تأثیر جیبرلین و اسید سالیسیلیک بر ویژگی‌های جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بذور فرسوده کدوی تخم کاغذی

صغری قهرمانی*[۱]، محمد صدقی[۲]، حوریه توکلی[۳]

[۱]کارشناسی‌ارشد علوم و تکنولوژی بذر، دانشگاه محقق اردبیلی

[۲]دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی

[۳]کارشناسی‌ارشد زراعت، دانشگاه محقق اردبیلی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۲۶

چکیده

فرسودگی طی انبارداری مهمترین عامل خسارت به بذر است. به‌منظور بررسی اثر برخی هورمون‌های گیاهی بر ویژگی‌های جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بذور فرسوده کدوی تخم کاغذی آزمایشی در سال ۱۳۹۳ در دانشگاه محقق اردبیلی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح فرسودگی (صفر، ۵ و ۱۰ روز فرسوده شده) و سه سطح پرایمینگ (آب یا شاهد، جیبرلین (۱۰۰ ppm) و اسید سالیسیلیک (۱۰۰ ppm) بود. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که فرسودگی درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی را کاهش داد. پرایمینگ سبب کاهش تاثیر فرسودگی و بهبود درصد (۲٤ درصد) و سرعت جوانه‌زنی (۱۰/۸ درصد) گردید. فرسودگی و پرایمینگ موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به‌ترتیب به میزان ۷ و ۲/۸۵ برابر نسبت به شاهد شد. بیشترین میزان پرولین (۰/۹۲ میکروگرم بر گرم وزن تر) بر اثر فرسودگی شدید و عدم پیش‌تیمار قابل مشاهده بود و کمترین میزان آن (۰/۲۸ میکروگرم بر گرم وزن تر) مربوط به کاربرد اسید سالیسیک و عدم فرسودگی بود.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، اسیدسالیسیلیک، پرولین، جیبرلین، کدوی تخم‌کاغذی.

مقدمه

کدوی تخم کاغذی از جمله گیاهانی است که به صورت سنتی از دانه‌های آن برای دفع کرم کدو استفاده می‌شده است. بعدها پژوهش‌ها نشان داد که دانه‌های این گیاه و روغن حاصل از آن حاوی مواد موثره ارزشمندی است که نقش عمده‌ای در معالجه غده پروستات، مداوای سوزش مجاری ادراری و معالجه تصلب شرایین دارد. مصرف دانه‌های این گیاه سبب افزایش مقاومت بدن در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌شود. کدوی تخم کاغذی از اهمیت فراوانی در صنایع دارویی برخوردار است و در طب سنتی بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Fu et al., 2006).

در تعریف پری (Perry, 1972)، قدرت بذر یک مشخصه فیزیولوژیک وابسته به ژنوتیپ است و توانایی بذر برای تولید سریع گیاهچه در مزرعه و سطح تحمل آن در برابر شرایط نامساعد محیطی را تعیین می‌کند که به نظر این محقق، قدرت بذر تحت تاثیر ساختار ژنتیکی و عوامل محیطی تغییر می‌کند. عوامل متعددی روی قدرت بذر موثرند

*نویسنده مسئول: soghra.ghahremani67@gmail.com

که مهم‌ترین آن‌ها ساختار ژنتیکی، محیط و تغذیه گیاه مادر، ذخایر بذر، مرحله رسیدگی در زمان برداشت، پاتوژن‌ها، صدمات مکانیکی و فرسودگی بذر می‌باشند (Perry, 1980).

بعد از ساختار ژنتیکی، فرسودگی بذر بیشترین تأثیر را بر قدرت بذر دارد (Ellis and Raberts, 1980). فرسودگی یا پیری بذر به فرآیند از دست رفتن کیفیت بذر با گذشت زمان اطلاق می‌شود و توانایی بذر برای زنده ماندن را کاهش می‌دهد. پیری بذر موجب کاهش درصد و سرعت سبز شدن گیاهچه‌ها و در نتیجه سبب افت محصول دانه می‌شود (Ghassemi-Golezani et al., 1996). پدیده‌های زیادی در دوره پیری بذرها روی گیاه مادر و انبار رخ می‌دهند که عامل افت قدرت و قوه زیست آن‌ها می‌باشند.

فرسودگی بذر موجب تخریب DNA شده و این امر منجر به اختلال در فرآیند نسخه‌برداری و در نهایت عدم سنتز آنزیم‌های ضروری (آمیلازها و آنتی اکسیدان‌ها) مورد نیاز برای مراحل اولیه جوانه‌زنی بذر می‌گردد. بدون فعالیت آنزیمی مناسب، ذخایر بذر هیدرولیز نشده و در نتیجه مولکول‌های لازم برای سنتز حامل‌های انرژی نظیر ATP قابل دسترس نخواهند بود (McDonald, 1999).

اختلالات غشایی یکی از دلایل اصلی فرسودگی بذر است که در نتیجه آن سلول‌های بذر توانایی نگهداری موقعیت و وظیفه طبیعی‌شان را نخواهند داشت. عامل اصلی این اختلالات افزایش سطح اسیدهای چرب آزاد و تولید رادیکال‌های آزاد از طریق پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد (Grilli et al., 1995). هنگامی که فرسودگی بذر افزایش می‌یابد غشای سلولی نفوذپذیری خود را از دست داده و به متابولیت‌های سیتوپلاسمی اجازه ورود به درون فضای بین سلولی را می‌دهد. تخریب غشا هم از طریق هیدرولیز فسفولیپیدها توسط فسفولیپاز و هم به وسیله اکسیداسیون فسفولیپیدها اتفاق می‌افتد (Al-Maskri et al., 2004).

پرایمینگ بذر روش آبگیری کنترل شده تا مرحله قبل از ظهور ریشه‌چه است و از روش‌های موثر بر بهبود ظهور سریع و یکنواخت گیاهچه‌ها به شمار می‌رود. نظر کلی در مورد این فرایند تاثیر مثبت آن در کاهش زمان لازم برای جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه و نیز درصد جوانه‌زنی نهایی و ظهور تحت شرایط نامساعد مخصوصا برای بذرهای با قدرت رشد پایین می‌باشد. پرایمینگ بذر منجر به بهبود کارایی بذر می‌شود، بنابراین یک ایده مطرح می‌شود که پرایمینگ می‌تواند برخی از وقایع مخرب که طی فرسودگی بذر رخ می‌دهند را معکوس کند (Black and Bewley, 2009). گزارش‌های متعدد پرایمینگ بذر را عامل افزایش ساخت RNA ریبوزومی، تولید بیشتر DNA میتوکندریایی (Bradford, 1986)، افزایش فعالیت آلفا و بتا آمیلاز (Powell, 1998)، بهبود جوانه‌زنی تحت شرایط تنش شوری، خشکی، سرما و هم‌چنین افزایش توانایی بذر در تکمیل فرآیند جوانه‌زنی طی شرایط دمایی پایین معرفی کرده است. پرایمینگ سبب تغییر مقدار پروتئین‌ها می‌شود اما نوع آن‌ها ثابت است (McDonald, 1999).

خیساندن بذور با مطلوب‌ترین غلظت هورمون‌های رشد گیاهی، افزایش جوانه‌زنی و همچنین افزایش کارایی رشد و عملکرد را در پی دارد. هورمون‌های گیاهی که بطور معمول برای پرایمینگ استفاده می‌شود، اکسین (IAA, IBA, NAA)، جیبرلین‌ها (GA)، کینتین، اسید آبسیزیک (ABA)، پلی‌آمین‌ها[1]، اتیلن و اسید سالیسیلیک می‌باشد. جیبرلین‌هاشامل گروهی از هورمون‌ها هستند که بیشترین دخالت مستقیم را در کنترل و تسهیل جوانه‌زنی بذر دارند. افزایش سنتز و آزاد سازی اسیدجیبرلیک (GA_3) در بذر موجب تجزیه نشاسته و تبدیل آن به مواد قابل استفاده جنین شده و جوانه‌زنی شروع می‌شود. اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گوناگونی از اسید سالیسیلیک بر سیستم‌های گیاهی

1- Polyamines

مشاهده شده است که شامل افزایش جذب و انتقال یون، جوانه‌زنی بذر، نفوذپذیری غشا، تنفس میتوکندریایی، بسته شدن روزنه‌ها، سرعت رشد و شدت فتوسنتز می‌باشد (Afzal et al., 2006).

توکل افشاری و همکاران (Tavakol Afshari et al., 2007) در تحقیق خود نشان دادند که هورمون اسید آبسیزیک سبب ترمیم‌پذیری بذرهای زوال یافته کلزا شد که این امر منجر به افزایش درصد جوانه‌زنی نسبت به بذور بدون پرایمینگ گردید. هورمون پرایمینگ با سیتوکنین، اکسین و جیبرلین تحت غلظت صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ ppm بر روی بروموس باعث افزایش صفات مختلف جوانه‌زنی و رشد در گیاهچه‌های زوال یافته بروموس شد (Esvand et al., 2010). هدف از این آزمایش بررسی تاثیر جیبرلین و اسید سالیسیلیک بر فرایند جوانه‌زنی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بذور فرسوده کدوی تخم کاغذی بود.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تاثیر جیبرلین و اسید سالیسیلیک بر بذور فرسوده کدوی تخم کاغذی (*Cucurbita pepo* L.) آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۹۳ در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر دانشکده‌ی علوم کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. فاکتور اول فرسودگی در سه سطح (صفر، ۵، ۱۰ روز فرسوده شده) و فاکتور دوم پرایمینگ (آب (شاهد)، جیبرلین، اسیدسالیسیلیک) بود.

به‌منظور تهیه توده‌های بذری با درجه فرسودگی متفاوت، بذرهای کدوی‌تخم‌کاغذی پس از ضدعفونی سطحی به سه قسمت مساوی تقسیم گردید. یک قسمت به‌عنوان شاهد بدون فرسودگی در نظر گرفته شد و دو قسمت دیگر برای اعمال فرسودگی در درون پارچه‌های توری گذاشته شد و به درون آون با دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۹۵ درصد به مدت ۵ و ۱۰ روز منتقل شد (Tavakkoli Kakhki et al., 2005). هر روز در چند نوبت بذور درون توری‌ها زیرورو شد تا بذور به طور یکنواخت فرسوده شود. یک قسمت از بذور پس از پنج روز و قسمت دیگر پس از ده روز از آون خارج گردید. بدین‌ترتیب سه توده بذری با درجات فرسودگی متفاوت فراهم گردید.

پس از تهیه غلظت‌های هورمونی (۱۰۰ ppm)، بذور به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۰ درجه درون محلول‌های اسید سالیسیلیک، جیبرلین و آب خیسانده شد (Alivand et al., 2012). در پایان این مدت تمامی بذور سه بار با آب معمولی و یک بار با آب مقطر شستشو و سپس بذور به‌مدت یک روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا خشک شوند. برای انجام آزمون جوانه‌زنی استاندارد، تعداد ۲۵ بذر از هر تیمار به روش بین کاغذی (BP) درون پتری‌دیش‌های ١٤ سانتی‌متری کشت شد (ISTA, 2009). شمارش بذور جوانه‌زده به‌صورت روزانه و به‌مدت ۷ روز انجام گردید. معیار جوانه‌زنی یک بذر، رشد ریشه‌چه و خروج آن به میزان ۲ میلی‌متر از پوسته بذر در نظر گرفته شد. سرعت جوانه‌زنی در این پژوهش با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Ellis and Raberts, 1980):

$$GR=\sum_{I=1}^{N}\frac{Si}{Di}$$

فرمول ۱

در این فرمول،

GR= سرعت جوانه‌زنی (تعداد بذور جوانه زده در هر روز)، Si= تعداد بذور جوانه زده در هر روز، Di= تعداد روزتا شمارشnام، N=تعداد دفعات شمارش

برای آزمون رشد گیاهچه پس از باز شدن کامل برگ‌های لپه‌ای، ده گیاهچه‌ی نرمال از هر تیمار انتخاب و صفات طول ریشه‌چه و ساقه‌چه (به وسیله خط‌کش) اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز: برای استخراج عصاره حاوی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ۰/۱ گرم از بافت ساقه‌چه پس از انجماد در نیتروژن مایع داخل هاون چینی واقع بر روی یخ به خوبی سائیده شد. سپس با افزودن ۱۰-۵ میلی‌لیتر از بافر استخراج هموژنیزه گردید. عصاره حاصل به داخل سانتریفوژ یخچال‌دار منتقل شد و در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، به‌مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. سپس با استفاده از روشناور فعالیت آنزیم کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز با روش کار و میشرا (Kar and Mishra, 1976) اندازه‌گیری شد.

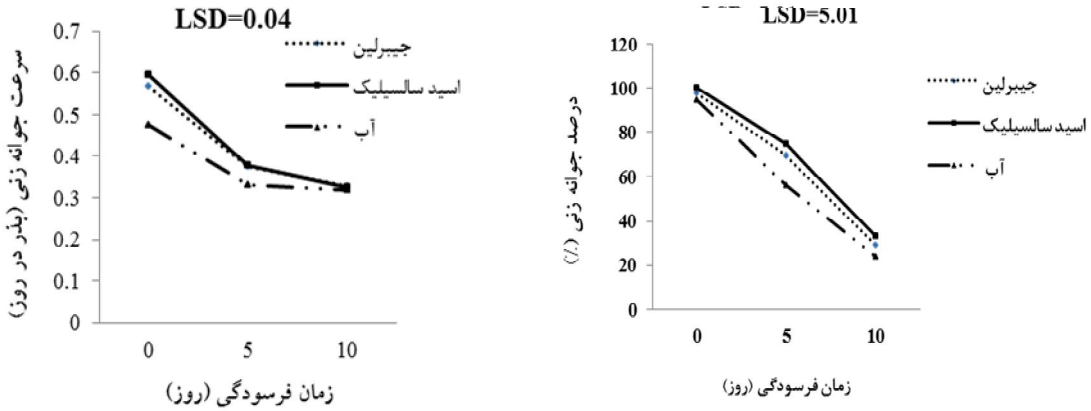
مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز شامل بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با اسیدیته ٦,٨، گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ٤۰ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت این آنزیم در طول موج ٤۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم در نهایت بر حسب $\mu mol.g^{-1} Fw.min^{-1}$ بیان گردید. سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز طبق روش کار و میشرا (Kar and Mishra, 1976) همراه با تغییراتی انجام شد. به ۲,۸ میلی‌لیتر بافر فسفات منوسدیک ۲۵ میلی‌مولار با pH برابر ٦,٨، پیروگالول ۱۰ میلی‌مولار (۱۰۰ میکرولیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. فعالیت آنزیم با اضافه کردن پیروگالول به مخلوط واکنش شروع شد. محلول بلانک حاوی ۲,۹ میلی‌لیتر بافر فسفات منوسدیک ۲۵ میلی‌مولار با pH برابر ٦,٨ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. فعالیت آنزیم در طول موج ٤۲۰ نانومتر براساس شدت رنگ نارنجی پورپوروگالین تولید شده در زمان‌های ٤۰ و ۱۰۰ ثانیه پس از افزودن پیروگالول اندازه‌گیری شد. برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز به ۲,۸ میلی‌لیتر بافر فسفات منوسدیک با pH برابر ٦,٨، عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر) و آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار اضافه شد. فعالیت آنزیمی با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش شروع شد. محلول بلانک حاوی ۲,۹ میلی‌لیتر بافر فسفات منوسدیک ۲۵ میلی‌مولار با pH برابر ٦,٨ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. میزان کاهش جذب نور در طول موج ۲٤۰ نانومتر مابین زمان‌های ۱۵ و ۷۵ ثانیه بعد از اضافه کردن آب اکسیژنه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب $\mu mol.g^{-1} Fw.min^{-1}$ بیان گردید.

سنجش مقدار پرولین: اندازه‌گیری پرولین با استفاده از روش بیتس و همکاران (Bates et al.,1973) انجام گرفت. به این صورت که مقدار g ۰/۱ بافت گیاهچه در ml ۱۰ سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳٪ سائیده شده و با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه در دمای °C ٤ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس در لوله جداگانه دیگری، به ml ۲ از عصاره حاصل، ml ۲ معرف ناین‌هیدرین و ml ۲ اسید اسیتیک گلاسیال خالص اضافه شده و لوله‌ها به‌مدت h ۱ در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از اضافه کردن ml ٤ تولوئن به هر کدام از لوله‌ها، به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. پس از تشکیل دو فاز جداگانه، فاز بالایی رنگی، با دقت جدا و مقدار جذب در دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج nm ۵۲۰ قرائت شد. غلظت پرولین براساس میکرومول بر گرم وزن تر تعیین شد.

کلیه تجزیه‌های آماری و مقایسه میانگین‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و SPSS 18 انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده گردید. رسم شکل و نمودارها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

نتایج

درصد جوانه‌زنی: نتایج پژوهش نشان داد که اثر متقابل فرسودگی و پرایمینگ بر درصد جوانه‌زنی معنی‌دار بود (جدول ۱) و این صفت با تشدید فرسودگی کاهش یافت. همانطور که شکل (۱) نشان می‌دهد کاربرد جیبرلین و اسیدسالیسیلیک توانست درصد جوانه‌زنی را افزایش دهد. اما تاثیر اسیدسالیسیلیک بیشتر از جیبرلین بود. به طوری‌که بیشترین درصد جوانه‌زنی (۱۰۰ درصد) در اثر کاربرد اسیدسالیسیلیک و بدون فرسودگی مشاهده شد. در حالی‌که کمترین درصد جوانه‌زنی (۲٤ درصد) مربوط به بذور تیمار نشده با هورمون در فرسودگی شدید (۱۰ روز فرسودگی) بود.**سرعت جوانه‌زنی:** اثر متقابل فرسودگی و پرایمینگ بر سرعت جوانه‌زنی معنی‌دار شد (جدول ۱). فرسودگی منجر به کاهش سرعت جوانه‌زنی شد، اما کاربرد هورمون حتی در شرایط بدون فرسودگی نیز منجر به افزایش سرعت جوانه‌زنی شد که نشان می‌دهد کاربرد اسیدسالیسیلیک و جیبرلین سرعت جوانه‌زنی را حتی در شرایط مساعد افزایش داده و منجر به استقرار سریع گیاهچه می‌گردد. با توجه به مقایسه میانگین اثرات متقابل بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۰/۵۹ بذر در روز) مربوط به پیش‌تیمار اسیدسالیسیلیک و بذور بدون فرسودگی بود. کم‌ترین سرعت جوانه‌زنی (۰/۳۱) نیز تحت تاثیر فرسودگی شدید (۱۰ روز) و در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل۲).



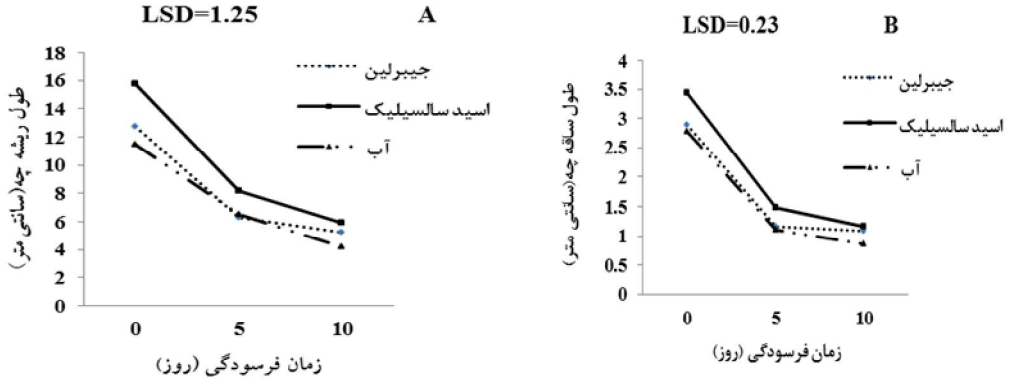
شکل۱- تاثیر پرایمینگ و فرسودگی بر درصد جوانه‌زنی **شکل۲**- تغییرات سرعت جوانه‌زنی تحت تاثیر فرسودگی و پرایمینگ

طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه: طول ریشه‌چه و ساقه‌چه تحت تاثیر پرایم با هورمون و فرسودگی قرار گرفتند (جدول۱). مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها نشان داد که پیش‌تیمار با جیبرلین تاثیر مثبتی بر طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در همه سطوح فرسودگی داشت؛ اما کاربرد اسیدسالیسیلیک طول ریشه‌چه و ساقه‌چه را بیشتر از جیبرلین تحت تاثیر قرار داد و موجب افزایش این صفات شد. به‌طوری که بیشترین طول ریشه‌چه (۱۵/۷۳ سانتی‌متر) و طول ساقه‌چه (۳/٤۳ سانتی‌متر) با پیش‌تیمار اسیدسالیسیلیک و در بذور فرسوده نشده بدست آمد. تشدید فرسودگی سبب کاهش طول ریشه‌چه در همه تیمارها شد. کمترین مقدار طول ریشه‌چه (٤/۲۳ سانتی‌متر) و ساقه‌چه (۰/۸سانتی‌متر) در اثر فرسودگی (۱۰ روز) و پیش‌تیمار با آب قابل مشاهده بود (شکل ۳).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر فرسودگی و پرایمینگ بر روی صفات اندازه‌گیری شده در گیاهچه کدوی تخم کاغذی

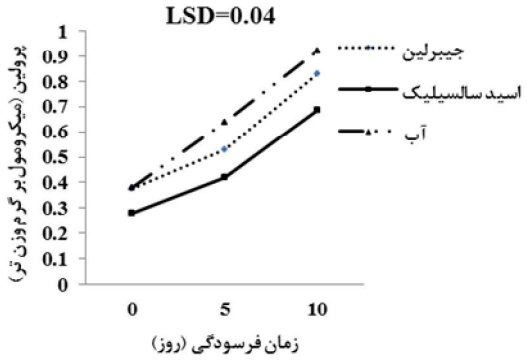
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	پرولین	پلی‌فنل اکسیداز	کاتالاز	پراکسیداز
فرسودگی	۲	۱۰۵۷۸/۳۷**	۰/۱۲۷۱**	۱۶۵/۹۲**	۱۰/۸۹۵**	۰/۴۹۶۴**	۰/۲۰۸۴**	۱/۷۱۱۶**	۰/۱۹۸**
پرایمینگ	۲	۲۵۸/۰۳۷**	۰/۰۰۸۷	۱۵/۳۶**	۰/۴۶۴**	۰/۰۷۸۲**	۰/۱۶۹۸**	۰/۴۷۵۲**	۰/۷۸۹**
فرسودگی× پرایمینگ	۴	۳۹/۷*	۰/۰۰۲۶*	۲/۱۳*	۰/۰۴۶*	۰/۰۰۴۲*	۰/۰۰۳۱*	۰/۱۵۱۸**	۰/۰۰۶۰۷**
خطا	۱۸	۱۶/۰۰	۰/۰۰۲۷	۰/۵۳۳۲	۰/۰۱۹۲	۰/۰۰۱۶۳	۰/۰۰۲۳	۰/۰۰۶۳	۰/۰۰۱۱۳
ضریب تغییر (٪)		۶/۲۲	۱۲/۵۷	۸/۶	۷/۸۲	۷/۱۵	۱۰/۱۳	۱۲/۲۱	۷/۸۴

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد



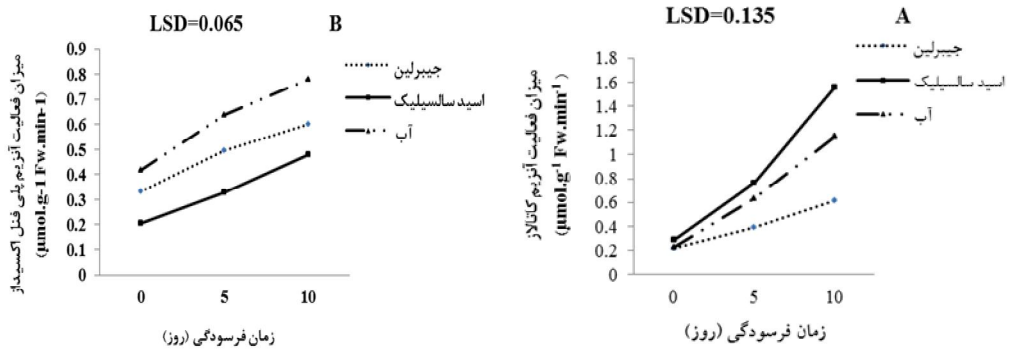
شکل ۳- تاثیر پیش‌تیمار با هورمون بر طول ریشه‌چه (A) و طول ساقه‌چه (B) تحت تاثیر فرسودگی

میزان پرولین: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل هورمون‌های جیبرلین و اسیدسالیسیلیک بر میزان پرولین معنی‌دار بود (جدول۱). افزایش سنتزپرولین در اثر فرسودگی به‌صورت صعودی قابل مشاهده بود؛ اما کاربرد پیش تیمارهای هورمونی از میزان سنتز پرولین کاست به‌طوری‌که بیشترین میزان این اسمولیت در اثر فرسودگی شدید و عدم پیش‌تیمار قابل مشاهده بود و کم‌ترین میزان آن مربوط کاربرد اسیدسالیسیک و عدم فرسودگی بود (شکل ٤).

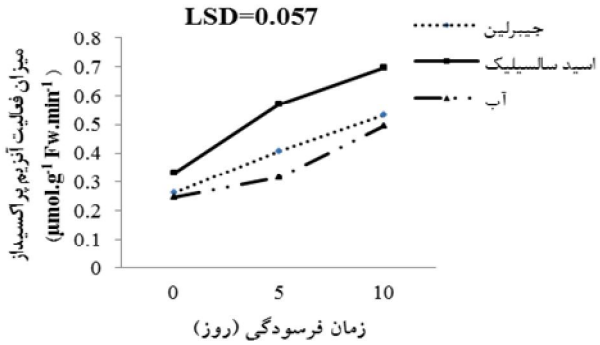


شکل ٤- تغییر میزان پرولین در اثر پیش‌تیمار و فرسودگی

فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز: طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل فرسودگی و پرایمینگ تاثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز داشت. معنی‌دار بودن اثر متقابل تیمارهای آزمایشی را می‌توان به متفاوت بودن واکنش هورمون‌ها در فرسودگی‌های مختلف نسبت داد. همان‌گونه که شکل ٥ (A, B) نشان می‌دهد میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در اثر تشدید فرسودگی افزایش یافته است؛ اما کاربرد جیبرلین و اسیدسالیسیلیک فعالیت این دو آنزیم را به شدت افزایش دادند، در حالی که در شرایط بدون فرسودگی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای هورمونی درمورد فعالیت کاتالاز و پراکسیداز وجود نداشت. این موضوع نشان‌دهنده تاثیر هورمون اسیدسالیسیلیک در پاسخ دفاعی گیاه نسبت به تنش وارد شده است. همچنین بررسی شکل ٦ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تحت تاثیر فرسودگی و پیش‌تیمار افزایش یافته است؛ اما تاثیر تیمارهای هورمونی کمتر از تاثیر عدم پیش‌تیمار می‌باشد.



شکل ۵- تاثیر کاربرد هورمون‌های گیاهی بر فعالیت کاتالاز (A) و پلی فنل اکسیداز (B) تحت تاثیر فرسودگی



شکل ٦- میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تاثیر هورمون‌ها و فرسودگی

بحث

فرسودگی سبب تغییرات مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعدد می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که فرسودگی درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی را کاهش داد. این نتایج با یافته‌های هسو و همکاران (Hsu et al., 2003) مطابقت داشت. کاهش جوانه‌زنی و سرعت آن را می‌توان به افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان طی فرسودگی نسبت داد. در بین تیمارهای بهبود دهنده، تاثیر اسیدسالیسیلیک بیشتر از جیبرلین بود. پرایمینگ سبب کاهش تاثیر فرسودگی و بهبود درصد و سرعت جوانه‌زنی گردید. پرایمینگ با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی می‌شود (Hsu et al., 2003). تنش‌های محیطی که فرسودگی نیز از آن جمله است موجب افزایش انواع اکسیژن فعال می‌شود اکسیژن فعال نیز موجب انتقال سیگنال شده و پاسخ دفاعی را فعال می‌کند. افزایش پراکسیدهیدروژن و رادیکال های آزاد در سیتوپلاسم سلول‌ها در طی فرسودگی، منجر به غیرفعال شدن فعالیت های فتوسنتتیک شده و عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را سبب می‌شود. همچنین کاهش پیوستگی پروتئین‌ها در طی فرسودگی اتفاق افتاده و باعث افزایش حساسیت پروتئین‌ها به آنزیم‌های تجزیه‌کننده می‌گردد و در نهایت کاهش قوه‌نامیه بذور مشاهده می‌شود (Berlett and Stadtman, 1997). بنابراین تغییرات درصد و سرعت جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز بر همین اساس می‌باشد. پرایمینگ با کاهش عوارض زوال، موجب ترمیم بیان ژن‌های مربوط به فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود. همچنین پرایمینگ موجب کاهش خسارت غشای سلولی شده و تولید رادیکال‌های

آزاد اکسیژن را کاهش می‌دهد و از این طریق می‌تواند موجب افزایش جوانه‌زنی شود. آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌توانند با کم کردن میزان رادیکال‌های آزاد از فرسودگی بذر جلوگیری و روند آن را کندتر کنند، ولی کاهش مقدار آنتی‌اکسیدانت‌ها پس از ادامه یافتن روند فرسودگی می‌تواند نشان دهنده شکست مکانیسم دفاعی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت بذر در برابر این رادیکال‌ها باشد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بذر در روزهای اول فرسودگی افزایش می‌یابند، ولی با افزایش روند فرسودگی قابلیت دفاع را از دست می‌دهند و از مقدار آن‌ها کاسته می‌شود (Kaewnaree et al., 2011). کاتالاز به حفظ هموستازی اکسیژن فعال در زمان ایجاد تنش کمک می‌کند، فعالیت آن در گیاه به هنگام تنش افزایش یافته (Magbanua et al., 2007) و سنتز آن یک پاسخ سازگار یافته در برابر تنش اکسیداتیو می‌باشد (Mittler, 2002). اسید سالیسیلیک به عنوان یک مولکول علامت دهنده شناخته شده است که نقش عمده‌ای را در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی در گیاهان ایفا می‌کند. کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک عملکرد گیاهی را تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش می‌دهد و همچنین این هورمون مرگ سلولی را در مواجهه با انواع تنش ها کنترل می‌کند. یکی از واضح‌ترین علایم و نشانه مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی تحت تاثیر اسید سالیسیلیک تغییر در میزان بیان پروتئین‌ها می‌باشد (Mauch et al., 2001).

گزارشات متعددی مبنی بر نقش اسید سالیسیلیک بر کاهش اثرات ناشی از تنش‌ها وجود دارد. از جمله اسید سالیسیلیک با اثر بر روی آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی مانند کاتالاز (Slaymarker et al., 2002)، سوپراکسید دیسموتاز، پلی‌فنل‌اکسیداز (Dat et al.,1998)، پراکسیدازها (El-Tayeb, 2005)، متابولیت‌هایی مانند آسکوربیک اسید، گلوتاتیون (Borsanio et al., 2001) تاثیر گذاشته و منجر به افزایش آنها می‌گردد. اسید سالیسیلیک باعث تجمع آبسزیک اسید و ایندول استیک اسید نیز می‌شود ولی بر روی سیتوکنین تاثیری ندارد .اسید سالیسیلیک گسترش، تقسیم و مرگ سلولی را تنظیم کرده، و در واقع بین رشد و پیری تعادل ایجاد می‌نماید (Popova et al., 1997).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش با وجود اینکه جیبرلین توانست به جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های فرسوده کمک کند؛ اما تاثیر کاربرد اسیدسالیسیلیک بیشتر از این هورمون بود که شاید به علت تاثیر اسیدسالیسیلیک در افزایش پاسخ دفاعی و تحمل گیاه بوده باشد.

References

Afzal, I., Basra, S., Farooq, M., and Nawaz, A. 2006. Alleviation of salinity stress in spring wheat by hormonal priming with ABA, salicylic acid and ascorbic acid. Agricultural and Biology. 1:23-28.

Alivand, R., Tavakol Afshari, R., and Sharifzade, F. 2012. Effect of gibberellin, salicylic acid and ascorbic acid on seed germination characteristics in deteriorated rape seed. Iranian Journal of Field Crop Science. 43(4): 561-571.

Al-Maskri, A.Y., Khan, M.M., JavedIqbal, M., and Abbas, M. 2004. Germinability, vigour and electrical conductivity changes in accelerated aged watermelon (*Citrullusl anatus* L.) seeds. J Food Agric Environ. 3: 100-103.

Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free Proline for water stress studies. Plant soil. 39: 205-208.

Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J. Biol. Chem. 272: 20313-20316.

Black, M., and Bewley, J.D. 2009. Seed Technology and its Biological Basis. Translated by R, TavakkolAfshari. A, AbbasiSurki. E, Ghasemi. University of Tehran Press. 515 pages.

Borsanio, O., Valpuesta, V., and Botella, M.A. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol*. 126: 1024-1030.

Bradford, K.J. 1986. Manipulation of seed water relation via osmotic priming to improve germination under stress conditions. Horticultural Science. 21:1105-1111.

Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, CH., and Scott, I.M. 1998. Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermo tolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. Plant Physiol. 116: 1351–1357.

Ellis, R., and Roberts, E.H. 1980. Towards a rational basis for testing seed quality. In: P.D. Hebblethwaite (ed.) Seed Production. Butterworth's, London. pp. 605-635.

El-Tayeb, M.A. 2005. Response of barley gains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. Plant Growth Regul. 45: 215-225.

Esvand, H.R., Alizadeh, M.A., and Fekri, A. 2010. How hormonal of aged and non-aged seeds of brome grass affects seedling physiological characters. Journal of New Seeds. 1: 52-64.

Fu, C.L., Shi, H. Li, Q.H. 2006. A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. Plant Foods for Hum. Nutr. 61:73-80.

Ghasemi-Golezani, K., Salehian, V., Rahimzadeh Khoie, F., and Moghaddam, M. 1996. Effect of seed vigor on seedling emergence and grain yield of wheat. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. 3: 48-54.

Grilli, I., Bacci, E., Lombardi, T., Spano, C., and Floris, C. 1995. Natural Aging: Poly (A) polymerase in germination embryos of *Triticum durum* wheat. Ann Bot. 76: 15–21.

Hsu, C.C., Chen, C.L., Chen, J.J., and Sung, J.M. 2003. Accelerated aging-enhanced lipid peroxidation in bitter gourd seeds and effects of priming and hot water soaking treatments. Scientia Horticulture. 98, 201-212.

International Seed Testing Association. 2008. International rules for seed testing (supplement). Seed. Sci. Technol. 27: 1-333.

Kaewnaree, P., Vichitphan, S., Klanrit, P., Siri, B., and Vichitphan, K. 2011. Effect of accelerated Aging Process on Seed Quality and Biochemical Changes in Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.) Seed Biotech. 10(2): 175-182.

Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology. 578: 315-319.

Magbanua, Z.V., Moraes, C.M.D., Brooks, T.D., Williams, W.P., and Luthe, D.S. 2007. Is Catalase Activity One of the Factors Associated with Maize Resistance to *Aspergillus flavus*. Molecular Plant Microbe Interact. 20(6): 697–706.

Mauch, F., Mauch-Mani, B., Gaille, C., Kull, B., Haas, D., and Reimmann, C. 2001. Manipulation of salicylate content in Arabidopsis thaliana by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. 25: 67–77.

McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. Seed Sci. Technol. 27: 177-237.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405-410.

Perry, D.A. 1980b. Seed vigor and seedling establishment. Adv. Res. Technol. seeds. 5:25-40.

Perry, D.A. 1972. Seed vigour and field establishment. Hort. Abs. 42: 334-342.

Popova, L., Pancheva, T., and Uzunova, A. 1997. Salicylic acid: Properties, Biosynthesis and Physiological role. Plant Physiol. 23: 85-93

Powell, A.A. 1998. Seed improvement by selection and invigoration. Sci. Agric. Piracicaba. 55:126-133.

Slaymarker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D. Pozo, O.D., Martin, G.B., and Klessig, D.F. 2002. The Tobacco salicylic acid-banding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydras, which exhibition antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. PNAS. 99 (18): 11640-11645.

Tavakkoli Kakhki, H. R., Beheshti, A., and Nassiri Mahalati, M. 2005. Evaluation of seed vigor tests for determining alfalfa seed quality. Iranian Journal of Field Crops Research. 3(1): 25-34.

Tavakol Afshari, R., Afshari, S., and Majnon Hoseini, N. 2007. Effect of Abscisic acid and Cytokines on seed germination and vigor of deterioration rape seed under high drought stress. Journal of Agronomy Sciences. 39: 164-179.