

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

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

چکیده

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

واژه‌های کلیدی: پراکسیداسیون چربی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، پیری بذر، گلرنگ.

مقدمه

در طی انبارداری با گذشت زمان به تدریج قوه حیات و توان جوانه‌زنی بذرها کاهش می‌یابد (Verma et al., 2003). زوال بذر در طی انبارداری باعث کاهش کیفیت بذر، استقرار گیاهچه و در نهایت عملکرد گیاه در مزرعه خواهد شد (McDonald, 1999). کاهش کیفیت بذر به شدت تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند دمای محیط، محتوی رطوبت بذر و رطوبت نسبی محیط قرار می‌گیرد (Priestly, 1986). تغییرات مختلف بیوشیمیایی و متابولیکی در طی فرایند پیری بذر رخ می‌دهد که نتیجه نهایی آن کاهش توان جوانه‌زنی و نمو بذر است (McDonald, 1999). در فیزیولوژی بذر گونه‌های فعال اکسیژن شامل پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH). معمولاً به عنوان مولکول‌های سمی مورد توجه‌اند که تجمع آنها باعث پراکسیداسیون چربی‌ها، غیر فعال شدن آنزیم‌ها، خسارت به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاءهای سلول می‌شود (McDonald, 1999; Bailly, 2004). خسارت به غشاءهای سلول به عنوان عامل اصلی زوال بذرهای انبار شده شناخته شده است (McDonald, 1999). در طول دوره انبارداری در حالی که محتوی رطوبتی بذر پائین است اکسیداسیون خود به خود چربی‌ها موجب تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (Bailly, 2004; McDonald, 1999). در طی فرایند جوانه‌زنی در حالی که محتوی رطوبتی بذر افزایش می‌یابد گونه‌های فعال اکسیژن بر اثر فعالیت تنفسی در میتوکندری یا فعالیت گلی‌اکسی‌زوم‌ها تولید می‌شوند. همچنین در زمان جوانه‌زنی گونه‌های فعال اکسیژن که در زمان خشک بودن بذر تولید شده و در بافت‌های مختلف بذر محبوس شده‌اند آزاد می‌شوند (Bailly, 2004). افزایش تولید و آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن موجب افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌های غشاء شده در نتیجه ساختار غشاءهای سلولی به هم خورده و غشاءها سلامت خود را از دست می‌دهند در نتیجه میزان نشت الکترولیت‌ها از سلول افزایش می‌یابد (Goel & Sheoran, 2003; McDonald, 1999).

میزان تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در زمان جوانه‌زنی به وسیله میزان تولید و آزاد شدن گونه‌های

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

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

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

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

روز پیری، پیری طبیعی و بدون پیری) انجام شد. به منظور اندازه‌گیری درصد و میانگین زمان جوانه‌زنی، آزمون استاندارد جوانه‌زنی بر اساس ISTA^۱ (1985) انجام گرفت. ابتدا بذرها توسط محلول هیپوکلیت سدیم ۵۰ درصد ضد عفونی شدند. سپس ۲۵ عدد بذر در هر پتری‌دیش استریل (قطر ۹ سانتی‌متر) بر روی کاغذ صافی قرار داده شد و مقدار ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد. پتری‌دیش‌های در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰ درصد به مدت ۷ روز قرار داده شد. تعداد بذره‌های جوانه زده هر روز تا رسیدن به روز هفتم شمارش و یادداشت‌برداری شد. بذرهایی که طول ریشه چه آنها حداقل ۲ میلی‌متر بود به عنوان بذر جوانه زده در نظر گرفته شد. سپس درصد جوانه‌زنی و میانگین زمان جوانه‌زنی محاسبه شدند. میانگین زمان جوانه‌زنی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Bailey et al., 2000):

$$MTG = \frac{[n1 \times 1 + (n2 - n1) \times 2 + (n3 - n2) \times 3 + \dots + (n7 - n6) \times 7]}{n7}$$

که در این رابطه $n1$ تا $n7$ درصد جوانه‌زنی در روز اول تا هفتم و MTG میانگین زمان جوانه‌زنی است. شاخص بنیه گیاهیچه پس از اندازه‌گیری طول گیاهیچه با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

= شاخص بنیه

میانگین طول گیاهیچه (cm) × درصد جوانه‌زنی

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

به منظور اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از بذر و محور جنین طبق روش (Tammela et al., 2005) عمل

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

مواد و روش‌ها

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

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

آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۴ تکرار و پنج تیمار پیری (سه تیمار پیری تسریع شده ۴، ۸ و ۱۲

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

اندازه‌گیری شد.

به منظور تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در محور جنین ابتدا پوشش بذر و محور جنین را جدا کرده و سپس جنین‌های جدا شده را در فویل آلومینیومی پیچیده و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز کرده و نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

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

نحوه استخراج آنزیم پراکسیداز مانند آنزیم کاتالاز بود و فعالیت آن به روش Chance & Maehly (1955) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۱۰ میلی‌مولار گویاکول، ۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده بود. پس از اضافه کردن عصاره، بلافاصله افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه قرائت شد. محلول جذب زمینه (Blank) شامل تمامی مواد بجز عصاره استخراج شده بود. میزان تتراکویاکول تشکیل شده با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=26.6 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) محاسبه شد. فعالیت ویژه آنزیم به

شد. ابتدا پوشش بذر (پریکارپ) را جدا کرده و در هر ظرف تعداد ۲۵ عدد بذر قرار داده و مقدار ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به آن اضافه شد. ظروف در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس هدایت الکتریکی محلول با استفاده از دستگاه EC متر (inolab) قرائت شد. میزان نشت الکترولیت‌ها بر حسب میکروزیمنس بر سانتی‌متر در بذر محاسبه و گزارش شد.

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

به منظور برآورد میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در بذر و محور جنین بذر، میزان تولید مالون دی‌آلدهاید در کل بذر و محور جنین براساس Heath & Packer (1968) اندازه‌گیری شد. پس از جداکردن پوشش بذر ۰/۵ گرم بذر را در هاون چینی کاملاً پودر کرده سپس ۴ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱ درصد به آن اضافه شد و کاملاً هموژنیزه شد سپس مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و ۲ میلی‌لیتر از محلول روشن‌ساز آن جمع‌آوری شد. به محلول روشن‌ساز جمع‌آوری شده مقدار ۴ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد تیوباریتوریک اسید (TBA) حاوی ۲۰ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مخلوط را بلافاصله در حمام آب و یخ قرار داده تا کاملاً سرد شود. سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول روشن‌ساز آن جمع‌آوری شد. میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل (Shimadzu UV-100) قرائت شد و پس از کسر میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=155 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) میزان مالون دی‌آلدهید تولید شده محاسبه شد و برحسب میکرومول در گرم وزن تر بذر گزارش شد. اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدهاید در محور جنین نیز پس از جدا کردن جنین بذر مطابق روش بالا

نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی نشان‌دهنده این است که با افزایش مدت زمان پیری مصنوعی درصد جوانه‌زنی بذرها کاهش یافت به طوری که درصد جوانه‌زنی از ۹۴ درصد در تیمار بدون پیری به ۴۱ درصد در تیمار ۱۲ روز پیری رسید (جدول ۱). در تیمار پیری طبیعی نیز درصد جوانه‌زنی کاهش یافت و به ۶۵ درصد رسید که نسبت به بذره‌های بدون پیری کاهش معنی‌داری نشان داد و با تیمار ۴ روز پیری مصنوعی تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱). کاهش درصد جوانه‌زنی بر اثر پیری در اکثر تحقیقات مشاهده شده است. اگرچه مکانیسم‌های دقیق از دست رفتن قوه حیات بذر هنوز مشخص نشده ولی دلایل متعدد بیوشیمیایی و متابولیکی برای کاهش توان جوانه‌زنی بذرها عنوان شده است که از آن جمله می‌توان به پراکسیداسیون چربی‌ها و خسارت به غشاءهای سلولی همچون آسیب به فرایند سنتز RNA، تخریب DNA، رسوب و غیر فعال شدن آنزیم‌ها اشاره کرد (Lehner et al., 2008; Murthy et al., 2003; Basra et al., 2003). میانگین زمان جوانه‌زنی بر اثر تیمار پیری مصنوعی در تیمار ۱۲ روز پیری نسبت به بذره‌های بدون پیری افزایش یافت ولی تیمارهای ۴ و ۸ روز پیری با تیمار بدون پیری تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱). میانگین زمان جوانه‌زنی در تیمار پیری طبیعی نسبت به بقیه تیمارها افزایش بیشتری نشان داد. افزایش مدت زمان جوانه‌زنی در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است (Basra et al., 2003; Verma et al., 2003; Goel et al., 2003). افزایش میانگین زمان جوانه‌زنی احتمالاً به دلیل وقفه‌ای است که در شروع فرایند جوانه‌زنی در بذره‌های پیر شده ایجاد می‌شود. علت وقفه ایجاد شده احتمالاً این است که بذر برای تعمیر خسارت‌های وارد شده به غشاء و دیگر قسمت‌های سلول همچون آغاز مجدد فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی و جلوگیری از بروز تنش اکسیداتیو نیاز به زمان دارد و تعمیر این خسارت‌ها فقط پس از جذب آب توسط بذر امکان‌پذیر است. بنابراین مدت زمان لازم برای تکمیل فرایند جوانه‌زنی در بذره‌های پیر افزایش می‌یابد که نتیجه آن کاهش سرعت جوانه‌زنی است (Berjake & Villers, 1972; Priestly, 1986; Bailly et al., 1998, 2000).

صورت مایکرومول تتراگوپاکول تشکیل شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سکوریات پراکسیداز ابتدا ۰/۱ گرم جنین را با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی کاملاً پودر کرده سپس ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱ درصد PVP (w/w)، ۰/۱ درصد Tritox x-100 و ۵ میلی‌مولار آسکوریات به آن اضافه شد و پس از یکنواخت کردن محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس محلول روشن‌آور برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم برداشت شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم براساس روش Nakano & Asada (1981) انجام شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۵ میلی‌مولار آسکوریات، ۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده بود. پس از اضافه کردن عصاره مخلوط واکنش را تکان داده و بلافاصله میزان کاهش جذب مخلوط واکنش در طول موج ۲۶۵ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. محلول جذب زمینه (Blank) شامل تمامی مواد به جز عصاره استخراج شده بود. میزان آسکوریات اکسیدشده با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) محاسبه شد و فعالیت ویژه آنزیم براساس مایکرومول آسکوریات مصرف شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول در عصاره‌های استخراج شده از روش Bradford (1976) استفاده شد. پس از استخراج هر آنزیم مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده به ۲۹۵۰ میکرولیتر محلول برادفور اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. پس از اندازه‌گیری و محاسبات صفات ذکر شده، نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه واریانس و مقایسه میانگین شدند. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

تیمار پیری مصنوعی با افزایش مدت زمان پیری میزان نشت الکترولیت‌ها از بذر افزایش یافته است به طوری که این مقدار در تیمار ۱۲ روز پیری به حداکثر مقدار رسیده بود (جدول ۱). میزان نشت الکترولیت‌ها از بذرهای پیر شده طبیعی نیز به شدت افزایش یافته بود که نشان‌دهنده خسارت زیاد وارده به غشاء سلول این بذرها است. افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذرهای پیر شده طبیعی و مصنوعی در مطالعات مختلف گزارش شده است (Goel & Sheoran, 2003; Basra et al., 2003; Verma et al., 2003; Goel et al., 2003; Verma et al., 2003). میزان نشت الکترولیت‌ها با درصد جوانه‌زنی ($r=-0/929$) و شاخص بنیه گیاهچه ($r=-0/931$) همبستگی منفی و بالایی نشان داد و با میانگین زمان جوانه‌زنی ($r=0/549$) همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). این همبستگی‌ها نشان‌دهنده این است که با افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذر توان جوانه‌زنی و رشد گیاهچه کاهش می‌یابد که با یافته‌های دیگر محققان مطابقت دارد (Basra et al., 2003). افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذر ناشی از برخی تغییرات ساختمانی غشاء سلول است که باعث از بین رفتن یکپارچگی غشاء می‌شود، در نتیجه قابلیت نفوذ پذیری غشاء افزایش یافته و میزان خروج الکترولیت‌ها و دیگر مواد از بذر افزایش یافته است (Goel & Sheoran, 2003). از جمله تغییراتی که در غشاء رخ می‌دهد و باعث افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذر می‌شود می‌توان به پراکسیداسیون چربی‌های غشاء سلولی اشاره کرد (Copeland & Mc Donald, 1985). از دست رفتن عملکرد غشاء و نشت مواد مختلف از سلول یکی از فاکتورهای اصلی مسئول کاهش پتانسیل جوانه‌زنی و رشد گیاهچه است (Goel & Sheoran, 2003; Woodstock et al., 1985). پراکسیداسیون چربی‌های غشاء از جمله عوامل اصلی است که باعث می‌شود ساختار غشاءهای سلولی بر هم خورده و نشت الکترولیت‌ها افزایش یابد. در این تحقیق نیز نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که با افزایش مدت زمان پیری مصنوعی میزان مالون‌دی‌آلدهاید (MDA) که نشان‌دهنده پراکسیداسیون چربی‌ها است افزایش یافته و در تیمار ۱۲ روز پیری به حداکثر مقدار خود رسید (جدول ۱).

شاخص بنیه گیاهچه از دیگر صفاتی بود که تحت تاثیر پیری بذر قرار گرفت. نتایج مقایسه بنیه گیاهچه نشان داد که تیمار پیری مصنوعی باعث کاهش بنیه گیاهچه شد و با افزایش مدت زمان پیری مصنوعی این کاهش شدیدتر بود. به طوری که در تیمار ۱۲ روز پیری شاخص بنیه گیاهچه به حداقل مقدار خود رسید (جدول ۱). در بذرهای پیری طبیعی نیز شاخص بنیه گیاهچه کاهش یافت. کاهش شاخص بنیه گیاهچه ناشی از کاهش اجزاء آن یعنی درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه است که هر دو در شرایط پیری بذر کاهش یافتند. کاهش بنیه گیاهچه بر اثر پیری در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Sung & Jeng, 1994; Sung, 1996). Verma et al. (2003) در مطالعه بر روی کلم نشان دادند که بنیه گیاهچه با پارامترهای مزرع‌های مانند سرعت ظهور گیاهچه، درصد استقرار گیاهچه و عملکرد همبستگی بالا، مثبت و معنی‌داری دارد و کاهش بنیه گیاهچه بر اثر اعمال پیری تسریع شده باعث کاهش استقرار گیاهچه و در نهایت عملکرد دانه کلم خواهد شد. همچنین Basra et al. (2003) در مطالعه‌ای که بر روی بذرهای پنبه انجام دادند، دریافتند که تیمار پیری تسریع شده باعث کاهش درصد سبز شدن، رشد گیاهچه و کاهش سطح برگ گیاه می‌شوند. تیمار پیری تسریع شده با کاهش دادن بنیه گیاهچه باعث کاهش درصد سبز شدن و استقرار مناسب گیاهچه می‌شود که می‌تواند در نهایت عملکرد محصول را کاهش دهد. بذرها در زمان رسیدگی فیزیولوژیک دارای بالاترین میزان بنیه بذر هستند و نگهداری طولانی مدت آنها در شرایط طبیعی موجب کاهش تدریجی بنیه آنها می‌شود (Goel & Sheoran, 2003; Lehner et al., 2008). در مورد علت کاهش بنیه گیاهچه در طی انبارداری و پیری تسریع شده دلایل مختلفی عنوان شده که مهمترین آن افزایش پراکسیداسیون چربی بر اثر حمله رادیکال‌های آزاد است که باعث برهم خوردن ساختار غشاءهای سلولی می‌شوند (Bailly, 2004). میزان نشت الکترولیت‌ها از بذر یکی از پارامترهای نشان‌دهنده سلامت غشاء است که در بیشتر مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج مقایسه میانگین نشت الکترولیت‌ها از بذر نشان‌دهنده این است که در

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

| میانگین زمان جوانه زنی | درصد جوانه زنی | شاخص ویسکوز | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | نشت الکترولیتها از بذور | نشت الکترولیتها از بذور | محتوی MDA | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | نشت الکترولیتها از بذور | نشت الکترولیتها از بذور | محتوی MDA | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | نشت الکترولیتها از بذور | نشت الکترولیتها از بذور | محتوی MDA | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | |
|------------------------|----------------|-------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|------------------------------|------------------------------|-------|
| ۳۲۰/۱ | a | ۵۳۳/۱ | a | ۴۷/۹۳ | a | ۱۲/۲۶ | d | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ |
| ۵۳۲/۱ | c | ۲۲۴/۱ | c | ۲۲/۹۰ | c | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ |
| ۱۴۶/۱ | b | ۴۲۸/۵ | b | ۳۷/۶۴ | b | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ |
| ۶۳۳/۴ | c | ۱۳۸۳ | d | ۱۷/۹۹ | d | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ |
| ۲۱۷/۵ | d | ۲۶۷/۴ | d | ۹/۷۸ | e | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ |

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

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

| میانگین زمان جوانه زنی | درصد جوانه زنی | نشت الکترولیتها از بذور | نشت الکترولیتها از بذور | محتوی MDA | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | نشت الکترولیتها از بذور | نشت الکترولیتها از بذور | محتوی MDA | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | نشت الکترولیتها از بذور | نشت الکترولیتها از بذور | محتوی MDA | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | میانگین زمان جوانه زنی (روز) | نشت الکترولیتها از بذور | نشت الکترولیتها از بذور | محتوی MDA | |
|------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|-----------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|-------|
| ۳۲۰/۱ | a | ۵۳۳/۱ | a | ۴۷/۹۳ | a | ۱۲/۲۶ | d | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ | a | ۱۲/۲۶ |
| ۵۳۲/۱ | c | ۲۲۴/۱ | c | ۲۲/۹۰ | c | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ | b | ۲۰/۵۷ |
| ۱۴۶/۱ | b | ۴۲۸/۵ | b | ۳۷/۶۴ | b | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ | c | ۱۷/۴۵ |
| ۶۳۳/۴ | c | ۱۳۸۳ | d | ۱۷/۹۹ | d | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ | bc | ۱۸/۲۶ |
| ۲۱۷/۵ | d | ۲۶۷/۴ | d | ۹/۷۸ | e | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ | a | ۲۶/۹۴ |

* و ** پد ترتیب معنی دار در سطح ۱ و ۵ درصد.

افزایش نشت الکترولیت‌ها از محور جنین در تیمارهای مختلف پیری با افزایش تولید MDA همراه بود. نتایج مقایسه میانگین MDA محور جنین نشان‌دهنده افزایش آن در تیمارهای پیری مصنوعی و پیری طبیعی است (جدول ۱) که افزایش تولید MDA ناشی از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در بذر است که می‌تواند ناشی از ضعف سیستم آنتی‌اکسیدانتی و یا افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن باشد (Bailly, 2004).

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

نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان‌دهنده این است که افزایش مدت زمان پیری مصنوعی باعث کاهش بیشتر فعالیت آنزیم پراکسیداز شد. همچنین پیری طبیعی نیز فعالیت این آنزیم را نسبت به بذرهای پیر نشده کاهش داد (جدول ۱). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز مانند آنزیم پراکسیداز بر اثر تیمارهای پیری کاهش یافت و در تیمار ۱۲ روز پیری به حداقل مقدار خود رسید (جدول ۱). کاهش فعالیت این دو آنزیم در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Goel & Sheoran, 2003; Sung, 1994; Chiu et al., 1995; Sung & Jeng, 1996). میزان کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط پیری طبیعی و مصنوعی از آنزیم کاتالاز و پراکسیداز بیشتر بود که احتمالاً نشانه حساسیت بیشتر این آنزیم به پیری بذر است. در تیمار پیری طبیعی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز کاهش بیشتری را نسبت به دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز نشان داد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با محتوی MDA بذر و جنین همبستگی منفی و بالایی را نشان داد. همچنین همبستگی فعالیت این آنزیم‌ها با درصد

میزان MDA در بذرهای پیری طبیعی نیز نسبت به بذرهای بدون پیری به طور معنی‌داری بیشتر بود (جدول ۱). افزایش همزمان نشت الکترولیت‌ها و محتوی MDA بذر در مطالعات دیگر گزارش شده و عنوان شده پراکسیداسیون چربی‌ها می‌تواند بخش قابل توجهی از افزایش نشت الکترولیت‌ها همچنین کاهش قابلیت جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را توضیح دهد (Chiu et al., 1995; Goel et al., 2003; Bailly, 2004; Sung, 1996; Gidrol et al., 1989). در این مطالعه نیز بین محتوی MDA و درصد جوانه‌زنی ($r = -0.840$) و بنیه گیاهچه ($r = -0.820$) همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد. همچنین محتوی MDA با میزان نشت الکترولیت‌ها از بذر ($r = 0.891$) همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد (جدول ۲)، که این همبستگی‌ها نشان‌دهنده رابطه بین پراکسیداسیون چربی‌ها و افزایش نشت الکترولیت‌ها بر اثر تخریب ساختار غشاء است که در نهایت موجب کاهش توان جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه شده است.

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

نتایج مقایسه میانگین نشت الکترولیت‌ها از محور جنین نشان‌دهنده این است که میزان نشت الکترولیت‌ها در تیمار پیری مصنوعی با افزایش مدت زمان پیری مصنوعی افزایش یافت و در ۱۲ روز پیری به حداکثر مقدار خود رسید (جدول ۱). در تیمار پیری طبیعی نیز میزان نشت الکترولیت‌ها به شدت افزایش یافت و به حدود ۴/۶ برابر بذرهای پیر نشده رسید (جدول ۱). در بیشتر مطالعات انجام شده میزان نشت الکترولیت‌ها در کل بذر مورد بررسی قرار گرفته است با این حال Chiu et al. (1995) با مطالعه بر روی بذرهای هندوانه و Stewart & Bewley (1980) با مطالعه بر روی بذرهای سویا گزارش کردند که میزان نشت الکترولیت محور جنین بر اثر پیری مصنوعی افزایش می‌یابد و با افزایش مدت زمان تیمار پیری، آسیب به غشاء سلول‌های جنین بیشتر شده و میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در شرایط پیری بذر می‌شود (Murthy et al., 2003; Machado Neto et al., 2001). از دیگر دلایلی که برای کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت طی فرایند پیری بذر ذکر شده است، حمله گونه‌های فعال اکسیژن به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت است که در شرایط پیری افزایش یافته و موجب تخریب آنزیم‌ها می‌شود (Bailly, 2004). در نهایت در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در بذرها به علت کاهش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانت، موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود که یکی از عوامل اصلی و مهم پیری و زوال بذرها گلرنگ در هر دو شرایط پیری مصنوعی و طبیعی است که باعث کاهش توان جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گلرنگ می‌شود.

جوانه‌زنی و بنیه گیاهچه مثبت و بالا بود (جدول ۲). با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تیمارهای پیری میزان گونه‌های فعال اکسیژن در بذر افزایش می‌یابد که افزایش آنها باعث افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و دیگر ماکرومولکول‌های حیاتی سلول می‌شود که در نهایت موجب زوال بذر خواهد شد. کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بر اثر پیری بذر به دلایل متعددی مانند آسیب رسیدن به سنتز RNA که در نهایت موجب کاهش تولید پروتئین خواهد شد، کاهش سنتز پروتئین‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، رسوب و غیرفعال شدن آنزیم‌ها اتفاق می‌افتد (Priestly, 1986; McDonald, 1999; Basra et al., 2003). علاوه بر آن اضافه شدن قندهای احیا شده به پروتئین‌ها که به صورت غیر آنزیمی صورت می‌گیرد و به واکنش مایلارد معروف است باعث غیرفعال شدن

REFERENCES

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
2. Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer C. and P. M. Mullineaux. (eds), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, London. pp. 77–100.
3. Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14:93-107.
4. Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. & Come, D. (1996). Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds a related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*, 97, 104-110.
5. Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. & Come, D. (1998). Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. *Physiologia Plantarum*, 104, 646–652.
6. Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. & Come, D. (2000). Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Science Research*, 10, 35–42.
7. Basra, S. M. A., Ahmad, N., Khan, M. M., Iqbal, N. & Cheema, M. A. (2003). Assessment of cotton seed deterioration during accelerated ageing. *Seed Science and Technology*, 31, 531-540.
8. Berjake, P. & Villers, T. A. (1972). Aging in plant embryos: Acceleration of senescence following artificial aging treatment. *New Phytology*, 71, 513 – 518.
9. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
10. Chance, B. & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, 764–775.
11. Chiu, K. Y., Wang, C. S. & Sung, J. M. (1995). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging and hydration of watermelon seeds differing in ploidy. *Physiologia Plantarum*, 94, 441-446.
12. Copeland, L. O. & Mc Donald, M. B. (1985). *Principles of seed science and technology*. second edition, Minneapolis: Burgess Publishing.
13. Gidrol, H. Serghini, Noubhani, A., Mocouot, B. & Mazliak, P. (1989). Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidation and membrane damage. *Physiologia Plantarum*, 76, 591-597.
14. Goel, A. & Sheoran, I. S. (2003). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. *Biologia Plantarum*, 46(3), 429-434.
15. Goel, A., Coel, A. K. & Sheoran, I. S. (2003). Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1093-1100.

16. Heath, R. L. & Packer, I. (1968). Photoperoxidant in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
17. Jiang, Y. & Huang, B. (2001). Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science*, 41, 436-442.
18. Lehner, A., Mamadou, N., Poels, P., Come, D., Bailly, C. & Corbineau, F. (2008). change in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during aging in wheat grains. *Journal of Cereal Science*, 47(3), 555-565.
19. Machado Neto, N. B., Custodio, C. C. & Takaki, M. (2001). Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Seed Science and Technology*, 29, 137-149.
20. McDonald, M. B. (1999). Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. *Seed Science and Technology*, 27, 177-237.
21. Murthy, U. M. N., Kumar, P. P. & Sun, W. Q. (2003). Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiate* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1057-1067.
22. Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22 (5), 867-880.
23. Noctor, G. & Foyer, C. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
24. Priestly, D. A. (1986). *Seed aging: Implication for seed storage and persistence in the soil*. Cornell University Press. Ithaca, NY.
25. Stewart, R. C. R. & Bewley, D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean Axes. *Plant Physiology*, 62, 245-248.
26. Sung, J. M. (1996). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. *Physiologia Plantarum*, 97, 85-89.
27. Sung, J. M. & Jeng, T. L. (1994). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiologia Plantarum*, 91, 51-55.
28. Tammela, P., Vaananen, P. S., Lakso, I., Hopia, A., Vourela, H. & Nygrem, M. (2005). Tocopherols, tocoterienols and fatty acids as indicators of natural ageing in *Pinus sylvestris* seeds. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 20, 378-384.
29. Verma, S. S., Verma, U. & Tomer, R. P. S. (2003). Studies on seed quality parameters in deterioration seeds in Brassica (*Brassica campestris*). *Seed Science and Technology*, 31, 389-398.
30. Woodstock, L.W., Furman, K. & Leffler, H. R. (1985). Relationship between weathering deterioration and germination, respiratory metabolism and mineral leaching from cotton seeds. *Crop Science*, 25, 459-466.
31. Zeinali, E. (1999). *Safflower (characteristics, production and utilization)*. Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources Press. (In Farsi).