

## تأثیر تیمارهای مختلف فرسودگی بذر و جوانه‌زنی در دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پراکسیداسیون لیپیدی گیاهچه‌های کدوی تخم کاغذی

صغری قهرمانی<sup>۱\*</sup>، محمد صدقی<sup>۲</sup>، رئوف سیدشریفی<sup>۲</sup>

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته علوم و تکنولوژی بذر، دانشگاه محقق اردبیلی

۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۰)

### چکیده

به منظور بررسی اثرات فرسودگی بذر بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پراکسیداسیون لیپیدی در گیاهچه‌های کدوی تخم کاغذی آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح فرسودگی (شاهد، ۵ و ۱۰ روز فرسودگی در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۹۵ تا ۱۰۰ درصد) و سه سطح دماهای جوانه‌زنی (۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه) بود. نتایج حاصل نشان داد که آنزیم‌های سوپراکسیددیسمیوتاز و کاتالاز تحت تأثیر فرسودگی ۵ روز و در دمای ۲۵ درجه و پراکسیداز در تیمار شاهد و در دمای ۲۵ درجه بیشترین فعالیت را داشتند. همچنین، بیشترین میزان مالون دی آلدئید (۷/۱ میلی مول بر گرم وزن تر) در دمای ۱۵ درجه و در بذور ۱۰ روز فرسوده مشاهده شد. بیشترین مقدار ماده خشک مصرف شده در تنفس (۰/۱۸ میلی گرم) از تیمار ۵ روز فرسودگی و دمای ۳۵ درجه حاصل شد و کم‌ترین (۰/۰۰۹ میلی گرم) آن نیز مربوط به ۱۰ روز فرسودگی و دمای ۳۵ درجه بود. به نظر می‌رسد که کاهش قدرت بذر بر اثر فرسودگی و دمای بالا منجر به تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی شده و گیاه برای مقابله با آسیب‌های ناشی از آن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را افزایش داده است. با توجه به نتایج حاصل از شاخص‌های جوانه‌زنی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت دمای ۱۵ درجه بهترین دما برای جوانه‌زنی بذرهای فرسوده این گیاه است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، پراکسیداسیون، دما، فرسودگی.

## Effect of different seed deterioration treatments and germination under different temperatures on the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seedlings

Soghra Ghahremani<sup>1</sup>, Mohammad Sedghi<sup>2</sup>, Raouf Seyed Sharifi<sup>2</sup>

1. Former M.Sc. student of Seed Science and Technology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

2. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

(Received: 25.Oct.2016 – Accepted: 28.Feb.2017)

### Abstract

In order to investigate the effects of seed deterioration on the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in pumpkin seedlings a factorial experiment conducted based on completely randomized design with three replications. Treatments were three deterioration levels (control, 5 and 10 days deterioration at 45°C and 95-100% relative humidity) and three germination temperatures (15, 25 and 35°C). Results showed that activity of superoxide dismutase and catalase were the highest at 5 days aging and 25°C, and activity of peroxidase was the highest at non-aging and 25°C. Also, the highest amount of Malondialdehyde (7.1 mmol gr<sup>-1</sup>FW) observed in the seeds with 10 days deterioration and 15°C. The highest respiration index (0.018 mg) achieved in 5 days deterioration and 35°C and the lowest value (0.009 mg) was related to 10 days deterioration and 35°C. It seems that reduction in seed vigor under deterioration and high temperatures causes to oxidative stress and lipid peroxidation and leads to increase in the activity of antioxidant enzymes in order to face the related damages. Considering results obtained from germination and antioxidant enzymes activity the best temperature for germination of aged seeds of pumpkin was 15°C.

**Key words:** enzyme, peroxidation, temperature, deterioration.

\* Email: soghra.ghahremani67@gmail.com

## مقدمه

گیاهان دارویی مخازن غنی از مواد موثره اساسی بسیاری از داروها هستند. اگرچه این مواد با هدایت فرآیندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند، ولی سنتز آن‌ها به طور بارز تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند و این عوامل سبب تغییر در رشد گیاهان دارویی، مقدار و کیفیت مواد موثره آن‌ها می‌گردد (Omid Beygi, 1995). کدوی تخم کاغذی (*Cucurbita pepo* L.)، گیاهی یک ساله، علفی و جزو گیاهان دارویی بسیار مهم محسوب می‌شود. بذرهاى این گیاه منبع سرشاری از پروتئین و روغن بوده و حاوی مواد موثره مفیدی از جمله اسیدهای چرب امگا-۳، فیتوسترول و ویتامین E به ویژه گاما توکوفرول است (Aruyi et al., 2007). با توجه به اثرات مثبت و متعدد دانه‌های این گیاه از آن داروهای زیادی در اکثر نقاط دنیا تولید می‌شود که از بین آن‌ها می‌توان به پروستاتینک، اورجنین، سیتواورجنین و ... اشاره کرد (Omid beygi, 1995).

جوانه‌زنی از بحرانی‌ترین مراحل استقرار گیاهچه‌ها است و اهمیت زیادی در تعیین تراکم نهایی بوته در واحد سطح دارد و اغلب توسط دما، حتی زمانی که شرایط رطوبتی مناسب باشد محدود می‌شود. این فرآیند با ظهور ریشه‌چه و ساقه‌چه و طولیل شدن آن‌ها و تخصیص مواد غذایی ذخیره به محور جنینی آغاز می‌شود (Jordan et al, 1989).

از لحاظ اقتصادی استفاده از بذر نامطلوب سبب خسارت فراوان می‌شود، چنانکه سالانه میلیون‌ها دلار در آمریکا صرف خرید بذر سالم می‌شود که این مقدار در سطح جهانی و با در نظر گرفتن کاهش عملکرد و در نتیجه استفاده از بذر ضعیف بسیار بیشتر می‌شود. سالیانه در حدود ۲۵ درصد بذر برداشت شده بر اثر فرسودگی از بین می‌روند و یا کیفیت آن‌ها به میزان زیادی کاهش می‌یابد (McDonald, 1999).

کیفیت بذر (شامل قوه زیست و قدرت بذر) از جمله

عوامل تأثیرگذار بر عملکرد گیاهان زراعی در شرایط مزرعه است، به طوری که تهیهی بذرهایی با استانداردهای بالای قدرت همواره مورد نظر محققان بوده است. قدرت بذر از طریق یکنواختی سبز شدن در مزرعه و همچنین، رشد گیاهچه‌ی حاصل از آن عملکرد را تحت تأثیر قرار می‌دهد. فرسودگی بذر موجب کاهش کیفیت و استقرار بذر می‌شود. طی فرآیند فرسودگی، اولین مولفه‌ای که کاهش می‌یابد، کیفیت بذر است که بر کاهش ظرفیت جوانه‌زنی و قدرت حیات موثر است (Basra et al., 2003).

عوامل متعددی بر قدرت بذر اثر دارند که مهم‌ترین آن‌ها شامل ساختار ژنتیکی، محیط و تغذیه گیاه مادر، ذخایر بذر، مرحله رسیدگی در زمان برداشت، پاتوژن‌ها، صدمات مکانیکی و فرسودگی بذر هستند (Perry, 1980a). ساختار ژنتیکی اغلب بیشترین اثر را بر قدرت بذر دارد (Ram and Weisher, 1988). ساختار ژنتیکی می‌تواند صفات متعددی را تحت تأثیر قرار دهد و منجر به تفاوت‌هایی در قدرت بذر شود (Dornbos et al., 1989). بعد از ساختار ژنتیکی، فرسودگی بذر بیشترین تأثیر را بر قدرت بذر دارد (Ellis and Raberts, 1980). بذور با کیفیت و یا قدرت بالاتر می‌توانند بهتر سبز شوند و در شرایط مواجهه با تنش‌های محیطی گیاهچه‌های نیرومندتری تولید کنند (De Figueiredo et al., 2003). بذر بسته به دما و رطوبت در دوران رسیدگی، برداشت و انبارداری نامناسب دچار فرسودگی می‌شود (Marshall and Lewis, 2004).

تحقیقات نشان داده است که فرسودگی بذر روی گیاه مادری شروع می‌شود و با سرعتی متناسب با دما و مقدار رطوبت بذر طی دوران رسیدگی، برداشت، خرم‌ن کوبی، خشک کردن، ذخیره‌سازی و کاشت ادامه می‌یابد. فرسودگی موجب کاهش کیفیت و استقرار بذر می‌شود (Ellis and Raberts, 1980). مطالعات نشان داده است که حداکثر قدرت بذر در گندم و ذرت قبل از رسیدگی فیزیولوژیک حاصل می‌شود، ولی به طور قطع قدرت بذر در طول دوره‌ی انبارداری در همین وضعیت باقی نمی‌ماند

آنتی‌اکسیدانت از جمله کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسمیوتاز هستند که می‌توانند اثرات مخرب ROS را کاهش دهند (Singh Gill and Tuteja, 2010). در استروما و غشای تیلاکوئید آنزیمی فعالیت می‌کند که قادر است تا واکنش سوپراکسید به پراکسیدهیدروژن را کاتالیز کند. این آنزیم سوپراکسیددیسمیوتاز نام دارد. آنزیم کاتالاز از جمله آنزیم‌هایی است که از سلول‌ها در برابر پراکسیدهیدروژن محافظت می‌کند و برای برخی از سلول‌ها حتی در شرایط طبیعی ضروری است همچنین، کاتالاز نقش مهمی در کسب مقاومت در برابر تنش اکسایشی در واکنش‌های تطبیقی سلول‌ها بازی می‌کند (Asada, 1994). پراکسیداز در گیاهان دارای نقش‌های چندگانه‌ی فیزیولوژیک و بیوشیمیایی است و در ایجاد پیوند با مولکول‌های دیواره‌ی سلولی، اکسایش اکسین، تولید لیگنین و پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده دخالت دارد همچنین، پراکسیداز اغلب به عنوان آنزیم مسمومیت‌زدای ROS عمل می‌کند، زیرا  $H_2O_2$  ماده‌ای است که برای دامنه گسترده‌ای از واکنش‌های وابسته به پراکسیداز به عنوان ماده پذیرنده الکترون عمل می‌کند (Quiroga *et al.*, 2000).

چاکماک و همکاران (Cakmak *et al.*, 2010) مشاهده کردند که در بذور یونجه با فرسودگی طولانی مدت، میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دسیمیوتاز کاهش یافت. آن‌ها علت کاهش قابلیت جوانه‌زنی در بذور فرسوده یونجه را افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ذکر کردند. مورتی و همکاران (Murthy *et al.*, 2002) گزارش کردند که با افزایش مدت انبارداری و فرسودگی بذر مقدار مالون‌دی‌آلدئید در بذر افزایش می‌یابد و در مقابل کاهش در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گلوکاتیون ردکتاز و آسکوربات پراکسیداز نیز مشاهده می‌شود که با قدرت بذر همبستگی مثبت دارد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بذر در روزهای اول فرسودگی افزایش می‌یابند، ولی با افزایش روند فرسودگی قابلیت

(Basra *et al.*, 2003). پیری بذر موجب کاهش درصد و سرعت سبز شدن گیاهچه‌ها و در نتیجه سبب افت محصول دانه می‌شود (Ghassemi-Golezani *et al.*, 1996). پراکسیداسیون لیپیدی شاید تنها عاملی است که به طور مکرر نقش آن در فرسودگی بذر مورد اشاره قرار گرفته است. تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) از طریق اکسیداسیون موجب رخ دادن پدیده پراکسیداسیون لیپیدی در بذر می‌گردد. مکانیسم پراکسیداسیون لیپیدی اغلب توسط اکسیژن موجود در اطراف اسیدهای چرب غیراشباع از قبیل اسیداولئیک و لینولئیک که به طور معمول در غشاهای سلولی بذر وجود دارند، آغاز می‌شود. همچنین، رادیکال‌های آزاد، ترکیبات دیگری مانند پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و DNA را مورد هجوم قرار می‌دهند (McDonald, 1999).

از جمله واکنش‌های گیاهان به انواع تنش‌ها، افزایش انواع اکسیژن فعال (ROS) است. فعالیت متابولیت‌های اکسنده و انتقال الکترون، منبع اصلی ROS در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم سلول‌های گیاهی است (Singh Gill and Tuteja, 2010). انواع اکسیژن فعال از احیای ناقص اکسیژن طی فرآیندهای زیستی و هوازی سلول مانند فتوسنتز، تنفس و تنفس نوری به وجود می‌آید (Mittler, 2002). به طوری که حدود یک تا دو درصد از اکسیژن مصرفی سلول منجر به تولید ROS می‌شود (Bhattacharjee, 2005). اگر چه طی تنش‌های محیطی ROS به وجود آمده دارای پتانسیلی است که منجر به ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو در سلول‌ها می‌شود، ولی بررسی‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد ROS نقش کلیدی در گیاهان ایفا می‌کند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و ترکیبات با وزن مولکولی پایین این توانایی را دارد که بدون آن که خود مورد تغییر قرار گیرد و به مواد مخرب رادیکال تبدیل شود، ROS را مهار کند (Mittler *et al.*, 2004). گیاهان برای کاهش آسیب‌های ناشی از ROS دارای مکانیسم دفاعی شامل آنزیم‌های

<sup>1</sup> Reactive oxygen species

شمارش بذور جوانه زده به صورت روزانه و به مدت ۷ روز انجام گردید. معیار جوانه زنی یک بذر، رشد ریشه چه و خروج آن به میزان ۲ میلی متر از پوسته بذر در نظر گرفته شد. درصد جوانه زنی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (ISTA, 2008):

$$GP = 100 \cdot (N_G / N_T)$$

$N_G$ : تعداد بذور جوانه زده،  $N_T$ : تعداد کل بذور  
سرعت جوانه زنی نیز در این پژوهش با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Ellis and Rabertts, 1980):

$$GR = \sum_{i=1}^N \frac{Si}{Di}$$

در این فرمول:  $GR$  = سرعت جوانه زنی (تعداد بذور جوانه زده در هر روز)،  $Si$  = تعداد بذور جوانه زده در هر روز،  $Di$  = تعداد روز تا شمارش  $n$ ام،  $N$  = تعداد دفعات شمارش

همچنین مقدار ماده خشک مصرف شده در تنفس طبق روش حسن و همکاران (Hasan et al., 2004) و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$SR = SDW - (PDW + RDW + RSDW)$$

در این فرمول:  $SR$  = مقدار ماده خشک مصرف شده در تنفس،  $SDW$  = وزن بذور خشک قبل از جوانه زنی،  $PDW$  = وزن خشک ساقچه چه،  $RDW$  = وزن خشک ریشه چه،  $RSDW$  = وزن خشک باقی مانده بذر بعد از اتمام دوره، نمونه برداری برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت و پراکسیداسیون لیپیدی انجام گرفت (Kusvuran et al., 2013; Sevengor et al., 2011). برای استخراج عصاره حاوی آنزیم های آنتی اکسیدانت ۰/۵ گرم از هر گیاهچه پس از انجماد در نیتروژن مایع داخل هاون چینی که از قبل در یخچال نگهداری شده بود به خوبی ساییده شد. سپس، با افزودن ۱۰ میلی لیتر از بافر فسفات سرد حاوی ۰/۵ میلی مولار EDTA هموژنیزه گردید. هموژن ها به اپندورف های ۲ میلی لیتری منتقل و سپس، در داخل

دفاع را از دست می دهند و از مقدار آن ها کاسته می شود (Kaewnaaree et al., 2011). با توجه به اینکه کدوی تخم کاغذی یک گیاه روغنی است و اکسیداسیون روغن آن تحت تاثیر دما، موجب کاهش جوانه زنی می شود، به نظر می رسد که بررسی فرسودگی و دما بر جوانه زنی بذورهای این گیاه ضروری باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر فرسودگی بذر بر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت و پراکسیداسیون لیپیدی کدوی تخم کاغذی در دماهای مختلف بود.

## مواد و روش ها

به منظور بررسی تأثیر دما و فرسودگی بر میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی آزمایشی در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه محقق اردبیلی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح فرسودگی (شاهد، ۵ و ۱۰ روز فرسودگی در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد با رطوبت نسبی ۹۵ تا ۱۰۰ درصد) و سه سطح دماهای جوانه زنی (۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه) بود. بذور کدوی تخم کاغذی پس از ضد عفونی سطحی به ۳ قسمت مساوی تقسیم شدند که یک قسمت به عنوان شاهد بدون فرسودگی در نظر گرفته شد و دو قسمت دیگر برای اعمال فرسودگی در درون پارچه توری گذاشته شد و به درون آون با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد با رطوبت نسبی ۹۵ تا ۱۰۰ درصد به مدت ۵ و ۱۰ روز منتقل گردید. برای انجام آزمون جوانه زنی، تعداد ۲۵ بذر از هر تیمار به روش بین کاغذی (BP)<sup>۱</sup> درون پتری دیش های ۱۴ سانتی متری کشت شد (ISTA, 2008). ابتدا ۲۵ عدد بذر روی یک لایه کاغذ صافی که با آب مقطر خیسانده شده بود، قرار گرفت و سپس، کاغذ صافی مرطوب دیگری روی بذور گذاشته شد. پتری دیش ها به درون ژرمیناتورهایی با دماهای ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد منتقل گردید.

<sup>1</sup>Between Paper

برده شد. میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون لامبرت-بیر و ضریب خاموشی محصول واکنش گایاکول پراکسیداز ( $13/3 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) محاسبه شد. فعالیت آنزیم در نهایت بر حسب  $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ Fw.min}^{-1}$  بیان گردید.

$$\frac{\text{POD}/\text{min}}{13.3} = \text{فعالیت آنزیم پراکسیداز}$$

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش ابی (Abi, 1984) استفاده گردید. نمونه های آنزیمی از ترکیب کردن ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، ۰/۵ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی مولار و ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی به دست آمد که در ادامه حجم نمونه ها با اضافه کردن آب مقطر به ۳ میلی لیتر رسانده شد. میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. نمونه بلانک حاوی تمام مواد استفاده شده به جز عصاره آنزیمی استخراج شده بود. میزان پراکسید هیدروژن تجزیه شده با استفاده از ضریب خاموشی ( $\epsilon=39/4\text{Mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) محاسبه شد. فعالیت ویژه آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین بیان شد.

میزان مالون دی آلدئید با استفاده از روش (McCue and Shetty, 2002) بدست آمد. در لوله های آزمایش، ۲۰۰ میلی لیتر از بافت هموزن با ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. ۵۰۰ میلی لیتر از تری کلرواستیک-اسید ۲۰٪ با ۱ میلی لیتر از تیوباریتوریک اسید ۱۰ میلی مولار مخلوط شد. لوله های آزمایش به انکوباتور ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه منتقل شد. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در  $13000\text{g}$  سانتریفیوژ شد. مقدار جذب روشنای در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و غلظت MDA بر اساس جذب مولی و بر حسب  $\text{mmol.g}^{-1}\text{FW}$  بیان شد. مقدار MDA با استفاده از ضریب خاموشی  $155\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  محاسبه شد.

سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده شد و در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. برای پیش گیری از اثر مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه ها، روشنای حاصل به سه قسمت تقسیم و تا زمان تعیین فعالیت آنزیم های فوق در دمای  $20^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شد (Sairam et al., 2002).

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

۱: بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، حاوی EDTA ۰/۱ میلی مولار، متیونین ۱۳mM و نیتروبلوتترازولیموم  $75\mu\text{M}$  (NBT) pH=۷.۲: محلول ریوفلاوین ۰/۱۲mM نمونه های آنزیمی از ترکیب کردن ۸۸۵ میکرو لیتر از بافر ۱، ۱۵ میکرو لیتر بافر ۲ و ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. میزان جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز

$$\frac{100[(\text{OD Control}-\text{OD Sample})/\text{OD Control}]\times 100}{50} = (\text{Unit.mg}^{-1})$$

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز با روش (Kato and Shimizu, 1987) انجام شد. بافرهای مورد استفاده برای اندازه گیری این آنزیم به ترتیب زیر بود:

۱: بافر حاوی گایاکول ۴۵ میلی مولار؛ ۱۱۲ میکرو لیتر گایاکول با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی لیتر رسانده شد. ۲: بافر حاوی آب اکسیژنه ۲۲۵ میلی مولار؛ ۴۵۰ میکرو لیتر  $\text{H}_2\text{O}_2$  با بافر فسفات به حجم ۲۰ میلی لیتر رسانده شد.

برای تهیه نمونه آنزیمی ۱۰۰ میلی مولار بافر سدیم فسفات (pH=۵/۸) و ۷/۲ میلی مولار گایاکول، ۱۱/۸ میلی مولار  $\text{H}_2\text{O}_2$  و ۰/۱ میلی لیتر از عصاره آنزیمی به کار

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گیاهچه‌های کدوی تخم کاغذی در جدول (۱) آورده شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار فرسودگی، دما و اثر متقابل آن‌ها بر میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسمیوتاز، کاتالاز، پراکسیداز و نیز مالون دی آلدئید است. اثر دما بر مقدار ماده خشک مصرف شده در تنفس معنی‌دار نبود.

کلیه تجزیه‌های آماری و مقایسه میانگین‌ها پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SAS9.1 و SPSS18 انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده گردید. رسم شکل و نمودارها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر روی

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر صفات اندازه‌گیری شده در کدوی تخم کاغذی

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

منابع تغییرات S.O.V		درجه آزادی df	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	پراکسیداز Peroxidase	کاتالاز Catalase	سوپراکسید دیسمیوتاز Superoxide dismutase	مالون دی آلدئید Malone dialdehyde	مقدار ماده خشک مصرف شده در تنفس Amount of dry material that used in respiration	درصد جوانه‌زنی Germination percentage
Deterioration	فرسودگی	2	0.6358**	3824.2**	110.79**	3920.94**	4.49**	0.0031*	13207.7**
Temperature	دما	2	0.0819**	1986.82**	145.5**	1470.86**	8.92**	0.0026**	1781.91**
Deterioration × Temperature	فرسودگی × دما	4	0.0217**	1215.1**	29.44**	535.43**	21.17**	0.00016**	496.59**
Error	خطا	18	0.0017	0.525	0.091	0.436	0.0562	0.0000078	32.59
C.V.(%)	ضریب تغییر (%)		9.52	0.56	2.38	1.22	4.62	13.14	9.15

MS، \* و \*\* به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

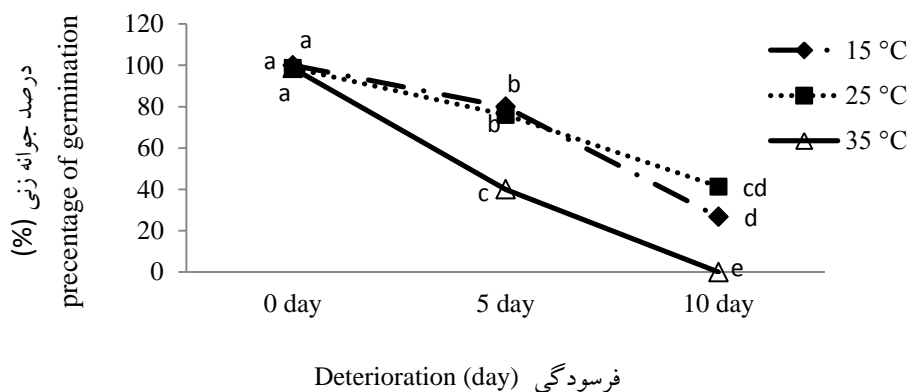
ns, \*, \*\*. Not significant, significant at 5 % and 1% probability levels, respectively.

همکاران (Ghassemi-Golezani *et al.*, 2010) برای کلزا گزارش شده است. در پژوهشی که بصرا و همکاران (Basra *et al.*, 2003) انجام دادند درصد سبز شدن بذرها پنبه با افزایش در دوره‌ی تسریع پیری کاهش پیدا کرد، به طوری درصد سبز شدن از ۸۷ درصد در بذرها شاهد به صفر درصد در بذرهایی که طی ۱۵ روز فرسوده شده بودند، رسید. پیری بذر حتی در شرایط مناسب نگهداری نیز اتفاق می‌افتد و رفته رفته بذر توانایی جوانه‌زنی خود را از دست می‌دهد. پیری در ابتدا کیفیت

**درصد جوانه‌زنی:** نتایج پژوهش نشان داد که درصد جوانه‌زنی تحت تأثیر فرسودگی و دما قرار گرفت و فرسودگی و افزایش دما موجب کاهش درصد جوانه‌زنی شد (شکل ۱). در بین تیمارهای آزمایشی، ۱۰ روز فرسوده کردن بذور و دمای ۳۵ درجه دارای کم‌ترین درصد جوانه‌زنی در مقایسه با بذور شاهد (۱۰۰ درصد) بود. بر طبق نتایج به دست آمده می‌توان گفت که با افزایش سطوح فرسودگی از درصد جوانه‌زنی کاسته می‌شود که نتایج مشابهی توسط قاسمی گل‌عدانی و

آنتی اکسیدانت معنی دار بود که نشان می دهد احتمالاً فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت موجب بهبود جوانه زنی در شرایط وجود تنش می شود (جدول ۲).

فیزیولوژیکی بذر را تحت تاثیر قرار می دهد، بنابراین در بذرهای پیر قوه نامیه کاهش می یابد (Copeland and McDonald, 1985). همبستگی درصد جوانه زنی با سرعت جوانه زنی و فعالیت آنزیم های



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر ترکیب تیماری دما و فرسودگی بر درصد جوانه زنی بذرهای کدوی تخم کاغذی  
Fig1- Comparison of means for the effects of temperature and deterioration on the percentage of germination in pumpkin seeds

احتمال زیاد، فرسودگی موجب تاخیر در فرآیندهای متعدد جذب آب و شروع فعالیت های آنزیمی می گردد و به دنبال این پدیده سرعت جوانه زنی کاهش پیدا می کند.

#### میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز:

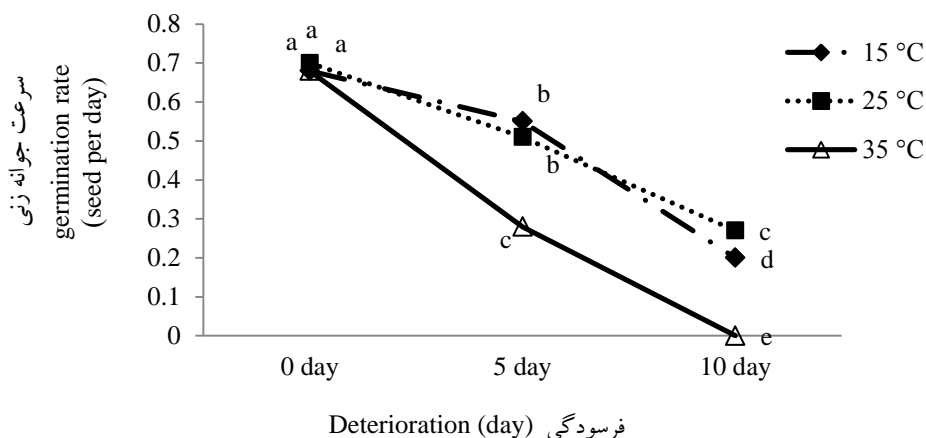
بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز در دمای ۲۵ درجه و طی ۵ روز فرسودگی مشاهده شد. کم ترین میزان فعالیت آن نیز در سطح فرسودگی سوم و در دمای ۳۵ درجه به دست آمد (شکل ۳). شکل گیری انواع اکسیژن فعال از احیاء ناقص اکسیژن شروع شده و تولید ROS در موجودات زنده تحت تأثیر تنش های محیطی اتفاق می افتد. از جمله انواع اکسیژن فعال  $O_2$ ،  $OH$ ،  $H_2O_2$  بوده که واکنش پذیری بسیار بالایی دارند (Bowler *et al.*, 1992). با این که افزایش تولید ROS در طی بروز تنش منجر به آسیب به سلول ها می شود، اما می تواند سیگنال هایی را فعال کند، که منجر به فعال سازی مسیر دفاعی و پاسخ به تنش شود (Disikan *et al.*, 2001).

#### سرعت جوانه زنی: اثر متقابل فرسودگی و دما بر

سرعت جوانه زنی بذور کدوی تخم کاغذی تأثیر معنی داری داشت (جدول ۱). افزایش فرسودگی و دما موجب کاهش سرعت جوانه زنی شد. مقایسه میانگین اثر متقابل داده های آزمایش نشان داد که بیشترین سرعت جوانه زنی (۰/۶۹ بذر در روز) در سطح فرسودگی بذور تیمار نشده و در دمای ۲۵ درجه و کم ترین سرعت جوانه زنی در سطح فرسودگی ۱۰ روز و در دمای ۳۵ درجه به دست آمد (شکل ۲). قدرت و کیفیت بذر تحت تأثیر فرسودگی و پیری بذر قرار می گیرد و به دنبال آن سرعت جوانه زنی کاهش می یابد (Basra *et al.*, 2003). فرسودگی بذور گندم زمان شروع و پایان جوانه زنی را افزایش داد. با افزایش سطح فرسودگی در این بذور، از سرعت جوانه زنی و درصد گیاهچه های نرمال کاسته شد، به طوری که تیمار شاهد (بدون اعمال فرسودگی) بیشترین سرعت جوانه زنی را داشت (Soltani *et al.*, 2008). به

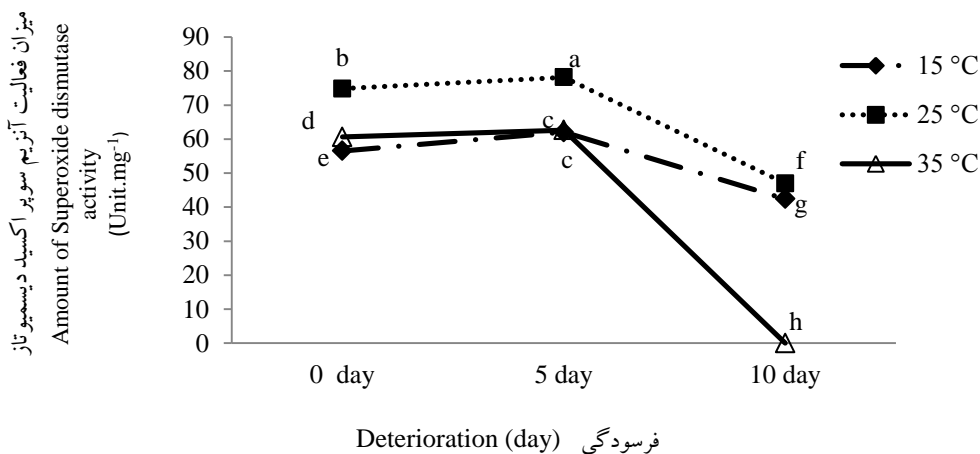
در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشد، منجر به خنثی‌سازی اثر رادیکال سوپراکسید می‌باشد (Bowler *et al.*, 1992) که توسط پیوند دوگانه با لیپیدها واکنش داده و منجر به پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود (Sankar, 2010). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز که اولین خط دفاعی آنزیم‌ها

در طی تنش اکسیداتیو اولین ROS تولید شده رادیکال سوپراکسید می‌باشد (Bowler *et al.*, 1992) که توسط پیوند دوگانه با لیپیدها واکنش داده و منجر به پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود (Sankar, 2010). فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز که اولین خط دفاعی آنزیم‌ها



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر ترکیب تیماری دما و فرسودگی بر سرعت جوانه‌زنی بذرهای کدوی تخم کاغذی

Fig 2- Comparison of means for the effects of temperature and deterioration on the rate of germination in pumpkin seeds



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر ترکیب تیماری دما و فرسودگی بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز در گیاهچه‌های کدوی تخم کاغذی

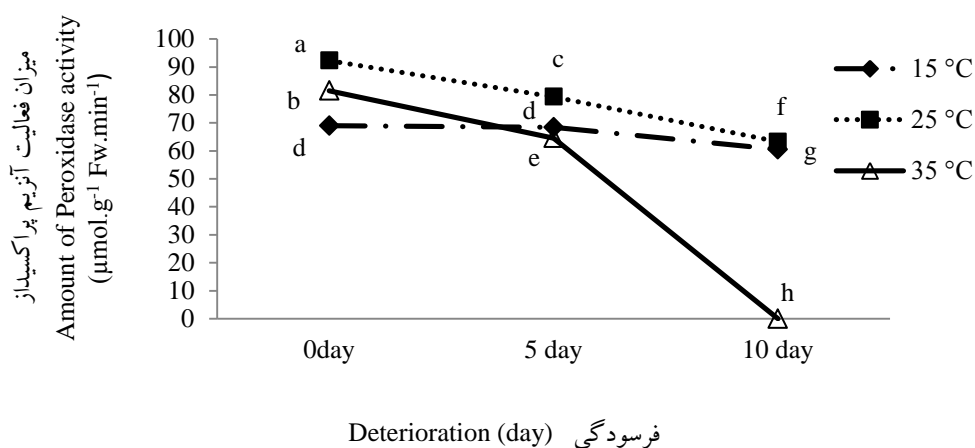
Fig 3- Comparison of means for the effects of temperature and deterioration on the activity of superoxide dismutase in pumpkin seedlings



بیشترین فعالیت را در دمای ۲۵ درجه و شاهد فرسودگی داشت. کمترین میزان فعالیت این آنزیم نیز از تیمار ۱۰ روز فرسودگی و دمای ۳۵ درجه حاصل شد (شکل ۴). آنتی اکسیدانت‌ها می‌توانند با کم کردن میزان رادیکال‌های آزاد از فرسودگی بذر جلوگیری و روند آن را کندتر کنند، ولی کاهش مقدار آنتی اکسیدانت‌ها پس از ادامه یافتن روند فرسودگی می‌تواند نشان‌دهنده شکست مکانیسم دفاعی سیستم‌های آنتی اکسیدانت بذر در برابر این رادیکال‌ها باشد. آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بذر در روزهای اول فرسودگی افزایش می‌یابند، ولی با افزایش روند فرسودگی قابلیت دفاع را از دست می‌دهند و از مقدار آن‌ها کاسته می‌شود (Kaewnaee *et al.*, 2011).

افزایش میزان فعالیت سوپراکسیددیسمیوتاز بر اثر ۵ روز فرسودگی و دمای ۲۵ درجه را می‌توان به تاثیر سازشی آن در این شرایط نسبت داد. از دلایل افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت می‌توان به نقش این آنزیم‌ها به عنوان یکی از اجزای مهم مکانیسم دفاعی در گیاه اشاره کرد. با توجه به نتایج به دست آمده ممکن است که دمای ۲۵ درجه برای فعالیت این آنزیم مناسب باشد و افزایش طول دوره فرسودگی منجر به کاهش فعالیت آن شود. همچنین، به نظر می‌رسد که تأثیر سوپراکسید دسیموتاز در دمای ۳۵ درجه نسبت به آنزیم‌های دیگر در مهار رادیکال‌های آزاد کمتر باشد.

#### میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز: آنزیم پراکسیداز



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر ترکیب تیماری دما و فرسودگی بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های کدوی تخم کاغذی

Fig 4- Comparison of means for the effects of temperature and deterioration on the activity of peroxidase in pumpkin seedlings

مکانیسم دفاعی گیاه اهمیت ویژه‌ای داشته و در مسیره‌ای انتقال سیگنال که از عوامل فعال شدن سایر مکانیسم‌های دفاعی می‌باشد، درگیر می‌شود. از آنجایی که کاتالاز به حفظ هموستازی اکسیژن فعال در زمان ایجاد تنش کمک می‌کند، فعالیت آن در گیاه به هنگام تنش افزایش یافته (Magbanua *et al.*, 2007) و سنتز آن یک پاسخ سازگار یافته در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشد (Mittler, 2002).

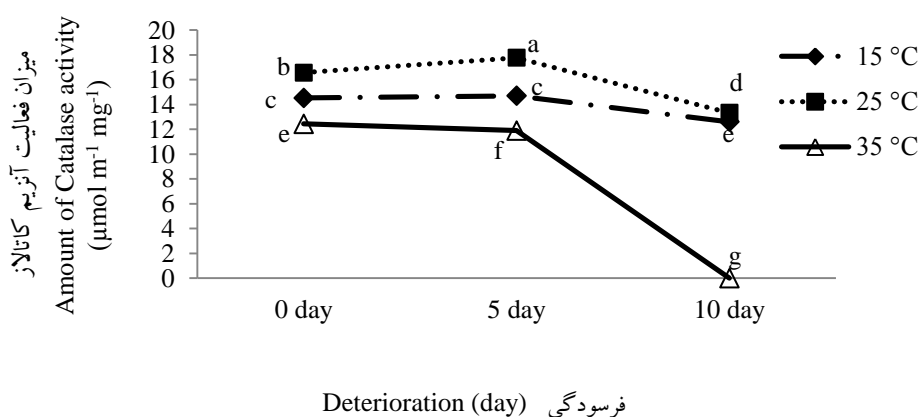
#### میزان فعالیت آنزیم کاتالاز: بیشترین میزان

فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه و طی ۵ روز فرسودگی مشاهده شد. کمترین میزان فعالیت آن نیز در سطح فرسودگی سوم و در دمای ۳۵ درجه به دست آمد (شکل ۵). از جمله پاسخ‌های گیاهان به انواع تنش‌های زنده و غیرزنده، انتشار اکسیژن فعال مانند پراکسید هیدروژن می‌باشد. نقش پراکسید هیدروژن در

افزایش دما و طول دوره فرسودگی بر میزان مالون دی آلدئید افزوده شد. سیرم و همکاران (Sairam *et al.*, 2002). معتقدند که زمانی که دفاع آنتی اکسیدانتی کاهش و یا تشکیل رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد، تنش اکسیداتیو پدید می‌آید و می‌تواند منجر به افزایش پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، تخریب غشاهای لیپیدی و در نتیجه خروج آلدئیدهای گوناگونی از جمله مالون دی آلدئید شود.

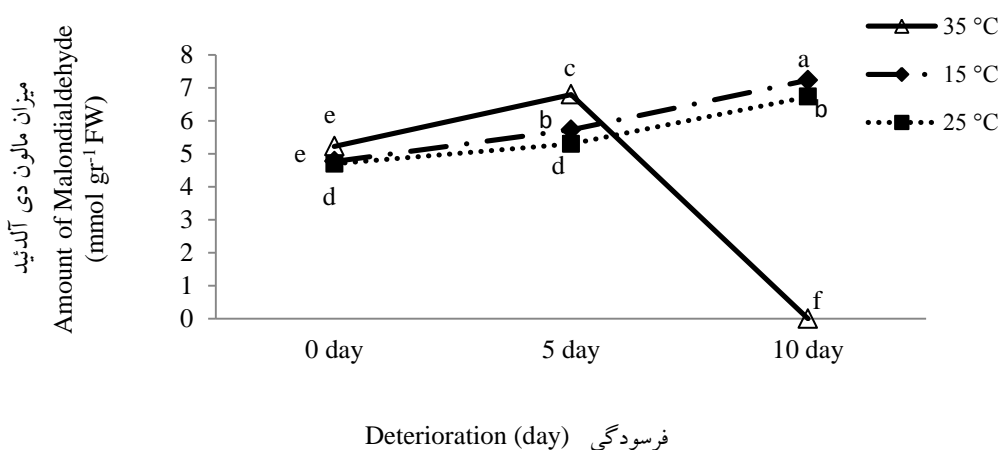
### میزان مالون دی آلدئید: نتایج حاصل از تجزیه

واریانس داده‌ها نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار فرسودگی و دما بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی بود (جدول ۱). بیشترین میزان مالون دی آلدئید در دمای ۱۵ درجه و در بدور ۱۰ روز فرسوده مشاهده شد (شکل ۶). به نظر می‌رسد که با افزایش دما و فرسودگی بدور، بر میزان رادیکال‌های آزاد افزوده و تجمع این ترکیبات مضر منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلولی و اندامک‌ها می‌شود، به طوری که با



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر ترکیب تیماری دما و فرسودگی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های کدوی تخم کاغذی

Fig 5- Comparison of means for the effects of temperature and deterioration on the activity of catalase in Pumpkin seedlings



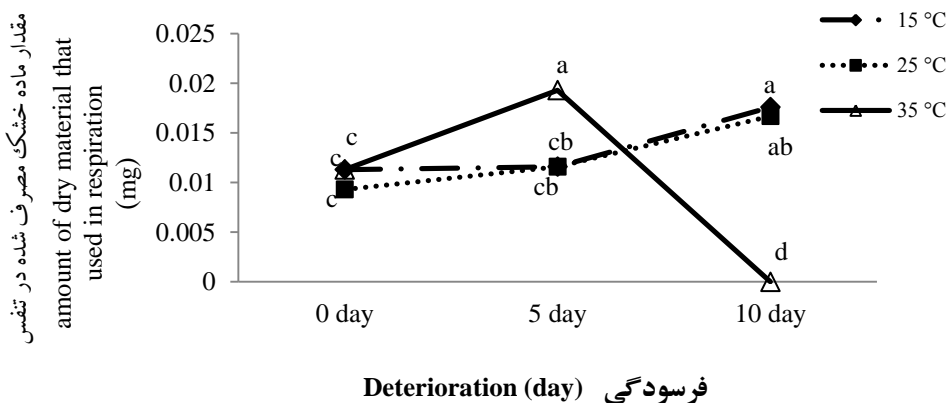
شکل ۶- مقایسه میانگین اثر ترکیب تیماری دما و فرسودگی بر میزان مالون دی آلدئید گیاهچه‌های کدوی تخم کاغذی

Fig 6- Comparison of means for the effect of temperature and deterioration on the amount of Malondialdehyde in pumpkin seedlings

مرتبط با آن نیز این نظر را تایید می کند. افزایش دما موجب افزایش شدت تنفس و هدر رفت مواد ذخیره ای بذر می گردد که چنین نتایجی توسط حسن و همکاران (Hasan et al., 2004) نیز گزارش شده است. همبستگی مقدار ماده خشک مصرف شده در تنفس با آنزیم های آنتی اکسیدانت و پراکسیداسیون لیپیدی نشان می دهد که احتمالاً فعالیت این آنزیم ها و پراکسیداسیون لیپیدی با مصرف انرژی موجب هدررفت انرژی می شوند، اما با این وجود فعالیت این آنزیم ها برای کاهش اثرات مخرب تنش ضروری می باشد (جدول ۲).

**مقدار ماده خشک مصرف شده در تنفس: نتایج**

حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان دهنده تأثیر معنی دار فرسودگی و اثر متقابل فرسودگی و دما بر مقدار ماده خشک مصرف شده در تنفس بود (جدول ۱). بیشترین مقدار ماده خشک مصرف شده در تنفس از تیمار ۵ روز فرسودگی و دمای ۳۵ درجه حاصل شد و کم ترین آن نیز مربوط به ۱۰ روز فرسودگی و دمای ۳۵ درجه بود (شکل ۷). این نتایج نشان می دهد که در تیمار ۱۰ روز فرسودگی و دمای ۳۵ درجه بذر به طور کامل فاقد قوه زیست شده است و نتایج حاصل از درصد جوانه زنی و سایر صفات



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر ترکیب تیماری دما و فرسودگی بر مقدار ماده خشک مصرف شده در تنفس در کدوی تخم کاغذی

Fig 7- Comparison of means for the effects of temperature and deterioration on the respiration index in pumpkin

جدول ۲- ضرایب همبستگی ساده بین صفات اندازه گیری شده در گیاهچه های کدوی تخم کاغذی تحت تیمارهای فرسودگی و دماهای مختلف

Table 2- Correlation coefficients among studied traits in pumpkin seeds affected by deterioration and temperature

صفت	SR	GR	GP	SOD	CAT	POX	MDA
SR	1						
GR	0.55	1					
GP	0.54	0.998**	1				
SOD	0.471*	0.771**	0.774**	1			
CAT	0.531**	0.728**	0.733**	0.943**	1		
POX	0.506**	0.812**	0.810**	0.951**	0.941**	1	
MDA	0.878**	0.242	0.241	0.619**	0.708**	0.672**	1

GR: germination rate, GP: germination percentage, SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, POX: peroxidase, MDA: Malone dialdehyde, SR: amount of dry material that used in respiration

شد و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت راهی برای مقابله با آن است. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که دمای ۱۵ درجه بهترین دما برای جوانه‌زنی بذره‌های فرسوده باشد. همچنین، پیشنهاد می‌شود که از روش‌های بهبود بذر نظیر پرایمینگ در آزمایش‌های آتی استفاده شود.

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل نشان دهنده افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بر اثر فرسودگی و دماهای بالا نسبت به شاهد بود. به نظر می‌رسد که دلیل آن آسیب‌های ناشی از تنش وارد شده به گیاه بود که در نهایت منجر به پراکسیداسیون لیپیدی

## Reference

## منابع

- Abi, H. 1984.** Catalase in vitro. *Method of Enzymology*, 105:121-126.
- Aruyi, H., M. Azizi Arani, and A. Emami. 2007.** Effect of planting date on the grain yield and oil content in medicinal pumpkin. Final research report. No. 2. Department of Horticulture. Ferdowsi University of Mashhad.
- Asada, K. 1994.** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer CH and Mullineaux PM, eds. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. London: CRC Press. 77-104.
- Basra, S.M.A., N. Ahmad, M.M. Khan, N. Iqbal, and M.A. Cheema. 2003.** Assessment of cotton seed deterioration during accelerated ageing. *Seed Sci. Technol.* 31: 531-540.
- Bhattachrjee, S. 2005.** Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. *Curr. Sci.* 89: 1113-1121.
- Bowler, C., M. Van Montagu, and D. Inzé. 1992.** Superoxide dismutases and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.
- Cakmak, T., O. Atici, G. Agar, and S. Sunar. 2010.** Natural aging- related biochemical changes in alfalfa seeds stored for 42 years. *Int. Res. J. Plant Sci.* 1(1): 1-6.
- Copeland, L.O., and M.B. McDonald. 1985.** Seed vigor and vigor tests. In principles of Seed Science and Technology. Second Edition, McMilan Publishing Company, New York. U.S.A. pp. 121-144.
- De Figueiredo, E., M.C. Albuquerque, and N.M. De Carvalho. 2003.** Effect of the type of environmental stress on the emergence of sunflower (*Helianthus annuus* L.), soybean (*Glycine max* L.) and maize (*Zea mays* L.) seeds with different levels of vigor. *Seed Sci. Technol.* 31:465-479.
- Desikan, R., S.A.H. Mackerness, J.T. Hancock, and S.J. Neill. 2001.** Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127: 159-172.
- Dornbos, D.L., Mullen, R. E., Shibles, R.M. 1989.** Drought stress effects during seed filling on soybean seed germination and vigour. *Crop Sci.* 29: 476-480.
- Ellis, R.H., and E.H. Roberts. 1980.** Towards a rational basis for testing seed quality. In: P.D. Hebblethwaite (ed.) Seed Production. Butterworths, London. pp. 605-635.
- Ghasemi Golezani, K., V. Salehian, F. Rahimzadeh Khoie, and M. Moghaddam. 1996.** Effect of seed vigor on seedling emergence and grain yield of wheat. *J. Agric. Sci. Nat. Res.* 3: 48-54. (In Persian, with English Abstract).
- Ghassemi-Golezani, K., S. Khomari, B. Dalili, A. Hosseinzade-Mahootchy, and A. Chadordooz-Jeddi. 2010.** Effects of seed aging on field performance of winter oilseed rape. *J. Food Agric. Environ. Sci.* 8: 175-178.

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

**Hasan, M. A., J.U. Ahmed, M.M. Hossein, and M.A. Ullah. 2004.** Germination characters and seed reserve mobilization during germination of different wheat genotypes under variable temperature regimes. *J. Nat. Sci. Found. Sri Lanka.* 32:97-107.

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

**Jordan, G.L., and M.R. Haferkamp. 1989.** Temperature responses and calculated heat units for germination of several range grasses and shrubs. *J. Range Manage.* 42:41-45.

**Kaewnaree, P., S. Vichitphan, P. Klanrit, B. Siri, and K. Vichitphan. 2011.** Effect of accelerated aging process on seed quality and biochemical changes in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Seed Biotechnol.* 10(2): 175-182.

**Kato, M., and S. Shimizu. 1987.** Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: phenolic dependent peroxidative degradation. *Can. J. Bot.* 65: 729-735.

**Kusvuran, S., S. Ellialtioglu, and Z. Polat. 2013.** Antioxidative enzyme activity, lipid peroxidation, and proline accumulation in the callus tissues of salt and drought tolerant and sensitive pumpkin genotypes under chilling stress. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 54(4): 319-325.

**Magbanua, Z.V., C.M.D. Moraes, T.D. Brooks, W.P. Williams, and D.S. Luthe. 2007.** Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20(6): 697-706.

**Marshal, A.H., and D.N. Lewis. 2004.** Influence of seed storage conditions on seedling emergence, seedling growth and dry matter production of temperate forage grasses. *Seed Sci. Technol.* 9:493-501.

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

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

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

**Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, and F. Van Breusegem. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9(10): 490-498.

**Murthy, U.M.N., Y. Liang, P.P. Kumar, and W.Q. Sun. 2002.** Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiata*. *Physiol. Planta.* 115: 213-220.

**Omid Beygi, R. 1995.** Principles of production and processing of medicinal plants. Fekr Ruz Publications. P: 283. (In Persian).

**Perry, D. A. 1980.** The concept of seed vigour and its relevance to seed production techniques. In: P. D. Hebblethwaite (ed.). *Seed production.* Butterworths, London, pp. 585-591.

**Quiroga, M., C. Guerrero, M.A. Botella, A. Barcelo, I. Amaya, M.I. Medina, F.J. Alonso, S.M. De Forchetti, H. Tigier, and V. Valpuesta. 2000.** A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* 122: 1119-1127.

**Ram, C., and L.E. Weisher. 1988.** Effect of artificial aging on physiological biochemical parameters of seed quality in wheat. *Seed Sci. Technol.* 16:579-587.

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

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

**Singh Gill, S., and N. Tuteja. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants: A Review. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.

**Soltani, E., B. Kamkar, S. Galeshi, and F. Akram Ghaderi. 2008.** The effect of seed deterioration on seed reserves depletion and heterotrophic seedling growth of wheat. *J. Agric. Sci. Nat. Resour.* 15(1): 13-17. (In Persian, with English Abstract).

**Sunkar, R. 2010.** Plant stress tolerance (Methods and Protocols). Department of Biochemistry and Molecular Biology. 401p.