هفتمین کنفرانس بین‌المللی
مهندسی قابلیت اطمینان و ایمنی

بررسی دقت تاثیر میدان مغناطیسی و هیدروژن پراکسید بر نتایج جوانه‌زنی بذر و فعالیت آنزیم آلفا–آمیلاز گیاه فلفل تند (*Capsicum frutescens*)

حلیمه حسن پور*[۱]

[۱] **استادیار، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران،** hassanpour@ari.ac.ir

چکیده

فلفل تند (*Capsicum frutescent*) از گیاهان خانواده سیب‌زمینیان با ارزش غذایی و دارویی است. از مشکلات کشت این گیاه، درصد پایین جوانه‌زنی بذر گیاه است. تجمع رادیکال‌های آزاد در سطح مناسب می‌توانند در القای جوانه‌زنی نقش داشته باشند. میدان مغناطیسی از فاکتورهای فیزیکی بوده که نفوذپذیری غشای سلولی و تجمع رادیکال‌های آزاد را در سلول‌ها تحریک می‌نمایند. در این مطالعه، تاثیر میدان مغناطیسی و هیدروژن پراکسید بر جوانه‌زنی بذر و فعالیت آنزیم موثر بر جوانه‌زنی بذر مورد مطالعه قرار گرفته است. بذرها پس از استریل، در غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکسید (۵۰ و ۸۰ میلی مولار) و میدان مغناطیس (۰ و ۴ میلی تسلا) قرار گرفته‌اند. به منظور دقیق و قابل اطمینان بودن داده‌ها، نتایج براساس میانگین‌گیری از تست‌ها و بازه‌های اطمینان نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که هیدروژن پراکسید در غلظت ۵۰ میلی مولار سبب القای درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، رشد گیاهچه‌ها و فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز شده است. در حالی‌که افزایش غلظت هیدروژن پراکسید، باعث کاهش رشد درصد جوانه‌زنی شده، اعمال میدان مغناطیس سبب تقویت، رشد و فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز گردیده است. برهم‌کنش میدان مغناطیسی نیز سبب القای جوانه‌زنی و رشد بویژه در تیمار هیدروژن پراکسید (۵۰ میلی مولار) و میدان مغناطیسی شده است. براساس نتایج، سطح رادیکال‌های آزاد درون سلولی در جوانه‌زنی بذر موثر بوده و تیمار میدان مغناطیس با افزایش سطح رادیکال‌ها و القای فعالیت آنزیم‌های مرتبط با جوانه‌زنی، سبب القای جوانه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بررسی دقت، آلفا–آمیلاز، جوانه‌زنی، رشد، رادیکال‌های آزاد، هیدروژن پراکسید، بازه اطمینان.

مقدمه

گیاه فلفل تند (*Capsicum frutescent*) از خانواده سیب‌زمینی‌یان بوده و دارای کاربردهای غذایی و دارویی است. عصاره گیاه حاوی ماده موثره کپسایسین از دسته الکالوئیدها، ترکیبات فنلیک، فلاونوئید و ترکیبات فرار است. در طب سنتی از آن برای درمان سرفه، درد دندان، گلودرد، روماتیسم، التیام زخم و ضدعفونی‌کننده استفاده می‌شود. از مشکلات کشت این گیاه، جوانه‌زنی بسیار پایین بذر آن است که می‌تواند به دلایل مختلف از جمله حضور ترکیبات شیمیایی در پوسته بذر، ضخامت زیاد پوست بذر و غیره باشد. پرایمینگ بذر یکی از تکنیکهای ازبین‌بردن خواب بذر است که می‌تواند توسط برخی فاکتورهای شیمیایی و فیزیکی از جمله پراکسید هیدروژن و میدان مغناطیسی انجام شود. جوانه‌زنی، فرایندی پیچیده است که با جذب آب شروع شده و در پی آن وقایع متابولیکی اتفاق افتاده و جنین بذر فعال می‌شود. طی جوانه‌زنی، فعال‌سازی متابولیسم صورت گرفته و با تحریک تنفس سلولی، فعال شدن میتوکندری، ترمیم DNA، رونویسی و ترجمه RNA همراه است این وقایع بیوشیمیایی، با خیساندن بذر و تجمع رادیکال‌های آزاد آغاز می‌شود [۱]. تجمع هیدروژن پراکسید و سایر رادیکال‌های آزاد در مراحل اولیه جوانه‌زنی مشاهده شده که بصورت برون و درون سلولی تجمع می‌یابند [۲]. با جذب آب، تولید هیدروژن پراکسید از فعالیت

میتوکندری، فعال شدن مسیرهای بتااکسیداسیون، آنزیم NADPH اکسیداز، پراکسیدازهای خارج سلولی و آندواکسالات اکسیدازها افزایش می‌یابد. مقدار رادیکال‌های آزاد بایستی توسط مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی تنظیم شود تا جوانه‌زنی آغاز شود. سیگنالینگ هیدروژن پراکسید و ارتباط متقابل با ملکول‌های دیگر، فیتوهورمون‌ها، اکسیداسیون پروتئین ها و RNA، نقش مهمی را در تنظیم جوانه‌زنی ایفا می‌کنند [۳]. میدان مغناطیسی یک از تنش‌های فیزیکی است که به دلیل انقلاب صنعتی و بسیاری از دستگاه‌های ساخت بشر بر موجودات زنده تأثیر می‌گذارد. اثر میدان مغناطیسی بر سلول‌ها به شدت میدان، مدت زمان در معرض‌گیری و نوع گونه بستگی دارد. اجزا مختلف سلول نظیر میتوکندری، غشای سلولی، پروتئین و DNA می‌توانند به میدان مغناطیسی پاسخ دهند [۴]. در کشاورزی مدرن، از شدت‌های خاصی از میدان برای القای رشد، تولید محصول و تجمع متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود. از طرفی، نسبت به سموم خطرات کمتری برای محیط زیست داشته باشد [۵]. میدان مغناطیسی می‌تواند ویژگی‌های الکترومغناطیسی ملکول‌های زیستی، نفوذپذیری غشا و فعالیت آنزیم‌ها در مسیرهای بیوشیمیایی را تغییر دهد. همچنین گزارش شده است که میدان مغناطیسی، غلظت و فعالیت رادیکال‌های آزاد، جریان‌های یونی غشاء و رشد و تکثیر سلولی را تغییر می‌دهد [۶ و ۷]. تاکنون مطالعات کمی در ارتباط با تاثیر میدان مغناطیسی و پراکسید هیدروژن بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهان صورت گرفته و در گیاه فلفل تند نیز بررسی نشده است. از طرفی نشان داده‌اند که میدان مغناطیسی می‌تواند محتوای ترکیبات ROS را تغییر دهد، سطح تجمع ROS می‌تواند در کنترل و تنظیم فرایندهای سلولی و رشد نقش داشته باشد. بنابراین هدف از پژوهش حاضر، بررسی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های فلفل تند تحت میدان مغناطیسی و پراکسید هیدروژن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه بذر و ضدعفونی آن

بذرهای گیاه فلفل تند (*Capsicum frutescens*) از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد و تا موقع کشت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. ابتدا ضدعفونی کردن بذرها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد صورت گرفت. سپس با آب مقطر استریل ۳ با شستشو شد و سپس در محلول الکل ۷۰ درصد برای مدت ۱ تا ۲ دقیقه قرار گرفت و چند بار با آب مقطر استریل شستشو شدند و برای پرایمینگ آماده شد.

پرایمینگ بذرها با هیدروژن پراکسید و میدان مغناطیسی

پیش تیمار بذرها با تیمار هیدروژن پراکسید در غلظت های ۵۰ و ۸۰ میلی مولار تحت میدان مغناطیسی انجام شد. برای اعمال تیمارهای پرایمینگ، یک گرم از بذرهای ضدعفونی شده در ظروف شیشه‌ای که حجم آن به اندازه یک ویال (۱۵۰ میلی‌لیتر) بود، ریخته شد و ۵۰ میلی‌لیتر از محلول‌های هیدروژن پراکسید به آنها اضافه گردید. بذرها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد پرایم شدند. برای تأمین اکسیژن به بذر غوطه‌ور در محلول از یک پمپ آکواریوم استفاده شد، به‌طوری که در تمام طول زمان پرایم، پمپ روشن بود و برای جلوگیری از تغییر غلظت محلول درب بطری با فویل آلومینیمی مسدود شد. بعد از اتمام مدت زمان پرایمینگ، بذرها از بطری خارج و با آب مقطر شستشو شدند، در پتری دیش های حاوی کاغذ صافی قرار گرفتند و سپس تحت شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی ۰ و ۴ میلی تسلا برای یک ساعت در ۳ روز متوالی قرار گرفتند [۸]. تیمارها شامل شاهد (Con)، میدان مغناطیسی (MF)، پراکسید هیدروژن ۵۰ میلی مولار (H_2O_2 50)، H_2O_2 50+ MF، H_2O_2 80، H_2O_2 80+ MF بود. پتری دیش ها برای دو هفته در شرایط اتاق کشت قرار گرفتند و سپس برای آنالیزهای جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم برداشت شدند.

بررسی جوانه‌زنی و رشد

به‌منظور انجام آزمایش‌های جوانه‌زنی تعداد ۲۵ عدد از بذرهای پرایم‌شده هر تیمار و همین تعداد بذر پرایم‌نشده به‌عنوان شاهد در سه تکرار و درون پتری‌دیش‌هایی با قطر دهانه ۹ سانتی‌متر که حاوی ۲ لایه کاغذ صافی بود قرار داده شدند و به هر پتری ۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس پتری‌دیش‌ها به ژرمیناتور با دمای ۱۵/۲۵ درجه سانتیگراد (روز/ شب) منتقل گردید. ارزیابی بذرهای جوانه زده بطور مرتب هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت ۱۴ روز انجام گردید. بذری جوانه‌زده محسوب شد که ریشه‌چه‌ی آن به اندازه ۲ میلیمتر و بیشتر از بذر خارج شده باشد. ارزیابی جوانه‌زنی، روز چهاردهم زمانی که تعداد بذرهای جوانه‌زده برای ۳ روز متوالی ثابت ماند به اتمام رسید و این زمان به‌عنوان پایان جوانه‌زنی در نظر گرفته شد. در این آزمایش شاخص‌های سرعت جوانه‌زنی و متوسط زمان جوانه‌زنی محاسبه شد [۹].

بررسی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز طبق روش Tripathi و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. محلول نشاسته (۱٪، ۵ میلی لیتر، بافر سدیم استات ۰/۱ مولار) و آب دیونیزه (۰/۱ میلی لیتر) در ۵۵ درجه سانتیگراد برای ۱۰ دقیقه قرار گرفت. با اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره لپه های جوانه، واکنش آغاز شد و بعد از ۵ دقیقه با اضافه نمودن اسید کلریدریک ۱ مولار واکنش متوقف و جذب آن در ۶۱۰ نانومتر قرائت شد [۱۰].

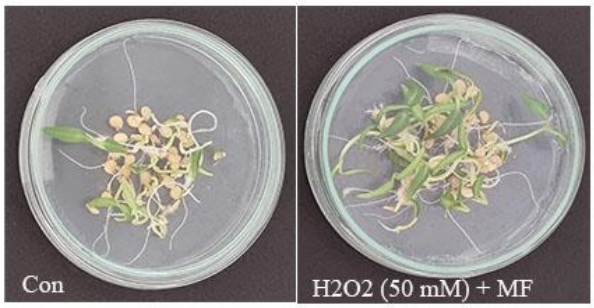
آنالیز آماری

آنالیز آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد و از آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA در سطح معنی داری $P \leq$ ۰/۰۵ استفاده شد. برای هر تیمار ۳–۵ تکرار گذاشته شد و مقایسه میانگین با استفاده از آنالیز LSD انجام شد. نتایج حاصل از تحقیق، براساس میانگین‌گیری از مقادیر بدست آمده توسط تست‌ها مشخص گردید و همچنین، به منظور بررسی دقت نتایج بدست آمده، بازه اطمینانی برای هر کدام از یافته‌ها مشخص گردیده است تا دامنه تغییرات نتایج براساس حد بالا و حد پایین تعیین گردد.

نتایج

بررسی نتایج جوانه‌زنی و رشد

درصد جوانه‌زنی تحت تیمارهای مختلف میدان مغناطیسی و هیدروژن پراکسید تغییر معنی‌داری را نشان داد. تیمار میدان مغناطیسی ۴ میلی تسلا، هیدروژن پراکسید و برهم کنش آن ها سبب افزایش معنی دار درصد جوانه‌زنی نسبت به تیمار شاهد شد. سرعت جوانه‌زنی نیز تحت تیمارهای میدان مغناطیسی، H_2O_2 (۵۰ میلی مولار) و برهم کنش بین آن دو نیز افزایش معنی داری یافت. بالاترین سرعت جوانه‌زنی در تیمار H_2O_2 (50 mM) + MF مشاهده شد که ۴۲/۲ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۱). بعلاوه، میدان مغناطیسی سبب افزایش معنی‌دار طول ریشه‌چه و ساقه‌چه شد و به ترتیب افزایش ۱۴/۸ و ۳۵/۷ درصدی را نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۱). اثر القایی میدان مغناطیسی بر رشد گیاهچه ها و جوانه‌زنی می تواند در ارتباط با تاثر میدان بر نفوذپذیری غشا، جذب یونی و رشد باشد [۱۱]. Luo و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که اثر میدان مغناطیسی بر رشد جلبک کلرلا در ارتباط با اثر آن بر القای تولید سطح ROS و ترکیبات آنتی اکسیدانی است [۱۲]. اعمال تیمار هیدروژن پراکسید در غلظت ۵۰ میلی مولار سبب افزایش معنی دار درصد جوانه‌زنی، رشد ساقه و ریشه شد، اما در غلظت بالاتر (۸۰ میلی مولار) درصد جوانه زنی نسبت به ۵۰ میلی مولار کاهش یافت.



شکل ۱: تصویری از بذرهای جوانه زده تحت تیمار هیدروژن پراکسید (۵۰ میلی مولار) + میدان مغناطیسی در مقایسه با تیمار شاهد (Con).

از طرفی، با افزایش غلظت هیدروژن پراکسید در تیمار H_2O_2 80 (mM سرعت جوانه‌زنی و رشد نیز نسبت به هیدروژن پراکسید ۵۰ میلی مولار کاهش یافت. افزایش رشد می‌تواند در ارتباط با تاثیر تیمار H_2O_2 بر القای بیان پروتئین‌ها، تنظیم بیان ژن و تجمع پروتئین‌های مرتبط با جوانه‌زنی باشد و جوانه‌زنی را تحریک نماید. سطح H_2O_2 درون سلولی توسط سیستم‌های آنتی اکسیدان تنظیم شده و سیگنالینگ H_2O_2 و ارتباط متقابل با ملکول‌های دیگر، فیتوهورمون‌ها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و RNA سبب تنظیم جوانه‌زنی می‌شود [۳].

جدول ۱: میانگین اثر تیمارهای هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و میدان مغناطیسی (MF) بر پارامترهای جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گیاه فلفل تند

تیمار	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی (روز)	طول ریشه‌چه (سانتی متر)	طول ساقه‌چه (سانتی متر)
Con	۵۱/۳ ± ۲/۷ c	۱۰/۱ ± ۰/۷۸ a	۲/۷ ± ۰/۰۹ ab	۱/۴ ± ۰/۱۳ c
MF	۷۴/۶ ± ۱/۹ b	۸/۳ ± ۰/۶۶ b	۳/۱ ± ۱/۰۸ a	۱/۹ ± ۰/۱۱ a
H_2O_2 50	۸۰/۸ ± ۲/۳ ab	۸/۰ ± ۰/۵۱ b	۳/۱ ± ۱/۱ a	۱/۶ ± ۰/۰۹ b
H_2O_2 50+ MF	۸۸/۵ ± ۳/۵ a	۷/۱ ± ۰/۳۹ c	۳/۲ ± ۰/۰۸ a	۲/۰ ± ۰/۰۸ a
H_2O_2 80	۸۷/۷ ± ۲/۸ a	۹/۱ ± ۰/۶۳ ab	۲/۸ ± ۰/۰۷ ab	۱/۵ ± ۰/۰۵ b
H_2O_2 80+ MF	۷۴/۳ ± ۴/۷ b	۹/۰ ± ۰/۳۷ ab	۲/۷ ± ۰/۰۹ b	۱/۷ ± ۰/۰۴ ab

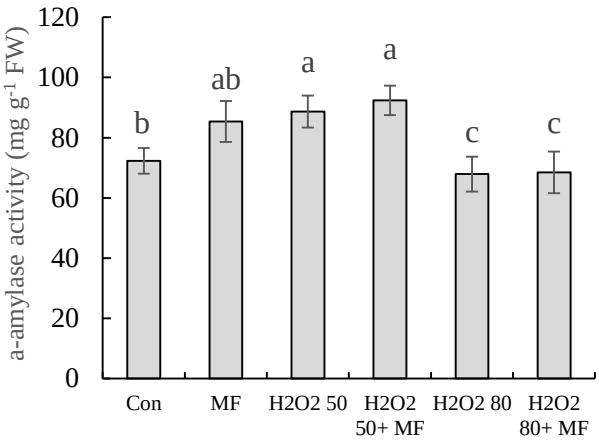
لازم به ذکر است که در جدول فوق، حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

بررسی فعالیت آنزیم آلفا–آمیلاز

فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز تحت تاثیر میدان مغناطیسی و هیدروژن پراکسید افزایش یافت. تیمار هیدروژن پراکسید باعث القای بیشتر فعالیت آنزیم نسبت به میدان مغناطیسی شد. تیمار هیدروژن پراکسید در غلظت ۵۰ میلی مولار سبب افزایش معنی دار محتوای فعالیت آنزیم شد و اعمال میدان مغناطیسی سبب افزایش بیشتر فعالیت آنزیم (۲۷/۸ درصد) نسبت به تیمار شاهد شد (شکل ۲). افزایش غلظت هیدروژن پراکسید سبب کاهش فعالیت آنزیم شد که مرتبط با کاهش رشد بود.

براساس شکل، میانگین مقادیر حاصل از تست به همراه واریانس‌های آنها (دامنه تغییرات یا بازه اطمینان) نمایش داده شده است.

آلفا آمیلاز، آنزیم کلیدی جوانه‌زنی بذر و شکستن ملکول نشاسته است. فعالیت آن بر متابولیسم کربوهیدرات ها تاثیر گذاشته و در پی آن رشد صورت می گیرد [۱۳]. تاثیر هیدروژن پراکسید بر القای جوانه‌زنی بذر در ارتباط با تنظیم سطح هورمونی، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی، ملکول های سیگنالینگ و متابولیم کربوهیدرات باشد.



شکل ۲: نتایج و بازه اطمینان تاثیر میدان مغناطیسی (MF) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) بر فعالیت آنزیم آلفا–آمیلاز

نتیجه‌گیری

تیمار هیدروژن پراکسید در غلظت ۵۰ میلی مولار سبب القای جوانه‌زنی و رشد از طریق القای فعالیت آنزیم آلفا–آمیلاز شد. اعمال میدان مغناطیسی سبب اثر القایی بیشتر تاثیر هیدروژن پراکسید بر جوانه‌زنی شد. غلظت بالای هیدروژن پراکسید، اثر بازدارندگی روی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه های فلفل دارد.

مراجع

[1] Dong, X., Li, X., Ding, L., Cui, F., Tang, Z. and Liu, Z."Stage extraction of capsaicinoids and red pigments from fresh red pepper (Capsicum) fruits with ethanol as solvent." *LWT-Food Science and Technology*, vol. 59(1), pp. 396-402, 2014.

[2] Kubala, S., Garnczarska, M., Wojtyla, Ł., Clippe, A., Kosmala, A., Żmieńko, A., Lutts, S. and Quinet, M. "Deciphering priming-induced improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) germination through an integrated transcriptomic and proteomic approach." *Plant Science*, vol. 231, pp. 94-113, 2015.

[3] Wojtyla, Ł., Lechowska, K., Kubala, S., & Garnczarska, M "Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination." *Frontiers in plant science*, vol. 7, pp. 66, 2016.

[4] Pauling, L. “Diamagnetic anisotropy of the peptide group.” *PNAS*, 1979, vol. 76(5), pp. 2293–2294.

[5] Aladjadjiyan, A. “Infuence of stationary magnetic field on lentil seeds.” *Int Agrophys*, 2010 vol. 24, pp. 321–324.

[6] Latef, A. A. A., Dawood, M. F., Hassanpour, H., Rezayian, M., Younes, N. A. “Impact of the static magnetic feild on growth, pigments, osmolytes, nitric oxide, hydrogen sulfide, phenylalanine ammonia-lyase activity, antioxidant defense system, and yield in lettuce. *Biol*, 2020, vol. 9(7), pp. 172.

[7] Taghizadeh, M., Nasibi, F., Kalantari, K. M., Ghanati, F. “Evaluation of secondary metabolites and antioxidant activity in *Dracocephalum polychaetum* Bornm. cell suspension culture under magnetite nanoparticles and static magnetic feld elicitation.” *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2019, vol. 136, pp. 489–498.

[8] Bocian, S. and Holubowicz, R. "Effect of different ways of priming tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds on their quality." *Pol J Nat Sci*, 2008, vol. 23, pp. 729-739.

[8] Abdul-Baki, A.A. and Anderson, J.D. "Relationship between decarboxylation of glutamic acid and vigor in soybean seed 1." *Crop science*, 1973, vol. 13, pp. 227-232.

[10] Tripathi, P., Leggio, L. L., Mansfeld, J., Ulbrich-Hofmann, R., Kayastha, A. M. “α-Amylase from mung beans (*Vigna radiata*)-correlation of biochemical properties and tertiary structure by homology modelling.” *Phytochem*, 2007, vol. 68, pp. 1623–1631.

[11] Hassanpour, H., Hassanpour, S. “Promoting impact of electromagnetic feld on antioxidant system and performance of vascular tissues in *Physalis alkekengi*.” *Russ J Plant Physiol*, 2021, vol. 68, pp. 545–551.

[12] Luo, X., Zhang, H., Li, Q., Zhang, J. “Efects of static magnetic feld on Chlorella vulgaris: growth and extracellular polysaccharide (EPS) production.” *J Appl Phycol*, 2020, vol. 32, pp. 2819–2828.

[13] Wang, W., Peng, S., Chen, Q., Mei, J., Dong, H., Nie, L. “Effects of pre-sowing seed treatments on establishment of dry direct-seeded early rice under chilling stress.” *AoB PLANTS*, 2016, vol. 8, pp. plw074.