



تغییرات در کربوهیدرات‌های محلول و فعالیت آنزیم‌های پالاینده گونه‌های اکسیژن فعال در کدوتخم کاغذی طی انبارداری در دماها و رطوبت‌های مختلف بذر

*فرشید قادری^۱، افشین سلطانی^۲ و حمیدرضا صادقی‌پور^۳

^۱دانشیار و استاد گروه زراعت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

^۲دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه گلستان

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۵

چکیده

زوال یک پدیده طبیعی است که در همه بذرهای رخ می‌دهد و منجر به کاهش تدریجی توان زیستی بذر طی انبارداری می‌گردد و سرعت زوال به وضعیت فیزیولوژیکی و ساختار ژنتیکی بذرهای و شرایط انبارداری بستگی دارد. در مطالعه حاضر روابط بین انباشت قندهای احیایی و غیراحیایی، مقدار پروتئین محلول، فعالیت آنزیم‌های پالاینده گونه‌های اکسیژن فعال (کاتالاز و پراکسیداز) و زوال بذر در کدو تخم کاغذی (*Cucurbita pepo* subsp. *Pepo*. *Convar. Pepo* var. *styriaca* Greb) بررسی شد. بذرهای این گیاه در دماهای ۳۵ و ۵۰ درجه سلسیوس و رطوبت بذر ۸،۵ و ۱۴ درصد به مدت ۲ و ۴ روز قرار گرفتند. با افزایش دما و رطوبت بذر، انباشت قندهای احیایی افزایش و مقدار پروتئین محلول و قندهای غیراحیایی کاهش یافت که بیانگر این موضوع است که زوال در بذر کدوتخم کاغذی با واکنش‌های آمادوری و مایلارد همراه است. کاهش پروتئین‌های محلول با افزایش هدایت الکتریکی همراه بود. علت افزایش هدایت الکتریکی غشاء ممکن است ناشی از برخی اختلالات در ترکیبات پروتئین‌های غشاء در نتیجه واکنش گلیکوسیون غیر آنزیمی پروتئین‌ها و آمینواسیدها با قندهای احیایی در واکنش‌های آمادوری و مایلارد باشد. همچنین کاهش جوانه‌زنی با کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز همراه بود که بیانگر کاهش کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانت در حفاظت بذرهای در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد. به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده از این تحقیق بیانگر این مطلب است که زوال در بذرهای کدو تخم کاغذی با انباشت قندهای احیایی و کاهش پروتئین محلول همراه است که حاکی از فعال شدن واکنش‌های آمادوری و مایلارد در بذرهای کدو تخم کاغذی در طی زوال می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، پروتئین، جوانه‌زنی، زوال، کاتالاز، واکنش‌های آمادوری و مایلارد.

*مسئول مکاتبه: farshidghaderifar@yahoo.com

مقدمه

در بذره‌های فاقد کمون، بالاترین کیفیت بذر در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک حاصل می‌شود. شرایط محیطی در فاصله بین رسیدگی فیزیولوژیک تا رسیدگی برداشت و شرایط انبارداری بر کیفیت بذر تاثیرگذار می‌باشند (گوئل و شئوران، ۲۰۰۳). نظر به اینکه بذرها بعد از برداشت بلافاصله کشت نمی‌شوند و در انبار نگهداری می‌شوند (هانگ و ایس، ۱۹۹۶)، از این رو با افزایش دوره انبارداری، بذرها دچار زوال شده و کیفیت آن‌ها کاهش می‌یابد (لی و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین زوال بذر یک مسئله مهم در تولید محصولات کشاورزی می‌باشد (اسچومبر و برادفورد، ۲۰۱۰).

زوال بذر شامل برخی تغییرات بیوشیمیایی و بیوفیزیکی شامل کاهش فعالیت آنزیم‌ها، کاهش تمامیت غشاء و تغییرات ژنتیکی می‌باشد که نتیجه آن ابتدا باعث کاهش قدرت بذر و به دنبال آن کاهش توان زیستی بذر می‌باشد (کوربینو و همکاران، ۲۰۰۲؛ اکرم قادری، ۲۰۰۹). در دو دهه گذشته پژوهش‌های زیادی برای درک عوامل بنیادی فیزیولوژی زوال بذر و راه‌های کنترل آن صورت گرفته است اما هنوز دلایل قاطعی برای کاهش توان زیستی بذر در طی زوال ارائه نشده است. برخی محققان علت زوال بذر را پراکسیداسیون لیپید ناشی از افزایش گونه‌های اکسیژن فعال گزارش کردند (هنری، ۱۹۹۳؛ اسمیت و برجاک، ۱۹۹۵؛ والترز، ۱۹۹۸؛ مکدونالد، ۱۹۹۹؛ تیان و همکاران، ۲۰۰۸). در برخی از گزارش‌ها علت زوال بذر غیر فعال شدن آنزیم‌ها، اختلال در کارکرد غشاء سلول و خسارت به اسیدهای آمینه دانسته‌اند (سانگ و جنگ، ۱۹۹۴؛ والترز، ۱۹۹۸؛ فریتاز و همکاران، ۲۰۰۶). افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولتیک که در نتیجه منجر به تجزیه پروتئین‌ها و کربوهیدرات می‌شود نیز به‌عنوان علل زوال بیان شده‌اند (بیلی و همکاران، ۲۰۰۸).

در برخی از مطالعات فرآورده‌های ناشی از واکنش‌های آمادوری و مایلارد نیز به‌عنوان علل زوال معرفی شده‌اند (سان و لئوپولد، ۱۹۹۵؛ مورتی و همکاران، ۲۰۰۲). واکنش‌های آمادوری و مایلارد شبکه پیچیده‌ای از واکنش‌هایی هستند که به دنبال یک واکنش کربونیل-آمین رخ می‌دهند، که در نتیجه آن فرآورده‌های ثانویه متعددی ایجاد می‌شود (کیسلنگر و همکاران، ۲۰۰۳). در این واکنش‌ها، قندهای احیایی از طریق غیر آنزیمی با گروه‌های آمین آزاد پروتئین‌ها، پپتیدها، فسفولیپیدها و اسید نوکلئیک واکنش کرده و فرآورده‌های جانبی و نهایی غیر معمول در سطح سلول ایجاد و انباشته می‌شود (برنال-لوگو و لئوپولد، ۱۹۹۲؛ و تلافیر و لئوپولد، ۱۹۹۱؛ مورتی و سان، ۲۰۰۰؛ سان لئوپولد، ۱۹۹۵؛ استریلگ و همکاران، ۲۰۰۸) و در نتیجه از طریق تغییرات شیمیایی پروتئین‌ها و DNA و تغییر ساختار و کارکرد آنها (مورتی و سان، ۲۰۰۰)،

فعالیت‌های متابولیکی سلول را مختل کرده و توانایی سیستم متابولیکی در مقابل خسارت رادیکال‌های آزاد و ترمیم خسارت در طی جوانه‌زنی را کاهش می‌دهد. همچنین فعالیت آنزیم‌های پالاینده گونه‌های اکسیژن فعال تحت تاثیر محصولات آمادوری و مایلارد قرار می‌گیرند (مورتی و همکاران، ۲۰۰۳). فعالیت آنزیم‌های پالاینده گونه‌های اکسیژن فعال تحت تاثیر انباشت محصولات مایلارد کاهش می‌یابد. در نتیجه کاهش این آنزیم‌ها و افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال، سرعت تولید واکنش‌های آمادوری و مایلارد افزایش می‌یابد و در نتیجه جوانه‌زنی بذر کاهش می‌یابد (وتلافر و لئوپولد، ۱۹۹۱؛ ماچادو و همکاران، ۲۰۰۱؛ مورتی و همکاران، ۲۰۰۲). همچنین این واکنش‌ها فعالیت‌های آنزیم‌هایی از قبیل $Cu-Zn$ -سوپراکسید دیسموتاز (ثانی گوچی و همکاران، ۱۹۸۹)، ریونوکلئاز (ابل و همکاران، ۱۹۸۳)، ATP -آز وابسته به Na^+/K^+ (گارنر و همکاران، ۱۹۸۷) و لیزوزیم (وتلافر و لئوپولد، ۱۹۹۱) را کاهش می‌دهد. گزارش شده است که گلیکاسیون غیر آنزیمی DNA نقش مهمی در تشدید شکستن رشته‌های DNA و ایجاد اتصالات عرضی بین رشته‌ای و درون رشته‌ای دارد (لی و کرامی، ۱۹۸۹). تلفات فعالیت آنزیم‌های ترمیم کننده DNA از قبیل DNA لیگاز یکی از عوامل درگیر در تغییر مواد ژنتیکی و مرگ بذر در طی پیر شدن می‌باشد (آسبورن، ۱۹۸۰). اختلال و اضمحلال DNA رونویسی را کاهش می‌دهد و سبب سنتز ناقص پروتئین‌هایی که برای جوانه‌زنی بذر ضروری است می‌شود (مک دونالد، ۱۹۹۹).

با وجود مطالعات متعدد در زمینه نقش واکنش‌های آمادوری و مایلارد در انسان‌ها و حیوانات و شناخته شدن این واکنش‌ها به عنوان عامل اصلی پیری در این موجودات (استریلگ و همکاران، ۲۰۰۸؛ دیلز، ۱۹۹۳)، مطالعات کمی در زمینه انباشت فرآورده‌های این واکنش‌ها در زوال بذرها در طی انبارداری صورت گرفته است. از این رو هدف از این تحقیق درک اساسی از مکانیزم‌های زوال بذر کدو تخم کاغذی در طی زوال و ارتباط آن با واکنش‌های آمادوری و مایلارد بود.

مواد و روش‌ها

برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی دخیل در زوال بذرهای کدو تخم کاغذی از داده‌های آزمایش‌های انجام شده برای تعیین ضرایب پیش بینی انبارداری این گیاه استفاده شد (قادری فر و همکاران، ۲۰۱۰). دو تیمار دمایی و سه سطح رطوبت بذر و دو دوره زمانی از آزمایش‌های قبلی انتخاب شد. تیمارهای دمایی شامل دمای ۳۵ و ۵۰ درجه سلسیوس، تیمارهای رطوبتی شامل ۵، ۸ و ۱۴ درصد رطوبت بذر و تیمارهای زمان ۲ و ۴ روز تحت ترکیب شرایط دمایی و رطوبتی انتخاب

گردید. بذرها داخل فویل آلومینیومی قرار گرفتند و سپس فویل‌ها در داخل ظرف‌های در بسته گذاشته شدند. سپس این ظرف‌ها در دماهای مربوطه قرار گرفتند و در زمان‌های مورد نظر از انکوباتور خارج و درصد جوانه‌زنی، قندهای احیایی، قندهای غیراحیایی، پروتئین محلول، وضعیت اکسید و احیاء گروه‌های تیول پروتئین‌ها، فعالیت آنزیم کاتلاز و پراکسیداز و هدایت الکتریکی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری جوانه‌زنی: برای انجام آزمون جوانه‌زنی در هر تیمار، ۳ تکرار ۵۰ تایی از بذر شمارش و روی دو عدد کاغذ حوله‌ای به ابعاد ۳۰×۴۵ سانتی‌متر قرار گرفته و با کاغذی دیگر روی بذرها پوشانده شد (قادری فر و سلطانی، ۲۰۱۰). برای جلوگیری از کاهش رطوبت، کاغذهای حوله‌ای درون پلاستیک گذاشته و سپس در داخل انکوباتور و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز قرار گرفتند. در روز هفتم درصد بذرهاى جوانه زده اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری قندهای احیایی: برای اندازه‌گیری قندهای احیایی از روش مایلر (۱۹۵۹) استفاده شد. برای این کار ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره تغلیظ شده حاوی قندهای محلول با ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از آن بلافاصله ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم سدیم تارتارات ۴۰ درصد به آن افزوده شده و پس از سرد شدن لوله‌ها، جذب نور در طول موج ۵۷۵ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت گردید. با مقایسه با نمودار استاندارد قندهای احیایی، میزان قندهای احیایی هر یک از نمونه‌ها محاسبه و اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی: برای اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی از روش ارائه شده توسط هاندل (۱۹۶۸) استفاده شد. بدین منظور ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره الکلی تغلیظ شده با ۰/۱ میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم ۳۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از سرد شدن لوله‌ها، ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون به آن افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس جذب نور هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد.

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین محلول: اندازه‌گیری پروتئین محلول به روش برادفورد (۱۹۷۶) انجام شد. برای اندازه‌گیری پروتئین محلول، ۲۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی تهیه شده از تیمارهای مربوطه را به لوله‌های آزمایش منتقل و به آن ۸۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. به مخلوط حاصل ۵ میلی‌لیتر

معرف برادفورد اضافه و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. بعد از ۲۰ دقیقه، میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد.

آنالیز وضعیت اکسید و احیاء گروه‌های سولفیدریل (تیول) پروتئین‌ها: شناسایی وضعیت اکسید و احیاء گروه‌های تیول پروتئین‌ها به وسیله نشانه‌گذاری گروه‌های تیول پروتئین‌ها با مونوبرومویمیان (mBBBr) بر اساس روش کوبریهل و همکاران (۱۹۹۲) انجام گردید. به منظور بررسی وضعیت ردوکس گروه‌های تیول ابتدا استخراج پروتئین‌های محلول صورت گرفت.

الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات تحت شرایط احیایی در یک سیستم ژل ناپیوسته با غلظت آکریل آمید ۱۵ درصد انجام شد (فلینگ و گریگرسون، ۱۹۸۳). سیستم ژل ناپیوسته شامل ژل متراکم کننده و ژل جداکننده است.

مقدار پروتئین بارگیری شده در هر چاهک الکتروفورز ۱۰۰ میکروگرم محاسبه گردید. پس از برقراری جریان، الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۷۰ ولت در مدت ۱۵ ساعت انجام گردید. پس از الکتروفورز، به منظور تثبیت ژل و حذف mBBBr اضافی، ژل‌ها در محلول ۱۲ درصد تری کلرواستیک اسید به مدت ۶ ساعت قرار گرفتند و در طی این مدت دو مرتبه محلول تعویض گردید. سپس ژل‌ها به محلول حاوی متانول ۴۰ درصد و اسید استیک ۱۰ درصد برای مدت زمان ۱۰ ساعت منتقل گردید. فلئورسانس پروتئین‌های نشان‌دار شده با mBBBr با استفاده از دستگاه UV-ترانس ایلومیناتور مدل uvitec-BTS-20-M.EEC در طول موج تحریکی ۳۶۰ نانومتر مشاهده و عکسبرداری شد.

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز: برای استخراج آنزیم کاتالاز از روش کار و میسرا (۱۹۷۶) استفاده شد و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش لوک (۱۹۶۲) استفاده شد. در این روش، ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات مونوسدیک (۵۰ میلی‌مولار) با pH برابر ۶/۸، ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه (۱۵ میلی‌مولار) ترکیب و برای اندازه‌گیری استفاده شد. با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی شروع شد.

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز: استخراج آنزیم پراکسیداز به روش مورتی و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش ریسنده و همکاران (۲۰۰۲) با اندکی تغییرات انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۲/۷۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات مونوسدیک (۲۵ میلی‌مولار) با pH برابر ۶/۸، ۱۰۰ میکرو لیتر پیروگالول (۱۰ میلی‌مولار)، ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرو لیتر آب

اکسیژنه (۴۰ میلی مولار) به حجم نهایی ۳ میلی لیتر بود. با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی شروع شد. تغییرات جذب نور در اثر تولید پورپوروگالین از پیروگالول در طول موج ۴۲۰ نانومتر برای مدت زمان ۲ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

اندازه گیری هدایت الکتریکی بذرها: برای اندازه گیری هدایت الکتریکی در بشرهای ۵۰۰ میلی لیتری مقدار ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید. ۳ تکرار ۵۰ تایی از هر نمونه بذر شمارش و وزن آنها تعیین شد و بعد از توزین در بشرهای محتوی آب مقطر قرار گرفتند. سپس کلیه بشرها به وسیله فویل آلومینیومی پوشانده شدند در انکوباتور و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در پایان دوره ۲۴ ساعت خیساندن بذر، هدایت الکتریکی نمونه‌ها با EC متر اندازه گیری شد. میزان هدایت الکتریکی هر نمونه به ازای هر گرم بذر به صورت زیر محاسبه شد (همپتون و تکرونی، ۱۹۹۵):

$$(۲-۴) \quad \text{هدایت الکتریکی} = \frac{\text{قابلیت هدایت الکتریکی (میکروزیمنس بر سانتی متر)}}{\text{وزن نمونه بذر (گرم)}}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها: محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

درصد جوانه زنی: بین دماها و رطوبت بذر و اثرات متقابل دما و رطوبت بذر از لحاظ درصد جوانه زنی اختلاف معنی داری در ۲ و ۴ روز دوره زمانی زوال وجود داشت (جدول ۱). با افزایش دما از ۳۵ به ۵۰ درجه سلسیوس، درصد جوانه زنی در هر دو تیمار زمانی زوال (۲ و ۴ روز) کاهش یافت به طوری که درصد جوانه زنی در تیمار ۲ روز زوال در دمای ۳۵ و ۵۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۹۲ و ۶۷/۴۴ درصد و در تیمار ۴ روز زوال به ترتیب ۸۲ و ۳۴/۶۷ درصد بود (جدول ۱). درصد کاهش جوانه زنی در تیمار ۴ روز زوال نسبت به تیمار ۲ روز زوال بیشتر بود به طوری که درصد کاهش جوانه زنی در تیمار ۲ روز زوال از دمای ۳۵ به ۵۰ درجه سلسیوس ۲۴ درصد و در تیمار ۴ روز زوال ۴۸ درصد بود. بین سطوح رطوبت بذر نیز از لحاظ درصد جوانه زنی اختلاف معنی داری در هر دو سطح تیمار زمانی وجود داشت. با افزایش

رطوبت بذر، درصد جوانه‌زنی در تیمار ۲ روز زوال به ترتیب ۹۱، ۷۹ و ۷۱ درصد و در تیمار ۴ روز زوال برای رطوبت‌های بذر ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب ۸۴، ۵۳ و ۳۹ درصد بود. در شکل ۱ برهمکنش دما و رطوبت بذر بر درصد جوانه‌زنی کدو تخم کاغذی در تیمارهای ۲ و ۴ روز زوال ارائه شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود در دمای ۳۵ درجه سلسیوس بین سطوح رطوبت بذر از لحاظ درصد جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و بذرها دارای درصد جوانه‌زنی مشابه‌ای بودند در حالی که در دمای ۵۰ درجه سلسیوس با افزایش رطوبت بذر، درصد جوانه‌زنی به شدت کاهش یافت که درصد کاهش در تیمار ۴ روز زوال بیشتر از ۲ روز زوال بود.

قندهای احیایی: در تیمار ۲ روز زوال، بین دماها از لحاظ قندهای احیایی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما بین رطوبت‌های بذر در سطح احتمال ۵ درصد از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دیده شد. با افزایش رطوبت بذر میزان قندهای احیایی کاهش یافت (جدول ۱). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در سطوح مختلف رطوبتی از لحاظ قندهای احیایی تفاوت چشمگیری وجود نداشت اما در دمای ۵۰ درجه سلسیوس با افزایش رطوبت بذر، میزان قندهای احیایی به آهستگی کاهش یافت. در تیمار ۴ روز زوال، بین دماها و سطوح رطوبت از لحاظ قندهای احیایی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما اثر متقابل دما و رطوبت بذر معنی‌دار بود (جدول ۱). با افزایش رطوبت بذر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، میزان قندهای احیایی به صورت خطی افزایش یافت در صورتی که در دمای ۵۰ درجه سلسیوس با افزایش رطوبت بذر، میزان قندهای احیایی کاهش یافت (شکل ۲). همچنین در کلیه سطوح تیماری، میزان قندهای احیایی در تیمار ۴ روز زوال نسبت به ۲ روز زوال بیشتر بود که حاکی از این است که با افزایش طول دوره زوال، میزان قندهای احیایی افزایش می‌یابد.

قندهای غیراحیایی: در تیمار ۲ روز زوال، بین دماها از لحاظ قندهای غیراحیایی اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری وجود نداشت اما بین سطوح رطوبت از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱). با افزایش رطوبت بذر میزان قندهای غیراحیایی به طور خطی افزایش یافت. میزان قندهای غیراحیایی در رطوبت‌های ۸ و ۱۴ درصد نسبت به رطوبت ۵ درصد به ترتیب ۱۴ و ۳۶ درصد بیشتر بود (جدول ۱). شکل (۳) نشان‌دهنده افزایش قندهای غیراحیایی با افزایش رطوبت بذر در دماهای ۳۵ و ۵۰ درجه سلسیوس می‌باشد. همچنین در کلیه سطوح رطوبتی میزان قندهای غیراحیایی در دمای ۵۰ درجه سلسیوس نسبت به دمای ۳۵ درجه سلسیوس بیشتر بود.

جدول ۱- مقایسه میانگین و خلاصه نتایج تجربه واریانس درصد جوانه زنی، قندهای احیایی، قندهای غیر احیایی، پروتئین محلول و هدایت الکتریکی کدو تخم کاغذی در دماها و سطوح رطوبت بذر در دو دوره زمانی زوال (۲ و ۴ روز).

| دما (درجه سلسیوس) | روز ۲ | | | | | | روز ۴ | | | | | | | | |
|-------------------|----------------|---------------|-------------------|---------------|----------------|----------------|---------------|-------------------|---------------|----------------|----------------|---------------|-------------------|---------------|----------------|
| | درصد جوانه زنی | قندهای احیایی | قندهای غیر احیایی | پروتئین محلول | هدایت الکتریکی | درصد جوانه زنی | قندهای احیایی | قندهای غیر احیایی | پروتئین محلول | هدایت الکتریکی | درصد جوانه زنی | قندهای احیایی | قندهای غیر احیایی | پروتئین محلول | هدایت الکتریکی |
| ۳۰ | ۹۲/۰۰a | ۰/۹۹a | ۲۲/۳۳a | ۲۹/۲۵a | ۳۴/۸۳a | ۸۲/۷۸a | ۱۷/۷۸a | ۹/۵۴b | ۱۶/۳۳a | ۱۶/۷۸a | ۸۲/۷۸a | ۱۷/۷۸a | ۹/۵۴b | ۱۶/۳۳a | ۱۶/۷۸a |
| ۵۰ | ۶۸/۴۴b | ۱/۰۰a | ۳۲/۵۳a | ۳۱/۳۷b | ۳۷/۱۱a | ۳۴/۷۷b | ۵/۴۷a | ۴/۳۹a | ۱۶/۳۳a | ۱۵/۴۷a | ۳۴/۷۷b | ۵/۴۷a | ۴/۳۹a | ۱۶/۳۳a | ۱۵/۴۷a |
| LSD (0.05) | ۷/۳۷۴ | ۰/۸۵۵ | ۳/۰۹ | ۰/۹۷۷ | ۴/۸۰ | ۸/۷۷ | ۲/۷ | ۱/۸۷۱ | ۵۴/۱ | ۲/۷ | ۸/۷۷ | ۱/۸۷۱ | ۱/۸۷۱ | ۵۴/۱ | ۳۵/۳ |
| رطوبت بذر (درصد) | ۹۰/۶۷a | ۱/۰۷a | ۸۸/۴۶b | ۲۸/۶۴a | ۳۲/۷۶b | ۴۴/۰۰b | ۱۷/۴۱a | ۱۶/۹۵a | ۱۷/۳۳a | ۱۷/۴۱a | ۴۴/۰۰b | ۱۷/۴۱a | ۱۶/۹۵a | ۱۷/۳۳a | ۱۷/۴۱a |
| ۵ | ۷۹/۳۳b | ۰/۹۱b | ۲۱/۵۶b | ۲۸/۱۳a | ۳۴/۵۱b | ۵۲/۶۷b | ۱۸/۰۷b | ۱۶/۶۱a | ۱۶/۳۳a | ۱۸/۰۷b | ۵۲/۶۷b | ۱۸/۰۷b | ۱۶/۶۱a | ۱۶/۳۳a | ۱۸/۰۷b |
| ۸ | ۷۰/۷۷b | ۱/۰۰ab | ۲۸/۸۸a | ۳۱/۵۶b | ۴۱/۲۵a | ۳۹/۳۳c | ۱۷/۰/۴a | ۱۰/۱۰/۱b | ۱۵/۳۳a | ۱۷/۰/۴a | ۳۹/۳۳c | ۱۷/۰/۴a | ۱۰/۱۰/۱b | ۱۵/۳۳a | ۱۷/۰/۴a |
| ۱۴ | ۹/۰۳۳ | ۰/۱۰۵ | ۳/۷۸۷ | ۱۸/۱۹۷ | ۵/۷۷ | ۱۰/۸۰۵ | ۳/۵ | ۲/۸ | ۷۸/۱ | ۳/۵ | ۱۰/۸۰۵ | ۳/۵ | ۲/۸ | ۷۸/۱ | ۳/۵ |
| LSD (0.05) | ۹/۰۳۳ | ۰/۱۰۵ | ۳/۷۸۷ | ۱۸/۱۹۷ | ۵/۷۷ | ۱۰/۸۰۵ | ۳/۵ | ۲/۸ | ۷۸/۱ | ۳/۵ | ۱۰/۸۰۵ | ۳/۵ | ۲/۸ | ۷۸/۱ | ۳/۵ |

خلاصه تجربه واریانس

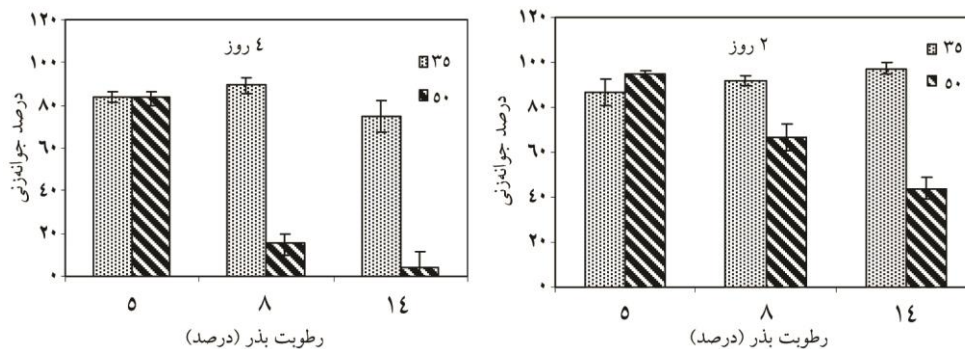
دما **

رطوبت بذر **

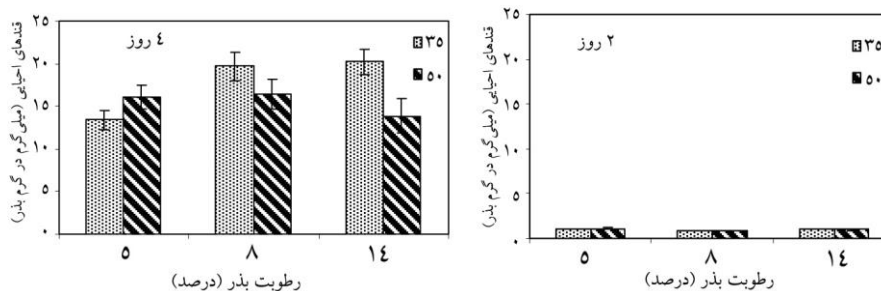
اثر متقابل دما و رطوبت بذر **

ضریب تغییرات (%) ۸/۹۵

NS و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و غیر معنی دار می باشند.



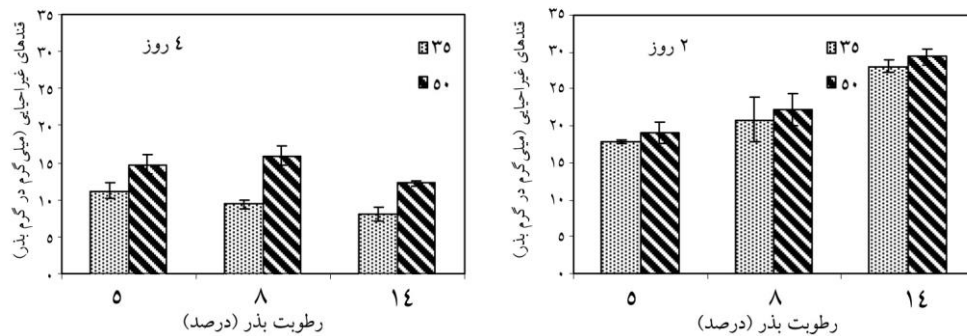
شکل ۱- اثرات دما و رطوبت بذر بر درصد جوانه‌زنی بذرهای کدو تخم کاغذی در ۲ و ۴ روز زوال. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند.



شکل ۲- اثرات دما و رطوبت بذر بر مقدار قندهای احيایی بذرهای کدو تخم کاغذی در ۲ و ۴ روز زوال. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند.

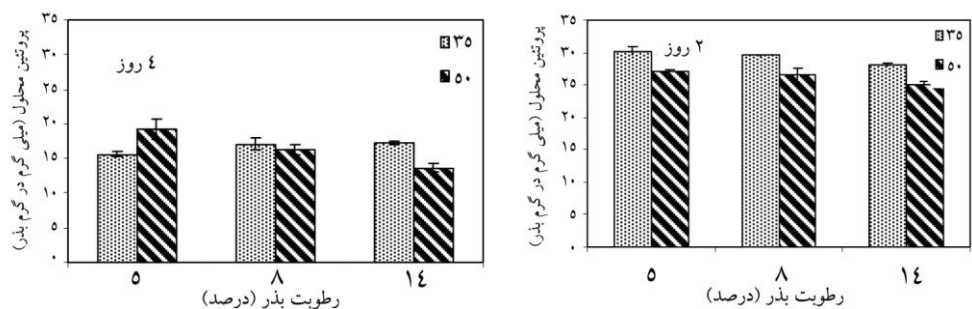
در تیمار ۴ روز زوال، بین دماها و سطوح رطوبت از لحاظ قندهای غیراحيایی اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری وجود داشت (جدول ۱). با افزایش دما از ۳۵ به ۵۰ درجه سلسیوس، میزان قندهای غیراحيایی از ۹/۵۴ به ۱۴/۲۹ میلی‌گرم در گرم بذر افزایش یافت اما با افزایش میزان رطوبت بذر، برخلاف تیمار ۲ روز زوال، میزان قندهای غیراحيایی کاهش یافت. شکل ۳ نشان‌دهنده واکنش قندهای غیراحيایی در سطوح دمایی و رطوبت بذر است. با افزایش رطوبت بذر در هر دو دما میزان قندهای غیراحيایی کاهش یافتند که بر عکس تیمار ۲ روز زوال بود. میزان قندهای غیراحيایی در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در سطوح رطوبت بذر ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب ۱۱/۷۰، ۹/۳۹ و ۸/۰۶ میلی‌گرم در گرم بذر و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۱۴/۷۴، ۱۵/۹۳ و ۱۲/۲۰ میلی‌گرم در گرم بذر بود.

همچنین نکته‌ای که باید به آن توجه کرد این است که با افزایش دوره زوال از ۲ به ۴ روز میزان قندهای غیراحیایی در حدود ۵۰ درصد کاهش یافت (شکل ۳).



شکل ۳- اثرات دما و رطوبت بذر بر مقدار قندهای غیراحیایی بذرهای کدو تخم کاغذی در ۲ و ۴ روز زوال. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند.

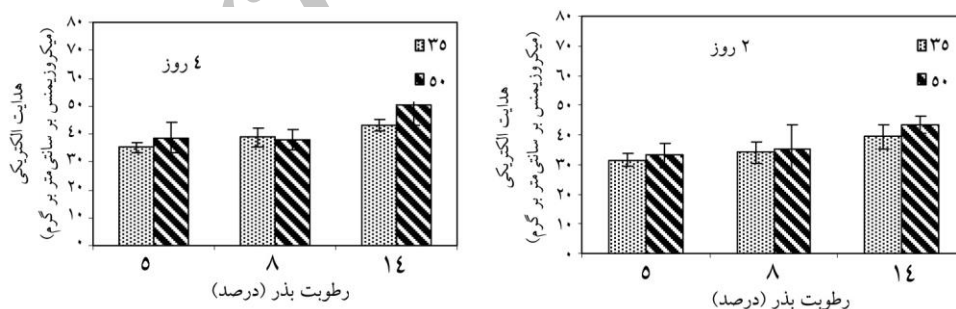
پروتئین محلول: در تیمار ۲ روز زوال، بین دماها و سطوح رطوبت از لحاظ پروتئین محلول اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱). با افزایش دما از ۳۵ به ۵۰ درجه سلسیوس، پروتئین محلول از ۲۹/۲۵ به ۲۶/۲۷ میلی‌گرم در گرم بذر کاهش یافت (جدول ۱). همچنین با افزایش رطوبت بذر نیز پروتئین محلول کاهش یافت. در هر دو دما با افزایش رطوبت بذر میزان پروتئین محلول کاهش یافت. میزان پروتئین محلول در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در رطوبت‌های ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب ۳۰/۱۹، ۲۹/۵۷ و ۲۷/۹۹ میلی‌گرم در گرم بذر بود، در حالی که در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۲۷/۰۸، ۲۶/۶۸ و ۲۵/۰۴ میلی‌گرم در گرم بذر بود (شکل ۴).



شکل ۴- اثرات دما و رطوبت بذر بر مقدار پروتئین محلول بذرهای کدو تخم کاغذی در ۲ و ۴ روز زوال. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند.

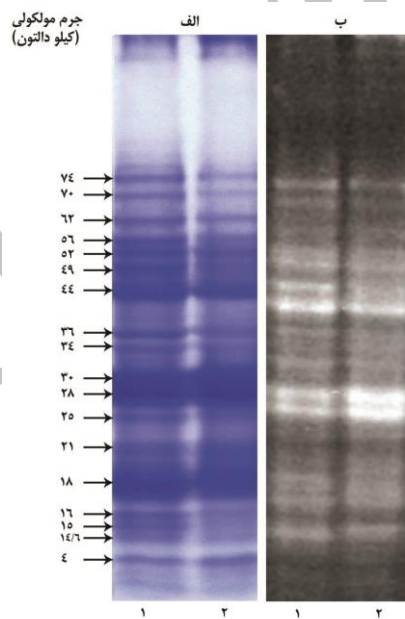
در تیمار ۴ روز زوال بین دماها و رطوبت بذر از لحاظ پروتئین محلول اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. اما اثر متقابل دما و رطوبت بذر معنی‌دار بود (جدول ۱). با این وجود با افزایش دما و رطوبت بذر، میزان پروتئین محلول کاهش یافت. همانطور که در شکل (۴) مشاهده می‌شود در دمای ۳۵ درجه سلسیوس بین سطوح رطوبت بذر از لحاظ پروتئین محلول اختلافی وجود نداشت اما در دمای ۵۰ درجه سلسیوس با افزایش رطوبت بذر، پروتئین محلول کاهش یافت. همچنین با افزایش طول دوره زوال از ۲ به ۴ روز، میزان پروتئین محلول کاهش یافت.

هدایت الکتریکی بذرهای زوال یافته: در تیمار ۲ روز زوال، بین دما و اثرات متقابل دما و رطوبت بذر از لحاظ هدایت الکتریکی بذرهای کدو تخم کاغذی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما بین سطوح رطوبت بذر از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱). با افزایش دما از ۳۵ به ۵۰ درجه سلسیوس هدایت الکتریکی افزایش یافت که این افزایش از لحاظ آماری معنی‌داری نبود اما با افزایش سطوح رطوبت از ۵ به ۱۴ درصد، هدایت الکتریکی بذرهای کدو تخم کاغذی افزایش یافت که میزان آن در رطوبت‌های ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب ۳۲/۲۹، ۳۴/۵ و ۴۱/۲۵ میکروزیمنس بر سانتی‌متر بر گرم بود. شکل ۵ مقدار هدایت الکتریکی بذر در سطوح دمایی و رطوبتی را نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود در هر دو دما با افزایش رطوبت بذر، هدایت الکتریکی بذرها افزایش یافت که میزان آن در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در رطوبت‌های ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب ۳۱، ۳۴ و ۳۹ میکروزیمنس بر سانتی‌متر بر گرم و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۳۳، ۳۵ و ۴۳ میکروزیمنس بر سانتی‌متر بر گرم بود.



شکل ۵- اثرات دما و رطوبت بذر بر هدایت الکتریکی بذرهای کدو تخم کاغذی در ۲ و ۴ روز زوال. میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند.

در تیمار ۴ روز زوال، همانند تیمار ۲ روز زوال تنها بین سطح رطوبت بذر از لحاظ هدایت الکتریکی اختلاف معنی داری وجود داشت و بین دماها و اثر متقابل دما و سطوح رطوبت اختلاف معنی داری وجود نداشت (جدول ۱). همانطور که مشاهده می شود با افزایش دما هدایت الکتریکی بذرهای کدو تخم کاغذی افزایش یافت و میزان آن در دماهای ۳۵ و ۵۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۳۹ و ۴۲ میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم بود. همچنین با افزایش رطوبت نیز هدایت الکتریکی بذرهای کدو تخم کاغذی به طور خطی افزایش یافت که مقدار آن در رطوبت های ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب ۳۷، ۳۸ و ۴۸ میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم بود. شکل (۵) هدایت الکتریکی بذرهای کدو تخم کاغذی در سطوح دمایی و رطوبتی در ۴ روز زوال را ارائه می دهد. همانطور که ملاحظه می شود در هر دو دما با افزایش رطوبت بذر، هدایت الکتریکی به طور خطی افزایش یافت و میزان آن در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب ۳۵، ۳۹ و ۴۳ میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۳۸، ۳۹ و ۵۱ میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم بود. به طور کلی در تیمار ۴ روز زوال در کلیه سطوح دمایی و رطوبتی مقدار هدایت الکتریکی بذرها بیشتر از تیمار ۲ روز زوال بود.

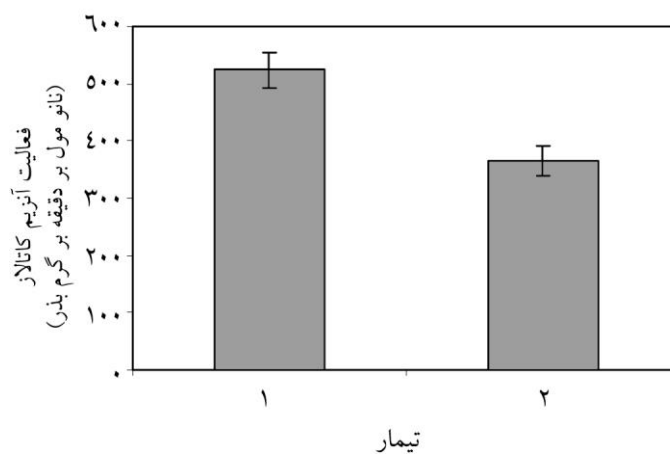


شکل ۶- الگوی الکتروفورزی پروتئین های محلول بذرهای کدو تخم کاغذی در طی زوال رنگ آمیزی شده با کوماسی برلیانت بلو (الف) و وضعیت اکسید و احیای گروه های تیول پروتئین های نشاندار شده با مونوپرومویمان (ب). ۱. تیمار دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، ۵ درصد و دو روز زوال و ۲. تیمار دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، ۱۴ درصد و ۴ روز زوال.

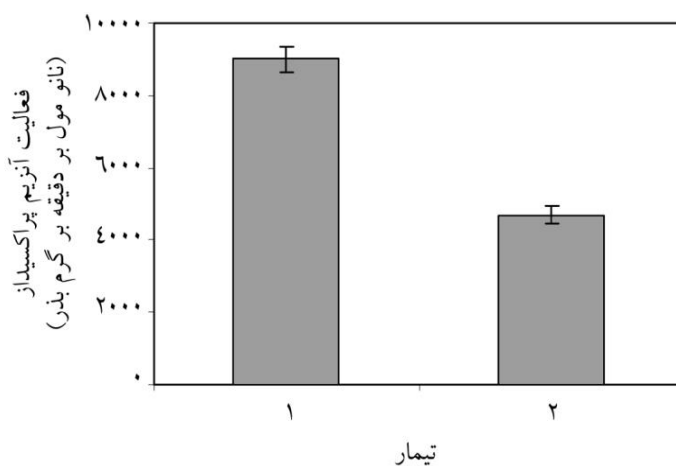
وضعیت اکسید و احیاء گروه‌های تیول پروتئین‌های محلول در طی زوال: مهمترین پروتئین‌های محلول در بذره‌های کدو تخم کاغذی دارای جرم‌های مولکولی ۴، ۱۶-۱۴/۶، ۱۸، ۲۱، ۲۵، ۳۰-۲۸، ۳۶-۳۴، ۴۴، ۵۶-۴۹، ۶۲، ۷۰ و ۷۴ کیلو دالتون بودند (شکل ۶). همانطور که مشاهده می‌شود در تیمار زوال در مقایسه با تیمار شاهد، از شدت باندهای ۱۶-۱۴/۶، ۳۶-۳۴، ۵۶-۴۹، ۶۲ و ۷۰ کیلودالتون کاسته شده است و تا حدودی به شدت باند ۲۱ کیلو دالتون افزوده شده است. این کاهش شدت باندهای پلی پپتیدی نشان‌دهنده شکسته شدن پروتئین‌ها می‌باشد. مقایسه باندهای پروتئینی دارای گروه‌های تیول که توسط ماده فلئورسنت مونو پروبیمان نشان‌دار شده بودند (شکل ۶-ب) نشان داد که مهم‌ترین پروتئین‌های محلول که در تیمار زوال فلئورسانس کمتری را نشان می‌دهند دارای جرم‌های مولکولی ۴۹ و ۷۰ کیلودالتون می‌باشند و پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۳۰-۲۸ کیلو دالتون دارای فلئورسانس بیشتری نسبت به شاهد بودند.

فعالیت آنزیم کاتالاز: در شکل (۷) میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد رطوبت بذر و ۲ روز زوال (به‌عنوان شاهد) با تیمار حداکثر زوال (۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۴ درصد رطوبت و ۴ روز زوال) ارائه شده است. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار زوال یافته کمتر از تیمار شاهد بود که این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار شاهد و زوال به ترتیب ۵۲۴/۲۵ و ۳۶۵/۲۵ نانومول بر دقیقه بر گرم بذر بود.

فعالیت آنزیم پراکسیداز: میزان فعالیت این آنزیم نیز همانند آنزیم کاتالاز در تیمار شاهد بیشتر از تیمار زوال بود که اختلاف این دو تیمار از لحاظ آماری معنی‌دار بود (شکل ۸). مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار شاهد و زوال به ترتیب ۹۰۰۹/۱۵ و ۴۶۹۵/۸۷ نانومول بر دقیقه بر گرم بذر بود. به عبارتی دیگر میزان فعالیت این آنزیم در تیمار زوال در حدود ۴۵ درصد کمتر از تیمار شاهد بود.



شکل ۷- مقایسه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در کدو تخم کاغذی در تیمار ۱ (۳۵ درجه، رطوبت ۵ درصد و ۲ روز زوال) با تیمار ۲ (۵۰ درجه، رطوبت ۱۴ درصد و ۴ روز زوال). میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند.



شکل ۸- مقایسه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کدو تخم کاغذی در تیمار ۱ (۳۵ درجه، رطوبت ۵ درصد و ۲ روز زوال) با تیمار ۲ (۵۰ درجه، رطوبت ۱۴ درصد و ۴ روز زوال). میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند.

بحث

با افزایش دما و رطوبت بذر و طول دوره زوال، درصد جوانه‌زنی کاهش یافت (شکل ۱). کاهش درصد جوانه‌زنی بذر در هر دو تیمار مدت زوال، با افزایش دما و رطوبت بیشتر بود. همچنین در کلیه

سطوح دمایی و رطوبتی درصد جوانه‌زنی در تیمار ۴ روز زوال کمتر از ۲ روز زوال بود. کاهش درصد جوانه‌زنی در طی زوال بذر در گیاهان مختلف گزارش شده است (فریتاز و همکاران، ۲۰۰۶؛ بسرا و همکاران، ۲۰۰۳؛ تراواتا و همکاران، ۱۹۹۵؛ شکارامورتی و همکاران، ۱۹۹۴؛ کالپانا و مادهاوارائو، ۱۹۹۴). در اثر فرآیند زوال مقدار قندهای غیراحیایی و قندهای احیایی تغییر کرد (شکل ۲ و ۳). با افزایش طول دوره زوال مقدار قندهای غیراحیایی کاهش یافت و میزان قندهای احیایی افزایش یافت. کاهش قندهای غیراحیایی ممکن است به دلیل فعال شدن فرآیندهای اولیه مربوط به جوانه‌زنی باشد که در آن قندهای غیراحیایی مصرف و میزان آن کاهش می‌یابد (دومان و همکاران، ۱۹۸۲؛ براون و هوبر، ۱۹۸۷). به علاوه به دلیل فعال شدن برخی هیدرولازها در طی زوال، امکان هیدرولیز قندهای غیراحیایی و تولید شدن قندهای احیایی که در این حالت مشاهده گردید قابل توجه می‌باشد (کومار و همکاران، ۱۹۹۹). همچنین در تیمار ۲ روز زوال با افزایش رطوبت بذر قندهای غیراحیایی افزایش یافت اما در تیمار ۴ روز زوال با افزایش رطوبت بذر کاهش یافت. این اثر رطوبت بر میزان قندهای غیر احیایی را می‌توان احتمالاً ناشی از فرآیند گلوکونئوزنز دانست که در رطوبت بیشتر به‌طور کارآمدتری در بذرها ۲ روز زوال یافته عمل کرده است ولی با تقویت و تشدید فرآیند زوال در طی ۴ روز، فعالیت گلوکونئوزنزی کاهش یافته و غلبه با فرآیندهای زوالی می‌باشد. از این رو سطوح پایین‌تر قندهای غیراحیایی در تیمار ۴ روز زوال با افزایش رطوبت بذر مشاهده می‌گردد. در واقع انباشت قندهای احیایی زمینه‌ساز واکنش‌های آمادوری و مایلارد می‌باشد و نتایج برخی محققان بیانگر آن است که واکنش‌های آمادوری و مایلارد در زوال بذر دخیل هستند (مورتی و همکاران، ۲۰۰۳؛ مورتی و همکاران، ۲۰۰۲؛ سان و لئوپولد، ۱۹۹۵؛ وتلافر و لئوپولد، ۱۹۹۱). در طی این واکنش، قندهای احیایی از طریق غیرآنزیمی با گروه‌های آمین پروتئین‌ها و اسیدهای هسته‌ای واکنش کرده و فرآورده‌های جانبی و نهایی غیرمعمول در سلول ایجاد و انباشته می‌شوند که اصطلاحاً مشهور به محصولات آمادوری و مایلارد هستند. پروتئین‌هایی که تحت واکنش مایلارد قرار گرفته‌اند از لحاظ عملکرد دچار اختلال بوده و در نتیجه در کارایی سلول یا بذر تاثیر می‌گذارند. برخی مطالعات بیانگر آن است که بین واکنش‌های آمادوری و مایلارد و توان زیستی بذر رابطه خطی منفی وجود دارد و با افزایش محصولات آمادوری و مایلارد توان زیستی بذر کاهش می‌یابد (مورتی و همکاران، ۲۰۰۰؛ سان و لئوپولد، ۱۹۹۵). وجود قندهای احیایی زمینه ساز انجام واکنش‌های آمادوری و مایلارد می‌باشد زیرا قندهای احیایی محرک اولیه واکنش‌های آمادوری و مایلارد می‌باشند و به محض این که این قندها

شکل می‌گیرند سریعاً در واکنش‌های مایلارد استفاده می‌شوند (سان و لئوپولد، ۱۹۹۵). همانطور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود با افزایش دوره زوال از ۲ به ۴ روز میزان قندهای احیایی به‌طور چشمگیری افزایش یافت که حاکی از وجود ظرفیت برای انجام واکنش‌های آمادوری و مایلارد در بذرهاى کدو تخم کاغذی در حین زوال می‌باشد. با انباشت قندهای احیایی و افزایش واکنش‌های آمادوری و مایلارد، پروتئین‌ها غیرفعال می‌شوند و به اسیدهای نوکلئیک خسارت وارد می‌شود. با افزایش طول دوره زوال از ۲ به ۴ روز میزان پروتئین محلول کاهش یافت (شکل ۴). همچنین در هر دو دما با افزایش رطوبت بذر، میزان پروتئین محلول کاهش یافت. کاهش پروتئین محلول در طی زوال در گیاهان مختلف گزارش شده است. جنگ و سانگ (۱۹۹۴) در بادام زمینی گزارش کردند که با افزایش طول دوره زوال پروتئین محلول کاهش یافت. به دنبال کاهش پروتئین‌های محلول در اثر واکنش‌های آمادوری و مایلارد، افزایش در هدایت الکتریکی غشاء مشاهده می‌شود (شکل ۵). علت افزایش هدایت الکتریکی غشاء ممکن است ناشی از برخی اختلالات در ترکیبات پروتئین‌های غشاء در نتیجه واکنش گلیکوسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها و آمینواسیدها با قندهای احیایی در واکنش‌های آمادوری و مایلارد می‌باشد (ولرسکی و وسیلو، ۲۰۱۲). الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول در در بذرهاى کدو تخم کاغذی نشان داد که از شدت باندهای ۱۶-۱۴/۶، ۳۶-۳۴، ۵۶-۴۹، ۶۲ و ۷۰ کیلو دالتون در تیمار زوال در مقایسه با شاهد کاسته شده بود (شکل ۶). این امر می‌تواند ناشی از فعال شدن پروتئین‌هایی باشد که سبب هضم این پروتئین‌ها می‌گردند و اشاره به فعالیت پروتئولیتیکی بیشتر در طی زوال دارد. مقایسه باندهای پروتئینی دارای گروه‌های تیول که توسط ماده فلئورسنت مونوبرویمان نشاندار شده بودند، نشان‌دهنده تغییراتی در وضعیت ردوکس پلی پپتیدها در بذرهاى کدو تخم کاغذی در طی زوال می‌باشد (شکل ۶-ب). پلی پپتیدهایی که دارای گروه‌های تیول آزاد بیشتری باشند، بالطبع دارای شدت فلئورسانس بالاتری می‌باشند. در طی زوال میزان فلئورسانس پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۴۹ و ۷۰ کیلو دالتون در مقایسه با شاهد کمتر بود که بیانگر این مطلب است که این پروتئین‌ها در طی زوال گروه‌های آزاد تیول خود را از دست داده و دارای گروه‌های تیول آزاد کمتری می‌باشند و در نتیجه فلئورسانس کمتری را نشان می‌دهند. میزان فلئورسانس کمتر در طی زوال حاکی از آسیب به گروه‌های تیول و اکسید شدن آن‌ها توسط گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد. اسیدهای آمینه حاوی سولفور به‌ویژه تیول جایگاه‌های مستعدی برای گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشند. گونه‌های اکسیژن فعال می‌تواند یک اتم هیدروژن از گروه‌های سیستین جدا کرده و تولید رادیکال‌های

تایل نماید و این نوبه خود از طریق اتصال عرضی با رادیکال تیول دیگر، پل‌های دی سولفیدی را تشکیل می‌دهد (فار و کوگما، ۱۹۹۱).

فعالیت آنزیم‌های پالاینده گونه‌های اکسیژن فعال تحت تأثیر انباشت محصولات ناشی از واکنش‌های آمادوری و مایلارد کاهش می‌یابند. با کاهش این آنزیم‌ها، تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال افزایش می‌یابد و در نتیجه افزایش گونه‌های اکسیژن فعال، سرعت تشکیل واکنش‌های مایلارد افزایش می‌یابد. در نتیجه انباشت بیشتر محصولات واکنش‌های آمادوری و مایلارد، فعالیت آنزیم‌های پالاینده بیشتر کاهش می‌یابد و موازنه بین تولید گونه‌های اکسیژن فعال و سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانت مختل می‌گردد. گزارش‌های متعدد حاکی از آن است که با کاهش فعالیت آنزیم‌های پالاینده میزان گونه‌های اکسیژن فعال افزایش می‌یابد (رائو و همکاران، ۲۰۰۶؛ تورز و همکاران، ۱۹۹۷؛ هسو و همکاران، ۱۹۹۷؛ بیلی و همکاران، ۱۹۹۶؛ چپو و همکاران، ۱۹۹۵). در شرایط معمول برای جلوگیری از آسیب گونه‌های اکسیژن فعال، سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانت در گیاهان وجود دارد (آلشر و همکاران، ۲۰۰۲). این سیستم‌ها شامل آنزیم‌هایی مثل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، دی‌هیدروآسکوربات ردوکتاز و گلوکاتایون ردوکتاز و ترکیبات آنتی‌اکسیدانت نظیر آسکوربات و گلوکاتایون می‌باشند (آسادا، ۱۹۹۲؛ اسمیت و همکاران، ۱۹۸۹؛ گیلهام و دوچ، ۱۹۸۶). در شکل (۷) و (۸) میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در تیمارهای شاهد و حداکثر زوال ارائه شده است. میزان فعالیت این دو آنزیم در بذره‌های این گیاه تحت تأثیر زوال تغییر کرد. همانطور که مشاهده می‌شود میزان فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار زوال یافته در مقایسه با شاهد کمتر بود. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار زوال یافته نسبت به شاهد بیشتر از کاتالاز تحت تأثیر زوال قرار گرفته بود. با افزایش تولید و انباشتگی گونه‌های اکسیژن فعال، یکسری محصولات ثانویه (آلدئیدها و کتون‌ها) تولید می‌شود، که این محصولات باعث افزایش تولید محصولات آمادوری و مایلارد می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که در طی زوال بذره‌های کدو تخم کاغذی، درصد جوانه‌زنی کاهش می‌یابد که این کاهش با افزایش انباشت قندهای احیایی همراه است. در واقع انباشت قندهایی احیایی زمینه‌ساز واکنش‌های آمادوری و مایلارد می‌باشد در طی این واکنش، قندهای احیایی با گروه‌های آمین پروتئین‌ها واکنش کرده و محصولات جانبی در سلول ایجاد می‌کنند و پروتئین‌ها

غیرفعال شده و به دنبال آن میزان پروتئین محلول کاهش یافت. به دنبال کاهش پروتئین‌های محلول، افزایش در هدایت الکتریکی غشاء در اثر برخی اختلالات در ترکیبات پروتئین‌های غشاء در نتیجه واکنش گلیکوسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها و آمینواسیدها با قندهای احیایی در واکنش‌های آمادوری و مایلارد رخ می‌دهد. فعایت آنزیم‌های پالایند گونه‌های اکسیژن فعال تحت تاثیر انباشت محصولات ناشی از واکنش‌های آمادوری و مایلارد کاهش می‌یابند. با کاهش این آنزیم‌ها، تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال افزایش می‌یابد و در نتیجه، سرعت تشکیل واکنش‌های مایلارد افزایش می‌یابد. در نتیجه انباشت بیشتر محصولات واکنش‌های آمادوری و مایلارد، فعالیت آنزیم‌های پالایند اکسیژن بیشتر کاهش می‌یابد و موازنه بین تولید گونه‌های اکسیژن فعال و سیستم‌های دفاعی آنتی اکسیدانت مختل می‌گردد. این نتایج بیانگر این مطلب است که یکی از دلایل اصلی زوال در بذر کدو تخم کاغذی در طی انبارداری انباشت محصولات واکنش‌های آمادوری و مایلارد می‌باشد.

منابع

1. Akramghaderi, F. 2009. The study of seed quality development, germination, longevity and deterioration in some medicinal plants: medicinal pumpkin, black cumin and borago. Ph.D thesis in Gorgan University Agricultural Sciences and Natural Resources. p180
2. Alscher, R.G., Erturk, N., and Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.*, 53:1331-1341.
3. Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.*, 85:235-241.
4. Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., and Corbineau, F. 2008. From intracellular signaling network to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C.R. Bio.*, 331:806-814.
5. Basra, S.M.A., Ahmad, N., Khan, M.M., Iqbal, N., and Cheema, M.A. 2003. Assessment of cottonseed deterioration during accelerated ageing. *Seed Sci. Technol.*, 31:531-540.
6. Bernal-Lugo, I., and Leopold, A.C. 1992. Changes in soluble carbohydrates during seed storage. *Plant Physiol.*, 98:1207-1210.
7. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.*, 72:248-252.
8. Brown, C.S., and Huber, S.C. 1987. Photosynthesis, reserve mobilization and enzyme of sucrose metabolism in soybean cotyledons. *Physiol. Plant.*, 70: 537-543.

9. Chiu, K.Y., Wang, C.S., and Sung, J.M. 1995. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging and hydration of watermelon seeds differing in ploidy. *Physiol. Plant.*, 94: 441-446.
10. Corbineau, F., Gay-Mathieu, C., Vinel, D., and Come, D. 2002. Decrease in sunflower seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. *Physiol Plant.*, 116:489-496.
11. Dills, W.L. 1993. Protein fructosylation: fructose and the maillard reaction. *Am. J. Clin. Nutr.*, 58:779-787.
12. Doman, D.C., Walker, J.C., Trelease, R.N., and Moore, B.D. 1982. Metabolism of carbohydrate and lipid reserves in germinated cotton seeds. *Planta.*, 155: 502-510.
13. Eble A.S., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. 1983. Non-enzymatic glucosylation and glucose-dependent cross-linking of proteins. *J. Biol. Chem.*, 258: 9406-9412.
14. Farr, S.B., and Kogoma, T. 1991. Oxidative stress response in *Escherchia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.*, 55: 561-585.
15. Fling, S.P., and Gregerson, D.S. 1983. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.*, 155: 83-88.
16. Freitas., R.A., Dias, D.C.F.S., Olivira, M.G.A., Dias, L.A.S., and Jose, I.C. 2006. Physiological and biochemical changes in naturally and artificially aged cotton seeds. *Seed Sci. Technol.*, 34:253-264.
17. Garner M.H., Wang, G.M., and Spector, A. 1987. Stimulation of glycosylated lens epithelial Na⁺, K-ATPase by an aldose reductase inhibitor. *Exp. Eye Res.*, 44: 339-345.
18. Ghaderi-Far, F., Soltani, A., and Sadeghipour, H.R. 2010. Determination of seed viability constants in medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) subsp. *Pepo*. *Convar. Pepo* var. *styriaca* Greb), borago (*Borago officinalis* L.) and black cumin (*Nigella sativa* L.). *J. Plant Prod.*, 17: 53-66.
19. Ghaderi-Far, F., and Soltani, A. 2010. Seed Testing and Control. *Jehad Danshgahi Mashhad*, p200.
20. Gillham, D.J., and Dodge, A.D. 1986. Hydrogen peroxide scavenging systems within pea chloroplasts. *Planta.*, 167: 246-251.
21. Goel, A., and Sheoran, I.S. 2003. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. *Biol Plant.*, 46: 429-434.
22. Hampton, J.G., and TeKrony, D.M. 1995. *Handbook of Vigor Test Methods*. The International Seed Testing Association, Zurich.
23. Handel, E.V. 1968. Direct micro determination of sucrose. *Anal. Biochem.*, 22: 280-283.
24. Hendry, G. 1993. Evolutionary origins and natural function: A climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.*, 123: 3-14.
25. Hong, T.D., and Ellis, R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behavior. *IPGRI*. p. 62.

26. Hsu, C.C., and Sung, J.M. 1997. Antioxidant role of glutathione associated with accelerated aging and hydration of triploid watermelon seeds. *Physiol Plant.*, 100: 967-974.
27. Jeng, T.L., and Sung, J.M. 1994. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. *Seed Sci. Technol.*, 22: 531-539.
28. Kalpana, R., and Madhava-Rao, K.V. 1994. Absence of the role of lipid peroxidation during accelerated ageing of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) cultivars. *Seed Sci. Technol.*, 22: 253-260.
29. Kar, M., and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.*, 57: 315-319.
30. Kislinger, T., Humeny, A., Peich, C.C., Zhang, X., Niwa, T., Pischetsrieder, M., and Becker, C.M. 2003. Relative quantification of N-(Carboxymethyl) lysine, imidazolone A, and the amadori product in glycated lysozyme by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 51-57.
31. Kobrehel, K., Wong, J.H., Balogh, A., Kiss, F., Yee, B.C., and Buchanan, B.B. 1992. Specific reduction of wheat storage proteins by thoredoxin *h*. *Plant Physiol.*, 99: 919-924.
32. Kumar, G.N.M., Houtz, R.L., and Knowles, N.R. 1999. Age-induced protein modifications and increased proteolysis in potato seed-tubers. *Plant Physiol.*, 119: 89-99.
33. Lee, A.T., and Cerami, A. 1989. Non-enzymatic glycosylation of DNA by reducing sugars. In: Bayness, J.W., Monnier, V.M. (eds). *The Maillard Reaction in Ageing, Diabetes and Nutrition*. New York: Alan, R Liss. Inc, 291-299.
34. Li, J., Zhang, Y., Yu, Z., Wang, Y., Yang, Y., Liu, Z., and Jiang, J. 2007. Superior storage stability in low lipoxygenase maize varieties. *J. Store Prod Res.*, 43: 530-534.
35. Luck, H. 1962. *Methods of Enzymatic Analysis*. E.D. By H.U. Bergmeyer (1st edition), Verlage Chemie Weinheim, pp: 885-894.
36. Machado Neto, N.B., Custodio, C.C., and Takaki, M. 2001. Evaluation of naturally and artificially aged seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Seed Sci. Technol.*, 29: 137-149.
37. McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci. Technol.*, 27: 177-237.
38. Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
39. Murthy, U.M.N., and Sun, W.Q. 2000. Protein modification by the Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.*, 51:1221-1228.

40. Murthy U.M.N., Liang, Y., Kumar, P.P., and Sun, W.Q. 2002. Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiate*. *Physiol. Plant.*, 115:213-220.
41. Murthy, U.M.N., Kumar, P.P., and Sun, W.Q. 2003. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiate* (L.) Wilczec: Lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *J. Exp. Bot.*, 54: 1057-1067.
42. Osborne, D.J. 1980. Senescence in seeds. In: Thimann KV, ed. *Senescence in Plants*. Boca Raton: CRC Press, 13–37.
43. Rao, R.G.S., Singh, P.M., and Rai, M. 2006. Storability of onion seeds and effects of packaging and storage conditions on viability and vigour. *Sci Hort.*, 110:1-6.
44. Resenda, M.L.V., Nojosa, G.B.A., Cavalcanti, L.S., Aguilar, M.A.G., Silva, L.H.C.P., Perez, J.O., Andrade, G.C.G., Carvalho, G.A., and Castro, R.M. 2002. Induction of resistance in cocoa against *crinipellis pernicioso* and *verticillium dahliae* by acibenzolar-s-methyl (ASM). *Plant Pathol.*, 51:621-628.
45. Schwember, A.R., and Bradford, K.J. 2010. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. *J. Exp. Bot.*, 61:4423-4436.
46. Shekaramurthy, S., Patkar, K.L., Shetty, S.A., Prakasg, H.S., and Shetty, H.S. 1994. Effect of thiram treatment on sorghum seed quality in relation to accelerated ageing. *Seed Sci. Technol.*, 22: 607-617.
47. Smit, I.K., Vierheller, T.L., and Thorne, C. 1989. Properties and function of glutathione reductase in plants. *Physiol. Plant.*, 77: 449-456.
48. Smith, MT., and Berjak, P. 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: Kigel J, Galili G, (eds), *Seed Development and Germination*. New York: Marcel Dekker, Inc. 701–746.
49. Strelec, I., Ugarcic-Hardi, Z., and Hlevnjak, M. 2008. Accumulation of amadori and maillard products in wheat seeds aged under different storage conditions. *Croatica Chem Acta*, 81: 131-137.
50. Sun, W.Q., and Leopold, A.C. 1995. The maillard reaction and oxidative stress during ageing of soybean seeds. *Physiol Plant.*, 94: 94-104.
51. Sung, J.M., and Jeng, T.L. 1994. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiol. Plant.* 91: 51-55.
52. Taniguchi, N., Kinoshita, N., Arai, K., Iizuka, S., Usui, M., and Naito, T. 1989. Inactivation of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase through non-enzymatic glycosylation. In: Baynes JW and Monnier VM, (eds). *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition*. New York: Alan R. Liss, Inc., 277–290.

53. Tian, X., Song, S., and Lei, Y. 2008. Cell death and reactive oxygen species metabolism during accelerated ageing of soybean axes. *Russ J. Plant Physiol.*, 55: 33-40
54. Torres, M., De Paula, M., Perez-Otaola, M., Darder, M., Frutos, G., and Martinez-Honduvilla, C.J. 1997. Aging-induced changes in glutathione system of sunflower seeds. *Physiol. Plant.*, 101: 807-814.
55. Trawatha, S.E., Tekrony, D.M., and Hildebrand, D.F. 1995. Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity. *Crop Sci.*, 35:862-868.
56. Veselovsky, V.A., and Veselova, T.V. 2012. Lipid peroxidation, carbohydrate hydrolysis, and amadori-maillard reaction at early stages of dry seed aging. *Russ. J. Plant Physiol.*, 59: 763-770.
57. Walters, C. 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed ageing. *Seed Sci Res.*, 8:223-244.
58. Wettlaufer, S.H., and Leopold, A.C. 1991. Relevance of amadori and maillard products to seed deterioration. *Plant Physiol.*, 97: 165-169.



Changes in soluble carbohydrates and reactive oxygen species - scavenger enzymes activity in Medicinal Pumpkin during storage at different temperature and seed moisture

*F. Ghaderi-Far¹, A. Soltani^{1,2}, and H.R. Sadeghipour²

^{1,2}Assistant Prof. and Professor, Dept. of Agronomy, University Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran., ³Associate Prof., Dept. of Biology, Golestan University, Gorgan, Iran

Accepted: 2013/3/26 ; Received: 2014/2/24

Abstract

Seeds deterioration is a natural phenomenon that occurs in all seeds and leading to gradual decline of seed viability during storage. However, the rate at which seeds age depends upon their physiological status, genetic constitution and storage conditions. In this study we the examined relationship among accumulation of reducing and non-reducing of sugars, soluble protein, the activity of free radical detoxifying enzymes, and seed deterioration in medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo* subsp. *Pepo*. *Convar. Pepo* var. *styriaca* Greb) during storage. The seeds were incubated at different storage conditions of temperature (35 and 5°C) and seed moisture content (5, 8 and 14%) for 2 and 4 days. The accumulation of reducing sugars increased and soluble proteins and non-reducing sugars decreased during storage with increasing moisture content and temperature, suggesting that seed deterioration was associated with Amadori and Maillard reactions. The decrease in soluble proteins was related to increase electrical conductivity, which suggests membrane damage during deterioration. The increase in electrical conductivity may result from some disorders in protein components of the membrane, which arise from non-enzymatic glycosylation of proteins by reducing sugars in the Amadori and Maillard reactions. The decrease in germination was also associated with a decrease in catalase and peroxidase activity and as a result the antioxidant system was not sufficient to protect seeds against free radical damage. These results suggest that the accumulation of reducing sugar and decrease of soluble protein are coupled with Amadori and Maillard reactions and these reactions are responsible for medicinal pumpkin seed deterioration during seed ageing.

Keywords: Germination; deterioration; Amadori and Maillard reactions; Protein; Catalase; Peroxidase

*Corresponding author; akranghaderi@yahoo.com