مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۴، ۱۳۸۹ (۷۸۹-۷۸۱)

بررسی اثر جیبرلین و آبسیزیک اسید بر جوانه‌زنی، القاء خواب و فعالیت آنزیم‌های اسید و آلکالین فسفاتاز جنین بذر گندم نان (*Triticum aestivum*) رقم RL4137

رضا توکل‌افشاری[1]*، سمیرا بدری[2] و علیرضا عباسی[3]
۱، ۲، ۳، دانشیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۵ - تاریخ تصویب: ۸۹/۶/۳۱)

چکیده

اثر دو هورمون گیاهی، جیبرلین و آبسیزیک اسید به ترتیب در بذر خواب و پس‌رس شده گندم نان مورد بررسی قرار گرفت. اهداف این تحقیق ارزیابی تأثیر تیمارهای مختلف پس‌رسی در مقایسه با تأثیر هورمون جیبرلین بر شکست خواب بذر و همچنین ارزیابی اثر هورمون آبسیزیک اسید در القاء مجدد خواب در بذر پس‌رس شده بود. بدین منظور بذر خواب تحت تیمار پس‌رسی و جیبرلین و بذرهایی که ۶ هفته دوره پس‌رسی را طی کرده بودند تحت تیمار آبسیزیک اسید قرار داده شدند. نتایج نشان داد که استفاده از تیمار جیبرلین ۱۰۰ میکرومول بر روی بذر خواب گندم نان می‌تواند جایگزین اثر پس‌رسی به مدت ۶ هفته به منظور از بین بردن خواب گردد. در رابطه با اثر هورمون آبسیزیک اسید در القاء خواب در بذر پس‌رس شده، تیمار ۱۰۰ میکرومول هیچگونه تأثیری روی خواب بذر نشان نداد، اما تیمار ۲۰۰ میکرو مول باعث القاء خواب معادل چهار هفته پس‌رسی شد. به عبارت دیگر آبسیزیک اسید برحسب غلظت مورد استفاده آن می‌تواند القا کننده خواب در بذر گندم نان باشد. تیمار پس‌رسی سبب افزایش فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در محور جنینی تا هفته سوم گردید در حالی که فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز تحت تأثیر این تیمار کاهش یافت. میزان فعالیت اسید فسفاتاز تحت تیمار هورمون جیبرلین قرار نگرفت ولی در مقابل هورمون آبسیزیک اسید اثر منفی روی فعالیت این آنزیم داشت. در مورد آنزیم آلکالین فسفاتاز پس‌رسی سبب کاهش فعالیت این آنزیم شد. اما جیبرلین و آبسیزیک اسید تأثیری بر افزایش و یا کاهش فعالیت آلکالین فسفاتاز نداشتند.

واژه‌های کلیدی: **آبسیزیک اسید، جیبرلین، پس‌رسی، اسید و آلکالین فسفاتاز، گندم.**

مقدمه

در طول چند دهه گذشته مطالعات بسیار زیادی در زمینه خواب بذر و جوانه‌زنی بر روی گیاهان زراعی منتشر شده است. خواب بذر در جائی که جوانه‌زنی و رشد سریع مورد نیاز باشد، عموماً یک صفت نامطلوب برای محصولات کشاورزی محسوب می‌شود اما در برخی موارد سبب افزایش ظرفیت جوانه‌زنی بذر از طریق جلوگیری از جوانه‌زنی زود هنگام بذر در شرایط نامساعد

* نویسنده مسئول: رضا توکل افشاری تلفن: ۰۲۶۱-۲۲۴۶۰۷۴ E-mail: tavakkol@ut.ac.ir

می‌شود. القاء خواب بذر می‌تواند از اواسط دوره نمو بذر شروع و در برخی از گیاهان با اتمام مرحله بلوغ پایان و یا تداوم یابد (Hilhorst & Karssen, 1992; Bewley, 1997; Kermode, 2005). تقریباً همه وقایع سلولی و متابولیک شناخته شده که قبل از تکمیل جوانه‌زنی در بذر فاقد خواب اتفاق می‌افتد، در بذر خواب خیسانده شده نیز اتفاق خواهد افتاد (Bewley, 1997). در واقع فعالیت‌های متابولیک بذر خواب غالبا تفاوت اندکی با بذر بدون خواب دارند. از این رو یک بذر خواب ممکن است تقریباً تمامی اعمال متابولیک مورد نیاز برای کامل شدن جوانه‌زنی را انجام دهد، با وجود این به دلایل ناشناخته‌ای محور جنین قادر به طویل شدن نیست (Finkelstein et al., 2008). بسیاری از عوامل از قبیل کاهش دما، نور یا به کار بردن هورمون‌هایی مانند جیبرلین و یا استفاده از تیمارهایی نظیر پس‌رسی سبب کاهش خواب بذر می‌شوند (Ogawa et al., 2003). پس‌رسی به یک دوره نگهداری بذر در شرایط دمای اتاق برای شکستن خواب بذر برخی گونه‌ها اشاره دارد. بذری که دوره پس‌رسی را طی کرده باشد به دامنه گسترده‌تری از شرایط محیطی پاسخ می‌دهد. طول دوره پس‌رسی بسیار متغیر است و از چندین روز تا چندین ماه و یا بیشتر در بین بذر گیاهان امکان‌پذیر است (Tavakkol Afshari & Hucl, 2002).

هورمون‌های گیاهی از عوامل مؤثر بر فعالیت‌های مختلف رشد، نمو و خواب بذر هستند. آبسیزیک اسید و جیبرلین در بیولوژی جوانه‌زنی بذر تأثیر آنتاگونیستی دارند و اثر تنظیمی مختلفی را در فرایندهای مختلف نشان می‌دهند. تعداد زیادی از مطالعات اخیر نقش اسید آبسیزیک و جیبرلین‌ها را در کنترل جوانه‌زنی گزارش کرده‌اند (Kermode, 2005; Finkelstein, 2008). در گندم گزارشات متفاوتی در ارتباط با میزان آبسیزیک اسید بر سطوح خواب گزارش شده است. در برخی از تحقیقات حساسیت جنین‌ها به آبسیزیک اسید رابطه نزدیکی با خواب بذر دارد (Kawakami et al., 1997; Kucera et al., 2005). در برخی منابع دیگر رابطه بین محتوی آبسیزیک اسید و خواب بذور گندم گزارش نشده است (Gianinetti & Venier, 2007). در جوانه‌زنی بذر تلخه، هورمون آبسیزیک اسید نقشی در جلوگیری از شکست خواب بذر نداشت (Goggin et al., 2009).

بر خلاف سیستم‌های جانوری، اطلاعات کمی در رابطه با نقش فسفوریلاسیون- دفسفوریلاسیون در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیک در گیاهان و همچنین در بذر وجود دارد. فسفاتازها دفسفریلاسیون فسفات آلی و تبدیل آن به فسفات معدنی را بر عهده دارند. فسفاتازها فرآیندهای فیزیولوژیک مثل تنظیم فسفات معدنی را بر عهده دارند و نقش حیاتی در انتقال انرژی، تنظیم متابولیت‌ها، ساختارهای مهم بیومولکولی مثل اجسام فیتین در بذرهای جوانه نزده و دفسفریلاسیون پروتئین‌ها و نوکلئوتیدها را بر عهده دارند (Senna et al., 2006).

نقش دقیق فسفاتازها در فرایند جوانه‌زنی بذر مشخص نیست زیرا که این آنزیم‌ها به شکل‌های مختلفی ظاهر می‌شوند و مشخصات بیوشیمیایی متفاوتی را تحت تأثیر عوامل محیطی نشان می‌دهند. به عنوان مثال در ذرت، تجزیه فیتین تحت تأثیر آنزیم فیتاز که یک نوع خاص از فسفاتاز است قرار می‌گیرد و سبب رهاسازی فسفات از اسید فیتیک می‌شود (Senna et al., 2006). اسید فسفاتازها (EC 3. 1. 3. 2.) در گیاهان و جانوران به طور وسیعی وجود دارند. اسید فسفاتاز، کاتالیزور غیراختصاصی هیدرولیز مونو استرهای فسفات و اکسیژن از آب به فسفات معدنی در محیط‌های اسیدی می‌باشد (Tabaldi et al., 2008). آلکالین فسفاتاز با نام کامل آلکالین فسفو مونو استراز و (EC 3. 1. 3. 1) در pHهای بالاتر از ۷ فعالیت می‌کند. این آنزیم در طیف وسیعی از گیاهان، جانوران و تک‌سلولی‌ها فعالیت دارد (Ruan et al., 2006). زوال بذر بر فعالیت آلکالین فسفاتاز تأثیر منفی داشت و فعالیت آن را ۴۴٪ کاهش داد (Ravikumar et al., 1998).

هدف از این تحقیق: ۱) تأثیر تیمارهای مختلف پس‌رسی و هورمون جیبرلین بر جوانه‌زنی بذرهای خواب گندم؛ ۲) تأثیر آبسیزیک اسید بر القاء خواب در بذر پس‌رس شده و ۳) مطالعه تغییرات فعالیت آنزیم‌های اسید و آلکالین فسفاتاز در تیمارهای ذکر شده بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از یک رقم گندم بهاره قرمز کانادایی

به نام RL4137 استفاده شد. این رقم به دلیل وجود خواب در مرحله بلوغ فیزیولوژیک مورد استفاده قرار گرفت (Tavakko Afshari & Hucl, 2002). این رقم در شرایط مزرعه‌ای در مزرعه آموزشی و پژوهشی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران در پائیز سال ۱۳۸۵ کاشته شد. این رقم در چهار تکرار کشت شد. هر کرت شامل چهار ردیف که طول هر ردیف ۳ متر و فاصله بین ردیف‌ها ۰/۵ متر و فاصله بین دو تکرار ۱ متر در نظر گرفته شد. در مرحله رشدی زادکس ۹۲ خوشه‌ها برداشت گردید (Zadoks et al., 1974). بذرها توسط دست از خوشه‌ها جداسازی شده و جهت حفظ خواب در آن ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Dastaran and Tavakkol Afshari, 2009).

اندازه‌گیری خواب بذر

برای اندازه‌گیری خواب بذر، تعداد ۵۰ عدد بذر در ۴ تکرار از بذرهای خواب نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد بر روی کاغذ صافی در داخل ظرف‌های پتری حاوی ۶ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شدند و به ژرمیناتور با درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی انتقال یافتند. پس از ۷۲ ساعت بذرهای جوانه زده شمارش گردید (Dastaran & Tavakkol Afshari, 2009). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار انجام شد. ملاک جوانه‌زنی بذر خروج ریشه چه به طول یک میلی‌متر در نظر گرفته شد.

اعمال تیمارهای مختلف پس‌رسی

بذرهای برای گذراندن دوره پس‌رسی به ژرمیناتور با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد منتقل و تحت شرایط تاریکی نگهداری شدند. آزمون پس‌رسی به مدت شش هفته انجام شد. در هر هفته ۴ تکرار ۵۰ تایی از بذرهای در داخل ظرف‌های پتری بر روی دو لایه کاغذ صافی استریل به همراه شش میلی‌لیتر آب و در شرایط استاندارد جوانه‌زنی قرار گرفته و پس از ۷۲ ساعت تعداد بذر جوانه زده شمارش و ثبت گردید. اولین مرتبه آزمایش در اولین روز خروج بذر از سردخانه انجام شد.

اثر جیبرلین بر جوانه‌زنی بذر خواب

برای بررسی اثر هورمون جیبرلین بر جوانه‌زنی بذر خواب، مقدار شش میلی‌لیتر از از محلول اسید جیبرلیک (GA_3) با غلظت ۱۰۰ میکرومول به ظرف‌های پتری اضافه گردید. این آزمایش در ۴ تکرار ۵۰ تایی و درقالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط تاریکی و دمای یخچال در داخل ظرف‌های پتری به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. پس از طی ۷۲ ساعت بذرها به ظرف‌های پتری حاوی ۶ میلی‌لیتر آب مقطر انتقال و به ژرمیناتور با درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی انتقال یافتند.

اثر آبسیزیک اسید بر القاء خواب در بذر پس‌رس شده

برای بررسی اثر هورمون آبسیزیک اسید برالقاء خواب بذر پس‌رس شده، از دو غلظت۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مول محلول آبسیزیک اسید استفاده شد. مقدار ۶ میلی‌لیتر از هر غلظت به ظرف‌های پتری حاوی بذر پس‌رس شده (هفته ششم پس‌رسی) اضافه گردید. بذرها در ۴ تکرار ۵۰ تایی در قالب طرح کاملاً تصادفی و در شرایط تاریکی و دمای یخچال به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. آزمون جوانه‌زنی مشابه آزمایش قبل انجام و درصد جوانه‌زنی بذرهای تیمار شده پس از ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد.

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های اسید وآلکالین فسفاتاز جنین گندم تحت تیمارهای مختلف پس‌رسی و هورمونی

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز، بذرهای خواب و تیمارهای پس‌رسی در شرایط جوانه‌زنی استاندارد قرار گرفتند. این آزمون به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. هر تیمار در سه تکرار ۵۰ بذری انجام گرفت. بذرها روی کاغذ صافی استریل در درون ظرف‌های پتری قرار داده شدند و شش میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد.زمان آبنوشی بذرها ۸ ساعت بود که برای تمامی تیمارها به طور یکسان اعمال شد (Razeghi Yadak & Tavakkol Afshari, 2010). بعد از اتمام زمان آبنوشی جنین بذرها به کمک پنس و اسکالپل جدا شدند.

در تیمارهای هورمونی، ۶ میلی‌لیتر از غلظت ۲۰۰ میکرولیتر آبسیزیک اسید بر روی هفته ششم پس‌رسی اعمال شد و بذرها در شرایط تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (به منظور جلوگیری از جوانه‌زنی بذر) به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. بذرها در سه تکرار ۵۰ تایی در داخل ظرف‌های پتری حاوی محلول آبسیزیک

اسید قرار گرفتند. سپس به شرایط جوانه‌زنی استاندارد منتقل و به مدت ۸ ساعت در داخل ظرف پتری حاوی ۶ میلی‌لیتر آب مقطر و بر روی دو لایه کاغذ صافی قرار داده شدند. پس از طی این مدت جنین بذرها استخراج شده و برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها استفاده شد. اثر هورمون جیبرلین نیز مشابه با همین روش بر روی بذرها مورد بررسی قرار گرفت با این تفاوت که غلظت مورد استفاده ۱۰۰ میکرولیتر و بر روی بذرهای خواب اعمال شد.

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین

استخراج پروتئین جنین به منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های فسفاتاز به روش Lee (2000) انجام شد. ۵۰ جنین جدا شده به کمک پنس و اسکالپل در داخل یک هاون قرار داده شدند و در حضور ازت مایع کوبیده شدند تا به صورت پودر درآمدند. به ۰/۱ گرم از پودر بدست آمده ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج پروتئین جنین اضافه شد و یک ساعت در ظرف آبی که حاوی یخ بود قرار گرفت. سپس ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار با ۱۵ هزار دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتریفیوژ شد. نمونه‌های استخراجی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین بذر از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976). جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین نمونه‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید و میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. این کار برای تمامی نمونه‌ها به منظور تعیین مقدار پروتئین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم صورت گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت اسید و آلکالین فسفاتاز در محور جنین

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها از روش Pan & che (1988) استفاده شد. واکنش با افزودن ۵ میلی‌مولار پارا نیترو فنل فسفات و ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم استات بافر با pH=۵/۴ به ۱۰ میکرولیتر نمونه استخراجی در اندازه کل ۲۰۰ میکرولیتر برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و ۱۰ میلی‌مولار پارا نیترو فنل فسفات (pNP) و ۱۰۰ میلی‌مولار تریس HCl بافر با pH=۸/۳ به ۷۰ میکرولیتر نمونه استخراجی در حجم کلی ۲۰۰ میکرولیتر برای آلکالین فسفاتاز شروع شد. این محلول برای هر تکرار آزمایشی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه نگهداری شد. سپس به آن ۵۰ میکرولیتر KOH یک مولار اضافه شد تا واکنش متوقف شود. میزان جذب pNP آزاد شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. این عمل برای هر نمونه در سه تکرار انجام شد. فعالیت آنزیم‌ها به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر و زمان یک دقیقه اندازه‌گیری شد.

تجزیه آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار آماری MSTATC صورت گرفت و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف پس‌رسی، جیبرلین و آبسیزیک اسید بر جوانه‌زنی بذر خواب و پس‌رس شده

جدول آنالیز واریانس بیانگر معنی‌دار بودن اثر تیمارهای مختلف بر جوانه‌زنی می‌باشد (جدول ۱). مقایسه میانگین تیمارها نشان می‌دهد که تیمار پس‌رسی و جیبرلین سبب کاهش سطوح خواب و افزایش میزان جوانه‌زنی شدند که البته تفاوت بین هفته ششم پس‌رسی و تیمار جیبرلین در شکستن خواب معنی‌دار نیست (جدول ۲). با افزایش دوره پس‌رسی، درصد جوانه‌زنی افزایش یافت به طوری که درصد جوانه‌زنی از صفر (خواب) به ۷۱٪ در شش هفته پس‌رسی رسید.

جدول۱- جدول تجزیه واریانس برای جوانه‌زنی و فعالیت فسفاتازها در بذر گندم رقم RL4137

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد جوانه‌زنی	فعالیت اسید فسفاتاز	فعالیت آلکالین فسفاتاز
تیمار	۹	۰/۲۱۸ **	۰/۰۳۵**	۰/۰۰۲**
خطا	۳۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۰۲
ضریب تغییرات (درصد)		۱۰/۱۴	۲/۵۱	۲/۸۷

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف پس‌رسی و تیمارهای هورمونی بر درصد جوانه‌زنی بذر خواب و پس‌رس شده

تیمار	درصد جوانه‌زنی	گروه‌بندی دانکن
بذر خواب	۰	e
هفته اول پس‌رسی	۶/۵	d
هفته دوم پس‌رسی	۷/۵	d
هفته سوم پس‌رسی	۷/۵	d
هفته چهارم پس‌رسی	۱۶/۵	c
هفته پنجم پس‌رسی	۳۶/۵	b
هفته ششم پس‌رسی	۷۱	a
جیبرلین	۷۳	a
بذر پس‌رس شده به مدت شش هفته		
اسید آبسیزیک (۱۰۰ میکرومول)	۷۱	a
اسید آبسیزیک (۲۰۰ میکرومول)	۳۴	b

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

تأثیر آبسیزیک اسید در القاء خواب بذر، وابسته به غلظت آن بود. تیمار ۱۰۰ میکرومول از این هورمون تأثیری بر کاهش جوانه‌زنی بذر پس‌رس شده نداشت. اما در تیمار ۲۰۰ میکرومول از آبسیزیک اسید درصد جوانه‌زنی حدود ۵۰٪ کاهش یافت. این نتیجه بیانگر این مطلب است که آبسیزیک اسید باعث القاء خواب در بذرهای فاقد خواب در گندم می‌شود.

در این آزمایش، بالاترین درصد جوانه‌زنی در تیمار جیبرلین و بذرها با شش هفته پس‌رسی مشاهده شد. این نتایج بیانگر این مهم هستند که جیبرلین می‌تواند جایگزین اثر پس‌رسی در فرایند شکست خواب بذردر گندم گردد و آبسیزیک اسید باعث القاء خواب در بذرهای فاقد خواب می‌گردد.

تأثیر سطوح مختلف پس‌رسی، جیبرلین و آبسزیک اسید بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز محور جنینی بذر خواب و پس‌رس شده

تیمار پس‌رسی تا سه هفته اول، اثر مثبت روی فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز داشت. اما این افزایش با گذشت زمان پس‌رسی در طی هفته های بعدی حفظ نگردید (جدول ۳). بیشترین میزان فعالیت آنزیم در بذرهایی که سه هفته پس‌رسی را طی کرده بودند مشاهده شد. سه هفته پس‌رسی سبب افزایش ۷۵ درصدی فعالیت اسید فسفاتاز در محور جنینی شد. تیمارهای هفته های چهارم، پنجم و ششم دارای فعالیت مشابهی از آنزیم اسید فسفاتاز بودند و روند صعودی و افزایشی از خود نشان ندادند.

با توجه به جدول ۳ در مقایسه با تیمارهای پس‌رسی، هورمون جیبرلین اثر مثبتی بر افزایش فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز نداشت. این نتیجه با نتایج شارما و همکاران در سورگوم همخوانی ندارد. نامبردگان گزارش کردند که تیمار جیبرلین به ترتیب سبب افزایش و کاهش اسید فسفاتاز در جنین و آندو سپرم بذر سورگوم می‌شود (Sharma et al., 2004). در مطالعه‌ای دیگر Reyes et al. (2006) بیان کردند که فوق بیان ژن فسفاتاز سبب جلوگیری از بیوسنتز جیبرلین می‌شود.

بر خلاف جیبرلین، آبسیزیک اسید در القاء خواب بذر نقش مثبتی داشت. تیمار ۲۰۰ میکرومول آبسیزیک اسید در مقایسه با هفته سوم پس‌رسی سبب کاهش ۵۴ درصدی فعالیت اسید فسفاتاز در محور جنینی شد. این میزان کاهش معادل فعالیت این آنزیم در هفته اول پس‌رسی بود. Sharma et al. (2004) نیز گزارش مشابهی مبنی بر کاهش اسید فسفاتاز در جنین بذر سورگوم توسط آبسیزیک اسید ارائه کردند.

تأثیر سطوح مختلف پس‌رسی، جیبرلین و آبسیزیک اسید بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز محور جنینی بذر خواب و پس‌رس شده

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با افزایش دوره پس‌رسی

جدول ۳- اثر سطوح مختلف پس‌رسی و تیمارهای هورمونی بر فعالیت آنزیم‌های اسید و آلکالین فسفاتاز محور جنینی بذر خواب و پس‌رس شده گندم نان رقم RL4137

تیمار	اسید فسفاتاز (OD)	گروه‌بندی دانکن	آلکالین فسفاتاز (OD)	گروه‌بندی دانکن
بذر خواب	۰/۰۸۵۱	de	۰/۰۷۳۳	a
هفته اول پس‌رسی	۰/۱۹۲۸	c	۰/۰۵۱۹	abc
هفته دوم پس‌رسی	۰/۲۹۳۰	ab	۰/۰۶۹۵	a
هفته سوم پس‌رسی	۰/۳۲۰۰	a	۰/۰۶۶۴	ab
هفته چهارم پس‌رسی	۰/۲۱۴۸	bc	۰/۰۴۸۸	abc
هفته پنجم پس‌رسی	۰/۲۰۵۷	bc	۰/۰۳۵۲	bc
هفته ششم پس‌رسی	۰/۲۲۶۵	bc	۰/۰۲۷۴	c
جیبرلین (۱۰۰ میکرومول)	۰/۰۲۳۳	e	۰/۰۶۴۲	ab
بذر پس‌رس شده به مدت شش هفته				
اسید آبسیزیک (۲۰۰ میکرومول)	۰/۱۴۷۲	cd	۰/۰۲۰۰	c

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

به صورت خطی کاهش می یابد به طوری که میزان فعالیت این آنزیم در هفته ششم پس‌رسی نسبت به شاهد ۹۷ درصد کاهش نشان داد که بیانگر به حداقل رسیدن فعالیت این آنزیم است.

میزان فعالیت این آنزیم در تیمار با ۱۰۰ میکرومول هورمون جیبرلین معادل بذرهای هفته سوم پس‌رسی بود و این میزان تفاوت معنی‌داری با بذرهای خواب و هفته‌های اول و دوم و همچنین چهارم نشان نداد. تیمار جیبرلین برای شکستن خواب بر خلاف تیمارهای پس‌رسی، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را کاهش نداد. در نتیجه می‌توان گفت که تیمار هورمونی جیبرلین در مقایسه با فرایند پس‌رسی اثر کاهشی کمتر بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز داشته که با نتایج Sharma et al. (2004) مطابقت دارد.

در تیمار ۲۰۰ میکرومول آبسیزیک اسید بر روی بذرهای پس‌رس شده (شش هفته پس‌رسی) میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز مشابه بذرهای سطح ششم پس‌رسی بود و این امر نشانگر اثر عدم تأثیر این هورمون بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در بذرهای پس‌رس شده می‌باشد. به عبارت دیگر اثر اسید آبسیزیک در القاء خواب بذر از راه کاهش آنزیم آلکالین فسفاتاز بعید به نظر می‌رسد. این نتایج در تضاد با نتایج Sharma et al. (2004) و هم راستای نتایج Hey et al. (1997) و Merlot et al. (2001) است.

بحث

برخی بذرها نیازمند به یک دوره زمانی در شرایط محیطی خاص برای شکستن خواب خود هستند. این دوره پس‌رسی نام دارد. نتایج حاصل از این آزمایش نشانگر اثر مثبت این دوره بر جوانه‌زنی بذر گندم رقم RL4137 بود. میزان جوانه‌زنی در طی دوره پس‌رسی به مدت شش هفته در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی، ۷۱ درصد افزایش یافت. این نتیجه با نتایج Etezadi et al. (2003) در گندم و Dastaran & Tavakkol Afshari (2009) در جو هماهنگی دارد. در بذر برنج و یولاف وحشی نیز نتایج مشابهی در طی دوره پس‌رسی گزارش شده است (Gianinetti & Venieri, 2007; Foley & Fennimore, 1998). اما شکستن خواب در بسیاری از موارد نیاز به زمان طولانی و شرایط محیطی خاص دارد، بنابراین استفاده از تیمارهای شیمیایی مؤثر در شکست خواب مانند هورمون‌های گیاهی امروزه بسیار متداول شده است. جیبرلین یک هورمون ضروری در جوانه‌زنی بذر است (Ogawa et al., 2003). همچنین از این هورمون در شکست خواب بذر بسیار استفاده می‌شود. نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار ۱۰۰ میکرومول از اسید جیبرلیک جوانه‌زنی را در بذر خواب ۷۳ درصد افزایش داد که مشابه با درصد جوانه‌زنی پس از شش هفته پس‌رسی بود. اثر مثبت این هورمون در شکستن خواب بذر زمان طولانی پس‌رسی را بسیار کوتاه و تقریباً حذف کرد. در یک بررسی، نقش

مثبت جیبرلین در فیزیولوژی جوانه‌زنی غلات را افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و همچنین اسیدی کردن محیط آندوسپرم برای افزایش فعالیت سایر آنزیم‌های هیدرولیزی دانسته‌اند (Dominguez & Cejudo, 1999).

نقش متضاد هورمون‌های گیاهی در القاء و شکستن خواب بذر از دیرباز مورد توجه محققین بوده است (Finkelstein et al., 2008). آبسیزیک اسید یکی از هورمون‌های مطرح در کاهش اثر اسید جیبرلیک در جوانه‌زنی و القاء خواب بذر است (Kermode, 2005). تیمار ۱۰۰ میکرومول آبسیزیک اسید تأثیری در کاهش جوانه‌زنی و یا القاء خواب بذر نداشت، اما ۲۰۰ میکرومول آن توانست جوانه‌زنی را ۵۲ درصد کاهش دهد و درصد جوانه‌زنی مشابه با درصد جوانه در هفته پنجم پس‌رسی بود. وابستگی القاء خواب بذر در گندم نان به غلظت آبسیزیک اسید در این آزمایش می‌تواند پیشنهاد کننده این موضوع باشد که غلظت‌های بالاتر این هورمون در افزایش سطح خواب بذر نقش مثبتی دارند. توجه به حساسیت پاسخ به هورمون‌های گیاهی نیز همانند غلظت هورمون‌ها دارای اهمیت زیادی است (Ogawa et al., 2003). در این آزمایش سعی شد که اثر هورمون‌ها را در حداکثر و حداقل حساسیت که همان مرحله خواب و پس‌رس بذر بوده در نظر گرفته شود. در رابطه با جیبرلین به نظر می‌رسد که در بذر خواب حداکثر پاسخ‌دهی و حساسیت به این هورمون وجود دارد اما برای آبسیزیک اسید پاسخ به سوال هایی نظیر حساسیت مراحل مختلف پس‌رسی به این هورمون همچنان نیاز به تحقیق دارد. نقش بازدارندگی هورمون آبسیزیک اسید در بذر پس‌رس و غیر خواب محدود به اعمال کنترل رشد و نمو محور جنینی در مرحله سوم جوانه‌زنی است در صورتی که در بذرهای خواب این محدودیت بر مراحل یک و دو جوانه‌زنی که همان مراحل اصلی و واقعی جوانه‌زنی هستند اعمال می‌گردد (Gianinetti & Venieri, 2007). در یک تحقیق بر روی خواب بذر برنج قرمز، عامل اصلی خواب بذر حساسیت به هورمون آبسیزیک اسید و نه سطوح داخلی این هورمون در بذر گزارش شد (Gianinetti & Venieri, 2007). در این تحقیق همچنین کاهش سطوح آبسیزیک اسید در طی دوره پس‌رسی علیرغم حساسیت بالا به این هورمون عامل اصلی جوانه‌زنی بذر برنج قرمز بوده است.

در این تحقیق، سه هفته پس‌رسی، فعالیت اسید فسفاتاز را ۷۵ درصد افزایش داد، البته این افزایش ازهفته سوم به بعد مشاهده نشد و تقریباً به صورت ثابت باقی ماند. این در حالی بود که، تیمار ۱۰۰ میکرومول جیبرلین تأثیر معنی‌داری بر افزایش این آنزیم نداشت. این نتیجه در راستای نتایج Reyes et al. (2006) می‌باشد. این محققین بیان کردند که فوق بیان ژن فسفاتاز سبب جلوگیری از بیوسنتز جیبرلین می‌شود. البته در تحقیقات متعدد دیگر جیبرلین سبب افزایش فعالیت اسید فسفاتاز در غلات شده است. در یک گزارش فعالیت این آنزیم در مراحل جوانه‌زنی بذر گندم افزایش و محتوی فیتات کاهش یافت (Centeno et al., 2003). ۲۰۰ میکرومول آبسیزیک اسید سبب کاهش معنی‌دار ۳۵ درصدی اسید فسفاتاز در جنین بذر پس‌رس شد. به عبارت دیگر سطوح فعالیت این آنزیم بسیار مشابه با بذر خواب و اوایل دوره پس‌رسی بود. بنابراین علیرغم عدم تأثیر جیبرلین بر افزایش فعالیت این آنزیم، آبسیزیک اسید سبب کاهش فعالیت آن شد. بر اساس نتایج این آزمایش، اثر آنتاگونیستی جیبرلین و آبسیزیک اسید بر فعالیت اسید فسفاتاز وجود نداشته و به نظر می‌رسد دوره پس‌رسی از روشی دیگر در افزایش فعالیت این آنزیم نقش دارد. اثر بازدارندگی اسید آبسیزیک بر جوانه‌زنی ممکن است بوسیله محدود کردن انرژی قابل دسترس متابولیت‌ها باشد (Kermode, 2005). در سورگوم گزارش شده که جیبرلین و آبسیزیک اسید به ترتیب سبب افزایش و کاهش اسید فسفاتاز در جنین بذر شد، اما در آندوسپرم جیبرلین کاهش و آبسیزیک اسید افزایش فعالیت این آنزیم را به همراه داشت (Sharma et al., 2004).

فعالیت آلکالین فسفاتاز در جنین با شش هفته پس‌رسی به میزان ۶۲ درصد کاهش یافت. بر خلاف پس‌رسی طبیعی، تیمار ۱۰۰ میکرومول جیبرلین تغییری در فعالیت آلکالین فسفاتاز را در مقایسه با جنین بذر خواب به همراه نداشت. در مقایسه با اسید فسفاتاز، آبسیزیک اسید تأثیری بر کاهش فعالیت آلکالین فسفاتاز جنین نداشت. با توجه به نقش آبسیزیک اسید در کاهش درصد جوانه‌زنی بذر پس‌رس،

نمی‌توان نقش این هورمون را به کاهش فعالیت این آنزیم مرتبط دانست. در جنین و آندوسپرم بذر سورگوم، جیبرلین و آبسیزیک سبب افزایش فعالیت اسید و آلکالین فسفاتاز شدند (Sharma et al., 2004). نکته قابل توجه در این تحقیق یکسان بودن فعالیت اسید و آلکالین فسفاتاز در جنین بذر خواب بود (به ترتیب ۰/۰۸۵۱ و ۰/۰۷۳۳). نشان دادن الگوی متفاوت فعالیت این دو آنزیم پس از اعمال دوره پس‌رسی بیانگر مکانیزم‌های متفاوت فیزیولوژیک در محور جنین بذر گندم می‌باشد. همچنین باید متذکر شد که مقایسه تیمار جیبرلین در این دو آنزیم، بیانگر تأثیر بیشتر این هورمون بر اسید فسفاتاز می‌باشد. در رابطه با آبسیزیک اسید مشابه با جیبرلین، تأثیر بر اسید فسفاتاز بیشتر از آلکالین فسفاتاز بوده است.

فیتات به عنوان مهمترین فرم ذخیره فسفر در دانه غلات و لگوم‌ها بوده و همچنین به عنوان یک کمپلکس نمکی با کلسیم و منیزیوم در ترکیب مایواینوسیتول می‌باشد (Ashford & Jacobsen, 1974). فسفات نقش مهمی در انتقال انرژی داشته و همچنین یک تنظیم‌کننده متابولیکی است. به علاوه فسفات یکی از اجزای تشکیل‌دهنده ماکرومولکول‌ها مانند فسفولیپید، پروتئین و اسید نوکلئیک است. در صورت کاهش میزان فسفات، رشد و نمو بذر دچار اختلال می‌شود. فسفاتازها شامل اسید و آلکالین گروهی از آنزیم‌ها هستند که هیدرولیز استرهای فسفات را در محیط‌های اسیدی و قلیایی کاتالیز می‌کنند (Gibson & Ullah, 1990). بنابراین، فعالیت این آنزیم‌ها با فراهم کردن فسفات و متابولیسم در ارتباط مستقیم می‌باشد.

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان بر نقش متفاوت فیزیولوژی شکست خواب توسط دوره پس‌رسی و تیمار شیمیایی تأکید کرد. دوره پس‌رسی با افزایش اسید فسفاتاز و کاهش آلکالین فسفاتاز در شکست خواب و افزایش درصد جوانه‌زنی نقش ایفا کرد، لیکن جیبرلین تأثیری بر فعالیت این آنزیم‌ها به همراه نداشت و نمی‌توان نقش مثبت جیبرلین در افزایش درصد جوانه‌زنی را به فعالیت این آنزیم‌ها مرتبط دانست. در القاء خواب بذر پس‌رس شده، اهمیت کاهش فعالیت اسید فسفاتاز را می‌توان به عنوان یک عامل فیزیولوژیک تأثیرگذار در نظر گرفت.

REFERENCES

1. Ashford, A. E. & Jacobsen, J. V. (1974). Cytochemical localization of phosphatase in barley aleurone cells: the pathway of gibberellic acid induced enzyme release. *Planta*, 120, 81-105.
2. Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9, 1055- 1066.
3. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method of microgram quantities of protein ultilizing the principle of protein-dying. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
4. Centeno, C., Viveros, A., Brenes, A., Lozano, A. & De La Cuadra, C. (2003). Effect of several germination conditions on total P, phytate P, phytase, acid phophatase activities and inositol phosphate esters in spring and winter wheat. *Journal of Agricultural Science*, 141, 313-321.
5. Dastaran Mamaghani, F. & Tavakkol Afshari, R. (2009). Study of seed dormancy, period of after-ripening, and pre-harvest sprouting resistance in barley genotypes. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 40, 77-88. (In Farsi).
6. Dominguez, F. & Cejudo, F. J. (1999). Patterns of starchy endosperm acidification and protease gene expression in wheat grains following germination. *Plant Physiology*, 119, 81-88.
7. Etezadijam, J., Tavakkol Afshari, R., Yazdi-Samadi, B. & Hoseinzadeh, H. (2005). Pre-harvest sprouting resistance and study of correlation and path analysis of seed characteristics with pre-harvest sprouting resistance in bread wheat. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 36, 733-742. (In Farsi).
8. Finkelstein, R., Reeves, W., Arizumi, T. & Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 387-415.
9. Foley, M. E. & Fennimore, S. A. (1998). Genetic basic for seed dormancy. *Seed Science Research*, 8, 173-182.
10. Gianinetti, A. & Vernieri, P. (2007). On the role of abscisic acid in seed dormancy of red rice. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3449-3462.
11. Gibson, D. M. & Ullah, A. B. J. (1990). Phytase and their action on phytic acid. In: Eds: Morre, D.J., Boss, W.F., and Loewus, F.A. *Inositol metabolism in plants*. Pp. 77-92. Wiley-Liss, New York.
12. Goggin, D. E., Steadman, K. J., Neil Emery, R. J., Farrow, S. C., Benech-Arnold, R. L. & Powels, S. B. (2009). ABA inhibits germination but not dormancy release in mature imbibed seeds of *Lolium rigidum*

Gaud. *Journal of Experimental Botany*, 60, 3387-3396.
13. Hey, S. J., Bacon, A., Burnett, E. & Neill, S. J. (1997). Abscisic acid singal transduction in epiderma cells of *Pisum sativum* L. Argenteum: both dehydrin mRNA accumulation ans stomatal responses require protein phosphorylation and dephosphorylation. *Planta*, 202, 85-92.
14. Hilhorst, H. W. M. & Karssen, C. M. (1992). Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regulation*, 11, 225-238.
15. Kawakami, N., Miyake, Y. & Noda, K. (1997). ABA insensitivity and low ABA levels during seed development of non-dormant wheat mutants. *Journal of Experimental Botany*, 48, 1415–1421.
16. Kermode, A. R. (2005). Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24, 319-344.
17. Kucera, B., Cohn, M. A. & Leubner-Metzger, G. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15, 281-307.
18. Lee, T. M. (2000). Phosphate starvation induction of acid Phosphatase in *Ulva lactuca L*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39, 29-32.
19. Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. & Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant Journal*, 25, 295-303.
20. Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. & Yamaguchi, S. (2003). Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *The Plant Cell*, 15, 1591-1604.
21. Pan, S. M. & Chen, Y. R. (1988). The effects of salt stress on acid phosphatase activity of *Zea maysa* seedling. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 29, 33-38.
22. Ravikumar, R., Ananthakrishnan, G., Ganapathi, A. & Appasamy, T. (1998). Biochemical changes induced by accelerated ageing in *Bambusa bambos* seeds. *Biologia Plantarum*, 40, 459-464.
23. Razeghi Yadak, F. & Tavakkol Afshari, R. (2010). Effect of drought stress on seed embryo axis phosphatase activities during early stages of germination of two bread wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 41, 385-392. (In Farsi).
24. Reyes, D., Rodriguez, D., Gonzalez-Garcia, M., Lorenzo, O., Nicolas, G., Garca-Martnez, J. & Nicolas, C. (2006). Overexpression of a protein phosphatase 2C from Beech seeds in Arabidopsis shows phenotypes related to abscisic acid responses and gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, 141, 1414–1424.
25. Ruan, C., Wang, W. & Gu, B. (2006). Detection of alkaline phosphatase using surface-enhanced raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 78, 3379-3384.
26. Senna, R., Simonin, V., Silva-Neto, M. A. C. & Fialho, E. (2006). Induction of acid phosphatase activity during germination of maize seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 467-473.
27. Sharma, A., Thakur, M., Rana, M. & Singh, K. (2004). Effect of plant growth hormones and abiotic stresses on germination, growth and phosphatase activities in *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds. *African Journal of Biotechnology*, 3, 308-312.
28. Tabaldi, L. A., Ruppenthal, R., Pereira, L.B., Cargnelutti, D., Goncalves, J. F., Morsch, V. M. & Schetinger, M. R. C. (2008). Presence of multiple acid phosphatase activity in seedling s of cucumber, radish and rocket salad. *Ciencia Rural*, 38, 1-5.
29. Tavakkol Afshari, R. & Hucl, P. (2002). Variation of seed dormancy and after-ripening in tetraploid wheat. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 4, 23-36.
30. Zadoks, J. C., Change, T. T. & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14, 415-421.