اثر انبارداری طبیعی و زوال تسریع شده بر تغییرات کمی و کیفی پروتئین‌های ذخیره‌ای و آنزیم کاتالاز در بذور نخود (*Cicer arietinum* L.)

مهدی شعبان[1]، فرشید قادری‌فر*[1]، حمیدرضا صادقی‌پور[2] و احد یامچی[3]

[1] گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [2] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، [3] گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ١٣٩٥/٠١/٠٨، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٤/٠٥/٣١)

چکیده:

این مطالعه به منظور بررسی اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر تغییرات کمی و کیفی پروتئینی و آنزیم کاتالاز در بذر نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L.) در آزمایشگاه تحقیقات بذر دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ١٣٩٤ انجام شد. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. تیمارها شامل انبارداری طبیعی دو و چهار سال و زوال مصنوعی یک تا پنج روز از طریق آزمون تسریع پیری به همراه تیمار شاهد بودند. پس از اعمال تیمارهای زوال صفاتی از قبیل درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن خشک گیاهچه، شاخص قدرت بذر، پروتئین محلول و کربونیلاسیون پروتئین‌ها، الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها، فعالیت و حضور آنزیم کاتالاز در ژل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد با افزایش شدت زوال مصنوعی و همچنین افزایش مدت زمان نگه‌داری بذور درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور، وزن خشک گیاهچه و شاخص قدرت بذر کاهش یافت. افزایش شدت زوال سبب کاهش پروتئین محلول و افزایش کربونیله شدن پروتئین‌ها شد که این روند در شرایط زوال مصنوعی ٤ و ٥ روز بیشتر از تیمارهای انبارداری طبیعی بود. نتایج حاصل از الگوی الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین‌های بذر نخود نشان داد بین تیمارهای زوال مصنوعی با شاهد اختلافی وجود دارند ولی در نمونه‌های خشک و در تیمار انبارداری ٤ سال یک باند پروتئینی سبک با وزن مولکولی ٩/٩ کیلودالتون حذف می‌شود. آبنوشی بذرها به مدت ٤، ٨ و ١٢ ساعت سبب احیای باند مذکور گردید. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به تیمار شاهد بود و با افزایش شدت زوال مصنوعی تا سه روز میزان فعالیت آن افزایش یافته و از آن به بعد دوباره کاهش یافت. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای زوال مصنوعی ٤ و ٥ روز بیشتر از انبارداری طبیعی بود. نتایج الکتروفورز Native-PAGE نشان داد در بذور نخود یک باند مربوط به فعالیت آنزیم کاتالاز در ژل وجود دارد. افزایش شدت زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی سبب شد که باند فعالیت کاتالاز کم‌رنگ‌تر شود که نشان دهنده کاهش فعالیت این آنزیم می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بذر سبب تغییر در میزان کمی و کیفی پروتئین‌های بذر نخود و کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شد. این عوامل سبب کاهش قدرت بذر و کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور و وزن خشک گیاهچه به خصوص در تیمارهای زوال مصنوعی شدید شد.

کلید واژه‌ها: الکتروفورز، آنزیم، جوانه‌زنی و کربونیلاسیون پروتئین.

مقدمه:

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) گیاهی یکساله و از نظر تولید کلی دانه سومین گیاه مهم از تیره لگومینه در دنیا می‌باشد (FAO, 1994). پروتئین‌های موجود در دانه نخود به دلیل دارا

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: farshidghaderifar@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

بودن بخشی از اسیدهای آمینه ضروری بدن انسان، دسترسی زیستی بالای آن‌ها و کم بودن فاکتورهای ضد تغذیه‌ای آن به عنوان یک رژیم غذایی مناسب مورد استفاده انسان‌ها قرار می‌گیرد (Clemente *et al*., 1999).

طی انبارداری توان زیستی بذرها کاهش یافته و این پدیده به طور طبیعی در همه بذرها رخ می‌دهد و سرعت وقوع آن به وضعیت فیزیولوژیکی و ساختار بذر و همچنین شرایط انبارداری آن‌ها بستگی دارد (قادری‌فر و همکاران، ۱۳۹۳). انبارداری طولانی مدت بذور در شرایط طبیعی همانند زوال تسریع شده سبب کاهش قدرت حیات بذر و در نتیجه کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور در شرایط مزرعه‌ای خواهد شد. طی انبارداری بذر تغییراتی در ساختار بذر رخ داده که وابسته به دما، رطوبت بذر و طول مدت انبارداری بذر بوده که در نهایت این تغییرات منجر به زوال بذر می‌گردند (Spano *et al*., 2004). به هر حال طی انبارداری، زوال بذر یک مرحله‌ی پیچیده بوده (Walters *et al*., 2010) که عواملی از قبیل کیفیت بذر (Probert *et al*., 2009)، تیمارهای پیش از انبارداری (از قبیل تیمارهای خشک کردن و تحمل بذر به این تیمارها)، رطوبت بذر، دمای انبار (Ellis and Hong, 2006)، آرایش و نحوه‌ی ذخیره‌سازی بذور در انبار (Gomez-Campo, 2006) روی آن اثر دارند. این در حالی است که در شرایطی که بذور تحت شرایط پیری تسریع شده قرار می‌گیرند رطوبت و دمای محیط و همچنین زمان قرارگیری بذور تحت این شرایط بیشترین اثر را بر زوال بذر و کاهش قدرت حیات آن دارند (McDonald, 1999). این اطلاعات بیان می‌دارد که رطوبت محیط بیشتر از دما می‌تواند به بذر آسیب وارد نماید (Wang, 2015). به گفته‌ی Probert و همکاران (۲۰۰۹) به طور کلی بذرهایی که در شرایط سرد مرطوب نگه‌داری می‌شوند نسبت به بذرهایی که در شرایط گرم و خشک نگه‌داری می‌شوند قوه نامه خود را زودتر از دست داده و دارای طول عمر کمتری می‌باشند.

برخی تغییرات بیوشیمیایی که حتی در رطوبت‌های کم اتفاق می‌افتند زمینه‌ساز زوال بذر می‌باشند که منجر به کاهش قابلیت حیات و قدرت بذر می‌گردند (McDonald, 1999). نظریه‌های محتمل در زمینه علت وقوع زوال در بذور، خسارت به سیستم‌های بیولوژیکی بذر توسط گونه‌های فعال اکسیژن تولیدی در نتیجه فرآیندهایی از قبیل پراکسیداسیون لیپید، غیرفعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرفعال شدن و تغییر شکل پروتئین‌های دخیل در فرآیندهای زیستی، تخریب غشای سلولی می‌باشد (McDonald, 1999; Walters, 1998). تولید گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در مراحل‌های بیوشیمیایی معمولی گیاهان در زنجیره‌ها انتقال الکترون در کلروپلاست و میتوکندری و همچنین در غشای پلاسمایی رخ می‌دهد و تولید این ترکیبات طی تنش اکسیداتیو افزایش یافته و پتانسیل خسارت‌زایی بالایی به بسیاری از ترکیبات سلولی دارند (Delvin and Gustine, 1992). از اثراتی که این گونه‌های فعال بر این ترکیبات دارند پراکسیداسیون لیپید که سبب تخریب غشا شده، غیرفعال شدن پروتئینی و تغییر در DNA را می‌توان نام برد (Delvin and Gustine, 1992).

پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در اواسط دوره رسیدگی به مقدار زیادی در بذر تجمع یافته و طی آبنوشی بذر برای فراهمی آمینواسیدهای مورد نیاز جوانه‌زنی و نمو گیاهچه شکسته می‌شوند (li *et al*., 2007). گلوبولین فراوان‌ترین پروتئین ذخیره‌ای در بذور حبوبات می‌باشد (Mandal and Mandal, 2000). طی زوال بذر و همچنین در طی انبارداری طبیعی بذور گونه‌های فعال اکسیژن سبب وارد آمدن خسارات زیادی به پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌گردند (Bailly, 2004). به گفته‌ی Davies (۲۰۰۵) در سیستم‌های بیولوژیکی پروتئین‌ها مهم‌ترین هدف رادیکال‌های آزاد می‌باشند. در این زمینه اطلاعات در مورد چگونگی خسارت وارد شده به پروتئوم بذرهای خشک کم می‌باشد (Sathish *et al*., 2015). اخیراً مشاهده شده که طی زوال کنترل شده ۱۸ تغییر در آنالیز پروتئوم بذور آرابیدوپسیس مشاهده شده است که حاکی از اثر زوال بر پروتئین‌های بذور این گیاه می‌باشد (Rajjou *et al*., 2008). آنچه مسلم است این است که زوال بذر سبب خسارت به پروتئین‌ها و آنزیم‌ها شده و در نهایت سبب کاهش فعالیت آنزیمی می‌گردد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

(Gamer *et al*., 1987). Bonneau و همکاران (۱۹۹٤) گزارش کردند که زوال سبب خسارت به آنزیم‌های هیدرولیتیک بذر سویا شده و در نهایت انتقال ذخایر پروتئینی و کربوهیدراتی کاهش یافته و درصد جوانه‌زنی نیز به دنبال آن کاهش یافت.

طی تنش اکسیداتیو تولید برخی‌گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل پراکسید هیدروژن طی زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی، بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب و بسیاری از وقایع تنفسی و زوال بذر افزایش می‌یابند (Scandalios *et al*., 1997). در گیاهان راه‌های دفاعی متفاوتی برای مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش خسارت‌زایی آن‌ها وجود دارد که سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی از این قبیل راه‌های دفاعی می‌باشند (Alvarez *et al*., 1998). Moller و همکاران (۲۰۰۷) بیان نمودند که آنزیم کاتالاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های پالاینده گونه‌های فعال اکسیژن بوده که به همراه سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سبب کاهش اثرات خسارت‌زایی گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردند. کاتالاز سبب تجزیه مولکول پراکسید هیدوژن به آب و اکسیژن می‌گردد (Tayefi-Nasrabadi *et al*., 2011). این آنزیم به طور گسترده‌ای در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات وجود دارد (Kirkman and Gaetani, 2007). این آنزیم یک زنجیره پلی‌پپتیدی ترامر بوده که هر کدام از آن‌ها دارای بیش از ۵۰۰ آمینواسید می‌باشند (Tayefi-Nasrabadi *et al*., 2011). کاتالاز دارای چهار گروه هم پورفیرین بوده که امکان واکنش این آنزیم با پراکسید هیدروژن را فراهم می‌کنند (Regelsberger *et al*., 2002). مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که کاتالاز نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان و طی خشک شدن و پیری بازی‌می‌کند (Mura *et al*., 2007). کاتالاز ممکن است به فرم‌های مختلفی در گیاهان وجود داشته باشد (Lee and An, 2005). از این رو بررسی وجود یا عدم وجود فرم‌های مختلف این آنزیم آنتی‌اکسیدانت در بذوری که به طور طبیعی در انبار نگه‌داری شده و مقایسه آن با زوال مصنوعی مهم به نظر می‌رسد. از این رو هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر تغییرات کمی و کیفی پروتئین‌ها و آنزیم کاتالاز در بذور نخود ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه به منظور بررسی اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر تغییرات کمی و کیفی در پروتئین‌های ذخیره‌ای و آنزیم کاتالاز در بذور نخود زراعی و در سال ۱۳۹٤ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گردید. در این آزمایش بذور نخود رقم هاشم که به مدت دو و چهار سال در شرایط طبیعی انبار نگهداری شده بودند به عنوان تیمارهای زوال طبیعی و از بذور تازه برداشت شده برای شاهد و القای زوال مصنوعی استفاده گردید. برای این کار تعداد ۱۰۰ عدد بذر نخود روی توری فلزی که در تماس مستقیم با آب نبود، در داخل ظروف پلاستیکی به ابعاد ۳/۵×۱۱×۱۱ سانتی‌متر که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود، قرار داده شد. سپس درب ظرف‌ها کاملاً بسته شده و در دمای ثابت ٤۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ روز در انکوباتور قرار داده شد. در طول آزمایش رطوبت نسبی داخل ظرف‌های پلاستیکی ۱۰۰ درصد بود.

برای انجام آزمون جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در هر تیمار زوال طبیعی و مصنوعی، ٤ تکرار ۲۵ تایی از بذر شمارش و بین سه عدد کاغذ حوله‌ای به ابعاد ٤۵×۳۰ سانتی‌متر قرار گرفته و طبق روش ایستا به مدت ۸ روز در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد (ISTA, 1985). معیار جوانه‌زنی نیز خروج ریشه به میزان ۲ میلی‌متر در نظر گرفته شد (Soltani *et al*., 2006). در کلیه تیمارهای دمایی منحنی پیشرفت جوانه‌زنی در مقابل زمان (ساعت) ترسیم و زمان لازم برای ۵۰ درصد (D_{50}) جوانه‌زنی از طریق درون‌یابی برآورد گردید. همچنین معکوس زمان تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی (1/D50) به‌عنوان سرعت جوانه‌زنی در نظر گرفته شد (با استفاده از برنامه جرمین) (سلطانی و مداح، ۱۳۸۹). در پایان آزمون نیز وزن خشک گیاهچه تعیین شد. شاخص قدرت بذر از حاصل‌ضرب درصد جوانه‌زنی در طول گیاهچه به دست آمد (Agrawal, 2003):

=شاخص قدرت بذر

(طول ریشه‌چه+طول ساقه‌چه) طول گیاهچه × درصد جوانه زنی

که در این رابطه طول گیاهچه بر حسب سانتی‌متر می‌باشد.

برای تعیین مراحل مختلف آبنوشی بذور نخود از هر تیمار سه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

تکرار (به عنوان مثال تیمار شاهد) از بذور نخود دورن پتری‌دیش و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵۲ ساعت آبنوشی شدند و مراحل مختلف آبنوشی تعیین گردید.

برای اندازه‌گیری پروتئین محلول مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بافت بذری (بر مبنای وزن تازه) با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج هموژنیزه شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها از فاز بالایی برای اندازه‌گیری پروتئین محلول استفاده شد. برای اندازه‌گیری پروتئین محلول، ۱۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی به لوله‌های آزمایش منتقل و به آن ۹۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. به محلول حاصل ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. بعد از ۲۰ دقیقه، میزان جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. با مقایسه با نمودار استاندارد پروتئین سرم آلبومن گاوی در مقادیر ۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، میزان پروتئین محلول در هر یک از تیمارها تعیین گردید (Bradford, 1976).

برای استخراج و دیالیز پروتئین‌ها جهت اندازه‌گیری کربونیلاسیون پروتئین‌ها ابتدا ۰/۵ گرم بافت بذری (بر مبنای وزن تازه) را با استفاده از ٦ میلی‌لیتر بافر استخراج کاملاً هموژنیزه نموده و پس از صاف نمودن و سانتریفیوژ عصاره را به مدت ۱٦ ساعت داخل لوله‌های دیالیز با کات آف ۸۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ کیلودالتون قرار داده و پس از این کار از عصاره حاصل برای اندازه‌گیری کربونیلاسیون پروتئین‌ها استفاده شد (Sun and Leopold, 1995). اندازه‌گیری میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها بر اساس روش Reznick و Packer (۱۹۹٤) به طریقه اسپکتروفتومتری و با استفاده از یک میلی‌لیتر از عصاره پروتئینی به دست آمده از عمل دیالیز در محلول دی‌نیتروفنیل هیدرازین ۱۰ میلی‌مولار در اسید کلریدریک ۲/۵ مولار انجام شد. در نهایت پس از استخراج پروتئین‌های کربونیل جذب نوری نمونه‌ها به همراه تیمار بلانک آن‌ها در طول موج ۳۷۵ نانومتر قرائت و با استفاده از ضریب خاموشی کمپلکس پروتئین–فنیل هیدرازین به مقدار ۲۲۰۰۰ بر مولار بر سانتی‌متر با استفاده از رابطه زیر میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها اندازه‌گیری شد:

= غلظت پروتئین‌های کربونیله

(ضریب خاموشی کمپلکس پروتئین–فنیل هیدرازین/میزان جذب)

برای انجام الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین ابتدا پروتئین‌ها استخراج شدند. بافر استخراج پروتئین محتوی تریس HCl ۰/۵ مولار با اسیدیته ۸، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۲ درصد، اوره ۵ مولار، بتا مرکاپتواتانول ۵ درصد به همراه EDTA ۱۰۰ میلی‌مولار بود. برای استخراج پروتئین مقدار ۱۰ میلی‌گرم از آرد نمونه بذری داخل میکروتیوب ریخته شده و ٤۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج به آن اضافه گردید و در میکروسانتریفیوژ یخچال‌دار مدل ٥٤۲٤ آر به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و از محلول رویی آن برای بارگذاری در ژل استفاده شد (Laemmli, 1970). الکتروفورز در ژل تحتانی ۱۰ درصد و ژل فوقانی ۵ درصد با استفاده از روش Laemmli (۱۹۷۰) انجام شد. پس از الکتروفورز جهت مشاهده باندهای پروتئینی ژل مربوطه با استفاده از کماسی بلو G-250 رنگ آمیزی گردید. پروتئین نشانه به کار رفته در این آزمایش نیو انگل‌اند بایولبز (New England Biolabs) از شرکت بایولبز بود.

وزن مولکولی باندهای پروتئینی مجهول از طریق حرکت نسبی (Rf) پروتئین‌ها و با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

Rf=(خط حرکت کلی مشخص شده با رنگ/مسافت پروتئین‌مجهول)

در این فرمول لگاریتم حرکت نسبی پروتئین‌ها معرف وزن مولکولی آنهاست. ابتدا از وزن مولکولی پروتئین نشانه لگاریتم گرفته و در نمودار رگرسیونی رسم شده و معادله مربوطه وزن مولکولی پروتئین مجهول محاسبه شد.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز یک گرم از بافت بذری خشک و آبنوشی شده پودر شده با ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون چینی بر 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 شده و با اضافه نمودن پراکسید هیدروژن به عنوان پیش‌ماده واکنش کاتالاز پیش‌ماده آغاز و تغییرات جذب پیش‌ماده به مدت ۲ دقیقه و هر ۲۰ ثانیه یکبار در طول موج

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

۲٤۰ نانومتر ثبت و از یک دقیقه اول آن برای محاسبه فعالیت کاتالاز استفاده گردید (Luck, 1962).

برای تعیین کیفی آنزیم کاتالاز با استفاده از روش الکتروفورز Native-PAGE به ترتیب به یک و ۲ گرم بافت بذری خشک و ١٤ ساعت آبنوشی شده، ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل تریس ۰/۱ مولار با اسیدیته برابر با ۷/۵، ساکارز ۰/٤ مولار، کلرید پتاسیم ۱۰ میلی مولار، سولفات منیزیم یک میلی مولار، EDTA یک میلی‌مولار، فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMFS) یک میلی‌مولار، تریتون X-100 ۰/۱ درصد (حجم/حجم)، پلی وینیل پلی پیرولیدون (PVPP) ۰/٦ درصد و ۲-مرکاپتو اتانول ۵۰ میلی‌مولار بود) اضافه و استخراج در داخل یخ انجام شد. عصاره حاصل پس از صاف شدن توسط پارچه ململ به مدت یک ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ فاز بالایی برداشته شده و در ژل الکتروفورز نیتیو بارگذاری شد (Jordy *et al*, 2000). الکتروفورز نیتیو در محیط احیایی حاوی تریتون X-100 انجام و پس از افزودن پیش‌ماده‌ی کاتالاز (پراکسید هیدروژن) و واکنش با آنزیم موجود در ژل با استفاده از پتاسیم فریک سیانید و کلرید آهن رنگ‌آمیزی شد.

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و برای برازش مدل دو تکه‌ای در برنامه SAS از رویه Nlin استفاده شد.

نتایج:

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در تیمارهای زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی درصد جوانه‌زنی بذر با افزایش شدت زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی کاهش یافت. با افزایش تعداد روزهای زوال مصنوعی تا سه روز کاهش درصد جوانه‌زنی بذور روند کندی داشت ولی در تیمارهای چهار و پنج روز این روند شدت بیشتری یافت. بیشترین جوانه‌زنی در تیمار شاهد حدود ۹٦ درصد و کم‌ترین جوانه‌زنی در تیمار پنج روز زوال حدود ۲٤ درصد مشاهده شد (شکل ۱). با توجه به افت درصد جوانه‌زنی در بذور نخود مشاهده شد که در تیمار سه روز زوال درصد جوانه‌زنی بذور نسبت به شاهد حدود ۱۵ درصد کاهش یافت و در تیمار چهار سال انبارداری نیز افت جوانه‌زنی بذور به همین میزان بود. در زوال طبیعی دو و چهار سال نسبت به زوال‌های شدید چهار و پنج روز افت درصد جوانه‌زنی کمتر مشاهده شد و تیمار سه روز با تیمار چهار سال تفاوت معنی‌داری نداشت.

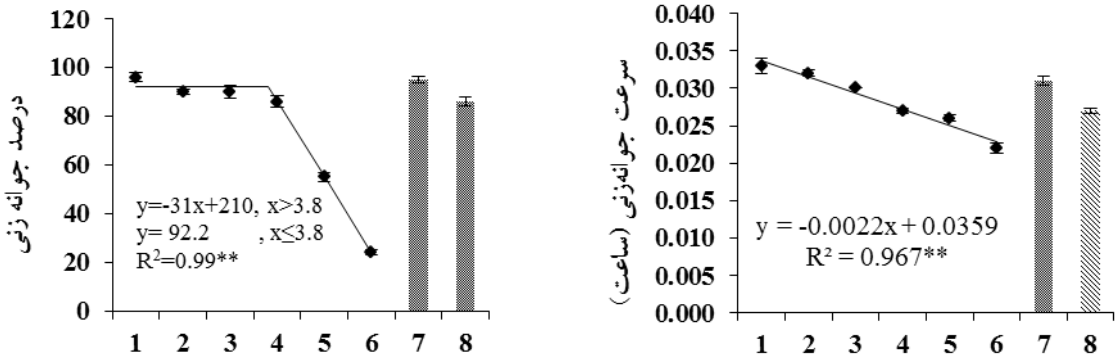
نتایج این مطالعه نشان داد در شرایط زوال مصنوعی با افزایش تعداد روزهای زوال سرعت جوانه‌زنی بذور به طور خطی کاهش یافت. بیشترین میزان سرعت جوانه‌زنی در تیمار شاهد و کم‌ترین میزان سرعت جوانه‌زنی در تیمار پنج روز زوال مشاهده شد. بذوری که تحت تیمار انبارداری طبیعی دو سال بودند از نظر سرعت جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری با تیمارهای زوال مصنوعی یک و دو روز نداشت. از طرفی تیمار انبارداری چهار سال با تیمارهای زوال مصنوعی سه و چهار روز اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۱). در زوال طبیعی دو و چهار سال نسبت به زوال‌های شدید چهار و پنج روز افت سرعت جوانه‌زنی کمتر مشاهده شد و این نشان داد که زوال مصنوعی شدید به مدت ۵ روز سرعت جوانه‌زنی بذور نخود را بیشتر از انبارداری طبیعی ٤ سال کاهش داد.

وزن خشک گیاهچه نخود با افزایش زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی به طور خطی کاهش یافت. بیشترین میزان وزن خشک گیاهچه (٦۲ میلی‌گرم) در تیمار شاهد و کمترین میزان آن (۱۲ میلی‌گرم) در تیمار زوال مصنوعی ۵ روز به دست آمد. افزایش مدت زمان انبارداری بذرها در انبار نیز سبب کاهش وزن خشک گیاهچه شد که نشان دهنده اثر منفی انبارداری طولانی بر کیفیت بذرها و کاهش قابلیت حیات آنهاست. همچنین نتایج نشان داد زوال مصنوعی ٤ و ۵ روز نسبت به انبارداری طبیعی اثر منفی بیشتری بر وزن خشک گیاهچه گذاشته است (شکل ۲).

نمودار روند شاخص قدرت بذر نیز نشان داد با افزایش شدت زوال مصنوعی تا ۳ روز این شاخص با شیب اندکی کاهش یافته ولی از آن به بعد و تا زوال ۵ روز شیب کاهش

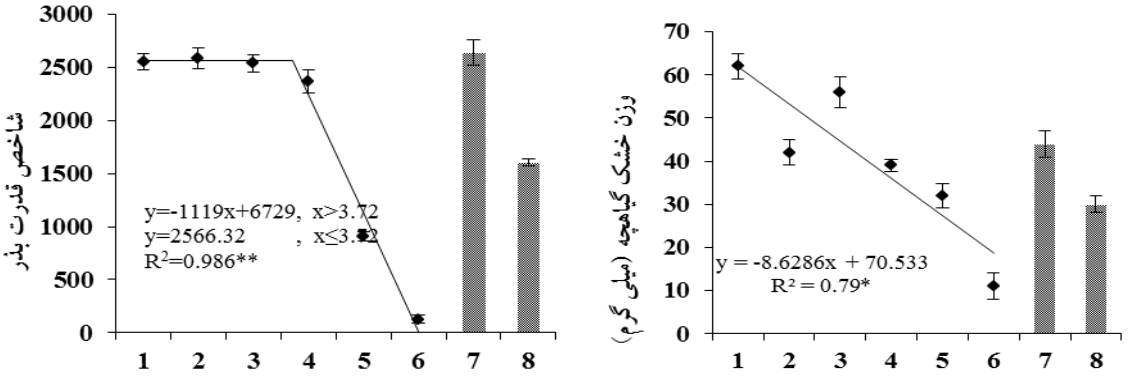
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]



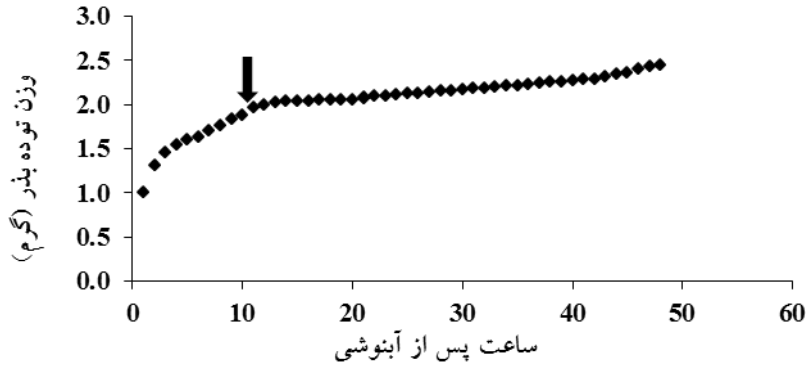
شکل ۱- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای نخود ایرانی.

(به ترتیب ۱=تیمار شاهد، ۲ الی ۵=زوال مصنوعی یک تا پنج روز و ۷ الی ۸= انبارداری طبیعی دو و چهار سال).



شکل ۲- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر وزن خشک گیاهچه و شاخص قدرت بذرهای نخود.

(به ترتیب ۱=تیمار شاهد، ۲ الی ۵=زوال مصنوعی یک تا پنج روز و ۷ الی ۸= انبارداری طبیعی دو و چهار سال).



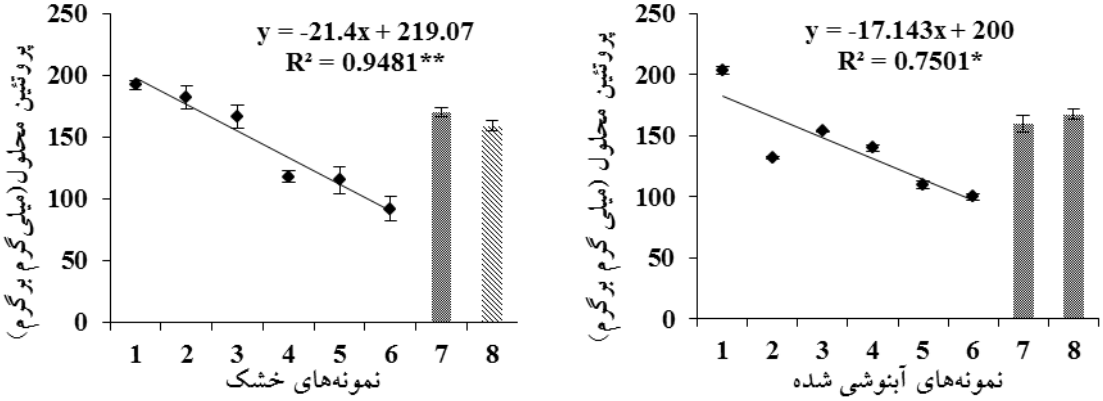
شکل ۳- مراحل مختلف آبنوشی در بذر نخود ایرانی.

شاخص قدرت بذر بیشتر شد به طوری که در زوال ۵ روز به حداقل میزان خود رسید. کاهش شاخص قدرت بذر در تیمارهای انبارداری طبیعی ۲ و ٤ سال نسبت به زوال مصنوعی ٤ و ۵ روز بالاتر بود (شکل ۲).

برای اندازه‌گیری تغییرات کمی پروتئین‌ها و آنزیم کاتالاز از بذور خشک و بذوری که به مدت ١٤ ساعت آبنوشی شدند و وارد فاز دوم آبنوشی شده بودند استفاده گردید (شکل ۳). بیشترین میزان پروتئین محلول در نمونه‌های خشک و ١٤ ساعت آبنوشی شده مربوط به تیمار شاهد بود. با افزایش تعداد روزهای زوال مصنوعی میزان پروتئین محلول نیز به صورت خطی کاهش یافت. پس از ١٤ ساعت آبنوشی میزان پروتئین محلول در زوال دو و سه روز بیشتر از زوال مصنوعی یک روز

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]



شکل ٤- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان پروتئین محلول نمونه‌های بذری خشک و آبنوشی شده نخود ایرانی.
(به ترتیب ۱=تیمار شاهد، ۲ الی ۵=زوال مصنوعی یک تا پنج روز و ۷ الی ۸= انبارداری طبیعی دو و چهار سال).

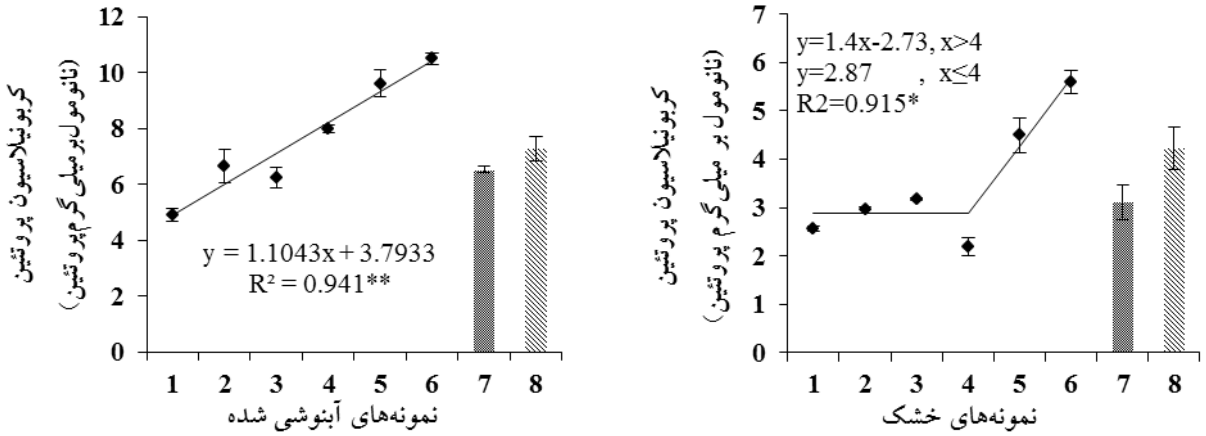
بود. میزان پروتئین محلول در تیمارهای انبارداری طبیعی بیشتر از زوال مصنوعی سه، چهار و پنج روز بود و مشاهده شد که بین تیمارهای مختلف انبارداری طبیعی از این نظر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. این نتایج نشان داد که زوال مصنوعی نسبت به انبارداری طبیعی میزان پروتئین محلول را بیشتر کاهش داده است (شکل ٤).

نتایج این تحقیق نشان داد طی افزایش مدت زمان زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی تغییراتی در کربونیلاسیون پروتئین‌های بذور نخود مشاهده شد. در هر دو نمونه‌های خشک و آبنوشی شده با افزایش شدت زوال مصنوعی و همچنین افزایش مدت زمان انبارداری طبیعی میزان کربونیلاسیون پروتئین افزایش یافت که این افزایش در نمونه‌های آبنوشی شده نسبت به نمونه‌های خشک بیشتر بود و روند فزایش آنها نیز خطی بود. در نمونه‌های خشک افزایش مدت زمان زوال مصنوعی تا سه روز سبب افزایش اندکی در کربونیلاسیون پروتئین‌ها شد ولی در تیمارهای زوال ٤ و ٥ روز شدت کربونیلاسیون پروتئین‌ها افزایش بیشتری یافت. همچنین در هر دو نمونه خشک و آبنوشی شده میزان کربونیلاسیون پروتئین در تیمارهای انبارداری طبیعی از تیمارهای زوال مصنوعی ٤ و ٥ روز کمتر بود (شکل ٥).

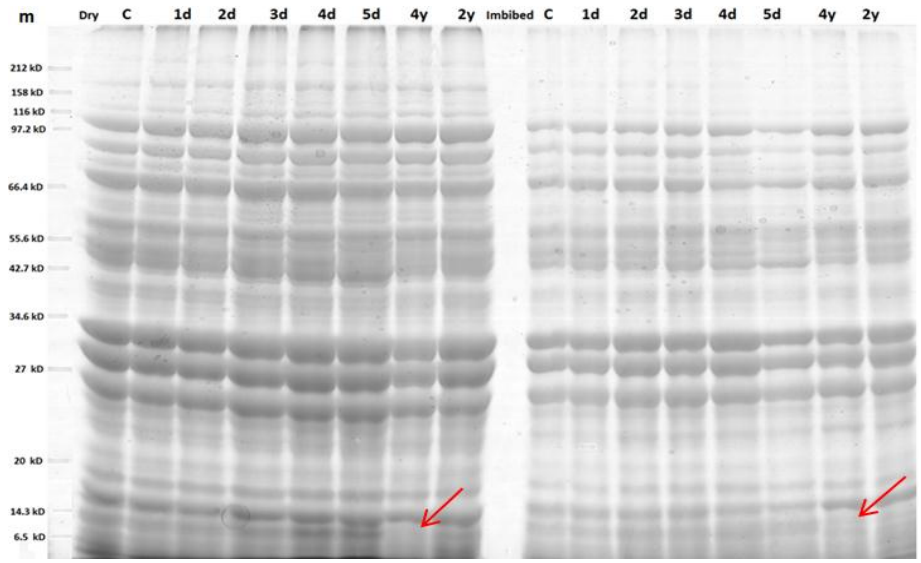
نتایج حاصل از الکتروفورز تک بعدی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر نخود در شرایط مختف انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی در نمونه‌های خشک و ١٤ ساعت آبنوشی نشان داد در طی زوال مصنوعی تغییر خاصی در باندهای پروتئینی حاصل از SDS-page مشاهده نشده ولی در تیمارهای انبارداری طبیعی تغییراتی مشاهده گردید. در ژل الکتروفورزی مشاهده شد که در تیمار انبارداری طبیعی به مدت ٤ سال و در بذور خشک یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۹/۹ کیلودالتون حذف گردیده ولی در تیمارهای آبنوشی شده دوباره این باند پروتئینی احیا شده است. (شکل ٦).

برای بررسی دقیق‌تر تغییر در باندهای پروتئینی بذرهایی که به مدت ٤ سال در انبار نگه‌داری شده بودند را به همراه سایر تیمارها به مدت ٤، ٨ و ١٢ ساعت در معرض آبنوشی قرار داده و الکتروفورز تک بعدی پروتئین‌های بذور نخود دوباره انجام شد. ژل حاصل از الکتروفورز تک بعدی در نمونه‌ی خشک و نمونه‌های آبنوشی شده نشان داد در تیمار چهار سال انبارداری باند پروتئینی با زون مولکولی ۹/۹ کیلودالتون در نمونه‌های خشک حذف شده که در سایر تیمارهای انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی این باند وجود داشت. با آبنوشی بذرها به مدت ٤، ٨ و ١٢ ساعت این باند دوباره احیا گردید. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش مدت زمان انبارداری بذرها تغییراتی در پروتئین‌های آن‌ها رخ داده که منجر به تخریب پروتئین‌های موجود در بذر و کربونیلاسیون آن‌ها می‌گردد ولی با این وجود با شروع آبگیری بذرها مرحله‌های ترمیمی شروع به کار نموده و سبب احیای برخی از خسارات وارد شده به بذر می‌گردد. با توجه به اینکه با افزایش مدت زمان انبارداری در بذرها میزان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]



شکل ۵- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر کربونیلاسیون پروتئین‌های بذری در نمونه‌های خشک و آبنوشی شده نخود ایرانی. میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند فاقد تفاوت معنی‌دار با هم هستند.

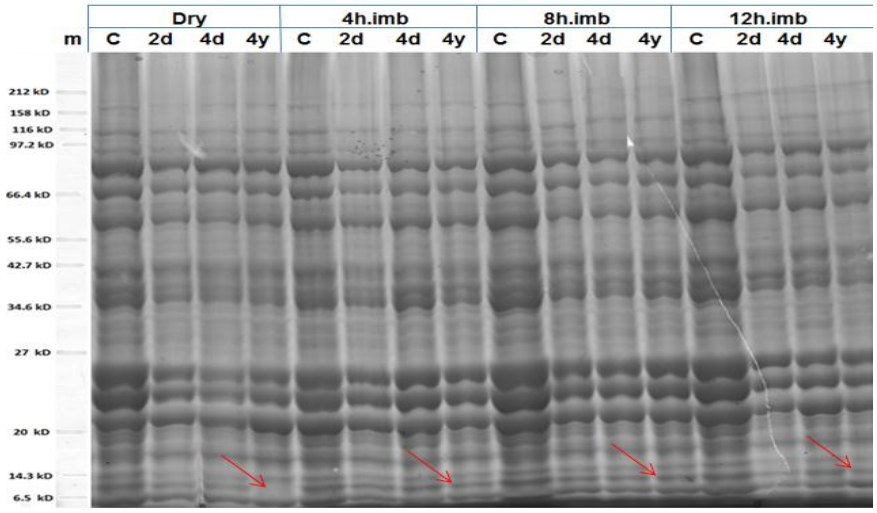


شکل ٦- الکتروفورز (SDS-PSGE) پروتئین‌های ذخیره‌ای بذور نخود تحت اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی (m=مارکر،C =شاهد، 1d=زوال یک روز، 2d= زوال دو روز، 3d= زوال سه روز، 4d= زوال چهار روز، 5d= زوال پنج روز، 2y= زوال دو سال، 4d= زوال چهار سال، Dry=نمونه‌های خشک و Imbibed=نمونه‌های آبنوشی شده به مدت ١٤ ساعت)

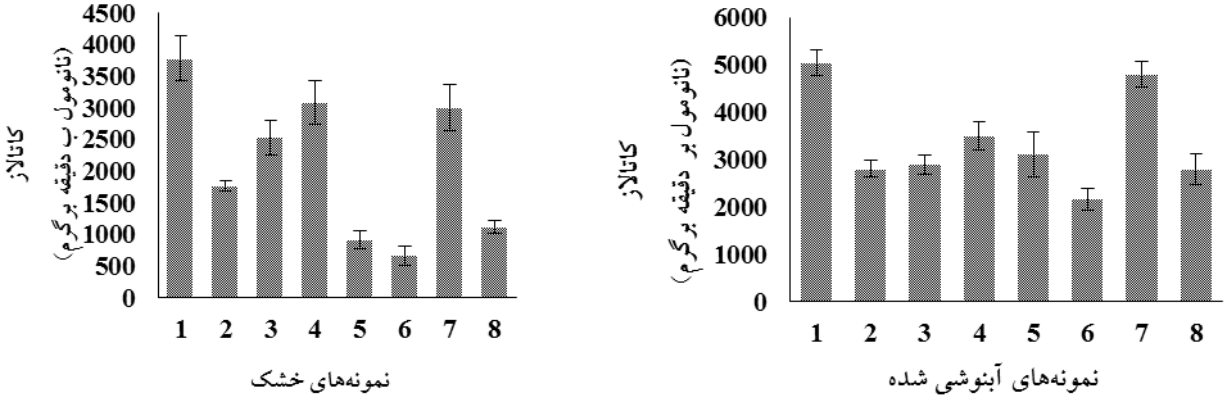
پروتئین محلول کاهش یافته و میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها افزایش یافته است می‌توان نتیجه گرفت که باندی که با آبنوشی بذر شروع به تظاهر دوباره می‌نماید ممکن است همه‌ی پروتئین‌های اولیه بذر را احیا ننموده بلکه به احتمال زیاد بخشی از این پروتئین‌ها بازسازی شده‌اند و یا ممکن است پروتئین‌های جدیدی با وزن مولکولی ۹/۹ کیلودالتون شروع به سنتز نموده باشند. به هر حال آنچه که مشهود است این است که زوال مصنوعی به مدت یک الی ۵ روز و همچنین انبارداری بذور به مدت دو سال هیچ تغییری را در الگوی باندهای پروتئینی بذور نخود در شرایط تک بعدی نشان نداد ولی مشاهده شد که با گذشت چهار سال یکی از باندهای پروتئینی سبک با وزن مولکولی ۹/۹ کیلو دالتون حذف شده است که ناشی از اثرات زوال بذر طی انباردری طبیعی می‌باشد. (شکل ۷)

نتایج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد در نمونه‌های خشک و آبنوشی شده میزان فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد بالاترین میزان بود و با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]



شکل ۷- الکتروفورز (SDS-PSGE) پروتئین‌های ذخیره‌ای بذور نخود تحت اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی در ساعت‌های آبنوشی (m=مارکر،C =شاهد، 2d= زوال دو روز، 4d= زوال چهار روز، Dry=نمونه‌های خشک و imb=نمونه‌های آبنوشی شده به مدت ٤، ٨ و ١٢ ساعت)



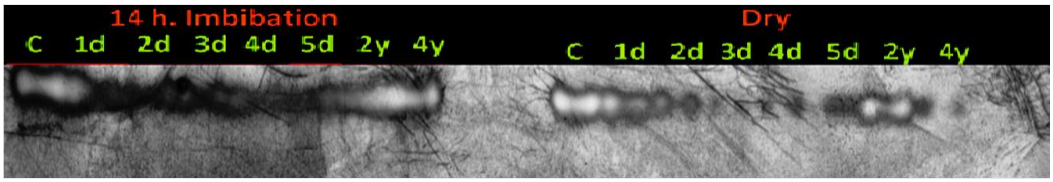
شکل ۸- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه‌های خشک و آبنوشی شده نخود ایرانی.
(به ترتیب ۱=تیمار شاهد، ۲ الی ۵=زوال مصنوعی یک تا پنج روز و ۷ الی ۸= انبارداری طبیعی دو و چهار سال).

افزایش شدت زوال مصنوعی و همچنین افزایش مدت زمان انبارداری طبیعی میزان فعالیت این آنزیم کاهش یافت. در نمونه‌های خشک میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از یک تا سه روز افزایش یافت و از سه روز به بعد میزان فعالیت آن کاهش یافت تا به کم‌ترین میزان فعالیت خود در تیمار ۵ روز رسید. در نمونه‌های خشک و آبنوشی شده از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز بین تیمارهای زوال ۲ و ۳ روز با انبارداری دو سال اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۸).

نتیجه زایموگرام آنزیم کاتالاز حاکی از وجود یک باند فعالیت از این آنزیم در گیاه نخود بود و این آنزیم در بذور خشک و آبنوشی شده به مدت ١٤ ساعت فعالیت داشت. این نتایج نشان داد در بذور خشک و آبنوشی شده میزان حضور آنزیم کاتالاز با افزایش شدت زوال کاهش یافت (شکل ۹). در بذور خشک در تیمارهای دو، سه، چهار و پنج روز زوال باند کاتالاز به طور ضعیفی قابل رویت بود (شکل ۱۰). همچنین در بذور نگه‌داری شده در انبار آنزیم کاتالاز در حالت خشک و آبنوشی شده با سوبسترای خود واکنش داده و منجر به تشکیل باند روشن گردید و مشاهده شد که در نمونه‌های آبنوشی شده میزان فعالیت این آنزیم بر حسب واکنش آن‌ها با سوبسترای خود بیشتر بوده است. در نمونه‌های خشک میزان واکنش آنزیم

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

شکل ۹- الکتروفورز ((Native-PSGE آنزیم کاتالاز بذور نخود تحت اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی (C=شاهد، 1d=زوال یک روز، 2d= زوال دو روز، 3d= زوال سه روز، 4d= زوال چهار روز، 5d= زوال پنج روز، 2y= زوال دو سال، 4d= زوال چهار سال، Dry=نمونه‌های خشک و Imbibed=نمونه‌های آبنوشی شده به مدت ١٤ ساعت)



شکل ۱۰- الکتروفورز ((Native-PSGE آنزیم کاتالاز بذور نخود تحت اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی با شدت رنگ کمتر (C=شاهد، 1d=زوال یک روز، 2d= زوال دو روز، 3d= زوال سه روز، 4d= زوال چهار روز، 5d= زوال پنج روز، 2y= زوال دو سال، 4d= زوال چهار سال، Dry=نمونه‌های خشک و Imbibed=نمونه‌های آبنوشی شده به مدت ١٤ ساعت)

کاتالاز با سوبسترای خود در تیمار انبارداری ٤ سال با افزایش مدت زمان انبارداری کاهش یافت و منجر به تشکیل باند ضعیف‌تری نسبت به انبارداری ۲ سال شد (شکل ۹).

بحث:

درصد جوانه‌زنی، وزن خشک گیاهچه و شاخص قدرت بذور نخود در زوال تسریع شده به خصوص زوال ٤ و ٥ روز نسبت به انبارداری طبیعی کاهش بیشتری را نشان داد. در شرایط مختلف زوال طبیعی و مصنوعی دما و رطوبت نسبی محیط بر میزان جوانه‌زنی بذور اثر گذاشته و افزایش دما و رطوبت محیط سبب تسریع زوال بذر می‌گردد (Nkang and Umoh, 1997). در شرایط زوال مصنوعی رطوبت و دمای محیط بالاست در نتیجه میزان خسارت وارد شده به بذر نخود بیشتر از انبارداری طبیعی بوده و درصد جوانه‌زنی نیز با افت بیشتری مواجه شده است. نگه‌داری طولانی مدت بذور در انبار سبب افت قدرت و جوانه‌زنی بذور می‌گردد (Akhtar, 1992). در این تحقیق مشاهده شد که زوال‌های طبیعی و مصنوعی شدید سبب کاهش کیفیت و در نهایت سبب کاهش حداکثر میزان جوانه‌زنی بذور شد به طوری که در شرایط انبارداری ٥ روز درصد جوانه‌زنی به حدود ۲۰ درصد تیمار شاهد رسید. طهماسبی و همکاران (۱۳۹٤) بیان نمودند که زوال سبب کاهش درصد جوانه‌زنی بذور آفتابگردان شده و علت اصلی این پدیده را کاهش قابلیت زنده‌مانی بذر طی زوال عنوان نمودند. کاهش سرعت جوانه‌زنی بذور نخود در شرایط انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی به دلیل کاهش قدرت و کیفیت بذور در شرایط انبارداری و زوال بوده که اثر زوال مصنوعی ٥ روز بر سرعت جوانه‌زنی نسبت به انبارداری طبیعی ۲ و ٤ سال بیشتر بود. پیری تسریع شده و کنترل شده به عنوان یک نشانگر برای طول عمر بذر در شرایط انبارداری طبیعی مورد استفاده قرار گرفته است (Demir and Mavi, 2008). محسن نسب و همکاران (۱۳۸۹) عنوان نمودند که افزایش شدت زوال سبب کاهش سرعت جوانه‌زنی بذور می‌گردد. آن‌ها عنوان نمودند سرعت جوانه‌زنی یکی از شاخص‌های مهم در تعیین کیفیت بذر می‌باشد و هر چه بذرها بتوانند در مدت زمان کمتری، درصد جوانه‌زنی بالاتری داشته باشند از سرعت جوانه‌زنی بالاتری نیز برخوردار خواهند بود. قدرت بالاتر بذرها سبب افزیش سرعت جوانه‌زنی آن‌ها می‌گردد (حسینی، ۱۳۸۷). بذور دارای قدرت بالاتر کارکرد بهتری داشته و در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

نتیجه درصد و سرعت جوانه‌زنی آن‌ها تحت شرایط تنش‌های مختلف محیطی بیشتر شده و در نهایت درصد سبز و عملکرد بالاتری در مزرعه دارند (قاسمی گلعذانی و همکاران، ۱۳۷۵). سلطانی و همکاران (۱۳۸۷) با بررسی اثر زوال بذر بر ذخایر بذر و رشد هتروتروفیک گیاهچه گندم بیان کردند که بذور زوال یافته نسبت به بذور شاهد سرعت جوانه‌زنی کمتری داشته و به ازای هر روز افزایش در دوره زوال بذر این سرعت به میزان ۰/۹ درصد کاهش یافته است.

کاهش قدرت، درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور و وزن خشک گیاهچه طی زوال دارای دلایل بیوفیزیکی و بیوشیمیایی متعدد می‌باشد. تغییراتی که در ترکیبات ذخیره‌ای بذر رخ می‌دهد از این دست تغییرات می‌باشند. ذخایر بذری شامل مولکول‌های پیچیده‌ای هستند (Bewley and Black, 1995). پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها از جمله ماکرومولکول‌های ضروری برای انجام فرآیند جوانه‌زنی می‌باشند زیرا بخشی از این ترکیبات طی زوال بذر تخریب شده و این بخش تخریب شده جهت تأمین انرژی و بیوسنتز ترکیبات جدید کاربردی ندارند (McDonald, 1999). نتایج این تحقیق نشان داد با افزایش شدت زوال مصنوعی و همچنین افزایش مدت زمان انبارداری طبیعی میزان پروتئین محلول کاهش یافت ولی شدت کاهش میزان پروتئین محلول در شرایط زوال مصنوعی شدید بیشتر از شرایط انبارداری طبیعی بود. همچنین میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها در هر دو شرایط خشک و آبنوشی شده با افزایش شدت زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی افزایش یافت. شدت‌های بالای زوال مصنوعی اثر بیشتری بر کربونیلاسیون پروتئین‌ها نسبت به انبارداری طبیعی داشت. محققین دیگر نیز بیان نمودند که شدت زوال سبب کاهش میزان سنتز پروتئین در بذر می‌گردد (McDonald, 1999; Barsa *et al*., 2003). McDonald (۱۹۹۹) بیان نمود که طی زوال بذر خسارت به DNA سبب خسارت به فرآیند پروتئین‌سازی شده که در نهایت میزان پروتئین محلول که جهت جوانه‌زنی بذر مورد نیاز است کاهش یافته است. این یافته‌ها بیان می‌دارید که کاهش میزان پروتئین محلول با افزایش میزان پروتئین‌های کربونیله شده رابطه داشته و نشان دهنده این واقعیت بوده که شرایطی که باعث افزایش کربونیلاسیون پروتئین می‌گردد میزان پروتئین محلول را کاهش می‌دهد. Sun و Leopold (۱۹۹۵) نیز بیان نمود که اندازه‌گیری کربونیلاسیون پروتئین می‌تواند اطلاعاتی در مورد خسارت زوال به پروتئین‌های بذر به ما ارائه نماید. در این مطالعه با افزایش میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها، درصد جوانه‌زنی نیز کاهش یافت و با توجه به اینکه کربونیلاسیون پروتئین‌ها در تیمارهای زوال مصنوعی شدید بیشتر بود افت درصد جوانه‌زنی در این تیمار نیز نسبت به تیمار انبارداری طبیعی بیشتر بود. کربونیلاسیون پروتئین‌ها می‌تواند در ساعات ابتدای جوانه‌زنی خسارات جبران ناپذیری را به بذر وارد نموده و سبب کاهش معنی‌دار درصد جوانه‌زنی خواهد شد (Simontacchi *et al*., 1993). شرایط زوال مصنوعی که دما و رطوبت نسبت به انبارداری طبیعی بالاتر است اثر بیشتری بر کاهش پروتئین محلول و افزایش کربونیلاسیون پروتئین‌ها داشت. با افزایش شدت زوال میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها افزایش یافته که این میزان در تیمارهای انبارداری طبیعی کمتر از زوال مصنوعی بود. بیشتر بودن میزان پروتئین محلول در تیمارهای انبارداری طبیعی و همچنین کاهش میزان کربونیلاسیون پروتئین در این تیمار نسبت به زوال مصنوعی قابل توجیه می‌باشد. به عقیده‌ی Balesevic-Tubic و همکاران (۲۰۱۰) با افزایش دما و رطوبت محیط طی انبارداری بذور ارتودوکس قابلیت حیات آن‌ها کاهش می‌یابد. در این شرایط و با توجه به بالا بودن میزان دمای محیط تنفس بذر افزایش یافته و در نتیجه استفاده از کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های ذخیره‌ای افزایش یافته که سبب کاهش میزان پروتئین محلول بذر می‌گردد (Kochanek *et al*., 2009). این در حالی است که به دنبال افزایش دمای انبار دناتوره شدن پروتئین‌ها افزایش یافته (Probert *et al*., 2009) و همین امر دلیل اصلی افزایش پروتئین‌های کربونیله شده تحت شرایط زول مصنوعی و انبارداری طبیعی نسبت به شاهد می‌باشد. از طرفی با افزایش رطوبت محیط و بر طبق منحنی‌های هیگروسکوپیک جذب آب

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

در بذر میزان رطوبت بذر نیز افزایش یافته و همین امر سبب افزایش تنفس بذر و فعال شدن برخی از آنزیم‌های کاتابولیک شده که مصرف کربوهیدرات و پروتئین‌های ذخیره‌ای را افزایش می‌دهند (Nagel and Borner, 2010). با افزایش میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها در شرایط زوال مصنوعی می‌توان بیان داشت که تحت این شرایط عواملی از قبیل افزایش دسترسی پروتئین‌ها به پروتئینازها برای دناتوره شدن، افزایش فعالیت پروتئینازها و افزایش فرآیند پروتئولیز به وسیله‌ی تغییرات مولکولی در پلی‌پپتیدها از دلایل اصلی دناتوره شدن و کربونیلاسیون پروتئین‌ها می‌باشند (Kumar *et al*., 1999). با توجه به اینکه در شرایط انبارداری طبیعی رطوبت محیط اندک بود ولی مشاهده شد که همگام با افزایش مدت زمان انبارداری میزان جوانه‌زنی بذرها نسبت به زوال‌های مصنوعی شدید کاهش کمتری یافت و همچنین میزان پروتئین محلول نیز روندی مشابه داشت. در بذور ارتودوکس از قبیل نخود حضور پروتئین‌های ویژه‌ای از قبیل پروتئین‌های شوک گرمایی، پروتئین‌های فراوان سنتز شده در اواخر جنین زایی (LEA) و برخی از پروتئین‌های ذخیره‌ای سبب افزایش تحمل بذر به پسابیدگی و نگه‌داری حالت سکون در بذر می‌باشند (Wang, 2015). Rajjou و همکاران (۲۰۰۸) بیان داشت که یک همبستگی مثبت بین وجود این پروتئین‌های تنشی با قابلیت حیات بذر وجود دارد. در این تحقیق نیز کاهش قابلیت حیات بذر در شرایط زوال مصنوعی همراه با افزایش شدید تخریب پروتئینی و کربونیلاسیون پروتئین‌ها در هر دو شرایط خشک و آبنوشی شده بود. این در حالی است که طی وقوع تنش در بذرها برخی از پروتئین‌های مخصوص تنش شکل گرفته و در اجتناب بذر از تنش دخالت داشته و سبب‌ترمیم خسارات وارده به بذر و محافظت ماشین سلولی از اثرات تنش می‌گردند (Rajjou, 2008).

نتایج الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای نشان داد که با افزایش مدت زمان انبارداری بذور تا چهار سال گستردگی باندهای پروتئینی بذر نخود کاهش یافته و با گذشت زمان نگه‌داری بذور به مدت چهار سال یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۹/۹ کیلو دالتون حذف شد و این نتایج با نتایج کار Machado و همکاران (۲۰۰۱) و همچنین Sathish و همکاران (۲۰۱۵) همخوانی داشت. این یافته‌ها بیان می‌دارد که الگوی پروتئینی بذر طی انبارداری بذر تغییر یافته که سبب تخریب پروتئین‌های موجود در بذر زوال یافته می‌شوند و با شروع آبنوشی بذر مرحله‌ی ترمیم افزایش یافته و شروع به بازسازی پروتئین تخریب شده و یا پروتئین‌های جدیدی با وزن مولکولی مشابه می‌کنند. به گفته‌ی Rajjou و همکاران (۲۰۰۸) کاهش باندهای پروتئینی به دلیل تغییرات پس از ترجمه و تغییر شکل پروتئین‌ها طی زوال بذر می‌باشد. Sathish و همکاران (۲۰۱۵) نیز بیان نمودند که در بذور زوال یافته ماش به مدت یک تا ۵ روز هیچ گونه تغییری در الگوی باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های آن‌ها مشاهده نشد ولی از زوال ٦ تا ۱۰ روز یکی از باندهای پروتئینی با وزن مولکولی ٦۰/۲۱ کیلو دالتون حذف شد. همچنین Vasudevan و همکاران (۲۰۱۲) بیان نمودند که برخی از باندهای پروتئین بذور بادام زمینی که تحت تأثیر زوال ٦ و ۹ روز قرار گرفته بودند، حذف شدند. آن‌ها بیان نمودند که این تغییرات در بذوری که در معرض زوال مصنوعی قرار گرفتند مشابه تغییرات در بذوری بود که در انبار طبیعی نگه‌داری شد بودند. طی زوال بذر تغییراتی در ترکیب پروتئین‌های غشا، دناتوره شدن پروتئین‌ها رخ داده و سبب کاهش فرآیند ترجمه‌ی mRNA می‌گردد (Nooden, 2012; Delahaie *et al*., 2013). Golovina و همکاران (۱۹۹۷) بیان داشتند که در شرایط انبارداری طبیعی با رطوبت کم پروتئین‌ها حساسیت بیشتری به دناتوره شدن دارند ولی با این وجود تحت این شرایط خسارت اکسیداتیو به آنزیم‌ها از دلایل اصلی دخیل در زوال بذر می‌باشد (Walters, 2007). Kapoor و همکاران (۲۰۱۰) نیز بیان داشتند که طی زوال بذر پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر کاهش یافته‌اند. Rajjou و همکاران (۲۰۰۸) بیان داشتند که کاهش قدرت و قابلیت حیات بذر در زمان جوانه‌زنی می‌تواند به دلیل تغییر در پروتئین‌های بذر خشک طی زوال باشد. به هر حال طی زوال بذر با اثر رادیکال‌های آزاد بر پروتئین‌ها خسارات

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

زیادی به پروتئین‌ها وارد شده که سبب کاهش کارایی آنها می‌گردد (Sathish *et al*., 2015).

گیاهان دارای پروتئین‌های متفاوتی بوده که برخی از آن‌ها از قبیل کاتالاز قابلیت متابولیزه نمودن پراکسید هیدروژن را دارا می‌باشند (Tayefi-Nasrabadi *et al*., 2011). کارکردهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی به آنزیم کاتالاز نسبت داده شده است که می‌توان از بین آنها به سمیت زدایی پراکسید هیدروژن، پاسخ به تنش، دخالت در سیستم دفاعی گیاهی، رسیدگی میوه، خشک شدن و زوال بذر و گیاه اشاره نمود (Andrea, 1998). در این تحقیق مشاهده شد که با توجه به اینکه بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو نمونه خشک و آبنوشی شده مربوط به تیمار شاهد بود با افزایش شدت زوال مصنوعی تا سه روز میزان فعالیت این آنزیم افزایش و از آن به بعد کاهش یافت. در نمونه‌های انبارداری طبیعی نیز میزان فعالیت این آنزیم بیشتر از زوال مصنوعی ۵ روز بود. به گفته McDonald (۲۰۰٤) طی زوال بذر فعالیت آنزیم‌های پالاینده رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و سبب کاهش خسارت به پروتئین، DNA و افزایش ذخیره‌ی آمینواسیدی شده و از این طریق قدرت و قابلیت حیات بذور را در طی زوال افزایش می‌دهند. به منظور مشاهده حضور آنزیم کاتالاز الکتروفورز نیتیو در دمای ٤ درجه سانتیگراد انجام و سپس ژل در مجاورت سوبسترای کاتالاز که پراکسیدهیدروژن بود قرار گرفت و باند پروتئینی کاتالاز ظاهر شد. برای وقوع واکنش آنزیم با سوبسترا بایستی آنزیم در فرم ساختمانی کامل خود باشد (فریدی و همکاران، ۱۳۸۹). دمای بهینه فعالیت کاتالاز ۳۷ درجه سانتی‌گراد بوده و سوبسترای این آنزیم در این دما بهترین واکنش را با آنزیم کاتالاز انجام داد. وقوع واکنش آنزیم کاتالاز با سوبسترای خود منجر به ظهور یک باند از این آنزیم شد که نشان دهنده حضور یک باند فعالیت از آنزیم کاتالاز در بذور نخود می‌باشد. باند کاتالازی مشاهده شده معرف ایزوفورم خاصی از آنزیم کاتالاز نبوده و صرفاً فعالیت و حضور کاتالاز را در نمونه بیان داشته و برای تشخیص دقیق ایزوفورم‌های مختلف آنزیم کاتالاز بایستی از تکنیک ایزالکتریک فوکوسینگ (IEF) استفاده نمود. با این حال باند کاتالازی مشاهده شده در این آزمایش ممکن است متشکل از چند نو ایزوفورم متفاوت از آنزیم کاتالاز باشد. بسیاری از پژوهشگران وجود بیش از یک ایزوفورم از آنزیم کاتالاز را در گیاهان مختلف از قبیل آفتابگردان، گندم، کاج، فلفل، پنبه، ذرت، اسفناج، تنباکو، سیر و گلرنگ گزارش نموده‌ان (Lee and An, 2005; Garcia *et al*., 2000; Havir and McHale, 1987; Mullen and Gifford, 1993). به عنوان نمونه در گیاهان تک لپه از قبیل ذرت و همچنین در برخی دو لپه‌ای‌ها از قبیل تنباکو، آرابیدوپسیس و کدو آنزیم کاتالاز دارای سه ایزوفورم مختلف بوده که توسط سه ژن مختلف کد می‌شوند (Mhamdi *et al*., 2010). قوت و ضعف ظهور باند فعالیت مربوط به آنزیم کاتالاز با داده‌های حاصل از فعالیت این آنزیم هم‌خوانی داشته و هر تیماری که فعالیت کاتالاز در آن بیشتر بوده تشکیل باند روشن‌تری داده و تیماری هم که فعالیت آنزیمی کمتری داشته باند ضعیف‌تری تشکیل داد. در نمونه‌های خشک و در زوال‌های ۳ تا ۵ روز شدت ظهور باند کاتالاز به حدی اندک بود که در غلظت رنگ بالا (در جهت رنگ‌آمیزی بهتر ژل و ظهور بیشتر باندها) قادر به رویت نبودند ولی با بررسی ژل‌هایی که با غلظت کمتری رنگ‌آمیزی شدند مشاهده می‌گردد که آنزیم کاتالاز به میزان اندک بر روی ژل طاهر گردید که نشان دهنده فعالیت اندک این آنزیم در این تیمارها می‌باشد (شکل ۱۰). Kibinza و همکاران (۲۰۱۱) نیز بیان نمودند که کاتالاز یک آنزیم کلیدی دخیل در فرآیندهای ترمیمی بذر پس از زوال بذر می‌باشد که پس از آبنوشی بذر در طی پرایمینگ سنتز این آنزیم افزایش یافته است. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و ضعیف شدن باندهای کاتالازی در تیمارهای زوال شدید مصنوعی و انبارداری طبیعی ٤ سال بیشتر بود و بیشترین کاهش این صفات در تیمارهای زوال مصنوعی ٤ و ۵ روز بود که کم‌ترین درصد جوانه‌زنی بذور نخود در آن‌ها رخ داد. این نتایج بیان می‌دارد که کاهش قابلیت حیات و جوانه‌زنی بذرهای نخود با کاهش فعالیت و میزان حضور آنزیم کاتالاز رابطه مثبت دارد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

نتیجه‌گیری کلی:

نتایج این تحقیق نشان داد کاهش قدرت بذر به دلیل کاهش کیفیت آنها سبب کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی و در نهایت کاهش میزان وزن خشک تولیدی گیاهچه شده است. کاهش درصد جوانه‌زنی بذور به دنبال خسارات سلولی و کاهش قابلیت حیات بذور رخ می‌دهد. زوال بذر از عواملی است که با ایجاد شرایط تنش اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در این شرایط سبب ایجاد خسارات جبران ناپذیری به بذر شده که به دنبال آن درصد و سرعت جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. در این تحقیق مشخص شد که زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی سبب کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور شد که اثر زوال مصنوعی ۵ روز در کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی بیشتر از انبارداری طبیعی ۲ و ٤ سال بود. کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی همگام با کاهش میزان پروتئین محلول و افزایش کربونیلاسیون پروتئین بود. تغییرات پروتئینی در تیمار انبارداری طبیعی ٤ سال منجر به حذف یک باند پروتئینی در الگوی الکتروفورزی شد و مشاهده شد که با شروع آبگیری بذور این باند احیا گردید. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد و کاهش شدید آن در تیمارهای زوال ٤ و ۵ روز را نیز می‌توان از روی الگوی ظهور باند فعالیت کاتالازی اثبات نمود. در نهایت نتایج این تحقیق نشان داد افزایش شدت زوال مصنوعی و افزایش مدت زمان انبارداری طبیعی بذر سبب تغییر در پروتئین‌های بذر نخود و افزایش کربونیلاسیون آن‌ها شده و با کاهش بیشتر حضور و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل کاتالاز سبب کاهش قابلیت حیات بذر و کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور نخود شد و این کاهش در تیمارهای زوال مصنوعی شدید نسبت به انبارداری طبیعی بیشتر بود.

منابع:

حسینی، ف. (۱۳۸۷) بررسی اثر زوال بذر بر جوانه زنی، استقرار و عملکرد پنج رقم کلزا در شرایط آب و هوایی اهواز. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی اهواز .اهواز، ایران.

سلطانی، ا. و مداح، و. (۱۳۸۹) برنامه‌های کاربردی ساده برای آموزش و پژوهش در کشاورزی. انجمن علمی بوم شناختی ایران.

سلطانی، ا.، کامکار، ب.، گالشی، س. و اکرم قادری، ف. (۱۳۸۷) اثر زوال بذر بر ذخایر ژنتیکی بذور و رشد هتروتروفیک گیاهچه گندم. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۱۵: ٦۸-۷٦.

طهماسبی، ب.، قادری‌فر، ف.، صادقی پور، ح. ر. و گالشی، س. (۱۳۹٤) تأثیر زوال تسریع شده بر پارامترهای جوانه زنی، اسیدهای چرب و هیدروپراکسیدهای لیپیدی بذرهای آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.). نشریه فرآیندها و کارکرد گیاهی ٤: ۷۳-۸۳.

فریدی، م.، سریری، ر.، جعفریان، و. و ناظم. ح. (۱۳۸۹) استخراج و بررسی مشخصات آنزیم تایروزیناز بادام زمینی شمال ایران. مجله زیست شناسی گیاهی ایران ۲: ٤۹-٦۲.

قادری‌فر، ف.، سلطانی، ا. و صادقی پور، ح.ر. (۱۳۹۳) تغییرات بیوشیمیایی طی زوال بذرهای کدوی تخم کاغذی: پراکسیداسیون لیپید و صدمات غشا. مجله زیست شناسی گیاهی ایران ٦: ۹٦-۱۱۲.

قاسمی گلعذانی، ک.، صالحیان، م.، رحیمزاده خوی، ف. و مقدم، م. (۱۳۷۵) اثر قدرت بذر بر سبز شدن گیاهچه گندم و عملکرد دانه گندم. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۲:٤۸-٥٤.

محسن نسب، ف.، شرفی زاده، م. و سیادت، ع. (۱۳۸۹) بررسی اثر زوال بذر(پیری تسریع شده) بر جوانه زنی و رشد گیاهچه‌ی ارقام گندم در شرایط آزمایشگاه. فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی گیاهان زراعی ۲: ۸۷-۹۰.

Agrawal, R. (2003) Seed technology. Pub. Co. PVT. LTD. New Delhi. India.

Akhter, F. N., Kabir, G., Mannan, M. A. and Shaheen, N. N. (1992) Aging effect of wheat and barley seeds upon germination mitotic index and chromosomal damage. Journal of Islamic Academic of Science 5: 44-48.

Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishikava, A., Dixon, R. A. and Lamb, C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell 92: 773-784.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

Andrea, M. (1998) Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and postharvest and with special reference to ethylene. Physiologia Plantarum 104: 668-672.
Bailly, C. (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research 14(02):93-107.
Balesevic-Tubic, S., Tatic, M., Dordevic, V., Nikolic, Z. and Dukic, V. (2010). Seed viability of oil crops depending on storage conditions. Helia 33: 153-160.
Basra, S. M. A., Ahmad, N., Khan, M. M., Iqbal, N. and Cheema, M. A. (2003) Assessment of cottonseed deterioration during accelerated ageing. Seed Science and Technology 31: 531-540.
Bewley, J. D. and Black, M. (1995) Seeds: physiology of development and germination. New York: Plenum Press. 460 pp.
Bonneau, L., Carre, M. and Martin-Tanguy, J. (1994) Polyamines and related enzymes in rice seeds differing in germination potential. Plant Growth Regulation 15: 75-82.
Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-252.
Clemente, A., Vioque, J., Sanchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J. and Millan, F. (1999) Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. Food Chemistry 67: 269–274.
Davies, M. J. (2005) The oxidative environment and protein damage. BBA-Proteins Proteome 1703(2):93-109.
Delahaie, J., Hundertmark, M., Bove, J., Leprince, O., Rogniaux, H. and Buitink, J. (2013) LEA polypeptide profiling of recalcitrant and orthodox legume seeds reveals ABI3-regulated LEA protein abundance linked to desiccation tolerance. Journal of Experimental Botany 64: 4559-4573.
Delvin, W. and Gustine, D. (1992) Involvement of the oxidative bust in phytoalexin accumulation and hypersensitive reaction. Plant Physiology 100: 1189-1195.
Demir, I. and Mavi, K. (2008) Controlled deterioration and accelerated aging tests to estimate the relative storage potential of cucurbit seed lots. Hortscience 43: 1544–1548.
Ellis, R. and Hong, T. (2006) Temperature sensitivity of the low-moisture-content limit to negative seed longevity–moisture content relationships in hermetic storage. Annals of botany 97: 785-791.
FAO. (1994). FAO yearbook production. Rome, Italy.
Gamer, M. H., Wang, G. M. and Spector, A. (1987) Stimulation of glucosylated lens epithelial Na, K-ATPase by an aldose reductase inhibitor. - Experimental Eye Research 44: 339-345.
Garcia, R., Kaid, N., Vignaud, C. and Nicolas, J. (2000) Purification and some properties of catalase from wheat germ (*Triticum aestivum* L.). Journal of Agriculture and Food Chemistry 48: 1050-1057.
Golovina, E. A., Willem F. W. and Folkert, A. H. (1997) Long-term stability of protein secondary structure in dry seeds. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 117: 343-348.
Gomez-Campo, C. (2006) Erosion of genetic resources within seed genebanks: the role of seed containers. Seed Science Research 16(04): 291-294.
Havir, E. A. and McHale, N. A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple form of catalase in tobacco leaves. Plant Physiology 84: 450-455.
ISTA. (1985) International Rules for Seed Testing. Annexes 1985. Seed Science and Technology 13: 356-513.
Jordy, M. N., Danti, S., Favre, J. M. and Racchi, M. L. (2000) Histological and biochemical changes in *Pinus* spp. seeds during germination and post-germinative growth: triacylglycerol distribution and catalase activity. Australian Journal of Plant Physiology 27:1109–1117.
Kapoor, N., Arya, A., Siddiqui, M., Amir, A. and Kumar, H. (2010) Seed deterioration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under accelerated ageing. Asian Journal of Plant Science 9:158-162.
Kibinza, S., Bazina, J., Bailly, C., Corbineau, F. and El Maarouf-Boureau, H. (2011) Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. Plant Science 181: 309–315.
Kirkman, H. N. and Gaetani, G. F. (2007) Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. Trends in Biochemistry Science 32: 44-50.
Kochanek, J., Kathryn, J. S., Robin, J. P. and Steve, W. A. (2009) Variation in seed longevity among different populations, species and genera found in collections from wild Australian plants. Australian Journal of Botany 57: 123-131.
Kumar, G. M., Robert L. H. and Richard K. N. (1999) Age-induced protein modifications and increased proteolysis in potato seed-tubers. Plant Physiology 119: 89-100.
Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature 227: 680-685.
Lee, S.H. and An, C.S. (2005) Differential expression of three catalase genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Molecular Cells 20: 247-255.
Li, Q., Wang, B. C., Xu, Y., Zhu, Y. X. (2007) Systematic studies of 12S seed storage protein accumulation and degradation patterns during Arabidopsis seed maturation and early seedling germination stages. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 40:373-381.
Luck, H. (1962) Methods of enzymatic analysis. E.B. By Bergmeyer (1th edition), Verlag chemie weinheim Pp:885-894.
Machado, N., Custodio, C. and Takaki, M. (2001) Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris* L. Seed Science and Technology 29:137-149.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

Mandal, S. and Mandal, R. (2000) Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. Current Science 79:576-589.

McDonald, M. B. (2004) Orthodox seed deterioration and its repair. In: Seed Physiology: Applications to Agriculture. (eds. Benech-Arnold RL, Sanchez RA) Pp. 273 – 304. Food Products Press and The Haworth Reference Press, imprints of The Haworth Press, Inc, New York, London.

McDonald, M. B. (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. Seed Science and Technology 27: 177-237.

Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., VanBreusegem, F. and Noctor, G. (2010) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. Journal of Experimental Botany 61: 4197-220.

Moller, I. M., Jensen, P. E. and Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review in Plant Biology 58: 459–481.

Mullen, R.T. and Gifford, D. J. (1993) Purification and characterization of catalase from Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) megagametophytes. Plant Physiology 103: 477-483.

Mura, A., Pintus, F., Medda, R., Floris, G., Rinaldi, A. C. Padiglia, A. (2007) Catalase and antiquity from Euphorbia characias: Two proteins involved in plant defense. Biochemistry 72: 501-508.

Nagel, M. and Borner, A. (2010) The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. Seed Science Research 20: 1-12.

Nkang, A. and Umoh, E. O. (1997) Six month storability of five soybean cultivars as influenced by stage of harvest, storage temperature and relative humidity. Seed Science and Technology 25: 93-99.

Nooden, L. D. (2012) Senescence and Aging in plants: Elsevier.

Probert, R. J., Matthew, I. D. and Fiona, R. H. (2009). Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. Annals of botany 104: 57-69.

Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S. P., Belghazi, M., Job, C. and Job, D. (2008) Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: a comparison between artificial and natural aging protocols. Plant Physiology 148:620-641.

Rajjou, L. (2008) Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. Comptes Rendus Biologies 331: 796-805.

Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Plasser, L., Schwaiger, H., Furtmuller, P.G., Peschek, G.A., Zamocky, M. and Obinger, C. (2002) Occurrence and biochemistry of hydroperoxidase in oxygenic phototrophic prokaryotes (cyanobacteria). Plant Physiology and Biochemistry 40: 479-490.

Reznick, A. Z. and Packer, L. (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods in Enzymology 233: 357–363.

Sathish, S., Rayees, A., Natesan, S., Nagappan, A., Hyeon, S. P., Senthil, K., Renganathan, U., Muthurajan, R., Muthusamy, B. and Gon, S. K. (2015) Proteomic analysis of ageing in black gram (*Vigna mungo* L.) seeds and its relation to seed viability. Plant Omics Journal 8: 201-211.

Scandalios, J. G., Guan, L. M., Polidoros, A. N. (1997) Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY., pp. 343-406.

Simontacchi, M., Caro, A., Fraga, C. G. and Puntarulo, S. (1993) Oxidative stress affects a-tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination. Plant Physiology 103: 949-953.

Soltani, A., Gholipoor, M. and Zeinali, E. (2006) Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. Environmental and Experimental Botany 55:195-200.

Spano, C., Castiglione, M. R., Bottega, S. and Grilli, I. (2004) Natural ageing of wheat seeds. Current Topics in Plant Biology 5: 89–94.

Sun, W. Q. and Leopold, A. C. (1995) The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. Plant Physiology 94:94–104.

Tayefi-Nasrabadi1, h., Dehghan, G., Daeihassani, B., Movafegi, A. and Samadi, A. (2011) Some biochemical properties of catalase from safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv. M-CC-190). African Journal of Agricultural Research 6: 5221-5226.

Vasudevan, S. N., Shakuntala, N. M., Doddagoudar, S. R., Mathad, R. C., Macha, S. I. (2012) Biochemical and molecular changes in aged peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. The Ecoscan 1: 347 – 352.

Walters, C. (1998) Understanding the mechanisms and kinetics of seed ageing. Seed Science Research 8: 223-244.

Walters, C. (2007) Materials used for seed storage containers. Seed Science Research 17: 233-242.

Walters, C., Ballesteros, D. and Vertucci, V. A. (2010) Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. Plant Science 179: 565-573.

Wang, Y. (2015) Physiological characterization on seed aging of six native Shrub species. M.Sc Degree thesis. University of Saskatchewan. 126pp.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-06]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1396.6.21.25.7]