰/۳۵۱ ***	۰/۰۷۳ ***	۰/۰۰۶
شاخص جوانه‌زنی	۰/۰۲۸	۱/۴۷ ***	۰/۹۹ ***	۰/۰۵۸
شاخص بینه	۳۴۶/۸	۵۶۷۹۸۲ ***	۱۹۹۸۶۵ ***	۴۴۷۶۴/۱ ***
شاخص تیمسون	۱۷/۸	۱۱۰/۴ **	۳۴۲/۷۸ ***	۳۳/۲
قند احیاکننده	۷۶/۲	۲۰۶/۱۹ *	۲۲/۱۸	۶/۹۷
قند کل	۳۳۱/۳	۷۴/۸۷	۱۴۱۱/۱ *	۴۹۸/۹
H_2O_2	۴۴۷/۹	۶۳/۱	۴۲۹۳/۸ **	۷۷۷/۲
مالون‌دی‌آلدئید	۰/۰۰۰۰۰۷۷	۰/۰۰۰۰۵۸ ***	۰/۰۰۰۰۴۲ *	۰/۰۰۰۰۰۸۰ ***
ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل	۳۹۵/۲	۱۲۰/۹	۸۱۴/۵	۸۴۰/۴

*, ** و *** نشان دهنده معنی‌داری به ترتیب در سطح ۰/۱، ۱ و ۵ درصد است.

*, ** and *** show significant differences at 0.1, 1 and 5% probability level, respectively.

۲B). وزن خشک ریشه‌چه در گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با آب، SA و NaHS به ترتیب ۲۹/۷، ۳۶/۵ و ۴۷/۴ درصد در مقایسه با وزن خشک ریشه‌چه در گیاهچه‌های پرایم نشده در شرایط غیر تنش شوری بیشتر بود. به علاوه، در تنش‌های شوری ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl، وزن خشک ریشه‌چه در گیاهچه‌های پرایم نشده به ترتیب ۲۲/۴، ۳۴/۵ و ۴۷/۹ درصد در مقایسه با گیاهچه‌های آبیاری شده با آب مقطر (شاهد) کاهش نشان داد. نتایج نشان داد وزن خشک ریشه‌چه در گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با آب، SA و NaHS از وزن خشک ریشه‌چه در گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده تحت

نتایج مربوط به تغییرات شاخص‌های رشد در گیاهچه‌های یونجه تحت تیمارهای مختلف پرایمینگ نشان داد که طول گیاهچه‌ها در بذرهای پرایم شده با آب، SA و NaHS در مقایسه با شاهد بیشتر بود. تنش شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار باعث شد طول گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده در مقایسه با گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده تحت شرایط غیر تنش شوری (شاهد) کاهش معنی‌داری پیدا کند (شکل‌های ۱ و ۲A). پرایمینگ با آب، SA و NaHS کاهش طول گیاهچه‌های تحت تنش شوری را به طور قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده تحت تنش شوری بهبود داد و پرایمینگ با NaHS بیشترین تأثیر را در این مورد داشت (شکل‌های ۱ و

شرایط ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl بالاتر بود (شکل‌های ۱ و ۲B).

جدول ۳- تأثیر پرایمینگ با آب، اسید سالیسیلیک (SA) و سدیم هیدروسولفید (NaHS) بر درصد جوانه‌زنی (FGP)، میانگین زمان جوانه‌زنی (MGT)، شاخص تیمسون، میانگین سرعت جوانه‌زنی (MGR)، شاخص جوانه‌زنی (GI) و شاخص بُنیه (VI) بذره‌های یونجه تحت تنش شوری (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار). مقادیر میانگین چهار تکرار \pm SD است. حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن است.

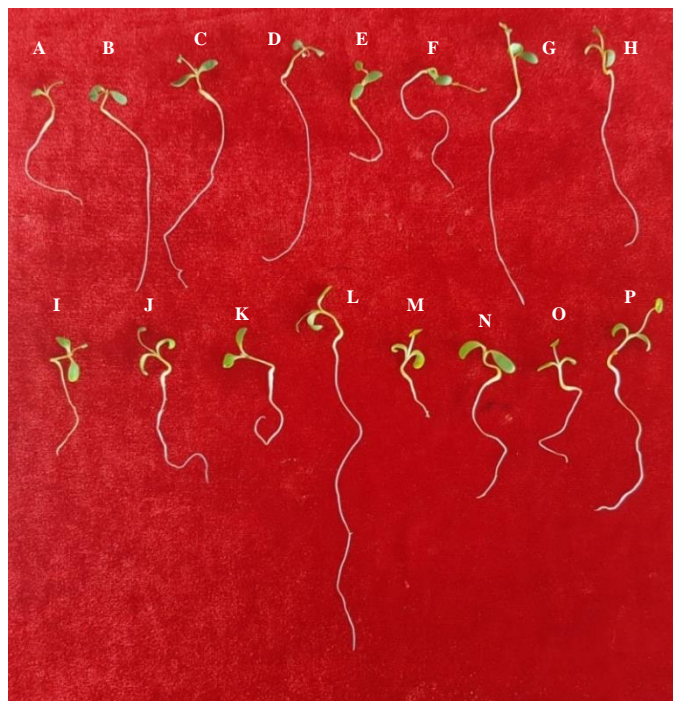
Table 3- The effect of priming with water, SA and NaHS on germination percentage (FGP), mean germination time (MGT), timson's index, mean germination rate (MGR), germination index and vigour index (VI) in alfalfa seeds under salt stress (0, 25, 50 and 100 Mm). The data are mean of four replicates \pm SD. Different letter in each column indicates significant differences between treatments according to Duncan's test.

VI	GI (seed.day ⁻¹)	MGR (day ⁻¹)	شاخص تیمسون (%.day ⁻¹)	MGT (day)	FGP (%)	شوری (mM NaCl)	تیمارهای پرایمینگ
۴۹۳±۲۶ ^{f-g}	۱/۳۸±۰/۱ ^b	۰/۶۳±۰/۰۵ ^{g-h}	۴۹/۶±۰/۶ ^a	۱/۶±۰/۱ ^c	۹۸/۱±۰/۲۵ ^a	۰	بدون پرایم
۴۰۹±۲۵ ^g	۱/۳۹±۰/۲ ^b	۰/۷۱±۰/۰۸ ^{f-g}	۴۳/۷±۲/۷ ^{a-c}	۱/۴±۰/۱ ^d	۸۸/۱±۰/۶۴ ^{a-b}	۲۵	
۲۸۰±۳۷ ^h	۰/۹۹±۰/۱۶ ^c	۰/۵۷±۰/۰۲ ⁱ	۴۰/۰±۴/۹ ^{b-c}	۱/۷۷±۰/۰۵ ^b	۷۳/۷±۰/۱۰ ^{c-d}	۵۰	
۱۸۷±۷۴ ⁱ	۰/۶۷±۰/۲۳ ^d	۰/۵±۰/۰ ⁱ	۳۳/۴±۱۱/۴ ^d	۲/۰±۰/۰ ^a	۶۶/۸±۴/۵ ^d	۱۰۰	
۷۰۶±۱۶ ^c	۱/۹۲±۰/۰۵ ^a	۰/۹۸±۰/۰۲ ^a	۴۸/۴±۰/۶ ^a	۱/۰±۰/۰۳ ^g	۹۶/۱۸±۰/۲۵ ^a	۰	پرایم با آب
۵۷۵±۴۶ ^{d-e}	۱/۷۴±۰/۱۲ ^a	۰/۹۲±۰/۰۳ ^{a-d}	۴۵/۳±۳/۶ ^{a-c}	۱/۱±۰/۰۴ ^{f-g}	۹۰/۶±۱/۴ ^{a-b}	۲۵	
۶۰۱±۳۲ ^d	۱/۶۹±۰/۱۱ ^a	۰/۸۴±۰/۰۵ ^{c-e}	۴۶/۶±۱/۸ ^{a-b}	۱/۲±۰/۰۷ ^{e-f}	۹۳/۱±۰/۷۵ ^{a-b}	۵۰	
۴۱۵±۵۳ ^{f-g}	۱/۲۱±۰/۲ ^{b-c}	۰/۸۵±۰/۱۱ ^{b-e}	۳۳/۱±۳/۶ ^d	۱/۲±۰/۱۵ ^{e-g}	۶۶/۸±۰/۶۴ ^d	۱۰۰	
۷۴۹±۳۰ ^{b-c}	۱/۸۹±۰/۰۷ ^a	۰/۹۵±۰/۰۳ ^{a-b}	۴۸/۴±۱/۵ ^a	۱/۰۵±۰/۰۳ ^g	۹۶/۸۱±۰/۶۲ ^a	۰	پرایم با NaHS
۷۸۴±۲۷ ^{b-c}	۱/۸۰±۰/۰۴ ^a	۰/۹۵±۰/۰۴ ^{a-b}	۴۶/۲±۱/۰۲ ^{a-b}	۱/۰۵±۰/۰۵ ^g	۹۲/۵±۰/۴۰ ^{a-b}	۲۵	
۹۸۳±۱۰۲ ^a	۱/۶۶±۰/۲۲ ^b	۰/۹۰±۰/۰۶ ^{a-d}	۴۳/۷±۴/۵ ^{a-c}	۱/۱۱±۰/۰۷ ^{f-g}	۸۷/۵±۱/۷ ^{a-b}	۵۰	
۶۱۲±۱۵۹ ^d	۱/۳۳±۰/۲۴ ^b	۰/۷۸±۰/۰۲ ^{e-f}	۳۸/۷±۷/۵ ^{c-d}	۱/۲۸±۰/۰۴ ^{d-e}	۸۳/۷±۰/۶۴ ^{b-c}	۱۰۰	
۷۴۴±۲۴ ^{b-c}	۱/۹۳±۰/۰۶ ^a	۰/۹۵±۰/۰۳ ^{a-b}	۴۹/۴±۰/۰۷ ^a	۱/۰۴±۰/۰۳ ^g	۹۸/۷±۰/۲۸ ^a	۰	پرایم با SA
۸۲۱±۳۴ ^b	۱/۸۷±۰/۰۸ ^a	۰/۶۵±۰/۰۰۶ ^{a-d}	۴۸/۴±۱/۲ ^a	۱/۵۲±۰/۰۱ ^{f-g}	۹۶/۸±۰/۴۷ ^a	۲۵	
۵۰۵±۲۰ ^{e-f}	۱/۶۸±۰/۲۶ ^a	۰/۸۳±۰/۱۳ ^{d-e}	۴۷/۰±۲/۵ ^a	۱/۲۲±۰/۰۲ ^{e-f}	۹۴/۳±۱/۰ ^{a-b}	۵۰	
۴۵۵±۳۰ ^{f-g}	۱/۶۸±۰/۲۳ ^a	۰/۸۵±۰/۱۳ ^{b-e}	۴۶/۲±۱/۷ ^{a-b}	۱/۱۹±۰/۱۹ ^{e-g}	۹۲/۵±۰/۷۰ ^{a-b}	۱۰۰	

گیاهچه‌های حاصل از بذره‌های پرایم نشده در اولین روز جوانه‌زنی در شرایط تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار NaCl) ۱۳ درصد در مقایسه با شاهد مربوطه افزایش نشان داد. در حالی که میزان قند کل در گیاهچه‌های حاصل از بذره‌های پرایم نشده در روزهای ۳، ۶ و ۱۰ پس از جوانه‌زنی افزایش

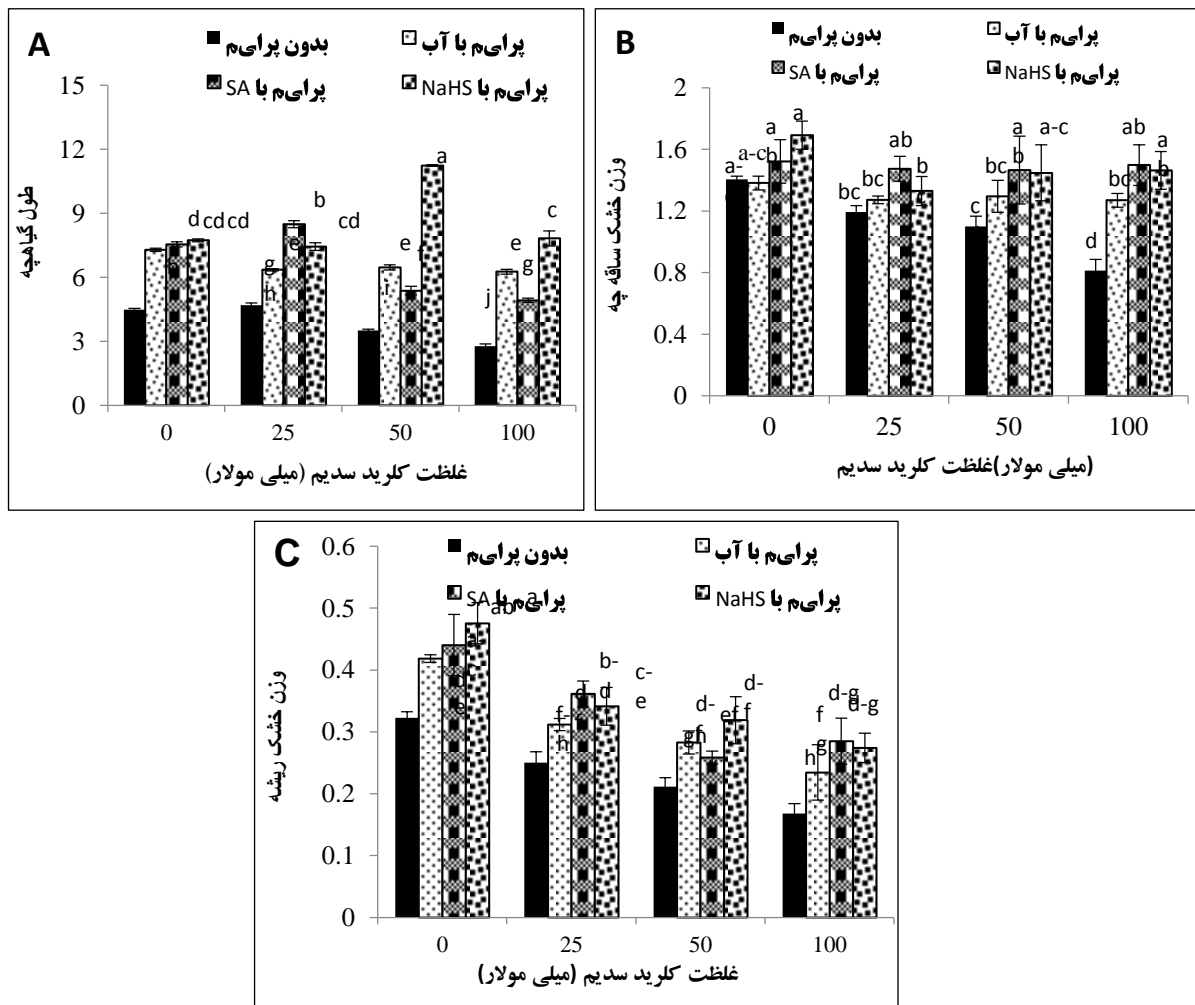
تأثیر پرایمینگ با آب، NaHS و SA بر میزان قند کل و قندهای احیاکننده گیاهچه‌های یونجه در مراحل اولیه رشد در شرایط غیر تنش و تنش شوری نتایج جدول آنالیز واریانس نشان داد که تنش شوری تأثیر معنی‌داری بر سطح قند کل و تیمارهای پرایمینگ تأثیر معنی‌داری بر سطح قندهای احیاکننده داشتند (جدول ۲). تجمع قند کل در

معنی‌داری را در پاسخ به تنش شوری در مقایسه با شاهد مربوطه‌شان نشان ندادند (شکل ۳A)



شکل ۱- گیاهچه‌های یونجه حاصل از بذرهای پرایم شده با تیمارهای مختلف. (A) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده تحت شرایط غیرشوری، (B) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با آب تحت شرایط غیرشوری، (C) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با SA تحت شرایط غیرشوری، (D) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با NaHS تحت شرایط غیرشوری، (E) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده تحت شرایط شوری ۲۵ میلی‌مولار، (F) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با آب تحت شرایط شوری ۲۵ میلی‌مولار، (G) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با SA تحت شرایط شوری ۲۵ میلی‌مولار، (H) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با NaHS تحت شرایط شوری ۲۵ میلی‌مولار، (I) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده تحت شرایط شوری ۵۰ میلی‌مولار، (J) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با آب تحت شرایط شوری ۵۰ میلی‌مولار، (K) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با NaHS تحت شرایط شوری ۵۰ میلی‌مولار، (L) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با NaHS تحت شرایط شوری ۵۰ میلی‌مولار، (M) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده تحت شرایط شوری ۱۰۰ میلی‌مولار، (N) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با آب تحت شرایط شوری ۱۰۰ میلی‌مولار، (O) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده تحت شرایط شوری ۱۰۰ میلی‌مولار، (P) گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با NaHS تحت شرایط شوری ۱۰۰ میلی‌مولار.

Figure 1- Alfalfa seedlings obtained from seeds primed with different priming treatments. (A) seedlings obtained from non-primed seeds under non-salinity, (B) seedlings obtained from water-primed seeds under non-salinity, (C) seedlings obtained from SA-primed seeds under non-salinity, (D) seedlings obtained from NaH-primed seeds under non-salinity, (E) seedlings obtained from non-primed seeds under 25 mM salinity, (F) seedlings obtained from water-primed seeds under 25 mM salinity, (G) seedlings obtained from SA-primed seeds under 25 mM salinity, (H) seedlings obtained from NaHS-primed seeds under 25 mM salinity, (I) seedlings obtained from non-primed seeds under 50 mM salinity, (J) seedlings obtained from water-primed seeds under 50 mM salinity, (K) seedlings obtained from SA-primed seeds under 50 mM salinity, (L) seedlings obtained from NaHS-primed seeds under 50mM salinity, (M) seedlings obtained from non-primed seeds under 100 mM salinity, (N) seedlings obtained from water-primed seeds under 100 mM salinity, (O) seedlings obtained from SA-primed seeds under 100 mM salinity, (P) seedlings obtained from NaHS-primed seeds under 100 mM salinity.

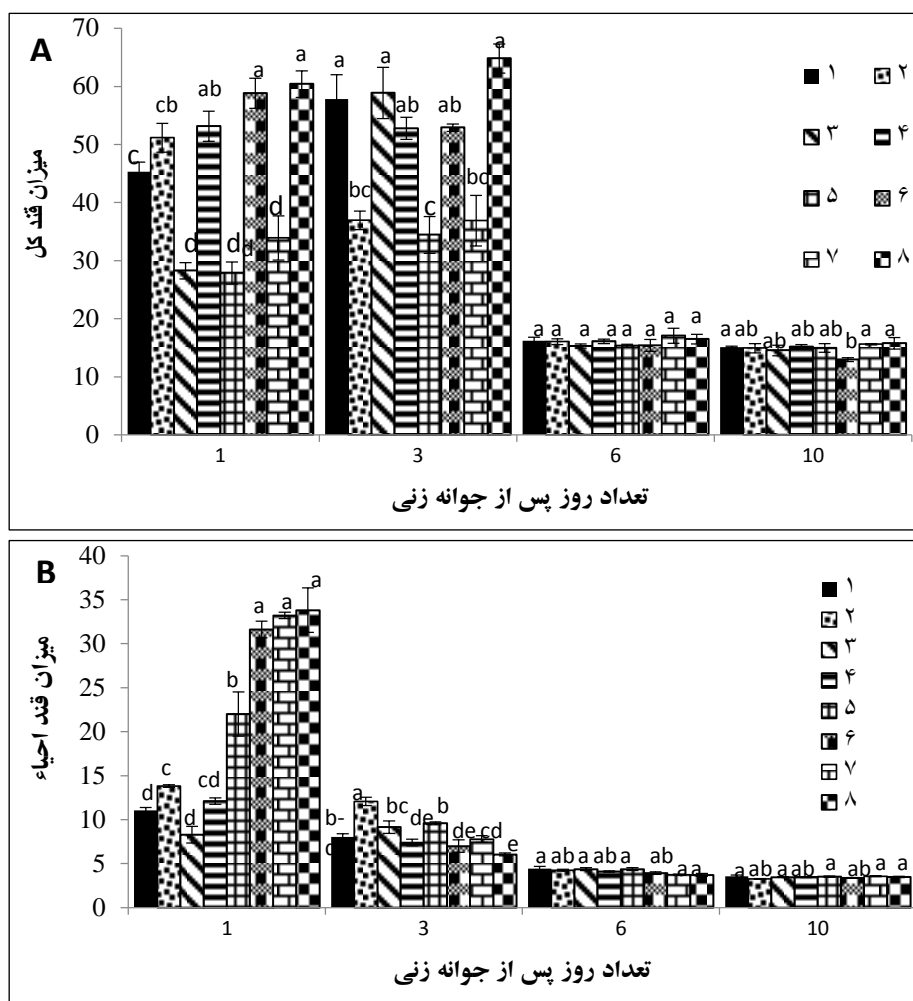


شکل ۲- تأثیر پرایمینگ با آب، اسید سالیسیلیک (SA) یا سدیم هیدروسولفید (NaHS) بر رشد گیاهچه یونجه تحت تنش شوری (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار). (A) طول گیاهچه (سانتی‌متر/گیاهچه)، (B) وزن خشک ساقه (میلی گرم/گیاهچه)، (C) وزن خشک ریشه (میلی گرم/گیاهچه). داده‌ها میانگین چهار تکرار \pm SE است. حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن است.

Figure 2- The effect of priming with water, SA and NaHS on seedling growth of alfalfa under salt stress (0, 25, 50 and 100 Mm NaCl). (A) Seedling length (Cm/seedling), (B) shoot dry weight (mg/seedling) and (C) root dry weight (mg/seedling). The data are means of four replications \pm SE. Different letter in each column indicates significant differences between treatments according to Duncan's test.

به شوری (۵۰ میلی مولار NaCl) افزایش یافت و در سومین روز پس از جوانه‌زنی، میزان قند کل در بذره‌های پرایم شده با آب، SA و NaHS به ترتیب ۴۲/۸، ۴۳ و ۷۵ درصد در مقایسه با بذره‌های پرایم نشده تحت تنش شوری افزایش پیدا کرد (شکل ۳A).

نتایج مربوط به تأثیر تیمارهای پرایمینگ بر میزان قند کل در مراحل اولیه رشد در یونجه تحت تنش شوری نشان داد تجمع قند کل در اولین روز جوانه‌زنی در بذره‌های پرایم شده با SA و NaHS (برخلاف بذره‌های پرایم شده با آب) به ترتیب ۱۵ و ۱۸ درصد در مقایسه با بذره‌های پرایم نشده در پاسخ



شکل ۳- تأثیر پرایمینگ با آب، اسید سالیسیلیک (SA) و سدیم هیدروسولفید (NaHS) بر میزان قند کل (میلی گرم/گرم وزن تر) (A) و قند احیاکننده (میلی گرم/گرم وزن تر) در ۱، ۳، ۶ و ۱۰ روز پس از جوانه‌زنی بذرهای یونجه در شرایط تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار). داده‌ها میانگین چهار تکرار \pm SE است. حروف غیرمشابه مربوط به هر پارامتر در هر زمان (روز پس از جوانه‌زنی) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن است. (۱) بذر پرایم نشده در شرایط غیرتنش؛ (۲) بذر پرایم نشده در شرایط تنش شوری؛ (۳) بذر پرایم شده با آب در شرایط غیرتنش؛ (۴) بذر پرایم شده با آب در شرایط تنش شوری؛ (۵) بذر پرایم شده با SA در شرایط غیرتنش؛ (۶) بذر پرایم شده با SA در شرایط تنش شوری؛ (۷) بذر پرایم شده با NaHS در شرایط غیرتنش؛ (۸) بذر پرایم شده با NaHS در شرایط تنش شوری.

Figure 3- The effect of priming with water, SA and NaHS on the contents of total sugar (mg/g FW) and reducing sugar (mg/g FW) at 1, 3, 6 and 10 days after germination of alfalfa under salt stress (0 and 50 mM). The data are means of four replications \pm SE. Different letter in each column indicates significant differences between treatments according to Duncan's test. 1) unprimed seeds/non-salt stress; 2) unprimed seeds/salt stress; 3) water-primed seeds/non-salt stress; 4) water primed seeds/salt stress; 5) SA-primed seeds/non-salt stress; 6) SA-primed seeds/salt stress; 7) NaHS-primed seeds/non-salt stress; 8) NaHS-primed seeds/salt stress.

در روزهای ششم و دهم پس از جوانه‌زنی، محتوی قند کل در بذرهای پرایم شده با آب، SA و NaHS در مقایسه با بذرهای پرایم نشده افزایش معنی‌داری در پاسخ به تنش شوری نشان ندادند (شکل ۳A). میزان قند احیاکننده در اولین و سومین روز پس از جوانه‌زنی در گیاهچه‌های حاصل از

معنی‌داری یافت (شکل ۴A). پرایمینگ بذرها با آب، SA و NaHS باعث شد تجمع H_2O_2 در گیاهچه‌ها در روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ پس از جوانه‌زنی در شرایط تنش شوری به میزان قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده کاهش معنی‌داری پیدا کند که بیشترین کاهش در تجمع H_2O_2 در پاسخ به تنش شوری در تیمارهای پرایمینگ با SA و NaHS مشاهده شد (شکل ۴A). تنش شوری موجب افزایش تجمع MDA در گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده در روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ پس از جوانه‌زنی به ترتیب ۵۵، ۴۰، ۶۹ و ۵۶ درصد در مقایسه با شاهد شد (شکل ۴B). مقایسه تجمع MDA در گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای پرایم شده با آب، SA و NaHS و نمونه‌های پرایم نشده نشان داد که پرایمینگ با آب، SA و NaHS باعث شد تجمع MDA در روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ پس از جوانه‌زنی در شرایط تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار NaCl) کاهش معنی‌داری نشان داد که بیشترین کاهش در تجمع MDA در گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم شده با SA و NaHS مشاهده شد (شکل ۴B). ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل در پاسخ به تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار NaCl) در روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ پس از جوانه‌زنی در گیاهچه‌های حاصل از بذرهای پرایم نشده افزایش معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان نداد (شکل ۴C). فعالیت آنتی‌اکسیدان کل در گیاهچه‌ها در روزهای ۳ و ۶ پس از جوانه‌زنی در پاسخ به تیمارهای پرایمینگ افزایش معنی‌داری را در

بذرهای پرایم نشده تحت تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار NaCl) به ترتیب ۲۵ و ۵۰ درصد بالاتر از میزان آن در گیاهچه‌های شاهد مربوطه بود، درحالی‌که افزایش معنی‌داری در میزان قند احیاکننده در ششمین و دهمین روز پس از جوانه‌زنی در بذرهای پرایم نشده در مقایسه با شاهد مشاهده نشد (شکل ۳B). پرایمینگ بذرها با SA و NaHS باعث شد مقدار احیاکننده در اولین روز جوانه‌زنی به ترتیب ۱۲۹ و ۱۴۵ درصد در مقایسه با بذرهای پرایم نشده تحت تنش شوری بالاتر باشد، درحالی‌که در پرایمینگ با آب افزایش معنی‌داری در میزان قند احیاکننده در اولین روز جوانه‌زنی در پاسخ به تنش شوری مشاهده نشد (شکل ۳B). در سومین، ششمین و دهمین روز پس از جوانه‌زنی افزایش معنی‌داری در میزان قند احیاکننده در تیمارهای پرایمینگ با آب، SA و NaHS در پاسخ به تنش شوری مشاهده نشد (شکل ۳B).

تأثیر پرایمینگ با آب، NaHS و SA بر میزان H_2O_2 ، MDA و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل در مراحل اولیه رشد گیاهچه‌های یونجه در شرایط غیر تنش و تنش شوری

جدول آنالیز واریانس نشان داد که تنش شوری و تیمارهای پرایمینگ به ترتیب تأثیر معنی‌داری بر میزان H_2O_2 و سطح مالون‌دی‌آلدئید داشتند، درحالی‌که تنش شوری و تیمارهای پرایمینگ بر ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل تأثیر معنی‌داری نداشتند (جدول ۲). میزان H_2O_2 در بذرهای پرایم نشده در روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ پس از جوانه‌زنی در پاسخ به تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار NaCl) به ترتیب ۸۲، ۷۰، ۱۱۲ و ۸۹ درصد در مقایسه با شاهد افزایش

پیدا کردن رابطه بین این تغییرات و تحمل به تنش شوری در مراحل ابتدایی رشد گیاهچه‌ها، میزان قند کل، قند احیاکننده، MDA، H_2O_2 و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ پس از جوانه‌زنی تحت تیمارهای پرایمینگ (آب، SA و NaHS) و تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این مطالعه نشان داد که شوری FGP را در بذرهاى پرایم نشده یونجه کاهش داده و باعث کاهش سرعت جوانه‌زنی و طولانی شدن زمان جوانه‌زنی شده است، همان‌طور که با شاخص‌های MGT، MGR، GI و شاخص تیمسون ارزیابی شد. این کاهش در میزان و سرعت جوانه‌زنی در بذرهاى یونجه تحت تنش شوری می‌تواند به این علت باشد که به واسطه پتانسیل اسمزی بالا در شرایط شوری، بذرها قادر به جذب مقادیر آب کافی نیستند که به کاهش دادن و یا به تأخیر افتادن فرآیند جوانه‌زنی منجر می‌شود (Hayat et al., 2010). همچنین، کاهش محتوی آب بافتی به واسطه کاهش جذب آب به کاهش رشد و نمو سلولی منجر می‌شود. محدودیت جذب آب و پیامدهای آن برای رشد و نمو سلولی باعث شد طول گیاهچه‌ها و نیز وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه در یونجه در پاسخ به تنش شوری کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان دهد. میزان H_2O_2 در روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ پس از جوانه‌زنی تحت شرایط تنش شوری افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد که این افزایش با تجمع بالای MDA تحت شرایط شوری همراه بود. این نتایج تأیید کرد که تنش شوری باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در بذرهاى جوانه‌زده و گیاهچه‌های جوان شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که

مقایسه با گیاهچه‌های حاصل از بذرهاى بدون پرایم تحت شرایط تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار NaCl) نشان ندادند، درحالی که فعالیت آنتی‌اکسیدان کل در روز اول (به ترتیب برای بذرهاى پرایم شده با SA و NaHS به میزان ۴۳/۵ و ۳۲/۱ درصد) و روز دهم (به ترتیب برای بذرهاى پرایم شده با آب، SA و NaHS به میزان ۱۴۸، ۷۷/۶ و ۲۰۳ درصد) پس از جوانه‌زنی در تیمارهای پرایمینگ در مقایسه با بذرهاى پرایم نشده تحت شرایط تنش شوری افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۴C).

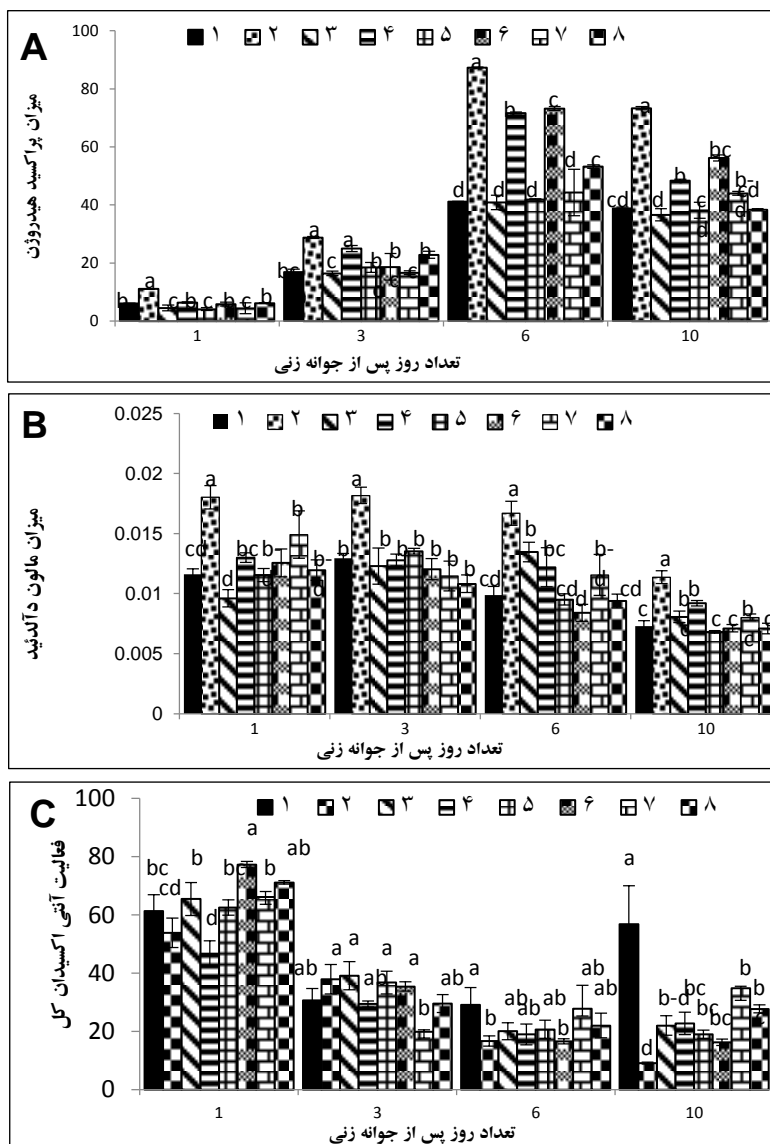
بحث

فرآیند جوانه‌زنی و مراحل نخستین رشد گیاهچه‌ها مراحل کلیدی برای استقرار مناسب گیاه هستند و گیاهان در طی این مراحل نسبت به تنش‌های محیطی از جمله شوری بسیار حساس است (Li et al., 2011). تنش شوری شروع جوانه‌زنی را به تأخیر انداخته و شاخص‌های مختلف جوانه‌زنی از جمله سرعت جوانه‌زنی و نیز یکنواختی در ظهور گیاهچه‌ها را کاهش می‌دهد که به این ترتیب به کاهش در تولید محصول منجر می‌گردد (Jisha et al., 2013). در چندین مطالعه نشان داده شده است که تکنیک‌های پرایمینگ، درصد و سرعت جوانه‌زنی و نیز یکنواختی در ظهور گیاهچه‌ها را در شرایط تنش بهبود می‌بخشند (Abdel Latef and Tran, 2016). در این مطالعه، تأثیر پرایمینگ بذرها با آب، SA و NaHS بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد ابتدایی گیاهچه‌ها در شرایط غیرتنش و تنش شوری بررسی شد. به منظور شناخت تغییرات بیوشیمیایی ایجاد شده در مراحل پس از جوانه‌زنی در تیمارهای پرایمینگ و به منظور

در بذرها در حال جوانه زدن در شرایط تنش شوری القاء می‌کند که باعث بهبود تحمل گیاه در مقابل شرایط تنش‌زای محیطی مانند شرایط شوری می‌گردد (Nazar et al., 2015). در مطالعه‌ای روی *Torreya grandis* بیان شد که SA تحمل به شوری را از طریق فعال کردن فرآیند فتوسنتز به واسطه افزایش دادن محتوی کلروفیل و کاهش دادن تنش اکسیداتیو به واسطه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش می‌دهد (Li et al., 2014). SA تنش اکسیداتیو القاء شده توسط NaCl را در *Vigna radiata* به حداقل رسانده است، به طوری که در پاسخ به تیمار SA میزان MDA به عنوان یک مارکر پراکسیداسیون و تولید ROS (مانند H_2O_2) کاهش پیدا کرد (Khan et al., 2014). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که افزایش میزان MDA و H_2O_2 در طی روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ پس از جوانه‌زنی در شرایط تنش شوری با پرایمینگ بذرها با SA به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش نشان داده است، این نتایج گواه آن است که SA تنش اکسیداتیو القاء شده توسط NaCl را در بذرها یونجه جوانه‌زده و گیاهچه‌های یونجه به میزان درخور توجهی کاهش داده است. بنابراین، پرایمینگ بذر با SA به عنوان یک رویکرد مهم برای افزایش دادن فعالیت آنزیم‌های جاروب‌کننده H_2O_2 پیشنهاد می‌شود. تأثیر مثبت پرایمینگ با SA در کاهش تنش اکسیداتیو القاء شده توسط شوری در *Triticum aestivum* (Li et al., 2013) به اثبات رسیده است.

پرایمینگ بذرها با SA باعث شد تأثیرات بازدارندگی تنش شوری روی درصد جوانه‌زنی و شاخص‌های جوانه‌زنی کاهش یابد (جدول ۱، شکل ۱). این یافته با مطالعات انجام شده درباره تأثیر SA بر جوانه‌زنی در شرایط تنش شوری هماهنگ است (Anaya et al., 2018; Rhaman et al., 2020). پرایمینگ بذرها با SA، رشد گیاهچه‌های یونجه را تحت شرایط شوری بهبود داد که احتمالاً با القاء فعالیت میتوزی توسط تیمار پرایمینگ مرتبط است (Boukari et al., 2019). نتایج نشان داد که درحالی که میزان قند کل در طی روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ روز پس از جوانه‌زنی تحت تنش شوری افزایش معنی‌داری پیدا نکرد، پرایمینگ با SA باعث شد تجمع قند کل در ۱ و ۳ روز پس از جوانه‌زنی در شرایط تنش شوری به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یابد و در روزهای ۶ و ۱۰ تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان ندهد. این نتایج نشان می‌دهد که سطح افزایش یافته قند کل که به عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی یا اسمولیت در تنظیمات اسمزی مشارکت دارد، در روزهای نخستین پس از جوانه‌زنی به جذب کارآمدتر آب کمک می‌کند، ولی در روزهای ۶ و ۱۰ سنتز کربوهیدرات در مقایسه با روزهای ۱ و ۳ کاهش نیافته است و قند کل سنتز شده برای رشد گیاهچه به ویژه رشد ریشه‌چه مصرف می‌شود و به این ترتیب افزایش در تجمع قند کل در گیاهچه‌های ۶ و ۱۰ روزه مشاهده شد.

SA برخی تغییرات بیوشیمیایی و متابولیک مانند تغییرات در فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی



شکل ۴- تأثیر پرایمینگ با آب، اسید سالیسیلیک (SA) و سدیم هیدروسولفید (NaHS) بر میزان (A) پراکسید هیدروژن (میکرومولار/گرم بافت تازه گیاهچه)، (B) میزان مالون‌دی‌آلدئید (میکرومولار/گرم بافت تازه گیاهچه) و (C) ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل (درصد بازدارندگی) در ۱، ۳، ۶ و ۱۰ روز پس از جوانه‌زنی یونجه رقم اصفهانی تحت تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار). مقادیر میانگین چهار تکرار \pm SE است. حروف غیرمشابه مربوط به هر پارامتر و در هر روز پس از جوانه زنی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن بین تیمارها است. (بذر پرایم نشده در شرایط غیرتنش؛ ۲) بذر پرایم نشده در شرایط تنش شوری؛ ۳) بذر پرایم شده با آب در شرایط غیرتنش؛ ۴) بذر پرایم شده با آب در شرایط تنش شوری؛ ۵) بذر پرایم شده با SA در شرایط غیرتنش؛ ۶) بذر پرایم شده با SA در شرایط تنش شوری؛ ۷) بذر پرایم شده با NaHS در شرایط غیرتنش؛ ۸) بذر پرایم شده با NaHS در شرایط تنش شوری.

Figure 4 The effect of priming treatments with water, SA and NaHS on the contents of hydrogen peroxide ($\mu\text{g/g}$ FW) (A), malondialdehyde ($\mu\text{g/g}$ FW) (B) and total antioxidant activity (% inhibition) at 1, 3, 6 and 10 days after germination of alfalfa under salt stress (0 and 50 mM). The data are means of four replications \pm SE. Different letter in each column indicates significant differences between treatments according to Duncan's test. 1) unprimed seeds/non-salt stress; 2) unprimed seeds/salt stress; 3) water-primed seeds/non-salt stress; 4) water primed seeds/salt stress; 5) SA-primed seeds/non-salt stress; 6) SA-primed seeds/salt stress; 7) NaHS-primed seeds/non-salt stress; 8) NaHS-primed seeds/salt stress.

احتمالاً به جذب بیشتر آب به واسطه ایجاد پتانسیل اسمزی منفی تر در بذرها کمک می‌کند و به درصد جوانه‌زنی بیشتر و سرعت بالاتر جوانه‌زنی در شرایط تنش شوری منجر می‌گردد. پرایمینگ گیاه با دهنده H_2S (NaHS) تحمل گیاه را در مقابل شرایط تنش‌های غیرزیستی مانند شوری افزایش می‌دهد (Wang *et al.*, 2012). تأثیر مثبت NaHS به‌عنوان دهنده H_2S بر کاهش دادن آسیب‌های ناشی از تنش‌های محیطی به مجموعه‌ای از مکانیسم‌های سیستم‌های دفاعی مانند فعال شدن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و تغییر سیستم جاروب‌کننده ROS نسبت داده می‌شود (Fotopoulos *et al.*, 2013). نتایج این مطالعه نشان داد که پرایمینگ بذرها با NaHS و بنابراین افزایش سطح H_2S باعث کاهش تأثیرات منفی شوری روی شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها شد. در توافق با این یافته، مطالعه انجام شده روی تأثیر پرایمینگ بذرها با آفتابگردان با NaHS در شرایط تنش خشکی نشان داد که تیمار بذرها با NaHS شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها را در شرایط تنش خشکی اعمال شده توسط پلی‌اتیلن گلیکول بهبود داده است (Ocvirk *et al.*, 2021). تیمار بذرها با NaHS باعث شد آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از شوری به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کند، به طوری که کاهش معنی‌دار در تجمع H_2O_2 و MDA در طی روزهای ۱، ۳، ۶ و ۱۰ روز پس از جوانه‌زنی در مقایسه با بذرها تیمار نشده تحت شرایط تنش شوری مشاهده شد (شکل ۴A-B). تأثیر مثبت H_2S برای بالا بردن سطح تحمل گیاهان در مقابل

سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در پاسخ گیاه به شرایط تنش‌زا مانند شوری بازی می‌کند و گیاهان را در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. مهار فعالیت رادیکال DPPH برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل استفاده می‌شود (Kaur *et al.*, 2014). نتایج این مطالعه نشان داد که در پاسخ به تنش شوری درصد مهار فعالیت رادیکال DPPH در گیاهچه‌های حاصل از بذرها پرایم نشده در روزهای ۱ و ۳ پس از جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد، در حالی که در روزهای ۶ و ۱۰ روز پس از جوانه‌زنی کاهش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان داد (شکل ۴C). پرایمینگ با SA درصد مهار فعالیت رادیکال DPPH را در گیاهچه‌های حاصل از پرایم شده در مقایسه با گیاهچه‌های حاصل از بذرها پرایم نشده تحت تنش شوری افزایش داد. سطح بالاتر مهار فعالیت رادیکال DPPH با ظرفیت بالاتر آنتی‌اکسیدانی کل مرتبط است. در این راستا تأثیر مثبت SA در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه بامیه گزارش شده است (Youssef *et al.*, 2022). H_2S یک مولکول علامتی است که برخی از فرآیندهای فیزیولوژیک (مانند سازماندهی ریشه، جوانه‌زنی و فتوسنتز) و پاسخ‌های بیوشیمیایی (مانند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) را در گیاهان تنظیم می‌کند (Ali *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2021). پرایمینگ با NaHS باعث شد که میزان قند کل در روزهای ۱ و ۳ پس از جوانه‌زنی در پاسخ به تنش شوری به میزان معنی‌دار در مقایسه با بذرها تیمار نشده با NaHS افزایش پیدا کند که این تجمع

نتایج این مطالعه نشان داد که پرایمینگ بذرهای یونجه با NaHS یا SA تحمل به شوری را در مراحل ابتدایی رشد گیاهچه‌های یونجه بهبود می‌دهد. تأثیر مثبت این تیمارهای پرایمینگ می‌تواند به کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن مانند H_2O_2 و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نسبت داده شود. علاوه بر این، پرایمینگ بذر با NaHS یا SA که به افزایش محتوای قند کل و تاحدودی قند احیاکننده در گیاهچه‌هایی که تحت تنش شوری رشد می‌کنند منجر می‌شود، در تنظیم اسمزی مؤثر است و ممکن است به افزایش جذب و حفظ آب کمک کند. به‌طور کلی، پرایمینگ بذر با NaHS یا SA را می‌توان به‌عنوان پرایمینگ مؤثر برای استقرار بهتر گیاهچه‌های یونجه در محیط‌های شور توصیه کرد.

تنش‌های محیطی در ذرت تحت تنش گرما (Li *et al.*, 2013) آرابیدوپسیس تحت تنش خشکی (Jin *et al.*, 2011) و یونجه تحت تنش شوری (Lai *et al.*, 2014) به اثبات رسیده است. نتایج مربوط به درصد مهار فعالیت رادیکال DPPH در بذرهای تیمار شده با NaHS نشان داد که درصد مهار فعالیت رادیکال DPPH در پاسخ به تنش شوری در روزهای ۱، ۶ و ۱۰ روز پس از جوانه‌زنی در مقایسه با بذرهای تیمار نشده به میزان معنی داری بالاتر بود که این افزایش درصد مهار فعالیت رادیکال DPPH با سطح کاهش یافته H_2O_2 و MDA به‌عنوان شاخصی برای پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در توافق است.

نتیجه‌گیری

References

- Abdel Latef, A. A. and Tran, L. S. (2016) Impacts of priming with silicon on the growth and tolerance of maize plants to alkaline stress. *Frontiers in Plant Science* 7: 243
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A. and Ghezzehei, T. A. (2013) A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers* 97: 253-261.
- Ali, B., Song, W. J., Hu, W. Z., Luo, X. N., Gill, R. A., Wang, J. and Zhou, W. J. (2014) Hydrogen sulfide alleviates lead-induced photosynthetic and ultrastructural changes in oilseed rape. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 102: 25-33.
- Anaya, F., Fghire, R., Wahbi, S. and Loutfi, K. (2018) Influence of salicylic acid on seed germination of *Vicia faba* L. under salt stress. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17: 1-8.
- Antoniou, C., Xenofontos, R., Chatzimichail, G., Christou, A., Kashfi, K. and Fotopoulos, V. (2020) Exploring the potential of nitric oxide and hydrogen sulfide (NOSH)-releasing synthetic compounds as novel priming agents against drought stress in *Medicago sativa* plants. *Biomolecules* 10: 1-17.
- Bakhshi, D. and Arakawa. O. (2006) Effects of UV-B irradiation on phenolic compound accumulation and antioxidant activity in "Jonathan" apple influenced by bagging, temperature and maturation. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 4(1): 75-79.

- Boukari, N., Jelali, N., Renaud, J. B., Youssef, R. B., Abdelly, C. and Hannoufa, A. (2019) Salicylic acid seed priming improves tolerance to salinity, iron deficiency and their combined effect in two ecotypes of Alfalfa. *Environmental and Experimental Botany* 167: 103820.
- Daszkowska-Golec, A. (2011.) Arabidopsis seed germination under abiotic stress as a concert of action of phytohormones. *OMICS* 15: 763-774.
- Dubois, M., Gilles K. A., Hamilton, J. K., Rebers P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Feghhenabi, F., Hadi, H., Khodaverdiloo, H. and Van Genuchten, M. T. (2020) Seed priming alleviated salinity stress during germination and emergence of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agricultural Water Management* 231: 106022.
- Fotopoulos, V., Christou, A. and Manganaris, G. A. (2013) Hydrogen sulfide as a potent regulator of plant responses to abiotic stress factors. In: *Molecular approaches in plant abiotic stress* (Eds. Gaur, R. K. and Sharma, P.) 353-373. CRC Press, UK.
- Hayat, Q., Hayat S., Irfan M., and Ahmad A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany* 68(1): 14-25.
- Hussian, I., Ahmad, R., Muhammad, F., Rehman, A., Amin, M. and Bakar, M. A. (2014) Seed priming: a tool to invigorate the seeds. *Scientia Agriculturae* 7: 122-128.
- Ibrahim, E. A. (2016) Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. *Journal of Plant Physiology* 192: 38-46.
- Javed, S. A., Shahzad, S. M., Ashraf, M., Kausar, R., Arif, M. S., Albasher, G., Rizwana, H. and Shakoor, A. (2022) Interactive effect of different salinity sources and their formulations on plant growth, ionic homeostasis and seed quality of maize. *Chemosphere* 291: 132678.
- Jin, Z., Shen, J., Qiao, Z., Yang, G., Wang, R., and Pei, Y. (2011) Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414: 481-486
- Jisha, K. C., Vijayakumari, K. and Puthur, J. T. (2013) Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35:1381-1396.
- Kaur, N., Kumar, A., Kaur, K., Gupta, A. K., Singh, I. (2014) DPPH radical scavenging activity and contents of H₂O₂, malondialdehyde and proline in determining salinity tolerance in chickpea seedlings. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 51: 407-415.
- Khan, M. I. R., Asgher, M., and Khan, N. A. (2014) Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycine betaine and ethylene in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 80: 67-74
- Lai, D., Mao, Y., Zhou, H., Li, F., Wu, M., Zhang, J. (2014) Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling there establishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K⁺ loss in seedlings of *Medicago sativa*. *Plant Science* 225: 117-129

- Li, F. L., Bao, W. K. and Wu, N. (2011) Morphological, anatomical and physiological responses of *Campylotropis polyantha* (Franch.) Schindl. seedlings to progressive water stress. *Scientia Horticulturae* 127: 436-443.
- Li, T., Hu, Y., Du, X., Tang, H., Shen, C. and Wu, J. (2014) Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress in *Torrey agrandis* cv. *Merrillii* seedlings by activating photosynthesis and enhancing antioxidant systems. *PLoS One* 9: e109492.
- Li, G., Peng, X., Wei, L. and Kang, G. (2013) Salicylic acid increases the contents of glutathione and ascorbate and temporally regulates the related gene expression in salt-stressed wheat seedlings. *Gene* 529: 321-325.
- Li, Z. G., Yang, S. Z., Long, W. B., Yang, G. X. and Shen, Z. Z. (2013) Hydrogen sulphide may be a novel down stream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Cell Environment* 36: 1564-1572.
- Liu, H., Wang, J., Liu, J., Liu, T. and Xue, S. (2021) Hydrogen sulfide (H₂S) signaling in plant development and stress responses. *aBIOTECH* 2: 32-63.
- Machado Neto, N. B., Saturnino, S. M., Bomfim, D. C. and Custodio, C. C. (2004) Waterstress induced by mannitol and sodium chloride in soybean cultivars. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47: 521-529.
- Miransari, M. and Smith, D. L. (2014) Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 99: 110-121.
- Mostofa, M. G., Rahman, A., Ansary, M. M. U., Watanabe, A., Fujita, M. and Tran, L. S. P. (2015) Hydrogen sulfide modulates cadmium-induced physiological and biochemical responses to alleviate cadmium toxicity in rice. *Scientific Reports* 5: 1-17.
- Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Nazar, R., Umar, S. and Khan, N. A. (2015) Exogenous salicylic acid improves photosynthesis and growth through increase in ascorbate-glutathione metabolism and S assimilate ion in mustard under salt stress. *Plant Signaling and Behavior* 10: e1003751.
- Ocvirk, D., Špoljarević, M., Kristić, M., Hancock, J. T., Teklić, T. and Lisjak, M. (2021) The effects of seed priming with sodium hydrosulphide on drought tolerance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in germination and early growth. *Annals of Applied Biology* 178: 400-413.
- Paparella, S., Araújo, S. S., Rossi, G., Wijayasinghe, M., Carbonera, D. and Balestrazzi, A. (2015) Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Reports* 34: 1281-1293
- Pérez-Fernández, M. A., Calvo-Magro, E. and Ferrer-Castán, D. (2006) Simulation of germination of pioneer species along an experimental drought gradient. *Journal of Environmental Biology* 27: 679-685.
- Pradhan, N., Prakash, P., Tiwari, S. K., Manimurugan, C., Sharma, R. P. and Singh, P. M. (2014) Osmopriming of tomato genotypes with polyethylene glycol 6000 induces tolerance to salinity stress. *Trends in Biosciences* 7: 4412-4417.
- Rhaman, M. S., Imran, S., Rauf, F., Khatun, M., Baskin, C. C., Murata, Y. and Hasanuzzaman, M. (2020) Seed priming with phytohormones: an

- effective approach for the mitigation of abiotic stress. *Plants* (Basel) 10: 1-17.
- Ranal, M. A., and Santana, D. G. (2006) How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira De Botanica* 29: 1-11.
- Salemi, F., Nasr Esfahani, M. and Tran, L. S. P. (2019) Mechanistic insights into enhanced tolerance of early growth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) under low water potential by seed-priming with ascorbic acid or polyethylene glycol solution. *Industrial Crops and Products* 137: 436-445.
- Shi, H., Ye, T. and Chan, Z. (2013) Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). *Plant Physiology and Biochemistry* 71: 226-234.
- Shrivastava, P. and Kumar, R. (2015) Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22: 123-131.
- Tabatabaei, S. A. (2014) The effect of priming on germination indexes and seedreserve utilization of maize seeds under salinity stress. *Seed Science and Technology* 3: 44-51.
- Toit, A. D. (2015) The health benefits of hydrogen sulfide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16: 68-68.
- Valivand, M., Amooaghaie, R. and Ahadi, A. (2019) Seed priming with H₂S and Ca²⁺ trigger signal memory that induces cross-adaptation against nickel stress in zucchini seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 143: 286-298.
- Vasileva, V. and Pachev, I. (2015) Nitrogen use efficiency and life cycle of nodules in alfalfa after different mineral fertilization and soil cultivation. *Global Journal of Environmental Science and Management* 1: 333-339.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151: 59-66.
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y. and Gritsanapan, W. (2013) Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products* 44: 566-571.
- Wang Y., Li L., Cui W., Xu S., Shen W. and Wang R. (2012) Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil* 351: 107-119.
- Younesi, O. and Moradi, A. (2014) Effect of priming of seeds of *Medicago sativa* 'bami' with gibberellic acid on germination, seedlings growth and antioxidant enzymes activity under salinity stress. *Journal of Horticultural Research* 22: 167-174.
- Youssef, S. M., López-Orenes, A., Ferrer, M. A. and Calderón, A. A. (2022) Salicylic-acid-regulated antioxidant capacity contributes to growth improvement of okra (*Abelmoschus esculentus* cv. Red Balady). *Agronomy* 12: 1-14.
- Yu, Z., Duan, X., Luo, L., Dai, S., Ding, Z. and Xia, G. (2020) How plant hormones mediate salt stress responses. *Trends in Plant Science* 25: 1117-1130.

- Yu, R., Zuo, T., Diao, P., Fu, J., Fan, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Ma, X., Lu, W., Li, A., Wang, R., Yan, F., Pu, L., Niu, Y. and Wuriyangan, H. (2021) Melatonin enhances seed germination and seedling growth of *Medicago sativa* under salinity via a putative melatonin receptor *MsPMTR1*. *Frontiers in Plant Science*. 12: 702875.
- Zhao, C., Zhang, H., Song, C., Zhu, J. K. and Shabala, S. (2020) Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. *The Innovation* 1: 100017.