

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 پردشتی^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 زیست‌فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۹۱ اجرا شد. تیمارهای آزمایشی، شامل دو سطح پیش‌تیمار بذری (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 پیش‌تیمار 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 بر گرم بافت تازه) در غلظت ۱۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم و برای پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز (به ترتیب: ۱/۷ و ۵۰/۱ میکرومول بر گرم 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، پراکسیده شدن لیپیدهای غشا را کاهش داد، 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 بذور سرخارگل در شرایط شور و افزایش نسبی تحمل در این مرحله شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین، سدیم نیترو پروساید، مالون دی‌آلدهید

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 گل‌ستاره (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. purpurea* و *E. pallida*، *E. angustifolia* 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 (CaCl₂) 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 ROS، می‌تواند اختلال در متابولیسم سلول از طریق پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، اکسیداسیون پروتئین‌ها،

واکنش با ROSها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، نقش مهمی در محافظت گیاهان از تنش‌های اکسیداتیو داشته باشد (Arasimowicz and Li *et al.*, 2008؛ Floryszak-Wieczorek, 2007؛ 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 گیاهچه‌های 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 نیتروژن 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 (Besson-Bard *et al.*, 2004؛ Misra and Dwivedi, 2004). با توجه به اهمیت درک پاسخ‌های 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.

بازدارندگی فعالیت آنزیم‌ها و خسارت به نوکلئیک اسیدها را به دنبال داشته باشد (Turkan and Demiral, 2009). ترکیب آلدئیدی ناشی از پراکسیده شدن لیپیدهای غشا، با اندازه‌گیری مالون دی آلدئید (MDA) سنجش و برآورد شده است (Xu *et al.*, 2008). خسارت اکسیداتیو به پروتئین‌ها شامل تغییرات آمینو اسیدها در جایگاه‌های ویژه، قطعه‌قطعه 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 حذف‌کننده 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 رهاکننده نیتریک اکسید (NO) است که نقش آن در گیاهان به عنوان ترکیبی مهم در پژوهش‌ها مورد توجه است (Arasimowicz and Beligni and Lamattina, 2001؛ 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 پاسخ‌های سازشی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارد (Besson-Bard *et al.*, 2008). گزارش شده که NO می‌تواند با

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 جوانه‌زنی، 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 پارافیلیم برای حفظ رطوبت پوشانده شدند و در دمای 26 ± 1 درجه سانتیگراد برای ۱۲ روز در ژرمیناتور قرار گرفتند. بذرهای جوانه‌زده از روز دوم در ۱۲ روز متوالی (هر دو روز در میان) در ساعتی معین شمارش شدند. معیار جوانه‌زنی خروج ریشه‌چه به اندازه دو میلی‌متر بود.

در پایان جوانه‌زنی، برای محاسبه درصد نهایی جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، بنيه (قدرت) جوانه‌زنی و شاخص جوانه‌زنی از رابطه‌های زیر استفاده شد (Ellis and Roberts, 1981؛ Bi and Dai, 1993):
رابطه ۱:

درصد نهایی جوانه‌زنی = تعداد کل بذرهاى جوانه‌زده /
تعداد کل بذرهاى آزمایش شده $\times 100$

رابطه ۲:

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

رابطه ۳:

بنیه جوانه‌زنی = تعداد بذرهاى جوانه‌زده در روز چهارم
/ تعداد کل بذرهاى آزمایش شده $\times 100$

برای محاسبه شاخص جوانه‌زنی از رابطه ۴ استفاده شد:

$$\sum_{i=1}^{j=t} Gi/t \quad \text{رابطه ۴}$$

که در آن Gi تعداد بذر جوانه‌زده در روز t 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 8°C - درجه سانتیگراد نگهداری شد تا میزان پراکسید 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 آلدئید به عنوان محصول پراکسیده شدن اسیدهای چرب غشاها با روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری 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 سانتی‌فیوژ (مدل 5417R، شرکت Ependorf، آلمان) با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد سانتی‌فیوژ شد. سپس، به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۵ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد TCA حاوی ۰/۵ درصد تیوباریتوریک اسید (TBA) افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد شد. سپس، نمونه‌ها مجدداً در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتی‌فیوژ شدند. ماده قرمز رنگ مالون دی آلدئید-تیوباریتوریک 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 رنگیزه‌های اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. تعیین غلظت مالون دی آلدئید از ضریب خاموشی معادل $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1} \times 155$ ، بر حسب نانومول بر گرم بافت تازه بر اساس رابطه ۵ محاسبه شد.

$$\text{رابطه ۵: } [(A532-A600)/155] \times 100$$

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 میلی‌لیتر 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 سانتی‌فیوژ شد. سپس، محلول رویی برای بررسی فعالیت آنزیم‌های 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) اندازه‌گیری 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. کووت‌های حاوی مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در حالی که به آرامی تکان داده می‌شدند در معرض نور فلورسانس قرار گرفتند، سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر ثبت شد. برای سنجش فعالیت این آنزیم علاوه بر کووت‌های 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 می‌شود. 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

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 معنی دار بودن تفاوت‌ها در نظر گرفته شد. نمودارها، با نرم‌افزار SigmaPlot نسخه ۱۲ رسم شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهم‌کنش تیمارهای شوری \times پیش‌تیمار 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 پیش‌تیمار با نیتریک اکسید (سدیم نیتروپروساید ۰/۱ میلی‌مولار) در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار است (جدول ۲). نتایج برش‌دهی با تیمارهای شوری هم‌نشان 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 پیش‌تیمار با آب خالص در شرایط عدم شور (تیمار شاهد) مربوط است (شکل ۱). پیش‌تیمار بذرها سرخارگل با نیتریک اکسید (سدیم نیتروپروساید ۰/۱ میلی‌مولار) توانست تنها در غلظت‌های بالاتر شوری

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 به جای 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

(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 میلی مولار 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 **=به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

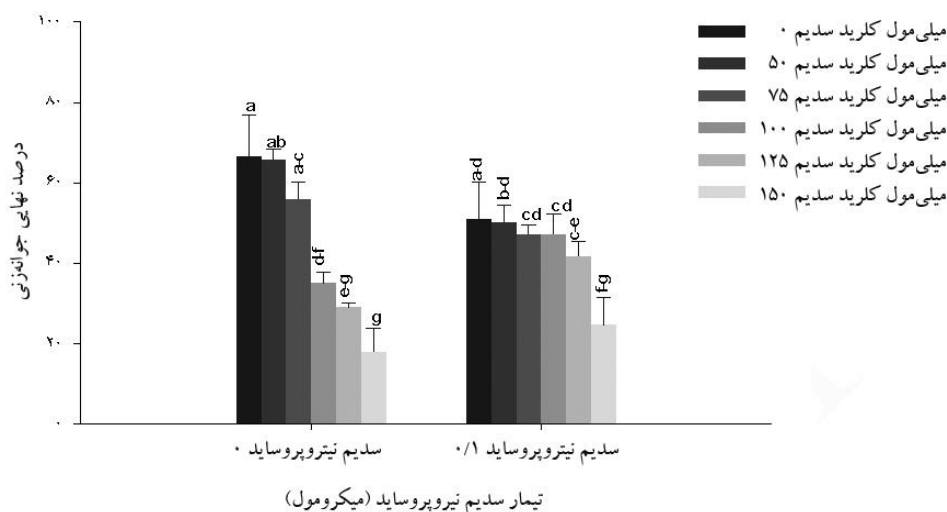
میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
شاخص جوانه‌زنی	بنیه جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	درصد نهایی جوانه‌زنی		
۱۲/۱ ^{ns}	۱۷۳/۴ ^{ns}	۵۶/۲ ^{ns}	۱۸/۸ ^{ns}	۱	پیش تیمار
۱۳۰/۱ ^{**}	۱۳۸۸/۸ ^{**}	۶۰۰/۹ ^{**}	۱۲۶۶/۶ ^{**}	۵	شوری
۱۰/۸ ^{ns}	۸۶/۹ ^{ns}	۳۳/۴ ^{ns}	۲۶۷/۵ [*]	۵	پیش تیمار × شوری
۷/۸	۱۰۸/۲	۳۰/۳	۹۰/۶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

جدول ۲- برش دهی برهم کنش تیمارهای شوری × پیش تیمار با استفاده از پیش تیمار روی درصد نهایی جوانه‌زنی

سطح معنی‌دار	درجه آزادی	تیمار
</۰۰۰۱	۵	پیش تیمار با آب خالص
۰/۰۲۲	۵	پیش تیمار با نیتریک اکسید (SNP 0.1)

جدول ۳- برش دهی برهم کنش تیمارهای شوری × پیش تیمار با استفاده از شوری. FGP: درصد نهایی جوانه‌زنی، MDA: مالون دی آلدئید، PRO: پروتئین، SOD: آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، POD: آنزیم پراکسیداز، CAT: آنزیم کاتالاز، APX: آنزیم آسکوربات پراکسیداز

سطح معنی‌دار							درجه آزادی	تیمارهای شوری (میلی مولار)
APX	CAT	POD	SOD	PRT	MDA	FGP		
</۰۰۰۱	۰/۰۰۶	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	۰/۰۴۶	۱	۰
</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	۰/۰۶۰	۱	۵۰
۰/۲۰۵	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	۰/۰۵۲	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	۰/۲۷۶	۱	۷۵
۰/۰۳۵	۰/۱۴۷	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	۰/۱۲۶	۱	۱۰۰
</۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	۰/۱۱۶	۱	۱۲۵
</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	</۰۰۰۱	۰/۴۴۸	۱	۱۵۰



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

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.

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 جوانه‌زنی (۱۷/۲)

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

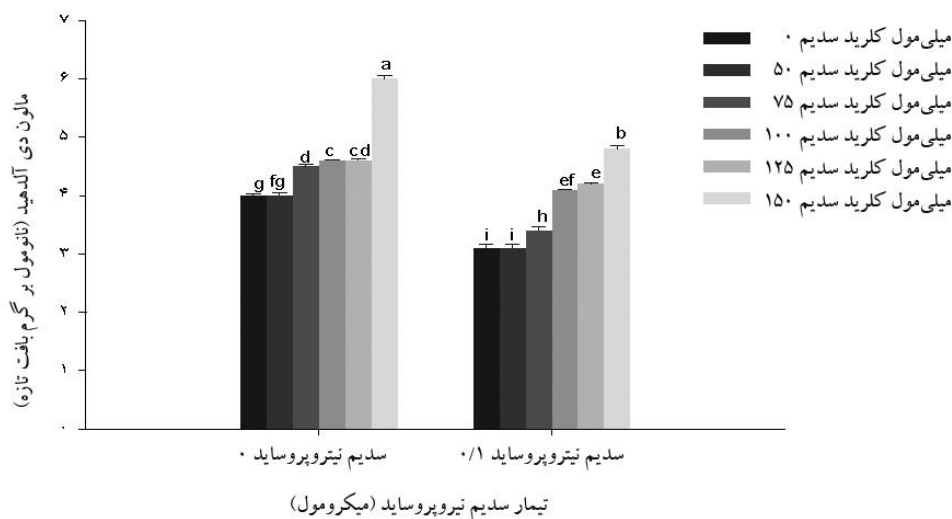
ویژگی‌های جوانه‌زنی	تیمار شوری			
	شاخص جوانه‌زنی	بنیه جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	
			(میلی مول کلرید سدیم)	
	۱۷/۲ \pm ۲/۲۴ ^a	۵۳/۷ \pm ۶/۹۵ ^a	۳۴/۲ \pm ۴/۶۱ ^a	۰
	۱۳/۳ \pm ۰/۸۸ ^b	۴۲/۸ \pm ۳/۰۱ ^{ab}	۲۴/۳ \pm ۲/۲۲ ^b	۵۰
	۱۲/۳ \pm ۱/۰۲ ^{bc}	۳۷/۵ \pm ۴/۶۸ ^{bc}	۱۹/۲ \pm ۰/۹۸ ^{bc}	۷۵
	۹/۲ \pm ۱/۰۲ ^{cd}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

در شکل ۳ مشاهده می‌شود که در سطوح مختلف تنش شوری، مقدار پروتئین بذور سرخارگل به طور چشمگیری کاهش یافته است. کمترین میزان پروتئین (۸/۲ میلی گرم بر گرم بافت تازه) در شوری ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم به دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم شوری) برابر با ۲۲/۵ میلی گرم بر گرم پروتئین در بافت تازه، ۵۷ درصد کاهش داشت. استفاده از نیتریک اکسید در تمامی بسترهای شور، سبب افزایش معنی دار محتوای پروتئین برگ‌ها شد (جدول ۵ و شکل ۳) نتایج برش دهی با استفاده از تیمارهای شوری نشان داد که مقدار پروتئین در تمام غلظت‌های شور و در بین شیوه‌های پیش تیمار بسیار معنی دار 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 میلی مولار محلول کلرید سدیم نسبت به پیش تیمار با آب خالص بود (شکل ۳).

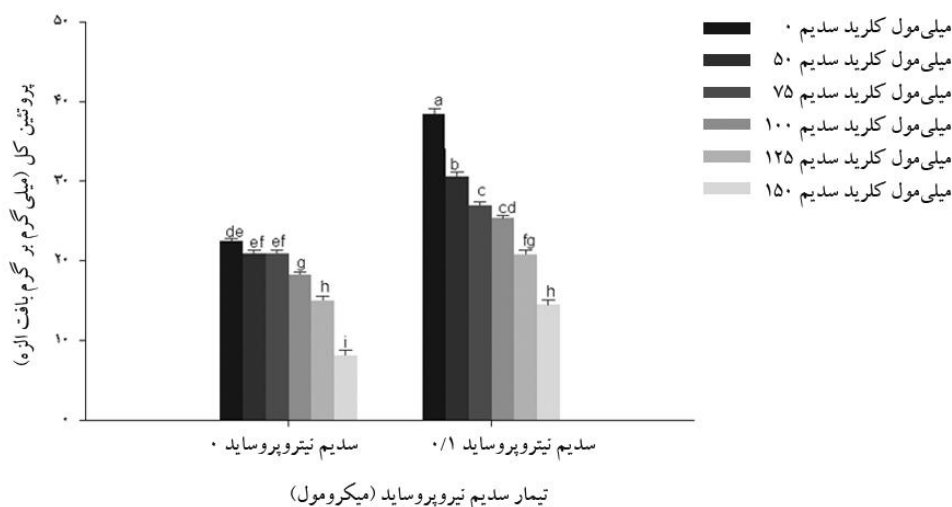
با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها، برهمکنش تیمارهای شوری و پیش تیمار بذرها سبب افزایش معنی دار محتوای MDA به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا در بذور سرخارگل شده است (جدول ۵). برش دهی این برهم کنش با استفاده از شوری نشان داد که میزان MDA در همه بسترهای شور در سطح احتمال یک درصد معنی دار شده است (جدول ۳). میانگین‌های به دست آمده از داده‌های برهم کنش 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 میلی مولار کلرید سدیم بود (شکل ۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های برهم کنش، پیش تیمار 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 پیش تیمار بذور با سدیم نیترو پروساید در سطح شوری زیاد (۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم) بود (شکل ۲).

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های بیوشیمیایی مورد مطالعه. ns = عدم تفاوت معنی دار، * و ** = به ترتیب معنی دار 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.

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییر
APX	CAT	POD	SOD	PRO	MDA		
۴۹۹/۵**	۱/۳۴**	۱/۰۵**	۵۷۹/۲**	۶۹۸/۷**	۶/۷۶**	۱	پیش تیمار
۴۴۲/۲**	۱۴/۵**	۱/۰۵**	۴۷۸/۱**	۲۴۰/۹**	۳/۳۷**	۵	شوری
۴۸/۸**	۰/۴۵**	۰/۰۸**	۱۱۹/۲**	۲۱/۵**	۰/۲۴**	۵	پیش تیمار × شوری
۰/۷۶۹	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۸	۰/۸۱	۱/۸۴	۰/۰۰۶	۲۴	خطای آزمایش
۳/۱	۲/۲	۱/۴	۱/۲	۳/۷	۲	-	ضریب پراکندگی



شکل ۲- اثر برهم کنش سدیم نیترو پروساید و شوری بر تغییرات مالون دی آلدئید بذر سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون LSD است.



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

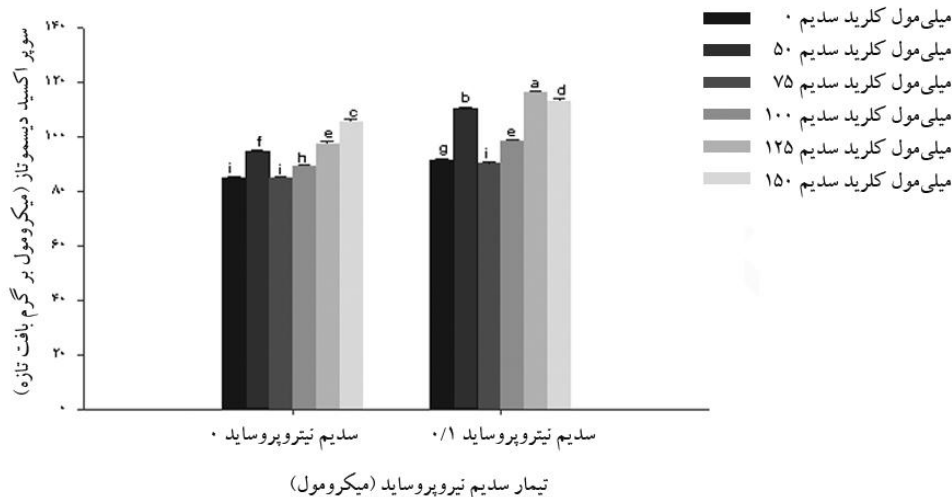
میلی مولار افزایش یافت (شکل ۴). آماده سازی بذور با سدیم نیترو پروساید (SNP ۰/۱ میلی مولار) در شرایط شور و نتایج برهم کنش آنها، افزایش فعالیت آنزیم SOD را نسبت به تیمار آب خالص نشان داد (شکل ۴). نتایج برش دهی به وسیله شوری بیانگر این است که فعالیت این

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 میلی مولار، فعالیت این آنزیم نسبت به شرایط عدم شوری (شاهد) به جز در غلظت ۷۵

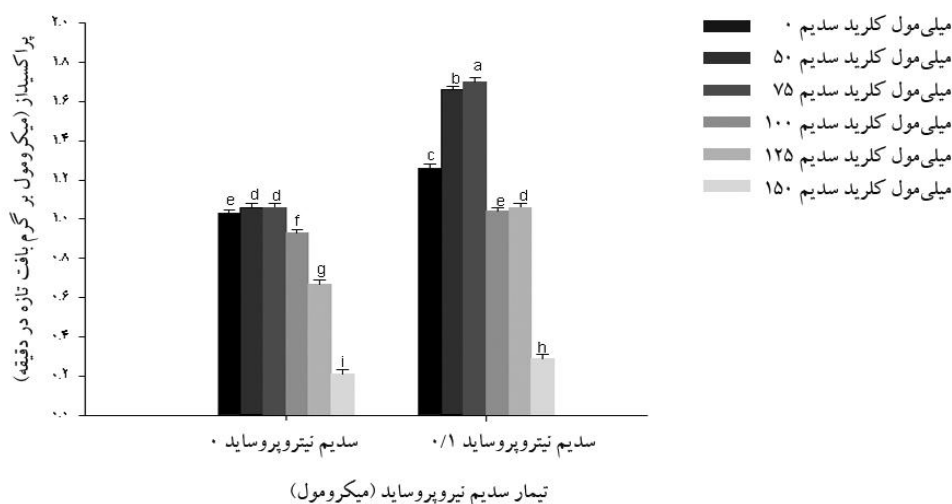
معنی داری وجود دارد (جدول ۳). روند میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت شوری در بستر بذور سرخارگل، فعالیت آنزیم POD تا غلظت ۷۵ میلی‌مولار کلرید سدیم افزایش یافت و پس از آن روند کاهش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد (بستر غیر شور) دیده شد به طوری که کمترین فعالیت این آنزیم در بیشترین غلظت نمک کلرید سدیم (۱۵۰ میلی‌مولار) ثبت شد (شکل ۵). همچنین، NO اضافی (SNP ۰/۱ میلی‌مولار) در محیط شور موجب افزایش میزان فعالیت این آنزیم در مقایسه با پیش‌ تیمار با آب خالص شده است به طوری که بیشینه میزان فعالیت این آنزیم (۱/۷ میکرومول بر گرم بافت تازه در غلظت ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با شرایط عدم شور ۱/۲ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه) به دست آمد (شکل ۵).

آنزیم در تمام سطوح شوری به غیر از غلظت ۷۵ میلی‌مولار نمک (با سطح احتمال پنج درصد) بسیار معنی دار بوده است (جدول ۳). پس از ثبت بیشترین فعالیت این آنزیم (۱۱۶/۳ میکرومول بر گرم بافت تازه) در غلظت ۱۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم، فعالیت بالایی (۱۱۰/۳ میکرومول بر گرم بافت تازه) در غلظت ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به دست آمد که در مقایسه با شرایط عدم شور (شاهد) به ترتیب ۲۷/۵ درصد و ۲۰/۹ درصد افزایش داشت (شکل ۴).

بر اساس نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس، برهمکنش پیش‌ تیمار NO در غلظت‌های مختلف تیمار شوری بر فعالیت آنزیم POD بسیار معنی دار بود (جدول ۵). برش‌دهی این اثر با غلظت‌های مختلف شوری گویای این است که در هر دو شیوه پیش‌ تیمار، از نظر فعالیت این آنزیم اختلاف بسیار



شکل ۴- اثر برهم‌کنش سدیم تیروپروساید و شوری بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بذر سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون LSD است.

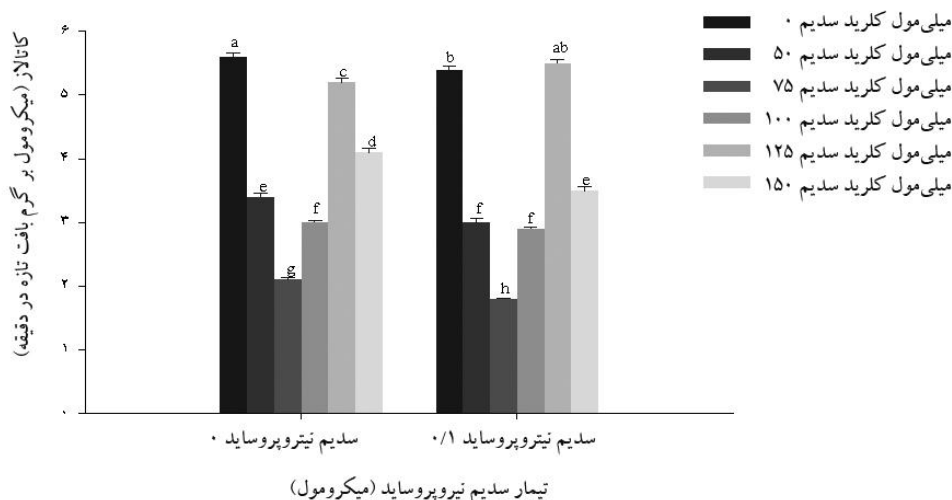


شکل ۵- اثر برهم کنش سدیم نیتروپروساید و شوری بر فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در بذر سرخارگل. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون LSD است.

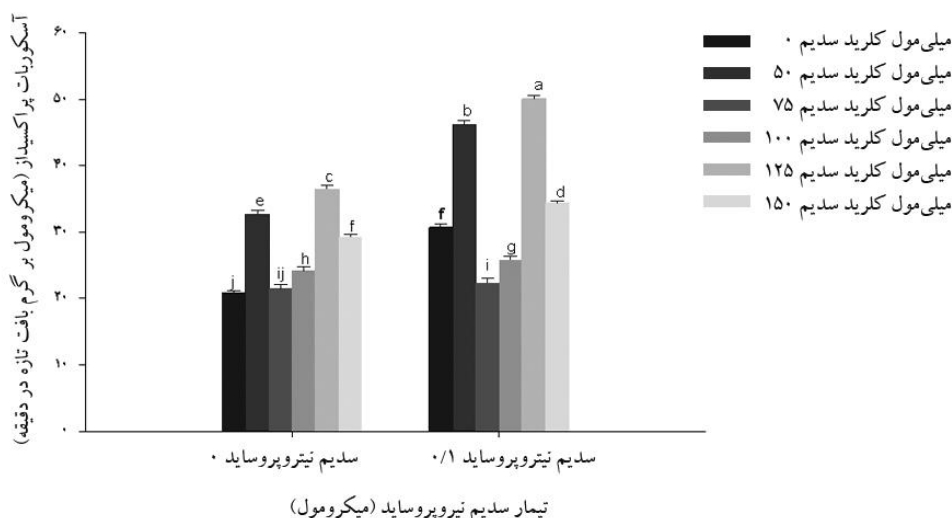
آنزیم CAT وجود دارد (جدول ۳).

همچنین در این آزمایش، تنش شوری موجب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم APX شده است (جدول ۵ و شکل ۷). علاوه بر افزایش فعالیت آنزیم APX در بستر شور بذرها، کاربرد SNP برون زاد نیز فعالیت این آنزیم را القا نمود (شکل ۷)؛ برش دهی برهم کنش‌ها به وسیله شوری نشان داد (جدول ۳) که در تمامی غلظت‌های نمک به جز غلظت ۷۵ میلی مولار، دو شیوه پیش تیمار بذرها به ایجاد اختلاف معنی دار در فعالیت آنزیم APX منجر شده است که در غلظت ۱۰۰ میلی مولار با سطح احتمال پنج درصد و در سایر غلظت‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی دار بوده است (جدول ۳). بر اساس روند مقایسه میانگین داده‌ها، فعالیت آنزیم APX به بیشترین مقدار خود (۵۰/۱ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه) در غلظت ۱۲۵ میلی مولار تیمارهای شوری رسید.

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم CAT در سطوح مختلف نمک کلرید سدیم روند معنی دار و معکوسی را نشان داد به طوری که با افزایش غلظت نمک، فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد (صفر میلی مولار نمک) کاهش یافت (جدول ۵ و شکل ۶). در این آزمایش در بررسی برهم کنش غلظت‌های مختلف شوری با شیوه‌های پیش تیمار بذرها، مشاهده شد که پیش تیمار NO برون زاد در بستر شور بذرها، نتوانست به غیر از غلظت ۱۲۵ میلی مولار (افزایش اندک این آنزیم نسبت به تیمار شاهد)، فعالیت آنزیم CAT را به مانند سایر آنزیم‌ها نسبت به پیش تیمار با آب خالص افزایش دهد (شکل ۶). برش دهی به وسیله شوری نشان داد که به جز غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک (عدم معنی دار شدن فعالیت آنزیم) در دیگر غلظت‌های بستر شور در بین پیش تیمار بذرها اختلاف بسیار معنی دار از نظر فعالیت



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



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

باشد. در گزارش‌ها بیان شده است که پیش‌تیمار نیتریک اکسید خارجی از یک سو با افزایش فعالیت دو آنزیم آلفا آمیلاز و بتا آمیلاز و در نتیجه تبدیل آسان‌تر نشاسته به قند و از سوی دیگر، از راه تأثیر بر سیستم

بحث

در پژوهش حاضر، افزایش درصد جوانه‌زنی بذور سرخارگل با پیش‌تیمار NO در سطوح بالاتر شوری می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر مثبت NO در شوری زیاد

شوری باشد. این طور به نظر می‌رسد که نقش NO در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها، مربوط به توانایی NO در واکنش با رادیکال‌های آلكوكسیل (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; Laspinas 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 پروتئین‌ها، اکسیداسیون آمینو اسیدها به گروه‌های کربونیل، افزایش نیترات، آمونیوم و آمینو اسیدهای آزاد، کاهش فعالیت آنزیم‌های 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 آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از شوری و القای سنتز برخی آنزیم‌ها مانند آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدانی و کاهش اثر سمی 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 شاخص‌های جوانه‌زنی، رشد و زیست توده گیاهیچه تأکید شده است. Zheng و همکاران (۲۰۰۹) نیز در مطالعه خود در بررسی تأثیر پیش تیمار NO بر بهبود جوانه‌زنی بذور گندم در شرایط شور به نتایج مشابهی دست یافتند.

کاهش بنیه و شاخص جوانه‌زنی بذور سرخارگل در شوری زیاد ممکن است از دو راه کاهش درصد سبز گیاهیچه‌ها و در نتیجه کاهش تراکم بوته به کمتر از حد معمول و همچنین کاهش سرعت رشد گیاهیچه‌ها بر عملکرد و بازده گیاه اثر بگذارد. به علاوه، رشد گیاهیچه‌ها در محیط‌های شور تحت تأثیر آثار سمیت نمک و خشکی فیزیولوژیک قرار می‌گیرند 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 در نتیجه کاهش معنی‌دار محتوای MDA بذرها، احتمالاً ناشی از کاهش خسارت اکسیداتیو و سالم تر ماندن غشاها در نتیجه سیستم‌های آنتی‌اکسیدان با کارایی بیشتر در بذور تیمار شده با NO در شرایط

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، سمیت 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 آنزیم‌ها در سطوح مختلف شوری دست یافتند. در بررسی فعالیت این آنزیم مشاهده شد که پیش‌تیمار سدیم نیترو پروساید به عنوان دهنده NO نتوانست فعالیت این آنزیم را مانند سایر آنزیم‌ها نسبت به آب خالص (SNP₀) 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 غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم (صفر، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار) بر فعالیت آنزیمی سرخارگل داشت که با افزایش

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 سمی و واکنش‌پذیر است (Shi *et al.*, 2007). همچنین، NO می‌تواند به طور مستقیم با آنیون سوپر اکسید ترکیب شده و تولید رادیکال پراکسی نیتريت (ONOO⁻) کند که سمیت 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

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 بذرهاى سرخارگل در مرحله جوانه‌زنی در شرایط بستر شور شود. با این حال، با استناد به یافته‌های به دست آمده از این پژوهش، می‌توان استفاده از SNP را به عنوان دهنده NO برای بهبود آثار منفی شوری در مرحله جوانه‌زنی سرخارگل پیشنهاد کرد.

سپاسگزاری

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

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 می‌توان 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 می‌تواند 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،

منابع

- Amiri, M. B., Rezvani Moghaddam, P., Ehyai, H. R., Fallahi, J. and Aghhavan Shajari, M. (2010) Effect of osmotic and salinity stresses on germination and seedling growth indices of artichoke (*Cynara scolymus*) 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 Ca²⁺ signalling. *Molecular 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 predictors 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-ormatxe, 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-Kozłowska, 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 (*Lycopersicon 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-trichloroindophenol 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 (*Echinacea 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-Sanam¹, Mohsen Zavareh^{1*}, Hemmatollah Pirdashti²,
Mohammad Hossein Mirjalili³ and Abuzar Hashempour⁴

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 completely randomized design in factorial arrangement 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 $\mu\text{M g}^{-1}$ FW), POD (1.7 $\mu\text{M g}^{-1}$ FW. min.) and APX (50.1 $\mu\text{M g}^{-1}$ 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