Ageing Mechanisms in Chickpea Seeds: Relationship of Sugar Hydrolysis and Lipid Peroxidation with Amadori and Millard Reactions

Mahdi Shaban [1], Farshid Ghaderi-Far [*1], Hamid Reza Sadeghipour [2] and Ahad Yamchi [3]

[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
[3] Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract
This experiment was performed in order to study on ageing mechanisms of chickpea seeds (*Cicer arietinum* L.) in natural storage and accelerated ageing conditions in seed laboratory of Gorgan Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran at 2015. Experiment was in completely randomized design arrangement with four replications. Treatments were 2 and 4 years natural storage and 1-5 days of accelerated ageing with control treatment. The results showed that with increasing of natural storage and accelerated ageing duration, germination percentage was decreased. Increasing of ageing duration decreased soluble sugars, non-reducing sugars and soluble proteins but lipid peroxidation, reducing sugars, protein carbonylation and Amadori and Millard reaction were increased. In natural storage condition lipid peroxidation was more than sugar hydrolysis but in accelerated ageing condition sugar hydrolysis was more than lipid peroxidation. These results show that the main reason of Amadori and Millard reaction in chickpea seeds in natural storage condition is lipid peroxidation and in accelerated ageing condition is sugar hydrolysis. Also, the results showed that Amadori reaction in natural storage condition was more than Amadori reaction and in accelerated ageing condition Millard reaction was more than Amadori reaction. The results of the present study showed that sever Millard reaction after Amadori reaction induced higher damage on seed and results to more decrease of seed viability and reduce of seed germination percentage in accelerated ageing than natural storage.
Keywords: Storage, Germination, Accelerated Ageing, Reducing Sugars.

* Corresponding Author: farshidghaderifar@yahoo.com

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال نهم، شماره سی و یکم، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۲۰-۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۲۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۱۰/۲۸

ساز و کار زوال در بذر نخود، ارتباط هیدرولیز قندها و پراکسیداسیون لیپید با واکنش‌های آمادوری و مایلارد

مهدی شعبان [۱]، فرشید قادری‌فر [*۱]، حمیدرضا صادقی‌پور [۲] و احد یامچی [۳]
[۱] گروه زراعت، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران
[۳] گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده

این آزمایش برای مطالعهٔ ساز و کارهای زوال در بذر نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L.) در شرایط انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی در آزمایشگاه تحقیقات بذر دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۴ انجام شد. آزمایش به‌صورت طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تیمارها شامل انبارداری طبیعی دو و چهار سال و زوال مصنوعی یک تا پنج روز با آزمون تسریع پیری با تیمار شاهد بودند. نتایج نشان داد با افزایش دورهٔ زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی، درصد جوانه‌زنی کاهش یافت. با افزایش مدت زوال قندهای محلول، قندهای غیراحیایی و پروتئین محلول کاهش یافت؛ ولی میزان پراکسیداسیون لیپید، قندهای احیایی، نشاسته و کربونیلاسیون پروتئین و واکنش‌های آمادوری و مایلارد افزایش یافتند. در شرایط انبارداری طبیعی، میزان پراکسیداسیون لیپید بیشتر از هیدرولیز قندها ولی در شرایط زوال مصنوعی هیدرولیز قندها بیشتر از پراکسیداسیون لیپید بود. این نتایج نشان می‌دهد که دلیل اصلی وقوع واکنش‌های آمادوری و مایلارد در بذرهای نخود و در شرایط انبارداری طبیعی، پراکسیداسیون لیپید و در شرایط زوال مصنوعی، هیدرولیز قندها است. همچنین نتایج نشان داد در شرایط انبارداری طبیعی نسبت به زوال مصنوعی، میزان واکنش آمادوری، بیشتر ولی واکنش مایلارد به میزان کمتری انجام شد؛ درحالی‌که، در شرایط زوال مصنوعی، میزان واکنش مایلارد بیشتر و واکنش آمادوری کمتری انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که در شرایط زوال مصنوعی شدید، وقوع شدید واکنش مایلارد پس از واکنش آمادوری، خسارت بیشتری را به بذر اعمال کرد و در نهایت، قابلیت حیات بذر را کاهش و افت بیشتر درصد جوانه‌زنی را در شرایط زوال مصنوعی نسبت به انبارداری طبیعی سبب شد.

واژه‌های کلیدی: انبارداری ، جوانه‌زنی، زوال تسریع شده و قندهای احیایی.

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: farshidghaderifar@yahoo.com ، شماره تماس: ۰۱۷۳۲۴۲۷۰۶۰

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

در مدت انبارداری، قابلیت حیات بذرها کاهش می‌یابد و این پدیده به‌طور طبیعی در همهٔ بذرها اتفاق می‌افتد و سرعت وقوع آن به وضعیت فیزیولوژیک، ساختار بذر و شرایط انبارداری آن‌ها بستگی دارد (Ghaderi-Far *et al*., 2014a). انبارداری طولانی مدت و زوال تسریع شده، کاهش قدرت حیات و در نتیجه، کاهش درصد جوانه‌زنی بذرها را در شرایط مزرعه‌ای سبب می‌شود. Tahmasebi و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که زوال، کاهش درصد جوانه‌زنی بذرها را سبب می‌شود و علت اصلی این پدیده کاهش قابلیت حیات بذر در مدت زوال است.

در شرایط زوال مصنوعی و همچنین انبارداری طبیعی، برخی تغییرات بیوشیمیایی زمینه‌ساز زوال بذر می‌شوند (McDonald, 1999). نظریه‌های محتمل در زمینهٔ علت وقوع زوال در بذرها، خسارت به سیستم‌های زیستی بذر توسط گونه‌های فعال اکسیژن است. گونه‌های فعال اکسیژن در فرایندهایی از قبیل پراکسیداسیون لیپید، غیرفعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرفعال شدن و تغییر شکل پروتئین‌های دخیل در فرایندهای زیستی و تخریب غشای سلولی تولید می‌شوند (McDonald, 1999; Walters, 1998). به گفتهٔ Ghaderi-Far و همکاران (۲۰۱۴b) در مدت زوال بذر، رادیکال‌های آزاد با اثر خود بر پراکسیداسیون لیپید تسریع این پدیده را سبب می‌شوند.

با وجود تفاوت‌هایی که در شرایط وقوع زوال در شرایط مصنوعی و طبیعی وجود دارد این پرسش وجود دارد که آیا در این دو شرایط، سازوکارهای دخیل در زوال بذر مشابه‌اند یا متفاوت؟ با توجه به بالا بودن رطوبت و دمای محیط در شرایط زوال مصنوعی، ممکن است سازوکارهای زوال در این شرایط نسبت به شرایط انبارداری طبیعی متفاوت باشد (Murthy and Sun, 2000). Walters (۱۹۹۸) بیان کرد که در وقوع زوال بذر، سازوکارهای متعددی وجود دارند. Wilson و McDonald (۱۹۹۹) اظهار داشتند که پراکسیداسیون لیپید و تخریب و کاهش فسفولیپیدهای غشا علت های اصلی زوال بذر هستند. در پژوهش‌های Koostra و Harrington (۱۹۶۹) روی بذرهای خیار، Priestley و Leopold (۱۹۸۳) روی بذرهای سویا و Matsuda و Hirayama (۱۹۷۳) روی بذرهای برنج بیان شد که پراکسیداسیون لیپید و تخریب فسفولیپیدهای غشاء نقش اندکی در زوال بذر در شرایط انبارداری طبیعی دارند یا هیچ نقشی در این زمینه ندارند. این نظریه‌ها به این دلیل است که در شرایط انبارداری طبیعی که دما و رطوبت محیط اندک است، سیتوپلاسم بذرها در یک حالت شیشه‌ای می‌باشند که ویسکوزیتهٔ (گرانروی) زیاد و محتوای آب اندکی دارند که در این شرایط، تحرک مولکولی اندک در سیتوپلاسم، از وقوع بسیاری از فرایندهای آسیب‌رسان جلوگیری می‌کند (Leopold *et al*., 1994). در شرایط زوال مصنوعی که با افزایش دما و رطوبت نسبی محیط همراه است، ویسکوزیته سیتوپلاسم بذر کاهش می‌یابد و حالت ژله‌ای به خود می‌گیرد و در نتیجه، تحرک مولکولی و احتمال وقوع فرایندهای آسیب‌رسان به سرعت افزایش می‌یابد (Murthy and Sun, 2000).

از جمله تغییراتی که در مدت زوال بذر ایجاد می‌شود تغییرات پس از ترجمه در پروتئین‌ها است

(Hana and Salwa, 2014). از جملهٔ این تغییرات، فرایندی به نام کربونیلاسیون پروتئین‌ها است که در آن، یکی از گونه‌های اکسیژن فعال به‌طور مستقیم به پیوند کربن - هیدروژن در پروتئین یا قند حمله می‌کند و گونه‌های کربونیل فعال تولید می‌کند که با پروتئین‌ها واکنش می‌دهند (Grune *et al*., 2013). کربونیلاسیون پروتئین‌ها در نهایت، کاهش عملکرد طبیعی و فعالیت کاتالیتیک پروتئین‌های هدف را باعث می‌شود (Nystrom, 2005). در مدت زوال، فرایند کربونیلاسیون پروتئین با شدت بیشتری انجام می‌شود (Dalle-Donne *et al*., 2003).

فرایند پراکسیداسیون لیپید با تولید آلدهیدها، کتون‌ها و الکل‌ها و فرایند هیدرولیز قندها با تولید قندهای احیایی، از دلایل اصلی زوال بذر با راه‌اندازی واکنش‌های غیرآنزیمی آمادوری و مایلارد هستند. این فرایندها در هر دو شرایط زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی اتفاق می‌افتند (Murthy and Sun, 2000). واکنش‌های آمادوری و مایلارد یک‌سری از واکنش‌های پیچیده هستند که به دنبال واکنش کربونیل - آمین اولیه انجام می‌شوند. این واکنش‌ها به‌طور کلی چهار مرحله هستند: ۱) تجمع غیرآنزیمی قندهای احیایی، آلدهید یا کتون‌ها که با گروه آمینی پروتئین‌ها یا نوکلئیک اسیدها ترکیب می‌شوند و تشکیل گلوکوزیل آمین می‌دهند (مرحلهٔ بازگشت‌پذیر)؛ ۲) بازترتیبی گلوکوزیل آمین و در نهایت، تجمع تولیدهای آمادوری از قبیل ۱- آمینو -آلفا - داکسی کتوز؛ ۳) تخریب و دهیدراسیون تولید های آمادوری به ترکیبات حد واسط آمینو یا کربونیل؛ ۴) واکنش ترکیبات حدواسط کربونیل با دیگر گروه‌های آمینو و به‌دنبال آن بازترتیبی و تولید ترکیبات نهایی گلیکوزیلاسیون (Murthy and Sun, 2000). این واکنش‌ها قابلیت حیات بذرها را کاهش می‌دهند (Baker and Bradford, 1994). Wettlaufer و Leopold (۱۹۹۱) بیان کردند که تجمع تولیدهای آمادوری و مایلارد کاهش جوانه‌زنی را در بذرهای سویا موجب شد. محور جنینی بذرها در تشکیل تولیدات آمادوری مستعد است. بین تجمع تولیدات آمادوری و پراکسیداسیون لیپیدی همبستگی وجود دارد (Murthy *et al*., 2003). بررسی‌ها نشان داده‌اند که زوال تسریع‌شده، کاهش قابلیت حیات بذرهای گندم را سبب شده که همگام با تجمع تولیدهای مایلارد بوده است (McDonald, 1999). نتایج کار Strelec و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد در مدت زوال، گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌های بذر گندم، به شکل‌گیری گلیکوزیل آمین در واکنش آمادوری منجر می‌شود. آن‌ها بیان کردند که شکل‌گیری تولیدات آمادوری به شرایط نگه‌داری بذر بستگی دارد. در بذرهای ماش (Wettlaufer and Leopold, 1991) و سویا (Murthy *et al*., 2003) زوال بذر، افزایش تجمع تولیدات آمادوری را سبب می‌شود. شرایط دمای پایین نگه‌داری بذرها، تغییرات اندکی در میزان تجمع تولیدات آمادوری سبب شد (Strelec *et al*., 2008). وقوع واکنش مایلارد خسارت به آنزیم‌ها و کاهش فعالیت آنزیمی را سبب می‌شود (Gamer *et al*., 1987 Bonneau) و همکاران (۱۹۹۴) گزارش کردند که زوال، خسارت به آنزیم‌های هیدرولیتیک را در بذر سویا و کاهش انتقال ذخایر و در نتیجه، کاهش درصد جوانه‌زنی را سبب می‌شود. Murthy و همکاران

(۲۰۰۳) بیان کردند که در بذرهای ماش، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به واکنش‌های مایلارد حساس هستند. Taniguchi و همکاران (۱۹۸۹) بیان کردند که وقوع واکنش‌های مایلارد به کاهش میزان فعالیت آنزیم‌هایی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز منجر می‌شود. Murthy و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که قابلیت حیات بذرها به تجمع تولیدهای مایلارد حساس است و وقوع این واکنش، کاهش قابلیت حیات بذر را موجب می‌شود. آن ها بیان کردند که تجمع تولیدهای مایلارد، حتی پس از ازبین‌رفتن کامل قابلیت حیات بذر و تبدیل آن به بذر مرده، ادامه دارد. Sun و Leopold (۱۹۹۵) بیان کردند که تجمع تولیدهای مایلارد در بذرهای زوال‌یافته اتفاق می‌افتد؛ ولی در بذرهای خشک نسبت به آب‌نوشی شده کمتر است. در رطوبت بذر حدود ۸ تا ۱۲ درصد، دلیل اصلی وقوع واکنش‌های آمادوری و مایلارد، پراکسیداسیون لیپید است. هنگامی‌که رطوبت بذر به کمتر از ۶ درصد برسد، به‌دلیل اینکه بذرها در حالت شیشه‌ای قرار دارند و قندها هیدرولیز نمی شوند، دلیل اصلی زوال، اکسیداسیون خودبه‌خودی لیپیدها است؛ ولی در رطوبت‌های بیشتر، به دلیل هیدرولیز بیشتر قندها، دلیل اصلی زوال بذر، تجمع قندهای احیایی و وقوع واکنش‌های آمادوری و مایلارد است (McDonald, 1999).

شناخت سازوکارهای دخیل در زوال بذر، علاوه بر کمک به پژوهش‌های بعدی دربارهٔ زوال بذر، درک بهتر چگونگی وقوع زوال بذر را ممکن می‌کند. بر همین اساس می‌توان اعمال مدیریتی را برای انبارداری بذرها و افزایش مدت نگه‌داری آن‌ها در انبار به کار برد. در حال حاضر، اطلاعات دربارهٔ شناخت سازوکارهای شرکت‌کننده در زوال، اندک است و به آزمایش‌های بیشتری برای یافتن سازوکارهای دخیل در زوال بذر به‌ویژه سازوکارهای شروع‌کنندهٔ زوال، در شرایط انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی نیاز است. از این‌رو هدف از انجام این پژوهش، بررسی سازوکارهای دخیل در زوال بذرهای نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L.) در شرایط انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی و تفاوت‌های بین این‌دو است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر، در آزمایشگاه تحقیقات بذر دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹۴ انجام شد. در این آزمایش بذر های نخود رقم هاشم که به‌مدت دو و چهار سال در شرایط طبیعی انبار نگه‌داری شده بودند، تیمارهای زوال طبیعی در نظر گرفته شدند. بذرهای تازه برداشت شده برای نمونه‌های شاهد و تیمارهای زوال مصنوعی استفاده شدند. برای شبیه‌سازی زوال مصنوعی، بذرهای نخود در ظروف پلاستیکی به ابعاد ۳/۵×۱۱×۱۱ سانتی‌متر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شدند؛ سپس درب ظرف‌ها کاملاً بسته شد و به مدت یک، دو، سه، چهار و پنج روز در دمای ثابت۴۳ درجهٔ سانتیگراد داخل انکوباتور قرار داده شد. در مدت آزمایش، رطوبت نسبی داخل ظرف‌های پلاستیکی ۱۰۰ درصد بود.

برای انجام آزمون جوانه‌زنی، در هر تیمار زوال طبیعی و مصنوعی چهار تکرار ۲۵ تایی از بذرها شمارش و روی دو عدد کاغذ حوله‌ای به ابعاد ۴۵×۳۰ سانتی‌متر قرار داده شد. روی بذرها با کاغذ دیگری

پوشانده شد و به مدت هشت روز در دمای ۲۰ درجهٔ سانتیگراد قرار داده شد (Mohammadi *et al*., 2010). معیار جوانه‌زنی، خروج ریشه‌چه به میزان دو میلی‌متر در نظر گرفته شد (Soltani *et al*., 2006).

برای اندازه‌گیری صفات زیست‌شیمیایی مربوط به سازوکار زوال بذر نخود، از بذرهایی استفاده شد که به‌مدت ۱۴ ساعت آب‌نوشی کرده بودند و وارد مرحلهٔ دوم آب‌نوشی شده بودند. برای تعیین مراحل مختلف آب‌نوشی بذرهای نخود، از هر تیمار سه تکرار از بذرهای نخود، درون پتری‌دیش و به مدت ۵۲ ساعت در دمای ۲۰ درجهٔ سانتیگراد آب‌نوشی شدند و مراحل مختلف آب‌نوشی تعیین شد.

استخراج قندهای محلول، با اتانول و طبق روش Omokolo و همکاران (۱۹۹۶) با تغییراتی انجام شد. برای اندازه‌گیری قند کل، ۱۰۰ میکرولیتر از عصارهٔ الکلی تغلیظ شده و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجهٔ سانتیگراد قرار داده شد؛ سپس میزان جذب نور هریک از تیمارها پس از سردشدن، با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV-1800، شرکت Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد و با مقایسه با نمودار استاندارد گلوکز، میزان قند کل اندازه‌گیری شد (McCready *et al*., 1950).

برای اندازه‌گیری قندهای احیایی، ۱/۵ میلی‌لیتر از عصارهٔ تغلیظ شدهٔ حاوی قندهای محلول، با ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۰ درجهٔ سانتیگراد قرار گرفت. بلافاصله، ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم سدیم تارتارات ۴۰ درصد به آن افزوده شد و پس از سردشدن لوله‌ها، جذب نمونه در طول موج ۵۷۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. با مقایسهٔ نمودار استاندارد قندهای احیایی (گلوکز)، میزان قندهای احیایی هر یک از نمونه‌ها محاسبه و اندازه‌گیری شد (Miller, 1959).

برای اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصارهٔ الکلی تغلیظ‌شده، با ۰/۱ میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم ۳۰ درصد مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجهٔ سانتیگراد قرار داده شد. پس از سردشدن لوله‌ها، ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون به آن افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۴۰ درجهٔ سانتیگراد قرار گرفتند؛ سپس جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. با مقایسهٔ نمودار استاندارد ساکارز، قندهای غیراحیایی محاسبه شدند (Handel, 1968).

برای استخراج و اندازه‌گیری نشاسته از روش McCready و همکاران (۱۹۵۰) با تغییراتی استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصارهٔ حاوی نشاسته استخراج شد. در مرحلهٔ بعد با ۳ میلی‌لیتر از معرف آنترون مخلوط شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجهٔ سانتیگراد قرار گرفت. پس از سردشدن لوله‌ها، جذب آن‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر با دستگاه خوانده شد. برای اندازه‌گیری مقدار نشاسته، از نمودار استاندارد قند کل (گلوکز) استفاده شد.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید به روش Du و Bramlage (۱۹۹۲) با تغیراتی انجام شد. در این روش میزان پراکسیداسیون لیپید براساس مقدار مالون‌دیآلدهید (MDA) موجود در هر عصاره، با دستگاه اسپکتروفتومتر و طبق رابطهٔ ۱ محاسبه شد.

$$LP=[[(A_{532}-A_{600})-[(A_{440}-A_{600})\ (MA)]]/157000]\times10^{6}$$

رابطهٔ ۱:

در این رابطه، LP، مقدار مالون‌دی‌آلدهید بر حسب نانومول بر میلی‌لیتر و MA، جذب مولی ساکارز در غلظت‌های ۱ تا ۱۰ میلی‌مولار در ۵۳۲ و ۴۴۰ نانومتر است که به‌ترتیب ۸/۴ و ۱۴۷ محاسبه شد که نسبتی معادل ۰/۰۵۷۱ است (Du and Bramlage, 1992). میزان پراکسیداسیون لیپید بر اساس نانومول مالون‌دی‌آلدهید موجود به ازای هر گرم بذر بیان شد.

برای اندازه‌گیری پروتئین محلول، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بافت بذری (برمبنای وزن تازه) با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج، هموژنیزه شد. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها، از فاز بالایی برای اندازه‌گیری پروتئین محلول استفاده شد. برای اندازه‌گیری پروتئین محلول، ۱۰ میکرولیتر از عصارهٔ پروتئینی به لوله‌های آزمایش منتقل و به آن ۹۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. به محلول حاصل، ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه و به مدت ۲ دقیقه مخلوط شد. پس از ۲۰ دقیقه، میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان پروتئین محلول در هر یک از تیمارها، با مقایسه با نمودار استاندارد پروتئین، تعیین شد (Bradford, 1976).

برای استخراج و دیالیز پروتئین‌ها به‌منظور اندازه‌گیری واکنش‌های آمادوری، مایلارد و کربونیلاسیون پروتئین‌ها، ابتدا ۰/۵ گرم بافت بذری (بر مبنای وزن تازه) با شش میلی‌لیتر بافر استخراج، کاملاً هموژنیزه شد. عصارهٔ حاصل، پس از صاف‌شدن و سانتریفیوژ، به مدت ۱۶ ساعت داخل لوله‌های دیالیز با کات آف ۸۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ کیلودالتون دیالیز شد. از عصارهٔ حاصل، برای اندازه‌گیری تولید آمادوری، مایلارد و کربونیلاسیون پروتئین‌ها استفاده شد (Sun and Leopold, 1995).

اندازه‌گیری محصولات آمادوری در پروتئین بذر نخود بر اساس روش Wettlaufer و Leopold (۱۹۹۱)، با نیترو بلو تترازولیوم انجام شد. بدین‌منظور، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصارهٔ دیالیزشده به یک میلی‌لیتر از معرف نیترو بلو تترازولیوم ۰/۵ میلی‌مولار در سدیم کربنات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر ۱۰/۳، اضافه شد. محلول بلانک، حاوی ۱۱۰۰ میکرولیتر معرف نیترو بلو تترازولیوم بود. تغییرات جذب هر نمونه در طول موج ۵۵۰ نانومتر به مدت ۱۰ دقیقه و هر ۳۰ ثانیه یک‌بار با دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت و فاصلهٔ زمانی صفر تا ۸ دقیقه برای محاسبهٔ میزان محصولات آمادوری، استفاده شد.

میزان محصولات مایلارد با اندازه‌گیری میزان فلوئورسانس پروتئین‌های استخراج شده از بذر با دستگاه اسپکتروفلوئوریمتر (مدل F-2500، شرکت Hitachi، ژاپن) اندازه‌گیری شد (Sun and Leopold, 1995). بدین منظور، برای هر یک از نمونه‌ها به‌طور جداگانه در تکرار اول، میزان ۰/۳ گرم از پروتئین با طیف طول موج ۳۲۰ تا ۴۱۰ نانومتر تحریک و در طول موج ساطعی ۲۷۰ تا ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. پیک به‌دست آمده در همهٔ نمونه‌ها، با اندکی تغییر، ۳۷۰/۴۴۰ به دست آمد؛ سپس میزان تجمع تولیدهای مایلارد در سایر تکرارهای هر نمونه، با این دامنهٔ طول موج اندازه‌گیری شد.

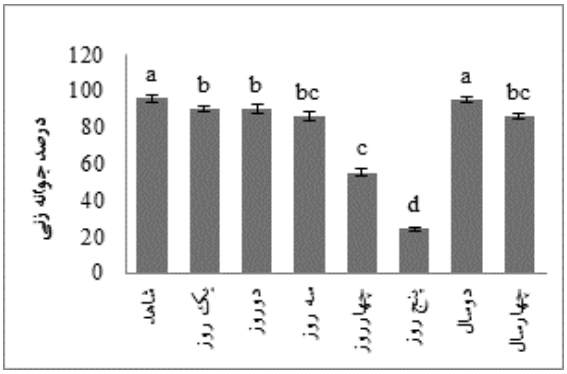
میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها بر اساس روش Reznick و Packer (۱۹۹۴) با اسپکتوفتومتری و با

یک میلی‌لیتر از عصارهٔ پروتئینی به دست آمده از عمل دیالیز (در محلول دی نیتروفنیل هیدرازین ۱۰ میلی‌مولار در کلریدریک اسید ۲/۵ مولار) اندازه‌گیری شد. پس از استخراج پروتئین‌های کربونیل، جذب نمونه‌ها با تیمار بلانک آن‌ها در طول موج ۳۷۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده و میزان کربونیلاسیون پروتئین، با ضریب خاموشی کمپلکس پروتئین - فنیل هیدرازین به مقدار ۲۲۰۰۰ بر مولار بر سانتی‌متر، اندازه‌گیری شد.

تجزیهٔ داده‌ها با نرم افزار SAS و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج

نتایج این پژوهش نشان داد که در تیمارهای زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی، قابلیت جوانه‌زنی بذر با افزایش شدت زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی کاهش یافت. با افزایش تعداد روزهای زوال، درصد جوانه‌زنی بذرها کاهش یافت؛ به‌طوری‌که بیشترین میزان جوانه‌زنی در تیمار شاهد به میزان ۹۶ درصد و کمترین میزان جوانه‌زنی به میزان ۲۴ درصد در تیمار پنج روز زوال، مشاهده شد (شکل ۱). در تیمار سه روز زوال، درصد جوانه‌زنی بذرها نسبت به شاهد حدود ۱۵ درصد کاهش یافت و در تیمار چهار سال انبارداری نیز افت جوانه‌زنی بذرها به همین میزان بود. در تیمارهای انبارداری طبیعی دو و چهار سال نسبت به تیمارهای زوال شدید چهار و پنج روز، افت درصد جوانه‌زنی کمتری مشاهده شد و تیمار سه روز با تیمار چهار سال تفاوت معنی‌داری نداشت.



شکل ۱- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر درصد جوانه‌زنی بذرهای نخود ایرانی - مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

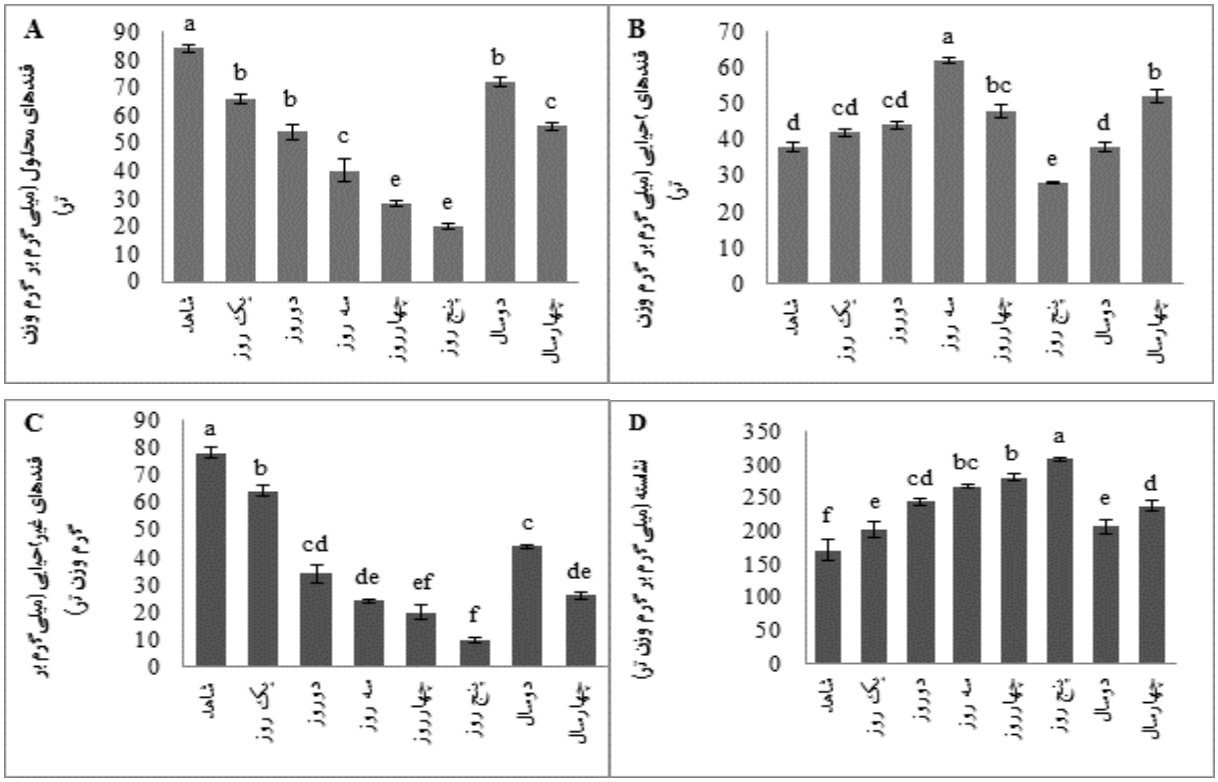
تیمار شاهد، بیشترین و تیمار زوال مصنوعی پنج روز، کمترین میزان قندهای محلول را داشتند. افزایش شدت زوال مصنوعی کاهش میزان قندهای محلول را سبب شد. در حالت انبارداری طبیعی نیز با افزایش مدت انبارداری، میزان قندهای محلول کاهش یافت. زوال مصنوعی شدید چهار و پنج روز نسبت به انبارداری طبیعی دو و چهار سال، اثر بیشتری بر میزان قندهای محلول داشت و کاهش میزان قندهای محلول در تیمارهای زوال مصنوعی چهار و پنج روز، بیشتر از تیمارهای انبارداری طبیعی دو و چهار سال بود. میزان قندهای محلول در انبارداری طبیعی چهار سال تقریبا مشابه زوال مصنوعی سه روز بود (شکل ۲-A).

بیشترین میزان قندهای احیایی، مربوط به تیمار زوال سه روز و کمترین میزان آن نیز مربوط به تیمار زوال مصنوعی پنج روز بود. در زوال مصنوعی، با افزایش روزهای زوال تا سه روز، میزان قندهای احیایی افزایش یافت و از آن به بعد در تیمارهای زوال چهار و پنج روز، روند کاهشی را نشان داد. در تیمارهای زوال طبیعی نیز میزان قندهای احیایی در تیمار انبارداری دو

سال، کمتر از تیمار انبارداری چهار سال بود. در تیمار انبارداری چهار سال، میزان تولید قندهای احیایی، بیشتر از زوال مصنوعی چهار و پنج روز بود؛ در حالی که در انبارداری دو سال، میزان قندهای محلول، تنها از زوال مصنوعی پنج روز، بیشتر و نسبت به سایر تیمارهای زوال مصنوعی، کمتر بود (شکل ۲-B).

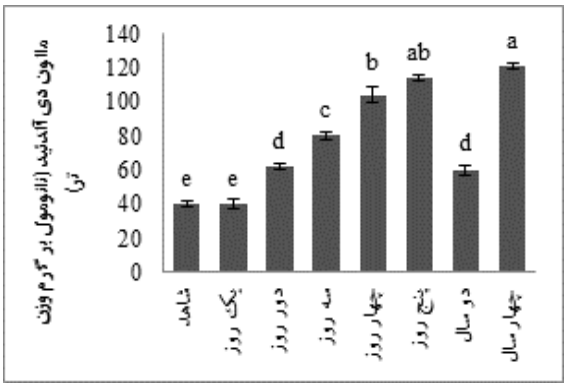
برخلاف قندهای احیایی، تولید قندهای غیراحیایی در زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی روند کاهشی را نشان داد؛ به‌طوری‌که بیشترین میزان تولید قندهای غیراحیایی مربوط به تیمار شاهد و کمترین میزان آن مربوط به تیمار زوال پنج روز بود. تولید قندهای غیراحیایی در تیمار انبارداری چهار سال، بیشتر از تیمارهای زوال مصنوعی سه، چهار و پنج روز بود؛ ولی از سایر تیمارهای زوال مصنوعی، کمتر بود. در تیمارهای انبارداری طبیعی نیز با افزایش مدت انبارداری بذر میزان قندهای غیر احیایی کاهش یافت (شکل ۲-C).

کمترین میزان تجمع نشاسته، در تیمار شاهد دیده شد. بیشترین میزان تجمع نشاسته، مربوط به تیمار زوال پنج روز بود. با افزایش شدت زوال مصنوعی و همچنین افزایش مدت انبارداری طبیعی، پس از ۱۴ ساعت آب‌نوشی بذرها میزان تجمع نشاسته نیز افزایش یافت. تجمع نشاسته در تیمار انبارداری دو سال، مشابه زوال مصنوعی یک روز بود و تنها از تیمار شاهد بیشتر بود؛ ولی در تیمار انبارداری چهار سال، تجمع نشاسته از تیمارهای شاهد و زوال یک روز، بیشتر بود و نسبت به سایر تیمارهای زوال مصنوعی، کمتر بود (شکل ۲-D).



شکل ۲- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان قندهای محلول، احیایی، غیر احیایی و نشاسته در بذرهای آب‌نوشی شدهٔ نخود ایرانی - مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

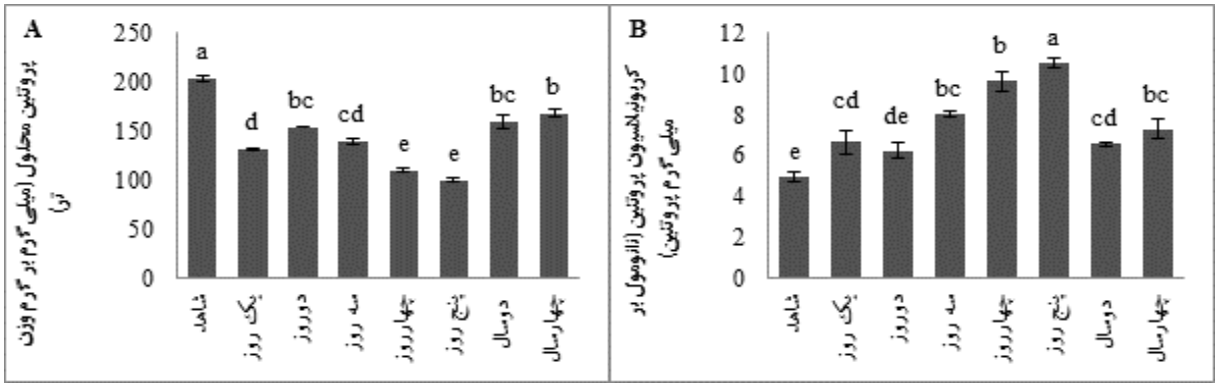
تولید مالون‌دی‌آلدهید در تیمارهای زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی، با افزایش شدت زوال و مدت انبارداری بذر ها، روند افزایشی داشت. بیشترین تولید مالون‌دی‌آلدهید مربوط به تیمار انبارداری چهار سال بود که نشان‌دهندهٔ پراکسیداسیون لیپید بیشتر در این تیمار است (شکل۳). در تیمار انبارداری چهار سال، میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید نسبت به تیمار دو سال، بیشتر بود و تفاوت بین آن‌ها هم معنی‌دار بود. در تیمار بین تیمار زوال دو روز و انبارداری دو سال نیز از این نظر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.



شکل ۳- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان مالون‌دی‌آلدهید بذرهای آب‌نوشی‌شدهٔ نخود ایرانی – مقادیر، میانگین سه تکرار± انحراف معیار است. حروف غیرمشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

با افزایش تعداد روزهای زوال مصنوعی، میزان پروتئین محلول در بذرهای نخود ایرانی روند کاهشی داشت؛ ولی میزان پروتئین محلول، در تیمار زوال دو روز، بیشتر از زوال مصنوعی یک روز بود. میزان پروتئین محلول در حالت انبارداری طبیعی بیشتر از زوال مصنوعی بود و مشاهده شد که بین تیمارهای مختلف انبارداری طبیعی از این نظر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. میزان پروتئین محلول، در تیمارهای انبارداری دو و چهار سال، با تیمار زوال مصنوعی دو روز تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴-A).

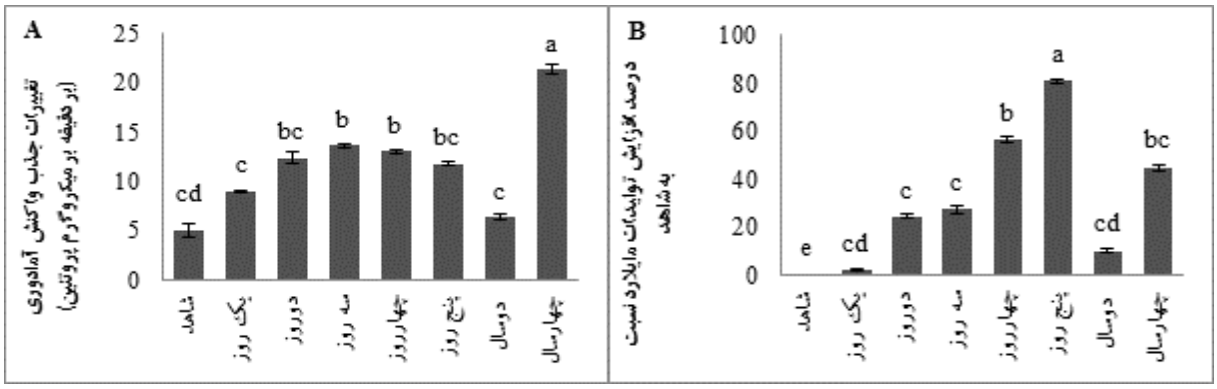
در مدت زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی، تغییراتی در کربونیلاسیون پروتئین بذرهای نخود مشاهده شد. نتایج این بررسی نشان داد که با افزایش شدت زوال مصنوعی و همچنین افزایش مدت انبارداری طبیعی، میزان کربونیلاسیون پروتئین افزایش یافت. میزان کربونیلاسیون پروتئین در تیمارهای انبارداری طبیعی از تیمارهای زوال مصنوعی چهار و پنج روز، کمتر بود. میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها در تیمارهای زوال مصنوعی یک تا چهار روز با تیمارهای انبارداری طبیعی دو و چهار سال تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴-B).



شکل ۴- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر میزان پروتئین محلول و کربونیلاسیون پروتئین‌ها در بذرهای آب‌نوشی‌شدهٔ نخود ایرانی – مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

افزایش مدت انبارداری و همچنین افزایش شدت زوال مصنوعی، افزایش تولید و تجمع محصولات آمادوری را موجب شد. بیشترین میزان تجمع تولیدهای آمادوری مربوط به تیمار انبارداری چهار سال، بود و همچنین تیمار شاهد کمترین میزان تجمع تولیدهای آمادوری را داشت. تجمع تولیدهای آمادوری در تیمارهای زوال مصنوعی تا زوال سه روز، افزایش و در تیمارهای چهار و پنج روز دوباره کاهش یافت. تجمع تولیدهای آمادوری در تیمارهای زوال مصنوعی شدید نسبت به تیمارهای انبارداری طبیعی چهار سال، کمتر بود که نشان‌دهندهٔ نمود بیشتر واکنش آمادوری در شرایط انبارداری طبیعی است (شکل ۵-A).

زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی، میزان واکنش مایلارد را افزایش می‌دهند. بیشترین میزان تجمع تولیدهای مایلارد در تیمار زوال مصنوعی پنج روز، مشاهده شد. درصد وقوع واکنش مایلارد در تیمار انبارداری طبیعی چهار سال، نسبت به تیمارهای زوال مصنوعی چهار و پنج روز، کمتر بود. این نتایج نشان داد که افزایش شدت زوال مصنوعی تا پنج روز، بیشترشدن تجمع تولیدهای مایلارد را نسبت به شرایط انبارداری طبیعی دو و چهار سال، سبب شد. کمترین میزان تجمع تولیدهای مایلارد نیز در تیمار شاهد حاصل شد. درصد افزایش تولیدهای مایلارد در تیمار زوال پنج روز، ۸۰ درصد بود؛ ولی این تجمع در تیمار دو و چهار سال، به‌ترتیب به ۱۰ و ۴۵ درصد رسید (شکل ۵-B).



شکل ۵- اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی بر تجمع تولیدهای آمادوری و مایلارد در بذرهای نخود ایرانی-
مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

بحث

درصد جوانه‌زنی در زوال تسریع‌شده به‌ویژه زوال چهار و پنج روز، بیشتر از انبارداری طبیعی کاهش یافت؛ به‌طوری‌که در شرایط انبارداری پنج روز، درصد جوانه‌زنی به میزان ۲۰ درصد تیمار شاهد رسید. در شرایط مختلف زوال طبیعی و مصنوعی، دما و رطوبت نسبی محیط بر میزان جوانه‌زنی بذرها اثر گذاشت و در شرایط زوال مصنوعی، رطوبت و دمای محیط بیشتر بود؛ در نتیجه، میزان خسارت وارد شده به بذر نخود بیشتر از انبارداری طبیعی و کاهش درصد جوانه‌زنی نیز بیشتر از انبارداری طبیعی بود که با نتایج سایر محققان مطابقت داشت (Akhter *et al.*, 1992; Nkang and Umoh, 1997).

ذخایر بذری شامل مولکول‌های پیچیده‌ای هستند (Bewley and Black, 1994). پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها از جمله ماکرومولکول‌های ضروری برای انجام فرایند جوانه‌زنی هستند زیرا بخشی از اسیدهای چرب آزاد و قندهای محلول، در مدت زوال بذر تخریب می‌شوند و برای تأمین انرژی و بیوسنتز ترکیبات جدید کاربردی ندارند (McDonald, 1999). کاهش درصد جوانه‌زنی با کاهش میزان قندهای محلول و قندهای غیراحیایی و افزایش میزان قندهای احیایی و نشاسته همراه بود. Ghaderi-Far و همکاران (۲۰۱۴a) بیان کردند که زوال، افزایش قندهای احیایی و کاهش میزان قندهای غیراحیایی در بذرهای کدو تخم کاغذی را سبب شد. در پژوهش حاضر مشاهده شد که میزان قندهای محلول با افزایش شدت زوال کاهش یافت که این پدیده در تیمارهای زوال مصنوعی، شدیدتر از تیمارهای انبارداری طبیعی بود. کاهش میزان ساکارز، رافینوز و استاکیوز می‌تواند بر خاصیت نفوذپذیری غشا اثر بگذارد و افزایش میزان قندهای احیایی را باعث شود که می‌تواند به تخریب ترکیبات پروتئینی منجر شود (Marcos-Filho, 2005). افزایش میزان قندهای احیایی تا شدت زوال سه روز نشان‌دهندهٔ دخالت این پدیده در فرایند زوال بذر است. Murthy و Sun (۲۰۰۰) در بررسی خود روی ماش بیان کردند که افزایش هیدرولیز قندها در مدت انبارداری طبیعی و تبدیل آن‌ها به قندهای احیایی از قبیل گلوکز، فروکتوز و گالاکتوز، دلیل اصلی وقوع واکنش‌های آمادوری و مایلارد بود که در نهایت به زوال بذر منجر می‌شود. در مدت زوال مصنوعی با افزایش آبگیری بذر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ قندها از قبیل اینورتاز و آلفا – گالاکتوزیداز افزایش میزان قندهای احیایی را سبب می‌شوند (Wettlaufer and Leopold, 1991). با افزایش مدت تیمار زوال مصنوعی تا پنج روز، بذرها در معرض رطوبت بیشتری قرار گرفتند که این رطوبت زیاد، فعالیت آنزیم‌های یادشده را افزایش داد و در نهایت، بذرها میزان قندهای احیایی بیشتری نسبت به انبارداری طبیعی تولید کردند (Viviana *et al.*, 2010). Braccini و همکاران (۲۰۰۱) و Marcos-Filho (۲۰۰۵) بیان کردند که در مدت زوال بذر میزان قندهای محلول، کاهش ولی قندهای احیایی افزایش یافتند. Lugo-Bernal و Leopold (۱۹۹۲) بیان کردند که افزایش میزان قندهای محلول، در مدت زوال بذر کاهش میزان سوبسترای لازم را برای تنفس بذر باعث شد و در نهایت، قابلیت حیات و جوانه‌زنی بذر را کاهش داد. Sun و Leopold (۱۹۹۳) و همچنین Leopold و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کردند که حالت شیشه‌ای بذر خشک، افزایش قابلیت انبارداری آن‌ها را سبب می‌شود. آن‌ها بیان کردند که حالت کریستالی بذرها از هیدرولیز قندها و در نتیجه، کندشدن روند زوال بذر جلوگیری می‌کند. در بررسی حاضر نیز مشخص شد در شرایط انبارداری طبیعی، میزان جوانه‌زنی پس از آب‌نوشی، بیشتر از حالت زوال مصنوعی شدید بود. به نظر می‌رسد که بیشتر بودن میزان قندهای محلول، در شرایط انبارداری طبیعی، با قابلیت حیات بذر رابطهٔ مثبتی داشته باشد. Corte و همکاران (۲۰۰۶) نیز بیان کردند که مقادیر زیاد کربوهیدرات‌های محلول در بذرها، علاوه بر تأمین انرژی لازم برای بذر در زمان جوانه‌زنی، عاملی مهم در تعیین قابلیت انبارداری

طولانی مدت آن‌ها است. ارتباط افزایش میزان قندهای محلول با افزایش قابلیت انبارداری بذرها به دلیل نقش مهم قندها در نگه‌داری غشاها و نفوذپذیری پروتئین‌های غشایی در شرایط رطوبت اندک انبار است (Carpenter *et al*., 1987).

McDonald (۱۹۹۹) بیان کرد که در رطوبت ۸ تا ۱۲ درصد بذرها، اکسیداسیون خودبه‌خودی لیپیدها افزایش یافت. همچنین در شرایطی که بذر رطوبت اندکی داشت، میزان هیدرولیز قندها در آن بسیار اندک بود و دلیل اصلی زوال در این شرایط، پراکسیداسیون لیپید بود. در پژوهش حاضر، میزان پراکسیداسیون لیپید در تیمارهای انبارداری طبیعی بیشتر از تیمارهای زوال مصنوعی بود. به گفتهٔ Goel و همکاران (۲۰۰۳) افزایش میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید و نشت الکترولیت‌ها بخش درخور توجهی از کاهش قابلیت جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاهچه را توجیه می‌کند. افزایش میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید، ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بذر بود که خود ممکن است ناشی از ضعف سیستم آنتی‌اکسیدان باشد (Bailly, 2004).

بیشترین میزان پروتئین محلول مربوط به تیمار شاهد بود. با افزایش شدت زوال مصنوعی و همچنین افزایش مدت نگه‌داری بذرها در انبار، میزان پروتئین محلول کاهش و میزان کربونیلاسیون پروتئین افزایش یافت. کاهش میزان پروتئین محلول در تیمارهای انبارداری طبیعی نسبت به تیمارهای زوال مصنوعی کمتر بود. محققان دیگر نیز بیان کردند که افزایش شدت زوال، کاهش میزان سنتز پروتئین را در بذر سبب می‌شود (McDonald, 1999; Basra *et al*., 2003). McDonald (۱۹۹۹) بیان کرد که در مدت زوال بذر، آسیب به DNA به فرایند پروتئین‌سازی آسیب می‌زند و در نهایت، میزان پروتئین محلول لازم برای جوانه‌زنی بذر کاهش می‌یابد. با افزایش شدت زوال، میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها افزایش یافت که این میزان در تیمارهای انبارداری طبیعی کمتر از زوال مصنوعی بود. در شرایط انبارداری طبیعی، میزان قندهای محلول نسبت به شرایط زوال مصنوعی، بیشتر بود؛ به همین دلیل تجمع قندهای احیایی در آن‌ها کمتر از زوال مصنوعی بود و در نهایت، میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها در این تیمار نسبت به زوال مصنوعی، کمتر بود.

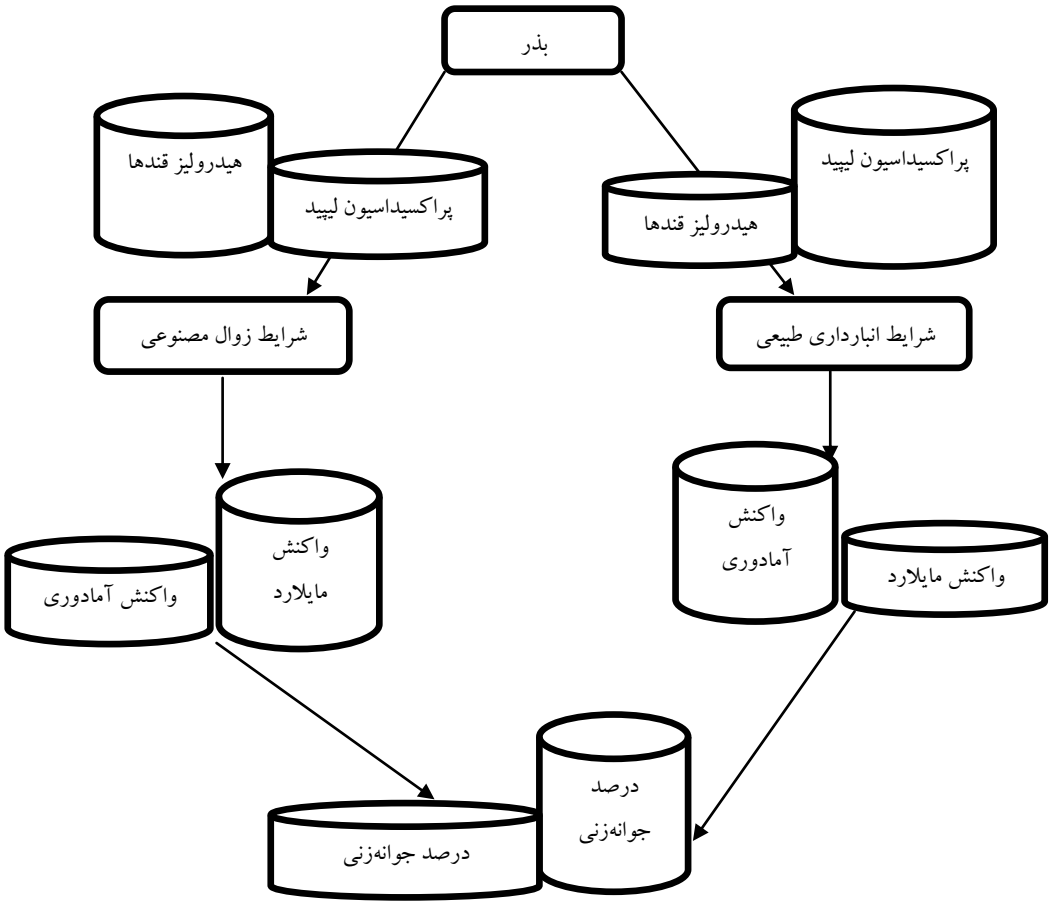
واکنش‌های آمادوری و مایلارد به دنبال حملهٔ غیرآنزیمی ساده به گروه‌های آمینواسیدی پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها با قندهای احیایی و آلدهیدها انجام می‌شود (Murthy *et al*., 2003; Ryoji *et al*., 2012). این واکنش‌ها در فعالیت آنزیم‌های ترمیمی دخالت می‌کنند؛ به‌طوری‌که در مدت زوال کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های ترمیمی DNA را از قبیل DNA لیگاز سبب می‌شود. با توجه به اینکه این آنزیم یکی از آنزیم‌های اصلی کنترل‌کنندهٔ تغییر در ویژگی‌های ژنتیکی بذر است، آسیب به آن در مدت زوال می‌تواند کاهش کارایی بذرهای زوال دیده را شود (Osborne, 1980). Wettlaufer و Leopold (۱۹۹۱) بیان نمودند بین تجمع تولیدهای مایلارد با زوال بذر ارتباط نزدیکی وجود دارد. قندهای احیایی، نیرو محرکهٔ اولیه برای شروع اجباری واکنش‌های آمادوری و مایلارد هستند و از این نظر ضروری هستند (Veselovsky and Veselova, 2012; Colville *et al*., 2012). در ادامهٔ واکنش و با افزایش میزان قندهای احیایی یا آلدهیدها و کتون‌ها، واکنش‌های آمادوری و مایلارد افزایش

می‌یابند. در شدت‌های زوال مصنوعی شدید (چهار و پنج روز) میزان قندهای احیایی تولید شده بیشتر از شرایط انبارداری طبیعی بود و تجمع تولیدهای آمادوری و مایلارد نیز در این تیمارها بیشتر بود. Murthy و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که در مدت زوال بذر، اضافه‌شدن قندهای احیایی به پروتئین‌ها به‌صورت غیرآنزیمی، غیرفعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را سبب می‌شود. به عقیدهٔ Hanan و Salwa (۲۰۱۴) با افزایش تجمع تولیدهای آمادوری، تغییرات پس از ترجمه در برخی از پروتئین‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی ایجاد می‌شود که کاهش کارایی این سیستم و ضعف در جوانه‌زنی بذر را سبب می‌شود. Sun و Leopold (۱۹۹۵) در بررسی خود روی بذرهای سویا بیان کردند که در مدت انبارداری، قندهای احیایی ناشی از هیدرولیز رافینوز و استاکیوز افزایش یافت و به دنبال آن واکنش آمادوری و مایلارد نیز انجام شد. نتایج پژوهش حاضر نیز افزایش میزان تجمع تولیدهای آمادوری و مایلارد را با افزایش شدت زوال مصنوعی و همچنین افزایش مدت انبارداری طبیعی نشان داد.

محققان بیان کرده‌اند که در آغاز سازوکارهای دخیل در زوال مصنوعی و طبیعی، شباهت بسیار و در مراحل بعدی این سازوکارها و نیز سرعت آن‌ها تفاوت وجود دارد (Delouche and Baskin, 1973; Santos and Paol, 2007). برخی دیگر از محققان بیان کرده‌اند که در شرایط زوال مصنوعی، یک‌سری وقایع متابولیک دیگر اتفاق می‌افتد که ممکن است در شرایط انبارداری طبیعی اتفاق نیفتد (Bailly *et al*., 1996; Fanan *et al*., 2006). Lugo-Bernal و Leopold (۱۹۹۲) بیان کردند که افزایش قندهای احیایی از قبیل گالاکتوز می‌تواند به تخریب پروتئین و در نهایت، کاهش کیفیت بذرهایی منجر شود که به‌طور مصنوعی زوال یافته‌اند؛ در حالی‌که قندهای احیایی از عوامل اصلی دخیل در واکنش‌های بازترتیبی یا ایزومریزاسیون آمادوری و مایلارد هستند. Locher و Bucheli (۱۹۹۸) بیان کردند که در مدت زوال مصنوعی افزایش میزان قندهای احیایی، تسریع زوال بذر را با تخریب ساختاری ترکیبات پروتئینی و در نهایت، کاهش حیات بذر را سبب می‌شود. در بررسی حاضر مشاهده شد که در زوال مصنوعی شدید، میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها بیشتر از انبارداری طبیعی بود. افزایش میزان قندهای احیایی در شدت‌های زیاد زوال مصنوعی آسیب را به پروتئین‌ها سبب شد که خود افزایش بیشتر کربونیلاسیون پروتئین‌ها را در تیمار زوال مصنوعی نسبت به انبارداری طبیعی موجب شد. کربونیلاسیون پروتئین‌ها می‌تواند در ساعات ابتدایی جوانه‌زنی خسارات جبران‌ناپذیری به بذر وارد کند و کاهش معنی‌دار درصد جوانه‌زنی را باعث شود (Simontacchi *et al*., 1993). با افزایش میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها، درصد جوانه‌زنی کاهش یافت. با توجه به بیشتر بودن میزان کربونیلاسیون پروتئین‌ها در تیمارهای زوال مصنوعی شدید، افت درصد جوانه‌زنی در این تیمار نسبت به تیمار انبارداری طبیعی بیشتر بود.

علاوه بر هیدرولیز قندها، پراکسیداسیون لیپید نیز آغازی برای واکنش‌های غیرآنزیمی آمادوری و مایلارد و در نهایت، تخریب پروتئین و DNA است (Murthy and Sun, 2000; Bhatia *et al*., 2010). Murthy و Sun (۲۰۰۰) بیان کردند که در مدت زوال بذر، ممکن است هر دو آن‌ها با هم یا تنها یکی از

آن‌ها انجام شود که بستگی به شرایط دارد. در شرایطی که رطوبت بذر اندک است، پراکسیداسیون لیپید به دلیل هیدرولیزنشدن قندها، علت اصلی وقوع و آغاز واکنش‌های آمادوری و مایلارد است (Murthy and Sun, 2000). در بررسی حاضر، مشخص شد که در هر دو شرایط انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی، هر دو فرایند اتفاق می‌افتد؛ ولی میزان آن‌ها در شرایط انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی متفاوت است. دلایل اصلی زوال بذر، هر کدام به طور جداگانه بر وقوع دو واکنش آمادوری و مایلارد اثر می‌گذارند. قندهای احیایی ناشی از هیدرولیز قندها و همچنین آلدهیدها، کتون‌ها و الکل‌های تولیدی ناشی از پراکسیداسیون لیپید با گروه آمینی پروتئین‌ها واکنش می‌دهند و وقوع این دو واکنش را سبب می‌شوند (Wettlaufer and Leopold, 1991; Sun and Leopold, 1995). نتایج پژوهش حاضر، نشان داد که در بین تیمارهای زوال مصنوعی، بیشترین میزان تجمع تولیدهای مایلارد، در تیمار زوال پنج روز و به میزان ۹۵ درصد نسبت به تیمار شاهد بود. در بین تیمارهای انبارداری طبیعی نیز بیشترین میزان تجمع تولیدهای مایلارد به تیمار انبارداری چهار سال و به میزان ۴۵ درصد نسبت به تیمار شاهد تعلق داشت. از سویی، میزان تجمع تولیدهای مایلارد در تیمارهای زوال مصنوعی چهار و پنج روز (به ترتیب ۵۸ و ۹۵ درصد نسبت به تیمار شاهد) بیشتر از تیمارهای انبارداری طبیعی دو و چهار سال (به ترتیب ۱۴ و ۴۵ درصد نسبت به تیمار شاهد) بود. در تیمار زوال مصنوعی سه روز، بیشترین میزان واکنش آمادوری در تیمارهای زوال مصنوعی و حدود ۳۰۰ درصد تیمار شاهد بود؛ ولی در تیمار انبارداری طبیعی چهار سال، میزان وقوع واکنش‌های آمادوری به حدود ۵۰۰ درصد تیمار شاهد رسید. به نظر Murthy و Sun (۲۰۰۰) دلایل اصلی وقوع واکنش آمادوری و مایلارد به‌ترتیب، پراکسیداسیون لیپید و هیدرولیز قندها است. نتایج این آزمایش نشان داد تجمع تولیدهای آمادوری در شرایط انبارداری طبیعی، بیشتر از شرایط زوال مصنوعی بود. همچنین در شرایط انبارداری طبیعی چهار سال میزان تجمع تولیدهای مایلارد حدود ۵۰ درصد شرایط زوال مصنوعی پنج روز بود. این نتایج نشان داد که پراکسیداسیون لیپید و هیدرولیز قندها، دلایل اصلی وقوع واکنش‌های آمادوری و مایلارد، هر کدام به‌طور جداگانه بر این واکنش‌ها اثر گذاشته‌اند. در حالت انبارداری طبیعی به دلیل کم‌بودن دما و رطوبت محیط، میزان پراکسیداسیون لیپید نسبت به هیدرولیز قندها اثر بیشتری بر زوال بذر داشت؛ ولی در حالت زوال مصنوعی به دلیل زیادبودن میزان رطوبت محیط، تجمع قندهای احیایی افزایش یافت و اثر بیشتری بر وقوع زوال بذر داشت. به نظر می‌رسد پیش‌روی زوال بذر تا وقوع واکنش مایلارد که پس از واکنش آمادوری اتفاق می‌افتد، کاهش شدید قدرت حیات بذر و در نهایت، کاهش درصد جوانه‌زنی بذرها را باعث شده است. به هرحال، این نتایج بیان می‌کند که در شرایط انبارداری طبیعی، واکنش آمادوری نسبت به واکنش مایلارد دخالت بیشتری در زوال بذر داشته است؛ ولی در شرایط زوال مصنوعی علاوه بر واکنش آمادوری، واکنش مایلارد بیشتر افزایش یافته است و کاهش بیشتر جوانه‌زنی بذر را نسبت به انبارداری طبیعی موجب شده است (شکل ۶).



شکل ۶- شمای کلی سازوکارهای اثرگذار بر زوال بذر نخود در مدت انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی

جمع‌بندی

کاهش درصد جوانه‌زنی در شرایط زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی، به‌دلیل کاهش قابلیت حیات بذر های نخود است. در هر دو شرایط انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی، واکنش‌هایی انجام می‌شوند که بذر را به سمت زوال و درنتیجه، کاهش جوانه‌زنی سوق می‌دهند. در شرایط انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی در وقوع زوال شباهت‌هایی وجود دارد؛ ولی سازوکار اصلی زوال در این دو شرایط متفاوت است. در شرایط انبارداری طبیعی، تولید قندهای احیایی نسبت به شرایط زوال مصنوعی کمتر ولی میزان پراکسیداسیون لیپید، بیشتر است. در شرایط زوال مصنوعی، تولید بیشتر قندهای احیایی، ترکیب شدن آن‌ها را با پروتئین‌های بذر، افزایش میزان کربونیلاسیون پروتئین و در نهایت کاهش میزان پروتئین محلول را نسبت به انبارداری طبیعی سبب شد. بررسی حاضر مشخص کرد که در مراحل زوال بذرهای نخود در مدت انبارداری طبیعی و زوال مصنوعی، سازوکارهای متفاوتی نقش دارند؛ به‌طوری‌که در شرایط انبارداری طبیعی، میزان پراکسیداسیون لیپید و در شرایط زوال مصنوعی، هیدرولیز قندها نقش مهمی در وقوع واکنش‌های آمادوری و مایلارد و در نهایت، زوال بذر دارند. در شرایط انبارداری طبیعی، وقوع واکنش

آمادوری و در شرایط زوال مصنوعی، وقوع واکنش مایلارد بیشتر بود. با توجه به افت بیشتر درصد جوانه‌زنی در تیمارهای زوال مصنوعی شدید نتیجه گرفت که وقوع واکنش مایلارد که مرحله‌ای پس از واکنش آمادوری است، بیشتر به بذرها آسیب می‌زند و بیشتر درصد جوانه‌زنی را کاهش می‌دهد.

سپاسگزاری

در اینجا از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان بابت فراهم‌کردن امکانات انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Akhter, F. N., Kabir, G., Mannan, M. A. and Shaheen, N. N. (1992) Aging effect of wheat and barley seeds upon germination mitotic index and chromosomal damage. Journal of Islamic Academic of Science 5: 44-48.

Bailly, C. (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research 14: 93-107.

Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, 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.

Baker, E. H. and Bradford, K. J. (1994) The fluorescence assay for Maillard product accumulation does not correlate with seed viability. Seed Science Research 4: 103-106.

Basra, S. M. A., Ahmad, N., Khan, M. M., Iqbal, N. and Cheema, M. A. (2003) Assessment of cotton seed deterioration during accelerated ageing. Seed Science and Technology 31: 531-540.

Bewley, J. D. and Black, M. (1994) Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, New York.

Bhatia, V. S., Sanjeev, Y., Kanchan, J. and Guruprasad, K. N. (2010) Field deterioration of soybean seed: role of oxidative stresses and antioxidant defense mechanism. Journal of Plant Biology 37(2): 179–190.

Bonneau, L., Carre, M. and Martin-Tanguy, J. (1994) Polyamines and related enzymes in rice seeds differing in germination potential. Plant Growth Regulators 15: 75-82.

Braccini, A. L., Braccini, M. C. L. and Scapim, C. A. (2001) Mecanismos de deterioração das sementes: aspectos bioquímicos e fisiológicos. Informativo Abrates 11(1): 10-15.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-252.

Carpenter, J. F., Crowe, L. M. and Crowe, J. H. (1987) Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying. Biochemica et Biophysica Acta 92(3): 109-115.

Colville, L., Emma, L. B., Antony, S. L., Hugh, W. P., Laurence, C. and Ilse, K. (2012) Volatile fingerprints of seeds of four species indicate the involvement of alcoholic fermentation, lipid peroxidation, and Maillard reactions in seed deterioration during ageing and desiccation stress. Journal of Experimental Botany 63(18): 6519–6530.

Corte, V. B., Borges, E. E. L., Pontes, C. A., Leite, I. T. A., Ventrella, M. C. and Mathias, A. A. (2006) Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de

Caesalpinia peltophoroides Benth. (*Leguminosae Caesalpinoideae*). Revista Árvore 30(6): 941-949.

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. and Milzani, A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. Trends in Molecular Medicine 9(4): 169–176.

Delouche, J. C. and Baskin, C. C. (1973) Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. Seed Science and Technology 1(2): 427-452.

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.

Fanan, S., Medina, P. F., Lima, T. C. and Filho, J. M. (2006) Avaliação do vigor de sementes de trigo pelos testes de envelhecimento acelerado e de frio. Revista Brasileira de Sementes 28(2): 152-158.

Gamer, M. H., Wang, G. M. and Spector, A. (1987) Stimulation of glucosylated lens epithelial Na, K-ATPase by an aldose reductase inhibitor. Experiment Eye Research 44: 339-345.

Ghaderi-Far, F., Soltani, A. and Sadeghipour, H. R. (2014a) Biochemical changes in pumpkin seeds during ageing: lipid peroxidation and membrane damages. Iranian Journal of Plant Biology 6(20): 69-112 (in Persian).

Ghaderi-Far, F., Soltani, A. and Sadeghipour, H. R. (2014b) Changes in soluble carbohydrates and reactive oxygen species scavenger enzymes activity in pumpkin seeds during storage in different temperatures and seed humilities. Journal of Plant Production 7(1): 157-179 (in Persian).

Goel, A., Coel, A. K. and Sheoran, I. S. (2003) Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. Journal of Plant Physiology 160: 1093-1100.

Grune, T., Catalgol, B., Jung, T. and Uverski, V. N. (2013) Protein oxidation and aging. In: different model systems and affecting factors. (Ed. Uverski, V. N.) 295–370. Wiley, Inc., Hoboken, New Jersey.

Hanan, M. A. and Salwa. A. A. (2014) Effects of gamma irradiation on biochemical and antioxidant defense system in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. International Journal of Advanced Research 2(8): 287-300.

Handel, E. V. (1968) Direct microdetermination of sucrose. Analytical Biochemistry 22: 280-283.

Koostra, P. T. and Harrington, J. F. (1969) Biochemical effect of age on membranal lipids of *Cucumis sativus* L. seed. Proceedings of the International Seed Testing Association 34: 329-340.

Leopold, A. C., Bruni, F. and Williams, R. J. (1992) Water in dry organisms. In: Water and life (Eds. Somero, G. N., Osmond, C. B. and Bolis, C. L.) 161-169. Springer, Berlin, Heidelberg.

Leopold, A. C., Sun, W. Q. and Bernal-Lugo, I. (1994) The glassy states in seeds: Analysis and function. Seed Science Research 4: 267-274.

Locher, R. and Bucheli, P. (1998) Comparison of soluble sugar degradation in soybean seed under simulated tropical storage conditions. Crop Science 38: 1229-1253.

Lugo-Bernal, I. and Leopold, A. C. (1992) Changes in soluble carbohydrates during seed storage. Plant Physiology 98(3): 1207-1210.

Marcos-Filho, J. M. (2005) Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba, Fealq.

Matsuda, H. and Hirayama, O. (1973) Changes of lipid components and lipolytic acylhydrolase activities in rice grains during their storage. Journal of Agricultural Chemistry Society of Japan 47: 279-384.

McCready, R. M., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H. S. (1950) Determination of starch and amylase in vegetables. Analytical Chemistry 22: 1156-1158.

McDonald, M. B. (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. Seed Science and Technology 27: 177-237.

Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducting sugars. Analytical Chemistry 31: 426-428.

Mohammadi, H., Soltani, A., Sadeghipour, H.R. and Zeinali, E. (2010) Effects of seed aging on subsequent seed reserve utilization and seedling growth in soybean. International Journal of Plant Production 5 (1): 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.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. Journal of Exprimental Botany 54: 1057-1067.

Murthy, U. M. N. and Sun, W. Q. (2000) Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany 348: 1221-1228.

Nkang, A. and Umoh, E. O. (1997) Six month storability of five soybean cultivars as influenced by stage of harvest, storage temperature and relative humidity. Seed Science and Technology 25: 93-99.

Nystrom, T. (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. EMBO Journal 24: 1311–1317.

Omokolo, D. N., Tsala, G. N. and Djocgoue, P. F. (1996) Changes in carbohydrate, amino acid and phenol contnts in cocoa pods from three clones after infection with *phytophtora megakarya* Bra and Grif. Annals of Botany 86: 29-36.

Osborne, D. J. (1980) Senescence in seeds. In: Senescence in plants (Ed. Thimann, W. J.) 13–36. CRC Press, Florida.

Priestley, D. A. and Leopold, A. C. (1983) Lipid changes during natural ageing of soybean seeds. Physiologia Plantarum 59: 467-470.

Reznick, A. Z. and Packer, L. (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods Enzymology 233: 357–363.

Ryoji, N., Masao, J., Masamitsu, I., Hidenori, K., Yasuhiko, Y. and Yoshikazu, Y. (2012) Advanced glycation end products and their receptors as risk factors for aging. Anti-Aging Medicine 9(4): 108-113.

Santos, S. R. G. and Paula, R. C. (2007) Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do vigor de lotes de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith und Downs (branquilho) – Euphorbiaceae. Revista Instituto Florestal 19(1): 1-12.

Simontacchi, M., Caro, A., Fraga. C. G. and Puntarulo, S. (1993) Oxidative stress affects a-tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination. Plant Physiology 103: 949-953.

Soltani, A., Gholipoor, M. and Zeinali, E. (2006) Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. Environmental and Experimental Botany 55: 195-200.

Strelec, I., Hardi, Z. U. and Hlevnjak, M. (2008) Accumulation of Amadori and Maillard products in wheat seeds aged under different storage conditions. Croatica Chemica Acta 81(1): 131-137.

Sun, W. Q. and Leopold, A. C. (1993) The glassy state and accelerated aging of soybeans. Physiolgia Plantarum 89: 767-114.

Sun, W. Q. and Leopold, A. C. (1995) The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. Plant Physiology 94: 94–104.

Tahmasebi, B., Ghaderi-Far, F., Sadeghipour, H. R. and Galeshi, S. (2015) Effect of accelerate germination traits, lipids and lipid hydroperoxide in sunflower seeds. Journal of Plant Process and Function 4(12): 73-83 (in Persian).

Taniguchi, N., Kinoshita, N., Arai, K., Iizuka, S., Usui, M. and Naito, T. (1989) Inactivation of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase through non-enzymatic glycosylation. In: The Maillard reaction in ageing, diabetes and nutrition (Eds. Baynes, J. W., Monnier, V. M.) 277-290. Alan R Liss, Inc., New York.

Veselovsky, V. A. and Veselova, T. V. (2012) Lipid peroxidation, carbohydrate hydrolysis, and Amadori–Maillard reaction at early stages of dry seed aging. Russian Journal of Plant Physiology 59(6): 811–817.

Viviana, B. C., Eduardo, E. D. E., Lima, E. B., José, F. D. E., Carvalho, G. V. and Mirian, S. S. (2010) Alterations in the lipid and soluble sugar content of melanoxylon brauna seeds during natural and accelerated ageing. Revista Brasileira de Sementes 32(3): 152-162.

Walters, C. (1998) Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. Seed Science Research 8: 223-244.

Wettlaufer, S. H. and Leopold, A. C. (1991) Relevance of Amadori and Maillard products to seed deterioration. Plant Physiology 97: 165-169.

Wilson, D. O. and McDonald, M. B. (1986) The lipid peroxidation model of seed ageing. Seed Science and Technology 14: 269-300.