

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر زوال طبیعی و مصنوعی بذر بر گونه‌های فعال اکسیژن، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و خصوصیات جوانه‌زنی بذر در ارقام محلی و اصلاح‌شده برنج (*Oryza sativa*) حاصل از مزارع استان گیلان

محدثه لطیف‌زاده شاهخالی^۱، سید محمدرضا احتشامی^{۲*}، فؤاد مرادی^۳

چکیده مبسوط

مقدمه: زوال بذر با تنش اکسیداتیو و تجمع کنترل‌نشده گونه‌های فعال اکسیژن مرتبط می‌باشد. بذرهای گروهی از آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی را داشته که از آن‌ها در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کرده و در حفظ بنیه بذر و حمایت از فرایندهای جوانه‌زنی بذر کمک‌کننده می‌باشند. پاسخ ارقام مختلف به زوال بذر متفاوت می‌باشد. آگاهی از منابع و سازوکار زوال و چگونگی پاسخ ارقام مختلف می‌تواند ما را در انتخاب رقم مناسب منطقه کمک کرده، همچنین در انتخاب و اعمال روش‌های مدیریتی مناسب برای انبارداری و افزایش مدت زمان نگهداری بذر در انبار به‌کار رود.

مواد و روش‌ها: آزمایش به‌صورت فاکتوریل با دو عامل در طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل یک و شش ماه انبارداری (دمای چهار درجه سلسیوس، رطوبت بذر ۱۱ درصد و رطوبت نسبی انبار ۶۰ درصد) و پیری تسریع‌شده (۹۶ ساعت نگهداری بذر در دمای ۴۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد) بودند که در چهار رقم برنج (خزر، هاشمی، گیلانه و دمسیاه) اعمال شدند. درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ساقچه و ریشه‌چه، وزن خشک ساقچه و ریشه‌چه و شاخص بنیه گیاهچه، فعالیت آلفا‌آمیلاز، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و پراکسیددهیدروژن (H_2O_2) صفات مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پیری تسریع‌شده و نگهداری بذر در انبار به‌مدت شش ماه، درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقچه، وزن خشک ریشه‌چه و ساقچه، شاخص بنیه گیاهچه و فعالیت آنزیم آلفا‌آمیلاز را در هر چهار رقم کاهش دادند. این کاهش همراه با افزایش محتوای MDA و H_2O_2 و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت SOD و POX بود. محتوای MDA در بذرهای پیری تسریع‌شده کم‌تر از بذرهای با طول عمر ۶ ماه در انبار بود. فعالیت آنزیم CAT بعد از اعمال تیمار زوال افزایش نشان داد، این افزایش در بذرهای دارای طول عمر شش ماه بیش‌تر بود. این بذرهای همچنین H_2O_2 کم‌تری را در مقایسه با بذرهای پیری تسریع‌شده نشان دادند. رقم خزر محتوای H_2O_2 کم‌تری را در نتیجه فعالیت بیش‌تر آنزیم CAT نشان داد. علاوه بر این، رقم خزر درصد و سرعت جوانه‌زنی بالاتری را بعد از اعمال تیمار زوال در مقایسه با ارقام دیگر نشان داد. افت درصد جوانه‌زنی ناشی از زوال در رقم دمسیاه بسیار شدید بود. این رقم کم‌ترین درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، بنیه بذر و فعالیت آنزیم آلفا‌آمیلاز را در تیمار پیری تسریع‌شده نشان داد. رقم گیلانه و هاشمی در ابتدای آزمایش جوانه‌زنی و فعالیت آلفا‌آمیلاز، سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز بالاتری را نشان دادند، اما در جریان زوال قابلیت جوانه‌زنی در آن‌ها همسو با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاهش نشان داد.

نتیجه‌گیری: تیمارهای قراردادن شش ماهه بذر در انبار و پیری تسریع‌شده، اثرات منفی بر سرعت جوانه‌زنی چهار رقم مورد مطالعه گذارند. این افت در سرعت جوانه‌زنی همراه با افزایش رادیکال آزاد در بذرهای با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت SOD و POX بود که این اثرات در رقم خزر با شدت کم‌تر و در رقم دمسیاه شدیدتر بود که این نتایج اهمیت بیش‌تر شرایط انبار را در نگهداری رقم دمسیاه نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پراکسیداز، پیری تسریع‌شده، سرعت جوانه‌زنی، مالون‌دی‌آلدئید، جنبه‌های نوآوری:

- ۱- اثر انبارداری و زوال بذر بر تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، گونه‌های فعال اکسیژن و جوانه‌زنی بذر برنج بررسی شد.
- ۲- نتایج آزمون پیری تسریع‌شده و طبیعی برای نتیجه‌گیری بهتر در مورد پاسخ ارقام مقایسه گردید.
- ۳- دو رقم اصلاح‌شده با دو رقم محلی (با سطح زیرکشت بالا در منطقه مقایسه شد.

^۱ دانشجوی دکتری زراعت گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده

کشاورزی، دانشگاه گیلان
<http://dorl.net/dor/20.1001.1.23831251.1400.8.2.8.4>

^۲ دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه

گیلان

^۳ دانشیار پژوهشی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج



مقدمه

بذر نقطه ثقل امنیت غذایی، حفظ ذخایر ژنتیکی و نقطه شروع تولید در هر گیاهی بوده و پیش‌نیاز برای رسیدن به عملکرد بالا در همه گونه‌های گیاهی است (لپرینس^۱ و همکاران، ۲۰۱۶). زوال بذر از مشکلات عمده در بخش کشاورزی است و تلفات ناشی از آن در کشورهای کم‌تر توسعه‌یافته و نواحی جغرافیایی که بذرهای طی رسیدگی و انبارداری با دما و رطوبت نسبی بالا مواجه می‌شوند به مراتب بیشتر است (کاپلند و مک‌دونالد^۲، ۲۰۰۸). حتی در شرایط محیطی بهینه نیز زوال بذر می‌تواند رخ داده و مانع بزرگی بر سر راه کشاورزی و نیز حفظ ذخایر ژرم‌پلاسم باشد (لی^۳ و همکاران، ۲۰۱۷). آزمون‌های زیادی جهت بررسی قابلیت انبارداری بذرهای ابداع و انجام می‌شوند. پیری تسریع‌شده آزمونی دقیق، کم‌هزینه و قابل اعتماد برای این منظور می‌باشد. این آزمون در فهم سازوکارهای سلولی و بیوشیمیایی که طی زوال و پیری بذر رخ می‌دهند، راهگشا می‌باشد (برتو و گارسیا^۴، ۲۰۱۷).

زوال بذر وقایع سلولی و متابولیک متعددی را متأثر کرده که برآیند آن‌ها اختلال در زنده‌مانی و بنیه بذر بوده و می‌تواند درصد و سرعت جوانه‌زنی، چگونگی رشد گیاهیچه و عملکرد در مزرعه را تحت‌الشعاع قرار دهند (قاسمی‌گلعدانی^۵ و همکاران، ۲۰۱۰). شروع این اتفاقات را تنش اکسیداتیو و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌دانند (بیلی^۶ و همکاران، ۲۰۰۸). رادیکال‌های آزاد پتانسیل تخریب غشا، DNA و پروتئین‌ها را دارند. تغییرات کروموزومی در سلول‌های ریشه‌چه، تخریب DNA در جنین بذرهای خشک و آبنوشی‌شده (دانتس^۷ و همکاران، ۲۰۱۹)، تخریب غشاهای سلولی ناشی از پراکسیداسیون خودبخودی و یا آنزیمی لیپیدها (چندل^۸ و همکاران، ۲۰۱۵) با تولید رادیکال آزاد شروع می‌شوند.

اما بذرهای پس از خشک‌شدن مجهز به انواع گوناگونی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانت آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که آن‌ها را در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن حفاظت می‌کنند (راجو و دبائوجون^۹، ۲۰۰۸). این آنزیم‌ها گونه‌های فعال اکسیژن تولیدی در حین زوال بذر را جمع کرده و همچنین سطوح آن‌ها را در حین نمو گیاهیچه تنظیم کرده و جوانه‌زنی و مراحل اولیه رشد گیاهیچه را حمایت می‌کنند (یائو^{۱۰} و همکاران، ۲۰۱۲). آنزیم‌هایی چون کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز به‌طور گسترده‌ای این مسئولیت‌ها را در بذرهای برعهده دارند. در جریان زوال بذر، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، ناشی از کاهش فعالیت‌های تنظیمی^{۱۱} ژن‌های درگیر در متابولیسم پروتئین‌ها مشاهده می‌گردد (ین^{۱۲} و همکاران، ۲۰۱۴). با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت چون CAT و SOD در جریان انبارداری، بذرهای توانایی زنده‌مانی و جوانه‌زنی خود را از دست می‌دهند (چن^{۱۳} و همکاران، ۲۰۱۶).

خصوصیات ژنتیکی ارقام مختلف گیاهان متفاوت بوده و می‌تواند سرعت واکنش‌های رخ داده در جریان زوال را متأثر کند. اندوخته غذایی که بذرهای حین نمو روی گیاه مادری کسب می‌کنند نیز در این امر نقش دارند (والترز^{۱۴} و همکاران، ۲۰۱۰). در واقع ثابت شده است که برخی ارقام خاص نسبت به ارقام دیگر، زوال کم‌تری را نشان می‌دهند (کاپلند و مک‌دونالد، ۲۰۰۸). در بررسی اثر پیری تسریع‌شده در ۴ رقم برنج، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در دو رقم 4K58 و C178 به‌طور معنی‌داری کم‌تر از دو رقم 4K59 و C179 بودند، درحالی‌که محتوای رادیکال‌های آزاد در دو رقم 4K58 و C178 بالاتر بود (کائو^{۱۵} و همکاران، ۲۰۱۹). در بررسی زوال طبیعی در بذرهای یولافی که برای ۶ و ۱۲ ماه در ۴ درجه سلسیوس انبار شده بودند، گزارش شد که

⁹ Rajjou and Debeaujon

¹⁰ Yao

¹¹ Downregulate

¹² Yin

¹³ Chen

¹⁴ Walters

¹⁵ Cao

¹ Leprince

² Copeland and MacDonald

³ Li

⁴ Barreto and Garcia

⁵ Ghassemi-Golezani

⁶ Bailly

⁷ Dantas

⁸ Chandel

از مرکز تحقیقات برنج رشت تهیه و در سال‌های زراعی ۱۳۹۶-۹۷ و ۱۳۹۷-۹۸ به مدت دو سال زراعی در مزرعه‌ای واقع در شهرستان شفت، روستای شادخال کشت شد. این شهرستان در غرب استان گیلان با مساحت معادل ۶۸۱/۳ کیلومتر مربع و در ۴۸ درجه و ۵۲ دقیقه طول جغرافیایی و ۳۸ درجه و ۲۵ دقیقه عرض جغرافیایی قرار دارد. ویژگی‌های خاک مزرعه در جدول ۲ آورده شده است. اطلاعات آب و هوایی منطقه مورد نظر در جدول ۳ آورده شده است. متوسط دما در دو سال مطالعه مشابه اما متوسط بارندگی در سال دوم اندکی بیش‌تر از سال اول بود. در طول دوره رشد گیاه میزان بارندگی توزیعی نامتقارن داشت. در مرداد سال ۹۶ میزان متوسط بارندگی صفر میلی‌متر و در همین ماه در سال ۹۷ متوسط بارندگی ۶۸/۴ میلی‌متر بود.

برای تأمین نیازهای کودی در مورد کود نیتروژن، به‌میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار از منبع کود اوره (نصف قبل از نشا و نصف در زمان وجین)، کود پتاسیم به‌میزان ۲۵۰ کیلوگرم در هکتار از منبع سولفات پتاسیم و کود فسفر از ۱۲۰ کیلوگرم در هکتار از منبع سوپرفسفات تریپل به‌صورت پایه و قبل از کاشت استفاده گردید. جهت کنترل علف‌های هرز از علف‌کش بوتاکلر به‌صورت پس از کاشت و وجین دستی استفاده شد. جهت عدم اختلاط بین ارقام، فاصله یک متری بین کرت‌ها لحاظ شد. در مرحله برداشت از هر کرت حدود ۴۰ خوشه از ساقه‌های اصلی برداشت و از قسمت وسط هر خوشه، بذرها با دست جدا و مخلوط شده و به‌عنوان یک نمونه بذر برای انجام آزمون‌ها نگهداری شد (فیو^۴ و همکاران، ۲۰۱۷). برای علامت‌گذاری ساقه‌های اصلی از اتیکت استفاده گردید. صفات مورد بررسی در آزمایشگاه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده زیست دانشگاه تهران در سال ۹۷ و ۹۸ انجام گرفت. صفات درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، وزن خشک ریشه‌چه، ساقه‌چه، شاخص بنیه گیاهچه، محتوای مالون‌دی‌آلدئید، محتوای پراکسید هیدروژن، فعالیت آنزیم‌های آلفا‌آمیلاز، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در ۱- بذرها با

جوانه‌زنی، فعالیت کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به‌طور معنی‌داری کاهش و سرعت تولید رادیکال اکسیژن و مالون‌دی‌آلدئید افزایش نشان داد (کونگ^۱ و همکاران، ۲۰۱۴). در پژوهشی در دو هیبرید برنج، درصد و سرعت جوانه‌زنی بعد از قرار گرفتن بذرها در ۱۰۰ درصد رطوبت نسبی و ۴۰ درجه سلسیوس کاهش نشان دادند (زنگ^۲ و همکاران، ۲۰۱۶). در مطالعه ارقام برنج ندا، فجر، شیرودی، لنجان، خزر بعد از تیمار پیری مصنوعی گزارش شد که بین ارقام مورد مطالعه، بالاترین درصد جوانه‌زنی مربوط به خزر و ندا بود. در این پژوهش گزارش شد که مناسب‌ترین رقم برای انبارداری در شرایط مرطوب و نیمه‌گرمسیری شمال کشور ارقام ندا و خزر می‌باشند (بیژن‌زاده^۳ و همکاران، ۲۰۱۷).

تحقیقات کمی در زمینه تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و گونه‌های فعال اکسیژن در جریان زوال و میزان تأثیر این تغییرات بر جوانه‌زنی ارقام مورد کشت در شمال کشور انجام گرفته است. با آگاهی از منابع و مکانیسم این تغییرات در ارقام مختلف، ممکن است بتوانیم با انتخاب رقم یا ارقام مناسب منطقه قدمی برداشته و یا با توجه ویژه به اقدامات مدیریتی انبارداری در ارقام حساس، افت کیفیت بذر را کاهش داده و یا روند این کاهش را آهسته‌تر کرد، حتی اگر به‌طور کامل متوقف نشود. از این روی این پژوهش با هدف بررسی برهمکنش اثر زوال طبیعی و مصنوعی و رقم بر روابط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و گونه‌های فعال اکسیژن و تغییرات وضعیت جوانه‌زنی در چهار رقم برنج در استان گیلان طراحی و انجام گردید.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تغییرات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی طی زوال بذر برنج در دو رقم محلی هاشمی و دمسیاه و دو رقم اصلاح‌شده خزر و گیلا نه طراحی و انجام گرفت. برخی ویژگی این ارقام در جدول (۱) آماده است. نشا این ارقام از طبقه بذر مادری

¹ Kong

² Zhang

³ Bijanzadeh

⁴ Fu

در ادامه وزن خشک آن‌ها بعد از قرارگیری نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سلسیوس با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ مشخص گردید. از این داده‌ها جهت تعیین شاخص بنیه گیاهچه بر اساس طول گیاهچه با استفاده از رابطه ۲ استفاده شد (عبدالباکی و اندرسون^۳، ۱۹۷۳).

$$\text{SVI} = \text{GR} \times (\text{MRL} + \text{MSL}) \quad \text{رابطه ۲:}$$

که در آن SVI^4 ، شاخص بنیه گیاهچه، GR، درصد جوانه‌زنی نهایی، MSL، میانگین طول ریشه‌چه و MSL، میانگین طول ساقه‌چه می‌باشند.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا‌امیلاز از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید (DNS) و روش برنفلد^۵ و ۰/۲۶ گرم از بذرهایی که در فاز اولیه جوانه‌زنی قرار داشتند، استفاده شد (دی^۶ و همکاران، ۲۰۰۳).

جهت اندازه‌گیری محتوای مالون‌دی‌آلدئید از ۰/۲ گرم بذر و ۱ میلی‌لیتر معرف TBA ۰/۰۵ درصد حاوی TCA ۲۰ درصد استفاده گردید و ثبت میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر انجام گرفت (هت و پاکر^۷، ۱۹۶۸). برای سنجش محتوای پراکسید هیدروژن از روش ولیوکوا^۸ و همکاران (۲۰۰۰) و بافر پتاسیم فسفات ۱۰ میلی‌مولار با (pH=۷) و دید پتاسیم ۱ مولار استفاده شد و جذب محلول واکنش در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. به‌منظور بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز از روش آئبی^۹ (۱۹۸۴)، از بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار همراه با پراکسید هیدروژن ۳ درصد استفاده گردید. فعالیت آنزیمی در مدت ۱۸۰ ثانیه در دستگاه اسپکتروفوتومتر در مد کینیتیک^{۱۰} در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌روش (ابلز و بیلز^{۱۱}، ۱۹۹۱) با استفاده از بافر استات سدیم ۲۰۰ میلی‌مولار با pH مساوی ۵ همراه با پراکسید هیدروژن ۳ درصد و بنزیدین

رطوبت نسبی متوسط ۱۱ درصد و طول عمر یک ماه پس از برداشت ۲- بذرهایی با طول عمر شش ماه که در انبار (دمای ۴ درجه سلسیوس) قرار داشتند و ۳- بذرهایی حاصل از پیری تسریع‌شده (۹۶ ساعت قرارگیری در دمای ۴۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد در انکوباتور یخچال‌دار شرکت بایندر^۱ کشور آلمان) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای آزمون جوانه‌زنی استاندارد، در هر رقم ۴ تکرار ۵۰ تایی بذر در پتری به ابعاد ۹ سانتی‌متر با یک لایه کاغذ واتمن به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. از شروع آزمایش هر روز تعداد بذرهایی جوانه‌زده با معیار جوانه‌زنی ظهور طول ریشه‌چه به ابعاد ۲ میلی‌متر، شمارش و یادداشت شد (منجم و همکاران، ۲۰۱۷). درصد جوانه‌زنی برابر با درصد بذرهایی جوانه‌زده نرمال در روز نهایی شمارش (روز چهاردهم) نسبت به همه بذرهایی مورد آزمون می‌باشد. سرعت جوانه‌زنی از رابطه ۱ محاسبه گردید (مگوئر^۲، ۱۹۶۲).

$$\text{رابطه ۱:} \quad \text{سرعت جوانه‌زنی} = \sum \frac{G_i}{d_i}$$

که در آن G_i تعداد بذرهایی جوانه‌زده نرمال و d_i روز شمارش می‌باشد. جهت حفظ رطوبت در پتری‌ها، آن‌ها در کیسه پلاستیکی قرار گرفتند. در زمان شمارش روزانه، در صورت نیاز به هر پتری ۱ میلی‌لیتر آب مقطر اتوکلاو شده افزوده شد. برای اجرای آزمون پیری تسریع‌شده از ظرف‌های پلاستیکی درب‌دار به ابعاد ۱۵×۱۰×۳/۵ سانتی‌متر استفاده گردید. ابتدا ظرف‌ها با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر پر شده و سپس بذرها روی توری سیمی که روی ظرف تعبیه شده بود، قرار داده شدند و درب ظرف به‌طور کامل بسته شده و به مدت ۹۶ ساعت در دمای ثابت ۴۵ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند. رطوبت نسبی داخل ظرف پلاستیکی در مدت آزمایش ۱۰۰ درصد بود. پس از پایان آزمون جوانه‌زنی استاندارد تعداد ۱۰ گیاهچه عادی به‌طور تصادفی از هر پتری انتخاب و طول ساقه‌چه و ریشه‌چه با استفاده از خط‌کش برحسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد.

³ Abdul-Baki and Anderson

⁴ Seed vigour index

⁵ Bernfeld

⁶ Dey

⁷ Heath and Packer

⁸ Velikova

⁹ Aebi

¹⁰ Kinetic

¹¹ Abeles and Biles

¹ Binder

² Maguire

جدول ۱. برخی خصوصیات ارقام مورد مطالعه (منجم^۱ و همکاران، ۲۰۱۶؛ کاوسی و الهقلی‌پور، ۲۰۱۷)

Table 1. Some characteristics of the studied cultivars

No.	Cultivar رقم	جمعیت Population	Agronomic properties خصوصیات زراعی
1	هاشمی (Hashemi)	بومی-Local	زودرس- پابلند- کیفیت بالا Early maturing- Tall- High quality
2	گیلانه (Gilaneh)	اصلاح‌شده-Improved	زودرس-پاکوتاه-کیفیت مشابه ارقام بومی Early maturing- Dwarf- Similar quality to native cultivars
3	خزر (Khazar)	اصلاح‌شده-Improved	میان‌رس- ارتفاع متوسط- کیفیت متوسط semi-Dwarf- Medium quality
4	دمسیاه (Domsiyah)	بومی-Local	زودرس- پابلند-کیفیت بالا Early maturing- Tall- High quality

جدول ۲. مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش (عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری)

Table 2. Physical and chemical properties of soil in the experiment site (depth 0-30 cm)

بافت خاک Texture	نوع سیستم آبیاری Type of irrigation system	پتاسیم قابل جذب K (mg Kg ⁻¹)	فسفر قابل جذب P (mg Kg ⁻¹)	نیتروژن کل N (%)	هدایت الکتریکی EC (dsm ⁻¹)	pH	کربن آلی O.C. (%)
رسی-سیلتی Clay-Silty	کرتی Flooding irrigation	118	31	0.22	0.53	7.11	2.436

جدول ۳. اطلاعات هواشناسی محل اجرای آمایش در طول فصل رشد برنج (سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷)

Table 3. Meteorological information during the growth season of rice in experimental site (2017 and 2018)

سال Year	ماه Month	میانگین دمای کمینه Minimum Temperature (°C)	میانگین دمای بیشینه Maximum Temperature (°C)	میانگین دما Average Temperature (°C)	مجموع بارندگی Rainfall (mm)	مجموع ساعات آفتابی Sunny hour (hour.month ⁻¹)	میانگین رطوبت نسبی Average of relative humidity (RH)
۱۳۹۶ 2017	Apr. فروردین	8.5	18.6	13.58	86.2	140	77.7
	May. اردیبهشت	14.19	24.2	19.19	27.8	168.8	77.3
	Jun. خرداد	18.77	28.13	23.45	18.6	229.5	75.25
	Jul. تیر	20.66	31.6	25.9	13.8	232.5	74.55
	Aug. مرداد	22.1	33.8	28	0	293.7	68.8
۱۳۹۷ 2018	Sep. شهریور	21.3	32.5	26.9	61	245.8	74.3
	Apr. فروردین	8.59	18.77	13.6	20.4	145.9	74.97
	May. اردیبهشت	14.2	24.5	19.4	37.2	170.4	73.6
	Jun. خرداد	18.2	27.9	23	48.7	230.3	74.6
	Jul. تیر	22.913	33.26	28.08	30.8	295.4	72.5
2018	Aug. مرداد	22.72	31.28	27	68.4	164.9	76.85
	Sep. شهریور	19.73	30.44	25.08	13.8	209.7	73.9

¹ Monajem

² Kavooosi and Allahgholipour

دادند که این کاهش تنها در تیمار پیری تسریع‌شده معنی‌دار بود، این درحالی بود که رقم محلی دمسیاه به شدت از این دو تیمار متأثر شده و درصد جوانه‌زنی ضعیف‌تری را در مقایسه با ارقام دیگر در هر دو سال و هر دو تیمار زوال نشان داد (جدول ۶). باید اذعان شود که درصد جوانه‌زنی تا حدی در سال ۱۳۹۶ بهتر از سال ۱۳۹۷ بود که به‌نظر می‌رسد به توزیع بارندگی در دو سال مطالعه مربوط باشد. در سال ۱۳۹۶ همزمان با دوره نمو بذر در مرداد ماه مجموع بارندگی این ماه صفر میلی‌متر بود، درحالی که در سال ۱۳۹۷ در این ماه ۶۸/۴ میلی‌متر بارندگی ثبت گردید. ساعات آفتابی و درصد رطوبت نسبی ثبت‌شده در این دو ماه نیز بسیار متفاوت بودند (جدول ۳). سان^۵ و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که شرایط محیطی از جمله دما و رطوبت نسبی حین نمو بذرها بر بنیه و توان جوانه‌زنی آن‌ها بسیار تأثیرگذار است.

کاهش درصد جوانه‌زنی در بذره‌های زوال مصنوعی بیش‌تر از بذره‌های قرارداده‌شده در انبار بود. این تیمار درصد جوانه‌زنی در سال ۱۳۹۶ را ۲۳/۲، ۱۱/۶، ۱۰/۱ و ۶۹ درصد به‌ترتیب در ارقام هاشمی، گیلا، خزر و دمسیاه کاهش داد، همچنین در سال ۱۳۹۷ این کاهش ۱۹/۲، ۱۴/۷، ۸/۹ و ۶۴/۹ درصد به‌ترتیب در ارقام هاشمی، گیلا، خزر و دمسیاه ثبت شد (جدول ۶). به نظر می‌رسد که دما و رطوبت نسبی بالا در پیری مصنوعی اثر شدیدتری بر قابلیت جوانه‌زنی بذرها گذاشته باشد که این نتایج با نتایج شعبان^۶ و همکاران (۲۰۱۷) در بذره‌های نخود مطابقت دارد. کاهش درصد جوانه‌زنی ناشی از زوال بذر در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (کیبینزا^۷ و همکاران، ۲۰۱۱؛ ین و همکاران، ۲۰۱۴). دلایل زیادی را می‌توان علت کاهش درصد جوانه‌زنی ناشی از زوال بذر بیان کرد از جمله کاهش فعالیت آنزیم‌های مسئول در جوانه‌زنی، کاهش سلامت غشای سلولی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش تجمع MDA و خسارت به ماکرومولکول‌هایی چون RNA و DNA، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی

۲۰ میلی‌مولار در متانول ۵۰ درصد و دستگاه اسپکتروفوتومتر در مد کینیتیک^۱ در طول موج ۵۳۰ نانومتر در مدت ۶۰ ثانیه استفاده شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از قابلیت آن در بازدارندگی واکنش احیایی فتوشیمیایی نیتروبولوترازولیوم (NBT) تعیین شد.

محلول واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، نیتروبولوترازولیوم ۷۵ میلی‌مولار و ربیولاوین ۷۵ میلی‌مولار بود.

جذب محلول در مد فتومتریک^۲ و طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد (جیانوپولیتیس و ریس^۳، ۱۹۹۷).

جهت تجزیه‌های آماری قبل از انجام تجزیه مرکب داده‌ها، به‌منظور اطمینان از یکنواختی واریانس اشتباه آزمایش، از میانگین مربعات خطای آزمایش دو سال مطالعه و آزمون F استفاده گردید (ربیعی و محیط^۴، ۲۰۱۳). تجزیه واریانس و محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SAS نسخه ۹/۱ انجام و مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده گردید.

نتایج و بحث

درصد و سرعت جوانه‌زنی

در بررسی صفت درصد جوانه‌زنی و با توجه به معنی‌دار بودن آزمون F، داده‌های هر سال جداگانه تجزیه و در جدول شماره ۵ گزارش گردید. نتایج این جدول نشان داد که اثر زوال و رقم و برهمکنش این دو عامل بر درصد جوانه‌زنی در هر دو سال معنی‌دار شد. مقایسه میانگین داده‌ها در دو سال مطالعه نشان داد که سه رقم هاشمی، گیلا و خزر یک ماه بعد از برداشت درصد جوانه‌زنی بالایی داشته و بعد از شش ماه انبارمانی و نیز پیری تسریع‌شده کاهش درصد جوانه‌زنی را نشان

¹ Kinitic

² Photometric

³ Giannopolitilis and Ries

⁴ Rabiei and Mohit

⁵ Sun

⁶ Shaban

⁷ Kibinza

بذر در روز نسبت به بذرهای دارای طول عمر یک ماه کاهش نشان داد، درحالی که این عدد در رقم خزر و گیلانه به ترتیب ۳/۲۸ و ۳/۷ بذر در روز بود. همچنین اعمال پیری تسریع شده، ۱۲/۰۶، ۳/۲۵ و ۶/۰۵ بذر در روز به ترتیب در ارقام هاشمی، خزر و گیلانه، سرعت جوانه‌زنی را در مقایسه با بذرهای دارای طول عمر یک ماه کاهش دادند (جدول ۶). به نظر می‌رسد که بذرهای دو رقم خزر و گیلانه توانستند کیفیت و بنیه خود را بعد از گذشت شش ماه در انبار حفظ کرده و سریع‌تر جوانه زده و شروع به سبز شدن کنند. لی^۵ و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که بذرهای تنباکو (*Nicotiana tabacum*) تاریخته از نظر قابلیت انبارمندی، سرعت جوانه‌زنی بالاتری را در نتیجه بیان بالاتر ژن‌های Cu/ZnSOD (مسئول در تولید آنزیم SOD) نشان داده‌اند، درحالی که بذرهای غیر تاریخته از نظر این ژن، نشت یونی بالاتری داشته که خسارت بیش‌تر ROS ها بر غشای سلولی آنها را نشان می‌دهد. این یافته‌ها به نقش مهم آنزیم SOD در بهبود جوانه‌زنی و انبارمندی در بذرهای اشاره مستقیم دارد.

طول و وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه

طبق نتایج تجزیه واریانس مرکب، اثر ساده رقم و زوال بر طول ساقه‌چه و ریشه‌چه و وزن خشک آنها در سطح یک درصد معنی‌دار شد. برهمکنش دو عامل مورد مطالعه تنها بر طول ریشه‌چه در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴).

تیمارهای زوال طول ساقه‌چه را کاهش دادند که این کاهش تنها در تیمار پیری تسریع شده معنی‌دار بود. همچنین این تیمارها سبب کاهش معنی‌دار وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه شدند (جدول ۷). تیمار پیری تسریع شده کاهش ۷۵ درصد وزن خشک ساقه‌چه و ۷۴/۷ درصد وزن خشک ریشه‌چه را نسبت به بذرهای با طول عمر ۱ ماه موجب شد (جدول ۷). کاهش طول ریشه‌چه هر چهار رقم مورد مطالعه ناشی از تیمارهای زوال مشاهده شد که این کاهش در رقم خزر از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. طول ریشه‌چه در این رقم در

اکسیدانت مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز، گلوکاتایون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز (کببیزنا و همکاران، ۲۰۰۶؛ گوئل^۱ و همکاران، ۲۰۰۳؛ سانگ و چیوپ^۲ ۱۹۹۵؛ برار^۳ و همکاران، ۲۰۱۹). در پژوهش حاضر نیز کاهش درصد جوانه‌زنی در تیمارهایی مشاهده شد که کاهش شدید فعالیت آنزیم آلفا‌امیلاز و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و افزایش تجمع پراکسید هیدروژن را نشان دادند. یین^۴ و همکاران (۲۰۱۴) کاهش فعالیت آنزیم‌های آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، منویدروآسکوربات ردوکتاز را دلیل تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در جنین بذرهای پیر برنج گزارش کرده و این عامل را علت افول جوانه‌زنی در این بذرها دانستند. نتایج آنالیز واریانس مرکب اثر زوال و رقم بر سرعت جوانه‌زنی نشان داد که برهمکنش این دو عامل بر سرعت جوانه‌زنی از لحاظ آماری معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که سرعت جوانه‌زنی بذرهای دو رقم یک ماه بعد از برداشت حداکثر بوده و با قرار گرفتن در انبار به مدت شش ماه ۳۲/۸، ۲۱/۵۶، ۲۲/۱۴ و ۵۲/۹ درصد کاهش را به ترتیب در ارقام هاشمی، گیلانه، خزر و دمسیاه نشان دادند. پیری تسریع شده نیز سبب کاهش ۶۰/۰۴، ۳۵/۲۵، ۲۱/۹ و ۷۵/۵۲ درصدی این صفت مهم جوانه‌زنی به ترتیب در ارقام هاشمی، گیلانه، خزر و دمسیاه در مقایسه با بذرهای دارای طول عمر یک ماه شد. افت سرعت جوانه‌زنی در جوانه‌زنی دو رقم محلی هاشمی و دمسیاه نسبت به دو رقم اصلاح شده خزر و گیلانه شدیدتر بود (جدول ۶). تأخیر در جوانه‌زنی ناشی از اعمال پیری تسریع شده در برنج در مطالعه دانتهس و همکاران (۲۰۱۹) نیز گزارش شده است.

بذر خزر و گیلانه بعد از یک ماه انبارداری، سرعت جوانه‌زنی کم‌تری نسبت به رقم هاشمی نشان دادند (سرعت جوانه‌زنی ۲۰/۰۸ بذر در روز در رقم هاشمی در مقایسه با سرعت جوانه‌زنی ۱۴/۸۱ و ۱۷/۱۶ بذر در روز به ترتیب در ارقام خزر و گیلانه) اما بعد از قرارگیری شش ماه در انبار سرعت جوانه‌زنی رقم هاشمی ۶/۵۹

¹ Goel

² Sung and Chiub

³ Brar

⁴ Yin

⁵ Lee

جدول ۴. تجزیه واریانس مرکب اثر رقم و زوال بر صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بذر برنج
Table 4. Combined analysis of variance for the interaction of deterioration and cultivar on morphological, physiological and biochemical traits of rice seed

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	طول ساقه‌چه Shoot length	طول ریشه‌چه Radicle length	وزن خشک ساقه‌چه Shoot dry weight	وزن خشک ریشه‌چه Radicle dry weight	شاخص بنیه گیاهچه SVI	فعالیت آنزیم آلفا‌آمیلاز α- Amylase activity	فعالیت آنزیم پراکسیداز POX activity	فعالیت آنزیم دی‌سموتاز SOD activity	فعالیت آنزیم سوپراکسید دی‌سموتاز SOD activity	محتوای پراکسید هیدرو ژن H ₂ O ₂ content
Year (Y)	1	4.06**	1.49*	0.0000017 ^{ns}	0.0017*	0.00025 ^{ns}	48036.5*	0.00003 ^{ns}	182×10 ⁻¹¹ **	0.00000179**	0.027*	0.027*
Cultivar (C)	3	122.54**	5.399**	14.01**	0.0008*	0.0019**	1146825.4**	0.0084**	195×10 ⁻¹¹ **	0.00000162**	0.0596**	0.0596**
Deterioration (D)	2	396.6**	14.61**	21.86**	0.096**	0.039**	2568227.4**	0.074*	887×10 ⁻¹¹ **	0.000027**	7.96**	7.96**
D*C	6	24.6**	0.285 ^{ns}	1.34**	0.0002 ^{ns}	0.00016 ^{ns}	211302.9**	0.002**	207×10 ⁻¹¹ **	0.0000092**	0.024**	0.024**
C*Y	3	1.91**	0.931*	1.92**	0.00039 ^{ns}	0.000054 ^{ns}	9067.9 ^{ns}	0.0006**	147×10 ⁻¹¹ **	0.0000043**	0.006 ^{ns}	0.006 ^{ns}
D*Y	2	4.35**	1.424**	1.8**	0.0029**	0.00054*	3963.4 ^{ns}	0.00039**	591×10 ⁻¹³ ^{ns}	0.0000005**	0.0131 ^{ns}	0.0131 ^{ns}
D*C*Y	6	1.119**	0.273**	0.96*	0.00055 ^{ns}	0.00011 ^{ns}	17053.08*	0.00035**	236×10 ⁻¹² **	0.00000027**	0.0085 ^{ns}	0.0085 ^{ns}
Error	47	0.202	0.258	0.32	0.0003	0.00009	6871.88	0.000085	221×10 ⁻¹³	0.00000005	0.0057	0.0057
ضرب تغییرات (درصد) C.V (%)		3.68	6.21	7.99	14.6	13.6	6.07	8.27	10.47	12.58	11.22	11.22

ns, * and **: Not significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively
 *، **، ns: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد

جدول ۵. تجزیه واریانس اثر رقم و زوال بر درصد جوانه‌زنی، فعالیت آنزیم کاتالاز و محتوای پراکسید هیدروژن بذر برنج

Table 5. Analysis of variance for deterioration and cultivar on germination percentage, CAT activity and H₂O₂ content of rice seed

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	درصد جوانه‌زنی Germination percentage		فعالیت آنزیم کاتالاز CAT activity		محتوای پراکسید هیدروژن H ₂ O ₂ content	
		۱۳۹۶ (2017)	۱۳۹۷ (2018)	۱۳۹۶ (2017)	۱۳۹۷ (2018)	۱۳۹۶ (2017)	۱۳۹۷ (2018)
رقم (C) Cultivar	3	1707.0**	1600.8**	2×10 ⁻⁸ **	1×10 ⁻⁸ **	0.035*	0.03**
زوال (D) Deterioration	2	2506.1**	2152.8**	1×10 ⁻⁷ **	1×10 ⁻⁷ **	490.0**	3.71**
D*C	6	522.14**	440.8**	9×10 ⁻⁸ **	7×10 ⁻⁸ **	0.19 ^{ns}	0.01**
خطا Error	24	5.56	2.39	2×10 ⁻⁹	1×10 ⁻⁹	0.009	0.0026
ضریب تغییرات (درصد) C.V (%)		2.7	1.78	12.52	8.81	13.51	7.88

ns, *, ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, * and **: Not significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively

درصد شاخص بنیه گیاهچه بذرهای دارای طول عمر ۱ ماه بود (جدول ۶). شاخص بنیه گیاهچه دو رقم هاشمی و خزر در دو تیمار یک و شش ماه انبارداری در یک گروه آماری قرار گرفتند، درحالی پیری تسریع شده سبب کاهش معنی‌دار این شاخص در هر دو رقم گردید (جدول ۶). پاسخ متفاوت جوانه‌زنی و بنیه گیاهچه ارقام مختلف برنج به زوال توسط بیژن‌زاده و همکاران (۲۰۱۶) گزارش شده است.

در گلرنگ نیز پیری تسریع شده و طبیعی کاهش بنیه گیاهچه را منتج شده و این کاهش ناشی از کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و افزایش تجمع رادیکال آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها، عیوب کرموزومی و ژنتیکی و اضمحلال پروتئین‌های جنین و خسارت غشای سلولی بوده است (زمانی^۴ و همکاران، ۲۰۱۰). سان و همکاران، (۲۰۰۷) در برنج تراریخته، بیان ژن‌های مسئول در تولید HSPs^۵ با ثابت نگه‌داشتن وضعیت پروتئین‌های سلولی و محدود کردن تجمع گونه‌های فعال اکسیژن، بنیه بذر و قابلیت انبارمندی آن را حفظ می‌کنند (کاور^۶ و همکاران، ۲۰۱۵).

بذرهای بعد از یک ماه انبارداری، اگرچه کوتاه‌تر از سه رقم دیگر بود، اما افت طول ریشه‌چه در آن به دنبال زوال طبیعی و مصنوعی با سرعت کم‌تری اتفاق افتاد (جدول ۶) که می‌تواند ناشی از حساسیت کم‌تر این رقم به شرایط و اتفاقات رخ داده در جریان زوال باشد که با نتایج گزارش بیژن‌زاده و همکاران (۲۰۱۶) در مورد رقم خزر مطابقت دارد. حساسیت طول ساقه‌چه و ریشه‌چه به زوال و کاهش وزن خشک گیاهچه توسط محققین دیگر نیز (کاپور^۱ و همکاران (۲۰۱۰) در نخود، قاسمی^۲ و همکاران (۲۰۱۴) در گندم (گودرزبان^۳ و همکاران، ۲۰۱۴) در گندم گزارش شده بود.

شاخص بنیه گیاهچه

طبق نتایج تجزیه مرکب برهمکنش زوال و رقم بر شاخص بنیه گیاهچه در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). در اثر زوال بذر این شاخص همسو با درصد جوانه‌زنی کاهش نشان داد که این کاهش در تیمار پیری تسریع شده مشهودتر از قرارگیری بذرها در انبار به مدت شش ماه بود (جدول ۴). افت این شاخص در رقم دمسیاه با شدت بیش‌تری صورت گرفته، به طوری که در تیمار پیری تسریع شده و بذرهای دارای طول عمر شش ماه شاخص بنیه گیاهچه در این رقم به ترتیب ۲۵ و ۷۷

⁴ Zamani

⁵ Small heat shock proteins

⁶ Kaur

¹ Kapoor

² Ghasemi

³ Goodarziyan

لطیف‌زاده شاهخالی و همکاران: بررسی تأثیر زوال طبیعی و مصنوعی بذر بر گونه‌های فعال اکسیژن

قرارگیری به مدت شش ماه در ۴ درجه سلسیوس و بذره‌های حاصل از پیری تسریع‌شده در حین جوانه‌زنی فعالیت آلفا‌امیلاز کم‌تری را در مقایسه با بذره‌های با طول عمر ۱ ماه از خود نشان دادند. کاهش فعالیت این آنزیم ناشی از زوال بذر در بذره‌های با طول عمر شش ماه از شدت کم‌تری برخوردار بود.

فعالیت آنزیم آلفا‌امیلاز

بر اساس نتایج تجزیه واریانس مرکب اثر رقم و زوال و برهمکنش آن‌ها بر میزان فعالیت آنزیم آلفا‌امیلاز در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). مطابق نتایج حاضر در شکل ۱-الف زوال بذر سبب کاهش فعالیت این آنزیم در هر چهار رقم مورد مطالعه شد. بذرها پس از

جدول ۶. برهمکنش زوال و رقم بر درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و شاخص بنیه بذر برنج

Table 6. Interaction of deterioration and cultivar on germination percentage, germination rate, radicle length, and shoot vigor index of rice seed

تیمار Treatment	درصد جوانه‌زنی (درصد) در سال ۱۳۹۶ Germination percentage (%) in 2017	درصد جوانه‌زنی (درصد) در سال ۱۳۹۷ Germination percentage (%) in 2018	سرعت جوانه‌زنی (بذر بر روز) Germination rate (seed.d ⁻¹)	طول ریشه‌چه (سانتی‌متر) Radicle length (cm)	شاخص بنیه بذر Shoot vigor index
HP1	99.5a	99.7a	20.07a	8.86a	1776.3a
HP2	97.3ab	96.3b	13.49b	8.39ab	1567.7ab
HP3	76.44d	80.6e	8.02e	7.24bc	1174.0e
GP1	99.33a	100a	17.16b	9.12a	1810.3a
GP2	97.7ab	99a	13.46c	7.14bc	1567.7bc
GP3	87.8c	85.3d	11.11d	6.39cde	1381.5d
KP1	99.7a	97.7ab	14.81c	6.95cd	1462cd
KP2	98.3ab	96b	11.53d	6.56cd	1392.3cd
KP3	89.6c	89c	11.56d	5.7de	1086.5e
DP1	94.7b	94b	14.3c	7.08bcd	1530.6bcd
DP2	76d	74.7f	7.57e	6.94cd	1182.6e
DP3	29.5e	33g	3.5f	5.12e	382.4f

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

Data with different letters in the same column are significantly different at 0.05 level.

H، رقم هاشمی، G، رقم گیلانه، K، رقم خزر و D، رقم دمسیاه-P1 و P2، نگهداری بذرها در انبار به مدت یک و شش ماه و P3، تیمار ۹۶ ساعت پیری تسریع‌شده

جدول ۷. مقایسه میانگین اثرات ساده برای طول ساقه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه برنج

Table 7. Mean comparison of simple effects for shoot length, shoot and radicle dry matter of rice

	طول ساقه‌چه (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	وزن خشک ساقه‌چه (گرم) Shoot dry weight (g)	وزن خشک ریشه‌چه (گرم) Radicle dry weight (g)	محتوای پراکسید هیدروژن در سال ۱۳۹۶ (نانوگرم بر گرم وزن تر) H ₂ O ₂ content in 2017 (nm.g ⁻¹ Fw)
زوال (Deterioration)				
۱ ماه (1 Month)	8.76 a	0.165 a	0.095 a	0.06c
۶ ماه (6 Month)	8.49 a	0.139 b	0.092 b	0.77b
پیری تسریع‌شده (Accelerated ageing)	7.29 b	0.045 c	0.024 c	1.24a
رقم (Cultivar)				
هاشمی (Hashemi)	8.45 a	0.121 a	0.081 a	0.64b
گیلانه (Gilaneh)	8.57 a	0.121 a	0.073 ab	0.72ab
خزر (Khazar)	7.35 b	0.116 a	0.07 b	0.63b
دمسیاه (Domsiyah)	8.33 a	0.107 a	0.057 c	0.76a

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

Data with different letters in the same column are significantly different at 0.05 level.

SOD در سطح یک درصد معنی‌دار شده است (جدول ۴). تجزیه واریانس فعالیت آنزیم کاتالاز در دو سال مطالعه نیز نشان داد که اثر زوال و رقم و برهمکنش این عوامل بر فعالیت آنزیم کاتالاز معنی‌دار شد (جدول ۵). فعالیت آنزیم کاتالاز در سال اول مطالعه بالاتر بود. احتمالاً متوسط بارندگی بالاتر در مرداد ماه سال دوم در زمان رسیدگی بذر روی گیاه مادری و اثر آن بر درصد جوانه‌زنی بی‌تأثیر بر فعالیت کم‌تر آنزیم در سال دوم نباشد. بیش‌ترین فعالیت آنزیم کاتالاز در سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ در حین جوانه‌زنی بذرهای خزری که شش ماه در چهار درجه سلسیوس در انبار نگهداری شده بودند و کم‌ترین فعالیت این آنزیم نیز در بذرهای گیلانه در تیمار پیری تسریع‌شده مشاهده گردید. قرارگرفتن بذرها در انبار به‌مدت شش ماه سبب افزایش فعالیت این آنزیم گردید (شکل ۱-د، ج). طبق نتایج مقایسه میانگین (شکل ۱ ب) بیش‌ترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در رقم گیلانه و حضور یک ماهه بذر در انبار و کم‌ترین مقدار فعالیت در رقم خزر و تیمار پیری تسریع‌شده مشاهده شد. میزان فعالیت این آنزیم با انبارداری شش ماهه بذرهای هاشمی، گیلانه، خزر و دمسیاه به‌ترتیب ۱۴/۲۸، ۷۵/۵، ۵۹/۱۸ و ۱۷/۴۶ درصد کاهش نشان داد که این کاهش در ارقام محلی هاشمی و دمسیاه از لحاظ آماری غیرمعنی‌دار بود. در ارقام گیلانه و خزر کاهش فعالیت آنزیم بعد از شش ماه با شدت بیش‌تری انجام گرفت. تیمار پیری تسریع‌شده نیز فعالیت آنزیم پراکسیداز را در هر چهار رقم کاهش داد. در این تیمار نیز افت فعالیت آنزیم در دو رقم گیلانه و خزر با شدت بیش‌تری نسبت به دو رقم دیگر اتفاق افتد (شکل ۱-ب). از میزان فعالیت آنزیم SOD در تیمار پیری تسریع‌شده و انبارداری شش ماهه بذرها کاسته شد. در تیمار یک ماه انبارداری بین ارقام خزر، گیلانه و هاشمی تفاوتی معنی‌داری از نظر فعالیت آنزیم SOD مشاهده نشد، درحالی که رقم محلی دمسیاه فعالیت کم‌تری از نظر این آنزیم در مقایسه با سه رقم دیگر نشان داد. شش ماه انبارداری سبب افت فعالیت این آنزیم گردید، این کاهش در سه رقم هاشمی، خزر و دمسیاه بیش‌تر بوده و این سه رقم در یک گروه آماری قرار گرفتند، اما کاهش فعالیت آنزیم در رقم گیلانه با شدت کم‌تری

فعالیت آلفاآمیلاز در بذرهای ارقام اصلاح‌شده گیلانه و خزر در بذرهای دارای طول عمر یک ماه بالاتر از دو رقم دیگر بود. افت فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز ناشی از زوال در رقم گیلانه با شدت بیش‌تر و در رقم خزر با شدت کم‌تری اتفاق افتاد. به نظر می‌رسد در بین چهار رقم مورد مطالعه، فعالیت آنزیم در رقم گیلانه حساس‌تر به وقایع منتج از زوال بذر باشد. دو رقم هاشمی و دمسیاه فعالیت آنزیمی کم‌تری را در هر سه مرحله مورد آزمایش از خود نشان دادند (شکل ۱-الف). رقم محلی دمسیاه در تیمار پیری تسریع‌شده کم‌ترین مقدار فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز را معادل ۰/۰۲۸ (میکرومول گلوکز آزادشده در گرم وزن تر بذر) از خود نشان داد، این درحالی است که بالاترین فعالیت آنزیم نیز در رقم گیلانه یک ماه پس از برداشت معادل ۰/۲۰۶۴ (میکرومول گلوکز آزادشده در گرم وزن تر بذر) که این برتری در درصد جوانه‌زنی این تیمار نیز مشاهده شد (شکل ۱-الف).

مشابه با نتیجه پژوهش حاضر در شش رقم گندم و دو تیمار پیری تسریع‌شده و طبیعی، فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز در هر دو تیمار کاهش نشان داد و این کاهش در پیری طبیعی با شدت کم‌تری نسبت به پیری تسریع‌شده اتفاق افتاد (چائوهان^۱ و همکاران، ۲۰۱۱). در پژوهش حاضر کاهش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز همسو با کاهش سرعت جوانه‌زنی در تیمارهای زوال در هر چهار رقم مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد که کاهش فعالیت این آنزیم ناشی از زوال قابلیت جوانه‌زنی بذرها را به‌شدت کاهش می‌دهد؛ که با یافته‌های لی و کیم^۲ (۲۰۰۰) در برنج مطابقت دارد که کاهش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز ناشی از زوال را با تغییر در وضعیت فسفولیپیدها و تغییرات پراکسیداتیو وابسته به زوال و به‌دنبال آن تغییر غشاهای داخلی و خارجی پلاستیدها و میتوکندری‌ها، خسارت در سنتز DNA، RNA و پروتئین‌ها مرتبط دانستند.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

تجزیه واریانس مرکب نشان داد که اثرات ساده رقم و زوال و برهمکنش آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های POX و

¹ Chauhan

² Lee and Kim

فعالیت آنزیم CAT در تیمارهای زوال مصنوعی و طبیعی تا حدی افزایش نشان داد.

این افزایش در تیمار نگهداری بذر با بهمدت شش ماه در انبار قابل توجه بود (شکل ۱-د، ج). احتمالاً تغییر در فعالیت آنزیم CAT به دلیل نقش پررنگ این آنزیم در تبدیل رادیکال آزاد H_2O_2 به آب و اکسیژن می‌باشد. مقایسه بین تیمار پیری تسریع‌شده با تیمار قراردادن بذر با بهمدت شش ماه در انبار در چهار رقم مورد مطالعه نشان می‌دهد که محتوای H_2O_2 در تیمار پیری تسریع‌شده بالاتر و در بذرهای دارای طول عمر شش ماه کم‌تر بود، درحالی‌که فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار قراردادن بذر با بهمدت شش ماه در انبار به‌طور واضحی بیش‌تر از بذرهای حاصل از پیری تسریع‌شده بود (شکل ۱-ج، د). یائو و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که پیری تسریع‌شده رونویسی ژن‌های PsAPX، PsSOD، PsGRcm و PsGRcyt در محور جنینی بذرهای نخودفرنگی (*Pisum sativum*) را پس از یک روز آبیگری حدود ۱/۸ تا ۲/۱ برابر کاهش داد، درحالی‌که رونویسی ژن PsCAT در محور جنینی و همچنین بافت‌های ریشه‌چه و ساقه‌چه تغییر نشان نداد. این اتفاقات کاهش ظرفیت جوانه‌زنی در بذرهای زوال‌یافته و کاهش رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه را به دنبال داشته است که با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد. این محققین در نتایج خود به اهمیت آنزیم SOD و APX در میانجیگری اتفاقات ناشی از زوال بذر در فازهای مختلف جوانه‌زنی اذعان کرده و ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را برای تکمیل فرایند جوانه‌زنی ضروری دانستند.

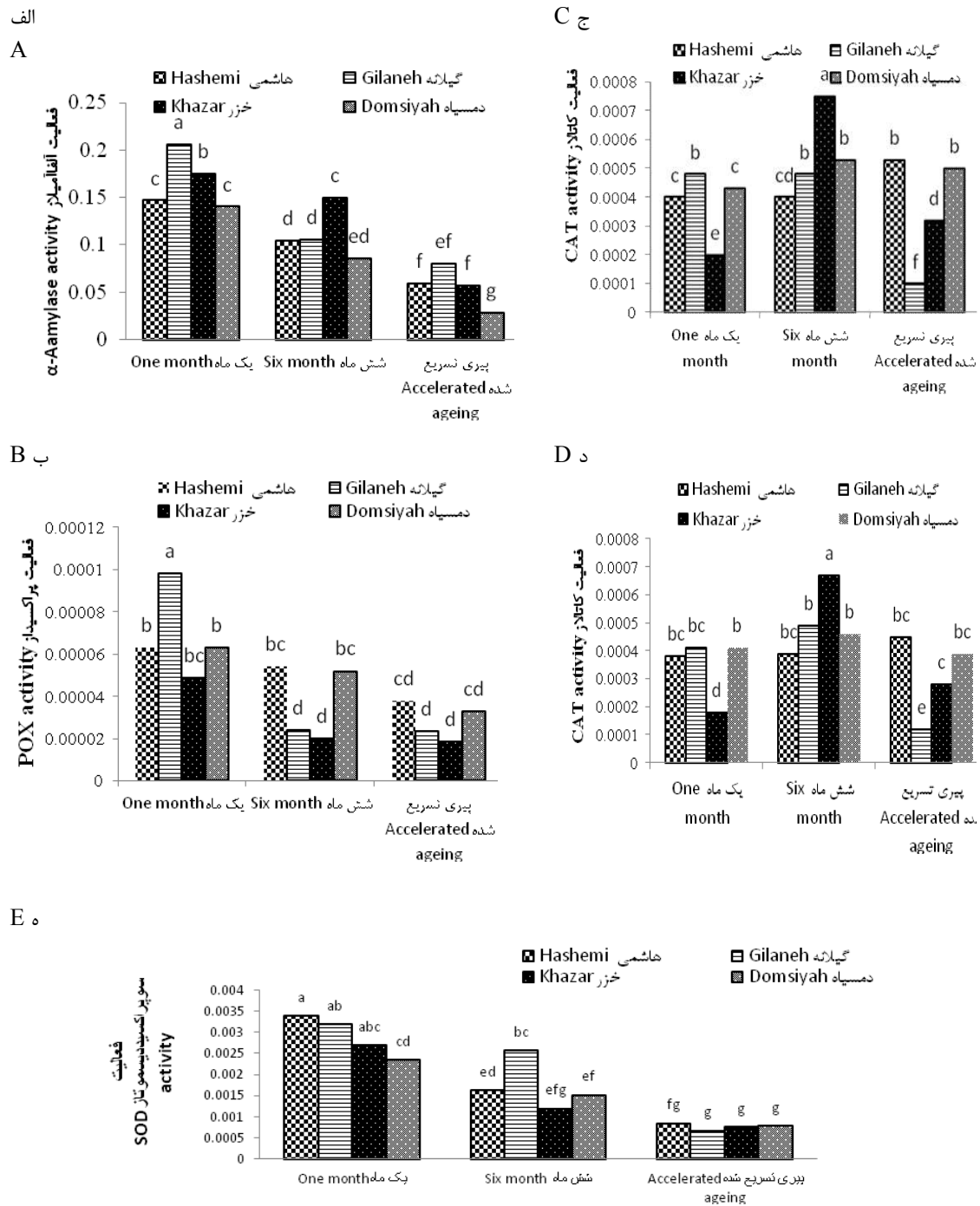
محتوای مالون‌دی‌آلدئید

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس مرکب اثر رقم و زوال و برهمکنش آن‌ها بر این صفت در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). محتوای MDA در هر دو تیمار زوال نسبت به بذرهای دارای طول عمر یک ماه افزایش نشان داد (شکل ۲-ب). محتوای مالون‌دی‌آلدئید شاخصی برای پراکسیداسیون لیپیدها در نظر گرفته می‌شود. پراکسیداسیون لیپیدها اثرات مخربی بر عملکرد میتوکندری از طریق اضمحلال غشاء داشته و موجب کاهش میزان ATP تشکیل‌شده در طول جوانه‌زنی

اتفاق افتاد. هر چهار رقم در تیمار پیری تسریع‌شده کاهش فعالیت آنزیم SOD را نشان داده و در میان ارقام تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. رقم گیلانه در تیمار پیری تسریع‌شده با فعالیت آنزیم $0/0068$ واحد بر میلی‌گرم پروتئین کم‌ترین و رقم هاشمی در تیمار بذرهای دارای طول عمر یک ماه با $0/0034$ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز را نشان دادند (شکل ۱-ه). تنش اکسیداتیو ناشی از زوال می‌تواند افزایش تجمع ماکرومولکول‌های اکسیدشده را به دنبال داشته باشد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت متفاوت در غیرفعال کردن این ترکیبات نقش دارند (کیبینزا و همکاران، ۲۰۱۱). در گیاهان مختلف کاهش کارایی دفاع آنتی‌اکسیدانت سلول‌ها ناشی از زوال در بذرها گزارش شده است. در پژوهش حاضر کاهش محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز همراه با افزایش محتوای پراکسید هیدروژن در هر دو تیمار بذرهای دارای طول عمر ۶ ماه و پیری تسریع‌شده مشاهده شده است (شکل ۱-ب، ه). کاهش معنی‌دار فعالیت POX در انبارداری شش ماهه در رقم گیلانه و خزر مشاهده شد. این کاهش در تیمار پیری تسریع‌شده در رقم گیلانه معنی‌دار و در رقم خزر غیرمعنی‌دار بود. کاهش فعالیت SOD در رقم گیلانه بعد از شش ماه انبارداری در مقایسه با سه رقم دیگر کم‌تر بود. کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ناشی از زوال در مطالعه (ین^۱ و همکاران ۲۰۱۴) نیز گزارش شده است. در پژوهش حاضر کاهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز همراه با افزایش محتوای پراکسید هیدروژن بود که این یافته‌ها می‌توانند توجیهی بر علت کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، کاهش بنیه بذر باشند که با نتایج پژوهش طالبانی و گلپایگانی^۲ (۲۰۱۱) در رقم هاشمی مطابقت دارد. لی و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که بیان بیش‌تر ژن‌های مؤثر در تولید حذف‌کننده‌های ROSها در بذرهای گیاهان تراریخته توانایی انبارمندی در آن‌ها را افزایش می‌دهد و این بذرها دیرتر دچار زوال می‌گردند. در پژوهش حاضر

¹ Yin

² Tilebeni and Golpaygani



شکل ۱. برهمکنش زوال بذر و رقم بر فعالیت آنزیم‌های الف- آلفاآمیلاز (میکرومول گلوکز آزاد شده در گرم وزن بذر) ب - پراکسیداز (واحد بر میلی گرم پروتئین)، ج و د - کاتالاز (واحد بر میلی گرم پروتئین) به ترتیب در سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷، ه - سوپراکسیددیسموتاز (واحد بر میلی گرم پروتئین). یک ماه- بذرهاى قرار گرفته در انبار به مدت یک ماه، شش ماه- بذرهاى قرار گرفته در انبار به مدت شش ماه و پیری تسريع شده- بذرهاى حاصل از پیری تسريع شده (۹۶ ساعت قرار گرفتن در ۴۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد)

Fig. 1. Interaction of deterioration and cultivar on A- α -Amylase (μm glucose. g^{-1}SW), B-POX (Unit.mg protein) C and D-CAT(Unit.mg protein) in 2017 and 2018 and E-SOD (Unit.mg protein), 1 month natural storage, 6 months natural storage and Accelerated Ageing (96 hours in 45°C and 100% RH

دفاع/بیماری را نشان داد. این محققین افزایش محتوای MDA بذر در انبار را علت کاهش قابلیت انبارمانی رقم حساس بیان کردند.

محتوای H_2O_2

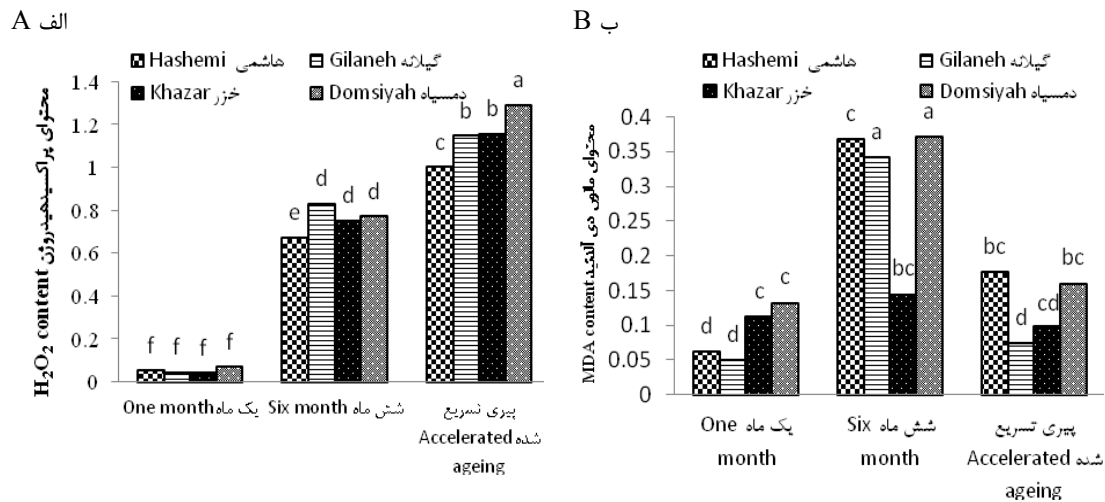
در بین رادیکال‌های آزاد تولیدی از تنش اکسیداتیو، پراکسید هیدروژن به علت ماندگاری بالا در pH زیستی، به‌عنوان مهم‌ترین رادیکال آزاد در نظر گرفته می‌شود. با توجه به معنی‌داری آزمون F، داده‌های هر سال این صفت جداگانه تجزیه واریانس شده و در جدول ۵ گزارش گردید. در سال ۱۳۹۶، اثر ساده زوال و رقم بر محتوای پراکسید هیدروژن معنی‌دار شدند. مقایسه میانگین داده‌های این سال نشان داد که بذره‌های دارای طول عمر یک ماه کم‌ترین مقدار این رادیکال آزاد را داشته و دو تیمار دیگر سبب افزایش معنی‌دار این صفت شده‌اند. همچنین در مقایسه بین ارقام مشخص شد که رقم دمسیاه محتوای پراکسید هیدروژن بالاتری را نشان داد. البته باید اذعان شود که رقم گیلانه نیز محتوای پراکسید هیدروژن مشابهی داشته و با رقم دمسیاه در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۷). اثر ساده زوال و رقم و برهمکنش این دو عامل بر محتوای پراکسید هیدروژن بذر در سال ۱۳۹۷ از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار شدند (جدول ۵). مقایسه میانگین داده‌های این سال نشان داد که محتوای پراکسید هیدروژن در بذرها بعد از اعمال پیری تسریع‌شده و قراردادن شش ماهه بذرها در انبار افزایش نشان داد که این افزایش در تیمار پیری تسریع‌شده چشمگیر بود (شکل ۲-الف). رقم دمسیاه در تیمار پیری تسریع‌شده بالاترین محتوای این رادیکال آزاد معادل ۱/۲۹ نانومول بر گرم وزن تر بذر را نشان داد که تفاوت آماری معنی‌داری را با دیگر ارقام نشان داد. در بذره‌های دارای طول عمر شش ماه نیز این رقم محتوای پراکسید هیدروژن بالایی را نشان داد که با ارقام خزر و گیلانه در این تیمار زوال در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۲-الف).

می‌شود. همچنین کاهش سنتز آنزیم‌های مورد نیاز برای مراحل اولیه جوانه‌زنی را نیز به‌دنبال دارند که این اتفاقات زنجیروار جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را متأثر می‌کنند (مک‌دونالد^۱، ۱۹۹۹). گائو^۲ و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که در بذره‌های برنج در معرض زوال محتوای مالون‌دی‌آلدئید افزایش نشان می‌دهد که این افزایش در ارقام حساس بیش‌تر می‌باشد. در پژوهش حاضر اعمال تیمار پیری تسریع‌شده سبب افزایش محتوای MDA (فرآورده پراکسیداسیون لیپیدها) شد اما شدت این افزایش کم بوده و تنها در رقم هاشمی از لحاظ آماری معنی‌دار بود (شکل ۲-ب). شعبان و همکاران (۲۰۱۷) در مقایسه بذره‌های نخود در پیری تسریع‌شده و پیری طبیعی در انبار نشان داد که بذره‌های پیرشده محتوای MDA بیش‌تر و واکنش‌های مایلارد^۳ کم‌تری را نسبت به بذره‌های پیری تسریع‌شده نشان دادند، این درحالی بود که وضعیت جوانه‌زنی در این بذرها مشابه نتیجه پژوهش حاضر وضعیت بهتری را نشان داد. محتوای MDA در بذره‌های با طول عمر شش ماه در هر چهار رقم به‌شدت افزایش یافت، به‌حدی که مقدار آن در رقم هاشمی از ۰/۰۶۳ به ۰/۳۶۸۳ و در رقم گیلانه از ۰/۰۵ به ۰/۳۴۲۳ و در رقم خزر از ۰/۱۱۳۲ به ۰/۱۴۵۳ و در رقم محلی دمسیاه از ۰/۱۳۳۱ به ۰/۳۷۱۵ نانومول بر گرم وزن تر بذر افزایش یافت (شکل ۲-ب). در بذره‌های رقم خزر نسبت به ارقام دیگر بعد از شش ماه، مقدار کم‌تری MDA دیده شد. این احتمال وجود دارد که سطوح بالای آنزیم کاتالاز در این رقم مسئول کاهش تجمع محتوای مالون‌دی‌آلدئید بوده باشد. ارقام هاشمی و دمسیاه در هر دو تیمار زوال نسبت به دو رقم دیگر محتوای MDA بالاتری را نشان دادند (شکل ۲-ب). گائو و همکاران (۲۰۱۶) بعد از دو سال نگهداری بذر در انبار ارقام IY998 و BY998 برنج با پتانسیل انبارمانی متفاوت، گزارش کردند که رقم حساس IY998 درصد جوانه‌زنی کم‌تر و محتوای MDA بیش‌تر ناشی از تغییر وضعیت پروتئین‌های وابسته به گلوپروتئین و پروتئین‌های درگیر در

¹ McDonald

² Gao

³ Millard reaction



شکل ۲. برهمکنش دو عامل زوال و رقم بر (الف) محتوای پراکسید هیدروژن در سال ۱۳۹۷ و (ب) محتوای مالون دی‌آلدئید یک ماه- بذره‌ای قرار گرفته در انبار به مدت یک ماه، شش ماه- بذره‌ای قرار گرفته در انبار به مدت شش ماه و پیری تسریع‌شده- بذره‌ای حاصل از پیری تسریع‌شده (۹۶ ساعت قرار گرفتن در ۴۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد)

Fig. 2. Interaction of deterioration and cultivar on A- H₂O₂ content in 2018, B-MDA content, 1 month natural storage, 6 months natural storage and Accelerated Ageing (96 hours in 45°C and 100% RH)

جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و شاخص بنیه گیاهچه در رقم اصلاح‌شده خزر در مقایسه بین دو تیمار قرارگرفتن یک و شش ماهه در انبار در یک گروه آماری قرار داشتند. کاهش سرعت جوانه‌زنی در این رقم با شدت کم‌تری در مقایسه با سه رقم دیگر اتفاق افتاد. این توانایی با فعالیت بیش‌تر آنزیم آلفا‌امیلاز در این رقم همراه بود. این درحالی بود که صفات مربوط به جوانه‌زنی با شدت بالایی در رقم محلی دمسیاه افت نشان داد. دو رقم دیگر مطالعه وضعیت بینابینی این دو رقم را نشان دادند. در کلیه ارقام مورد مطالعه همراه با اعمال زوال با افزایش محتوای MDA و H₂O₂ کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و POX و افزایش فعالیت CAT مشاهده شد. فعالیت آنزیم CAT در تیمار قرارگیری بذرها به مدت شش ماه در انبار و رقم خزر بسیار چشمگیر بود. با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که رقم خزر در مقابل سازوکارهای زوال مقاوم‌تر و رقم دمسیاه حساسیت بالاتری به شرایط پیش‌آمده حین زوال نشان می‌دهند و باید به شرایط و ویژگی‌های انبار در زمان نگهداری این رقم توجه بیش‌تری مبذول داشت.

گزارش شده است که گیاه نخود (*Cicer arietinum*) تراریخته از نظر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، با کاهش محتوای رادیکال آزاد H₂O₂ و MDA توانستند بنیه بذر و قابلیت انبارمانی خود را ارتقا دهند (سالوی^۱ و همکاران، ۲۰۱۶). پتلا^۲ و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که در برنج بیان آنزیم‌هایی مانند (PMT^۳) که در بازسازی پروتئین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نقش دارند، با سازوکاری ناشناخته از تجمع ROS ها و پراکسیداسیون لیپیدها حین زوال جلوگیری کرده و مانع کاهش بنیه بذر شده و انبارمانی و طول عمر بذرها را بهبود می‌دهند. در این گیاهان افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و آنتی‌اکسیدانت غیر آنزیمی آسکوربیک اسید و کاهش محتوای H₂O₂ و MDA مشاهده و گزارش شد.

نتیجه‌گیری

در چهار رقم مورد مطالعه پس از اعمال تیمار زوال کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی و کاهش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و آنزیم آلفا‌امیلاز همراه با کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و POX مشاهده شد. صفات درصد

¹ Salvi

² Petla

³ Protein L-Isoaspartyl O-methyltransferase

منابع

- Abdul-Baki, A.A. and Anderson, J.D. 1973. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Journal of Crop Science*, 13(6): 630-633. <https://doi.org/10.2135/cropsci1973.0011183X001300060013x>
- Abeles, F.B. and Biles, C.L. 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiology*, 95: 269-273. <https://doi.org/10.1104/pp.95.1.269>
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H. and Corbineau, F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10): 806-814. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.022>
- Barreto, L.C. and Garcia, Q.S. 2017. Accelerated ageing and subsequent imbibition affect seed viability and the efficiency of antioxidant system in macaw palm seeds. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(3): 72-78. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2367-z>
- Bijanzadeh, E., Naderi, R., Nosrati, K. and Egan, T.P. 2017. Effects of accelerated ageing on germination and biochemistry of eight rice cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 40(2): 156-164. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1201502>
- Brar, N.S., Kaushik, P. and Dudi, B.S. 2019. Assessment of natural ageing related physio-biochemical changes in onion seed. *Agriculture*, 9(8): 1-15. <https://doi.org/10.3390/agriculture9080163>
- Cao, D., Chen, S., Huang, Y., Qin, Y. and Ruan, G. 2019. Effects of artificial aging on physiological characteristics of rice seeds with different dormancy characteristics. *Agricultural Biotechnology*, 8(1): 52-56.
- Chandel, R K., Khan, Z. and Gandotra, S. 2015. Alterations in protein and isozymes profiles during accelerated ageing in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Journal of Functional and Environmental Botany*, 5(1): 64-69. <https://doi.org/10.5958/2231-1750.2015.00010.4>
- Chauhan, D.S., Deswal, D.P., Dahiya, O.S. and Punia, R.C. 2011. Change in storage enzymes activities in natural and accelerated aged seed of wheat (*Triticum aestivum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 81(11): 1037-1040.
- Chen, D., Li, Y., Fang, T. Shi, X. and Chen, X. 2016. Specific roles of tocopherols and tocotrienols in seed longevity and germination tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Science*, 244: 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.12.005>
- Copeland, L. and MacDonald, M.B. 2008. *Principles of Seed Science and Technology*. (Translated: Akram Ghaderi, F., Kamkar, B. and Soltani, A). Ferdowsi University of Mashhad Publication. 511p. [In Persian].
- Dantas, A.F., Fascineli, M.L., Jose, S.C.B.R., Padua, J.G., Gimenes M.A. and Grisolia, C.K. 2019. Loss of genetic integrity in artificially aged seed lots of rice (*Oryza sativa* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 846: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.008>
- Dey, G., Bhupinder, S. and Banerjee, R. 2003. Immobilization of alpha-amylase produced by *Bacillus circulans* GRS 313. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(2): 167-176. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000200005>
- Fu, H., Cao, D.D., Hu, W.M., Guan, Y.J., Fu, Y.Y., Fang, Y.F. and Hu, J. 2017. Studies on optimum harvest time for hybrid rice seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4): 1124-1133. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7838>

- Gao, J., Fu, H., Zhou, X., Chen, Z., Luo, Y., Cui, B., Chen, G. and Liu, J. 2016. Comparative proteomic analysis of seed embryo proteins associated with seed storability in rice (*Oryza sativa* L.) during natural aging. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103: 31-44. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.026>
- Ghasemi, E., Goodarzian Ghahfarokhi, M., Darvishi, B. and Heidari kazafi, Z. 2014. The effect of hydro-priming on germination characteristics, seedling growth and antioxidant activity of accelerated aging wheat seeds. *Cercetari Agronomice in Moldova*, 4: 41-48. <https://doi.org/10.1515/cerce-2015-0003>
- Ghassemi-Golezani, K., Khomari, S., Dalil, B., Hosseinzadeh-Mahootchy, A. and Chadordooz-Jeddi, A. 2010. Effects of seed aging on field performance of winter oilseed rape. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8(1): 175-178.
- Giannopolitilis, C.N. and Ries, S.K. 1997. Superoxide dismutase.o.purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 59: 315-318. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.315>
- Goel, A., Goel, A.K. and Sheoran, I.S. 2003. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1093-1100. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00881>
- Goodarzian Ghahfarokhi, M., Ghasemi, E., Saedi, M. and Heidari Kazafi, Z. 2014. The effect of accelerated aging on germination characteristics, seed reserve utilization and malondialdehyde content of two wheat cultivars. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 10(2): 15-23.
- Heath, R.L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Kapoor, N., Arya, A., Siddiqui, M.A., Amir, A. and Kumar, H. 2010. Seed deterioration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under accelerated aging. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(3): 158-162. <https://doi.org/10.3923/ajps.2010.158.162>
- Kaur, H., Petla, B.P., Kamble, N.U., Singh, A., Rao, V., SalviGhosh, P. and Majee, M. 2015. Differentially expressed seed aging responsive heat shock protein OsHSP18.2 implicates in seed vigor, longevity and improves germination and seedling establishment under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 6: 713-713. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00713>
- Kavoosi, M. and Allahgholipour, M. 2017. Effect of rate and split application of nitrogen fertilizer on growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cvs. Gilaneh and Abjiboji. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 19(2): 165-180. [In Persian with English Summary].
- Kibinza, S., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J.M., Corbineau, F. and El-Maarouf-Bouteau, H. 2011. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science*, 181: 309-315. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.06.003>
- Kibinza, S., Vinel, D., Côme, D., Bailly, C. and Corbineau, F. 2006. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. *Physiologia Plantarum*, 128(3): 496-506. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00771.x>
- Kong, Q., Mao, P., Yu, X. and Xia, F. 2014. Physiological changes in oat seeds aged at different moisture contents. *Seed Science and Technology*, 42(2): 190-201. <https://doi.org/10.15258/sst.2014.42.2.08>
- Lee, S.S. and Kim, J.H. 2000. Total sugars, -amylase activity, and germination after priming of normal and aged rice seeds. *Korean Journal of Crop Science*, 45(2): 108-111.
- Lee, Y.P., Baek, K.H. Lee, H.S., Kwak, S.S., Bang, J.W. and Kwon, S.Y. 2010. Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display

- enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 61(9): 2499-2506. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq085>
- Leprince, O., Pellizzaro, A. Berriri, S. and Buitink, J. 2016. Late seed maturation: drying without dying. *Journal of Experimental Botany*, 68(4): 827-841. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw363>
- Li, Y., Wang, Y., Xue, H. Pritchard, H.W. and Wang, X. 2017. Changes in the mitochondrial protein profile due to ROS eruption during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 114: 72-87. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.02.023>
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2(2): 176-177. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>
- McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, 27(1): 177-237.
- Monajem, S., Zeinali, E., Ghaderi-Far, F., Soltani, E. and Hosseini Chaleshtari, M. 2016. Evaluation of the seed vigour diversity of rice genotypes (*Oryza sativa* L.) *Journal of Crop Production*, 8(4): 121-142.
- Petla, B.P., Kamble, N.U., Kumar, M., Verma, P., Ghosh, S., Singh, A., Rao, V., Salvi, P., Kaur, H., Saxena, S.C. and Majee, M. 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. <https://doi.org/10.1111/nph.13923>
- Rabiei, B. and Mohit, A. 2013. *Analysis of Statistical Designs in Agricultural Research (with Emphasis on SAS Software)*. University of Guilan Press. 427p. [In Persian].
- Rajjou, L. and Debeaujon, I. 2008. Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10): 796-805. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.021>
- Salvi, P., Saxena, C.S., Petla, B.P., Kamble, N.U., Kaur, H., Verma, P., Rao, V., Ghosh, S. and Majee, M. 2016. Differentially expressed galactinol synthase(s) in chickpea are implicated in seed vigor and longevity by limiting the age induced ROS accumulation. *Scientific Reports*, 6(1): 1-15. <https://doi.org/10.1038/srep35088>
- Shaaban, M., Ghaderifar, F., Sadeghipour, H. and Yamchi, A. 2017. Ageing mechanisms in chickpea seeds: relationship of sugar hydrolysis and lipid peroxidation with amadori and millard reactions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 9(1): 1-20. [In Persian with English Summary].
- Sun, Q., Wang, J. and Sun, B. 2007. Advances on seed vigor physiological and genetic mechanisms. *Agricultural Sciences in China*, 6(9): 1060-1066. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(07\)60147-3](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(07)60147-3)
- Sung, J.M. and Chiu, C.C. 1995. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Science*, 110: 45-52. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)91223-J](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)91223-J)
- Tilebeni, H.G. and Golpayegani, A. 2011. Effect of seed ageing on physiological and biochemical changes in rice seed (*Oryza sativa* L.). *International Journal of AgriScience*, 1(3): 138-143.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant system in acid-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151(1): 59-66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Walters, C., Ballesteros, D. and Vertucci, V.A. 2010. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. *Plant Science*, 179: 565-573. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.06.016>
- Yao, Z., Liu, L., Gao, F., Rampitsch, C., Reinecke, D.M., Ozga, J.A. and Ayele, B.T. 2012. Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential

- expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea. *Journal of Plant Physiology*, 169(15): 1477-1488. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.06.001>
- Yin, G., Xin, X., Song, C., Chen, X., Zhang, J., Wu, S., Li, R., Liu, X. and Lu, X. 2014. Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.006>
- Zamani, A., Nouri, S.A.S. Afshari, R.T., Nezhad, H.I., Akbari, G.A. and Tavakoli, A. 2010. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity under natural and accelerated aging in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 41(3): 545-554. [In Persian with English Summary].
- Zhang, Y.X., Xu, H.H., Liu, S.J., Li, N., Wang, W.Q., Møller, I.M. and Song, S.Q. 2016. Proteomic analysis reveals different involvement of embryo and endosperm proteins during aging of Yliangyou 2 hybrid rice seeds. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01394>

Research Article

Investigating the Effects of Natural and Artificial Seed Deterioration on Reactive Oxygen Species, Antioxidant Enzymes, and Seed Germination Characteristics in Local and Improved Rice (*Oryza sativa*) Cultivars Derived from the Farms in Guilan Province

Mohadeseh Latifzadeh Shahkhali¹, Seyed Mohammad Reza Ehteshami^{2,*}, Foad Moradi³

Extended abstract

Introduction: Seed deterioration is associated with oxidative stress and uncontrolled accumulation of reactive oxygen species. Seeds have a group of enzymatic and non-enzymatic antioxidants that protect them against reactive oxygen species and help maintain seed vigor and support seed germination processes. The response of different cultivars to seed deterioration is different. Knowledge about the sources and mechanisms of deterioration and how different cultivars respond can help to select the appropriate cultivar for the region and also provide useful information in selecting and applying appropriate management methods for storage and increasing the storage time of seeds.

Materials and Methods: The Experiment was conducted as factorial based on a completely randomized block design with three replications. Treatments included one and six months of natural storage (4°C, 11 percent moisture content of seeds and 60% RH) and accelerated aging (96 hours at 45°C and 100% RH) applied on four cultivars including Hashemi, Gilaneh, Khazar, and Domsiyah. Germination percentage, germination rate, shoot length, radicle length, shoot dry weight, radicle dry weight, shoot vigor index (SVI), α -amylase activity, catalase (CAT), peroxidase (POX), superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) content were evaluated.

Results: The results showed that accelerated aging and storage of seeds for six months led to reduced germination percentage, germination rate, shoot length, radicle length, shoot dry weight, radicle dry weight, shoot vigor index (SVI), α -amylase activity reduced in all four cultivars. This decrease was accompanied by an increase in the free radical content of MDA and H_2O_2 and a decrease in the activity of the antioxidant enzymes SOD and POX. Malondialdehyde content was lower in the seeds stored for six months. The activity of CAT increased after deterioration treatment, this increase was more intense in the seeds stored for six months. These seeds also showed lower H_2O_2 content compared to accelerated aging seeds. Khazar cultivar showed lower H_2O_2 content as a result of higher CAT enzyme activity. Moreover, this cultivar showed better germination percentage and germination rate after deterioration treatment compared to other cultivars. The decrease in germination percentage due to deterioration in Domsiyah was very severe. This cultivar showed the lowest germination percentage, germination rate, seed vigor and α -amylase activity in the accelerated aging treatment. Gilaneh and Hashemi cultivars showed higher germinability, α -amylase activity and SOD and POX at the beginning of the experiment but after deterioration treatment, their germinability decreased along with the activity of antioxidant enzymes.

Conclusions: In all studied cultivars, the accelerated aging and storage of seeds for six months adversely affected germination rate. This decrease was accompanied by an increase in free radicals in the seeds and a decrease in the activity of antioxidant enzymes SOD and POX, which were less severe in Khazar cultivar and more severe in Domsiyah cultivar. These results indicate the greater importance of the storage conditions in Domsiyah cultivar.

Keywords: Accelerating aging, Germination Rate, MDA, POX

Highlights:

- 1- The effect of storage and seed deterioration on the activity of antioxidant enzymes, reactive oxygen species and seed germination in rice was investigated.
- 2- The results of accelerated aging test and natural ageing were compared for better conclusion about the response of the cultivars.
- 3- The two improved cultivars were compared with two local cultivars (with high cultivation area).

¹ Ph.D. Student Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Guilan, <http://dorl.net/dor/20.1001.1.23831251.1400.8.2.8.4> Guilan, Iran

² Associated Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Guilan, Iran

³ Research Associate of Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran

* Corresponding author, E-mail: smrehteshami@guilan.ac.ir

DOI: 10.52547/yujrs.8.2.21



CrossMark