زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال ششم، شماره بیستم، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۵۵-۷۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۱۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۰۸/۰۵
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۱۰/۲۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰

# تأثیر نیتریک اکسید برون‌زاد بر جوانه‌زنی و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در شرایط شوری

سمانه اسدی صنم [۱]، محسن زواره [۱]*، همت‌اله پیردشتی [۲]، محمد حسین میرجلیلی [۳] و ابوذر هاشم‌پور [۴]
[۱] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
[۲] گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
[۳] گروه مهندسی کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
[۴] گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

## چکیده

با هدف بررسی نقش نیتریک اکسید برون‌زاد به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر در کاهش آثار تنش اکسیداتیو ناشی از شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه فیزیولوژی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۹۱ اجرا شد. تیمارهای آزمایشی، شامل دو سطح پیش تیمار بذر (آب خالص استریل و نیتریک اکسید) و سطوح مختلف شوری (۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌مولار محلول کلرید سدیم) بود. نتایج نشان داد که پیش تیمار دهنده نیتریک اکسید در تحمل تنش شوری، افزایش معنی‌داری بر درصد نهایی جوانه‌زنی داشت. سطوح مختلف شوری موجب کاهش بسیار معنی‌دار سرعت جوانه‌زنی، بنیه و شاخص جوانه‌زنی بذور سرخارگل شد. استفاده از نیتریک اکسید خارجی در محیط شور، موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با شرایط عدم استفاده از آن شد، به طوری که بیشینه میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (۱۱۶/۳ میکرومول برگرم بافت تازه) در غلظت ۱۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم و برای پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز (به‌ترتیب: ۱/۷ و ۵۰/۱ میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه) در غلظت‌های ۵۰ و ۱۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم به دست آمد. نیتریک اکسید تأثیر معنی‌دار و معکوسی بر فعالیت آنزیم کاتالاز داشت. علاوه بر این، استفاده از نیتریک اکسید خارجی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، پراکسیده‌شدن لیپیدهای غشا را کاهش داده، سبب تأخیر در تجزیه پروتئین‌ها شد. به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که سدیم نیترو پروساید به عنوان دهنده نیتریک اکسید می‌تواند با پاکسازی رادیکال‌های آزاد موجب بهبود ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر سرخارگل در شرایط شور و افزایش نسبی تحمل در این مرحله شود.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین، سدیم نیترو پروساید، مالون دی آلدهید

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: mzavareh@guilan.ac.ir، شماره تماس: ۰۱۳۱۶۶۹۰۰۰۹

**مقدمه**

شوری یکی از تنش‌های غیرزیستی مهم و فراگیر در کشاورزی امروزی است که رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان شیرین‌رُست را کاهش می‌دهد (Parida and Das, 2005). پیش‌بینی شده است که تا سال ۲۰۵۰ احتمالاً بیش از ۵۰ درصد زمین‌های فاریاب جهان تحت تأثیر شوری قرار خواهند گرفت (Wang *et al*., 2003) که نشان‌دهنده تهدیدی جدی برای تولید پایدار غذا به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک است (Paranychianakis and Chartzoulakis, 2005).

جنس *Echinacea* گیاهی علفی و چندساله از خانواده گل ستاره (Asteraceae) است که خاستگاه آن شمال آمریکا است و تاکنون ۹ گونه و چهار رقم از آن معرفی شده است (Stanisavijevic *et al*., 2009). سه گونه: *E. angustifolia*، *E. pallida* و *E. purpurea* به عنوان گونه‌های مهم دارویی از این جنس شناخته شده‌اند که از ریشه و اندام هوایی آنها به عنوان داروهای گیاهی استفاده می‌شود (Bauer and Wagner, 1991).

گونه *E. purpurea* گیاهی با گل‌های مخروطی شکل و به رنگ ارغوانی تا صورتی است (Mrozikiewicz *et al*., 2010) که در فلور ایران وجود ندارد ولی به دلیل اهمیت گسترده‌ای که دارد، بذر آن در سال ۱۳۷۲ به ایران وارد و نام سرخارگل برای آن برگزیده شد (Omidbaigi, 2002). این گیاه، تحمل بالایی به دامنه گسترده‌ای از شرایط آب و هوایی و اقلیمی، درجات مختلف رطوبتی و دمایی و شرایط محیطی خاکی از جمله خشکی نشان داده است (Sabra *et al*., 2012a). این ویژگی‌ها در کنار تقاضای روزافزون صنایع دارویی برای استفاده از این گیاه، ضرورت کشت گسترده آن را در جهان (Stanisavijevic *et al*., 2009) و در ایران برجسته می‌کند. با وجود این، گرچه مطالعاتی در شرایط شوری روی این گیاه انجام شده است ولی چندان زیاد نیست.

برای نمونه، در دو پژوهشی که تحمل شوری سرخارگل با چند گیاه دیگر مقایسه شد، با توجه به شرایط محیط رشد گیاهان (از نظر دما و شدت نور) تحمل متوسط (Zollinger *et al*., 2007) و پایین (Niu and Rodriguez, 2006) برای این گیاه گزارش شد. در این دو پژوهش، گیاهان در معرض ترکیب کلرید سدیم (NaCl) و کلرید کلسیم ($CaCl_2$) قرار گرفتند. بنابراین، با توجه به تأثیر کلسیم بر کاهش برخی از آثار نامطلوب شوری در برخی گیاهان (Cramer *et al*., 1985)، تأیید اثر کلرید سدیم بر گیاه سرخارگل در این دو مطالعه دشوار بوده است.

بذر سرخارگل توان رویشی اندکی دارد و رشد اولیه آن نیز بسیار کند است (Omidbaigi, 2002). بنابراین، وجود بستر مناسب برای رشد و جوانه زنی بذر آن ضروری به نظر می‌رسد. از آن جا که تأثیر شوری عمدتاً بر جوانه زنی بذر و ابتدای رشد گیاهچه است (Grim and Campbell, 1991)، این موضوع می‌تواند ضرورت تعیین آستانه تحمل این گیاه به شوری برای جلوگیری از تأخیر در آغاز جوانه زنی و بهبود استقرار گیاهچه را ایجاب نماید.

تنش شوری با خسارت اکسیداتیو القا شده توسط ROSها، می‌تواند اختلال در متابولیسم سلول از طریق پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، اکسیداسیون پروتئین ها،

بازدارندگی فعالیت آنزیم‌ها و خسارت به نوکلئیک اسیدها را به دنبال داشته باشد (Turkan and Demiral, 2009). ترکیب آلدهیدی ناشی از پراکسیده شدن لیپیدهای غشا، با اندازه‌گیری مالون دی آلدهید (MDA) سنجش و برآورد شده است (Xu *et al*., 2008). خسارت اکسیداتیو به پروتئین ها شامل تغییرات آمینو اسیدها در جایگاه های ویژه، قطعه قطعه شدن زنجیر پپتیدی، تغییر بار الکتریکی و در نهایت مستعد شدن پروتئین برای پروتئولیز گزارش شده است (Noctor and Foyer, 1998). با وجود این، گیاهان برای کاهش این آثار مخرب، سازوکارهای مختلفی را در خود ایجاد کرده و توسعه داده‌اند که نمونه‌ای از آنها تولید آنزیم‌های حذف کننده ROSها از جمله سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیدازهای متنوعی نظیر آسکوربات پراکسیداز (APX) است (Tanou *et al*., 2009). با توجه به ماهیت این مشکل گسترده در گیاه، یافتن روشی که بتواند گیاهان را از تجمع ROS و خسارت‌های اکسیداتیو بعدی محافظت کند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

سدیم نیترو پروساید (SNP) یک ترکیب رها کننده نیتریک اکسید (NO) است که نقش آن در گیاهان به عنوان ترکیبی مهم در پژوهش‌ها مورد توجه است (Beligni and Lamattina, 2001؛ Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007؛ Lei *et al*., 2007؛ Li *et al*., 2008). رادیکال آزاد NO، یک مولکول فعال زیستی است که در تنظیم بسیاری از کارکردهای سلولی متنوع در گیاه از محدوده رشد ریشه تا پاسخ های سازشی به تنش های زیستی و غیرزیستی نقش دارد (Besson-Bard *et al*., 2008). گزارش شده که NO می‌تواند با واکنش با ROSها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، نقش مهمی در محافظت گیاهان از تنش‌های اکسیداتیو داشته باشد (Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007؛ Li *et al*., 2008؛ Zheng *et al*., 2009). در رابطه با تأثیر NO در کاهش آثار تنش شوری، Uchida و همکاران (۲۰۰۲) با کاربرد غلظت یک میکرومولار SNP در گیاهچه های برنج، Lei و همکاران (۲۰۰۷) با کاربرد غلظت ۰/۲ میلی‌مولار SNP در گیاهچه‌های گندم و Li و همکاران (۲۰۰۸) با کاربرد غلظت ۵۰ میکرومولار SNP در گیاهچه‌های جو، محافظت در برابر خسارت اکسیداتیو و افزایش تحمل به تنش اسمزی را گزارش کردند. Nasibi و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش خشکی، کاهش فعالیت برخی از آنزیم‌ها نظیر: SOD، POD و APX را در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار SNP گزارش کردند و این کاهش را احتمالاً به تنش نیتروزاتیو ایجاد شده در این غلظت مربوط دانستند. برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که NO با جانشینی اثر نور یا شکست خواب بذر سبب افزایش جوانه زنی شده است (Misra and Dwivedi, 2004؛ Besson-Bard *et al*., 2008). با توجه به اهمیت درک پاسخ های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سرخارگل به تنش شوری در ارزیابی امکان استفاده از آب یا خاک شور در تولید این گیاه (Sabra *et al*., 2012a, b) و همچنین، نقش زیاد خسارت‌های اکسیداتیو ناشی از وجود تنش شوری، این آزمایش با هدف بررسی نقش NO خارجی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر در کاهش آثار تنش اکسیداتیو ناشی از شوری و تحریک یا فعال‌سازی پاسخ‌های حفاظتی گیاه در شرایط شوری انجام شد.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۱ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه فیزیولوژی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری اجرا شد. تیمارهای آزمایشی، شامل دو سطح پیش‌تیمار بذر (آب خالص استریل و سدیم نیترو پروساید یا SNP به عنوان دهنده NO با غلظت ۱۰۰ میکرومولار) و شش بستر جوانه‌زنی با شوری‌های متفاوت (۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌مولار محلول کلرید سدیم) بود. در این آزمایش، از آب خالص استریل به عنوان شاهد برای سطح صفر شوری (بستر جوانه‌زنی غیر شور) استفاده شد.

پیش از آغاز آزمایش، بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شدند. دقیقاً پیش از جوانه زنی، بذرها در آب خالص استریل و سدیم نیترو پروساید ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۲۰ ساعت خیسانده شدند. پس از طی این مدت، بذرها تا رسیدن به وزن اولیه در دمای اتاق و شرایط تاریکی خشک شدند. برای هر تکرار، ۵۰ بذر خیس‌خورده در داخل پتری‌دیش‌هایی با قطر نه سانتی‌متر قرار داده شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های شوری آماده شده به پتری‌دیش‌ها اضافه شد. پتری‌دیش‌ها با پارافیلم برای حفظ رطوبت پوشانده شدند و در دمای ۱±۲۶ درجه سانتیگراد برای ۱۲ روز در ژرمیناتور قرار گرفتند. بذرهای جوانه زده از روز دوم در ۱۲ روز متوالی (هر دو روز در میان) در ساعتی معین شمارش شدند. معیار جوانه زنی خروج ریشه‌چه به اندازه دو میلی‌متر بود.

در پایان جوانه‌زنی، برای محاسبه درصد نهایی جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، بنیه (قدرت) جوانه‌زنی و شاخص جوانه‌زنی از رابطه‌های زیر استفاده شد (Bi and Dai, 1993 ؛Ellis and Roberts, 1981):

رابطه ۱:

درصد نهایی جوانه‌زنی = تعداد کل بذرهای جوانه‌زده / تعداد کل بذرهای آزمایش شده × ۱۰۰

رابطه ۲:

سرعت جوانه‌زنی = تعداد بذور جوانه‌زده / روز اول شمارش + تعداد بذور جوانه‌زده / روز آخر شمارش

رابطه ۳:

بنیه جوانه‌زنی = تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز چهارم / تعداد کل بذرهای آزمایش شده × ۱۰۰

برای محاسبه شاخص جوانه‌زنی از رابطه ۴ استفاده شد:

رابطه ۴:

$$\sum_{i=1}^{j=t} Gi/t$$

که در آن $Gi$ تعداد بذر جوانه زده در روز $i$ام و $t$ تعداد کل روزهای جوانه‌زنی است.

۱۴ روز پس از جوانه‌زنی، همه گیاهچه‌های جوان موجود در پتری‌دیش‌ها جمع‌آوری شد و به سرعت در نیتروژن مایع قرار گرفت. گیاهچه‌های جمع‌آوری شده پس از خروج از نیتروژن مایع، در یخچال ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد تا میزان پراکسیده شدن لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) موجود در آنها اندازه‌گیری شود.

**سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا:** برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دی آلدهید به عنوان محصول پراکسیده شدن اسیدهای چرب غشاها با روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه گیری شد. به طور خلاصه، در ابتدا، ۰/۵ گرم از بافت تازه برگی با نیتروژن مایع در هاون چینی آسیاب شد و به آن ۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۱ درصد اضافه شد. عصاره به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با دستگاه سانتریفیوژ (مدل 5417R، شرکت Ependorf، آلمان) با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. سپس، به ۱ میلی لیتر از محلول رویی، ۵ میلی لیتر محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد شد. سپس، نمونه ها مجدداً در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. ماده قرمز رنگ مالون دی آلدهید-تیوباربیوتریک اسید (MDA-TBA) تولید شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل T80+UV/VIS، شرکت PG Instrument، انگلستان) اندازه‌گیری شد و جذب سایر رنگیزه های اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. تعیین غلظت مالون دی آلدهید از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ $mM^{-1}$ $cm^{-1}$، بر حسب نانومول بر گرم بافت تازه بر اساس رابطه ۵ محاسبه شد.

رابطه ۵: $[(A532-A600)/155]\times100$

**استخراج آنزیم‌ها:** ۰/۵ گرم بافت تازه برگ با کمک نیتروژن مایع در هاون چینی آسیاب شد و پس از آن به بافت آسیاب شده، یک میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیته=۷) حاوی EDTA ۰/۵ مولار و PVPP ۲ درصد اضافه گردید. محلول حاصل در دمای چهار درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، محلول رویی برای بررسی فعالیت آنزیم های SOD، POD، CAT و APX و همچنین میزان پروتئین کل مورد استفاده قرار گرفت.

## اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها

**فعالیت آنزیم SOD:** سنجش فعالیت آنزیم SOD با روش Rao و Sresty (۲۰۰۰) اندازه گیری شد. محلول واکنش آنزیمی شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و NBT ۷۵ میکرومولار و ۱۵ میکرولیتر ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده بود. کووت های حاوی مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در حالی که به‌آرامی تکان داده می شدند در معرض نور فلورسانس قرار گرفتند، سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر ثبت شد. برای سنجش فعالیت این آنزیم علاوه بر کووت های نمونه و بلانک از کووت شاهد نیز استفاده شد. برای خواندن نمونه‌ها،کووت شاهد همراه با نمونه‌ها در معرض نور قرار گرفته، کووت بلانک در تاریکی قرار داده می شود. سپس، جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده و فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه محاسبه شد.

**فعالیت آنزیم POD:** برای سنجش فعالیت آنزیم

POD از روش Nickel و Cunningham (۱۹۶۹) استفاده شد. ۴۹۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۲۲۵ میلی‌مولار و ۴۹۰ میکرولیتر محلول گایاکول ۴۵ میلی‌مولار با هم مخلوط و به آن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در محلول بلانک به‌جای عصاره آنزیمی، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار استفاده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد.

**فعالیت آنزیم CAT:** برای سنجش فعالیت آنزیم CAT از روش Cakmak و Marschner (۱۹۹۲) استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۹۸۰ میکرولیتر از بافر فسفات حاوی هیدروژن پراکسید ۲ میلی‌مولار مخلوط شدند و تغییرات جذب آنها در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول هیدروژن پراکسید بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد.

**فعالیت آنزیم APX:** برای سنجش فعالیت آنزیم APX از روش Aono و همکاران (۱۹۹۵) استفاده شد. ۷۷۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته=۷ با ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید ۵ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط شدند. سپس، با افزودن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول آسکوربیک اسید بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد.

**سنجش میزان پروتئین کل:** سنجش غلظت پروتئین محلول با روش Bradford (۱۹۷۶) با دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

**تحلیل داده‌ها:** برای تجزیه آماری داده‌های به دست آمده، از نرم‌افزار SAS نسخه ۹ استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD انجام شد و $P<0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در نظر گرفته شد. نمودارها، با نرم افزار SigmaPlot نسخه ۱۲ رسم شد.

## نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهم‌کنش تیمارهای شوری × پیش تیمار بذرها بر درصد نهایی جوانه‌زنی بذر سرخارگل معنی‌دار است (جدول ۱). نتایج برش‌دهی با استفاده از پیش‌تیمار نشان داد که درصد نهایی جوانه‌زنی در پیش‌تیمار با آب خالص در سطح احتمال یک درصد و در پیش تیمار با نیتریک اکسید (سدیم نیترو پروساید ۰/۱ میلی‌مولار) در سطح احتمال پنج درصد معنی دار است (جدول ۲). نتایج برش‌دهی با تیمارهای شوری هم نشان داد که درصد نهایی جوانه‌زنی به غیر از تیمار شوری صفر (بستر غیر شور) که در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود، در سایر بسترهای شور معنی‌دار نیست (جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌های برهم‌کنش پیش‌تیمار و شوری نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی (۶۶/۷ درصد) به پیش تیمار با آب خالص در شرایط عدم شور (تیمار شاهد) مربوط است (شکل ۱). پیش‌تیمار بذرهای سرخارگل با نیتریک اکسید (سدیم نیترو پروساید ۰/۱ میلی‌مولار) توانست تنها در غلظت‌های بالاتر شوری

(۱۰۰-۱۵۰ میلی مولار NaCl)، موجب افزایش درصد جوانه زنی بذرها نسبت به پیش تیمار با آب خالص شود به طوری که کمترین درصد جوانه زنی (۱۸ درصد) در پیش تیمار بذور با آب خالص (شاهد) در سطح ۱۵۰ میلی‌مولار محلول کلرید سدیم به دست آمد که آماده سازی بذور با NO توانست میزان آن را به ۲۴/۷ درصد در این غلظت از بستر شور افزایش دهد (شکل ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های جوانه‌زنی مطالعه شده. ns= عدم تفاوت معنی‌دار، * و **= به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

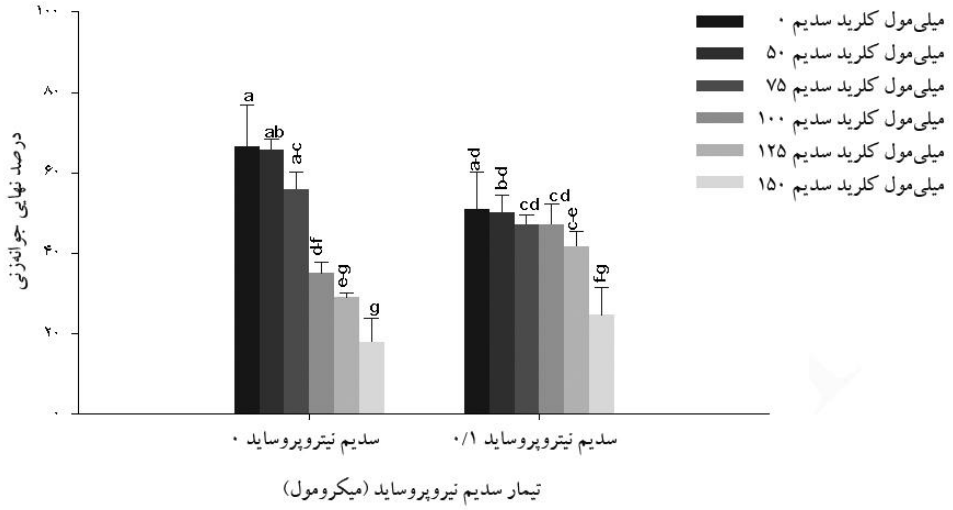
| منابع تغییر | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | درصد نهایی جوانه‌زنی | سرعت جوانه‌زنی | بنیه جوانه‌زنی | شاخص جوانه‌زنی |
| پیش‌تیمار | ۱ | ۱۸/۸$^{ns}$ | ۵۶/۲$^{ns}$ | ۱۷۳/۴$^{ns}$ | ۱۲/۱$^{ns}$ |
| شوری | ۵ | ۱۲۶۶/۶$^{**}$ | ۶۰۰/۹$^{**}$ | ۱۳۸۸/۸$^{**}$ | ۱۳۰/۱$^{**}$ |
| پیش‌تیمار × شوری | ۵ | ۲۶۷/۵$^{*}$ | ۳۳/۴$^{ns}$ | ۸۶/۹$^{ns}$ | ۱۰/۸$^{ns}$ |
| خطای آزمایش | ۲۴ | ۹۰/۶ | ۳۰/۳ | ۱۰۸/۲ | ۷/۸ |
| ضریب پراکندگی | - | ۱۵ | ۱۷ | ۲۰ | ۱۹ |

جدول ۲- برش‌دهی برهم‌کنش تیمارهای شوری × پیش‌تیمار با استفاده از پیش‌تیمار روی درصد نهایی جوانه‌زنی

| تیمار | درجه آزادی | سطح معنی‌دار |
|---|---|---|
| پیش‌تیمار با آب خالص | ۵ | <۰/۰۰۱ |
| پیش‌تیمار با نیتریک اکسید (SNP 0.1) | ۵ | ۰/۰۲۲ |

جدول ۳- برش‌دهی برهم‌کنش تیمارهای شوری × پیش‌تیمار با استفاده از شوری. FGP: درصد نهایی جوانه‌زنی، MDA: مالون دی آلدهید، PRO: پروتئین، SOD: آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، POD: آنزیم پراکسیداز، CAT: آنزیم کاتالاز، APX: آنزیم آسکوربات پراکسیداز

| تیمارهای شوری (میلی‌مولار) | درجه آزادی | سطح معنی‌دار | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | FGP | MDA | PRT | SOD | POD | CAT | APX |
| ۰ | ۱ | ۰/۰۴۶ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۶ | <۰/۰۰۱ |
| ۵۰ | ۱ | ۰/۰۶۰ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ |
| ۷۵ | ۱ | ۰/۲۷۶ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | ۰/۰۵۲ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | ۰/۲۰۵ |
| ۱۰۰ | ۱ | ۰/۱۲۶ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | ۰/۱۴۷ | ۰/۰۳۵ |
| ۱۲۵ | ۱ | ۰/۱۱۶ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ |
| ۱۵۰ | ۱ | ۰/۴۴۸ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ | <۰/۰۰۱ |




شکل ۱- اثر برهم‌کنش سدیم نیترو پروساید و شوری بر درصد نهایی جوانه‌زنی بذر سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

بر پایه نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، سطوح مختلف شوری موجب کاهش خطی و بسیار معنی‌دار سرعت جوانه‌زنی، بنیه بذر و شاخص جوانه‌زنی بذور سرخارگل شد (جدول ۱). بر پایه نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴)، بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۳۴/۲)، بنیه بذر (۵۳/۷) و شاخص جوانه زنی (۱۷/۲) در تیمار شاهد به دست آمد. افزایش شوری تا ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، سبب کاهش سرعت جوانه‌زنی، بنیه جوانه‌زنی و شاخص جوانه‌زنی به ترتیب به میزان: ۵/۵، ۱۰/۵ و ۳/۸ نسبت به تیمار شاهد شده است (جدول ۴). در پژوهش حاضر آماده‌سازی بذور با دهنده NO، تأثیر معنی‌داری بر این شاخص‌ها نداشت.

جدول ۴- اثر پیش‌تیمار نیتریک اکسید بر ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر سرخارگل در بستر شور. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

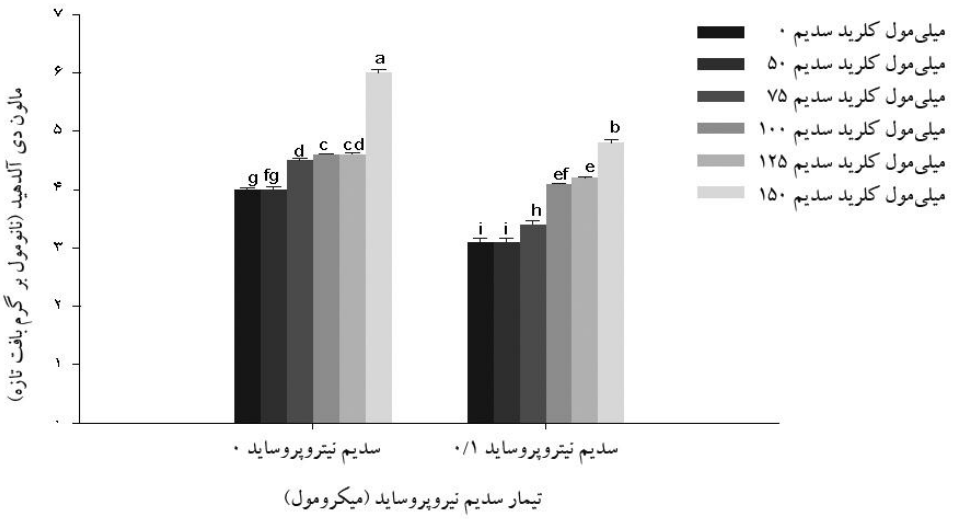
| تیمار شوری (میلی‌مول کلرید سدیم) | ویژگی‌های جوانه‌زنی | | |
|---|---|---|---|
| | سرعت جوانه‌زنی | بنیه جوانه‌زنی | شاخص جوانه‌زنی |
| ۰ | ۳۴/۲±۴/۶۱[a] | ۵۳/۷±۶/۹۵[a] | ۱۷/۲±۲/۲۴[a] |
| ۵۰ | ۲۴/۳±۲/۲۲[b] | ۴۲/۸±۳/۰۱[ab] | ۱۳/۳±۰/۸۸[b] |
| ۷۵ | ۱۹/۲±۰/۹۸[bc] | ۳۷/۵±۴/۶۸[bc] | ۱۲/۳±۱/۰۲[bc] |
| ۱۰۰ | ۱۴/۵±۱/۶۱[cd] | ۲۸/۲±۴/۰۱[cd] | ۹/۲±۱/۰۲[cd] |
| ۱۲۵ | ۱۲/۵±۰/۹۲[d] | ۲۳/۸±۲/۵۱[d] | ۸±۰/۴۶[d] |
| ۱۵۰ | ۵/۵±۱/۰۶[e] | ۱۰/۵±۲/۲۵[e] | ۳/۸±۰/۶۱[e] |

با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده ها، برهمکنش تیمارهای شوری و پیش‌تیمار بذرها سبب افزایش معنی‌دار محتوای MDA به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا در بذر سرخارگل شده است (جدول ۵). برش‌دهی این برهم‌کنش با استفاده از شوری نشان داد که میزان MDA در همه بسترهای شور در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده است (جدول ۳). میانگین‌های به دست آمده از داده‌های برهم‌کنش بین تیمارها نشان داد که بیشترین مقدار MDA برابر با ۶ نانومول بر گرم بافت تازه مربوط به پیش تیمار با آب خالص در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بود (شکل ۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های برهم‌کنش، پیش‌تیمار نیتریک اکسید برون‌زاد سبب کاهش در اکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول و محتوای مالون دی آلدهید در بذور سرخارگل شد به طوری که بیشترین کاهش MDA (۴/۸ نانومول بر گرم بافت تازه) مربوط به پیش‌تیمار بذور با سدیم نیترو پروساید در سطح شوری زیاد (۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) بود (شکل ۲).

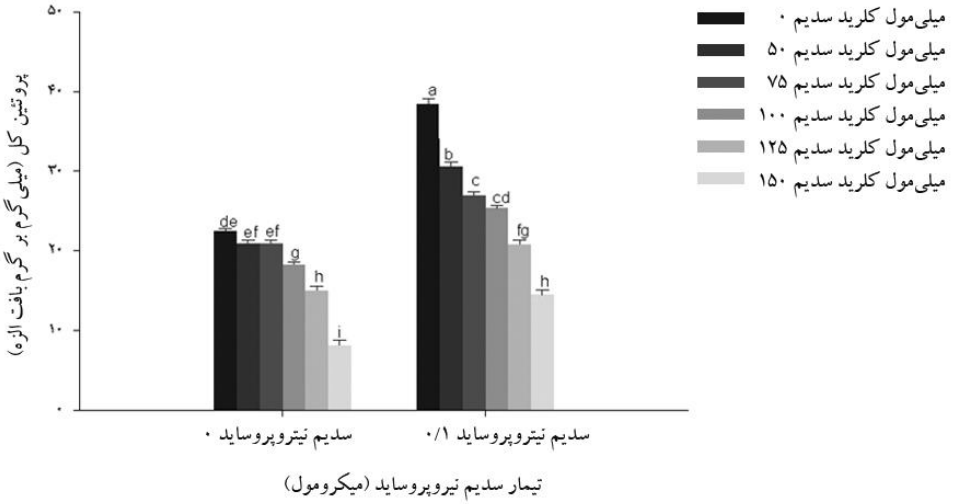
در شکل ۳ مشاهده می‌شود که در سطوح مختلف تنش شوری، مقدار پروتئین بذور سرخارگل به طور چشمگیری کاهش یافته است. کمترین میران پروتئین (۸/۲ میلی‌گرم بر گرم بافت تازه) در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم شوری) برابر با ۲۲/۵ میلی‌گرم بر گرم پروتئین در بافت تازه، ۵۷ درصد کاهش داشت. استفاده از نیتریک اکسید در تمامی بسترهای شور، سبب افزایش معنی‌دار محتوای پروتئین برگ‌ها شد (جدول ۵ و شکل ۳) نتایج برش‌دهی با استفاده از تیمارهای شوری نشان داد که مقدار پروتئین در تمام غلظت‌های شور و در بین شیوه‌های پیش‌تیمار بسیار معنی‌دار شده است (جدول ۳). با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، مقدار پروتئین موجود در عصاره نمونه‌هایی که با نیتریک اکسید در شرایط شور تیمار شدند نسبت به بذوری که تیمار آنها با آب خالص (سدیم نیترو پروساید صفر) بوده است، افزایش نشان داد؛ بیشترین افزایش، ۷۶ درصد مربوط به غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار محلول کلرید سدیم نسبت به پیش‌تیمار با آب خالص بود (شکل ۳).

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های بیوشیمیایی مورد مطالعه. ns= عدم تفاوت معنی‌دار، * و **= به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد. MDA: مالون دی آلدهید، PRO: پروتئین، SOD: آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، POD: آنزیم پراکسیداز، CAT: آنزیم کاتالاز، APX: آنزیم آسکوربات پراکسیداز.

| منابع تغییر | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | MDA | PRO | SOD | POD | CAT | APX |
| پیش‌تیمار | ۱ | ۶/۷۶** | ۶۹۸/۷** | ۵۷۹/۲** | ۱/۰۵** | ۱/۳۴** | ۴۹۹/۵** |
| شوری | ۵ | ۳/۳۷** | ۲۴۰/۹** | ۴۷۸/۱** | ۱/۰۵** | ۱۴/۵** | ۴۴۲/۲** |
| پیش‌تیمار×شوری | ۵ | ۰/۲۴** | ۲۱/۵** | ۱۱۹/۲** | ۰/۰۸** | ۰/۴۵** | ۴۸/۸** |
| خطای آزمایش | ۲۴ | ۰/۰۰۶ | ۱/۸۴ | ۰/۸۱ | ۰/۰۰۰۰۸ | ۰/۰۰۷ | ۰/۷۶۹ |
| ضریب پراکندگی | - | ۲ | ۳/۷ | ۱/۲ | ۱/۴ | ۲/۲ | ۳/۱ |




شکل ۲- اثر برهم‌کنش سدیم نیترو پروساید و شوری بر تغییرات مالون دی آلدهید بذر سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

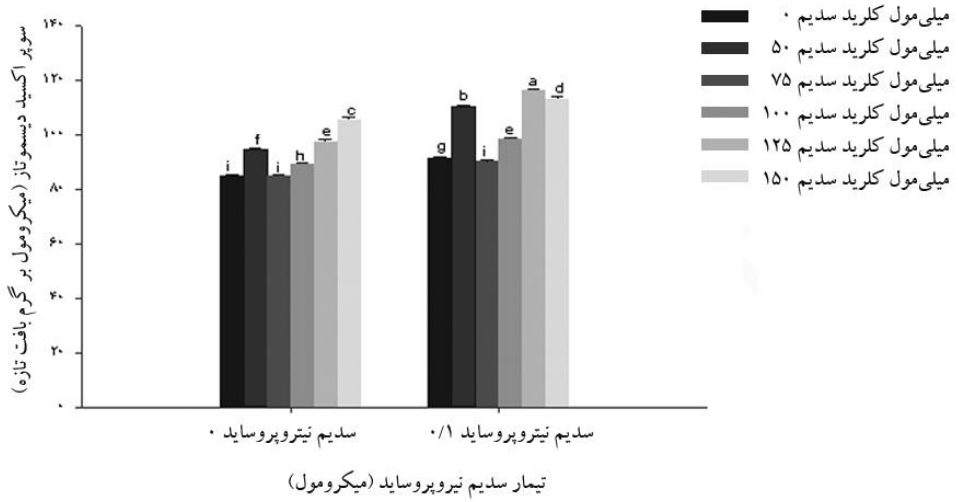



شکل ۳- اثر برهم‌کنش سدیم نیترو پروساید و شوری بر تغییرات پروتئین بذر سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

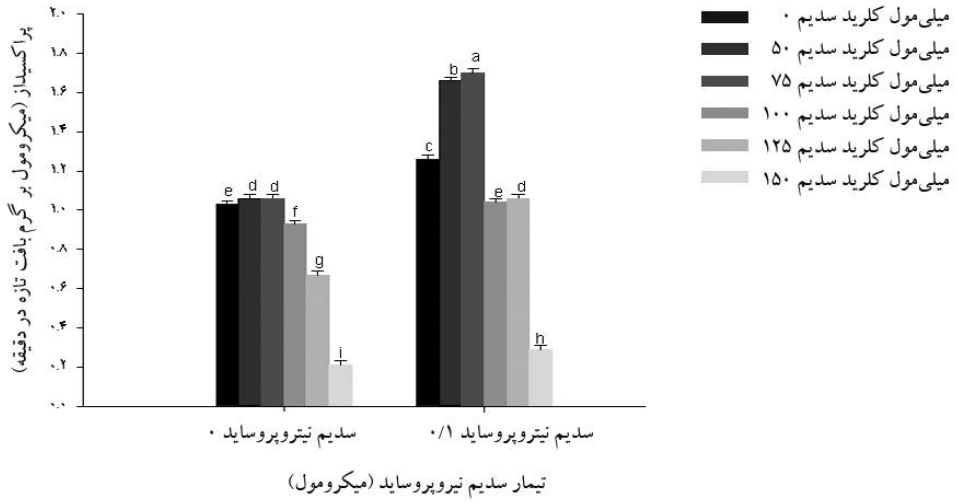
با توجه به نتایج آزمایش، غلظت های متفاوت تنش شوری افزایش معنی داری بر فعالیت آنزیم SOD داشته است (جدول ۵ و شکل ۴) به طوری که با افزایش غلظت محلول کلرید سدیم به ۱۵۰ میلی‌مولار، فعالیت این آنزیم نسبت به شرایط عدم شوری (شاهد) به‌جز در غلظت ۷۵ میلی‌مولار افزایش یافت (شکل ۴). آماده‌سازی بذور با سدیم نیترو پروساید (SNP ۰/۱ میلی‌مولار) در شرایط شور و نتایج برهم کنش آنها، افزایش فعالیت آنزیم SOD را نسبت به تیمار آب خالص نشان داد (شکل ۴). نتایج برش‌دهی به‌وسیله شوری بیانگر این است که فعالیت این

آنـزیم در تمـام سـطوح شـوری بـه غیـر از غلظـت ۷۵ میلی‌مولار نمـک (بـا سـطح احتمـال پـنج درصـد) بسـیار معنـی‌دار بـوده اسـت (جـدول ۳). پـس از ثبـت بیشـترین فعالیت این آنزیم (۱۱۶/۳ میکرومول برگـرم بافـت تـازه) در غلظت ۱۲۵ میلی‌مولار کلریـد سـدیم، فعالیـت بـالایی (۱۱۰/۳ میکرومـول برگـرم بافـت تـازه) در غلظـت ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به دسـت آمـد کـه در مقایسـه بـا شرایط عدم شور (شاهد) بـه ترتیـب ۲۷/۵ درصـد و ۲۰/۹ درصد افزایش داشت (شکل ۴).

بـر اسـاس نتـایج بـه دسـت آمـده از جـدول تجزیـه واریـانس، بـرهمکنش پـیش‌تیمـار NO در غلظـت‌هـای مختلـف تیمـار شـوری بـر فعالیـت آنـزیم POD بسـیار معنی‌دار بود (جدول ۵). برش‌دهی این اثر با غلظت‌های مختلف شوری گویای ایـن اسـت کـه در هـر دو شـیوه پیش‌تیمـار، از نظـر فعالیـت ایـن آنـزیم اخـتلاف بسـیار معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). روند میانگین داده‌هـا نشان داد که بـا افـزایش غلظـت شـوری در بسـتر بـذور سرخارگل، فعالیت آنزیم POD تا غلظت ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم افزایش یافـت و پـس از آن رونـد کـاهش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد (بستر غیر شور) دیـده شـد به طوری کـه کمتـرین فعالیـت ایـن آنـزیم در بیشـترین غلظت نمک کلرید سدیم (۱۵۰ میلی‌مـولار) ثبـت شـد (شکل ۵). همچنین، NO اضافی (SNP ۰/۱ میلی‌مولار) در محیط شور موجب افزایش میزان فعالیت ایـن آنـزیم در مقایسه با پـیش‌تیمـار بـا آب خـالص شـده اسـت بـه طـوری کـه بیشـینه میـزان فعالیـت ایـن آنـزیم (۱/۷ میکرومول بر گرم بافـت تـازه در دقیقـه) در غلظـت ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با شرایط عـدم شـور (۱/۲ میکرومول برگرم بافـت تـازه در دقیقـه) بـه دسـت آمد (شکل ۵).



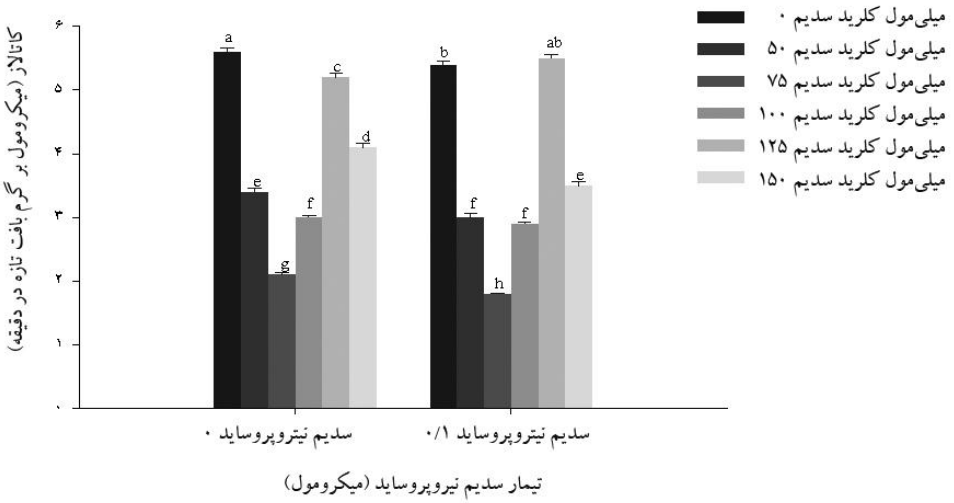

شکل ۴- اثر برهم‌کنش سدیم نیترو پروساید و شوری بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در بذر سـرخارگل. مقـادیر، میـانگین سـه تکرار ± SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.



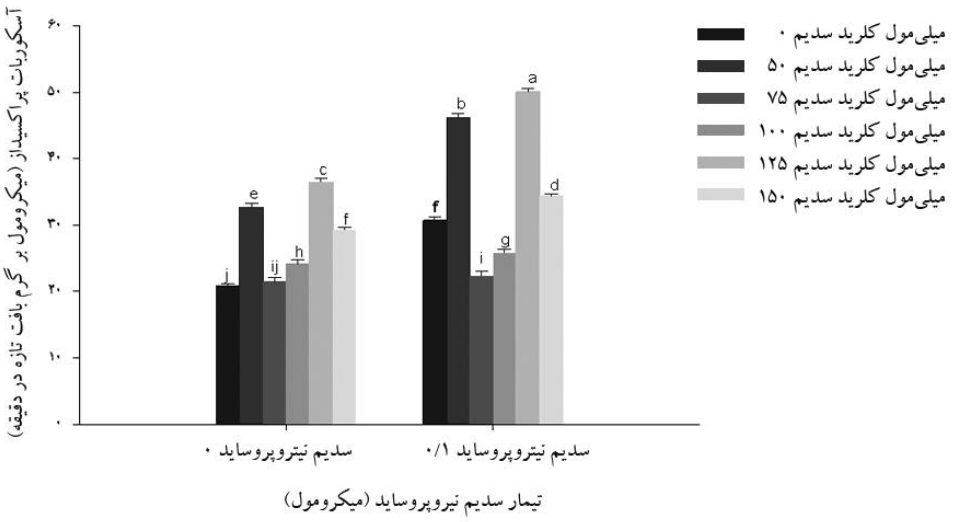

شکل ۵- اثر برهم‌کنش سدیم نیترو پروساید و شوری بر فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در بذر سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم CAT در سطوح مختلف نمک کلرید سدیم روند معنی‌دار و معکوسی را نشان داد به طوری که با افزایش غلظت نمک، فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد (صفر میلی‌مولار نمک) کاهش یافت (جدول ۵ و شکل ۶). در این آزمایش در بررسی برهم‌کنش غلظت‌های مختلف شوری با شیوه‌های پیش‌تیمار بذرها، مشاهده شد که پیش‌تیمار NO برون‌زاد در بستر شور بذرها، نتوانست به غیر از غلظت ۱۲۵ میلی‌مولار (افزایش اندک این آنزیم نسبت به تیمار شاهد)، فعالیت آنزیم CAT را به مانند سایر آنزیم‌ها نسبت به پیش‌تیمار با آب خالص افزایش دهد (شکل ۶). برش‌دهی به‌وسیله شوری نشان داد که به‌جز غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک (عدم معنی دارشدن فعالیت آنزیم) در دیگر غلظت‌های بستر شور در بین پیش تیمار بذرها اختلاف بسیار معنی دار از نظر فعالیت آنزیم CAT وجود دارد (جدول ۳).

همچنین در این آزمایش، تنش شوری موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم APX شده است (جدول ۵ و شکل ۷). علاوه بر افزایش فعالیت آنزیم APX در بستر شور بذرها، کاربرد SNP برون‌زاد نیز فعالیت این آنزیم را القا نمود (شکل ۷)؛ برش‌دهی برهم‌کنش‌ها به وسیله شوری نشان داد (جدول ۳) که در تمامی غلظت‌های نمک به‌جز غلظت ۷۵ میلی‌مولار، دو شیوه پیش‌تیمار بذرها به ایجاد اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم APX منجر شده است که در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار با سطح احتمال پنج درصد و در سایر غلظت‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۳). بر اساس روند مقایسه میانگین داده‌ها، فعالیت آنزیم APX به بیشترین مقدار خود (۵۰/۱ میکرومول برگرم بافت تازه در دقیقه) در غلظت ۱۲۵ میلی‌مولار تیمارهای شوری رسید.




شکل ۶- اثر برهم‌کنش سدیم نیترو پروساید و شوری بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در بذر سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.




شکل ۷- اثر برهم‌کنش سدیم نیترو پروساید و شوری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در بذر سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD است.

## بحث

در پژوهش حاضر، افزایش درصد جوانه‌زنی بذور سرخارگل با پیش‌تیمار NO در سطوح بالاتر شوری می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر مثبت NO در شوری زیاد باشد. در گزارش‌ها بیان شده است که پیش‌تیمار نیتریک اکسید خارجی از یک سو با افزایش فعالیت دو آنزیم آلفاآمیلاز و بتاآمیلاز و در نتیجه تبدیل آسان‌تر نشاسته به قند و از سوی دیگر، از راه تأثیر بر سیستم

آنتی اکسیدانی و کاهش اثر سمّی و مخرب تنش شوری سبب بهبود درصد جوانه‌زنی بذور در شرایط شوری می‌شود (Zheng *et al*., 2009). Amiri و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی اثر شوری بر شاخص‌های جوانه‌زنی دو گیاه دارویی سرخارگل و آرتیشو، درصد جوانه‌زنی این دو گیاه را به ترتیب ۸ و ۷۵ درصد در شوری ۵- بار کلرید سدیم گزارش کردند. در نتایج آنها، به حساسیت سرخارگل نسبت به تنش شوری با کاهش شاخص های جوانه‌زنی، رشد و زیست‌توده گیاهچه تأکید شده است. Zheng و همکاران (۲۰۰۹) نیز در مطالعه خود در بررسی تأثیر پیش تیمار NO بر بهبود جوانه زنی بذر گندم در شرایط شور به نتایج مشابهی دست یافتند.

کاهش بنیه و شاخص جوانه‌زنی بذر سرخارگل در شوری زیاد ممکن است از دو راه کاهش درصد سبز گیاهچه ها و درنتیجه کاهش تراکم بوته به کمتر از حد معمول و همچنین کاهش سرعت رشد گیاهچه ها بر عملکرد و بازده گیاه اثر بگذارد. به علاوه، رشد گیاهچه‌ها در محیط‌های شور تحت تأثیر آثار سمیت نمک و خشکی فیزیولوژیک قرار می گیرند که اثر نامناسب بر استقرار بوته‌ها دارد (Farooq *et al*., 2006). در پژوهش حاضر، آماده‌سازی بذور با دهنده NO تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های جوانه‌زنی نداشت.

به نظر می‌رسد پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در تمام سطوح شوری بررسی شده در این آزمایش و تأثیر بیشتر نیتریک اکسید بر کاهش در اکسیداسیون چربی‌های غشای سلولی و درنتیجه کاهش معنی‌دار محتوی MDA بذرها، احتمالاً ناشی از کاهش خسارت اکسیداتیو و سالم تر ماندن غشاها در نتیجه سیستم های آنتی‌اکسیدان با کارآیی بیشتر در بذور تیمار شده با NO در شرایط شوری باشد. این طور به نظر می‌رسد که نقش NO در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها، مربوط به توانایی NO در واکنش با رادیکال‌های آلکوکسیل (LO) و لیپید پراکسیل (LOO) و در نتیجه، توقف زنجیره پراکسیداسیون لیپیدها باشد (Lei *et al*., 2007). با این حال، نقش این ماده در کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید در مطالعات مربوط به تنش فلز سنگین کادمیوم نیز گزارش شده است (Hsu and Kao, 2004؛ Laspina *et al*., 2005). در مطالعات دیگر نیز به نقش حفاظتی نیتریک اکسید در برابر تنش اکسیداتیو در گیاهانی نظیر: جو (Li *et al*., 2008)، گندم (Zheng *et al*., 2009) و خیار (Shi *et al*., 2007) در شرایط شور اشاره شده است.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، میزان پروتئین در بستر شور بذرها کاهش نشان داد که این کاهش تحت تنش شوری می‌تواند به علت کاهش در سنتز پروتئین، تسریع پروتئولیز و واسرشت پروتئین ها، اکسیداسیون آمینو اسیدها به گروه‌های کربونیل، افزایش نیترات، آمونیوم و آمینو اسیدهای آزاد، کاهش فعالیت آنزیم های نیترات ردوکتاز و گلوتامین سنتتاز و تجزیه آنزیم‌های درگیر در سنتز پروتئین‌ها باشد (Moran *et al*., 1994؛ Sharma and Dietz, 2009). با این وجود، استفاده از نیتریک اکسید در تمام بسترهای شور این گیاه، سبب افزایش معنی‌دار محتوای پروتئین برگ‌ها شد. به نظر می‌رسد تیمار گیاهان با SNP، نقش به‌سزایی در حفاظت پروتئین‌ها تحت تنش داشته باشد. در این پژوهش، نیتریک اکسید به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر توانست با کاهش آسیب های اکسیداتیو ناشی از شوری و القای سنتز برخی آنزیم‌ها مانند آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدانی، موجب تأخیر در تجزیه پروتئین‌ها و افزایش تحمل شوری شود. نتایج به دست آمده با یافته‌های Shi و همکاران (۲۰۰۷) در خیار و Li و همکاران (۲۰۰۸) در جو هماهنگی دارد.

به نظر می‌رسد مهم‌ترین تأثیر تنش شوری پس از اختلال در وضعیت آب سلولی، تولید آنیون‌های مخرب از جمله آنیون‌های سوپر اکسید در میتوکندری سلول و خسارت اکسیداتیو باشد (Mittova *et al*., 2004) با این وجود، افزایش فعالیت آنزیم SOD پس از آماده‌سازی بذرها با سدیم نیترو پروساید در شرایط شور و نقش NO در کاهش تنش اکسیداتیو القا شده با شوری احتمالاً می‌تواند مربوط به توانایی NO در القای آنزیم SOD و تبدیل یون سوپر اکسید به هیدروژن پراکسید و اکسیژن مولکولی باشد. زیرا اگر هیدروژن پراکسید تولید شده به موقع از سلول دفع نشود، آنیون‌های سوپر اکسید واکنش داده، تولید رادیکال هیدروکسیل می‌کنند که بسیار سمّی و واکنش‌پذیر است (Shi *et al*., 2007). همچنین، NO می‌تواند به طور مستقیم با آنیون سوپر اکسید ترکیب شده و تولید رادیکال پراکسی‌نیتریت ($ONOO^-$) کند که سمّیت و خسارت‌های آن به سلول بسیار کمتر از رادیکال‌های اکسیژن است (Beligni and Lamattina, 2001). در این راستا، Sabra و همکاران (۲۰۱۲b) نیز در بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی سه گونه *E. angustifolia*، *E. pallida* و *E. purpurea* در غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم، افزایش فعالیت آنزیم SOD را تنها در گونه *E. purpurea* گزارش کردند.

در پژوهش حاضر، تیمار نیتریک اکسید در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار توانست با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و با دخالت در پاکسازی یون سوپر اکسید، تولید هیدروژن پراکسید درون سلولی را در شرایط تنش کاهش دهد و سبب افزایش فعالیت آنزیم POD شود. با این وجود، احتمال می‌رود NO برون‌زاد با تبدیل آنیون سوپر اکسید به هیدروژن پراکسید توسط آنزیم SOD، این آنیون را از سلول حذف کند و از سوی دیگر، با القای آنزیم پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، سمّیت هیدروژن پراکسید را کاهش دهد (Kopyra and Gwozdz, 2003). در توافق با این نتایج، بسیاری از پژوهش‌ها کارکرد NO را در کاهش تنش اکسیداتیو به القای فعالیت آنزیم‌های حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد نسبت داده‌اند (Uchida *et al*., 2002؛ Li *et al*., 2008؛ Zheng *et al*., 2009). روند معنی‌دار و معکوس فعالیت آنزیم CAT با افزایش سطوح شوری در این آزمایش، مشابه با نتایج Sabra و همکاران (۲۰۱۲b) بود که در بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهچه‌های *E. purpurea* به کاهش فعالیت آنزیم CAT و روند معکوس فعالیت آن نسبت به فعالیت سایر آنزیم ها در سطوح مختلف شوری دست یافتند. در بررسی فعالیت این آنزیم مشاهده شد که پیش تیمار سدیم نیترو پروساید به عنوان دهنده NO نتوانست فعالیت این آنزیم را مانند سایر آنزیم‌ها نسبت به آب خالص ($SNP_0$) افزایش دهد.

افزایش فعالیت آنزیم APX بذرها در بستر شور (Momeni *et al*., 2012) روند تقریباً مشابهی را با فعالیت آنزیم SOD و همچنین با نتایج Sabra و همکاران (۲۰۱۲b)، در بررسی اثر غلظت های مختلف نمک کلرید سدیم (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار) بر فعالیت آنزیمی سرخارگل داشت که با افزایش

غلظت نمک، افزایش فعالیت آنزیم APX را تأکید داشتند. SNP برون‌زاد فعالیت این آنزیم را نیز القا نمود که نتایج مشابه در ریشه کدو تحت تیمار شوری و ریشه لوبیا تحت تیمار کادمیوم (Kopyra and Gwozdz, 2003) و همچنین، در برگ گوجه‌فرنگی تحت تیمار خشکی (Nasibi *et al*., 2009) گزارش شده است.

## نتیجه‌گیری

به طور کلی، با توجه به نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت که سرخارگل در مرحله جوانه‌زنی به تنش شوری تحمل پایینی دارد. در کنار این موضوع، بهبود درصد نهایی جوانه‌زنی بذر سرخارگل در تنش شوری زیاد در اثر استفاده از تأثیر سدیم نیترو پروساید به عنوان دهنده NO می تواند بیانگر افزایش نسبی تحمل در این مرحله باشد. یافته‌های این آزمایش همچنین، نشان داد که آثار مثبت NO احتمالاً از راه اثر بر انباشت پروتئین، کاهش MDA و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه اعمال شده که در نهایت توانسته سبب محافظت ساختمان غشای سلولی، کاهش آثار نامطلوب تنش و تحمل بذرهای سرخارگل در مرحله جوانه‌زنی در شرایط بستر شور شود. با این حال، با استناد به یافته‌های به دست آمده از این پژوهش، می توان استفاده از SNP را به عنوان دهنده NO برای بهبود آثار منفی شوری در مرحله جوانه زنی سرخارگل پیشنهاد کرد.

## سپاسگزاری

نگارندگان از حمایت و مساعدت مالی دانشگاه گیلان و پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، به خاطر اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌نمایند.

## منابع

Amiri, M. B., Rezvani Moghaddam, P., Ehyai, H. R., Fallahi, J. and Aghhavani Shajari, M. (2010) Effect of osmotic and salinity stresses on germination and seedling growth indices of artichoke (*Cynara scoolymus*) and purple coneflower (*Echinacea purpurea*). Environmental Stresses in Crop Sciences 3: 165-176 (in Persian).

Aono, M., Saji, H., Fujiyama, K., Sugita, M., Kondo, N. and Tanaka, K. (1995) Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. Plant Physiology 107: 645-648.

Arasimowicz, M. and Floryszak-Wieczorek, J. (2007) Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. Plant Science 172: 876-887.

Bauer, R. and Wagner, H. (1991) *Echinacea* species as potential immunostimulating drugs. In: Economic and medicinal plant research (Eds. Wagner, H. and Farnsworth, N. R.) 253-321. Academic Press, New York.

Beligni, M. V. and Lamattina, L. (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. Plant, Cell and Environment 24: 267-278.

Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008) Nitric oxide in plants: production and cross-talk with $Ca^{2+}$ signalling. Molcular Plant 1: 218-228.

Bi, X. H. and Dai, X. W. (1993) Seed science. China Agriculture Press, Beijing.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Cakmak, I. and Marschner, H. (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiology 98: 1222-1227.

Cramer, G. R., Lauchli, A. and Polito, V. S. (1985) Displacement of $Ca^{2+}$ by $Na^{+}$ from the plasmalemma of root cells. Plant Physiology 79: 207-211.

Ellis, R. and Roberts, A. (1981) The qualification of ageing and survival in orthodox seeds. Seed Science and Technology 9: 373-409.

Farooq, M., Basra, S. M. A., Warraich, E. A. and Khaliq, A. (2006) Optimization of hydropriming techniques for rice seed invigoration. Seed Science and Technology 34: 529-534.

Grim, J. P. and Campbell, B. D. (1991) Growth rate, habitat productivity and plant strategy as predicators of stress responses. Academic Press, London.

Heath, L. R. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Hsu, Y. T. and Kao, C. H. (2004) Cd toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. Plant Growth Regulation 42: 227-238.

Kopyra, M. and Gwozdz, E. A. (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of Lupinus luteus. Plant Physiology and Biochemistry 41: 1011-1017.

Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M. P. (2005) Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Sciences 169: 323-330.

Lei, Y., Yin, C., Ren, J. and Li, C. (2007) Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. Biologia Plantarum 516: 386-390.

Li, Q. Y., Niu, H. B., Yin, J., Wang, M. B., Shao, H. B., Deng, D. Z., Chen, X. X., Ren, J. P. and Li, Y. C. (2008) Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 56: 220-225.

Misra, N. and Dwivedi, U. N. (2004) Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars. Plant Science 166: 1135-1142.

Mittova, V., Guy, M., Tal, M. and Volokita, M. (2004) Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. Journal of Experimental Botany 55: 1105-1113.

Momeni, N., Arvin, M. J., Khagoei nejad, G., Daneshmand, F. and Keramat, B. (2012) The effect of sodium chloride and salicylic acid on antioxidant defense system in maize (*Zea mays* L.). Journal of Plant Biology 14: 23-34 (in Persian).

Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V. and Aparicio-Tejo, P. (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. Planta 194: 346-352.

Mrozikiewicz, P. M., Bogacz, A., Karasiewicz, M., Mikolajcza, P. L., Ozarowski, k. M., Seremak-Mrozikiewicz, A., Czerny, B., Bobkiewicz-Kozlowska, T. and Grzeskowiak, E. (2010) The effect of standardized *Echinacea purpurea* extract on rat cytochrome P450 expression level. Phytomedicine 17: 830-833.

Nasibi, F., Manoochehri Kalantari, Kh. and Khodashenas, K. (2009) The effect of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on some biochemical parameters in tomato seedlings (*Lycopersicun esculentum*) under drought stress. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 16(2): 121-133 (in Persian).

Nickel, R. S. and Cunningham, B. A. (1969) Improved peroxidase assay method using Ieuco 2,3,6-trichlcroindophenol and application to comparative measurements of peroxidase catalysis. Analytical Biochemistry 27: 292-299.

Niu, G. and Rodriguez, D. S. (2006) Relative salt tolerance of five herbaceous perennials. HortScience 41: 1493-1497.

Noctor, G. and Foyer, C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 249-279.

Omidbaigi, R. (2002) Study of cultivation and adaptability of purple coneflower (*Echinaceae purpurea*) in the north of Tehran. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 6(2): 231-240 (in Persian).

Paranychianakis, N. and Chartzoulakis, K. (2005) Irrigation of Mediterranean crops with saline water: from physiology to management practices. Agriculture, Ecosystems and Environment 106: 171-187.

Parida, A. K. and Das, A. B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60: 324-349.

Rao, K. V. M. and Sresty, T. V. S. (2000) Antioxidant parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Science 157: 113-128.

Sabra, A., Adam, L., Daayf, F. and Renault, S. (2012a) Salinity-induced changes in caffeic acid derivatives, alkamides and ketones in three *Echinacea* species. Environmental and Experimental Botany 77: 234-241.

Sabra, A., Daayf, F. and Renault, S. (2012b) Differential physiological and biochemical responses of three *Echinacea* species to salinity stress. Scientia Horticulturae 135: 23-31.

Sharma, S. S. and Dietz, K. J. (2009) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. Trends in Plant Science 14: 43-50.

Shi, Q., Ding, F., Wang, X. and Wei, M. (2007) Exogenous nitric oxide protects cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 45: 542-550.

Stanisavijevic, I., Stojicevic, S., Velickovic, D., Veljkovic, V. and Lazic, M. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of *Echinacea* (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. Biotechnology and Bioengineering 17(3): 478-483.

Tanou, G., Molassiotis, A. and Diamantidis, G. (2009) Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. Environmental and Experimental Botany 65: 270-281.

Turkan, I. and Demiral, T. (2009) Recent developments in understanding salinity tolerance. Environmental and Experimental Botany 67: 2-9.

Uchida, A., Jagendorf, A. T., Hibino, T., Takabe, T. and Takabe, T. (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. Plant Science 163: 515-523.

Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218: 1-14.

Xu, Q., Xu, X., Zhao, Y., Jiao, K., Herbert, S. J. and Hao, L. (2008) Salicylic acid, hydrogen peroxide and calcium-induced saline tolerance associated with endogenous hydrogen peroxide homeostasis in naked oat seedlings. Plant Growth Regulation 54: 249-259.

Zheng, C., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., Liu, W., Jing, Qi. and Cao, W. (2009) Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. Environmental and Experimental Botany 67: 222-227.

Zollinger, N., Koenig, R., Cerny-Koenig, T. and Kjelgren, R. (2007) Relative salinity tolerance of intermountain western United States native herbaceous perennials. HortScience 42: 529-534.

# Effect of exogenous nitric oxide on germination and some of biochemical characteristics of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) in saline condition

**Samaneh Asadi-Sanam [1], Mohsen Zavareh [1]*, Hemmatollah Pirdashti [2], Mohammad Hossein Mirjalili [3] and Abuzar Hashempour [4]**

[1] Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2] Department of Agronomy, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
[3] Department of Agricultural Engineering, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[4] Department of Horticulture, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

## Abstract

To find out the role and effects of exogenous nitric oxide (NO) application in reducing oxidative damage induced by salinity stress in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) seed germination, a compeletly randomized design in factorial arrangment with three replications was conducted in Plant Physiology Laboratory of the Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University in 2012. The crop seeds were pre-soaked in 0.1 mM of sodium nitroprusside (SNP 0.1; as nitric oxide donor) solution as well as in distilled water (SNP 0; as control) for 20 hs just before the onset of the experiment. Then, pre-treated seeds were subjected to different levels of salinity (0, 50, 75, 100, 125, 150 mM NaCl solution) to germinate. Results showed that the SNP0.1 treatment in saline conditions had significant effect on germination percentage. Different levels of salinity significantly reduced germination rate, germination vigor and index. Pretreated with exogenous NO increased the activity of SOD, POD and APX as compared with SNP0. Accordingly, the highest activity of SOD (116.3 μM $g^{-1}$ FW), POD (1.7 μM $g^{-1}$ FW. min.) and APX (50.1 μM $g^{-1}$ FW. min.) was related to the 125, 50 and 125 Mm NaCl, respectively. Significant and adverse effects of NO were seen on CAT activity. Exogenous NO, as an antioxidant, also reduced peroxidation of membrane lipids (MDA) and delayed the oxidation of proteins. Overall, it could be concluded that sodium nitroprusside as NO donor could improve coneflower seed germination characteristics in saline condition and increase salinity tolerance by means of scavenging of free ROS radicals.

**Key words:** Antioxidant enzymes, Protein, Sodium nitroprusside, Malondialdehyde

* Corresponding Author: mzavareh@guilan.ac.ir