الإنبات وفعالية إنزيمي اليوريز والكاتليز في البذور الحديثة والقديمة لنباتي الحمص *Cicer arietinum* L والماش *Phaseolus aureus* Roxb.

أسيل كاظم الانباري
قسم علوم الحياة - كلية التربية (الرازي) - جامعة ديالى

الخلاصة

تمت دراسة العلاقة بين الإنبات للبذور الحديثة والقديمة والفعالية الإنزيمية لإنزيمي اليوريز uraeseوالكاتليز catalase لنباتي الحمص والماش , حيث تم حساب النسبة المئوية للإنبـات لبـذور الحمص الحديثة والقديمة وكانت (83.3 و0) % على التوالي , أما الماش فقد كانت نـسبة إنبـات بذوره (91.1 و0)% للحديثة والقديمة. إن الفعالية الإنزيمية الكلية لليوريز في بذور الحمص الحديثة والقديمة كانت (2.90 و0.07) وحدة / مليلتر على التوالي أما الماش فقد كانت الفعاليـة الإنزيميـة لليوريز في بذوره الحديثة والقديمة هي (1,43 و0.02) وحدة / مليلتـر , وعنـد قيـاس الفعاليـة الإنزيمية الكلية للكاتليز للبذور الحديثة والقديمة للحمص كانت (3.23 و0.04) وحدة / مليلتر , أما في بذور الماش الحديثة والقديمة فأن الكاتليز فيه كان (0.95 و0.01) وحدة / مليلتر على التوالي , ولمعرفة دور اليوريز والكاتليز في عملية إنبات وتنفس البذور فقد تم معاملة البذور الحديثة بنقعها لمدة (36) ساعة بإحدى مثبطات اليوريز (EDTA) وانخفضت نسبة الإنبات لبذور الحمـص والمـاش الحديثة إلى (33.3 و40.8) % على التوالي وعند معاملة البذور الحديثة بإحدى مثبطات الكاتليز ($CuSO_4$)فأن نسبة الإنبات انخفضت الى (27 و36.5) % للحمص والماش على التـوالي , وفـي الوقت نفسه تم معاملة البذور القديمة بنقعها لمدة (36) ساعة بمحلول اليوريا وارتفعت نسبة الإنبـات للحمص والماش الى (16.5 و21) % على التوالي , أما عند معاملة البذور القديمة للحمص والماش بحامض الاسكوربيك فأن نسبة الإنبات ارتفعت الى (17.8 و19.4)% على التوالي .

المقدمة

إن التعمير هو الفشل في المحافظة على ثبات البيئة الداخلية Homeostasis (الاتزان بين عناصر الـكائن الحـي المـختلفة مرتبطا بقـلة الحيويـة Viability مع زيادة القـابـلية لـلتأثر سلبا وان عملية تعمير البذور تـؤدي إلـى تقييد الكثير من الفعاليات الفسيولوجـية للجنين (Vieirasantos وآخرون ،2001) . تتأثر حيوية البذور بزيادة الفترة الزمنية لخزنها مما يؤدي إلى تدهور إنباتها (محمد ويونس ، 1991)كونها تزيد من أكسـدة الدهون التي من الممكن أن تتسبب في تـوليد الجذور الحرة التـي تقود لأضرار في فعالية الأنزيمات الضرورية للإنبات وتغيير فـي أحماضها الامينية (Smithو Bergak ، 1995).

يحفز إنزيم اليوريز عملية الإنبات وذلك من خلال دوره التناسقي مع الارجنييز(Arginase) ليستحث نقاط الإنبات في بروتين البذور خلال عملية الإنبات (Polacco و Holland ، 1993) وذلك بتحريكه ايض البروتين المخزون لتغذية البادرات (Goldraij وآخرون ، 2003). إن الدور الرئيسي لليوريز هو تمكين النباتات من استخدام اليوريا الخارجية فضلا عن المتكونة داخليا بصورة طبيعية كمصدر للنتروجين (Witte وآخرون ، 2005) وهذه الكميات من النتروجين الموجودة في اليوريا تكون غير متاحة للنبات ما لم تتحلل باليوريز ، حيث يحفز اليوريز التحلل المائي لليوريا ليكون ثنائي اوكسيد الكاربون والامونيا الذي يندمج مع المركبات العضوية بوساطة إنزيم glutamine synthetase وهذا يزيد من قدرة النبات لاستخدام النتروجين (Gallardo وآخرون ، 1999).

تاريخ استلام البحث 19 / 1 / 2010 .
تاريخ قبول النشر 27 / 5 / 2010 .

يعمل إنزيم الكاتليز في البذور على بدء العمليات الفسيولوجية وأهمها التنفس حيث يتواجد في تراكيبGlyoxysomes والسايتوبلازم والمايتوكوندريا في البذرة (Willekens وآخرون ، 1995)
يعتبر الكاتليز من الآليات الدفاعية المضادة للأكسدة حيث يعمل على سحب وتخزين بيروكسيد الهيدروجين (كاسح الجذور الحرة) (YangوPoovaiah ، 2002).
إن الأكسدة وعواملها تؤثر على البذور مما ينتج عنه فساد أو تدهور وتغيير لون البذرة وقد بين Luhova وآخرون (2003) إن إنزيم الكاتليز يظهر نوعين من الفعالية وهي تحفيز انشطار بيروكسيد الهيدروجين الى ماء وأوكسجين وتحويل الواهب المختزل الى واهب مؤكسد ,تتأكسد البروتينات بالجذور الحرة ويحصل تداخلات بين القوى بين السلاسل البـبتيدية مغيرا الشحنة الـكهربائية مما يؤدي الى تحلل البروتينProtolysis نتيجة لإجهاد الخلية بتراكم بيروكسيد الهيدروجين (Desikan وآخرون ، 2001) وقد تبين إن بعض المواد لها القابلية على تثبيط عمل اليوريز مثل مادة EDTA باعتبارها عامل كلابي Chelatorحيث تتنافس مع اليوريا في الارتباط بالموقع الفعال لإنزيم اليوريا وكبريتات النحاس المائية باعتبارها كمثبط لعمل إنزيم الكاتليز لذا هدفت هذه الدراسة لمعرفة العلاقة بين إنزيمي اليوريز والكاتليز في إنبات وتنفس البذور لجنسين من العائـــلة البقولية الحمص .*Cicer arietinum* L والماش .*Phaseolus aureus* Roxb الحديثة والقديمة باعتبارها من الأجناس التي تستهلك كثيرا بين الشعوب .

المواد وطرائق البحث

1) المواد الكيمياوية المستخدمة:

هايبوكلوريد الصوديوم ,دارئ الفوســفات , خزين اليوريا , محلول حامض الاسكوربيك دارئ HEPES (N 2 Hydroxy ethyl piperazine N2 ethan sulphate),
محلول EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid), بيروكسيد الهيدروجينH_2O_2
محلول كبريتات النحاس المائية ($CuSO_4.6H_2O$), مولبيدات الامونيوم , فينول ,نيتروبروسيد الصوديوم , هيدروكسيد الصوديوم NaOH, البومين , حامض الهيدروكلوريك HCL , محلول البايوريت .

2) طرائق العمل :

تم الحصول على البذور القديمة من معشب كلية العلوم / جامعة بابل إذ كانت بذور الحمص والماش القديمة من حاصل عام 1991 والحديثة من محصول عام 2007 من السوق المحلية لمدينة الحلة من الصنف المحلي وتم اختبار حيوية البذور بمادة التترازوليوم حسب ما أورده أمين وعباس (1988).

معاملة البذور وزراعتها

تم تعقيم البذور الحديثة والقديمة بهايبوكلوريد الصوديوم 1% ولمدة 3 دقائق ثم غسلت بالماء المقطر وتم نقع البذور لمدة (36) ساعة بالمحاليل التالية :

أ) البذور الحديثة قسمت الى :
1- بدون نقع (معاملة مقارنة)
2- منقوعة بمحلول EDTA بتركيز (200 جزء بالمليون)
3- منقوعة بمحلول كبريتات النحاس بتركيز (10 mM)

ب) البذور المعمرة قسمت الى :
1- بدون نقع (معاملة مقارنة)
2- منقوعة بمحلول اليوريا بتركيز (500 mM)
3- منقوعة بمحلول حامض الاسكوربيك بتركيز(300جزء بالمليون)

زرعت البذور في أطباق بتري تحتوي على ورقتي ترشيح وإضافة 10 مل من الماء المقطر بوضع 10 بذور في الطبق الواحد وبعشرة مكررات . تم استنبات البذور في حاضنة بلغت درجة الحرارة فيها 25± ° م ورطوبة نسبية 50 % ولمدة (15) يوما ثم حسبت نسبة الإنبات.

تحضير مستخلص البذور

تم تحضير مستخلص البذور الحديثة والقديمة وذلك بأخذ (5) غم من البذور المطحونة وأضيف لها محلول دارئ الفوسفات (pH=7.5,0.2N) ثم ترك لمدة 45 دقيقة في حمام ثلجي هزاز رشح المزيج بعدها بثلاث طبقات من قماش الشاش ووضع الرائق في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة سرعته 3000 دورة / الدقيقة ثم اخذ الرائق وتم تقدير الفعالية الإنزيمية لليوريز والكاتليز .

تقدير البروتين

تم تقدير محتوى مستخلص البذور من البروتين حسب طريقة محمد وعبد الله (1996) بأخذ 2 مل من مستخلص البذور وأضيف له 3 مل من محلول البايوريت ثم وضع لمدة 30 دقيقة في حمام مائي بدرجة 37م° وتم قياس الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي للأشعة المرئية Spectrophotometerعند الطول الموجي (555) نانوميتر وقورن مع منحنى البروتين .

قياس الفعالية الإنزيمية لليوريز

تم اخذ 215 مايكروليتر من محلول دارئHEPES (50mM) (pH=7.5) و25 مايكروليتر من محلول خزين اليوريا ووضعت في أنابيب اختبار وتركت في حمام مائي بدرجة حرارة 37م° لمدة 3 دقائق وتم إضافة 10 مايكروليتر من المحلول الإنزيمي ليصبح الحجم النهائي 250 مليلتر . حضنت الأنابيب في الحمام المائي بنفس الدرجة لمدة 15 دقيقة وأضيف 5 مليلتر من phenole nitroprossud و5 مليلتر من 6% hypochloride sodium مع الرج السريع وتركت في الحمام المائي بدرجة 37م° لمدة 20 دقيقة ليظهر اللون الأزرق وتم قياس الامتصاصية عند الطول الموجي 625 نانومتر ثم قدرت الفعالية الإنزيمية (وحدة /مليلتر) وفق المعادلة الآتية :

$$Uraese\ activity\ (u/ml) = \frac{Ureae\ (\mu)}{0.01 \times 15 \times 2}$$ (الخفاجي ، 2007)

حيث إن :

(0.01) هي كمية الإنزيم اللازمة لتحويل واحد مايكرمول من اليوريا إلى امونيا خلال الدقيقة الواحدة وعند درجة حرارة 37 م °

(15) زمن التفاعل (دقيقة)

(2) كمية الامونيا الناتجة من تحلل اليوريا

قياس الفعالية الإنزيمية للكاتليز

تم تقدير الفعالية الإنزيمية في بذور الحمص والماش الحديثة والقديمة حسب الطريقة التي استخدمها العلواني (2006) وذلك بخلط 5 غرام من البذور مع محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم (0.1M) pH(7.8) وبنسبة (1:2 حجم / وزن) . المستخلص تم ترشيحه بواسطة الشاش وتم إجراء الطرد المركزي على سرعة 12000 دورة/ دقيقة و لمدة 30 دقيقة (Luhova وآخرون ، 2003) تم تقدير فعالية الإنزيم حيث يؤخذ 0.2 مل من المستخلص ويحضن مع 1 مل من المزيج الحاوي على H_2O_2 (65mM) مع دارئ الفوسفات (60mM) pH (7.4) في 25C° لمدة 4 دقائق . بعدها يتم إيقاف عمل الإنزيم بإضافة 1 مل من مولبيدات الامونيوم (32.4 mM) . تؤخذ القراءات لتقدير فعالية الإنزيم عند الطول الموجي (405) نانوميتر ويتم تقدير الفعالية حسب المعادلة آلاتية :

$$Catalase\ \ activity\ (u/ml) = \frac{Sample - Blank1}{Blank\ 2 - Blank\ 3} \times 271$$

حيث إن :

Blank 1 : يحتوي على 1مل من المادة الأساس (الـ H_2O_2 مع المحلول الدارئ) و 1 مل من المولبيدات و0.2 مل من العينة .

Blank2: يحتوي على 1مل من المادة الأساس (الـ H_2O_2 مع المحلول الدارئ) و 1 مل من المولبيدات و0.2 مل من المحلول الدارئ .

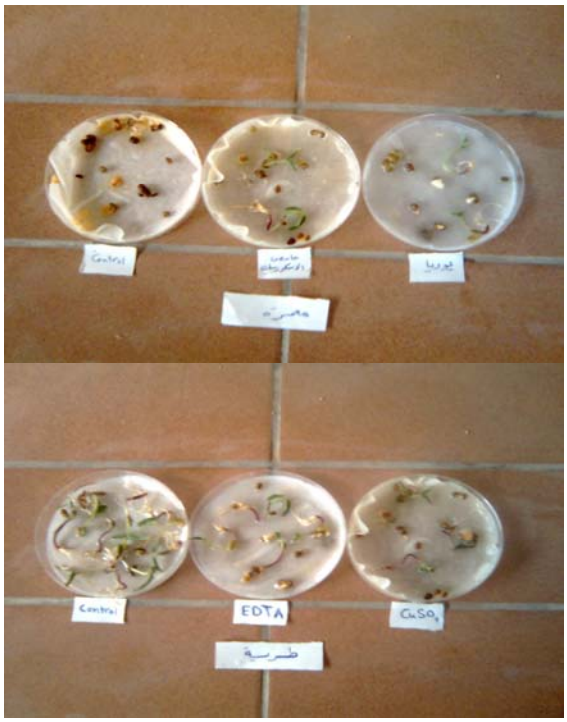
Blank3: يحتوي على 1مل من المحلول الدارئ و 1 مل من المولبيدات و0.2 مل من المحلول الدارئ .

النتائج والمناقشة

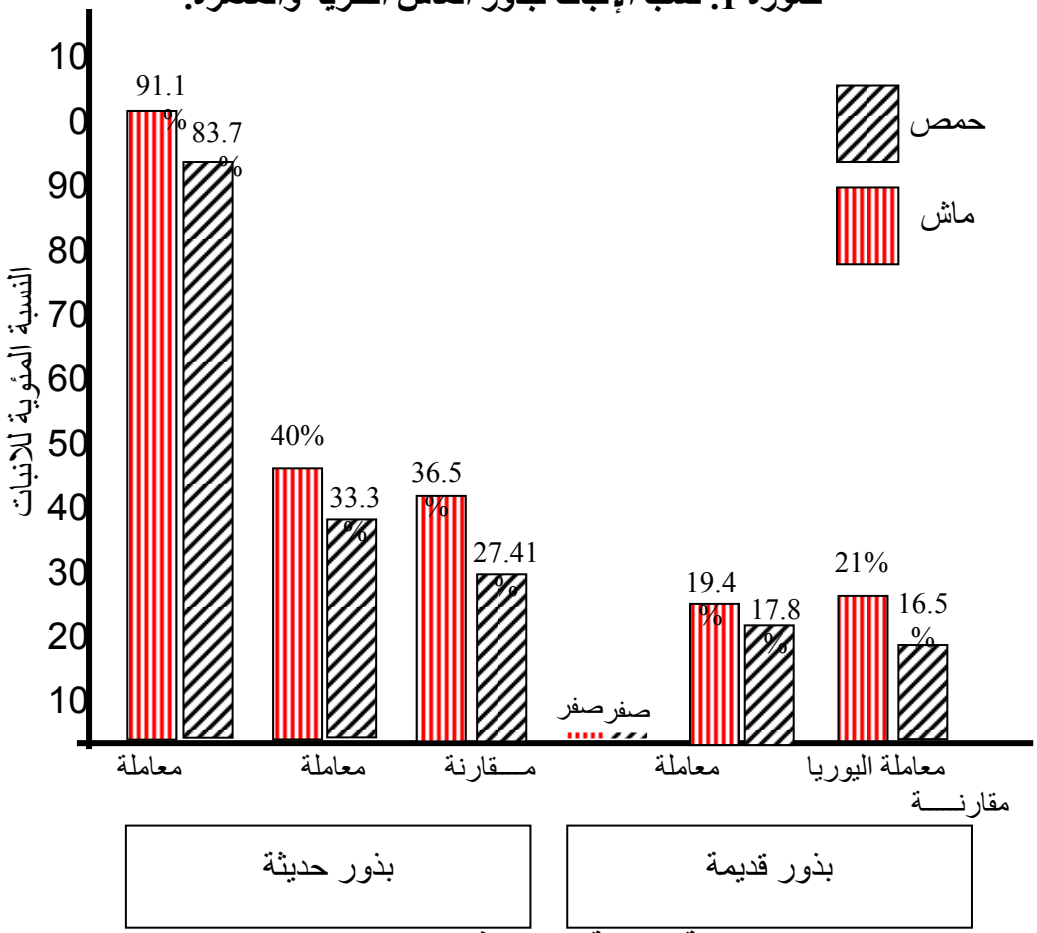
1- نسبة الإنبات

أظهرت النتائج المبينة في الشكلين (1) و (2) نسبة إنبات بذور الحمص والماش الحديثة اذ كانت (83.7 %و91.1 %) على التوالي والقديمة (0 %) لكلا النباتين وعند معاملة البذور الحديثة بإحدى مثبطات اليوريز EDTA فان نسبة الإنبات للحمص والماش انخفضت إلى (33.3 % و40.2 %) على التوالي وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Zonia وآخرون (1995) إلى إن وجود مثبطات اليوريز في وسط تنقيع بذور *Arabidopsis* يؤخر عملية الإنبات 36 ساعة ويوقفها تماما في البذور القديمة ولتأكيد دورالبوريز في إنبات البذور تم معاملة البذور القديمة باليوريا (صورة 1) إذ ارتفعت نسبة الإنبات من (0 %) لكل من الحمص والماش إلى (16.5 % و 21 %) وهذا يؤكد دور اليوريز في تمكين النبات من استخدام اليوريا الخارجية فضلا عن الداخلية كمصدر للنيتروجين(Witte وآخرون ، 2005) وتتفق هذه النتائج مع(Goldraij وآخرون ، 2003) إلى دور اليوريز في استحثاث نقاط الإنبات في البذور.

أما عند معاملة البذور الحديثة بأحد مثبطات الكاتليز (كبريتات النحاس) فقد أظهرت النتائج المبينة في الشكل (1) و (2) وصورة (1) إن نسب الإنبات لبذور الحمص والماش الحديثة انخفضت الى (27.4 % و 36.5 %) على التوالي وهذا يؤكد دور الكاتليز في بدء العمليات الفسلجية في البذور كالتنفس وتثبيطه أدى الى تثبيط العديد من هذه العمليات وتتفق هذه النتيجة مع(Yourk وآخرون ، 2005) عند معاملة إنزيم الكاتليز المنقى من ثمار التفاح الأصفر بـ $CuSO_4$, NaCl , $NaNO_3$,KCN , $MnCl_2$, Citric acid , Benzoic acid عملت على تثبيطه وقد يكون ذلك بسبب زيادة المواد الفينولية ويظهرمن الشكلين (1) و(2) إن استخدام فيتامين C (Ascorbic acid) بنقع البذور القديمة فيه قد زاد من نسبة إنباتها من (0 %) إلى(17.8% و 19.4 %) لكل من الحمص والماش على التوالي وذلك لان Ascorbic acid يتفاعل مع الجذور الحرة بسهولة فهو مضاد أولي للأكسدة بكونه كابح غير إنزيمي لسلسلة عمليات الأكسدة (Beyer ، 1994 و Smirnoff ، 2000) وفي دراسة (Willekens وآخرون ، 1997) عند معاملة أوراق التبغ بالكاتليز الخارجي Exogenous supplied أدى الى زيادة سحب بيروكسيد الهيدروجين من داخل الخلايا بالعمل تعاضديا مع إنزيم البيروكسيديز وكبح الجذور الحرة بأقل نسبة من الكاتليز .



صورة 1. نسب الإنبات لبذور الماش الطرية والمعمرة.



شكل1. النسبة المئوية لإنبات بذور الحمص والماش الحديثة والقديمة

2- الفعالية الإنزيمية للبذور الحديثة والقديمة

يبين الجدول (1) إن الفعالية الإنزيمية لليوريزلبذور الحمص الحديثة والقديمة كانت (4 2.90 و 0.072) وحدة / مليلتر وبذور الماش الحديثة والقديمة أظهرت لليوريز فعالية إنزيمية (1.43 و 0.02) وحدة / مليلترعلى التوالي وهذه النتيجة تتفق مع (Hogan وآخرون ، 1983) الى وجود فعالية عالية لإنزيم اليوريز في الأنسجة الحديثة مقارنة بالقديمة

جدول 1. الفعالية الإنزيمية لبذور الحمص والماش الحديثة والقديمة .

	البذور	الفعالية الإنزيمية الكلية وحدة / مل لليوريز	الفعالية الإنزيمية الكلية وحدة / مل للكاتليز	محتوى البروتين ملغم / مل	الفعالية النوعية لليوريز وحدة / ملغم بروتين	الفعالية النوعية للكاتليز وحدة / ملغم بروتين
حديثة	الحمص	2.904	3.236	33.925	0.085	0.095
	الماش	1.431	0.954	82.012	0.017	0.011
قديمة	الحمص	0.072	0.048	12.601	0.005	0.006
	الماش	0.023	0.012	21.333	0.001	0.0005

أما فعالية إنزيم الكاتليز لبذور الحمص الطرية والمعمرة فكانت (3.236 و 0.048) وحدة/ مليلتر وأظهرت بذور الماش الحديثة والقديمة تباينا في فعالية الكاتليز حيث كانت (0.954 و 0.012) وحدة/ مليلترعلى التوالي وذلك لان عملية التعمير هي إحدى العوامل المسببة لتكون الجذور الحرة في الأنسجة النباتية(Scandalous ، 1993) التي تعمل على التفاعل مع جذر الهيدروكسيل وإزالة Absttoction من تلك المركبات مخلفا مركبات عضوية حاملة للجذر الحر , كما تتأكسد البروتينات بالجذور الحرة مسببة تغيير في موقع الأحماض الامينية وكسر الأواصر الببتيدية مؤدية لقطعها بزيادة تراكم بيروكسيد الهيدروجين(Desikan وآخرون ، 2001)

المصادر

أمين ، هاشم محمد وعلي حسين عباس. 1988.فحص وتصديق البذور.وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .جامعة بغداد.

الخفاجي ، محمد عبد الله جبر.2007. تنقية وتوصيف وتقييد إنزيم اليوريز المستخلص من بذور نبات الحنظل *Citrullus colocynthis* . أطروحة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة بغداد .

العلواني ، بشير عبد الحمزة محمد .2006. أسباب ظاهرة التعمير بدلالة فرضية التأكسد من خلال تكوين الجذور العرضية في عقل الماش .*Phaseolus aureus* Roxb. أطروحة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة بابل .

محمد ، عبد العظيم كاظم و ليلى نجم عبد الله.1996. فسلجة النبات العملي . وزارة التعليم العالي البحث العلمي . جامعة بابل.

محمد ، عبد العظيم كاظم و مؤيد احمد اليونس.1991. أساسيات فسيولوجيا النبات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . ثلاثة أجزاء . جامعة بغداد.

Beyer, R.E.1994 .The role of ascorbic acid in antioxidant protection of biomembranes interaction with vitamin E and coenzyme bioenergy . Biomembr .26 (4) : 349 – 358.

Desikan, R. , S. A. Mackerness, J. T. Hancock and S. J. Neill .2001.Regulation of the *Arabidopsis* transcriptase by oxidative stress. Plant Physiolgy. 127: 159- 172.

Gallardo,F.,F. R. Canton ,A. Garcica –Gutierrez , F. M. Canovas and E. G. Kirby. 1999.Expression of conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar . Planta (210) : 19- 25.

Goldraij, A. B. , L. J. Beamer and J. C.Polacco.2003. Intra allelic complementation at the ubiquitous urease coding locus of soybean. Plant physiology . (132) : 1801 -1810 .

Hogan,M. E., I. E. Swift and J. Done.1983 . Urease assay and ammonia release from leaf tissues .Phytochemistry . 22: 663-667.

Luhova ,L.,D.Hederova and,P. Pec.2003. Activities amino oxidase , peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum*L.under different conditions. Plant and Soil Environment. 49 (4): 151 – 157.

Polacco,J. C.and M. A. Holland.1993 .Roles of urease in plant cells, Ininternat -ional review of cytology (14) : 65- 103 . Academic press. Inc.SanDiego.

Scandaluos,J.G.1993.Oxygen stress and superoxide dismutase.Plant Physiology. 101: 712.

Smith,M.and,P.Bergak.1995.Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation tolerant and desiccation sensitive seeds, In kigel.J.Galili Geds. Seed development and germination.New York. Marcel.Dekker.Inc.701-746.

Smirnoff, N.2000.Ascorbic acid metabolism and function of multifaceted mole-culecurrent opinion . Plant Biology. 3: 229- 235

Vieirasantos, C.L.,A.Compos,H.Azevedo and G.Caldera.2001.Insitu and invitro senescence inducedby KCl stress inutritional in balance lipid peroxidation and antioxidant metabolism . J.of Experimental Botany .52(35): 351-360.

Willekens, H., S. Chamngpol, M. Davey , M. Schraudner, C. Langbartels, M. Vanmontage ,D. Inze and W. Vancomp.1997 .Catalase is sink for $H_2O_2$and is indispensade for stress defence . C3 Plants .J. EMBO. 16(16): 4806- 4816.

Willekens ,H.,D.Inze,M. VanMontagu and W. VonCamp.1995 .Catalase in plants. Mol . Breeding 1:207 – 228.

Witte, G.P.,S. Tiller.E. Isidor, H.Davies and M.A.Taylor.2005 Analysis of two alleles of urease gene from potato poly morphisms , expression and extensive alterative splicing of the corres – ponding mRNA . J. of exp. Botany . 56 (40) : 91- 99 .

Yang,T. and B. W. Poovaiah.2002. Hydrogen peroxide homeostasis activation of Plant catalase by calcium calmodnlin .PNAS.99(6):4097-4102.

Yourk, I. H. Demir ,K. Ekici ,and A. Savran.2005. Purification and properties catalase from Van apple (Golden Delicious) . Pakistan .J.of Nutrition . 4 (1) : 8 – 10 .

Zonia ,L. E. ,N. E. Stebbins and J. C. Polacco.1995.Essential role of urease in germination of nitrogen – limited *Arabidopsis thaliana* seeds .Plant Physiology . 107: 1097- 1103.

GERMINATION AND UREASE , CATALASE ENZYMES ACTIVITY IN FRESH AND AGED SEEDS OF *Cicer arietinum* L AND *Phaseolus aureus* Roxb.

Aseel Kadhom AlAnbari
Biology Department- College of Education(al-razi)/
University of Diyala

ABSTRACT

This study was conducted the relationship between germination and enzyme activity of urease , catalase in fresh and aged seeds of *Cicer arietinum* L and *Phaseolus aureus* Roxb. Germination percentage , enzyme activity of extracts of seeds , inhibitors of urease (EDTA) 200 ppm ,catalase ($CuSO_4$) 10mM to fresh seeds , stimulaters of urease (Urea) 500 mM , catalase (Ascorbic acid) 200ppm to aged seeds was studied.

The results showed :

The Germination percentage of fresh seeds of *Cicer arietinum* L and *Phaseolus aureus* Roxb. was (83.7 , 91.1)% while the aged seeds was (0%) for each one of them . the total activity of urease in *C. arietinum* was (2.90 ,0.07) Unit / ml in extracts of fresh and aged seeds . The *Ph. aureus* plant the total urease activity was(1.43 ,0.02) Unit / ml in extracts fresh and aged seeds .The total activity of catalse in *C. arietinum* fresh and aged seeds was (3.23 ,0.04) Unit / ml while the *Ph. aureus* was (0.95 ,0.01) Unit /ml of fresh and aged seeds. To be sure of effective of urease and catalase in metabolism of seeds (germination , respiration) we Treated of fresh seeds (soaking) (36) h in inhibitors (EDTA) to reduction of germination percentage of *C. arietinum* and *Ph. aureus* was (33.3,40.8)% while ($CuSO_4$) reduction of germination was (27, 36.5)% . On the anther hand the aged seeds treated by stimulators by soaking (36) h in urea solution it was increasing the germination percentage to (16.5,21)% for *C. arietinum* and *Ph. aureus* , ascorbic acid increasing the germination percentage to (17.8,19.4)% .