

تأثیر پلاسمای سرد آرگون بر روی فعالیت آنزیم‌های مسیر اکسیداتیو ارقام مهم تجاری سویای مورد استفاده در جیره غذایی آبزیان

خدیجه سیاحی^۱، امیرحسین ساری^{۱*}، آیدین حمیدی^۲، بهاره نوروزی^۳، فرشید حسینی^۲

^۱ گروه فیزیک، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

^۳ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۱۱

چکیده

پلاسمای سرد به دلیل داشتن دمای بین ۲۵ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و فشار در حد اتم‌سفر یا حتی پایین‌تر، برای ارتقای سلامت و کیفیت محصولات زراعی به کار می‌رود. این روش، تولید کنندگان صنعت غذایی را از لزوم استفاده از مواد شیمیایی و یا روش‌هایی که ممکن است به بذر گیاه آسیب بزند، بی‌نیاز می‌کند. در این مقاله، اثر پلاسمای سرد آرگون بر روی بذر سویای مورد استفاده در جیره غذایی آبزیان، در ۴ رقم و هر رقم در ۲ طبقه مادری و گواهی شده مطالعه شد. در این راستا، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، اسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب با روش‌های چنس و ماهلی، ناکانو-آسادا و جیانوپولوتیس-رایز در تمامی رقم‌ها و طبقه‌ها اندازه‌گیری گردید. نتایج ثابت کرد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به مقدار ۰/۸۸ تا ۴/۴۰ برابر، آنزیم اسکوربات پراکسیداز به میزان ۰/۴ تا ۴/۰۱ برابر و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به میزان ۰/۸۶ تا ۵/۸۹ برابر افزایش پیدا کرده بود. این میزان افزایش فعالیت آنزیمی در تیمار ۶۰ ثانیه‌ای پلاسمای سرد بدست آمد و تقریباً بیشتر گروه‌ها بعد از تیمار ۴۲۰ ثانیه دچار کاهش در فعالیت این آنزیم‌ها شدند. نتایج ثابت کرد برای تحریک جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های مهم در مسیر فعال‌سازی بذرهای سویا، زمان تیمار ۶۰ ثانیه پلاسمای با فرکانس و ولتاژ به ترتیب ۸ کیلوهرتز و ۵ کیلوولت مورد نیاز است. در صورتی که زمان‌های تیمار بالاتر با همین شرایط پلاسمای سرد، موجب کاهش فعالیت آنها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پلاسمای سرد، آرگون، آنتی‌اکسیدان، سویا، جیره غذایی آبزیان

مقدمه

گیاه سویا یکی از مهمترین محصولات مورد استفاده در تغذیه و جیره غذایی آبزیان هستند، با این حال به دلیل دیواره ضخیم و عدم دسترسی کافی به بخش‌های تکثیری آن، جوانه‌زنی این محصول کم می‌باشد (Ling و همکاران، ۲۰۱۴). روش‌هایی به مانند میدان مغناطیسی (Matwiczuk و همکاران، ۲۰۱۲؛ Mildaziene و همکاران، ۲۰۱۸)، نور فرابنفش و استفاده از مواد شیمیایی مثلاً استفاده از هورمون‌ها،

موجب تحریک جوانه زنی آنها می‌شود (Zhang و همکاران، ۲۰۱۱). اما این روش‌ها در عین گران بودن و وقت‌گیر بودن، به دلیل برخی اثرات سمی آنها موجب انواع واکنش‌های آلرژی در انسان می‌شوند (Homola و Šimek، ۲۰۲۱). تیمار بذر با استفاده از پلاسمای سرد یک روش با صرفه‌ی اقتصادی می‌باشد که موجب تحریک رشد گیاه می‌شود. اما به دلیل این که این روش فاقد ذرات با قدرت یونی کردن ملکول‌های دیگر هستند، بنابراین در ژن‌های گیاه

پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که پلاسمای سرد، فعالیت هر آنزیم را به مقدار منحصر به فرد تغییر می‌دهد. این واقعیت ثابت می‌کند که مسیر پیام رسانی این آنزیم‌ها باهم فرق دارند. از طرفی، زمان مورد نیاز پلاسمای سرد در بین آنزیم‌ها فرق داشت که دلیل آن نیز می‌تواند به محل متفاوت این آنزیم‌ها در ساختار بذر باشد. به طوری که هر کدام از این محل‌ها، تابش متفاوتی از پلاسما را دریافت می‌کنند. همچنین تفاوت ژنوتاییپی رقم‌ها و طبقه‌ها نیز می‌تواند دلیل پاسخ متفاوت آنها به پلاسمای سرد باشد. در مقابل، زمان تیمار طولانی‌تر از نقطه اپتیمم، موجب کاهش فعالیت این آنزیم‌ها می‌شد.

مواد و روش‌ها

معرفی ارقام مهم تجاری سویا کشور: این تحقیق به صورت آزمایشگاهی به منظور بررسی امکان سنجی کاربرد فناوری تیمار با پلاسمای سرد برای بهبود کیفیت بذر ارقام تجاری مهم سویا کشور شامل ۵ رقم در دو طبقه طبق جدول ۱ در مرکز تحقیقاتی فیزیکی پلاسما دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران و در مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کرج انجام شد. بدین منظور نمونه کافی از بذور ارقام سویای مورد، هر رقم در دو طبقه اشاره در جدول ۱ با جوانه‌زنی استاندارد (۸۰ درصد) و یا بالاتر تهیه شدند.

تغییری ایجاد نمی‌کند (Jiang و همکاران، ۲۰۱۴). همچنین این روش موجب افزایش مقاومت گیاه به بیماری‌ها از جمله انواع آلودگی به میکروارگانیسم‌ها می‌شود (Adhikari و همکاران، ۲۰۲۰). گازی که در پلاسمای سرد استفاده می‌شود فقط تا ضخامت ۵ میکرومتری می‌تواند وارد بذر شود (Volin و همکاران، ۲۰۰۰). بنابراین کاملاً مشخص است که آسیب وارد شده، نمی‌تواند چشم‌گیر باشد. در مطالعه‌ای از هوا برای تولید پلاسمای سرد جهت جوانه‌زنی بذر کتان استفاده کردند. نتایج ثابت کرد که حتی اگر تیمار پلاسما ۴ ماه قبل از جوانه‌زنی انجام شده باشد، فعالیت‌های زیستی بذر افزایش می‌یابد. این یافته ثابت کرد که از نظر صنعتی، بذره‌های تیمار شده در آینده محصولات بیشتر و سالم‌تری خواهند داشت (de Groot و همکاران، ۲۰۱۸). در مطالعه دیگری که بر روی بذر آفتابگردان انجام شد، پلاسمای سرد به همراه میدان مغناطیسی استفاده گردید و این روش موجب افزایش جبرلین و کاهش آبسسیسک اسید شد (Mildažienė و همکاران، ۲۰۱۰).

در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های دخیل در جوانه‌زنی بذر سویا در چهار رقم و هر رقم در دو طبقه مادری و گواهی شده در حضور پلاسمای سرد بررسی شد. گاز آرگون، بعنوان گاز تولیدکننده پلاسما و در فشار اتم‌سفری استفاده گردید. زمان پلاسما وارد شده به مقدار ۳۰، ۶۰، ۱۸۰، ۳۰۰ و ۴۲۰ ثانیه بود. در ادامه فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، اسکوربات

جدول ۱- ارقام مهم تجاری سویا کشور در طبقات متفاوت

رقم	طبقه (داخل رقم)
ساری	مادری
Sari	گواهی شده
	Certified
صبا	مادری
Saba	Registered

جدول ۱- ارقام مهم تجاری سویا کشور در طبقات متفاوت

رقم	طبقه (داخل رقم)
آرین Arian	گواهی شده Certified مادری Registered
کتول Katoul	گواهی شده Certified مادری Registered
ویلیامز Williams	گواهی شده Certified پایه Foundation گواهی شده Certified

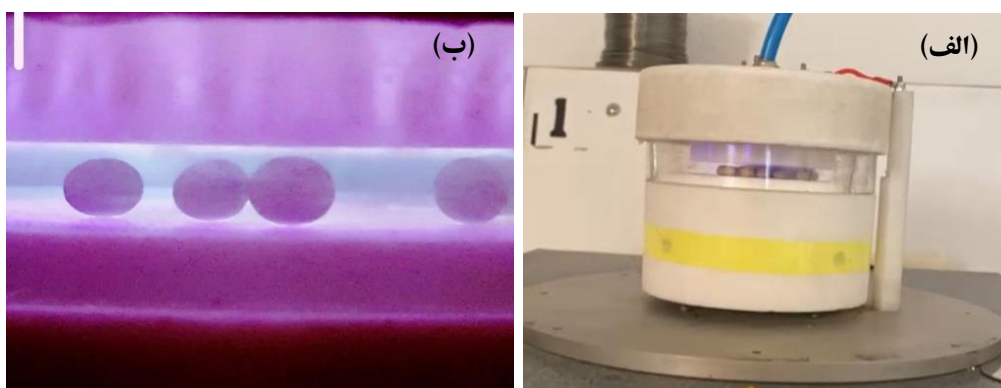
الکترودها پو شانده شد و در بین دو الکتروود، پلا سما ایجاد شد. جهت ایجاد فاصله بین دو الکتروود از یک جداکننده از جنس پلکسی گلس با ضخامت سه میلی متر استفاده شد. بذرها به طور یکنواخت و مستقیم تحت تأثیر پلاسمای سرد تولید شده توسط دستگاه تخلیه سد دی الکتریک قرار گرفتند (Domonkos و همکاران، ۲۰۲۱). تخلیه سد دی الکتریک با استفاده از گاز آرگون با اعمال ولتاژ پنج کیلو ولت با فرکانس هشت کیلو هرتز بین دو الکتروود انجام گرفت. جریان عبوری در پلاسمای تخلیه سد دی الکتریک در حدود یک میکرو آمپر بود. سرعت جریان گاز در داخل محفظه تولید پلاسمای دو لیتر در دقیقه حفظ شد.

طیف انتشار مرئی - فرابنفش^۱ توسط راکتور پلاسمای توسط طیف سنج (HR4000CG-UV-NIR Ocean Optics) اندازه گیری شد. ولتاژ با استفاده از یک پروب ولتاژ بالا (P6015 Tektronix HV) و جریانها توسط یک پروب جریان (TCP202 Tektronix) با یک اسیلوسکوپ دیجیتال (MSO4032) اندازه گیری شدند.

تیمار کردن بذرها با پلاسمای سرد: بذره‌های سویای مورد بررسی از مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کرج تهیه شد. بذرها در سال ۱۴۰۰ تولید شدند. بذرها شامل پنج رقم و هر رقم تجاری شامل دو طبقه بود (جدول ۱). تیمار بذرها توسط پلاسمای سرد در مرکز تحقیقات فیزیک پلاسمای دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران انجام شد. بذرها به مدت ۳۰، ۶۰، ۱۸۰، ۳۰۰ و ۴۲۰ ثانیه تحت تیمار پلاسمای قرار گرفتند و آزمایش در قالب طرح آشیانه‌ای - فاکتوریل با چهار تکرار در مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کرج در سال ۱۴۰۰ انجام شد.

شکل ۱ دستگاه پلاسمای تخلیه سد دی الکتریک را نشان می‌دهد. به منظور ساخت دستگاه پلاسمای تخلیه سد دی الکتریک از دو الکتروود تخت از جنس آلومینیوم (طول ۴۵ سانتی متر، عرض ۶/۵ سانتی متر و ضخامت دو میلی متر) استفاده شده است. هر دو الکتروود به وسیله یک ورقه دی الکتریک از جنس میکا (طول ۶۰ سانتی متر، عرض ۱۲ سانتی متر و ضخامت یک میلی متر) جهت ممانعت از ایجاد جرقه بین

1. UV-visible emission spectra



شکل ۱- (الف) دستگاه پلاسمای تخلیه سد دی الکتریک (ب) تیمار بذرهای سویا

سنجش فعالیت آنزیم‌ها

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت این آنزیم به روش چنس و ماهلی (Chance و Maehly, ۱۹۵۵) با اندکی تغییرات مورد سنجش قرار گرفت.

بافرهای سنجش آنزیم CAT

۲۵ میلی مولار بافر فسفات + ۱/۱ میلی مولار EDTA

+ ۱۰ میلی مولار آب اکسیژنه

$K_2HPO_4 = 1 \times 0.025 \times 174.18 = 4.3545 \text{ gr}$

$KH_2PO_4 = 1 \times 0.025 \times 136.09 = 3.4 \text{ gr}$

$EDTA = 1 \times 1 \times 10^{-3} \times 372.24 = 0.372242 \text{ gr}$

$H_2O_2 = 0.1 \times 100 \text{ ml} = 10 \times v_2 \rightarrow v_2 = 10.22 \text{ ml}$

→ $1 \times 1000 = 100$ میکرو لیتر

EDTA یکبار به KH_2PO_4 و یکبار به K_2HPO_4 اضافه

می‌کنیم و مرحله آخر به هر دو H_2O_2 اضافه کرده و

هر کدام به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده شد.

$PH = 7.61 \text{ baz} + 39 \text{ acid}$

سنجش فعالیت آنزیم APX

بافرهای سنجش آنزیم APX برای ۱۰۰ میلی لیتر

۲۵ میلی مولار بافر فسفات + ۰/۱ میلی مولار EDTA

+ ۰/۵ میلی مولار آسکوربیک اسید + ۱۰ میلی مولار

آب اکسیژنه

$K_2HPO_4 = 1 \times 0.025 \times 174.18 = 4.3545 \text{ gr}$

$KH_2PO_4 = 1 \times 0.025 \times 136.09 = 3.4 \text{ gr}$

$EDTA = 1 \times 1 \times 10^{-3} \times 372.24 = 0.372242 \text{ gr}$

$ASA = 1 \times 5 \times 10^{-3} \times 176.13 = 0.88065 \text{ gr}$

$H_2O_2 = 0.1 \times 100 \text{ ml} = 10 \times v_2 \rightarrow v_2 = 10.22 \text{ ml}$

آزمون کشت بذرهای تیمار شده با پلاسما: این آزمون با کشت ۲۰۰ بذر (به صورت هشت تکرار ۲۵ بذری) در لابلای ۳ لایه (دولایه زیر و یک لایه رو) کاغذ جوانه‌زنی به ابعاد ۳۰×۴۵ سانتی متر مرطوب شده با آب معمولی و لوله شده (کشت به صورت ساندویچی) و تعداد ۲۵ بذر را برای سهولت شمارش شان در دو ردیف، ردیف اول تقریباً ۱۲ سانتی متر پایین‌تر از لبه بالایی کاغذ و ردیف دوم سه سانتی متر زیر لبه ردیف اول قرار داده می‌شوند. محل قرارگیری در بذور در ردیف دوم باید طوری بود که هر گیاهچه بین دو بذر از ردیف بالایی قرار گرفته، جوانه‌زده و گیاهچه‌اش ظاهر شد. پس از قراردادن ورقه سوم کاغذ جوانه‌زنی بر روی بذور و پوشاندن آنها، سه ورق کاغذ جوانه‌زنی به صورت لوله‌ای به قطر ۴ سانتی متر درآمد و به وسیله کش لاستیکی بسته شد. سپس بذور کشت شده را در دمای ثابت ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۸ روز (Iranbakhsh و همکاران، ۲۰۲۰) درون ژرمیناتور قرار داده شد و با ارزیابی گیاهچه‌ها و تعیین گیاهچه‌های عادی^۱ و غیر عادی^۲ براساس معیارهای انجمن بین‌المللی آزمون بذر (ISTA) (Sossou Agoyi و همکاران، ۲۰۲۲) در آزمایشگاه تجزیه بذر مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کرج انجام شد.

1. Normal seedling

2. Abnormal seedling

$$\text{میکرومولار و } 50 \text{ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود.}$$

$$100 - \left[\frac{(\text{OD Control} - \text{OD Sample})}{\text{OD Control}} \times 100 \right]$$

$$\text{(Unit/mg) فعالیت آنزیم (SOD) =}$$

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس برای فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان: بر اساس جدول تجزیه واریانس، ارقام مورد مطالعه، طبقه داخل رقم و مدت زمان تیمار پلاسما از لحاظ فعالیت آنزیم های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه ها تفاوت معنی داری نشان دادند. اثر متقابل رقم \times زمان و طبقه داخل رقم \times زمان نیز معنی دار بود که نشان دهنده واکنش های متفاوت ارقام و طبقه درون رقم در زمان های مختلف تیمار پلاسما بود (جدول ۲).

میکرولیتر $100 = 1 \times 1000$
 EDTA و ASA به طور جداگانه یکبار به KH_2PO_4 و یکبار به K_2HPO_4 اضافه شد. در مرحله آخر به هر دو H_2O_2 اضافه و هر کدام را به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده شد.

$$\text{PH} = 7.61 \text{ baz} + 39 \text{ acid}$$

سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD):
 سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با اندکی تغییرات به روش جیانوپولوتیس و رایز (Nakano و Asada، ۱۹۸۱) و با کمک سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد.

مخلوط واکنش نمونه ها شامل: بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار با $\text{PH}=6.8$ ، بافر HEPES ۵۰۰ میلی مولار، ۱ میلی مولار EDTA، Na_2CO_3 ۵۰۰ میلی مولار، متیونین ۱۳۰ میلی مولار، نیتروبلوترازولیوم (NBT) ۷/۵ میکرومولار، و ریبوفلاوین ۲۰۰

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس برای فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی

میانگین مربعات				
کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیداز		
**۸۱۷۳/۲۱	**۳۰۷۲/۸۰	**۸۵۱/۳۶	۴	رقم
**۲۷۴۲/۰۹	**۵۵۲/۲۵	**۱۴۸۴/۸۶	۵	طبقه (داخل رقم)
**۳۳۸۲۷/۱۹	**۲۴۰۳۰/۰۵	**۲۸۳۳۹/۳۷	۵	زمان
**۳۷۰/۲۷	**۳۰۴/۵۹	**۱۷۳/۲۸	۲۰	رقم \times زمان
**۵۶۹/۰۵	**۵۹/۰۰	**۱۰۳/۰۹	۲۵	طبقه (داخل رقم) \times زمان
۱۴/۴۵	۱۵/۲۲	۷/۶۳	۱۸۰	خطا
۶/۲۵	۴/۹۹	۸/۵۸	-	ضریب تغییرات (%)

** معنی دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر تیمار پلاسما بر رقم و طبقه داخل رقم برای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سویا.

رقم	طبقه (داخل رقم)	مدت تیمار پلاسما (سرد (ثانیه)	کاتالاز (میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر)	سوپراکسید دیسموتاز (میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر)	آسکوربات پراکسیداز (میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر)
ساری	مادری	۰	۳۳/۸۲ ± ۰/۷۷	۱۷/۹۹ ± ۰/۴۹tuv	۳۶/۴۲ ± ۱/۰۲np
		۳۰	۱۳۰/۰۰ ± ۱/۱c	۷۲/۸۶ ± ۰/۹۴ef	۹۶/۰۳ ± ۰/۷ab
		۶۰	۱۴۸/۹۷ ± ۰/۵۱a	۷۷/۴۸ ± ۰/۵۸cde	۹۷/۴۸ ± ۰/۸۱a
		۱۸۰	۱۳۳/۷۲ ± ۱/۰۶b	۷۳/۴۷ ± ۰/۷۸def	۹۵/۳۱ ± ۰/۸۰ab
		۳۰۰	۳۴/۶ ± ۰/۷۸۷	۱۶/۴ ± ۰/۴۸uv	۳۶/۴۵ ± ۰/۸۴np
		۴۲۰	۳۱/۸۹ ± ۰/۶۲	۱۵/۴۰ ± ۰/۴۲vw	۳۳/۴۷ ± ۰/۴۰o-r
	گواهی شده	۰	۳۹/۰۷ ± ۰/۴۴u	۱۰/۶۵ ± ۰/۴۱wx	۲۷/۱۵ ± ۰/۹۴uvw
		۳۰	۷۵/۴۵ ± ۰/۲۷klm	۵۶/۹۰ ± ۰/۲۸lm	۷۶/۹۸ ± ۰/۶۹e-j
		۶۰	۷۹/۶۹ ± ۰/۶۹j	۶۲/۷۶ ± ۰/۳۷h-k	۷۹/۸۱ ± ۰/۴۷e
		۱۸۰	۷۴/۱۴ ± ۰/۱۶lm	۵۷/۰۰ ± ۱/۱۵lm	۷۷/۸۷ ± ۰/۶۲e-j
		۳۰۰	۳۹/۷۵ ± ۱/۴۴tu	۱۰/۷۵ ± ۰/۶۷wx	۲۶/۵۸ ± ۰/۶۳vw
		۴۲۰	۳۹/۵۳ ± ۱/۲۷tu	۹/۱۱ ± ۱/۶۱x	۲۴/۹۸ ± ۰/۵۶w
صبا	مادری	۰	۳۹/۲۴ ± ۰/۴۱u	۲۰/۰۰ ± ۰/۶۷s-v	۵۴/۸ ± ۰/۸۹m
		۳۰	۷۲/۴۵ ± ۰/۸۴mn	۵۸/۱۹ ± ۱/۰۳jkl	۹۴/۷۸ ± ۰/۵۴ab
		۶۰	۷۸/۱۵ ± ۰/۵۰jk	۶۰/۰۳ ± ۰/۸۶i-l	۹۳/۹۷ ± ۰/۵۹b
		۱۸۰	۷۶/۸۹ ± ۰/۱۷jkl	۵۸/۴۶ ± ۰/۲۹jkl	۹۵/۱۶ ± ۰/۶۵ab
		۳۰۰	۳۸/۷۱ ± ۱/۱۷u	۲۲/۵۸ ± ۰/۸۷r-t	۲۱/۹۳ ± ۱/۱۲x
		۴۲۰	۳۸/۸۳ ± ۰/۷۳u	۲۱/۸۰ ± ۰/۷۸r-u	۲۵/۳۰ ± ۰/۵۵w
	گواهی شده	۰	۲۲/۳۲ ± ۰/۳۲w	24 ± ۰/۴۷rs	۳۳/۸۴ ± ۰/۶۲o-q
		۳۰	۶۱/۸۷ ± ۰/۵q	۵۱/۳۸ ± ۱/۱۰m	۷۴/۷۷ ± ۰/۵۵f-k
		۶۰	۶۷/۱۰ ± ۰/۵۲op	۵۷/۲۷ ± ۰/۷۲kl	۷۷/۳۱ ± ۰/۳۶e-l
		۱۸۰	۶۲/۵۵ ± ۰/۵q	۵۱/۵۳ ± ۰/۸۳m	۷۳/۳۱ ± ۱/۱۵jkl
		۳۰۰	۲۲/۷۸ ± ۱/۴۷w	۲۷/۲۰ ± ۰/۷۷r	۳۲/۹۴ ± ۱/۲۹p-s
		۴۲۰	۲۱/۸۶ ± ۱/۸۵w	۲۵/۳۲ ± ۰/۸۱r-u	۲۱/۵۳ ± ۱/۱۷x
آرین	مادری	۰	۲۲/۹۳ ± ۰/۹۷w	۱۷/۰۶ ± ۰/۷۲uv	۳۵/۶۱ ± ۰/۷۹np
		۳۰	۷۴/۶۶ ± ۱/۹۴lm	۶۳/۵۸ ± ۰/۹۷vh-j	۷۴/۴۱ ± ۰/۸۵f-k
		۶۰	۷۸/۱۳ ± ۱/۰۸jkl	۶۸/۱۷ ± ۰/۶۲fgh	۷۵/۸۹ ± ۰/۴۸f-j
		۱۸۰	۷۴/۶۱ ± ۰/۹۴lm	۶۲/۹۸ ± ۰/۸۷h-k	۷۴/۱۸ ± ۰/۴۳h-k
		۳۰۰	۲۳/۲۳ ± ۱/۴۰w	۲۰/۹۶ ± ۱/۰۲s-v	۳۵/۸۷ ± ۰/۴۹np
		۴۲۰	۲۰/۱۹ ± ۰/۷۶w	۲۱/۰۹ ± ۰/۶۴s-v	۳۱/۴۸ ± ۰/۹۰q-t
	گواهی شده	۰	۲۱/۱۲ ± ۰/۶۷w	۱۶/۴ ± ۰/۸۳uv	۲۹/۷۹ ± ۱/۴۵s-v
		۳۰	۶۴/۷۷ ± ۰/۷۱pq	۴۱/۸۴ ± ۰/۲۵n	۷۲/۱۳ ± ۰/۸۵k
		۶۰	۶۹/۹۴ ± ۰/۵no	۶۴/۴۳ ± ۱/۴g-i	۷۷/۹۴ ± ۰/۵ef
		۱۸۰	۶۴/۷۴ ± ۱/۵۲pq	۵۴/۲۵ ± ۰/۳۹lm	۷۳/۲۹ ± ۰/۴۵jkl
		۳۰۰	۲۲/۲۸ ± ۰/۹۲w	۱۸/۲۱ ± ۰/۳۶tuv	۳۰/۱۹ ± ۱/۴۹p-u

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر تیمار پلاسما بر رقم و طبقه داخل رقم برای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سویا.

رقم	طبقه (داخل رقم)	مدت تیمار پلاسمای سرد (ثانیه)	کاتالاز (میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر)	سوپراکسید دیسموتاز (میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر)	آسکوربات پراکسیداز (میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر)
۴۲۰			۲۱/۱۲ ± ۱/۲w	۱۸/۰۲ ± ۰/۷۵tuv	۳۱/۴۸ ± ۰/۹q-t
کتول	مادری	۰	۵۱/۹۰ ± ۰/۹r	۲۰/۳۳ ± ۰/۷۰s-v	۳۶/۶۳ ± ۰/۴۲no
۳۰			۱۱۴/۶۱ ± ۱/۶۲e	۸۰/۶ ± ۱/۰۹bc	۷۴/۳۰ ± ۱/۰۸۳g-k
۶۰			۱۱۸/۰۵ ± ۱/۰۹d	۸۷/۹۱ ± ۱/۳۲a	۷۷/۷۳ ± ۰/۳۲e-h
۱۸۰			۱۱۴/۴۵ ± ۱/۸۷e	۸۲/۳۰ ± ۰/۷۴bc	۷۴/۸۳ ± ۰/۷۶f-k
۳۰۰			۵۴/۰۳ ± ۰/۸۶t	۲۵/۷۵ ± ۰/۹۳rs	۳۷/۰۱ ± ۲/۱۳no
۴۲۰			۵۳/۱۰ ± ۰/۴۸t	۲۴/۳۹ ± ۱/۱۶rs	۳۸/۰۲ ± ۱/۰۷n
۰	گواهی شده		۴۴/۲۸ ± ۰/۹۹s	۲۱/۳۳ ± ۰/۷۱r-v	۱۶/۳۱ ± ۰/۸۲y
۳۰			۹۵/۵۷ ± ۰/۵۹g	۷۷/۴۴ ± ۰/۴۵cde	۶۲/۷۷ ± ۰/۵۲l
۶۰			۹۹/۳۹ ± ۱/۰f	۸۵/۲ ± ۰/۴۳ab	۶۵/۵۲ ± ۰/۴۰l
۱۸۰			۹۵/۳۷ ± ۰/۶۵g	۷۹/۶۴ ± ۱/۳۵bc	۶۳/۴۰ ± ۰/۷۵l
۳۰۰			۴۵/۰۸ ± ۱/۲۷s	۲۵/۲۳ ± ۰/۷۹rs	۱۹/۶۴ ± ۱/۳۸x
۴۲۰			۴۲/۴۷ ± ۰/۷۷st	۲۴/۴۹ ± ۱/۰۳rs	۱۹/۲۹ ± ۱/۳۹xy
ویلیامز	پایه	۰	۳۳/۲۶ ± ۱/۳۶v	۳۵/۲۶ ± ۰/۶۸np	۳۵/۰۰ ± ۰/۲۶ np
۳۰			۸۴/۲۴ ± ۰/۶۵kl	۸۶/۰۳ ± ۰/۳۲d	۸۶/۰۳ ± ۰/۳۲d
۶۰			۹۰/۱۴ ± ۰/۹۳j	۸۹/۶۵ ± ۰/۲۹c	۸۹/۲۶ ± ۰/۲۹c
۱۸۰			۸۶/۰۲ ± ۱/۱۶kl	۸۷/۹۳ ± ۰/۴۶cd	۸۷/۹۳ ± ۰/۴۶cd
۳۰۰			۳۴/۳۳ ± ۰/۸۵v	۳۶/۱۵ ± ۱/۴۲np	۳۶/۱۵ ± ۱/۴۲np
۴۲۰			۳۲/۷۴ ± ۰/۷۲v	۳۵/۰۴ ± ۱/۰۳np	۳۵/۰۴ ± ۱/۰۳np
۰	گواهی شده		۳۴/۷۰ ± ۰/۶۹v	۳۲/۷۹ ± ۱/۳۳q	۲۸/۹ ± ۰/۲۱tuw
۳۰			۷۵/۹۳ ± ۱/۲۱i	۶۷/۲۲ ± ۱/۷۳gh	۷۳/۹۶ ± ۰/۵۱ijk
۶۰			۷۹/۵۴ ± ۱/۲h	۶۹/۸۷ ± ۱/۰۷fg	۷۵/۷۸ ± ۰/۸۴f-j
۱۸۰			۷۶/۱۳ ± ۱/۸۳i	۶۶/۸۷ ± ۰/۳۵gh	۷۳/۴ ± ۰/۱۸j
۳۰۰			۳۴/۶۳ ± ۰/۷۰v	۳۵/۱۲ ± ۱/۳۴opq	۲۶/۶۹ ± ۲/۳۲vw
۴۲۰			۳۳/۴۴ ± ۰/۹۲v	۳۴/۱۴ ± ۰/۶۱pq	۲۹/۸۳ ± ۱/۰۷

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (Se) بیان شدند. حروف مختلف در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار است که توسط آزمون دانکن تعیین شده است (P=۰/۰۱)

۴/۴۰ برابر نسبت به تیمار شاهد خود بیشتر بود. کاهش مقدار کاتالاز در اکثر نمونه‌های تحت تیمار ۴۲۰ ثانیه (به استثنای طبقه گواهی شده رقم ساری و طبقه مادری رقم کتول)، طبقه مادری رقم صبا و طبقه گواهی شده رقم ویلیامز در تیمار ۳۰۰ ثانیه نسبت به شاهد مشاهده شد. حداکثر میزان کاتالاز در طبقه

آنزیم کاتالاز (CAT): تیمار پلاسما اثرات مختلفی بر آنزیم کاتالاز داشت. نتایج مقایسه میانگین به روش دانکن نشان داد که مقدار کاتالاز از ۲۰/۱۹ تا ۱۴۸/۹۷ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر در بین تمام نمونه‌ها متغیر است (جدول ۳). به‌طور کلی، میزان کاتالاز در گیاهچه‌های تحت تیمار پلاسما ۰/۸۸ تا

آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و سیستم‌های آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی را افزایش می‌دهند تا گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) اضافی را حذف کنند. در سلول‌های گیاهی، اجرای کارآمد این سیستم‌های سم زدایی برای مبارزه با آسیب اکسیداتیو ضروری است (Stolárik و همکاران، ۲۰۱۵).

Zhang و همکاران افزایش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز را پس از تیمار پلاسما آرگون DBD روی دانه‌های سویا گزارش کردند (Zhang و همکاران، ۲۰۱۷). در مطالعه دیگری در سویا، تیمار پلاسما با منابع مختلف گاز (نیترژن و اکسیژن) به مدت ۱، ۲ و ۳ دقیقه باعث کاهش ۲۹ درصدی فعالیت کاتالاز در بذر سالم شد و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز تفاوت معناداری بین بذرهای تیمار شده و کنترل نشان نداد. آن‌ها بیان کردند که میزان کم فعالیت کاتالاز، مقدار گلوکاتینون و پراکسیداسیون لیپیدی در بذرهای تیمار شده با پلاسما نشان می‌دهد که H_2O_2 تولید شده تحت تیمار پلاسما، دفاع آنتی‌اکسیدانی را فعال نمی‌کند و باعث آسیب به غشای سلولی نمی‌شود. در واقع H_2O_2 تولید شده می‌تواند به‌عنوان یک مولکول سیگنال در اقلای جوانه‌زنی عمل کند (Pizá و همکاران، ۲۰۱۸). در تحقیقی دیگر توسط Švubová و همکاران در سال ۲۰۲۱، نتایج تیمار پلاسما سرد به مدت ۵ و ۱۰ دقیقه در دانه‌های زیره نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گیاهچه‌های کنترل و تیمار پلاسما ۵ دقیقه‌ای گزارش نشد، اما آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتینون ردوکتاز در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری داشتند. در حالیکه، ۱۰ دقیقه تیمار پلاسما باعث افزایش آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتینون ردوکتاز در مقایسه با کنترل شد (Švubová, Slovákova و همکاران، ۲۰۲۱).

مادری رقم ساری در تیمار ۶۰ ثانیه نسبت به شاهد آن مشاهده شد.

سوپراکسید دیسموتاز (SOD): تیمار پلاسما اثرات مختلفی بر سوپراکسید دیسموتاز داشت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که مقدار سوپراکسید دیسموتاز از ۹/۱۱ تا ۸۷/۹۱ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر در بین نمونه‌ها متغیر بود (جدول ۳). به‌طورکلی، میزان آنزیم در گیاهچه‌های تحت تیمار پلاسما ۰/۸۶ تا ۵/۸۹ برابر نسبت به تیمار شاهد خود بیشتر بود. حداکثر میزان سوپراکسید دیسموتاز در طبقه گواهی شده رقم ساری در تیمار ۶۰ ثانیه نسبت به شاهد آن مشاهده شد. کاهش سوپراکسید دیسموتاز در طبقه گواهی شده رقم ساری در ۴۲۰ ثانیه و طبقه مادری رقم ساری در ۳۰۰ و ۴۲۰ ثانیه نسبت به شاهد مشاهده شد.

آسکوربات پراکسیداز (APX): تیمار پلاسما اثرات مختلفی بر روی آسکوربات پراکسیداز داشت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که مقدار آنزیم از ۱۶/۳۱ تا ۹۷/۴۸ میکرومول در دقیقه بر گرم وزن تر در بین تمام نمونه‌ها متغیر است (جدول ۳). به‌طورکلی، میزان آنزیم در گیاهچه‌های تحت تیمار پلاسما ۰/۴۰ تا ۴/۰۱ برابر نسبت به تیمار شاهد خود بیشتر بود. حداکثر مقدار آسکوربات پراکسیداز در طبقه گواهی شده رقم کنترل در تیمار ۶۰ ثانیه نسبت به شاهد آن مشاهده شد. کاهش در آسکوربات پراکسیداز در طبقه مادری رقم آربین در تیمار ۴۲۰، طبقه گواهی شده رقم صبا در تیمارهای ۳۰۰ و ۴۲۰، طبقه مادری رقم ساری در تیمار ۴۲۰، طبقه گواهی شده رقم ساری در تیمارهای ۳۰۰ و ۴۲۰، طبقه گواهی شده رقم ویلیامز در تیمار ۳۰۰ و طبقه پایه رقم ویلیامز در تیمار ۴۲۰ ثانیه نسبت به شاهد آن‌ها مشاهده شد.

تحت شرایط تنش، گیاهان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز،

نتیجه گیری

مدت زمان مناسب، تکنیکی امید بخش برای بهبود فعالیت های آنتی اکسیدانی گیاهچه در گیاهان است. بنابراین، پرایمینگ بذر سویا با پلاسمای سرد ممکن است راهکاری جدید و مناسب برای محافظت از سویا در برابر تنش های محیطی باشد.

پلاسمای سرد می تواند تأثیر مثبتی بر فعالیت کاتالاز ۰/۸۸ تا ۴/۴۰ برابر، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ۰/۸۶ تا ۵/۸۹ برابر و آسکوربات پراکسیداز ۰/۴۰ تا ۴/۰۱ برابر نسبت به تیمار شاهد گردید. نتایج این مطالعه سه یافته جدید به ارمغان آورد: (۱) ارقام و طبقات مختلف درون ارقام پاسخ قابل توجهی به تیمار پلاسمای سرد داشتند. (۲) زمان های مختلف تیمار پلاسمای متفاوت معنی داری در فعالیت های آنتی اکسیدانی گیاهچه ها داشتند. (۳) تیمار ۶۰ ثانیه بیشترین تأثیر مثبت را بر فعالیت های آنتی اکسیدانی گیاهچه ها داشت. در حال حاضر، پلاسمای سرد در

سپاسگزاری

بدینوسیله از مرکز تحقیقات فیزیک پلاسمای دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران به خاطر ایجاد تسهیلات و مساعدت در انجام این پژوهش و مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کرج به جهت تأمین بذر، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

- Adhikari, B., Pangomm, K., Veerana, M., Mitra, S., Park, G., 2020. Plant disease control by non-thermal atmospheric-pressure plasma. *Frontiers in Plant Science* 11, 77.
- Asnavandi, A., Barzin, G., Mahabadi, T.D., Entezari, M., Pishkar, L., 2022. Low Temperature Plasma Affects Physiological and Genetic Attributes of *Foeniculum vulgare*. *Russian Journal of Plant Physiology* 69(2), 1-9.
- Babajani, A., Iranbakhsh, A., Oraghi Ardebili, Z., Eslami, B., 2019. Seed priming with non-thermal plasma modified plant reactions to selenium or zinc oxide nanoparticles: cold plasma as a novel emerging tool for plant science. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 39, 21-34.
- Chance, B., Maehly, A., 1955. Assay of catalase and peroxidase in: Colowick SP and NO Kaplan (ed) *Methods of enzymology* 1954:1, 357-424.
- de Groot, G.J., Hundt, A., Murphy, A.B., Bange, M.P., Mai-Prochnow, A., 2018. Cold plasma treatment for cotton seed germination improvement. *Scientific Reports* 8(1), 14372.
- Domonkos, M., Tichá, P., Trejbal, J., Demo, P., 2021. Applications of cold atmospheric pressure plasma technology in medicine, agriculture and food industry. *Applied Sciences* 11(11), 4809.
- Hosseini, S.I., Mohsenimehr, S., Hadian, J., Ghorbanpour, M., Shokri, B., 2018. Physico-chemical induced modification of seed germination and early development in artichoke (*Cynara scolymus* L.) using low energy plasma technology. *Physics of Plasmas* 25(1), 013525.
- Iranbakhsh, A., Oraghi Ardebili, Z., Molaei, H., Oraghi Ardebili N., Amini, M., 2020. Cold plasma up-regulated expressions of WRKY1 transcription factor and genes involved in biosynthesis of cannabinoids in Hemp (*Cannabis sativa* L.). *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 40, 527-537.
- Iranbakhsh, A., Oraghi Ardebili, Z., Oraghi Ardebili, N., Ghoranneviss, M., Safari, N., 2018. Cold plasma relieved toxicity signs of nano zinc oxide in *Capsicum annuum* cayenne via modifying growth, differentiation, and physiology. *Acta Physiologiae Plantarum* 40, 1-11.
- Jiang, J., Lu, Y., Li, J., Li, L., He, X., Shao, H., Dong, Y., 2014. Effect of seed treatment by cold plasma on the resistance of tomato to *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt). *Plos one* 9(5), e97753.
- Li, K., Zhang, L., Shao, C., Zhong, C., Cao, B., Shi, Q., Gong, B., 2021. Utilising cold plasma seed treatment technologies to delay cotyledon senescence in tomato seedlings. *Scientia Horticulturae* 281, 109911.

- Li, K., Zhong, C., Shi, Q., Bi, H., Gong, B., 2021. Cold plasma seed treatment improves chilling resistance of tomato plants through hydrogen peroxide and abscisic acid signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine* 172, 286-297.
- Ling, L., Jiafeng, J., Jiangang, L., Minchong, S., Xin, H., Hanliang, S., Yuanhua, D., 2014. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Scientific Reports* 4(1), 5859.
- Matwijczuk, A., Kornarzynski, K., Pietruszewski, S., 2012. Effect of magnetic field on seed germination and seedling growth of sunflower. *International Agrophysics* 26(3).
- Mildažienė, V., Aleknavičiūtė, V., Žūkiene, R., Paužaitė, G., Naučienė, Z., Filatova, I., Lyushkevich, V., Haimi, P., Tamošiūnė, I., Baniulis, D., 2019. Treatment of common sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds with radio-frequency electromagnetic field and cold plasma induces changes in seed phytohormone balance, seedling development and leaf protein expression. *Scientific Reports* 9(1), 6437.
- Mildaziene, V., Pauzaite, G., Naucienė, Z., Malakauskiene, A., Zukiene, R., Januskaitiene, I., Jakstas, V., Ivanauskas, L., Filatova, I., Lyushkevich, V., 2018. Pre- sowing seed treatment with cold plasma and electromagnetic field increases secondary metabolite content in purple coneflower (*Echinacea purpurea*) leaves. *Plasma Processes and Polymers* 15(2), 1700059.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22(5), 867-880.
- Pizá, M.C.P., Prevosto, L., Zilli, C., Cejas, E., Kelly, H., Balestrasse, K., 2018. Effects of non-thermal plasmas on seed-borne Diaporthe/Phomopsis complex and germination parameters of soybean seeds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 49, 82-91.
- Sadhu, S., Thirumdas, R., Deshmukh, R., Annapure, U., 2017. Influence of cold plasma on the enzymatic activity in germinating mung beans (*Vigna radiate*). *Lwt* 78, 97-104.
- Selcuk, M., Oksuz, L., Basaran, P., 2008. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource technology* 99(11), 5104-5109.
- Šimek, M., Homola, T., 2021. Plasma-assisted agriculture: History, presence, and prospects— A review. *The European Physical Journal D* 75, 1-31.
- Singh, R., Prasad, P., Mohan, R., Verma, M.K., Kumar, B., 2019. Radiofrequency cold plasma treatment enhances seed germination and seedling growth in variety CIM-Saumya of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 12, 78-81.
- Sossou, H., Agoyi, E., Kafoutchoni, K., Sodedji, F., Agbahoungba, S., Quenum, F.J., Sikirou, R., Assogbadjo, A., Sinsin, B., 2022. Seed system and seed quality of Kersting's groundnut in Benin. *African Crop Science Journal* 30(s1), 1-20.
- Stolárik, T., Henselová, M., Martinka, M., Novák, O., Zahoranová, A., Černák, M., 2015. Effect of low-temperature plasma on the structure of seeds, growth and metabolism of endogenous phytohormones in pea (*Pisum sativum* L.). *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 35(4), 659-676.
- Švubová, R., Slováková, L., Holubová, L., Rovňanová, D., Gálová E., Tomeková, J., 2021. Evaluation of the impact of cold atmospheric pressure plasma on soybean seed germination. *Plants* 10(1), 177.
- Thirumdas, R., Annapure, U.S., 2020. Enzyme inactivation in model systems and food matrixes by cold plasma. *Advances in Cold Plasma Applications for Food Safety and Preservation*, 229-252.
- Ussenov, Y., Akildinova, A., Kuanbaevich, B.A., Serikovna, K.A., Gabdullin, M., Dosbolayev, M., Daniyarov, T., Ramazanov, T., 2022. The effect of non-thermal atmospheric pressure plasma treatment of wheat seeds on germination parameters and α -amylase enzyme activity. *IEEE Transactions on Plasma Science* 50(2), 330-340.
- Volin, J.C., Denes, F.S. Young R.A., Park, S.M., 2000. Modification of seed germination performance through cold plasma chemistry technology. *Crop science* 40(6), 1706-1718.

- Zhang, S., Li, L., Zhang, C., Li, G., 2011. ALA altered ABA content of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedling. *Agricultural Science & Technology-Hunan* 12(4), 484-591.
- Zhang, S., Rousseau, A., Dufour, T., 2017. Promoting lentil germination and stem growth by plasma activated tap water, demineralized water and liquid fertilizer. *RSC advances* 7(50), 31244-31251.

The effect of cold argon plasma on the activity of oxidative enzymes of important commercial soybean cultivars used in aquatic diets

Kh. Sayahi¹, A.H. Sari^{1*}, A. Hamidi², B. Nowruzi³, F. Hasani²

¹ Department of Physics, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

² Seed and Plant Certification and Registration Institute (SPCRI), Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

³ Department of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

Abstract

Cold plasma due to its temperature in the range of 25-100° C under atmospheric or even lower pressure, can be employed to improve healthy and quality of crops. By using this technique, industrial food developers are not forced to employ chemical materials or other toxic methods. In the present study, the impact of cold argon plasma on 4 cultivars and 2 within cultivar (class) of soybean seeds cultivars used in aquatic diets was studied. In this manner, activity of catalase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase were measured respectively by Chance-Maehly, Nakano-Asada and Giannopolitis-Ries. The observations confirmed the activity of catalase, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase increased as 0.88-4.40, 0.4-4.01 and 0.86-5.89 fold, respectively. The corresponding values were obtained by the plasma for 60 s and almost all enzymes indicated a lower activity with the plasma treatment for 420 s. These observations confirmed that for promotion of seed germination and enzyme activity, the plasma for 60 s with the frequency and voltage of 8 kHz and 5 kV is needed. In contrast, the longer exposure times make a lower physiological activity in seeds. In general, this method is suggested to reach healthier and heavier seeds.

Keywords: Cold plasma, Argon, Antioxidant, Soybean, Aquatic diets

*Corresponding author; sari@srbiau.ac.ir