گیاه و زیست فناوری ایران
Iranian Journal of Plant & Biotechnology (IJPB)

مقاله پژوهشی

اثر هیدروپرایمینگ و هورمون-پرایمینگ بر سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی بذور نخود (*Cicer arietinum* L.)

حمید نوری (نویسنده مسئول)[1*] و سعید نواب‌پور[2]

۱*- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، h.nouri@yu.ac.ir

۲- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، s.navabpour@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۳

Investigating changes in yield and yield components of white beans under the conditions of biological fertilizers application

Hamid Nouri (Corresponding author)[1*] and Saeed Navabpour[2]

1*- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran, h.nouri@yu.ac.ir

2- Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, s.navabpour@gau.ac.ir

Received: September 2024 Accepted: November 2024

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر پرایمینگ بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی بذور نخود به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. تیمارهای پرایمینگ شامل شاهد، پرایمینگ با آب و پرایمینگ با اسید سالیسیلیک (در سطوح ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰ و ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند. نتایج نشان داد هیدروپرایمینگ منجر به افزایش میزان مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن، پرولین، اسید آسکوربیک و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پروکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز گردید. بیشترین میزان تولید مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن در تیمار پرایم شده با غلظت ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک حاصل گردید. افزایش غلظت اسید سالیسیلیک تا ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش مقدار پرولین و اسید آسکوربیک گردید. بالاترین فعالیت آنزیم کاتالاز به میزان ۳۷۷۷ نانومول بر دقیقه بر گرم متعلق به تیمار پرایمینگ بذر با مقدار ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک بود. در شرایط پرایمینگ بذر با مقدار ۶۰۰ میلی‌گرم بر گرم اسید سالیسیلیک بالاترین فعالیت آنزیم پراکسیداز به مقدار ۳۹۰ نانومول بر دقیقه بر گرم به دست آمد. بالاترین میزان فعالیت آن نیز در تیمار پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حاصل گردید. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز نیز در تیمار پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک در غلظت ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب به مقادیر ۱/۴۶ میکرومول بر دقیقه بر گرم و ۰/۹۹ میکرومول بر دقیقه بر گرم بالاترین میزان بودند. پرایمینگ بذر با آب و اسید سالیسیلیک منجر به افزایش میزان آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گردید. با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک تا ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به دلیل افزایش تولید مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن از میزان و فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها کاسته شد.

کلمات کلیدی: بذر، جوانه‌زنی، کاتالاز، گونه‌های فعال اکسیژن

فصلنامه گیاه و زیست فناوری ایران

تابستان ۱۴۰۳، دوره ۱۹، شماره ۲، صص ۴۷-۳۰

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of priming on the antioxidant properties of chickpea seeds as a completely randomized design with four replications. The priming treatments included control, priming with water and priming with salicylic acid (at levels of 300, 600, 900, 1200, 1500 and 1800 $mg.L^{-1}$). The results showed that hydropriming increased the amount of malondialdehyde, hydrogen peroxide, proline, ascorbic acid and the activity of catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase and glutathione reductase enzymes. The highest production of malondialdehyde (87 $nmol.g^{-1}$) and hydrogen peroxide (315 $nmol.g^{-1}$) was obtained in the primed treatment with a concentration of 1800 $mg.L^{-1}$ of salicylic acid. Increasing the concentration of salicylic acid up to 600 $mg.L^{-1}$led to an increase in the amount of proline and ascorbic acid to 0.39 and 9.8 $mg.g^{-1}$, respectively. The highest level of catalase enzyme activity was 3777 $nmol.min^{-1}.g^{-1}$ belonging to a seed priming treatment with 900 $mg.L^{-1}$of salicylic acid. In seed priming condition with 600 $mg.g^{-1}$ of salicylic acid, the highest peroxidase enzyme activity was obtained as 390 $nmol.min^{-1}.g^{-1}$. The highest level of its activity was obtained in seed priming treatment with salicylic acid 900 $mg.L^{-1}$. The activities of superoxide dismutase and glutathione reductase enzymes were also the highest in the seed priming treatment with salicylic acid at a concentration of 900 $mg.L^{-1}$at 1.46 $\mu mol.min^{-1}.g^{-1}$ and 0.99 $\mu mol.min^{-1}.g^{-1}$, respectively. Seed priming with water and salicylic acid led to an increase in the amount of enzymatic antioxidants and an increase in the activity of antioxidant enzymes. By increasing the concentration of salicylic acid up to 1800 $mg.L^{-1}$, the amount and activity of antioxidants decreased due to the increased production of malondialdehyde and hydrogen peroxide.

Keywords: Catalase, Germination, Reactive oxygen species, Seed

Iranian Journal of Plant & Biotechnology
Summer 2024, Vol 19, No 2, Pp 30-47

مقدمه و کلیات

جوانه‌زنی بذر تضمین‌کننده دوام، استقرار و عملکرد نهایی گیاهان می‌باشد (صورآذر و همکاران، ۱٤۰۱). جوانه‌زنی مطلوب بذر و استقرار گیاهچه‌ها اهمیت ویژه‌ای در دستیابی به رشد و به تبع آن عملکرد مطلوب دارد(Eskandari, 2012).با این حال، گیاهان اغلب در معرض تنش‌های غیرزنده قرار می‌گیرند که محدودیت عمده‌ای برای تولید محصولات کشاورزی در سراسر جهان است (صورآذر و همکاران، ۱٤۰۱). شرایط نامطلوب محیطی که گیاهان در چرخه رویشی با آنها روبرو می‌شوند، واکنش‌های متابولیکی آنها را مختل کرده و بر عملکرد سلول‌های گیاهی از قبیل فعالیت‌های بیوشیمیایی تأثیر منفی می‌گذارند (Aymen, 2018). از جمله این واکنش‌ها تغییر در میزان تولید مالون دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی و فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی می‌باشد. تغییرات پراکسیداتیو در ترکیبات اسیدهای چرب غشاها سبب تغییر در کارکرد غشاهای سلولی شده که اینها خود سبب افزایش ویسکوزیته و نفوذپذیری غشاها شده و در نهایت سبب افزایش نشت الکترولیت‌ها و میزان هدایت الکتریکی می‌گردد (شعبان و همکاران، ۱۳۹۷). اثرات کلی پراکسیداسیون لیپید کاهش سیالیت غشا، افزایش نشت مواد از غشا، آسیب به پروتئین‌های غشا و در نهایت غیرفعال شدن گیرنده‌ها، آنزیم‌ها و کانال‌های یونی می‌باشد (Gill and Tuteja, 2010). گیاه برای مقابله و کاهش خسارات ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن از سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی برخوردار بوده که پالایش این گونه‌های فعال اکسیژن را بر عهده دارند. سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان شامل آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از قبیل پرولین، آسکوربیک اسید، آلفا توکوفرول و برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز هستند که وظیفه پالایش گونه‌های فعال اکسیژن را در شرایط مختلف بر عهده دارند (Moller *et al*., 2017). در اثر وقوع تنش در گیاهان تولید برخی متابولیت‌های با وزن مولکولی کم که نقش اسمولیتی حفاظتی بر عهده دارند از قبیل پرولین افزایش می‌یابد (Hoekstra *et al*., 2001). به عقیده‌ی Oliveira و همکاران (2012) آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی سبب کاهش میزان گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند. عدم توانایی بذور در تولید برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ضروری از پیامدهای آنزیم سازی ناقص و ناکارا در این بذور می‌باشد (توکل افشاری و همکاران، ۱۳۸٦). تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن طی تنش اکسیداتیو سبب کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شده است (Lehner *et al*., 2008). در این شرایط کاهش فعالیت کاتالاز سبب تجمع پراکسید هیدروژن شده و همین امر سبب خسارت مستقیم و یا به واسطه تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل به بذر و می‌گردد (Goel *et al*., 2023). یکی از روش‌های بهبود بذر و جوانه‌زنی بذر، تسریع رشد و استقرار گیاهچه، یکنواختی، کاهش زمان گلدهی و تولید گیاهچه قوی پرایمینگ بذر است که موجب بهبود کیفیت و عملکرد محصول در شرایط تنش‌زا و بدون تنش در گیاهان می‌گردد (Bose *et al*., 2018). پرایمینگ بذر انواع مختلفی دارد که از آنها می‌توان به

روش‌های اسموپرایمینگ، هیدروپرایمینگ، هالوپرایمینگ، بیوپرایمینگ، هورمون پرایمینگ و سایر روش‌های پرایمنگ بذر اشاره نمود (Singh *et al*., 2015). در مطالعه حاضر از روش‌های هیدروپرایمینگ و هورمون پرایمینگ استفاده شده است. در روش هیدروپرایمینگ برای بهبود تحمل تنش برای گیاهان بذرها در آب مقطر به همراه هوادهی تا مدت زمان معینی جهت القای فعالیت‌های متابولیکی قبل از جوانه‌زنی و بدون اینکه جوانه‌زنی واقعی آغاز شود، خیسانده می‌شوند و در ادامه بذرها از طریق خشک کردن مناسب در زیر سایه به وزن اصلی خود برگردانیده می‌شوند (Jisha *et al*., 2013). هورمون پرایمینگ نیز، پیش‌تیمار بذر با هورمون‌های مختلف از جمله اسید سالیسیلیک، اسید آبسیزیک، اسید جیبرلیک، کینتین و غیره می‌باشد (Singh *et al*., 2015). اسیدسالیسیلیک یکی از مواد مهم مورد استفاده در پرایمینگ بذر بوده که از ترکیبات فنلی بوده و توسط گیاهان تولید می‌شود (پرمون و همکاران، ۱۳۹۳). این گروه از ترکیبات می‌توانند به عنوان تنظیم کننده رشد عمل کنند (Raskin *et al*., 2022). اسیدسالیسیلیک به عنوان یک سیگنال مولکولی مهم در واکنش‌های گیاهی در پاسخ به تنش‌های محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sairam *et al*., 2017). کاربرد اسیدسالیسیلیک ممکن است روی بسیاری از فرآیندهای گیاهی مانند جوانه‌زنی بذور، نفوذپذیری غشاها و سرعت رشد اثر داشته باشد (Khan *et al*., 2023). تحقیقات نشان داد که استفاده از اسید سالیسیلیک جوانه‌زنی لوبیا را در شرایط تنش فلزات سنگین افزایش داده است، همچنین رشد ریشه گیاهچه، وزن خشک گیاهچه لوبیا نسبت به شاهد (بدون اسید سالیسیلیک) افزایش یافت و همچنین بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اثر داشت (Gul *et al*., 2020; Nouairi *et al*., 2019). همچنین استفاده از اسید سالیسیلیک در فرآیند پرایمینگ بذر روی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اثرگذار بود (Eftekhar *et al*., 2019). در مطالعه صورآذر و همکاران (۱۴۰۱) مشخص شد که کاربرد اسید سالیسیلیک و آب در فرآیند پرایمینگ بذر منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت از قبیل کاتالاز، پلی فنول اکسیداز و پراکسیداز گردید. در مطالعه‌ای دیگر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل کاتالاز و پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در فرآیند پرایمینگ بذر با مواد نمکی و آب گزارش شده است (Amuaghaee, 2011). از این رو هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثر پرایمینگ بذر با آب و اسید سالیسیلیک بر خصوصیات بیوشیمیایی و فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در بذر نخود می‌باشد.

فرآیند پژوهش

تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر تیمار پرایمینگ با مقادیر مختلف اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بذور نخود زراعی اجرا شد. در این آزمایش بذور نخود رقم آرمان استفاده گردید. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. برای پرایمینگ بذرها، تعداد بذر مورد نظر را در درون دو لایه کاغذ صافی قرار داده و سپس محلول های مورد نظر برای پرایمینگ را به آنها افزوده و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی به مدت ۲٤

ساعت قرار داده شد. تیمارهای پرایمینگ شامل شاهد، پرایمینگ با آب و پرایمینگ با اسید سالیسیلیک (در سطوح ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰ و ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید به روش Heath and Packer (۱۹۶۸) همراه با تغیراتی انجام شد. در این روش میزان پراکسیداسیون لیپید براساس مقدار مالون دی آلدهید (MDA) موجود در هر عصاره طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$LP=[[(A_{532}-A_{600})-[(A_{440}\ A_{600})\ (MA)]]/155000] * 10^6$$

که در این رابطه LP مقدار مالون دی‌آلدئید بر حسب نانومول بر میلی لیتر و MA جذب مولی ساکارز در غلظت‌های ۱۰-۱ میلی‌مولار در ۵۳۲ و ٤٤٠ نانومتر است که به‌ترتیب ۸/٤ و۱٤۷ محاسبه شد که نسبتی معادل ۰/۰۵۷۱ می‌باشد (Du and Bramleg, 1992). در نهایت میزان پراکسیداسیون لیپید بر اساس نانومول MDA موجود با ازای هر گرم بذر بیان گردید.

به منظور اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن به میزان ۰/۳ گرم بافت بذری با ۱/۵ میلی لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی روی یخ هموژنیزه و پس از انتقال به میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور و در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید و از عصاره حاصله برای اندازه گیری میزان پراکسید هیدروژن در طول موج ۳۹۰ نانومتر استفاده گردید (Ghiazdowska *et al*., 2010).

برای اندازه‌گیری مبزان پرولین مقدار ۰/۵ گرم از نمونه‌ی بذری را توزین و پودر نموده و سپس آنها را به لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی لیتری منتقل کرده و ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳/۳ درصد به آنها اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ و از محلول‌های حاصل جهت اندازه‌گیری میزان پرولین به روش Bates و همکاران (1973) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد.

به منظور اندازه‌گیری میزان اسیدآسکوربیک ۰/۲ گرم بافت بذری با ۲ میلی لیتر اسیدپرکلریک ۰/۵ میلی مولار در هاون چینی روی یخ ساییده شده و سپس در میکروتیوب ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شده و جذب نوری نمونه ها در طول موج ۷۳۵ نانومتر انجام شد (Zhang *et al*., 2010).

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز یک گرم از بافت بذری با ۳ میلی لیتر با فر استخراج در هاون چینی روی یخ ساییده شده و پس از عبور از دو لایه پارچه ململ در میکروتیوب ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. تغییرات جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر به مدت دو دقیقه اندازه گیری و از یک دقیقه اول آن برای محاسبه فعالیت کاتالاز استفاده گردید (Luck., 1962).

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز به میزان ۲ گرم از بافت بذری با ٤ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون چینی روی یخ ساییده شده و پس از عبور از دو لایه پارچه ململ در میکروتیوب ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. تغییرات جذب در طول موج ٤۷۰ نانومتر به مدت ٤ دقیقه اندازه‌گیری و از یک دقیقه اول آن برای محاسبه فعالیت پراکسیداز استفاده گردید (Resenda *et al*., 2002).

برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به میزان ۰/۳ گرم از بافت بذری با ۲ میلی لیتر بافر استخراج در هاون چینی روی یخ ساییده شده و پس از عبور از دو لایه پارچه ململ در میکروتیوب ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه (دو زمان ۱۵ دقیقه ای) در ۱۵۰۰۰ دور و در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه اندازه گیری و از یک دقیقه اول آن برای محاسبه فعالیت آسکوربات پراکسیداز استفاده گردید (Resenda *et al*., 2002).

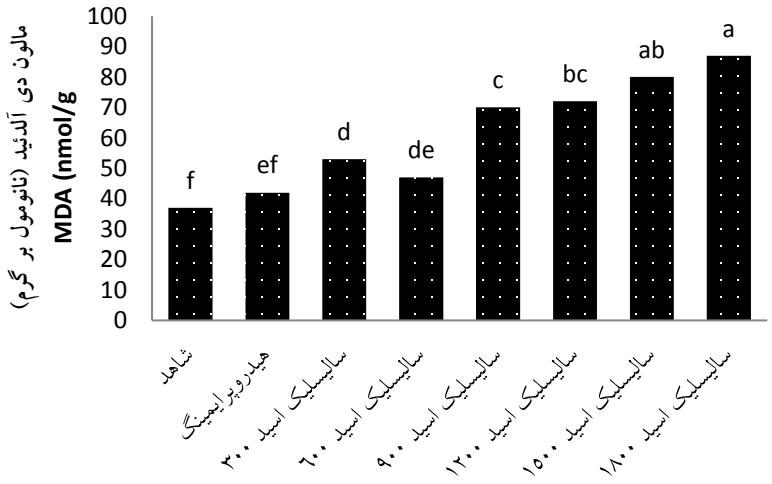
سنجش سوپر اکسید دیسموتاز بر اساس تغییر شیمیائی نیترو بلو تترازولیوم و طبق روش Minami و Yoshikawa (۱۹۷۹) انجام شد. بدین منظور محلول واکنش شامل ۵۵ هزارم مول نیترو بلو تترازولیوم، ۱/٤۲ درصد ترایتون X-100، EDTA 0.1 mM، ۱٦ میلی مول پیروگالول بود که پس از اضافه کردن عصاره نمونه بافت تغییر جذب در اسپکترو فتو متر در طول موج ٥٦۰ نانو متر ارزیابی گردید.

سنجش فعالیت گلوتاتین ردوکتاز با روش (Sgherri *et al*., 1994) انجام شد. بدین منظور ۲ گرم از بافت مورد نظر در بافر با pH=7 حاوی ۱۰۰ میلی مول فسفات پتاسیم، ۱ میلی مول EDTA و ۰/۲ پلی وینیل فسفات در مجاورت یخ با دستگاه هموژن شد. سپس در ۱۸۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. محلول روئی جهت سنجش فعالیت گلوتاتین ردوکتاز مورد استفاده قرارگرفت. برای این منظور محلول واکنش شامل ۲۰۰ میلی مول فسفات پتاسیم (pH=7.5)، ۲ میلی مول EDTA، یک و نیم میلی مول کلرور منیزیم، نیم میلی‌مول اکسید گلوتاتیون، ٥۰ میکرو مول NADH ساخته و ابتدا جذب در ۳٤۰ نانومتر قرائت گردید و به ۱ میلی‌لیتر از این محلول به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده از بافت گیاه اضافه و بعد از یک دقیقه مجددا جذب قرائت شد. با استفاده از منحنی استاندارد آنزیم، فعالیت نمونه استخراجی تعیین گردید.

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسات میانگین با آزمون LSD در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

براساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که تولید مالون‌دی‌آلدئید تحت تأثیر تیمار پرایمینگ بذر قرار گرفت و نتایج نشان داد بیشترین تولید مالون دی آلدئید به میزان ۸۷ نانومول برگرم در تیمار پرایم شده با غلظت ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک حاصل گردید. افزایش غلظت اسید سالیسیلیک از ۳۰۰ تا ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش تولید مالون دی‌آلدئید شد که نشانه پراکسیداسیون لیپید بیشتر در این تیمارها می‌باشد. کمترین میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید به میزان ۳۷ نانومول بر گرم نیز متعلق به تیمار شاهد و عدم پرایم بذرها بود و دارای تفاوت آماری معنی‌داری با تیمار هیدروپرایمینگ (٤۲ نانومول بر گرم) نداشت، این در حالی بود که این تیمار با سایر تیمارها دارای اختلاف آماری معنی‌داری بود (شکل ۱).

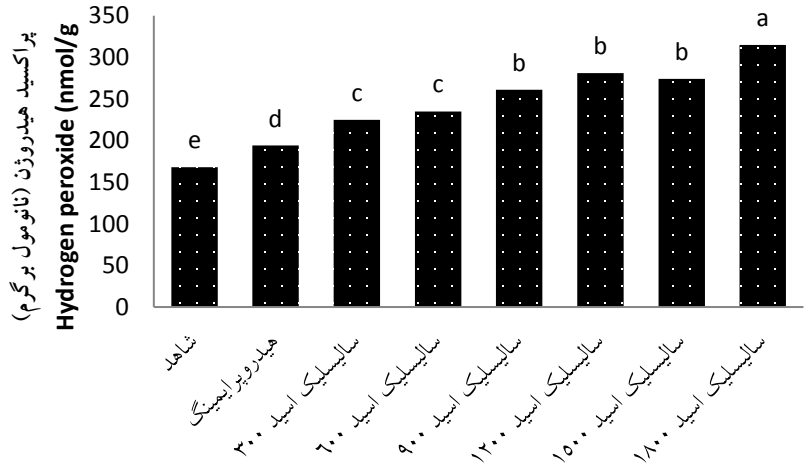


شکل ۱- اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر میزان تولید مالون دی آلدئید در بذور نخود (ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند)

Fig 1- The effect of different seed priming treatments on the amount of malondialdehyde production in chickpea seeds (columns with at least one similar letter do not have significant differences)

پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک و هیدروپرایمینگ سبب تغییرات مثبتی در روند افزایش تولید پراکسید هیدروژن گردید. براساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که تولید پراکسید هیدروژن با افزایش غلظت کاربرد اسید سالیسیلیک در فرآیند پرایمینگ بذرها افزایش یافت. در بین سطوح مختلف تیمار پرایمینگ بذر، بیشترین میزان تولید پراکسید هیدروژن مربوط به تیمار پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به میزان ۳۱۵ نانومول برگرم بود و کمترین میزان تولید پراکسید هیدروژن در تیمار شاهد به میزان ۱۶۸ نانومول برگرم به دست آمد (شکل ۲). در شرایط پرایمینگ بذر یا آب و اسیدسالیسیلیک تا غلظت ۱۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان تولید مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن افزایش یافت. افزایش تولید گونه‌های فعالی اکسیژن در زمان شورع فرآیند جوانه‌زنی بذر به دلیل نقش فعال گونه‌های فعال اکسیژن در فرآیند شکست خواب و القای جوانه‌زنی در بذر می‌باشد (Yousif Abdullah Al Hijab *et al*., 2024). در فرآیند پرایمینگ بذر که به شروع مقدمات برای جوانه‌زنی بذر همراه می‌باشد میزان تولید گونه‌های فعالی اکسیژن از قبیل پراکسید هیدروژن افزایش یافته که به دنبال آن با پراکسیداسیون بیشتر غشای سلولی میزان نشت الکترولیت‌ها و همچنین میزان تولید مالون دی‌آلدئید که بیانگر افزایش پراکسیداسیون غشای سلولی است افزایش می‌یابد (Liu *et al*., 2022). در مطالعه حاضر نیز افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک به دلیل نقش القایی این ماده در شروع فرآیند جوانه‌زنی بذر و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی بوده که منجر به افزایش تولید

مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن شده است. در شرایط پرایمینگ بذر با آب و با محلول اسید سالیسیلیک به دلیل جذب آب و آزادی عمل بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن و به خصوص در غلظت‌های بالای اسید سالیسیلیک در محلول پرایمینگ بذر و خسارت بالاتر به غشاها میزان پراکسیداسیون لیپیدی نسبت به تیمارهای انبارداری طبیعی افزایش یافته است. Mira و همکاران (2015) نیز بیان نمودند محتوای رطوبتی بذر بر میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن اثر دارند که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. به گفته Gul (2023) افزایش میزان تولید مالون دی آلدئید همراه با نشت الکترولیت ها بخش قابل توجهی از کاهش قابلیت جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه را توجیه می‌نماید. افزایش میزان تولید مالون دی آلدئید ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بذر بوده که می تواند ناشی از ضعف سیستم آنتی اکسیدانت باشد (Bailly, 2004). Wani و همکاران (2023) بیان نمودند که افزایش بیش از اندازه تولید مالون‌دی آلدئید در بذور نشانه شروع کاهش قابلیت حیات در آنها می‌باشد و این تولید نیز با افزایش محتوای رطوبتی افزایش می‌یابد. Basit و همکارارن (2022) بیان نمودند که با افزایش میزان رطوبت بذر واکنش‌های از قبیل پراکسیداسیون لیپید بیشتر رخ می‌دهند.

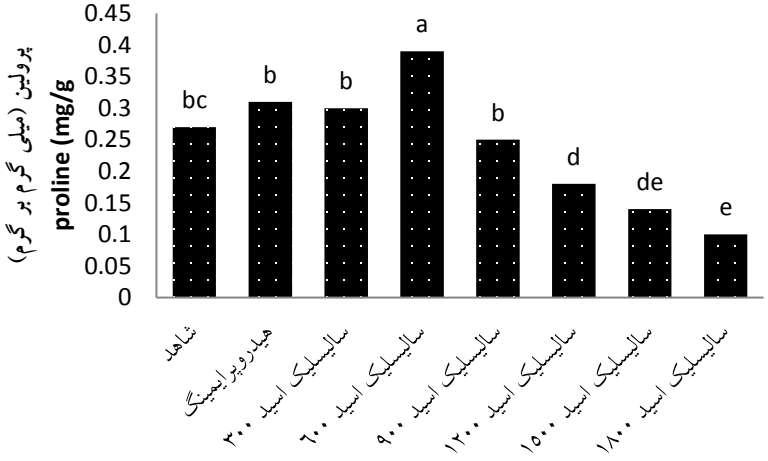


شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر میزان پراکسید هیدروژن تولید شده در بذور نخود (ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند)

Fig 2- The effect of different seed priming treatments on the amount of hydrogen peroxide produced in chickpea seeds (columns that have at least one similar letter do not have significant differences)

میزان آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی در شرایط وقوع تنش اکسیداتیو دستخوش تغییراتی شده که ممکن است سلول را در برابر خسارت اکسیداتیو در امان نگه دارد. پرولین یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی بوده که در شرایط وقوع تنش‌های محیطی در بافت های مختلف گیاهی تولید آن افزایش می‌یابد. در این تحقیق مشاهده شد که تولید پرولین در تیمار پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بالاتر از

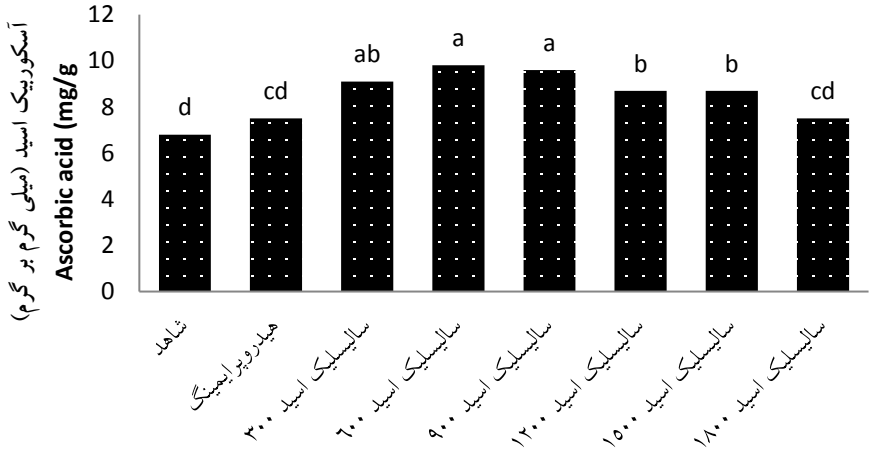
سایر تیمارهای پرایمینگ بذر بود (۰/۳۹ میلی‌گرم بر گرم). این در حالی بود که افزایش غلظت اسید سالیسیلیک در فرآیند پرایمینگ بذر منجر به کاهش میزان تولید پرولین گردید به طوری که در شرایط پرایمینگ بذر با مقدار ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کمترین میزان پرولین به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر گرم حاصل گردید (شکل ۳).



شکل ۳- اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر میزان پرولین تولید شده در بذور نخود (ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند)

Fig 3- The effect of different seed priming treatments on the amount of proline produced in chickpea seeds (columns with at least one letter in common do not have significant differences)

یکی از آنتی اکسیدانت‌های غیرآنزیمی دخیل در فرآیند پالایش گونه‌های فعال اکسیژن اسید آسکوربیک بوده که در این مطالعه تحت تأثیر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر دستخوش تغییراتی شده است. نتایج نشان داد علاوه بر اینکه هیدروپرایمینگ منجر به افزایش مقدار تولید آن شده است، افزایش غلظت اسید سالیسیلیک در فرآیند پرایمینگ بذر تا ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به افزایش اسید آسکوربیک گردید. بالاترین میزان اسید آسکوربیک به میزان ۹/۸ میلی‌گرم بر گرم در تیمار پرایمینگ با اسید سالیسیلیک ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حاصل گردید و با افزایش بیشتر غلظت اسید سالیسیلیک درفرآیند پرایمینگ بذر میزان تولید اسید سالیسیلیک کاهش یافت، به طوری که میزان آن در تیمار پرایمینگ با اسید سالیسیلیک ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ۷/۵ میلی‌گرم بر گرم رسید. همچنین نتایج نشان داد کمترین میزان اسید سالیسیلیک به مقدار ۶/۸ میلی‌گرم بر گرم متعلق به تیمار شاهد بود (شکل ٤).



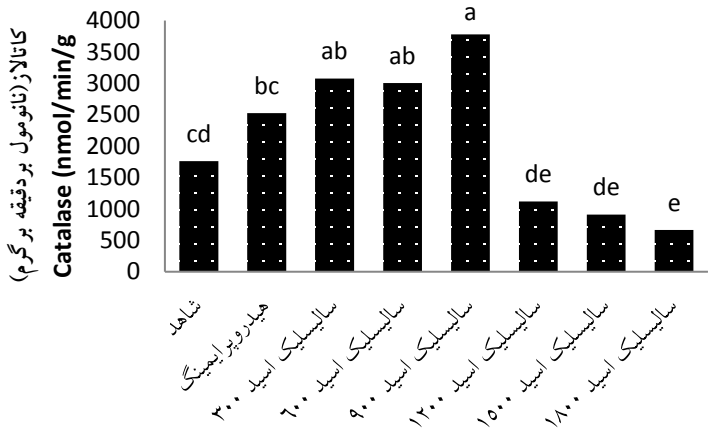
شکل ٤- اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر میزان آسکوربیک اسید تولید شده در بذور نخود (ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند)

Fig 4- The effect of different seed priming treatments on the amount of ascorbic acid produced in chickpea seeds (columns with at least one similar letter do not have significant differences)

براساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدانت از قبیل کاتالاز تحت تأثیر تیمارهای پرایمینگ بذر قرارگرفت. نتایج نشان داد که هیدروپرایمینگ میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. از طرفی افزایش غلظت اسید سالیسیلیک در فرآیند پرایمینگ بذر تا غلظت ۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گردید به طوری که بالاترین میزان فعالیت این آنزیم به میزان ۳۷۷۷ نانومول بر دقیقه بر گرم متعلق به تیمار پرایمینگ بذر با مقدار ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک بود و از این مقدار به بعد افزایش میزان اسید سالیسیلیک در فرآیند پرایمینگ بذر منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شد به طوری که کمترین میزان فعالیت این آنزیم به مقدار ٦٦٥ نانومول بر دقیقه بر گرم در تیمار پرایمینگ بذر با مقدار ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک حاصل گردید (شکل ۵). در شرایطی که میزان گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه افزایش یافته و پراکسیداسیون لیپیدی نیز افزایش می‌یابد، گیاه در شرایط تنش اکسیداتیو قرار گرفته که در نتیجه آن ممکن است خساراتی جبران ناپذیر به گیاه وارد گردد. از این رو در گیاه مکانیسم‌هایی برای مقابله با فرآیند اکسیداسیون قرارداشته که مشتمل بر آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد. آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی نظیر پرولین و اسیدآسکوربیک در مقابله با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابند که در این مطالعه نیز افزایش غلظت اسید سالیسیلیک در فرآیند پرایمینگ بذر تا غلظت ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به افزایش تولید پرولین و اسیدآسکوربیک شده است و میزان این دو را نسبت به تیمار شاهد به ترتیب به میزان ۳۰ و ۳۱ درصد افزایش داده است و اختلاف بین آنها از نظر

آماری معنی‌دار بود. همچنین بر طبق این نتایج مشخص شد که میزان پرولین و اسید سالیسیلیک با افزایش بیشتر اسید سالیسیلیک در محلول پرایمینگ بذر منجر به کاهش میزان پرولین و اسیدآسکوربیک شده است و در غلظت ۱۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر از اسید سالیسیلیک به کمترین میزان رسیده که به احتمال زیاد نشان دهنده عدم کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی در غلظت مذکور در جهت مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از تولید زیاد گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی سبب کاهش میزان گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (Oliveira et al., 2012). به گفته Hoekstra و همکاران (2021) در اثر وقوع تنش در گیاهان تولید برخی متابولیت‌های با وزن مولکولی کم که نقش اسمولیتی حفاظتی بر عهده دارند از قبیل پرولین افزایش می‌یابد. در این زمینه Wani و همکاران (2020) در تحقیق خود عنوان نمودند که پرولین از عملکرد طبیعی سلولی با استفاده از سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌نماید. Kong و همکاران (2015) نیز در تحقیق خود بیان نمودند که افزایش شدت تنش اکسیداتیو سبب افزایش محتوای پرولین در بذور زوال یافته می‌گردد. در شرایط عدم کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی، آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی این کمبود را جبران می‌نمایند و این بدین دلیل است که سیستم‌های آنتی اکسیدانی در شرایط مختلف تکمیل کننده یکدیگر می‌باشد (Kong *et al*., 2015). فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت وابسته به محتوای رطوبتی بذر می‌باشد (شعبان و همکاران، ۱۳۹۷). با شروع فرآیند پرایمینگ بذر و آبگیری بذر از محلول پرایمینگ مشتمل بر هیدروپرایمینگ و پرایمینگ با اسیدسالیسیلیک فعالیت آنزیم پروکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز نیز شروع به افزایش نمود به طوری که میزان فعالیت آنها تا حدود غلظت ۶۰۰ تا ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت و میزان فعالیت این آنزیم‌ها با افزایش بیشتر غلظت اسید سالیسیلیک شروع به کاهش یافتن نمود. کاهش میزان فعالیت این آنزیم‌ها با افزایش بیشتر غلظت اسید سالیسیلیک به دلیل غلبه گونه‌های فعال اکسیژن بر سیستم آنتی‌اکسیدانی و شروع فعالیت‌های آنزیمی مورد نیاز جهت فرآیند جوانه‌زنی بذر می‌باشد. افزایش میزان تولید پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید در غلظت‌های بالای اسید سالیسیلیک نیز دلیلی بر این مدعا بوده زیرا افزایش بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط وقوع تنش اکسیداتیو دلیل عدم کارایی لازم سیستم‌های آنتی اکسیدانی آنزیمی تحت این شرایط می‌باشد که در این مطالعه این واقعیت مشهود بود. میزان پراکسید هیدروژن در نتیجه‌ی افزایش پراکسیداسیون لیپید با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک شدت زوال مصنوعی و مدت زمان انبارداری طبیعی افزایش یافت. این در حالی بود که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مورد نظر در این آزمایش نیز با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک در فرآیند پرایمینگ بذر تا حدی افزایش یافت و از آن به بعد کاهش یافت. افزایش در شدت غلظت اسید سالیسیلیک تا ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب تولید بیشتر پراکسید هیدروژن در بذور شد ولی در این شدت از زوال تجمع پرکسید هیدروژن و سایر گونه‌های فعال اکسیژن با اثر سیمت خود سبب غلبه آنها بر فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و کاهش فعالیت

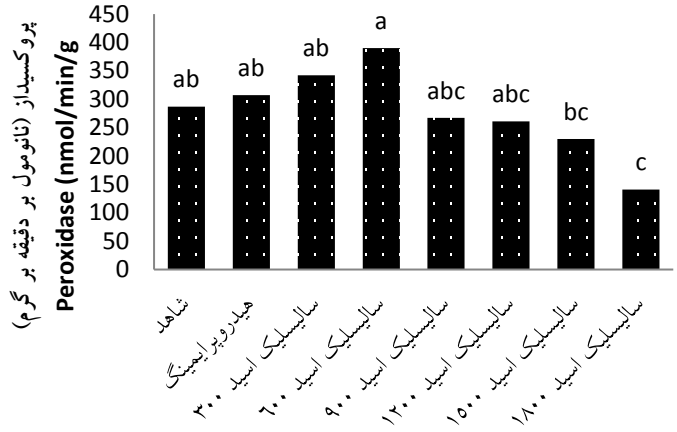
آنزیم‌های کاتالاز، پروکسیداز، آسکوربات پروکسیداز، سوپراکسیدیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز شد (Kong *et al.*, 2016). آنزیم کاتالاز از مهمترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بوده که با افزایش فعالیت در طی افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند خسارت های ناشی از این گونه‌ها را طی تنش اکسیداتیو کاهش دهد (توکل افشاری و همکاران، ١٣٨٦). آنها بیان نمودند که با آبگیری بذور فعالیت آنزیم کاتالاز به طور چشمگیری افزایش یافت. آنزیم های آنتی اکسیدانت از جمله مکانیسم‌هایی هستند که میتوانند در پروسه ترمیمی بذور طی فرآیند تنش اکسیداتیو دخالت داشته و با تأثیر رویدادهای زوالگر در بذور مقابله نماید (توکل افشاری و همکاران، ١٣٨٦). با افزایش آبگیری بذور میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت تا حدودی افزایش یافته، ولی از آن حد به بعد به دلیل افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن ممکن است این گونه‌های فعال بر فعالیت این آنزیم‌ها غلبه نموده و سبب کاهش کارایی آنها گردند.



شکل ٥- اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر فعالیت آنزیم کاتالاز بذور نخود (ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند)

Fig 5- The effect of different seed priming treatments on catalase enzyme activity of pea seeds (columns with at least one similar letter do not have significant differences)

آنزیم پراکسیداز نیز روندی مشابه با آنزیم کاتالاز داشت و نتایج نشان داد در شرایط پرایمینگ بذر با مقدار ٦٠٠ میلی‌گرم بر گرم اسید سالیسیلیک بالاترین فعالیت این آنزیم به مقدار ٣٩٠ نانومول بر دقیقه بر گرم به‌دست آمد. روند تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز به گونه‌ای بود که افزایش بیشتر غلظت اسید سالیسیلیک تا ١٨٠٠ میلی‌گرم بر لیتر منجر به کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز تا مقدار ١٤١ نانومول بر دقیقه بر گرم شد. این در حالی بود که فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار هیدروپرایمینگ با تیمار شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ٦).

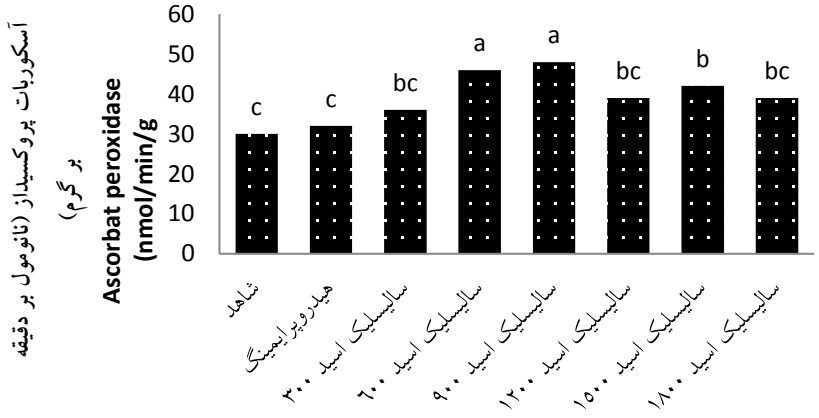


شکل ٦- اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر فعالیت آنزیم پروکسیداز بذور نخود (ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند)

Fig 6- The effect of different seed priming treatments on the peroxidase enzyme activity of chickpea seeds (columns with at least one letter in common do not have significant differences)

براساس نتایج اساس نتایج این مطالعه مشخص شد که کمترین فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز در تیمار شاهد و به میزان ۳۰ نانومول بر دقیقه بر گرم حاصل گردید. بالاترین فعالیت آن نیز در تیمار پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حاصل گردید. این نتایج همچنین نشان داد که هر چند فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز در تیمار هیدروپرایمینگ نیبت به تیمار شاهد بیشتر بود، ولی اختلاف آنها از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۷). براساس نتایج مشخص شد که هیدروپرایمینگ منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نسبت به تیمار شاهد شد. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک در تیمار پرایمینگ بذر تا غلظت ٦۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود در حالی که افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پروکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز تا غلظت ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود و از این غلظت به بعد میزان فعالیت این آنزیم‌ها با افزایش بیشتر غلظت اسید سالیسیلیک در محلول پرایمینگ بذر کاهش یافت تا کمترین میزان فعالیت آنها در غلظت ۱۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر از اسید سالیسیلیک به دست آمد. در مطالعه صور آذر و همکاران (١٤٠١) نیز مشخص شد که تیمارهای پرایمینگ بذر با آب منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل کاتالاز و پراکسیداز شد که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. افزایش غلظت اسید سالیسیلیک تا حدی منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شد و از آن به بعد با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک میزان فعالیت آنها کاهش یافت. نتایج مشابهی در مطالعه صورآذر و همکاران (١٤٠١) گزارش شده است که تأیید کننده نتایج حاصل از این مطالعه می‌باشد. در توجیه کاهش فعالیت آنزیمی در شرایط افزایش غلظت اسید سالیسیلیک می‌توان عنوان داشت که افزایش بیش از حد غلظت اسید سالیسیلیک خود می‌تواند القا کننده

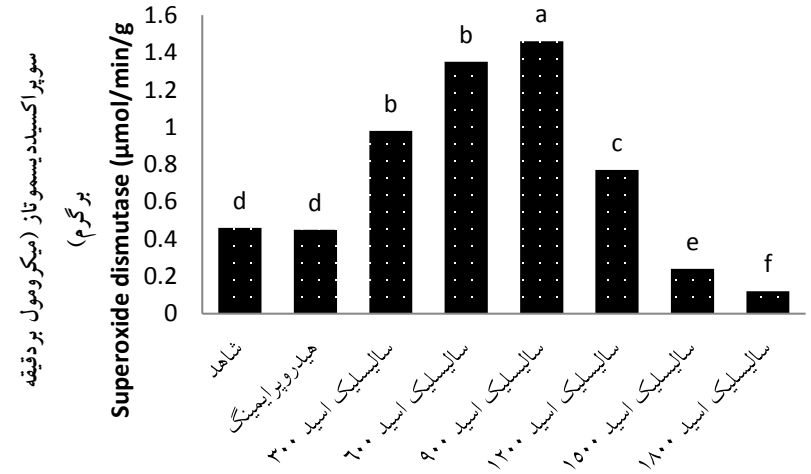
تنش اکسیداتیو بوده و این احتمال وجود دارد که در برخی موارد، پاسخ های تنش با واسطه اسید سالیسیلیک به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن منجر به مهار فعالیت آنزیم کاتالاز گردد که در این مطالعه مشهود بود. ممکن است دلیل این فرآیند اثر سالیسیلات بر کمپلکس‌های حاوی آهن از طریق کلات کردن آهن باشد (Liu *et al*., 2016). همچنین در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که کاربرد اسید سالیسیلیک تا غلظت مشخصی منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گردید و با افزایش بیشتر غلظت اسید سالیسیلیک در محلول، میزان فعالیت این آنزیم‌ها با کاهش قابل توجه مواجه گردید (Zhang *et al*., 2015)، که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. همچنین عنوان شده است که در شرایط افزایش بیش از اندازه تولید گونه‌های فعال اکسیژن، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت رخ داده و همین امر سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌گردد (Yousif Abdullah Al Hijab *et al*., 2024). به دنبال کاهش کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی در شرایط افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در فرآیند پرایمینگ بذر قابلیت جوانه‌زنی بذور با تجمع گونه‌های فعال اکسیژن کاهش می‌یابد (Wojtyla *et al*., 2016). Yousif Abdullah Al Hijab و همکاران (2024) بیان نمود که تجمع پراکسید هیدروژن سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و به دنبال آن افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید شده که در نهایت سبب کاهش قابلیت حیات بذور می‌گردد. همچنین در این زمینه گزارش شده است که فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های پیش تیمار شده ممکن است سلول را برای مقابله و غلبه بر تنش از طریق تثبیت غشأها و تشکیل یک ظرفیت بالا برای مقاومت در برابر اکسیداسیون آماده کند (Amuaghaee, 2011). پرایمینگ بذر آویشن باغی با اسید سالیسیلیک موجب افزایش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان آنزیمی مثل آنزیم های CAT، SOD، PPO و POD شده است (Mahmoodi Tarkhorani *et al*., 2017). هنگامی که اسید سالیسیلیک در غلظت و زمان مناسب به کار برده می‌شود با تغییر فعالیت آنزیم هایی نظیر سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز یا آنزیم‌های دخیل در تولید یا تجزیه پراکسید هیدروژن متصل به غشأی سیتوپلاسمی موجب افزایش موقت و جزیی در مقدار پراکسید هیدروژن شده که منجر به القای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول می‌گردد (Hayat *et al*., 2007).



شکل ۷- تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز بذور نخود (ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند)

Fig 7- Different treatments of seed priming on the level of ascorbate peroxidase enzyme activity of chickpea seeds (columns with at least one letter in common do not have significant differences)

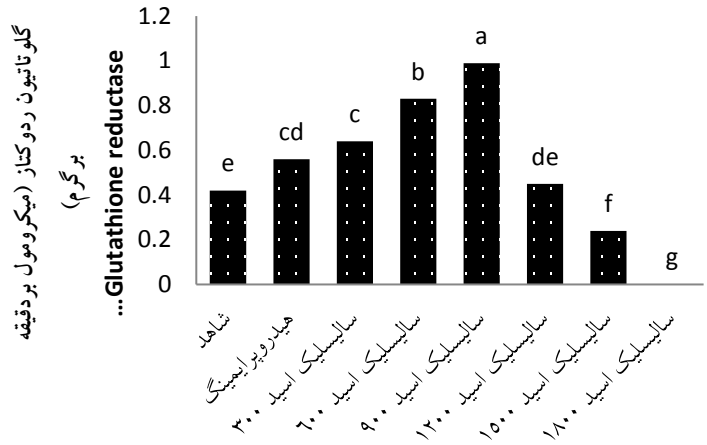
با افزایش غلظت اسید سالیسیلک در فرآیند پرایمینگ بذر تا غلظت ۹۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تا مقدار ۱/٤٦ میکرومول بر دقیقه بر گرم افزایش یافت. افزایش بیشتر غلظت سالیسیلک اسید منجر به کاهش فعالیت این آنزیم شد، به طوری که کمترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار پرایمینگ با اسید سالیسیلیک ۱۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مقدار ۰/۱۲ میکرومول بر دقیقه بر گرم به‌دست آمد. اختلاف بین دو تیمار شاهد و هیدروپرایمینگ نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۸).



شکل ۸- اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بذور نخود (ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند)

Fig 8- The effect of different seed priming treatments on the activity level of superoxide dismutase enzyme in chickpea seeds (columns with at least one letter in common do not have significant differences)

فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز نیز تحت تأثیر سطوح مختلف تیمار پرایمینگ بذر قرار گرفت. بر اساس این نتایج مشخص شد که بالاترین و کمترین میزان فعالیت این آنزیم به مقادیر ۰/۹۹ و صفر میکرومول بر دقیقه بر گرم به ترتیب در تیمارهای پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک در غلظت های ۹۰۰ و ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حاصل گردید. نتایج همچنین نشان داد اختلاف بین فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در دو تیمار هیدروپرایمینگ (۰/٥٦ میکرومول بر دقیقه بر گرم) و شاهد (۰/٤۲ میکرومول بر دقیقه بر گرم) از نظر آماری معنی‌دار بود (شکل ۹). در شرایط پرایمینگ بذر یا اسیدسالیسیلیک ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز کمترین میزان بود که نشانه عدم کارایی این آنزیم ها برای مقابله با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در این غلظت از اسید سالیسیلیک می‌باشد. این شرایط به احتمال زیاد با شروع فرآیندهای بعدی زمینه‌ساز شروع جوانه‌زنی بذر همراه است که با تولید انبوه گونه‌های فعال اکسیژن همراه می‌باشد (Yousif Abdullah Al Hijab *et al*., 2024). Ellouzi و همکاران (2023) بیان داشتند که گلیکاسیون غیرآنزیمی در مرحله‌ی اول از سری واکنشهای آمادوری و مایلارد منجر به کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز میشود که این فرآیند در سطح تیمار ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از تیمار پرایمینگ مشهود بود. کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در شرایط پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز به احتمال زیاد به دلیل کاهش سطوح گلوتاتیون احیا شده که یک فاکتور مهم در جلوگیری از خسارت اکسیداتیو می‌باشد (Hongna *et al*., 2021). به نظر می‌رسد در پرایمینگ بذر یا اسید سالیسیلیک ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میزان گلوتاتیون احیا شده نسبت به غلظت‌های کمتر اسید سالیسیلیک کاهش بیشتری داشته و در نتیجه میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در غلظت ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در فرآیند پرایمینگ بذر کاهش بیشتری داشته است. به هر حال نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک به میزان زیاد میزان پراکسیداسیون لیپید و تولید گونه‌های فعال اکسیژن بیشتر شده که ممکن است کارایی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کاهش یافته و در نهایت منجر به عدم کارایی آنها در غلظت های بسیار بالا گردد که همین امر تا حدودی خود می‌تواند به دلیل نقش اسیدسالیسیلیک در غلظت های بالا در وقوع تنش اکسیداتیو در بذر باشد که سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی را با اختلال مواجه نموده است (Ellouzi *et al*., 2023).



شکل ۹- اثر تیمارهای مختلف پرایمینگ بذر بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز بذور نخود (ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند دارای تفاوت معنی‌دار با هم نمی‌باشند)

Fig 9- The effect of different seed priming treatments on glutathione reductase enzyme activity of pea seeds (columns with at least one letter in common do not have significant differences)

نتیجه‌گیری کلی

پرایمینگ بذر با آب و اسید سالیسیلیک منجر به تغییراتی در مقدار آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گردید. هیدروپرایمینگ و پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک تا غلظت ٦٠٠ الی ٩٠٠ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش میزان پرولین، اسید آسکوربیک و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پروکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز گردید. براساس نتایج این مطالعه مشخص شد که پرایمینگ بذر با آب و اسید سالیسیلیک تا غلظت ٦٠٠ الی ٩٠٠ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش میزان آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گردید. از طرفی با افزایش بیشتر غلظت اسید سالیسیلیک تا ۱۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به دلیل افزایش تولید مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن از میزان و فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی کاسته شد.

منابع

۱) پرمون، ق.، عبادی، ع.، جهانبخش گده کهریز، س. و م، داوری. ۱۳۹۳. تأثیر پرایمینگ با اسید سالیسیلیک بر خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بذور پیر شده ماریتیغال. نشریه تولید گیاهان زراعی، ۷(٤): ۲۲۳-۲۳٤.

۲) توکل افشاری، ر.، قاسم، ف.، مجنون حسینی، ن.، علیزاده، ه. و م.ر، بی همتا. ۱۳۸٦. تأثیر پیری بذر بر صفات جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کاتالاز و پراکسیداز در ژنوتیپ‌های جو. مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۷(۲): ۳٤٦-۳۳۷.

۳) شعبان، م.، قادری فر، ف.، صادقی پور، ح.ر. و ا، یامچی. ۱۳۹۷. بررسی جوانه زنی و فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی کلیدی دخیل در زوال بذر نخود در طی انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی. نشریه تولید گیاهان زراعی، ۱۱(۷): ۵۱-۷۱.

٤) صورآذر، خ.، صدقی، م. و ر، سیدشریفی. ١٤٠١. تأثیر انواع پرایمینگ بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لوبیا قرمز تحت تنش کلریدکبالت. پژوهش های بذر ایران، ٩(١): ١١١-١٢٦.

5) Amuaghaee, R. 2011. The effect of hydro and osmopriming on alfalfa seed germination and antioxidant defenses under salt stress. *African Journal of Biotechnology,* 10(3): 6269-6275.

6) Aymen, E.M. 2018. Seed Priming with Plant Growth Regulators to Improve Crop Abiotic Stress Tolerance. In: Rakshit, A. and H.B, Singh. (eds.). Advances in Seed Priming. Institute of Agricultural Sciences, BHU, Varanasi, Uttar Pradesh, India, 95-106.

7) Basit, F. Bhat, J.A. Ulhassan, Z. Noman, M. Zhao, B. Zhou, M. and W.Y, Guan. 2022. Seed priming with spermine mitigates chromium stress in rice by modifying the ion homeostasis, cellular ultrastructure and phytohormones Balance. *Antioxidants,* 11: 1704.

8) Bates, L.S., Walden, R.P. and I.D, Teave. 1973. Rapid defermination of free praline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.

9) Bose, B., Kumar, M. Singhal, R.K. and S, Mondal. 2018. Impact of Seed Priming on the Modulation of Physico-chemical and Molecular Processes during Germination, Growth, and Development of Crops. In: Rakshit, A. and Singh, H.B. (eds.). Advances in Seed Priming. Institute of Agricultural Sciences, BHU, Varanasi, Uttar Pradesh, India, 23-40.

10) Eftekhar, N., Fallah, S., Abbasi Sooraki, A., Khodaverdiloo, H. and A, Rahimi. 2019. Effect of salicylic acid and potassium nitrate pretreatment on enhancing the sunflower tolerance in contaminated soils with cadmium. *Iranian Journal of Seed Sciences and Research*, 6(2): 161-175.

11) Ellouzi, H., Zorrig, W., Amraoui, S., Oueslati, S., Abdelly, C., Rabhi, M. and H.M, Kadambot. 2023. "Seed Priming with Salicylic Acid Alleviates Salt Stress Toxicity in Barley by Suppressing ROS Accumulation and Improving Antioxidant Defense Systems, Compared to Halo- and Gibberellin Priming" *Antioxidants,* 12: (9): 1779. https://doi.org/10.3390/antiox12091779.

12) Eskandari, H. 2012. Seed quality variation of crop plants during seed development and maturation. *International Journal of Plant Production,* 3(11): 557-560.

13) Ghiazdowska, A., Krasuska, U. and R, Bogatek. 2010. Dormancy removal in apple embryos by nitric oxid or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. *Planta*, 232: 1397-1407.

14) Gill, S.S. and N, Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 909-930.

15) Goel, A., Coel, A.K. and I.S, Sheoran. 2023. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1093-1100.
Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. and J, Buitink. 2021. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Sciences,* 6: 431–438.

16) Gul, F., Arfan, M., Shahbaz, M. and S, Basra. 2020. Salicylic acid seed priming modulates morphology, nutrient relations and photosynthetic attributes of wheat grown under cadmium stress. *International Journal of Agriculture and Biology,* 23: 197-204.

17) Hongna, C., Leyuan, T., Junmei, S., Xiaori, H. and C, Cheng Xianguo. 2021. Exogenous salicylic acid signal reveals an osmotic regulatory role in priming the seed germination of *Leymus chinensis* under salt-alkali stress. *Environmental and Experimental Botany,* 188: 104–498.

18) Jisha, K.C., Vijayakumari, K. and J.T, Puthur. 2013. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(5): 1381-1396.

19) Khan, W., Prithiviraj, B. and D, Smith. 2023. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Plant Physiology*, 160: 485-492.

20) Kong, L., Huo, H. and P, Moa. 2015. Antioxidant response and related gene expression in aged oat seed. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1-9.

antioxidant enzyme activity in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 178: 171- 178.

32) Sgherri, C.L.M., Liggini, B. Puliga, S. and F, Navari-Izzo. 1994. Antioxidant system in Sporoblus stapfianus. Changes in response to desiccation and rehydration, *Phytochemistry*, 35 :561–565.

33) Singh, H., Jassal, R.K., Keng, J.S., Sandhu, S.S., Kang H. and K, Grewal. 2015. Seed priming techniques in field crops - a review. *Agricultural Review*, 36(4): 251-264.

34) Wani, A.S., Ahmad, A., Hayat, S. and I, Tahir. Epibrassinolide and proline alleviate the photosynthetic and yield inhibition under salt stress by acting on antioxidant system in mustard. *Plant Physiology and Biochemistry,* 135: 385–394.

35) Wojtyla, Ł., Garnczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L. and S, Jurga. 2016. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal of Plant Physiology*, 163: 1207–1220.

36) Yousif Abdullah Al Hijab, L., Al-Hazmi, N. E. and D.M, Naguib. 2024. Rhizobacteria-priming improves common bean seeds germination under different abiotic stresses through improving hydrolysis and antioxidant enzymes kinetics parameters. *Rhizosphere*, 29: 100842.

37) Zhang, M., Zhuo, J. J., Wang, X., Wu, S. and X.F, Wang. 2010. Optimizing seed water content: relevance to storage stability and molecular mobility. *Journal of integrative plant biology*, 52: 324–33.

38) Zhang, Y., Xu, S., Yang, S. and Y, Chen. 2015. Salicylic acid alleviates cadmium-induced inhibition of growth and photosynthesis through upregulating antioxidant defense system in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.). *Protoplasma*, 252(3): 911-924.

21) Lehner, A., Mamadou, N., Poels, P., Come, D., Bailly, C. and F, Corbineau. 2008. change in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activityes in the embryo during aging in wheat grains. *Journal of Cereal Science*, 47(3): 555-565.

22) Liu, X., Quan, W. and D, Bartels. Stress memory responses and seed priming correlate with drought tolerance in plants: An overview. *Planta*, 255: 45.

23) Liu, Z., Ding, Y., Wang, F., Ye, Y. and C, Zhu. 2016. Role of salicylic acid in resistance to cadmium stress in plants. *Plant Cell Reports*, 35(4): 719-731.

24) Luck, H. 1962. Methods of enzymatic analysis. E.B. By Bergmeyer (1th edition), *Verlag chemie Weinheim*, 885-894.

25) Minami, M. and H, Yoshikawa, 1979. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clinival and Chimical Acta,* 92: 337–342.

26) Mira, S., Estrelles, E. and M.E, González-Benito. 2015. Effect of water content and temperature on seed longevity of seven Brassicaceae species after 5 years of storage. *Plant Biology,* 17: 153–162.

27) Moller, I.M., Jensen, P.E. and A, Hansson. 2017. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review in Plant Bioligy*, 58: 459–481.

28) Nouairi, I., Jalali, K., Zribi, F., Barhoumi, F., Zribi, K. and H, Mhadhbi. 2019. Seed priming with calcium chloride improves the photosynthesis performance of faba bean plants subjected to cadmium stress. *Photosynthetica*, 57(2): 438-445.

29) Oliveira, J.T.A., Andrade, N.C., Martins-Miranda, A.S., Soares, A.A., Gondim, D.M.F. and J.H, Araujo. 2012. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Physiology and Biochemistry,* 51: 145–152.

30) Raskin, I. 2022. Role of salicylic acid in plants. An. Rev. *Plant Physiology*, 43: 168-160.

31) Resenda, M.L.V., Nojosa, G.B.A., Cavalcanti, L.S., Aguilar, M.A.G., Silva, L.H.C.P., Perez, J.O., Sairam, P.K., Deshmukh, P.S. and D.S, Shukla. 2017. Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased