"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد سوم، شماره 1، بهار و تابستان 93
شماره صفحه: 30-17

بررسی پراکسیداسیون چربی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در بذر دو رقم سویا تحت تاثیر پیری تسریع شده

مهرناز مهرآور[1*]، آرین ساطعی[2]، آیدین حمیدی[3]، محمدرضا احمدی[4] و معصومه صالحی[5]

1.کارشناسی ارشد واحد ثبت و کنترل گواهی بذر و نهال مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان

2.استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

3.استادیار موسسه ثبت و کنترل گواهی بذر و نهال

4.کارشناس واحد ثبت و کنترل گواهی بذر و نهال مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان

5.پژوهشگر مرکز ملی تحقیقات شوری

چکیده

به منظور بررسی تاثیر پیری تسریع شده بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و پراکسیداسیون لپید دو رقم سویا، آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی بصورت فاکتوریل با 5 زمان پیری (3، 6، 9 و 12 روز پیری و بذور پیر نشده) و دو رقم (سحر و کتول) در آزمایشگاه تجزیه بذر مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان در سال 1391 انجام شد. در این آزمایش پیری تسریع شده با نگهداری بذور در دمای 40 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 100 درصد انجام گرفت. آزمون قوه نامیه، هدایت الکتریکی، پراکسیداسیون لپید و اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پلی فنل اکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در بذور پیر شده و نشده انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش زمان پیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بجز پراکسیداز کاهش یافت که نتیجه آن افزایش پراکسیداسیون لپید و افزایش هدایت الکتریکی مواد نشت یافته از بذربوده و مجموع این عوامل موجب کاهش شدید قوه نامیه بذور گردید. در بین صفات اندازه گیری شده هدایت الکتریکی بیشترین همبستگی را با قوه نامیه (0/861-) داشت و صفتی مناسب جهت ارزیابی سریع قوه نامیه بذور پیر شده است. نتایج همچنین نشان داد که رقم کتول بردباری بیشتری به پیری تسریع شده نسبت به رقم سحرداشت.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، بنیه بذر، پیری تسریع شده، رقم، سویا

مقدمه

در طی انبارداری با گذشت زمان به تدریج قوه حیات و توان جوانه‌زنی بذرها کاهش می‌یابد (Verma *et al.*,2003). زوال بذر در طی انبارداری باعث کاهش کیفیت بذر، استقرار گیاهچه و عملکرد گیاه در مزرعه خواهدشد (McDonald, 1999). کاهش کیفیت بذر به شدت تحت تأثیرعوامل مختلف مانند دمای محیط، محتوی رطوبت بذر و رطوبت نسبی محیط قرار می‌گیرد و تغییرات مختلف بیوشیمیایی و متابولیکی درطی فرآیند پیری رخ می‌دهد که در

*نویسنده مسئول: مهرناز مهرآور،
E-mail: mehrnazmehravar@yahoo.ca
تاریخ دریافت: 92/2/28
تاریخ تصویب: 92/9/11

اکسیژن[1](ROS) مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) رادیکال سوپراکسید O_2^o و رادیکال هیدروکسیل (OH) معمولاً به عنوان مولکول‌های سمی مورد توجه- اند که تجمع آنها باعث پراکسیداسیون چربی‌ها، غیر فعال شدن آنزیم‌ها، خسارت به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاهای سلولی می‌شود(MC Donald , 1999; Bailly, 2004).

مکانیزم‌های مختلفی در فرآیند پیری بذر شرکت دارند که سبب کاهش بنیه و کیفیت بذر می‌شوند عدم توانایی بذر در تولید آنزیم‌های ضروری جهت سم زدایی و ترمیم یکی از پیامدهای آنزیم سازی ناقص و ناکارآ در بذرهای پیر شده است دو آنزیم مهم آنتی اکسیدانت در بذر جو، پراکسیداز[2] وکاتالاز[3] می‌باشند که از بین برنده رادیکال های آزاد هستند. کاتالاز یکی از آنزیم‌هایی است که در تمام سلولهای زنده وجود دارد و پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) را سریع به آب و گاز اکسیژن می‌شکند (در ثانیه ۴۰ میلیون مولکول H_2O_2 را به آب و گاز اکسیژن می شکند در واقع کاتالاز از (H_2O_2) به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند پراکسیداز نیز از آنتی اکسیدانت های مهم است که از پراکسید هیدروژن به عنوان پذیرنده الکترون برای کاتالیز تعدادی از واکنش های اکسیداتیو استفاده می‌کند. واکنش گونه‌های اکسیژن، CO_2 و پراکسیدهیدروژن نقش مهمی در فرسودگی بذر در طول پیری ایفا می‌کنند (Simontacchi *et al.*, 1993). خسارت به غشاهای سلول به عنوان عامل اصلی زوال بذرهای انبار شده شناخته شده است (McDonald, 1999) در طول دوره انبارکردن در حالی که محتوی رطوبتی بذر پایین است اکسیداسیون خود به خودی چربی‌ها موجب تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (McDonald, 1999; Bailly, 2004). آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)[4] در چرخه گلوتاتیون – آسکوربات با استفاده از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون موجب تجزیه پراکسیداسیون هیدروژن[5] می‌شود (Noctor and Foyer, 1998) که با حذف پراکسید هیدروژن علاوه بر کاهش خسارت ناشی از آن، مانع تشکیل رادیکال خطرناک هیدروکسیل از پر اکسیدهیدروژن ورادیکال سوپر اکسید در طی واکنش هایر–وایس می‌شوند (Sung, 1996).

اثر پیری زودرس بر بذر پنبه نشان داد که محتوی غشا و اسیدهای چرب آزاد و پراکسیداز با گذشت پیری بطور خطی افزایش یافت بذور پنبه از دسته بذرهایی است که یکسال پس از انبار داری بشدت قوه نامیه آن کاهش می‌یابد بذرهای پنبه نیز مانند سایر بذرهای روغنی آمادگی بیشتری برای زوال در کیفیت روغن دارد. بهم ریختگی غشاء یکی از دلایل اصلی فساد بذر است. دلیل اصلی ترکیدگی غشا و افزایش شکاف غشاء میزان اسیدهای چرب آزاد و رادیکال‌های آزاد تولید شده در اثر پراکسیدسیون لیپید است (Goel and Goel, 2003). مکانیزم‌های حفاظتی که باعث جمع آوری رادیکال های آزاد تولید شده در اثر پراکسیداسیون چربی در داخل بذر می‌شوند در سویا و آفتابگردان گزارش شده است (Sung, 2006). این مکانیسم‌های حفاظتی

1 . Reactive Oxygen Species(ROS)
2 . Peroxidase
3 . Catalase

4 . Ascorbat Peroxidase
5 . Haber-Weiss

چندین رادیکال آزاد و آنزیم‌های جمع کننده پراکسیدها مانند کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز [1]واسیداسکوربیک را درگیر می‌کنند. همچنین مطالعاتی که در مورد بذر سویا در طول انبار داری انجام شده نشان داد که دلیل اصلی از دست رفتن قوه نامیه بذر هنوز به طور کامل شناخته شده نیست در حضور اکسیژن پیری بذرها می‌تواند موجب تغییرات پراکسید در اسیدهای چرب شود (Stewat and Pewley, 1980). پراکسیداز به عنوان یک احیا کننده برای خیلی از رادیکال‌های آزاد و به خصوص پراکسیدهیدروژن عمل می‌کند. بنابراین خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به کمترین مقدار می‌رساند (Arora *et al*., 2002; Kocsy *et al*., 2005). بذرهای سویا به لحاظ نوع ترکیبات از بذرهایی است که به پیری حساس هستند و از این رو هدف این مطالعه بررسی تاثیر پیری تسریع شده بر دو رقم سویا کتول و سحر و انتخاب بهترین شاخص به منظور ارزیابی سریع بذر و انتخاب رقم متحمل به پیری بود.

مواد و روش

دو رقم بذر سویا با قوه نامیه ۹۴ درصد و خلوص فیزیکی ۹۸ درصد و رطوبت ۱۲ درصد از شرکت اتحادیه تعاون روستایی گرگان که تولیدی سال ۱۳۹۱ جهت انجام آزمایش های پیری تسریع شده در آزمایشگاه تجزیه بذر مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان مورداستفاده قرار گرفتند. آزمون پیری تسریع شده توسط انجمن بین المللی آزمون بذر(ISTA) [2] برای بذر سویا طبق دستور العمل استاندارد انجام گردید. ابتدا دمای آون روی ۰/۳±۴۱ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردیده و با تثبیت دمای مورد نظر به مدت دو ساعت، آزمون پیری بذر در آن انجام شد.

برای جلوگیری از آلودگی قارچی، قبل از هر آزمایش جعبه‌های پلاستیکی والک ها با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵درصد یا مایع ظرف شویی به خوبی شسته شده و خشک شد. مقدار ۱±۴۰ میلی لیتر آب مقطر (بدون یون) وارد هر جعبه پلاستیکی نموده و یک الک خشک طوری روی آن قرار داده شد که آب روی صفحه مشبک آن پاشیده نشود. مقدار ۰/۵±۴۲ گرم بذر سویا (حداقل ۱۰۰بذر) توزین نموده و به صورت یک لایه روی صفحه الک قرار داده شد تا به صورت یکنواخت آب جذب کنند. سپس درپوش جعبه پلاستیکی روی آن گذاشته شد جعبه‌های پلاستیکی حاوی بذر به فاصله ۲/۵ سانتی‌متر روی قفسه‌های آون قرار گرفت تا یکنواختی دما در داخل آون تضمین گردد. دو جعبه حاوی بذر سویا (حداقل ۲۰۰ بذر) برای پیری و یک یا دو نمونه شاهد برای هر آزمایش لازم بود. پایان مدت پیری (۳، ۶، ۹، ۱۲) روز جعبه‌های پلاستیکی از آون خارج گردیده و بذرهای موجود در جعبه‌های شاهد دوباره توزین شدند. در طول آزمایش اگر وزن بذرها کمتر از ۵۲ گرم و یا بیش از ۵۵ گرم باشد، آزمایش دوباره تکرار گردید و سپس آزمون جوانه زنی روی نمونه‌های بذری انجام گرفت (ISTA, 2010). به منظور اندازه گیری درصد جوانه زنی، آزمون استاندارد جوانه زنی بر اساس ISTA(2010) انجام گرفت. ابتدا بذرها توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد ضد عفونی شدند. سپس ۵۰ عدد بذر در هر ظرف پتری استریل (قطر ۹ سانتی متر) بر روی

1 . Super oxide dismutase
2 . International Seed Testing Association (ISTA)

کاغذ صافی قرار داده شد و مقدار ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد. ظرف های پتری در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت ۹۰ درصد به مدت ۷ روز قرار داده شد. تعداد بذرهای جوانه زده هر روز تا رسیدن به روز هفتم شمارش و یادداشت برداری و سپس درصد جوانه زنی محاسبه شد. به منظور اندازه گیری هدایت الکتریکی، چهار تکرار ۵۰ بذری از هر نمونه به طور تصادفی شمارش و با ترازوی دقیق با دقت ۰/۱۰ گرم توزین شد. برای هر تکرار یک ظرف (ارلن) درنظر گرفته شده و ۵±۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر یا آب مقطر دو بار تقطیر شده در داخل آن ریخته شد. برای جلوگیری از آلودگی، دهانه هر ظرف با فویل آلومینیومی یا درپوش دیگری بسته شده و به مدت ۲۴-۱۸ساعت در دمای ۲±۲۰ نگهداری شد تا دمای آب به دمای مورد نظر برسد. در هر آزمایش دو ظرف حاوی آب مقطر دو بار تقطیر شده به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. با برداشتن در پوش هر ظرف، بذرهای یک تکرار (۵۰ عدد) در داخل آن ریخته شده و دهانه آن دوباره بسته شد ظرف کمی تکان داده شد تا همه بذرها در آب غوطه ور گردند. زمان شروع آزمایش روی ظرف نوشته شده و برای ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۲±۲۰ نگهداری شد. تعداد ظرف‌هایی که دریک زمان آزمون آنها شروع می‌شود باید در حدود ۱۲ ظرف باشد تا مدت اندازه گیری هدایت الکتریکی وثبت آن‌ها در پایان آزمایش بیش از ۱۵دقیقه طول نکشد. بعد از۲۴ ساعت، هر ظرف به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه تکان داده شد تا مواد نشت یافته از بذرها مخلوط گردد. سپس سلول هدایت سنج طوری در محلول وارد گردیدکه با بذرها تماس نداشته باشد و هدایت الکتریکی محلول ثبت شد. درصورت مشاهده بذرهای سخت، آن‌ها را جدا نموده و پس از خشک کردن و توزین، وزن آن‌ها از وزن ۵۰ بذر آن تکرار کسر شد. به منظور اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در بذر و محور جنین بذر، میزان تولید مالون دی آلدئید(MDA) درکل بذر و محور جنین اندازه گیری شد (Heath and Packer,1968). اندازه گیری فعالیت آنزیم‌ها پراکسیداز (Koroi,1989)، آنزیم کاتالاز (Kar and Mishra 1976)، پلی فنل اکسیداز (Kar and Mishra 1976)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (Beauchamp *et al.*,1983) اندازه گیری آسکوربات پراکسیداز(Nakano and Asada, 1981) نیز در بذرها به شرح زیر انجام شد.

اندازه گیری پراکسیداسیون چربی ها

به منظور بر آورد میزان پراکسیداسیون چربی ها در بذر ومحور جنین بذر، میزان تولید مالون دی آلدئید(MDA) درکل بذر و محور جنین براساس روش هیس و پیکر (Heath and packer; 1968) اندازه گیری شد. پس از جدا کردن پوشش بذر۰/۵ گرم بذر را در هاون چینی کاملا پودر کرده سپس ۴ میلی لیتر محلول اسید تری کلرواستیک ۱درصد به آن اضافه شد وکاملا هموژنیزه شد سپس مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و ۲ میلی لیتر از محلول روشناور جمع آوری شده و مقدار ۴ میلی لیتر محلول ۵ درصد اسید تیوباریتوریک (TBA) حاوی ۲۰درصد اسید تری کلرو استیک (TCA) اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد.سپس مخلوط را بلافاصله در حمام آب و یخ قرارداده تا کاملا سرد شود. سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در۱۰۰۰۰ دور دردقیقه سانتریفوژشد و محلول رویی شناور آن جمع آوری شد. میزان جذب مخلوط

در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد و پس از کسر میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب خاموشی میزان مالون دی آلدهید تولید شده محاسبه شد وبر حسب میکرو مول در گرم وزن تر بذر گزارش شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

جهت تهیه محلول عصاره گیری ۱/۲ گرم تریس و ۲ گرم اسید آسکوربیک و ۳/۸ گرم بوراکس[1] و ۲گرم Na_2 EDTA[2] و ۵۰ گرم پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ (۱۶/۶ گرم پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰) با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. یک گرم نمونه با چهار میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری به مدت ۳۰ دقیقه همگن شد. ۲ میلی گرم تامپون استات ۰/۲ مولار، pH ۵ با ۰/۴ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۲ میلی‌لیتر بنزیدین[3] محلول در الکل ۵۰ درجه ۰/۰۱ مولار مخلوط و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به مخلوط اضافه شد. جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد خوانده شد. لازم به ذکر است به منظور حفظ فعالیت پراکسیداز کلیه مراحل سنجش فعالیت آنزیم در ظرف یخ انجام گرفت (Koroi, 1989).

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش این آنزیم از عصاره آنزیمی استخراج شده برای فعالیت پراکسیداز استفاده شد. ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد با ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و جذب در ۲۴۰ نانومتر خوانده شد (کلیه مراحل فوق در ظرف یخ انجام شد) فعالیت آنزیم بر حسب تجزیه یک میکرومول آب اکسیژنه در یک دقیقه محاسبه گردید (Kar and Mishra 1976) .

اندازه گیری فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

جهت بررسی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز از عصاره آنزیمی استخراج شده برای فعالیت پراکسیداز استفاده شد. جهت انجام آزمایش ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۷/۶ با ۰/۴ میلی‌لیتر پیروگالول[4] ۰/۰۲ مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و در بن‌ماری ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت. سپس تغییرات جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم بر حسب $ODmin^{-1}g^{-1}FW$ گزارش گردید (Monolangan and Dinabandha،1975).

اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

ابتدا مقدار ۰/۲۱۲ گرم از KH^2PO^4 را با ۰/۱۹۳ گرم میتونین در بالن ژوژه در تاریکی (پوشاندن بالن با فویل)مخلوط گردید و به کمک آب مقطر حجم محلول به ۸۸ سانتی متر مکعب رسانده شد، سپس ۰/۰۶۱ گرم از NBT[5] را به حجم ۱۰۰ سی سی با آب مقطر رسانده شد و ۰/۳۷ گرم از EDTA به کمک آب مقطر به حجم ۱۰۰ سانتی متر مکعب رسانده شد. سپس ۱ مول از NBT و یک مول از EDTA به محلول فوق اضافه شد و حجم کلی محلول به ۹۹ سانتی متر مکعب رسانده شد، سپس ۰/۷۵ گرم از ریبوفلاوژن را به کمک آب مقطر به حجم ۱۰۰ سانتی متر مکعب

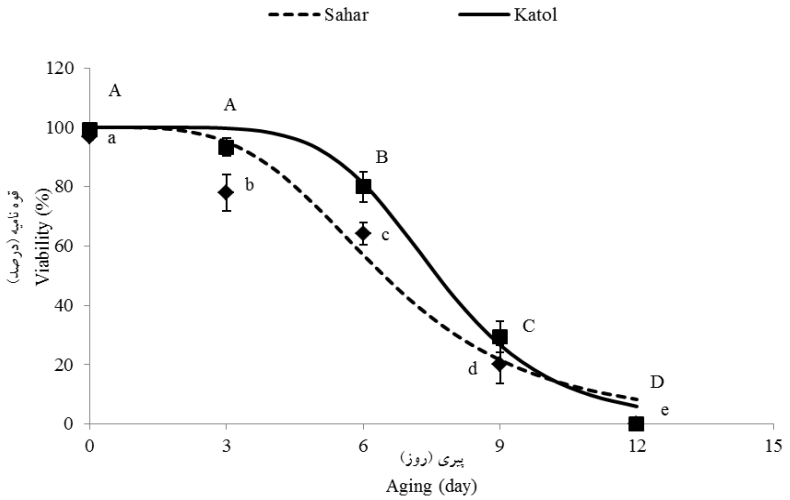
1 . Di-Sodium Tetra Borate
2 . Disodiume thylendiamin etetra acetic acid
3 . Benzidine
4 . Pyrogallo
5 . Nitroblue tetra zolium(NBT)

رساندیم و ۱ مول از آن را به محلول فوق که حجم آن ۹۹ سانتی متر مکعب است اضافه گردید تا حجم آن به ۱۰۰ سی سی برسد. مقدار ۳ سانتی متر مکعب از این محلول با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط کرده و در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده تا آنزیم غیرفعال شود بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه در نور (شرایط آزمایشگاه) قرار داده و جذب نوری در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. ۳ سانتی متر مکعب محلول با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط کرده و در آن به مدت ۱۵ دقیقه در نور (شرایط آزمایشگاه) قرار داده و جذب نوری در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. ۳ سانتی متر مکعب محلول با ۱۰۰ میکرولیتر محلول عصاره گیری به عنوان بلانک استفاده شد (Beauchamp *et al.*,1983). تجزیه واریانس داده‌ها آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت فاکتوریل با ۵ زمان پیری (۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز پیری و بذور پیر نشده) و دو رقم سحر و کتول با سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) انجام پذیرفت. محاسبه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودار به ترتیب با استفاده از نرم‌افزار Word و Excel انجام شدند. کمیت ها به صورت میانگین و خطای معیار معرفی شده اند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که درصد جوانه زنی بذرهای در اثر پیری تسریع شده کاهش معنی داری داشت و در ۱۲ روز پیری به صفر رسیده است (جدول ۱ و شکل ۱). جوانه زنی رقم کتول در سطوح ۳، ۶ و ۹ روز پیری بیشتر از رقم سحر بود. برازش داده ها با تابع کاهشی نشان داد که ۵۰ درصد کاهش در قوه نامیه به ترتیب در رقم سحر و بعد از ۴ و۶ روز وکتول بعد از ۳ و ۶ روز پیری اتفاق افتاده است (شکل ۱). بنابراین رقم کتول تحمل بیشتری به پیری تسریع شده نسبت به رقم سحر دارد. نتایج مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی نشان دهنده این است که درصد جوانه زنی از ۹۸ درصد در تیمار بدون پیری به ۲۴ درصد در تیمار ۹روز پیری و به صفر درصد در تیمار۱۲روز پیری رسید. اختلاف معنی‌داری بین سطوح پیری و رقم از لحاظ هدایت الکتریکی مشاهده شد (جدول ۱). با ایجاد پیری تسریع شده هدایت الکتریکی بذور افزایش یافت (شکل۲). هدایت الکتریکی بذر رقم کتول در تیمار بدون پیری کمتر از رقم سحر بود در حالی که اختلاف معنی-داری در درصد جوانه‌زنی مشاهده نشد. عدم اختلاف معنی‌دار در بررسی اثر متقابل رقم و پیری نشان داده است که پیری بر هدایت الکتریکی هر دو رقم تاثیر مشابهی داشت (جدول۱) و علت اختلاف دو رقم به دلیل اختلاف اولیه در بذور دو رقم است. میزان نشت الکترولیت ها از بذر یکی از پارامترهای نشان دهنده سلامت غشاء است که در بیشتر مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است نتایج مقایسه میانگین نشت الکترولیت‌ها از بذر نشان دهنده این است که در تیمار پیری مصنوعی با افزایش مدت زمان پیری میزان نشت الکترولیت‌ها از بذر افزایش یافت به طوری که این مقدار در تیمار ۱۲ روز پیری به حداکثر مقدار خود رسیده است. اختلاف بین سطوح پیری، رقم و اثرمتقابل پیری و رقم بر میزان پراکسیداسیون لپید معنی‌دار بود (جدول ۱). پراکسیداسیون لپید در ۱۲ روز پیری اختلاف بسیار معنی‌داری با سایر سطوح داشته است (شکل ۳). از جمله تغییراتی که در غشاء رخ می‌دهد و باعث افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذر می‌شود پراکسیداسیون چربی‌های غشاء سلولی می

باشد (Copeland and Mc Donald, 1985) از دست رفتن عملکرد غشاء و نشت مواد مختلف از سلول یکی از عوامل اصلی مسئول کاهش پتانسیل جوانه‌زنی و رشد گیاهچه است (Goel and Sheoran, 2003) پراکسیداسیون چربی‌های غشاء از جمله عوامل اصلی است که باعث می‌شود ساختارهای غشاء سلول بهم خورده و نشت الکترولیت‌ها افزایش یابد دراین تحقیق نیز نتایج بدست آمده نشان دهنده این است که با افزایش مدت زمان پیری مصنوعی میزان مالون دی آلدئید (MDA) که نشان دهنده پراکسیداسیون چربی‌ها است افزایش یافته و در تیمار ۱۲ روز پیری به حداکثر مقدار خود رسیده است. میزان MDA در بذرهای پیر شده نسبت به بذرهای بذر پیر نشده به طور معنی داری بیشتر بوده است افزایش همزمان نشت الکترولیت‌ها میزان MDA بذر در مطالعات دیگر گزارش شده است و عنوان شده پراکسیداسیون چربی ها می‌تواند بخش قابل توجهی از افزایش نشت الکترولیت ها و هم چنین کاهش فعالیت جوانه‌زنی را توضیح دهد (Chiu *et al*., 2006).



شکل ۱- تاثیر مدت پیری و رقم بر جوانه زنی دو رقم سویا (سحر وکتول) نقاط دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند (حروف بزرگ رقم کتول و حروف کوچک رقم سحر) و میله‌ها نشاندهنده خطای معیار هستند.

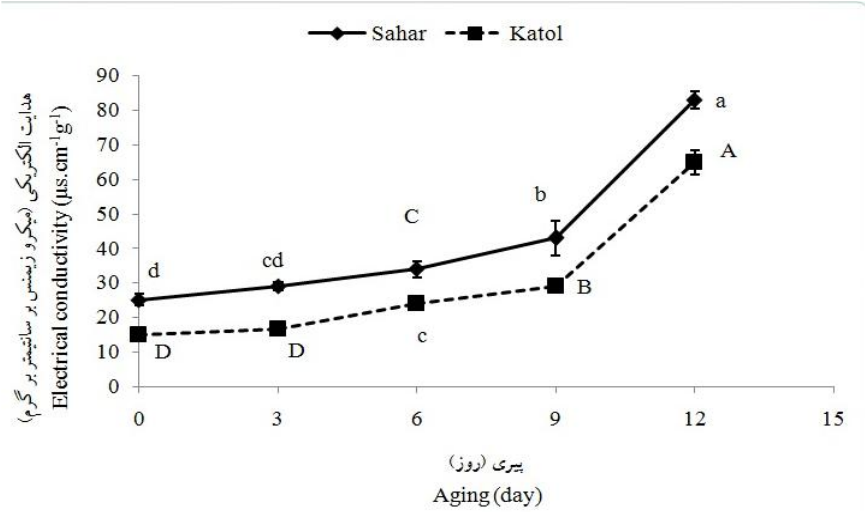
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده سویا (اعداد داخل جدول میانگین مربعات می‌باشد).

Table 1- Analysis of variance of measured traits of soybean (Data in table are mean square)

		میانگین مربعات(MS)							
منابع تغییرات	درجه آزادی	پراکسیداز	کاتالاز	پلی فنل اکسیداز	اسکوربات پراکسیدا ز	هدایت الکتریکی	پراکسیداسیون لپید	سوپراکسید دیسموتاز	درصد جوانه زنی
Sources	Df	Peroxidase	Catalase	Polyphenol Oxidase	Ascorbate peroxidase	EC	Lipid peroxidation	SOD	Germination percent
پیری Aging	4	0.000267**	0.139**	0.0008**	0.023**	2862.24**	0.109**	0.205**	10526.8**
رقم Cultivar	1	0.00000056 ns	0.013 ns	0.00001 ns	0.053*	1258.54 **	0.067 **	0.029 ns	563.33**
اثر متقابل Interaction	4	0.000182**	0.442**	0.00029 **	0.043 **	17.55 ns	0.015 *	0.131 **	78.66 ns
CV (%)		15.04	19.87	17.91	17.69	9.28	31.49	27.62	10.04

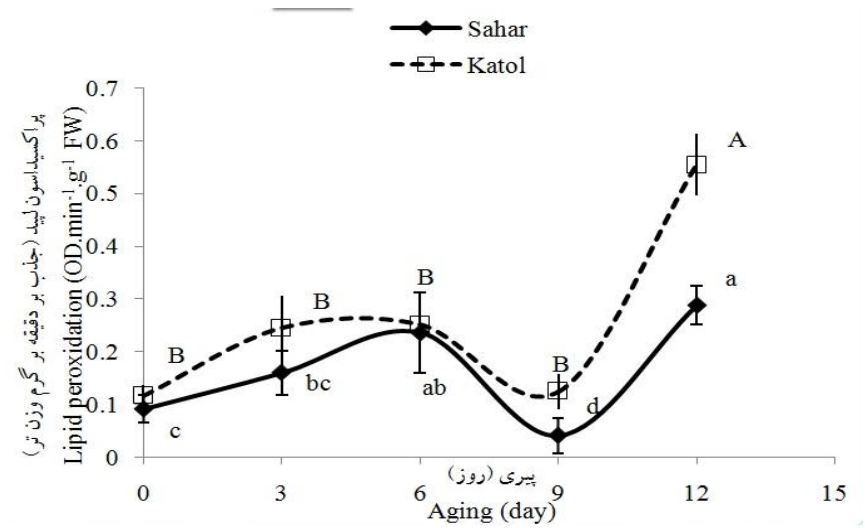
** معنی‌دار در سطح ۱ درصد، * معنی‌دار در سطح ۵ درصد و ns معنی‌دار نیست.

**, * significant at 1 and 5% and ns no significant.



شکل ۲- تاثیر پیری و رقم بر هدایت الکتریکی دو رقم سویا (سحر وکتول) نقاط دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند (حروف بزرگ رقم کتول و حروف کوچک رقم سحر) و میله‌ها نشاندهنده خطای معیار هستند.

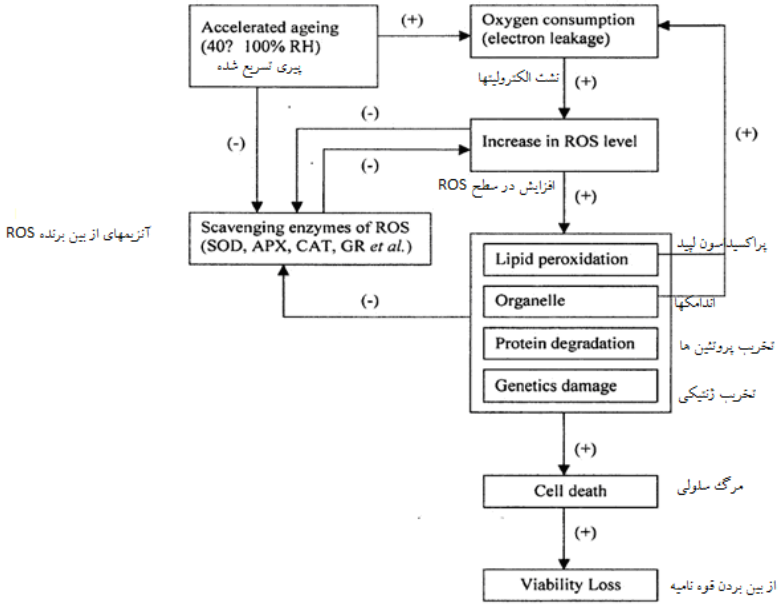
مک دونالد (McDonald, 1999) ملاحظه کرد که تولید انواع اکسیژن مثال (ROS) که موجب پراکسیداسیون چربی می‌شود ممکن است اساس ایجاد زوال بذرها باشد و بر اساس این تجربیات مدلی برای توضیح و ارتباط بین بنیه بذر- مرگ سلول- تولید و حذف انواع اکسیژن مثال (ROS) و پراکسیداسیون لیپید در طی پیری تسریع شده پیشنهاد شد. بر اساس نتایج آزمایشات بدست آمده می‌توان مدلی پیشنهادی جهت فرآیندهای سلولی در طی پیری بذر به شرح ذیل ارایه داد (شکل ۴).



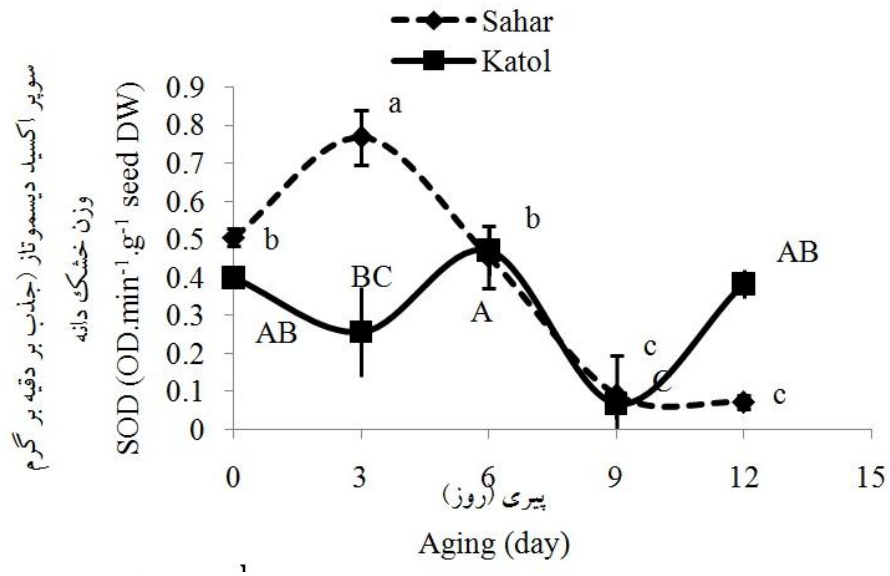
شکل ۳- تاثیر مدت پیری بر پراکسیداسیون لیپید دو رقم سویا (سحر وکتول) نقاط دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند (حروف بزرگ رقم کتول و حروف کوچک رقم سحر) و میله‌ها نشان دهنده خطای معیار هستند.

اختلاف بین سطوح مدت پیری و اثرمتقابل مدت پیری و رقم بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار و اختلاف دو رقم معنی‌دار نبود (جدول ۱). روند فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

(SOD) در طول دوران پیری کاهشی بود و این کاهش در رقم سحر مشهودتر از رقم کتول بود (شکل۵).



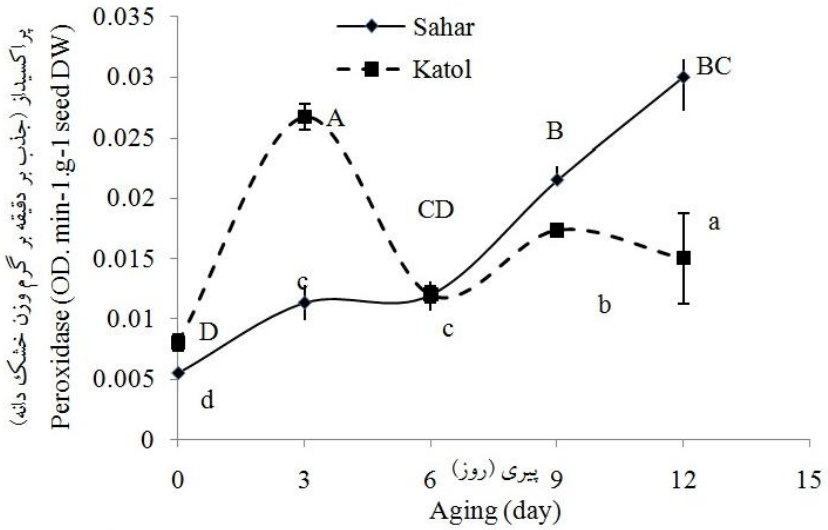
شکل ۴- مدلی که نشان دهنده رابطه بین پیری، افزایش انواع اکسیژن مثال(ROS) ها، نشت الکترونی و مرگ سلولی است (+) نشان دهنده ایجاد و (-) نشان دهنده ممانعت است.



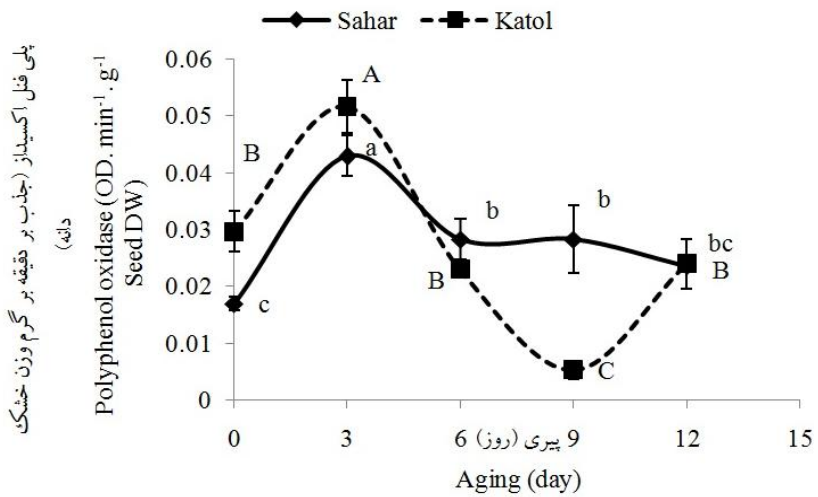
شکل ۵- تاثیرمدت پیری برفعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز دو رقم سویا (سحر وکتول) نقاط دارای حروف مشترک اختلاف معنی-داری ندارند (حروف بزرگ رقم کتول و حروف کوچک رقم سحر) و میله‌ها نشان دهنده خطای معیار هستند.

اختلاف بین سطوح پیری و اثرمتقابل پیری و رقم بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار و اختلاف دو رقم معنی‌دار نبود (جدول ۱). میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در بذرهای پیر نشده کم است و با پیر شدن بذرها فعالیت آنزیم پراکسیداز به دلیل جلوگیری از متوقف شدن جوانه زنی بذر افزایشی یافته است

(شکل ۶) بیشترین افزایش در رقم سحر مشاهده شده است. اختلاف بین سطوح مدت پیری و اثرمتقابل مدت پیری و رقم بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار و اختلاف دو رقم معنی‌دار نبود (جدول ۱ و شکل ۷).

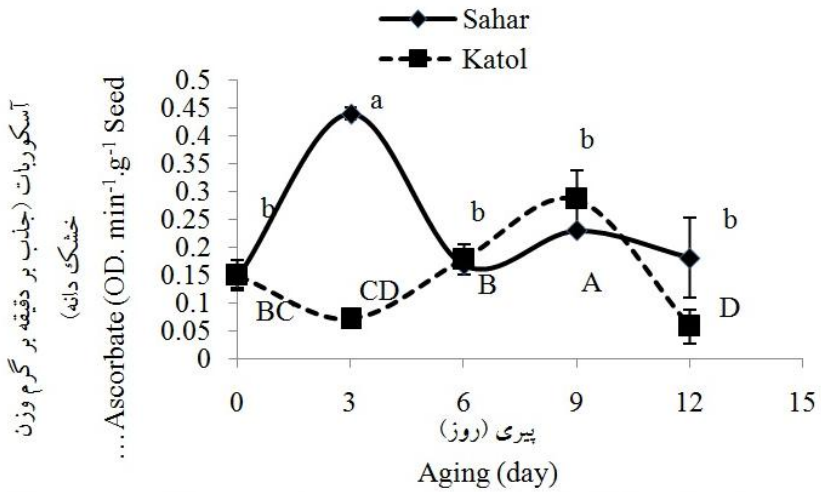


شکل ۶- تاثیرپیری و رقم برفعالیت آنزیم پراکسیداز دو رقم سویا (سحر وکتول) نقاط دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند (حروف بزرگ رقم کتول و حروف کوچک رقم سحر) و میله‌ها نشاندهنده خطای معیار هستند.



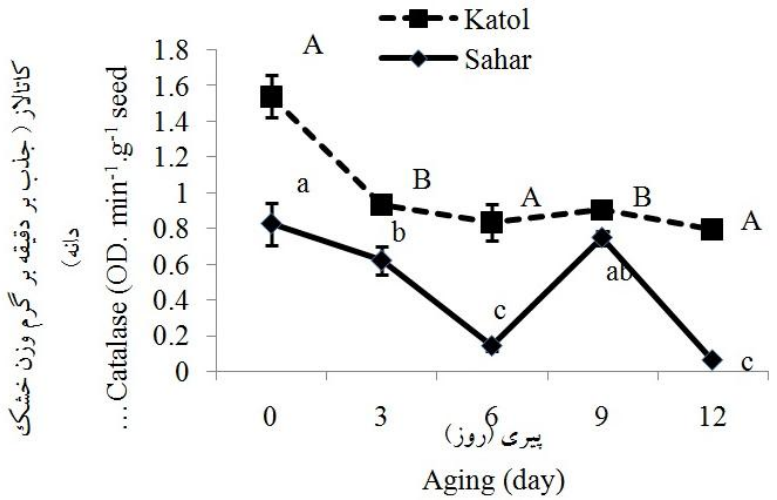
شکل ۷- تاثیرپیری و رقم برفعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در دو رقم سویا (سحر وکتول) نقاط دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند (حروف بزرگ رقم کتول و حروف کوچک رقم سحر) و میله‌ها نشاندهنده خطای معیار هستند.

اختلاف بین سطوح پیری، رقم و اثرمتقابل پیری و رقم بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۱). میزان فعالیت آنزیم آسکوربات در بذور پیر نشده پایین بود با پیری بذر میزان فعالیت آن در رقم سحر افزایش معنی‌داری داشت و سپس کاهش یافت (شکل ۸).



شکل ۸- تاثیرمدت پیری برفعالیت آنزیم آسکوربات در دو رقم سویا (سحر وکتول) نقاط دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند (حروف بزرگ رقم کتول و حروف کوچک رقم سحر) و میله‌ها نشان دهنده خطای معیار هستند.

اختلاف بین سطوح پیری و اثرمتقابل پیری و رقم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز معنی‌دار بود (جدول ۱). میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با پیری بذور کاهش یافته است (شکل ۹).



شکل ۹- تاثیرپیری و رقم برفعالیت آنزیم کاتالاز در دو رقم سویا (سحر وکتول) نقاط دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند (حروف بزرگ رقم کتول و حروف کوچک رقم سحر) و میله‌ها نشاندهنده خطای معیار هستند.

میزان آنزیم کاتالاز در رقم کتول بیشتر از سحر بود. نتایج بررسی ضرایب همبستگی نشان داد که درصد جوانه زنی بذرها با پراکسیداز، پراکسیداسیون لیپید و هدایت الکتریکی همبستگی منفی و معنی‌دار دارند و با آنزیم سوپراکسید دیسموتاز همبستگی مثبت دارد و بهترین رابطه همبستگی بین درصد جوانه زنی و هدایت الکتریکی بذر مشاهده شد (۰/۸۶۱-) (جدول ۲). به نظر می‌رسد با توجه به این نتایج هدایت الکتریکی بهترین شاخص برای ارزیابی سریع قوه نامیه در بذور پیر شده باشد. دراین مطالعه نیز بین

محتوی MDA و درصد جوانه‌زنی همبستگی منفی و معنی‌داری وجود دارد و بین محتوی MDA و میزان نشت الکترولیت از بذر همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد که این همبستگی‌ها نشان دهنده رابطه بین پراکسیداسیون چربی‌ها و افزایش نشت الکترولیت‌ها بر اثر تخریب غشاء است که در نهایت موجب کاهش توان جوانه‌زنی ورشد گیاهچه شده است. در طی پیری بذر پراکسیداسیون لیپید صورت می‌گیرد.

جدول ۲- جدول ضرایب همبستگی بین صفات

	پراکسیداز Peroxidase	کاتالاز Catalase	سوپراکسید دیسموتاز SOD	پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase	آسکوربات Ascorbate	پراکسیداسیون لیپید Lipid peroxidation	هدایت الکتریکی Electrical conductivity	قوه نامیه Viability
Peroxidase پراکسیداز	1							
کاتالاز Catalase	-0/539**	1						
سوپراکسید دیسموتاز SOD	-0/662/**	0/403*	1					
پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase	0/223	0/070	0/293	1				
آسکوربات Ascorbate	-0/155	-0/016	0/240	-0/009	1			
پراکسیداسیون لیپید Lipid peroxidation	۰/0/174	-0/087	0/093	0/032	-0/442*	1		
هدایت الکتریکی Electrical conductivity	۵۰۱0/501۰/**	-0/276	-0/357	-0/243	-0/108	0/516**	1	
قوه نامیه Viability	-0/527**	0/281	0/551**	0/358	0/031	-0/401*	-/861**	1

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد، * معنی‌دار در سطح ۵ درصد.

بحث

کاهش درصد جوانه‌زنی بر اثر پیری بذر در اکثر تحقیقات مشاهده شده است اگر چه مکانیزم‌های دقیق از دست رفتن قوه نامیه بذر هنوز مشخص نشده ولی دلایل متعدد بیوشیمیایی و متابولیکی برای کاهش توان جوانه‌زنی بذرها عنوان شده است که از آن جمله می توان به پراکسیداسیون چربی ها و خسارت به غشاءهای سلولی همچنین آسیب به فرایند سنتز RNA تخریب DNA رسوب و غیرفعال شدن آنزیم‌ها اشاره کرد (Lehner *et al*., 2008;Murthy *et al*., 2003; Basra *et al*., 2003). افزایش نشت الکترولیت ها ناشی از برخی تغییرات ساختمانی غشاء سلول است که باعث از بین رفتن یکپارچگی غشاء می‌شود در نتیجه قابلیت نفوذ پذیری غشاء افزایش یافته و میزان خروج الکترولیت ها و دیگر مواد از بذر افزایش یافته است (Goel and Sheoran, 2003). از دست رفتن عملکرد غشاء و نشت مواد مختلف از سلول یکی از فاکتورهای اصلی مسئول کاهش پتانسیل جوانه‌زنی و رشد گیاهچه است (Goel and Sheoran, 2003) پراکسیداسیون چربی‌های غشاء از جمله عوامل اصلی است که باعث می‌شود ساختارهای غشاء سلول بهم خورده و نشت الکترولیت ها افزایش یابد دراین تحقیق نیز نتایج بدست آمده نشانه این است که با افزایش مدت زمان پیری مصنوعی میزان مالون دی آلدئید (MDA) که نشان دهنده پراکسیداسیون چربی‌ها است افزایش یافته و در تیمار ۱۲ روز پیری به حداکثر مقدار خود رسیده است. MDA دربذرهای پیر شده نسبت به بذرهای بذر پیر نشده به طور معنی

داری بیشتر بوده است افزایش همزمان نشت الکترولیت‌ها و میزان MDA بذردر مطالعات دیگر گزارش شده است و عنوان شده پراکسیداسیون چربی ها می‌تواند بخش قابل توجهی از افزایش نشت الکترولیت ها و هم چنین کاهش فعالیت جوانه‌زنی را توضیح دهد(Chiu *et al*, 2006) .

روند فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در طول دوران پیری کاهشی بود و این کاهش در رقم کتول مشهودتر از رقم سحر بود. این نتایج با نتایج جنگ و سانگ (Jeng and Sung, 2006) در مورد بذرهای بادام زمینی و بیلی و همکاران (Bailly *et al.*, 2000) در مورد بذرهای آفتابگردان تطابق داشت که نشان دادند کاهش درصد جوانه زنی بذور با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بوده و پیری تسریع شده تجمع MDA را القا می کند. مک دونالد (McDonald,1999) ملاحظه کرد که تولید ROS که موجب پراکسیداسیون چربی می‌شود ممکن است اساس ایجاد زوال بذرها باشد و بر اساس این تجربیات مدلی برای توضیح و ارتباط بین بنیه بذر- مرگ سلول- تولید و حذف ROS و پراکسیداسیون لیپید در طی پیری تسریع شده پیشنهاد شد.

سوپراکسیددسموتاز اولین ماده تولید شده از احیا یک ظرفیتی اکسیژن یعنی رادیکال سوپراکسید را از بین می‌برد، بنابراین به SOD «دفاع اولیه» در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن گفته می‌شود (Alscher *et al.*, 2002). به نظر می‌رسد نقش آنزیم SOD جهت از بین بردن سوپراکسید بسیار مهم است، زیرا غشا فسفولیپیدی نسبت به رادیکال سوپراکسید نفوذناپذیر است (Alscher *et al.*, 2002). آسکوربات اسید یکی دیگر از آنتی اکسیدان های آنزیمی است که در کلروپلاست، سیتوزول، واکوئل و همچنین فضاهای آپوپلاستی سلول های برگ در غلظت های بالا یافت می‌شود (Cho and Seo, 2005). گزارش شده است که حدود ۴۰-۲۰درصد از آسکوربات اسید در سلول های مزوفیل برگ حضور دارند (Arora *et al.*, 2002). از نظر محققان مختلف این آنزیم به‌عنوان مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان در گیاهان می‌باشد. آسکوربات اسید پر اکسیداز دارای چندین نقش اساسی در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه مانند رشد، نمو و متابولیزم است و همچنین به عنوان یک احیاء کننده برای خیلی از رادیکالهای آزاد و به خصوص پراکسید هیدروژن عمل می‌کند، بنابراین خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به کمترین مقدار می‌رساند (Arora *et al.*, 2002; Kocsy *et al.*, 2005).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی پیری تسریع شده موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در دو رقم سویا شده که نتیجه آن پراکسیداسیون چربی‌های غشا و نشت مواد در آزمون هدایت الکتریکی شد. در بین صفات اندازه گیری شده هدایت الکتریکی صفت مناسبی و سریع برای تعیین قوه نامیه بذور سویا می‌باشد. روند کاهش قوه نامیه با افزایش پیری در رقم کتول کمتر از رقم سحر بود.

سپاسگزاری

نویسندگان وظیفه خود می‌دانند از همکاران آزمایشگاه تجزیه بذر واحد تحقیقات ثبت استان گلستان تشکر و قدردانی نمایند.

منبع

References

Alscher, R.G., N. Erturk, and Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J. Exp. Bot. 53: 1331-1341.

Arora, A., R. Sairam, Srivastava, G. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science 82: 1227-1238.
Association, I.S.T., 2010. The germination test. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf: International Seed Testing Association, 1-46.
Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci. Res. 14:93-107.
Bailly, C., A. Benamar, F. Corbineau, Côme, D. 2000. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. Seed Sci. Res. 10: 35-42.
Basra, S., N. Ahmad, M. Khan, N. Iqbal, M. Cheema, 2003. Assessment of cottonseed deterioration during accelerated ageing. Seed Sci. and Technol. 31: 531-540.
Beauchamp, C.O., S.L. Gonias, D.P. Menapace, S.V. Pizzo, 1983. A new procedure for the synthesis of polyethylene glycol-protein adducts; effects on function, receptor recognition, and clearance of superoxide dismutase, lactoferrin, and alpha 2-macroglobulin. Anal. Biochem. 131: 25-33.
Cho, U. H., Seo, N. H. 2005. Oxidative stress in (*Arabidopsis thaliana*) exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant Sci. 168: 113-120.
Goel, A., A.K. Goel, I.S. Sheoran, 2003. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. J. Plant Physiol. 160: 1093-1100.
Goel, A., and Sheoran, I. 2003. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. Biol. plantarum 46: 429-434.
Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189-198.
Kar, M., D. Mishra, 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol. 57: 315-319.
Kocsy, G., R. Laurie, G. Szalai, V. Szilagyi, L. Simon-Sarkadi, G. Galiba, De Ronde, J.A. 2005. Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses. Physiol. Plantarum 124: 227-235.
Koroi, S., 1989. Gel electrophoresis tissue and spectrophotometrscho unter uchungen zomeinfiuss der temperature auf struktur der amylase and peroxidase isoenzyme'. Physiol. Rev. 20: 15-23.
Lehner, A., N. Mamadou, P. Poels, D. Côme, Bailly, C. Corbineau, F. 2008. Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. J. Cereal Sci. 47: 555-565.
Maehly, A., Chance, B. 1954. Catalases and peroxidases. Methods of biochemical analysis 1: 357-424.
McDonald, M., 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. Seed Sci. & Technol. 27: 177-237.
Murthy, U.N., P.P. Kumar, Sun, W.Q. 2003. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. J. Exp. Bot. 54: 1057-1067.
Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiol. 22: 867-880.
Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Biol. 49: 249-279.
Priestley, D.A., 1986. Seed aging: implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Associates.
Simontacchi, M., A. Caro, C.G. Fraga, Puntarulo, S. 1993. Oxidative stress affects [alpha]-tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination. Plant physiol. 103: 949-953.
Stewart, R.R., Bewley, J.D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant physiol. 65: 245-248.
Sung, J., 1996. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during ageing. Plant Physiol. 97: 85–89.
Sung, J., T. Jeng, 2006. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. Physiol. Plantarum 91: 51-55.
Verma, S., U. Verma, Tomer, R. 2003. Studies on seed quality parameters in deteriorating seeds in Brassica (*Brassica campestris*). Seed Sci. Technol. 31: 389-396.