



علوم و تحقیقات بذر ایران

سال سوم / شماره سوم / ۱۳۹۵ (۲۱ - ۱۱)



ارزیابی تأثیر تنش شوری بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های حاصل از بذر پرایم شده ماریتیغال (*Silybum marianum*)

مهرانگیز جوکار تنگ کرمی^{۱*}، احمد قنبری^۲، فواد مرادی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۰

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های حاصل از بذر پرایم‌شده ماریتیغال در شرایط تنش شوری انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل با چهار فاکتور و سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی در پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج اجرا شد. فاکتور اول: ژنوتیپ (رقم مجارستان و توده بومی آمل)، فاکتور دوم: بذر پرایم‌شده و بدون پرایم، فاکتور سوم: تنش شوری (۱۵۰ میلی‌مولار) و شاهد (صفر میلی‌مولار)، و فاکتور چهارم: مراحل نمونه‌برداری (۲۴ و ۹۶ ساعت پس از کاشت) بود. نتایج نشان داد که پرایمینگ بذر باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم مجارستان شد، به طوری که فعالیت کاتالاز در بذره‌های پرایم‌شده نسبت به شاهد به میزان ۹۶ درصد افزایش یافت. همچنین پرایمینگ فعالیت آنزیم پراکسیداز را در هر دو ژنوتیپ و آسکوربات پراکسیداز را در توده بومی آمل افزایش داد. افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در بذره‌های پرایم‌شده در مرحله جوانه‌زنی و افزایش فعالیت پراکسیداز در مرحله آبنوشی مشاهده گردید. به‌طور کلی نتایج نشان داد در شرایط تنش شوری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز برای بذره‌های پرایم‌شده بیشتر از بذره‌های بدون پرایم بود، همچنین پرایمینگ در رقم مجارستان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را بیش‌تر از توده آمل تحت تأثیر قرار داد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پرایمینگ بذر، تنش شوری، ماریتیغال، مراحل جوانه‌زنی

۱- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت

۲- استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۳- دانشیار پژوهش، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

* نویسنده مسئول: jokar2006@yahoo.com

مقدمه

یکی از مهم‌ترین موانع توسعه کاشت گیاهان دارویی و عدم تمایل به کاشت آن‌ها، استقرار ضعیف و غیر یکنواخت آن‌ها در خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک کشور خصوصاً در شرایط تنش‌های محیطی است. با توجه به این-که اراضی کشاورزی مرغوب به کشت گیاهان زراعی تخصیص یافته لذا توسعه کاشت گیاهان دارویی به اراضی حاشیه‌ای و ضعیف‌تر معطوف می‌گردد. استقرار ضعیف گیاهچه گیاهان دارویی که اغلب از رشد اولیه کندی نیز برخوردارند، یکی از مهم‌ترین موانع استفاده از این اراضی است. توسعه روش‌های تکنولوژی بذر همانند پرایمینگ، منجر به افزایش کیفیت بذر و در نتیجه بهبود استقرار آن می‌گردد (Corbineau and Come, 2006). پرایمینگ بذر تکنیکی است آسان، کم‌هزینه و کم‌خطر که با بهبود استقرار گیاهچه در شرایط تنش باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش شوری شده و در نهایت منجر به افزایش عملکرد می‌گردد (Iqbal and Ashraf, 2006). امروزه پرایمینگ بذر^۱ به‌طور گسترده و توسعه یافته، جهت اصلاح جوانه‌زنی و سبز شدن گیاهچه در گستره زیادی از گیاهان زراعی استفاده می‌شود (McDonald, 2000). بسیاری از مطالعات در زمینه پرایمینگ روی گیاهان زراعی متمرکز بوده (Khan et al., 1992؛ Bradford et al., 1990؛ Afzal et al., 2003؛ Wang et al., 2003؛ Hsu et al., 2004؛ Rashid et al., 2006؛ al., 2004)، اما مطالعات اندکی بر روی گونه‌های دارویی انجام گرفته است. پرایمینگ می‌تواند خطر استقرار کم در رویشگاه‌های تحت تنش را کاهش داده و اجازه رشد یکنواخت را بدهد. بنابراین هر گونه بهبود استقرار که از پرایمینگ حاصل شود از لحاظ اقتصادی در صنعت بذر مقرون به صرفه خواهد بود و از طرفی سبب افزایش بازده در عرصه‌های بذرکاری می‌گردد (Demir Kaya, 2005).

ماریتیغال یا خارمریم (*Silybum marianum*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که به‌دلیل اهمیت آن در صنعت داروسازی و تولید روغن گیاهی، تولید آن مورد توجه قرار گرفته است. ماریتیغال گیاهی علفی، یک‌ساله و متعلق به تیره گل ستاره‌ای‌ها است. در میوه ماریتیغال فلاونوئیدهای مختلفی ساخته و ذخیره می‌شود که در صنایع داروسازی اهمیت زیادی دارد. همچنین دانه این

گیاه دارای ۲۵-۲۰ درصد روغن است که ۶۰-۵۰ درصد آن را اسید اولئیک تشکیل می‌دهد که علاوه بر مصرف خوراکی، در صنایع آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Davork, 2003). برخلاف وجود پتانسیل بالا برای تولید این گیاه دارویی در کشور، هنوز به تولید تجاری آن دست نیافته‌ایم.

افزایش مقاومت این گیاه در مراحل اولیه رشد شامل جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه به تنش شوری یکی از راهکارهایی است که به افزایش سطح زیر کشت آن در اراضی حاشیه‌ای و کم‌شور منجر می‌شود. بنابراین بررسی اثر پرایمینگ بذر و مکانیسم عمل آن به‌عنوان یک راهبرد در توسعه تولید و سطح زیر کشت ماریتیغال از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این آزمایش به‌منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌عنوان یکی از مکانیزم‌های متأثر از پرایمینگ در گیاهچه‌های حاصل از بذر پرایم شده ماریتیغال در شرایط تنش شوری و در مراحل اولیه نمو گیاهچه انجام گرفت. همچنین در این آزمایش تأثیر پرایمینگ در ژنوتیپ‌های مختلف و در مراحل مختلف جوانه‌زنی گیاه ماریتیغال برای شرایط تنش شوری و کنترل مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل با چهار فاکتور ($2 \times 2 \times 2 \times 2$) در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج اجرا گردید. فاکتور اول ژنوتیپ شامل رقم اصلاح شده مجارستان و توده بومی آمل، فاکتور دوم شامل پرایمینگ و بدون پرایمینگ، فاکتور سوم شامل تنش شوری (۱۵۰ میلی‌مولار) و شاهد (صفر میلی‌مولار) و فاکتور چهارم شامل مراحل نمونه‌برداری در زمان‌های ۲۴ (مرحله آبنوشی) و ۹۶ ساعت پس از کشت (مرحله جوانه‌زنی) بود. جهت اعمال پرایمینگ، بذرهای ماریتیغال به مدت ۶ و ۱۸ ساعت (به ترتیب بهترین ترکیب تیماری انتخابی رقم مجارستان و توده بومی آمل طی چندین آزمایش مختلف که در این جا آورده نشده است) در محلول نیترات پتاسیم (KNO_3) ۲- بار قرار داده شدند. پس از اتمام زمان مورد نظر، بذرها با استفاده از آب مقطر آب‌شویی شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار داده شدند تا به

¹Seed priming

به میزان ۲۵۰ میکرولیتر، آب مقطر استریل به میزان ۵۰۰ میکرولیتر و عصاره آنزیمی به میزان ۳۰ میکرولیتر بود. از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی به عنوان شاهد اسپکتروفتومتر استفاده شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11) به روش ناکانو و اسدا (Nakano and Asada, 1987) در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط واکنش حاوی آب اکسیژنه^۳ ۷۰ میلی مولار محلول در آب مقطر به میزان ۱۵۰ میکرولیتر، آسکوربیک ۰/۵ میلی مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار به-میزان ۸۵۰ میکرولیتر و عصاره آنزیمی به میزان ۶۰ میکرولیتر بود.

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX, EC 1.11.1.7) به روش همدا و کلین (Hemeda and Kelin, 1990) در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷) به میزان ۲۵۰ میکرولیتر، گایاکول (Guaiacol) ۱۰ میلی-مولار محلول در آب دوبار تقطیر به میزان ۲۵۰ میکرولیتر، H₂O₂ ۷۰ میلی مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷) به میزان ۳۴ میکرولیتر، آب دوبار تقطیر استریل شده به میزان ۴۶۷ میکرولیتر و عصاره آنزیمی به میزان ۲۰ میکرولیتر بود. فعالیت ویژه آنزیم های آنتی-اکسیدان به ازای واحد در میلی گرم پروتئین گزارش شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SAS و برای تحلیل اثرات متقابل از روش برش دهی استفاده گردید. مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون کمترین اختلاف معنی دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

سرعت جوانه زنی

شکل ۱ اثر پرایمینگ بذر بر میزان سرعت جوانه زنی دو ژنوتیپ آمل و مجارستان را در شرایط تنش شوری نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، پرایمینگ بذر نسبت به شاهد باعث افزایش معنی دار سرعت جوانه زنی در هر دو ژنوتیپ شده است به طوری که میزان این شاخص را ۳۸/۶ و ۴۵/۱۸ درصد به ترتیب در ژنوتیپ های آمل و مجارستان افزایش داده است. میزان این شاخص در ژنوتیپ

رطوبت اولیه خود برسند. سپس هر تیمار به طور جداگانه در یک پاکت پلاستیکی ریخته شد و برای کشت آماده گردید (McDonald, 2000). در مرحله بعد بذره های مورد مطالعه بر اساس طرح آزمایشی تعریف شده، درون پتری دیش های شیشه ای ۹ سانتی متری در شرایط بدون تنش (شاهد) و تنش شوری (۱۵۰ میلی مولار) کشت شدند و سپس در ژرمیناتور در دمای ثابت ۲۰ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۴۵ درصد با ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی، قرار گرفتند (ISTA, 1996). تعداد بذره های جوانه زده به صورت روزانه یادداشت و بذرهایی که طول ریشه چه آن ها حدود ۲ تا ۳ میلی متر بود، به عنوان بذر جوانه زده محسوب شدند. در نهایت سرعت جوانه زنی^۲ با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$GR = \sum n_i / d_i \quad (1) \text{ رابطه}$$

در این فرمول GR: سرعت جوانه زنی؛ n_i: تعداد بذره های جوانه زده و d_i: تعداد روز پس از شروع آزمایش می باشد. نمونه برداری از بذر طی دو مرحله آنبوشی (۲۴ ساعت پس از کشت) و ۵۰ درصد جوانه زنی (۹۶ ساعت پس از کشت) انجام شد. نمونه ها بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شدند و سپس برای سنجش فعالیت آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز و پروتئین محلول کل به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند. برای استخراج پروتئین محلول کل و آنزیم های آنتی اکسیدان حدود ۰/۵ گرم بذر/ گیاهچه فریز شده درون هاون چینی در دمای ۴ درجه سانتی گراد سائیده شد و ۳ میلی لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷) به آن افزوده شد. مخلوط حاصل را درون فالكون ۱۵ میلی لیتری ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی برای سنجش پروتئین و فعالیت آنزیم ها استفاده گردید. برای اندازه گیری پروتئین محلول کل از روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) به روش ابی (Aebi, 1983) و در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه-گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷) به میزان ۲۵۰ میکرولیتر، آب اکسیژنه ۷۰ میلی مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار

³ H₂O₂

² Germination percentage (GP)

است. درحالی که در توده بومی آمل روی فعالیت کاتالاز تأثیر معنی داری نداشت.

همان طور که در جدول ۴ مشاهده می کنید، پرایمینگ باعث تغییرات متفاوت در فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش و بدون تنش گردید. در شرایط تنش میزان فعالیت این آنزیم در بذرهای پرایم شده نزدیک به دو برابر بذرهای شاهد افزایش یافت ولی در شرایط بدون تنش یا شاهد میزان فعالیت این آنزیم در بذرهای پرایم شده به میزان ۲۶ درصد نسبت به بذرهای پرایم نشده کاهش یافت (جدول ۴). بررسی روند تغییر فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد، تا مرحله آبنوشی (۲۴ ساعت بعد از کاشت) تفاوت معنی داری بین بذرهای پرایم شده و شاهد ایجاد نشده اما فعالیت این آنزیم از این مرحله تا جوانه زنی (۹۶ ساعت پس از کشت) در بذرهای پرایم شده نسبت به شاهد به میزان ۱۰۳/۷ درصد افزایش یافت (سطح احتمال ۵ درصد) (جدول ۳).

مجارستان نسبت به آمل افزایش بیش تری داشته است. با توجه به شکل ۲ اثر پرایمینگ بذر بر میزان سرعت جوانه زنی در ژنوتیپ های آمل و مجارستان در شرایط بدون تنش (شاهد) نیز معنی دار است. پرایمینگ بذر در هر دو ژنوتیپ میزان این شاخص را نسبت به شاهد (بدون پرایم) به طور معنی داری افزایش داده است به طوری که میزان آن در دو ژنوتیپ آمل و مجارستان به ترتیب ۳۲/۱۳ و ۴۱/۲۵ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد که این افزایش در ژنوتیپ مجارستان بیش تر از آمل می باشد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج حاصل از مقایسه میانگین تأثیر پرایمینگ بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ های مورد مطالعه در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد پرایمینگ در رقم مجارستان باعث افزایش معنی دار میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به تیمار بدون پرایم شده است، به طوری که پرایمینگ فعالیت این آنزیم را ۹۶/۴ درصد افزایش داده

جدول ۱- میانگین مربعات آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز

Table 1. Mean square of catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
ژنوتیپ (E) Genotype	1	821892**	148577**	120504**
پرایمینگ (P) Priming	1	193122	299740**	287804**
تنش (S) Stress	1	69771	476767**	124019**
زمان (T) Time	1	304634	45558**	7070931**
E×P	1	166457*	216525**	101455**
E×S	1	23112	387729**	235 ns
E×T	1	285333**	324915**	285350**
P×S	1	417717**	304806**	92390**
P×T	1	108131**	248188**	1099 ns
S×T	1	4024 ns	64451**	14332**
S×P×E	1	351153**	222563**	568950**
T×P×E	1	41958**	629862**	643630**
T×S×E	1	5990 ns	325336**	93273**
T×S×P	1	214458**	288884**	120248**
T×S×P×E	1	113637**	163876**	696070**
خطا Error		2577.5	1658	2144.3
CV (%) ضریب تغییرات		20.7	2.4	5.7

ns, *, ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, *, **: not significant, significant in 5 and 1%, respectively

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

گرفته است. بررسی تأثیر پرایمینگ در شرایط تنش شوری و بدون تنش نشان داد (جدول ۴)، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بذرهای پرایم شده در شرایط تنش شوری بیش از دو برابر بذرهای شاهد (۱۳۲ درصد افزایش فعالیت) بود که از لحاظ آماری معنی دار است. در شرایط بدون تنش، بین بذرهای پرایم شده و پرایم نشده از نظر میزان فعالیت پراکسیداز تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

پرایمینگ بذر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را در ژنوتیپ‌های مجارستان و آمل به ترتیب به میزان ۱۴۰ و ۱۰ درصد افزایش داد (جدول ۳). هر چند تأثیر پرایمینگ روی هر دو ژنوتیپ معنی دار است اما روشن است که فعالیت پراکسیداز در رقم مجارستان به مقدار بسیار بالاتری (۱۴ برابر) نسبت به توده بومی آمل تحت تأثیر پرایمینگ قرار

جدول ۲- برش دهی اثرات متقابل

Table 2. Slice of interaction

برش دهی اثر متقابل: میانگین مربعات سطوح پرایمینگ در هر سطح ژنوتیپ				
Slice of interaction: Mean square of priming levels in each genotype level				
S.O.V	df	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
Majar	1	359085**	512890**	23752**
Amol	1	495.04 ns	3375**	36558**
برش دهی اثر متقابل: میانگین مربعات سطح ژنوتیپ در هر سطح تنش شوری				
Slice of interaction: Mean square of genotype levels in each salt stress level				
S.O.V	df	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
Control	1	284678 **	28137**	55040**
stress	1	560327**	508170**	65693**
برش دهی اثر متقابل: میانگین مربعات سطوح پرایمینگ در هر سطح تنش شوری				
Slice of interaction: Mean square of priming levels in each salt stress level				
S.O.V	df	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
Control	1	21394**	10.69 ns	27032**
stress	1	589446**	604536**	353163**
برش دهی اثر متقابل: میانگین مربعات سطوح پرایمینگ در هر سطح زمان				
Slice of interaction: Mean square of priming levels in each time level				
S.O.V	df	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
24 hour	1	6117184 ns	546714**	162237**
96 hour	1	295136**	1215124**	126667**
برش دهی اثر متقابل: میانگین مربعات سطوح زمان در هر سطح تنش شوری				
Slice of interaction: Mean square of time levels in each salt stress level				
S.O.V	df	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase
Control	1	11934 **	109193 **	3224291 **
stress	1	189345 **	817 **	3860973 **

ns, *, ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, *, **: not significant, significant in 5 and 1%, respectively

آبنوشی مشاهده شد، به طوری که میزان فعالیت آن در بذرهای پرایم شده نسبت به شاهد در مرحله آبنوشی ۲/۵۶ برابر افزایش پیدا کرده است.

بررسی تأثیر پرایمینگ بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در مراحل آبنوشی و جوانه زنی نشان داد پرایمینگ باعث افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم در مراحل آبنوشی و جوانه زنی شده است (جدول ۵). بیشترین تأثیر پرایمینگ بر فعالیت این آنزیم در ۲۴ ساعت بعد از کاشت یا مرحله

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر پرایمینگ بذر بر میزان فعالیت برخی آنزیمهای آنتی اکسیدان در دو ژنوتیپ آمل و مجارستان
Table 3. Mean comparison of the seed priming effect on activity of some antioxidant enzymes in Amol and Majar genotype

ژنوتیپ Genotype	پرایمینگ بذر Seed priming	کاتالاز Catalase (U/mg protein)	پراکسیداز Peroxidase (U/mg protein)	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase (U/mg protein)
Majar	پرایمینگ priming	498.5 a	501.22 a	885.2 a
	بدون پرایمینگ Non-priming	253.8 b	208.85 b	822.3 b
Amol	پرایمینگ priming	112 a	255.62 a	876.9 a
	بدون پرایمینگ Non-priming	109.9 a	b 231.90	630.1 b

میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند
 Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5%

میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

شرایط شاهد و شرایط تنش شوری فعالیت آسکوربات پراکسیداز را به ترتیب ۹/۱ و ۳۳ درصد افزایش داد. هر چند اختلاف ایجاد شده در هر دو شرایط تنش و کنترل معنی‌دار است ولی تأثیر پرایمینگ روی افزایش آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش ۳/۷ برابر تأثیر آن در شرایط کنترل بوده است. بررسی تغییر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، در دو مرحله آبنوشی و جوانه‌زنی نشان داد پرایمینگ باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در هر دو مرحله گردید (جدول ۵). پرایمینگ بذر باعث شد از کاشت تا مرحله آبنوشی میزان فعالیت پراکسیداز در بذرهای پرایم شده نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش

نتایج حاصل از بررسی تأثیر پرایمینگ بذر روی میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ژنوتیپ‌های مجارستان و آمل نشان داد (جدول ۳) که پرایمینگ، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در ژنوتیپ‌های آمل و مجارستان به ترتیب به میزان ۷/۷ و ۳۹ درصد افزایش داده است. این میزان افزایش فعالیت آنزیم تحت تأثیر پرایمینگ، در توده آمل ۵/۱ برابر رقم مجارستان است. نتایج ارایه شده در جدول ۴ نشان می‌دهد، پرایمینگ بذر در مقایسه با عدم پرایمینگ باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش شوری و شاهد گردید. پرایمینگ بذر در

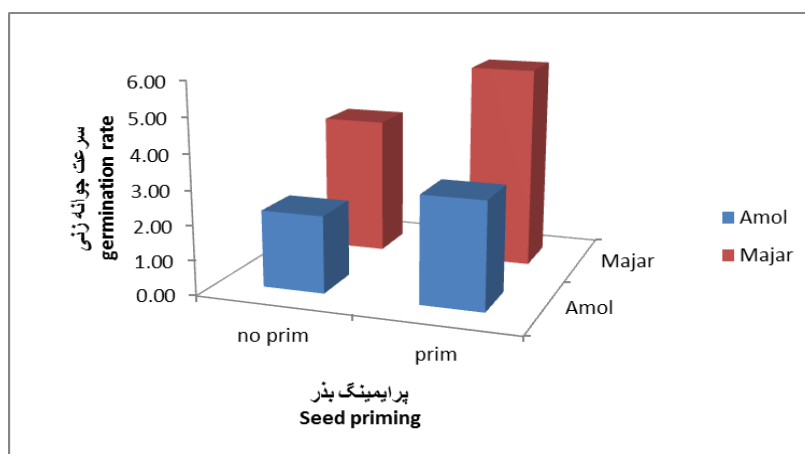
جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تنش شوری بر میزان فعالیت برخی آنزیمهای آنتی اکسیدان در بذرهای پرایم شده و بدون پرایم
Table 4. Mean comparison of the salt stress effect on activity of some antioxidant enzymes in primed and non-primed seeds

تنش شوری Stress levels	پرایمینگ بذر Seed priming	کاتالاز Catalase (U/mg protein)	پراکسیداز Peroxidase (U/mg protein)	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase (U/mg protein)
Control (Non-stress)	priming	175.3 b	199 a	786 a
	Non-priming	237 a	200 a	720 b
Stress	priming	440.2 a	557 a	975 a
	Non-priming	126.7 b	240 b	733 b

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر پرایمینگ بذر بر میزان فعالیت برخی آنزیمهای آنتی اکسیدان در دو زمان ۲۴ و ۹۶ ساعت
Table 5. Mean comparison of the Seed priming effect on activity of some antioxidant enzymes in 24 and 96 hou

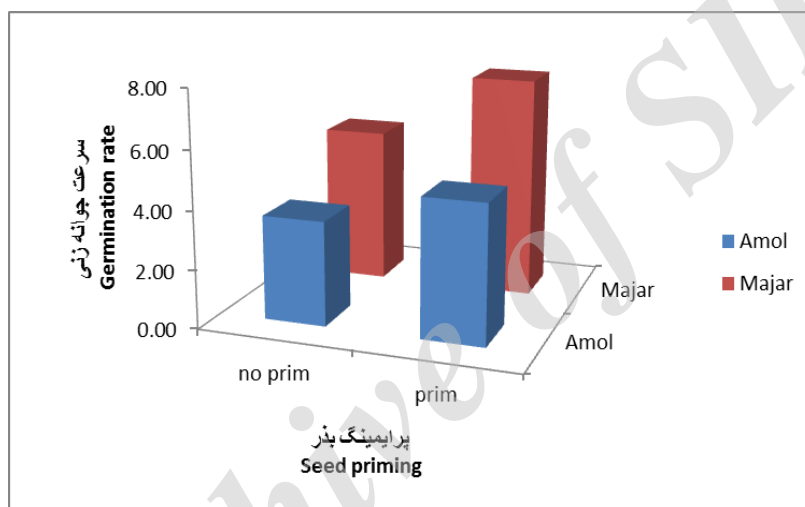
سطوح زمان Time levels	پرایمینگ بذر Seed priming	کاتالاز Catalase (U/mg protein)	پراکسیداز Peroxidase (U/mg protein)	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase (U/mg protein)
24 hour	priming	181.6 a	419.5 a	502 a
	Non-priming	149.7 a	117.6 b	337.6 b
96 hour	priming	435.9 a	373.3 a	1260 a
	Non-priming	214.1 b	323 b	1114.8 b

میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند
 Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5%



شکل ۱- اثر پرایمینگ بذر بر سرعت جوانه زنی دو ژنوتیپ آمل و مجارستان در شرایط تنش شوری

Figure 1. The effect of seed priming on germination rate of Amol and Majar genotypes in salt stress



شکل ۲- اثر پرایمینگ بذر بر سرعت جوانه زنی دو ژنوتیپ آمل و مجارستان در شرایط بدون تنش (شاهد)

Figure 2. The effect of seed priming on germination rate of Amol and Majar genotypes in non-salt stress

آب و افزایش وزن بذر به صورت خطی بوده و سپس فرآیند جذب آب وارد مرحله دوم شده و در این مرحله سرعت جذب آب به مقدار ثابتی می‌رسد. در طول این دو مرحله جذب آب باعث فرآیندهای متابولیکی مهم شده و مقدمات خروج ریشه‌چه و جوانه زنی ایجاد می‌شود تا این که در پایان مرحله دوم و شروع مرحله سوم ریشه‌چه ظاهر می‌شود. در واقع هدف از پرایمینگ جذب آب تا انتهای مرحله دوم و توقف فرآیندهای متابولیکی تا این مرحله می‌باشد. نتایج این بررسی با یافته‌های حسن پور اقدم و همکاران (Hassanpouraghdam *et al.*, 2009) نیز مطابقت داشت. آن‌ها کاربرد نیترات پتاسیم (KNO_3) را روی جوانه زنی مطالعه و دریافتند این نوع پرایمینگ می‌تواند با

پیدا کند به طوری که این افزایش تا مرحله جوانه زنی نیز ادامه داشت.

بحث و نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج این آزمایش پرایمینگ بذر تأثیر معنی داری بر میزان سرعت جوانه زنی دو ژنوتیپ آمل و مجارستان هم در شرایط تنش شوری و هم در شرایط بدون تنش (شاهد) داشت و باعث افزایش این شاخص شد (شکل ۱ و ۲). بر اساس مطالعات انجام شده، مهم‌ترین عامل موثر در نحوه واکنش بذر به پرایمینگ مربوط به فرآیند جذب آب طی مرحله جوانه زنی بذر است (Copleland and McDonald, 2001). فرآیند جذب آب توسط بذر شامل سه مرحله است، به طوری که در مرحله اول سرعت جذب

آمل نسبت به رقم مجارستان از حساسیت بیش‌تری برخوردار است. این مسأله در میزان سرعت جوانه‌زنی نیز کاملاً مشهود است به‌طوری‌که توده بومی آمل نسبت به مجارستان دارای سرعت جوانه‌زنی کم‌تری بود.

همچنین بررسی لاین‌های حساس و مقاوم به تنش خشکی ذرت نشان داد که سطح فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در لاین‌های مقاوم بالاتر از لاین‌های حساس است (Delengo, 1993). از مقایسه ارقام حساس و مقاوم جو نیز نتایج مشابهی حاصل شد (Amini, 2007). همچنین مقایسه ارقام حساس و مقاوم گندم به تنش شوری نیز نشان داد که سطح فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در ارقام مقاوم بالاتر است. اسفندیاری و همکاران (Esfandiari, et al., 2007) گزارش کردند که در ارقام حساس گندم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پایین‌تر از رقم مقاوم بوده است. همچنین نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که پرایمینگ بذر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را در شرایط تنش شوری به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از شرایط بدون تنش افزایش داد. هر چند شرایط تنش شوری خود به تنهایی نقش مهمی در افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان دارد اما مقایسه بذرهای پرایم‌شده و پرایم‌نشده در این آزمایش نشان داد افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها در شرایط تنش شوری برای بذرهای پرایم‌شده چندین برابر بذرهای بدون پرایم یا شاهد است، از طرفی در شرایط بدون تنش یا کنترل پرایمینگ بذر نه تنها سطح کاتالاز را افزایش نداده بلکه باعث کاهش آن نیز شده است. در مورد پراکسیداز تفاوت معنی‌داری بین بذرهای پرایم‌شده و بدون پرایم در شرایط کنترل یا بدون تنش مشاهده نشده است. همچنین تأثیر پرایمینگ روی افزایش آسکوربات پراکسیداز در شرایط تنش بیش از سه برابر تأثیر آن در شرایط کنترل بوده است.

نتایج این تحقیق با سایر پژوهش‌ها که تأثیر تنش خشکی (Amini, 2007)، تنش شوری (Moosavi, 2010) و تنش سرما (Mirali, 2009) را روی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، در مراحل مختلف جوانه‌زنی بررسی کرده‌اند، تطابق دارد. افضل و همکاران (Afzal et al, 2006) در بررسی اثر پرایمینگ

توجه به هدف پرایمینگ و گیاه مورد مطالعه تأثیر مطلوبی روی جوانه‌زنی و کیفیت بذرهای جوانه‌زده کلزا داشته باشد. این محققین بیان نمودند که اسموپرایمینگ با KNO_3 باعث افزایش معنی‌دار درصد و سرعت جوانه‌زنی و طول ساقچه در گونه *Brassica napus* L. در شرایط تنش شوری شده است.

بررسی نتایج این آزمایش نشان داد تأثیر پرایمینگ بذر بر تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به شرایط تنش و ژنوتیپ بستگی دارد. پرایمینگ تأثیر معنی‌دار بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط شوری و شاهد نشان داد. همچنین مقایسه ژنوتیپ‌ها با یکدیگر نیز نشان داد فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در رقم مجارستان بیش‌تر از توده آمل بوده اما فعالیت آسکوربات پراکسیداز در توده بومی آمل بیش‌تر از رقم مجارستان است.

در بسیاری از پژوهش‌ها تغییر سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تأثیر پرایمینگ بذر در ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان زراعی گزارش شده است (Kaur et al., 2005). بر اساس این پژوهش‌ها تأثیر پرایمینگ بر تغییر سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان زراعی یکسان نبوده، و نوع آنزیم‌هایی که تحت تأثیر پرایمینگ قرار می‌گیرند نیز بر اساس نوع پرایم (Mirali, 2009) و ژنوتیپ مورد مطالعه متفاوت است. به طوری‌که در برخی مطالعات پرایمینگ، کاهش سطح فعالیت برخی آنزیم‌ها (Kaur et al., 2005) و در مطالعات دیگر افزایش سطح فعالیت گزارش شده است (Moosavi, 2009; Mirali, 2010). عیسوند و همکاران (Eisvand et al., 2008) نیز در بررسی اثر پرایمینگ بر کیفیت فیزیولوژیک بذرهای علف گندمی گزارش کردند که افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز تحت تأثیر پرایمینگ افزایش یافته است. همچنین افزایش سطح فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در بذرهای پرایم‌شده ذرت و بهبود استقرار آن نیز در شرایط تنش گزارش شده است (Ya-jing, et al., 2009).

با توجه به نتایج حاصل از مقایسه دو ژنوتیپ، فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در بذر توده بومی آمل کم‌تر از رقم مجارستان تحت تأثیر پرایمینگ قرار گرفته‌اند. بررسی نتایج حاصل از برخی پژوهش‌ها نشان داد که سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ژنوتیپ‌های حساس به تنش پایین‌تر است. لذا به‌نظر می‌رسد توده بومی

مختلف محیطی گزارش شده است (Zhang *et al*, 2007; Yagmur and Kaydan, 2008; Kebinza *et al*, 2011). کبینزا و همکاران (Kebinza *et al*, 2011) گزارش کردند آنتی‌اکسیدان نقش کلیدی در افزایش مقاومت بذرهای پیرشده گیاه آفتابگردان در شرایط تنش داشته‌اند. در تحقیق باکلوا و همکاران (Bakalova, *et al*, 2004) بر روی گندم گزارش شده که آنتی‌اکسیدان در مقایسه با پراکسیداز از حساسیت بیش‌تری برخوردار و در نتیجه زودتر از پراکسیداز فعال شده است.

به‌طور کلی بر اساس نتایج این آزمایش پرایمینگ بذر میزان سرعت جوانه‌زنی و فعالیت آنتی‌اکسیدان کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز را در گیاه ماریتیغال افزایش داده است، جالب توجه این‌که در شرایط تنش شوری افزایش فعالیت این آنتی‌اکسیدان در بذرهای پرایم-شده به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از بذرهای پرایم‌نشده در شرایط کنترل یا بدون تنش بوده است. همچنین پرایمینگ بذر باعث تسریع در آغاز فعالیت برخی آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر پراکسیداز شده و از طرف دیگر یک شب افزایشی در فعالیت این آنتی‌اکسیدان در طی مراحل جوانه‌زنی بذر گیاه ماریتیغال شده است. پیشنهاد می‌گردد سایر سیستم‌های آنتی‌اکسیدان در اثر پرایمینگ بذر و در شرایط تنش‌های محیطی مختلف نیز مورد بررسی قرار گیرد.

بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان بذرهای ارقام حساس و مقاوم به شوری گندم گزارش کردند که تنش شوری سطح آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را افزایش داده است.

بررسی اثر پرایمینگ بذر بر سطح فعالیت آنتی‌اکسیدان نشان داد که تغییر سطوح فعالیت این آنتی‌اکسیدان تا جوانه‌زنی از روند یکسانی برخوردار نیستند، به‌طوری‌که در اثر پرایمینگ فعالیت آنتی‌اکسیدان پراکسیداز سریع‌تر از سایر آنتی‌اکسیدان‌ها آغاز شده است. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در بذرهای پرایم‌شده مرحله جوانه‌زنی (۹۶ ساعت بعد از کاشت) مشاهده شده در حالی‌که افزایش فعالیت پراکسیداز در مرحله آنبوشتی (۲۴ ساعت بعد از کاشت) مشاهده گردید. تفاوت بذر گیاهان مختلف در مورد تقدم و تاخر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان و یا حساسیت بیش‌تر برخی آنتی‌اکسیدان‌ها در شرایط تنش، به ساختار اندوخته‌های بذر و ترکیب ژنتیکی آن بستگی دارد. به‌نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در مرحله جوانه‌زنی به‌دلیل نقش حفاظتی این آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان است و به همین دلیل است که در شرایط تنش فعالیت این آنتی‌اکسیدان پیدا کرده است. در بسیاری از پژوهش‌ها نقش حفاظتی این آنتی‌اکسیدان‌ها در شرایط تنش‌های

منابع

- Aebi, H. 1983. Methods of enzymatic analysis. 3rd ed. (Eds. Bergmeyer, H.U., J. Bergmeyer, M. Grabi 273-282, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Germany. **(Book)**
- Afzal, I., Aslam, N., Mahmood, F., Hameed, A., Irfan, S. and Ahmad, G. 2004. Enhancement of germination and emergence of canola seeds by different priming techniques. *Caderno de Pesquisa Série Biologia Santa Cruz do Sul*. 16: 19-34. **(Journal)**
- Amini, Z. 2007. Evaluation of antioxidant activity in barley under salt stress. MSc. Dissertation, International Emam-Khomeini University, Ghazvin, Iran. (In Persian)**(Thesis)**
- Bradford, K.J., Steiner, J.J. and Trawatha, S.T. 1990. Seed priming influence and emergence of pepper seed lots. *Crop Science*, 30: 718-721. **(Journal)**
- Cano, E.A., Bolaryn, M.C., Perez-Alfocea, F. and Caro, M. 1991. Effect of NaCl priming on increased salt tolerance in tomato. *Journal of Horticulture Science*, 66: 621-628. **(Journal)**
- Corbineau, F. and Come, D. 2006. Priming: a technique for improving seed quality. *International Seed Testing Association*, 132: 38-40. **(Handbook)**
- Copleland, L.O. and McDonald, M.B. 2001. Principles of seed science and technology. Kluwer Academic Publisher, USA. **(Book)**
- Davork, Z., Kosina, P., Walterova, D., Simanek, V., Bachleda, P. and Ulrichova, J. 2003. Cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *Silybum marianum*. *Toxicology Letters*, 173: 201-212. **(Journal)**
- Demir Kaya, M., Okcu, G., Atak, M., Cikili, Y. and Kolsarici, O. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy*, 24: 291-295. **(Journal)**

- Eisvand, H.R. 2008. Evaluation of seed priming effect on physiological quality of deteriorated tall wheat grass (*Agropyron elongatum* Host.) seeds under drought stress. Ph.D Dissertation, Tehran University, Karaj, Iran. (In Persian)(**Thesis**)
- Hassanpour aghdam, M.B., Emarat Pardaz, J. and Farsad Akhtar, N. 2009. The effect of osmo-priming on germination and seedling growth of *Brassica napus* L. under salinity conditions. Journal of Food Agriculture and Environment, 7 (2): 620-622. (**Journal**)
- Hsu, C.C., Chen, C.L., Chen, J.J. and Sung, J.M. 2003. Accelerated aging hence lipid per oxidation in bitter gourd seeds and effects of priming and hot water soaking treatments. Scientia Horticulturæ, 98: 201-212. (**Journal**)
- Iqbal, M. and Ashraf, M. 2006. Wheat seed priming in relation to salt tolerance: growth, yield and level of free salicylic acid and polyamines. Annales Botanici Fennici, 43: 250-259. (**Journal**)
- ISTA, 1996. International rules for seed testing. Seed Science and Technology, 13: 299-355. (**Journal**)
- Kaur, S., Gupta, A.K. and Kaur, N. 2005. Seed priming increases crop yield possibly by modulating enzymes of sucrose metabolism in Chickpea. Journal of Agronomy and Crop Science, 191: 81-87. (**Journal**)
- Khan, A.A. 1992. Preplant physiological seed conditioning. Horticulture Review, 13: 131-181. (**Journal**)
- McDonald, M.B. 2000. Seed priming. In: Black, M., Bewley, J.D. (Eds.), Seed Technology and Its Biological Basis. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, pp. 287-325. (**Book**)
- Miralli, M. 2009. Physiological and biochemical effects of abscisic acid on deteriorated canola (*Brassica napus* L.) seeds under low temperature stress. MSc. Dissertation, Tehran University, Karaj, Iran. (In Persian)(**Thesis**)
- Moosavi, A. 2010. The effect of osmopriming on quantity and quality traits of *Amaranthus* forage and grain genotypes under salt and drought stress. MSc. Dissertation, Tehran University, Karaj, Iran. (In Persian)(**Thesis**)
- Nakano, Y. and Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydro ascorbate radical. Plant Cell Physiology, 28: 131-140. (**Journal**)
- Rashid, A., Holligton, P.A., Harris, D. and Khan, P. 2006. On-farm seed priming for barley on normal, saline and saline-sodic soils. European Journal of Agronomy, 24: 276-281. (**Journal**)
- Wang, H.Y., Chen, C.L. and Sung, J.M. 2003. Both warm water soaking and solid priming treatments enhance anti-oxidation of bitter gourd seeds germinated at sub-optimal temperature. Seed Science and Technology, 31: 47-56. (**Journal**)
- Yagmur, M. and Kaydan, D. 2008. Alleviation of osmotic stress of water and salt stress in germination and seedling growth of triticale with seed priming treatments. African Journal of Biotechnology, 7(13): 2156-2162. (**Journal**)

The evaluation of salt stress effect on antioxidant enzymes activity in seedling induced of Milk thistle primed seeds

Mehrangiz Jokar Tangkarami*¹, Ahmad Ghanbari², Foad Moradi³

Received: October 11, 2015

Accepted: January 30, 2016

Abstract

This experiment was performed in order to evaluation antioxidant enzymes activity in seedling induced of milkthistle primed seeds in salt stress condition. The experiment was conducted in factorial based on completely randomized design with four factors and three replications in Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII). These factors were included of genotype (Amol and Majar), priming (primed and non-primed seeds), stress: salinity (150 mM) and control led (non-salinity) and time of sampling in 24 and 96 hours after sowing. The results showed the seed priming increased significantly the catalase (CAT) activity in Majar, peroxidase (POX) activity in both genotypes and ascorbat peroxidase (APX) in Amol, so that CAT activity increased in Majar primed seeds than control 96%. Priming increased POX activity in Majar 14-fold greater than Amol. Increasing CAT and APX activity were observed in primed seeds in germination stage but POX activity increasing was observed in imbibition stage. Overall, the results showed the CAT, POX and APX activity was higher in primed seeds than non-primed in salt stress condition. Priming affected CAT and POX activity in Majar greater in Amol.

Key words: Antioxidant enzymes; Germination stages; Seed priming; Salt stress; *Silybium marianum*

1. Assistant professor, Faculty of Agricultural Sciences, Jiroft University, Jiroft, Iran

2. Professor, Faculty of Agricultural Sciences, Zabol University, Zabol, Iran

3. Research Associate, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

*Corresponding author: jokar2006@yahoo.com