مقاله پژوهشی

بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و شاخصه‌های قدرت بذر کلزا با پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک و صمغ عربی

محمد قادری و علی‌اصغر علیلو*

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

(تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۵/۳۱، تاریخ پذیرش نهایی:۱۴۰۱/۰۸/۲۴)

چکیده

فرسودگی از تغییرهای برگشت ناپذیر بذر است که می‌تواند قوه نامیه آن را تهدید کند. پیش‌تیمار بذر از جمله روش‌هایی است که با اصلاح ساختار و عملکرد بذر، قدرت بذور فرسوده را بهبود می‌دهد. در این راستا، ابتدا بهترین ترکیب پیش‌تیماری اسید سالیسیلیک، تیواوره و صمغ عربی برای صفات جوانه‌زنی و گیاهچه بذر فرسوده کلزا رقم اکاپی انتخاب شد. سپس با استفاده از طرح‌های آزمایشی مجدداً اثر آن روی شاخص‌های جوانه‌زنی، رشد گیاهچه، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GP) و آلفا- آمیلاز (α-amylase) بررسی شد. نتایج طرح تاگوچی ترکیب یک میلی-مولار اسید سالیسیلیک و ۰/۷۵ درصد صمغ عربی را به‌عنوان تیمار منتخب معرفی کرد که اثربخشی آن در آزمایش‌های بعدی تأیید شد. اثر تحریک‌کنندگی این تیمار بر صفات سرعت جوانه‌زنی، طول و وزن ریشه‌چه و گیاهچه نسبت به تیمار شاهد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود به‌طوری‌که، طول و وزن گیاهچه را به ترتیب ۳۰ و ۶۰ درصد افزایش داد. نتایج آنزیمی نشان داد، فعالیت آنزیم‌های SOD، APX و α-amylase به‌طور معنی‌دار (P≤0.01) تحت تأثیر تیمار منتخب قرار گرفت و سطح فعالیت آن‌ها به ترتیب ۱۴، ۲۲/۷ و ۵/۵ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. در کل، پیش‌تیمار بذور کلزا با ترکیب اسید سالیسیلیک و صمغ عربی می‌تواند با تحریک سیستم دفاعی و انتقال مواد ذخیره‌ای موجب تسریع در جوانه‌زنی و تشکیل گیاهچه قوی شود. تقویت این عوامل می‌تواند شرایط لازم جهت استقرار بهینه گیاه کلزا را در شرایط محیطی متغیر فراهم کند.

کلمات کلیدی: آلفا آمیلاز، پرایمینگ، تنظیم‌کننده رشد، رشد گیاهچه

مقدمه

به دنبال روند رشد جمعیت جهانی، تولید محصولات غذایی باید به بیش از ۷۰ درصد سطح فعلی تا سال ۲۰۵۰ افزایش می‌یابد. در این بین هدف‌گذاری برای تولید دانه‌های روغنی به دلیل نیاز به روغن خوراکی، پروتئین و استفاده‌های صنعتی بعد از غلات مورد توجه جدی قرار گرفته است. کلزا (*Brassica napus* L.) گیاهی یک‌ساله از خانواده Brassicaceae است که اهمیت ویژه‌ای در تولید روغن خوراکی باکیفیت دارد. این گیاه به دلیل خصوصیات کیفی و زراعی بسیار مناسب پس از سویا به رتبه دوم در تأمین روغن خوراکی رسیده است (Vinnichek *et al.*, 2019). تولید گیاهان عموماً در محیط‌های تنش‌زا صورت می‌گیرد که در نتیجه عملکرد اقتصادی آن‌ها از پتانسیل

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: aliasghar.aliloo@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

عملکرد فاصله می‌گیرد. با توجه به اینکه اثر تنش‌های محیطی روی مراحل مختلف زندگی گیاه متفاوت است بنابراین، اثر محیط باید به صورت مجزا در هر دوره زندگی مطالعه شود.

مرحله جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه دارای نقش حیاتی در چرخه زندگی گیاهان زراعی است. از عوامل محدودکننده این مرحله می‌توان به عوامل درونی بذر و عوامل محیطی اشاره کرد. فرسودگی یکی از عوامل درونی است که تحت تأثیر عوامل محیطی تسریع می‌شود. فرسودگی فرآیندی غیرقابل برگشت و متفاوت در بین توده‌های بذری است. بذور روغنی به علت دارا بودن اسیدهای چرب بالا سرعت فرسودگی بیشتری دارند (Coolbear, 2020). یکی از عوامل تسریع فرسودگی در بذور روغنی به‌ویژه کلزا، پراکسیداسیون اسیدهای چرب در اثر تهاجم رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که در طول انبارداری تشدید می‌شود (Xu *et al*., 2016). یکی از مهم‌ترین اثرات فرسودگی، آسیب به ساختمان اسیدهای نوکلئیک و کاهش فعالیت آنزیم‌ها است که اثرات بالینی آن با کاهش درصد، سرعت جوانه‌زنی و استقرار ضعیف گیاهان زراعی آشکار می‌شود (Coolbear, 2020). بنابراین راهکارهایی که سرعت فرسودگی را کاهش می‌دهند و یا کارایی بذور فرسوده را در هنگام استقرار بهبود می‌بخشند مورد استقبال مصرف‌کنندگان بذر است. به همین منظور تیمارهای بذری و روش‌های بهینه‌سازی آن‌ها در جهت بهره‌برداری هر چه بهتر از توانایی‌های بذر در حال توسعه هستند.

یکی از روش‌های پرکاربرد در این زمینه پیش‌تیمار بذر یا پرایمینگ بذر(Seed priming) است. در این روش جذب آب تا قبل از خروج ریشه‌چه اتفاق می‌افتد سپس بذور به رطوبت اولیه خود، برگردانده می‌شوند. درحالی‌که فعالیت متابولیسم‌های جوانه‌زنی شروع شده و در وضعیت آمادگی قرار می‌گیرند (Ibrahim, 2016, Farooq *et al*., 2006). پرایمینگ با افزایش درصد، سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی و همچنین رفع خواب بذر، استقرار گیاهان را بهبود می‌بخشد (Malek *et al*., 2019). لازم به ذکر است این روش با آب، مواد معدنی، مواد آلی و یا به صورت ترکیبی از آن‌ها انجام می‌شود. به همین خاطر روش‌های پیش‌تیمار آبی (Hydro priming)، پیش‌تیمار اسمزی (Osmo priming)، پیش‌تیمار شوری (Halo priming)، پیش‌تیمار با مواد مغذی (Nutrient priming)، پیش‌تیمارهای هورمونی (Hormone priming) و پیش‌تیمار مواد شیمیایی (Chemical priming) توسعه یافتند (Zhu *et al*., 2021; Waqas *et al*., 2019).

پیش‌تیمار بذر با مواد آلی و هورمون‌های رشد با افزایش سرعت جوانه‌زنی و سبزشدن باعث تثبیت تراکم و افزایش عملکرد گیاهان زراعی در شرایط مختلف می‌گردد (Kaya *et al*., 2020). کنترل گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) به اختصار ROS، یکی از دلایل اصلی بهبود صفات ذکر شده است. گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های آزاد اکسیژن (سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) و هیدروکسیل (OH^-)) و همچنین غیر رادیکال‌ها (پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و اکسیژن منفرد (O_2)) هستند که در اثر فرسودگی بذر تولید می‌شوند و طیف وسیعی از آسیب‌ها را به مولکول‌های حیاتی وارد می‌کنند (Jeevan Kumar *et al*., 2015). این مولکول‌ها دارای عملکرد دوگانه‌ای در بذور هستند. در غلظت‌های بالا، باعث آسیب به ساختار و عملکرد سلول‌ها و در غلظت‌های پایین به عنوان پیام‌رسان ثانویه در واکنش به جوانه‌زنی و پاسخ به محیط عمل می‌کنند (Sachdev *et al*., 2021). عموماً احیا O_2^- در حضور آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) باعث تولید یک مولکول اکسیژن و پراکسید هیدروژن می‌شود. پراکسید هیدروژن به دلیل پایداری بالا دارای فراوانی بیشتری نسبت به سایر ROSها است که در حضور Fe^{2+} باعث تولید رادیکال هیدروکسیل می‌شود. پراکسید هیدروژن اکثر آنزیم‌ها را با اکسید کردن گروه تیولی آنها غیرفعال می‌کند. از سوی دیگر رادیکال هیدروکسیل توانایی برهمکنش با تمامی ماکرومولکول‌های بیولوژیکی را طی فرآیندهای انبارداری و جوانه‌زنی دارد (Rane *et al*., 2021). بنابراین در صورت افزایش و تجمع، کاهش قوه‌نامیه و قدرت‌نامیه بذر و در نهایت مرگ سلول را منجر خواهند شد (Petla *et al*., 2016). براساس تحقیقات صورت گرفته در مورد پیش‌تیمار بذور روغنی با اسید سالیسیلیک، گزارش شده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

است که این پیش‌تیمار شدت فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز به عنوان دو آنزیم مهم در سیستم دفاعی گیاهان در شرایط تنش سرما و خشکی افزایش داده است (Zhu *et al*., 2021). اثرات افزایشی این پیش‌تیمار روی فعالیت آنزیمی و کاهش اثرات نامطلوب زوال در صفات جوانه‌زنی و بهبود شرایط استقرار گیاهچه در مورد سویا (*Glycine max* L.) نیز گزارش شده است (Nazari *et al*., 2020). در مورد سایر گیاهان زراعی نیز مطالعه‌ها نشان می‌دهد پیش‌تیمارهای آلی باعث افزایش فعالیت سیستم دفاعی بذر می‌شوند برای مثال پیش‌تیمار براسینواستروئید (Brassinosteroids) در بذر برنج (*Oryza sativa* L.) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز شده است (Basit *et al*., 2022). پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک روی بذر نخود (*Cicer arietinum* L.) (Kaur *et al*., 2022) و گندم (*Triticum aestivum* L.) (Azmat *et al*., 2020) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های APX، SOD، POD و CAT در شرایط تنش شده است. اثرات مشابهی در مورد پیش‌تیمار بذور ماش (*Vigna radiata* L.) توسط اسید سالیسیلیک گزارش شده است (Roychoudhury *et al*., 2016). پیش‌تیمار نیترات پتاسیم، اسید سالیسیلیک و دی‌اکسید سیلیکون روی برنج فعالیت کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را به بیش از دو برابر افزایش داد (Ali *et al*., 2021).

آلفا-آمیلاز از مهم‌ترین آنزیم‌های جوانه‌زنی است که متابولیسم آن در اثر فرسودگی مختل می‌شود. این آنزیم تحت تأثیر پیش‌تیمارهای بذری قرار می‌گیرد. براساس گزارش (Farooq *et al*., 2020) پیش‌تیمار بذر لوبیا چشم بلبلی باعث افزایش ۷۸ درصدی فعالیت آلفا-آمیلاز شد. همچنین پیش‌تیمار آبی و اسمزی بذر برنج تحت تأثیر تنش باعث متابولیسم بهتر نشاسته به ویژه افزایش فعالیت آلفا-آمیلاز شد (Zheng *et al*., 2016). اثر پیش‌تیمار سلنیوم روی برنج (Khaliq *et al*., 2015) و پیش‌تیمار پلی‌اتیلن گلیکول در بذر سورگوم (*Sorghum bicolor* L. Moench) نیز باعث افزایش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز شده است (Tounekti *et al*., 2020). درکل شروع فعالیت‌های آنزیمی یا افزایش فعالیت آن‌ها یکی از اهداف اصلی در استفاده از این روش‌ها می‌باشد که در اغلب مطالعه‌ها به آن اشاره شده است.

از ترکیبات آلی دیگر که در هنگام پیش‌تیمار برای بهبود قدرت بذر استفاده می‌شود می‌توان به تیو اوره اشاره کرد. گزارش‌های موجود نشان می‌دهد استفاده از این ترکیب شیمیایی باعث بهبود شاخصه‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در بذر ماش در شرایط تنش شوری و کم آبی شده است (Jhanji and Dhingra, 2020). مطالعه جالب توجه دیگر نشان می‌دهد تیوه اوره یک اثر افزایشی در ترکیب با کلرید پتاسیم، اسید جیبرلیک و اسید سالیسیلیک در جوانه‌زنی و استقرار گیاه برنج تحت تنش کم آبی ایفا می‌کند (Mahadi *et al*., 2020). همچنین نتایج پیش‌تیمار با مشتقات اوره روی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه *Nothofagus glauca* امیدبخش بوده است (Cabello *et al*., 2019). در کنار اثربخشی تیواوره در تحریک جوانه‌زنی و بهبود رشد اولیه بذور گیاهان علفی، اثر آن بر بذر درختان خانواده مرکبات به همراه اسید جیبرلیک نیز گزارش شده است (Yadav *et al*., 2022). با توجه به بررسی‌ها به نظر می‌رسد در صورت کاربرد تیو اوره به همراه سایر تنظیم‌کننده-های رشد می‌تواند اثر بزرگی بر شاخصه‌های جوانه‌زنی داشته باشد. صمغ عربی یکی از پرکاربردترین حامل‌های عوامل زیستی و غیرزیستی در هنگام پیش‌تیمار بذر است. این پلیمر طبیعی حاوی ترکیبات شیمیایی پتاسیم، کلسیم، منیزیم، و گروه‌های مختلف کربوهیدرات (آرابینوز، گالاکتوز) همراه با گلیکوپروتئین و پلی‌ساکارید است. این ماده به راحتی به پوسته بذور می‌چسبد و ضمن انتقال عوامل پیش‌تیمار، خود نیز به دلیل ماهیت پیچیده شیمیایی که دارد بر فیزیولوژی بذر و گیاهچه در هنگام جوانه‌زنی و رشد اولیه تأثیر می‌گذارد (Ali *et al*., 2009).

با توجه به بررسی‌های صورت گرفته و به علت محدود بودن پژوهش‌های موجود در مورد پیش‌تیمار اسید سالسیلیک، تیواوره و صمغ عربی روی بذر فرسوده گیاه کلزا در این

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

آزمایش ابتدا سعی شد بهترین ترکیب تیماری با استفاده از تابع تاگوچی از روی پاسخ‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه تعیین شود و در گام بعدی وضعیت فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به همراه آنزیم آلفا-آمیلاز در ترکیب تیماری منتخب در مقایسه با شاهد روی بذور فرسوده و غیرفرسوده بررسی شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه روی بذر و گیاهچه کلزا رقم اکاپی تحت تأثیر پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک، تیواوره، صمغ عربی و پیش‌تیمار آبی انجام شد. بذر مورد استفاده از آزمایشگاه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه تهیه شد. این رقم تحمل نسبی به شوری داشته و از سازگاری و عملکرد بالا در تمام مناطق سرد و معتدل برخوردار است. بذور با دو درجه متفاوت فرسودگی براساس طول انبارداری جهت آزمایش انتخاب شدند. بذور فرسوده محصول سال ۱۳۹۸ و بذور غیرفرسوده محصول سال ۱۴۰۰ بودند. لازم به ذکر است شرایط نگهداری بذور بعد از تولید به صورت فضای باز و در محیط آزمایشگاه بود. قبل از شروع آزمایش طی دو نمونه قوه‌نامیه هر طبقه، طبق آزمون استاندارد جوانه‌زنی بررسی شد. برای تعیین نوع ترکیب تیماری و غلظت مناسب آن با استفاده از تابع تاگوچی آزمایشی روی بذور فرسوده طراحی شد. این تابع با کاهش چشمگیر در ترکیبات مختلف و تکرار آزمایش‌های فاکتوریل باعث کاهش در زمان و هزینه اجرای آزمایش‌ها می‌گردد. توابع مورد استفاده در این آزمایش به شرح زیر است:

$$LB(\,Larger\ is\ better\,)_{(i)} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\left(\frac{1}{y_i}\right)^2$$

$$SN(\,Signal\ to\ noise\,)_{(i)} = -10 \times \log\left(LB_i\right)$$

در این توابع؛ n برابر با تعداد تکرار، y_i: برابر با مقدار پاسخ شاخص قدرت بذر به تیمار یا ترکیب تیماری خاص است.

هدف اصلی این تابع به حداکثر رساندن یا به حداقل رساندن مقدار تیمار وابسته در فرآیند بهینه‌سازی است (Taguchi, 1995). بهینه‌سازی پیش‌تیمار بذر، معمولاً نیازمند به اجرای فاکتورهای متعدد با سطوح بالا است که در این مطالعه درصورت اجرای آزمایش فاکتوریل برای سه فاکتور اسید سالیسیلیک، صمغ عربی و تیواوره با پنج سطح و در چهار تکرار نیازمند به ۵۰۰ پلات آزمایشی بود که با اجرای روش تاگوچی تعداد پلات آزمایشی به ۲۵ عدد کاهش یافت.

بهینه‌سازی با سه پیش‌تیمار شامل اسید سالیسیلیک در پنج سطح صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار، صمغ عربی در پنج سطح صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد و تیمار تیواوره در پنج سطح صفر (شاهد)، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌مولار انجام شد. پیش‌تیمار به صورت خیساندن بذر در تیمار یا ترکیب تیمارها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج ساعت در شرایط بدون نور انجام شد. صفات مورد ارزیابی در این مرحله شامل درصد جوانه‌زنی و صفت رشد گیاهچه‌ای بود که از تست جوانه‌زنی به روش پتری‌دیش حاصل شد. با توجه به اهمیت قدرت‌نامیه و قوه‌نامیه از ترکیب هر دو صفت طبق فرمول زیر شاخص قدرت بذر استخراج شد و این صفت در تجزیه تابع تاگوچی مورد استفاده قرار گرفت.

شاخص قدرت بذر = (درصد جوانه‌زنی × طول گیاهچه)×۱۰۰

بعد از تعیین بهترین ترکیب (غلظت یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک + ۰/۷۵ درصد صمغ عربی) به‌وسیله تابع تاگوچی، آزمایش تأیید نتایج آن به‌صورت طرح کرت‌های کاملاً تصادفی در چهار تکرار روی بذور فرسوده مجدداً انجام شد. لازم به ذکر است که به علت غیرمعنی‌دار شدن اثر تیمار تیواوره، این تیمار از بررسی‌های بعدی حذف شد (جدول ۱) و پیش‌تیمار آبی نیز به عنوان کنترل به آن اضافه شد.

آزمون جوانه‌زنی و رشد گیاهچه: تست جوانه‌زنی براساس قوانین ایستا (ISTA- International Seed Testing Association) با ۱۰۰ بذر در چهار تکرار طبق روش آماری ذکر شده انجام شد. برای ضدعفونی، بذور ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری شست‌وشو داده شدند. در مرحله بعد بذور ۲۰ الی ۳۰ دقیقه درون هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی شده و سپس به مدت پنج دقیقه آب‌شویی زیر آب

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

جدول ۱- نتایج حاصل از تابع تاگوچی برای پاسخ صفت قدرت شاخص بذر به تیواوره، اسید سالیسیلیک و صمغ عربی

سطح تیمار	تیواوره	سالسیلیک اسید	صمغ غربی
یک	۸۴/۴۲	۷۱/۸۳	۷۳/۲۵
دو	۷۷/۶۳	۷۲/۹۸	۷۲/۱۶
سه	۷۶/۵۴	۸۱/۹۱	۶۹/۳۹
چهار	۷۴/۴۳	۷۷/۲۰	۹۰/۰۸
پنج	۷۹/۵۱	۸۸/۶۰	۸۷/۶۴
Delta	۹/۹۸	۱۶/۷۷	۲۰/۶۹
رتبه	سه	دو	یک
		ANOVA	
	ns	+	*

سطح تیمار یک الی پنج به ترتیب برای صمغ عربی (شاهد، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵ و یک درصد)، اسید سالیسیلیک (شاهد، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵ و یک میلی‌مول) و تیوه‌اوره (شاهد، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌مول)؛ ns، غیر معنی‌دار؛ *، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد؛ **، معنی-دار در سطح احتمال یک درصد و + معنی‌دار در سطح احتمال ۱۰ درصد است. اعداد مشخص‌شده نشان‌دهنده بهترین سطح تیمار برای گزینش ترکیب تیماری است. Analysis of variance (ANOVA) تجزیه واریانس همراه با سطح معنی‌داری برای هر صفت.

جاری انجام شد. ادامه‌ی ضدعفونی در زیر هود لامینار قبلاً استریل شده انجام گرفت، بذور به مدت ۳۰ ثانیه درون الکل ۷۰ درصد به‌طور مداوم هم‌زده شد و بعد پنج بار به فاصله یک دقیقه با آب‌مقطر اتوکلاو شده، آب‌شویی شدند. کشت در شرایط استریل انجام شد. تست گیاهچه به‌صورت کشت درون پتری‌دیش و با ۲۵ عدد بذر بود. مراحل رشد گیاهچه در دستگاه ژرمیناتور با دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و با شدت نوری ۷۵۰ لوکس در مترمربع انجام شد. بررسی شاخص‌های رشد گیاهچه و جوانه‌زنی پس از هفت روز صورت گرفت. برای آزمون جوانه‌زنی، مؤلفه درصد و سرعت جوانه‌زنی و برای آزمون گیاهچه، مؤلفه‌های طول و وزن ساقه‌چه، ریشه‌چه و گیاهچه مورد بررسی قرار گرفته است. جهت محاسبه سرعت جوانه‌زنی (GR) از فرمول زیر استفاده شد (Ellis and Roberts, 1981):

$$MGT\ (Mean\ Germination\ Time) = \sum (d_i \times n_i) / N$$
$$GR\ (Germination\ Rate) = 1/MGT$$

در این فرمول؛ d_i: روز جوانه‌زنی، n_i: تعداد جوانه‌زده در همان روز، N: تعداد کل جوانه‌زده‌ها

جهت تهیه نمونه گیاهی لازم برای استخراج عصاره آنزیمی، تست استاندارد جوانه‌زنی مجدداً روی بذور فرسوده و غیرفرسوده به روش ذکرشده در بالا، اجرا شد. با توجه به ماهیت این آزمون، آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور اول شامل دو سطح شاهد و ترکیب تیماری اسید سالیسیلیک + صمغ عربی و فاکتور دوم شامل دو سطح کیفیت بذر (فرسوده و غیرفرسوده) بود که در پنج تکرار انجام شد. نمونه‌برداری به صورت تصادفی به تعداد ۱۰ عدد بذر جوانه‌زده از هر تیمار در روز سوم انجام و بلافاصله وارد سنجش فعالیت آنزیمی شد.

سنجش فعالیت آنزیمی، استخراج آنزیم: جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برحسب تصادف ۱۰ عدد از بذور جوانه‌زده جدا و در داخل هاون چینی که از پیش سرد شده هموژن گردید. در ادامه، مقدار یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵ اضافه گردید و نمونه‌های حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت محلول روشناور حاصل برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

(Giannopolitis and Ries, 1977)، کاتالاز (Kar and Mishra, 1976)، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز (Nakano and Asada, 1981) و آلفا–آمیلاز (Xiao *et al.*, 2006) مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج حاصل از بررسی‌های اولیه توسط تابع تاگوچی با استفاده از نرم‌افزار Minitab تجزیه شد. داده‌های آزمایش‌های بعدی توسط نرم‌افزار SAS تجزیه واریانس شد. مقایسه میانگین با روش LSD در سطح احتمال آماری پنج درصد صورت گرفت. نتایج میانگین فعالیت آنزیمی به صورت (میانگین ± دوبرابر انحراف معیار میانگین) در شکل‌ها گزارش شد.

نتایج

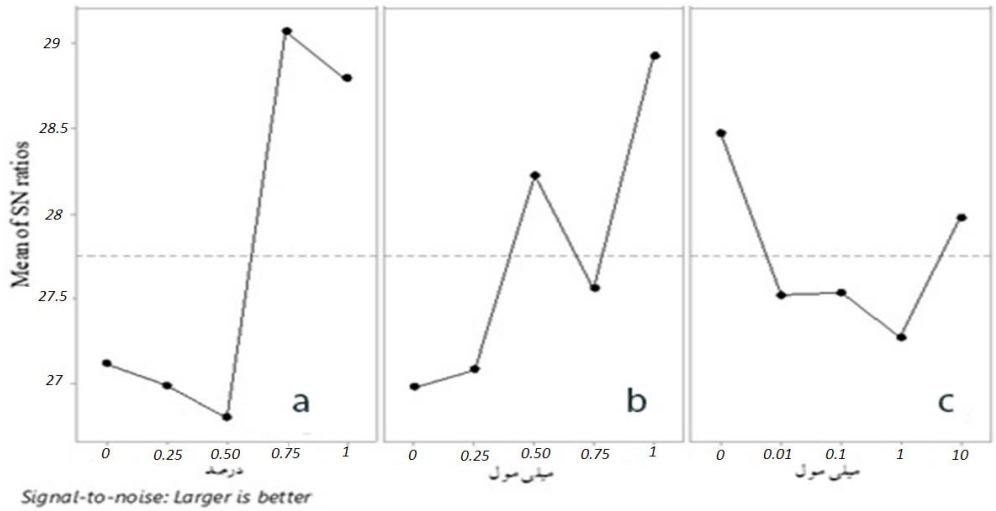
بهینه‌سازی: نتایج طرح تاگوچی ترکیب یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک و ۰/۷۵ درصد صمغ عربی را به‌عنوان تیمار منتخب معرفی کرد. در طراحی آزمایش‌ها دو روش طرح‌های کامل و طرح‌های کسری کاربرد دارد. طرح تاگوچی از طرح‌های عاملی کسری است که در آن فقط از بخشی از ترکیبات ممکن استفاده می‌شود. در نتیجه با انجام تعداد محدودی از آزمایش‌ها اطلاعات گسترده‌ای از اثرات تیمارها و یا اثرات متقابل آن‌ها قابل بررسی است. باتوجه به اینکه در این آزمایش برای تعیین سطوح بهینه فاکتورها از تابع زیان (Loss function) در حالت مقدار بزرگتر- بهتر (Larger is better) استفاده شد در نتیجه هر چه اعداد مربوط به این خروجی بزرگتر بود نشان می‌داد، کارایی سطح همان تیمار دارای اثر بزرگتری روی تیمار وابسته است، با توجه به شکل یک می‌توان نتیجه گرفت تیمار صمغ عربی در غلظت ۰/۷۵ درصد، تیمار اسید سالیسیلیک در غلظت یک میلی‌مولار و تیواوره در غلظت شاهد بیشترین اثر را روی شاخص قدرت بذر داشته است. نسبت بالای سیگنال به نویز (Signal-to-Noise) در این آزمایش برای سطوح ذکرشده نشان می‌دهد حساسیت شاخص قدرت بذر به سطوح این تیمارها بیش از عوامل غیرقابل کنترل است (شکل ۱). همچنین با توجه به نتایج تجزیه واریانس این تابع اثر تیواوره بر روی افزایش شاخص قدرت بذر غیر معنی‌دار بود (جدول ۱) که نشان دهنده آن است که این تیمار دارای اثر قابل توجه روی قوه‌نامیه و قدرت‌نامیه نیست و می‌توان از آزمایش مجدد آن صرف نظر کرد. همچنین جدول یک نشان می‌دهد بیشترین اثر، مربوط به تیمار صمغ عربی است که در رتبه اول قرار گرفته و رتبه دوم مربوط به اثر تیمار اسید سالیسیلیک است. لازم به ذکر است که رتبه تیمار تیواوره در این جدول نیز در پایین‌ترین سطح (رتبه سوم) قرار داشت.

تأیید نتایج تابع تاگوچی: باتوجه به نتایج (جدول ۲) بین تیمارها از لحاظ صفات درصد جوانه‌زنی و طول ساقه‌چه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، درحالی‌که سایر صفات، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح یک درصد داشتند. با توجه به میانگین ترکیب تیماری اسید سالیسیلیک + صمغ عربی (منتخب) برای درصد جوانه‌زنی و طول ساقه‌چه، هر چند افزایش نسبت به سایر تیمارها دیده می‌شود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود (جدول ۲). در مورد سایر صفات، ترکیب منتخب دارای مقادیر بالاتر و معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد بود که نشان می‌داد نتایج تابع تاگوچی جهت گزینش بهترین ترکیب تیماری به صورت بسیار مناسب عمل نموده است (جدول ۲). همچنین نتایج نشان می‌دهد ترکیب منتخب در مقایسه با پیش‌تیمار آبی توانسته است صفت طول ریشه‌چه را به صورت معنی‌دار افزایش دهد. نکته قابل توجه اینکه در سایر صفات نیز بهبود عملکرد توسط این ترکیب دیده می‌شود.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمارهای اعمال شده روی فعالیت آنزیمی نشان داد اثر اصلی پیش‌تیمار روی فعالیت آنزیم‌های APX، SOD و GP در سطح احتمال آماری پنج درصد معنی‌دار بود (شکل ۲). مقایسه میانگین این اثر اصلی نشان داد فعالیت آنزیم APX و SOD تحت تأثیر پیش‌تیمار منتخب نسبت سایر تیمارها افزایش معنی‌دار دارد (شکل ۲). با توجه به میانگین فعالیت گایاکول پراکسیداز، پیش‌تیمار آبی باعث افزایش معنی‌دار آن نسبت به شاهد شد. همچنین میانگین فعالیت آنزیم CAT حاکی از افزایش نسبی آن نسبت به تیمار شاهد بود. باتوجه به نتایج (جدول ۳) اختلاف

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]



شکل ۱- نتایج تابع تاگوچی برای اثر پیش‌تیمار بذر با صمغ عربی (a)، اسید سالیسیلیک (b) و تیواوره (c) و طی فرآیند جوانه‌زنی بذر کلزا رقم اکاپی. نتایج میانگین مربوط به نسبت سیگنال به نویز است. نکته: هرچقدر شاخص دارای مقدار بیشتری است بیانگر اثر بیشتر همان تیمار روی شاخص قدرت بذر است.

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات قوه‌نامیه و قدرت‌نامیه بذر کلزا رقم اکاپی تحت تأثیر پیش‌تیمارها

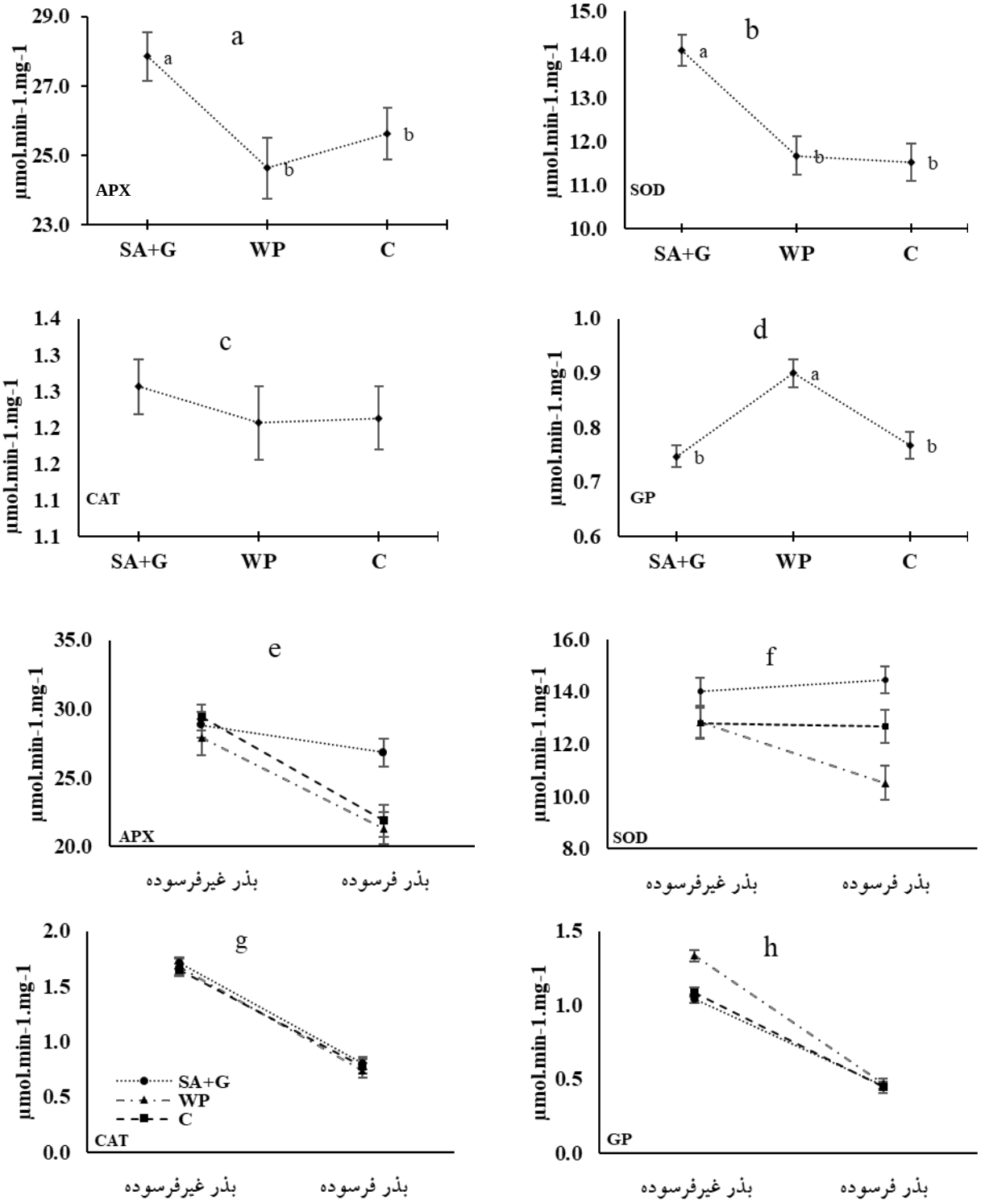
تیمار	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه زنی (1/day)	طول ریشه‌چه (cm)	طول ساقه‌چه (cm)	طول گیاهچه (cm)	وزن تر ریشه‌چه (g)	وزن تر ساقه‌چه (g)	وزن تر گیاهچه (g)	وزن خشک ریشه‌چه (g)	وزن خشک ساقه‌چه (g)	وزن خشک گیاهچه (g)
شاهد	۶۸	۰/۲۷^{b}	۳/۴۱^{b}	۳/۳۴	۶/۷۵^{b}	۰/۰۵^{b}	۰/۵۲^{b}	۰/۵۷^{b}	۰/۰۰۷^{b}	۰/۰۵^{b}	۰/۰۵^{b}
پیش‌تیمار آبی	۶۱	۰/۲۸^{a}	۱/۹۴^{c}	۳/۳۰	۵/۲۴^{b}	۰/۰۴^{b}	۰/۳۲^{b}	۰/۳۶^{b}	۰/۰۰۵^{b}	۰/۰۳^{b}	۰/۰۳^{b}
اسید سالیسیلیک + صمغ عربی†	۷۳	۰/۲۸^{a}	۵/۰۰^{a}	۳/۸۰	۸/۸۰^{a}	۰/۰۹^{a}	۰/۷۴^{a}	۰/۸۴^{a}	۰/۰۱۲^{a}	۰/۰۷^{a}	۰/۰۸^{a}
منابع تغییر	ANOVA										
تیمار	ns	**	**	ns	**	**	**	**	**	**	**

***، ** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و غیرمعنی‌دار است. حروف غیرمشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است. † ترکیب تیماری شامل یک میلی‌مول اسید سالیسیلیک به همراه ۰/۷۵ درصد صمغ عربی است. Analysis of variance (ANOVA) تجزیه واریانس همراه با سطح معنی‌داری برای هر صفت.**

معنی‌داری ($P\leq0.05$) بین بذور فرسوده و غیرفرسوده از لحاظ شدت فعالیت آنزیمی ثبت شد. نتایج، افزایش معنی‌دار شدت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان APX، CAT و GP را در بذور غیرفرسوده نسبت به بذور فرسوده نشان داد.

نتایج اثر متقابل نشان داد بین ترکیب‌های تیماری اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال آماری پنج درصد وجود دارد ($P\leq0.05$). با توجه به شکل سه نتایج نشان می‌دهد اثر پیش تیمارهای به کار رفته روی فعالیت آنزیم‌های APX و SOD در بذور فرسوده و غیرفرسوده یکسان عمل نکرده است. پیش‌تیمار منتخب باعث افزایش فعالیت آنزیم APX در بذور فرسوده نسبت به سایر تیمارها شد. همچنین مشابه این نتایج در آنزیم SOD دیده می‌شود. هر چند شدت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بذور غیرفرسوده بالاتر از بذور فرسوده است اما در مورد فعالیت آنزیم SOD، بیشترین فعالیت از تیمار

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر اصلی پیش‌تیمار و ترکیب تیماری پیش‌تیمار و شدت فرسودگی بذر بر فعالیت آنزیمی بذور کلزا رقم اکاپی ۷۲ ساعت بعد از شروع جوانه‌زنی a-d؛ اثر اصلی، a؛ (آسکوربات پراکسیداز (APX)، b؛ سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، c؛ کاتالاز (CAT)، d؛ گایاکول پراکسیداز (GP) و e-h؛ ترکیب تیماری پیش‌تیمار و شدت فرسودگی. نتایج میانگین فعالیت آنزیمی به صورت (میانگین ± دو برابر انحراف معیار میانگین) در شکل‌ها گزارش شد. اسید سالیسیلیک + صمغ عربی (SA+G)، پیش‌تیمار آبی (WP) و شاهد (C). حروف مشابه دارای اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد نمی‌باشد.

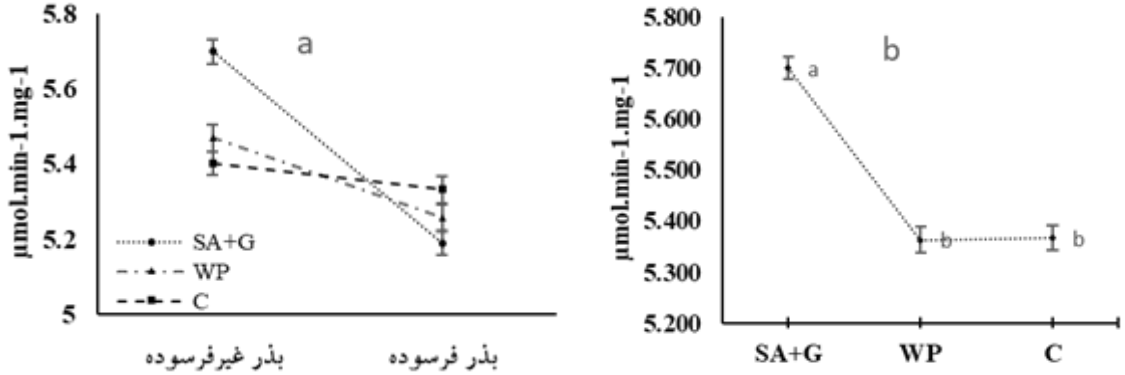
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر درجه فرسودگی بذر بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گایاکول پراکسیداز (GP) بذر کلزا رقم اکاپی

تیمار	APX	SOD	CAT	GP	Amylase
	($\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$)				
بذر غیرفرسوده	۲۸/۷ ± ۰/۶۲ a	۱۲/۳ ± ۰/۳۳ a	۱/۶ ± ۰/۰۴ a	۱/۱ ± ۰/۰۲ a	۵/۳۵ ± ۰/۰۱۸ a
بذر فرسوده	۲۳/۳ ± ۰/۶۴ b	۱۲/۵ ± ۰/۳۴ a	۰/۷ ± ۰/۰۳ b	۰/۴ ± ۰/۰۲ b	۵/۲۵ ± ۰/۰۲۰ b

سنجش فعالیت آنزیمی ۷۲ ساعت بعد از شروع جوانه‌زنی. نتایج میانگین فعالیت آنزیمی به صورت (میانگین ± دوبرابر انحراف معیار میانگین). حروف مشابه دارای اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد نمی‌باشد. واحد آنزیمی به صورت $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ بیان شد.



شکل ۳- مقایسه میانگین ترکیب تیمار شدت فرسودگی (نمودار a) و پیش‌تیمار (اسید سالیسیلیک + صمغ عربی (SA+G)، پیش‌تیمار آبی (WP) و شاهد (C) نمودار b) روی فعالیت آنزیمی آلفا- آمیلاز بذور کلزا رقم اکاپی ۷۲ ساعت بعد از شروع جوانه‌زنی. نتایج میانگین فعالیت آنزیمی به صورت (میانگین ± دو برابر انحراف معیار میانگین) در شکل‌ها گزارش شد.

منتخب در بذور فرسوده حاصل شد. نکته قابل توجه بعدی این که، اثر پیش‌تیمار آبی در بذور غیرفرسوده باعث افزایش فعالیت آنزیم گایاکول نسبت به سایر پیش‌تیمارها شده است (شکل ۲).

نتایج به دست آمده از فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز، حاکی از معنی‌دار بودن اثر درجه فرسودگی بر فعالیت این آنزیم است (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر اصلی درجه فرسودگی بذر نشان می‌دهد میزان فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد کاهش یافته است. همچنین مقایسه میانگین اثر اصلی پیش‌تیمار نشان می‌دهد در پیش‌تیمار منتخب میزان فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد و پیش‌تیمار آبی افزایش داشته است. باتوجه به نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین ترکیب تیماری، بیشترین شدت فعالیت این آنزیم از بذور غیرفرسوده و تحت تأثیر پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک + صمغ عربی حاصل شد درحالی‌که کمترین فعالیت نیز از همین آنزیم در بذور فرسوده به‌دست آمد (شکل ۳).

بحث

فرسودگی یا زوال از خصوصیات ذاتی بذور است که تحت تنش، تسریع شده و باعث کاهش قوه‌نامیه و قدرت‌نامیه بذر می‌شود (Hampton, 2020). پیش‌تیمار بذر از روش‌هایی است که می‌تواند سرعت فرآیند فرسودگی را کاهش دهد. تیمارهای مناسب با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و به دنبال آن کاهش پراکسیداسیون لیپیدی طی جوانه‌زنی باعث بهبود شرایط جوانه‌زنی و رشد اولیه می‌شود (Ibrahim, 2016). تیمارهای آلی همانند اسید سالسیلیک می‌توانند با افزایش و تنظیم فعالیت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و هیدرولیز کننده نشاسته در طی جوانه‌زنی موجب بهبود عملکرد بالفعل بذر در شرایط متغیر محیطی شود (Coolbear, 2020). زیرا افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اثر فرسودگی باعث برهم خوردن تعادل درون سلولی می‌شود (Jeevan Kumar *et al*., 2015). نتایج ترکیبی تابع تاگوچی و تجزیه واریانس در این آزمایش نشان داد پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک + صمغ عربی می‌تواند کارایی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آلفا-آمیلاز را در بذور فرسوده کلزا بهبود بخشد. نکته قابل توجه اینکه نتایج اولیه تابع تاگوچی در آزمایش مجدد به روش تجزیه واریانس نیز تأیید شد، که نشان می‌داد، این تابع می‌تواند به عنوان جایگزینی مناسب به جای طرح‌های آزمایشی مرسوم جهت بهینه‌سازی شرایط پیش‌تیمار با فاکتورهای متعدد استفاده شود. نتایج تابع تاگوچی ترکیب تیماری اسید سالیسیلیک و صمغ عربی را برای بهبود قوه‌نامیه و قدرت‌نامیه بذر معرفی کرد که در شاخص قدرت بذر خود را نشان داد. اگرچه روش تاگوچی اساساً برای فرآیندهای تکنولوژیکی توسعه یافته است، اما در مطالعات کشاورزی نیز برای بهبود بازده محصول و بهینه‌سازی شرایط ارزشمند است. کاربرد روش تاگوچی برای بهینه‌سازی شرایط جوانه‌زنی بذر در چغندر (Mukasa *et al*., 2003)، جو (Yaldagard *et al*., 2008) و *Miscanthus ainensis* (Awty-Carroll *et al*., 2020) نیز گزارش شده است. با اینکه گزارش‌های متعددی مبنی بر اثرات مثبت پیش‌تیمار تیواوره به تنهایی و یا در ترکیب با مواد معدنی و آلی وجود دارد ولی نتایج این آزمایش نشان داد بذر کلزا در مرحله جوانه‌زنی پاسخ مثبتی به این تیمار نشان نداد. به احتمال بسیار قوی یکی از دلایل تأثیر غیرمعنی‌دار این تیمار مربوط به تفاوت پاسخ ژنوتیپ‌ها و زمان ارزیابی درصد جوانه‌زنی است. مشابه این نتایج در آزمایش اثر تیمار تیو اوره به تنهای و یا در ترکیب با سایکوسل روی جوانه‌زنی ژنوتیپ‌های مختلف کاهو نیز گزارش شده است (Sankhla, 1970).

در این مطالعه پیش‌تیمار منتخب (یک میلی‌مولار اسید سالیسیلیک + ۰/۷۵ درصد صمغ عربی)، صفات جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه کلزا را نسبت به تیمار شاهد بهبود داد. همچنین درصد و سرعت جوانه‌زنی به ترتیب ۷/۳ و ۳/۷ درصد افزایش نشان دادند. این تیمار در مقایسه با تیمار شاهد، رشد طولی ریشه‌چه و گیاهچه را به ترتیب به میزان ۴۶ و ۳۰ درصد افزایش داد. روند بهبود در وزن خشک ریشه‌چه (۷۱/۴ درصد) و گیاهچه (۶۰ درصد) نیز مشاهده شد. تحقیقات نشان می‌دهد پیش‌تیمار اسید سالیسیلیک صفات جوانه‌زنی و رشدی را با تعدیل اثر تنش‌ها بهبود می‌بخشد (Zhu *et al*., 2021). مشابه نتایج این آزمایش، اثر مثبت اسید سالیسیلیک روی جوانه‌زنی سورگوم (Shihab and Hamza, 2020)، آرابیدوبسیس (Lee *et al*., 2010)، گندم (Dolatabadian *et al*., 2009) نیز گزارش شده است. افزایش سرعت جوانه‌زنی در بذور پیش‌تیمار شده نسبت به بذور شاهد می‌تواند به افزایش سرعت جذب آب (Aliloo *et al*., 2014a; Aliloo *et al*., 2014b)، ترمیم و آماده‌سازی ساختار و آنزیم‌های بذر (Mondal and Bose, 2021) و تضعیف پوسته بذری (Johnson and Puthur, 2021) مربوط باشد. افزایش شاخصه‌های رشدی گیاهچه مانند طول و وزن گیاهچه ارتباط بسیار نزدیکی با سرعت جوانه‌زنی دارند. زیرا، بذور تحت پیش‌تیمار زودتر جوانه‌زده و گیاهچه بزرگتری را ایجاد می‌کنند. درحالی‌که، تمامی تیمارها در یک زمان مشخص ارزیابی می‌شوند. به علاوه، افزایش سطح فعالیت آنزیم‌ها به صورت مداوم به روند رشد گیاهچه‌های حاصل از بذور تیمار شده، آن‌ها کمک می‌کند که در این مطالعه مجدداً اثرگذاری هر دو عامل مهم به اثبات رسید. در تحقیق حاضر اثر پیش‌تیمار منتخب روی درصد جوانه‌زنی با وجود افزایش نسبی معنی‌دار نبود. در غالب موارد، برهمکنش بین عوامل محیطی و هورمون‌های گیاهی تعیین‌کننده ورود بذر به مرحله جوانه‌زنی است. نتایج گزارش‌ها در مورد اثر اسید سالسیلیک بر جوانه‌زنی متناقض بوده و همزمان اثر تحریک‌کننده‌گی و بازدارنده‌گی جوانه‌زنی برای آن گزارش شده است که بیشتر مربوط به غلظت هورمون به کار رفته است (Alonso-Ramirez *et al*., 2009). در گیاه آرابیدوبسیس مقادیر بالاتر از یک

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

میلی‌مول در لیتر اسید سالیسیلیک باعث کاهش درصد جوانه‌زنی و در غلظت‌های کمتر، جوانه‌زنی در شرایط تنش بهبود می‌یابد که مرتبط با افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است (Rajjou *et al.*, 2006). در آزمایش اخیر افزایش نسبی در درصد جوانه‌زنی احتمالاً مربوط به افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه باشد.

در غالب موارد بهترین کیفیت بذر در زمان رسیدگی فیزیولوژیک اتفاق می‌افتد و با سپری شدن زمان از کیفیت آن به دلیل فرسودگی کاسته می‌شود. یکی از علائم فرسودگی کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های بذر در هنگام جوانه‌زنی است که در این آزمایش به خوبی تأیید شد. با توجه به یافته‌ها کاهش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌های APX، CAT و GP به ترتیب ۵۶، ۱۸ و۶۳ درصد نشان دهنده حساسیت این آنزیم‌ها به فرسودگی بذر است. عوامل زیادی در فرسودگی بذر مشارکت دارند که موجب کاهش قوه‌نامیه و قدرت بذر می‌شوند که در بین آن‌ها تجمع گونه‌های فعال اکسیژن از مخرب‌ترین عوامل بشمار می‌روند. تجمع این مواد سمی باعث پراکسیده شدن چربی‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، صدمه به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاهای سلولی می‌شود (Coolbear, 2020). کاهش در میزان فعالیت آنزیم‌های مطالعه شده به احتمال قوی مربوط به حمله این مواد سمی به ساختار پروتئینی آنزیم‌ها باشد. یافته‌های این تحقیق در توافق با گزارش بلوچی و استادیان (Balouchi and Ostadian, 2018) در مورد کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در طی فرایند فرسودگی بذور کتان (*Linum usitatissimum* L.) بود.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به عنوان سیستم دفاعی در گیاهان هستند تا گونه‌های فعال اکسیژن اضافی را حذف کنند و از آسیب آن‌ها به ساختارهای حیاتی گیاه جلوگیری کنند. از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهی می‌توان به APX، SOD، CAT و GP اشاره کرد. براساس نتایج، پیش‌تیمار منتخب در بذور فرسوده باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و APX به ترتیب به میزان ۱۴ و ۲۲/۷ درصد نسبت به تیمار شاهد شد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان می‌دهد سیستم دفاعی گیاه تحت تأثیر تیمار منتخب فعال شده است. افزایش ۶۰ درصدی وزن خشک گیاهچه هم‌زمان با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تیمار منتخب نشان می‌دهد که صدمات وارده به ساختار و عملکرد سلول‌های بذری کاهش یافته و در نتیجه توان بذر در تبدیل ذخایر بذری به ساختارهای گیاهچه‌ای افزایش یافته است. شاید بتوان گفت اسید سالیسیلیک یکی از پیچیده‌ترین هورمون‌های گیاهی از لحاظ نحوه عمل آن بر فیزیولوژی گیاه است. زیرا از طریق مسیرهای متعدد متابولیکی فعالیت گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. افزایش سطح بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تیمارهای بذری توسط این هورمون گزارش شده است (Tayyab *et al.*, 2020). همچنین افزایش فعالیت پروتئازها، پروتئازوم‌ها، آنزیم‌های گلیکولیز و مسیر پنتوزفسفات و تولید پروتئین‌ها در نتیجه تیمار خارجی اسید سالیسیلیک به اثبات رسیده است (Talaat, 2021). یکی از یافته‌های مهم دیگر این آزمایش اثرگذاری پیش‌تیمار منتخب بر افزایش شش درصد فعالیت آنزیم آلفا–آمیلاز نسبت به تیمار شاهد بود. این نتایج در تأیید یافته‌های Liu و همکاران (۲۰۱۹) بود که گزارش کردند تیمار بذر گیاه لیمونیوم (*Limonium bicolor*) با اسید سالیسیلیک، فعالیت آنزیم کلیدی جوانه‌زنی را افزایش می‌دهد. تمامی این موارد بالا فرضیه تأثیرگذاری این پیش‌تیمار منتخب از طریق سنتز پروتئین‌های شروع‌کننده جوانه‌زنی، تحریک سیستم دفاعی و انتقال مواد غذایی در بهبود شاخصه‌های جوانه‌زنی و رشد اولیه کلزا را تأیید می‌کنند. وجود صمغ عربی در ترکیب تیماری از عوامل مهمی بود که توانست همراه با اسید سالیسیلیک روی شاخصه‌های قدرت بذر و آنزیم‌های مورد مطالعه تأثیر مثبت بگذارد. با توجه به ساختار پیچیده صمغ عربی و وجود ترکیبات آلی و معدنی متعدد در آن، احتمال تأثیرگذاری آن‌ها روی فرایند جوانه‌زنی و رشد گیاه‌چه وجود داد. از سوی دیگر قدرت فیلم‌کنندگی بالای صمغ عربی در هنگام پیش‌تیمار می‌تواند کارایی عوامل همراه با آن را بالا ببرد. این پلیمر آلی بعد از تیمار به‌صورت پوشش مناسب روی بذور باقی می‌ماند و در نتیجه مواد اضافه شده به آن به مدت طولانی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

در اختیار بذر قرار می‌گیرد. همچنین با توجه به ساختار پلی‌ساکاریدی صمغ عربی، مواد اضافه‌شده در آن شلانه می‌شوند و در نتیجه در هنگام آبنوشی مجدد بذر به فرم آهسته رهش در اختیار بذر و به‌ویژه گیاه‌چه در حال رشد قرار می‌گیرند. بنابراین همراهی اسید سالیسیلیک با صمغ عربی احتمال در اختیار گذاشتن این تنظیم‌کننده رشد را برای بذر کلزا بیشتر کرده است که در شاخص‌های جوانه‌زنی و فعالیت‌های آنزیمی خود را نشان داد. اما بررسی‌های دقیق‌تری لازم است تا مکانیزم عمل صمغ عربی در فیزیولوژی جوانه‌زنی، رشد گیاه‌چه و مواد حامل مشخص شود.

در کل پیش‌تیمار بذر کلزا با ترکیب تیماری یک مول اسید سالیسیلیک و ۰/۷۵درصد صمغ عربی اثرات قابل ملاحظه روی صفات جوانه‌زنی، گیاهچه‌ای، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آلفا-آمیلاز داشت. این ترکیب تیماری با بهبود معنی‌دار سرعت جوانه‌زنی و شاخص‌های رشدی در بذور فرسوده می‌تواند به استقرار سریع و مناسب گیاه کلزا در شرایط محیطی متغیر کمک کند. همچنین افزایش سطح فعالیت برخی از آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان بذر کلزا تحت پیش‌تیمار منتخب روند مثبتی از خود نشان داد به‌طوری‌که فعالیت آنزیم‌های APX و SOD در مقایسه با تیمار شاهد افزایش چشمگیری یافتند که حاکی از فعال‌سازی سیستم دفاعی برای حمایت از قوه‌نامیه و قدرت‌نامیه بذر بود. افزایش سطح فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در بذور غیرفرسوده توسط تیمار منتخب احتمال نحوه عمل چند کاره آن را تأکید می‌کند. با توجه به اثر مثبت این ترکیب تیماری بر صفات جوانه‌زنی، گیاهچه‌ای و آنزیمی گیاه کلزا، پیشنهاد می‌شود از آن برای بهبود قدرت بذر ارقام کلزا در شرایط مزرعه‌ای استفاده شود.

منابع

Ali, L. G., Nulit, R., Ibrahim, M. H. and Yien, C. Y. S. (2021) Efficacy of KNO_3, SiO_2 and SA priming for improving emergence, seedling growth and antioxidant enzymes of rice (*Oryza sativa*), under drought. Scientific Reports 11: 1-11.

Ali, B. H., Ziada, A. and Blunden, G. (2009) Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. Food and Chemical Toxicology 47: 1-8.

Aliloo, A., Alahyari, S. and Mosavi, S. (2014a) Micronutrient priming improves germination and seedling establishment in lentil. Advances in Applied Agricultural Sciences 11: 37-44.

Aliloo, A. A., Ezzati, F. and Mustafavi, S. H. (2014b) Influence of seed moisture content and salicylic acid treatments on low and freezing temperature tolerance of fennel seeds. Poljoprivreda i Sumarstvo 60: 175.

Alonso-Ramirez, A., Rodriguez, D., Reyes, D., Jimenez, J. A., Nicolas, G., Lopez-Climent, M., Gomez-Cadenas, A. and Nicolas, C. (2009) Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in Arabidopsis seeds. Plant Physiology 150: 1335-1344.

Awty-Carroll, D., Ravella, S., Clifton-Brown, J. and Robson, P. (2020) Using a taguchi DOE to investigate factors and interactions affecting germination in *Miscanthus sinensis*. Scientific Reports 10: 1-11.

Azmat, A., Yasmin, H., Hassan, M. N., Nosheen, A., Naz, R., Sajjad, M., Ilyas, N. and Akhtar, M. N. (2020) Co-application of bio-fertilizer and salicylic acid improves growth, photosynthetic pigments and stress tolerance in wheat under drought stress. Plant Biology 8: e9960.

Balouchi, H. and Ostadian Bidgoly, R. (2018) Effect of seed deterioration on germination and antioxidant enzymes activity of oil flax (*Linum usitatissimum* L.) Red Bazrak genotype. Journal of Plant Process and Function 7: 205-218.

Basit, F., Liu, J., An, J., Chen, M., He, C., Zhu, X., Li, Z., Hu, J. and Guan, Y. (2022) Seed priming with brassinosteroids alleviates aluminum toxicity in rice via improving antioxidant defense system and suppressing aluminum uptake. Environmental Science and Pollution Research 29: 10183-10197.

Cabello, A., Espinoza, N., Espinoza, S., Cabrera, A. and Santelices, R. (2019) Effect of pre-germinative treatments on *Nothofagus glauca* seed germination and seedling growth. New Zealand Journal of Forestry Science 49.

Coolbear, P. (2020) Mechanisms of Seed Deterioration. Seed Quality. CRC Press.

Dolatabadian, A., Modarres Sanavy, S. A. M. and Sharifi, M. (2009) Effect of salicylic acid and salt on wheat seed germination. Acta Agriculturae Scandinavica Section B–Soil and Plant Science 59: 456-464.

Ellis, R. and Roberts, E. (1981) The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. Seed Science and Technology (Netherlands).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

Farooq, M., Basra, S., Afzal, I. and Khaliq, A. (2006) Optimization of hydropriming techniques for rice seed invigoration. Seed Science and Technology 34: 507-512.

Farooq, M., Rehman, A., Al-Alawi, A. K., Al-Busaidi, W. M. and Lee, D. J. (2020) Integrated use of seed priming and biochar improves salt tolerance in cowpea. Scientia Horticulturae 272: 109507.

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

Hampton, J. (2020) Methods of Viability and Vigor Testing: A Critical Appraisal. Seed Quality. CRC Press.

Ibrahim, E. A. (2016) Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. Journal of Plant Physiology 192: 38-46.

Jeevan Kumar, S., Rajendra Prasad, S., Banerjee, R. and Thammineni, C. (2015) Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. Annals of Botany 116: 663-668.

Jhanji, S. and Dhingra, M. (2020) Ameliorative effect of thiourea priming on germination characteristics of mungbean (*Vigna radiata* L.) under water and salinity stress. Legume Research 43: 353-358.

Johnson, R. and Puthur, J. T. (2021) Seed priming as a cost effective technique for developing plants with cross tolerance to salinity stress. Plant Physiology and Biochemistry 162: 247-257.

Kar, M. and Mishra, D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology 57: 315-319.

Kaur, H., Hussain, S. J., Kaur, G., Poor, P., Alamri, S., Siddiqui, M. H. and Khan, M. I. R. (2022) Salicylic acid improves nitrogen fixation, growth, yield and antioxidant defence mechanisms in Chickpea genotypes under salt stress. Journal of Plant Growth Regulation 1-14.

Kaya, C., Senbayram, M., Akram, N. A., Ashraf, M., Alyemeni, M. N. and Ahmad, P. (2020) Sulfur-enriched leonardite and humic acid soil amendments enhance tolerance to drought and phosphorus deficiency stress in maize (*Zea mays* L.). Scientific Reports 10: 1-13.

Khaliq, A., Aslam, F., Matloob, A., Hussain, S., Geng, M. and Wahid, A. (2015) Seed priming with selenium: Consequences for emergence, seedling growth, and biochemical attributes of rice. Biological Trace Element Research 166: 236-244.

Lee, S., Kim, S. G. and Park, C. M. (2010) Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in Arabidopsis. New Phytologist 188: 626-637.

Liu, J., Li, L., Yuan, F. and Chen, M. (2019) Exogenous salicylic acid improves the germination of *Limonium bicolor* seeds under salt stress. Plant Signaling and Behavior 14: e1644595.

Malek, M., Ghaderi-Far, F., Torabi, B., Sadeghipour, H. R. and Hay, F. R. (2019) The influence of seed priming on storability of *rapeseed* (*Brassica napus*) seeds. Seed Science and Technology 47: 87-92.

Mahadi, S. N., Nulit, R., Mohtar, M. A., Ibrahim, M. H. and Ghani, N. I. (2020) Synergistic effect of KCl, thiourea, GA_3 and SA on the germination and early seedling growth enhancement of drought-stressed *Malaysian indica* rice cv. MR220. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 29: 101779.

Mondal, S. and Bose, B. (2021) Seed Priming: An Interlinking Technology between Seeds, Seed Germination and Seedling Establishment.

Mukasa, Y., Takahashi, H., Taguchi, K., Ogata, N., Okazaki, K. and Tanaka, M. (2003) Accumulation of soluble sugar in true seeds by priming of sugar beet seeds and the effects of priming on growth and yield of drilled plants. Plant Production Science 6: 74-82.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22: 867-880.

Nazari, R., Parsa, S., Tavakkol Afshari, R., Mahmoodi, S. and Seyyedi, S. M. (2020) Salicylic acid priming before and after accelerated aging process increases seedling vigor in aged soybean seed. Journal of Crop Improvement 34: 218-237.

Petla, B. P., Kamble, N. U., Kumar, M., Verma, P., Ghosh, S., Singh, A., Rao, V., Salvi, P., Kaur, H. and Saxena, S. C. (2016) Rice protein l-isoaspartyl methyltransferase isoforms differentially accumulate during seed maturation to restrict deleterious isoAsp and reactive oxygen species accumulation and are implicated in seed vigor and longevity. New Phytologist 211: 627-645.

Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C. and Job, D. (2006) Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. Plant Physiology 141: 910-923.

Rane, J., Singh, A. K., Tiwari, M., Prasad, P. V. and Jagadish, S. K. (2021) Effective use of water in crop plants in dryland agriculture: Implications of reactive oxygen species and antioxidative system. Frontiers in Plant Science 12.

Roychoudhury, A., Ghosh, S., Paul, S., Mazumdar, S., Das, G. and Das, S. (2016) Pre-treatment of seeds with salicylic acid attenuates cadmium chloride-induced oxidative damages in the seedlings of *mungbean* (*Vigna radiata* L. Wilczek). Acta Physiologiae Plantarum 38: 1-18.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

Sankhla, N. (1970) Interaction between cycocel and thiourea in germination and growth of lettuce. Biochemie und Physiologie der Pflanzen 161: 187-190.

Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M. and Hasanuzzaman, M. (2021) Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. Antioxidants 10: 277.

Shihab, M. O. and Hamza, J. H. (2020) Germination and seedling growth in primed sorghum seed with gibberellic and salicylic acids. Plant Archives 2: 1409-1416.

Taguchi, G. (1995) Quality engineering (Taguchi methods) for the development of electronic circuit technology. IEEE Transactions on Reliability 44: 225-229.

Talaat, N. B. (2021) Polyamine and nitrogen metabolism regulation by melatonin and salicylic acid combined treatment as a repressor for salt toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. Plant Growth Regulation 95: 315-329.

Tayyab, N., Naz, R., Yasmin, H., Nosheen, A., Keyani, R., Sajjad, M., Hassan, M. N. and Roberts, T. H. (2020) Combined seed and foliar pre-treatments with exogenous methyl jasmonate and salicylic acid mitigate drought-induced stress in maize. PLoS One 15: e0232269.

Tounekti, T., Mahdhi, M., Zarraq, A. F. and Khemira, H. (2020) Priming improves germination and seed reserve utilization, growth, antioxidant responses and membrane stability at early seedling stage of Saudi sorghum varieties under drought stress. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 48: 938-953.

Vinnichek, L., Pogorelova, E. and Dergunov, A. (2019) Oilseed market: Global trends. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,. IOP Publishing 012030.

Waqas, M., Korres, N. E., Khan, M. D., Nizami, A. S., Deeba, F., Ali, I. and Hussain, H. (2019) Advances in the concept and methods of seed priming. In: Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings. Pp. 11-41. Springer, Singapore.

Xiao, Z., Storms, R. and Tsang, A. (2006) A quantitative starch? Iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. Analytical Biochemistry 351: 146-148.

Xu, Y. G., Liu, R., Sui, N., Shi, W., Wang, L., Tian, C. and Song, J. (2016) Changes in endogenous hormones and seed-coat phenolics during seed storage of two *Suaeda salsa* populations. Australian Journal of Botany 64: 325-332.

Yadav, R. K., Prakash, O., Srivastava, A. K., Dwivedi, S. V. and Gangwar, V. (2022) Effect of plant growth regulators and thiourea on seed germination and seedling growth of Jatti Khatti (*Citrus jambhiri* Lush.). The Pharma Innovation Journal 11: 1393-1399.

Yaldagard, M., Mortazavi, S. A. and Tabatabaie, F. (2008) Application of ultrasonic waves as a priming technique for accelerating and enhancing the germination of barley seed: Optimization of method by the Taguchi approach. Journal of the Institute of Brewing 114: 14-21.

Zheng, M., Tao, Y., Hussain ,S., Jiang, Q., Peng, S., Huang, J., Cui, K. and Nie, L. (2016) Seed priming in dry direct-seeded rice: Consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under drought stress. Plant Growth Regulation 78: 167-178.

Zhu, Z. H., Sami ,A., Xu, Q. Q., Wu, L. L., Zheng, W. Y., Chen, Z. P., Jin, X. Z., Zhang, H., Li, Y. and Yu, Y. (2021) Effects of seed priming treatments on the germination and development of two rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties under the co-influence of low temperature and drought. PloS One 16: e0257236.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]

Improving activity of antioxidant enzymes and vigor in rapeseed by salicylic acid and gum arabic seed priming

Mohammad ghaderi, Ali Asghar Aliloo*

Department of Plant Engineering and Genetics, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Iran
(Received: 22/08/2022, Accepted: 15/11/2022)

Abstract

Deterioration is an irreversible feature of the seed that threatens its viability. Seed priming is one of the methods which improves vigor by modifying the structure and performance of deteriorated seeds. In this regard, at the first step, the best priming combination of different concentrations of salicylic acid, thiourea, and gum arabic was selected by germination and seedling traits in deteriorated seeds of canola var. Okapi. Then, using conventional experimental designs, its effect was tested on germination indices, seedling growth, antioxidant enzymes' catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GP), and alpha-amylase (α-amylase). The results of the Taguchi method introduced a combination of 1 mM salicylic acid and 0.75% gum arabic as the best treatment, and its effectiveness was confirmed by subsequent experiments. The stimulating effect of this treatment on germination rate, root and seedling length, and seedling weight was significant compared to the control treatment ($p\leq0.01$). The length and weight of seedlings increased by 30 and 60%, respectively. Enzymatic results showed that the activity of SOD, APX, and α-amylase enzymes was significantly ($p\leq0.01$) increased by the selected treatment by 14, 22.7, and 5.5%, respectively, compared to the control treatment. In general, priming the seeds with a combination of salicylic acid and gum arabic stimulates the defense system and remobilization of reserves, which is reflected in the improvement of germination and seedling indices. Enhancing these factors provides a suitable condition for the optimal establishment of canola in environmental conditions.

Keywords: Alpha-amylase, Growth Regulators, Priming, Seedling Growth

Corresponding author, Email: aliasghar.aliloo@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-05-09]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.8.8]