"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد دهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰
(ص ۴۲-۲۹)
مقاله پژوهشی

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 10, No.: 1, Spring 2021
(pp: 29-42)
DOI: 10.22034/ijsst.2020.128242.1303
Research Article

مطالعه پیش‌تیمار اسید آسکوربیک بر شاخص‌های جوانه‌زنی و بیوشیمیایی بذرهای علف بره (*Festuca ovina*) تحت تنش خشکی

حسین رضا روحی[۱]، محمدحسن وفائی[۲*]، مریم ثمن[۳]، علیرضا شاهبداغلو[۴]

۱. دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، ایران
۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، ایران
۳. عضو هیئت علمی گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۴. کارشناس پژوهشی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۰)

چکیده

جوانه‌زنی بذر از بحرانی‌ترین مراحل چرخه زندگی گیاه بوده که به‌شدت تحت تاثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد. در این راستا اثر اسید آسکوربیک در بهبود وضعیت جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان بذرهای علف بره تحت تنش خشکی طی آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. بذرهای پیش‌تیمار نشده (شاهد) و پیش‌تیمار شده با اسید آسکوربیک در غلظت‌های صفر (هیدروپرایمینگ)، ۱ و ۲ میلی‌مولار و سطوح خشکی صفر، ۰/۴-، ۰/۸- و ۱/۲- مگاپاسکال مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پیش‌تیمار بذرها با اسید آسکوربیک در سطوح مختلف خشکی موجب افزایش درصد جوانه‌زنی، بنیه بذر، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، کربوهیدرات‌های محلول، پروتئین‌های محلول و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و کاهش متوسط زمان جوانه‌زنی، هدایت الکتریکی و محتوای مالون دی‌آلدهید شد. در پتانسیل ۱/۲- مگاپاسکال، پیش‌تیمار بذر با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک سبب افزایش شاخص بنیه بذر، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های محلول به‌ترتیب به‌میزان ۱۶۷/۰۳، ۲۲/۲۶، ۳۵/۷۷ و ۱۸۷/۹۱، ۲۲/۶۱، ۳۰/۲۰ درصد و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز به‌ترتیب به میزان ۱۱/۸۵، ۲۲/۸۱، ۱۲/۲۵ و ۱۳/۸۳، ۳۱/۳۳، ۹/۹۳ درصد شد. بنابراین استفاده از اسید آسکوربیک در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار جهت کاهش اثرات منفی ناشی تنش خشکی قابل توصیه است.

کلمات کلیدی: آسکوربات پراکسیداز ، بنیه بذر ، پیش‌تیمار ، هدایت الکتریکی

Study of ascorbic acid priming on germination and biochemical indexes of sheep fescue (*Festuca ovina*) seeds under drought stress

H.R. Rouhi[1], M.H. Vafaei[2], M. Saman[3], A.R. Shahbodaghloo[4]

1. Ph.D of Crop Physiology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Assistant professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
3. Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran
4. Research Expert, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
(Received: Oct. 27, 2019 – Accepted: Apr. 08, 2020)

Abstract

Germination of seeds, one of the most critical stages of plant cycle is greatly influenced by drought stress. In this way, the effects of ascorbic acid to improve germination and antioxidant enzyme activities in sheep fescue seeds under drought stress were studied. A factorial experiment based on completely randomized design with three replications was done. None-primed seed (control group) and priming of different concentrations of ascorbic acid (0, 1 and 2 mM) under 0, -0.4, -0.8 and -1.2 MPa drought stress levels were evaluated. The results showed that seed priming with ascorbic acid in different drought levels increased some traits such as germination percentage, vigour index, plumule and radicle length, soluble carbohydrates and protein contents and antioxidant enzymes activities (catalase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase). While it decreased mean germination time, electrical conductivity and malondialdehyde content in comparison to nonprime seeds. So seed priming with 1 and 2 mM of ascorbic acid in -1.2 MPa level increased vigour index, soluble carbohydrates and proteins, respectively by 167.03, 22.26, 35.77, 187.91, 22.61 and 30.20% compared to nonprimed seeds. Also, it increased activity of catalase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase, respectively by 11.85, 22.81, 12.25, 13.83, 31.33 and 9.93% compared to non-primed seeds. Therefore, the use of 1 and 2 mM ascorbic acid concentrations to reduce the negative effects caused by drought stress is recommended.

Keywords: ascorbate peroxidase, seed vigour, priming, electrical conductivity

* Email: m.vafaei@basu.ac.ir

مقدمه

نقش تعیین کننده وجایگاه خاص گیاهان علوفه‌ای در حفظ حاصلخیزی خاک و جلوگیری از فشار بیش از حد دام بر مراتع کشور سبب افزایش اهمیت مطالعه در جهت بالا بردن عملکرد گیاهان علوفه‌ای شده است (Rouhi *et al.*, 2009). با توجه به کافی نبودن تولید علوفه در کشور جهت رفع نیازهای جاری از یک‌سو و وقوع تنش‌های غیرزنده نظیر خشکی از سوی دیگر، افزایش تولید علوفه از طریق بالا بردن عملکرد در واحد سطح واستفاده از گیاهان علوفه مرتعی مهمترین مساله در رابطه با تولید گیاهان علوفه‌ای است.

علف بره (*Festuca ovina*) گیاهی است پایا، به ارتفاع حدود ۶۰ سانتی‌متر، پشته‌ای، ایستاده که به خانواده گندمیان تعلق دارد. از لحاظ پراکندگی، گسترش بسیار وسیع در مناطق کوهستانی کشور دارد. قابلیت خوشخوراکی این گیاه مرتعی توسط گوسفندان سبب نامگذاری آن بنام علف بره شده است (FitzGerald and Hodkinson, 2017). در این میان بالا بردن کارآیی بذر از طریق استفاده از روش‌های مختلف ارتقا دهنده کارآیی بذر می‌تواند ما را در جهت رسیدن به استقرار بهتر و هدف نهایی که همانا افزایش عملکرد علوفه است یاری کند. از جمله یکی از روش‌های معمول و کارآمد در این زمینه تیمار کردن بذرها پیش از کاشت می‌باشد که به پرایمینگ موسوم است. پرایمینگ بذر روشی است که اجازه جذب آب بصورت کنترل شده به بذر قبل از کشت تا سطحی داده می‌شود که فعالیت‌های اولیه جوانه‌زنی شروع گردد اما از خروج ریشه‌چه جلوگیری می شود، سپس بذر خشک شده و تا زمان کاشت قابلیت نگهداری را دارا می باشند (Varier *et al.*, 2010). پرایمینگ باعث افزایش سرعت جوانه زنی در مزرعه به خصوص در شرایط نا مساعد از جمله کمبود رطوبت می‌شود (Jisha *et al.*, 2013). تحقیقات نشان داده کاربرد ویتامین‌های محلول در آب نظیر اسید آسکوربیک تحت شرایط تنشی نه تنها موجب افزایش در مقدار پروتئین‌های اصلی گیاه می‌شود، بلکه سبب القای پروتئین‌های جدید و ترکیبات حفاظت کننده اسمزی نیز می‌گردد (Mazid *et al.*, 2011; Azooz *et al.*, 2013).

اسید آسکوربیک از مهمترین آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی با وزن مولکولی پایین است که در فرآیندهای رشدی و نموی گیاه نقش بارزی برعهده دارد (Wang *et al.*, 2013). این ترکیب در فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی نظیر تنظیم رشد، تمایز و متابولیسم گیاه تحت شرایط تنش مشارکت دارد (Khan *et al.*, 2011). اسید آسکوربیک قادر است به‌طور مستقیم باعث سمیت‌زدایی سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن منفرد گشته و از طریق واکنش آسکوربات پراکسیداز باعث احیای پراکسید هیدروژن به آب گردد (Azooz *et al.*, 2013). تحقیقات اخیر بیانگر نقش کلیدی اسید آسکوربیک در چرخه آسکوربات گلوتاتیون است که گیاه را در برابر تنش‌های اکسیداتیو نظیر خشکی و شوری محافظت می کند (Mazid *et al.*, 2011; El-besiweny and Sadak, 2015). در این راستا آزوز و همکاران (Azooz *et al.*, 2013) اظهار داشتند پیش‌تیمار بذر باقلا (*Vicia faba*) با اسید آسکوربیک سبب افزایش در محتوای پتاسیم و منیزیم، کاهش در محتوای سدیم و کلر، کاهش در نشت مواد از غشاء و مهمتر از همه تجمع قندهای محلول، پروتئین‌های آزاد و پرولین شد. احمد و همکاران (Ahmad *et al.*, 2012) پیش‌تیمار بذر ذرت با اسید آسکوربیک را عاملی موثر در افزایش تحمل به سرما گزارش کردند. حیدریان و همکاران (Heydarian *et al.*, 2014) نیز بهبود در جوانه‌زنی بذرهای کبر (*Capparis spinosa*) را در نتیجه پیش‌تیمار اسید آسکوربیک تحت تنش خشکی گزارش کردند.این آزمایش به بررسی اثر اسید آسکوربیک در بهبود جوانه‌زنی، بنیه بذر و سایر خصوصیات فیزیولوژیکی-بیوشیمیایی بذرهای علف بره در شرایط تنش خشکی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه تکنولوژی بذر دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا انجام شد. بذر علف بره مورد استفاده در این تحقیق، توده مورد کاشت در عرصه مراتع شهرستان همدان بود و قوه نامیه آن‌ها طبق آزمون جوانه‌زنی استاندارد ۹۲ درصد تعیین شد (ISTA, 2007). آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل پرایمینگ در چهار سطح (عدم پیش‌تیمار ، پیش‌تیمار با آب مقطر و پیش‌تیمار اسید آسکوربیک در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار) و تنش خشکی در چهار سطح (صفر، ۰/۴-، ۰/۸- و ۱/۲- مگاپاسکال) بود. بذرها در غلظت‌های صفر (هیدروپرایمینگ)، ۱ و ۲ میلی‌مولار از اسید آسکوربیک به‌مدت ۱۲ ساعت درون پتری دیش (با قطر ۱۵سانتی‌متر) قرار گرفتند. سپس بذرها از پتری خارج و پس از شستشو باآب مقطر به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک شدند. مقداری از بذرها جهت آزمون هدایت الکتریکی وبقیه برای آزمون جوانه‌زنی استاندارد به روش روی کاغذ (Top of paper) انجام شد و بذرها به‌مدت ۲۱ روز در دمای متناوب ۲۵-۱۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند (ISTA, 2007). اندازه‌گیری هدایت الکتریکی به روش (Hampton and TeKrony, 1995) صورت گرفت. برای این کار از ۵۰ بذر در چهار تکرار برای هر تیمار استفاده گردید. ابتدا وزن خشک بذرها با ترازوی یک‌صدم گرم (Sartorius BA310S) اندازه‌گیری شد. سپس بذرها به ارلن‌های حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل و توسط پلاستیک تیره پوشانده و در ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت ظروف حاوی آب و توده بذر از ژرمیناتور خارج و محلول به آرامی به‌مدت ۳۰ ثانیه همزده شد، دمای محلول زمان اندازه‌گیری هدایت الکتریکی ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. هدایت الکتریکی آب مقطر (شاهد) نیز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین و از مقدار هدایت الکتریکی حاصل از هر تیمار کسر شد. جهت تعیین هدایت الکتریکی از دستگاه هدایت سنج الکتریکی (CyberScan PC 510) استفاده شد و میزان هدایت الکتریکی برحسب وزن بذر مربوط برای هر نمونه با استفاده از رابطه (۱) تعیین گردید:

رابطه (۱)

$$\text{هدایت‌الکتریکی } (\mu S.cm^{-1}g^{-1}) = \frac{\text{بذر محلول هدایت الکتریکی}(\mu S.cm-1) - \text{مقطر آب هدایت الکتریکی}(\mu S.cm-1)}{\text{وزن‌بذر}(g)}$$

از محلول پلی‌اتیلن گلایکول ۶۰۰۰ در غلظت‌های صفر (آب مقطر)، ۰/۴-، ۰/۸- و ۱/۲- مگاپاسکال (MPa) جهت اِعمال تنش خشکی استفاده شد (Michel and Kaufmann, 1973). معیار جوانه‌زنی بذرها خروج ۲ میلی‌متر ریشه‌چه بود. جوانه‌زنی بذرها هر روز شمارش و در پایان آزمایش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه اندازه‌گیری و نمونه‌گیری به منظور تعیین پارامترهای بیوشیمیایی مورد نظر انجام گرفت.

درصد جوانه‌زنی نهایی از رابطه (۲) محاسبه شد (Sepehri and Rouhi, 2016):

$$FGP = \left(\frac{Ni}{N}\right) \times 100 \qquad \text{(رابطه ۲)}$$

Ni: تعداد کل بذرهای جوانه‌زده در روز آخر شمارش؛
N: تعداد کل بذرها

متوسط زمان جوانه‌زنی(MGT) از رابطه (۳) محاسبه شد (Ellis and Roberts, 1981):

$$MGT = \sum Dn/n \qquad \text{(رابطه ۳)}$$

در رابطه فوق، n تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز Dاُم و D تعداد روزهای شمارش از آغاز جوانه‌زنی می باشد.

شاخص بنیه بذر (VI) نیز از رابطه (۴) محاسبه شد (ISTA, 2007):

$$VI = \left(\frac{FGP}{SL}\right) \times 100 \qquad \text{(رابطه ۴)}$$

FGP: درصد جوانه‌زنی نهایی؛ SL: طول گیاهچه

اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول به‌روش آنترون (Irigoyen *et al*., 1992) انجام شد و از گلوکز جهت تهیه استاندارد استفاده شد. پروتئین‌های محلول به روش برادفورد (Bradford, 1976) تعیین و از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد استفاده شد. اندازه‌گیری پراکسیداسیون چربی به‌روش کاوال‌کانتی (Cavalcanti *et al*., 2004) از طریق آزمون تیوباربیتوریک اسید و تعیین محتوای مالون دی‌آلدهید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی صورت گرفت. فعالیت آنزیم کاتالاز (با ضریب خاموشی ۳۹/۴ میلی مول بر سا نتی‌متر) به روش اسپکتروفتومتری و بر اساس میزان مصرف پراکسیدهیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و به‌صورت واحد آنزیم (یک میکرومول پراکسیدهیدروژن تجزیه شده در دقیقه) بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Cakmak and Horst, 1991). فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نیز به روش اسپکتروفتومتری و بر اساس میزان توانایی آنزیم در ممانعت از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم درطول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و به‌صورت واحد آنزیم (یک واحد سوپراکسیددیسموتاز در ممانعت از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم در دقیقه) بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Giannopolitis and Ries, 1977). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (با ضریب خاموشی ۲/۸ میلی مول بر سا نتی‌متر) به روش اسپکتروفتومتری و بر اساس میزان اکسیداسیون آسکوربات درطول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و به‌صورت واحد آنزیم (یک میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه) بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Nakano and Asada, 1981).

جهت نرمال کردن داده‌های درصد جوانه‌زنی از تبدیل آرک‌سینوس (arcsin) استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزارSAS,9.1 صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSD درسطوح احتمال پنج و یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

درصد جوانه‌زنی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی تنش خشکی و پیش‌تیمار به‌همراه اثرمتقابل آن‌ها بر درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۱). در شرایط بدون تنش، بین درصد جوانه‌زنی حاصل از بذرهای پیش‌تیمار شده و بذور پیش‌تیمار نشده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). تنش خشکی درصد جوانه‌زنی بذرهای پیش‌تیمار شده و پیش‌تیمار نشده را کاهش داد اما روند افت درصد جوانه‌زنی بذرهای پیش‌تیمار شده نسبت به بذرهای پیش‌تیمار نشده کمتر بود (جدول ۲). در پتانسیل ۰/۴- مگاپاسکال، بالاترین درصدجوانه‌زنی در پیش‌تیمار با غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک مشاهده شد به طوری که ۵۷ درصد افزایش در جوانه‌زنی را نسبت به بذرهای پیش‌تیمار نشده نشان داد (جدول ۲). این در حالی بود که تفاوت تیمار فوق با غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک، و پیش‌تیمار شده با آب معنی‌دار نبود. در پتانسیل‌های ۰/۸- و۱/۲- مگاپاسکال نیز نتایجی مشابه پتانسیل ۰/۴- مگاپاسکال مشاهده شد (جدول ۲). با توجه به ماهیت آنتی‌اکسیدانی اسید آسکوربیک و نقش حفاظتی آن در برابر تنش‌های اکسیداتیو، بهبود در جوانه‌زنی بذرهای علف بره در نتیجه کاربرد آن امری محتمل است. در این راستا شائو و همکاران (Shao *et al*., 2007) گزارش کردند کاربرد مقادیر خارجی اسید آسکوربیک گیاهان را در برابر تنش‌های محیطی محافظت نموده و اثرات منفی تنش را به حداقل مقدار ممکن می‌رساند. آن‌ها در تشریح ادعای خود بیان داشتند، حفاظت از فرآیندهای متابولیکی سلول در برابر صدمات ناشی از پراکسیدهیدروژن، ممانعت از آسیب به غشای پلاسمایی و در نهایت اثرات هم‌افزایی با سایر آنتی اکسیدان‌ها از جمله وظایف اسید آسکوربیک در گیاهان محسوب می‌شود. حیدریان و همکاران (Heydarian *et al*., 2014) نیز بهبود درصد جوانه‌زنی

بذرهای کبر (*Capparis spinosa*) را در نتیجه کاربرد اسید آسکوربیک تحت تنش خشکی گزارش کردند.

متوسط زمان جوانه‌زنی

نتایج نشان داد که اثرات اصلی و اثرمتقابل خشکی و پیش‌تیمار در سطح احتمال یک درصد معنی دار است (جدول ۱). در شرایط بدون تنش، کمترین متوسط زمان جوانه‌زنی متعلق به بذرهای پیش‌تیمار شده با غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک بود که اختلاف معنی‌داری با غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک نداشت اما اختلاف آن با پیش‌تیمار با آب و بذرهای پیش‌تیمار نشده معنی‌دار بود (جدول ۲). این در حالی بود که اختلاف بین غلظت اول اسید آسکوربیک با پیش‌تیمار توسط آب و بذرهای پیش‌تیمار نشده معنی‌دار نبود. با تشدید تنش خشکی، متوسط زمان جوانه‌زنی نیز افزایش یافت (جدول ۲). در خشکی ۰/۴- مگاپاسکال، کمترین مقدار در پیش‌تیمار با غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها و شاهد داشت (جدول ۲). در این سطح خشکی، بین غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک و پیش‌تیمار با آب تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در پتانسیل ۰/۸- مگاپاسکال، اختلاف معنی‌داری در متوسط زمان جوانه‌زنی حاصل از تیمارهای مختلف ثبت نگردید اما تفاوت آن‌ها با بذرهای پیش‌تیمار نشده معنی‌دار بود (جدول ۲). در خشکی ۱/۲- مگاپاسکال نیز روندی مشابه پتانسیل ۰/۸- مگاپاسکال مشاهده شد (جدول ۲). تحقیقات نشان داده کاربرد ویتامین‌ها و هورمون‌های رشد به‌عنوان پیش‌تیمار قادر به افزایش در سرعت و کارآیی فرآیندهای ترمیمی است (Jisha *et al*., 2013). این مساله وقتی نمود بیشتری پیدا می‌کند که بذر با شرایط تنش‌زا مواجه می‌شود (Heydarian *et al*., 2014) در این رابطه احمد و همکاران (Ahmad *et al*., 2012) اظهار داشتند پیش‌تیمار بذرهای ذرت (*Zea mays*) با اسید آسکوربیک سبب کاهش مدت زمان جوانه‌زنی و افزایش سرعت جوانه‌زنی در شرایط تنش اکسیداتیو شد. کاتا و همکاران (Kata *et al*., 2014) نیز بهبود جوانه‌زنی بذرهای برنج (*Oryza sativa*) را در نتیجه کاربرد اسید آسکوربیک گزارش کرده و اسید آسکوربیک را به‌عنوان کاهنده اثرات منفی تنش اکسیداتیو معرفی کردند.

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس خصوصیات جوانه‌زنی بذور علف بره

Table 1- The ANOVA table of germination characteristics of sheep fescue seeds

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares											
		GP	MGT	PL	RL	VI	EC	Car	Pr	MDA	CAT	SOD	APX
پیش‌تیمار Priming	3	776.17**	10.04**	2.25**	1.73**	7.73**	6.59**	247.93**	9.59**	143.79**	0.001**	29.29**	0.001**
تنش Stress	3	3655.06**	23.56**	21.75**	18.33**	108.92**	240.41**	288.11**	8.84**	2599.08**	0.005**	51.86**	0.004**
پیش‌تیمار * تنش Priming*Stress	9	84.92**	0.48**	0.10**	0.09**	0.42**	1.58**	15.65 **	0.178*	13.33**	0.00005**	5.59**	0.001*
خطا Error	32	15.18	0.152	0.024	0.016	0.114	0.109	2.99	0.073	0.852	0.00001	1.27	0.00004
ضریب تغییرات CV(%)	-	5.91	5.37	8.97	5.79	8.27	1.29	2.45	3.12	2.11	1.59	4.67	2.32

ns، **، * به ترتیب ، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، یک درصد و بدون اختلاف معنی‌دار

درصد جوانه‌زنی، GP; متوسط زمان جوانه‌زنی، MGT; طول ساقه‌چه،PL; طول ریشه‌چه، RL; شاخص بنیه ،VI; هدایت الکتریکی، EC; قندهای محلول، Car; پروتئین‌های محلول، Pr; مالون دی‌آلدهیدMDA; کاتالاز، CAT; سوپراکسیددیسموتاز، SOD; آسکوربات پراکسیداز، APX

ns,**,* Respectively non-significant and significant of 1 and 5 percent of probability

S.O.V: Source of Variation, df: degree of freedom, CV: Coefficient of Variation, GP: Germination Percentage, MGT: Mean Germination Time, PL: Plumule Length, RL: Radicle Length, VI: Vigor Index, EC: Electrical conductivity, Car: Carbohydrate content, Pr: Protein content, MDA: Malondialdehyde content, CAT: Catalase, SOD: Superoxide dismutase, APX: Ascorbate peroxidase

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار اسید آسکوربیک بر خصوصیات جوانه‌زنی بذور علف بره تحت شرایط تنش خشکی

Table 2- Mean comparison of ascorbic acid priming effect on germination characteristics of sheep fescue seed under drought stress conditions

تیمارها Treatments	تنش خشکی Drought Stress (MPa)	درصد جوانه‌زنی Germination Percentage	متوسط زمان جوانه‌زنی Mean Germination Time (day)	طول ساقه‌چه Plumule Length (cm)	طول ریشه‌چه Radicle Length (cm)	شاخص بنیه Vigor Index	هدایت الکتریکی Electrical conductivity ($\mu S.cm^{-1}g^{-1}$)
	0	89.79 a	4.89 fg	5.38 ab	4.01 b	8.43 b	19.15 h
اسید آسکوربیک ۱ میلی‌مولار Ascorbic acid (1mM)	-0.4	68.55 bc	7.03 d	3.37 c	2.16 cd	3.79 cd	26.20 f
	-0.8	61.31 cde	7.49 cd	2.96 d	1.85 e	2.95 fgh	28.16 c
	-1.2	55.20 efg	8.32 bc	2.70 de	1.70 ef	2.43 gh	29.15 ab
	0	92.05 a	4.19 g	5.72 a	4.39 a	9.30 a	19.13 h
اسید آسکوربیک ۲ میلی‌مولار Ascorbic acid (2mM)	-0.4	74.02 b	6.09 e	3.44 c	2.28 c	4.24 d	24.23 g
	-0.8	65.72 bcd	7.51 cd	3.00 d	1.88 de	3.20 def	27.29 de
	-1.2	58.25 def	7.79 bcd	2.79 de	1.70 ef	2.62 fgh	28.32 c
	0	90.33 a	5.18 f	5.15 b	4.01 b	8.27 b	19.19 h
پیش‌تیمار با آب مقطر Hydropriming	-0.4	69.33 bc	7.24 d	3.00 d	1.93 de	3.42 de	27.15 e
	-0.8	61.75 cde	7.77 bcd	2.77 de	1.71 ef	2.76 efg	28.01 cd
	-1.2	51.33 fg	8.45 b	2.44 ef	1.46 fg	2.00 hi	28.72 bc
	0	90.22 a	5.44 ef	5.13 b	3.88 b	8.12 c	19.16 h
شاهد nonprimed	-0.4	47.20 gh	8.60 b	2.21 fg	1.17 gh	1.59 ij	28.18 c
	-0.8	41.66 hi	9.72 a	1.97 gh	1.01 hi	1.23 j	29.21 ab
	-1.2	37.65 i	10.42 a	1.71 h	0.74 i	0.91 j	29.66 a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد در آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار ندارند

In each column means followed by the same letter are not significantly different at the $P < 0.01$ level of Least Significant Difference

طول ساقه‌چه

اثر اصلی تنش خشکی و پیش‌تیمار و برهم‌کنش آن‌ها بر طول ساقه‌چه در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). در شرایط بدون تنش، طویل‌ترین ساقه‌چه را پیش‌تیمار با غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک به خود اختصاص داد که اختلاف معنی‌داری با غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک نداشت اما تفاوت آن با پیش‌تیمار توسط آب و بذرهای پیش‌تیمار نشده معنی‌دار بود (جدول ۲). کمترین طول ساقه‌چه در این شرایط مربوط به بذرهای پیش‌تیمار نشده بود و با پیش‌تیمار توسط آب تفاوت معنی‌داری به لحاظ آماری نداشت (جدول ۲). در پتانسیل ۰/۴- مگاپاسکال، بیشترین طول ساقه‌چه در غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک نداشت اما طول

ساقه‌چه را در مقایسه با بذرهای پیش‌تیمار نشده ۵۵ درصد افزایش داد (جدول ۲). نتایج بدست آمده در خشکی ۰/۸- مگاپاسکال نیز مشابه پتانسیل ۰/۴- مگاپاسکال بود (جدول ۲). در پتانسیل ۱/۲- مگاپاسکال، اختلاف معنی‌داری در طول ساقه‌چه حاصل از تیمارهای مورد استفاده مشاهده نشد اما تفاوت آن‌ها با بذرهای پیش‌تیمار نشده معنی‌دار بود (جدول ۲). مطالعات نشان داده اسید آسکوربیک نقش‌های متعددی را در تقسیم سلولی و توسعه دیواره سلول بر عهده دارد (Behairy *et al*., 2012). مشخص شده کاربرد مقادیر خارجی اسید آسکوربیک موجب تحریک سلول‌های مرکز استراحت جهت ورود مجدد به چرخه سلولی و کاهش مدت زمان مرحله G1 می‌گردد. G1 مرحله رشد و آماده شدن سلول برای همانند سازی DNA است و از سایر مراحل چرخه سلولی طولانی‌تر است، بنابراین کاربرد اسید آسکوربیک سبب کوتاه شدن چرخه سلولی و تسریع در تقسیم سلول‌ها می‌شود (Mazid *et al*., 2011; Xu *et al*., 2015). در این راستا احمد و همکاران (Ahmad *et al*., 2012) بهبود در طول ساقه‌چه و افزایش در وزن خشک آن را در نتیجه پیش‌تیمار بذرهای ذرت با اسید آسکوربیک گزارش کردند. حیدریان و همکاران (Heydarian *et al*., 2014) نیز افزایش در طول ساقه‌چه بذرهای پیش‌تیمار شده کبر با اسید آسکوربیک را تحت تنش خشکی گزارش نمودند.

طول ریشه‌چه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد اثر اصلی خشکی و پیش‌تیمار و اثر متقابل تیمارها در سطح یک درصد بر طول ریشه‌چه معنی‌دار است (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها در شرایط بدون تنش نشان داد که پیش‌تیمار بذر با غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک سبب بهبود طول ریشه‌چه به میزان ۱۳ درصد در مقایسه با عدم پیش‌تیمار گردید (جدول ۲). این در حالی بود که اختلاف معنی‌داری بین غلظت اول اسید آسکوربیک، پیش‌تیمار با آب و شاهد مشاهده نشد. با افزایش شدت تنش، طول ریشه‌چه در بذرهای پیش‌تیمار شده و پیش‌تیمار نشده کاهش یافت (جدول ۲). در پتانسیل ۰/۴- مگاپاسکال، بین سطوح اسید آسکوربیک از یک‌سو و بین سطح اول اسید آسکوربیک و پیش‌تیمار با آب از سوی دیگر تفاوت معنی‌داری ثبت نشد اما هرسه تیمار فوق اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند (جدول ۲). در پتانسیل ۰/۸- مگاپاسکال، اگرچه پیش‌تیمار بذر باعث افزایش معنی‌دار طول ریشه‌چه نسبت به عدم پیش‌تیمار شد اما اختلاف تیمارها با یکدیگر معنی‌دار نبود (جدول ۲). در خشکی ۱/۲- مگاپاسکال نیز روندی مشابه پتانسیل ۰/۸- مگاپاسکال مشاهده شد (جدول ۲). با توجه به نقش اسید آسکوربیک در چرخه سلولی، تقسیم و طویل شدن سلول‌ها، افزایش طول ریشه‌چه در بذرهای پیش‌تیمار شده با این ترکیب دور از انتظار نبود. در این رابطه زو و همکاران (Xu *et al*., 2015). افزایش در طول ریشه‌چه فستوکای بلند (*Festuca arundinacea*) را در نتیجه کاربرد اسید آسکوربیک گزارش کردند. این محققین اظهار داشتند کاربرد مقادیر خارجی اسید آسکوربیک سبب تسریع در شروع تقسیمات سلولی در آغازین‌های ریشه شده و این مساله با کاهش در سطوح mRNAهای آسکوربات اکسیداز همراه است. حیدریان و همکاران (Heydarian *et al*., 2014) پیش‌تیمار اسید آسکوربیک را موجب تحریک در رشد ریشه‌چه کبر تحت تنش خشکی دانستند. احمد و همکاران (Ahmad *et al*., 2012) نیز افزایش در وزن خشک ریشه‌چه حاصل از بذرهای پیش‌تیمار شده ذرت با اسید آسکوربیک را گزارش کردند. آن‌ها همچنین گزارش کردند بین غلظت‌های مورد استفاده اسید آسکوربیک در وزن خشک ریشه‌چه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

شاخص بنیه بذر

نتایج حاصل از تجزیه واریانس، معنی‌دار بودن اثرات اصلی و برهم‌کنش پیش‌تیمار و تنش را در سطح یک درصد برای شاخص بنیه نشان داد (جدول ۱). در شرایط

عدم تنش، پیش‌تیمار با غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک شاخص بنیه را نسبت به سایر تیمارها و بذرهای پیش‌تیمار نشده افزایش داد (جدول ۲). این در حالی بود که اختلاف معنی‌داری بین غلظت اول اسید آسکوربیک با پیش‌تیمار توسط آب مشاهده نشد اما تفاوت آن‌ها با بذرهای پیش‌تیمار نشده معنی‌دار بود. در خشکی ۰/۴- مگاپاسکال، بین تیمارهای مختلف از نظر شاخص بنیه تفاوت معنی‌داری ثبت نشد اما اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند (جدول ۲). در خشکی‌های ۰/۸- و ۱/۲- مگاپاسکال نیز نتایجی مشابه پتانسیل ۰/۴- مگاپاسکال حاصل شد (جدول ۲). با توجه به اثر منفی تنش خشکی بر درصد جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، کاهش در شاخص طولی بنیه امری اجتناب ناپذیر است. پیش‌تیمار بذر با تاثیر بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بهبود درصد جوانه‌زنی، طول گیاهچه، امکان بهبود شاخص طولی بنیه را تحت تنش‌های اکسیداتیو فراهم می‌کند (Lopez *et al*., 2016). در این رابطه بهایری و همکاران (Behairy *et al*., 2012) بهبود در شاخص طولی بنیه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) را در نتیجه پیش‌تیمار با اسید آسکوربیک تحت شرایط تنشی گزارش کردند. این محققین کاهش در شاخص طولی بنیه در بذرهای پیش‌تیمار نشده‌ای که در معرض تنش قرار داشتند را گزارش نمودند. حیدریان و همکاران (Heydarian *et al*., 2014) نیز پیش‌تیمار بذرهای کبر با اسید آسکوربیک را موجب افزایش شاخص بنیه در مقایسه با بذرهای پیش‌تیمار نشده تحت تنش خشکی ذکر کردند. احمد و همکاران (Ahmad *et al*., 2012) اظهار داشتند پیش‌تیمار اسید آسکوربیک به‌میزان ۲۰ میلی‌گرم در لیتر روی بذرهای ذرت سبب بهبود شاخص بنیه بذر تحت شرایط تنش گردید.

هدایت الکتریکی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس، معنی‌دار بودن اثرات اصلی و اثر متقابل را در سطح یک درصد برای هدایت الکتریکی نشان داد (جدول ۱). در شرایط عدم تنش، بین میزان هدایت الکتریکی حاصل از بذرهای پیش‌تیمار شده و پیش‌تیمار نشده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). با افزایش شدت تنش، هدایت الکتریکی نیز افزایش یافت. در هر سه سطح خشکی، پیش‌تیمار بذرها به‌ویژه با غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک، اثر منفی خشکی را تا اندازه بیشتری نسبت به سایر تیمارها خنثی نمود (جدول ۲). بیشترین مقادیر هدایت الکتریکی در تمام سطوح خشکی نیز متعلق به بذرهای پیش‌تیمار نشده بود (جدول ۳). مطالعات نشان داده اسید آسکوربیک به چند روش قادر به خنثی‌سازی خسارات رادیکال‌های آزاد و ممانعت از آسیب به غشاء پلاسمایی است (Xu *et al*., 2015). یکی از روش‌ها تنظیم تولید آنتی اکسیدان چربی‌دوست آلفاتوکوفرول است. روش دیگر از طریق فعال‌سازی مسیرهای بیوسنتزی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌باشد و روش سوم مداخله مستقیم به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و سمیت زدایی سلول از وجود رادیکال‌های آزاد است (Mazid *et al*., 2011). در این راستا زو و همکاران (Xu *et al*., 2015) اظهار داشتند کاربرد اسید آسکوربیک موجب کاهش صدمات به غشای سلولی فستوکای بلند شد که علائم آن با کاهش در سطوح رادیکال سوپراکسید آنیون، پراکسیدهیدروژن و مالون دی‌آلدهید همراه بود. این محققین نقش مستقیم اسید آسکوربیک در کنترل رادیکال‌های آزاد و بهبود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان آنزیمی در گیاهان تیمارشده را علت حفظ ساختار غشاء تحت تنش خشکی دانستند. آزوز و همکاران (Azooz *et al*., 2013) نیز اظهار داشتند پیش‌تیمار بذرهای باقلا با اسید آسکوربیک سبب کاهش در نشت مواد از غشاء و حفظ انسجام آن شد.

کربوهیدرات‌های محلول

با توجه به معنی‌دار شدن اثرات اصلی و اثر متقابل تنش و پیش‌تیمار (جدول ۱)، نتایج نشان داد که در شرایط بدون تنش، کمترین مقدار کربوهیدرات‌های محلول در بذرهای

پیش‌تیمار نشده و بیشترین آن در بذرهای پیش‌تیمار شده بدست آمد (جدول ۳). در این میان پیش‌تیمار اسید آسکوربیک با غلظت ۲ میلی‌مولار مقادیر بیشتری را نسبت به پیش‌تیمار با آب و بذرهای پیش‌تیمار نشده از خود نشان داد اما اختلاف معنی‌داری با غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک نداشت. در این شرایط، پیش‌تیمار با آب از یک‌سو با سطح اول با اسید آسکوربیک و از سوی دیگر با بذرهای پیش‌تیمار نشده تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳). با تشدید تنش خشکی، میزان کربوهیدرات‌های محلول در بذرهای پیش‌تیمار شده و پیش‌تیمار نشده افزایش یافت (جدول ۳). در تمام سطوح خشکی، بین مقادیر حاصل از تیمارهای مورد استفاده با یکدیگر اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری مشاهده نشد اما تفاوت آن‌ها با بذرهای پیش‌تیمار نشده معنی‌دار بود (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار اسید آسکوربیک بر خصوصیات بیوشیمیایی بذور علف بره تحت شرایط تنش خشکی

Table 3- Mean comparison of ascorbic acid priming effect on biochemical characteristics of sheep fescue seeds under drought stress conditions

تیمارها Treatments	تنش خشکی Drought Stress (MPa)	صفات Traits: قندهای محلول Soluble carbohydrates (mg.[gdw]$^{-1}$)	پروتئین‌های محلول Soluble proteins (mg.[gfw]$^{-1}$)	مالون دی‌آلدهید Malondialdehyde (nmol.[gfw]$^{-1}$)	فعالیت کاتالاز Catalase activity (Units[mgpr]$^{-1}$)	فعالیت سوپراکسید دیسموتاز Superoxide dismutase activity (Units[mgpr]$^{-1}$)	فعالیت آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase Activity (Units[mgpr]$^{-1}$)
اسید آسکوربیک ۱ میلی‌مولار Ascorbic acid (1mM)	0	66.94 d-g	9.84 bc	22.03 h	0.229 fg	21.55 f	0.273 i
	-0.4	68.69 cde	9.68 bc	42.81 g	0.251 c	24.76 cde	0.304 ef
	-0.8	74.77 b	8.76 d	48.98 e	0.268 b	26.17 bc	0.319 cd
	-1.2	80.71 a	8.54 def	51.52 d	0.283 a	27.55 ab	0.339 a
اسید آسکوربیک ۲ میلی‌مولار Ascorbic acid (2mM)	0	69.71 cde	10.43 a	21.95 h	0.233 ef	21.61 f	0.278 hi
	-0.4	70.63 cd	9.96 b	41.64 g	0.257 c	25.03 bcd	0.310 de
	-0.8	74.93 b	8.62 de	48.09 ef	0.271 b	26.72 bc	0.324 bc
	-1.2	80.94 a	8.19 efg	51.74 d	0.288 a	29.59 a	0.332 ab
پیش‌تیمار با آب مقطر Hydropriming	0	64.46 fgh	9.84 bc	22.53 h	0.224 gh	21.39 f	0.274 i
	-0.4	68.16 c-f	9.47 c	46.27 f	0.239 de	22.14 f	0.297 fg
	-0.8	72.00 bc	8.46 def	52.54 cd	0.252 c	25.08 bc	0.303 ef
	-1.2	79.78 a	7.71 hi	54.49 cd	0.272 b	26.07 bc	0.313 cde
شاهد nonprimed	0	61.65 h	8.09 gh	22.75 h	0.219 h	21.82 f	0.272 i
	-0.4	63.59 gh	7.80 gh	51.90 d	0.231 efg	22.15 f	0.289 gh
	-0.8	64.27 gh	7.30 i	57.51 b	0.242 d	22.26 ef	0.298 fg
	-1.2	66.01 efg	6.29 j	61.48 a	0.253 c	22.53 def	0.302 ef

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد در آزمون حداقا اختلاف معنی‌دار ندارند.

In each column means followed by the same letter are not significantly different at the $P < 0.01$ level of Least Significant Difference.

حافظ و قریب (Hafez and Gharib, 2016) نیز افزایش در میزان کربوهیدرات‌های محلول گندم (*Triticum aestivum*) را در نتیجه کاربرد اسید آسکوربیک تحت تنش خشکی گزارش کردند. همچنین آزوز و همکاران (Azooz *et al*., 2013) بیان داشتند پیش‌تیمار بذرهای باقلا با اسید آسکوربیک موجب افزایش در کربوهیدرات‌های محلول شد.

پروتئین‌های محلول

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، اثرات اصلی خشکی و پیش‌تیمار بر پروتئین‌های محلول در سطح یک درصد و اثر متقابل آن‌ها در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در شرایط عدم تنش، پیش‌تیمار با غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک بیشترین میزان پروتئین‌های محلول را به خود اختصاص داد و تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها و شاهد داشت اما اختلاف آن با غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک معنی‌دار نبود (جدول ۳). بین مقادیر حاصل از غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک و پیش‌تیمار با آب تفاوت معنی‌داری ثبت نشد. با افزایش شدت تنش مقدار پروتئین‌های محلول کاهش یافت و کمترین میزان را بذرهای پیش‌تیمار نشده نشان دادند (جدول ۳). در خشکی ۰/۴- مگاپاسکال، بین غلظت‌های اسید آسکوربیک از یک‌سو و بین غلظت اول اسید آسکوربیک و پیش‌تیمار با آب از سوی دیگر تفاوت معنی‌داری ثبت نشد اما سه تیمار فوق اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند (جدول ۳). در پتانسیل ۰/۸- مگاپاسکال، اگرچه پیش‌تیمار بذر باعث افزایش معنی‌دار پروتئین‌های محلول نسبت به شاهد شد اما اختلاف تیمارها با یکدیگر معنی‌دار نبود (جدول ۳). در خشکی ۱/۲- مگاپاسکال نیز نتایجی مشابه پتانسیل ۰/۴- مگاپاسکال مشاهده شد (جدول ۳). تحقیقات نشان داده اسید آسکوربیک تنظیم پاسخ به تنش‌های غیر زنده را از طریق کمپلکس‌های پیچیده و واکنش‌های شیمیایی برعهده دارد. به‌عنوان مثال، فعال‌سازی واکنش‌های آنزیمی، القای سنتز پروتئین‌های تنشی و تولید پرولین و برخی ترکیبات شیمیایی دفاعی از آن جمله است (Mazid *et al*., 2011). این ترکیب همچنین به‌عنوان یک کوفاکتور در بیوسنتز هورمون‌های جیبرلین، اسید آبسیزیک، اسید سالیسیلیک و اتیلن دخالت داشته و از این طریق موجب افزایش تحمل به تنش‌ها می‌شود (Mazid *et al*., 2011). در این رابطه حافظ و قریب (Hafez and Gharib, 2016) افزایش در پروتئین‌های محلول گندم را در نتیجه کاربرد اسید آسکوربیک تحت تنش خشکی گزارش کردند. زو و همکاران (Xu *et al*., 2015) افزایش در پروتئین‌های مسئول در شل کردن دیواره سلولی (cell wall loosening) و پروتئین‌های مسئول در تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در نتیجه کاربرد اسید آسکوربیک در فستوکای بلند تحت تنش خشکی گزارش کردند.

محتوای مالون دی آلدهید

اثر اصلی تنش خشکی و پیش‌تیمار و اثرمتقابل آن‌ها بر محتوای مالون دی‌آلدهید در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). در شرایط عدم تنش، بین محتوای مالون دی‌آلدهید حاصل از بذرهای پیش‌تیمار شده و پیش‌تیمار نشده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). با افزایش شدت تنش محتوای این ترکیب افزایش یافت. در خشکی ۰/۴- مگاپاسکال، کمترین میزان مالون دی‌آلدهید به ترتیب در غلظت‌های ۲ و ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک و سپس پیش‌تیمار با آب بدست آمد (جدول ۳). این در حالی بود که اختلاف بین سطوح اسید آسکوربیک معنی‌دار نبود. در پتانسیل‌های ۰/۸- و ۱/۲- مگاپاسکال روندی مشابه پتانسیل ۰/۴- مگاپاسکال مشاهده شد (جدول ۳). با توجه به استراتژی‌های کاهنده اثر رادیکال‌های آزاد توسط اسید آسکوربیک تحت تنش‌های غیرزنده، کاهش در محتوای مالون دی‌آلدهید در نتیجه کاربرد این ترکیب قابل پیش‌بینی بود. در این راستا زو و همکاران (Xu *et al*., 2015) اظهار داشتند کاربرد اسید

آسکوربیک موجب کاهش صدمات به غشای سلولی فستوکای بلند از طریق کاهش در سطوح رادیکال‌های آزاد و محتوای مالون دی‌آلدهید شد. این محققین نقش مستقیم اسید آسکوربیک در کنترل رادیکال‌های آزاد و بهبود در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان آنزیمی در گیاهان تیمارشده را علت افزایش تحمل به خشکی عنوان کردند. خان و همکاران (Khan *et al*., 2011) کاهش در پراکسیداسیون چربی‌ها را درنتیجه پیش‌تیمار با اسید آسکوربیک گزارش و اذعان نمودند ارتقاء سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در بذور پیش‌تیمار شده سبب کاهش محتوای مالون دی‌آلدهید و افزایش تحمل به تنش اکسیداتیو می‌گردد. البسیونی و ساداک (El-besiweny and Sadak, 2015) نیز کاهش در پراکسیداسیون چربی ناشی از تنش شوری را در نتیجه کاربرد اسیدآسکوربیک روی کتان (*Linum Usitatissimum*) گزارش کردند.

کاتالاز

با توجه به معنی‌دار شدن اثرات اصلی و اثر متقابل تنش و پیش‌تیمار (جدول ۱)، مقایسه میانگین داده‌های آنزیم کاتالاز نشان داد که در شرایط بدون تنش، فعالیت این آنزیم در هر دو غلظت اسید آسکوربیک بیشتر از عدم پیش‌تیمار بود. همچنین بین غلظت اول اسید آسکوربیک و پیش‌تیمار با آب تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در این شرایط، اختلاف معنی‌داری بین پیش‌تیمار با آب و بذرهای پیش‌تیمار نشده وجود نداشت (جدول ۳). در خشکی ۰/۴- مگاپاسکال کمترین فعالیت کاتالاز به بذرهای پیش‌تیمار نشده اختصاص داشت که تفاوت معنی‌داری را با پیش‌تیمار توسط آب نشان نداد (جدول ۳). این در حالی بود که بین سطوح اسید آسکوربیک اختلاف معنی‌داری ثبت نشد اما تفاوت آن‌ها با پیش‌تیمار توسط آب و شاهد معنی‌دار بود. در پتاسیل ۰/۸- مگاپاسکال نیز نتایج مشابه خشکی ۰/۴- مگاپاسکال بود با این تفاوت که اختلاف بین پیش‌تیمار با آب و شاهد معنی‌دار بود (جدول ۳). در خشکی ۱/۲- مگاپاسکال نیز روندی مشابه پتانسیل ۰/۸- مگاپاسکال مشاهده شد (جدول ۳). بهبود در فعالیت کاتالاز در نتیجه پیش‌تیمار با اسید آسکوربیک در ذرت (Ahmad *et al*., 2012) و گندم (Afzal *et al*., 2006) تحت تنش‌های غیرزنده گزارش شده است. حافظ و قریب (Hafez and Gharib, 2016) نیز افزایش تحمل به خشکی گندم در نتیجه کاربرد اسید آسکوربیک را به افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز نسبت دادند. البسیونی و ساداک (El-besiweny and Sadak, 2015) بهبود در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و کاهش در پراکسیداسیون چربی را در کتان در نتیجه کاربرد اسید آسکوربیک گزارش کردند. مزید و همکاران (Mazid *et al*., 2011) اظهار داشتند اسید آسکوربیک با تاثیر مثبتی که بر مسیرهای بیوسنتزی هورمون‌های رشد می‌گذارد قادر به افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تنش اکسیداتیو است. زو و همکاران (Xu *et al*., 2015) افزایش در سطوح رونویسی آنزیم کاتالاز را در نتیجه کاربرد اسید آسکوربیک تحت تنش خشکی گزارش کردند.

سوپراکسیددیسموتاز

براساس نتایج آزمایش، اثرات اصلی و برهم‌کنش پیش‌تیمار و خشکی در سطح احتمال یک درصد بر فعالیت این آنزیم معنی‌دار بود (جدول ۱). در شرایط عدم تنش، بین تیمارهای مختلف و شاهد در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). در خشکی ۰/۴- مگاپاسکال، بیشترین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک مشاهده شد که تفاوتی با غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک نداشت اما اختلاف معنی‌داری با پیش‌تیمار توسط آب و شاهد نشان داد (جدول ۳). در این سطح خشکی، بین پیش‌تیمار با آب و بذرهای پیش‌تیمار نشده تفاوت معنی‌داری ثبت نگردید. در پتانسیل ۰/۸- مگاپاسکال، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها به لحاظ

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مشاهده نشد. این در حالی بود که تفاوت بذرهای پیش‌تیمار شده با بذرهای پیش‌تیمار نشده معنی‌دار بود (جدول ۳). در تنش ۱/۲- مگاپاسکال، اگرچه بالاترین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در غلظت ۲ میلی‌مولار اسید آسکوربیک مشاهده شد اما تفاوت آن با غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک معنی‌دار نبود (جدول ۳). در این سطح از تنش، بین غلظت ۱ میلی‌مولار اسید آسکوربیک و پیش‌تیمار با آب اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). مزید و همکاران (Mazid *et al*., 2011) بیان داشتند کاربرد مقادیر خارجی اسید آسکوربیک از یک‌سو سبب بهبود در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز شده و از سوی دیگر موجب افزایش در محتوای کاروتنوئیدها، توکوفرول و گلوتاتیون گشته و منجر به افزایش تحمل به تنش‌ها می‌گردد. در این راستا حمید و همکاران (Hameed *et al*., 2015) گزارش کردند کاربرد اسید آسکوربیک تحت تنش شوری توانست میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را درگیاه *Limonium stocksii* نسبت به شاهد افزایش دهد. زو و همکاران (Xu *et al*., 2015) اظهار داشتند کاربرد مقادیر خارجی اسید آسکوربیک سبب افزایش تحمل به خشکی در فستوکای بلند شد. این محققین افزایش تحمل به خشکی را ناشی از افزایش در سطوح رونویسی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به‌همراه نقش آنتی‌اکسیدانی اسید آسکوربیک عنوان کردند.

آسکوربات پراکسیداز

اثر اصلی تنش خشکی و پیش‌تیمار بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز در سطح یک درصد و اثرمتقابل آن‌ها در سطح پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). در خشکی صفر، اختلاف معنی‌داری بین بذرهای پیش‌تیمار شده و پیش‌تیمار نشده در فعالیت آسکوربات پراکسیداز مشاهده نشد (جدول ۳). در پتانسیل ۰/۴- مگاپاسکال، بیشترین فعالیت آسکوربات پراکسیداز در سطح دوم اسید آسکوربیک مشاهده شد که تفاوتی با سطح اول اسید آسکوربیک نداشت اما اختلاف معنی‌داری با پیش‌تیمار توسط آب و شاهد نشان داد (جدول ۳). در این پتانسیل، بین غلظت اول اسید آسکوربیک و پیش‌تیمار با آب از یک‌سو و بین پیش‌تیمار با آب و بذرهای پیش‌تیمار نشده از سوی دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). بررسی داده‌ها در در خشکی ۰/۸- مگاپاسکال نشان داد، اختلاف معنی‌داری بین سطوح اول و دوم اسید آسکوربیک از یک طرف و بین پیش‌تیمار با آب و بذرهای پیش‌تیمار نشده از طرف دیگر وجود ندارد (جدول ۳). در پتانسیل ۱/۲- مگاپاسکال خشکی نیز روندی مشابه پتانسیل ۰/۸- مگاپاسکال مشاهده شد (جدول ۳). زو و همکاران (Xu *et al*., 2015) دریافتند اسید آسکوربیک نه تنها در نقش یک احیاکننده قوی در سطوح سلولی قادر به حذف گونه‌های فعالی نظیر پراکسید هیدروژن است بلکه به‌عنوان سوبسترای کاتالیزکننده واکنش آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز عمل می‌کند و با این‌کار صدمات ناشی از تنش خشکی را به حداقل مقدار ممکن می‌رساند. افزایش در فعالیت آسکوربات پراکسیداز در نتیجه کاربرد اسید آسکوربیک در باقلا (Yunis *et al*., 2010) و ذرت (Ahmad *et al*., 2012) نیز گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این آزمایش نشان داد تنش خشکی اثرات منفی بر شاخص‌های جوانه‌زنی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بذر علف بره داشته و با افزایش شدت تنش، درصد و سرعت جوانه‌زنی، بنیه بذر، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه، کربوهیدرات‌های محلول، پروتئین‌های محلول، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز کاهش و متوسط زمان جوانه‌زنی، هدایت الکتریکی و مالون دی‌آلدهید افزایش یافت. اماکاهش طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و به تبع آن بنیه بذر و

افزایش در هدایت الکتریکی، کربوهیدرات‌های محلول و مالون دی‌آلدهید بیش از سایر صفات مورد بررسی تحت تاثیر تنش خشکی قرار گرفتند. به‌عبارت دیگر تنش خشکی روی پارامترهای رشدی و فیزیولوژیکی گیاهچه تأثیر گذاشته و سبب تولید گیاهچه‌های ضعیف‌تری شد، این مساله در سطوح بالای خشکی بیشتر مشاهده شد. از سوی دیگر در مطالعه حاضر افزایش تولید مالون دی‌آلدهید در بذرهای قرار گرفته در خشکی نشان از بروز تنش اکسیداتیو و به تبع آن پراکسیداسیون چربی‌ها داشته که با پیش‌تیمار اسید آسکوربیک به ویژه در غلظت ۲ میلی‌مولار از شدت آن کاسته شد. پراکسیداسیون چربی‌ها عامل اصلی تخریب تدریجی سلول بوده که به‌دنبال آن حمله رادیکال‌های آزاد به مولکول‌ها و ساختارهای مهم سلولی رخ می‌دهد. رادیکال‌های آزاد به شکل مستقیم و غیرمستقیم سبب بروز آسیب‌های میتوکندریایی، غیرفعال شدن آنزیم‌های موثر در جوانه‌زنی، اختلالات غشایی و خسارات ژنتیکی می‌شوند. مقایسه پیش‌تیمار با آب و غلظت‌های مورد استفاده اسید آسکوربیک تحت تنش خشکی در اغلب صفات مورد بررسی نشان داد بین غلظت‌های مختلف آن تفاوت معنی‌دار نبوده اما اثر مطلوبتری نسبت به پیش‌تیمار با آب در خصوص بهبود پارامترهای مورد بررسی بذرهای علف بره داشته است. بنابراین استفاده از اسید آسکوربیک در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار جهت کاهش اثرات سوء ناشی از تنش خشکی بر جوانه‌زنی قابل توصیه بوده اما در شرایط بدون تنش تفاوت چندانی در استفاده از اسید آسکوربیک و پیش‌تیمار با آب وجود ندارد.

منابع

Reference

Afzal, I., S.M.A. Basra, M. Faooq, and A. Nawaz. 2006. Alleviationof salinity stress in spring wheat by hormonal priming withABA, salicylic acid and ascorbic acid. Int. J. Agric. Biol. 8: 23-28.

Ahmad, I., T. Khaliq, A. Ahmad, S.M.A. Basra, Z. Hasnain, and A. Ali. 2012. Effect of seed priming with ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide on emergence, vigor and antioxidant activities of maize. Afr. J. Biotechnol. 11(5): 1127-1132.

Azooz, M.M., A.M. Alzahrani, and M.M. Youssef. 2013. The potential role of seed priming with ascorbic acid and nicotinamide and their interactions to enhance salt tolerance in broad bean (*Vicia faba L.*). Aust. J. Crop Sci. 7: 2091-2100.

Behairy, R.T., M. El-Danasoury, and L. Craker. 2012. Impact of ascorbic acid on seed germination, seedling growth, and enzyme activity of salt-stressed Fenugreek. J. Medic. Active Plants. 1(3): 106-113.

Bradford, M.M. 1976. A dye binding assay for protein. Analyt Biochem.72: 248-254.

Cakmak, I., and W. Horst. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glycine max*). Plant Physiol. 83: 463–468.

Cavalcanti, F.R., J.T.A. Oliveira, A.S. Martins-Miranda, R.A. Viégas, and J.A.G. Silveira. 2004. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpeas leaves. New Phytol. 163: 563–571.

El-Bassiouny, H.M.S, and M.S. Sadak. 2015. Impact of foliar application of ascorbic acid and alpha-tocopherol on antioxidant activity and some biochemical aspects of flax cultivars under salinity stress. Acta Biol. Colomb. 20: 209-222.

Ellis, R.A., and E.H. Roberts, 1981. The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. Seed Sci. Technol. 9: 373–409.

FitzGerald, A., and T. R. Hodkinson. 2017. The diploid Festuca ovina subsp. ovina (Poaceae) confirmed cytologically for Ireland, New J. Bot. 7: 182-183.

Giannopolitis, C., and S. Ries. 1977. Superoxid desmutase. I: Occurence in higher plant, Plant Physiol. 59: 309–314.

Hafez, E.M., and H.S. Gharib. 2016. Effect of exogenous application of ascorbic acid on physiological and biochemical characteristics of wheat under water stress. Int. J. Plant Prod. 10: 579-596.

Hameed, A., S. Gulzar, I. Aziz, T. Hussain, B. Gu, and M. Ajmal Khan. 2015. Effects of salinity and ascorbic acid on growth, water status and antioxidant system in a perennial halophyte. AoB Plants. 7: 1-11.

Hampton, J.G., and D.M. TeKrony. 1995. Handbook of Vigour Test Methods. The international Seed Testing Association, Zurikh.

Heydariyan, M., N. Basirani, M. Sharifi-Rad, I. Khmmari, and S. Rafat Poor. 2014. Effect of seed priming on germination and seedling growth of the caper (*Capparis spinosa*) under drought stress. Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res. 2 (8): 2381-2389.

Irigoyen, J.J., D.W. Emerich, and M. Sanchez-Diaz. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiol. Plant. 84: 55-60.

ISTA. 2007. International Rules for Seed Testing. Seed Sci. Technol. 13: 299–520.

Jisha, K.C., K. Vijayakumari, and J.T. Puthur. 2013. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. Acta Physiol. Plant. 35: 1381–1396.

Kata, L.P., M. Bhaskaran, and R. Umarani. 2014. Influence of priming treatments on stress tolerance during seed germination of rice. Int. J. Agric. Environ. Biotechnol. 7: 225-32.

Khan, M.B., M.A. Gurchani, M. Hussain, S. Freed, and K. Mahmood. 2011. Wheat seed enhancement by vitamin and hormonal priming. Pak. J. Bot. 43: 1495.1499.

López, L.V.P., A.R. Rodríguez, M.E.S. Coronado, P.E.M. Hernández, and A.O. Segovia. 2016. Effects of hydropriming treatments on the invigoration of aged Dodonaea viscosa seeds and water-holding polymer on the improvement of seedling growth in a lava field. Restoration Ecol. 24 (1): 61.70.

Mazid, M., T.A. Khan, Z.H. Khan, S. Quddusi, and F. Mohammad. 2011. Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants. Int. J. Plant Anim. Environ. Sci. 1: 167-184.

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

Nakano, Y., and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide scavenged by ascrobate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiol. 22: 867–880.

Rouhi, H.R. 2009. The effects of Hydropriming and Osmopriming on germination traits of four pasture forage plant species under dryness and low temperature stresses. Msc. Thesis. Univ. of Tehran, St Zobahan, Karaj, Iran. (In Persian, with English Abstract)

Sepehri, A., and H.R. Rouhi. 2016. Enhancement of seed vigor performance in aged groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds by sodium nitroprusside under drought stress. Philipp. Agric. Scientist. 99(4): 339-347.

Shao, H.B., L. Y. Chu, G. Wu, J. H. Zhang, Z.H. Lu, and Y.C. Hu. 2007. Changes of some anti-oxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. Colloids Surface. B.: Biointerf 54(2): 143-149.

Varier, A., A.K., Vari, and M. Dadlani. 2010. The subcellular basis of seed priming. Curr. Sci. 99(4): 450-456.

Wang, J., Z. Zhang, and R. Huang. 2013. Regulation of ascorbic acid synthesis in plants. Plant Signal Behav. 8: 1559-2324.

Xu, Y., Q. Xu, and B. Huang. 2015. Ascorbic acid mitigation of water stress inhibition of root growth inassociation with oxidative defense intall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Front. Plant. Sci. 6: 807.

Younis, M.E., M.N.A. Hasaneen, and A.M.S. Kazamel. 2010. Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimental effects of NaCl and mannitol stress in Vicia faba seedlings. Protoplasma. 239: 39–48.