

Effect of pretreatment on germination characteristics and activity of some hydrolytic enzymes and glyoxylate cycle in marigold (*Calendula officinalis*) seedlings under salinity stress

Haniyeh Saadat ^{1,*}, Mohammad Sedghi ²

Extended abstract

Introduction: Salinity stress leads to the excessive production of reactive oxygen species, which at high levels can cause oxidative damage, disrupt membrane lipid functions, inactivate enzymes, and hinder metabolic activities in plants. Salinity affects seedling growth through osmotic stress, ionic toxicity, deficient absorption of essential nutrients and water, production of free radicals, destruction of the cell membrane, and reduced cell division. Utilizing pretreatment methods serves as a simple approach to mitigate the adverse effects of environmental stress. Seed pretreatment induces biochemical changes, such as the activation of enzymes involved in cellular metabolism, inhibition of metabolism, and improved water absorption, thereby aiding the germination process. This study aims to assess the impact of pretreatment on germination characteristics, activity of certain hydrolytic enzymes, and the glyoxylate cycle in marigold seedlings under salinity stress.

Materials and Methods: A factorial experiment was conducted based on a completely randomized design with three replications at the University of Mohaghegh Ardabili in 2023. Experimental treatments included four salinity levels (0, 50, 100, and 150 mM sodium chloride) and four pretreatment methods (control with distilled water, pretreatment with salicylic acid at 100 mg/L, gibberellin at 20 mg/L, and chitosan at 0.8% w/v, dissolved in 1% acetic acid).

Results: The findings indicated that salinity reduced germination percentage, mean daily germination, petiole length, and seedling dry weight. However, pretreatment with salicylic acid, gibberellin, and particularly chitosan significantly improved these parameters. The germination coefficient, radicle length, and seedling fresh weight in chitosan-pretreated groups without salinity were approximately 75%, 68%, and 34% higher compared to the control (distilled water) and 150 mM salinity treatments, respectively. Additionally, the activities of amylase, protease, and malate synthase in chitosan-pretreated groups without salinity increased by approximately 82%, 46%, and 70%, respectively, compared with the control and 150 mM salinity.

Conclusions: The results of this research demonstrate that seed pretreatment using salicylic acid, gibberellin, and especially chitosan is an effective strategy for enhancing germination indices and the activity of certain hydrolytic enzymes and the glyoxylate cycle, thereby alleviating the detrimental effects of salinity on marigold seedlings and promoting their growth.

Keywords: *Amylase, Chitosan, Malate Synthase, Salicylic Acid*

Highlights:

1. Seed pretreatment with salicylic acid, gibberellin, and especially chitosan significantly improved germination indices of marigold seeds under salinity conditions.
2. This pretreatment enhanced the enzymatic activity of amylase, protease, and malate synthase.
3. Chitosan pretreatment exhibited superior effects on germination indices and biochemical characteristics.

¹ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

² Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

*Corresponding author, E-mail: t.saadat2020@gmail.com

<http://dx.doi.org/10.61882/yujs.11.2.1>



CrossMark

ISSN: 2383-1480 (On-Line); 2383-1251 (Print)



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Received: 5.4.2024; Revised: 14.5.2024;
Accepted: 29.5.2024; Online Published: 21.3.2025

تأثیر پیش‌ تیمار بر خصوصیات جوانه‌زنی و فعالیت برخی آنزیم‌های هیدرولیتیک و چرخه گلی‌اکسیلات در گیاهچه همیشه بهار (*Calendula officinalis*) تحت تنش شوری

هانیه سعادت^{۱*}، محمد صدقی^۲

چکیده مبسوط

مقدمه: تنش شوری منجر به تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که در سطوح بالا می‌تواند باعث آسیب اکسیداتیو، اختلال در عملکرد غشای لیپیدی، غیرفعال کردن آنزیم‌ها و مانع از فعالیت‌های متابولیک شود. شوری از طریق تنش اسمزی، سمیت یونی، کمبود جذب آب، تخریب غشای سلولی و کاهش تقسیم سلولی رشد گیاهچه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. استفاده از روش پیش‌ تیمار ابزار ساده‌ای در کاهش اثرات سوء تنش‌های محیطی است. پیش‌ تیمار بذر باعث تغییرات بیوشیمیایی در بذرها می‌شود، مانند فعال شدن آنزیم‌های دخیل در متابولیسم سلولی، مهار متابولیسم و جذب آب که به فرآیند جوانه‌زنی کمک می‌کنند. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر پیش‌ تیمار بر خصوصیات جوانه‌زنی و فعالیت برخی آنزیم‌های هیدرولیتیک و چرخه گلی‌اکسیلات در گیاهچه همیشه بهار تحت تنش شوری اجرا گردید.

مواد و روش‌ها: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۴۰۲ انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل چهار سطح شوری (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) و چهار سطح پیش‌ تیمار (شاهد (آب مقطر)، پیش‌ تیمار با اسید سالیسیلیک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، جیبرلین (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و کیتوزان (۰/۸ درصد وزنی- حجمی) که در اسید استیک یک درصد حل شده بود) بود.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که شوری درصد جوانه‌زنی، میانگین جوانه‌زنی روزانه، طول ساقچه و وزن خشک گیاهچه را کاهش داد، ولی پیش‌ تیمار بذر با اسید سالیسیلیک، جیبرلین و به‌ویژه کیتوزان این صفات را بهبود بخشید. ضریب جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و وزن تر گیاهچه در پیش‌ تیمار با کیتوزان و بدون شوری به ترتیب در حدود ۷۵، ۶۸ و ۳۴ درصد نسبت به شاهد (آب مقطر) و شوری ۱۵۰ میلی‌مولار بیش‌ تر بود. همچنین، فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و مالات سنتاز در پیش‌ تیمار با کیتوزان و بدون شوری به ترتیب در حدود ۸۲، ۴۶ و ۷۰ درصد نسبت به شاهد (آب مقطر) و شوری ۱۵۰ میلی‌مولار افزایش نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار بذر با اسید سالیسیلیک، جیبرلین و به‌ویژه کیتوزان روشی مؤثر برای بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و فعالیت برخی آنزیم‌های هیدرولیتیک و چرخه گلی‌اکسیلات محسوب می‌شود و می‌تواند اثرات مضر شوری بر برخی صفات در گیاهچه همیشه بهار را کاهش داده و رشد گیاهچه را بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: اسید سالیسیلیک، آمیلاز، جیبرلین، کیتوزان، مالات سنتاز

جنبه‌های نوآوری:

- ۱- پیش‌ تیمار بذر با استفاده از اسید سالیسیلیک، جیبرلین و به‌ویژه کیتوزان سبب بهبود برخی شاخص‌های جوانه‌زنی بذر همیشه بهار تحت شرایط شوری گردید.
- ۲- این پیش‌ تیمارها فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و مالات سنتاز را افزایش داد.
- ۳- پیش‌ تیمار با کیتوزان تأثیر بهتری بر شاخص‌های جوانه‌زنی و صفات بیوشیمیایی نشان داد.

^۱ دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

^۲ استاد گروه زراعت، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

<http://dx.doi.org/10.61882/yujs.11.2.1>



CrossMark

*رایانامه نویسنده مسئول: t.saadat2020@gmail.com

شاپا: ۱۴۸۰-۲۳۸۳ (برخط): ۱۲۵۱-۲۳۸۳ (چاپی)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۷؛ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۹؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۱۲/۲۹

مقدمه

گل همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)

گیاهی یک‌ساله با ساختاری علفی از خانواده کاسنی است. بومی شمال آفریقا و جنوب اروپا می‌باشد، این گیاه از اهمیت زیادی در ایران و جهان برخوردار است و یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی و زینتی که به‌طور گسترده مورد استقبال قرار گرفته‌اند (زعفرانچی^۱ و همکاران، ۲۰۱۹). ترکیبات اصلی این گیاه شامل فلاونوئیدها، فلاونولها، گلیکوزیدها، ساپونین‌ها، ویتامین E، اسانس و کالندولین است. گیاه همیشه بهار دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد ویروسی است و به درمان معده درد، اختلالات روده، سرطان، ترمیم زخم‌ها و التهابات پوستی کمک می‌کنند (سوروری و دانایی^۲، ۲۰۲۳؛ خلیل‌زاده^۳ و همکاران، ۲۰۲۰).

تنش شوری مهم‌ترین تنش غیرزیستی است، که تأثیر منفی بر بهره‌وری محصولات در مناطق خشک و نیمه خشک جهان دارد (آهنگر^۴ و همکاران، ۲۰۲۰)، و یک چالش جدی برای پایداری تولیدات کشاورزی است. شوری می‌تواند دسترسی به مواد مغذی ضروری و آب را برای گیاهان محدود کرده و در نتیجه عملکرد گیاهان را کاهش دهد (اریف^۵ و همکاران، ۲۰۲۰). علاوه بر این، شوری با تداخل در جذب آب و فرآیندهای فیزیولوژیکی، بر فیزیولوژی گیاه تأثیر منفی می‌گذارد (الخرابشه^۶ و همکاران، ۲۰۲۱؛ موخوپادهای^۷ و همکاران، ۲۰۲۱). سطح بالای سدیم و کلر باعث عدم تعادل یونی و تنش اسمزی می‌شود که بر مورفولوژی گیاه، تولید زیست توده و صفات بیوشیمیایی تأثیر منفی می‌گذارد. گیاهان مختلف دارای سازوکار تطبیقی برای غلبه بر تنش نمک با جذب یون‌های سدیم در واکوئل از طریق تنظیم

اسمزی هستند (راهنشان^۸ و همکاران، ۲۰۱۸). مرحله جوانه‌زنی به شوری حساس است و از این طریق عملکرد محصولات را کاهش می‌دهد (مرادی و پیری^۹، ۲۰۱۸).

یکی از راه‌حل‌های ممکن برای غلبه بر اثرات منفی تنش شوری، استفاده از پیش‌تیمار^{۱۰} است. این فن، آسان، کم هزینه و کم خطر تأثیرات مثبتی بر سامانه کشاورزی داشته و در بین کشاورزان بسیار محبوب است (پیری^{۱۱} و همکاران، ۲۰۱۸). پیش‌تیمار بذر یک تیمار قبل از کاشت است که باعث ایجاد حالت فیزیولوژیکی، برای جوانه‌زنی موثر بذر، می‌شود. پیش‌تیمار بذر جذب آب را تنظیم می‌کند که فرآیند متابولیک طبیعی را در مراحل اولیه جوانه‌زنی قبل از ظهور ریشه‌چه آغاز می‌کند (لوتس^{۱۲} و همکاران، ۲۰۱۶؛ جانسون و پوتور^{۱۳}، ۲۰۲۱). پیش‌تیمار بذر با حفظ و اصلاح ترمیم ژنتیکی، سنتز پروتئین و سازوکارهای پاداکسیدانی جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه را افزایش می‌دهد (صدیق^{۱۴} و همکاران، ۲۰۱۹). استفاده از هورمون‌های گیاهی مختلف به‌عنوان عوامل پیش‌تیمار به یک رویکرد ثابت با اثرات سودمند ثابت شده در ارتقاء تحمل به تنش گیاه تبدیل شده است (رحمان^{۱۵} و همکاران، ۲۰۲۱).

پیش‌تیمار هورمونی یکی از پیش‌تیمارهای رایج است که در آن بذرهای در هورمون‌های گیاهی ضروری با تأثیر مستقیم بر متابولیسم بذر، مانند اسید سالیسیلیک‌ها و جیبرلین‌ها برای بهبود جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه در شرایط نامطلوب خیس‌انده می‌شوند (رحمان و همکاران، ۲۰۲۱). اسید سالیسیلیک یک هورمون محرک رشد گیاهی است که نقش دفاعی کاملاً مشخصی دارد (چن^{۱۶} و همکاران، ۲۰۲۰).

⁸Rahneshan

⁹Moradi and Piri

¹⁰Pretreatment

¹¹Piri

¹²Lutts

¹³Johnson and Puthur

¹⁴Saddiq

¹⁵Rhman

¹⁶Chen

¹Zaferanchi

²Soroori and Danaee

³Khalilzadeh

⁴Ahanger

⁵Arif

⁶Alkharabsheh

⁷Mukhopadhyay

سالیسیلیک، جیبرلین و کیتوزان درصد جوانه‌زنی، میانگین جوانه‌زنی روزانه، ضریب جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن خشک و تر گیاهچه، فعالیت آنزیم آمیلاز و ملات سنتاز را تحت شرایط تنش در گیاهان مختلف افزایش می‌دهد.

هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر پیش تیمار بر خصوصیات جوانه‌زنی و فعالیت برخی آنزیم‌های هیدرولیتیک و چرخه گلی‌اکسیلات در گیاهچه همیشه بهار تحت تنش شوری جهت تعدیل اثرات سوء ناشی از تنش شوری بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار سطح شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) و چهار سطح پیش تیمار (شاهد (آب مقطر)، جیبرلین (۲۰ میلی گرم در لیتر)، اسید سالیسیلیک (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) و کیتوزان (۰/۸ درصد وزنی-حجمی)) در سه تکرار ۲۵ بذری در دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۴۰۲ انجام شد. بذری گواهی شده همیشه بهار رقم جیتانا (Gitana) تولید ۱۴۰۱ بود که از شرکت پاکان بذری اصفهان تهیه شده بود. ابتدا بذرها درون محلول‌های پیش تیمار و آب مقطر به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس غوطه‌ور شدند. بعد از پیش تیمار، بذرها به وسیله آب مقطر شستشو و در دمای آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت خشک گردیدند. آزمون جوانه‌زنی به روش پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ روز انجام گرفت (ایستا^۸، ۲۰۱۳). در این مرحله از آزمون، شمارش بذرها یک روز پس از انتقال بذرها به محیط کشت آغاز شد و تا ثابت شدن جوانه‌زنی (۱۲ روز) پس از کاشت ادامه یافت. سپس، شاخص‌های رشد و صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شدند.

درصد جوانه‌زنی: در پایان دوره جوانه‌زنی

(۱۲ روز) تعداد کل بذرها جوانه زده شمارش و درصد آن به کل بذری محاسبه گردید.

کیتوزان یک ترکیب فعال زیستی حاصل از گیاهان و سخت پوستان دریایی مانند پوسته خرچنگ و میگوهای زنده است. در سال‌های اخیر، به دلیل خاصیت غیر سمی و زیست تخریب پذیر آن به طور گسترده در کشاورزی برای بهبود کیفیت محصول و سازگاری با تنش مورد استفاده قرار گرفته است (کوچی‌اکا و لیبراک^۱، ۲۰۲۱). کیتوزان واکنش‌های فیزیولوژیکی را افزایش داده و اثرات منفی تنش‌های غیرزیستی را توسط پیام‌رسان‌های ثانویه از طریق سازوکار انتقال تنش کاهش می‌دهد. تولید قندها، اسیدهای آلی، اسیدهای آمینه و سایر متابولیت‌های مورد نیاز برای سازگاری مرتبط با تنش اسمزی، سیگنال‌دهی تنش و متابولیسم انرژی به همراه خواهد داشت (هیدانگ‌مایوم^۲ و همکاران، ۲۰۱۹). این ماده به عنوان یک پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد یا ویژگی‌های محافظ DNA عمل می‌کند و ساختار آن، که دارای تعداد زیادی گروه هیدروکسیل و آمینو برای واکنش با گونه‌های فعال اکسیژن است، ممکن است به سازوکار مهار کیتوزان مرتبط باشد (سالاخنا و زوادزینسکا^۳، ۲۰۱۴). کیتوزان همچنین باعث سنتز هورمون گیاهی درون‌زا می‌شود (یوتایراتاناکج^۴ و همکاران، ۲۰۰۷). گزارش‌ها نشان داده است که پیش تیمار با نیترات پتاسیم درصد جوانه‌زنی، ضریب جوانه‌زنی، میانگین جوانه‌زنی و اکثر شاخص‌های جوانه‌زنی را در گیاه همیشه بهار افزایش داد (جمالی^۵، ۲۰۲۳). همچنین، پژوهش‌های دیگر نیز اثرات مثبت روش‌های مختلف پیش تیمار را بر گیاه همیشه بهار تحت تنش نشان داده است. به عنوان مثال، بیگم حسینی^۶ و همکاران (۲۰۱۳) گزارش داد که پیش تیمار بذری با کیتوزان ویژگی‌های جوانه‌زنی، گیاه همیشه بهار را تحت تنش افزایش می‌دهد. علاوه بر این، سعادت^۷ و همکاران (۲۰۲۳e). نشان داد که پیش تیمار با اسید

¹Kociecka and Liberacki

²Hidangmayum

³Salachna and Zawadzińska

⁴Uthairatanakij

⁵Jamali

⁶Begum Hosseini

⁷Saadat

⁸ISTA

شد.

سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز: در این آزمایش فعالیت آنزیم پروتئاز به روش (هولوردا و روقرس)^۶ (۱۹۹۲) اندازه‌گیری شد. این آنزیم که از نوع اندوپروتئاز است، بر مبنای واکنش با آزوکارژین قابل اندازه‌گیری است و میزان جذب روشناور در طول موج ۳۶۶ نانومتر ثبت شد. به این منظور، عصاره پروتئینی استخراج شده با بریج، استات سدیم و آزوکارژین مخلوط و پس از ۵ ساعت به‌منظور توقف واکنش TCA به محیط اضافه شد. پس از سانتیفریوژ در ۱۳۰۰ دور، از روشناور حاصل میزان جذب ثبت گردید.

سنجش فعالیت آنزیم مالات سنتاز: فعالیت این آنزیم طبق روش اصلاح شده (کوپر و بیورس)^۷ (۱۹۶۹) اندازه‌گیری شد. میزان جذب در ۱ میلی‌لیتر از مخلوط مورد آزمایش که شامل بافر فسفات (pH=۶/۵)، ۱۰۰ میلی‌مولار استیل کوآنزیم A، ۰/۵ میلی‌مولار سدیم گلی‌اکسیلات، ۳ میلی‌مولار کلرید منیزیم و ۱۰۰ میلی‌مولار nitrobenzoic acid (DTNB) -2,5'-dithiobis بود در طول موج ۴۱۲ نانومتر به مدت ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری شد. در واقع واکنش با افزایش گلی‌اکسیلات در دمای ۳۵ درجه سلسیوس آغاز شد.

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار 9.1 SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. برای رسم شکل‌ها از نرم افزار Excel 2018 استفاده شد.

نتایج و بحث

درصد جوانه‌زنی و میانگین جوانه‌زنی روزانه:

اثر پیش‌ تیمار و شوری بر درصد جوانه‌زنی و میانگین جوانه‌زنی روزانه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی (۸۸/۸۳ درصد) و میانگین جوانه‌زنی روزانه (۷/۴۰۳) در پیش‌ تیمار با کیتوزان مشاهده شد.

میانگین جوانه‌زنی روزانه: جهت محاسبه

میانگین جوانه‌زنی روزانه از رابطه ۱ استفاده گردید (هوگنبوم و پیترسون)^۱ (۱۹۸۷).

$$\text{MDG}^2 = \text{PG/Tx} \quad \text{رابطه ۱:}$$

GP: درصد جوانه‌زنی Tx: تعداد روزهای آزمایش (طول دوره اجرای آزمایش)

ضریب جوانه‌زنی: جهت محاسبه ضریب

جوانه‌زنی از رابطه ۲ استفاده گردید (فتحی امیرخیز)^۳ و همکاران، (۲۰۱۲).

$$\text{GC}^4 = 1/\text{MGT} \times 100 \quad \text{رابطه ۲:}$$

$$1/\text{MGT} \times 100$$

MGT: میانگین مدت جوانه‌زنی

طول ریشه‌چه و ساقه‌چه: طول ریشه‌چه و

ساقه‌چه به‌وسیله‌ی خط‌کش مدرج بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد.

وزن تر و خشک گیاهچه: وزن تر و خشک

گیاهچه بر روی ترازوی دیجیتالی و با دقت یک هزارم اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز: چهار روز

پس از کاشت بذر در پتری و مطابق روش (دومان)^۵ و همکاران، (۱۹۸۲) فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز اندازه‌گیری شد. بذرها در بافر فسفات ۶۰ میلی‌مولار (pH=۶/۸) هموژنیزه و سپس در ۱۲۰۰۰g و به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ شدند. فعالیت آنزیم در محیط واکنش که حاوی ۶۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH= ۶/۸)، ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کلرید کلسیم و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشاسته بود، مشخص شد. عصاره آنزیم (یک میلی‌لیتر) پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در حمام آب گرم به محیط آزمایش اضافه شد. فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با استفاده از نشاسته و با طول موج ۶۲۰ نانومتر به صورت میکروگرم نشاسته و گرم بر دقیقه مواد تازه با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مشخص

¹Hoogenboom and Peterson

²Mean daily germination

³Fathi Amirkhiz

⁴Germination coefficient

⁵Doman

⁶Holwerda and Rogers

⁷Cooper and Beevers

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر پیش تیمار و شوری روی صفات مورد مطالعه در گیاهچه همیشه بهار

Table 1. Analysis of variance for the effect of pretreatment and salinity on studied traits in marigold seedling

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی D. F.	میانگین مربعات Mean squares			
			درصد جوانه‌زنی Germination percentage	میانگین جوانه‌زنی روزانه Mean daily germination	ضریب جوانه‌زنی Germination coefficient	طول ریشه‌چه Seedling length
Pretreatment (P)	پیش تیمار	3	5.729**	5.729**	18127.35**	9.751 **
Salinity (S)	شوری	3	5.157**	5.157**	10853.63**	9.043**
P×S	پیش تیمار و شوری	9	0.175 ^{ns}	0.175 ^{ns}	428.17*	0.089 ^{ns}
Error	خطا	48	0.141	0.141	197.07	0.178
CV (%)	ضریب تغییرات (درصد)		5.655	5.655	10.279	7.315

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

ns, * and ** indicating not significant, the significant differences at 5 and 1 percent probability levels.

ادامه جدول ۱.

Table 1. Continued

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی D. F.	میانگین مربعات Mean squares			
			وزن تر گیاهچه Seedling fresh weight	وزن خشک گیاهچه Seedling dry weight	آلفا آمیلاز Alpha amylase	پروتئاز Protease
Priming (P)	پیش تیمار	3	873.687**	415.66**	13.923**	275.461**
Salinity (S)	شوری	3	858.926**	558.08**	3.8437**	21.025**
P×S	پیش تیمار و شوری	9	32.550*	5.39 ^{ns}	0.343**	0.977*
Error	خطا	48	15.218	17.15	0.109	0.433
CV (%)	ضریب تغییرات (درصد)		4.045	8.506	16.195	2.597

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

ns, * and ** indicating not significant, the significant differences at 5 and 1 percent probability levels.

میتوکندری جوانه‌زنی را در بذور تسریع می‌کند (شیوانکار^۱ و همکاران، ۲۰۰۳). در این تحقیق، افزایش آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز طی پرایمینگ تحت تنش شوری سبب افزایش درصد جوانه‌زنی شد. با افزایش تنش شوری ذخایر جذب شده در جنین بذرها کاهش می‌یابد (مینا و یداو^۲، ۲۰۱۸). کاهش پتانسیل اسمزی، تخریب مراحل متابولیک جوانه‌زنی و افزایش ترکیبات فنولی طی تنش شوری جوانه‌زنی را کاهش می‌دهد، افزایش این ترکیبات منجر به کاهش

البته سطوح اسید سالیسیلیک و جیبرلین نیز در درصد جوانه‌زنی و میانگین جوانه‌زنی روزانه موثر بود (جدول ۲). با افزایش شوری، درصد جوانه‌زنی و میانگین جوانه‌زنی روزانه کاهش یافت. به‌طوری که، بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی (۸۸/۹۲ درصد) و میانگین جوانه‌زنی روزانه (۷/۴۱) در شاهد (شوری صفر) و کم‌ترین آن‌ها به ترتیب ۷۰/۲۵ درصد و ۵/۸۵ در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار به‌دست آمد (جدول ۲).

پیش تیمار با افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیز کننده مانند آمیلاز، افزایش مقدار ATP، افزایش سنتز DNA، RNA و افزایش و ارتقاء عملکرد

¹Shivankar²Meena and Yadav

جدول ۲. مقایسه میانگین تأثیر پیش‌تیمار و شوری برای صفات مطالعه شده در همیشه بهار

Table 2. Mean comparison for the effect of pretreatment and salinity for studied traits in marigold

تیمارها Treatments	درصد جوانه‌زنی Germination (%)	میانگین جوانه‌زنی روزانه Mean daily germination	طول ساقه‌چه Pedicel length (cm)	وزن خشک گیاهچه Seedling dry weight (mg)
شاهد (آب مقطر) Control (distilled water)	69.42 ^d	5.78 ^d	4.93 ^c	41.71 ^d
اسیدسالیسیلیک Salicylic acid	77.58 ^c	6.46 ^c	5.12 ^c	46.43 ^c
جیبرلین Gibberellin	83.25 ^b	6.94 ^b	6.08 ^b	51.39 ^b
کیتوزان Chitosan	88.83 ^a	7.40 ^a	6.87 ^a	55.23 ^a
شوری (میلی‌مولار) Salinity (Mm)				
0	88.92 ^a	7.41 ^a	6.66 ^a	55.88 ^a
50	82.33 ^b	6.86 ^b	6.17 ^b	51.89 ^b
100	77.58 ^c	6.46 ^c	5.49 ^c	46.92 ^c
150	70.25 ^d	5.85 ^d	4.66 ^d	40.07 ^d

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون دانکن است.

The different letters in each column indicate a significant difference at 5% probability level based on Duncan test..

خروج ریشه‌چه را تسریع کرده و موجب افزایش درصد جوانه‌زنی می‌شود (عبداللهی‌پور و حقیقی^۶، ۲۰۱۹). طبق تحقیقات پیشین، پیش‌تیمار درصد جوانه‌زنی در گل همیشه بهار را افزایش داده و باعث بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی تحت تنش می‌شود (سندو و سهروات^۷، ۲۰۱۹؛ اکبری^۸ و همکاران، ۲۰۱۹؛ هلالی سلطان احمدی^۹، ۲۰۲۱؛ باقری^{۱۰} و همکاران، ۲۰۲۲).

میانگین جوانه‌زنی روزانه در طول پیش‌تیمار با کاربرد اسیدسالیسیلیک، جیبرلین و به‌ویژه کیتوزان نسبت به شاهد افزایش یافت. این صفت از نسبت درصد جوانه‌زنی به طول دوره اجرای آزمایش به‌دست می‌آید. بنابراین افزایش درصد جوانه‌زنی طی سطوح مختلف پیش‌تیمار منجر به افزایش میانگین جوانه‌زنی روزانه خواهد شد. در واقع، میانگین جوانه‌زنی روزانه مدت زمان لازم برای جوانه‌زنی بذر را نشان می‌دهد. با افزایش سرعت جوانه‌زنی روزانه، میانگین جوانه‌زنی

جذب آب در طول مرحله آبنوشی شده و در نتیجه درصد جوانه‌زنی کاهش می‌یابد (فاضلی‌نسب^۱ و همکاران، ۲۰۲۳؛ رجبی‌دهنوی^۲ و همکاران، ۲۰۲۰). در واقع، افزایش یون‌های سدیم و کلر طی تنش شوری، موجب ایجاد سمیت یونی (کایا^۳ و همکاران، ۲۰۰۶) و اختلال در سوخت و ساز عنصرهای غذایی شده و در نهایت بر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه تأثیر سوء گذاشته و منجر به کاهش درصد جوانه‌زنی می‌شود (ژو^۴ و همکاران، ۲۰۱۰). کاهش درصد جوانه‌زنی در اثر تنش شوری در مطالعات سعادت و همکاران (۲۰۲۳c) بر روی لوبیا و سعادت و همکاران (۲۰۲۳d) در گیاه برنج نیز گزارش شده است. پیش‌تیمار بذر با پلی اتیلن گلیکول با افزایش فعالیت‌های تنفسی، تولید ATP، تحریک فعالیت RNA و سنتز پروتئین موجب افزایش جوانه‌زنی می‌شود (چوژنوووسکی و کوما^۵، ۱۹۹۷). پیش‌تیمار از طریق نرم کردن پوسته بذر در شرایط تنش شوری

⁶Abdolahipour and Haghighi

⁷Sindhu and Sehrawat

⁸Akbari

⁹Helali Sultan ahmadi

¹⁰Bagheri

¹Fazeli-Nasab

²Rajabi Dehnavi

³Kaya

⁴Zhou

⁵Chojnowski and Come

روزانه و به تبع آن درصد جوانه‌زنی کاهش می‌یابد (سعادت و همکاران، ۲۰۲۳e).

ضریب جوانه‌زنی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر پیش تیمار و شوری در سطح احتمال یک درصد و برهم‌کنش آن‌ها روی ضریب جوانه‌زنی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیش‌ترین ضریب جوانه‌زنی (۲۳۲/۶۷) از تیمار با کیتوزان ۰/۸ درصد و بدون شوری و کم‌ترین ضریب جوانه‌زنی (۵۷/۳۳) در شاهد (آب مقطر) با شوری ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۱A). البته کاربرد اسیدسالیسیلیک و جیبرلین نیز ضریب جوانه‌زنی را نسبت به شاهد تحت تنش افزایش داد. ضریب جوانه‌زنی عکس میانگین مدت جوانه‌زنی است. پس کاهش میانگین مدت جوانه‌زنی طی پیش تیمار منجر به افزایش ضریب جوانه‌زنی خواهد شد. نتایج این تحقیق با نتایج سعادت و همکاران (۲۰۲۳e) در راستای افزایش ضریب جوانه‌زنی تحت شرایط تنش شوری طی پیش تیمار در گیاه لوبیا مطابقت دارد. این صفت درصد جوانه‌زنی بالا را نشان می‌دهد (باقری، ۲۰۱۴).

طول ریشه‌چه و ساقه‌چه: اثر پیش تیمار و شوری روی طول ساقه‌چه و برهم‌کنش پیش تیمار و شوری نیز روی طول ریشه‌چه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). کاربرد کیتوزان، اسید سالیسیلیک و جیبرلین توانست طول ریشه‌چه و ساقه‌چه را افزایش دهد. اما تاثیر کیتوزان بیشتر از اسید سالیسیلیک و جیبرلین بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیش‌ترین طول ساقه‌چه (۶/۸۷ سانتی‌متر) و کم‌ترین آن (۴/۹۳ سانتی‌متر) در پیش تیمار با کیتوزان مشاهده شد. شوری این صفت را کاهش داد، به‌طوری‌که کم‌ترین طول ساقه‌چه (۴/۶۶ سانتی‌متر) در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (جدول ۲). همچنین، نتایج مقایسه میانگین روی طول ریشه‌چه هم نشان داد که بیش‌ترین طول ریشه‌چه (۷/۵۸ سانتی‌متر) از تیمار با کیتوزان ۰/۸ درصد و بدون شوری و کم‌ترین آن (۲/۴۴ سانتی‌متر) در شاهد (آب مقطر) با شوری ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۱B). تنش شوری با کاهش پتانسیل

اسمزی در محیط ریشه‌چه، رشد گیاهچه را کاهش می‌دهد در حالی که رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد، این امر منجر به پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، مانند آسیب غشای سلولی، پراکسیداسیون لیپیدی، کاتابولیسم پروتئین، تخریب اسید نوکلئیک می‌شود (جیانگ^۱ و همکاران، ۲۰۱۷). این پاسخ‌ها به میزان سمیت یونی، تغییرات ظرفیت اسمزی، مدت زمان تنش و نوع گیاه بستگی دارد (میورا و فوروموتا^۲، ۲۰۱۳).

کاهش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه تحت تنش شوری می‌تواند به کاهش اندازه سلول یا اختلال در فعالیت میتوزی نسبت داده شود. دلیل اصلی کاهش رشد، کمبود مواد معدنی ناشی از افزایش یون‌های سدیم در محیط اطراف ریشه‌چه است (خان^۳ و همکاران، ۲۰۰۶). شوری با تاخیر انداختن جوانه‌زنی و سمیت یون‌های کلر و سدیم و اثرات اسمزی طول ریشه‌چه و ساقه‌چه را کاهش می‌دهد (جمیل^۴ و همکاران، ۲۰۰۶). در مطالعه حاضر، روش‌های پیش تیمار به‌طور قابل توجهی جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه را در بذر گل همیشه بهار در مقایسه با بذر غیر پراریم شده افزایش داد. اما اثر پیش تیمار با کیتوزان در هماهنگ‌سازی جوانه‌زنی بارزتر بود، همان‌طور که توسط اسید سالیسیلیک و جیبرلین نسبت به کیتوزان پایین‌تر نشان داده شده است. پیش تیمار، رهاسازی کربوهیدرات‌های محلول در بذر را افزایش داده و با استفاده از ذخایر بذر از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های ساکارز سنتتاز و گلوتامین سنتتاز، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه را افزایش می‌دهد (کائور^۵ و همکاران، ۲۰۰۲). در واقع، افزایش طول گیاهچه طی پیش تیمار به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در جوانه‌زنی است و افزایش میزان مواد ذخیره‌ای بذر و طول شدن گیاهچه بر اثر افزایش انرژی در بذرهای پراریم شده ارتباط دارد (کائور و همکاران، ۲۰۰۶). گزارش شده است که

¹Jiang

²Miura and Furumoto

³Khan

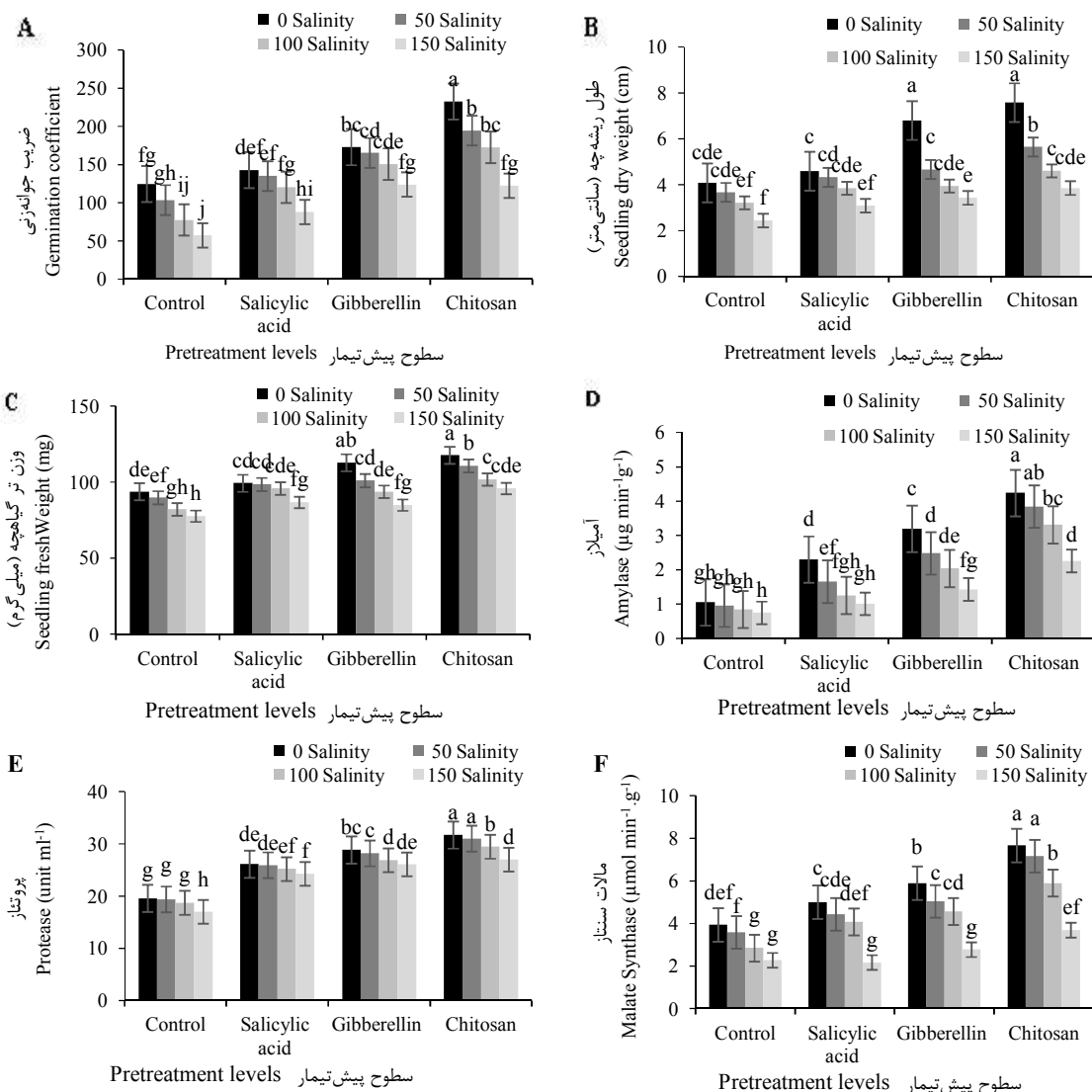
⁴Jamil

⁵Kaur

برهم‌کنش آن‌ها تنها روی وزن تر گیاهچه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیش‌ترین وزن خشک گیاهچه (۵۵/۲۳ میلی‌گرم) و کم‌ترین آن (۴۱/۷۱ میلی‌گرم) به‌ترتیب در پیش‌ تیمار با کیتوزان و آب مقطر مشاهده شد. البته تیمار با اسید سالیسیلیک و جیبرلین نیز توانست وزن خشک گیاهچه را افزایش دهد. اما تاثیر کیتوزان بیش‌تر از آن‌ها بود (جدول ۲).

پیش‌ تیمار طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در گیاه همیشه بهار را افزایش می‌دهد (هلالی سلطان احمدی، ۲۰۲۱؛ باقری و همکاران، ۲۰۲۲). نتایج آزمایشی نشان داد که پیش‌ تیمار تحت تنش شوری طول ریشه‌چه و ساقه‌چه را در گیاه برنج و لوبیا نیز افزایش داد (سعادت و همکاران، ۲۰۲۳d؛ ۲۰۲۳e).

وزن تر و خشک گیاهچه: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر پیش‌ تیمار و شوری روی وزن تر و خشک گیاهچه در سطح احتمال یک درصد و



شکل ۱. مقایسه میانگین برهم‌کنش پیش‌ تیمار و شوری برای ضریب جوانه‌زنی (A)، طول ریشه‌چه (B)، وزن تر گیاهچه (C)، آمیلاز (D)، پروتئاز (E) و ملات سنتاز (F) در همیشه بهار. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

Fig. 1. Mean comparison of the interaction of pretreatment and salinity for germination coefficient (A), seedling dry weight (B), seedling fresh weight (C), amylase (D) and malate synthase (E) in marigold; The different letters indicate significant differences at 5% probability level based on Duncan test.

شوری این صفت را کاهش داد، به‌طوری‌که بیش‌ترین وزن خشک گیاهچه (۵۵/۸۸ میلی‌گرم) و کم‌ترین آن (۴۰/۰۷ میلی‌گرم) به ترتیب در شوری صفر و ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (جدول ۲). طبق نتایج مقایسه میانگین، بیش‌ترین وزن تر گیاهچه (۱۱۷/۷۷ میلی‌گرم) از تیمار با کیتوزان ۰/۸ درصد و بدون شوری و کم‌ترین آن (۷۷/۳ میلی‌گرم) در شاهد (آب مقطر) با شوری ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۱C). البته سطوح اسید سالیسیلیک و جیبرلین نیز در وزن تر گیاهچه موثر بود. از دلایل کاهش وزن خشک گیاهچه در سطوح مختلف شوری به‌خصوص شوری ۱۵۰ میلی‌مولار عدم تعادل یون‌های سدیم و کلر و تنش اسمزی است (الکرکی^۱، ۲۰۰۰). در واقع، اختلال تنش شوری به دلیل تغییرات در جذب آب ناشی از رسوب نمک زیاد در فضاهای بین سلولی است (ژنگ^۲ و همکاران، ۲۰۰۶). کاهش تحرک مواد غذایی و انتقال آن‌ها از لپه‌ها به محور روپان موجب کاهش وزن خشک ساقچه می‌شود (یادگاری^۳، ۲۰۱۷). همچنین، کاهش وزن گیاهچه می‌تواند به دلیل هزینه انرژی متابولیک مربوط به سازگاری به شرایط تنش باشد (ژو و همکاران، ۲۰۱۰). شوری، با تحمیل تنش اسمزی بر گیاهچه، باعث کاهش جذب آب و آسیب به سامانه ریشه‌چه می‌شود و با تجمع یون‌های سمی و کاهش جذب عناصر غذایی موجب اختلال در متابولیسم گیاه و در نتیجه کاهش وزن خشک گیاهچه می‌شود (حقیقی^۴ و همکاران، ۲۰۲۳). افزایش سنتر آنزیم‌های هیدرولیکی، افزایش میزان پویایی ذخایر بذر و افزایش راندمان تبدیل ذخایر پویا در طی پیش تیمار با اسید سالیسیلیک، جیبرلین و به‌خصوص کیتوزان موجب افزایش وزن خشک گیاهچه می‌شود (سیوریتیپ^۵ و همکاران، ۲۰۰۳). پیش تیمار با فعال سازی فعالیت‌های متابولیکی جنین، نظیر سنتر DNA، تحریک فعالیت RNA، سنتر پروتئین، ترمیم غشای سلولی و تولید هورمون‌های تحریک

کننده جوانه‌زنی، وزن خشک گیاهچه را افزایش می‌دهد (چوژنووسکی و کوما، ۱۹۹۷). سعادت و همکاران (۲۰۲۳e: ۲۰۲۳d) در گیاهچه برنج و لوبیا افزایش وزن خشک گیاهچه را طی پیش تیمار تحت شوری گزارش نمودند. جذب غیرعادی یون توسط گیاهچه به علت وجود سمیت یونی ناشی از تنش شوری و در پی آن اختلال بروز متابولیکی در گیاهچه باعث کاهش وزن تر گیاهچه می‌شود (کریمی^۶ و همکاران، ۲۰۰۴). این تحقیق نشان داد که غلظت بالای شوری باعث کاهش وزن تر گیاهچه شد، زیرا تنش شوری پتانسیل آب را از طریق عدم تعادل یونی و سمیت سلولی کاهش می‌دهد. تحقیقات نشان داده است که پیش تیمار بذرها وزن تر گیاهچه را در گیاه همیشه بهار افزایش می‌دهد (هلالی سلطان احمدی و همکاران، ۲۰۱۸). پیش تیمار بر رشد محور جنین و نمو گیاهچه تأثیر گذاشته و سبب افزایش هدایت الکتریکی می‌شود و با تحت تأثیر قراردادن فرآیندهای فیزیولوژیک و متابولیکی گیاهچه، جذب آب و وزن تر گیاهچه را افزایش می‌دهد (بصرا^۷ و همکاران، ۲۰۰۶). سعادت و همکاران (۲۰۲۳d؛ ۲۰۲۳e) در گیاهچه برنج و لوبیا افزایش وزن تر گیاهچه طی پیش تیمار تحت تنش شوری را گزارش نمودند.

فعالیت آنزیم آمیلاز: در این تحقیق، اثر ساده پیش تیمار و شوری و برهم کنش آن‌ها بر فعالیت آنزیم آمیلاز در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۱). پیش تیمار با اسید سالیسیلیک و جیبرلین توانست روی آمیلاز تأثیر بگذارد، اما تأثیر کیتوزان بیشتر از اسید سالیسیلیک و جیبرلین بود. به‌طوری‌که بیش‌ترین فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز (۴/۲۴ میکروگرم در گرم بر دقیقه) از تیمار با کیتوزان ۰/۸ درصد و بدون شوری و کم‌ترین آن (۰/۷۵ میکروگرم در گرم بر دقیقه) در شاهد (آب مقطر) با شوری ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده گردید (شکل ۱D). آنزیم‌هایی مانند آمیلاز نقش زیادی در رشد و نمو اولیه جنین دارند. هر افزایش در فعالیت

¹Al-Karaki²Zhang³Yadegari⁴Haghighi⁵Sivritepe⁶Karimi⁷Basra

واحد بر میلی‌لیتر) از تیمار با کیتوزان ۰/۸ درصد و بدون شوری و کم‌ترین آن (۴/۰۵ واحد بر میلی‌لیتر) در شاهد (آب مقطر) با شوری ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده گردید (شکل ۱E).

پروتئاز جز آنزیم‌های هیدرولیتیک است و کاهش آن طی تنش باعث اختلال در متابولیسم مواد ذخیره‌ای از جمله پروتئین شده و جوانه‌زنی را کاهش می‌دهد (جوب^۸ و همکاران، ۲۰۰۵). پیش‌تیمار با تحریک ساخت آنزیم‌های هیدرولیزکننده از قبیل آمیلاز و پروتئاز، آزادسازی گلوکز در بذر را افزایش داده و انرژی لازم برای افزایش طول گیاهچه را فراهم می‌کند (عبدلی^۹، ۲۰۲۰). علاوه بر این پیش‌تیمار با افزایش تعداد و فعالیت میتوکندری‌ها در سلول باعث افزایش انرژی در سلول می‌شود (کورک^{۱۰} و همکاران، ۲۰۱۹).

فعالیت آنزیم مالات سنتاز: تجزیه واریانس جدول ۱ نشان داد، که اثر پیش‌تیمار و شوری و برهم‌کنش آن‌ها بر فعالیت آنزیم مالات سنتاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. البته پیش‌تیمار با اسید سالیسیلیک و جیبرلین نیز روی فعالیت آنزیم مالات سنتاز تاثیر داشت. اما تاثیر کیتوزان بیشتر از آن‌ها بود. به‌طوری‌که بیش‌ترین فعالیت آنزیم مالات سنتاز ۱۷/۱۷ میکرومول بر گرم در دقیقه) از تیمار با کیتوزان ۰/۸ درصد و بدون شوری و کم‌ترین آن ۷/۲۷ میکرومول در گرم بر دقیقه) در شاهد (آب مقطر) با شوری ۱۵۰ میلی‌مولار مشاهده گردید (شکل ۱F).

چرخه گلی‌اکسیلات در گلی‌اکسی‌زوم‌ها در طول جوانه‌زنی بذر و رشد اولیه گیاهچه قبل از فتوسنتز اتفاق می‌افتد و لیپیدها را به کربوهیدرات‌های ساختاری تبدیل می‌کند. گلی‌اکسی‌زوم‌ها پس از استقرار فتوسنتز ناپدید می‌شوند. فعالیت چرخه در بذرهایی که ذخیره چربی بیش‌تری دارند بیش‌تر است (ایستموند و گراهام^{۱۱}، ۲۰۰۱). بذر گل همیشه بهار دارای تقریباً ۲۰ درصد لیپید است که آن را برای

این آنزیم منجر به رشد اولیه سریع‌تر گیاهچه می‌شود. آنزیم آمیلاز جهت فراهم‌سازی انرژی مورد نیاز برای جوانه‌زنی مهم است (تایز^۱ و همکاران، ۲۰۱۵). در این آزمایش با افزایش سطوح شوری، فعالیت آنزیم آمیلاز نیز کاسته شد که احتمالاً دلیل آن اختلال در مسیر بیوسنتز جیبرلین است. به‌طوری‌که در بذرهایی پریم شده با کیتوزان میزان فعالیت آن افزایش یافت. این نقش مهم پیش‌تیمار را در القای سنتز از ابتدا یا افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و در نتیجه تولید متابولیت‌های جوانه‌زنی در مقادیر لازم را تایید می‌کند (سونگ و چانگ^۲ ۱۹۹۳: لی و کیم^۳ ۲۰۰۰). کاهش فعالیت آنزیم آمیلاز طی تنش شوری باعث کاهش تحرک ذخایر بذر می‌شود (مک‌دونالد^۴، ۱۹۹۹). در طول پیش‌تیمار فعال‌سازی آلفا آمیلاز در جنین اتفاق می‌افتد (واریر^۵ و همکاران، ۲۰۱۰)، در نتیجه مواد ذخیره‌ای به ساکارز و گلوکز تبدیل شده و با انتقال به جنین باعث رشد جنین شده و جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را افزایش می‌دهد (پاررا و کنتلیف^۶، ۱۹۹۴). افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز در بذرهایی پریم شده تحت تنش در مطالعات سعادت و همکاران (۲۰۲۳d) روی برنج و سعادت و همکاران، (۲۰۲۳b) روی ذرت نیز گزارش شده است. پیش‌تیمار فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک از جمله آلفا آمیلاز در گیاه همیشه بهار افزایش می‌دهد (افضل^۷ و همکاران، ۲۰۱۷).

فعالیت آنزیم پروتئاز: در این تحقیق، اثر پیش‌تیمار و شوری بر فعالیت آنزیم پروتئاز در سطح احتمال یک درصد و برهم‌کنش آن‌ها بر روی این صفت در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). پیش‌تیمار با اسید سالیسیلیک و جیبرلین توانست فعالیت آنزیم پروتئاز را افزایش دهد. اما تاثیر کیتوزان بیشتر از اسید سالیسیلیک و جیبرلین بود. به‌طوری‌که بیش‌ترین فعالیت آنزیم پروتئاز ۱۵/۲۱

¹Taiz

²Sung and Chang

³Lee and Kim

⁴McDonald

⁵Varier

⁶Parera and Cantliffe

⁷Afzal

⁸Job

⁹Abdoli

¹⁰Kurek

¹¹Eastmond and Graham

مطالعه فعالیت چرخه گلی اکسیلات مناسب می‌کند. مالات سنتاز منحصر به چرخه‌ی گلی اکسیلات بوده که از مراحل دکربوکسیلاسیون چرخه‌ی کربس اجتناب می‌کند (صدقی^۱ و همکاران، ۲۰۱۱). طی این این چرخه بذرها از لیپیدها در طول جوانه‌زنی به عنوان یک منبع انرژی استفاده می‌کنند (برگ^۲ و همکاران، ۲۰۰۲). مالات سنتاز هم در این تحقیق طی شوری کاهش یافت، که این امر کاهش تبدیل لیپید به قند را نشان می‌دهد و در نتیجه لیپیدهای موجود به عنوان پیش ماده در واکنش‌های پراکسیداسیون استفاده می‌شوند. در واقع، در طول رشد بین تجزیه چربی و ظهور آنزیم مالات سنتاز یک رابطه قوی وجود دارد (ایستموند و گراهام، ۲۰۰۱). در این تحقیق، پیش تیمار با اسید سالیسیلیک، جیبرلین و به‌ویژه کیتوزان باعث افزایش این آنزیم چرخه گلی اکسیلات شد. در مطالعه‌ای سعادت و همکاران (۲۰۲۳b) روی ذرت گزارش شد که مالات سنتاز طی پیش تیمار و تحت تنش نسبت به شاهد افزایش یافت. نتایج یک مطالعه نشان داد که مالات سنتاز تحت تنش طی پیش تیمار در گیاه همیشه بهار افزایش می‌یابد (صدقی، ۲۰۱۳).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش تنش شوری تمام شاخص‌های جوانه‌زنی بذر همیشه بهار به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. تیمار با اسید سالیسیلیک و جیبرلین، شاخص‌های جوانه‌زنی را تحت تنش شوری در همیشه بهار افزایش داد، اما تأثیر پیش تیمار با کیتوزان بیشتر بود. همچنین، اعمال پیش تیمار با اسید سالیسیلیک و جیبرلین به‌ویژه پیش تیمار با کیتوزان فعالیت آنزیم آمیلاز، پروتئاز و مالات سنتاز در بذرها تحت تنش شوری همیشه بهار بهبود بخشید. در نهایت، پیش تیمار بذر با کیتوزان می‌تواند راهکاری مناسب برای تعدیل اثر شوری در گیاه همیشه بهار باشد.

¹Sedghi

²Berg

- Abdolahipour, B. and Haghighi, M. 2019. The effect of pine wood vinegar on germination, growth and physiological characteristics, and uptake of elements in Basil. Journal of Science and Technology Greenhouse Culture, 10(2): 11-24. [In Persian] <https://doi.org/10.29252/ejgcst.10.2.11>
- Abdoli, M. 2020. Effect of aging of seed and hydro-priming on germination characteristics and activity of some antioxidant enzymes of hybrid corn (*Zea mays* L.). Iranian Journal of Seed Science and Research, 7(2): 147-159. [In Persian] <https://doi.org/10.22124/jms.2020.4543>
- Afzal, I., Rahim, A., Qasim, M., Younis, A., Nawaz, A. and Bakhtavar, M.A. 2017. Inducing salt tolerance in french marigold (*Tagetes patula*) through seed priming. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, 16(3): 109-118. <https://doi.org/10.24326/asphc.2017.3.11>
- Ahanger, M.A., Aziz, U., Alsahli, A.A., Alyemeni, M.N. and Ahmad, P. 2020. Influence of exogenous salicylic acid and nitric oxide on growth, photosynthesis, and ascorbate glutathione cycle in salt stressed *Vigna angularis*. Biomolecules, 10(1): 42. <https://doi.org/10.3390/biom10010042>
- Akbari, M., Yadegari, M. and Hamed, B. 2019. Effect of priming on seed germination characteristics and fatty acids content in marigold (*Calendula officinalis* L.) seeds under UV stress and temperature. Iranian Journal of Seed Science and Research, 6(2): 203-214. [In Persian] <https://doi.org/10.22124/jms.2019.3600>
- Al-Karaki, G.N. 2000. Growth, water use efficiency, and sodium and potassium acquisition by tomato cultivars grown under salt stress. Journal of Plant Nutrition, 23: 1-8. <https://doi.org/10.1080/01904160009381992>
- Alkharabsheh, H.M., Seleiman, M.F., Hewedy, O.A., Battaglia, M.L., Jalal, R.S., Alhammad, B.A., Schillaci, C., Ali, N. and Al-Doss, A. 2021. Field crop responses and management strategies to mitigate soil salinity in modern agriculture. Agronomy, 11(11): 2299. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112299>
- Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A. and Hayat, S. 2020. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. Plant Physiology and Biochemistry, 156: 64-77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.042>
- Bagheri, A.R., Mondani, F., Geravandi, A. and Amiri, S. 2022. Evaluation of the effect of osmo and hydro priming on germination traits of polymorph seeds of Marigold compact petal variety (*Calendula officinalis* L.). Iranian Journal of Seed Science and Technology, 11(1): 1-14. [In Persian] <https://doi.org/10.22092/ijssst.2021.126923.1282>
- Bagheri, M.Z. 2014. The effect of maize priming on germination characteristics, catalase and peroxidase enzyme activity and total protein content under salt stress. International Journal Biosciences, 4(2): 104-112.
- Basra, A.S., Farooq, M., Afzal, I. and Hussain, M. 2006. Influence of osmopriming on the germination and early seedling growth of coarse and fine rice. International Journal of Agriculture Biology, 8: 19-21.
- Begum Hosseini, M., Taheri, Q., Vaezi Kakhki, M.R. and Salati, M. 2013. The effect of seed priming with chitosan on the germination characteristics of the medicinal plant (*Calendula officinalis*) under drought stress conditions, National conference on non-agent defense in the sector Agriculture, 29-30 Nov. 2013. Pishtaz Iranian Science Cooperative Company, Qeshm, Iran
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. 2002. Biochemistry. In: Freeman, W. H. (eds.). Biological Sciences. New York Publication. 1026p.
- Chen, X., Zhang, R., Xing, Y., Jiang, B., Li, B. and Xu, X. 2021. The efficacy of different seed priming agents for promoting sorghum germination under salt stress. PloS One, 16(1): e0245505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245505>

- Chojnowski, F.C. and Come, D. 1997. Physiological and biochemical changes induced in sunflower seeds by osmopriming and subsequent drying, storage and aging. *Seed Science Research*, 7: 323-331. <https://doi.org/10.1017/S096025850000372X>
- Cooper, T.G.D. and Beevers, H. 1969. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm: enzyme constituents and catalytic capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 244: 3507-3513. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83401-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83401-9)
- Doman, D.C., Walker, J.C., Trelease, R.N. and Moore, B.D. 1982. Metabolism of carbohydrate and lipid reserves in germinated cotton seeds. *Planta*, 155(6): 502-510. <https://doi.org/10.1007/BF01607574>
- Eastmond, P.J. and Graham, L.A. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in Plant Science*, 6(2): 72-77. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01835-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01835-5)
- Fathi Amirkhiz, K., Omid, H., Heshmati, S. and Jafarzadeh, L. 2012. Study of black cumin (*Nigella sativa* L.) germination attributes and seed vigor under salinity stress by osmopriming accelerators pretreatment. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 10(2): 299-310. [In Persian] <https://doi.org/10.22067/gsc.v10i2.16170>
- Fazeli-Nasab, B., Khajeh, H., Piri, R. and Moradian, Z. 2023. Effect of humic acid on germination characteristics of *Lallemantia royleana* and *Cyamopsis tetragonoloba* under salinity stress. *Iranian Journal of Seed Research*, 9(2): 51-62. [In Persian] <https://doi.org/10.61186/yujs.9.2.51>
- Haghighi, B., Karimi, M. and Moradi, H. 2023. Investigating the effect of humic acid on the morphological and physiological characteristics of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) under salt stress. *Plant Process and Function*, 12(57): 285-298. [In Persian]
- Helali soltanahmadi, F., Amerian, M.R., Ghiyasi, M. and Abbasdookht, H. 2018. Effects of seed priming on yield, yield components, and concentration of mineral phosphorus under drought stress in *Calendula officinalis* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 34(4): 565-578. [In Persian]
- Helali sultanahmadi, F. 2021. Studying the effect of priming on the induction of resistance to drought stress in the germination stage and the quantitative and qualitative yield of *Calendula officinalis* L. Ph.D. dissertation, Faculty of Agriculture, University of Shahrood, Iran. [In Persian]
- Hidangmayum, A., Dwivedi, B., Katiyar, D. and Hemantaranjan, A. 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(2): 313-326. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0633-1>
- Holwerda, B.C. and Rogers, J.C. 1992. Purification and characterization of aleurain. *Plant Physiology*, 99: 848-855. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.848>
- Hoogenboom, G. and Peterson, C.M. 1987. Shoot growth rate of soybean as affected by drought stress. *Agronomy Journal*, 79(4): 598-607. <https://doi.org/10.2134/agronj1987.00021962007900040004x>; <https://doi.org/10.2134/agronj1987.00021962007900040003x>
- ISTA. 2013. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, Switzerland: The International Seed Testing Association (ISTA).
- Jamali, A.R., Miano, T.F., Buledi, M.A. and Lashari, B.A. 2023. Effect of different nutrient applications on seed germination of African marigold (*Tagetes erecta* L.), *Journal of Horticultural Science and Technology*, 6(1): 1-6. <https://doi.org/10.46653/jhst2361001>
- Jamil, M., Lee, D.B., Jung, K.Y., Ashraf, M., Lee, S.C. and Rha, E.S. 2006. Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. *Journal of Central European Agriculture*, 7(2): 273-282.

- Jiang, C., Zu, C., Lu, D., Zheng, Q., Shen, J. and Wang, H. 2017. Effect of exogenous selenium supply on photosynthesis, Na⁺ accumulation and antioxidative capacity of maize (*Zea mays* L.) under salinity stress. Scientific Reports, 7: 42039. <https://doi.org/10.1038/srep42039>
- Job, D., Whalley, C. and Johnstone, S.M.L. 2005. Grey matter changes over time in high-risk subjects developing schizophrenia. Neuroimage, 25(4): 1023-1030. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.01.006>
- Johnson, R. and Puthur, J.T. 2021. Seed priming as a cost-effective technique for developing plants with cross tolerance to salinity stress. Plant physiology and biochemistry, 162: 247-257. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.034>
- Karimi, G., Heydari Sharifabad, H. and Osareh, M.H. 2004. Salinity effects on germination, seedling growth and proline content in pasture species *Atriplex verrucifera*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 12(4): 419-433. [In Persian]
- Kaur, S., Gupta, A. K. and Kaur, N. 2006. Effect of hydro and osmo priming of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds on anzymes of sucrose and nitrogen metabolism in nodules. Plant Growth Regulation, 49: 177-182. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-9103-9>
- Kaur, S., Gupta, A.K. and Kaur, N. 2002. Effect of osmo and hydro priming of chickpea seeds on seedling growth and carbohydrate metabolism under water deficit stress. Plant Growth Regulation, 37: 17-22.
- Kaya, M.D., Okçu, G., Atak, M., Cıkılı, Y. and Kolsarıcı, O. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). European Journal of Agronomy, 24(4): 291-295. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2005.08.001>
- Khalilzadeh, R., Seid Sharifi, R. and Pirzad, A. 2020. Mitigation of drought stress in pot marigold (*Calendula officinalis*) plant by foliar application of methanol. Journal of Plant Physiology and Breeding, 10(1): 71-84
- Khan, M., Shirazi, M., Ali, M., Mumtaz, S., Sherin, A. and Ashraf, M. 2006. Comparative performance of some wheat genotypes growing under saline water. Pakistan Journal of Botany, 38: 1633-1639.
- Kocięcka, J. and Liberacki, D. 2021. The potential of using chitosan on cereal crops in the face of climate change. Plants, 10: 1160. <https://doi.org/10.3390/plants10061160>
- Kurek, K., Plitta -Michalak, B. and Ratajczak, E. 2019. Reactive oxygen species as potential drivers of the seed aging process. Plants, 8: 193-174. <https://doi.org/10.3390/plants8060174>
- Lee S.S. and Kim J.H. 2000. Total sugars, α -amylase activity, and germination after priming of normal and aged rice seeds. Korean Journal of Crop Science, 45: 108-111.
- Lutts, S., Benincasa, P., Wojtyla, L., Kubala, S., Pace, R., Lechowska, K., Quinet, M., and Garneczarska, M. 2016. Seed Priming: New Comprehensive Approaches for an Old Empirical Technique. In: Susana Araujo, S., Balestrazzi, A. (eds.), New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology, InTech, India, pp. 1-46. <https://doi.org/10.5772/64420>
- McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration. Physiology, repair and assessment. Seed Science and Technology, 27: 177-237.
- Meena, H.N. and Yadav, R.S. 2018. Effects of reusing peanut seeds grown in saline irrigation water on yield attributes and quality traits. Journal of Irrigation and Drainage Engineering, 144: 04018002. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)IR.1943-4774.0001281](https://doi.org/10.1061/(ASCE)IR.1943-4774.0001281)
- Miura, K. and Furumoto, T. 2013. Cold signaling and cold response in plants. International Journal of Molecular Sciences, 14: 5312-5337. <https://doi.org/10.3390/ijms14035312>

- Moradi, A. and Piri, R. 2018. Enhancement of salinity stress tolerance in Cumin (*Cuminum cyminum* L.) as affected by plant growth promoting rhizobacteria during germination stage. *Journal of Plant Process and Function*, 6(22): 47-54. [In Persian]
- Mukhopadhyay, R., Sarkar, B., Jat, H.S., Sharma, P.C. and Bolan, N.S. 2021. Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security. *Journal of Environmental Management*, 280: 111736. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111736>
- Parera, C.A. and Cantliffe, D.J. 1991. Seed Priming: A presowing seed treatment. *Horticultural Reviews*, 16: 109-141. <https://doi.org/10.1002/9780470650561.ch4>
- Piri, R., Moradi, A. and Hoseini-Moghaddam, M. 2018. Effect of accelerated aging and seed priming on germination and some biochemical indices of cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Iranian Journal of Seed Science and Research*, 5(1): 69-81. [In Persian] <https://doi.org/10.22124/jms.2018.2901>
- Rahneshan, Z., Nasibi, F. and Moghadam, A.A. 2018. Effects of salinity stress on some growth, physiological, biochemical parameters and nutrients in two pistachio (*Pistacia vera* L.) rootstocks. *Journal of Plant Interactions*, 13: 73-82. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1424355>
- Rajabi Dehnavi, A., Zahedi, M. and Ludwiczak, A. 2020. Effect of salinity on seed germination and seedling development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) genotypes. *Agronomy*, 10(6): 859. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060859>
- Rhaman, M.S., Imran, S., Rauf, F., Khatun, M., Baskin, C.C., Murata, Y. and Hasanuzzaman, M. 2021. Seed priming with phytohormones: An effective approach for the mitigation of abiotic stress. *Plants*, 10: 37. <https://doi.org/10.3390/plants10010037>
- Saadat, H. and Sedghi, M. 2023a. The effect of priming and aging on the growth indicators and activity of antioxidant enzymes in hybrid maize single cross 704. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 12(2): 49-63. [In Persian] <https://doi.org/10.61186/yujs.10.2.49>
- Saadat, H. and Sedghi, M. 2023b. Effect of seed priming and aging on germination indices and activity of some hydrolytic enzymes and glyoxylate cycle in corn (*Zea mays* L.). *Iranian Journal of Seed Science and Research*, 10(1): 67-81. [In Persian]
- Saadat, H., Sedghi, M., Seyed Sharifi, R. and Farzaneh, S. 2023c. The effect of priming with different levels of chitosan on physiological and biochemical traits in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under salinity stress. *Plant Production Technology*, 14(2):75-89. [In Persian] <https://doi.org/10.61186/yujs.10.2.21>
- Saadat, H., Soltani, E. and Sedghi, M. 2023d. The effect of seed priming with chitosan on germination characteristics and activity of antioxidant enzymes in rice seedlings (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Process and Function*, 12(54): 239-258. [In Persian]
- Saadat, T., Sedghi, M., Seyed Sharifi, R. and Farzaneh, S. 2023e. Effect of chitosan on germination indices of common bean (*Phaseolus vulgaris*) (cv. Sedri) seeds under salt stress, *Iranian Journal of Seed Research*, 9(2): 151-162. [In Persian] <https://doi.org/10.61186/yujs.9.2.151>
- Saddiq, M.S., Iqbal, S., Afzal, I., Ibrahim, A.M., Bakhtavar, M.A. and Hafeez, M.B. 2019. Mitigation of salinity stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings through physiological seed enhancements. *Journal of Plant Nutrition*, 42: 1192-1204. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1609509>
- Salachna, P. and Zawadzińska, A. 2014. Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. *Journal of Ecological Engineering*, 15(3): 97-102.
- Sedghi, M. 2013. Changes in the activity of antioxidant and glyoxylate cycle enzymes of hydroprimed *Calendula officinalis* (L.) seeds after re-drying temperature stress. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 9(2): 279-286.

- Sedghi, M., Khomari, S. and Amanpour-Balaneji, B. 2011. Effect of seed vigor and hormone priming on glyoxylate cycle enzymes activity in Persian silk tree (*Albizia julibrissin* Durazz.). World Applied Science Journal, 13(3): 541-544.
- Shivankar, R., Deore, D. and Zode, N. 2003. Effect of pre-sowing seed treatment on establishment and seed yield of sunflower. Journal of Oilseeds Research, 20: 299-300.
- Sindhu, K. and Sehwat, S.K. 2019. Effect of seed priming on standard germination and electrical conductivity in marigold seeds. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 8(11): 1686-1692. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2019.811.196>
- Sivritepe, N., Sivritepe, H. and Eris, A. 2003. The effects of NaCl priming on salt tolerance in melon seedlings grown under saline conditions. Scientia Horticulturae, 97: 229-237. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00198-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00198-X)
- Soroori S, and Danaee E. 2023. Effects of foliar application of citric acid on morphological and phytochemical traits of *Calendula officinalis* L. under drought stress conditions. International Journal of Horticultural Science and Technology, 10(3): 361-374.
- Sung, F.J.M. and Chang, Y.H. 1993. Biochemical activities associated with priming of sweet corn seeds to improve vigor. Seed Science and Technology, 21: 97-105.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M. and Murphy, A. 2015. Plant Physiology and Development. Biological Sciences. Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Publication. 761p.
- Uthairatanakij, A., Teixeira Da Silva, J. A. and Obsuwan, K. 2007. Chitosan for improving orchid production and quality. Orchid Biotechnology, 1(1): 1-5.
- Varier, A., Kuriakose, A. and Dadlani, M. 2010. The subcellular basis of seed priming. Current Science, 99: 450-456.
- Yadegari, M. 2017. Study of phytohormones effects on UV-B stress seeds of thyme species. Journal of Herbal Drugs, 8(2): 109-115. [In Persian] <https://doi.org/10.18869/jhd.8.2.109>
- Zaferanchi, S., Salmasi, S.Z., Salehi Lisar, S.Y. and Sarikhani, M. R. 2019. Influence of organics and bio fertilizers on biochemical properties of *Calendula officinalis* L. International Journal of Horticultural Science and Technology, 6(1): 125-136.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J., Ismal, A.M. 2006. Role of ABA integrating plant responses to drought and salt stresses. Field Crops Research, 97: 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.08.018>
- Zhou, G., Ma, B.L., Li, J., Feng, C., Lu, J. and Qin, P. 2010. Determining salinity threshold level for castor bean emergence and stand establishment. Crop Science, 50: 2030-2036. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.09.0535>