

## ارزیابی جوانه‌زنی بذرهای گندم با سطوح مختلف قدرت بذر با استفاده از مدل هیدروتایم

مژده جمالی<sup>۱</sup>، فرشید قادری فر<sup>۲\*</sup>، حمیدرضا صادقی پور<sup>۳</sup>، الیاس سلطانی<sup>۴</sup>، سید مجید عالی‌مقام<sup>۵</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد در رشته زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲. دانشیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان.

۴. استادیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان.

۵. دانشجوی دکتری آگرواکولوژی گیاهان زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۸

### چکیده

مدل هیدروتایم و ضرایب آن برای بررسی روابط بین پتانسیل آب، درصد و سرعت جوانه‌زنی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی جوانه‌زنی بذرهای زوال یافته گندم به تنش خشکی به وسیله مدل هیدروتایم و بررسی و مقایسه ضرایب این مدل در سطوح مختلف زوال و پرایمینگ بود. در این آزمایش از بذرهای گندم با سطوح مختلف قدرت بذر استفاده شد. برای ایجاد سطوح مختلف قدرت بذر از بذرهای زوال یافته طبیعی و مصنوعی در دو شرایط انجام پرایمینگ و بدون پرایمینگ استفاده شد. برای انجام پرایمینگ از جیبرلیک اسید ۵۰ پی‌پی‌ام استفاده شد. سطوح مختلف پتانسیل آب نیز با استفاده از پلی‌اتیلن گلاکول ۶۰۰۰ در چهار سطح ۰، -۱/۶، -۱/۲ و -۱/۸ مگاپاسکال تهیه شد. در نهایت برای بررسی واکنش بذرهای زوال یافته گندم به تنش خشکی و اثرات پرایمینگ بر بهبود مؤلفه‌های جوانه‌زنی از مدل هیدروتایم استفاده شد. نتایج نشان داد که با افزایش زوال بذر (چه به صورت مصنوعی و چه به صورت طبیعی) هم در شرایط پرایمینگ و هم در بذرهای شاهد، مقدار ضریب هیدروتایم افزایش ( $\theta H$ ) یافت. اما مقدار افزایش ضریب هیدروتایم در شرایط پرایمینگ کمتر از بذرهای بدون پرایمینگ بود. در بذرهای پرایمینگ شده به ازای هر روز زوال مقدار ضریب هیدروتایم به مقدار ۱۴/۸ مگاپاسکال ساعت افزایش یافت، اما در بذرهای شاهد این شاخص به ازای هر روز زوال به میزان ۲۹/۶ مگاپاسکال ساعت افزایش پیدا کرد. درصد افزایش این ضریب در زوال طبیعی کمتر از زوال مصنوعی بود، در نتیجه خسارت ناشی از زوال مصنوعی بیشتر از انبارداری طبیعی می‌باشد. به علاوه خروجی مدل نشان داد که افزایش سطح زوال به طور معنی‌داری باعث کاهش یکنواختی جوانه‌زنی (افزایش  $\psi_{50}$ ) شد، اما پرایمینگ تأثیر معنی‌داری بر یکنواختی جوانه‌زنی نداشت. برای تیمار شاهد روند تغییرات ضریب  $\Psi_{b(50)}$  در مقابل مدت زوال نسبت به تیمار پرایمینگ متفاوت بود. در تیمار شاهد با افزایش زوال تا ۱/۹۹ روز، مقدار این ضریب منفی تر (افزایش مقاومت به خشکی) شد. بعد از این مدت با افزایش مدت زوال، مقدار این ضریب افزایش یافت. همچنین در شرایط انبارداری طبیعی پرایمینگ تأثیر معنی‌داری بر مقدار ضریب  $\Psi_{b(50)}$  نداشت. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که زوال باعث کاهش سرعت، یکنواختی و مقاومت به خشکی گردید و پرایمینگ تنها باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی شد و تأثیری بر دو مؤلفه دیگر نداشت.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، پیری، پرایمینگ، مدل‌سازی جوانه‌زنی.

### مقدمه

جوانه‌زنی بذر و استقرار گیاهچه از مراحل اصلی و مهم در چرخه زندگی گیاهان می‌باشند که تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی قرار می‌گیرد (Akram-Ghaderi et al., 2008). موفقیت و یا عدم موفقیت در تولید به عواملی مانند درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و تولید گیاهچه‌های قوی وابسته است. بیشترین مقدار استقرار گیاهچه زمانی حاصل

جوانه‌زنی بذر و استقرار گیاهچه از مراحل اصلی و مهم در چرخه زندگی گیاهان می‌باشند که تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی قرار می‌گیرد (Akram-Ghaderi et al., 2008).

شرایط محیطی تنش‌زا از قبیل تنش شوری، خشکی و دما می‌شود (Fujikura et al., 1993; Demir Kaya et al., 2006; Ashraf and Foolad, 2005; Akram-Ghaderi et al., 2008; Soltani et al., 2009; Chandran Jisha and Puthur, 2016). همچنین مشاهده شده است که این تکنیک باعث افزایش عملکرد در گیاهان شده است (Harris et al., 2001; Soltani et al., 2009; Rehman et al., 2014).

امروزه محققین برای پیش‌بینی صحیح از جوانه‌زنی و استقرار گیاهان از مدل‌ها استفاده می‌کنند. یکی از این مدل‌ها که حساسیت جوانه‌زنی بذرها به تنش خشکی را تعیین می‌کند، مدل هیدروتایم است (Cheng and Bradford, 1999; Rowse and Finch-Savage, 2003). استفاده از این مدل پس از مطالعات برادفورد (Bradford, 1990) و برادفورد و سوماکو (Bradford and Somasco, 1994) گسترش پیدا کرد. مدل هیدروتایم برای توصیف الگوی جوانه‌زنی بذرها در ارتباط با پتانسیل آب استفاده شده است (Bradford, 2002). این مدل توان بالایی برای توصیف و کمی‌سازی پتانسیل آب بر روی جوانه‌زنی و سبز شدن دارد (Larsen et al., 2004; Bradford, 1990). همچنین این مدل سرعت جوانه‌زنی ( $\theta_H$ )، تحمل به تنش در مرحله جوانه‌زنی ( $\Psi_{b(50)}$ ) و یکنواختی جوانه‌زنی ( $\psi_{50}$ ) را کمی‌سازی می‌کند که همگی شاخص‌های مهمی از قدرت بذر هستند (Alimagham and Ghaderi-Far, 2015). داهال و برادفورد (Dahal and Bradford, 1990) سرعت جوانه‌زنی ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی را با استفاده از مدل هیدروتایم مقایسه کردند. استیل و برادفورد (Still and Bradford, 1998) بیان کردند که از ضرایب مدل هیدروتایم می‌توان برای حصول بذرهایی با کیفیت بالا در طول نمو استفاده کرد.

نظر به اینکه ضرایب مدل هیدروتایم دارای مفهوم بیولوژیک می‌باشد، از این رو می‌توان از ضرایب مدل هیدروتایم برای بررسی واکنش بذرهای زوال یافته گندم به تنش خشکی استفاده کرد و مشخص کرد که پرایمینگ باعث بهبود کدام جزء از مؤلفه‌های جوانه‌زنی بذرهای گندم زوال یافته می‌گردد. با توجه به این موارد هدف از این مطالعه ارزیابی جوانه‌زنی بذرهای زوال یافته گندم به تنش خشکی به وسیله مدل هیدروتایم و بررسی و مقایسه ضرایب این مدل در سطوح مختلف زوال و پرایمینگ بود.

می‌شود که بذر بتواند بر شرایط نامطلوب محیطی چیره شده و واکنش مناسبی از خود نشان دهد (Meyer and Pendleton, 2000). ذخیره‌سازی نامناسب بذرها در انبار به شدت بر توانایی جوانه‌زنی و سبز شدن در مزرعه اثر نامطلوب دارد (Soltani et al., 2009). در واقع ذخیره‌سازی در انبار در شرایط نامناسب محیطی زمینه‌ساز واکنش‌هایی در بذر است که موجب کاهش قدرت بذر، قابلیت جوانه‌زنی و سبز شدن می‌گردد. مجموعه این عوامل منجر به زوال بذرها می‌شود که خود موجب کاهش کیفیت بذر در انبار می‌شود (Ghaderi-Far et al., 2014).

هر عاملی که از طریق کاهش سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی باعث استقرار نامناسب و کاهش تراکم گیاهچه شود؛ عملکرد را نیز کاهش می‌دهد؛ بنابراین برای استقرار مناسب گیاهچه و تولید عملکرد مطلوب، جوانه‌زنی خوب و مناسب تحت محدوده وسیعی از شرایط محیطی ضروری است (Jacobson and Bach, 1998). پتانسیل آب خاک از عوامل بسیار مهمی است که می‌تواند بر روی درصد و سرعت جوانه‌زنی تأثیرگذار باشد (Anda and Pinter, 1994). در مورد اثرات کاهش پتانسیل آب بر جوانه‌زنی، رشد گیاهچه و عملکرد گزارش‌های زیادی وجود دارد، مبنی بر این‌که کاهش پتانسیل آب، درصد جوانه‌زنی، شانس استقرار گیاه، سبز شدن یکنواخت، سرعت جوانه‌زنی و عملکرد را کاهش می‌دهد (Hucl, 1993; Baalbaki et al., 1999; Springer, 2005).

یکی از راه‌های بهبود جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌ها در شرایط نامساعد، پرایمینگ می‌باشد (Soltani et al., 2010; Ghassemi-Golezani et al., 2008). در پرایمینگ به بذرها اجازه داده می‌شود تا مقداری آب جذب کنند که مراحل اولیه جوانه‌زنی انجام شود؛ اما ریشه‌چه خارج نشود. به عبارت دیگر در این روش، بذرها تا فاز دوم آبنوشی پیش می‌روند؛ اما وارد فاز سوم نمی‌شوند. بعد از تیمار پرایمینگ، بذرها خشک شده و همانند بذرهای بدون تیمار (شاهد) ذخیره و کشت می‌شوند (McDonald, 1999). گزارش‌های مختلف حاکی از آن است که پرایمینگ باعث افزایش درصد، سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی و سبز شدن بذر می‌گردد (Espany et al., 2016; Ruan et al., 2002; Murungu et al., 2004; Demir Kaya et al., 2006; Nawaz et al., 2016). همچنین گزارش شده است که این تکنیک باعث افزایش دامنه جوانه‌زنی بذرها در

## مواد و روش‌ها

دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند ( Ghaderi-Far and Soltani, 2010). با شروع جوانه‌زنی بذرهای جوانه‌زده در هر پتری دیش شمارش شدند. بذرهای جوانه‌زده پس از شمارش از آزمایش حذف شدند. معیار جوانه‌زنی خروج ریشه‌چه به طول ۲ میلی‌متر یا بیشتر در نظر گرفته شد (Soltani et al., 2002).

برای بررسی واکنش بذرهای زوال یافته گندم به تنش خشکی و اثرات پرایمینگ بر بهبود مؤلفه‌های جوانه‌زنی از مدل هیدروتایم (فرمول ۱) استفاده شد:

$$\theta_H = [\psi - \psi_{b(g)}] \times t_g \quad [1]$$

در معادله (۱)  $\theta_H$ : ضریب هیدروتایم (برحسب مگاپاسکال ساعت)،  $\psi$ : پتانسیل آب (برحسب مگاپاسکال)،  $\psi_{b(g)}$ : پتانسیل آب پایه برای صدک‌های مختلف جوانه‌زنی (برحسب مگاپاسکال)،  $t_g$ : زمان موردنیاز برای خروج ریشه برای صدک‌های مختلف جوانه‌زنی (برحسب ساعت) می‌باشد. با بازنویسی معادله (۱) داریم:

$$\frac{1}{t_g} = \frac{\psi - \psi_{b(g)}}{\theta_H} \quad [2]$$

بر اساس معادله (۲) رابطه بین سرعت جوانه‌زنی صدک‌های مختلف جوانه‌زنی در مقابل پتانسیل آب به صورت خطی می‌باشد که شیب آن برابر  $1/\theta_H$  و عرض از مبدأ معادله، برابر  $\theta_H \psi_{b(g)}$  می‌باشد. مقدار  $\theta_H$  برای صدک‌های مختلف یکسان است، اما مقادیر پتانسیل پایه متغیر است. در این حالت فرض بر این است که فراوانی پتانسیل آب پایه در صدک‌های مختلف به صورت یک تابع نرمال می‌باشد که این تابع دارای میانگین  $(\psi_{b(50)})$  و انحراف معیار  $(\sigma_{\psi_b})$  می‌باشد (Bradford and Still, 2004; Alimaghani and Ghaderi-Far, 2015). با توجه به مفروضات بالا و اصول تابع نرمال، منحنی جوانه‌زنی در مقابل زمان به صورت معادله (۳) نوشته می‌شود:

$$probit(g) = \frac{\left( \psi - \left( \frac{\theta_H}{t_g} \right) \right) - \psi_{b(50)}}{\sigma_{\psi_b}} \quad [3]$$

در معادله (۳)،  $probit(g)$ : تابع پروبیت برای داده‌های درصد جوانه‌زنی تجمعی  $(g)$ ،  $\psi$ : پتانسیل آب (برحسب

این مطالعه در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه تحقیقات بذر دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان بر روی بذر گندم رقم کوه‌دشت انجام شد. در این آزمایش از بذرهای گندم با سطوح مختلف قدرت بذر استفاده شد. برای ایجاد سطوح مختلف قدرت بذر از بذرهای زوال یافته طبیعی و مصنوعی استفاده شد. توده زوال یافته طبیعی بذرهایی بودند که به مدت دو سال در انبار نگهداری شده بودند. برای ایجاد سطوح مختلف قدرت بذر از طریق مصنوعی از آزمون تسریع پیری استفاده شد (Poori et al., 2012). در این روش ابتدا بذرها با محلول ۰/۵ درصد سدیم هیپوکلرید ضدعفونی شد، سپس برای دوره‌های ۴۸، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد قرار گرفتند. برای این کار بذرهای روی یک توری سیمی از جنس آلومینیوم ریخته شده و در ظرف‌های در بسته که در کف آن ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شده بود قرار داده شدند و سپس ظرف‌ها در دمای موردنظر برای دوره‌های ذکر شده قرار گرفتند (برای هر تیمار از ظرف‌های جداگانه استفاده شد). در نهایت همه بذرها در یک‌زمان از انکوباتور خارج شدند. بعد از خشک شدن بذرها در محیط آزمایشگاه، بذرهای هر سطح زوال به دو قسمت مساوی تقسیم شدند. نیمی از بذرها به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد و مابقی بذرها تحت تیمار پرایمینگ قرار گرفتند. برای انجام پرایمینگ از جیبرلیک اسید ۵۰ پی‌پی‌ام استفاده شد (Ghaderi-Far, 2013). جهت انجام این کار بذرهای حاصل از سطوح مختلف قدرت بذر به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در محلول جیبرلیک اسید قرار گرفتند. محلول حاوی بذرها در طی آبتوشی، به‌وسیله پمپ آکواریوم هوادهی شد. پس از گذشت زمان موردنظر (۱۵ ساعت)، بذرها از محلول خارج شده و پس از شستشو در سایه (محیط آزمایشگاه) خشک شدند ( Ghaderi-Far, 2013).

سطوح مختلف پتانسیل آب با استفاده از پلی‌اتیلن گلاکول ۶۰۰۰ بر طبق فرمول میچل و کافمن (Michel and Kaufmann, 1973) در چهار سطح ۰، ۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸- مگاپاسکال تهیه شد. پس از تهیه محلول‌های پتانسیل آب ۳ تکرار ۵۰ تایی از بذرهای هر تیمار در پتری دیش قرار داده شد. مقدار مساوی از هر محلول (۶ میلی‌لیتر) در پتری‌دیش‌ها ریخته شد و در نهایت نمونه‌ها در انکوباتوری با

### نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس ضرایب مدل هیدروتایم در جدول ۱ ارائه شده است. این مدل شامل سه ضریب می‌باشد که هر سه دارای مفهوم بیولوژیک می‌باشند که شامل ضریب هیدروتایم ( $\theta_H$ )، پتانسیل آب‌پایه پنجاه درصد جوانه‌زنی ( $\Psi_{b(50)}$ ) و ضریب انحراف توزیع پتانسیل آب‌پایه ( $\sigma_{\Psi b}$ ) می‌باشد.

ضریب هیدروتایم نشان‌دهنده سرعت جوانه‌زنی می‌باشد، هر چه این ضریب کمتر باشد بیانگر بیشتر بودن سرعت جوانه‌زنی می‌باشد (Bradford and Still, 2004). همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش زوال بذر (چه به صورت مصنوعی و چه به صورت طبیعی) هم در شرایط پرایمینگ و هم در بذرهای شاهد، مقدار ضریب هیدروتایم افزایش یافت، به عبارت دیگر سرعت جوانه‌زنی کاهش پیدا کرد. مقدار کاهش سرعت جوانه‌زنی در شرایط پرایمینگ کمتر از بذرهای بدون پرایمینگ بود (شکل ۱). به طوری که در بذرهای پرایمینگ شده به ازای هر روز زوال مقدار ضریب هیدروتایم (شیب رگرسیون) به مقدار  $14/8$  مگاپاسکال ساعت افزایش یافت، اما در بذرهای شاهد این شاخص به ازای هر روز زوال به میزان  $29/6$  مگاپاسکال ساعت افزایش پیدا کرد (جدول ۲)؛ به عبارت دیگر پرایمینگ در مقایسه با تیمار شاهد، باعث کاهش ضریب هیدروتایم و افزایش سرعت جوانه‌زنی در بذرهای زوال یافته به ویژه در زوال‌های شدید شد، به طوری که این کاهش در حدود  $47$  درصد بود (شکل ۱، جدول ۲).

نکته قابل توجه شکل ۱، این است که درصد افزایش این ضریب در زوال طبیعی کمتر از زوال مصنوعی بود و بیانگر این مطلب است که شدت زوال در تیمارهای مصنوعی بیشتر از زوال طبیعی می‌باشد. در نتیجه خسارت ناشی از زوال مصنوعی بیشتر از انبارداری طبیعی می‌باشد. نتایج درون‌یابی در رگرسیون موجود در شکل ۱ نشان می‌دهد که در تیمار بدون پرایمینگ، اثر دو سال انبارداری بر روی ضریب هیدروتایم معادل  $0/8 \pm 0/1$  روز زوال مصنوعی بود. همچنین بعد از انجام پرایمینگ، اثر دو سال انبارداری بر روی ضریب هیدروتایم معادل  $1/2 \pm 0/3$  روز زوال مصنوعی به دست آمد. پوری و همکاران (Poori et al., 2012) در مطالعه خود بر روی پنبه بیان داشتند که زوال باعث کاهش سرعت جوانه‌زنی می‌شود. همچنین سلطانی و همکاران (Soltani et al., 2009) بیان داشتند که پرایمینگ باعث

مگاپاسکال)،  $\theta_H$ : ضریب هیدروتایم (برحسب مگاپاسکال ساعت)،  $t_g$ : زمان مورد نیاز برای جوانه‌زنی  $g$  درصد از بذرها (برحسب ساعت)،  $\Psi_{b(50)}$ : پتانسیل پایه برای ۵۰ درصد جوانه‌زنی (برحسب مگاپاسکال)،  $\sigma_{\Psi b}$ : ضریب انحراف معیار توزیع مقادیر پتانسیل پایه برای درصدهای مختلف جوانه‌زنی ( $\Psi_{b(g)}$ ) در جمعیت بذرهای می‌باشد.

برای محاسبه ضرایب مدل هیدروتایم، به داده‌های پروبیت درصد جوانه‌زنی در مقابل زمان مورد نیاز برای جوانه‌زنی  $g$  درصد از بذرها و پتانسیل آب برازش داده شد و ضرایب  $\theta_H$ ،  $\Psi_{b(50)}$  و  $\sigma_{\Psi b}$  برای بذرهای زوال یافته و پرایمینگ گندم برآورد شد (Alimagham and Ghaderi-Far, 2015).

در این مطالعه با توجه به اینکه تیمار دو سال انبارداری کیفی بود و تیمارهای زوال مصنوعی به صورت کمی بودند، جهت امکان انجام تجزیه رگرسیون، تیمارهای سطوح زوال مصنوعی به صورت جداگانه مورد تجزیه واریانس و رگرسیون قرار گرفتند. برای مقایسه اثرات انبارداری بر ضرایب هیدروتایم با مقادیر ضرایب مدل هیدروتایم در شرایط زوال مصنوعی از آزمون  $t$  استفاده شد.

جهت بررسی روند تغییرات ضرایب هیدروتایم ( $\theta_H$ ) و ضریب انحراف معیار توزیع مقادیر پتانسیل پایه ( $\sigma_{\Psi b}$ ) در مقابل مدت زمان زوال مصنوعی از رابطه رگرسیون ساده خطی استفاده شد؛ اما برای نشان دادن روند پتانسیل پایه پنجاه درصد ( $\Psi_{b(50)}$ ) در مقابل زمان زوال مصنوعی از معادله دو تکه‌ای (۴) استفاده شد:

$$\begin{aligned} \psi &= (a \times t) + b & \text{اگر } t < c \\ \psi &= (d \times t) + e & \text{اگر } t \geq c \end{aligned} \quad [4]$$

در معادله ۴،  $\Psi_{b(50)}$ : پتانسیل پایه پنجاه درصد جوانه‌زنی (مگاپاسکال)،  $a$ : شیب خط قبل از زمان چرخش (مگاپاسکال بر روز)،  $t$ : مدت انجام زوال مصنوعی (روز)،  $b$ : عرض از مبدأ خط قبل از زمان چرخش (مگاپاسکال)،  $c$ : نقطه چرخش (روز)،  $d$ : شیب خط پس از نقطه چرخش (مگاپاسکال بر روز)،  $e$ : عرض از مبدأ خط پس از نقطه چرخش (مگاپاسکال) را نشان می‌دهند.

جهت برازش رگرسیون برای معادله‌های ۳ و ۴ در نرم‌افزار آماری SAS، از رویه `proc nlin` و برای برازش رگرسیون ساده خطی درجه یک از رویه `proc reg` استفاده شد (Soltani, 2008).

رادیکال‌های سوپراکسید ( $O_2^{\bullet-}$ ) و ... رخ می‌دهد و در مقابل پرایمینگ باعث افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله گلوکاتیون، کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز در بذر می‌گردد که این ترکیبات از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپید طی فرآیند جوانه‌زنی باعث افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی می‌شوند (Hus and Sung, 1997; Basra et al., 2003; Ahmadpour Dehkordi and Balouchi, 2012).

افزایش سرعت سبز شدن در بذرهای پنبه در مزرعه گردید. در مطالعه‌های وینداور و همکاران (Windauer et al., 2007) گزارش کردند که پرایمینگ باعث کاهش ضریب هیدروتایم در بذرهای گیاه *Lesquerella fendleri* شد. برادفورد و استیل (Bradford and Still, 2004) در مطالعه خود بر روی بذرهای کاهو بیان داشتند که پرایمینگ باعث کاهش ضریب هیدروتایم گردید. روشن است که زوال بذر به دلیل تجمع اکسیدان‌هایی چون رادیکال‌های هیدروکسیل ( $\bullet OH$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ).

جدول ۱. تجزیه واریانس ضرایب مدل هیدروتایم برای تیمارهای زوال مصنوعی و پرایمینگ.#

Table 1. Variance analysis of coefficients of hydrotime model for artificial deterioration and Priming treatments.#

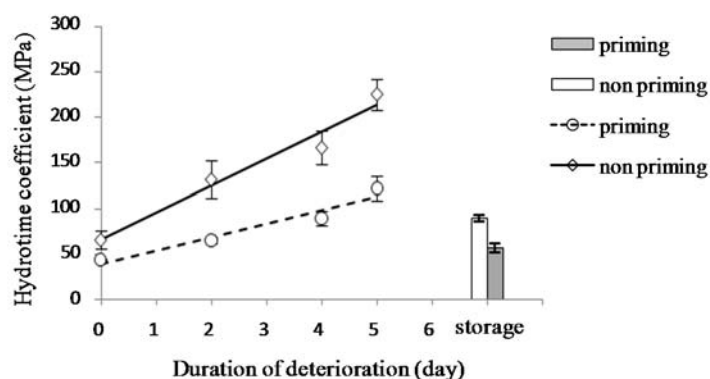
منابع تغییر	درجه آزادی	ضریب هیدروتایم	پتانسیل پایه	انحراف معیار پتانسیل آب پایه	
s.v	df	Hydrotime coefficients ( $\theta_H$ )	base water potential ( $\Psi_{b(50)}$ )	standard deviation of base water potential ( $\sigma_{\psi b}$ )	
Ddeterioration	زوال	3	151488**	2.2**	1.30*
Priming	پرایمینگ	1	27428**	2.0**	0.06 <sup>ns</sup>
Priming × Deterioration	پرایمینگ × زوال	3	1709*	0.3**	0.02 <sup>ns</sup>
Error	خطا	16	391	0.05	0.05
ضریب تغییرات (%)		17	12	20	
Coefficient of variation (%)					

# در تجزیه واریانس، داده‌های مربوط به دو سال انبارداری لحاظ نشده است و پارامترهای مربوط به این تیمار به صورت جداگانه با تیمارهای زوال مصنوعی مقایسه شده است.

#: In variance analysis, the data related to storage during two years not been considered and parameters of this treatment compared to artificial deterioration treatments, separately.

\*, \*\*, ns, به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی‌داری می‌باشند.

\*\*: significant at 1% level, \*: and significant at 5% level and ns: non significant.



شکل ۱. تغییرات ضریب هیدروتایم ( $\theta_H$ ) در شرایط زوال مصنوعی و طبیعی (دو سال انبارداری)، تحت تیمار پرایمینگ و عدم پرایمینگ در بذرهای گندم (رقم کوه‌دشت).

Fig. 1. Hydrotime coefficient ( $\theta_H$ ) in terms of artificial and natural deterioration (two years storage), under primed and non-primed seeds of wheat (cv. Koohdasht).

جدول ۲. ضرایب حاصل از برازش رگرسیون پارامترهای مدل هیدروتایم در مقابل مدت‌زمان زوال مصنوعی برای دو شرایط انجام پرایمینگ و عدم پرایمینگ. a: شیب خط رگرسیون (برای رگرسیون ضریب پتانسیل پایه این عدد نشان‌دهنده شیب قبل از نقطه چرخش می‌باشد)؛ b: عرض از مبدأ رگرسیون (برای رگرسیون ضریب پتانسیل پایه این عدد نشان‌دهنده عرض از مبدأ قبل از نقطه چرخش می‌باشد)؛ c: نقطه چرخش؛ d: شیب خط بعد از نقطه چرخش؛ e: عرض از مبدأ رگرسیون بعد از نقطه چرخش c.

Table 2. The coefficients resulted from regression analysis related to hydrotime model parameters versus duration of artificial deterioration on two priming and non-priming conditions. a: Slope of regression (for regression of base potential coefficient this number represented the slope before rotation point); b: Intercept of the regression (for regression of base potential coefficient this number represented the intercept before rotation point); c: rotation point; d: line slope after the rotation point c; e: intercept after the rotation point c.

ضرایب coefficients	ضریب هیدروتایم Hydrotime coefficients ( $\theta_H$ )		پتانسیل پایه base water potential ( $\Psi_{b(50)}$ )		انحراف معیار پتانسیل آب پایه standard deviation of base water potential ( $\sigma_{\Psi b}$ )
	پرایمینگ priming	بدون پرایمینگ non-priming	پرایمینگ priming	بدون پرایمینگ non-priming	مجموع پرایمینگ و بدون پرایمینگ Priming+ non-priming
a	14.8 ± 2.2	29.6 ± 3.7	-0.06 ± 0.08	-0.61 ± 0.08	0.20 ± 0.03
b	39.4 ± 7.3	66.4 ± 12.6	-1.97 ± 0.08	-1.97 ± 0.14	0.60 ± 0.10
c	-	-	3.12 ± 0.30	1.99 ± 0.17	-
d	-	-	0.40 ± 0.16	0.56 ± 0.06	-
e	-	-	-2.90 ± 0.23	-4.2 ± 0.14	-
R <sup>2</sup>	0.82**	0.86**	0.90**	0.89**	0.81**

\*\* نشان‌دهنده معنی‌داری رگرسیون در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

\*\* indicated a significant regression in probability level of 1%.

به‌منظور محاسبه حدود اطمینان برای هر یک از ضرایب رگرسیون هیدروتایم و پتانسیل پایه مقدار t استیودنت در سطح احتمال ۵ درصد، برابر ۲/۲۳ و برای ضرایب رگرسیون انحراف معیار پتانسیل آب پایه برابر ۲/۰۷ می‌باشد.

In order to calculate of confidence limits for each hydrotime regression coefficient and base potential the value of t-student is equal to 2.23 In 5% level and for regression coefficients of standard deviation of base water potential is equal to 2.07.

شاهد با افزایش زوال تا ۱/۹۹ روز، مقدار این ضریب منفی‌تر (افزایش مقاومت به خشکی) شد. بعد از این مدت با افزایش مدت زوال، مقدار این ضریب افزایش یافت. همچنین در شرایط انبارداری طبیعی پرایمینگ تأثیر معنی‌داری بر مقدار ضریب ( $\Psi_{b(50)}$ ) نداشت (شکل ۲). مقدار این ضریب برای تیمار دو سال زوال در مقایسه با بذرها زوال نیافته (برای هر دو تیمار پرایمینگ و شاهد) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۲).

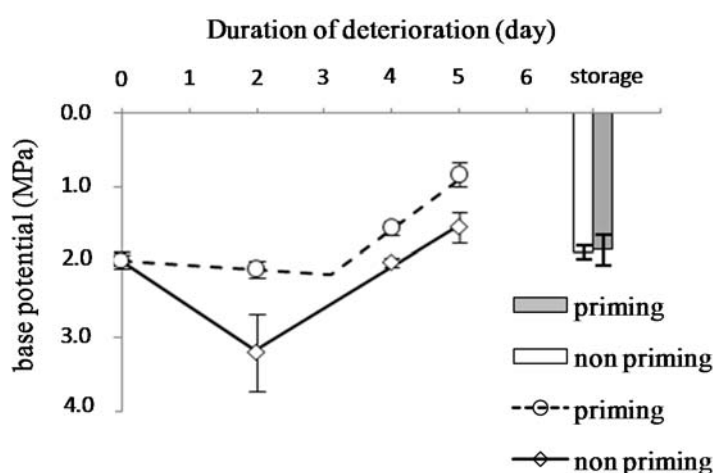
علت منفی‌تر شدن این ضریب در ۱/۹۹ روز زوال را می‌توان به پرایمینگ دمایی ارتباط داد (Gurusinghe et al., 2002). در بسیاری از گیاهان زراعی، قرار دادن بذرها در معرض دماهای پایین یا بالا باعث بهبود جوانه‌زنی و سبز شدن می‌شود (Wang et al., 2003). برخی محققان بیان داشته‌اند که اگر بذرها به مدت کوتاهی در معرض دمای بالا (۴۱-۴۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گیرند تحمل به تنش‌های محیطی در آن‌ها افزایش می‌یابد که علت آن افزایش مقدار پروتئین‌های شوک گرمایی در این تیمارها می‌باشد

ضریب  $\Psi_{b(50)}$  شاخصی برای نشان دادن تحمل به خشکی در مرحله جوانه‌زنی می‌باشد. هر چه مقدار این شاخص منفی‌تر باشد بیانگر مقاومت بیشتر به خشکی می‌باشد (Bradford and Still, 2004; Alimaghani and Ghaderi-Far, 2015). در شکل ۲ رابطه بین زوال و ضریب ( $\Psi_{b(50)}$ ) در شرایط انجام و عدم انجام پرایمینگ نشان داده شده است. در تیمار پرایمینگ، با افزایش مدت زوال تا ۳/۱۲ روز مقدار این ضریب تغییری نداشت؛ اما با بیشتر شدن مدت زوال از مدت ۳/۱۲ به بعد، مقدار آن افزایش یافت که بیانگر این موضوع است که تیمار پرایمینگ در بهبود میزان مقاومت به خشکی تأثیر مثبتی نداشت؛ اما در شرایط زوال شدید میزان مقاومت به خشکی به‌صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد. به ازای افزایش مدت زوال پس از ۳/۱۲ روز، ضریب ( $\Psi_{b(50)}$ ) به مقدار ۰/۴ مگاپاسکال در روز زوال افزایش یافت (جدول ۲، شکل ۲).

برای تیمار شاهد روند تغییرات ضریب  $\Psi_{b(50)}$  در مقابل مدت زوال نسبت به تیمار پرایمینگ متفاوت بود. در تیمار

احتمال وجود دارد که در بذرهای گندم که ۲ روز در این شرایط قرار می‌گیرند پروتئین‌های شوک گرمایی افزایش یافته و در نتیجه مقاومت به خشکی آن‌ها افزایش یابد. با وجود اینکه پرایمینگ باعث بهبود ضریب مدل هیدروتایم شد، اما تأثیری بر ضریب پتانسیل آب‌پایه نداشت و باعث منفی‌تر شدن این ضریب نشد؛ به عبارت دیگر پرایمینگ باعث بهبود مقاومت به خشکی نشد (شکل ۲).

(Wisniewski et al., 1996; Vierling, 1997). این تغییرات به پایداری پروتئین‌ها کمک کرده و باعث حفظ فعالیت آن‌ها می‌شود (Bäurle, 2016). این پروتئین‌ها با وزن مولکولی پایین می‌باشند که در تنش‌های محیطی افزایش می‌یابند و باعث ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی می‌گردند (Queitsch et al., 2000; Sun et al., 2002; Nath and Deb, 2010; Omar et al., 2011). اینک در آزمون تسریع پیری (زوال مصنوعی) بذرها به مدت کوتاهی در معرض دما و رطوبت نسبی بالا قرار می‌گیرند این

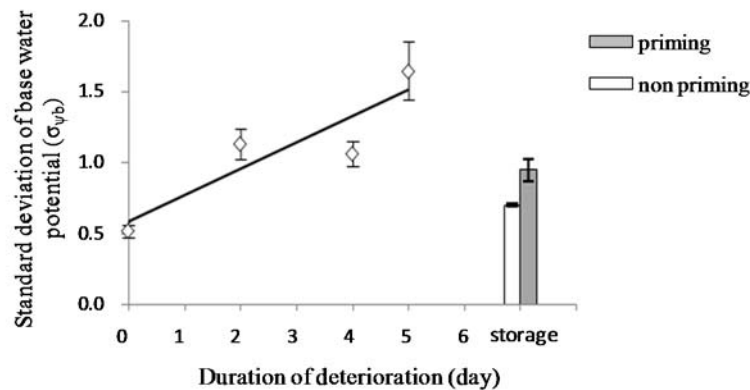


شکل ۲. تغییرات ضریب پتانسیل پایه پنجاه درصد ( $\Psi_{b(50)}$ ) در شرایط زوال مصنوعی و طبیعی (دو سال انبارداری) تحت تیمار پرایمینگ و عدم پرایمینگ بذرهای گندم (رقم کوه‌دشت).

Fig. 2. Changes in coefficient of base potential of fifty percent ( $\Psi_{b(50)}$ ) in terms of artificial and natural deterioration (two years storage) under priming and non-priming Treatments of wheat seeds (cv. Kohdasht).

با افزایش شدت زوال یکنواختی جوانه‌زنی بذرهای گندم کاهش یافت (شکل ۳) و بذرها غیریکنواخت جوانه زدند. در بذرهای انبارداری شده به مدت دو سال، در شرایط انجام پرایمینگ یکنواختی جوانه‌زنی به صورت معنی‌داری کاهش یافت. همچنین بذرهای انبارداری شده در مقایسه با بذرهای بدون زوال دارای یکنواختی جوانه‌زنی کمتری (ضریب انحراف معیار پتانسیل آب‌پایه بیشتر) بودند (شکل ۳).

سومین پارامتر مدل هیدروتایم که نشان‌دهنده یکنواختی جوانه‌زنی می‌باشد، ضریب انحراف معیار پتانسیل آب‌پایه ( $\sigma_{\Psi_b}$ ) می‌باشد. هر چه مقدار عددی این ضریب کمتر باشد بیانگر این مطلب است که بذرها با یکنواختی بیشتری جوانه می‌زنند (Alimaghani and Ghaderi-Far, 2015). همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود اثر زوال مصنوعی بر ضریب انحراف معیار پتانسیل آب‌پایه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. نتایج تجزیه رگرسیون نشان داد که



شکل ۳. تغییرات ضریب انحراف معیار پتانسیل آب پایه ( $\sigma_{\psi_b}$ ) در شرایط زوال مصنوعی و طبیعی (دو سال انبارداری).  
**Fig. 3. Changes in standard deviation coefficient of base water potential ( $\sigma_{\psi_b}$ ) in terms of artificial and natural deterioration (two years storage).**

### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که با استفاده از مدل هیدروتایم و ضرایب آن می‌توان اثرات تیمارهای زوال و پرایمینگ را بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی بذرهای گندم به‌طور روشن بررسی کرد؛ زیرا ضرایب این مدل دارای مفهوم بیولوژیک هستند و قابل تفسیر می‌باشند. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که: ۱. زوال باعث کاهش سرعت جوانه‌زنی (افزایش ضریب هیدروتایم) بذرهای گندم شد و پرایمینگ باعث بهبود سرعت جوانه‌زنی بذرهای زوال یافته در مقایسه با بذرهای شاهد گندم شد.

۲. زوال باعث کاهش مقاومت به خشکی بذرهای زوال یافته گندم شد و پرایمینگ در بذرهای گندم منجر به بهبود مقاومت به خشکی زوال یافته نگردید.  
 ۳. زوال باعث کاهش یکنواختی جوانه‌زنی بذرهای گندم شد و با اعمال تیمار پرایمینگ یکنواختی جوانه‌زنی تغییر نکرد.  
 ۴. به‌طور کلی نتایج نشان داد که زوال باعث کاهش سرعت جوانه‌زنی، یکنواختی جوانه‌زنی و مقاومت به تنش خشکی بذرهای گندم شد و پرایمینگ تنها باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی شده و بر یکنواختی و مقاومت به خشکی بذرهای زوال یافته گندم تأثیری نداشت.

### منابع

- Ahmadpour Dehkordi, S., Balouchi, H.R., 2012. Effect of seed priming on antioxidant enzymes and lipids peroxidation of cell membrane in black cumin (*Nigella sativa*) seedling under salinity and drought stress. *Electronic Journal of Crop Production*. 5, 63-85.
- Akram-Ghaderi, F., Soltani, A., Sadeghipour, H.R., 2008. Effect of temperature and water potential on germination of medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo*. convar. *pepo* var. *styriaca*), black cumin (*Nigella sativa* L.) and borago (*Borago officinalis* L.). *Journal of Agricultural Science and Natural Resources*. 15, without page number. [In Persian with English Summary].
- Alimaghani, S.M., Ghadri-Far, F., 2015. Hydrotim model: Introduction and application of this model in seed researches. *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 7, 41-52.
- Anda, A., Pinter, L., 1994. Sorghum germination and development as influenced by soil temperature and water content. *Agronomy Journal*. 86, 621-624.
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2005. Pre sowing seed treatment Ashotgun approach to improve germination, plant growth, and crop



- yield under saline and nonsaline conditions. *Advances in Agronomy*. 88, 223- 265.
- Ashraf, M., Rauf, H., 2001. Inducing salt tolerate in maize (*Zea mays* L.) through seed priming with chloride salts: growth and ion transport at early growth stages. *Acta Physiologiae Plantarum*. 23, 407- 414.
- Baalbaki, R.Z., Zurayk, R.A. Blelk, M.M., Tahouk, S.N., 1999. Germination and seedling development of drought tolerant and susceptible wheat under moisture stress. *Seed Science and Technology*. 27, 291-302.
- Bäurle, I., 2016. Plant Heat Adaptation: priming in response to heat stress [version 1; referees: 2 approved]. *F1000 Faculty Reviews*. 5, 1-5.
- Bradford, K.J., 1990. A water relation analysis of seed germination rates. *Plant Physiology*. 94, 840-849.
- Bradford, K.J., Somasco, O.A., 1994. Water relations of lettuce seed thermoinhibition. I. Priming and endosperm effects on base water potential. *Seed Science Research*. 4, 1-10.
- Bradford, K.J., 2002. Application of hydrothermal time to quantifying and modeling seed germination and dormancy. *Weed Science*. 50, 248-260.
- Bradford, K.J., Still, D.W., 2004. Application of hydrotime analysis in seed testing. *Journal of Seed Technology*. 26, 74-85.
- Basra, S.M.A., Ahmad, N., Khan, M.M., Iqbal, N., Cheema, M.A., 2003. Assessment of cotton seed deterioration during accelerated aging. *Seed Science and Technology*. 31, 531-540.
- Chandran Jisha, K., Puthur, J.T., 2016. Seed priming with beta-amino butyric acid improves abiotic stress tolerance in rice seedlings. *Rice Science*. 23, 242-254.
- Cheng, Z., Bradford, K.J., 1999. Hydrothermal time analysis of tomato seed germination responses to priming treatment. *Journal of Experimental Botany*. 50, 89-99.
- Dahal, P., Bradford, K.J., 1990. Effects of priming and endosperm integrity on seed germination rates of tomato genotypes. II. Germination at reduced water potential. *Journal of Experimental Botany*. 41, 1441-1453.
- Demir Kaya, M., Okçu, Gamze, Atak, M., Çikili, Y., Kolsarici, Ö., 2006. Seed treatment to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy*. 24, 291-295.
- Espanany, A., Fallah, S., Tadayyon, A., 2016. Seed priming improves seed germination and reduces oxidative stress in black cumin (*Nigella sativa*) in presence of cadmium. *Industrial Crops and Products*. 79, 195-204.
- Fujikura, Y., Kraak, H.L., Basra, A.S., Karssen, C.M., 1993. Hydropriming, a simple and inexpensive priming method. *Seed Science and Technology*. 21, 693-642.
- Ghaderi-Far, F., Soltani, A., 2010. *Seed Control and Certification*. Jihad University press of Mashhad. 200 p. [In Persian].
- Ghaderi-Far, F., 2013. Different effects of priming on emergence and yield of wheat in saline soil conditions. The final report of the research project. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. [In Persian with English Summary].
- Ghaderi-Far, F., Soltani, A., Sadeghipour, H.R., 2014. Changes in soluble carbohydrates and reactive oxygen species-scavenger enzymes activity in Medicinal Pumpkin during storage at different temperature and seed moisture. *Electronic Journal of Crop Production*. 7, 157-179. [In Persian with English Summary].
- Ghassemi-Golezani, K., Chadordooz-Jeddi, A., Nasrollahzadeh, S., Moghaddam, M., 2010. Effects of Hydro-Priming Duration on Seedling Vigour and Grain Yield of Pinto Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 38, 109-113.
- Gurusinghe, S., Powell, A.L.T., Bradford, K.J., 2002. Enhanced expression of BiP is associated with treatments that extend storage longevity of primed tomato seeds. *American Society of Horticultural Science*. 127, 528-534.
- Harris, D., Pathan, A.K., Gothkar, P., Joshi, A., Chivasa, W., Nyamudeza, P., 2001. On-farm seed priming: using participatory methods to revive and refine a key technology. *Agricultural Systems*. 69, 151-164.
- Hucl, P., 1993. Effect of temperature and moisture stress on the germination of diverse common bean genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*. 73, 697-702.
- Hus, J.L., Sung, J.M. 1997. Antioxidant role of glutathione associated with accelerated aging

- hydration of triploid watermelon seeds. *Physiologia plantarum*. 100: 967-974.
- Jacobson, S.E., Bach, A.P., 1998. The influence of temperature on seed germination rate in quinoa. *Seed Science and Technology*. 26, 515-523.
- Larsen, S.U., Bailly, C., Côme, D., Corbineau, F., 2004. Use of the hydrothermal time model to analysis interacting effects of water and temperature on germination of three grass species. *Seed Science Research*. 14, 35-50.
- McDonald, M.B., 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*. 27, 177-237.
- Meyer, S.E., Pendleton, R.L., 2000. Genetic regulation of seed dormancy in *Purshia tridentata* (Rosaceae). *Annals of Botany*. 85, 521-529.
- Michel, B.E., Kaufmann, M.R., 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant physiology*. 51, 914-916.
- Murungu, F.S., Chiduzza, C., Nyamugafata, P., Clark, L.J., Whalley, W.R., Finch Savage, W.E., 2004. Effects of on-farm seed priming on consecutive daily sowing occasions on the emergence and growth of maize in semi-arid Zimbabwe. *Field Crops Research*. 89, 49-57.
- Nath, S., Deb, B., 2010. Abiotic stress tolerance mechanism of plants by heat shock proteins: A review. *Biotechnology*. 3, 45-49.
- Nawaz, A., Farooq, M., Ahmad, R., Bsra, S.M.A., Lal, R., 2016. Seed priming improves stand establishment and productivity of no till wheat grown after direct seeded aerobic and transplanted flooded rice. *European Journal of Agronomy*. 76, 130-137.
- Omar, S.A., Fu, Q.T., Chen, M.S., Wang, G.J., Song, S.Q., Elsheery, N.I., Fu Xu, z., 2011. Identification and expression analysis of two small heat shock protein cDNAs from developing seeds of biodiesel feedstock plant *Jatropha curcas*. *Plant Science*. 181, 632-637.
- Queitsch, C., Hong, S.W., Vierling, E., Lindquist, S., 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in arabidopsis. *The Plant Cell*. 12, 479-492.
- Poori, K., Akbari, F., Ghaderi-Far, F., 2012. Response of deteriorated cotton seed to salinity stress at germination and seedling growth stages. *Journal of Plant Production*. 19, 53-68. [In Persian with English Summary].
- Rehman, H., Nawaz, Q., Basra, S.M.A., Afzal, I., Yasmeen, A., ul-Hassan, F., 2014. Seed Priming Influence on Early Crop Growth, Phenological Development and Yield Performance of Linola (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Integrative Agriculture*. 13, 990-996.
- Rowse, H.R., Finch-Savage, W.E., 2003. Hydrothermal threshold models can describe the germination response of carrot (*Daucus carota*) and onion (*Allium cepa*) seed populations across both sub- and supra-optimal temperatures. *New Phytologist*. 158, 101-108.
- Ruan, S., Xue, Q., Tylkowska, K., 2002. The influence of priming on germination of rice (*Oryza sativa* L.) seeds and seedling emergence and performance in flooded soil. *Seed Science and Technology*. 30, 61-67.
- Soltani, A., Galeshi, S., Zeinali, E., Latifi, N., 2002. Germination, seed reserve utilization and seedling growth of chickpea as affected by salinity and seed size. *Seed Science and Technology*. 30, 51-60.
- Soltani, A., 2008. Application of SAS in statistical analysis. Jihad University press of Mashhad. 182 p. [In Persian].
- Soltani, E., Akram-Ghaderi, F., Maemar, H., 2008. The effect of priming on germination components and seedling growth of cotton seeds under drought. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources*. 14, without page number. [In Persian with English Summary].
- Soltani, E., Galeshi, S., Kamkar, B., Akramghaderi, F., 2009. The effect of seed aging on the seedling growth as affected by environmental factors in wheat. *Research Journal of Environmental Science*. 3, 184-192.
- Soltani, E., Miri, A.A., Ghaderi-Far, F., 2009. The effect of seed priming on emergence and yield of cotton at different sowing dates. *Journal of Plant Production*. 16, 163-174. [In Persian with English Summary].
- Springer, T.L., 2005. Germination and early seedling growth of chaffy-seeded grasses at negative water potentials. *Crop Science*. 45, 2075-2080.

- Still, D.W., Bradford, K.J., 1998. Using hydrotime and ABA-time models to quantify seed quality of brassicas during development. American Society of Horticultural Science. 123, 692-699.
- Sun, W., Van Montagu, M., Verbruggen, N., 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1577, 1-9.
- Wang, H.Y., Chen, C.L., Sung, J.M., 2003. Both warm water soaking and matricondi-tioning treatments enhance anti-oxidation of bitter gourd seeds germinated at sub-optimal temperature. *Seed Science and Technology*. 31, 47-56.
- Vierling, E., 1997. The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Acta Physiologiae Plantarum*. 19, 539-547.
- Windauer, L., Altuna, A., Benech-Arnold, R., 2007. Hydrotime analysis of *Lesquerella fendleri* seed germination response to priming treatments. *Industrial Crops and Products*. 25, 70-74.
- Wisniewski, M., Close, T.J., Timothy, A., Arora, R., 1996. Seasonal patterns of dehydrins and 70-kDa heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants. *Physiologia Plantarum*. 96, 496-505.