



علوم و تحقیقات بذر ایران
سال هفتم/ شماره اول/ ۱۳۹۹ (۵۴ - ۴۱)

DOI: 10.22124/jms.2020.4316

اثر امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی، فعالیت برخی آنزیم‌ها و ویژگی‌های بیوشیمیایی بذر سرخارگل

فاطمه رسولی^{۱*}، منوچهر قلی‌پور^۲، کامبیز جهانبین^۲، حمیدرضا اصغری^۲

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۴

چکیده

یکی از روش‌های بیوفیزیکی پرایمینگ بذر، پیش‌تیمار بذر با امواج فراصوتی می‌باشد. ضربه‌های ممتد امواج فراصوتی سبب افزایش نفوذپذیری پوسته بذر، تسریع جذب آب و بالارفتن دمای بافت‌ها می‌شود. بالارفتن سرعت آماس و دمای بافت‌های بذرهای تیمار شده با امواج فراصوتی احتمالاً با تسریع در تغییرات متابولیسم بذر همراه می‌باشد. جوانه‌زنی بذر سرخارگل ضعیف و نامنظم می‌باشد که ناشی از خواب بذر می‌باشد. بنابراین به‌منظور بررسی اثر امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی، فعالیت برخی آنزیم‌ها و پارامترهای بیوشیمیایی جوانه‌زنی بذر سرخارگل، آزمایشی در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه زراعت دانشگاه صنعتی شاهرود در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۵ مدت تیمار امواج فراصوتی ۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه با دستگاه التراسونیک با قدرت ثابت ۵۰ وات و دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که امواج فراصوتی بر صفات اندازه‌گیری شده اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد. امواج فراصوتی فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، پروتئاز، الکل‌دهیدروژناز، گلوکز ۶- فسفات‌دهیدروژناز، غلظت پروتئین کل، محلول و قند کل را در اغلب تیمارها نسبت به شاهد افزایش داد. با افزایش فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، پروتئاز، الکل‌دهیدروژناز، آرژیناز و گلوکز ۶- فسفات‌دهیدروژناز درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و وزن خشک گیاهچه افزایش یافت. در بیش‌تر صفات اندازه‌گیری شده مدت ۱۵ دقیقه تیمار با امواج فراصوتی بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌ها و شاخص‌های جوانه‌زنی را نشان داد، بنابراین مدت ۱۵ دقیقه تیمار امواج فراصوتی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و قدرت ۵۰ وات برای پیش‌تیمار بذر سرخارگل پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آلفا آمیلاز، الکل‌دهیدروژناز، پروتئاز، پروتئین، گلوکز ۶- فسفات

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

۲- اعضای هیأت علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

*نویسنده مسئول: f.rasouli86@gmail.com

مقدمه

سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* L. (Moench) از تیره Astraceae، بومی آمریکای شمالی می‌باشد، ولی امروزه در اکثر نقاط آسیا، اروپا و ایران کشت می‌شود. نام گیاه از ریشه کلمه‌ی یونانی *Echinos* به معنی جوجه‌تیغی گرفته شده است، که اشاره به تیغ-دار بودن و خارهای برجسته روی بذرهای گیاه دارد (Cheryl-Kaiser et al., 2015; Chinard, 1952). مواد مؤثره این گیاه سبب افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌گردد، از آن‌جاکه این گیاه خاصیت تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی بدن را داشته و ضد ویروس می‌باشد، در درمان بسیاری از بیماری‌های ویروسی می‌توان از آن استفاده کرد (Razavinia et al., 2015; Li, 1998).

بذر عامل تکثیر و بروز ویژگی‌های زراعی یک ژنوتیپ و مهم‌ترین نهاده تولید محصولات زراعی و دستیابی به پتانسیل واقعی عملکرد است. جوانه‌زنی بذور سرخارگل ضعیف و نامنظم می‌باشد که ناشی از خواب فیزیکی بذر می‌باشد (Atwater, 1980). خواب بذر سرخارگل ترکیبی از دو نوع خواب فیزیولوژیک (درب‌گیرنده کنترل‌هایی در درون خود جنین) به همراه خواب فیزیکی است (Rasouli, 2018). کشت مستقیم بذر سرخارگل موجب جوانه‌زنی پایین و غیرقابل قبولی می‌گردد. در یک آزمایش مزرعه‌ای سرخارگل، جوانه‌زنی کم‌تر از ۱۰ درصد بذور سرخارگل گزارش شده است (Smith-Jochum and Albrecht, 1987).

پرایمینگ بذر شامل روش‌های بسیار ساده‌ای است که می‌تواند در جوانه‌زنی بهتر و استقرار مطلوب گیاهچه مؤثر باشد. یکی از روش‌های بیوفیزیکی پرایمینگ بذر، پیش-تیمار بذرها با امواج فراصوتی می‌باشد (Yaldagard et al., 2008). امواج فراصوتی، امواج مکانیکی هستند که فرکانس آن‌ها بیش از ۲۰ کیلو هرتز (KHZ)، دارای انرژی بالایی بوده و می‌توانند سبب بالارفتن دمای بافت‌ها شوند (Lipiec et al., 2004). امواج فراصوت سبب نفوذپذیری پوسته بذر، تسریع در جذب آب و بالارفتن دمای بافت‌ها می‌شوند، افزایش دمای بافت‌ها موجب تسریع در سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی جوانه‌زنی می‌گردد؛ افزایش جذب آب باعث شتاب در آماس بذرهای تیمار شده می‌گردد و به‌دنبال آن تغییرات محسوسی در متابولیسم بذر رخ می-

دهد (Copeland and McDonald, 1936). آبنوشی بذر اجازه فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک از جمله آمیلازها جهت شکستن نشاسته، پروتئاز برای تجزیه پروتئین و لیپاز جهت شکستن لیپیدها را می‌دهد. ترکیب عمل این آنزیم‌های هیدرولیتیک موجب فراهم‌شدن قندهای اصلی، آمینواسیدها و اسیدهای چرب شده و انتقال آن‌ها به محور جنینی را به دنبال دارد (Copeland and McDonald, 1936). با افزایش فعالیت آنزیم‌های جوانه‌زنی شاخص‌های جوانه‌زنی تحت اثر امواج فراصوتی بهبود می‌یابد (Chen et al., 2012). امواج فراصوتی قدرت بذر، بذرهای گیاهان مختلف را افزایش می‌دهد، اما شرایط بهینه اعمال تیمار امواج فراصوتی در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. امواج فراصوتی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، ۴۶۰ وات و ۱۵ دقیقه در گیاه جو حداکثر جوانه‌زنی را در پی داشت (Chen et al., 2012). امواج فراصوتی باعث افزایش شاخص‌های رشد به‌ویژه طول ریشه در گیاهچه می‌شود که این عمل می‌تواند در کسب رطوبت و مواد غذایی از محیط نقش به‌سزایی داشته باشد (Shin et al., 2011; Kim et al., 2006). گزارش شده است که پیش‌تیمار با امواج فراصوتی در جو سبب افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و به‌دنبال آن افزایش جوانه‌زنی در گیاه جو گردید (Yaldagard et al., 2008). آن‌ها دلیل افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و جوانه‌زنی جو را افزایش نفوذ-پذیری پوسته جو نسبت به آب، تسهیل در نفوذپذیری و افزایش سرعت نفوذ آب و به‌دنبال آن آماس بذر بیان کردند. گزارش شده است که پیش‌تیمار امواج فراصوتی سبب افزایش سرعت جوانه‌زنی در بذر ریحان گردید (Rasouli et al., 2015). یکی از مشکلات در کشت و تجاری‌سازی سرخارگل جوانه‌زنی نامناسب، ضعیف و تراکم نامناسب گیاهچه‌های سرخارگل می‌باشد، از این رو هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر امواج فراصوتی بر جوانه‌زنی، فعالیت برخی آنزیم‌ها و ویژگی‌های بیوشیمیایی بذر سرخارگل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این مطالعه از گونه *Echinacea purpurea* L. تهیه‌شده از پاکان بذر اصفهان که در سال ۱۳۹۶ تولید شده بود، استفاده شد.

نشاسته یک درصد و ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج بود که با ورتکس با هم مخلوط شدند و سپس در بن‌ماری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر معرف ۵ و ۳ دی-نیتروسالیسیلیک اسید متوقف شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر مدل Unico chinees قرائت گردید. در انتها با منحنی استاندارد مالتوز، فعالیت آلفا آمیلاز بر اساس قند احیایی مالتوز تشکیل شده ($\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{FW}$) محاسبه و بیان گردید (Guglieminetti *et al.*, 1995).

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز

برای استخراج عصاره جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز از بذره‌های سرخارگل پس از طی ۲۴ ساعت از جوانه‌زنی استفاده گردید. ۰/۲۵ گرم از بذر جوانه‌زده با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۲ مولار با $\text{pH}=7/5$ هموزن گردید. سپس عصاره حاصل با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. از فاز شفاف رویی برای فعالیت آنزیم استفاده شد (Marambe *et al.*, 1992).

سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز بر اساس روش مارامبی (Marambe *et al.*, 1992) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات، ۲۵۰ میکرولیتر عصاره و حجم مخلوط واکنش به یک میلی‌لیتر رسانده شد. واکنش با اضافه کردن یک میلی‌لیتر کازین یک درصد آغاز شد. مخلوط واکنش به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. واکنش با اضافه کردن ۳ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۵ درصد متوقف شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت میزان پروتئین محلول با روش بردفورد (Bradford, 1976) در طول موج ۵۹۵ نانومتر و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز

برای استخراج آنزیم ۰/۲ گرم بذر سرخارگل ۲۴ ساعت پس از آبتوشی با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون چینی سرد ساییده و هموژنیزه گردید. آن‌گاه از دو لایه پارچه ململ عبور داده شد و عصاره حاصل به میکروتیوپ-ها منتقل شد. میکروتیوپ‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در rpm

اجرای طرح آزمایشی: این آزمایش در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل اعمال تیمار امواج فراصوتی به مدت‌های ۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه با دستگاه التراسونیک (Elmasonic, Germany) با قدرت ثابت ۵۰ وات (انتخاب این قدرت بر اساس نتایج آزمایش-های مقدماتی بود که داده‌های آن ارائه نشد) بود. بذره‌های هر تکرار درون بشرهای حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفته و سپس در مدت زمان مورد نظر با امواج فراصوتی تیمار گردیدند. ۳۰ عدد بذر سرخارگل درون هر پتری-دیش قرار داده شد. ۵ تیمار در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت، جوانه‌زنی هر ۱۲ ساعت بررسی گردید. معیار جوانه‌زنی خروج ریشه‌چه به اندازه ۲ میلی‌متر یا بیش‌تر بود و جوانه‌زنی طی ۱۲ روز بررسی گردید.

در کلیه تیمارها، برای هر تکرار منحنی پیشرفت جوانه‌زنی در مقابل زمان (ساعت) ترسیم و زمان لازم برای ۵۰ درصد (D_{50}) جوانه‌زنی از طریق درون‌یابی برآورد گردید (Soltani and Maddah, 2010). درصد جوانه‌زنی با تقسیم تعداد بذره‌های جوانه‌زده به کل تعداد بذره‌های مورد استفاده ضرب در ۱۰۰ به دست آمد. محاسبات مورد نیاز با استفاده از برنامه جرمین (Germin) انجام شد (Soltani and Maddah, 2010).

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

استخراج آنزیم آلفا آمیلاز از روش گوگلی مینیتی (Guglieminetti *et al.*, 1995) صورت گرفت. برای استخراج عصاره از بذره‌های سرخارگل پس از طی ۲۴ ساعت از جوانه‌زنی آن‌ها استفاده گردید. ۰/۲ گرم از بذر جوانه‌زده با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل (استات سدیم ۵۰ میلی‌مولار و کلرید کلسیم ۲۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7/5$) با نیتروژن مایع هموزن گردید. سپس عصاره حاصل با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. فاز شفاف رویی به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۷۵ درجه سلسیوس به منظور غیرفعال کردن آنزیم بتا آمیلاز قرار داده شد.

در سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر از عصاره استخراجی، ۰/۵ میلی‌لیتر

P بود. افزایش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. ضریب خاموشی NADPH در طول موج ۳۴۰ نانومتر برابر $M^{-1} \text{cm}^{-1}$ ۶۲۲۰ می‌باشد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از تغییرات جذب نور در دقایق ۱ الی ۳ استفاده گردید. فعالیت آنزیم گلوکز-۶ فسفات دهیدروژناز بر حسب نانومول G-6-P اکسیدشده بر دقیقه بر گرم وزن تر بافت گیاهی بیان گردید.

استخراج و سنجش فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز

استخراج عصاره از روش کارلبرگ و مانرویک (Carlberg and Mannervik, 1985) انجام شد. جهت استخراج ۰/۰۵ گرم بافت تر گیاهیچه با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون چینی سرد هموژن گردید. بافر استخراج شامل فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۷/۵، اتیلن دی‌آمین تتراسدیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار، تریتون X-100 یک درصد، فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) یک میلی‌مولار و بتامرکاپتواتانول ۱ میلی‌مولار می‌باشد. پس از هموژن به درون میکروتیوپ ریخته و سپس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، دمای 4°C و مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از فاز شفاف رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز: مخلوط واکنش به حجم ۱ میلی‌لیتر شامل ۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر با ۶/۵ (۸۷۰ میکرولیتر)، گلوکاتایون اکسید شده (GSSG) ۲ میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر)، بتا نیکوتین آدنین دی‌نوکلوتید فسفات ۲ میلی‌مولار (۵۰ میکرولیتر) و عصاره (۳۰ میکرولیتر) بود. کاهش جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر و ضریب خاموشی (ϵ) برابر $6/22 \text{ m}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. از فعالیت آنزیم در ۱ دقیقه اول برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد (Carlberg and Mannervik, 1983). فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز بر حسب نانومول GSSG احیا شده بر دقیقه بر گرم وزن تر بافت گیاهی بیان گردید.

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم آرژیناز

برای استخراج عصاره آنزیمی، یک گرم بافت لپه‌ای به همراه محور لپه‌ای با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج در محیط سرد هموژن گردید. بافر استخراج شامل ۰/۱ مولار تریس، ۰/۵ مولار ملات، یک میلی‌مولار EDTA، ۰/۱

و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید و پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی (شفاف) برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت (Kang and Rawsthorne, 1996). سنجش فعالیت آنزیم الکل-دهیدروژناز به روش کانگ و روسترون (Kang and Rawsthorne, 1996) انجام شد. در این روش ۱۰۵۰ میکرولیتر مخلوط واکنش حاوی ۰/۸ میلی‌لیتر بافر تریس ۶۲/۵ میلی‌مولار با pH برابر با ۹، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پایه NAD ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۰/۰۵ میکرولیتر اتانول خالص بود. با اضافه کردن اتانول خالص به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی شروع شد. محلول بلانک فاقد اتانول خالص بود. تغییرات جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر برای مدت زمان ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم الکل‌دهیدروژناز بر اساس اتانول تجزیه شده در هر دقیقه به ازای هر گرم بافت بذر تازه جوانه زده با ضریب خاموشی (ϵ) برابر با $L \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ۶۲۲۰۰ بیان شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم از تغییرات جذب نور در یک دقیقه اول استفاده شد.

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم گلوکز-۶ فسفات دهیدروژناز

استخراج عصاره آنزیم گلوکز-۶ فسفات دهیدروژناز: ۰/۵ گرم بافت لپه با محور جنینی در هاون چینی سرد با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج حاوی تریس ۵۰ میلی‌مولار، سولفات منیزیم یک میلی‌مولار، کلرید پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۸ هموژن گردید. هموژن حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید و پس از سانتریفیوژ، فاز شفاف (میانی) برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت (Deutsch, 1983).

سنجش فعالیت آنزیم گلوکز-۶ فسفات

دهیدروژناز: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به روش دواچ (Deutsch, 1983) همراه با تغییراتی انجام شد. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل ۶۰۰ میکرولیتر از محلول تریس ۵۰ میلی‌مولار و کلرید منیزیم ۱ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر محلول پایه NADP^+ ۰/۱ میلی‌مولار، ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر محلول پایه G-6-P بود، با افزودن G-6-P به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی آغاز شد. بلانک فاقد G-6-

می‌گرم بر گرم وزن تر بیان شد. (Markwell *et al.*, 1981) و غلظت آن‌ها بر اساس استخراج و اندازه‌گیری قند کل: برای استخراج قندهای محلول از بذره‌های تازه جوانه‌زده (۰/۰۵ گرم) با اتانول بر اساس روش اوموکولو (Omokolo *et al.*, 1996) همراه با تغییراتی انجام شد و اندازه‌گیری قند کل از روش مک-کریدی (McCready *et al.*, 1950) انجام شد. داده‌های به‌دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد و رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مدت‌های مختلف امواج فراصوتی بر همه صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول‌های ۱ و ۲). درصد و سرعت جوانه‌زنی: شکل ۱ نتایج مقایسه میانگین درصد و سرعت جوانه‌زنی تحت اثر مدت‌های مختلف تیمار امواج فراصوتی را نشان می‌دهد، هر چهار مدت تیمار امواج فراصوتی سبب افزایش درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی نسبت به شاهد گردید. درصد جوانه‌زنی در تیمارهای ۱۵، ۲۵، ۲۰ و ۱۰ دقیقه به ترتیب ۵، ۹۲/۹۵، ۹۲، ۹۰/۸ و در تیمار شاهد ۸۸/۳ درصد بود. بیش‌ترین سرعت جوانه‌زنی در تیمار امواج فراصوتی ۱۵ دقیقه با میانگین ۰/۰۱۳ در ساعت مشاهده گردید (شکل ۱) B.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات حداکثر درصد جوانه‌زنی، سرعت تا پنجاه درصد جوانه‌زنی، وزن خشک گیاهچه، فعالیت آلفا آمیلاز، قند کل و پروتئاز

Table 1. Analysis of variance of Gmax, R50, Seedling dry weight, α amylase activity, Total sugar and Protease activity

S.O.V منابع تغییرات	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square					
		درصد جوانه‌زنی Gmax	سرعت جوانه‌زنی R50	وزن خشک گیاهچه Seedling dry weight	فعالیت آلفا آمیلاز α amylase activity	محتوای قند کل Total sugar content	فعالیت پروتئاز Protease activity
امواج فراصوتی Ultra-sound	4	19 **	0.00004 **	0.0002 **	0.1 **	5820**	26.7 **
اشتباه Error	15	1.3	0.000003	0.000003	0.001	216.4	2.2
ضریب تغییرات CV (%)		3.2	9.7	4.8	4.6	۶,۶	11

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**::Significant at 1% probability level

می‌مولار PMSF و ۲-مرکاپتواتانول ۱ v/v درصد هموزن گردید. هموزن حاصل از ۴ لایه توری مل‌مل گذرانده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. از فاز شفاف میانی برای اندازه‌گیری آنزیم استفاده شد (Roubelakis and Kliewer, 1978). قبل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آرژیناز، آنزیم با انکوبه کردن عصاره با ۱۰۰ می‌مولار Mn^{2+} در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با نسبت ۰/۹ می‌لیتر عصاره‌ی آنزیمی و ۰/۱ می‌لیتر Mn^{2+} ۱۰۰ می‌مولار فعال گردید (Greenberg, 1955). جهت اندازه‌گیری فعالیت آرژیناز از روش روی‌لاکیز و کلیور (Roubelakis and Kliewer, 1978) استفاده شد. مخلوط واکنش به حجم ۳ می‌لیتر که شامل ۳۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی فعال شده به همراه ۲۷۰۰ میکرولیتر محلول حد واسط بود. مخلوط واکنش در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. هر ۵ دقیقه ۰/۷ می‌لیتر از مخلوط واکنش برداشته شده و آزاد شدن اورنتین از آرژینین به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر تعیین شد (Chinard, 1952). بلانک نیز فاقد عصاره آنزیمی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. گرما سبب غیرفعال شدن آرژیناز می‌گردد. فعالیت این آنزیم بر اساس نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر بیان گردید.

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین محلول و کل: استخراج و اندازه‌گیری پروتئین محلول بر اساس روش برادفورد (Bradford, 1976) و کل از روش مارکول

جدول ۲ - تجزیه واریانس صفات پروتئین محلول، پروتئین کل، آنزیم الکل دهیدروژناز، آرژیناز و گلوکاتایون ردوکتاز

Table 2. Analysis of variance of solution protein, total protein, ADH, G-6-P, Arginase and GR

S.O.V منابع تغییرات	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square					
		محتوای پروتئین محلول Solution protein	محتوای پروتئین کل Total protein	فعالیت الکل دهیدروژناز ADH	فعالیت گلوکز-۶- فسفات G-6-P	فعالیت آرژیناز Arginase	فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز GR
امواج فراصوتی Ultra-sound	4	77.4**	4564**	5768742497**	0.000003**	1386**	3.5×10^{-3} **
اشتباه Error	15	7.8	597	11393134	0.000003	166.5	1.03
ضریب تغییرات CV (%)		4.8	10.3	6.4	9.1	5.9	8.1

** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

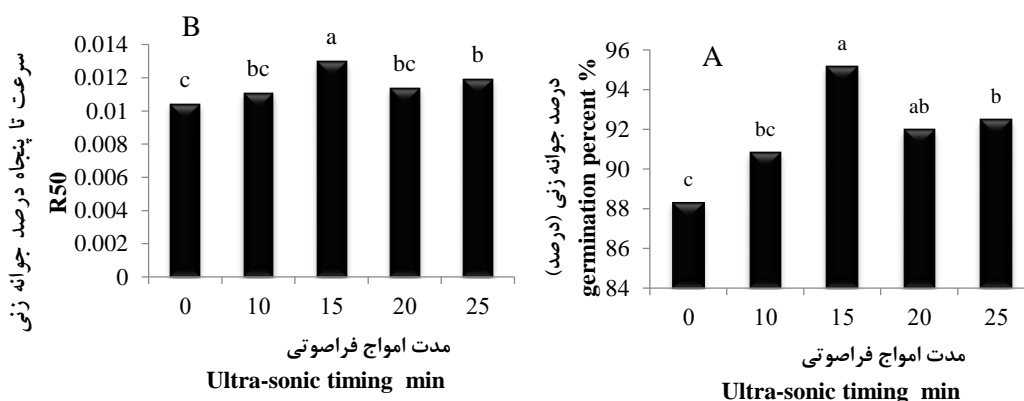
** Significant at 1% probability level

نشده). بهبود خصوصیات جوانه زنی و افزایش وزن تر در بذرهای جو پیش تیمار شده با امواج فراصوت گزارش شده است (Chen *et al.*, 2012). افزایش وزن گیاهچه در بذرهای جو پیش تیمار شده با امواج فراصوت می تواند ناشی از افزایش و تسریع متابولیسم با محتوی آبی بیش تر در گیاهان مرتبط دانست (Chen *et al.*, 2012).

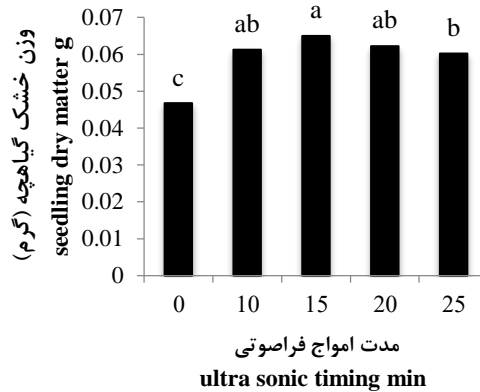
فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز: نتایج نشان داد که همه مدت زمان های تیمار امواج فراصوتی سبب افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز نسبت به شاهد گردید بیش ترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار ۲۵ دقیقه با میانگین ۱/۳۵ و کم ترین آن در تیمار شاهد با میانگین ۰/۷۵ میلی گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد (شکل A ۳). گزارش شده است که تیمار امواج فراصوتی در جو سبب افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و حداکثر جوانه زنی گردیده است (Yaldagard *et al.*, 2008).

به نظر می رسد که ارتعاشات پی در پی امواج فراصوت سبب نفوذپذیرتر شدن پوسته بذر و تسریع در جذب آب به داخل بذر شده باشد (Chen *et al.*, 2012). افزایش جذب آب باعث شتاب در آماس بذر تحت تأثیر امواج فراصوتی گردیده و به دنبال آن، جوانه زنی بهبود یافت. افزایش سرعت جوانه زنی را می توان به افزایش قابلیت دسترسی به آب نسبت داد که با افزایش جذب آب سرعت جوانه زنی افزایش یافته بود (Rasouli, 2018; Yaldagard *et al.*, 2008).

وزن خشک گیاهچه: شکل ۲ روند تغییرات وزن خشک گیاهچه را تحت اثر امواج فراصوتی نشان می دهد، بیش ترین میزان وزن خشک گیاهچه در مدت تیمار امواج فراصوتی ۱۵ دقیقه با میانگین ۷۰ میلی گرم و کم ترین نیز در تیمار شاهد با میانگین ۵۰ میلی گرم حاصل گردید. افزایش وزن خشک گیاهچه را می توان به افزایش کارایی استفاده از ذخایر بذر و قدرت بذر نسبت داد (نتایج ارائه



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر مدت تیمار بذر با امواج فراصوتی بر درصد جوانه زنی (A) و سرعت جوانه زنی (B) (hour⁻¹)
Figure 1. Mean comparison of ultra-sonic-wave time treatment effect on seed germination percent (A) and R50 (hour⁻¹) (B)



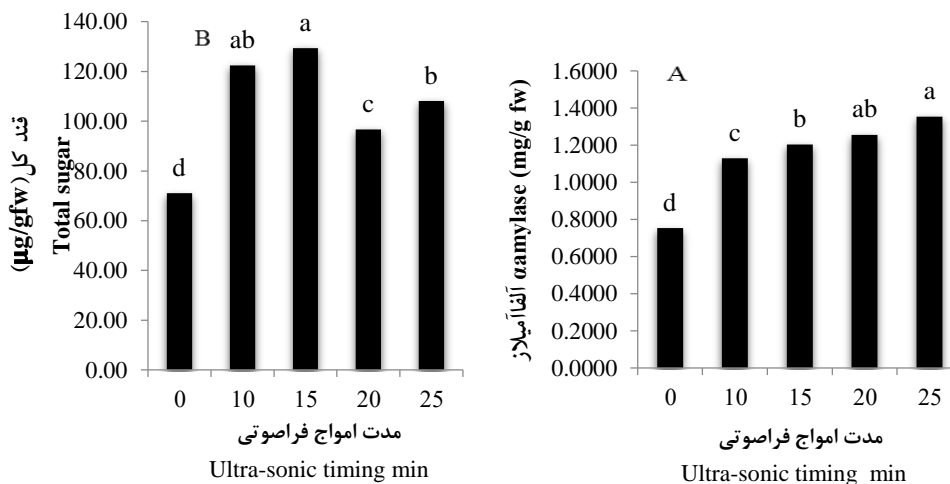
شکل ۲ - مقایسه میانگین اثر مدت تیمار بذر با امواج فراصوتی بر وزن خشک گیاهچه (گرم)

Figure 2. Mean comparison of ultra-sonic-wave time treatment effect on seedling dry matter

بذرهای خشک و در حال سکون با جذب آب شروع می-شود، جذب آب سبب افزایش سطح جیبرلیک اسید شده و به دنبال آن، جیبرلیک اسید موجب افزایش فعالیت آنزیم-های هیدرولیتیک از جمله آلفاآمیلاز می‌گردد. این افزایش منجر به تجزیه نشاسته به قند می‌گردد. هیدرولیز نشاسته یکی از اساسی‌ترین فعالیت‌ها در طول جوانه‌زنی می‌باشد زیرا تحرک قندهای کل نقش مهمی را در جهت کاهش پتانسیل آبی سلول و در نتیجه ورود آب به سلول و طولی-شدن سلول ایفا کرده و موجبات رشد گیاهچه را فراهم می‌آورد (Firenzuoli *et al.*, 1968; Copeland and McDonald, 1936). افزایش قندهای کل حتی بیان ژن‌های دخیل در تنظیم فرآیند اسمزی را در این مرحله تحت تأثیر قرار می‌دهد (Firenzuoli *et al.*, 1968; Marambe *et al.*, 1992; Copeland and McDonald, 1936).

آن‌ها این افزایش را به افزایش نفوذپذیری پوسته جو نسبت به آب، تسهیل در نفوذپذیری و افزایش سرعت نفوذ آب و به دنبال آن آماس بذر نسبت دادند که در نهایت جوانه‌زنی بهتر، سریع‌تر و بیش‌تر رخ داده بود (Yaldagard *et al.*, 2008). محققان متعددی (Yaldagard *et al.*, 2008; Sleper *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2011; Lipiec *et al.*, 2004; Machikowa *et al.*, 2013) افزایش سیالیت دیواره سلولی در نتیجه حرکت عناصر غذایی موجود در آندوسپرم را یکی دیگر از دلایل افزایش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز بیان داشتند.

قند کل: استفاده از پیش‌تیمار امواج فراصوتی تجمع قند کل را نسبت به شاهد افزایش داد به طوری که بیش‌ترین میزان قند کل در تیمار ۱۵ دقیقه با میانگین ۱۲۹ میلی-گرم بر گرم وزن تر حاصل گردید (شکل B ۳). جوانه‌زنی



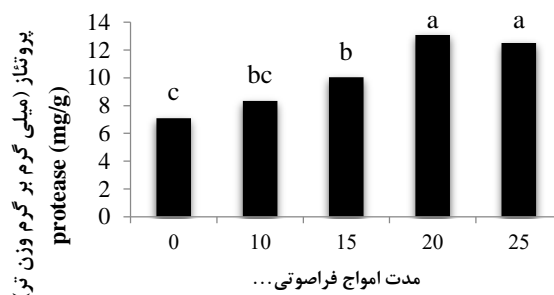
شکل ۳ - مقایسه میانگین اثر مدت تیمار بذر با امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز (A) و قند کل (B)

Figure 3. Mean comparison of ultra-sonic-wave time treatment effect on α-amylase activity (A) and total sugar (B)

پروتئاز باعث کاهش پروتئین‌ها در بذرهای در حال جوانه‌زنی می‌شود که این کاهش با فعالیت آندو پروتئازها شروع شده، این آنزیم‌ها پروتئین‌های ذخیره‌ای نامحلول را به پپتیدهای محلول تبدیل می‌کند (Eastmond *et al.*, 1996).

نتایج تجزیه واریانس جدول ۲ نشان داد که مدت زمان های مختلف تیمار امواج فراصوتی بر پروتئین کل، فعالیت آنزیم‌های الکل‌دهیدروژناز، گلوکز-۶- فسفات‌دهیدروژناز، آرژیناز و گلوکاتایون ردوکتاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

فعالیت آنزیم پروتئاز: همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود با افزایش مدت تیمار امواج فراصوتی فعالیت آنزیم پروتئاز افزایش پیدا کرد. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در مدت‌های ۲۰ و ۲۵ دقیقه با میانگین‌های ۱۳ و ۱۰ میلی-گرم بر گرم وزن تر بافت مشاهده شد و کم‌ترین میزان آن نیز در تیمار شاهد با میانگین ۷/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت مشاهده شد. افزایش سرعت جوانه‌زنی در بذرهای تیمار شده با امواج فراصوتی به افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و دهیدروژنازها نسبت داده شده است (Eastmond *et al.*, 1996; Marambe *et al.*, 1992).

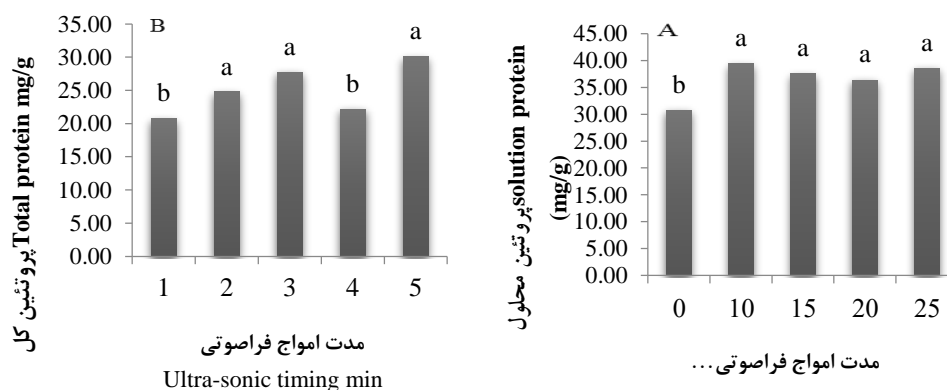


شکل ۴ - مقایسه میانگین اثر مدت تیمار بذر با امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم پروتئاز بذر جوانه‌زده

Figure 4. Mean comparison of ultrasonic wave time treatment effect on protease activity in Seed germination

B ۵). بیش‌ترین میزان پروتئین کل در مدت اعمال تیمار امواج فراصوتی ۱۰، ۱۵ و ۲۵ دقیقه مشاهده شد. پروتئین‌های ذخیره‌ای که در بذرها سنتز و ذخیره می‌شوند به‌عنوان منبع نیتروژن و کربن در طی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه مصرف می‌شوند.

رشد تغییرات پروتئین محلول و کل: در شکل ۵ مقایسه میانگین اثر امواج فراصوتی بر روند تغییرات پروتئین نشان داده شده است. همه مدت زمان‌های تیمار سبب افزایش میزان پروتئین محلول نسبت به شاهد گردید (A ۵). امواج فراصوتی سبب افزایش غلظت پروتئین کل در بیش‌تر تیمارها نسبت به شاهد شد (شکل



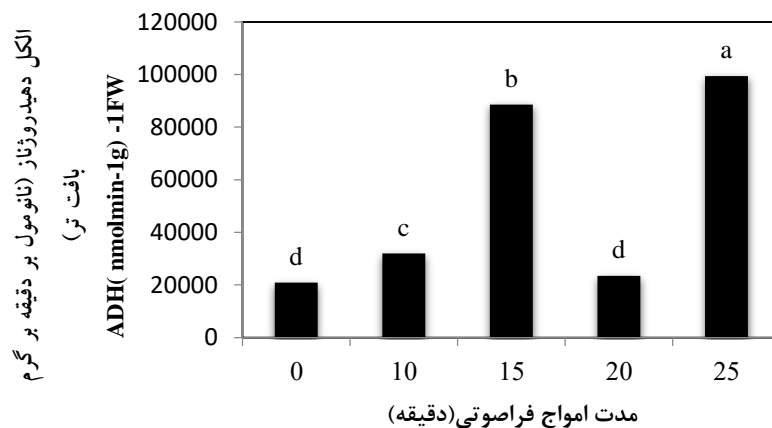
شکل ۵ - مقایسه میانگین اثر مدت تیمار بذر با امواج فراصوتی بر میزان پروتئین محلول (A) و پروتئین کل (B)

Figure 5. Mean comparison of ultra-sonic-wave times treatment effects on solution protein (A) and total protein (B)

گرم بافت تر مشاهده شد. پیش‌تیمار در اغلب زمان‌ها سبب افزایش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد گردید. از آن-جاکه ضربه‌های ممتد امواج فراصوتی به بذر، سبب نفوذ-پذیری پوسته بذر و تسریع در فرآیند آبنوشی و آماس بذر می‌گردد بعد از آبنوشی و آماس بذر کمبود اکسیژن در بذر رخ می‌دهد، چون انتشار گاز در آب ده‌هزار مرتبه کاهش می‌یابد، آبنوشی بذر نفوذپذیری اکسیژن را ضعیف می‌کند در این شرایط تولید انرژی از طریق تخمیر اتفاق می‌افتد (Tuan-hua and Scandalios, 1975). پیشنهاد می‌شود که فعالیت بالاتر الکل‌دهیدروژناز (ADH) عاملی مهمی در تأمین سریع‌تر انرژی بعد از آبنوشی بذر در شرایط کمبود اکسیژن جهت فعالیت سوخت و ساز فرآیند جوانه‌زنی می‌باشد. افزایش فعالیت آنزیم الکل‌دهیدروژناز در زمان جوانه‌زنی بذر ذرت گزارش شده است (Tuan-hua and Scandalios, 1975). آن‌ها بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم را ۲۴ ساعت بعد از آبنوشی گزارش نمودند و بیان داشتند که ۷۲ ساعت بعد از آبنوشی فعالیت این آنزیم بسیار کاهش یافته و با گذشت زمان بیش‌تر فعالیت آنزیم ثابت ماند که می‌توان به وجود اکسیژن کافی نسبت داد (Tuan-hua and Scandalios, 1975).

پروتناز باعث کاهش پروتئین‌ها در بذرهای در حال جوانه-زنی می‌شود که این کاهش با فعالیت آندو پروتینازها شروع شده، این آنزیم‌ها پروتئین‌های ذخیره‌ای نامحلول در بذر را به پپتیدهای محلول تبدیل می‌کند (Foti et al., 2002; Copeland and McDonald, 1936). به‌هنگام شرایط مطلوب جوانه‌زنی این پروتئین‌ها توسط پروتینازها تحت فرآیندهای پروتئولیتیک قرار گرفته و می‌شکنند. شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای نشان‌دهنده از بین‌رفتن مکانیسم بازدارنده در مقابل تجزیه می‌باشد و چون پیش-تیمار با امواج فراصوتی سبب افزایش فعالیت آنزیم پروتیناز (شکل ۴) و آرژیناز (شکل ۸) گردید و به‌دنبال انتقال آن به محور جنینی و ساخت ترکیبات پروتئینی جدید سبب افزایش پروتئین کل در بیش‌تر تیمارها نسبت به شاهد گردید.

فعالیت الکل‌دهیدروژناز: شکل ۶ روند تغییرات فعالیت آنزیم الکل‌دهیدروژناز را تحت اثر زمان‌های مختلف پیش-تیمار با امواج فراصوتی نشان می‌دهد. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در مدت ۲۵ دقیقه اعمال تیمار امواج فراصوتی با میانگین‌های ۹۹۴۲۴ و کم‌ترین میزان آن نیز در تیمار شاهد با میانگین ۲۰۸۶۰ نانومول بر دقیقه بر



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر مدت تیمار بذر با امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم الکل‌دهیدروژناز

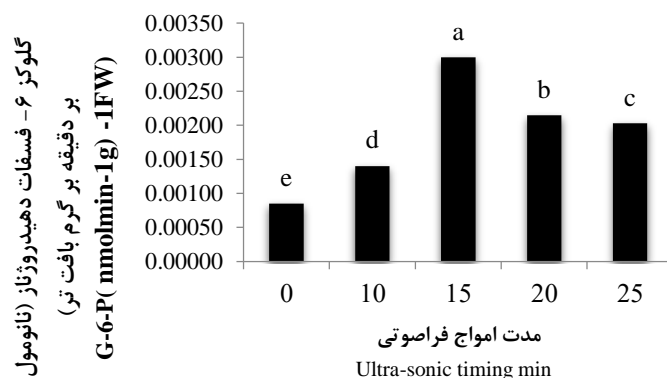
Figure 6. Mean comparison of ultra-sonic-wave time treatment effects on ADH activity

باشد، فعالیت این آنزیم NADPH را برای تنفس از طریق مسیر پنتوز فسفات تأمین می‌کند. همچنین NADPH را برای واکنش‌های بیوسنتزی اکسیداسیون و احیا تأمین می‌کند، NADPH تولیدی می‌تواند در مسیر آنتی-اکسیدانت‌های سلولی مثل گلوکاتایون و آسکوربات ایفای نقش کند. در پلاستیدهای غیرسبز (مانند آمیلوپلاست‌ها) و در کلروپلاست‌هایی که در تاریکی عمل می‌کنند و در

فعالیت آنزیم گلوکز-۶- فسفات دهیدروژناز: امواج فراصوتی سبب افزایش فعالیت آنزیم در همه تیمارها نسبت به شاهد شد (شکل ۷). بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در مدت اعمال تیمار امواج فراصوتی ۱۵ دقیقه مشاهده شد و بعد از آن فعالیت آنزیم کاهش یافت. در زمان جوانه‌زنی فعالیت هیدروژنازها افزایش پیدا می‌کند یکی از این هیدروژنازها گلوکز-۶- فسفات‌دهیدروژناز می-

۸). آرژنیناز آرژنین را به اوره و اورنتین تبدیل می‌کند. اورنتین پیش‌ساز بیوسنتز پلی‌آمین‌هایی همچون پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین می‌باشد. اوره موجود در واکنش اوره‌آزی به آمونیوم و CO_2 تبدیل می‌شود. آمونیوم تولیدی جهت بیوسنتز اسیدهای آمینه توسط سیستم آنزیمی GS/GOGAT مورد استفاده قرار می‌گیرد (Goldraj and Polacco, 1999; Zarei-Ghadikolae *et al.*, 2010). وجود آرژنین به مقدار زیاد در پروتئین‌های ذخیره‌ای بسیار مهم می‌باشد. آرژنین در مقایسه با سایر آمینواسیدها دارای نیتروژن بالایی می‌باشد. زیرا دارای گروه گوآنیدو می‌باشد. به‌طور کلی ۱۸ درصد از نیتروژن کل بذر را آرژنین در بر می‌گیرد.

در زمان جوانه‌زنی، بذرها از اسیدهای آمینه غنی از نیتروژن، نیتروژن را برای متابولیسم‌های بعدی آزاد می‌سازند، فعالیت بیش‌تر آرژنین نیتروژن بیش‌تری را برای متابولیسم بعدی فراهم می‌آورد (Goldraj and Polacco, 1999; Zarei-Ghadikolae *et al.*, 2010).



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر مدت تیمار بذر با امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز

Figure 7. Mean comparison of ultra-sonic-wave times treatment effects on G-6-P activity

GSSG می‌باشد (Foyer and Noctor, 2011). گلوکاتایون در چرخه‌های گزانتوفیل، مهلر و آسکوربات - گلوکاتایون نقش مؤثری را در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن و حفظ GSH ایفا می‌کند.

از این رو افزایش فعالیت GR به دلیل احیای مجدد گلوکاتایون اکسیدشده بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Bais *et al.*, 2003; Meloni *et al.*, 2004). یکی از دلایل افزایش میزان فعالیت این آنزیم را می‌توان به بالابودن فعالیت آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز در تیمارهای امواج فراصوتی نسبت داد که میزان NADPH بیش‌تری را برای فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز را فراهم می‌کند

زمانی که هنوز گیاهچه در مرحله هتروتروفی به سر می‌برد، مسیر پنتوز فسفات با کمک آنزیم گلوکز-۶- فسفات- دهیدروژناز NADPH (شکل احیایی) لازم برای واکنش‌های بیوسنتزی لیپید و آسمیلاسیون نیتروژن را تأمین می‌کند (Eastmond *et al.*, 1996). فعالیت این آنزیم بسیار مهم است زیرا با کاهش فعالیت این آنزیم ظرفیت آنتی‌اکسیدانت سلول کاهش می‌یابد. مطالعات متعددی G6PDH را به‌عنوان پتانسیلی از منبع NADPH در گیاهچه که در معرض محدودیت نوری قرار دارد بیان نمودند (Firenzuoli *et al.*, 1968; Kang and Rawsthorne, 1996; Eastmond *et al.*, 1996).

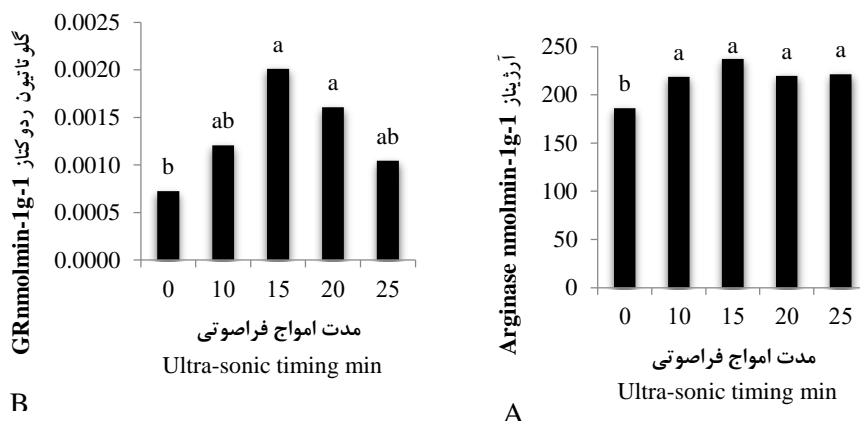
روند تغییرات فعالیت آنزیم آرژیناز: امواج فراصوتی سبب افزایش فعالیت آنزیم در همه تیمارها نسبت به شاهد شد. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه با میانگین ۲۲۴ نانومول بر دقیقه و کم‌ترین میزان در تیمار شاهد با میانگین ۱۸۶/۱۵ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد (شکل A

فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز: شکل ۸B فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز را تحت اثر مدت‌های مختلف امواج فراصوتی نشان می‌دهد. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم در مدت زمان‌های ۱۵ و ۲۰ دقیقه با میانگین ۰/۰۰۱۸ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر و در تیمار شاهد ۰/۰۰۰۷ نانومول بر دقیقه بر گرم بافت تر مشاهده شد.

گلوکاتایون ردوکتاز یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌ها در سیستم‌های بیولوژیک می‌باشد که حذف H_2O_2 را از طریق چرخه‌ی مونودیهیدروآسکوربات انجام می‌دهد. این آنزیم مسئول تبدیل گلوکاتایون اکسیدشده (GSSG) به گلوکاتایون احیاشده (GSH) و حفظ نسبت بالای GSH به

اکسیدانت به جهت مقابله با تنش‌های احتمالی بسیار مفید می‌باشد.

(Firenzuoli *et al.*, 1968). بالابودن سطح فعالیت آنزیم گلوکاتاتیون ردوکتاز به‌عنوان یکی از آنزیم‌های آنتی-



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر مدت تیمار بذر با امواج فراصوتی بر فعالیت آنزیم آرژیناز (A) و گلوکاتاتیون ردوکتاز (B)
Figure 8. Mean comparison of ultra-sonic wave time treatment effects on anginas (A) and GR (B) activity
 فراصوتی بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌ها و شاخص‌های نتیجه‌گیری

جوانه‌زنی را نشان داد، از این رو مدت ۱۵ دقیقه تیمار امواج فراصوتی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و قدرت ۵۰ وات برای پیش‌تیمار بذر سرخارگل پیشنهاد می‌شود.

پیش‌تیمار با امواج فراصوتی فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز، پروتئاز، الکل‌دهیدروژناز، گلوکز ۶- فسفات-دهیدروژناز، غلظت پروتئین کل و محلول و قند کل را در اغلب تیمارها نسبت به شاهد افزایش داد. با افزایش فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز، پروتئاز، الکل‌دهیدروژناز، آرژیناز و گلوکز ۶- فسفات‌دهیدروژناز درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و وزن خشک گیاهچه افزایش یافت. در بیش‌تر صفات اندازه‌گیری‌شده مدت ۱۵ دقیقه تیمار امواج

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از مسئولین دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود به خاطر فراهم‌کردن امکانات لازم برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی کنند.

منابع

- Atwater, B.R. 1980. Germination, dormancy, and morphology of the seeds of herbaceous ornamental plants. *Seed Science and Technology*, 8: 523-73. (**Journal**)
- Bais, H.P., Park, S.W., Weir, T.L., Callaway, R.M. and Vivanco, J.M. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*, 9: 26-32. (**Journal**)
- Bradford, M.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: 248-254. (**Journal**)
- Carlberg, I. and Mannervik, B. 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113: 484-490. (**Journal**)
- Chen, G., Wanga, Q., Liu, Y., Li, Y., Cui, J., Liu, Y., Liu, H. and Zhang, Y. 2012. Modelling analysis for enhancing seed vigour of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) using an ultrasonic technique. *Biomass and Bioenergy*, 47: 426-435. (**Journal**)
- Cheryl-Kaiser, C., Geneve, R. and Ernst, M. 2015. *Echinacea*. University of Kentucky Press, 120p. (**Book**)
- Chinard, F.P. 1952. Photometric estimation of proline and ornithine, *The Journal of Biological Chemistry*, 199:91-95. (**Journal**)
- Copeland, L.O. and McDonald, M.B. 1936. *Principles of Seed Science and Technology*. (**Book**)
- Deutsch, J. 1983. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: H.U. Bergmeyer, editor. *Methods of enzymatic analysis* 3rd english ed. Weinheim: Verlag Chemie, 191-197. (**Book**)
- Eastmond, P., Kolacna, L. and Rawsthorne, S. 1996. Photosynthesis by developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany*, 47: 1763-1769. (**Journal**)

- Foti, S., Cosentino, S.L., Patane, C. and Agosta, G.M.D. 2002. Effects of osmoconditioning upon seed germination of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) under low temperatures. *Seed Science and Technology*, 30(3): 521-533. **(Journal)**
- Firenzuoli, A.M., Vanni, P., Ramponi, G. and Baccari, V. 1968. Changes in enzyme levels during germination of seeds of *Triticum durum*. *Plant Physiology*, 43: 260-264. **(Journal)**
- Foyer, C.H. and Noctor, G. 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155(1): 2-18. **(Journal)**
- Goldraj, A. and Polacco, J.C. 1999. Arginase is inoperative in developing soybean embryos. *Plant Physiology*, 119: 297-303. **(Journal)**
- Greenberg, D.M. 1955. Enzymes of protein metabolism. *Methods in Enzymology*, 2: 368-374. **(Journal)**
- Guglieminetti, L., Yamaguchi, J., Perata, P. and Alpi, A. 1995. Amylolytic activities in cereal seeds under aerobic and anaerobic conditions. *Plant Physiology*, 109: 1669-1676. **(Journal)**
- Kang, F. and Rawsthorne, S. 1996. Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta*, 199: 321-327. **(Journal)**
- Kim, H.J., Feng, H., Kushad, M.M. and Fan, X.T. 2006. Effects of ultrasound, irradiation, and acidic electrolyzed water on germination of alfalfa and broccoli seeds and *Escherichia coli*157: H7. *Journal of Food Science*, 71: 168- 173. **(Journal)**
- Li, T.S.C. 1998. Echinacea: cultivation and medicinal value. *Horticultural Science and Technology*, 8: 22-129. **(Journal)**
- Lipiec, J., Janas, P. and Barabasz, W. 2004. Effect of oscillating magnetic field pulses on the survival of selected microorganisms. *International Agrophysics*, 18: 325-328. **(Journal)**
- Machikowa, T., Kulrattanak, T. and Wonprasaid, S. 2013. Effects of ultrasonic treatment on germination of synthetic sunflower seeds. *International Journal of Agriculture and Biological Engineering*, 7: 11-18. **(Journal)**
- Markwell, M.A.K., Hass, S.M., Tolbert, N.E. and Bieber, L.L. 1981. Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedure. *Methods in Enzymology*, 72: 296-303. **(Journal)**
- Marambe, B., Ando, T. and Kouno, K. 1992. Alpha-amylase and protease activities and water relations in germinating sorghum (*Sorghum bicolor* moench) seeds as affected by animal-waste composts. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38 (1): 123-131. **(Journal)**
- McCready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H.S. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. *Analytical Chemistry*, 22: 1156-1158. **(Journal)**
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C. and Cambraia, J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environment and Experimental Botany*, 49: 69-76. **(Journal)**
- Omokolo, D., Ndoumou, G., Ndzomo, T. and Djocgoue, P.F. 1996. Changes in carbohydrate, amino acid and phenol contents in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra and Grif. *Annals of Botany*, 77: 153-158. **(Journal)**
- Rasouli, F. 2018. The effect of ultrasonic-wave, jasmonic acid and salicylic acid on growth and some qualitative triates of *Stevia rebaudiana* Bertoni L and *Echinacea purpurea* L. Ph.D Dissertation, Shahrood University of Technology, Iran. (In Persian)**(Thesis)**
- Rasouli, F., Motaharynegad, H., Amini, G.H. and Gholipoor, M. 2015. The effect of ultra sound power and time on some germination characteristics basil. National Congress of Medicinal Plants. 18-19 January, 2015, Shahrood University of Technology, Iran. (In Persian)**(Conference)**
- Razavania, C.M., Aghaalykany, M. and Naghdabadi, H. 2015. The effect of vermicomposting and chemical fertilizer on quantitative and qualitative characteristics of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 31: 373-357. (In Persian)**(Journal)**
- Roubelakis, K.A. and Kliewer, W.M. 1978. Enzymes of Krebs-Henseleit in *Vitis vinifera* L. *Plant Physiology*, 62:344-347. **(Journal)**
- Sleper, D., Pathan, M.S., Camps-Raga, B., Boriraksantikul, N., Tantong, S., Gyawali, S.R., Kirawanich, P. and Islam, N.E. 2008. Experimental analysis of corn seed germination enhancement under the application of electromagnetic and magnetic fields. Proceeding of the European Electromagnetics (EUROEM 2008), Lausanne, Switzerland. **(Conference)**

- Shin, Y.K., Baque, M.A., Elghamedi, S., Lee, E.J. and Paek, K.Y. 2011. Effects of activated charcoal, plant growth regulators and ultrasonic pre-treatments on in vitro germination and protocorm formation of calanthe hybrids. *Australian Journal of Crop Science*, 5: 582- 588. **(Journal)**
- Smith-Jochum, C.C. and Albrecht, M.L. 1987. Field establishment of three Echinacea species for commercial production. *Acta Horticulture*, 208: 115-18. **(Journal)**
- Soltani, A. and Maddah, V. 2010. Simple Applied Programs for Education and Research in Agronomy. Issa Press. **(Book)**
- Tuan-hua ho, D. and Scandalios, J.G. 1975. Regulation of Alcohol Dehydrogenases in Maize Scutellum during Germination. *Plant Physiology*, 56: 56-59. **(Journal)**
- Yaldagard, M., Mortazavi, S.A. and Tabatabaie, F. 2008. Application of ultrasonic waves as a priming technique for accelerating and enhancing the germination of barley seed: optimization of method by the taguchi approach. *Journal of The Institute of Brewing*, 114: 14-21. **(Journal)**
- Zarei-Ghadikolaee, M., Abdolzadeh, A. and Sadeghipour, H.M. 2010. Arginase, glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase activities in moist chilled and warm-incubated walnut kernels. *Trees*, 24: 425-433. **(Journal)**



Effect of ultra-sonic waves on germination, some germination enzymes and biochemical parameters of *Echinacea purpurea* L. seed

Fatemeh Rasouli^{1*}, Manochaheer Gholipour², Kambiz Jahanbin², HamidReza Asghari²

Received: July 15, 2018

Accepted: January 14, 2019

Abstract

One of the biophysical methods of seed priming is seed pretreatment with ultrasonic wave. Continuous ultrasonic pulses increase the permeability of seeds shells, accelerate the absorption of water and increase the temperature of the tissues. Increase in turgescence rate and tissues temperature of the seeds treated with ultrasonic wave may be associated with accelerated changes in seed metabolism. Germination of *Echinacea purpurea* seeds is weak and irregular, which is caused by seed dormancy, so in order to investigation the effect of ultrasound waves on germination, some germination enzymes and biochemical treaties of coneflower (*Echinacea purpurea* L.) seeds, in 2017, an experiment was conducted as completely randomized design with 5 treatments and 4 replications in Agriculture Faculty of Shahrood University of Technology. Experimental treatments consisted of ultrasound waves at 0, 10, 15, 20 and 25 minutes with ultrasonic device with a constant power of 50 watts at 25°C. The results of analysis of variance showed that ultrasound treatment showed a significant effect on measured traits. Ultrasound waves increased the activity of α -amylase, protease, alcohol dehydrogenase, glucose 6-phosphate dehydrogenase and increased total protein and soluble sugar concentrations in most treatments than control. By increasing alpha-amylase, protease, alcohol dehydrogenase, anginas and glucose 6-phosphate dehydrogenase activity increased germination percentage, germination rate and seedling dry weight. In most traits, the duration of 15 minutes of treatment with ultrasonic waves showed the highest enzymes activity and germination indexes, So 15 min ultrasonic wave at 25°C and 50 watt power for improving germination and germination treats in coneflower seeds suggested

Keywords: α -amylase; Alcohol Dehydrogenase; G-6-P; Protease; Protein

How to cite this article

Rasouli, F., Gholipour, M., Jahanbin, K. and Asghari, H.R. 2020. Effect of ultra-sonic waves on germination, some germination enzymes and biochemical parameters on *Echinacea purpurea* L. seed. Iranian Journal of Seed Science and Research, 7(1): 41-54. (In Persian)(Journal)

DOI: [10.22124/jms.2020.4316](https://doi.org/10.22124/jms.2020.4316)

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit <http://jms.guilan.ac.ir/>

1. Ph.D student, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

2. Faculty members, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

*Corresponding author: f.rasouli86@gmail.com