نشریه علمی ـ پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد دهم، شماره ۲(۳۸)، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۵۲۸-۵۰۹

پیش‌تیمار بذر کنجد (*Sesamum indicum* L.) با پرولیـــن و اثربخشی آن بر جوانه‌زنی در دماهای متفاوت

نصیبه توکلی[1*]، علی عبادی[2]، حوریه توکلی[1] و پیام تیزفهم[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۴/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹

چکیده

به‌منظور بررسی تاثیر پرولین و دما بر میزان اسمولیت‌ها، میـــزان آنزیم‌های آنتی اکسیدان و شـــاخص‌های جوانه‌زنی کنجد، آزمایشی در سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح پرولین (صفر، ۵، ۱۰ میلی‌مولار) و دماهای مختلف جوانه‌زنی (۱۵، ۲۵، ۳۵ درجه سلسیوس) بودند. نتایج آزمایش نشان‌دهنده تاثیر مثبت پرولین بر شاخص‌های جوانه‌زنی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پرولین، پروتئین و تحرک ذخایر غذایی بود. به‌طوری که، کاربرد خارجی (اگزوژنیک) پرولین منجر به افزایش میزان این اسمولیت در گیاهچه‌ها گردید. همچنین، دماهای ۱۵ و ۳۵ درجه سلسیوس نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس منجر به تولید پرولین کمتری شدند. میزان آنزیم پراکسیداز نیز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کمتر از دماهای ۱۵ و ۳۵ درجه سلسیوس برآورد شد و افزایش پرولین منجر به افزایش میزان این آنزیم در دماهای مـورد بررسی گردید. در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با کاربـــرد ۱۰ میلی‌مولار پرولین بیشترین میزان کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز مشاهده گردید. همچنین، میزان این آنزیم‌ها در دماهای ۱۵ و ۳۵ درجه سلسیوس نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس کاهش نشان داد. با توجه به افزایش کارآیی ذخایر غذایی و شاخص قدرت بذر، درصد و سرعت جوانه‌زنی، میزان پرولین، پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اثر کاربرد پرولین به نظر می‌رسد که پیش‌تیمار بذر با پرولین می‌تواند یکی از راهکارهای مناسب برای جوانه‌زنی بهتر آن تحت شرایط تغییرات دما باشد.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، پرولین، پروتئین، شاخص‌های جوانه‌زنی بذر، کنجد.

۱- دانشجوی دکتری رشته فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته زراعت دانشگاه محقق اردبیلی

(* نگارنده‌ی مسئول) nasibehtavakoli93@gmail.com

مقدمه

کنجد (*Sesamum indicum*) گیاهی دانه‌روغنی می‌باشد که محصول مناطق گرم و نیمه‌گرمسیری است، با این‌وجود ارقام جدید آن در مناطق معتدل نیز کشت می‌گردند (Weise, 2000). دانه‌ی کنجد حاوی روغن با ارزشی است که بسته به شرایط محیطی و نوع رقم ممکن است میزان آن به ۴۵ تا ۶۲ درصد برسد و به دلیل وجود یک ترکیب آنتی‌اکسیدان به نام سزامولین[۱]، روغن آن از پایداری زیادی برخوردار می‌باشد (Hamalata and Chafooranissa, 2007). دما یکی از مؤلفه‌های محیطی می‌باشد که می‌تواند موجب ایجاد تنش در گیاهان شود (Pessarakli, 2001). از جمله پاسخ‌های گیاهان به انواع دماهای نامطلوب تجمع تنظیم کننده‌های اسمزی از جمله پلی‌آمین‌ها، قندهای محلول، برخی از پروتئین‌ها مانند پروتئین شوک حرارتی (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1999) و پرولین می‌باشد (Ashraf and Foolad, 2007; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1999). پرولین از تجزیه اسیدهای آمینه ضروری از جمله لیزین، متیونین (Tavakoli *et al*., 2014)، آرژنین و گلوتامات (Turkan, 2011) ساخته می‌شود. با این وجود، به دلیل اثرات نامطلوب تنش‌های محیطی، گیاهان نمی‌توانند به مقدار مورد نیاز تنظیم کننده‌های اسمزی را تولید کنند. بنابراین، کاربرد پرولین در شرایط تنش‌های محیطی، مؤثر واقع می‌شود، به‌طوری‌که بعد از جذب، غلظت درون سلولی آن افزایش می‌یابد (Ashraf and Foolad, 2007). تجمع پرولین در طی تنش، نقش محافظتی چندگانه داشته و افزایش تجمع آن در گیاهان منجر به محافظت از غشاهای سلولی شده و از آسیب به آنزیم‌ها در تنش‌های مختلف جلوگیری می‌کند (Ashraf and Foolad, 2007; Hasegawa *et al*., 2000; Okuma *et al*., 2000 & 2002). همچنین، پرولین به‌وسیله حفظ هموستازی ردوکس (Chen *et al*., 2006; Hoque *et al*., 2008) و مهار انواع اکسیژن فعال (Chen and Dickman, 2005; Chen *et al*., 2006) سلول‌های گیاهی را در برابر تنش محافظت می‌کند. هانگ و همکاران (Hong *et al*., 2000) اعلام کردند که نقش پرولین در مهار رادیکال‌های آزاد بیشتر از نقش اسمزی این اسید آمینه می‌باشد.

کاربرد اگزوژن پرولین از طریق تنظیم پروتئین‌های محافظت‌کننده (Khedr *et al*., 2003)، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی (Banu *et al*., 2009; Demiral and Turkan, 2004; Okuma *et al*., 2004) و جلوگیری از اکسیداسیون پروتئین‌ها (Hoque *et al*., 2008) موجب تحمل به تنش می‌شود. تنش‌های مختلف از جمله تنش دما موجب القاء انواع اکسیژن فعال می‌شوند (Pessarakli, 2001). ROSها ترکیبات سمی فعالی می‌باشند که می‌توانند از طریق آسیب به پروتئین‌ها، لیپیدها، DNA و کربوهیدرات‌ها منجر به مرگ سلولی شوند (Apel and Hirt, 2004; Banu *et al*., 2009; Guo *et al*., 2009)، همچنین، آنها مولکول‌های سیگنالی را فعال می‌کنند که ترکیبات واسطه‌ای کلیدی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی می‌باشند. این سیگنال‌ها می‌توانند با فعال کردن سیستم دفاع فیزیولوژیکی گیاه از جمله افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش تنظیم‌کننده‌های اسمزی از آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو جلوگیری کنند (Pessarakli, 2001). آزمایش‌های انجام شده توسط دیگر پژوهشگران نشان‌دهنده افزایش فعالیت کاتالاز (Aggarwal *et al*., 2011) پراکسیداز (Yan *et al*.,

۱- Sesamolin

2000; Hua and Guo, 2002)، افزایش رشد (Okuma *et al*., 2000)، افزایش درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و محتوای پرولین (Deivanai *et al*., 2011) در اثر کاربرد پرولین بوده است. با وجود بررسی‌های مختلف در مورد کاربرد اگزوژن پرولین در برابر تنش‌های مختلف (Cha-Um and Kirdmanee, 2010; Heuer, 2003) تاثیر این اسیدآمینه کمتر در مرحله جوانه‌زنی بر روی دماهای مختلف در گیاه کنجد مورد پژوهش قرار گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی میزان تغییرات جوانه‌زنی، تحرک ذخایر غذایی و میزان تحمل به تنش دمایی از طریق بررسی پرولین، پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بود.

مواد و روش‌ها

جهت بررسی پیش‌تیمار پرولین بر شاخص‌های جوانه‌زنی، میزان کارایی تحرک ذخایر غذایی و تحمل به تنش در شرایط دماهای مختلف آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه تحقیقاتی در دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۳ انجام شد. ابتدا بذرها با هیپوکلرید سدیم ۱۰٪ به‌مدت ۵ دقیقه و اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه ضدعفونی شدند. سپس بذرها درون محلول‌هایی با غلظت‌های (صفر، ۵ و۱۰ میلی‌مولار) پرولین به مدت ۴۸ ساعت (Deivanai *et al*., 2011) خیسانده شد، برای انجام پرایمینگ بذرها تازمانی درون محلول‌هایی قرار می‌گیرند و قبل از خروج ریشه‌چه از محلول خارج (در این پژوهش مشخص شد ریشه‌چه بذرهای کنجد در مدت زمان کمی بیشتر از ۴۸ ساعت خارج می‌شوند) و سپس بذور به مدت یک روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شده تا خشک گردند. در ادامه، بذور پرایم شده به روش بین کاغذ صافی درون پتری‌دیش‌های با قطر درونی ۱۴ سانتی‌متری کشت شده و به ژرمیناتورهای دارای دماهای ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس منتقل شدند. براساس گزارش ایستا (ISTA, 2010) دوره جوانه‌زنی کنجد ۱۰ روز می‌باشد. شمارش تعداد بذرهای جوانه‌زده از روز دوم کاشت آغاز شده و به طور مرتب تا روز دهم ادامه پیدا کرد. شمارش تعداد بذرهای جوانه‌زده بر اساس خروج جوانه دو میلی‌متری به‌صورت روزانه و به‌طور مرتب تا ۱۰ روز ادامه پیدا کرد. سرعت جوانه‌زنی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Scott *et al*., 1984).

$$D = \sum_{t=2}^{t=14} \frac{n}{t}$$

$\overline{D}$ سرعت جوانه‌زنی، n تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز و t تعداد روزها پس از قرار دادن بذرها در پتری‌دیش می‌باشد. درصد جوانه‌زنی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد: $G_P=100.(N_G/N_T)$

G_P درصد جوانه‌زنی، N_G تعداد بذرهای جوانه‌زده و N_T تعداد کل بذرها می‌باشد.

محاسبه شاخص قدرت نیز با استفاده از رابطه زیر انجام شد (Abdul-Baki, and Anderson, 1973).

شاخص وزنی قدرت بذر = میانگین وزن گیاهچه×درصد جوانه‌زنی
شاخص طولی قدرت بذر = میانگین طول گیاهچه×درصد جوانه‌زنی

مقدار استفاده از ذخایر (SRUR, mg seed^{-1})، کارایی استفاده از ذخایر (SRUE, mg mg^{-1}) و کسر ذخایر مصرف شده بذر (FUSR) از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Sedghi *et al*., 2010).

$$SRUR = SDW - RSDW$$
$$SRUE = \frac{SFDW}{SRUR}$$
$$FUSR = \frac{SRUR}{SDW}$$

SDW= وزن خشک بذر (گرم)، RSDW= وزن خشک باقی‌مانده بذر بر حسب گرم (بدون ریشه‌چه و ساقه‌چه)، SFDW= مجموع وزن خشک و تر گیاهچه بر حسب گرم (ریشه‌چه + ساقه‌چه)

در پایان دوره جوانه‌زنی (۱۰ روز) طول و وزن ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاهچه‌ها اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک گیاهچه، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و با استفاده از ترازوی دقیق (۰/۰۰۰۱ گرم) وزن خشک گیاهچه‌ها به‌دست آمد. تغییرات بیوشیمیایی گیاهچه‌ها بعد از ۱۰ روز اندازه‌گیری شد. برای سنجش پروتئین کل ابتدا ۰/۲ گرم نمونه‌تر برگی در هاون چینی در مجاورت نیتروژن به تدریج ساییده شده و با ۰/۶ میلی‌لیتر بافر (شامل Tris-HCl، EDTA و مرکاپتواتانول) استخراج همگن گردید. مخلوط حاصل درون لوله پلاستیکی داخل یخ قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۱۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و روشناور درون لوله‌های جدید به مدت ۲۰ دقیقه در۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. از روشناور[1] حاصل برای اندازه‌گیری پروتئین کل استفاده شد. میزان پروتئین در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1976). برای سنجش مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ابتدا ۰/۵ گرم نمونه‌تر برگی در هاون چینی در مجاورت نیتروژن مایع به تدریج ساییده شده و با ۳ میلی‌لیتر بافر تریس-کلریدریک ۰/۰۵ مولار با pH=۷/۵ هموژن گردید. همگنای حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد (Sudhakar *et al.*, 2001). از روشناور حاصل برای اندازاه‌گیری آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز استفاده شد. برای اندازه‌گیری کاتالاز از روش کار و میشرا (Kar and Mishra, 1976) استفاده شد. به‌این صورت که ۶۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به محلول حاوی بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار، pH =۷) و H_2O_2 (۵ میلی‌مولار) اضافه شد. پس از ورتکس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Smart Spec Plus Bio- RAD, Germany) میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. میزان آنزیم براساس میزان جذب بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. برای اندازه‌گیری پراکسیداز، ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۲/۵ میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی (تریس ۱۰۰ میلی‌مولار، پراکسیدهیدروژن ۵ میلی‌مولار و پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار) اضافه شد. میزان جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر قرائت شد (Kar and Mishra, 1976). پلی‌فنل اکسیداز نیز به روش کار و میشرا (Kar and Mishra, 1976) اندازه‌گیری شد. ابتدا به ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر تریس (۰/۲ مولار)، ۰/۳ میلی‌لیتر از پیروگالل (۰/۰۲ مولار) اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از روشناور به آن اضافه شد. مخلوط واکنش پس از ورتکس به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری پرولین از جوان‌ترین برگ‌ها با استفاده از روش بیتس و همکاران (Bates *et al.*, 1973) انجام گرفت. به این صورت که مقدار ۰/۱ گرم بافت برگی در دو میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳ درصد ساییده شده و با سرعت۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس از عصاره حاصل برای اندازه‌گیری پرولین استفاده شد. جذب در دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ و رسم شکل‌ها با استفاده از Excel انجام شد.

۱- Supernatant

نتایج و بحث

درصد جوانه‌زنی استاندارد: نتایج نشان داد که اثر متقابل پرولین و دما بر آزمون جوانه‌زنی استاندارد معنی‌دار بود (جدول ۱) و این صفت با افزایش غلظت پرولین و دما افزایش یافت. به‌طوری‌که، بیشترین درصد جوانه‌زنی (۱۰۰٪) در اثر کاربرد ۱۰ میلی‌مولار پرولین در دماهای ۱۵ و ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده شد. درحالی‌که کمترین درصد جوانه‌زنی (۵۸/۷۳٪) مربوط به پیش‌تیمار ۵ میلی‌مولار پرولین در دمای ۱۵ درجه سلسیوس بود (شکل ۱). دیوانایی و همکاران (Deivanai *et al*., 2011) مشاهده کردند که کاربرد ۵ و ۱۰ میلی‌مولار پرولین موجب افزایش درصد جوانه‌زنی در شرایط تنش می‌شود اما در آزمایش آنها در شرایط نرمال تفاوتی بین تیمار شاهد و کاربرد پرولین وجود نداشت. ممکن است عدم تاثیر کاربرد ۵ میلی‌مولار پرولین بر درصد جوانه‌زنی احتمالاً به علت کاهش فعالیت برخی از آنزیم‌ها در این تیمار از جمله پلی‌فنل اکسیداز باشد. زیرا پلی‌فنل اکسیداز یکی از آنزیم‌هایی است که در تبدیل فنل‌ها به کوئینون شرکت کرده و در سیستم‌های اکسیداسیون مربوط به بذر و گیاهچه‌های درحال رشد نقش مهمی ایفا می‌کند (Bewley and Black., 1983). یافته‌های این پژوهش نشان داد که پرایمینگ بذر با پرولین می‌تواند منجر به افزایش درصد جوانه‌زنی شود. جوانه‌زنی سریع، یکنواخت و کامل بذرها، موجب سبز شدن مطلوب و رشد اولیه سریع گیاهان می‌شود. رشد اولیه مطلوب نیز منجر به دریافت بیشتر نور خورشید و افزایش عملکرد می‌گردد (Rabie and Bayat, 2009). به نظر می‌رسد کاربرد پرولین با افزایش درصد جوانه‌زنی به بهبود استقرار گیاهچه کمک کرده و موجب بهبود عملکرد می‌گردد. جوانه‌زنی یک فرایند فیزیولوژیک می‌باشد و وابسته به فعالیت آنزیمی است. لذا با افزایش دما تا حد مطلوب برای جوانه‌زنی، گیاه قادر خواهد بود با افزایش فعالیت آنزیمی درصد و سرعت جوانه‌زنی را افزایش دهد. بیشترین درصد جوانه‌زنی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده و درصد جوانه‌زنی در دمای ۱۵درجه سلسیوس کاهش یافت که با نتایج ایزدی دربندی و همکاران (Izadi Darbani *et al*., 2012) مطابقت دارد.

سرعت جوانه‌زنی: اثر متقابل پرولین و دما بر سرعت جوانه‌زنی در سطح ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۱). همان‌طورکه شکل ۲ نشان می‌دهد در شرایط عدم کاربرد پرولین در هر سه دما، میزان سرعت جوانه‌زنی کاهش پیدا کرد ولی کاربرد پرولین سرعت جوانه‌زنی را افزایش داد. به نظر می‌رسد کاربرد ۵ و ۱۰ میلی‌مولار پرولین تفاوت معنی‌داری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ندارند. همچنین، بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۰/۷۵ بذر در روز) به پیش‌تیمار ۵ میلی‌مولار پرولین در دمای ۱۵ درجه سلسیوس تعلق گرفت که با دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس و کاربرد ۵ میلی‌مولار پرولین تفاوت آماری نداشت و کمترین سرعت جوانه‌زنی (۰/۱۶ بذر در روز) نیز تحت دمای ۱۵ درجه سلسیوس و بدون پیش‌تیمار مشاهده شد (شکل۲). سرعت جوانه‌زنی به‌عنوان یکی دیگر از شاخص‌های کیفیت بذر می‌باشد که در اثر پیش‌تیمار با پرولین افزایش نشان داد. هرچه بذر در زمان کمتری، درصد جوانه‌زنی بالاتری داشته باشد، دارای کیفیت مطلوب و بنیه بالاتری است (Rabie and Bayat, 2009). بنابراین، به نظر می‌رسد کاربرد اسمولیتی مانند پرولین با کمک به افزایش قدرت بذر (شکل ۱۰ و ۱۱) موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی می‌شود. با افزایش دما از دمای پایه تا دمای مطلوب به سرعت جوانه‌زنی افزوده می‌شود و سپس، با بیشتر شدن دما نسبت به دمای مطلوب، سرعت جوانه‌زنی کاهش می‌یابد (Zeinali *et al*., 2010). در آزمایشی

که ایزدی دربندی و همکاران (Izadi Darbani *et al*., 2012) بر روی گیاه کنجد انجام دادند نیز سرعت جوانه‌زنی در دمای ۱۵ درجه سلسیوس کمتر از دماهای بالاتر بود.

وزن خشک گیاهچه: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل پرولین و دماهای مختلف بر میزان وزن خشک گیاهچه‌ها معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج نشان داد کاربرد پرولین در دمای پایین تاثیر بیشتری بر افزایش وزن خشک گیاهچه‌ها داشت به طوری‌که در دمای ۱۵ درجه سلسیوس و با کاربرد پرولین بیشترین وزن خشک مشاهده شد در حالی‌که کمترین وزن خشک مربوط به عدم مصرف پرولین در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود (شکل ۳). در پژوهشی که اکوما و همکاران (Okuma *et al*., 2000) انجام دادند با کاربرد ۱۰ میلی‌مولار پرولین در گیاه توتون میزان رشد نسبت به شرایط تنش افزایش نشان داد. آنها عنوان کردند که دلیل آن تاثیر محافظتی پرولین بر غشاهای سلولی و آنزیم‌ها می‌باشد. از نظر اکیس و یلماز (Ekis and Yilmaz, 2003) عواملی که رشد محور جنینی را تحت تاثیر قرار می‌دهد بر انتقال مواد غذایی از لپه به محور جنینی مؤثر بوده و ممکن است علت کاهش وزن خشک تحت تاثیر دماهای بالا به دلیل کاهش انتقال مواد غذایی از لپه به محور جنینی باشد. زیرا، میزان کارایی استفاده از ذخایر غذایی در این پژوهش در دمای ۳۵ درجه سلسیوس کمتر از سایر دماها می‌باشد (شکل ۱۲). پرولین نیز مانند گلایسین بتائین یک اسمولیت خنثی و مفید در گیاه می‌باشد (Ashraf and Foolad, 2007)، تاثیر گلایسین بتائین در افزایش وزن خشک در پژوهش‌های پیشین مشاهده شده است (Aldesuquy *et al*., 2012).

پایداری غشای سلولی تحت تاثیر دما کاهش می‌یابد (Sairam *et al*., 2002) و حتی در شرایط بدون تنش، جوانه‌زنی با افزایش تنفس موجب تولید انواع اکسیژن فعال شده و موجب آسیب به غشاهای سلولی می‌گردد (Mittler, 2002). تخریب غشاء علاوه بر تاثیر مستقیم بر نفوذپذیری انتخابی آن، گرادیان الکتروشیمیایی لازم جهت سنتز ATP را در کلروپلاست و میتوکندری متأثر می‌سازد. پرولین توانایی واکنش مستقیم با رادیکال هیدروکسیل را داشته و به پایداری غشاءها کمک می‌کند. (Sairam *et al*., 2002). ممکن است علت افزایش وزن خشک توسط پیش‌تیمار پرولین به دلیل کاهش خسارت غشاها، افزایش بنیه بذر و افزایش انتقال ذخایر غذایی به سمت مراکز فعال رشدی باشد. زیرا، کاربرد پرولین شاخص قدرت بذر (شکل ۱۰ و ۱۱) و کارایی استفاده از ذخایر غذایی (شکل ۱۲) را افزایش داده است. همچنین، همبستگی وزن خشک با شاخص طولی و وزنی قدرت بذر و کارایی ذخایر غذایی نیز معنی‌دار بود (جدول ۲).

طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه: طول ریشه‌چه تحت تاثیر اثر متقابل پرایمینگ پرولین و دماهای مختلف در سطح احتمال ۱٪ قرار گرفت (جدول۱). مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی نشان داد که با افزایش غلظت پیش‌تیمار، طول ریشه‌چه در دماهای ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس افزایش یافت. به‌طوری که بیشترین طول ریشه‌چه (۱۳/۶۶سانتی‌متر) با پیش‌تیمار ۱۰ میلی‌مولار پرولین در دمای ۱۵ درجه سلسیوس به‌دست آمد. پژوهش‌های دیوانایی و همکاران (Deivanai *et al*., 2011) نیز نشان‌دهنده تاثیر مثبت کاربرد پرولین بر افزایش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه بود. کمترین طول ریشه‌چه (۰/۹۲۷ سانتی‌متر) نیز در دمای ۱۵ درجه سلسیوس و عدم مصرف پرولین (صفر) مشاهده شد (شکل۴-A). همچنین، اثرات اصلی دماها و سطوح مختلف پیش‌تیمار با پرولین بر طول ساقه‌چه معنی‌دار شد (جدول۱). پیش‌تیمار بذر با پـرولین منجر به افـزایش طول

ساقه‌چه شده و بیشترین طول ساقه‌چه (۹/۶۴۴ سانتی‌متر) به پیش‌تیمار ۱۰ میلی‌مولار پرولین تعلق گرفت. همچنین، کمترین میزان طول ساقه‌چه (۰/۷۶ سانتی‌متر) مربوط به عدم پیش‌تیمار پرولین بود. همبستگی وزن خشک گیاهچه با طول ریشه‌چه و ساقه‌چه مثبت و معنی‌دار بود (جدول ۲).

آنزیم کاتالاز: طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل پرولین و دما از نظر میزان آنزیم کاتالاز تفاوت معنی‌داری داشت. معنی‌دار بودن اثر متقابل تیمارهای آزمایشی را می‌توان به متفاوت بودن واکنش پرولین در دماهای مختلف نسبت داد. همان‌گونه که شکل ۵ نشان می‌دهد میزان آنزیم کاتالاز در اثر افزایش دما کاهش یافته است اما کاربرد ۵ میلی‌مولار پرولین دارای اثر افزاینده بر این آنزیم بود، به طوری که این اسمولیت توانست با وجود تنش دمای ۳۵ درجه سلسیوس، میزان کاتالاز را نسبت به زمانی که پرولین در این دما پیش‌تیمار نشده است، افزایش دهد. آگاروال و همکاران (Aggarwal *et al.*, 2011) نیز افزایش میزان فعالیت کاتالاز را در اثر کاربرد پرولین مشاهده کردند. تجمع پرولین علاوه بر کاهش مستقیم آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو می‌تواند با حفاظت از آنزیم‌های درگیر در سیستم آنتی‌اکسیدانی به مهار ROS کمک کند (Ashraf and Foolad, 2007). از آن‌جایی که کنجد یک گیاه گرمادوست می‌باشد به نظر می‌رسد تنش شدید برای این گیاه دمای ۱۵ درجه سلسیوس باشد، زیرا در این دما آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز بیشتر از سایر دماها می‌باشد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیبات با وزن مولکولی پایین این توانایی را دارند که بدون آن‌که خود مورد تغییر قرار گرفته و به مواد مخرب رادیکال تبدیل شود، ROS را مهار کنند (Mittler *et al.*, 2004). همچنین، از نظر هانگ و همکاران (Hong *et al.*, 2000) نقش پرولین در مهار رادیکال‌های آزاد بیشتر از نقش اسمزی این اسید آمینه می‌باشد. بنابراین، یکی از دلایل افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این پژوهش ممکن است ویژگی محافظتی پرولین باشد.

میزان پراکسیداز: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی پرولین و دما بر آنزیم پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌های مربوط به تیمارهای آزمایشی نشان داد که حداکثر پراکسیداز در دمای ۱۵ درجه سلسیوس و کاربرد ۱۰ میلی‌مولار پرولین می‌باشد (شکل۶ a وb). حداقل پراکسیداز نیز به شرایط عدم کاربرد پرولین اختصاص یافت (شکل ۶). افزایش میزان پراکسیداز در دمای پایین (۱۵ درجه سلسیوس) را می‌توان به اثرات سازگاری آن به این شرایط نسبت داد. پژوهش‌های پیشین نیز نشان می‌دهد که کاربرد پرولین موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز نسبت به شرایط نرمال و تنش می‌شود (Yan *et al.*, 2000; Hua and Guo, 2002). از آنجایی که میزان ROS در سلول‌ها، تحت تاثیر میزان پراکسیداز قرار می‌گیرد (Quiroga *et al.*, 2000) و با توجه به نقش محافظتی پرولین نسبت به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (Ashraf and Foolad, 2007) می‌توان بیان کرد که کاربرد پرولین با افزایش این آنزیم موجب تحمل به دماهای پایین در گیاه کنجد شده است. زیرا آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به عنوان اصلی‌ترین آنزیم‌های مهارکننده H_2O_2 شناخته شده‌اند. زند و همکاران (Zand *et al.*, 2010) نیز بیان کردند که میزان خسارت ناشی از ROS با افزایش سطوح آنزیم پراکسیداز گیاه می‌تواند تقلیل یابد.

میزان پلی‌فنل اکسیداز: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل دما و پرولین بر آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (جدول

۱). مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر متقابل تیمارهای آزمایشی نشان داد که بیشترین میزان این آنزیم (۱۱۲/۷۹تغییر در میزان جذب بر میلی‌گرم پروتئین) مربوط به دمای ۱۵ درجه سلسیوس و کاربرد ۱۰ میلی‌مولار پرولین بود و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و کاربرد ۵ میلی‌مولار پرولین کمترین میزان پلی‌فنل اکسیداز (۳۸/۳۹ تغییر در میزان جذب بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد (شکل ۷). افزایش جوانه‌زنی موجب تشدید تنفس شده و میزان تولید پراکسید هیدروژن را افزایش می‌دهد (Mittler, 2002). با وجود این‌که افزایش پراکسید هیدروژن منجر به آسیب سلول‌ها می‌شود، اما می‌تواند سیگنال‌هایی را فعال کند که موجب فعال‌سازی مسیر دفاعی و پاسخ به تنش شود (Desikan *et al*., 2001). ممکن است علت افزایش پلی‌فنل اکسیداز در دمای ۱۵ درجه سلسیوس به همین دلیل باشد. همچنین، از دلایل افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تاثیر پرایمینگ، می‌تواند ساخت DNA جدید در جنین در مدت پرایمینگ و در غیاب سلول‌های تقسیم شونده باشد که به دنبال آن افزایش سرعت سنتز DNA در بافت جنین اتفاق می‌افتد. افزایش سنتز پروتئین و DNA در بذرهای پرایم شده تنها بعد از ۶ تا ۱۲ ساعت پس از اعمال پرایمینگ گزارش شده است (Bray *et al*., 1989). همچنین، همبستگی پلی‌فنل اکسیداز با پرولین مثبت و معنی‌دار بود که نشان‌دهنده تاثیر مثبت پرولین بر میزان پلی‌فنل اکسیداز است (جدول ۲).

میزان پرولین: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی پرولین و دما بر میـــزان پرولین درون‌سلولی معنی‌دار بود (جدول ۱). افزایش کاربرد پرولین اگزوژن منجر به افزایش غلظت پرولین در کنجد شد. بیشترین میزان این اسمولیت در اثر کاربرد ۱۰ میلی‌مولار پرولین و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده شد و کمترین میزان آن مربوط به عدم کاربرد پرولین و دمای ۳۵ درجه سلسیوس بود (شکل ۸). دیوانایی و همکاران (Deivanai *et al*., 2011) نیز افزایش غلظت پرولین را در اثر کاربرد اگزوژن پرولین مشاهده کردند. همچنین همبستگی بین آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز با پرولین مثبت و معنی‌دار بود (جدول ۲) که نشان‌دهنده تاثیر مثبت و محافظتی پرولین بر آنزیم‌های آنتی اکسیدان است، زیرا گزارش‌های زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد پرولین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را محافظت می‌کند (Ashraf and Foolad, 2007; Hasegawa *et al*., 2000; Okuma *et al*., 2000 & 2002; Shah and Dubey, 1998). تجمع انواع اکسیژن فعال در اثر تنش‌های مختلف اتفاق می‌افتد (Pessarakli, 2001). ROS نیز به‌عنوان سیگنال عمل کرده و سنتز پرولین را القا می‌کند. در فرایند سنتز پرولین نیز NADPH، ATP و گلوتامات مصرف می‌شوند. NADPH و ATP از زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی تامین می‌شود. این امر در شرایط وجود تنش حایز اهمیت است زیرا نتیجه آن ادامه چرخه انتقال الکترون در جریان فتوسنتز و عدم تخریب غشاها و ماکرومولکول‌ها به واسطه خاصیت احیاکنندگی NADPH می‌باشد. بنابراین، علاوه بر اینکه پرولین از ماکرومولکول‌ها در برابر تنش محافظت می‌کند، قادر است از طریق کاهش NADPH، به‌طور مستقیم ROS را مهار کند (Turkan, 2011). نتیجه این فرایند نیز افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش می‌باشد که منجر به کند شدن روند کاهش رشد در طی تنش‌های محیطی می‌شود. به طوری‌که نتایج نشان می‌دهد همبستگی پرولین با طول ریشه‌چه و ساقه‌چه مثبت و معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲).

میزان پروتئین: اثر متقابل دما و پرولین تاثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین کل داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل نشان داد که

بیشترین میزان پروتئین کل (۶۱/۳۴ میلی‌گرم بر گرم) در اثر پیش‌تیمار ۱۰ میلی‌مولار پرولین، و دمای ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده شد (شکل ۹). از آثار تجمع انواع اکسیژن فعال در اثر وقوع تنش اکسیداتیو، آسیب به پروتئین‌ها و سایر ترکیبات سلولی می‌باشد و این ترکیبات ممکن است توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی محافظت شود (Mittler *et al*., 2004). سنتز پروتئین‌ها، مکانیسمی در پاسخ به تنش‌های مختلف می‌باشد که منجر به تحمل گیاه در برابر آسیب‌های ناشی از انواع تنش‌ها می‌شود (Maestri *et al*., 2002). در مجموع می‌توان گفت که نقش اسمولیت‌هایی مانند پرولین محافظت از پروتئین‌ها، غشا و آنزیم‌ها از خسارت‌های ناشی از تنش‌های محیطی است (Ashraf and Foolad, 2007). یکی از مکانیسم‌های تحمل گرما، القای پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) می‌باشد. HSPها نقش مهمی در هدایت سیگنال تنش و فعالیت ژن (Nollen and Morimoto, 2002) و تنظیم اکسیداسیون سلولی (Arrigo, 1998) بر عهده دارند. آنها همچنین با دیگر مکانیسم‌های واکنش به تنش از قبیل تولید اسمولیت‌ها (Diamant *et al*., 2001) و آنتی اکسیدان‌ها (Panchuk *et al*., 2002) اثر متقابل دارند. بنابراین، با توجه به نتایج پژوهش کاربرد پرولین با افزایش پروتئین شوک حرارتی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ممکن است اثر تنش دمای نامطلوب را خنثی کرده و موجب افزایش وزن خشک گردد.

شاخص طولی و وزنی قدرت بذر: اثر متقابل پیش‌تیمار و دما بر شاخص طولی و وزنی قدرت بذر معنی‌دار بود (جدول ۱). پیش‌تیمار بذر با پرولین قدرت بذر را افزایش داد. بیشترین شاخص طولی قدرت بذر (۲۴۱۵) مربوط به کاربرد ۱۰ میلی‌مولار پرولین در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود درحالی‌که حداکثر شاخص وزنی قدرت بذر به کاربرد ۱۰ میلی‌مولار پرولین در دمای ۱۵ درجه سلسیوس تعلق گرفت. کم‌ترین مقدار شاخص طولی و وزنی قدرت بذر نیز در شرایط عدم پیش‌تیمار و در دمای ۱۵ درجه سلسیوس مشاهده شد (شکل ۱۰ و ۱۱). شاخص قدرت تحت تاثیر کیفیت بذر، رطوبت و دما قرار می‌گیرد (Walters, 1998). شاخص بنیه روی کیفیت بذرها از طریق جوانه‌زنی نهایی و طول گیاهچه تاثیر می‌گذارد. بذرهایی که دارای شاخص قدرت بالاتری هستند، تنش‌های محیطی را بهتر تحمل می‌کنند. همچنین، علاوه بر داشتن درصد جوانه‌زنی بالا، گیاهچه‌های قوی و عادی تولید می‌کنند (Rabie and Bayat, 2009). افزایش شاخص قدرت و طول ساقه در اثر اعمال پلی‌آمین که همانند پرولین یکی از اسموپروتکتانت‌های مؤثر در تحمل به تنش‌ها است در فلفل قرمز توسط عزیزخان و همکاران (Aziz Khan *et al*., 2012) گزارش شده است. آنها عنوان کردند که پیش‌تیمار بذر با پلی‌آمین به جذب این اسمولیت انجامیده و منجر به افزایش فعالیت‌های متابولیک سلولی شده و در نتیجه جوانه‌زنی و شاخص قدرت افزایش یافته است.

کارایی و کسر ذخایر غذایی: اثر متقابل دما و پیش‌تیمار با پرولین بر کارایی استفاده از ذخایر غذایی معنی‌دار بود (جدول ۱). کاربرد پرولین به عنوان پیش تیمار موجب بهبود تحرک ذخایر غذایی شده و کارایی تحرک ذخایر غذایی را افزایش داد. بیشترین کارایی استفاده از ذخایر بذر (۴/۳۶ میلی‌گرم بر میلی‌گرم) در بذور پرایم شده با ۱۰ میلی‌مولار پرولین در دمای ۱۵ درجه سلسیوس به دست آمد. کمترین مقدار کارایی استفاده از ذخایر بذر (۱/۴۳ میلی‌گرم بر میلی‌گرم) در بذور پیش‌تیمار نشده و دمای ۲۵ درجه سلسیوس حاصل شد (شکل ۱۲). رضایی و همکاران (Rezaei *et al*., 2014) عدم تحرک ذخایر غذایی را به علت کاهش دسترسی محور جنینی به ذخایر لپه‌ها نسبت

دادند. زیرا عواملی که بر سرعت رشد محور جنینی تاثیر دارند، بر تحرک ذخایر و دسترسی آنها به محور جنینی از لپه‌ها نیز دخالت دارند (Akita and Cabuslay, 1990). کسر ذخایر مصرف شده بذر نیز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف پرولین قرار گرفت. بیشترین مقدار این صفت در غلظت بالای پرولین (۱۰ میلی‌مولار) مشاهده شد (شکل ۳). به نظر می‌رسد که افزایش سطح ABA یکی از دلایل اصلی کاهش تحرک ذخایر غذایی در طی جوانه‌زنی باشد (Penfield *et al*., 2004). بنابراین، با توجه به اینکه کاربرد پرولین از طریق ایجاد پتانسیل اسمزی از خسارت‌های ناشی از تنش می‌کاهد (Pessarakli, 201). احتمالاً استفاده از این ماده نیاز به تولید ABA را کاهش می‌دهد و منجر به افزایش کارایی استفاده از ذخایر غذایی می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش نشان‌دهنده افزایش میزان پرولین، درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، شاخص قدرت بذر، کارایی استفاده از ذخایر غذایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اثر کاربرد پرولین بود. با این‌وجود در شرایط بدون پیش‌تیمار با پرولین بیشترین میزان شاخص‌های جوانه‌زنی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قابل مشاهده بود، اما با کاربـرد پـرولین به عنوان پیش‌تیمار بیشترین شاخص‌های جوانه‌زنی به دمای ۱۵ درجه سلسیوس تعلق گرفت. دماهای ۱۵ و ۳۵ سلسیوس درجه نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس موجب کاهش سنتز پرولین شدند که ممکن است به دلیل استفاده گیاه از سایر مکانیزم‌های دفاعی در این دماها باشد. میزان پروتئین نیز با کاربرد پرولین در دمای ۱۵ درجه سلسیوس کاهش و در سایر دماها افزایش نشان داد. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد تحرک ذخایر غذایی در دمای ۱۵ درجه سلسیوس با کاربرد ۱۰ میلی‌مولار پرولین بیشتر بود که ممکن است به علت افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این دماها باشد. ارتباط مثبت پرولین با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اثرات مثبت و محافظت‌کننده پرولین بر آنزیم‌ها را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش به نظر می‌رسد کاربرد پرولین تاثیر مثبتی بر شاخص‌های جوانه‌زنی و مکانیزم دفاعی کنجد در برابر تغییرات دمایی دارد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس پرولین و دما بر صفات مورد مطالعه

Table 1- Analysis of variance for proline and temperature on studied traits

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات M.S.						
		شاخص طولی قدرت بذر Vigor index	شاخص وزنی قدرت بذر Vigor index	وزن خشک گیاهچه Seedling dry weight	طول ساقه‌چه Plumule length	طول ریشه‌چه Radical length	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	درصد جوانه‌زنی Germination percentage
پرولین Proline	2	302956^{**}	0.028^{**}	$84*10^{-7**}$	9.69^{**}	5.64^{ns}	30.11^{**}	363^{**}
دما Temperature	2	8092176^{**}	1.36^{**}	10^{-4**}	179.14^{**}	278^{**}	1842.5^{**}	985^{**}
دما ×پرولین Proline× Temperature	4	228927^{**}	0.099^{**}	$54*10^{-7*}$	1.62^{ns}	8.41^{**}	37.87^{**}	354^{**}
خطا Error	18	35194	0.01	$12*10^{-7}$	1.111	1.6	2.38	16
ضریب تغییرات CV (٪)	-	19	10	11.13	21.31	23.45	4.86	4.42

** ، * و ns به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و غیر معنی‌دار.

ns: non significant, *, **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

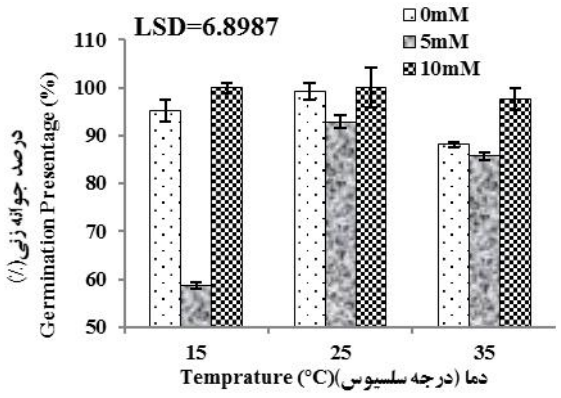
ادامه جدول ۱

Table 1- Continued

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات M.S.						
		کارایی ذخایر غذایی SRUE	کسر ذخایر غذایی FUSR	پلی‌فنل اکسیداز Polyphenol oxidase	پراکسیداز Peroxidase	کاتالاز Catalase	پروتئین Protein	پرولین Proline
پرولین Proline	2	0.94^{**}	$19*10^{-4**}$	5705^{**}	12239^{**}	3839^{**}	407.82^{**}	3.9^{**}
دما Temperature	2	8.4^{**}	$24*10^{-5\ ns}$	1441^{*}	5137^{**}	2228^{**}	351.8^{**}	0.54^{**}
دما ×پرولین Proline× Temperature	4	0.45^{*}	$137*10^{-7\ ns}$	1125^{*}	630^{ns}	734^{**}	624.18^{**}	0.046^{ns}
خطا Error	18	0.1	$12*10^{-5}$	373	242	118	18.18	0.076
ضریب تغییرات CV(٪)	-	11	1.22	26	16.14	21.2	14.32	12.87

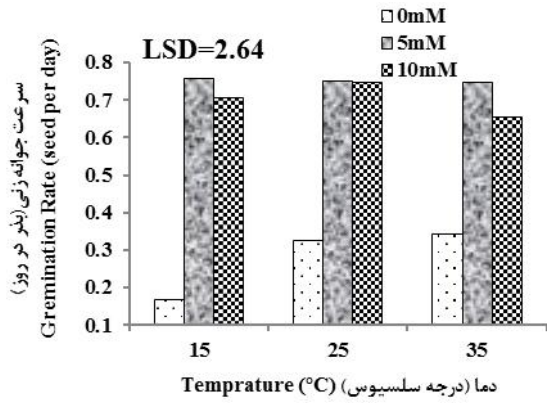
** ، * و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و غیر معنی‌دار.

ns: non significant, *, **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.



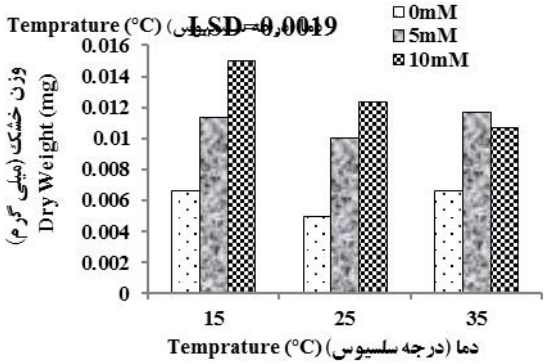
شکل ۱- تاثیر پرولین و دما بر درصد جوانه‌زنی

Figure 1- Effect of proline and temperature on germination percentage



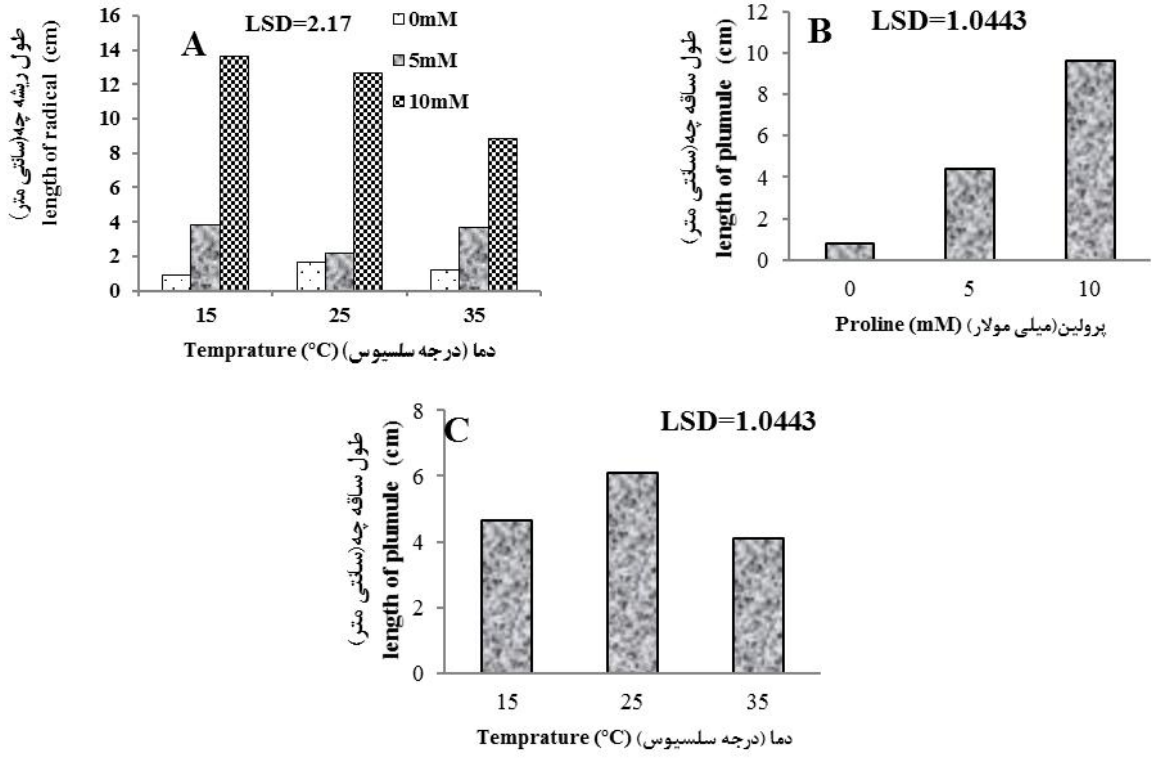
شکل ۲- تاثیر پرولین و دما بر سرعت جوانه‌زنی

Figure 2- Effect of proline and temperature on germination rate



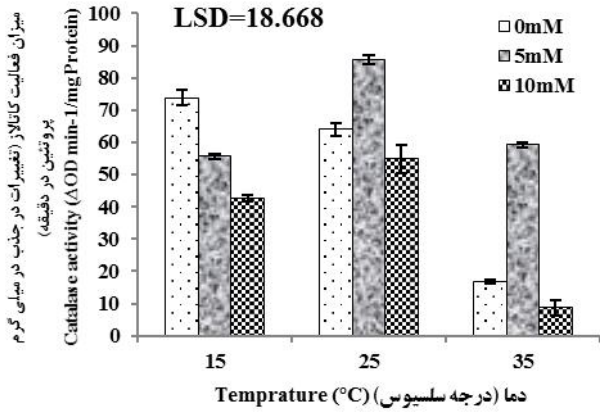
شکل ۳- تاثیر پرولین و دما بر وزن خشک گیاهچه

Figure 3- Effect of proline and temperature on seedling dry weight



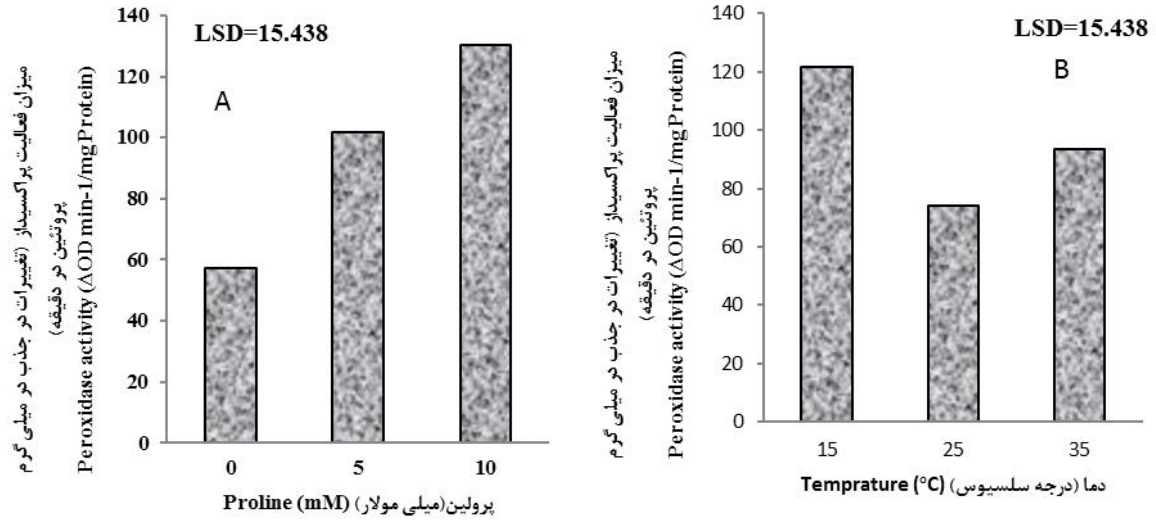
شکل ۴- A-تاثیر پرولین و دما بر طول ریشه‌چه B – تاثیر پرولین بر طول ساقه‌چه C- تاثیر دما بر طول ساقه‌چه

Figure 4- A- Effect of proline and temperature on radical length B- Effect of proline on plumule length C- Effect of temperature on plumule length



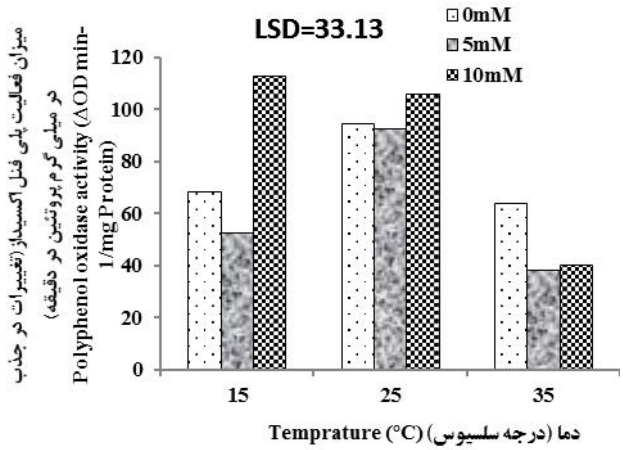
شکل ۵- تاثیر پیش‌تیمار با پرولین بر میزان آنزیم کاتالاز تحت تاثیر دماهای مختلف

Figure 5- Effect of proline priming on the catalase activity in different temperature



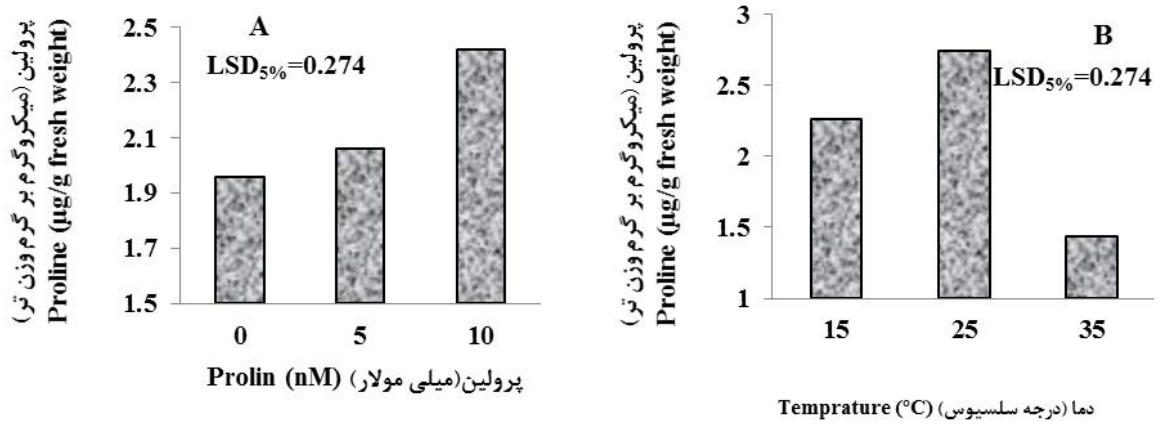
شکل ۶- A تاثیرپرولین بر میزان آنزیم پراکسیداز B تاثیر دما بر میزان آنزیم پراکسیداز

Figure 6-A- Effect of proline on the peroxidase enzyme B- Effect of temperature the peroxidase enzyme



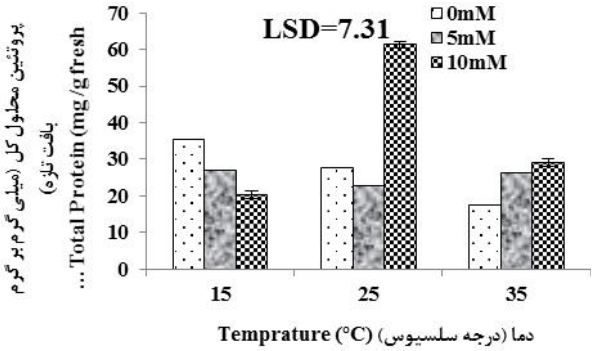
شکل ۷- تاثیر پیش‌تیمار با پرولین بر میزان آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تحت تاثیر دماهای مختلف

Figure 7- Effect of proline priming on the polyphenol oxides activity under different temperature



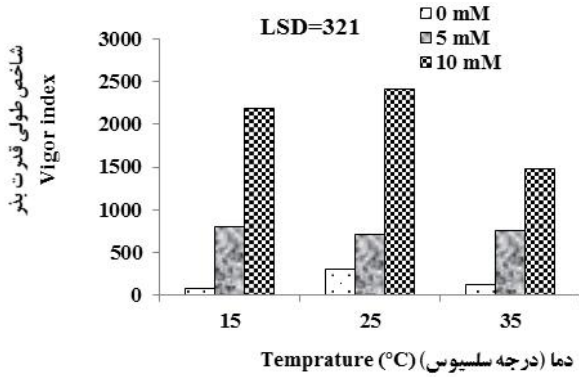
شکل ۸- تاثیر پرولین اگزوژن بر میزان پرولین درون سلولی تحت تاثیر دماهای مختلف

Figure 8- Effect of proline exogenous on the proline under different temperature



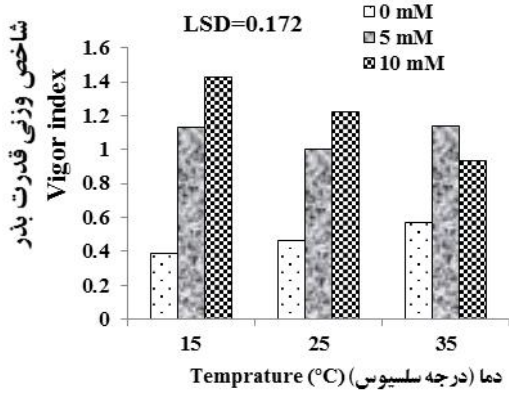
شکل ۹- تاثیر پرولین بر میزان پروتئین کل تحت تاثیر دماهای مختلف

Figure 9- Effect of proline on the total protein under different temperature



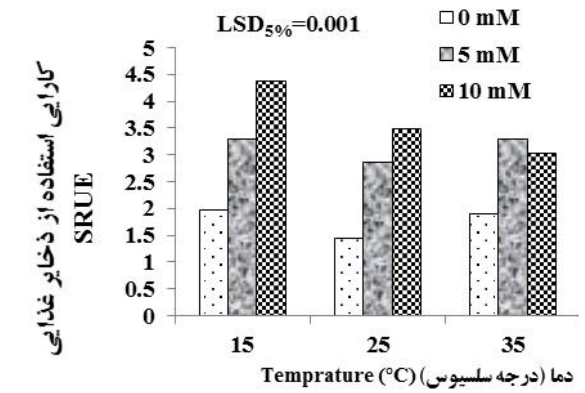
شکل ۱۰- تغییرات شاخص طولی قدرت بذر تحت تاثیر پیش‌تیمار با پرولین در دماهای مختلف

Figure 10- Length vigor index changes affect by seed priming with proline under different temperature



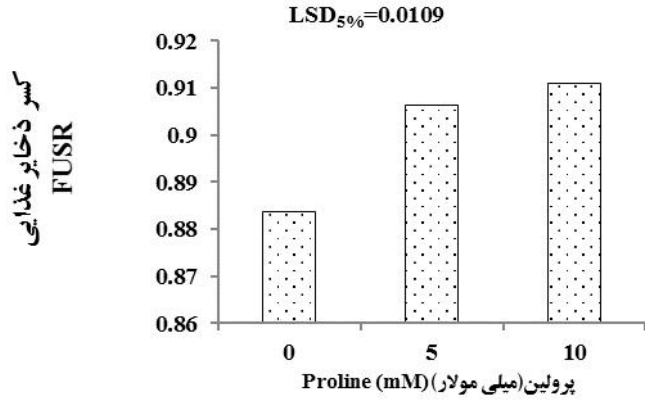
شکل۱۱- تاثیر پیش‌تیمار با پرولین بر شاخص وزنی قدرت بذر تحت تاثیر دماهای مختلف

Figure 11 - Weight vigor index changes affect by seed priming with proline under different temperature



شکل ۱۲- کارآیی استفاده از ذخایر غذایی در شرایط پیش‌تیمار با پرولین در دماهای مختلف

Figure 12- Effect of proline the SRUE under deferent temperature



شکل ۱۳- تغییرات کسر ذخایر غذایی در اثر کاربرد پرولین در شرایط دماهای مختلف

Fig 13- variations of FUSR influenced by proline application deferent temperature

References منابع مورد استفاده

- Abdul-Baki, A.A., and J.D. Anderson. 1973. Vigour determination in soybean by multiple criteria. *Crop Science*. 13: 630-633.
- Aggarwal, M., S. Sharma, N. Kaur, D. Pathania, K. Bhandhari, N. Kaushal, R. Kaur, K. Singh, A. Srivastava, and H. Nayyar. 2011. Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimizing oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Biological Trace Element Research*. 140:354–367
- Akita, A.S., and G.S. Cabuslay. 1990. Physiological basis of differential response to salinity in rice cultivars. *Plant Soil*. 123: 227-294.
- Aldesuquy. H.S., S.A. Abo-Hamed., M.A. Abbas, and A.H. Elhakem. 2012. Role of glycine betaine and salicylic acid in improving growth vigour and physiological aspects of droughted wheat cultivars. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 8(1): 149-171
- Apel, K., and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology. 55:373–99.
- Arrigo, A.P. 1998. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biological Chemistry*. 379, 19–26.
- Ashraf, M. and M.R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. 59: 206–216.
- Banu, M.N.A., M.A. Hoque., M. Watanabe-Sugimoto., K. Matsuoka, Y. Nakamura, and Y. Shimoishi. 2009. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiol*ogy. 166: 146–56.
- Bates, L.S., R.P. Waldren, and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free prolin for water stress studies. *Plant Soil*. 39: 205-208.

- Bewley J.D., and M, Black. 1983. Biochemistry of germination and growth. In: Bewley J. D. and M. Black. (eds.), Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination, Vol 1.-Springer-Verlag, New York
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bray, C.M., P.A. Davision, M. Ashraf, and R.M. Taylor. 1989. Biochemical changes during osmopriming of leek seed. *Annal Botany*. 63: 185-193.
- Cha-Um, S., and C. Kirdmanee. 2010. Effect of glycinebetaine on proline, water use, and photosynthetic efficiencies, and growth of rice seedlings under salt stress. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* 34: 517-527
- Chen, C., and M.B. Dickman. 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 102: 3459–64.
- Chen, C., S. Wanduragala, DF. Becker, and MB. Dickman, 2006. Tomato QM-like protein protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress by regulating intracellular prolinelevels. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 4001–6.
- Deivanai, S., R. Xavier, V. Vinod, K. Timalata, and O.F. Lim. 2011. Role of exogenous proline in ameliorating salt stress at early stage in two rice cultivars. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry.* 4(4): 157-174
- Demiral, T., and I. Turkan. 2004. Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment? *Journal of Plant Physiology*. 161:1089–100.
- Desikan, R., S.A.H. Mackerness, J.T. Hancock, and S.J. Neill. 2001. Regulation of the arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*. 127: 159-172.
- Diamant, S., N. Eliahu, D. Rosenthal, and P. Goloubinoff. 2001. Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 39586–39591.
- Ekis, H., and A. Yilmaz, 2003. Determination of the salt tolerance of some barely genotypes and the characteristics affecting tolerance. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* 27:257-260
- Hamalata, S., and L. Chafooranissa. 2007. Sesame lignans enhance the thermal stability of edible vegetable oils. *Food Chemistry.* 105: 1076- 1085.
- Hasegawa, P.M., R.A. Bressan, J.K. Zhu, and H.J. Bohnert. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology.* 51:463–99.
- Heuer, B. 2003. Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Science.* 165: 693-699
- Hong, Z., K. Lakkineni, Z. Zhang, and D.P.S. Verma. 2000. Removal of feedback inhibition of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*. 122:1129–36.

- Hoque, M.A., E. Okuma, M.N.A. Banu, Y. Nakamura, Y. Shimoishi, and Y. Murata. 2007. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *Journal of Plant Physiology*. 164:553–61.
- Hua, B., and W.Y. Guo. 2002. Effect of exogenous proline on SOD and POD activity of soyabean callus under salt stress. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*. 17, 37–40.
- ISTA. 2010. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland.
- Izadi Darbandi, A., M. Mohammadian, A. Yang, and H. Zarghani. 2012. Effect of temperature and salt on germination parameters and seed growth in Seaman (*Sesamum indicum*) population. *Iran Journal of Field Crop Research*. 10(2): 335-345. (In Persian).
- Kar, M., and D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*. 578: 315-319.
- Khedr, A.H.A., M.A. Abbas, A.A.A. Wahid, W.P. Quick, and G.M. Abogadallah. 2003. Proline induces the expression of salt-stress- responsive protein sand may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany.* 54: 2553–62.
- Maestri, E., N, Klueva, C. Perrotta, M. Gulli, H.T. Hguyen, and N. Marmiroli. 2002. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Molecular Biology.* 48: 667-81.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science.* 7: 405-410
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery, and F. Van Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science.* 9(10): 490-498.
- Nollen, E.A.A., and R.I. Morimoto. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science.* 115: 2809–2816.
- Okuma, E., Y. Murakami, Y. Shimoishi, M. Tada, and Y. Murata. 2004. Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition.* 50:1301–5.
- Okuma, E., K. Soeda, M. Fukuda, M. Tada, and Y. Murata. 2002. Negative correlation between the ratio K^+ to Na^+ and proline accumulation in tobacco suspension cells. *Soil Science and Plant Nutrition.* 48:753–7.
- Okuma, E., K. Soeda, M. Tada, and Y. Murata. 2000. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition.* 46: 257–263.
- Panchuk, I.I., R.A. Volkov, and F. Schoffl. 2002. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in arabidopsis. *Plant Physiology.* 129: 838–853.
- Pessarakli, M. 2001. Handbook of plant and crop physiology. Second Edition Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc.997 P.

- Quiroga, M., C. Guerrero, M.A. Botella, A. Barcelo, I. Amaya, M.I. Medina, F.J. Alonso, S.M. De Forchetti, H. Tigier, and V. Valpuesta. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and sobering. *Plant Physiology*. 122: 1119-1127.
- Rabie, B., and M. Bayat. 2009. Study parameters of seed germination and seedling growth canola cultivars (*Brassica napus* L.) by using seed vigor tests. *Iran Journal of Crop Science.* 40(1): 93-104 (In Persian).
- Rezaei, M., M. Sedghi, and R. Seyed Sharifi. 2014. Effect of seed priming on reserve mobilization of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) seeds under salinity stress. *Research of Crop Ecosystem.* 1(2): 67-74 (In Persian)
- Sairam, R.K., K.V. Rao, and G.C. Srivastava, 2002. Differential response of wheat genotypes to long-term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163: 1037-1046.
- Scott, S.J., R.A. Jones, and W.A. Williams. 1984. Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Science.* 24: 1192-1199.
- Sedghi, M., A. Nemati, and B. Esmaielpour. 2010. Effect of seed priming on germination and seedling growth of two medicinal plants under salinity. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 22(2): 130-139.
- Shah, K., and R.S. Dubey. 1998. Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seed- lings: role of proline as possible enzyme protectant. *Biologia Plantarum*. 40:121–30.
- Shinozaki, K., and K. Yamaguchi-Shinozaki. 1999. Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants. R.G. Landes Co. 180p
- Sudhakar, C., A. Lakshmi, and K.S. Giridara. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science.* 167:613-619
- Turkan, I. 2011. Plant responses to drought and salinity stress, development in a post-Genomic era. Advances in Botanical Research. 593p.
- Walters, C. 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research.* 8: 223–244.
- Weise, E.A. 2000. Oil seed crops. Blackwell Sci. Ltd Oxford, UK. 364 P.
- Yan, H., L.Z. Gang, C.Y. Zhao, and W.Y. Guo. 2000. Effects of exogenous proline on the physiology of soybean plantlets regenerated from embryos in vitro and on the ultra structure of their mitochondria under NaCl stress. *Soybean Science*. 19, 314–319.
- Zand, B., A. Soroushzadeh, F. Ghanati, and F. Moradi. 2010. Effect of foliar application of zinc (Zn) and auxin (IBA) on the activity of some antioxidant enzymes in the corn. *Iran Journal of Plant Biology.* 2:48-35.(In Persian).
- Zeinati, E., A. Soltani, S. Galeshi, and S.J. Sadati. 2010. Cardinal temperatures, response to temperature and range of thermal tolerance for seed germination in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Electronic Journal of Crop Production.* 3 (3): 23-42.

Pretreatment of Sesame Seed (*Sesamum indicum* L.) with Proline and its Effective on Seed Germination and Plant Physiological Defense Systems under Different Temperature Regimes

Nasibeh Tavakoli[1*], Ali Ebadi[2], Hourieh Tavakoli[1], and Payam Tizfahm[3]

Received: January 2014, Revised: 10 November 2015, Accepted: 9 March 2016

Abstract

To study the effects of proline and temperature on the rates of antioxidant enzymes and germination index, a factorial laboratory experiment based on completely randomized design was conducted with three replications at the Mohaghegh Ardabili University in 2014. Treatments cinsisted of three levels of proline (0, 5 and 10 mM) and different temperature regimes (15, 25 and 35°C). Results showed that proline significantly increased germination index, rates of antioxidant enzymes, proline, protein and mobility of food reserves. Exogenous application of proline increased assimilates in the seedlings. However, proline synthesis was decreased at temrature regimes of 15 and35°C as compared to 25 °C. Peroxidase enzyme rate at 25°C was lowere than of 15 and 35 °C and addition of proline increased levels of enzymes at these temperature regemes. Application of 10 mM proline at 25 °C showed the highest activity of catalase and polyphenol oxidase rates. However, rates of these enzymes at 15 and 35°C decreased as compared with that of 25°C. The length of radicle increased at all temperatures regemes and the length of plumule increased by proline, but reduced at temperatures of 15 and 35°C. According to the positive effects of proline on food reserves and seed vigor index, speed and rate of germination, proline, protein and antioxidant enzymes contents of seedlings, it seems that pretreatment of seeds with proline is an appropriate method for better seed germination attributs under these temperatures regemes.

Key words: Antioxidant enzyme, Germination, Proline, Sesame.

1- Ph.D. Student of Crop Physiology, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2- Associate Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
3- M.sc. Student of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
** Corresponding Author: nasibehtavakoli93@gmail.com*