اثر پیش‌تیمار بذر با اسید سالیسیلیک و پلی‌آمین‌ها بر فعالیت بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه بامیه در شرایط تنش دمای پایین

سمیه بهادری[۱]، بهروز اسماعیل پور[۱*]، مختار حیدری[۲]، سرور خرم دل[۳]، پریسا شیخ زاده[٤]، نصیبه توکلی حور[٤] و علیرضا قنبری[۱]

[۱]گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، [۲]گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه کشاورزی رامین، اهواز، [۳] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، [٤]گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٤/۰۸/۲۰)

چکیده:

تنش دمای پایین، یکی از عوامل محیطی محدود کننده در توسعه کشت و تولید بامیه است. در این پژوهش اثر اسپرمین، اسپرمیدین و اسید سالیسیلیک بر افزایش مقاومت گیاهچه‌های بامیه به تنش دمای پایین بررسی گردید. تیمارهای آزمایش شامل پیش‌تیمار بذور با آب مقطر، سالیسیلیک‌اسید (۰/۱ میلی‌مولار)، اسپرمین (۰/۵ میلی مولار) و اسپرمیدین (۰/۵ میلی‌مولار) و شاهد (بدون اعمال پیش‌تیمار) بود. آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۳ اجرا شد. گیاهچه‌های شاهد و پیش‌تیمار شده با آب و تنظیم کننده‌های رشد درمرحله شش‌برگی در شرایط تنش دمای پایین (دمای ۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۷۰ دقیقه در چهار روز متوالی) قرار گرفتند. پس از اعمال تنش سرما رنگیزه‌های فتوسنتزی، کربوهیدرات کل، پرولین، ثبات غشا، مقدار پروتئین کل، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز اندازه‌گیری شد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که کمترین مقدار نشت مواد یونی (۱۰درصد) مربوط به اسپرمین بود. بیشترین مقدار کلروفیل کل (۱۷/۲٤ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ)، حداکثر پرولین (۲/۹ میکروگرم بر گرم وزن تازه برگ)، کربوهیدرات کل (۱/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ) و حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز (۲۲/٦ تغییرات در جذب میلی‌گرم وزن تازه برگ) در اسید سالیسیلیک به‌دست آمد. همچنین، بیشترین مقدار پروتئین (۲۰٤/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ) و فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (۹۱ تغییرات در جذب میلی‌گرم وزن تازه برگ) از اسپرمین و اسید سالیسیلیک حاصل شد. پیش‌تیمار بذر با اسید سالیسیلیک و پلی‌آمین‌ها به‌طور معنی‌داری موجب افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول، پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌ویژه کاتالاز شد که باعث حفظ ساختار و یکپارچگی غشا و کاهش خسارت به غشا شد. نتایج حاصل بهبود علائم ناشی از تنش و آسیب‌ها در گیاهچه‌های تیمار شده توسط اسید سالیسیلیک را نشان می‌دهد، بنابراین پیشنهاد می‌شود که پیش‌تیمار بذر با سایر غلظت‌های اسید سالیسیلیک و پلی‌آمین‌ها به منظور بهبود مقاومت نسبت به تنش دماهای پایین در گیاه بامیه مورد مطالعه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اسپرمین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پرولین، نشت موادیونی

مقدمه:

توسعه غذاهایی با پروتئین بالا با منشأ گیاهی در کشورهای در حال توسعه ضروری است، زیرا قیمت بالای پروتئین حیوانی را کاهش می‌دهد. بامیه یک گیاه یک‌ساله، گرمسیری با نام علمی (*Abelmoschus esculentus* L.) یا (*Hibiscus esculentus* L.) متعلق به تیره گیاه‌شناسی ختمی‌سانان یا پنیرک‌سانان

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: razavi694@bsmaielpoor2008@gmail.com

(Malvaceae) است (دانشور، ۱۳۸۷). مصرف محصولاتی مانند بامیه نقش مهمی را در مبارزه با سوءتغذیه، که یک مشکل جدی در این کشورها می‌باشد، ایفا می‌کند (Aminigo and Akingbala, 2004). بامیه منبع مهمی از ویتامین‌های A، B وC و عناصر معدنی مانند کلسیم، پتاسیم بوده و هم‌چنین غنی از پروتئین می‌باشد (دانشور، ۱۳۸۷). گیاهان برای رشد بهینه به محدوده دمایی خاصی احتیاج دارند و خارج شدن از این محدوده به‌عنوان یک تنش محسوب می شود. در بیشتر گیاهان پس از قرارگیری در دماهای بین صفر تا ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد، تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مختلفی به‌وجود می‌آید (Seppanen, 2000). در گیاهان حساس به دمای پایین مانند گیاهان گرمسیری، نتیجه این تغییرات فیزیولوژیک ممکن است به‌صورت آسیب‌های قابل برگشت و غیرقابل بروز نماید. آسیب‌های اولیه اختلالاتی هستند که در واکنش‌های متابولیسمی به صورت موقتی ایجاد می‌شوند و معمولاً در صورت رفع عامل تنش‌زا قابل برگشت می‌باشند، ولی آسیب‌های ثانویه اختلالات متابولیسمی هستند که معمولاً پس از رفع تنش به حالت اولیه برنمی‌گردند (Allen and Ort, 2001).

پژوهش‌ها نشان داده است که با تغییر خصوصیات غشاء در حین تنش سرما، تعادل متابولیسمی مختل شده و با افزایش متابولیت‌های سمی، آسیب‌های ثانوی در گیاه ایجاد می‌شود (Seppanen, 2000). یکی از مهم‌ترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان که تحت تنش‌های سرما و یخبندان ایجاد می‌شود، تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست و میتوکندری‌ها است (Bakalova *et al*., 2004; Rahimizadeh *et al*., 2007). رادیکال‌های فعال اکسیژن، در فرآیندهای فیزیولوژیک مهم مانند تنفس نوری، فتوسنتز و تنفس تولید می‌شوند. رادیکال سوپراکسید در طی فتوسنتز در صورت اختلال در تجزیه آب در واکنش هیل و عدم انتقال الکترون به فتوسیستم II تشکیل می شود (Bhattacharjee, 2005). گونه‌های فعال اکسیژن شدیداً با بیومولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و پراکسیداسیون لیپید، تغییر ساختار پروتئین و جهش در مواد ژنتیکی مانند DNA را سبب می‌شوند که این امر به مختل شدن متابولیسم طبیعی گیاه و در نهایت مرگ سلول‌ها منجر می‌شود (Esfandiari *et al*., 2007; Pennycooke *et al*., 2004). گیاهان مکانیزم‌های حفاظتی مختلفی را برای تجزیه یا کاهش رادیکال‌های فعال اکسیژن دارند که در کاهش خسارت تنش‌های محیطی مؤثر است. سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان یکی از این مکانیزم‌های حفاظتی می‌باشد. گیاهانی که از سطوح بالاتری از آنتی اکسیدان‌ها برخوردار هستند، مقاومت بیشتری به آسیب‌های اکسیداتیو نشان می‌دهند. دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند که باعث شکسته شدن پراکسیدهیدروژن به آب و اکسیژن می‌گردند (قربانلی و همکاران.، ۱۳۸۲؛ Janda *et al*., 2005; Yong *et al*., 2008).

گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی، مانند سرما و یخبندان در مرحله سازگاری، با افزایش تولید مواد تنظیم‌کننده اسمزی، مقاومت به دمای پایین را افزایش می‌دهند. مواد تنظیم‌کننده فشار اسمزی بیشتر شامل اسیدهای آمینه (مانند پرولین)، کربوهیدرات، و پروتئین‌ها و برخی یون‌های معدنی هستند (جعفری و همکاران.، ۱۳۸۵). پرولین یکی از مهم‌ترین ترکیبات تنظیم‌کننده اسمزی می‌باشد که از دو مسیر گلوتامات و اورنیتین سنتز می‌شود و در شرایط تنش سرما سنتز آن به مقدار زیادی افزایش می‌یابد (Allen and Ort, 2001). از روش هایی که در سال‌های اخیر برای کاهش اثرات تنش های محیطی روی گیاهان مختلف استفاده شده است کاربرد مواد شیمیایی خارجی به منظور کاهش خسارت‌های تنش است (Yuan and Lin, 2008). از جمله این مواد می‌توان به اسیدسالیسیلیک اشاره کرد، که یک ترکیب فنلی شبه‌هورمون می‌باشد که به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی داخلی نقش مهمی را در مکانسیم‌های دفاع در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده دارد (Szalai *et al*., 2000). اسید سالیسیلیک به‌طور مستقیم و غیرمستقیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را فعال می‌کند. یکی از مولکول‌های پیام‌رسان مهم است و باعث تحریک بروز عکس‌العمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شود و همانند یک آنتی‌اکسیدان

غیرآنزیمی نقش مهمی را در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک در گیاهان در شرایط تنش ایفا می‌کند (Arfan *et al*., 2007). باتوجه به مطالعات انجام شده توسط Hayata و همکاران (۲۰۱۰) اسید سالیسیلیک باعث کاهش آثار سرما در هویج، گوجه‌فرنگی و همچنین باعث کاهش اثرات تنش اکسیداتیو در گیاهچه آرابیدوپسیس گردید (Waseem *et al*., 2006). پیش‌تیمار بذور در محلول نیترات پتاسیم سه درصد حاوی ۰/۱ میلی‌مول اسید سالیسیلیک می‌تواند در جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه بادمجان تحت درجه حرارت پایین موثر باشد (Zhang *et al*., 2011).

پلی‌آمین‌ها پلی‌کاتیون‌های مهمی هستند که در مراحل مختلف فیزیولوژیک و نموی گیاهان نقش دارند (Kasukabe *et al*., 2004). اخیراً نقش پلی‌آمین‌ها در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی، از جمله شوری و خشکی مورد توجه قرار گرفته است (Groppa and Benavides, 2008). در بسیاری از موارد، تنش‌های محیطی منجر به تجمع پلی‌آمین های آزاد منجر می‌گردد، که نشان دهنده اهمیت بیوسنتز پلی آمین‌ها به عنوان پاسخ‌های مهم بیوشیمیایی گیاهان در شرایط تنش می‌باشد (Kasukabe *et al*., 2004). پلی‌آمین‌ها با جلوگیری از پراکسیده شدن چربی‌های غشا، موجب حفظ سیالیت و ثبات آن شده و از بروز سرمازدگی جلوگیری می کنند (Mirdehghan *et al*., 2007). با توجه به اینکه بامیه یک محصول فصل گرم است و در مناطق سردسیری به علت دمای پایین رشد و نمو آن به تاخیر می‌افتد و از توسعه کشت آن در این مناطق جلوگیری می شود این آزمایش به منظور بررسی اثر پیش‌تیمار بذر با آب مقطر، اسپرمین، اسپرمیدین و اسید سالیسیلیک بر برخی فعالیت‌های آنزیمی و شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه بامیه به‌منظور کاهش تنش دمای پایین بررسی گردید.

مواد و روش‌ها:

این آزمایش در سال ۱۳۹۳ در گروه باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی (شهر اردبیل) انجام شد. بذرهای بامیه رقم بسنطی که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت، از شرکت سپاهان رویش اصفهان تهیه گردید. ابتدا در مرحله جوانه‌زنی، به‌منظور تعیین مدت زمان و غلظت مواد مورد استفاده آزمایشات مقدماتی انجام شد. سپس آزمایشی به صورت طرح کاملا تصادفی با پنج تیمار شامل خیساندن بذرها در آب مقطر(به مدت ۲٤ ساعت)، اسید سالیسیلیک (غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به مدت ۲٤ ساعت)، اسپرمین و اسپرمیدین (غلظت ۰/۵ میلی-مولار به مدت ۱۲ ساعت) و تیمار شاهد (بدون اعمال پیش-تیمار) در سه تکرار انجام گردید. جهت اعمال پیش‌تیمار بذرها در داخل پتری‌دیش بین ۲ عدد کاغذ واتمن شماره ۱ قرار داده شدند و محلول‌های تهیه شده برای پیش‌تیمار به مقدار مساوی به پتری‌دیش‌ها افزوده شد، بذرهای بامیه پس از پیش‌تیمار در مدت ۲٤ ساعت در دمای اتاق خشک شدند، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و مدت روشنایی ۱۲ ساعت در پتری‌دیش بین ۲ عدد کاغذ واتمن شماره ۱ در ژرمیناتور انجام شد. پس از جوانه‌زنی، یذور دارای حداقل دو میلی متر ریشه‌چه، بذور جوانه‌زده به به گلدان‌های پلاستیکی یک‌بار مصرف، با ارتفاع ۱۵ سانتی متر و قطر دهانه ۱۰ سانتی‌مترحاوی پیت‌ماس و پرلیت (نسبت‌چهار به یک حجمی) منتقل شده و به گلخانه ای با دمای ۲± ۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. آبیاری گلدان‌ها هر دو روز یک‌بار صورت گرفت. در مرحله دو تا سه برگی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های بزرگتر با قطر ۱۵ سانتی‌متر انتقال یافتند. گلدانها حاوی خاک، ماسه و کود دامی به نسبت ۲: ۱: ۱ بودند.

برای جلوگیری از شوک سرمایی، گیاهچه‌ها قبل از اعمال تنش سرما در شرایط دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو روز نگهداری شده و سپس تنش سرما اعمال گردید. به منظور اعمال تنش سرما، گلدان‌ها چهار روز متوالی و هر روز به مدت ۲۷۰ دقیقه در داخل اتاقک رشد با نور کم و دمای ۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. دو ماه بعد از کاشت و پس از اعمال تنش اندازه‌گیری طول ساقه و ریشه انجام شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کارتنوئیدها) بر اساس روش پیشنهادی Arnone (۱۹٤۹) انجام شد. در این روش رنگیزه‌ها با استفاده از استون۸۰ درصد استخراج شدند و

غلظت آنها براساس روابط زیر محاسبه گردید. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه می‌گردد.

$Chla = (۱۲/۲۵)(A٦٦۳/۲) - (۲/۷۹۸)(A٦٤٦/۸)$

$Chb = (۲۱/۲۱)(A٦٤٦/۸) - (۵/۱)(A٦٦۳/۲)$

$ChlT = Chla + Chlb$

$Cartenoide = (۱۰۰۰A٤۷۰ - ۱/۸Chla - ۸۵/۰۲Chlb)\ ۰/۰۰۰۱۹۸$

اندازه‌گیری مقدار پرولین با استفاده از معرف ناین هیدرین بر اساس روش پیشنهادی Bates (۱۹۷۳) انجام گرفت. در این روش از معرف ناین هیدرین و اسیداستیک گلاسیال برای اندازه‌گیری پرولین استفاده شد و نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تازه گزارش گردید.

اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول با استفاده از روش Irigoyen و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. ابتدا از ۰/۵ گرم از بافت برگی عصاره الکلی تهیه شد. سپس میزان قندهای محلول با استفاده از آنترون و اسیدسولفوریک ۷۲ درصد و با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

اندازه‌گیری ثبات غشا (نشت مواد یونی) بر اساس روش پیشنهادی Redmann و همکاران (۱۹۸٦) استفاده شد. ابتدا از برگ کاملاً توسعه یافته دیسک‌هایی تهیه شد. نمونه‌ها در ظرف سربسته حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه قرار گرفت و به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و توسط دستگاه شیکر تکان داده شد. پس از پایان زمان مورد نظر، قرائت در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شود (L_t). نمونه به محلول برگردانیده شد، سپس نمونه و محلول در اتوکلاو قرار داده شد و سپس قرائت در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شود (L_0).

معادله (۵) $(\%) \text{ نشت مواد محلول} = (L_t / L_0) \times ۱۰۰$

جهت اندازه‌گیری کمی پروتئین بر اساس روش پیشنهادی Bradford (۱۹۷٦) انجام شد. که مقدار ۰/۲ گرم از بافت برگ تر در هاون چینی سرد و در ظرف یخ با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ٦/۸ هموژن و سانترفیوژ گردید و جذب نمونه در طول موج ۵۹۵ با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز از روش Kara و Mishra (۱۹۷٦) استفاده شد:

آنزیم کاتالاز: ٦۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی را در ۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ و ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار در حمام یخ اضافه نموده و منحنی تغییرات جذب در طول موج ٢٤۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم به ازای هر میکروگرم بر میلی‌گرم پروتئین بافت تازه گیاهی به‌دست آمد.

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی را در ۱/۵ میلی‌لیتر تریس ۰/۲ مولار و ۰/۳ میلی‌لیتر پیروگالل ۰/۰۲ مولار حل نموده و میزان جذب در طول موج ٤۲۰ نانومتر یادداشت شد.

آنزیم پراکسیداز: ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی را در ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج که شامل بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار و آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار بود، منحنی تغییرات در طول موج ٤۲۵ نانومتر قرائت شد.

داده‌های آزمایش با نرم‌افزار آماری SAS ۹/۱ تجزیه آماری شده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث:

طول اندام هوایی و ریشه: نتایج تجزیه واریانس طول اندام هوایی و ریشه دانهال‌های بامیه رقم بسنطی نشان داد که اثر تیمارها بر طول اندام هوایی در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود، ولی بر طول ریشه معنی‌دار نبود (جدول۱). نتایج مقایسه میانگین طول اندام هوایی (جدول ۲) نشان داد بیشترین طول اندام هوایی در پیش‌تیمار بذور بامیه با اسپرمین در غلظت ۰/۵ میلی مولار وجود داشت (۱۳/۱٦ سانتی متر) که به طور معنی‌داری بیشتر از طول اندام هوایی در تیمار شاهد و یا تیمار ۰/۵ میلی‌مولار اسپرمیدین بود (به ترتیب ۱۰/۹ و ۱۰/۸۳ سانتی متر). به‌طور مشابهی کاهش رشد گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما گزارش گردیده است (Allen and Ort, 2001). هم‌چنین بهبود طول ریشه‌چه و ساقه‌چه برنج پس از پیش‌تیمار بذر با پلی‌آمین‌ها گزارش گردیده است (Farooq *et al*., 2008).

پیشنهاد گردیده است پلی‌آمین‌ها در القا و افزایش تقسیم سلولی نقش کلیدی دارند و نتایج آزمایش حاضر در مورد

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، صفات بیوشیمیایی و ثبات غشا بامیه تحت تنش دمای پایین

		میانگین مربعات											
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه	طول اندام هوایی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	پرولین	کربوهیدرات محلول	نشت مواد یونی	پروتئین کل	فعالیت آنزیم کاتالاز	فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز	فعالیت آنزیم پراکسیداز
تیمار	٤	۲۳/۵۳^{ns}	۳/٦*	۱۷/۲**	۲/٦^{ns}	۲۷/۵*	۳/۲*	۱/۳۵**	۰/۲۰٤**	۱٤۱۸**	۸۷۹٦**	۱۷۷**	۳٦٤*	۳۱۲^{ns}
اشتباه آزمایش	۱۰	۱۰/٤	۱	۲/۸	۱/۰۸	۵/۹	۰/٦۱	۰/۰۱	۰/۰۰٦	۲٤/۸۲	۱۹/۹	۳/۲	۱۰۱	۱۹۱۳
ضریب تغییرات		۲۳/٦	۸/۵	۱۷/۷	۱۹/٦	۱٦/۵	۲۱/٤	٤/۸۹	۱۳/٦	۱٤/۵	۲/٤۸	۱٦/۸	۱۲/٤	۱۷/۲

*، ** و ns به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌داری است.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، صفات بیوشیمیایی و ثبات غشا بامیه تحت تنش دمای پایین

تیمار	طول ریشه	طول اندام هوایی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	کربوهیدرات محلول	پروتئین	پرولین (میکروگرم بر گرم وزن تازه)	نشت مواد یونی (٪)	فعالیت آنزیم کاتالاز	فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز	فعالیت آنزیم پراکسیداز
	(سانتی‌متر)		(میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)								(تغییرات در جذب میلی‌گرم وزن تازه)		
شاهد (بدون اعمال تیمار)	۱۱/۲^{a}	۱۰/۹^{b}	۵/٤۳^{b}	٤/۲۰^{b}	۹/٦٤^{b}	۲/۱^{c}	۰/۳۱^{c}	۸۲^{b}	۱/۲۵^{d}	۵٤/۲^{a}	۱/٤^{c}	٧٦^{ab}	۲٤۳^{a}
پیش‌تیمار با آب (۲٤ ساعت)	۱۲/۳^{a}	۱۲/٦^{ab}	۱۰/۱۷^{a}	٤/٤۳^{ab}	۱٤/٦۱^{a}	۳/۳۱^{bc}	۰/۵۷^{b}	۲۰۳/۷^{a}	۱/٦۷^{c}	۵۵/۷^{a}	۷/۸۹^{b}	٦٤/۹^{b}	۲٤۸^{a}
۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید (۲٤ ساعت)	۱۱/۳^{a}	۱۲/۸^{ab}	۱۱/٦۰^{a}	۵/٦۳^{ab}	۱۷/۲٤^{a}	٤/۸۵^{a}	۱/۰۲^{a}	۲۰٤/۵^{a}	۲/۹^{a}	۳۷^{b}	۲۲/٦^{a}	۹۱^{a}	۲٦۹^{a}
۰/۵ میلی‌مولار اسپرمین (۱۲ ساعت)	۱٦/۲^{a}	۱۳/۱٦^{a}	۹/۳۵^{a}	٦/٤۲^{a}	۱۵/۷۷^{a}	۳/۷۹^{ab}	۰/۵۹^{b}	۲۰٤/۵^{a}	۲/٤۲^{b}	۱۰^{c}	۱۰/۵^{b}	۹۰^{a}	۲۵٦^{a}
۰/۵ میلی‌مولار اسپرمیدین (۱۲ ساعت)	۱۷^{a}	۱۰/۸۳^{b}	۱۰/۷۵^{a}	۵/۸۲^{ab}	۱٦/۵۸^{a}	٤/۱۹^{ab}	۰/۵۱^{b}	۲۰۲^{a}	۲/٤۵^{b}	۱۳^{c}	۱۰/۸٤^{b}	۷۹^{ab}	۲۵۰^{a}

میانگین‌ها با حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری را براساس آزمون دانکن نشان نمی‌دهد.

بهبود رشد گیاهچه احتمالاً به دلیل افزایش تقسیم سلولی ناشی از افزایش مقدار پلی‌آمین‌ها در مریستم انتهایی می‌باشد (Farooq *et al*., 2008).

رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد اثر پیش‌تیمار بذر بر کلروفیل a برگ در سطح ۱درصد و بر کلروفیل کل و کارتنوئیدهای برگ بامیه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود اما بر مقدار کلروفیل b اثر معنی داری نداشت.

نتایج مقایسه میانگین مربوط به رنگدانه‌های فتوسنتزی (جدول ۲) نشان داد بیشترین میزان کلروفیل a برگ بامیه در پیش‌تیمار بذر با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک وجود داشت (۱۱/٦ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) که به‌طور معنی‌داری بیشتر از کلروفیل برگ در تیمار شاهد بود (۵/٤۳) ولی با کلروفیل a برگ در سایر تیمارها تفاوت معنی داری نداشت.

بیشترین میزان کلروفیل کل برگ نیز در تیمار ۰/۱ میلی مولار اسید سالیسیلیک وجود داشت (۱۷/۲٤ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) که به طور معنی‌داری بیشتر از کلروفیل کل برگ در تیمار شاهد یود (۹/٦٤ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) یا کلروفیل کل برگ در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت. کاربرد تیمارهای اسیدسالیسیلیک، اسپرمیدین و اسپرمین باعث افزایش معنی‌دار میزان کارتنوئیدهای کل برگ نسبت به تیمار شاهد (به ترتیب ٤/۸۵، ٤/۱۹ و ۳/۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در مقایسه با ۲/۱) شد (جدول ۲).

دمای پایین می‌تواند موجب تخریب غشای تیلاکوئید کلروپلاست،تورم پلاستید و تیغه تیلاکوئید، تجمع قطرات چربی و سرانجام باعث بهم ریختگی کل پلاستید شود. سیستم نوری دو (PSII) اولین نقاطی در کلروپلاست است که آسیب درجه حرارت پایین به آن وارد می‌شود (Allen and Ort, 2001). علاوه بر این، باتوجه به مطالعه انجام شده توسط Allen و Ort (۲۰۰۱) تنش دمای پایین موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های جذب کربن مانند آنزیم چرخه کالوین، ATPستاز می‌شود، همچنین بازسازی روبیسکو و فسفریلاسیون و انتقال کربن تثبیت شده از برگ را کاهش می‌دهد و در نتیجه تجمع کربوهیدرات‌های محلول کاهش می‌یابد (Hsanuzzaman *et al*., 2013). در تنش دمای پایین، علت اصلی تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن عدم تعادل بین دریافت نور و فتوسنتز می‌باشد. همچنین کاهش دما در حضور نور خطر اکسیداسیون نوری را افزایش می‌دهد. ولی در گیاهان مقاوم به تنش سرما، تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن کنترل شده و تعدیل می‌گردد (Allen and Ort, 2001). نتایج این پژوهش نشان داد اسید سالیسیلیک اثر معنی‌داری بر بهبود رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش سرما داشت و سبب ایجاد اختلاف معنی‌دار در میزان کلروفیل a، کلروفیل کل و کارتنوئید برگ گیاه بامیه شد. نتایج مطالعه‌ای در ذرت نیز نشان داده است کاربرد اسید سالیسیلیک موجب افزایش معنی دار میزان کلروفیل a و b گردید (El-Khallal *et al*., 2009). همچنین گزارش گردیده است اسید سالیسیلیک باعث افزایش مقدارکلروفیل و کارتنوئید و میزان فتوسنتز گیاه ذرت شد، که این افزایش ناشی از اثر اسید سالیسیلیک بر افزایش میزان فتوسنتز به‌دلیل یهبود فعالیت روبیسکو و مقدار کلروفیل می‌باشند (Vazirimehr and Rigi, 2014). گزارش شده است در گیاه کدو، پیش تیمار بذر با اسید سالیسیلیک در غلظت کم باعث بهبود کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید و در نتیجه افزایش فتوسنتز در شرایط تنش شوری گردید (Rafique *et al*., 2011).

تخریب کلروپلاست‌ها و کاهش میزان کلروفیل یکی از مهم‌ترین اثرات تنش‌های محیطی در گیاهان می‌باشد. به‌نظر می‌رسد بخشی از کاهش میزان کلروفیل به‌دلیل عدم تولید کلروفیل و هم‌چنین تخریب کلروفیل‌های موجود بر اثر افزایش اتیلن در شرایط تنش باشد (Misra and Sricastatva, 2000). نتایج آزمایش حاضر در مورد اثر مثبت پلی‌آمین‌ها بر رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاه بامیه در شرایط تنش سرما می‌تواند با اثر پلی‌آمین‌ها بر تولید اتیلن در اراتباط باشد. یرای سنتز پلی‌آمین‌ها پیش‌ماده S-آدنوزیل متیونین نیاز می‌باشد که برای سنتز اتیلن نیز همین پیش‌ماده لازم است، بنابراین با افزایش سنتز پلی‌آمین‌ها و یا افزایش غلظت آنها در گیاه، سنتز اتیلن کاهش می‌یابد (Alcazar *et al*., 2006).

صفات بیوشیمیایی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر

پیش‌تیمار بذر بر میزان پرولین، کربوهیدرات‌های حلول، ثبات غشا، پروتئین کل و فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح احتمال ۱ درصد و بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد ولی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار نشد (جدول ۱).

پرولین: نتایج مقایسه میانگین نشان داد در شرایط تنش سرما، بیشترین میزان پرولین آزاد برگ (۲/۹ میکروگرم بر گرم وزن تازه) در پیش‌تیمار بذر با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک وجود داشت که به‌طور معنی‌داری بیشتر از پرولین برگ در تیمار شاهد و سایر تیمارها بود (جدول۲). کمترین میزان پرولین (۱/۲۵ میکروگرم بر گرم وزن تازه) در تیمار شاهد وجود داشت که به‌طور معنی‌داری کمتر از میزان پرولین در سایر تیمارها بود (جدول۲). گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی مکانسیم‌های دفاعی مختلفی ازجمله تولید ترکیبات تنظیم‌کننده اسمزی دارند. در شرایط تنش سرما، افزایش تجمع ترکیبات تنظیم کننده اسمزی در گیاهان انجام می‌شود. این ترکیبات در غلظت‌های بالا غیر سمی بوده و بدون تغییر در pH فیزیولوژیک باعث حفظ فشار اسمزی و همچنین تثبیت ساختار پروتئین و غشا تحت تنش می‌شوند و در نتیجه نقش مهمی در سازگاری سلول‌ها به تنش‌های محیطی دارند (Allen and Ort, 2001). نتایج آزمایش در مورد افزایش پرولین برگ پس از کاربرد پلی‌آمین‌ها در شرایط تنش سرما، با این نتایج مشابهت دارد که کاربرد اسپرمین و اسپرمیدین باعث افزایش مقدار پرولین گیاه بادمجان تحت تنش سرما گردید (Yan-ping *et al*., 2010). هم‌چنین گزارش گردیده است استفاده از اسید سالیسیلیک باعث افزایش پرولین تحت شرایط دمای پایین در هندوانه گردید (Sayyari *et al*., 2013). پیشنهاد گردیده است اسید سالیسیلیک با دخالت اسیدآبسیزیک می تواند باعث القا تجمع پرولین شود (Sakhabutdinova *et al*., 2003). در شرایط تنش کمبود آب، در اثر تجزیه پروتئین، سنتز پرولین افزایش می‌یابد (Johari Pireivatlou, 2010).

کربوهیدرات‌های محلول: بیشترین مقدار کربوهیدرات‌های محلول برگ در پیش‌تیمار بذر غلظت۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک وجود داشت (۱/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) وجود داشت که به طور معنی‌داری بیشتر از میزان کربوهیدرات‌های محلول برگ در تیمار شاهد (۰/۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و سایر تیمارها بود. گیاهان در مرحله سازگاری به تنش دمای پایین با تجمع آبسیزیک‌اسید در برگ-های خود موجب فعالیت برخی از ژن‌ها و بروز تغییرات در میزان کربوهیدرات درون سلول می‌شوند که در نتیجه تنظیم فشار اسمزی، تحمل‌پذیری گیاهان نسبت به تنش دمای پایین را افزایش می‌دهد (Gusta *et al*., 2005). گزارش شده است که نقش ترکیبات کربوهیدراتی در ایجاد تحمل نسبت به دماهای پایین می‌تواند بیشتر از سایر محافظت‌کننده‌های سرمایی باشد. ساکارز یک ترکیب ضروری است که می‌تواند باعث افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی مانند تنش دمای پایین شود. گلوکز دارای کنترل مستقیم و گسترده بر بیوسنتز هورمون اسیدآبسیزیک می‌باشد به‌طوری‌که غلظت بالای گلوکز در سلول منجر به سطوح بالای اسیدآبسیزیک درون سلولی می‌گردد، زیرا نسخه برداری ژن‌های بیوسنتز کننده اسیدآبسیزیک را افزایش می‌دهد. ساکارز نیز همانند گلوکز یکی از ترکیبات اساسی درخالت کننده در بیوسنتز اسیدآبسیزیک می‌باشد (Yadeghari *et al*., 2008).

نتایج این آزمایش نشان داد میزان کربوهیدرات‌های محلول برگ بامیه در شرایط تنش سرما تحت تاثیر پلی‌آمین‌ها قرار گرفت و پیش‌تیمار بذرها با غلظت ۰/۵ میلی مولار اسپرمین یا اسپرمیدین به‌طور قابل توجهی میزان کربوهیدرات‌های محلول برگ را افزایش داد (جدول ۲). در گیاه گندم نیز پیش‌تیمار بذر پلی‌آمین‌ها موجب میزان قندهای محلول نسبت به تیمار شاهد شد (Farooq *et al*., 2011).

ثبات غشا (نشت مواد محلول): نتایج مقایسه میانگین داده-ها (جدول ۲) نشان داد بیشترین نشت مواد محلول (۵۵/۷ و ٥٤/٢ درصد) به‌ترتیب مربوط به پیش‌تیمار بذر با آب مقطر به مدت ٢٤ ساعت و شاهد بود که به‌طور معنی‌داری بیشتر از نشت مواد محلول در سایر تیمارها بود. کمترین نشت مواد محلول از سلول (بیشترین ثبات غشا) در تیمارهای ۰/۵

میلی‌مولار اسپرمیدین و اسپرمین وجود داشت (۱۳ و۱۰ درصد) که به‌طور معنی‌داری کمتر از نشت مواد محلول در تیمار شاهد و سایر تیمارها بود. یکی از خسارت‌های تنش دمای پایین، وارد آمدن آسیب به ساختار غشا سلول است. این خسارت ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد در درون سلول و آسیب این رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب غشا شده و در نتیجه پراکسیداسیون چربی‌ها، رادیکال‌های پراکسی و هیدروپراکسی تولید می‌شود. رادیکال‌های جدید تولید شده می‌توانند واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها را افزایش داده و منجر به افزایش تولید مالوندی‌آلدئید (شاخص پراکسیداسیون چربی) شود. تداوم این امر موجب تخریب بیشتر غشا سلول و خروج آب و مواد محلول از درون سلول به فضای بین سلولی شده که نتیجه این وضعیت، بروز پدیده آب گزشدن (Water core) و افزایش نشت یونی است و در نهایت منجر به کاهش توانایی سلول‌ها برای حفظ آب و کاهش محتوای آب برگ خواهد شد (Erslues *et al*., 2006). نتایج آزمایش حاضر نشان داد از بین تیمارهای بکار رفته، پلی‌آمین‌های اسپرمین و اسپرمیدین بیشترین اثر را در کاهش نشت مواد محلول و افزایش ثبات غشا داشت. نتایج مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داد کاربرد پلی‌آمین‌های اسپرمین و اسپرمیدین موجب ایجاد مقاومت گیاه بادمجان به دمای پایین از طریق کاهش نفوذپذیری غشا شد (Yan-ping *et al*., 2010). پلی‌آمین‌ها با ایجاد ثبات در ساختار دو لایه چربی (Lipid bilayer) در غشا سلول از طریق ایجاد پیوند با ترکیبات آنیونی غشاء از تخریب غشا ناشی از تنش سرما ممانعت می کنند (جلیلی مرندی، ۱۳۸۹). هم‌چنین پلی‌آمین‌ها به دلیل دارا بودن توانایی آنتی‌اکسیدانی، در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد نقش داشته و موجب پایداری دیواره‌ی سلولی و غشا می‌شود (Hussein *et al*., 2006). مکانسیم دیگر اثر پلی‌آمین‌ها بر ثبات غشا ناشی از اثر پلی‌آمین‌ها بر فعالیت آنزیم‌های حذف کننده رادیکال‌های آزاد و در نتیجه موجب کاهش در محتوای رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن گردیده و هم‌چنین از فعالیت آنزیم لیپوکسی‌ژناز و تجزیه اسیدهای چرب غشاء جلوگیری می‌کند (نوح پیشه و منوچهری کلانتری، ۱۳۹۰). نتایج آزمایش حاضر در مورد اثر مثبت اسید سالیسیلیک بر کاهش نشت مواد محلول با نتایج گزارش شده در مورد کاهش نشت‌الکتریکی برگ هندوانه پس از کاربرد اسید سالیسیلیک در شرایط تنش سرما مشابهت دارد (Sayyari *et al*., 2013). پیشنهاد گردیده است کاربرد اسید سالیسیلیک در شرایط تنش شوری، میزان پلی‌آمین‌های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین را در گیاه افزایش می‌دهد که می‌تواند به یکپارچگی و حفظ غشا کمک کند (Nemeth *et al*., 2002). مکانیسم دیگر اسید سالیسیلیک با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن ارتباط دارد زیرا گزارش گردیده است کاربرد اسید سالیسیلیک با القای پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و جذب کلسیم، گیاه خیار را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت نموده و با افزایش تجمع کلسیم ب ثبات غشا را افزایش داد (Vazirimehr and Rigi, 2014).

پروتئین کل: نتایج این پژوهش نشان داد در شرایط تنش سرما، کمترین مقدار پروتئین کل در تیمار شاهد بود (۸۲ میلی-گرم بر گرم وزن تازه) و میزان پروتئین کل در تمامی تیمارها نسبت به شاهد به‌طور معنی‌دار افزایش یافت (جدول ۲). تغییر در بیان، تجمع و سنتز پروتئین در پاسخ به تنش‌های محیطی از مکانسیم‌های مهم گیاهان در جهت حفاظت از متابولیسم سلولی و ایجاد سازگاری محسوب می‌شود. پروتئین‌ها جز متابولیت‌هایی هستند که به طور متفاوت در پاسخ به تنش سرما بیان می‌شوند. پروتئین‌ها در فرآیندهایی هم‌چون ترارسانی علامتی، فرآیندهای مربوط به RNA، ترجمه، فتوسنتز، تنفس نوری، متابولیسم کربن، نیتروژن، سولفور و انرژی نقش دارند (Heidarvand *et al*., 2010). تنش سرما، مواد پروتئینی غشا را پس از تغییر ماهیت، رسوب می‌دهد و باعث از بین بردن لایه محافظ آب و بار الکتریکی غشاء می‌شود و این امر باعث انعقاد پروتئین می‌شود. انعقاد پروتئین باعث تغییر ماهیت غشاء می‌شود. در اثر تنش سرما، کاهش اتصال پیوندی پروتئین‌ها، سبب تجزیه آنزیم کلیدی فسفوانول پیروات کربوکسیلاز در گیاهان می‌شود و با افزایش دوباره نیز به حالت اولیه خود برنمی‌گردد (جلیلی مرندی، ۱۳۸۹). نتایج آزمایش حاضر در

مورد اثر مثبت پلیآمین‌ها بر افزایش پروتئین برگ در شرایط تنش سرما، با نتایج بررسی اثر اسپرمین و اسپرمیدین بر افزایش مقدار پروتئین گیاه بادمجان تحت تنش سرما نسبت به شاهد مشابهت دارد (Yan-ping *et al*., 2010). اسپرمیدین در تجزیه رادیکال‌های فعال اکسیژن نقش داشته و ماکرومولکول‌هایی مانند DNA و پروتئین را از این رادیکال‌های واکنش‌پذیر اکسیژن حفظ می‌کند (Kasukabe *et al*., 2004). پیشنهاد گردیده اسپرمیدین احتمالاً با از بین بردن رادیکال‌های فعال اکسیژن در کاهش تجزیه و افزایش بیوسنتز پروتئین در برگ‌های گیاه فلفل نقش دارد (نوح پیشه و منوچهری کلانتری، ۱۳۹۰). هم‌چنین گزارش گردیده است در گیاهان گوجه‌فرنگی و فلفل پس از تیمار با متیل جاسمونات و متیل‌سالیسیلات، مقاومت بافت‌ها به سرما را از طریق تحریک بیان ژن پروتئین-های شوک گرمایی افزایش یافت (جلیلی مرندی، ۱۳۸۹؛ Horvath *et al*., 2004).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: نتایج نشان داد در تمام تیمارها فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاه بامیه تحت تنش سرما نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار داشت (جدول ۱)، درحالی‌که فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تیمارهای اسپرمین و اسپرمیدین تنها نسبت به پیش‌تیمار بذر با آب مقطر به‌مدت ۲٤ ساعت افزایش معنی‌دار داشت. اثر تنش سرما بر افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در سایر گیاهان نیز گزارش گردیده است (Tasgin *et al*., 2006). در شرایط تنش دمای پایین به-علت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در محیط سلول، احتمال وقوع تنش اکسیداتیو (به‌عنوان تنش ثانویه) وجود دارد که باعث اختلال در اعمال فیزیولوژیک سلول می‌شود. گیاهان برای خنثی کردن اثر سمی رادیکال‌های فعال اکسیژن، از ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی و یا افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی استفاده می‌کنند (Chen *et al*., 2006). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ارقام مقاوم به سرما ذرت، برنج، یونجه، گوجه‌فرنگی و نخود بیشتر از ارقام حساس به سرما می‌باشد (Hsanuzzaman *et al*., 2013). پیش‌تیمار بذر بادمجان با اسپرمین و اسپرمیدین از طریق افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز، موجب مقاومت به تش دمای پایین گردیدند (Yan-ping *et al*., 2010). تنش سرما فعالیت آنزیم کاتالاز در زعفران را کاهش داد. با این حال، این تغییرات به‌طور قابل توجهی با کاربرد اسپرمیدین و پوترسین باعث افزایش تحمل گیاه به سرما گردید (Hsanuzzaman *et al*., 2013).

نتیجه‌گیری کلی:

باتوجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، می‌توان چنین اظهار داشت که تنش سرما پایداری غشاء سلولی را کاهش می‌دهد، اما پیش‌تیمار بذر بامیه با اسپرمین، اسپرمیدین و اسید سالیسیلیک تفاوت آشکاری با شاهد از لحاظ تاثیر بر پایداری غشاء نشان دادند. درحقیقت پیش‌تیمار با تنظیم کننده‌های رشد میزان خسارت غشا را کاهش می‌دهد. طی تنش دمایی مورد بررسی در پیش‌تیمار بذور با اسید سالیسیلیک و اسپرمین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز افزایش یافت و در کل فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز بیشتر از کاتالاز بود که نقش اصلی این آنزیم را در کاهش خسارت در بامیه نشان می‌دهد. بیشترین میزان کلروفیل کل، پرولین، کربوهیدرات محلول و پروتئین کل در پیش‌تیمار با اسید سالیسیلیک حاصل شد. بنابراین، پیش‌تیمار با اسید سالیسیلیک در افزایش توانایی گیاه در مقابله با تنش دمای پایین پیش‌تیمار با موثر است.همچنین از آنجا که اسید سالیسیلیک قادر به تاثیرگذاری بر بسیاری از فرآیندهای متابولیک و بیوشیمیایی است، پیشنهاد می‌شود که پیش‌تیمار بذر با سایر غلظت‌های اسید سالیسیلیک و پلی‌آمین‌ها به منظور بهبود مقاومت نسبت به تنش دماهای پایین در گیاه بامیه مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع:

جعفری، ر.، منوچهری کلانتری، خ. و ترک‌زاده، م. (۱۳۸۵) بررسی اثرات پاکلوبوترازول بر افزایش مقاومت به سرما در نهال‌های

گوجه‌فرنگی، مجله زیست شناسی ایران ۱۹: ۲۹۸-۲۹۰.

جعفری، ر.، منوچهری کلانتری، خ. و احمدی موسوی، ع. (۱۳۸٦) اثر پاکلوبوترازول بر تجمع آنتی‌اکسیدان‌ها در نهال‌های گوجه-فرنگی تحت تنش سرما، مجله زیست شناسی ایران ۲۰: ۲۱٦-۲۰٦.

جلیلی مرندی، ر. (۱۳۸۹) فیزیولوژی تنش در گیاهان باغبانی. انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه. ۱۱۰۰ صفحه.

دانشور، م . ح. (۱۳۸۷) پرورش سبزی، اهواز، انتشارات دانشگاه شهید چمران. ٤٦۱ صفحه.

قربانلی، خ.، ساطعی، م. و مقیسه، ا. (۱۳۸۲) اثر مقادیر متفاوت شوری بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و نیترات ردوکتاز در ریشه و برگهای ارقام کلزا، مجله پژوهش و سازندگی ٤۳: ۱٦۰-۱۵۳.

نوح پیشه، ز. و منوچهری کلانتری، خ. (۱۳۹۰) اثرات کاربرد متقابل اسپرمیدین و تنش شوری در گیاه فلفل، مجله زیست شناسی ایران ۲٤: ۸۵۷-۸٤۸

Alcazar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F. and Altabella, T. (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. Biotechnology Letters 28: 1867–1876.

Allen, D. J. and Ort, D. R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends In Plant Science 6:36-41.

Aminigo, E. R. and Akingbala, J. O. (2004) Nutritive composition and sensory properties of ogi fortified with okra seed meal. Journal of Applied Science and Environment 8: 23-28.

Arfan, M., Athar, H. R. and Ashraf, M. (2007) Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress. Journal of Plant Physiology 164: 685-694.

Arnone, D. T. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in beta vulgaris. Plant Physiology 24: 1-15.

Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving\plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.

Bakalova, S., Nikolova, A. and Nedeva, D. (2004) Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. Journal of Plant Physiology 30: 64-77.

Bates, L. S. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205-207.

Bhattacharjee, S. (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: Role in stress, senescence and signal transduction in plants. Journal of Current Science 89: 1113-1121.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Annual Biochemistry 72: 248-254.

Chen, Y., Zhang, M., Chen, T., Zhang, Y. and An, L. (2006) The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of *Sabina*. South Afrcan Journal of Botany 72: 272-279.

El-Khallal, S. M., Hathout, T. A., Ashour, A. A. and Kerrit, A. A. (2009) Brassinolide and salicylic acid induced growth, biocheimical activities and productivity of maize plants grown under salt stress. Journal of Agriculture and Biological Science 5: 380- 390.

erslues, P.E., Agrawal, M., Katiyar-Agrwal, S., Zhu, J., and Zhu, J. K. (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. The Plant of Journal 45:523-539.

Esfandiari, E., Shekari, F. and Esfandiari, M. (2007) The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. Journal of Notulae Botanicae Horti Agribotanici Cluj-Napoca 35: 48-56.

Farooq, M., Aziz, T., Rehman, H., Rehman, A., Alam, S. and Aziz, C.T. (2011) Evaluating surface drying and re - drying for wheat seed priming with polyamines: effects on emergence, early seedling growth and starch metabolism. Acta Physiolca Plantarum 33: 1707–1713.

Farooq, M., Shahzad, M. A., Basra, H. and Rehman, M. (2008) Seed priming with olyamines improves the germination and early seedling growth in fine rice. Journal of New Seed 9: 145-155.

Groppa, M. D. and Benavides, M. P. (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances.

Gusta, L.V., Trischuk, R. and Weiser, C. J. (2005) Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. Journal of Plant Growth Regulation 24: 308 - 318.

Hayata, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment. Environmental and Experimental Botany 68: 14–25.

Heidarvand, L. and Maali Amiri, R. (2010) What happens in plant molecular responses to cold stress. Acta Physioogiael Plantarum 32: 419–431.

Horvath, E., Szalai, G. and Janda, T. (2007) Induction of abiotic stresses tolerance by salicylic acid signaling. Journal of Plant Growth Regulation 26: 290 – 300.

Hsanuzzaman, M., Nahar, K. and Fujita, M. (2013) Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture 169 - 204.

Hussein, M. M., EL-Gereadly, H. M. and EL-Desuki, M. (2006) Role of putrescine in resistance to salinity of pea plants (*Pisum sativum* L.). Applied Science Research 2: 598- 604.

Irigoyen, J.J., Emerich, D. W. and sanchez-Diaz, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. Plant Physiology 84: 55-60.

Janda, T., Kosa, E. L., Szalai, G. and Paldi, E. (2005) Investigatin of antioxidant activity of maize during low temperature stress. Journal of Plant Physiology 49: 53-54.

Janda, T., Szalai, G., Tari, I. and Paldi, E. (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. Planta 208: 175 - 180.

Johari Pireivatlou, M. (2010) Effect of soil water stress on yield and proline content of four wheat lines. African Journal of Biotechnology 9: 036 – 040.

Kara, M. and Mishra. (1976) Catalse, peroxidase and polyphenol oxidase activities rice leaf senescence. Plant Physiology 57:315.

Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I. and Tachibana, S. (2004) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulated genes in transgenic Arabidopsis Thaliana. Plant Cell Physiology 45: 712–7.

Misra, A. and Sricastatva, N. K. (2000) Influence of water stress on Japanese mint. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 7: 51-58.

Nemeth, M., Janda, T., Hovarth, E., Paldi, E. and Szali, G. (2002) Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. Plant Science 162: 569-574.

Pennycooke, J. C., Cox, S. and Stushnoff, C. (2004) Relatioship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerace in petunia (*Petinia hybrida*). Journal of Environmental and Experimental Botany 53: 225-232.

Rafique, N., Raza, S.H., Qasim, M. and Iqbal, N. (2011) Pre-sowing application of ascorbic acid and salicylic acid to seed of pumpkin and seedling and seedling response to salt. Pakistan Journal of Botany 43: 2677-2682.

Rahimizadeh, M., Habibi, D., Madani, H., Mohammadi, H., Mehraban, A. and Sabet, A. M. (2007) The effect of micronutrients on antioxidant enzymes metabolism in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. Journal of Helia 47: 167-174.

Redmann, R. E., Haraldson, J. and Gusta, L. V. (1986) Leakage of UV-absorbing substances as a measure of salt injury in leaf tissue of woody species. Physiologia Plantarum 67: 87-91.

Sakhabutdinova, A. R., Fatkhutdinova, D. R., Bezrukova, M. V. and Shakirova, F. M. (2003) Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on whea plants. Bulgarian Journal of Plant Physioogy (Special Issue): 314-319.

Sayyari, M., Ghanbari, F., Fatahi, S. and Bavandpour, F. (2013) Chilling tolerance improving of watermelon seedling by salicylic acid seed and foliar application. Notulae Scientia Biologicae 5: 67-73.

Seppanen, M. M. (2000) Characterize of freezing tolerance in Solanum (*Commersonii dun*.) with special reference of the relationship between and oxidative stress. University of Helsinki Department of Production Section of Crop Husbandry 56:4-44.

Szalai, G., Tari, I., Janda, T., Pestenácz, A. and Páldi, E. (2000) Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in ACC and MACC contents in maize during chilling. Biology Plant 43: 637-640.

Tasgin, E., Atici, O., Nalbantoglu, B. and Petrova, L. (2006) Effects of salicylic acid and cold treatment on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. Journal of Phytochemistry 67: 710-715.

Vazirimehr, M.R. and Rigi, K. 2014. International Journal of Plant, Animal and Environmental sciences 4: 291-296.

Waseem, M., Ur-Rehman Athar, H. and Ashraf, M. 2006. Effect of salicylic acid appled through rooting medium on drought tolerance of wheat. Pakistan Journal of Botany 38(4): 1127-1136.

Yadeghari, L. Z., Heidari, R. and Carapetian J. (2008) The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyd (MDA), Total protein and pigments contents in soybean (*Glycine max*) seedlings. Research Journal of Biological Sciences 3(1): 74-79.

Yan-ping, Z., Hai-he, L., Shu-xing, S., Cheng-he, Z. and Xin-e, H. (2010) Effect of polyamine priming on seed vigor and seedling chilling tolerance in eggplant. Acta Horticulturae Sinica 37: 1783–1788.

Yong, Z., Hao-Ru, T. and Ya, L. (2008) Variation in antioxidant enzyme activities of two strawbreey cultivars with short-term low temperature stress. Journal of Agricultural Sciences 4: 456-462.

Yuan, S. and Lin, H.H. (2008) Role of salicylic acid in plant abiotic stress. Z. Naturforsch 63: 313-320.

Effects of seed priming with Salicylic acid and polyamines on physiological and biochemical characteristics of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) under low temperature stress

Somayeh bahadoori[1], Behrooz esmaielpour[1*], Mokhtar heidari[2], Surur khorramdel[3], Parisa shiekhzadeh mosadegh[4], Nasibeh tavakoli-hassankeloo[4] and Alireza Ghanbari[1]

[1]Horticultural Science, Faculty of Agricultural Science, Mohaghegh Ardabili University, [2]Horticultural Science, Faculty of Agricultural Science, Ramin University, [3]Agronomy, Faculty of Agricultural Science, Ferdoosi Mashhad University, [4]Agronomy, Faculty of Agricultural Science, Mohaghegh Ardabili University

(Received: 16 March 2015, Accepted: 11 November 2015)

Abstract:

Low temperature stress is one of the limiting environmental factors for development of okra cultivation and production. In order to investigate the effects of seed priming by plant growth regulators (such as salicylic acid, spermine and spermidine) on some physiological and biochemical characteristics of okra (*Abelmoschus esculentus cv*. Basenti) under low temperature stress, a completely randomized design was conducted with three replications during 2014. Experimental treatments included priming of okra seeds with distillated water, 0.1 mM concentration of Salicylic Acid, 0.5 mM of Spermine and Spermidine and control (non-primed seeds). Seedlings with primed and none-primed seeds were kept in greenhouse untill six-leaf growth stage then seedlings subjected were to low temperature stress (8ºC temperature for 270 minutes on four consecutive days). After exposing the seedling to low temperature stress photosynthetic pigments, total carbohydrates, protein, proline, antioxidant enzyme activity, membrane integrity and chlorophyll contents of leaves of okra were measured. Results indicated that the lowest forionic leakage (10 percent) was achieved by seed priming with Spermin. The highest value for total chlorophyll (17.24 mg/g leaf fresh weight), proline (2.9 µg/g leaf fresh weight), total carbohydrate (1.02 mg/g leaf fresh weight) and catalase enzyme activity (22.6 variation in absorbance mg leaf fresh weight) was obtained by seed priming with salicylic acid. Also, the highest amount of protein (204.5 mg/g leaf fresh weight), and poly phenol oxidase enzyme activity contents (91 variation in absorbance mg leaf fresh weight) were observed in seed priming by Salicylic Acid and Spermine. Seed priming by salicylic acid and polyamines increased soluble carbohydrates, proline, antioxidant enzymes activity contents, which enhanced memberane integrity and decreased membrane damages. With considering the improved seedlings treated by Salicylic Acid at low tempertature, it suggested that priming with different Salicylic Acid concentrations and Plyamyns to be studied for plant resistance improvement at low temperatures in Okra.

Keywords: Antioxidant enzyme, Ionic leakage, Low temperature stress, Proline, Salicylic Acid, Spermine.

*corresponding author, Email: bsmaielpoor2008@gmail.com