تأثیر پیش‌تیمار بذر با نیترات پتاسیم بر شاخص‌های قدرت گیاهچه در بذرهای فرسوده ماریتیغال (*Silybum marianum*)

علی عبادی، قاسم پرمون* و سدابه جهانبخش

اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۱

چکیده

به‌منظور بررسی اثر پیش‌تیمار بذر بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌های حاصل از بذرهای فرسوده ماریتیغال، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۲ اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل پیش‌تیمار با نیترات پتاسیم در غلظت‌های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر و فرسودگی بذر با قرار دادن آنها در رطوبت نسبی ۹۵-۹۰ درصد در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۰، ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت بود. نتایج نشان داد، در طی فرسودگی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاهش پیدا کرد (۵۰٪ سوپراکسید دیسموتاز، ۴۷٪ کاتالاز، ۴۱٪ پراکسیداز، ۳۹٪ آسکوربات پراکسیداز ۳۸٪، گلوتاتیون پراکسیداز و ۵۵٪ گلوتاتیون ردوکتاز) و پیش‌تیمار بذر موجب افزایش فعالیت آنزیمی شد. در بین غلظت‌های مختلف نیترات پتاسیم، کاربرد ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر، در اغلب صفات اندازه‌گیری شده بالاترین مقدار را نشان داد. نتایج معادلات رگرسیونی برای پیش‌بینی شاخص‌های طولی و وزنی قدرت نشان داد، در بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (R^2=۰/۳۱۳) و پراکسیداز (R^2=۰/۲۷۶) بالاترین سهم در پیش‌بینی شاخص طولی قدرت و فعالیت پراکسیداز (R^2=۰/۳۰۶) و گلوتاتیون ردوکتاز (R^2=۰/۳۰۵) نیز بیشترین سهم در پیش‌بینی شاخص وزنی قدرت را نشان دادند. نتایج تحلیل مسیر نشان داد، فعالیت پراکسیداز دارای تأثیر مستقیم و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز دارای تأثیر غیرمستقیم بر شاخص طولی قدرت و سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز تأثیر مستقیم بر شاخص وزنی قدرت بودند. به طور کلی با توجه به نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (به‌ویژه پراکسیداز و گلوتاتیون پراکسیدار و ردوکتاز) در قدرت بذر می‌توان نتیجه گرفت که نیترات پتاسیم با بهبود این آنزیم‌ها و فرسودگی با کاهش فعالیت آنها سبب تغییر قدرت بذر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، قدرت بذر، نیترات پتاسیم، رگرسیون، ماریتیغال.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۶۰۲۶۰۲۵۶ ، پست الکترونیکی: ghasem.parmoon@gmail.com

مقدمه

گیاهان دارویی مخازن اساسی بسیاری از ترکیبات و مواد دارویی می‌باشند که این ترکیبات علاوه بر عوامل ژنتیکی تحت تأثیر عوامل محیطی نیز قرار می‌گیرند. ماریتیغال (*Silybum marianum*) گیاه دارویی و مدیترانه‌ای است که از ترکیبات دانه آن می‌توان به سلیمارین، فلانویدها، اسید چرب و ترکیبات پلی‌فنولی اشاره کرد (۲۷). از این گیاه برای درمان ناراحتی‌های کبدی، چربی خون، دیابت و سرطان استفاده می‌شود (۲۹). استقرار محصولات به جوانه‌زنی یکنواخت بذرها و توانایی بذرها در جوانه‌زنی به شرایط محدود محیطی بستگی دارد. قدرت بذر به برخی از ویژگی‌های مرتبط با میزان سبز کردن در مزرعه و تولید گیاهچه و ذخیره-

سازی بذر اشاره می‌کند (۱۴). طبق تعریف اتحادیه بین‌المللی تجزیه بذر، به مجموعه ویژگی‌های بذر که میزان، سطح فعالیت و کارکرد بذر یا توده بذری را در خلال جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه تعیین می‌کند، قدرت بذر گفته می‌شود (۲۶). پیش‌تیمار، یک تیمار قبل از کاشت است که در آن بذرها به‌صورت کنترل شده، آب جذب می‌کنند تا فرایندهای متابولیکی پیش از جوانه-زنی در بذرها تا قبل از خروج ریشه‌چه انجام شود (۵). در طی پیش‌تیمار بذر فرایندهایی ازجمله نگهداری و انتقال مواد، فعال‌سازی و سنتز تعدادی از آنزیم‌ها و نوکلئیک اسیدها، ترمیم و بازسازی، سنتز ATP و ترمیم غشای سیتوپلاسمی رخ می‌دهد (۱۶). نیترات پتاسیم از ترکیبات اسمزی است که در پیش‌تیمار بذر استفاده می‌شود و باعث بهبود جوانه‌زنی، رشد گیاهچه، شاخص بنیه گیاهچه و همچنین باعث افزایش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، دهیدروژناز و کاتالاز تحت تنش‌های محیطی می‌شود (۹). عدالت پیشه و همکاران (۱۳۸۸) گزارش کردند که نیترات پتاسیم با غلظت کم، باعث بهبود جوانه‌زنی، رشد گیاهچه و شاخص بنیه گیاهچه ذرت شد.

فرسودگی از مهمترین عوامل ایجاد تنش‌های اکسیداتیو است که در کاهش قدرت بذر نقش مهمی دارد. فرسودگی موجب تخریب ساختارهای DNA و RNA ریبوزمی، افزایش فعالیت آنزیمی، تنفس و نفوذ پذیری غشاهای سلولی می‌شود (۲۳). مطالعات متعددی در جهت کاهش تأثیرات فرسودگی انجام شده است، Hsu و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی، تأثیر فرسودگی و پرایمینگ بر پراکسیداسیون چربی‌ها در کدوی تلخ گزارش کردند که فرسودگی در جنین و لپه‌ها موجب افزایش پراکسیداز کل و کاهش پروتئین‌های محلول، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان شده و پیش‌تیمار و خیساندن بذرها در آب گرم سبب بهبود فعالیت آنزیم-ها و افزایش میزان پروتئین محلول شد. طبق نظر این محققان، پرایمینگ و خیساندن باعث بهبود کیفیت بذر می‌شود. علت این امر به حداقل رساندن و کاهش پراکسیداسیون ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد و تنظیم فعالیت پراکسیداز می‌باشد. Chen و Sung (۲۰۰۱) نیز معتقدند که تغییر در مجموع پراکسیداسیون در بذرهای پیش‌تیمار شده، ناشی از تغییر در فعالیت رادیکال‌های آزاد و مهار آنزیم پراکسیداسیون می‌باشد. Goel و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه تغییرات آنزیمی تنش‌های اکسیداتیو در طی فرسودگی چند رقم پنبه نشان دادند که نگهداری بذرهای پنبه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز، سبب کاهش جوانه-زنی دانه پنبه به میزان ۴۵٪ می‌شود. فرسودگی میزان نشت یون‌ها، فعالیت پراکسیداز کل و مالون دی آلدهید را در هر دو رقم افزایش داد و سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد. پیش‌تیمار بذرها با آب مقطر و آسکوربات با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر به مدت ۱۲ ساعت سبب کاهش تأثیرات فرسودگی گردید، به‌طوری‌که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش و میزان مالون دی الدهید و پراکسیداز کل کاهش یافت. Kibinza و همکاران (۲۰۱۱) نیز در مطالعه خود نشان دادند که در طی فرسودگی، جوانه-زنی دانه آفتابگردان کاهش پیدا کرده و پیش‌تیمار بذرها با آمینو ۱، ۲ و ۴ تیرازول (3-amino-l, 2,4-triazol) سبب بهبود جوانه‌زنی می‌شود. آنان نشان دادند که در طی فرسودگی میزان هیدروژن پراکسید افزایش پیدا می‌کند که عمدتاً ناشی از افزایش مقدار آنها در پراکسی زوم می‌شود. نتایج این محققان نشان داد که در طی فرسودگی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌ویژه کاتالاز کاهش پیدا می‌کند. با توجه به اینکه بذرهای ماریتیغال حاوی روغن زیادی بوده و قوه نامیه کمی دارد؛ ولی با وجود این بذر آن می‌تواند تا ۹ سال در خاک باقی بماند و قوه نامیه خود را حفظ کند (۳۰)، این مطالعه به‌منظور بررسی تغییرات در فعالیت آنزیم‌های آنتی-

اکسیدان گیاهچه و تعیین سهم هریک از آنزیم‌ها بر شاخص قدرت بذر ماریتیغال اجرا شد.

مواد و روشها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۲ اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل پیش‌تیمار بذر با نیترات پتاسیم در غلظت‌های ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر و فرسودگی بذر در ۴ سطح فرسوده نشده (شاهد)، ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت فرسودگی بود. در این پژوهش شاخص طولی و وزنی قدرت، فعالیت آنزیم-های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در مرحله گیاهچه ای در ۱۴ روز بعد از جوانه‌زنی اندازه‌گیری شد. در این آزمایش، برای اعمال فرسودگی، بذرها در درون یک ظرف دارای محیط اشباع از بخار آب (رطوبت نسبی ۹۰ تا ۹۵ درصد) و در درون آون در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت قرار داده شدند (مدت زمان فرسودگی بر اساس پیش آزمایش تعیین شد). برای اعمال پیش‌تیمار نیز بعد از تهیه محلول‌ها با غلظت‌های مشخص، بذرها در درون ۲ لایه کاغذ صافی قرار داده شد تا محلول به آنها اضافه شود. این کار برای جلوگیری از هیدراته شدن بذرها در محلول-های فاقد اکسیژن انجام شد. بعد از گذشت ۱۲ ساعت و پایان پیش‌تیمار، بذرها با آب مقطر شستشو داده شده و در محیط آزمایشگاه برای بازگشت به رطوبت اولیه (خشک شدن تا رطوبت ۱۴ تا ۱۶٪) نگهداری شدند. برای محاسبه شاخص‌های قدرت بذر در ابتدا ۲۵ عدد بذر را در داخل ظروف پتری در درون ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و در ادامه به‌طور روزانه روند جوانه‌زنی آنها بر اساس خروج ریشه‌چه ۲ میلی‌متری محاسبه و بعد از پایان دوره جوانه‌زنی نهایی محاسبه و به صورت درصد اعلام شد. برای تعیین وزن خشک نمونه‌ها از آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. شاخص‌های وزنی و طولی قدرت گیاهچه، مطابق روش Abdul-Baki و Anderson (۱۹۷۳) اندازه‌گیری و محاسبه شد.

شاخص وزنی قدرت = وزن خشک گیاهچه × قابلیت جوانه‌زنی

شاخص طولی قدرت = طول گیاهچه × قابلیت جوانه زنی

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از گیاهچه‌ها بعد از ۱۴ روز رشد انجام شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش Stewart و Bewley (۱۹۸۰) اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۱ گرم بافت گیاهی در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار حاوی آب اکسیژنه ۱۰ میلی مولار و ۰/۱ میلی مولار EDTA مخلوط شد. عصاره حاصل با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس ۱/۸ میلی‌لیتر از بافر استخراج را با ۱۰۰ میکرو لیتر از مخلوط NBT (۷۵×۱۰^{-۶} مولار) و متیونین (۰/۰۱۲ مولار)، ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول ریبوفلاونین ($۱۰^{-۶}$ مولار)، ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول Na_2CO_3 (۰/۰۵ مولار) مخلوط و بعد ۵۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده شده و در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد.

برای استخراج عصاره پروتئینی و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، ۰/۲ گرم از بافت گیاهی را در ۱ میلی‌لیتر محلول تریس ۰/۰۵ مولار با pH= ۷/۵ له کرده و بعد به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد و پس از آن محلول روشناور برای اندازه‌گیری فعالیت آنزم‌ها استفاده شد (۳۳).

اندازه‌گیری میزان فعالیت کاتالاز در طول موج ۲۴۰ نانومتر و پراکسیداز در طول موج ۴۲۵ نانومتر با استفاده از روش Karo و Mishra (۱۹۷۶) انجام شد. برای اندازه‌گیری فعالیت سینتیکی آنزیم آسکوربات پراکسیداز، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با ۷ = pH و ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳٪ حجم در حجم و ۰/۲ میلی‌لیتر آسکوربات ۵ میکرو لیتر مخلوط کرده و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آنها افزوده و منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر یادداشت شد (۲۴).

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۲۵ گرم از پودر گیاهی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج تریس ۰/۰۵ مولار مخلوط و بعد ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵ میلی-مولار با pH= ۷/۸ و ۱۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسیداز ۳/۴۱ مولار و ۳ میکرولیتر محلول گایاکول ۲۰۰ میلی-مولار را باهم مخلوط کرده و ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی به آنها افزوده و جذب محلول در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز ۰/۲۵ گرم نمونه گیاهی را در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار حاوی ۱ نرمال سدیم کلرید ۱٪ PVP و آسکوربات ۱ میلی‌مولار با ۷ =pH له کرده و بعد به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در ادامه ۰/۱ میلی‌مولار از عصاره آنزیمی را در ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش که شامل تریس ۵۰ میلی‌مولار pH = ۷/۶ ، $MgCl_2$ ۵ میلی‌مولار، GSSG ۰/۵ میلی-مولار و NADPH ، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط کرده و قرائت در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام شد (۱۱). میزان پروتئین نمونه‌ها نیز به روش Bradford (۱۹۷۶) در طول ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد انجام گردید. برای تجزیه رگرسیونی از نرم افزار SPSS و تحلیل مسیر از SPSS و نرم افزار Amos استفاده شد.

نتایج

درصد جوانه‌زنی: نتایج نشان داد، درصد جوانه‌زنی تحت تأثیر اثرات اصلی فرسودگی قرار گرفت ولی اثرات اصلی نیترات پتاسیم و اثرات متقابل نیترات پتاسیم در فرسودگی بر درصد جوانه‌زنی تأثیرگذار نبود (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		درصد جوانه‌زنی	طول گیاهچه	وزن خشک گیاهچه	شاخص طولی قدرت	شاخص وزنی قدرت
پیش‌تیمار	۴	۰/۲۳۹ ns	۰/۱۵۹ ns	۰/۱۳۱**	۴/۱۸ ns	۰/۰۰۸۸*
فرسودگی	۳	۰/۹۳۳**	۰/۶۱۵**	۰/۳۴۹**	۶۷/۰۰**	۰/۰۵۵**
اثرات متقابل	۱۲	۰/۵۶۲ ns	۰/۱۵۳ ns	۰/۰۴۰ ns	۱۱/۱۲ ns	۰/۰۰۶۸ ns
خطا	۴۰	۰/۴۵۸	۰/۱۳۹	۰/۰۲۲	۴/۵۰	۰/۰۰۲۳
ضریب تغییرات	-	۸/۸۸	۱۴/۵۳	۸/۳۷	۱۶/۰۹	۱۴/۱۹

Ns،*،**: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

فرسودگی موجب کاهش درصد جوانه‌زنی شد. بالاترین درصد جوانه‌زنی (۶۸٪) از بذرهای شاهد (فرسوده نشده) و کمترین درصد جوانه‌زنی (۴۹٪) نیز از بذرهای فرسوده شده به مدت ۱۴۴ ساعت به دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی صفات فیزیولوژیک طی تیمارهای مختلف

تیمار		درصد جوانه‌زنی	طول گیاهچه	وزن خشک گیاهچه	شاخص طولی قدرت	شاخص وزنی قدرت
تیمار	سطح	درصد	سانتی‌متر	میلی‌گرم	-	-
نیترات پتاسیم (میلی‌گرم بر لیتر)	۰	۵۶/۳۳±۴/۲۵^{a}	۶/۱۶±۰/۴۴^{a}	۳/۱۷±۰/۳۰^{bc}	۱۷۲/۵۹ ±۱۸/۶^{a}	۰/۱۳۰ ±۰/۰۱^{ab}
	۱۵	۵۹/۳۳±۳/۸۴^{a}	۷/۲۱±۰/۸۳^{a}	۳/۴۲±۰/۲۰^{ab}	۱۹۶/۴۷ ±۲۶/۸^{a}	۰/۱۳۹ ±۰/۰۲^{a}
	۳۰	۶۲/۰۰±۴/۱۹^{a}	۷/۷۱±۰/۸۵^{a}	۳/۷۴±۰/۲۶^{a}	۲۰۹/۹۴ ±۳۶/۱^{a}	۰/۱۴۱ ±۰/۰۱^{a}
	۴۵	۵۷/۶۷±۳/۵۷^{a}	۶/۲۶±۰/۵۸^{a}	۲/۹۵±۰/۱۶^{c}	۱۷۲/۲۸ ±۲۳/۸^{a}	۰/۱۰۷ ±۰/۰۱^{bc}
	۶۰	۵۸/۶۷±۳/۷۰^{a}	۶/۵۶±۰/۵۶^{a}	۲/۷۸±۰/۲۰^{c}	۱۶۳/۱۹ ±۱۵/۸^{a}	۰/۰۹۲ ±۰/۰۱^{c}
فرسودگی (ساعت)	۰	۶۸/۰۰±۳/۶۶^{a}	۷/۹۷±۰/۶۷^{a}	۳/۷۸±۰/۲۲a	۲۵۳/۱۶ ±۲۸/۴^{a}	۰/۱۷۴ ±۰/۰۱^{a}
	۴۸	۶۴/۲۷±۱/۹۷^{a}	۷/۲۰±۰/۵۱^{ab}	۳/۵۳±۰/۲۰a	۲۱۱/۴۶ ±۱۶/۱^{a}	۰/۱۳۹ ±۰/۰۱^{b}
	۹۶	۵۳/۰۷±۲/۵۱^{b}	۵/۵۶±۰/۶۵^{bc}	۲/۵۹±۰/۱۶b	۱۳۱/۹۸ ±۱۲/۹^{b}	۰/۰۸۶ ±۰/۰۱^{c}
	۱۴۴	۴۹/۸۷±۳/۰۷^{b}	۶/۳۹±۰/۳۸^{c}	۲/۹۴±۰/۱۶b	۱۳۴/۹۹ ±۹/۸^{b}	۰/۰۸۷ ±۰/۰۱^{c}

در این جدول حروف مختلف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

رشد گیاهچه: اثرات اصلی پیش‌تیمار در سطح ۵ درصد بر وزن خشک گیاهچه معنی‌دار بود ولی بر طول گیاهچه تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد، پیش‌تیمار موجب بهبود وزن خشک گیاهچه‌ها گردید. بالاترین وزن خشک گیاهچه با میانگین ۳/۷۴ میلی‌گرم از غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین وزن خشک گیاهچه (۲/۷۸ میلی‌گرم بر لیتر) نیز از مصرف ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد (جدول ۲). فرسودگی نیز در سطح ۱ درصد بر طول و وزن خشک گیاهچه‌های ماریتیغال تأثیرگذار بود (جدول ۱). فرسودگی موجب کاهش طول و وزن خشک گیاهچه‌ها شد. در شدیدترین سطح فرسودگی طول گیاهچه‌ها ۲۰٪ و وزن خشک گیاهچه‌ها ۲۲٪ کاهش نشان داد (جدول ۲).

شاخص‌های قدرت: نتایج نشان داد، اثر اصلی پیش-تیمار در سطح ۵ درصد بر شاخص وزنی قدرت دارای اختلاف معنی‌دار بود، در حالی‌که بر شاخص طولی قدرت اثر معنی‌دار نداشت (جدول ۱). بر اساس مقایسه میانگین مربوط به شاخص وزنی، قدرت پیش-تیمار موجب افزایش شاخص وزنی قدرت شد. بیشترین شاخص وزنی قدرت در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نیترات پتاسیم مشاهده شد، این در حالی است که غلظت‌های ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر بر میزان شاخص وزنی تأثیر منفی داشت (جدول ۲). فرسودگی شاخص طولی و وزنی قدرت را تحت تأثیر قرار داد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فرسودگی سبب کاهش شاخص‌های قدرت شد. فرسودگی به مدت ۴۸ ساعت موجب کاهش ۱۷٪ شاخص طولی و ۲۱٪ شاخص وزنی قدرت شده و با افزایش مدت زمان فرسودگی به ۱۴۴ ساعت شاخص طولی قدرت ۴۶٪ و شاخص وزنی قدرت ۵۰٪ کاهش یافت (جدول ۲).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح ۱ درصد تحت تأثیر اثرات اصلی پیش‌تیمار و فرسودگی قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	گلوتاتیون پراکسیداز	گلوتاتیون ردوکتاز
پیش‌تیمار	۴	۰/۰۰۴۱۴**	۰/۱۶۳**	۰/۲۳۲**	۰/۰۸۱*	۰/۰۰۰۹*	۰/۰۰۱۴*
فرسودگی	۳	۰/۰۰۴۱۹**	۰/۳۴۹**	۰/۷۴۵**	۰/۲۴۳**	۰/۰۰۱۵*	۰/۰۰۱۸*
اثرات متقابل	۱۲	۰/۰۰۰۱۰ ns	۰/۰۴۰ ns	۰/۰۱۸ ns	۰/۰۳۸ ns	۰/۰۰۰۱۴ ns	۰/۰۰۰۰۷ ns
خطا	۴۰	۰/۰۰۰۲۲	۰/۰۰۷۹	۰/۰۱۵	۰/۰۲۸	۰/۰۰۰۵۲	۰/۰۰۰۷۶
ضریب تغییرات	-	۱۳/۹۸	۷/۴۵	۶/۳۸	۱۵/۸۸	۲۳/۳	۳۰/۵

Ns،*،**: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

مقایسه میانگین اثرات اصلی نشان داد که فعالیت این آنزیم در طی فرسودگی کاهش یافته و پیش‌تیمار بهبود فعالیت این آنزیم را سبب شد. بیشترین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (۰/۰۱۹ تغییرات جذب در میلی-گرم پروتئین بر دقیقه) در طی پیش‌تیمار بذر با نیترات پتاسیم از غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین فعالیت آن (۰/۰۰۸ تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه) از غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد (جدول ۴). فرسودگی سبب کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شد، به‌طوری که در فرسودگی ملایم (۴۸ ساعت) فعالیت آنزیم از ۰/۰۱۶ به ۰/۰۱۴ تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه کاهش پیدا کرد و با رسیدن فرسودگی به بالاترین مقدار خود، فعالیت آنزیم به ۰/۰۰۸ تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه کاهش یافت (جدول ۴). پیش‌تیمارها بر فعالیت کاتالاز و پراکسیداز اثر معنی‌دار داشتند (جدول ۳). فعالیت این دو آنزیم در طی پیش‌تیمار افزایش پیدا کرد. بیشترین فعالیت کاتالاز (۱/۸۹ تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه) از غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر نیترات پتاسیم مشاهده شد و بیشترین فعالیت پراکسیداز (۴/۵۴ تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه) از غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر این ماده به دست آمد. فرسودگی فعالیت کاتالاز و پراکسیداز را کاهش داد (α=٪۱). بیشترین فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در بذرهای فرسوده نشده مشاهده شد و با رسیدن مدت زمان فرسودگی به ۱۴۴ ساعت فعالیت کاتالاز ۴۶٪ و پراکسیداز ۴۱٪ کاهش یافت (جدول ۴).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر پیش‌تیمار کاهش یافت (α=٪۱، جدول ۳). به‌طوری که بیشترین و کمترین فعالیت این آنزیم (به ترتیب ۱/۵۱ و ۰/۹۸ تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه) در بذرهای پیش‌تیمار شده با آب مقطر و غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (جدول ۴). فرسودگی نیز موجب تغییر معنی‌دار در فعالیت آسکوربات پراکسیداز شد (α=٪۱ و جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش مدت زمان فرسودگی فعالیت آسکوربات پراکسیداز کاهش یافت، به‌طوری‌که در بذرهای فرسوده نشده (شاهد) فعالیت آنزیم ۱/۴۱ تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه بود و با تشدید فرسودگی به ۱۴۴ ساعت فعالیت آنزیم به ۰/۸۵ تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه کاهش یافت (جدول ۴).

فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز تحت تأثیر پیش‌تیمار و فرسودگی قرار گرفت (α=٪۵). پیش‌تیمار موجب افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز شد. غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر نیترات پتاسیم فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز را از ۰/۰۰۹ به ۰/۰۱۳ و فعالیت گلوتاتیون

ردوکتاز را از ۰/۰۰۶ به ۰/۰۱۰ افزایش داد. همچنین نتایج نشان داد که افزایش مدت زمان فرسودگی، فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز را کاهش داد. تشدید فرسودگی به ۱۴۴ ساعت موجب کاهش فعالیت به میزان ۳۸٪ در فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و ۵۵٪ در فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز شد (جدول ۴).

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده طی تیمارهای مختلف

تیمار		سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز	گلوتاتیون پراکسیداز	گلوتاتیون ردوکتاز
تیمار	سطح	تغییرات جذب در میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه				واحد بین‌المللی (U) بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه	
نیترات پتاسیم (میلی‌گرم بر لیتر)	۰	۰/۰۱۴ ±۰/۰۰۱۵^{b}	۱/۱۴ ±۰/۰۹^{d}	۳/۱۸± ۰/۲۳^{c}	۱/۵۱±۰/۲۲^{a}	۰/۰۰۹±۰/۰۰۱۴^{b}	۰/۰۰۶±۰/۰۰۱۴^{ab}
	۱۵	۰/۰۱۰ ±۰/۰۰۱۰^{c}	۱/۸۹ ±۰/۱۸^{a}	۴/۲۶±۰/۳۶^{a}	۱/۱۹±۰/۱۲^{b}	۰/۰۱۱±۰/۰۰۱۴^{ab}	۰/۰۰۷±۰/۰۰۱۱^{ab}
	۳۰	/۰۱۹ ±۰/۰۰۲۰^{a}	۱/۶۱ ±۰/۱۵^{b}	۴/۵۴±۰/۳۱^{a}	۰/۹۸±۰/۰۹^{b}	۰/۰۱۳±۰/۰۰۱۸^{a}	۰/۰۱۰±۰/۰۰۱۳^{a}
	۴۵	۰/۰۰۹ ±۰/۰۰۱۱^{c}	۱/۲۷ ±۰/۱^{cd}	۳/۷۹±۰/۲۲^{b}	۱/۲۱±۰/۰۸^{ab}	۰/۰۱۰±۰/۰۰۰۶^{ab}	۰/۰۰۶±۰/۰۰۱۱^{b}
	۶۰	۰/۰۰۸ ±۰/۰۰۰۹^{c}	۱/۴۴ ±۰/۱^{bc}	۳/۵۲±۰/۲۲^{bc}	۱/۰۸±۰/۰۸^{b}	۰/۰۰۸±۰/۰۰۰۴^{b}	۰/۰۰۵±۰/۰۰۰۹^{b}
فرسودگی (ساعت)	۰	۰/۰۱۶±۰/۰۰۱۷^{a}	۱/۹۴ ±۰/۱۷^{a}	۵/۰۳±۰/۲۷^{a}	۱/۴۱±۰/۱۲^{a}	۰/۰۱۳±۰/۰۰۱۵^{a}	۰/۰۰۹±۰/۰۰۱۵^{a}
	۴۸	۰/۰۱۴±۰/۰۰۱۵^{b}	۱/۵۸ ±۰/۰۷^{b}	۴/۰۱±۰/۱۵^{b}	۱/۴۲±۰/۱۵^{a}	۰/۰۱۱±۰/۰۰۱۱^{ab}	۰/۰۰۸±۰/۰۰۱۰^{ab}
	۹۶	۰/۰۱۱±۰/۰۰۱۲c	۱/۳۲ ±۰/۰۶^{c}	۳/۴۲±۰/۱۰^{c}	۱/۰۹±۰/۰۶^{b}	۰/۰۰۸±۰/۰۰۱۰^{b}	۰/۰۰۶±۰/۰۰۰۶^{b}
	۱۴۴	۰/۰۰۸±۰/۰۰۰۸^{d}	۱/۰۴ ±۰/۰۶^{d}	۲/۹۶±۰/۱۶^{d}	۰/۸۵±۰/۰۷^{b}	۰/۰۰۸±۰/۰۰۱^{b}	۰/۰۰۴±۰/۰۰۰۷^{b}

در این جدول حروف مختلف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

همبستگی: نتایج همبستگی شاخص‌های قدرت با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان داد بین شاخص طولی و وزنی قدرت همبستگی مثبت (r^2= ۰/۸۵۶) وجود دارد که این نشان دهنده تغییرات هم‌جهت این آنزیم‌ها در طی تیمارهای اعمال شده می‌باشد. فعالیت آنزیم با شاخص طولی و وزنی قدرت همبستگی معنی-دار داشت. همبستگی فعالیت این آنزیم‌ها با شاخص طولی و وزنی قدرت، مثبت بود. در بین آنزیم‌ها فعالیت پراکسیداز (r^2=۰/۵۵۳) و گلوتاتیون ردوکتاز (r^2=۰/۵۰۱) بالاترین همبستگی را با شاخص وزنی قدرت و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (r^2=۰/۴۲۴) و پراکسیداز (r^2=۰/۵۲۶) بالاترین همبستگی را با شاخص طولی قدرت داشتند. فعالیت آنزیم کاتالاز (r^2=۰/۷۸۲) و گلوتاتیون پراکسیداز (r^2=۰/۵۰۰) بالاترین همبستگی را با فعالیت پراکسیداز داشتند، همچنین گلوتاتیون پراکسیداز (r^2=۰/۶۰۳) بالاترین همبستگی را با فعالیت سوپراکسید دیسموتاز از خود نشان داد (جدول ۵). همچنین بین درصد جوانه‌زنی، طول گیاهچه و وزن خشک گیاهچه و شاخص‌های قدرت و بین فعالیت آنزیم‌ها و درصد جوانه‌زنی، طول گیاهچه و وزن خشک گیاهچه نیز همبستگی مثبت معنی‌داری وجود داشت. در بین آنزیم‌های آنتی اکسیدان، فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز بالاترین همبستگی (r^2=۰/۳۸۳) با درصد جوانه‌زنی و فعالیت کاتالاز بالاترین همبستگی با طول گیاهچه (r^2=۰/۳۳۳) و گلوتاتیون ردوکتاز بالاترین همبستگی (r^2=۰/۴۱۴) را با وزن خشک گیاهچه داشت (جدول ۵).

جدول ۵- نتایج همبستگی صفات اندازه‌گیری شده

	درصد جوانه‌زنی	طول گیاهچه	وزن خشک گیاهچه	شاخص وزنی قدرت	شاخص طولی قدرت	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	گلوتاتیون پراکسیداز	گلوتاتیون ردوکتاز
درصد جوانه‌زنی	۱										
طول گیاهچه	۰/۴۴۴*	۱									
وزن خشک گیاهچه	۰/۴۲۶**	۰/۵۹۲**	۱								
شاخص وزنی قدرت	۰/۷۷۱**	۰/۶۱۷**	۰/۸۱۶**	۱							
شاخص طولی قدرت	۰/۷۵۷**	۰/۸۴۹**	۰/۶۶۴**	۰/۸۷۳**	۱						
سوپراکسید دیسموتاز	۰/۳۳۳**	۰/۲۲۷	۰/۳۳۴**	۰/۴۹۹**	۰/۴۲۴**	۱					
پراکسیداز	۰/۲۷۳**	۰/۲۸۱*	۰/۳۳۱**	۰/۵۵۳**	۰/۵۲۶**	۰/۵۴۰**	۱				
کاتالاز	۰/۳۵۸*	۰/۳۳۳**	۰/۳۸۹**	۰/۴۳۱**	۰/۴۰۱**	۰/۳۷۳**	۰/۷۸۲**	۱			
آسکوربات پراکسیداز	۰/۳۳۸**	۰/۰۶۵	۰/۴۰۲**	۰/۴۷۲**	۰/۳۰۱*	۰/۱۷۱	۰/۳۰۱*	۰/۲۴۶	۱		
گلوتاتیون پراکسیداز	۰/۱۹۴	۰/۲۷۳*	۰/۲۹۳*	۰/۳۹۹**	۰/۴۲۲**	۰/۶۰۳**	۰/۵۰۰**	۰/۴۶۳**	۰/۱۳۱	۱	
گلوتاتیون ردوکتاز	۰/۳۸۳**	۰/۲۵۵*	۰/۴۱۴**	۰/۵۰۱**	۰/۴۱۲**	۰/۱۴۴	۰/۴۷۳**	۰/۳۷۲**	۰/۳۰۷*	۰/۲۵۳	۱

**و *: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد

معادله رگرسیونی: نتایج معادلات رگرسیونی برای پیش‌بینی شاخص‌های طولی و وزنی قدرت نشان داد که در بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (R^2 = ۰/۳۱۳) و پراکسیداز (R^2 = ۰/۲۷۶) بیشترین سهم در پیش‌بینی شاخص طولی قدرت و فعالیت پراکسیداز (R^2 = ۰/۳۰۶) و گلوتاتیون ردوکتاز (R^2 = ۰/۳۰۵) نیز بیشترین سهم را در پیش‌بینی شاخص وزنی قدرت نشان دادند. همچنین نتایج نشان داد، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز با تغییرات شاخص طولی قدرت از نوع خطی بود. این در حالی است که بین فعالیت کاتالاز با شاخص طولی یک رابطه درجه سوم و بین گلوتاتیون پراکسیداز و شاخص طولی رابطه درجه ۲ برقرار بود (جدول ۶).

جدول ۶- مدل‌های رگرسیونی پیش‌بینی شاخص قدرت در طی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهچه

صفات مستقل	صفات وابسته	همبستگی	ضرایب رگرسیونی معادله				مدل
Y	X	R square	b_0	b_1	b_2	b_3	Model
شاخص طولی قدرت	SOD	۰/۱۸۰	۱۰۹/۰	۶۱۲۸	....ns	....ns	$Y = b_0+b_1X$
	CAT	۰/۲۵۱	۶۲۶/۷	-۹۸۳/۲	۶۱۹/۷	-۱۱۱/۹	$Y = b_0+b_1X+b_2X^2+b_3X^3$
	POX	۰/۲۷۶	۱۶/۶۰	۴۳/۱۱	....ns	....ns	$Y = b_0+b_1X$
	APX	۰/۰۹۱	۱۱۸/۹	۵۳/۶۴	....ns	....ns	$Y = b_0+b_1X$
	GPX	۰/۳۱۳	۲۰۱/۳	-۹۹۵۳	۶۷۵۹۶	....ns	$Y = b_0+b_1X+b_2X^2+b_3X^3$
	GR	۰/۱۷۰	۱۲۵/۵	۸۴۰۹	....ns	....ns	$Y = b_0+b_1X$
شاخص وزنی قدرت	SOD	۰/۲۴۹	۰/۰۶۵۲	۴/۶۶۸	....ns	....ns	$Y = b_0+b_1X$
	CAT	۰/۳۰۲	۰/۴۸۰	-۰/۷۶۱	۰/۴۶۴۲	-۰/۰۸۱۶	$Y = b_0+b_1X+b_2X^2+b_3X^3$
	POX	۰/۳۰۶	۰/۰۰۸۰	۰/۰۲۹۱	....ns	....ns	$Y = b_0+b_1X$
	APX	۰/۲۲۳	۰/۰۵۶۵	۰/۰۵۴۵	....ns	....ns	$Y = b_0+b_1X\ X^3$
	GPX	۰/۲۲۹	۰/۱۱۵۱	-۳/۴۶۰	۳۱۵/۸	....ns	$Y = b_0+b_1X+b_2X^2$
	GR	۰/۳۰۵	۰/۱۰۷۹	-۴/۵۶۷	۶۹۸/۷	....ns	$Y = b_0+b_1X+b_2X^2$

SOD= سوپراکسید دیسموتاز، CAT= کاتالاز، POX= پراکسیداز، APX= آسکوربات پراکسیداز، GPX= گلوتاتیون پراکسیداز، GR= گلوتاتیون ردوکتاز.

شاخص وزنی قدرت با تغییرات فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز از نوع خطی و با کاتالاز از نوع درجه سوم بود.

تحلیل مسیر: نتایج تحلیل مسیر نشان داد در بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فعالیت پراکسیداز تأثیر مستقیم معنی‌داری بر شاخص طولی قدرت داشت؛ به‌طوری که تغییر یک واحد در فعالیت این آنزیم سبب تغییر ۰/۵۲۰ واحد در شاخص طولی قدرت به طور مستقیم می‌شد. این در حالی است که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز دارای تأثیر غیرمستقیم بودند. در بین آنزیم‌ها، کاتالاز دارای بیشترین تأثیر غیرمستقیم بود، به‌طوری که تغییر یک واحد در فعالیت این آنزیم سبب تغییر ۰/۳۱۶ واحدی در میزان شاخص طولی قدرت شد. همچنین نتایج نشان داد، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز دارای تأثیر مستقیم و پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز دارای تأثیر غیرمستقیم بر شاخص وزنی قدرت بودند که می‌تواند تأثیر این آنزیم از طریق

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز باشد. در بین اثرات مستقیم، بیشترین تأثیر را فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نشان داد، به‌طوری که تغییر یک واحد در فعالیت این آنزیم سبب تغییر ۰/۳۹۵ واحد در شاخص وزنی قدرت شد. در بین تأثیرات غیرمستقیم نیز پراکسیداز بیشترین تأثیر را نشان داد (جدول ۷).

جدول ۷- نتایج تحلیل مسیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بر شاخص طولی و وزنی قدرت

	شاخص طولی قدرت			شاخص وزنی قدرت		
	اثر مستقیم	غیرمستقیم	کل اثر	اثر مستقیم	غیرمستقیم	کل اثر
سوپراکسید دیسموتاز	–	۰/۱۵۱	۰/۱۵۱	۰/۳۹۵	۰/۰۰	۰/۳۹۵
پراکسیداز	۰/۵۲۰	۰/۰۰	۰/۵۲۰	۰/۰۰	۰/۴۱۸	۰/۴۱۸
کاتالاز	–	۰/۳۱۶	۰/۳۱۶	–	–	–
آسکوربات پراکسیداز	–	–	–	۰/۲۹۴	۰/۰۰	۰/۲۹۴
گلوتاتیون پراکسیداز	–	۰/۲۱۶	۰/۲۱۶	۰/۰۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۰
گلوتاتیون ردوکتاز	۰/۰۰	۰/۱۹۶	۰/۱۹۶	۰/۳۵۲	۰/۰۹۰	۰/۴۴۲

بحث

بر اساس نتایج این پژوهش فرسودگی موجب کاهش درصد جوانه‌زنی، طول و وزن خشک گیاهچه‌ها و شاخص‌های قدرت شد (جدول ۱). این نتایج با یافته های Goel و همکاران (۲۰۰۳) و Hsu و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد. در طی فرسودگی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و هیدروژن پراکسید افزایش یافته که این عامل موجب تخریب ساختارهای DNA و RNA ریبوزمی، افزایش فعالیت آنزیمی، تنفس و نفوذپذیری غشاهای سلولی می‌شود (۲۳). افزایش تولید رادیکال آزاد موجب عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شده، که موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به غشا می‌شود. آسیب غشا باعث افزایش نفوذپذیری غشا سلولی آن و موجب از بین رفتن نفوذپذیری انتخابی غشا شده که موجب تغییر ساختار و ویژگی‌های سلول‌ها شده که در نهایت در کاهش قدرت بذر و متناسب با آن درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند. با توجه به نتایج همبستگی مشاهده می‌شود که بین شاخص‌های قدرت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همبستگی مثبت وجود دارد که نشان دهنده تغییرات هم‌جهت آنها با یکدیگر می‌باشد. فرسودگی موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد (جدول ۱). افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و هیدروژن پراکسید در سیتوپلاسم سلول‌ها در طی فرسودگی باعث کاهش فعالیت RNA اکسیداز شده که خود موجب کاهش بیان ژن‌های مربوط به فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شده که این عامل نقش مهمی در کاهش فعالیت آنها محسوب دارد. همچنین فرسودگی موجب کاهش پیوستگی پروتئین‌ها و افزایش حساسیت پروتئین‌ها به آنزیم‌های تجزیه کننده شده که در نهایت منجر به کاهش قوه‌نامیه، رشد گیاهچه‌ها و قدرت بذر می‌شود (۶ و ۲۱).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان اولین عامل دفاعی در برابر تنش‌های اکسیداتیو عمل کرده و سبب واکنش رادیکال‌های آزاد و تبدیل آن به هیدروژن پراکسید شده؛ و از این طریق سبب کاهش تأثیرات مخرب رادیکال‌های آزاد می‌شود که در ادامه فعالیت دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز سبب حذف هیدروژن پراکسید از سلول می‌شود. با توجه به نتایج تحلیل مسیر مشاهده می‌شود که بیشترین تأثیر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

بر شاخص وزنی قدرت به‌صورت مستقیم و بر شاخص طولی به‌صورت غیرمستقیم است. همچنین نتایج همبستگی نشان داد، این آنزیم همبستگی بالایی با فعالیت پراکسیداز و گلوتاتیون پراکسیداز دارد. با توجه به اینکه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز موجب تبدیل رادیکال آزاد به هیدروژن پراکسید می‌شود قادر به خنثی کردن کامل تأثیرات تنش نبوده و هیدروژن پراکسیدهای تولیدی نیز بر شاخص‌های قدرت تأثیرگذار بوده و تأثیرات غیرمستقیم این آنزیم بر شاخص‌های قدرت می‌تواند به این علت باشد. همچنین همبستگی بالای این آنزیم با پراکسیداز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌تواند نشان دهنده این باشد که این آنزیم‌ها دارای نقش مهمی در حذف هیدروژن پراکسیدهای تولید شده توسط هیدروژن پراکسیداز می‌باشد. پراکسیداز به‌عنوان یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تجزیه هیدروژن پراکسید دارای نقش مهمی می‌باشد. این آنزیم بالاترین همبستگی را با شاخص‌های قدرت دارد، همچنین نتایج پیش بینی شاخص‌های قدرت نشان داد که پراکسیداز به همراه گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز بالاترین سهم را در پیش‌بینی شاخص طولی و وزنی قدرت دارد. فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند از طریق تأثیر بر رشد گیاهچه موجب تأثیر بر قدرت بذر شود. نتایج مطالعات قبلی نشان داده که فعالیت آنزیم پراکسیداز در واکوئل و دیواره سلولی افزایش یافته که این عامل سبب چوبی شدن این قسمت‌ها شده و از این طریق موجب محافظت سلول در طی تنش می‌شود (۱۲). پراکسیداز با محافظت از واکوئل سلولی در حفظ فشار تورگر می‌تواند در رشد سلول نقش داشته باشد و از این طریق در توان رشد گیاهچه‌ها یا همان شاخص طولی قدرت نقش داشته باشد. همچنین آنزیم پراکسیداز موجب چوبی شدن دیواره سلولی شده و از این طریق باعث افزایش نسبت وزن خشک به آب سلول شده و وزن خشک گیاه را بالا می‌برد و تأثیر آن بر شاخص وزنی قدرت به این دلیل می‌باشد. گلوتاتیون ردوکتاز از دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شناخته می‌شود ولی این آنزیم به طور مستقیم دارای خواص آنتی‌اکسیدانی نیست. این آنزیم موجب کاتالیز واکنش تبدیل گلوتاتیون دی سولفید به گلوتاتیون می‌شود که این عمل آن با مصرف NADPH همراه است (۱۵). در واقع این آنزیم موجب تداوم چرخه گلوتاتیون شده و از این طریق به‌صورت غیرمستقیم در تجزیه هیدروژن پراکسید نقش دارد. البته نتایج تحلیل مسیر نیز تأیید کننده این مطلب است. با توجه به نتایج تحلیل مسیر مشاهده می‌شود که تأثیرات گلوتاتیون ردوکتاز بر شاخص طولی قدرت بیشتر به‌صورت اثر غیرمستقیم می‌باشد. همچنین نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که گلوتاتیون تولید شده توسط گلوتاتیون رداکتاز بر میزان آسکوربات که سوبسترای فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز می‌باشد، تأثیر دارد (۱۵). نتایج تحلیل مسیر نیز تأثیر گلوتاتیون ردوکتاز بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز را نشان می‌دهد که این مطلب می‌تواند توجیه گر تأثیرات غیرمستقیم گلوتاتیون ردوکتاز نیز باشد. نتایج همبستگی نیز نشان داد بین فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز همبستگی مثبت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۵). آسکوربات پراکسیداز به‌عنوان یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب تجزیه هیدروژن پراکسید به آب می‌شود که از آسکوربات به عنوان بستر عمل استفاده می‌کند. در عمل این آنزیم الکترون اضافی موجود در هیدروژن پراکسید به دی هیدروآسکوربات منتقل شده و موجب تولید آب می‌شود. این آنزیم نقش کلیدی در چرخه گلوتاتیون – آسکوربات دارد (۲۵و۲۸). آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز از دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بوده که دارای همبستگی بالایی با شاخص‌های قدرت داشته و سهم زیادی در پیش‌بینی شاخص طولی قدرت

دارد (جدول ۵). گلوتاتیون پراکسیداز به‌عنوان کاتالیزور سبب تبدیل گلوتاتیون به گلوتاتیون دی سولفید شده و از این طریق الکترون اضافه موجود در هیدروژن پراکسید را گرفته و موجب تبدیل آن به آب می‌شود و از این طریق سبب انتقال الکترون اضافه از هیدروژن پراکسید به آن و تبدیل هیدروژن پراکسید به آب می‌شود. به‌طوری‌که آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز به‌عنوان کوفاکتور در فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نقش ایفا می‌کند (۱۳و۲۰). نتایج نشان می‌دهد که گلوتاتیون پراکسیداز از طریق آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز می‌تواند بر شاخص وزنی قدرت تأثیرگذار باشد. همچنین نتایج نشان داد که پیش‌تیمار موجب بهبود قدرت بذر شد. در بین غلظت‌های مختلف از نیترات پتاسیم، غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر از آن در اغلب صفات اندازه‌گیری شده بالاترین تأثیر را نشان داد. در واقع این غلظت از نیترات پتاسیم به‌عنوان غلظت بهینه در بهبود جوانه‌زنی و قدرت بذر به‌شمار می‌آید. این نتایج با یافته‌های دیگر پژوهش‌ها نیز مطابقت دارد (۱۳و ۲۰). در مطالعات دیگر نیز مشاهده شد که پیش‌تیمار بذر با نیترات پتاسیم موجب افزایش تحمل بذرها به تنش‌های اکسیداتیو ناشی از تنش شوری و خشکی شد (۲ و ۳). پیش‌تیمار باعث بهبود و ترمیم بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شده و از این طریق موجب افزایش فعالیت این آنزیم‌ها و در نهایت منجر به بهبود شاخص‌های قدرت و جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها می‌شود (۶ و ۲۱).

نتیجه‌گیری کلی

فرسودگی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را کاهش می‌دهد که این امر موجب کاهش درصد جوانه‌زنی، رشد گیاهچه‌ها و در نهایت شاخص‌های قدرت بذر می‌گردد. در بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فعالیت پراکسیداز به همراه گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز بالاترین همبستگی و سهم را در پیش‌بینی شاخص‌های قدرت نشان دادند. پیش‌تیمار موجب بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد و شاخص وزنی قدرت را افزایش داد، ولی بر شاخص طولی قدرت، درصد جوانه‌زنی و طول گیاهچه تأثیر معنی‌داری نداشت. در بین غلظت‌های مختلف نیترات پتاسیم، استفاده از غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر از آن در بیشتر صفات اندازه‌گیری شده دارای بیشترین تأثیر بود که این نشان دهنده مناسب‌ترین غلظت این ماده برای بهبود جوانه‌زنی و قدرت بذر ماریتیغال می‌باشد.

منابع

۱- عدالت پیشه، م، عباس دخت، ح، منتظری، ن. ۱۳۸۸. مطالعه هالوپرایمینگ و هیدروپرایمینگ بذر بر جوانه‌زنی ذرت تحت شرایط تنش شوری و خشکی. مجله الکترونیک کشاورزی و منابع طبیعی گلستان.۲: ۷۹ – ۶۷.

۲- عموآقایی، ر، ۱۳۹۲. تأثیر برخی هورمون‌ها و ترکیبات ازته روی ظرفیت، سرعت و هماهنگی جوانه‌زنی بذرهای قیچ تحت تنش شوری. مجله مجله زیست شناسی ایران.۲۶: ۴۷۵-۴۶۵.

۳- عموآقایی، ر، ولیوند، م. ۱۳۹۳. اثر مدت زمان سرمادهی، غلظت، نوع و زمان تیمار مواد ازته بر جوانهزنی و رشد دانه رست کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima Mozaff.*). مجله زیست شناسی ایران.۲۷: ۴۷۷-۴۳۵.

4- Abdul-Baki, A.A., Anderson, J.D. 1973. Vigor determination in soybean by multiple criteria. Crop Science, 13: 630-633.

5- Armin, M., Asgharipour, M., Razavi-Omrani, M. 2010. The Effect of Seed Priming on Germination and Seedling Growth of Watermelon (*Citrullus lanatus*). Advances in Environment Biology, 4: 501-505.

6- Berlett, B.S., Stadtman, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. Journal Biology and Chemistry, 272: 20313-20316.

7- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemis, 72: 248-254.

8- Chance, B., Maehly, A. 1955. Assay of catalase and peroxidase. Methods Enzymology, 2: 764-817.

9- Chang-Zheng, H., Jin, H., Zhi-Yu, Z., Song-Lin, R., Wen-Jian, S. 2002. Effect of seed priming with mixed-salt solution on germination and physiological characteristics of seedling in rice (*Oryza sativa* L.) under stress conditions. Journal Agriculture Life Science, 28: 175–178.

10- Chen, C.C., Sung, J.M. 2001. Priming bitter gourd seeds with selenium solution enhances Germinability and anti-oxidative responses under sub-optimal temperature. Plant Physiology, 111: 9–16.

11- Foyer, C.H., Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planetarium, 133: 21-25.

12- Gaspar, T., Penel, C., Castillo, F.J., Greppin, H. 2001. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. Plant Physiology, 64: 418- 423.

13- Goel, A., Goel, A.K., Sheoran, I.S. 2003. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. Plant Physiology, 160: 1093-1100.

14- Hampton, J.G., Coolbera, P., 1990. Potential versus actual seed performance can vigour testing provide and answer. Seed Science Technology, 18:215-228.

15- Hossain, M.A., Da-Silva, J.A.T., Fujita, M., 2011. Glyoxalase system and reactive oxygen species detoxification system in plant abiotic stress response and tolerance: an intimate relationship, in Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations, A. K. Shanker and B. Venkateswarlu, Eds., pp. 235– 266, INTECH-Open Access Publisher, Rijeka, Croatia,.

16- Hosseini, A., Koocheki, A. 2007. The effect of different priming treatments on germination percent and mean germination time of four varieties of sugar beet. Journal Agronomy Research, 5: 69-76.

17- Hsu, C.C., Chen, C.L., Chen, J.J., Sung, J.M. 2003. Accelerated aging-enhanced lipid peroxidation in bitter gourd seeds and effects of priming and hot water soaking treatments. Scientia Horticulture, 98: 201-212.

18- Hu, J., Xie, X.J., Wang, Z.F., Song, W.J. 2006. Sand priming improves alfalfa germination under high salt concentration stress. Seed Science Technology, 34: 199-204.

19- Karo, M., Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activity during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315-319.

20- Kibinza, S., Bazin, J., Bailly, CH., Farrant, J.M., Corbineau, F., Maarouf-Bouteau, H.E. 2011. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. Plant Science, 181: 309-315.

21- Kibinza, S., Vinel, D., Come, D., Bailly, C., Corbineau, F., 2006. Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging. Plant Physiology, 128: 496-506.

22- Krishna, P., Bhabak, A., Govindasamy, M. 2010. Functional Mimics of Glutathione Peroxidase: Bioinspired Synthetic Antioxidants. Accounts of Chemical Research, 43:1408-1419.

23- McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. Seed Science Technology, 27:177-237.

24- Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant and Cell Physiology, 22: 867-880.

25- Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49: 249–279.

26- Peery, D.A. 1978. Report of the Vigor Test Committee 1974-1977. Seed Science Technology, 6: 181-1599.

27- Ramasamy, K., Agarwal, R. 2008. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. Cancer Lett. 269: 352-362.

28- Raven, E.L. 2000. Peroxidase-catalyzed oxidation of ascorbate. Structural, spectroscopic and mechanistic correlations in ascorbate peroxidase. Subcell. Biochem. Subcellular Biochemistry, 35: 317-49.

29- Shaker, E., Mahmoud, H., Mnaa, S. 2010. Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage. Food and Chemical Toxicology, 48: 803-806.

30- Sindel, B. M. 1991. A review of the ecology and control of thistles in Australia. Weed Research, 31: 189-201.

31- Singh, B.G., Rao, G. 1993. Effect of chemicals soaking of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed on vigor index. Indian Journal Agriculture Science, 63: 232–233.

32- Stewart, R.R.C., Bewley, J.D. 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. Plant Physiology, 65: 245-248.

33- Sudhakar, C., Lakshmi, A., Giridara kumar, S. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Mours alba* L.) under NaCl salinity, Plant Science, 167: 613-619.

Effect of seed priming with potassium nitrate on seedling vigour index in seed aged of *Silybum marianum*

Ali Ebadie, Ghasem Parmoon*, Soodabe Jahanbakhsh

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Abstract

In order to investigate the changes in activity of antioxidant enzymes seedlings *Silybum marianum* during aging and the role of pretreatment on these enzymes, factorial experiment in a completely randomized design was carried in Ardabil University Mohaghegh in 2013. The treatments consisted of pretreatment with potassium nitrate at concentrations of 0, 15 , 30 , 45 and 60 mg L^{-1} and aging to put them in a relative humidity 95-90% at 40 ° C to time 0 , 48 , 96 and 144 hours. The results revealed that during aging activity the antioxidant enzymes decreased (50% superoxide dismutase, 47% catalase, 41% peroxidase, 39% ascrobat peroxidase, 38% glutathione peroxidase and 55% glutathione reductase) and pretreatment enhances the enzymatic activity. Among the different concentrations of potassium nitrate, the use of 30 mg L^{-1} most traits showed the highest value. Results of regression equations to predict the length and weight of power indices showed, between the activity of antioxidant enzymes, glutathione peroxidase (R^2= 0.313) and peroxidase activity (R^2= 0.276), the highest proportion in excess of the projected length vigour index and peroxidase (R^2= 0.306) and glutathione reductase (R^2= 0.305) activity also the greatest share of in predicting weight vigour index showed. The results of path analysis showed peroxidase activity has a direct effect and superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase has more direct impact on the length vigour index and superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase had a direct impact on the weight vigour index. The study concludes that *S. marianum* seed priming with potassium nitrate reduce the effects of aging and increase the seed vigour by changing on some antioxidant enzymes activity.

Key word: superoxide dismutase, catalase, seed vigour, potassium nitrate, regression, *Silybum marianum*