

اثر پیش تیمار بذر با اسید سالیسیلیک و پلی آمین ها 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^۴، نصیبه توکلی حور^۵ و علیرضا قنبری^۱
^۱گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ^۲گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه
کشاورزی رامین، اهواز، ^۳گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ^۴گروه زراعت و اصلاح نباتات،
دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۸/۲۰)

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 گیاهچه های بامیه به تنش دمای پایین بررسی گردید. تیمارهای آزمایش شامل پیش تیمار بذور با آب مقطر، سالیسیلیک اسید (۰/۱ میلی مولار)، اسپرمین (۰/۵ میلی مولار) و اسپرمیدین (۰/۵ میلی مولار) و شاهد (بدون اعمال پیش تیمار) بود. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۳ اجرا شد. گیاهچه های شاهد و پیش تیمار شده با آب و تنظیم کننده های رشد در مرحله شش برگی در شرایط تنش دمای پایین (دمای ۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۷۰ دقیقه در چهار روز متوالی) قرار گرفتند. پس از اعمال تنش سرما رنگیزه های فتوسنتزی، کربوهیدرات کل، پرولین، ثبات غشا، مقدار پروتئین کل، فعالیت آنزیم های کاتالاز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز اندازه گیری شد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که کمترین مقدار نشت مواد یونی (۱۰ درصد) مربوط به اسپرمین بود. بیشترین مقدار کلروفیل کل (۱۷/۲۴) میلی گرم بر گرم وزن تازه برگ، حداکثر پرولین (۲/۹ میکروگرم بر گرم وزن تازه برگ)، کربوهیدرات کل (۱/۰۲ میلی گرم بر گرم وزن تازه برگ) و حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز (۲۲/۶) تغییرات در جذب میلی گرم وزن تازه برگ) در اسید سالیسیلیک به دست آمد. همچنین، بیشترین مقدار پروتئین (۲۰۴/۵) میلی گرم بر گرم وزن تازه برگ) و فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (۹۱) تغییرات در جذب میلی گرم وزن تازه برگ) از اسپرمین و اسید سالیسیلیک حاصل شد. پیش تیمار بذر با اسید سالیسیلیک و پلی آمین ها به طور معنی داری موجب افزایش میزان کربوهیدرات های محلول، پرولین و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی به ویژه کاتالاز شد که باعث حفظ ساختار و یکپارچگی غشا و کاهش خسارت به غشا شد. نتایج حاصل بهبود علائم ناشی از تنش و آسیب ها در گیاهچه های تیمار شده توسط اسید سالیسیلیک را نشان می دهد، بنابراین پیشنهاد می شود که پیش تیمار بذر با سایر غلظت های اسید سالیسیلیک و پلی آمین ها به منظور بهبود مقاومت نسبت به تنش دماهای پایین در گیاه بامیه مورد مطالعه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اسپرمین، آنزیم های آنتی اکسیدان، پرولین، نشت مواد یونی

مقدمه:

کاهش می دهد. بامیه یک گیاه یک ساله، گرمسیری با نام علمی

(*Abelmoschus esculentus* L.) یا (*Hibiscus esculentus* L.)

متعلق به تیره گیاه شناسی ختمی سانان یا پنیرک سانان

توسعه غذاهایی با پروتئین بالا با منشأ گیاهی در کشورهای در

حال توسعه ضروری است، زیرا قیمت بالای پروتئین حیوانی را

(Malvaceae) است (دانشور، ۱۳۸۷). مصرف محصولاتی مانند بامیه نقش مهمی را در مبارزه با سوءتغذیه، که یک مشکل جدی در این کشورها می باشد، ایفا می کند (Aminigo and Akingbala, 2004). بامیه منبع مهمی از ویتامین های A، B و C و عناصر معدنی مانند کلسیم، پتاسیم بوده و همچنین غنی از پروتئین می باشد (دانشور، ۱۳۸۷). گیاهان برای رشد بهینه به محدوده دمایی خاصی احتیاج دارند و خارج شدن از این محدوده به عنوان یک تنش محسوب می شود. در بیشتر گیاهان پس از قرارگیری در دماهای بین صفر تا ۱۵ درجه سانتی گراد قرار گیرد، تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مختلفی به وجود می آید (Seppanen, 2000). در گیاهان حساس به دمای پایین مانند گیاهان گرمسیری، نتیجه این تغییرات فیزیولوژیک ممکن است به صورت آسیب های قابل برگشت و غیرقابل بروز نماید. آسیب های اولیه اختلالاتی هستند که در واکنش های متابولسمی به صورت موقتی ایجاد می شوند و معمولاً در صورت رفع عامل تنش از قابل برگشت می باشند، ولی آسیب های ثانویه اختلالات متابولسمی هستند که معمولاً پس از رفع تنش به حالت اولیه بر نمی گردند (Allen and Ort, 2001).

پژوهش ها نشان داده است که با تغییر خصوصیات غشاء در حین تنش سرما، تعادل متابولسمی مختل شده و با افزایش متابولیت های سمی، آسیب های ثانوی در گیاه ایجاد می شود (Seppanen, 2000). یکی از مهم ترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان که تحت تنش های سرما و یخبندان ایجاد می شود، تولید رادیکال های فعال اکسیژن در کلروپلاست و میتوکندری ها است (Bakalova et al., 2004; Rahimizadeh et al., 2007). رادیکال های فعال اکسیژن، در فرآیندهای فیزیولوژیک مهم مانند تنفس نوری، فتوسنتز و تنفس تولید می شوند. 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). گونه های فعال اکسیژن شدیداً با بیومولکول های زیستی مانند پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش داده و پراکسیداسیون لیپید، تغییر ساختار پروتئین و

جهش در مواد ژنتیکی مانند DNA را سبب می شوند که این امر به مختل شدن متابولسم طبیعی گیاه و در نهایت مرگ سلول ها منجر می شود (Esfandiari et al., 2007; Pennycooke et al., 2004). گیاهان مکانیزم های حفاظتی مختلفی را برای تجزیه یا کاهش رادیکال های فعال اکسیژن دارند که در کاهش خسارت تنش های محیطی مؤثر است. سیستم های آنزیمی آنتی اکسیدان یکی از این مکانیزم های حفاظتی می باشد. گیاهانی که از سطوح بالاتری از آنتی اکسیدان ها برخوردار هستند، مقاومت بیشتری به آسیب های اکسیداتیو نشان می دهند. دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز از مهمترین آنتی اکسیدان ها می باشند که باعث شکسته شدن پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می گردند (قربانی و همکاران، ۱۳۸۲; Yong et al., 2008; Janda et al., 2005).

گیاهان در مقابل تنش های محیطی، مانند سرما و یخبندان در مرحله سازگاری، با افزایش تولید مواد تنظیم کننده اسمزی، مقاومت به دمای پایین را افزایش می دهند. مواد تنظیم کننده فشار اسمزی بیشتر شامل اسیدهای آمینه (مانند پرولین)، کربوهیدرات، و پروتئین ها و برخی یون های معدنی هستند (جعفری و همکاران، ۱۳۸۵). پرولین یکی از مهم ترین ترکیبات تنظیم کننده اسمزی می باشد که از دو مسیر گلوتامات و اورنیتین سنتز می شود و در شرایط تنش سرما ستر آن به مقدار زیادی افزایش می یابد (Allen and Ort, 2001). از روش هایی که در سال های اخیر برای کاهش اثرات تنش های محیطی روی گیاهان مختلف استفاده شده است کاربرد مواد شیمیایی خارجی به منظور کاهش خسارت های تنش است (Yuan and Lin, 2008). از جمله این مواد می توان به اسیدسالیسیلیک اشاره کرد، که یک ترکیب فنلی شبه هورمون می باشد که به عنوان یک تنظیم کننده داخلی نقش مهمی را در مکانسیم های دفاع در برابر تنش های زنده و غیرزنده دارد (Szalai et al., 2000). اسید سالیسیلیک به طور مستقیم و غیرمستقیم آنزیم های آنتی اکسیدان را فعال می کند. یکی از مولکول های پیام رسان مهم است و باعث تحریک بروز عکس العمل گیاه در برابر تنش های محیطی می شود و همانند یک آنتی اکسیدان

غیرآنزیمی نقش مهمی را در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک در گیاهان در شرایط تنش ایفا می کند (Arfan et al., 2007). باتوجه به مطالعات انجام شده توسط Hayata و همکاران (۲۰۱۰) اسید سالیسیلیک باعث کاهش آثار سرما در هویج، گوجه فرنگی و همچنین باعث کاهش اثرات تنش اکسیداتیو در گیاهچه آراییدوپسیس گردید (Waseem et al., 2006). پیش تیمار بذور در محلول نیترا ت پتاسیم سه درصد حاوی ۰/۱ میلی مول اسید سالیسیلیک می تواند در جوانه زنی بذر و رشد گیاهچه بادمجان تحت درجه حرارت پایین موثر باشد (Zhang et al., 2011).

پلی آمین ها پلی کاتیون های مهمی هستند که در مراحل مختلف فیزیولوژیک و نمو گیاهان نقش دارند (Kasukabe et al., 2004). اخیراً نقش پلی آمین ها در افزایش تحمل گیاهان به تنش های غیرزیستی، از جمله شوری و خشکی مورد توجه قرار گرفته است (Groppa and Benavides, 2008). در بسیاری از موارد، تنش های محیطی منجر به تجمع پلی آمین های آزاد منجر می گردد، که نشان دهنده اهمیت بیوسنتز پلی آمین ها به عنوان پاسخ های مهم بیوشیمیایی گیاهان در شرایط تنش می باشد (Kasukabe et al., 2004). پلی آمین ها با جلوگیری از پراکسیده شدن چربی های 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 می افتد و از توسعه کشت آن در این مناطق جلوگیری می شود این آزمایش به منظور بررسی اثر پیش تیمار بذر با آب مقطر، اسپرمین، اسپرمیدین و اسید سالیسیلیک بر برخی فعالیت های آنزیمی و شاخص های بیوشیمیایی گیاه بامیه به منظور کاهش تنش دمای پایین بررسی گردید.

مواد و روش ها:

این آزمایش در سال ۱۳۹۳ در گروه باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی (شهر اردبیل) انجام شد. بذره های بامیه رقم بسطی که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت، از شرکت سپاهان

رویش اصفهان تهیه گردید. ابتدا در مرحله جوانه زنی، به منظور تعیین مدت زمان و غلظت مواد مورد استفاده آزمایشات مقدماتی انجام شد. سپس آزمایشی به صورت طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار شامل خیساندن بذرها در آب مقطر (به مدت ۲۴ ساعت)، اسید سالیسیلیک (غلظت ۰/۱ میلی مولار به مدت ۲۴ 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 پیش تیمار بذرها در داخل پتری دیش بین ۲ عدد کاغذ واتمن شماره ۱ قرار داده شدند و محلول های تهیه شده برای پیش تیمار به مقدار مساوی به پتری دیش ها افزوده شد، بذره های بامیه پس از پیش تیمار در مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک شدند، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و مدت روشنائی ۱۲ ساعت در پتری دیش بین ۲ عدد کاغذ واتمن شماره ۱ در ژرمناتور انجام شد. پس از جوانه زنی، بذور دارای حداقل دو میلی متر ریشه چه، بذور جوانه زده به به گلدان های پلاستیکی یکبار مصرف، با ارتفاع ۱۵ سانتی متر و قطر دهانه ۱۰ سانتی متر حاوی پیت ماس و پرلیت (نسبت چهار به یک حجمی) منتقل شده و به گلخانه ای با دمای 20 ± 2 درجه سانتی گراد انتقال یافتند. آبیاری گلدان ها هر دو روز یکبار صورت گرفت. در مرحله دو تا سه برگه، گیاهچه ها به گلدان های بزرگتر با قطر ۱۵ سانتی متر انتقال یافتند. گلدانها حاوی خاک، ماسه و کود دامی به نسبت ۲: ۱: ۱ بودند.

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

اندازه گیری رنگیزه های فتوسنتزی (کلروفیل و کارتنوئیدها) بر اساس روش پیشنهادی Arnone (۱۹۴۹) انجام شد. در این روش رنگیزه ها با استفاده از استون ۸۰ درصد استخراج شدند و

آنزیم کاتالاز: ۶۰ 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 ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم به ازای هر میکروگرم بر میلی‌گرم پروتئین بافت تازه گیاهی به دست 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 ۴۲۰ 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 ۴۲۵ 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 دانه‌های بامیه رقم بسنطی نشان داد که اثر تیمارها بر طول اندام هوایی در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود، ولی بر طول ریشه معنی دار نبود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین طول اندام هوایی (جدول ۲) نشان داد بیشترین طول اندام هوایی در پیش‌تیمار بذور بامیه با اسپرمین در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار وجود داشت (۱۳/۱۶ 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 بذور 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

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.

$$Chla = (A_{663/2} - A_{709/8}) \times (A_{663/2} - A_{709/8}) \times 1000$$

$$Chb = (A_{663/2} - A_{709/8}) \times (A_{663/2} - A_{709/8}) \times 1000$$

$$ChlT = Chla + Chlb$$

$$Cartenoide = (1000 \times A_{470} - 1/8 \times Chla - 85/02 \times Chlb) \times 0.000198$$

اندازه‌گیری مقدار پروکلین 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 پروکلین 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 برگ 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 (۱۹۸۶) استفاده شد. ابتدا از برگ کاملاً توسعه یافته دیسک‌هایی تهیه شد. نمونه‌ها در ظرف سربسته حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه قرار گرفت و به مدت ۲۴ 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).

$$\text{معادله (۵)} \quad 100 \times (L_t / L_0) = \text{نشت مواد محلول (\%)}$$

جهت اندازه‌گیری کمی پروتئین بر اساس روش پیشنهادی Bradford (۱۹۷۶) 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 ۶/۸ هموزن و سانترفیوژ گردید و جذب نمونه در طول موج ۵۹۵ با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز از روش Mishra و Kara (۱۹۷۶) استفاده شد:

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر پیش تیمار بر مقدار رنگیزه های فتوسنتزی، صفات بیوشیمیایی و ثبات غشا بامیه تحت تنش دمایی پایین

میانگین مریعات									
منابع	درجه	طول	طول اندام	کلروفیل	کلروفیل	کلروفیل	کلروفیل	کلروفیل	تغییرات
آزاد	ریشه	طول	هوازی	a	b	کل	کارتونید	پروتئین	تغییرات
تیمار	۴	۳۳/۵۳ ^{ns}	۳/۶°	۱۷/۲ ^{ns}	۲/۶ ^{ns}	۲۷/۵°	۳/۲°	۱/۳۵ ^{ns}	۳۱۳ ^{ns}
اشتباه آزمایش	۱۰	۱۰/۴	۱	۲/۸	۱/۰۸	۵/۹	۰/۶۱	۰/۰۱	۱۹۱۳
ضرب تغییرات	۲۳/۶	۸/۵	۱۷/۷	۱۹/۶	۱۶/۵	۲۱/۴	۴/۸۹	۱۳/۶	۱۷/۲

ns و ** به ترتیب معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و عدم تفاوت معنی داری است.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر پیش تیمار بر مقدار رنگیزه های فتوسنتزی، صفات بیوشیمیایی و ثبات غشا بامیه تحت تنش دمایی پایین

فعالیت	فعالیت	فعالیت	نشت	پروتلین	کربوهیدرات	کارتوتیوید	کل	کلروفیل	کلروفیل	کلروفیل	طول	ریشه	تیمار	(تغییرات در جذب میلی گرم وزن تازه)		(سانتی متر)						
														آزوم	آزوم پلی-		آزوم	مواد	پروتئین	محلوم	تازه	(L)
۲۴۳ ^a	۱/۴ ^c	۵۴/۳ ^a	۱/۲۵ ^d	۸ ^b	۰/۳۱ ^c	۲/۱ ^c	۹/۶ ^b	۴/۲۰ ^b	۵/۴ ^{ab}	۱۰/۹ ^b	۱۱/۳ ^a	شاهد (بدون اعمال تیمار)										
۲۴۸ ^a	۷/۸۹ ^b	۵۵/۷ ^a	۱/۶۷ ^c	۲۰۳۳ ^{ab}	۰/۵۷ ^b	۳/۳۱ ^{bc}	۱۴/۶۱ ^a	۴/۴۳ ^{ab}	۱۰/۱۱ ^{ab}	۱۲/۸ ^{ab}	۱۲/۳ ^{ab}	پیش تیمار با آب (۲۴ ساعت)										
۲۶۹ ^a	۲۲/۹ ^a	۳ ^b	۲/۹ ^a	۲۰۴/۵ ^d	۱/۰۳ ^a	۴/۸۵ ^a	۱۷/۲۴ ^a	۵/۶۳ ^{ab}	۱۱/۶ ^a	۱۲/۸ ^{ab}	۱۱/۳ ^{ab}	۰/۱ میلی مولار سالیسیلیک اسید (۲۴ ساعت)										
۲۵۶ ^a	۱۰/۵ ^b	۱۰ ^c	۲/۴۲ ^b	۲۰۴/۵ ^d	۰/۵۹ ^b	۳/۷۹ ^{ab}	۱۵/۷۷ ^a	۷/۴۲ ^a	۹/۳۵ ^a	۱۳/۱۶ ^a	۱۶/۳ ^a	۰/۵ میلی مولار اسپرین (۱۲ ساعت)										
۲۵۰ ^a	۱۰/۸۴ ^b	۱۳ ^c	۲/۴۵ ^b	۲۰۳ ^a	۰/۵۱ ^b	۴/۱۹ ^{ab}	۱۶/۵۸ ^a	۵/۸۲ ^{ab}	۱۰/۷۵ ^a	۱۰/۸۳ ^{ab}	۱۷ ^a	۰/۵ میلی مولار اسپرین (۱۲ ساعت)										

میانگین ها با حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری را براساس آزمون دانکن نشان نمی دهد.

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

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

نتایج مقایسه میانگین مربوط به رنگدانه‌های فتوستتزی (جدول ۲) نشان داد بیشترین میزان کلروفیل a برگ بامیه در پیش‌تیمار بذر با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک وجود داشت (۱۱/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) که به‌طور معنی‌داری بیشتر از کلروفیل برگ در تیمار شاهد بود (۵/۴۳) ولی یا کلروفیل a برگ در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت.

بیشترین میزان کلروفیل کل برگ نیز در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک وجود داشت (۱۷/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) که به‌طور معنی‌داری بیشتر از کلروفیل کل برگ در تیمار شاهد بود (۹/۶۴ 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 ۴/۸۵، ۴/۱۹ و ۳/۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در مقایسه با ۲/۱) شد (جدول ۲).

دمای پایین می‌تواند موجب تخریب غشای تیلوکوئید کلروپلاست، تورم پلاستید و تیغه تیلوکوئید، 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، ATP سنتز 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 فتوستتزی 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 فتوستتزی 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 معنی‌دار میزان کلروفیل a و b گردید (El-Khalla et al., 2009). همچنین گزارش گردیده است اسید سالیسیلیک باعث افزایش مقدار کلروفیل و کارتنوئید و میزان فتوستتزی گیاه ذرت شد، که این افزایش ناشی از اثر اسید سالیسیلیک بر افزایش میزان فتوستتزی به دلیل بهبود فعالیت روبیسکو و مقدار کلروفیل می‌باشند (Vazirimehr and Rigi, 2014). گزارش شده است در گیاه کدو، پیش‌تیمار بذر با اسید سالیسیلیک در غلظت کم باعث بهبود کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید و در نتیجه افزایش فتوستتزی 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 به دلیل 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 فتوستتزی گیاه بامیه در شرایط تنش سرما می‌تواند با اثر پلی‌آمین‌ها بر تولید اتیلن در ارتباط 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

پیش تیمار بذر بر میزان پرولین، کربوهیدرات های حلال، ثبات غشا، پروتئین کل و فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح احتمال ۱ درصد و بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار شد ولی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی دار 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 پیش تیمار بذر با غلظت ۰/۱ میلی مولار اسید سالیسیلیک وجود داشت که به طور معنی داری بیشتر از پرولین برگ در تیمار شاهد و سایر تیمارها بود (جدول ۲). کمترین میزان پرولین (۱/۲۵ میکروگرم بر گرم وزن تازه) در تیمار شاهد وجود داشت که به طور معنی داری کمتر از میزان پرولین در سایر تیمارها بود (جدول ۲). گیاهان در مقابل تنش های محیطی مکانسیم های دفاعی مختلفی از جمله تولید ترکیبات تنظیم کننده اسمزی دارند. در شرایط تنش سرما، افزایش تجمع ترکیبات تنظیم کننده اسمزی در گیاهان انجام می شود. این ترکیبات در غلظت های بالا غیر سمی بوده و بدون تغییر در pH فیزیولوژیک باعث حفظ فشار اسمزی و همچنین تثبیت ساختار پروتئین و غشا تحت تنش می شوند و در نتیجه نقش مهمی در سازگاری سلول ها به تنش های محیطی دارند (Allen and Ort, 2001). نتایج آزمایش در مورد افزایش پرولین برگ پس از کاربرد پلی آمین ها 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 می یابد (Johari Pireivatlou, 2010).

کربوهیدرات های محلول: بیشترین مقدار کربوهیدرات های محلول برگ در پیش تیمار بذر غلظت ۰/۱ میلی مولار اسید

سالیسیلیک وجود داشت (۱/۰۲ میلی گرم بر گرم وزن تر) وجود داشت که به طور معنی داری بیشتر از میزان کربوهیدرات های محلول برگ در تیمار شاهد (۰/۳۱ میلی گرم بر گرم وزن تر) و سایر تیمارها بود. گیاهان در مرحله سازگاری به تنش دمای پایین با تجمع آبسیزیک اسید در برگ های خود موجب فعالیت برخی از ژن ها و بروز تغییرات در میزان کربوهیدرات درون سلول می شوند که در نتیجه تنظیم فشار اسمزی، تحمل پذیری گیاهان نسبت به تنش دمای پایین را افزایش می دهد (Gusta et al., 2005). گزارش شده است که نقش ترکیبات کربوهیدراتی در ایجاد تحمل نسبت به دماهای پایین می تواند بیشتر از سایر محافظت کننده های سرمایی باشد. ساکارز یک ترکیب ضروری است که می تواند باعث افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش های محیطی مانند تنش دمای پایین شود. گلوکز دارای کنترل مستقیم و گسترده بر بیوسنتز هورمون اسیدآبسیزیک می باشد به طوری که غلظت بالای گلوکز در سلول منجر به سطوح بالای اسیدآبسیزیک درون سلولی می گردد، زیرا نسخه برداری ژن های بیوسنتز کننده اسیدآبسیزیک را افزایش می دهد. ساکارز نیز همانند گلوکز یکی از ترکیبات اساسی درخالت کننده در بیوسنتز اسیدآبسیزیک می باشد (Yadeghari et al., 2008).

نتایج این آزمایش نشان داد میزان کربوهیدرات های محلول برگ بامیه در شرایط تنش سرما تحت تاثیر پلی آمین ها قرار گرفت و پیش تیمار بذرها با غلظت ۰/۵ میلی مولار اسپرمین یا اسپرمیدین به طور قابل توجهی میزان کربوهیدرات های محلول برگ را افزایش داد (جدول ۲). در گیاه گندم نیز پیش تیمار بذر پلی آمین ها 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 ۵۴/۲ درصد) به ترتیب مربوط به پیش تیمار بذر با آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت و شاهد بود که به طور معنی داری بیشتر از نشت مواد محلول در سایر تیمارها بود. کمترین نشت مواد محلول از سلول (بیشترین ثبات غشا) در تیمارهای ۰/۵

۱۳۹۰). نتایج آزمایش حاضر در مورد اثر مثبت اسید سالیسیلیک بر کاهش نشت مواد محلول با نتایج گزارش شده در مورد کاهش نشت الکتریکی 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 مکانیسم‌های 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 ترانس‌مانی علامتی، فرآیندهای مربوط به RNA، ترجمه، فوسنتز، 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 مرندي، ۱۳۸۹). نتایج آزمایش حاضر در

میلی‌مولار اسپرمیدین و اسپرمین وجود داشت (۱۳ و ۱۰ 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 آب‌گزدن (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 می‌کنند (جلیلی مرندي، 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). مکانیسم دیگر اثر پلی‌آمین‌ها بر ثبات غشا ناشی از اثر پلی‌آمین‌ها بر فعالیت آنزیم‌های حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد و در نتیجه موجب کاهش در محتوای رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن گردیده و هم‌چنین از فعالیت آنزیم لیپوکسی‌ژناز و تجزیه اسیدهای چرب غشاء جلوگیری می‌کند (نوح پیشه و منوچهری کلانتری،

یونجه، گوجه فرنگی و نخود بیشتر از ارقام حساس به سرما می باشد (Hsanuzzaman et al., 2013). پیش تیمار بذر بادمجان با اسپرمین و اسپرمیدین از طریق افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز، موجب مقاومت به تنش دمای پایین گردیدند (Yan-ping et al., 2010). تنش سرما فعالیت آنزیم کاتالاز در زعفران را کاهش داد. با این حال، این تغییرات به طور قابل توجهی با کاربرد اسپرمیدین و پوترسین باعث افزایش تحمل گیاه به سرما گردید (Hsanuzzaman et al., 2013).

نتیجه گیری کلی:

باتوجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، می توان چنین اظهار داشت که تنش سرما پایداری غشاء سلولی را کاهش می دهد، اما پیش تیمار بذر بامیه با اسپرمین، اسپرمیدین و اسید سالیسیلیک تفاوت آشکاری با شاهد از لحاظ تاثیر بر پایداری غشاء نشان دادند. درحقیقت پیش تیمار با تنظیم کننده های رشد میزان خسارت غشا را کاهش می دهد. طی تنش دمایی مورد بررسی در پیش تیمار بذور با اسید سالیسیلیک و اسپرمین میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و پلی فنل اکسیداز افزایش یافت و در کل فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بیشتر از کاتالاز بود که نقش اصلی این آنزیم را در کاهش خسارت در بامیه نشان می دهد. بیشترین میزان کلروفیل کل، پرولین، کربوهیدرات محلول و پروتئین کل در پیش تیمار با اسید سالیسیلیک حاصل شد. بنابراین، پیش تیمار با اسید سالیسیلیک در افزایش توانایی گیاه در مقابله با تنش دمای پایین پیش تیمار با موثر است. همچنین از آنجا که اسید سالیسیلیک قادر به تاثیرگذاری بر بسیاری از فرآیندهای متابولیک و بیوشیمیایی است، پیشنهاد می شود که پیش تیمار بذر با سایر غلظت های اسید سالیسیلیک و پلی آمین ها به منظور بهبود مقاومت نسبت به تنش دماهای پایین در گیاه بامیه مورد مطالعه قرار گیرد.

مورد اثر مثبت پلی آمین ها 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 رادیکال های فعال اکسیژن نقش داشته و ماکرومولکول هایی مانند DNA و پروتئین را از این رادیکال های واکنش پذیر اکسیژن حفظ می کند (Kasukabe et al., 2004). پیشنهاد گردیده اسپرمیدین احتمالاً با از بین بردن رادیکال های فعال اکسیژن در کاهش تجزیه و افزایش بیوستز پروتئین در برگ های گیاه فلفل نقش دارد (نوح پیشه و منوچهری کلانتری، ۱۳۹۰). همچنین گزارش گردیده است در گیاهان گوجه فرنگی و فلفل پس از تیمار با متیل جاسمونات و متیل سالیسیلات، مقاومت بافت ها به سرما را از طریق تحریک بیان ژن پروتئین های شوک گرمایی افزایش یافت (جلیلی مرنندی، ۱۳۸۹؛ Horvath et al., 2004).

آنزیم های آنتی اکسیدان: نتایج نشان داد در تمام تیمارها فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاه بامیه تحت تنش سرما نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی دار داشت (جدول ۱)، درحالی که فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تیمارهای اسپرمین و اسپرمیدین تنها نسبت به پیش تیمار بذر با آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت افزایش معنی دار 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 رادیکال های آزاد اکسیژن در محیط سلول، احتمال وقوع تنش اکسیداتیو (به عنوان تنش ثانویه) وجود دارد که باعث اختلال در اعمال فیزیولوژیک سلول می شود. گیاهان برای خنثی کردن اثر سمی رادیکال های فعال اکسیژن، از ترکیبات آنتی اکسیدان و یا افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان استفاده می کنند (Chen et al., 2006). فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در ارقام مقاوم به سرما ذرت، برنج،

منابع:

جعفری، ر.، منوچهری کلانتری، خ. و ترک زاده، م. (۱۳۸۵) بررسی اثرات پاکلوپوترازول بر افزایش مقاومت به سرما در نهال های

- گوجه‌فرنگی، مجله زیست‌شناسی ایران ۱۹: ۲۹۸-۲۹۰.
- جعفری، ر.، منوچهری کلانتری، خ. و احمدی موسوی، ع. (۱۳۸۶) اثر پاکلوبوترازول بر تجمع آنتی‌اکسیدان‌ها در نهال‌های گوجه‌فرنگی تحت تنش سرما، مجله زیست‌شناسی ایران ۲۰: ۲۱۶-۲۰۶.
- 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. ۴۶۱ 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 ۴۳: ۱۶۰-۱۵۳.
- نوح پیشه، ز. و منوچهری کلانتری، خ. (۱۳۹۰) اثرات کاربرد متقابل اسپرمیدین و تنش شوری در گیاه فلفل، مجله زیست‌شناسی ایران ۲۴: ۸۵۷-۸۴۸.
- 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.
- Arnold, 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 quantitation 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 African Journal of Botany* 72: 272-279.
- El-Khallal, S. M., Hathout, T. A., Ashour, A. A. and Kerit, A. A. (2009) Brassinolide and salicylic acid induced growth, biochemical 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 Agrobotanici 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 Physiologica Plantarum* 33: 1707-1713.
- Farooq, M., Shahzad, M. A., Basra, H. and Rehman, M. (2008) Seed priming with polyamines 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 Physiologiae 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-Geready, 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) Investigation 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) Catalase, 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) Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia 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 wheat plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology (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., Pestencz, A. and Pldi, 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 applied 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, malondialdehyde (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 strawbree 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 bahadoori¹, Behrooz esmaelpour^{1*}, Mokhtar heidari², Surur khorramdel³, Parisa shiekhzadeh mosadegh⁴, Nasibeh tavakoli-hassankeloo⁴ and Alireza Ghanbari¹

¹Horticultural Science, Faculty of Agricultural Science, Mohaghegh Ardabili University,

²Horticultural Science, Faculty of Agricultural Science, Ramin University, ³Agronomy, Faculty of Agricultural Science, Ferdoozi Mashhad University, ⁴Agronomy, 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 distilled 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 until six-leaf growth stage then seedlings subjected were to low temperature stress (8°C 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: bsmaelpoor2008@gmail.com