مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۳، ۱۳۸۹ (۵۵۴-۵۴۵)

بررسی پراکسیداسیون چربی‌ها و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در بذر گلرنگ تحت شرایط پیری طبیعی و مصنوعی

اعظم زمانی[۱]*، سید احمد سادات نوری[۲]، رضا توکل افشاری[۳]، حمید ایران نژاد[۴]، غلام علی اکبری[۵] و افشین توکلی[۶]
۱، ۲، ۴، ۵، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران و استادیار پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
۳، دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۶، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
(تاریخ دریافت: ۸۸/۱/۱۸ - تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۲۹)

چکیده

این آزمایش به منظور شناخت مکانیسم‌های پیری بذرهای گلرنگ انجام شد که در آن از تیمارهای پیری طبیعی (انبارداری معمولی به مدت ۶ سال)، پیری مصنوعی (نگهداری در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد به مدت ۴، ۸ و ۱۲ روز) و بدون پیری استفاده شد. نتایج آزمایش نشان داد که درصد جوانه‌زنی، بنیه گیاهچه و فعالیت سه آنزیم آنتی‌اکسیدانت کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز بر اثر تیمار پیری مصنوعی و طبیعی کاهش یافت و محتوی مالون‌دی‌آلدهاید (MDA) بذر و جنین، میزان نشت الکترولیت‌ها از بذر و جنین همچنین میانگین زمان جوانه‌زنی بر اثر تیمار پیری مصنوعی و طبیعی افزایش یافت. همچنین بر اثر تیمار پیری مصنوعی و طبیعی میانگین زمان جوانه‌زنی افزایش یافت که این افزایش در تیمار پیری طبیعی از کلیه تیمارها بیشتر بود. در تیمار پیری مصنوعی با افزایش مدت زمان پیری اثرات تیمار شدیدتر بود به طوری که درصد جوانه‌زنی در تیمار بدون پیری، ۴، ۸ و ۱۲ روز پیری به ترتیب ۹۴، ۶۴، ۵۶ و ۴۱ درصد بود. آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به دو آنزیم دیگر حساسیت بیشتری نسبت به تیمارهای مختلف پیری نشان داد و درصد کاهش فعالیت آن در شرایط پیری از دو آنزیم دیگر بیشتر بود. میزان فعالیت هر سه آنزیم آنتی اکسیدانت با محتوی MDA بذر و جنین همبستگی منفی و معنی‌داری نشان داد و بیانگر این است که با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در تیمارهای پیری میزان گونه‌های فعال اکسیژن افزایش یافته که موجب افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها شده است که احتمالاً بر اثر پراکسیداسیون چربی‌ها و تخریب غشاءهای سلول، درصد جوانه‌زنی و بنیه بذر کاهش یافته است. تخریب غشاءهای سلول موجب افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذر و جنین شده که همبستگی قوی و منفی بین نشت الکترولیت‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نشانگر این مسئله است. به طور کلی کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌تواند یکی از مکانیسم‌های فیزیولوژیکی دخیل در زوال بذر تحت شرایط پیری طبیعی و مصنوعی باشد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداسیون چربی، آنزیم های آنتی اکسیدانت، پیری بذر، گلرنگ.

* نویسنده مسئول: اعظم زمانی تلفن: ۰۹۱۲-۵۹۶۳۹۰۵ E-mail: a_zamani61@yahoo.com

مقدمه

در طی انبارداری با گذشت زمان به تدریج قوه حیات و توان جوانه‌زنی بذرها کاهش می‌یابد (Verma et al., 2003). زوال بذر در طی انبارداری باعث کاهش کیفیت بذر، استقرار گیاهچه و در نهایت عملکرد گیاه در مزرعه خواهد شد (McDonald, 1999). کاهش کیفیت بذر به شدت تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند دمای محیط، محتوی رطوبت بذر و رطوبت نسبی محیط قرار می‌گیرد (Priestly, 1986). تغییرات مختلف بیوشیمیایی و متابولیکی در طی فرایند پیری بذر رخ می‌دهد که نتیجه نهایی آن کاهش توان جوانه‌زنی و نمو بذر است (McDonald, 1999). در فیزیولوژی بذر گونه‌های فعال اکسیژن شامل پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال سوپراکسید (O^-_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH.) معمولاً به عنوان مولکول‌های سمی مورد توجه‌اند که تجمع آنها باعث پراکسیداسیون چربی‌ها، غیر فعال شدن آنزیم‌ها، خسارت به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاءهای سلول می‌شود (McDonald, 1999 ; Bailly, 2004). خسارت به غشاءهای سلول به عنوان عامل اصلی زوال بذرهای انبار شده شناخته شده است (McDonald, 1999). در طول دوره انبارداری در حالی که محتوی رطوبتی بذر پائین است اکسیداسیون خود به خود چربی‌ها موجب تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (Bailly, 2004; McDonald, 1999). در طی فرایند جوانه‌زنی در حالی که محتوی رطوبتی بذر افزایش می‌یابد گونه‌های فعال اکسیژن بر اثر فعالیت تنفسی در میتوکندری یا فعالیت گلی‌اکسی‌زوم‌ها تولید می‌شوند. همچنین در زمان جوانه‌زنی گونه‌های فعال اکسیژن که در زمان خشک بودن بذر تولید شده و در بافت‌های مختلف بذر محبوس شده‌اند آزاد می‌شوند (Bailly, 2004). افزایش تولید و آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن موجب افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌های غشاء شده در نتیجه ساختار غشاءهای سلولی به هم خورده و غشاءها سلامت خود را از دست می‌دهند در نتیجه میزان نشت الکترولیت‌ها از سلول افزایش می‌یابد (Goel & Sheoran, 2003; McDonald, 1999).

میزان تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در زمان جوانه‌زنی به وسیله میزان تولید و آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن همچنین فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی تعیین می‌شود که تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی تعیین‌کننده میزان خسارت وارده توسط گونه‌های فعال اکسیژن است (Goel & Sheoran, 2003; Bailly et al.,1996). در بذرهای پیر به علت اختلالات ایجاد شده در ارگان‌های سلول مانند میتوکندری و گلی‌اکسی‌زوم‌ها میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد (Bailly, 2004).

سیستم آنتی‌اکسیدانتی شامل آنزیم‌ها و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانت باعث حذف گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند. متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانت مانند آسکوربیک اسید، گلوتاتیون (GSH)، ویتامین E و دیگر ترکیبات است که به ویژه در بذرهای خشک نقش بیشتری دارند (Bailly, 2004). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون رداکتاز و آنزیم‌های دیگر باعث حذف و غیرفعال شدن گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (Bailly, 2004; McDonald, 1999). آنزیم کاتالاز (CAT) به طور مستقیم باعث تجزیه پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) می‌شود (Jiang& Huang, 2001). آنزیم پراکسیداز (POD) با استفاده از مواد فنولیک به عنوان دهنده الکترون باعث تجزیه پراکسیدهیدروژن می‌شود (Noctor & Foyer, 1998) و آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در چرخه گلوتاتیون- آسکوربات با استفاده از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون موجب تجزیه پراکسیدهیدروژن می‌شود (Noctor & Foyer, 1998) که با حذف پراکسید هیدروژن علاوه بر کاهش خسارت ناشی از آن مانع تشکیل رادیکال خطرناک هیدروکسیل از پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید در طی واکنش هابر- وایس می‌شوند (Sung, 1996; McDonald, 1999).

بذر گلرنگ دارای حدود ۳۵ درصد روغن است که روغن آن حاوی ۷۶/۷ درصد اسید چرب لینولئیک،۱۶/۴ درصد اسید چرب اولئیک، ۰/۳ درصد اسیدچرب لینولنیک و ۶/۶ درصد سایر اسیدهای چرب است (Zeinali, 1999).

بذرهای روغنی از جمله گلرنگ که حاوی مقادیر قابل توجهی اسید چرب لینولئیک می‌باشند بسیار مستعد زوال هستند (Goel & Sheoran, 2003).

شناخت مکانیسم‌های پیری در بذرها می‌تواند به یافتن راه‌حل‌هایی برای جلوگیری یا کند کردن زوال بذرها کمک کند. مکانیسم‌های پیری در بذرهای گلرنگ در مطالعات دیگر مورد بررسی قرار نگرفته است و هدف از انجام این تحقیق بررسی پراکسیداسیون چربی‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت CAT، POD و APX در بذرهای پیر شده گلرنگ در شرایط طبیعی و مصنوعی بود و از اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدهاید به عنوان روشی آسان جهت برآورد میزان پراکسیداسیون چربی‌ها استفاده می شد.

مواد و روش‌ها

به منظور شناخت مکانیسم‌های پیری در بذر گلرنگ در شرایط پیری طبیعی و پیری مصنوعی از رقم محلی اصفهان استفاده شد. بذرهای مورد استفاده از بخش دانه‌های روغنی موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر واقع در کرج تهیه شد. بذرهای استفاده شده در تیمار پیری مصنوعی در مرداد ماه سال ۱۳۸۵ برداشت شده بودند. وزن هزار دانه آن ۳۵/۵ گرم و درصد روغن آن ۳۳/۲ درصد بود. بذرهای که به عنوان پیری طبیعی استفاده شدند در مرداد ماه سال ۱۳۷۹ برداشت شده بودند که در زمان برداشت وزن هزار دانه آنها ۳۵/۶ گرم، درصد روغن آنها ۳۳/۴ درصد و درصد جوانه‌زنی آنها ۹۵ درصد بود. بذرهای پیری طبیعی پس از برداشت و بوجاری کردن در شرایط اتاق به مدت ۶ سال نگهداری شدند.

تیمارهای پیری مصنوعی در رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد و دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد اعمال گردید. ابتدا بذرها را به منظور جلوگیری از حمله قارچها با پودر ویتاواکس ۳ درصد (w/w) آغشته و به صورت یکنواخت بر روی توری های سیمی استریل شده پخش شدند. سپس توری‌های سیمی درون جعبه قرار داده شدند و مقدار ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل ظرف ریخته و در دمای ۱ ± ۴۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. ظروف پس از گذشت ۴ ، ۸ و ۱۲ روز خارج و پس از شستشو بذرها توسط آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در معرض هوایی آزاد قرار داده شد تا کاملاً خشک شوند.

آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۴ تکرار و پنج تیمار پیری (سه تیمار پیری تسریع شده ۴، ۸ و ۱۲ روز پیری، پیری طبیعی و بدون پیری) انجام شد.

به منظور اندازه‌گیری درصد و میانگین زمان جوانه‌زنی، آزمون استاندارد جوانه‌زنی بر اساس ISTA[1] (1985) انجام گرفت. ابتدا بذرها توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد ضد عفونی شدند. سپس ۲۵ عدد بذر در هر پتری‌دیش استریل (قطر ۹ سانتی‌متر) بر روی کاغذ صافی قرار داده شد و مقدار ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد. پتری دیش‌های در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰ درصد به مدت ۷ روز قرار داده شد. تعداد بذرهای جوانه زده هر روز تا رسیدن به روز هفتم شمارش و یادداشت‌برداری شد. بذرهایی که طول ریشه چه آنها حداقل ۲ میلی‌متر بود به عنوان بذر جوانه زده در نظر گرفته شد. سپس درصد جوانه‌زنی و میانگین زمان جوانه‌زنی محاسبه شدند. میانگین زمان جوانه‌زنی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Bailly et al., 2000):

$$\frac{100[\Sigma ni]}{[ni \times ti]}$$

$$MTG=\frac{[n1\times1+(n2-n1)\times2+(n3-n2)\times3+\cdots+(n7-n6)\times7]}{n7}$$

که در این رابطه n1 تا n7 درصد جوانه‌زنی در روز اول تا هفتم و MTG[2] میانگین زمان جوانه‌زنی است.

شاخص بنیه گیاهچه پس از اندازه‌گیری طول گیاهچه با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

شاخص بنیه = درصد جوانه‌زنی × طول گیاهچه (cm) میانگین

به منظور اندازه‌گیری خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بذرهای کلیه تیمارها، ابتدا بذرها در پتری دیش‌های استریل قرار داده شده و مقدار ۷ میلی لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد و سپس در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد سپس بذرها جهت اندازه‌گیری صفات مختلف استفاده شدند.

1. International Seed Testing Association
2. Mean Time to Germination

به منظور اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از بذر و محور جنین طبق روش Tammela et al. (2005) عمل شد. ابتدا پوشش بذر (پریکارپ) را جدا کرده و در هر ظرف تعداد ۲۵ عدد بذر قرار داده و مقدار ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه به آن اضافه شد. ظروف در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس هدایت الکتریکی محلول با استفاده از دستگاه EC متر (inolab) قرائت شد. میزان نشت الکترولیت‌ها بر حسب میکروزیمنس بر سانتی متر در بذر محاسبه و گزارش شد.

برای اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها از محور جنین نیز مشابه بذرها عمل شد با این تفاوت که در هر ظرف ۵۰ عدد محور جنین قرار داده شد و میزان نشت الکترولیت‌ها بر حسب میکروزیمنس بر سانتی متر در هر محور جنین محاسبه و گزارش شد.

به منظور برآورد میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در بذر و محور جنین بذر، میزان تولید مالون دی‌آلدهاید در کل بذر و محور جنین براساس Heath & Packer (1968) اندازه‌گیری شد. پس از جداکردن پوشش بذر ۰/۵ گرم بذر را در هاون چینی کاملاً پودر کرده سپس ۴ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱درصد به آن اضافه شد و کاملاً هموژنیزه شد سپس مخلوط به مدت ۱۵دقیقه در ۱۲۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و ۲میلی‌لیتر از محلول روشناور آن جمع‌آوری شد. به محلول روشناور جمع‌آوری شده مقدار ۴ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد تیوباریتوریک اسید (TBA) حاوی ۲۰ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مخلوط را بلافاصله در حمام آب و یخ قرار داده تا کاملاً سرد شود. سپس مخلوط به مدت ۱۰دقیقه در ۱۰۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول روشناور آن جمع‌آوری شد. میزان جذب مخلوط در طول موج۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر مدل (Shimadzu UV-100) قرائت شد و پس از کسر میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب‌خاموشی (ε=155mM^{-1}cm^{-1}) میزان مالون دی‌آلدهید تولید شده محاسبه شد و برحسب میکرومول در گرم وزن تر بذر گزارش شد. اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدهاید در محور جنین نیز پس از جدا کردن جنین بذر مطابق روش بالا اندازه‌گیری شد.

به منظور تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در محور جنین ابتدا پوشش بذر و محور جنین را جدا کرده و سپس جنین‌های جدا شده را در فویل آلومنیومی پیچیده و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز کرده و نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری در دمای۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز ابتدا ۰/۱ گرم جنین را در هاون چینی به وسیله نیتروژن مایع کاملاً پودر کرده و سپس ۱ میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار فسفات سدیم (pH=۷) حاوی ۲ میلی‌مولار EDTA به آن اضافه شد. پس از یکنواخت کردن محلول به مدت ۱۵دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد بعد از آن محلول روشناور برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم برداشت شد. فعالیت آنزیم به روش Aebi (1984) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ مایکرولیتر عصاره استخراج شده بود. پس از اضافه کردن عصاره کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-100) قرائت شد. محلول جذب زمینه (Blank) شامل تمامی مواد بجز عصاره استخراج شده بود. میزان پراکسیدهیدروژن تجزیه شده با استفاده از ضریب‌خاموشی (ε=39.4mM^{-1}cm^{-1}) محاسبه شد. فعالیت ویژه آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

نحوه استخراج آنزیم پراکسیداز مانند آنزیم کاتالاز بود و فعالیت آن به روش Chance & Maehly (1955) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۱۰ میلی‌مولار گویاکول، ۱۵ میلی‌مولار پراکسیدهیدروژن و ۵۰ مایکرولیتر عصاره استخراج شده بود. پس از اضافه کردن عصاره، بلافاصله افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه قرائت شد. محلول جذب زمینه (Blank) شامل تمامی مواد بجز عصاره استخراج شده بود. میزان

تتراگویاکول تشکیل شده با استفاده از ضریب خاموشی (ε=26.6 $mM^{-1}cm^{-1}$) محاسبه شد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت مایکرومول تتراگویاکول تشکیل شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سکوربات پراکسیداز ابتدا ۰/۱ گرم جنین را با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی کاملاً پودر کرده سپس ۱میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱ درصد PVP (w/w)، ۰/۱ درصد Tritox x-100 و ۵ میلی‌مولار آسکوربات به آن اضافه شد و پس از یکنواخت کردن محلول به مدت ۱۵دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس محلول روشناور برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم برداشت شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم براساس روش Nakano& Asada (1981) انجام شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۵ میلی‌مولار آسکوربات، ۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ مایکرولیتر از عصاره استخراج شده بود. پس از اضافه کردن عصاره مخلوط واکنش را تکان داده و بلافاصله میزان کاهش جذب مخلوط واکنش در طول موج ۲۶۵ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. محلول جذب زمینه (Blank) شامل تمامی مواد به جز عصاره استخراج شده بود. میزان آسکوربات اکسیدشده با استفاده از ضریب خاموشی (ε=2.8 $mM^{-1}cm^{-1}$) محاسبه شد و فعالیت ویژه آنزیم براساس مایکرومول آسکوربات مصرف شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین بیان شد.

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول در عصاره‌های استخراج شده از روش Bradford (1976) استفاده شد. پس از استخراج هر آنزیم مقدار ۵۰ مایکرولیتر از عصاره استخراج شده به ۲۹۵۰ مایکرولیتر محلول برادفور اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

پس از اندازه‌گیری و محاسبات صفات ذکر شده، نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه واریانس و مقایسه میانگین شدند. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی نشان‌دهنده این است که با افزایش مدت زمان پیری مصنوعی درصد جوانه‌زنی بذرها کاهش یافت به طوری که درصد جوانه‌زنی از ۹۴ درصد در تیمار بدون پیری به ۴۱ درصد در تیمار ۱۲ روز پیری رسید (جدول ۱). در تیمار پیری طبیعی نیز درصد جوانه‌زنی کاهش یافت و به ۶۵ درصد رسید که نسبت به بذرهای بدون پیری کاهش معنی‌داری نشان داد و با تیمار ۴ روز پیری مصنوعی تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول۱). کاهش درصد جوانه‌زنی بر اثر پیری در اکثر تحقیقات مشاهده شده است. اگرچه مکانیسم‌های دقیق از دست رفتن قوه حیات بذر هنوز مشخص نشده ولی دلایل متعدد بیوشیمیایی و متابولیکی برای کاهش توان جوانه‌زنی بذرها عنوان شده است که از آن جمله می‌توان به پراکسیداسیون چربی‌ها و خسارت به غشاءهای سلولی همچنین آسیب به فرایند سنتز RNA، تخریب DNA، رسوب و غیر فعال شدن آنزیم‌ها اشاره کرد (Lehner et al., 2008; Murthy et al., 2003; Basra et al., 2003).

میانگین زمان جوانه‌زنی بر اثر تیمار پیری مصنوعی در تیمار ۱۲ روز پیری نسبت به بذرهای بدون پیری افزایش یافت ولی تیمارهای ۴ و ۸ روز پیری با تیمار بدون پیری تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول۱). میانگین زمان جوانه‌زنی در تیمار پیری طبیعی نسبت به بقیه تیمارها افزایش بیشتری نشان داد. افزایش مدت زمان جوانه‌زنی در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است (Basra et al., 2003; Verma et al., 2003; Goel et al., 2003). افزایش میانگین زمان جوانه‌زنی احتمالاً به دلیل وقفه‌ای است که در شروع فرایند جوانه‌زنی در بذرهای پیر شده ایجاد می‌شود. علت وقفه ایجاد شده احتمالاً این است که بذر برای تعمیر خسارت‌های وارد شده به غشاء و دیگر قسمت‌های سلول همچنین آغاز مجدد فعالیت سیستم آنتی اکسیدانتی و جلوگیری از بروز تنش اکسیداتیو نیاز به زمان دارد و تعمیر این خسارتها فقط پس از جذب آب توسط بذر امکان پذیر است. بنابراین مدت زمان لازم برای تکمیل فرایند جوانه‌زنی در بذرهای پیر افزایش می‌یابد که نتیجه آن کاهش سرعت

جوانه‌زنی است (Berjake & Villers, 1972; Priestly, 1986; Bailly et al., 1998, 2000).

شاخص بنیه گیاهچه از دیگر صفاتی بود که تحت تاثیر پیری بذر قرار گرفت. نتایج مقایسه بنیه گیاهچه نشان داد که تیمار پیری مصنوعی باعث کاهش بنیه گیاهچه شد و با افزایش مدت زمان پیری مصنوعی این کاهش شدیدتر بود. به طوری که در تیمار ۱۲ روز پیری شاخص بنیه گیاهچه به حداقل مقدار خود رسید (جدول۱). در بذرهای پیری طبیعی نیز شاخص بنیه گیاهچه کاهش یافت. کاهش شاخص بنیه گیاهچه ناشی از کاهش اجزاء آن یعنی درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه است که هر دو در شرایط پیری بذر کاهش یافتند.کاهش بنیه گیاهچه بر اثر پیری در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Sung & Jeng, 1994; Sung, 1996). Verma et al. (2003) در مطالعه بر روی کلم نشان دادند که بنیه گیاهچه با پارامترهای مزرعه‌ای مانند سرعت ظهور گیاهچه، درصد استقرار گیاهچه و عملکرد همبستگی بالا، مثبت و معنی‌داری دارد و کاهش بنیه گیاهچه بر اثر اعمال پیری تسریع شده باعث کاهش استقرار گیاهچه و در نهایت عملکرد دانه کلم خواهد شد. همچنین Basra et al. (2003) در مطالعه‌ای که بر روی بذرهای پنبه انجام دادند، دریافتند که تیمار پیری تسریع شده باعث کاهش درصد سبز شدن، رشد گیاهچه و کاهش سطح برگ گیاه می‌شوند. تیمار پیری تسریع شده با کاهش دادن بنیه گیاهچه باعث کاهش درصد سبز شدن و استقرار مناسب گیاهچه می‌شود که می‌تواند در نهایت عملکرد محصول را کاهش دهد. بذرها در زمان رسیدگی فیزیولوژیک دارای بالاترین میزان بنیه بذر هستند و نگهداری طولانی مدت آنها در شرایط طبیعی موجب کاهش تدریجی بنیه آنها می‌شود (Goel & Sheoran, 2003; Lehner et al., 2008). در مورد علت کاهش بنیه گیاهچه در طی انبارداری و پیری تسریع شده دلایل مختلفی عنوان شده که مهمترین آن افزایش پراکسیداسیون چربی بر اثر حمله رادیکال‌های آزاد است که باعث برهم خوردن ساختار غشاءهای سلولی می‌شوند (Bailly, 2004).

میزان نشت الکترولیت‌ها از بذر یکی از پارامترهای نشان‌دهنده سلامت غشاء است که در بیشتر مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج مقایسه میانگین نشت الکترولیت‌ها از بذر نشان‌دهنده این است که در تیمار پیری مصنوعی با افزایش مدت زمان پیری میزان نشت الکترولیت‌ها از بذر افزایش یافته است به طوری که این مقدار در تیمار ۱۲ روز پیری به حداکثر مقدار رسیده بود (جدول۱). میزان نشت الکترولیت‌ها از بذرهای پیر شده طبیعی نیز به شدت افزایش یافته بود که نشان‌دهنده خسارت زیاد وارده به غشاء سلول این بذرها است. افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذرهای پیر شده طبیعی و مصنوعی در مطالعات مختلف گزارش شده است (Goel & Sheoran, 2003; Basra et al., 2003; Goel et al., 2003; Verma et al., 2003). میزان نشت الکترولیت‌ها با درصد جوانه‌زنی (r=-۰/۹۲۹) و شاخص بنیه گیاهچه (r=-۰/۹۳۱) همبستگی منفی و بالایی نشان داد و با میانگین زمان جوانه‌زنی (r=۰/۵۴۹) همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). این همبستگی‌ها نشان‌دهنده این است که با افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذر توان جوانه‌زنی و رشد گیاهچه کاهش می یابد که با یافته‌های دیگر محققان مطابقت دارد (Basra et al., 2003). افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذر ناشی از برخی تغییرات ساختمانی غشاء سلول است که باعث از بین رفتن یکپارچگی غشاء می‌شود، در نتیجه قابلیت نفوذ پذیری غشاء افزایش یافته و میزان خروج الکترولیت‌ها و دیگر مواد از بذر افزایش یافته است (Goel & Sheoran, 2003). از جمله تغییراتی که در غشاء رخ می‌دهد و باعث افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذر می‌شود می‌توان به پراکسیداسیون چربی‌های غشاء سلولی اشاره کرد (Copeland & Mc Donald, 1985). از دست رفتن عملکرد غشاء و نشت مواد مختلف از سلول یکی از فاکتورهای اصلی مسئول کاهش پتانسیل جوانه‌زنی و رشد گیاهچه است (Goel & Sheoran, 2003; Woodstock et al., 1985). پراکسیداسیون چربی‌های غشاء از جمله عوامل اصلی است که باعث می‌شود ساختار غشاءهای سلولی بر هم خورده و نشت الکترولیت‌ها افزایش یابد. در این تحقیق نیز نتایج به دست آمده نشانه این است که با افزایش مدت زمان پیری مصنوعی میزان مالون‌دی‌آلدهاید (MDA) که نشان‌دهنده پراکسیداسیون چربی‌ها است افزایش یافته و

جدول ۱- نتایج مقایسات میانگین صفات مختلف فیزیولوزیک و بیوشیمیایی اندازه گیری شده در تیمارهای مختلف پیری در بذور گلرنگ

	درصد جوانه زنی	شاخص ویگور گیاهچه	میانگین زمان چرانه زنی (روز)	نشت الکترولیتها از بذر (مایکرو زیمنس در سانتی متر در بذر)	محتوی MDAبذر (نانو مول در گرم وزن تر)	نشت الکترولیتها از جنین (مایکرو زیمنس در سانتی متر در بذر)	محتوی MDA جنین (نانو مول در گرم وزن تر)	فعالیت آنزیم کاتالاز (مایکرو مول پراکسید هیدروژن در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)	فعالیت آنزیم پراکسیداز (مایکرو مول تتراگویاکول در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (مایکرو مول آسکوربات در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)
تیمارهای پیری										
بدون پیری	۹٤ a*	٤۱۰/٤۷ a	۱/۷۵ c	۲/۷۱ e	٤/۹۰۳ d	۰/۸۱ e	۱۲/۲٦ d	٤۷/۹۳ a	۵۳۳/۱ a	۳۲۰/۱ a
پیری طبیعی	٦۵ b	۲۱۱/۵۱ bc	۳/٤۲ a	۱۳/۷۹ b	۱۵/۱٤ b	۳/۷٦ c	۲۰/۵۷ b	۲۲/۹۰ c	۲۲٤/۱ c	۵۳/۲۱ c
٤ روز پیری	٦٤ b	۲۲۵/۰۵ b	۲/۰۳ c	۷/۵۱ d	۹/۲۰٤ c	۲/۷۵ d	۱٦/٤۵ c	۳٦/٦٤ b	٤۲۸/۵ b	۱٤٦/۱ b
۸ روز پیری	۵٦ c	۱٦۳/۹۱ c	۲/۰۹ c	۱۲/۲۷ c	۱۳/۹٤ b	٤/٦٤ b	۱۸/۲٦ bc	۱۷/۹۹ d	۱۳۸/۳ d	٦۳/۳٤ c
۱۲ روز پیری	٤۱ d	۹٦/۷ d	۲/٦۸ b	۱۸/۳٦ a	۲۰/۰٤ a	٦/۲٤ a	۲٦/۹٤ a	۹/۷۸ e	٦٦/٦٤ d	۲۱/۷۵ d

* میانگین های هر ستون که دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار ندارند.

جدول ۲- ضرایب همبستگی بین صفات مختلف اندازه گیری شده در تیمارهای مختلف پیری در بذور گلرنگ

	محتوی MDA بذر	محتوی MDA جنین	فعالیت آنزیم کاتالاز	فعالیت آنزیم پراکسیداز	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز	نشت الکترولیتها از بذر	نشت الکترولیتها از جنین	درصد جوانه زنی	میانگین زمان جوانه زنی
محتوی MDA جنین	/۷۱٤**	۱							
فعالیت آنزیم کاتالاز	-/۸۰۲**	-/٦۹۳**	۱						
فعالیت آنزیم پراکسیداز	-/۸۰۲**	-/۷۲۸**	/۹۱۰**	۱					
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز	-/۸۷۱**	-/٦۹٤**	/۹۲۳**	/۹۰۲**	۱				
نشت الکترولیتها از بذر	/۸۹۱**	/۷۵۷**	-/۹٤٤**	-/۹٤۲**	-/۹۵٤**	۱			
نشت الکترولیتها از جنین	/۸۵۵**	/٦۸۰**	-/۹٤۸**	-/۹۲۵**	-/۹٤۹**	/۹۷۳**	۱		
درصد جوانه زنی	-/۸٤۰**	-/٦۷۷**	/۹۳٦**	/۸٦۰**	/۸۹۹**	-/۹۲۹**	-/۹٤٤**	۱	
میانگین زمان جوانه زنی	/٦۱۷**	/۵٤۲*	-/٤٤۵*	-۰/٤۰۳	-/٦۱٤**	/۵٤۹*	/٤۷۸*	-۰/۳۲۹	۱
بنیه گیاهچه	-/۸۲۰**	-/٦٦۷**	/۹۱٤**	/۸۵۲**	/۹۰۲**	-/۹۳۱**	-/۹٤۲**	/۹٦۳**	-۰/۳۹٤

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد.

میزان MDA در بذرهای پیری طبیعی نیز نسبت به بذرهای بدون پیری به طور معنی‌داری بیشتر بود (جدول۱). افزایش همزمان نشت الکترولیت‌ها و محتوی MDA بذر در مطالعات دیگر گزارش شده و عنوان شده پراکسیداسیون چربی‌ها می‌تواند بخش قابل توجهی از افزایش نشت الکترولیت‌ها همچنین کاهش قابلیت جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را توضیح دهد (Chiu et al., 1995; Goel et al., 2003; Bailly, 2004; Sung, 1996; Gidrol et al., 1989). در این مطالعه نیز بین محتوی MDA و درصد جوانه‌زنی (r=-۰/۸۴۰) و بنیه گیاهچه (r=-۰/۸۲۰) همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد. همچنین محتوی MDA با میزان نشت الکترولیت‌ها از بذر (r=۰/۸۹۱) همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد (جدول۲)، که این همبستگی‌ها نشان‌دهنده رابطه بین پراکسیداسیون چربی‌ها و افزایش نشت الکترولیت‌ها بر اثر تخریب ساختار غشاء است که در نهایت موجب کاهش توان جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه شده است.

اگر لپه‌های بذر آسیب ببیند می‌تواند زنده بماند ولی اگر جنین شدیدا آسیب ببیند گیاهچه تشکیل نمی‌شود (Chiu et al., 1995). به همین دلیل خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی محور جنین و لپه‌ها جداگانه بررسی شد.

نتایج مقایسه میانگین نشت الکترولیت‌ها از محور جنین نشان‌دهنده این است که میزان نشت الکترولیت‌ها در تیمار پیری مصنوعی با افزایش مدت زمان پیری مصنوعی افزایش یافت و در ۱۲ روز پیری به حداکثر مقدار خود رسید (جدول ۱). در تیمار پیری طبیعی نیز میزان نشت الکترولیت‌ها به شدت افزایش یافت و به حدود ۴/۶ برابر بذرهای پیر نشده رسید (جدول ۱). در بیشتر مطالعات انجام شده میزان نشت الکترولیت‌ها در کل بذر مورد بررسی قرار گرفته است با این حال Chiu et al. (1995) با مطالعه بر روی بذرهای هندوانه و Stewart & Bewley (1980) با مطالعه بر روی بذرهای سویا گزارش کردند که میزان نشت الکترولیت محور جنین بر اثر پیری مصنوعی افزایش می‌یابد و با افزایش مدت زمان تیمار پیری، آسیب به غشاء سلول‌های جنین بیشتر شده و میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد. افزایش نشت الکترولیت‌ها از محور جنین در تیمارهای مختلف پیری با افزایش تولید MDA همراه بود. نتایج مقایسه میانگین MDA محور جنین نشان‌دهنده افزایش آن در تیمارهای پیری مصنوعی و پیری طبیعی است (جدول ۱) که افزایش تولید MDA ناشی از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در بذر است که می‌تواند ناشی از ضعف سیستم آنتی‌اکسیدانتی و یا افزایش تولید گون‌های فعال اکسیژن باشد (Bailly, 2004).

نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که فعالیت این آنزیم در تیمارهای مختلف پیری به شدت کاهش یافت و در تیمار ۱۲ روز پیری به حداقل مقدار خود رسید (جدول ۱). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز بر اثر پیری مصنوعی و طبیعی بذر در مطالعات دیگر گزارش شده است (Goel et al., 2003; Goel & Sheoran, 2003; Bailly et al., 1996; Lehner et al., 2008). همچنین Chiu et al. (1995) کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز را در مطالعه محور جنین بذرهای هندوانه بر اثر پیری مشاهده کردند.

نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان‌دهنده این است که افزایش مدت زمان پیری مصنوعی باعث کاهش بیشتر فعالیت آنزیم پراکسیداز شد. همچنین پیری طبیعی نیز فعالیت این آنزیم را نسبت به بذرهای پیر نشده کاهش داد (جدول۱). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز مانند آنزیم پراکسیداز بر اثر تیمارهای پیری کاهش یافت و در تیمار ۱۲ روز پیری به حداقل مقدار خود رسید (جدول۱). کاهش فعالیت این دو آنزیم در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Goel & Sheoran, 2003; Sung, 1996; Chiu et al., 1995; Sung & Jeng, 1994). میزان کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط پیری طبیعی و مصنوعی از آنزیم کاتالاز و پراکسیداز بیشتر بود که احتمالاً نشانه حساسیت بیشتر این آنزیم به پیری بذر است. در تیمار پیری طبیعی

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز کاهش بیشتری را نسبت به دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز نشان داد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت با محتوی MDA بذر و جنین همبستگی منفی و بالایی را نشان داد. همچنین همبستگی فعالیت این آنزیم‌ها با درصد جوانه‌زنی و بنیه گیاهچه مثبت و بالا بود (جدول ۲). با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در تیمارهای پیری میزان گونه‌های فعال اکسیژن در بذر افزایش می‌یابد که افزایش آنها باعث افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و دیگر ماکرومولکول‌های حیاتی سلول می‌شود که در نهایت موجب زوال بذر خواهد شد.

کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بر اثر پیری بذر به دلایل متعددی مانند آسیب رسیدن به سنتز RNA که در نهایت موجب کاهش تولید پروتئین خواهد شد، کاهش سنتز پروتئین‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، رسوب و غیرفعال شدن آنزیم‌ها اتفاق می‌افتد (Priestly, 1986; McDonald, 1999; Basra et al. 2003). علاوه بر آن اضافه شدن قندهای احیا شده به پروتئین‌ها که به صورت غیر آنزیمی صورت می‌گیرد و به واکنش مایلارد معروف است باعث غیرفعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در شرایط پیری بذر می‌شود (Murthy et al., 2003; Machado Neto et al., 2001). از دیگر دلایلی که برای کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت طی فرایند پیری بذر ذکر شده است، حمله گونه‌های فعال اکسیژن به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت است که در شرایط پیری افزایش یافته و موجب تخریب آنزیم‌ها می‌شود (Bailly, 2004).

در نهایت در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در بذرها به علت کاهش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانت، موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود که یکی از عوامل اصلی و مهم پیری و زوال بذرهای گلرنگ در هر دو شرایط پیری مصنوعی و طبیعی است که باعث کاهش توان جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گلرنگ می‌شود.

REFERENCES

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
2. Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer C. and P. M. Mullineaux. (eds), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants.* CRC Press, Boca Raton, London. pp. 77–100.
3. Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14:93-107.
4. Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. & Come, D. (1996). Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutas, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds a related to deterioration during accelerated aging. *Physioligia Plantarum*, 97, 104-110.
5. Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. & Come, D. (1998). Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. *Physiologia Plantarum*, 104, 646–652.
6. Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. & Come, D. (2000). Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Science Research*, 10, 35–42.
7. Basra, S. M. A., Ahmad, N., Khan, M. M., Iqbal, N. & Cheema, M. A. (2003). Assessment of cotton seed deterioration during accelerated ageing. *Seed Science and Technology*, 31, 531-540.
8. Berjake, P. & Villers, T. A. (1972). Aging in plant embryos: Acceleration of senescence following artificial aging treatment. *New Phtology*, 71, 513 – 518.
9. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizingthe principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
10. Chance, B. & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, 764–775.
11. Chiu, K. Y., Wang, C. S. & Sung, J. M. (1995). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associted with accelerated aging and hydration of watermelon seeds differing in ploidy. *Physioligia Plantarum*, 94, 441-446.
12. Copeland, L. O. & Mc Donald, M. B. (1985). *Principles of seed science and technology*. second edition, Minneapolis: Burgess Publishing.
13. Gidrol, H. Serghini, Noubhani, A., Mocouot, B. & Mazliak, P. (1989). Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidation and membrane damage. *Physioligia Plantarum*, 76, 591-597.

14. Goel, A. & Sheoran, I. S. (2003). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. *Biologia Plantarum*, 46(3), 429-434.
15. Goel, A., Coel, A. K. & Sheoran, I. S. (2003). Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1093-1100.
16. Heath, R. L. & Packer, I. (1968). Photoperoxidant in isolated chloroplast. I. Kinetics and stochiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
17. Jiang, Y. & Huang, B. (2001). Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Scince*, 41, 436–442.
18. Lehner, A., Mamadou, N., Poels, P., Come, D., Bailly, C. & Corbineau, F. (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.
19. Machado Neto, N. B., Custodio, C. C. & Takaki, M. (2001). Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Seed Science and Technology*, 29, 137-149.
20. McDonald, M. B. (1999). Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. *Seed Science and Technology*, 27, 177-237.
21. Murthy, U. M. N., Kumar, P. P. & Sun, W. Q. (2003). Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiate* (L.)Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *Journal of Exprimental Botany*, 54, 1057-1067.
22. Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22 (5), 867-880.
23. Noctor, G. & Foyer, C. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249–279.
24. Priestly, D. A. (1986). *Seed aging: Implication for seed storage and persistence in the soil*. Cornell University Press. Ithaca, NY.
25. Stewart, R. C. R. & Bewley, D. (1980). Lipid peroxidation associted with accelerated aging of soybean Axes. *Plant Physiology*, 62, 245-248.
26. Sung, J. M. (1996). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. *Physioligia Plantarum*, 97, 85-89.
27. Sung, J. M. & Jeng, T. L. (1994). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associted with accelerated aging of peanut seed. *Physioligia Plantarum*, 91, 51-55.
28. Tammela, P., Vaananen, P. S., Lakso, I., Hopia, A., Vourela, H. & Nygrem, M. (2005). Tocopherols, tocoterienols and fatty acids as indicators of natural ageing in *Pinus syluestris* seeds. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 20, 378-384.
29. Verma, S. S., Verma, U. & Tomer, R. P. S. (2003). Studies on seed quality parameters in deterioration seeds in Brassica (*Brassica campestris*). *Seed Science and Technology*, 31, 389-398.
30. Woodstock, L.W., Furman, K. & Leffler, H. R. (1985). Relationship betweenweathering deterioration and germination, respiratory metabolism and mineral leaching from cotton seeds. *Crop Science*, 25, 459-466.
31. Zeinali, E. (1999). *Safflower (characteristics, production and utilization)*. Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources Press. (In Farsi).