

تغییرات بیوشیمیایی طی زوال بذرهای کدوی تخم کاغذی: پراکسیداسیون لیپید و صدمات غشا

فرشید قادری فر^{۱*}، افشین سلطانی^۱ و حمیدرضا صادقی پور^۲

^۱ گروه زراعت، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

چکیده

قابلیت حیات بذرها به طور تدریجی طی انبارداری کاهش می‌یابد. صدمات وارده در سطح بیوشیمیایی باعث تغییر وضعیت فیزیولوژیکی بذر می‌شود و میزان خسارت به شرایط ذخیره بذر بستگی دارد. پراکسیداسیون لیپیدها توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش مهمی در کاهش قابلیت حیات بذر طی زوال دارد. در پژوهش حاضر، روابط بین فعالیت آنزیم‌های پالایند رادیکال آزاد (کاتالاز و پراکسیداز)، پراکسیداسیون لیپید و زوال بذر در کدوی تخم کاغذی (*Cucurbita pepo* subsp. *Pepo*. *Convar.* *var. styriaca* Greb) بررسی شد. بذرهای این گیاه در دماهای ۳۵ و ۵۰ درجه سانتیگراد و رطوبت بذر ۵، ۸ و ۱۴ درصد به مدت ۲ و ۴ روز قرار گرفتند. با افزایش دما و رطوبت بذر پراکسیداسیون لیپید افزایش یافت. افزایش پراکسیداسیون لیپید با افزایش هدایت الکتریکی همراه بود که بیانگر این است که طی زوال، غشای سلولی تخریب می‌شود. همچنین، کاهش جوانه‌زنی با کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز همراه بود که نشان‌دهنده کاهش کارآیی سیستم پاداکسایشی در حفاظت بذرها در مقابل رادیکال‌های آزاد است. به طور کلی، نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر بیانگر آن است که پدیده زوال در بذرهای کدوی تخم کاغذی با کاهش فعالیت آنزیم‌های پالایند رادیکال‌های آزاد اکسیژن و افزایش پراکسیداسیون لیپید ارتباط دارد.

واژه‌های کلیدی: پاداکسایشی، پیری، جوانه‌زنی، هدایت الکتریکی

(Ghaderi-Far *et al.*, است (Cucurbitaceae)

2011a). بذرهای این گیاه منبعی سرشار از پروتئین و

روغن و حاوی مواد مؤثره ارزشمند نظیر اسیدهای

چرب، فیتواستروئول و ویتامین E (به ویژه گاما

مقدمه

کدوی تخم کاغذی (*Cucurbita pepo* subsp.

Pepo. *Convar.* *var. styriaca* Greb) گیاهی

دارویی، یک‌ساله، علفی و متعلق به خانواده کدوئیان

آن، به دلیل کیفیت پایین از دست می‌رود (Benech- Arnold and Sanchez, 2004). به علاوه، این مقدار به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد، وقتی که کاهش عملکرد گیاه زراعی حاصل از کاشت بذرهایی با کیفیت پایین نیز در نظر گرفته شود (McDonald, 1999). بنابراین، داشتن درک روشنی از مراحل زوال بذر ضروری است.

زوال بذر شامل برخی تغییرات بیوفیزیکی و بیوشیمیایی شامل تغییر در ساختار مولکولی نوکلئیک اسیدها، کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های کلیدی در جوانه‌زنی و افزایش فعالیت برخی از آنزیم‌های هیدرولیز کننده، اختلال در یکپارچگی غشا و کاهش تنفس است که نتیجه این تغییرات به کاهش قدرت بذر، کاهش سرعت جوانه‌زنی و رشد گیاهچه، کاهش توانایی جوانه‌زنی بذرها تحت شرایط تنش‌زا، افزایش احتمال نمو گیاهچه‌های غیرطبیعی و کاهش درصد استقرار بوته در مزرعه و در نهایت باعث کاهش عملکرد منجر می‌گردد. همچنین، چنانچه شدت زوال زیاد باشد ممکن است هیچ بذری جوانه نزنند (Roberts, 1986؛ Corbineau *et al.*, 1993؛ TeKrony *et al.*, 2002؛ Mohammadi *et al.*, 2011).

علت اصلی زوال بذر و کاهش قابلیت حیات بذر طی انبارداری دقیقاً مشخص نیست اما چندین مطالعه جامع عامل اصلی زوال بذر را پراکسیداسیون لیپیدها دانسته‌اند (Wilson and McDonald, 1986؛ Hendry, 1993؛ Smith and Berjak, 1995؛ Walters, 1998؛ McDonald, 1999). پراکسیداسیون لیپیدها با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن از طریق غیر آنزیمی (autoxidation) یا آنزیمی آغاز می‌شود (Clerkx *et*

توکوفرول) است. مهم‌ترین اسید چرب موجود در روغن این گیاه لینولئیک اسید (۴۵ تا ۵۰ درصد) است. از مواد مؤثره بذره‌های این گیاه، داروهایی مانند: پیونن، پیوسترین و گرونیفینگ برای معالجه تورم پروستات و سوزش مجاری ادرار ساخته می‌شود (Aroiee and Omidbaigi, 2004).

از زمانی که بشر به اهلی کردن گیاهان پرداخت، نگهداری بذر از اهمیت خاصی برخوردار بوده است. کشاورزان مجبور بودند بذرها را از یک فصل رشد برای فصل رشد بعدی (به معنای انبارداری کوتاه مدت به مدت ۳ تا ۱۸ ماه) نگهداری کنند. همچنین در بانک‌های ژن لازم است که قابلیت حیات بذر برای دوره‌های نامشخص (۱۰ تا ۱۰۰ سال یا بیشتر) حفظ شود (Hong and Ellis, 1996).

بذرها همانند هر اندام دیگر پیر شده (زوال یافته) و از بین می‌روند. سرعت زوال بذر به عواملی از جمله: نوع، ساختار، محیط تولید و سلامت بذر و همچنین شرایط انبارداری بستگی دارد (Kalpana and Madhava Rao, 1996؛ Abba and Lovato, 1999). دما و رطوبت نسبی (و به دنبال آن رطوبت بذر) از مهم‌ترین عوامل زوال بذر طی انبارداری هستند و کاهش دما و رطوبت نسبی طی انبارداری، به افزایش طول دوره انبارداری بذرها منجر می‌گردد (Basra *et al.*, 2003؛ Sharma *et al.*, 2007). زوال بذر یک ویژگی ناخواسته در کشاورزی است و متأسفانه همه ساله بخش زیادی از بذره‌های تولید شده طی انبارداری نامناسب از بین می‌رود (Li *et al.*, 2007؛ Kapoor *et al.*, 2011). بر اساس برآوردها، سالیانه حدود ۲۵ درصد بذر یا بخش قابل توجهی از درآمد حاصل از

گلوکاتایون ردوکتاز، کاتالاز و پراکسیداز هستند (Kibinza et al.; Bowler et al., 1992; Asada, 1992) در واقع این آنزیم‌ها در شرایط معمول انبارداری وظیفه پالایش رادیکال‌های آزاد را به عهده دارند. طی زوال، فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی کاهش و در نتیجه پراکسیداسیون لیپید افزایش می‌یابد (Rao et al.; Torres et al., 1997; Bailly et al., 1996) و همکاران (Bailly et al., 2006) و همکاران (۱۹۹۶) و Torres و همکاران (۱۹۹۷) بیان داشتند که در بذرهاى آفتابگردان افزایش پراکسیداسیون لیپید طی زوال با کاهش در فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی مرتبط است.

پژوهش‌های متعددی به منظور درک بهتر سازوکارهای دخیل در زوال بذر صورت گرفته است (Smith and Wilson and McDonald, 1986; McDonald, 1999; Walters, 1998; Berjak, 1995; Murthy et al., 2003). در اغلب پژوهش‌ها از آزمون تسریع پیری برای مطالعه زوال استفاده شده است (Bailly et al., 1996; Basra et al., 2003; Kalpana and Madhava Rao, 1996). به این صورت که بذرها در یک دوره کوتاه مدت تحت تأثیر دمای بالا (۳۸-۴۵ درجه سانتیگراد) و رطوبت نسبی زیاد (حدود ۱۰۰ درصد) قرار می‌گیرند (Hsu et al., 2003; Pukacka and Ratajczak, 2005). به بیان دیگر، در تنها تأثیر یک دما و یک رطوبت نسبی طی دوره زوال بررسی می‌گردد. تحت این تیمار، بذرها سریعاً دچار زوال می‌شوند و با گذشت مدت زمان کوتاهی جوانه‌زنی آنها به شدت کاهش می‌یابد و به صفر می‌رسد. اما بذرها به ندرت در انبار تحت چنین شرایط محیطی قرار می‌گیرند. طی انبارداری دامنه دمایی و

(al., 2004) رادیکال آزاد شامل یک یا گروهی از اتم‌ها است که یک الکترون جفت نشده دارند. در روش آنزیمی، رادیکال آزاد توسط لیپوکسیژنازهایی که در بسیاری از بذرها وجود دارد، تولید می‌شود (Trawatha et al., 1995). سازوکار غیر آنزیمی اغلب به وسیله مولکول اکسیژن مجاور اسیدهای چرب غیر اشباع نظیر اولئیک اسید و لینولئیک اسید که از رایج‌ترین اسیدهای چرب غشای بذر هستند، آغاز می‌شود. نتیجه این عمل آزاد شدن یک رادیکال آزاد است که غالباً هیدروژن (H°) آزاد شده از یک گروه متیلنی مجاور پیوند دو گانه اسید چرب است. در سایر موارد، ممکن است رادیکال آزاد هیدروژن با سایر رادیکال‌های آزاد گروه‌های هیدروپراکسی (ROOH) ترکیب شود و در نتیجه رادیکال آزاد پراکسی (ROO°) تولید می‌شود. این رادیکال‌ها به تولید رادیکال‌های آزاد دیگر ادامه می‌دهند تا زمانی که با سایر رادیکال‌ها تلفیق شوند و این پایان واکنش است (McDonald, 1999). در این حال، رادیکال‌های آزاد به غشاها خسارت وارد می‌کنند و باعث تغییراتی در کیفیت روغن می‌شوند. در نتیجه، اسیدهای چرب با زنجیره طولانی به اجزای کوچک‌تر شکسته می‌شوند و برخی از آنها به صورت هیدروکربن‌های فرار آزاد می‌شوند (Wilson and Esashi et al., 1997; McDonald, 1986). پیامد نهایی این سلسله واکنش‌ها، اختلال ساختار غشا، نشت سلولی و اختلال در متابولیسم طبیعی سلول است. گیاهان دارای سیستم پاداکسایشی (antioxidant system) هستند که این سیستم وظیفه سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد اکسیژن را به عهده دارد که شامل: سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز،

شدند. درصد جوانه‌زنی، پراکسیداسیون لیپید، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و هدایت الکتریکی اندازه‌گیری شد.

آزمون جوانه‌زنی: برای انجام آزمون جوانه‌زنی در هر تیمار، سه تکرار ۵۰ تایی از بذر شمارش و روی دو عدد کاغذ حوله‌ای به ابعاد ۳۰×۴۵ سانتی‌متر قرار گرفته، روی بذر با کاغذی دیگر پوشانیده شد (Ghaderi-Far and Soltani, 2011). برای جلوگیری از کاهش رطوبت، کاغذهای حوله‌ای درون پلاستیک گذاشته، سپس درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز قرار گرفتند. در روز هفتم درصد بذرهای جوانه زده اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها: اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها با روش Heath و Packer (۱۹۶۸) همراه با تغییراتی انجام شد. در این روش، ۰/۲ گرم بذر کدوی تخم کاغذی با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی کوبیده و همگن شد. عصاره همگن به لوله سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g و در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. فاز میانی در زیر لایه لیپیدی برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدها مورد استفاده قرار گرفت. به ۲۵۰ میکرولیتر از این عصاره، ۲ میلی‌لیتر معرف تیوباریتوریک اسید ۰/۲۵ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. بلافاصله پس از این مرحله لوله‌های آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در یک ظرف یخ قرار گرفتند. پس از این مدت، محلول‌ها دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و میزان جذب نور نمونه‌ها در طول

رطوبتی متفاوتی بر بذرها حاکم است و از سوی دیگر، در دماها و رطوبت‌های مختلف سازوکارهای زوال متفاوت هستند (Murthy *et al.*, 2003). از این رو، برای درک بهتر سازوکارهای زوال بذر طی انبارداری باید از دامنه‌های متفاوتی از دماها و رطوبت بذر استفاده کرد. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر درک اساسی از سازوکارهای زوال بذر کدوی تخم کاغذی طی پیری در دامنه دمایی و رطوبتی مختلف و ارتباط آن با پراکسیداسیون لیپیدها و فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی کاتالاز و پراکسیداز است.

مواد و روش‌ها

برای اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی دخیل در زوال بذرهای کدوی تخم کاغذی از آزمایش‌های انجام شده برای تعیین ضرایب پیش‌بینی انبارداری این گیاه استفاده شد (Ghaderi-Far *et al.*, 2011b). برای این منظور از بذرهای تولیدی در شهرستان اردبیل در سال ۱۳۸۷ استفاده شد و پس از برداشت بذرها تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شدند. در آغاز آزمایش رطوبت اولیه بذر ۵ درصد بود. دو تیمار دمایی و سه سطح رطوبتی و دو دوره زمانی از آزمایش‌های پیشین انتخاب شد (Ghaderi-Far, 2009). تیمارهای دمایی در دو سطح ۳۵ و ۵۰ درجه سانتیگراد، تیمارهای رطوبتی در سه سطح ۵، ۸ و ۱۴ درصد رطوبت بذر و تیمارهای زمان در دو سطح ۲ و ۴ روز تحت ترکیب شرایط دمایی و رطوبتی انتخاب گردید. بذرها درون فویل آلومینیومی و فویل‌ها درون ظرف‌های وکیوم قرار داده شدند. سپس، این ظرف‌ها در دماهای یاد شده قرار گرفتند و در زمان‌های مورد نظر از انکوباتور خارج

مونوسدیک (۵۰ میلی مولار) با اسیدیته برابر ۶/۸، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (۱۵ میلی مولار) ترکیب و برای اندازه گیری استفاده شد. با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی آغاز شد. محلول بلانک، حاوی ۲/۹ میلی لیتر بافر فسفات مونوسدیک (۵۰ میلی مولار) با اسیدیته برابر با ۶/۸ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در نظر گرفته شد. کاهش جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای مدت زمان ۲ دقیقه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس آب اکسیژنه تجزیه شده در هر دقیقه به ازای هر گرم بذر با ضریب خاموشی (ε) برابر با $40 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ بیان شد.

استخراج و اندازه گیری فعالیت آنزیم

پراکسیداز: استخراج آنزیم پراکسیداز با روش Murthy و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد. برای استخراج آنزیم یک گرم بذر کدوی تخم کاغذی با ۳ میلی لیتر بافر استخراج در هاون چینی درون ظرف یخ کوبیده و همگن شد. پس از آن، محلول همگن از دو لایه پارچه ملامل عبور داده شد و عصاره حاصل پس از انتقال به میکروتیوب، به مدت ۱۵ دقیقه در 10000 g سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، فاز میانی در زیر لایه لیپیدی برای اندازه گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز با روش Resende و همکاران (۲۰۰۲) با اندکی تغییرات انجام شد. مخلوط واکنش حاوی $2/750$ میلی لیتر بافر فسفات مونوسدیک (۲۵ میلی مولار) با اسیدیته برابر با ۶/۸، ۱۰۰ میکرولیتر پیرو گالول (۱۰ میلی مولار)، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (۴۰ میلی مولار) به حجم نهایی ۳ میلی لیتر بود. با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط

موج های ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت شد. محلول شاهد حاوی ۲۵۰ میکرولیتر تری کلرو استیک ۰/۱ درصد بود که با ۲ میلی لیتر معرف تیوباربتوریک اسید ۰/۲۵ درصد مخلوط شده بود و تمامی تیمارها با محلول بلانک سنجیده شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس مقدار مالون دی آلدئید (MDA) موجود در هر عصاره طبق رابطه ۱ محاسبه گردید:

$$\text{LP (nmol. ml}^{-1}\text{)} = \frac{[(A_{532}-A_{600}) - [(A_{440}-A_{600}) (\text{MA})]]}{157000} \cdot 10^6$$

که MA جذب مولی سوکروز در غلظت های ۱ تا ۱۰ میلی مولار در ۵۳۲ و ۴۴۰ نانومتر است که به ترتیب ۸/۴ و ۱۴۷ محاسبه شد که نسبتی برابر با ۰/۰۵۷۱ است (Du and Bramlage, 1992). میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس نانومول مالون دی آلدئید موجود با ازای هر گرم بذر بیان گردید.

استخراج و اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز:

برای استخراج آنزیم کاتالاز از روش Mishra و Kar (۱۹۷۶) استفاده شد. برای استخراج آنزیم یک گرم بذر کدوی تخم کاغذی با ۳ میلی لیتر بافر استخراج در هاون چینی درون ظرف یخ کوبیده و همگن گردید. پس از آن محلول هموژن از دو لایه پارچه ملامل عبور داده شد و عصاره حاصل در میکروتیوب ریخته شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در 10000 g سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، فاز میانی در زیر لایه لیپیدی برای اندازه گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Luck (۱۹۶۲) استفاده شد. در این روش، ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات

مقایسه میانگین با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

درصد جوانه زنی: بین دوره‌های زوال، دماها و رطوبت بذر و تأثیر متقابل دوره زوال و دما، دوره زوال و رطوبت بذر، دما و رطوبت بذر و تأثیر دوره زوال، دما و رطوبت بذر از لحاظ درصد جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱). با افزایش دوره زوال از ۲ به ۴ روز، درصد جوانه زنی کاهش یافت به طوری که درصد جوانه‌زنی در ۲ و ۴ روز زوال به ترتیب: ۸۰/۲۲ و ۵۸/۶۷ درصد بود. همچنین، با افزایش دما از ۳۵ به ۵۰ درجه سانتیگراد، درصد جوانه‌زنی نیز کاهش یافت به طوری که درصد جوانه‌زنی در دمای ۳۵ و ۵۰ درجه سانتیگراد به ترتیب: ۸۷/۳۳ و ۵۱/۵۶ درصد بود (جدول ۱). بین سطوح رطوبت بذر نیز از لحاظ درصد جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری وجود داشت. با افزایش رطوبت بذر، درصد جوانه‌زنی برای رطوبت‌های بذر: ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب: ۸۷/۳۳، ۶۶/۰ و ۵۵/۰ درصد بود. در شکل ۱ اثر متقابل دوره زوال، دما و رطوبت بذر بر درصد جوانه‌زنی کدوی تخم کاغذی ارایه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد بین سطوح رطوبت بذر از لحاظ درصد جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و بذرها دارای درصد جوانه‌زنی مشابهی بودند در حالی که در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد با افزایش رطوبت بذر، درصد جوانه‌زنی به شدت کاهش یافت به طوری که درصد کاهش در تیمار ۴ روز زوال بیشتر از ۲ روز زوال بود.

واکنش فعالیت آنزیمی آغاز شد. در محلول بلانک به جای آب اکسیژنه از آب مقطر استفاده گردید. تغییرات جذب نور در اثر تولید پورپورو گالین از پیرو گالول در طول موج ۴۲۰ نانومتر برای مدت زمان ۲ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس ضریب خاموشی (E) برابر با $2/47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه گردید.

اندازه‌گیری هدایت الکتریکی بذرها: برای

اندازه‌گیری هدایت الکتریکی در ظروف بشر ۵۰۰ میلی‌لیتری مقدار ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. برای جلوگیری از آلودگی کلیه بشرها با فویل آلومینیومی پوشانیده شدند و پیش از قرار دادن بذرها در داخل آنها، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتوری با دمای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا از لحاظ دما به تعادل برسند. سه تکرار ۵۰ تایی از هر نمونه بذر شمارش و وزن آنها تعیین شد و پس از توزین در بشرهای محتوی آب مقطر قرار گرفتند. سپس، کلیه بشرها به وسیله فویل آلومینیومی پوشانیده شد و در انکوباتور با دمای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در پایان، دوره ۲۴ ساعت خیساندن بذر، هدایت الکتریکی نمونه‌ها با EC متر اندازه‌گیری شد. میزان هدایت الکتریکی هر نمونه به ازای هر گرم بذر بر اساس رابطه ۲ محاسبه شد (Hampton and TeKrony, 1995):

رابطه ۲: هدایت الکتریکی = قابلیت هدایت الکتریکی (میکروزیمنس بر سانتی‌متر) / وزن نمونه بذر (گرم)

تحلیل داده‌ها: محاسبات آماری و تحلیل داده‌ها با

نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و

جدول ۱- خلاصه نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین درصد جوانه زنی، پراکسیداسیون لیپید و هدایت الکتریکی کدوی تخم کاغذی در دماها و سطوح رطوبت بذر در دو دوره زمانی زوال (۲ و ۴ روز). * و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک و ۵ درصد، ns. غیرمعنی دار.

منابع تغییر	درصد جوانه زنی	پراکسیداسیون لیپید	هدایت الکتریکی
خلاصه تجزیه واریانس			
دوره زوال	**	*	**
دما	**	**	Ns
رطوبت بذر	**	ns	**
اثر متقابل دوره زوال و دما	**	*	ns
اثر متقابل دوره زوال و رطوبت بذر	**	*	ns
اثر متقابل دما و رطوبت بذر	**	*	ns
اثر متقابل دوره زوال و دما و رطوبت بذر	*	*	ns
تیمار	درصد جوانه زنی	پراکسیداسیون لیپید	هدایت الکتریکی
دوره زوال (روز)			
۲	۸۰/۲۲a	۱۶/۹۲b	۳۶/۰۲b
۴	۵۸/۶۷b	۲۲/۹۷a	۴۰/۶۷a
LSD (0.05)	۵/۴۵	۵/۰۳	۳/۱۳
دما (درجه سانتیگراد)			
۳۵	۸۷/۳۳a	۱۳/۹۹b	۳۶/۹۵b
۵۰	۵۱/۵۶b	۲۵/۹۰a	۳۹/۷۳a
LSD (0.05)	۵/۴۴	۵/۰۳	۳/۱۳
درصد رطوبت بذر			
۵	۸۷/۳۳a	۲۱/۱۱a	۳۴/۶۲b
۸	۶۶/۰۰b	۱۸/۶۲a	۳۶/۴۱b
۱۴	۵۵/۰۰c	۲۰/۶۲a	۴۴/۰۰a
LSD (0.05)	۶/۶۷	۶/۱۷	۳/۸۳

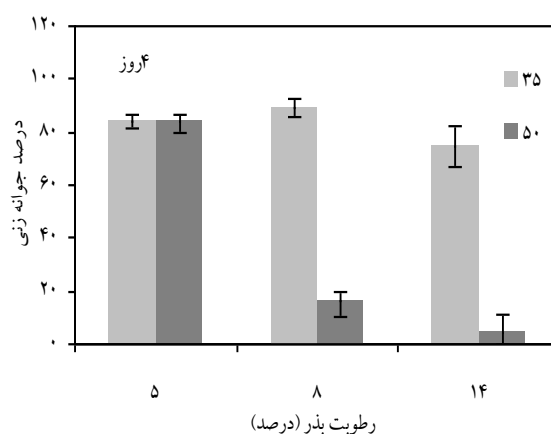
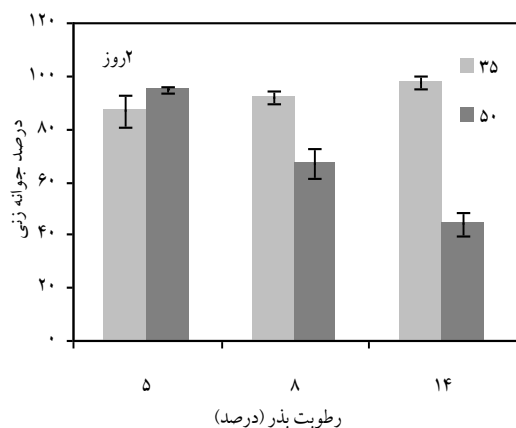
پراکسیداسیون لیپید: بر اساس جدول تجزیه

واریانس، بین دوره‌های زوال و دماها و تأثیر متقابل دوره زوال و دما، دوره زوال و رطوبت بذر، دما و رطوبت بذر و تأثیر سه گانه دوره زوال، دما و رطوبت بذر از لحاظ میزان پراکسیداسیون لیپیدها بذرهای کدوی تخم کاغذی اختلاف معنی داری وجود داشت (جدول ۱). بین سطوح دوره زوال از لحاظ پراکسیداسیون لیپید اختلاف

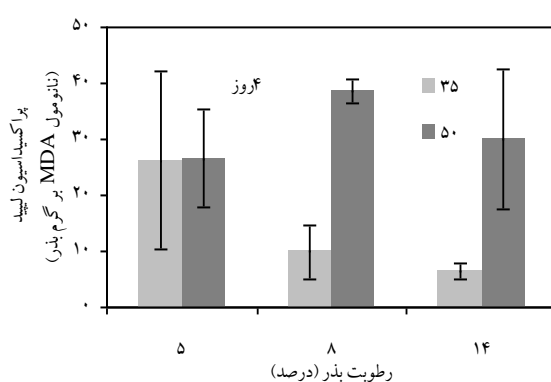
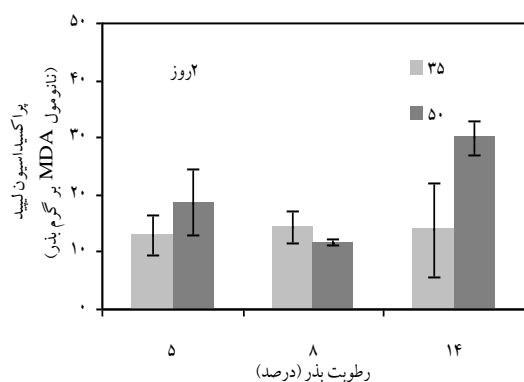
معنی داری وجود داشت. میزان پراکسیداسیون در دوره زوال ۲ و ۴ روز به ترتیب: ۱۶/۹۲ و ۲۲/۹۷ نانومول مالون دی آلدهید بر گرم بذر بود. با افزایش دما از ۳۵ به ۵۰ درجه سانتیگراد نیز پراکسیداسیون لیپید افزایش یافت، به طوری که مقدار آن در دماهای ۳۵ و ۵۰ درجه سانتیگراد به ترتیب: ۱۳/۹۹ و ۲۵/۹۰ نانومول مالون دی آلدهید بر گرم بذر بود (جدول ۱). در شکل ۲ واکنش

افزایش سطوح رطوبت بذر، مقدار پراکسیداسیون لیپید کاهش یافت به طوری که میزان آن در سطوح رطوبت ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب: ۲۶/۲۳، ۹/۹۳ و ۶/۴۱ نانومول مالون دی آلدهید بر گرم بذر بود و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد میزان پراکسیداسیون لیپید افزایش یافت و میزان آن در سطوح رطوبت بذر ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب: ۲۶/۵۶، ۳۸/۴۱ و ۳۰/۰۴ نانومول MDA بر گرم بذر بود. همچنین، میزان پراکسیداسیون لیپید در تیمار ۴ روز زوال بیشتر از ۲ روز زوال بود (شکل ۲).

پراکسیداسیون لیپید در سطوح دمایی و رطوبتی در بذرهای کدوی تخم کاغذی ارایه شده است. در ۲ روز زوال و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد با افزایش رطوبت بذر میزان پراکسیداسیون لیپید چندان تغییری نداشت و تقریباً مقدار آن مشابه بود اما در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد بین سطوح رطوبت از لحاظ این صفت اختلاف معنی داری وجود داشت، به طوری که میزان آن در رطوبت ۱۴ درصد بیشتر از رطوبت‌های ۵ و ۸ درصد بود. اما در ۴ روز زوال و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد با

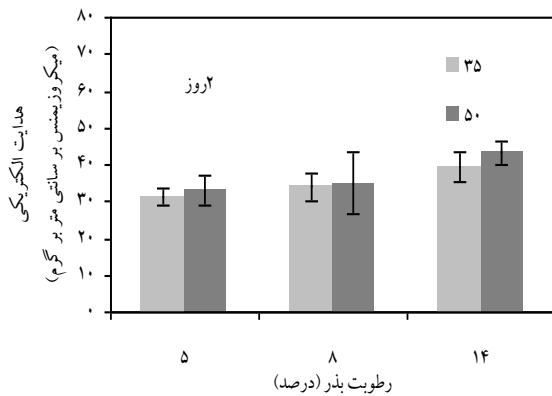


شکل ۱- تأثیر دما و رطوبت بذر بر درصد جوانه‌زنی بذرهای کدو تخم کاغذی در ۲ و ۴ روز زوال. مقادیر میانگین \pm SE تکرار ۳ است. اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.



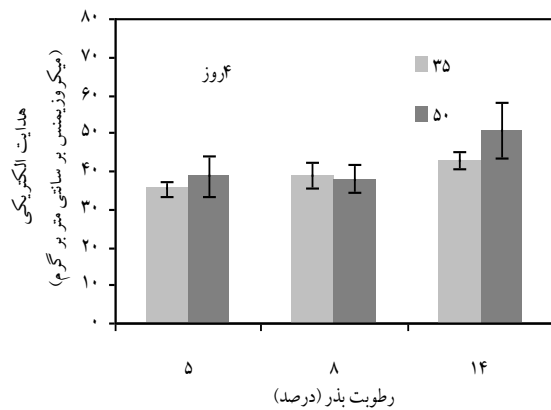
شکل ۲- تأثیر دما و رطوبت بذر بر مقدار پراکسیداسیون لیپید بذرهای کدو تخم کاغذی در ۲ و ۴ روز زوال. مقادیر میانگین \pm SE تکرار ۳ است. اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

در هر دو دما با افزایش رطوبت بذر، هدایت الکتریکی بذرها افزایش یافت که میزان آن در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در رطوبت‌های ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب: ۳۱، ۳۴ و ۳۹ میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به ترتیب: ۳۳، ۳۵ و ۴۳ میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم بود. در ۴ روز زوال نیز در هر دو دما با افزایش رطوبت بذر، هدایت الکتریکی به طور خطی افزایش یافت و میزان آن در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و رطوبت ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب: ۳۵، ۳۹ و ۴۳ میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به ترتیب: ۳۸، ۳۹ و ۵۱ میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم بود. به طور کلی، در تیمار ۴ روز زوال در کلیه سطوح دمایی و رطوبتی مقدار هدایت الکتریکی بذرها بیشتر از تیمار ۲ روز زوال بود.



هدایت الکتریکی بذره‌های زوال یافته: بین دماها

و تأثیر متقابل دوره زوال و دما، دوره زوال و رطوبت بذر، دما و رطوبت بذر تأثیر متقابل سه گانه دوره زوال، دما و رطوبت بذر از لحاظ هدایت الکتریکی بذره‌های کدوی تخم کاغذی اختلاف معنی داری وجود نداشت اما بین دوره زوال و سطوح رطوبت بذر از لحاظ آماری اختلاف معنی داری وجود داشت (جدول ۱). با افزایش دوره زوال از ۲ به ۴ روز هدایت الکتریکی افزایش یافت. همچنین، با افزایش سطوح رطوبت از ۵ به ۱۴ درصد، هدایت الکتریکی بذره‌های کدوی تخم کاغذی افزایش یافت که میزان آن در رطوبت‌های ۵، ۸ و ۱۴ درصد به ترتیب: ۳۴/۶۲، ۳۶/۴۱ و ۴۴/۰ میکروزیمنس بر سانتی متر بر گرم بود. شکل ۳ مقدار هدایت الکتریکی بذر در سطوح دمایی و رطوبتی را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌شود در ۲ روز زوال



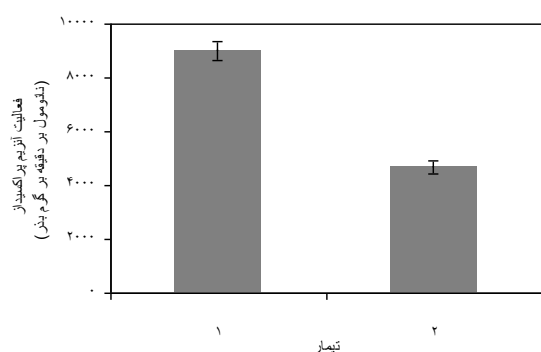
شکل ۳- تأثیر دما و رطوبت بذر بر هدایت الکتریکی بذره‌های کدو تخم کاغذی در ۲ و ۴ روز زوال. مقادیر میانگین \pm SE تکرار ۳ است. اختلاف معنی دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

با تیمار حداکثر زوال (۵۰ درجه سانتیگراد، ۱۴ درصد رطوبت و ۴ روز زوال) ارایه شده است. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار زوال یافته کمتر از

فعالیت آنزیم کاتالاز: در شکل ۴ میزان فعالیت

آنزیم کاتالاز در تیمارهای ۳۵ درجه سانتیگراد، ۵ درصد رطوبت بذر و ۲ روز زوال (به عنوان شاهد)

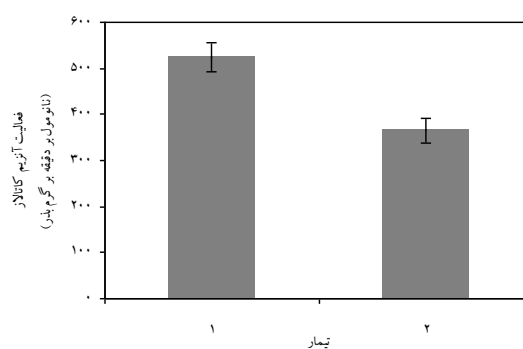
زوال بود که اختلاف این دو تیمار از لحاظ آماری معنی‌دار بود (شکل ۵). مقدار فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار شاهد و زوال به ترتیب: ۹۰۰۹/۱۵ و ۴۶۹۵/۸۷ نانومول بر دقیقه بر گرم بذر بود. به بیان دیگر، میزان فعالیت این آنزیم در تیمار زوال در حدود ۴۵ درصد کمتر از تیمار شاهد بود.



شکل ۵- مقایسه میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کدوی تخم کاغذی در تیمار ۱ (۳۵ درجه، رطوبت ۵ درصد و ۲ روز زوال) با تیمار ۲ (۵۰ درجه، رطوبت ۱۴ درصد و ۴ روز زوال). مقادیر میانگین $\pm SE$ است. اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

تیمار شاهد بود که این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار شاهد و زوال به ترتیب: ۵۲۴/۲۵ و ۳۶۵/۲۵ نانومول بر دقیقه بر گرم بذر بود.

فعالیت آنزیم پراکسیداز: میزان فعالیت این آنزیم نیز همانند آنزیم کاتالاز در تیمار شاهد بیشتر از تیمار



شکل ۴- مقایسه میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در کدوی تخم کاغذی در تیمار ۱ (۳۵ درجه، رطوبت ۵ درصد و ۲ روز زوال) با تیمار ۲ (۵۰ درجه، رطوبت ۱۴ درصد و ۴ روز زوال). مقادیر میانگین $\pm SE$ است. اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

بحث

با افزایش دما و رطوبت بذر و طول دوره زوال، درصد جوانه‌زنی کاهش یافت (شکل ۱). کاهش درصد جوانه‌زنی بذر در هر دو تیمار مدت زوال، با افزایش دما و رطوبت بیشتر بود. همچنین، در کلیه سطوح دمایی و رطوبتی درصد جوانه‌زنی در تیمار ۴ روز زوال کمتر از ۲ روز زوال بود. کاهش درصد جوانه‌زنی طی زوال بذر در گیاهان مختلف گزارش شده است (Kalpana and Shekaramurthy *et al.*, 1994؛ Madhava Rao, 1994؛ Basra *et al.*, 2003؛ Trawatha *et al.*, 1995؛ Freitas *et al.*, 2006).

چندین مطالعه جامع علت اصلی زوال بذر را پراکسیداسیون لیپید ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن گزارش کرده‌اند (Smith؛ Priestley, 1986؛ Walters, 1998؛ and Berjak, 1995). رادیکال‌های آزاد شامل آنیون سوپراکسید، هیدروژن پراکسید، رادیکال‌های هیدروژن و اکسیژن منفرد هستند که هر کدام از این رادیکال‌های آزاد از راه‌های متفاوتی به سلول خسارت وارد می‌کنند (McDonald, 1999؛ Blokhina *et al.*, 2003). تعیین مقدار مالون دی‌آلدئید به عنوان یکی از محصولات جانبی تولید شده از اسیدهای چرب غیر اشباع طی فرآیند پراکسیداسیون،

آفتابگردان نیز در برخی از دامنه‌های رطوبتی رابطه مستقیمی بین زوال و پراکسیداسیون لیپید وجود ندارد (Kibinza *et al.*, 2006). باید دانست که مالون دی آلدئید بر آوردی از میزان پراکسیداسیون لیپید است و برای بررسی دقیق‌تر باید محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپید مانند لیپید-هیدروپراکسیدها را اندازه‌گیری کرد، زیرا مالون دی آلدئید تنها از اسیدهای چرب با سه یا تعداد بیشتری پیوند دوگانه شکل می‌گیرد در صورتی که بافت‌های گیاهی اغلب دارای سطوح بالایی از اسیدهای چرب با دو پیوند دوگانه هستند (Griffiths *et al.*, 2000). همچنین، ممکن است در این محدوده رطوبتی سیستم‌های ترمیمی فعال شوند زیرا در این محدوده پراکسیداسیون لیپیدها در حداقل مقدار خود است و رطوبت کافی برای عمل بافری آب در مقابل حمله رادیکال‌های آزاد که سبب اکسیداسیون خودبه‌خودی می‌شوند وجود دارد اما رطوبت کافی برای عمل آنزیم لیپوکسیژناز و تولید رادیکال‌های آزاد حاصل از آن وجود ندارد (McDonald, 1999).

برای مطالعه دقیق‌تر تأثیر زوال بذر بر فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی، از مقایسه تیمار شاهد و تیمار حداکثر زوال (۵۰ درجه سانتیگراد و ۱۴ درصد رطوبت و ۴ روز زوال) استفاده شد. در شکل‌های ۳ و ۴ میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در تیمارهای شاهد و حداکثر زوال ارابه شده است. میزان فعالیت این دو آنزیم در بذرهای این گیاه تحت تأثیر زوال تغییر کرد. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار زوال یافته در مقایسه با شاهد کمتر بود. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار زوال یافته

روشی رایج برای کمی‌سازی مقدار پراکسیداسیون لیپیدها است (Stewart and Bewley, 1980؛ Chang؛ Bhattacharjee and Mukherjee, 1998 and Sung, 1998). در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، در رطوبت کمتر از ۶ درصد، میزان پراکسیداسیون لیپید افزایش یافت اما میزان آن در رطوبت‌های بالاتر کاهش یافت، در حالی که در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد میزان پراکسیداسیون لیپیدها تا رطوبت ۸ درصد افزایش یافت و با افزایش رطوبت از ۸ به ۱۴ درصد میزان پراکسیداسیون لیپیدها کاهش یافت (شکل ۲). همچنین، در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد با افزایش دوره زوال از ۲ به ۴ روز در رطوبت ۵ و ۸ درصد میزان پراکسیداسیون لیپید افزایش یافت اما در رطوبت بذر ۱۴ درصد تغییر چندانی نداشت. در مطالعه‌ای که در بذر گیاه ماش صورت گرفت، Murthy و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که در رطوبت بذر بین ۸ تا ۱۴ درصد پراکسیداسیون لیپید افزایش و در رطوبت بالاتر از ۱۶ درصد، پراکسیداسیون لیپید کاهش می‌یابد. در پژوهش حاضر در رطوبت بذر حدود ۱۴ درصد، میزان پراکسیداسیون لیپید نسبت به رطوبت ۸ درصد کمتر بود که گویای این مطلب است که در گیاه کدوی تخم کاغذی با افزایش رطوبت بذر از ۸ به ۱۴ درصد نقش پراکسیداسیون لیپید در کاهش زوال بذر کمتر است و عوامل دیگری در زوال بذر این گیاه دخیل است. به هر صورت، گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد پراکسیداسیون لیپید نقش مهمی در زوال بذر برخی از گونه‌ها نظیر: دال عدس (Kalpana and Madhava Rao, 1996)، گندم (Girard and Le Meste, 1992) و ذرت (Linn and Pearce, 1990) ندارد. در بذرهای

اکسیژن در گیاه ماش نیز گزارش شده است (Murthy *et al.*, 2002).

با کاهش فعالیت آنزیم‌های پالاینده اکسیژن فعال، میزان رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. تولید و انباشتگی رادیکال‌های آزاد به خسارت به اسیدهای چرب غیر اشباع غشاهای سلولی منجر شده، در ادامه رادیکال‌های آزاد دیگری تولید می‌شوند که این رادیکال‌ها با یکدیگر ترکیب می‌شوند و در نهایت، کلیه این تغییرات به اختلال در عملکرد غشا، افزایش ویسکوزیته غشا، افزایش نفوذپذیری و نشت مواد از بذر طی آبیگری و افزایش هدایت الکتریکی منجر می‌شوند (Priestly, 1986). همان‌طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود با افزایش دوره زوال از ۲ به ۴ روز میزان هدایت الکتریکی افزایش یافت. همچنین، با افزایش رطوبت بذر و دما هدایت الکتریکی افزایش یافت. افزایش هدایت الکتریکی بذر ناشی از اضمحلال غشا به علت حمله رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب غیر اشباع است که به از بین رفتن انسجام غشایی منجر می‌شود از این رو، سرعت واکنش‌های اکسیداتیو به میزان غیر اشباعی بودن اسیدهای چرب بستگی دارد و هر چه میزان آن بیشتر باشد تنش اکسیداتیو نیز بیشتر خواهد شد (Braccini *et al.*, 2000).

به طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که طی زوال بذرهای کدوی تخم کاغذی، فعالیت آنزیم‌های پالاینده رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش می‌یابد که نتیجه آن افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و به دنبال آن افزایش پراکسیداسیون لیپید و تخریب غشا سلولی است. مجموعه این عوامل باعث کاهش کیفیت بذر طی

نسبت به شاهد بیشتر از کاتالاز تحت تأثیر زوال قرار گرفته بود. گزارش‌های متعدد گویای آن است که با کاهش فعالیت آنزیم‌های پالاینده اکسیژن فعال میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد (Chiu *et al.*, 1995; Hsu and Sung, 1996; Bailly *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 2006). در شرایط معمول برای جلوگیری از آسیب رادیکال‌های آزاد، سیستم‌های دفاعی پاداکسایشی در گیاهان وجود دارد (Alscher *et al.*, 2002). این سیستم‌ها شامل آنزیم‌هایی نظیر: کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، دی هیدرو آسکوربات ردوکتاز و گلوکاتایون ردوکتاز و ترکیبات پاداکسایشی نظیر: آسکوربات و گلوکاتایون هستند (Gillham and Asada, 1992; Smit *et al.*, 1989; Dodge, 1986). در شرایط تنش اکسیداتیو موازنه بین تولید رادیکال‌های آزاد و این سیستم‌های دفاعی مختل می‌شود، در نتیجه میزان رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. Chang و Sung (۱۹۹۸) گزارش کردند که در بذرهای ذرت، با افزایش طول دوره زوال میزان فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و گلوکاتایون پراکسیداز کاهش و میزان پراکسیداسیون لیپید افزایش می‌یابد. همچنین، در بذرهای آفتابگردان زوال طی انبارداری به کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون ردوکتاز منجر شد (Kibinza *et al.*, 2006; Bailly *et al.*, 1996). در بادام زمینی نیز با افزایش دوره زوال (تسریع پیری) فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز کاهش یافت (Sung and Jeng, 1994). همچنین، کاهش فعالیت آنزیم‌های پالاینده

لیپیدها است.

زوال در این گیاه می‌گردد. این نتایج به روشنی بیانگر این مطلب است که بین کاهش فعالیت آنزیم‌های پالاینده رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون لیپید و زوال بذر کدوى تخم کاغذى طی پیری ارتباط وجود دارد و می‌توان بیان داشت که یکی از علت‌های اصلی زوال در بذر کدوى تخم کاغذى طی انبارداری پراکسیداسیون

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به خاطر فراهم نمودن امکانات اجرای این طرح، قدردانی می‌نمایند.

منابع

- Abba, E. J. and Lovato, A. (1999) Effect of seed storage temperature and relative humidity on maize (*Zea mays* L.) seed viability and seed vigor. *Seed Science and Technology* 27: 101-114.
- Alscher, R. G., Erturk, N. and Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Aroiee, H. and Omidbaigi, R. (2004) Effects of nitrogen fertilizer on productivity medicinal pumpkin. *Acta Horticulture* 629: 415-419.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 235-241.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, M. F. and Come, D. (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum* 97: 104-110.
- Basra, S. M. A., Ahmad, N., Khan, M. M., Iqbal, N. and Cheema, M. A. (2003) Assessment of cottonseed deterioration during accelerated ageing. *Seed Science and Technology* 31: 531-540.
- Benech-Arnold, R. L. and Sanchez, R. A. (2004) Handbook of seed physiology: application to agriculture. Food Products Press, Binghamton, New York.
- 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.
- Bowler, C., Van Montagu, M. and Inze, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116.
- Braccini, A. D. L., Reis, M. S., Moreira, M. A., Sedyama, C. S. and Scapim, C. A. (2000) Biochemical changes associated to soybean seeds osmoconditioning during storage. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 433-447.
- Chang, S. M. and Sung, J. M. (1998) Deteriorative changes in primed sweet corn seeds during storage. *Seed Science and Technology* 26: 613-626.
- Chiu, K. Y., Wang, C. S. and Sung, J. M. (1995) Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging and hydration of watermelon seeds differing in ploidy. *Physiologia Plantarum* 94: 441-446.
- Clerkx, J. M., Vaies, H. B., Ruys, G. J., Groot, S. P. C. and Koornneef, M. (2004) Genetic differences

- in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. *Physiologia Plantarum* 121: 448-461.
- 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.
- Du, Z. and Bramlage, W. J. (1992) Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1566-1570.
- Esashi, Y., Kamataki, A. and Zhang, M. (1997) The molecular mechanism of seed deterioration in relation to the accumulation of protein-acetaldehyde adducts. In: Basic and applied aspects of seed biology (Eds. Ellis, R. H., Black, M., Murdoch, A. J. and Hong, T. D) 489-498. Kluwer Academic Publisher, Boston.
- Freitas, R. A., Dias, D. C. F. S., Olivira, M. G. A., Dias, L. A. S. and Jose, I. C. (2006) Physiological and biochemical changes in naturally and artificially aged cotton seeds. *Seed Science and Technology* 34: 253-264.
- Ghaderi-Far, F. (2009) The study of seed quality development, germination, longevity and deterioration in some medicinal plants: medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo* L. subsp. *Pepo*. *Convar.* var. *styriaca* Greb), borago (*Borago officinalis* L.) and black cumin (*Nigella sativa* L.). PhD thesis. Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran (in Persian).
- Ghaderi-Far, F. and Soltani, A. (2011) Seed testing and control. Jihad Daneshgahi Mashhad Press, Mashhad, Iran (in Persian).
- Ghaderi-Far, F., Soltani, A. and Sadeghipour, H. R. (2011a) Changes in seed quality during seed development and maturation in medicinal pumpkin. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 17: 249-257.
- Ghaderi-Far, F., Soltani, A. and Sadeghipour, H. R. (2011b). Determination of seed viability constants in medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo* L. subsp. *Pepo*. *Convar.* var. *styriaca* Greb), borago (*Borago officinalis* L.) and black cumin (*Nigella sativa* L.). *Journal of Plant Production* 17(3): 53-66 (in Persian).
- Gillham, D. J. and Dodge, A. D. (1986) Hydrogen peroxide scavenging systems within pea chloroplasts. *Planta* 167: 246-251.
- Girard, J. and Le Meste, M. (1992) Absence de relation entre le taux de radicaux libres meure par RPE et la viabilite des semences de ble. *C R Acad Science Paris* 111: 417-422.
- 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.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 12: 189-198.
- Hendry, G. (1993) Evolutionary origins and natural function: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* 123: 3-14.
- Hong, T. D. and Ellis, R. H. (1996) A protocol to determine seed storage behaviour. International Plant Genetic Resources Institute, The University of Reading, Reading.
- Hsu, C. C. and Sung, J. M. (1997) Antioxidant role of glutathione associated with accelerated aging and hydration of triploid watermelon seeds. *Physiologia Plantarum* 100: 967-974.

- Hsu, C. C., Chen, C. L., Chen, J. J. and Sung, J. M. (2003) Accelerated aging-enhanced lipid peroxidation in bitter melon seeds and effects of priming and hot water soaking treatment. *Scientia Horticulturae* 98: 201-212.
- Kalpana, R. and Madhava Rao, K. V. (1994) Absence of the role of lipid peroxidation during accelerated ageing of seeds of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) cultivars. *Seed Science and Technology* 22: 253-260.
- Kalpana, 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., Kumar, H. and Amir, A. (2011) Physiological and biochemical changes during seed deterioration in aged seeds of rice. *American Journal of Plant Physiology* 6: 28-35
- Kar, M. and Mishra, D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57: 315-319.
- Kibinza, A., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J. M. and Corbineau, F. (2011) Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science* 181: 309-315.
- Kibinza, A., Vinel, D., Come, D., Bailly, C. and Corbineau, F. (2006) Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. *Physiologia Plantarum* 128: 496-506.
- Li, J., Zhang, Y., Yu, Z., Wang, Y., Yang, Y., Liu, Z. and Jiang, J. (2007) Superior storage stability in low lipoxygenase maize varieties. *Journal of Stored Products Research* 43: 530-534.
- Linn, S. S. and Pearce, R. S. (1990) Changes in lipids in bean seeds and corn caryopses aged in contrasting environments. *Annals of Botany* 65: 452-456.
- Luck, H. (1962) Catalase. In: *Methods of enzymatic analysis* (Ed. Bergmeyer, H. U) 885-894. Verlage Chemie Academic Press, Weinheim.
- McDonald, M. B. (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology* 27: 177-237.
- Mohammadi, H., Soltani, A., Sadeghipour, H. R. and Zeinali, E. (2011) Effects of seed ageing on subsequent seed reserve utilization and seedling growth in soybean. *International Journal of Plant Production* 5: 65-70.
- 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.
- Murthy, U. M. N., Liang, Y., Kumar, P. P. and Sun, W. Q. (2002) Non-enzymatic protein modification by the Maillard reaction reduces the activities of scavenging enzymes in *Vigna radiate*. *Physiologia Plantarum* 115: 213-220.
- Priestley, D. A. (1986) *Seed ageing*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Pukacka, S. and Ratajczak, E. (2005) Production and scavenging of reaction oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. *Journal of Plant Physiology* 162: 873-885.
- 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.

- Resenda, M. L. V., Nojosa, G. B. A., Cavalcanti, L. S., Aguilar, M. A. G., Silva, L. H. C. P., Perez, J. O., Andrade, G. C. G., Carvalho, G. A. and Castro, R. M. (2002) Induction of resistance in cocoa against *crinipellis perniciososa* and *verticillium dahliae* by acibenzolar-s-methyl (ASM). *Plant Pathology* 51: 621-628.
- Roberts, E. H. (1986) Quantifying seed deterioration. In: *Physiology of seed deterioration* (Eds. McDonald, M. B. and Nelson, C. J) 101-123. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sharma, S., Gambhir, S. and Munshi, S. K. (2007) Changes in lipid and carbohydrate composition of germinating soybean seeds under different storage conditions. *Asian Journal of Plant Science* 6: 502-507.
- Shekaramurthy, S., Patkar, K. L., Shetty, S. A., Prakasg, H. S. and Shetty, H. S. (1994) Effect of thiram treatment on sorghum seed quality in relation to accelerated ageing. *Seed Science and Technology* 22: 607-617.
- Smit, I. K., Vierheller, T. L. and Thorne, C. (1989) Properties and function of glutathione reductase in plants. *Physiologia Plantarum* 77: 449-456.
- Smith, M. T. and Berjak, P. (1995) Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: *Seed development and germination* (Eds. Kigel, J. and Galili, G.) 701-746. Marcel Dekker, New York.
- Stewart, R. R. C. and Bewley, J. D. (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean. *Plant Physiology* 65: 245-248.
- Sung, J. M. and Jeng, T. L. (1994) Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. *Physiologia Plantarum* 91: 51-55.
- TeKrony, D. M., Nelson, O., Egli, D. B. and White, G. M. (1993) Predicting soybean seed germination during warehouse storage. *Seed Science and Technology* 21: 127-137.
- Torres, M., De Paula, M., Perez-Otaola, M., Darder, M., Frutos, G. and Martinez-Honduvilla, C. J. (1997) Aging-induced changes in glutathione system of sunflower seeds. *Physiologia Plantarum* 101: 807-814.
- Trawatha, S. E., TeKrony, D. M. and Hildebrand, D. F. (1995) Soybean lipoxygenase mutants and seed longevity. *Crop Science* 35: 862-868.
- Walters, C. (1998) Understanding the mechanisms and kinetics of seed ageing. *Seed Science Research* 8: 223-244.
- Wilson, D. and McDonald, M. B. (1986) The lipid peroxidation model of seed aging. *Seed Science and Technology* 14: 269-300.

Biochemical changes during ageing in medicinal pumpkin: lipid peroxidation and membrane damage

Farshid Ghaderi-Far ^{1*}, Afshin Soltani ¹ and Hamid Reza Sadeghipour ²

¹ Department of Agronomy, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

² Department of Biology, Faculty of Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran

Abstract

Seeds gradually lose their viability during storage. The damage that occurs at the biochemical level can alter the seed physiological status and is affected by the storage conditions of the seed. The lipid peroxidation through the production of free radical plays an important role in the loss of seed viability during seed storage. In the present study, we examined the relationship between the activity of free radical detoxifying enzymes, lipid peroxidation and seed deterioration in medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo* subsp. *Pepo*. *Convar.* *Pepo* var. *styriaca* Greb) during storage. The seeds were incubated at different storage temperatures (35 and 5°C) and seed moisture content (5, 8 and 14%) for 2 and 4 days. Malondialdehyde content in seed was increased during storage with increasing moisture content and temperature, suggesting that seed deterioration was associated with lipid peroxidation. The increase in lipid peroxidation was related with increased electrical conductivity, which suggested membrane damage during deterioration. The decrease in germination was also associated with a decrease in catalase and peroxidase activity and as a result, the antioxidant system was not sufficient to protect seeds against free radical damage. Thus, medicinal pumpkin seed deterioration was closely related to decrease in the activities of free radical detoxifying enzymes and increased lipid peroxidation.

Key words: Antioxidant, Ageing, Germination, Electrical conductivity

* Corresponding Author: akranghaderi@gau.ac.ir