

## تاثیر زوال تسریع شده بر پارامترهای جوانه‌زنی، اسیدهای چرب و هیدروپراکسیدهای لیپیدی بذرهای آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.)

بهاره طهماسبی<sup>۱</sup>، فرشید قادری فر<sup>۱\*</sup>، حمیدرضا صادقی پور<sup>۲</sup> و سرالله گالشی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، <sup>۲</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۸/۰۷)

### چکیده:

ذخیره‌سازی بذر در انبار منجر به پیری آنها شده که در طی آن به تدریج قابلیت حیات خود را از دست می‌دهند. سرعت فرآیند پیری به دوره انبارداری، دمای انبار و محتوی رطوبت بذر بستگی دارد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و ۵ تیمار پیری در آزمایشگاه تحقیقات زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۱ اجرا گردید. برای ایجاد سطوح مختلف پیری بذر از آزمون تسریع پیری استفاده شد. بذرهای آفتابگردان به مدت ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ روز در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد قرار گرفتند و مولفه‌های جوانه زنی و پارامترهای بیوشیمیایی بر روی بذرهای پیر شده اندازه‌گیری شد. پارامترهای درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول گیاهچه، قدرت گیاهچه و میزان پروتئین بر اثر زوال کاهش و هدایت الکتریکی، میزان اسید چرب و لیپید هیدروپراکسیدها بر اثر زوال افزایش یافت. افزایش میزان اسیدهای چرب منجر به افزایش لیپید هیدروپراکسیدها در بذرهای زوال یافته شده و در نتیجه منجر به تخریب غشاهای سلولی بود که شاهد آن افزایش هدایت الکتریکی بذر است. همچنین با افزایش میزان لیپید هیدروپراکسیدها، درصد جوانه‌زنی به صورت خطی کاهش یافت که این بیانگر این مطلب است که پراکسیداسیون لیپید یکی از دلایل اصلی کاهش درصد جوانه‌زنی و قدرت بذر طی زوال بذرهای آفتابگردان می‌باشد. به‌طور کلی افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌تواند یکی از مکانیزم‌های فیزیولوژیکی دخیل در زوال بذرهای آفتابگردان باشد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداسیون لیپید، پیری، قدرت بذر، هدایت الکتریکی.

### مقدمه:

زوال یافته و قابلیت حیات خود را از دست می‌دهند (Gregg et al., 1994). زوال بذر شامل برخی تغییرات بیوفیزیکی و بیوشیمیایی شامل تغییر در ساختار مولکولی اسیدهای نوکلئیک، کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های کلیدی در جوانه‌زنی و افزایش فعالیت برخی از آنزیم‌های هیدرولیز کننده، اختلال در یکپارچگی غشاء و کاهش تنفس می‌باشد که در نتیجه این تغییرات، قدرت بذر (Seed vigor) کاهش یافته و منجر به کاهش سرعت جوانه‌زنی و رشد گیاهچه، کاهش توانایی جوانه‌زنی بذر در شرایط تنش، افزایش احتمال

بذر با انبارداری نامناسب دچار زوال (Deterioration) می‌شوند (Kalpana and Madhava Rao, 1996). کیفیت بذر به شدت تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند دمای انبار، محتوی رطوبت بذر و رطوبت نسبی محیط قرار می‌گیرد (Priestley, 1983; Walters et al., 2010; Escandon et al., 2013). کاهش این عوامل به‌طور چشم‌گیری باعث افزایش زمان انبارداری بذر می‌شود (Castellion et al., 2010). بنابراین در صورت بالا بودن دما و رطوبت نسبی محیط، بذرها سریع‌تر

لیپیدها و پروتئین‌های غشاء شده و به دنبال آن ساختار غشاء های سلولی به هم خورده و غشاءها سلامت خود را از دست می‌دهند و در نتیجه میزان نشت الکترولیت‌ها از سلول افزایش می‌یابد (McDonald, 1999; Goel and Sheoran, 2003).

Powell و Mathews (۱۹۸۱) دریافتند که در بذور پیر شده نخود، از دست رفتن فسفولیپیدهای غشاء به خصوص فسفاتیدیل کولین از علائم پیری به شمار می‌رود. مطالعات انجام شده توسط Bewley (۱۹۸۶) نشان داد که پیری تحت شرایط رطوبت و درجه حرارت بالا، همزمان با کاهش میزان فسفولیپیدهای غشاء، قابلیت حیات بذرها را نیز کاهش می‌دهد. کاهش جوانه‌زنی و قدرت بذر در طی انبار داری (پیری طبیعی) و آزمون پیری تسریع شده بر اثر تغییر ترکیب اسیدهای چرب و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و از دست رفتن فسفولیپیدهای غشاء است (McDonald, 1999; Murthy et al., 2003). در مطالعه‌ای که توسط Basra و همکاران (۲۰۰۳) بر روی بذور پیر شده پنبه انجام شد، مشخص شد که کاهش فسفولیپیدهای غشاء سلولی به علت پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد و تغییرات پراکسیداتیو در ترکیب اسیدهای چرب و لیپیدهای غشاء باعث اختلال در عملکرد غشاء سلولی در نتیجه افزایش ویسکوزیته و نفوذ پذیری غشاء و متورم شدن میتوکندری می‌شود.

هدف از این آزمایش بررسی ارتباط تجمع لیپید هیدروپراکسیدها و نقش پراکسیداسیون لیپید با کاهش قابلیت جوانه‌زنی بذرها و آفتابگردان در طی زوال بوده تا از این طریق نحوه و مکانیزم زوال بذرها و آفتابگردان آشکار گردد.

#### مواد و روش‌ها:

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقات زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۹۱ انجام شد. برای این مطالعه از بذرها و رقم ایروفولور آفتابگردان استفاده شد. برای ایجاد سطوح مختلف قدرت بذر آفتابگردان از آزمون تسریع پیری استفاده شد (Hampton and Tekrony, 1995). ابتدا به منظور جلوگیری از حمله قارچ‌ها، بذرها به وسیله وایتکس ضدعفونی و بعد در داخل ظروف پلاستیکی به ابعاد

نمونه گیاهچه‌های غیرطبیعی و کاهش درصد استقرار بوته در مزرعه و در نهایت کاهش عملکرد می‌گردد و در صورت زوال شدید ممکن است هیچ بذری جوانه نزنند (Tekrony et al., 1993; Corbineau et al., 2002).

پراکسیداسیون لیپید دلیل عمده خسارت بذر در طی انبارداری است (Balesevich et al., 2005). قادری فر و همکاران (۱۳۹۳). پراکسیداسیون لیپید با تولید رادیکال‌های آزاد از طریق غیر آنزیمی (اکسیداسیون خود به خود) یا آنزیمی شروع می‌شود (Blokhina et al., 2003). در روش آنزیمی، رادیکال آزاد به وسیله آنزیم‌های لیپوکسیژناز تولید می‌شود. به محض تولید رادیکال‌های آزاد خسارت شدیدی به غشاها وارد می‌شود. این رادیکال‌ها آغازگر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در غشا می‌باشند. نگهداری طولانی مدت بذور در انبار یا شرایط نامساعد نگهداری مانند درجه حرارت و رطوبت نسبی بالا باعث تشدید تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (Bailly, 2004). طی زوال بذر، تعداد زیادی گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شوند که سبب پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند. رادیکال آزاد شامل یک یا گروهی از اتم‌ها است که یک الکترون جفت نشده دارند. در فیزیولوژی بذر تجمع گونه‌های فعال اکسیژن شامل پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، رادیکال سوپراکسید ( $O_2^-$ ) و رادیکال هیدروکسیل ( $OH$ ) باعث پراکسیداسیون چربی‌ها، غیر فعال شدن آنزیم‌ها، خسارت به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاءهای سلول می‌شود (McDonald, 1999; Bailly, 2004). آسیب غشاءهای سلولی را به عنوان عامل اصلی زوال بذرها انبار شده دانسته‌اند (Kalpana and Madhava Rao, 1994). در طول دوره انبارداری در حالی که محتوای رطوبتی بذر پائین است اکسیداسیون خود به خودی لیپیدها موجب تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (McDonald, 1999; Bailly, 2004). در طی فرآیند جوانه‌زنی در حالی که محتوای رطوبتی بذر افزایش می‌یابد گونه‌های فعال اکسیژن بر اثر فعالیت تنفسی در میتوکندری یا فعالیت گلی‌اکسی‌زوم‌ها تولید می‌شوند. افزایش تولید و آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن موجب افزایش پراکسیداسیون

به منظور برآورد میزان لیپید هیدروپراکسیدها در بذره‌های آفتابگردان، از روش استفاده شده توسط Griffiths و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. پس از جدا کردن پوسته بذر ۰/۲ گرم بذر آفتابگردان با ۱ میلی‌لیتر اسید استیک ۰/۱۵ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۵ میلی‌لیتر متانول به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ عصاره‌گیری شد. هاون و دسته هاون پس از انتقال عصاره به دست آمده به لوله آزمایش، با ۲/۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۲/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو شد. این محلول نیز به عصاره قبلی اضافه گردید. عصاره به دست آمده با سرعت پائین و حدود ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، فاز بالایی را دور ریخته و از فاز پائینی که در تاریکی و داخل یخ نگه داشته شده بود، برای اندازه‌گیری میزان لیپید هیدروپراکسید استفاده شد. در دو لوله آزمایش میزان ۱۰۰ میکرولیتر، یا مقادیر بیشتر (معمولاً ۱ میلی‌لیتر بسته به نمونه گیاهی) از فاز پائینی را به کمک گاز نیتروژن تبخیر کرده و بقایای به جا مانده در لوله شماره ۱ با ۱۰۰ میکرولیتر متانول و در لوله شماره ۲ با ۵۰ میکرولیتر متانول و ۵۰ میکرولیتر محلول تری فنیل فسفین (TPP) ۲۵ میلی‌مولار مجدداً حل شد. هر دو لوله به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد و پس از این مدت به هر دو لوله مقدار ۹۰۰ میکرولیتر معرف فاکس اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه که لوله‌ها در تاریکی و دمای اتاق قرار گرفتند میزان جذب نور هرکدام در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل UV-1800 240V قرائت شد. محلول بلانک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم است که پس از تبخیر و اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر متانول تیمارهای بعدی روی آن انجام شد. نتایج به صورت میکرومول بر گرم بذر تر گزارش گردید.

به منظور اندازه‌گیری اسیدهای چرب، ابتدا براساس روش Hara و Radin (۱۹۷۸) استخراج روغن‌های ذخیره‌ای انجام شد. در این روش به ازای هر ۳۰۰ میلی‌گرم روغن تولید شده، ۳۰ میلی‌لیتر بنزن اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس شد. سپس ۳۰ میکرولیتر از فاز فوقانی بنزن برداشت و به لوله‌های

۳/۵×۱۱×۱۱ سانتی‌متر که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود، قرار داده شدند. سپس درب ظرف‌ها کاملاً بسته شده و در دمای ثابت ۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ روز در داخل انکوباتور قرار داده شدند. در طول آزمایش رطوبت نسبی داخل ظرف‌های پلاستیکی ۱۰۰ درصد بود. پس از گذشت زمان‌های مورد نظر ظروف خارج شده و بذرها به مدت ۲۴ ساعت در معرض هوای آزاد قرار داده شد تا کاملاً خشک شدند.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۵ تیمار پیری (در بالا ذکر شد) انجام شد. برای انجام آزمون جوانه‌زنی، ۳ تکرار ۲۵ تایی از بذرها شمارش و روی دو عدد کاغذ حوله‌ای به ابعاد ۳۰×۴۵ سانتی‌متر قرار گرفته و با کاغذی دیگر روی بذرها پوشانده شد (روش ساندویچ) (قادری فر و سلطانی، ۱۳۹۲). برای جلوگیری از تبخیر رطوبت، حوله‌های کاغذی درون پلاستیک گذاشته شد. نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز قرار داده شدند. شمارش بذرها روزانه سه بار صورت می‌گرفت. تعداد بذره‌های جوانه زده هر روز تا رسیدن به روز هفتم شمارش و یادداشت برداری شد. معیار بذور جوانه‌زده خروج ریشه‌چه، به اندازه ۲ میلی‌متر یا بیشتر بود (Soltani et al., 2002). سپس در پایان هفته، طول گیاهچه‌های طبیعی در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد.

به منظور اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها از بذر، ۵۰ بذر در ۳ تکرار وزن شده و در بشرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری قرار داده شدند و ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر (به منظور هم‌دمایی آب مقطر ۲۴ ساعت قبل در انکوباتور ۲۰ درجه قرار داده شده بود) به آن‌ها اضافه شد و بشرها با فویل بسته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Hampton and Tekrony, 1995). بعد از این مدت هدایت الکتریکی محلول با استفاده از دستگاه EC متر (مدل WTW, series Inolab Cond 720 ساخت کشور آلمان) قرائت شد. نتایج به صورت میکروزیمنس بر سانتی‌متر بر گرم محاسبه و گزارش شد.

در این رابطه  $a$ : عرض از مبدا؛  $b$ : شیب منحنی و  $t_0$ : نقطه چرخش روی منحنی می‌باشد.  
شاخص قدرت (Vigor Index) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Singh et al., 2004).

$$VI = (RL + SL) \times GP$$

در این رابطه  $RL$  و  $SL$  به ترتیب طول ریشه و طول ساقه بر حسب سانتی متر و  $GP$  درصد جوانه زنی می‌باشد.  
برای برآزش داده‌های طول گیاهچه، قدرت گیاهچه و پروتئین ( $y$ ) در مقابل دوره‌های زوال ( $x$ ) از مدل دو تکه‌ای زیر شد (بخشنامه، ۱۳۹۰).

$$Y = \begin{cases} a + b \times x & \text{if } x < t_0 \\ a + b_1 \times x & \text{if } x > t_0 \end{cases}$$

در این رابطه  $y$ : متغیر وابسته،  $x$ : دوره‌های زوال،  $b$  و  $b_1$ : شیب‌های منحنی می‌باشند و به داده‌های سرعت جوانه‌زنی در مقابل دوره زوال و نیز درصد جوانه‌زنی در مقابل لیپیدهای پروپراکسیدهای بذر مدل خطی ساده برآزش داده شد.  
تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار آماری SAS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد. مقایسه میانگین‌ها تیمارها نیز با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

### نتایج و بحث:

به داده‌های درصد جوانه‌زنی تجمعی در مقابل زمان در هر یک از تیمارهای زوال‌بذر مدل لجستیک برآزش داده شده است (شکل ۱). اثر زوال بر درصد جوانه‌زنی از یک مدل دو تکه‌ای تبعیت کرد، به طوری که با افزایش دوره زوال از صفر تا ۴ روز، درصد جوانه‌زنی ثابت بود ولی شیب تند نمودار از ۴ تا ۸ روز زوال نشان‌دهنده اثر شدید زوال بر کاهش درصد جوانه‌زنی بود (شکل ۲- $a$ ). سرعت جوانه‌زنی نیز از مدل خطی کاهشی تبعیت می‌گردد (Kapoor et al., 2011; Rashed et al., 2010). افزایش میانگین زمان جوانه‌زنی و کاهش سرعت جوانه‌زنی احتمالاً به دلیل وقفه‌ای است که در شروع فرآیند جوانه‌زنی در بذرهای پیر شده ایجاد می‌شود. علت وقفه ایجاد شده، احتمالاً این است که

آزمایش منتقل گردید و با بنزن به حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد و به آن ۰/۵ میلی لیتر معرف رودآمین افزوده شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب نور هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکترومتر قرائت شد و میزان اسیدهای چرب در نمونه‌ها محاسبه گردید و به صورت میکرومول در گرم بذر گزارش شد.

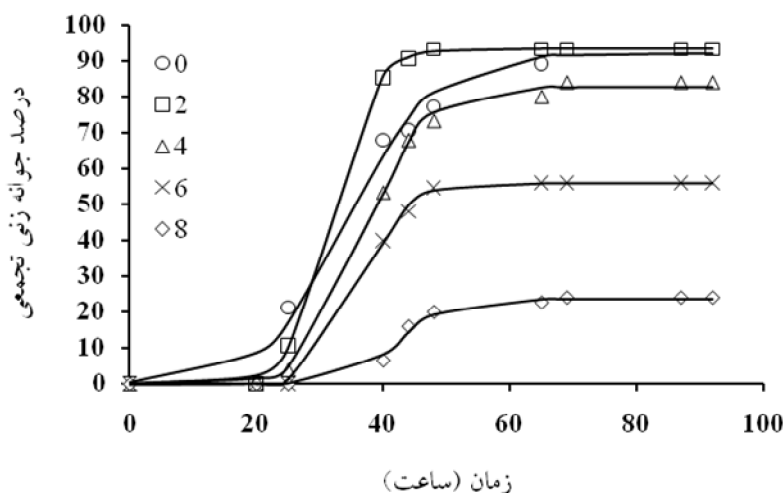
برای استخراج پروتئین محلول، ۲۰۰ میلی گرم بذر (بدون پوسته) آفتابگردان با ۲ میلی لیتر بافر استخراج هموژنیزه شد. پس از آن محلول هموژن از دو لایه پارچه ملامل عبور داده شد و عصاره حاصل به میکروتیوب انتقال یافت. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ ۳ فاز در میکروتیوب تشکیل شد که از فاز میانی محلول در زیر لایه لیپیدی برای اندازه‌گیری پروتئین محلول استفاده شد. برای اندازه‌گیری پروتئین محلول از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد.

برای کمی سازی واکنش درصد جوانه‌زنی تجمعی ( $y$ ) در مقابل زمان (ساعت) ( $x$ ) از مدل لجستیک زیر استفاده شد (Ghaderi-Far et al., 2012):

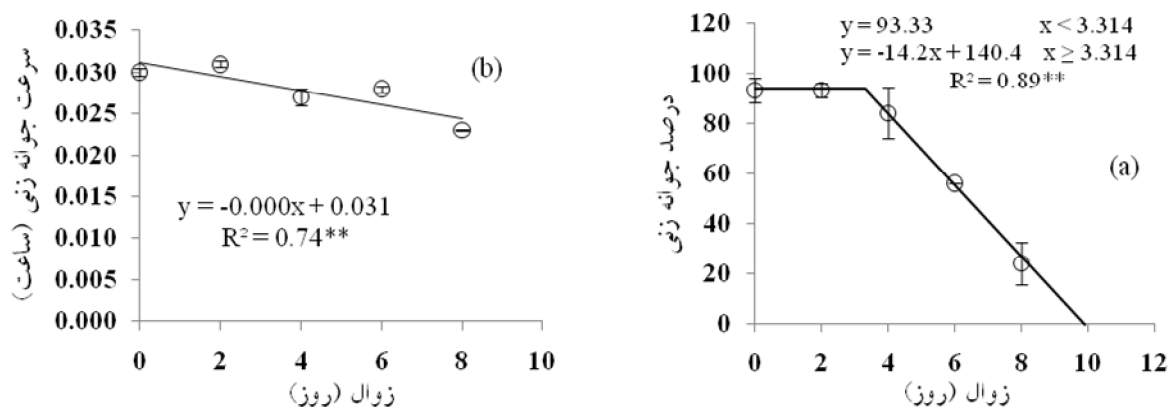
$$y = \frac{G_{\max}}{1 + \left(\frac{x}{D_{50}}\right)^a}$$

در این رابطه  $G_{\max}$ : حداکثر درصد جوانه‌زنی؛  $a$ : ضریب نشان‌دهنده تندی افزایش درصد جوانه‌زنی و  $D_{50}$ : مدت زمانی است که طول می‌کشد ۵۰ درصد از حداکثر جوانه‌زنی رخ دهد. معکوس زمان تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی ( $1/D_{50}$ ) به عنوان محاسبه سرعت جوانه‌زنی استفاده شد (Soltani et al., 2002).  
همچنین از مدل دو تکه‌ای برای برآزش داده‌های درصد جوانه‌زنی، هدایت الکتریکی، اسید چرب و لیپید هیدروپراکسیدها ( $y$ ) در مقابل دوره‌های زوال ( $x$ ) استفاده شد (بخشنامه، ۱۳۹۰):

$$Y = \begin{cases} a + b \times x & \text{if } x > t_0 \\ a + b \times t_0 & \text{if } x \leq t_0 \end{cases}$$



شکل ۱- برازش مدل غیر خطی لجستیک به داده‌های درصد جوانه‌زنی تجمعی در مقابل زمان‌های شمارش بذور جوانه‌زده در هر یک از سطوح زوال بذر آفتابگردان



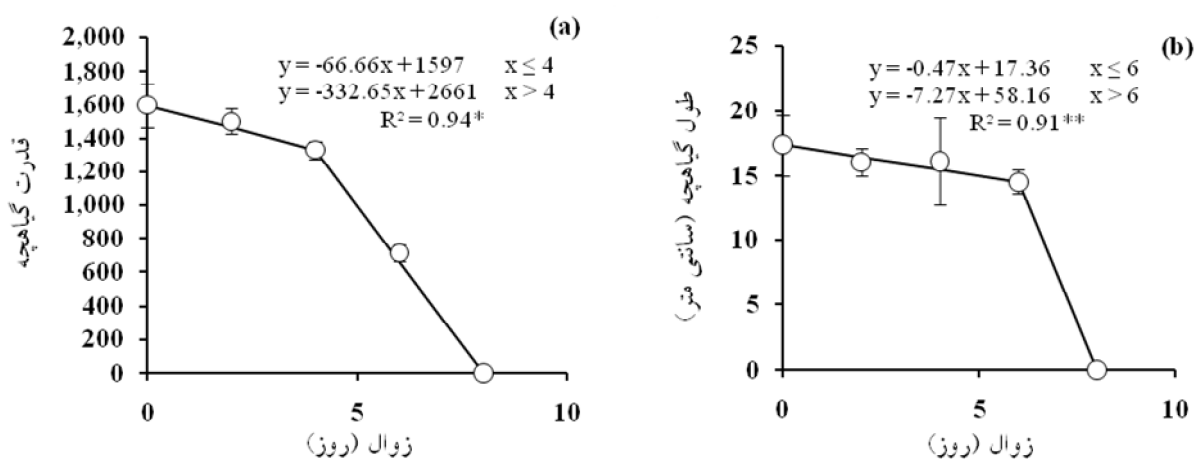
شکل ۲- درصد (a) و سرعت (b) جوانه‌زنی بذرهای آفتابگردان در دوره‌های مختلف زوال

کاهش نشان می‌دهد (McDonald, 1999; Basra et al., 2003). گزارشات متعددی نشان داده است که با زوال بذر وزن خشک ساقه و ریشه (Verma et al., 2003)، طول گیاهچه (Rao et al., 2006) و درصد گیاهچه‌های طبیعی (Vanpijlen et al., 1995) کاهش می‌یابد.

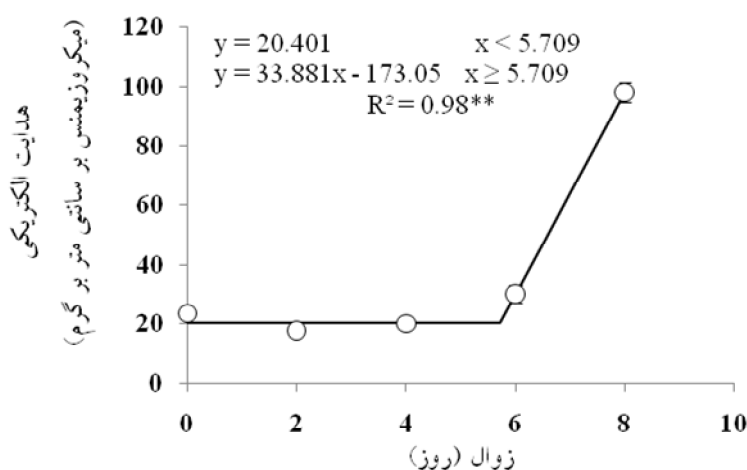
اندازه‌گیری میزان هدایت الکتریکی بذور می‌تواند یکی از پارامترهای تعیین‌کننده قدرت بذر باشد. درصد و سرعت جوانه‌زنی دارای رابطه معکوسی با هدایت الکتریکی می‌باشند (Mosavi et al., 2011). نتایج اثر زوال بر هدایت الکتریکی از یک نمودار دو تکه‌ای تبعیت می‌کند، به‌طوری‌که، پس از گذشت ۶ روز زوال تأثیری بر هدایت الکتریکی بذرهای

بذر برای تعمیر خسارت‌های وارد شده به غشاء و دیگر قسمت‌های سلول و همچنین آغاز مجدد فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانسی و جلوگیری از بروز تنش اکسیداتیو نیاز به زمان دارد و ترمیم این خسارت‌ها فقط پس از جذب آب توسط بذر امکان‌پذیر است. بنابراین مدت زمان لازم برای تکمیل فرایند جوانه‌زنی در بذرهای زوال یافته افزایش می‌یابد که نتیجه آن کاهش سرعت جوانه‌زنی است (Priestley, 1986; Bailly et al., 2000).

با افزایش زوال بذر طول گیاهچه و شاخص قدرت بذر با تبعیت از مدل دو تکه‌ای کاهش یافتند (شکل ۳ a و b). با زوال بذر، قدرت بذر اولین جزء از کیفیت بذر است که کاهش می‌یابد و به دنبال آن ظرفیت جوانه‌زنی یا قابلیت حیات بذر نیز



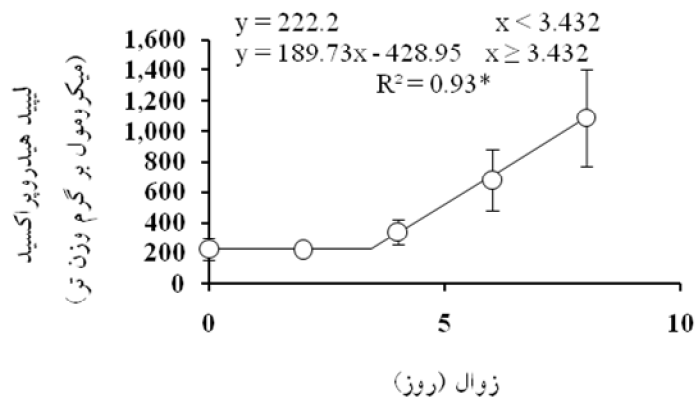
شکل ۳- طول گیاهچه و شاخص قدرت بذر آفتابگردان در دوره‌های مختلف زوال



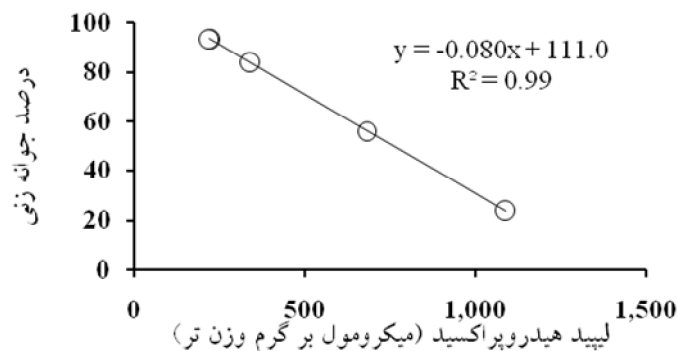
شکل ۴- هدایت الکتریکی بذرهای آفتابگردان در دوره‌های مختلف زوال

طی فرآیند پراکسیداسیون، روشی رایج برای کمی‌سازی مقدار پراکسیداسیون لیپید می‌باشد (Bhattacharjee and Mukherjee, 1998; Stewart and Bewley, 1980). به‌هرحال باید دانست که MDA برآوردی از میزان پراکسیداسیون لیپید می‌باشد و برای بررسی دقیق‌تر باید محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپید مثل لیپیدهای پروپراکسیدها را اندازه گرفت، زیرا MDA در اثر اکسیداسیون اسیدهای چرب با ۳ یا تعداد بیشتری پیوند دو گانه به‌وجود می‌آید، در صورتی که بافت‌های گیاهی اغلب دارای سطوح بالایی از اسیدهای چرب با ۲ پیوند دوگانه می‌باشند (Griffiths et al., 2000). لیپید هیدروپراکسیدها محصولات اولیه ناشی از پراکسیداسیون لیپید است (Mittler, 2002). مقدار لیپید هیدروپراکسیدهای دانه‌های آفتابگردان در طی زوال از مدل دو

نداشت، ولی از روز ۶ زوال به بعد، افزایش شدیدی در هدایت الکتریکی بذرها مشاهده شد، به‌طوری‌که، میزان هدایت الکتریکی از ۲۳/۴۶ به ۹۸ میکروزیمنس بر سانتی‌متر رسید (شکل ۴). در اثر زوال، غشاء آسیب دیده و میزان نشت مواد افزایش می‌یابد (Kalpana and Madhava Rao, 1994). افزایش هدایت الکتریکی بذرهای پیر شده در مطالعات مختلف گزارش شده است (Goel et al., 2003). قادری‌فر و همکاران، (۱۳۹۳). از جمله تغییراتی که در غشاء رخ می‌دهد و باعث افزایش نشت الکترولیت‌ها از بذر می‌شود می‌توان به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء سلولی اشاره کرد (Walters, 1998). تعیین مقدار مالون دی آلدئید (MDA) به‌عنوان یکی از محصولات جانبی تولید شده از اسیدهای چرب غیر اشباع در



شکل ۵- میزان لیپید هیدروپراکسیدها در بذره‌های آفتابگردان در دوره‌های مختلف زوال

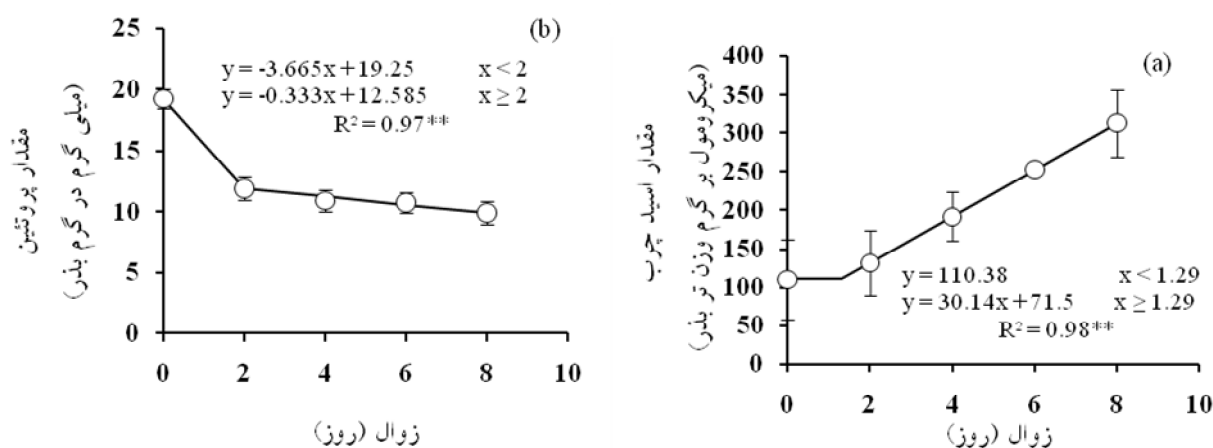


شکل ۶- رابطه درصد جوانه‌زنی و میزان لیپید هیدروپراکسیدها در بذره‌های آفتابگردان

افزایش میزان اسیدهای چرب غیر اشباع منجر به خسارت غشای سلولی می‌شود (Abreu *et al.*, 2013). نتیجه تخریب غشاء سلولی، مختل شدن متابولیسم سلولی و کاهش درصد جوانه‌زنی است (Peng *et al.*, 2011). افزایش هیدروپراکسیدهای لیپیدی طی زوال احتمالاً ناشی از تشدید تنفس و فرآیندهای ناخواسته مرتبط با آن بوده است. در مطالعه ای بر روی بذره‌های گردو مشاهده شد کاهش سبز شدن بذره‌های این گیاه پس از استقرار در شرایط گرم همراه با تشدید فعالیت دهیدروژنازهای میتوکندریایی و افزایش هیدروپراکسیدهای لیپیدی بوده است (Keshavarzian *et al.*, 2013)، که بیانگر این مطلب است که کاهش قابلیت حیات بذر با افزایش هیدروپراکسیدهای لیپیدی همراه است.

نتایج مقایسه میانگین اسیدهای چرب نشان‌دهنده این است که با افزایش مدت زمان زوال، مقدار اسیدهای چرب با تبعیت

تکه‌ای تبعیت کرد، به طوری که، با افزایش دوره زوال از صفر به ۴ روز میزان آنها تغییر چندانی نداشت، ولی با افزایش دوره زوال از ۴ به ۸ روز به طور فزاینده‌ای افزایش یافت (شکل ۵). لیپید هیدروپراکسیدها، اکسیدانت‌های فعالی هستند که تمایل به واکنش با دیگر ترکیبات را داشته و این فراورده‌های تخریبی قادر به واکنش با اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها می‌باشند، در نتیجه باعث زوال بذر می‌گردند (Petruzzilli and Taranto, 1984). در تایید اثر نامطلوب لیپید هیدروپراکسیدها در ارتباط با زوال بذر، رابطه معکوس بین درصد جوانه‌زنی و میزان لیپید هیدروپراکسیدها در شکل ۶ مشاهده می‌شود. به طوری که، با افزایش میزان لیپید هیدروپراکسیدها، درصد جوانه‌زنی کاهش یافت. پراکسیداسیون لیپیدها به احتمال زیاد دلیل اصلی زوال و کاهش قدرت و قابلیت حیات بذرها است. عاملی که منجر به کاهش محتوای لیپیدها طی انبارداری بذرها می‌شود و با



شکل ۷- میزان اسید چرب (a) و پروتئین (b) در بذره‌های آفتابگردان در دوره‌های مختلف زوال

که از یک مدل دو تکه ای تبعیت کرد (شکل ۷ b). با افزایش زوال از صفر به ۲ روز، مقدار پروتئین به شدت کاهش یافت (۳/۶۶ میلی گرم در هر روز زوال)، اما از ۲ روز زوال به ۸ روز، شیب کاهش پروتئین کمتر بود (۰/۳۳ میلی گرم در هر روز زوال). به عبارت دیگر، شدت کاهش پروتئین محلول در دوره‌های اولیه زوال شدیدتر از دوره‌های انتهایی زوال بود و پروتئین محلول در شروع زوال به‌شدت تحت تاثیر قرار گرفته و مقدار آن کاهش یافت. در طی زوال بذر، به دلیل میل ترکیبی زیاد اکسیژن‌های فعال و سایر آلدئیدهای تولید شده با بیومولکول‌های حیاتی نظیر پروتئین‌ها سبب دناتوره شدن آنها شده و این امر در نهایت شکستن پروتئینها توسط آنزیم‌های پروتئازی را تشدید می‌کند (Ravikumar *et al.*, 2002؛ Kapoor *et al.*, 2010؛ Ayyappan *et al.*, 2006). پژوهش Kapoor و همکاران (۲۰۱۰) بر روی نخود نشان داد که با کاهش میزان پروتئین محلول، درصد جوانه‌زنی، طول گیاهچه و در نتیجه قدرت بذر کاهش یافت.

#### نتیجه‌گیری:

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که کاهش قابلیت حیات و قدرت بذر آفتابگردان طی زوال به دلیل افزایش پراکسیداسیون لیپیدها است. پیامد نهایی پراکسیداسیون لیپید، اختلال ساختار غشاء، نشت سلولی و اختلال در متابولیسم طبیعی سلول می‌باشد، در نتیجه هدایت الکتریکی افزایش می‌-

از مدل دو تکه‌ای افزایش یافت، به طوری که، مقدار اسیدهای چرب از ۱۱۰/۴ میکرومول بر گرم وزن تر در تیمار بدون پیری به ۳۱۲/۵ میکرومول بر گرم وزن تر در تیمار ۸ روز پیری رسید (شکل ۷ a). در تحقیقی که توسط Abreu و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد، با افزایش زوال بذر آفتابگردان میزان روغن کاهش یافت و مقدار اسیدهای چرب افزایش یافت. پژوهشگران افزایش اسیدهای چرب در طی زوال را ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های لیپازی هم‌چون فسفولیپاز-دی دانسته‌اند (Wang *et al.*, 2012). افزایش اسیدهای چرب اثرات مخربی روی غشاء سلول دارند، این امر به علت اثر اسیدهای چرب در تولید رادیکال‌های آزاد مخربی است که ناشی از پراکسیداسیون لیپید است. پژوهش Sveinsdottir و همکاران (۲۰۰۹) بر روی گیاه ذرت نشان داد که افزایش اسیدهای چرب منجر به افزایش نشت مواد از غشاء می‌گردد. افزایش روند تولید اسیدهای چرب، pH سلول را کاهش داده و این امر متابولیسم انرژی سلول را مختل می‌کند (Kibinza *et al.*, 2006). مطالعات مختلفی نشان دادند با افزایش دوره زوال میزان اسیدهای چرب افزایش می‌یابد (Cornah and Smith, 2002; Borek *et al.*, 2011). تجمع متوالی اسیدهای چرب آزاد بر متابولیسم سلولی معمول اثر مخرب دارد. بنابراین، تجمع این ترکیبات به تغییر ماهیت آنزیم‌ها و از دست رفتن فعالیت آنها منجر می‌شود (Basavarajappa *et al.*, 1991).

روند تغییرات میزان پروتئین تحت تاثیر زوال قرار گرفت



خسارت ژنتیکی می‌شود (Yao *et al.*, 2012). این نتایج به روشنی بیانگر این مطلب است که بین کاهش قابلیت حیات بذر، پراکسیداسیون لیپید و زوال بذر آفتابگردان در طی پیری ارتباط وجود دارد و می‌توان عنوان کرد پراکسیداسیون لیپید یکی از دلایل اصلی زوال بذر آفتابگردان در طی انبارداری است.

یابد. از آنجا که بذرهای آفتابگردان حاوی مقدار زیادی ذخایر لیپیدی حاوی اسیدهای چرب غیراشباع هستند، بنابراین، پراکسیداسیون این اسیدهای چرب موجب تولید و انباشتگی گونه‌های فعال اکسیژن، سایر رادیکال‌های آزاد و آلدئیدهای فراری می‌شود که سبب خسارت به میتوکندری، کاهش pH سلول، غیر فعال شدن آنزیم‌ها، شکستگی غشاء سلولی و

#### منابع:

- deterioration during accelerated ageing. *Seed Science and Technology* 31:531-540.
- Bewley, J. D. (1986) Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. In: *Physiology of Seed Deterioration* (McDonald, M.B and Nelson, C.J), pp. 27-47. Crop Science Society of America.
- Bhattacharjee, A. and Mukherjee, A. K. (1998) The deleterious effects of high temperature during early germination on membrane integrity and subsequent germination of *Amaranthus lividus*. *Seed Science and Technology* 26: 1-8.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91:179-194.
- Borek, S., Kubala, S., Kubala, S. and Ratajczak, L. (2011) Comparative study of storage compound breakdown in germinating seeds of three lupine species. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1953-1968.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-252.
- Castellion, M., Matiacevich, S., Buera, P. and Maldonado, S. (2010) Protein deterioration and longevity of quinoa seeds long-term storage. *Food Chemistry* 121: 952-958.
- 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. *Physiologia Plantarum* 116: 489-496.
- Cornah, J. E. and Smith, M. (2002) Synthesis and function of glyoxylate cycle enzymes. *Plant Proximosomes* 8: 57-101.
- Escandon, J. M., Silva, R. S., Granja, A. A., Alves, M. C. and Pompelli, M. F. (2013) Germination responses of *Jatropha curcas* L. seeds to storage and aging. *Industrial Crops and Products* 44: 684-690.
- Ghaderi-Far, F., Alimaghani, S. M., Mohammad Kameli, A. M. and Jamali, M. (2012) Isabgol (*Plantago ovata* Forsk) seed germination and emergence as affected by environmental factors and
- بخشنامه، ا. (۱۳۹۰) ارزیابی روابط آلومتریک در ارقام گندم استان گلستان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
- قادری فر، ف. و سلطانی، ا. (۱۳۹۲) کنترل و گواهی بذر. چاپ دوم، انتشارات جهاد دانشگاهی، مشهد.
- قادری فر، ف.، سلطانی، ا. و صادقی پور، ح. ر. (۱۳۹۳) تغییرات در کربوهیدرات‌های محلول و فعالیت آنزیم‌های پالایند گونه‌های اکسیژن فعال در کدوتخم کاغذی طی انبارداری در دماها و رطوبت‌های بذر مختلف، مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی. ۷: ۱۷۹-۱۵۷.
- Abreu, L. A. D. S., Carvalho, M. I. M., Pinto, C. A. G., Kataoka, V. Y. and Silva, T. T. D. A. (2013) Deterioration of sunflower seeds during storage. *Journal of Seed Science* 35: 240-247.
- Ayyappan, V., Andy, G., Natesan, S., Won Choi, C. and Markandan, M. (2006) Changes in L- isoaspartyl Methyltransferase, storage components and Antioxidant enzymes activities during accelerated ageing in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds. *The Plant Sciences* 3:228-239.
- Bailey, C. (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14:93-107
- Bailey, C., Benmar, A., Corbineau, F. and Come, D. (2000) Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Science Research* 10: 35-42.
- Balešević, S., Malencic, D., Tatic, M. and Miladinovic, J. (2005) Influence of aging process on biochemical changes in sunflower seed. *Helia* 28: 107-114.
- Basavarajappa, B., Shetty, H. S. and Prakash, H. S. (1991) Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Science and Technology* 19: 279-286.
- Basra, S. M. A., Ahmad, N., Khan, M. M., Iqbal, N. and Cheema, M. A. (2003) Assessment of cotton seed

- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 9: 405-410.
- Mosavi, N. M., Gholami, H., Kord Firouzjaj, G., Sadeghi, M. and Sedighi, E. (2011) Free fatty acid and electrical conductivity changes in cotton seed (*Gossypium hirsutum*) under seed deterioration conditions. *International Journal of Agriscience*. 12: 62-66.
- 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. *Journal of Experimental Botany* 54:1057-1067.
- Peng, Q., Zhiyou, K., Xiaohong, L. and Yeju, L. (2011) Effects of accelerated aging on physiological and biochemical Characteristics of waxy and non-waxy wheat Seeds. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)* 18: 7-12.
- Petruzzilli, L. and G. Taranto. (1984) Phospholipids changes in wheat embryos aged under different storage conditions. *Journal of Experimental Botany* 35: 517-520.
- Powell, A. A. and Mathews, S. (1981) Association of phospholipid changes with early stages of seed aging. *Annals of Botany* 47:709-712.
- Priestley, D. A. (1986) Seed ageing. Cornell University press, Ithaca, New York.
- 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. *Scientia Horticulturae* 110: 1-6.
- Rashed, M. M., Shallan, M., Fathy, M. and Ismail, A. (2010) Changes in biochemical and isozymes components of watermelon seeds during accelerated ageing technique. *Journal of American Science* 6: 979-985.
- Ravikumar, R., Ananthakrishnan, G., Girija, S. and Ganapathia, A. (2002) Seed viability and biochemical changes associated with accelerated ageing in *Dendrocalamus strictus* seeds. *Journal of Plant Biology* 45:153-156.
- Singh, R. K., Jain, S. K. and Singhm A. K. (2004) Seed storage of African marigold (*Tagetes erecta* L.) for ex-situ conservation. *Seed Science and Technology* 32: 503-509
- Soltani, A., Galeshi, S., Zeinali, E. and Latifi, N. (2002) Germination, seed reserve utilization and seedling growth of chickpea as affected by salinity and seed size. *Seed Science and Technology* 30: 51-60.
- Stewart, R. R. C. and Bewley J. D. (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean. *Plant Physiology* 65: 245-248.
- Sveinsdottir, H., Yan, F. and Zhu, Y. (2009) Seed ageing-induced inhibition of germination and post-germination root growth is related to lower activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in maize roots. *Plant Physiology* 166:128-135.
- TeKrony, D. M. and Nelson, O., Egli, D. B. and White. planting depth. *International Journal Plant Production* 6: 185-194.
- Gidrol, X., Noubhani, A., Mocoquot, B., Fournier, A. and Pradet, A. (1998) Effect of accelerated ageing on protein synthesis in two legume seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 26: 281-288.
- Goel, A. and Sheoran, I. S. (2003) Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in seeds under natural ageing. *Biologia Plantarum* 46: 429-434.
- Goel, A., Goel, A. K. and Sheoran, I. S. (2003) Changes in oxidative stress enzymes during artificial aging in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *Plant Physiology* 160: 1093-1100.
- Gregg, B., Wanis, S. A. E., Bishaw, Z. and Gastel, A. J. G. (1994) Safe seed storage. WANA Seed Net work.
- Griffiths, G., Leverentz, M., Silkowski, H., Gill, N. and Sanchez-serrano, J. J. (2000) Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *Journal of Experimental Botany* 55: 555-558.
- Hampton, J. G. and Tekrony, D. M. (1995) Handbook of Vigor Test Methods. The International Seed Testing Association, Zurich.
- Hara, A. and Radin, N. S. (1978) Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. *Analytical Biochemistry* 90: 420-426.
- Kalpna, R. and Madhava Rao, K. V. (1994) Absence of the role of lipid peroxidation during accelerated ageing of seed of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) cultivars. *Seed Science and Technology* 22: 253-260.
- Kalpna, R. and Madhava Rao, K. V. (1996) Lipid changes during accelerated ageing of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) cultivars. *Seed Science and Technology* 24:475-483.
- Kapoor, N., Aria, A., Siddiqui, M. A., Amir, A. and Kumar, H. (2010) Seed deterioration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under accelerated ageing. *Asian Journal of Plant Sciences* 9: 158-162.
- Kapoor, N., Aria, A., Siddiqui, M. A., Kumar, H. and Amir, A. (2011) Physiological and biochemical changes during seed deterioration in aged seeds of rice( *oryza sativa* L.). *American Journal of Plant Physiology* 6: 28-35.
- Keshavarzian, M., Garivani, Z., Sadeghipour, H. R., Aghdasi, M. and Azimmohseni, M. (2013) Suppression of mitochondrial dehydrogenases accompanying post-glyoxylate cycle activation of gluconeogenesis and reduced lipid peroxidation events during dormancy breakage of walnut kernels by moist chilling. *Scientia Horticulture* 161: 314-323.
- Kibinza, S., Vinel, D., Come, D., Bailly, C. and Corbineau, F. (2006) Sunflower seeds deterioration as related to moisture content during aging, energy metabolism and active oxygen species scavenging. *Physiologia Plantarum* 128: 496-506.
- McDonald, M. B. (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology* 27: 177-237.

- Walters, C., Ballesteros, D. and Vertucci, V. (2010) Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. *Plant Science* 179: 565-573.
- Wang, F., Wang, R., Jing, W. and Zhang W. (2012) Quantitative dissection of lipid degradation in rice seeds during accelerated aging. *Plant Growth Regulation* 66: 49-58.
- Yao, Z., Liu, L., Gao, F., Rampitsch, C., Reinecke, D. M., Ozga, J. A. and Ayele, B. T. (2012) Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea. *Journal of Plant Physiology* 169: 1477-1488.
- G. M. (1993) Predicting soybean seed germination during warehouse storage. *Seed Science and Technology* 21: 127-137.
- Vanpijlen, J. G., Karaak, H. L., Bino, R. J. and Devos, C. H. R. (1995) Effects of ageing and osmopriming on germination characteristics and chromosome aberrations of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) seeds. *Seed Science and Technology* 23: 823-830.
- Verma, S. S., Verma, U. and Tomer, R. P. S. (2003) Studies on seed quality parameters in deterioration seeds in Brassica (*Brassica campestris*). *Seed Science and Technology* 31: 389-398.
- Walters, C. (1998) Understanding the mechanisms and kinetics of seed ageing. *Seed Science Research* 8:223-244.