اثر پیش‌تیمار لیزر بر شاخص‌های جوانه‌زنی دانه، فعالیت آلفا آمیلاز و رشد دانه‌رست خار مریم (*Silybum marianum* L.) در شرایط نرمال و تحت تنش سرب

عاطفه بنی شریف[۱،۲*] و ریحانه عموآقایی[۳]

[۱] **ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه علوم گیاهی**

[۲] **ایران، تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی**

[۳] **ایران، شهرکرد، پژوهشکده زیست فناوری شهرکرد، گروه علوم گیاهی**

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲

چکیده

اخیراً پیش‌تیمار دانه‌ها با لیزر هلیوم – نئون بعنوان یکی از ایمن‌ترین شیوه‌های تقویت جوانه‌زنی دانه، رشد دانه‌رست و افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌ها، علاقه جامعه علمی را به خود جلب کرده است. در این مطالعه، اثر لیزر بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L.) در شرایط نرمال و تحت تنش سرب بررسی گردید. ابتدا اثر غلظت‌های مختلف نیترات سرب (۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm) بر جوانه‌زنی نسبی، شاخص مقاومت ریشه و شاخص تحمل جوانه‌زنی دانه-های خارمریم در یک آزمایش با طرح کاملاً تصادفی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ppm ۱۲۵ نیترات سرب، اثر معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی دانه و رشد ریشه نداشت، اما غلظت‌های بالاتر پارامترهای فوق‌الذکر را کاهش داد. دومین آزمایش، اثر لیزر هلیوم – نئون با توان‌های مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌وات) و مدت زمان‌های متفاوت (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه) بر جوانه‌زنی بذر در یک آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی، بیشترین سرعت جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی، طول دانه‌رست و بنیه طولی را با تابش ۱۰ میلی‌وات بمدت ۲۰ دقیقه نشان داد. در سومین آزمایش، اثر متقابل مدت تابش لیزر هلیوم – نئون با توان ۱۰ میلی-وات (۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه) و غلظت‌های نیترات سرب (۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm) در یک آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی نشان داد، لیزر هلیوم – نئون با یک الگوی وابسته به دوز، جوانه‌زنی بذر، فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و رشد دانه‌رست را در هر دو شرایط بدون تنش سرب بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: تنش سرب، گیاه خارمریم، لیزر، جوانه‌زنی، رشد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۲۲۳۲۱۱۲ ، پست الکترونیکی: atefehbanisharif@gmail.com

مقدمه

سرب یکی از آلاینده‌های رایج زیست‌محیطی و دومین فلز سمی خطرناک است که از طریق صنایع فلزکاری، احتراق گازوئیل، پساب‌های صنعتی و کودهای شیمیایی به خاک، آب، اتمسفر و سرانجام به پیکره گیاهان وارد می‌شود و به‌طور گسترده اثرات سمی مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در آنها بر جای می‌گذارد. تحقیقات نشان داده است که سمیت سرب، جوانه‌زنی دانه‌ها را مهار می-نماید، رشد دانه‌رست‌ها را به تأخیر می‌اندازد و طول ساقه و ریشه، شاخص مقاومت و وزن خشک‌ریشه و ساقه را کاهش می‌دهد (۴۱ و ۴۷).

تحقیقات نشان داده است که تیمار سرب موجب کاهش درصد جوانه‌زنی، طول ریشه و ساقه، سطح برگ، ارتفاع گیاه، میزان کلروفیل و افزایش در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و

پراکسیداز در گیاه اطلسی شد (۴). سمیت سرب، رشد گیاه، طویل شدن ریشه، جذب و انتقال مواد غذایی، تولید کلروفیل، تقسیم سلولی و سازماندهی تیلاکوئیدهای کلروپلاست را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵۰). کاهش رشد ممکن است مرتبط با مهار شاخص‌های میتوزی در هنگام تیمار با فلزات سنگین نظیر سرب و کادمیوم باشد (۴۹). علاوه براین نشان داده شده است که سمیت فلز سنگین سرب، موجب تورم میتوکندری، از بین رفتن کریستالهای میتوکندری، واکوئولیزه شدن شبکه آندوپلاسمی و دیکتیوزوم و صدمه غشای پلاسمایی در سلول‌های ریشه سیر شد و در نتیجه نمو دانه‌رست‌ها را محدود نمود (۲۶).

در دهه‌های گذشته، کشف و کاربرد بسیاری از مواد شیمیایی برای بهبود باروری و کیفیت گیاهان زراعی، کنترل آفات و مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌های غیرزیستی، باعث انقلابی در بخش کشاورزی شده است. اما در سال-های اخیر تحقیقات نشان داده است که کاربرد روزافزون مواد شیمیایی باعث کاهش مقاومت گیاه، تغییر ساختار خاک و تغییر بازده محصولات می‌شود. از سوی دیگر این مواد شیمیایی پس از نفوذ به پیکره گیاه وارد زنجیره‌های غذایی شده و بر سلامت انسان تأثیر سوء می‌گذارند. از این‌رو، در سال‌های اخیر، استفاده از تکنیک‌های بیوفیزیکی در کشاورزی بعنوان یک شیوه سالم‌تر نسبت به تیمارهای شیمیایی مورد توجه محققان قرارگرفته است. یکی از بهترین تیمارهای بیوفیزیکی، پیش تیمار دانه‌ها با امواج الکترومغناطیسی لیزر پیوسته هلیم–نئون است (۴۸).

تحقیقات متعددی نشان داده است که نور لیزر باعث افزایش انرژی دانه‌ها، بلوغ جنین دانه و تشدید تبادل مواد غذایی و افزایش مقاومت به آفات و بیماری‌ها در گیاهان می‌شود و جوانه‌زنی، حجم ریشه و بخش‌های هوایی و کیفیت محصولات را افزایش می‌دهد (۱۳و ۴۸). ابراهیم‌زاده ابریشمی و عباسی (۱) گزارش کردند نور لیزر، میزان و سرعت جوانه‌زنی بذر ارقام گندم و همچنین طول، وزن‌تر ریشه‌چه و ساقه‌چه، تعداد گیاهچه را بطور معنی-داری افزایش داد. بررسی اثر تیمار نوری لیزر و اسید جیبرلیک بر میزان جوانه‌زنی بذر گیاه دارویی مریم گلی نشان داد که تیمار لیزر می‌تواند جایگزین مناسبی برای تیمارهای شیمیایی در تسریع جوانه‌زنی بذر این گیاه باشد (۲). میرشکاری و صیامی (۸) نیز دریافتند که تابش لیزر موجب بهبود جوانه‌زنی، رشد اولیه و شاخص‌های دارویی گیاه بارهنگ سرنیزه‌ای (*Plantago lanceolata*) شد و میانگین زمان لازم، برای رسیدن به ۵۰ درصد جوانه‌زنی را در حد معنی‌داری کاهش داد. تحقیق دیگری نشان داد که پیش‌تیمار دانه‌های سویا با لیزر با طول‌موج ۵۳۲ نانومتر، جوانه‌زنی و طول دانه‌رست‌های سویا را افزایش داد. تابش نوری لیزر با توان ۱۵ و مدت‌زمان ۵ دقیقه در سویا، متابولیسم گیاه را تغییر داد و موجب افزایش تولید نشاسته و ساکارز و اسیدهای بنزنی شد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین‌آمونیالیاز، باعث افزایش ایزوفلاوون‌ها در لپه و دانه‌رست‌های سویا شد (۴۶).

در مورد مکانیسم عمل تابش لیزر برای افزایش جوانه‌زنی بذر و رشد دانه‌رست گیاهان پیشنهاد شده است که احتمالاً فعالیت فتودینامیکی نور و یا انرژی لیزر هلیوم – نئون، جوانه‌زنی دانه‌ها را تسریع نموده است. در واقع بدلیل حساس بودن فیتوکروم‌ها به نور قرمز، با پرتودهی لیزر هلیوم–نئون فعالیت آنزیم‌های مرتبط با جوانه‌زنی مانند آمیلازها و همچنین انرژی درونی و آنتروپی طی جوانه‌زنی افزایش می‌یابد. نور لیزر تعادل انرژی جوانه‌زنی بذر را می‌شکند و در نتیجه تبادل انرژی بیشتری بین بذر و محیط اطراف صورت می‌گیرد (۲۲). تابش نوری لیزر در بهبود فعالیت آلفا آمیلاز مؤثر است و رادیکال‌هایی که خواب دانه را القا می‌نمایند، را بی‌اثر می‌نماید و به همین دلیل، درصد جوانه‌زنی و بنیه دانه‌ها را بهبود می‌بخشد (۳۳ و ۴۲).

علاوه براین تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که پیش‌تیمار دانه‌ها با لیزر، دانه‌رست‌ها را در مقابل تنش‌های مختلف

ازجمله خشکی (۵۲)، شوری (۶و۲۰) و UV-B (۱۲) حفاظت می‌نماید. حسین زاده ثابتی و همکاران (۵) گزارش نمودند که لیزر هلیوم–نئون با توان ۳/۳ میلی‌وات بمدت ۳۰ دقیقه، اثرات شوری بر مورفولوژی، فیزیولوژی و فرایندهای بیوشیمیایی را تعدیل کرد و باعث افزایش عملکرد ارقام مورد بررسی برنج تحت تیمارهای شوری شد.

مطابق با بررسی منابع ما، تأثیر لیزر هلیم– نئون بر جوانه-زنی و رشد اولیه گیاهان دارویی تاکنون بررسی نشده است. لذا پژوهش حاضر برای بررسی تأثیر لیزر هلیم– نئون بر جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاه خارمریم در شرایط نرمال و تحت تنش سرب طراحی شد. خارمریم یکی از گیاهان دارویی معروف جهت درمان اختلالات کبدی و صفراوی محسوب می‌شود. ۸۰ درصد فلاونوئیدهای این گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و برای تنظیم متابولیسم بدن مفید می‌باشد و در درمان انواع بیماری‌های کبدی، قلبی و سرطان مؤثر است. ماده مؤثره این گیاه موسوم به سیلی مارین در درمان سرطان، قابلیت تکثیر سلول‌ها را کاهش داده و از رشد تومورها جلوگیری می‌نماید (۳۴). علیرغم ارزش و اهمیت دارویی این گیاه اثر تنش فلزات سنگین بر مراحل رشد این گیاه بندرت بررسی شده است. با توجه به اطلاعات فوق چنین فرض شد که احتمالاً لیزر می‌تواند بعنوان یک روش بیوفیزیکی که نسبت به تیمارهای شیمیایی برتری دارد، برای بهبود جوانه‌زنی این گیاه تحت تنش سرب مورد استفاده قرار گیرد و پژوهش حاضر در جهت بررسی این فرضیه اجرا شد.

مواد و روشها

در این پژوهش ۳ آزمایش به شرح زیر انجام شد: تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات سرب بر جوانه‌زنی بذر و رشد دانه‌رست: در اولین آزمایش، غلظتی از فلز سنگین سرب که در آن جوانه‌زنی بذر و رشد دانه‌رست خارمریم تحت تأثیرات منفی قرار می‌گیرد، تعیین شد. برای این منظور دانه‌های خارمریم با هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد بمدت ۵ دقیقه استریل شد و با آب مقطر ۲ بار شسته شد. بذرهای ضدعفونی شده خارمریم روی کاغذ صافی در درون پتری دیش‌ها چیده شدند و در یک آزمایش ساده با طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار، تأثیر هرکدام از غلظت‌های متفاوت نیترات سرب (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm) بر روی جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست مطالعه شد. دانه‌های شاهد نیز با آب مقطر تیمار شدند. درصد جوانه‌زنی نسبی، درصد شاخص مقاومت ریشه و شاخص تحمل جوانه‌زنی با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه شد (۱۶).

رابطه۱

$$\text{جوانه‌زنی نسبی بذر} = \frac{\text{تعداد بذرهای جوانه زده تیمار}}{\text{تعداد بذرهای جوانه زده شاهد}} \times ۱۰۰$$

رابطه۲

$$\text{درصد شاخص مقاومت ریشه (RTI)} = \frac{\text{طول ریشه در تیمار}}{\text{طول ریشه در شاهد}} \times ۱۰۰$$

رابطه ۳

$$\text{شاخص جوانه‌زنی (GI)} = \frac{\text{جوانه زنی نسبی بذر} \times \text{درصد شاخص مقاومت ریشه}}{100}$$

اثر سطوح مختلف تابش لیزر بر جوانه‌زنی بذر و رشد دانه‌رست: در دومین آزمایش مدت‌زمانی از تابش لیزر که در آن جوانه‌زنی بذر خارمریم در شرایط نرمال تقویت می-شود، تعیین شد. بذرهای گیاه خارمریم در یک آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار در معرض تابش لیزر با شدت ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌وات در بازه زمانی-های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه قرارگرفته و حد مورد نظر تعیین شد. بمنظور تیمار از دستگاه لیزر هلیوم ـ نئون مدل No. MSHN5-A-B450MM با توان‌های مختلف و طول‌موج ۶۵۰ نانومتر استفاده شد. تابش بذرها در اتاق تاریک بمنظور تأثیر بهتر انجام گرفت. لازم بذکر است که بذرها قبل از تیمار با نور لیزر ۱۲ ساعت در آب استریل خیسانده شدند. سپس سطح دانه‌ها خشک شد و بر روی

کاغذ صافی مرطوب قرارگرفتند. در ضمن در هر بار استفاده، توان لیزر با استفاده از پاورمتر مدل LLM-3 آزموده شد. بذرها در پتری‌دیش‌ها در انکوباتور (مدل GC-1000) تحت دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بمدت ۱۰ روز بطور روزانه تعداد بذرهای جوانه‌زده شمارش شدند و شاخص‌های جوانه‌زنی مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد جوانه‌زنی نهایی بصورت درصد کل دانه‌های جوانه‌زده در هر تیمار بعد از ۱۰ روز و انرژی جوانه‌زنی بصورت درصد جوانه‌زنی بذرها در روز سوم بعد از کاشت تعیین شد (۱۵). سرعت جوانه‌زنی از رابطه ۴ محاسبه گردید که در این رابطه n تعداد بذور جوانه‌زده تا زمان t و t تعداد روز تا شمارش مورد نظر می‌باشد (۱۵).

رابطه ۴ $GR = (n/t)$

و بنیه طولی دانه‌رست مطابق فرمول زیر محاسبه شد (۱۵).

رابطه ۵

بنیه طولی = (مجموع طول ریشه‌چه و ساقه‌چه) × جوانه‌زنی نهایی

اثر برهمکنش نیترات سرب و لیزر بر جوانه‌زنی بذر و رشد دانه‌رست: اثرات تابش لیزر بر کاهش اثرات منفی فلز سنگین سرب بر جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست خارمریم در یک آزمایش بصورت فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی و در ۵ تکرار تعیین گردید. برای این منظور بذرهای ضدعفونی شده در پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب تحت سه سطح تابش (شاهد)، ۲۰،۰ دقیقه و ۴۰ دقیقه لیزر هلیوم ـ نئون با شدت ۱۰ میلی‌وات قرارگرفتند. سپس آب مقطر (شاهد) یا محلول نیترات سرب با دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ppm مطابق طرح آماری به پتری‌ها اضافه گردید. لازم بذکر است برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. درصد جوانه‌زنی بذرها و وزن‌تر و خشک دانه‌رست بعد از ده روز محاسبه گردید. بعد از اندازه‌گیری طول ریشه توسط خط‌کش و وزن‌تر دانه‌رست‌ها توسط ترازو، برای اندازه‌گیری وزن خشک، دانه‌رست‌های مربوط به هر تیمار را داخل پاکت‌های کاغذی مخصوص گذاشته و سپس در آون در دمای ۶۰ درجه بمدت ۴۸ ساعت خشک شدند. همچنین فعالیت آمیلاز بذرهای در حال جوانه‌زنی (۲۴ ساعت پس از تابش لیزر) به شرح زیر اندازه‌گیری شد.

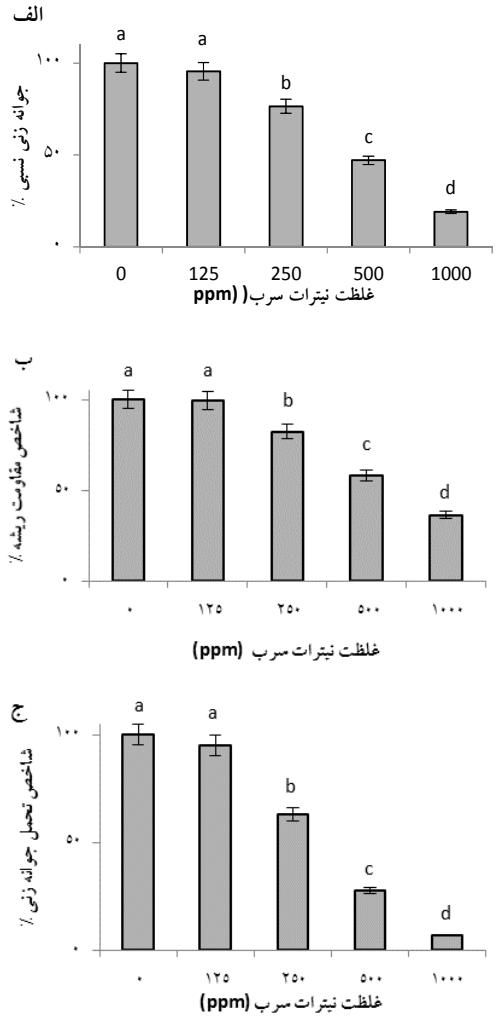
اندازه‌گیری آنزیم آلفا آمیلاز : بطور خلاصه، ۱ گرم دانه-های جوانه‌زده در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سرد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با کمک دسته و هاونی که در یک فریزر از قبل سرد شده بودند، له شدند. سپس عصاره حاصل در دور ۱۵۰۰۰ rpm بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. روشناور برای اندازه‌گیری فعالیت آلفا آمیلاز بکار برده شد. جهت اندازه‌گیری آنزیم آلفا آمیلاز ابتدا ۰/۵میلی‌لیتر محلول نشاسته (۲۰میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر فسفات پتاسیم (PH=۷) به داخل لوله‌آزمایش منتقل شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره حاوی آنزیم آلفا - آمیلاز به آن اضافه شده و بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بوسیله یک میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک یک نرمال واکنش را متوقف نموده و در ادامه یک میلی‌لیتر از معرف ید به آن اضافه شد. پس‌ازآن حجم محتوی لوله را با آب مقطر به حدود ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و میزان جذب رنگ را با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر خوانده و با نمونه شاهد (محلول نشاسته و ید بدون افزودن آنزیم) مقایسه شد (۵۳).

آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها توسط برنامه Excel انجام شد. مقایسه اختلاف بین میانگین‌ها نیز توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال $P < ۰/۰۵$ انجام گرفت.

نتایج

تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات سرب بر جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست گیاه خارمریم : مقایسه میانگین جوانه‌زنی نسبی در بین تیمارها نشان داد، سرب با غلظت ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm بترتیب جوانه‌زنی نسبی را ۴/۴۸٪،

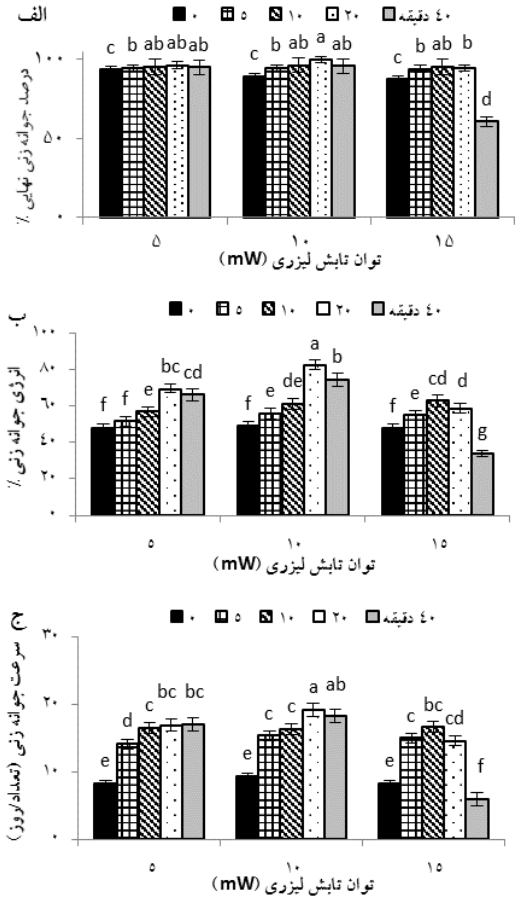
۲۳/۵۰٪، ۵۲/۹۰ ٪ و ۸۰/۸۲ ٪ (شکل۱- الف)، شاخص مقاومت ریشه را ۰/۸۱٪، ۱۷/۶۳٪، ۴۱/۵۳ ٪ و ۶۳/۵۵ ٪ (شکل۱ - ب) و شاخص تحمل جوانه‌زنی (شکل ۱ - ج) را ۵/۰۱٪، ۳۷/۰۲٪، ۷۲/۵۳٪ و ۹۳/۲۳٪ کاهش داد. اختلاف جوانه‌زنی نسبی، شاخص مقاومت ریشه و شاخص تحمل جوانه‌زنی در غلظت ppm ۱۲۵ با شاهد معنی‌دار نبود اما سایر غلظت‌ها با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند.



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات سرب بر جوانه‌زنی نسبی (الف)، شاخص مقاومت ریشه (ب) و شاخص تحمل جوانه‌زنی (ج)

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

تأثیر توان‌های مختلف و مدت تابش لیزر بر جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست خارمریم: مقایسه میانگین‌ها در بین تیمارها نشان داد ۵ ، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه تابش با توان ۵ میلی‌وات، اثرات مشابهی بر درصد جوانه‌زنی نهایی (شکل ۲- الف) داشتند و بطور معنی‌داری جوانه‌زنی نهایی را نسبت به شاهد افزایش دادند. بیشترین اثرات معنی‌دار لیزر با توان ۵ میلی‌وات بر انرژی جوانه‌زنی (شکل۲ - ب) و سرعت جوانه‌زنی (شکل ۲ - ج) در ۲۰ و ۴۰ دقیقه تابش بدست آمد. ۵ ، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه تابش با توان ۱۰ میلی‌وات بطور معنی‌داری درصد جوانه‌زنی نهایی (شکل ۲- الف)، انرژی جوانه‌زنی (شکل۲- ب) و سرعت جوانه‌زنی (شکل ۲ - ج) را نسبت به شاهد افزایش داد.



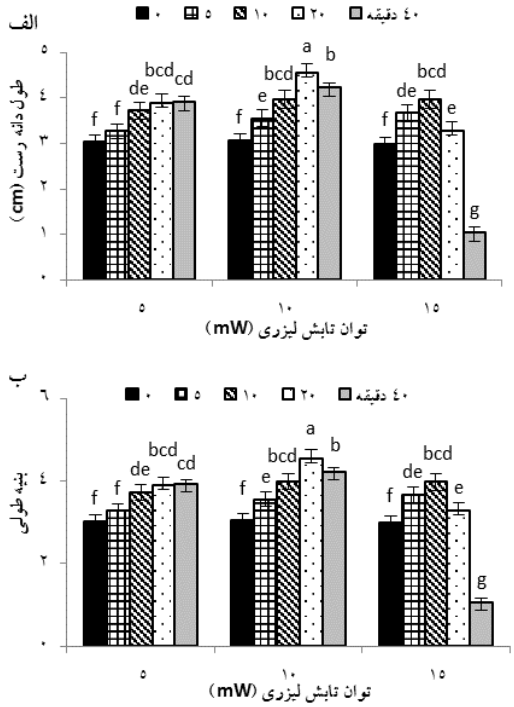
شکل۲- تأثیر توان (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌وات) و مدت تابش لیزر هلیوم-

نئون (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه) بر درصد جوانه‌زنی (الف)، انرژی جوانه‌زنی (ب) و سرعت جوانه‌زنی (ج) دانه‌رست خارمریم

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

تابش نوری لیزر با توان ۱۰ میلی‌وات بمدت ۲۰ دقیقه بهترین اثر را بر انرژی جوانه‌زنی داشت و انرژی جوانه‌زنی را ۶۸/۰۲ ٪ نسبت به شاهد افزایش داد اما اثر ۴۰ دقیقه تابش با توان ۱۰ میلی‌وات بر انرژی جوانه‌زنی در حد معنی‌داری کمتر از تیمار ۲۰ دقیقه بود. درحالی‌که اثر تابش نوری لیزر با توان۱۰ میلی‌وات بمدت ۱۰، ۲۰ و۴۰ دقیقه بر جوانه‌زنی نهایی و بمدت ۲۰ و۴۰ دقیقه بر سرعت جوانه‌زنی، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه تابش با توان ۱۵ میلی‌وات، بطور معنی‌داری درصد جوانه‌زنی نهایی (شکل ۲- الف)، انرژی جوانه‌زنی (شکل۲ - ب) و سرعت جوانه‌زنی (شکل۲ - ج) را نسبت به شاهد افزایش داد اما ۴۰ دقیقه تابش با توان ۱۵ میلی‌وات، هر سه پارامتر را نسبت به شاهد بطور معنی‌داری کاهش داد. درمجموع بیشترین اثرات معنی‌دار لیزر بر درصد جوانه‌زنی نهایی (شکل ۲- الف) انرژی جوانه‌زنی (شکل۲ - ب) و سرعت جوانه‌زنی (شکل ۲ - ج) در تابش با توان ۱۰ میلی‌وات بمدت ۲۰ دقیقه بدست آمد.

همچنین مقایسه میانگین‌ها در بین تیمارها نشان داد ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه تابش با توان ۵ میلی‌وات، بطور مشابه و معنی-داری طول دانه‌رست (شکل۳ - الف) و بنیه طولی (شکل ۳ - ب) را نسبت به شاهد افزایش دادند. تابش با توان ۱۰ میلی‌وات بمدت ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه نیز بطور معنی‌داری طول دانه‌رست و بنیه طولی را نسبت به شاهد افزایش دادند. اثر ۴۰ دقیقه تابش با توان ۱۰ میلی‌وات، بر پارامترهای فوق در حد معنی‌داری کمتر از تیمار ۲۰ دقیقه اما بالاتر از تیمار شاهد بود. ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه تابش با توان ۱۵ میلی‌وات، بطور معنی‌داری طول دانه‌رست (شکل۳ - الف) و بنیه طولی (شکل ۳ - ب) را نسبت به شاهد افزایش دادند اما ۴۰ دقیقه تابش با توان ۱۵ میلی‌وات، دو پارامتر مذکور را نسبت به شاهد بطور معنی‌داری کاهش داد. در مجموع تابش نوری لیزر با توان ۱۰ میلی‌وات بمدت ۲۰ دقیقه بیشترین اثرات را بر پارامترهای مذکور داشت و ۳۲/۹۴٪ طول دانه‌رست و ۴۸/۶۹ ٪ بنیه طولی را نسبت به شاهد افزایش داد.

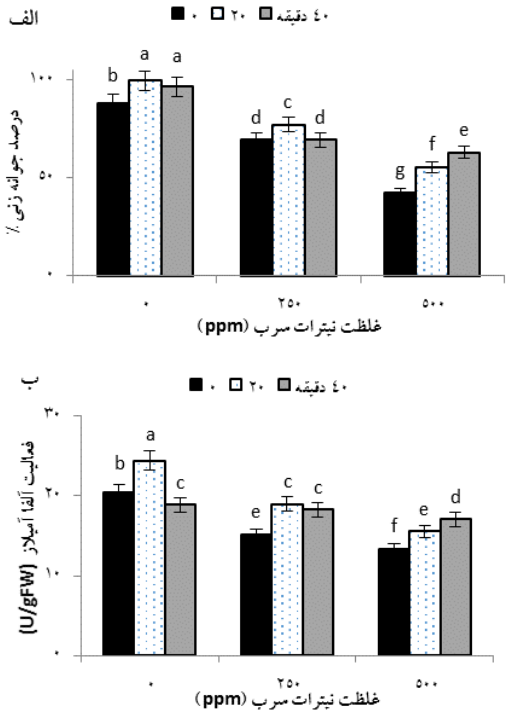


شکل ۳-تأثیر توان (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌وات) و مدت تابش لیزر هلیوم-نئون (۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه) طول دانه‌رست (الف) و بنیه طولی (ب) دانه‌رست خارمریم

حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

تأثیر غلظت‌های مختلف سرب و مدت تابش لیزر بر جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست: مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی (شکل۴-الف) در بین تیمارها نشان داد غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm سرب، درصد جوانه‌زنی دانه‌رست خارمریم را بترتیب ۲۱/۵۱ ٪ و ۵۱/۷۰ ٪ در مقایسه با

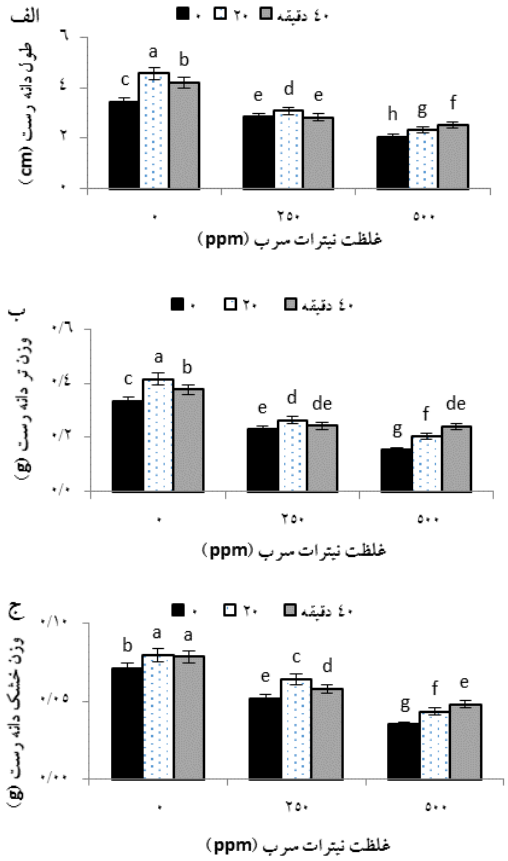
شاهد کاهش داد. در گروه شاهد (تیمار بدون سرب) تیمار ۲۰ و ۴۰ دقیقه تابش لیزر بطور مشابه و در حد معنی‌داری (حدود ۱۳٪) در مقایسه با شاهد جوانه‌زنی را افزایش داد. در تیمار با غلظت ۲۵۰ ppm سرب، تابش ۲۰ دقیقه لیزر، درصد جوانه‌زنی را ۱۱/۵۳ ٪ افزایش داد اما با ۴۰ دقیقه تابش لیزر، درصد جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری با شاهد این گروه نداشت. در تیمار با غلظت ۵۰۰ ppm سرب، تابش ۲۰ و۴۰ دقیقه تابش لیزر بترتیب ۲۹/۶۹ ٪ و۴۷/۶۷ ٪ درصد جوانه‌زنی را افزایش داد (شکل۴-الف).



شکل ۴ -تأثیر غلظت نیترات سرب (۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm) و مدت تابش لیزر (۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه) بر درصد جوانه‌زنی (الف) و فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز (ب) دانه‌رست خارمریم

حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

مقایسه میانگین فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بین تیمارها نشان داد غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm سرب، فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز دانه‌رست خارمریم را بترتیب ۲۵/۶۷٪ و ۳۴/۲۸ ٪ کاهش داد. در گروه شاهد، تیمار ۲۰ دقیقه‌ای لیزر در مقایسه با شاهد ۱۹/۹۲ ٪ فعالیت این آنزیم را افزایش داد و با تابش ۴۰ دقیقه فعالیت این آنزیم کاهش یافت. بهترین اثر لیزر در غلظت ۲۵۰ ppm سرب با ۲۰ و ۴۰ دقیقه تابش اما در غلظت ۵۰۰ ppm با ۴۰ دقیقه تابش بدست آمد. تابش ۲۰ دقیقه باعث افزایش ۲۵/۴۷ ٪ فعالیت آلفا آمیلاز در غلظت ۲۵۰ ppm و تابش ۴۰ دقیقه باعث افزایش ۲۰/۷۱ ٪ در غلظت ۲۵۰ ppm و افزایش ۲۷/۴۷ در غلظت ۵۰۰ ppm شد (شکل۴-ب).



شکل۵ - تأثیر غلظت نیترات سرب (۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm) و مدت تابش لیزر (۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه) برطول (الف)، وزن‌تر (ب) و خشک (ج) دانه‌رست خارمریم

حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

مقایسه میانگین در بین تیمارها نشان داد غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm سرب بترتیب طول دانه‌رست را ۱۶/۹۵ ٪ و ۴۰/۳۵٪، وزن تر دانه‌رست را ۳۰/۳۰ ٪ و ۵۴/۵۴ ٪ و وزن خشک دانه‌رست را ۲۸/۵۷ ٪ و ۵۷/۱۴ ٪ کاهش داد. در گروه شاهد (بدن تیمار سرب)، طول، وزن تر و وزن خشک دانه‌رست با تیمار ۲۰ دقیقه‌ای لیزر در مقایسه با شاهد بترتیب ۳۳/۳۳ ٪، ۲۴/۲۴ ٪ و ۱۱/۹۷ ٪ را و با تابش ۴۰ دقیقه ۲۲/۸۰ ٪، ۱۲/۱۲ ٪ و ۱۰/۵۶ ٪ افزایش یافت. در اغلب موارد بهترین اثر لیزر در غلظت ۲۵۰ ppm سرب با ۲۰ دقیقه تابش اما در غلظت ۵۰۰ ppm با ۴۰ دقیقه تابش بدست آمد. تابش ۲۰ دقیقه در دانه‌رست‌های تحت تنش ۲۵۰ ppm سرب، طول دانه‌رست، وزن تر و وزن خشک را ۸/۵۵ ٪، ۱۳/۰۴ ٪ و ۲۵/۴۹ ٪ و تابش ۴۰ دقیقه در دانه-رست‌های تحت تنش ۵۰۰ ppm سرب طول دانه‌رست، وزن تر و وزن خشک را ۲۳/۰۳ ٪، ۶۰ ٪ و ۳۷/۱۴٪ را افزایش داد (شکل۵).

بحث و نتیجه‌گیری

جوانه‌زنی یکی از مراحل حساس زندگی گیاه است که بشدت تحت تأثیر تنش‌های مختلف قرار می‌گیرد. اغلب، تنش‌ها میزان، سرعت یا هماهنگی جوانه‌زنی بذرها را بطور منفی تحت تأثیر قرار می‌دهد (۷و ۹). در این تحقیق هم نتایج اولین آزمایش نشان داد با افزایش غلظت سرب، جوانه‌زنی نسبی، شاخص مقاومت ریشه و شاخص تحمل جوانه‌زنی کاهش یافت (شکل۱). بطور مشابهی چهرگانی-راد و همکاران (۴) گزارش نمودند که تیمار سرب موجب کاهش درصد جوانه‌زنی، طول ریشه و ساقه گیاهچه اطلسی شد. ابراهام و همکاران (۱۰) نیز نشان دادند که افزایش غلظت بیشتر از ۷۵ و ۱۰۰ mg/l فلزات سنگینی نظیر Cd، Pb و Cu میزان جوانه‌زنی را در گیاه*Arachis hypogeae* کاهش داد که دلیل آن عدم تحرک ذخیره دانه و کاهش جذب آب بود. نتایج این تحقیق نشان داد که طول ریشه بیش از جوانه‌زنی دانه به تنش سرب حساس بوده است و کاهش شاخص تحمل جوانه‌زنی دانه محسوس‌تر از دو شاخص جوانه‌زنی نسبی و طول ریشه بود (شکل ۱) که با توجه به اینکه شاخص تحمل جوانه‌زنی، ترکیبی از اثرات دو شاخص دیگر را منعکس می‌نماید، قابل‌انتظار است. کبیر و همکاران (۲۸) نیز گزارش نمودند که جوانه‌زنی بذر، رشد دانه‌رست، وزن خشک و شاخص تحمل *Thespesia populnea* تحت تیمارهای ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میکرومولار سرب و کادمیوم نسبت به شاهد کاهش یافت و این کاهش مرتبط با کاهش فعالیت سلول‌های مریستمی و نیز کاهش بسیاری از آنزیم‌های موجود در لپه‌ها و اندوسپرم و نیز تولید گونه‌های فعال اکسیژنی بود. کاهش طول ریشه تحت تنش سرب بدلیل کاهش تقسیم سلولی ناحیه مریستمی، در پیاز (*Allium cepa*) هم گزارش شده است (۲۷ و ۳۸). بهرحال در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm سرب، درصد جوانه‌زنی بالاتر از ۶۰ و۴۰ درصد باقی ماند (شکل۱- الف) و مقادیر عددی بالای شاخص تحمل جوانه‌زنی دانه (شکل۱- ج) در این غلظت سرب بیانگر آن است که جوانه‌زنی بذر این گیاه تحمل نسبتاً بالایی به سرب دارد. چون در بسیاری از گیاهان جوانه‌زنی بوسیله غلظت‌های بسیار پایین سرب مهار می‌شود. مثلاً کوپیتک و همکاران (۲۹) نشان دادند سرب حتی در سطح میکرومولار اثرات سوء بر جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست *Vigna unguiculata* داشت. مشابه با نتایج ما مالار و همکاران (۳۱) نیز اعلام نمودند که آسیب کم دانه‌رست-های گیاه سنبل آبی در غلظت بالای سرب نشان دهنده این است که این گیاه مکانیسم مؤثری برای مقاومت به استرس القا شده توسط سرب دارد.

جوانه‌زنی از مراحل آسیب‌پذیر در چرخه زندگی گیاهان است. فلزات از دو طریق بر روی جوانه‌زنی دانه اثر می-گذارند: یکی بدلیل ماهیت سمی‌شان و دوم بدلیل ممانعت از جذب آب. مواجهه گیاهان با فلزات سنگین منجر به تغییر در فرایندها و ساختارهای سلولی می‌شود. یکی از اثرات آشکار سمیت فلز که در مرحله اولیه قابل‌مشاهده

می‌باشد کاهش در تکثیر و رشد سلول می‌باشد. در بذری که قرار است جوانه بزند، لازم است که پتانسیل آب جنین از یک آستانه بحرانی بگذرد. شواهد نشان می‌دهند که پتانسیل آب تا حدودی با تغییرات سرعت و درصد جوانه-زنی ارتباط دارد. بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که تنش فلزات با محدود نمودن جذب آب باعث کاهش جوانه‌زنی بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌شود (۳۰).

نتایج دومین آزمایش نشان داد ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه تابش با توان ۵ و ۱۰ میلی‌وات و ۵، ۱۰و ۲۰ دقیقه تابش با توان۱۵ میلی‌وات بطور معنی‌داری درصد جوانه‌زنی، انرژی جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول دانه‌رست و بنیه طولی را نسبت به شاهد افزایش دادند. تابش نوری لیزر با توان ۱۰ میلی‌وات بمدت ۲۰ دقیقه بهترین اثرات را نشان داد (شکل‌های۲ و۳). بطور مشابهی گزارش شده است که تابش لیزر هلیوم ـ نئون باقدرت ۱/۷ وات برای مدت ۹ دقیقه شاخص جوانه‌زنی دانه‌های *Acacia farnesiana* را تحت تأثیر قرارداد (۴۴). نتایج تحقیقات دیگر نیز نشان داد که پیش‌تیمار لیزر، جوانه‌زنی دانه‌های یونجه (۱۸)، تربچه (۳۵)، بادرنجبویه (۲۴) و ذرت و گندم (۴۵) را بهبود - بخشید.

چن و همکاران (۱۷) گزارش نمودند که لیزر هلیوم – نئون جوانه‌زنی دانه، بیوماس و رشد دانه‌رست *Isatis indogotica* را بطور قابل‌توجهی افزایش داد. آنها اعلام کردند که تغییرات آنتالپی در طی فرایند جوانه‌زنی دانه‌های پیش‌تیمار شده با نور لیزر بیشتر از نمونه‌های شاهد است. تغییر آنتالپی به گرما و انرژی درونی اشاره می‌نماید. لیزر بعنوان یک نور تأثیرگذار بوسیله ماکرومولکول‌ها جذب می‌گردد و در نتیجه دانه‌های تابش دیده با نور لیزر، انرژی بیشتری از محیط در مقایسه با نمونه‌های شاهد جذب می-کنند. لذا نور لیزر بخاطر اثرات الکترومغناطیسی و انرژی تولیدی مولکول‌های سلولی را تحت تأثیر قرار داده و باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها می‌گردد و همچنین آنتروپی و انرژی درونی دانه‌ها را در حین جوانه‌زنی افزایش می‌دهد و تعادل سینتیکی جوانه‌زنی دانه‌ها را تغییر می‌دهد. از سوی دیگر چون مطالعات نشان داده که جوانه‌زنی با تجمع رادیکال‌های آزاد در دانه‌ها مرتبط است و تجمع مقادیر کم ROS بمنزله سیگنالی برای راه‌اندازی فرایندهای جوانه‌زنی است، پیشنهاد شده است که احتمالاً با تابش لیزر، تولید ROS در دانه افزایش می‌یابد و همین امر باعث تسریع جوانه‌زنی می‌گردد که این موضوع به دوز استفاده شده و نیز گونه گیاهی بستگی دارد (۳۹).

نتایج این تحقیق نشان داد که ۴۰ دقیقه تابش با توان ۱۵ میلی‌وات، سرعت جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست خارمریم را نسبت به شاهد بطور معنی‌داری کاهش داد (شکل‌های ۲ و۳). احتمالاً شدت بالای لیزر تولید ROS در گیاهان را در حد زیادی افزایش می‌دهد که برخلاف مقادیر کم آن‌که محرک جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست بود، این مقادیر زیاد ROS اثرات مخرب و منفی بر گیاهان دارد. نتایج ولتژن و همکاران (۵۱) نیز نشان داد که شدت و مدت زیاد تابش لیزر دیود و CO_2 با طول موج‌های ۹۴۰ و ۱۰۶۰۰ نانومتر باعث کاهش رشد *Echinochloa crusgalli* و *Nicotiana tabacum* گردید. همچنین تیمار با شدت ۵ وات دیود لیزری میزان رشد گیاه *Stellaria media* را بطور قابل‌توجهی کاهش داد. در حالی‌که برای بهره‌گیری از اثرات مثبت لیزر بر رشد گیاهان شدت‌های پایین لیزر و بازه‌های زمانی بلند مدت مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما شدت بالای لیزر اثرات منفی را بر علف‌های هرز بر جای می‌گذارد و بعنوان یک علف‌کش طبیعی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۲). باصر کوچه‌باغ و همکاران (۳) در بررسی تأثیر تیمارهای مختلف امواج فراصوت، اشعه گاما و بتا، لیزر هلیوم–نئون و میدان مغناطیسی در سه مدت‌زمان ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه بر روی بذرهای گیاه تاتوره دریافتند که ۵ دقیقه تابش لیزر هلیوم–نئون طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، طول گیاه، وزن خشک و درصد جوانه‌زنی نهایی بذرهای گیاه تاتوره را در حد معنی‌داری افزایش داد اما اثر ۱۰ و

۱۵ دقیقه تابش لیزر هلیوم–نئون بر پارامترهای فوق کمتر از اثرات ۵ دقیقه تابش لیزر هلیوم–نئون بود و میزان این پارامترها با ۱۵ دقیقه تابش لیزر هلیوم–نئون حتی کمتر از بذرهای شاهد بود.

نتایج سومین آزمایش نشان داد در غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm سرب، جوانه‌زنی و فعالیت آلفا آمیلاز (شکل‌های ۴) و طول و وزن تر و خشک دانه‌رست (شکل‌های ۵) خارمریم کاهش یافت. تیمار ۲۰ دقیقه‌ای لیزر در مقایسه با شاهد جوانه‌زنی، طول و وزن تر و خشک دانه‌رست و فعالیت آلفا آمیلاز را در شرایط نرمال افزایش داد (شکل-های ۴ و ۵). آنزیم آلفا آمیلاز مهمترین آنزیم در مراحل اولیه جوانه‌زنی است و با تأمین سوبسترای رشد برای جنین دانه، جوانه‌زنی را تسریع می‌نماید. پودلسنی و همکاران (۴۰) نیز نشان دادند پیش‌تیمار دانه‌های لوپین و باقلا با لیزر هلیوم – نئون باعث افزایش انرژی درونی دانه-ها، افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز در لپه‌ها و تسریع جوانه-زنی شد. علاوه بر این، نور لیزر باعث افزایش وزن تر و خشک دانه‌رست‌ها و افزایش طول هیپوکوتیل و ریشه‌ها در باقلا و لوپین گردید. پروین و همکاران (۳۷) هم اعلام کردند اشعه لیزر پارامترهای ترمودینامیکی دانه را تحت تأثیر قرارداد و بطور قابل‌توجهی جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز را افزایش داد.

نتایج این تحقیق نشان داد دوز مناسب لیزر جوانه‌زنی دانه و فعالیت آلفا آمیلاز تحت تنش سرب را بهبود داد (شکل۴). و و همکاران (۵۲) نیز گزارش نمودند که تیمار لیزر هلیوم– نئون جوانه‌زنی و رشد ریشه و وزن تر دانه-رست کاج چینی را تحت تنش خشکی افزایش داد. آنها دریافتند که بهبود جوانه‌زنی دانه تحت تنش خشکی با تقویت فعالیت‌های آنزیمی در مدت جوانه‌زنی همراه بود و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مثل SOD و POD را در دانه‌رست‌ها افزایش داد.

بیوماس و وزن گیاه شاخص خوبی برای بنمایش گذاشتن خصوصیات رشد در حضور فلزات سنگین است. نتایج نشان داد که تیمار سرب، وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه دانه‌رست خارمریم را کاهش داد (شکل۵). بطور مشابهی فلزات سنگین وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه گیاه تربچه *Raphanus sativus* را کاهش دادند (۲۳). آلیا و همکاران (۱۴) نیز نشان دادند که Cd ، Pb و Zn در *Spinacia oleracea* اثرات منفی بر وزن تر و خشک ریشه و ساقه داشتند. تحقیق دیگری نیز نشان داد که Cd، Pb و Zn در *Brassica rapa* اثرات سمی بر جوانه‌زنی، رشد و وزن این گیاه بر جای گذاشتند (۴۳).

در این تحقیق پیش‌تیمار دانه‌های خارمریم با لیزر هلیوم-نئون، وزن تر و خشک ساقه و ریشه را در گیاهان تحت تنش سرب افزایش داد و بهترین اثر لیزر در غلظت ۲۵۰ppm سرب، با ۲۰ دقیقه تابش و در غلظت ۵۰۰ ppm سرب، با ۴۰ دقیقه تابش بدست آمد (شکل۵). فردوسی زاده و همکاران (۱۹) نیز گزارش کردند که پیش‌تیمار بلند مدت دانه‌ها با لیزر، وزن تر و خشک را تحت تنش شوری در گندم افزایش داد. مشابه با نتایج این تحقیق، محققان فوق دریافتند که بسته بمدت زمان قرارگیری در معرض نور لیزر، نتایج می‌تواند متفاوت باشد و تأثیرگذاری نور لیزر به نوع تنش هم‌بستگی دارد. بعنوان مثال برای غلظت-های مختلف شوری، بازه‌های زمانی متفاوتی از نور می-تواند در ایجاد تحمل در گیاهان مؤثر باشد. ابوالسود و شَهدا (۱۲) گزارش کردند پیش‌تیمار دانه‌های ذرت با لیزر هلیوم– نئون، طول و بیوماس بخش هوایی و وزن خشک ریشه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را در گیاهچه‌های ذرت تحت تنش UV را افزایش داد. گااو و همکاران (۲۰) نیز اعلام کردند که تیمار لیزر هلیوم– نئون تحمل به شوری در دانه‌رست فستوکای بلند را افزایش داد.

دو مکانیسم درباره نحوه اثر لیزر بر جوانه‌زنی و رشد گیاه در شرایط نرمال و تحت تنش پیشنهاد شده است: اول آنکه

فیتوکروم‌ها به این خاطر که طول‌موج لیزر هلیوم – نئون نزدیک به طول‌موج جذبی توسط فیتوکروم یعنی ۶۳۳ نانومتر است توسط لیزر هلیوم – نئون تحریک می‌گردند. با تحریک فیتوکروم‌ها، فعالیت آنزیم‌ها و فرایندهای مرتبط با فیتوکروم مانند جوانه‌زنی می‌تواند توسط نور لیزر افزایش یابد (۱۱، ۲۰، ۲۲، ۲۵و ۳۶). مکانیسم دوم آن است که تابش لیزر موجب جذب انرژی اضافی در دانه‌ها می‌شود و از طریق ایجاد میدان الکترومغناطیسی و گرما فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی را در گیاهان پیش‌تیمار شده با لیزر تشدید می‌نماید که نتیجه آن بصورت بهبود رشد و تحمل تنش تجلی می‌یابد (۱۱، ۲۱و ۲۵).

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از دوز مناسب لیزر جوانه‌زنی دانه و رشد اولیه دانه‌رست خار مریم تحت تنش سرب را بهبود داد. بهرحال برای آنکه روشن شود آیا پیش تیمار لیزری دانه‌ها در مزرعه نیز چنین اثراتی را نشان خواهد داد یا خیر تحقیقات بیشتری لازم است.

سپاسگزاری

از دانشگاه شهرکرد برای حمایت مالی و فراهم آوردن تجهیزات لازم برای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌شود. همچنین از آقای دکتر شهریاری برای کمک در تنظیم تجهیزات لیزری تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- ابراهیمی‌زاده ابریشمی، ا.، و عباسی، م.، ۱۳۸۸. بهینه‌سازی اثر نور لیزر در افزایش میزان جوانه‌زنی بذر گندم، فصلنامه پژوهش‌های گیاهی، شماره پیاپی ۱۳، سال چهارم، شماره ۱، صفحات ۶۱-۵۴.

۲- احمدی، ا.، مرتضایی نژاد، ف.، و گلپرور، ا.، ۱۳۹۵. بررسی اثر تیمار نور لیزر و تیمار اسید جیبرلیک بر میزان جوانه‌زنی بذر گیاه دارویی مریم گلی مزرعه روی *Salvia nemarosa*. دومین همایش ملی پدافند غیرعامل در بخش‌های کشاورزی، منابع طبیعی و محیط‌زیست با رویکرد توسعه پایدار، تعداد صفحات ۸.

۳- باصر کوچه‌باغ، س.، غروی کوچه‌باغ، پ.، اسلامی فرد، س.، بابایی، ع.، و پورعلی، س.، ۱۳۹۴. واکنش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه تاتوره به پیش‌تیمار فیزیکی بذر، همایش ملی گیاهان دارویی و داروهای گیاهی، ۷ صفحه

۴- چهرگانی راد، ع.، فرزان، س.، و شیرخانی، ز.، ۱۳۹۶. مطالعه اثر تیمار سرب بر برخی شاخص‌های مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه اطلسی (*Petunia hybrida* L.)، مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۰، شماره ۱، صفحات ۲۴۳-۲۲۶.

۵- حسین زاده ثابتی، ا.، نوری، ا.، خوش‌خلق سیما، ن.، رامشینی، ح.، و انصاری، م.، ۱۳۹۲. بررسی تأثیر اشعه لیزر بر صفات مرتبط باتحمل به شوری در مرحله گیاهچه ای برنج (*Oryza sativa* L.)، مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی، جلد پنجم، نیمه دوم، صفحات ۱۷۹-۱۶۱.

۶- زارع، ن.، نوری، ا.، خوش‌خلق سیما، ن.، و مرتضویان، م.، ۱۳۹۲. اثر لیزر بر تحمل گندم دوروم (*Triticum turgidum* var. durum) تحت شرایط تنش شوری، اولین همایش ملی تنش-های گیاهی غیر زیستی، ۵صفحه

۷- عموآقایی، ر.، ۱۳۹۲. تأثیر برخی هورمونها و ترکیبات ازته روی ظرفیت، سرعت و هماهنگی جوانه‌زنی بذرهای قیچ تحت تنش شوری، مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۶، شماره ۴، صفحات ۴۶۵-۴۷۵.

۸- میرشکاری، ب.، و صیامی، ر.، ۱۳۹۴. بهبود جوانه‌زنی، رشد اولیه و شاخص‌های دارویی بارهنگ سر نیزه‌ای (*Plantago lanceolata*) با پیش تیمار فیزیکی بذر، مجله بوم‌شناسی گیاهان زراعی، جلد ۱۱، شماره ۳، صفحات ۵۵-۴۷.

۹- نیک زاد چالشتری، خ.، و عموآقایی، ر.،۱۳۹۲. تأثیر پرایمینگ بر جوانه‌زنی دانه‌های گوجه‌فرنگی در دماهای زیر بهینه، مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۶، شماره ۲، صفحات ۲۲۶-۲۲۶.

10-Abraham, K., Sridevi, R., Suresh, B., and Damodharam, T., 2013. Effect of heavy metals (Cd, Pb, Cu) on seed germination of *Arachis hypogeae*, L. Asian J. Plant Sci. Res, 3(1), PP: 10-12.

11-Abu-Elsaoud, A. M., and Tuleukhanov, S. T., 2013. Can He-Ne laser induce changes in oxidative stress and antioxidant activities of wheat cultivars from Kasakhstan and Egypt? Sci. Int. 1 (3), PP: 39-50.

12-Abu-Elsaoud, A. M., and Shahda, R. H., 2017. Role of He-Ne laser pre-treatment in protecting *Zea mays* against the deleterious effects of ultraviolet radiations, Egypt. J. Exp. Biol. Bot. 13(2), PP: 403-422.

13-Aladjadjiyan, A., and Kakanakova, A., 2008. Physical methods inagro-food chain. J. Central Eur. Agric, 9(4), PP: 789-794.

14-Alia, N., Sardar, K., Said, M., Salma, K., Sadia, A., Sadaf, S., and Miklas, S., 2015. Toxicity and bioaccumulation of heavy metals in spinach (*Spinacia oleracea*) grown in a controlled environment. Int. J. Env. Res. Pub., Health, 12(7), PP: 7400-7416.

15-Association of Official Seed Analysis (AOSA). 1983. Seed vigour testing handbook. Contribution No. 32 to the Handbook on Seed Testing. Springfield, Association of Official Seed Analysis.

16-Barrena, R., Casals, E., Colon, J., Font, X., Sachez, A., and Puntes, V., 2009. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. Chemosphere, 75(7), PP: 850–857.

17-Chen, Y. P., Yue, M., and Wang, X. L., 2005. Influence of He–Ne laser irradiation on seeds thermodynamic parameters and seedlings growth of *Isatis indogotica*, Plant Sci, 168(3), PP: 601-606.

18-Cwintal, M., Dziwulska-Hunek, A., and Wilczek, M., 2010. Laser stimulation effect of seeds on quality of alfalfa. Int. Agrophys, 24(1), PP: 15–19.

19-Ferdosizadeh, L., Sadat-Noori, S. A., Zare, N., and Saghafi, S., 2013. Assessment laser pretreatments on germination and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. World J. Agri. Res, 1(1), PP: 5-9.

20-Gao, L. M., Li, Y. F., and Han, R., 2015. He-Ne laser preillumination improves the resistance of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) seedlings to high saline conditions. Protoplasma, 252(4), PP: 1135-1148.

21-Hernández Aguilar, C., Domínguez Pacheco, F. A., Cruz Orea, A., and Tsonchev, R. I., 2015. Thermal effects of laser irradiation on maize seeds. Int. Agrophys, 29(2), PP: 147-156.

22-Hernandez, A. C., Dominguez, P. A., Cruz, O. A., Ivanov, R., Carballo, C. A., and Zepeda, B. R., 2010. Laser in agriculture. Int. Agrophys, 24(4), PP: 407-422.

23-Hladun, K. R., Parker, D. R., and Trumble, J. T., 2015. Cadmium, copper, and lead accumulation and bio concentration in the vegetative and reproductive organs of *Raphanus sativus*: Implications for plant performance and pollination. J. Chem. Eco, 41(4), PP: 386-395.

24-Hoseini, M., Mirshekari, B., and Babazadeh-Igdir, H., 2013. Influence of biophysical priming on seed germination and yield on two landraces of lemon-balm (*Melissa officinalis* L.). Not. Sci. Biol, 5(2), PP: 238-243.

25-Jamil, Y., Perveen, R., Ashraf, M., Ali, Q., Iqbal, M., and Ahmad, M. R., 2013. He-Ne laser-induced changes in germination, thermodynamic parameters, internal energy, enzyme activities and physiological attributes of wheat during germination and early growth, Laser Phys. Lett. 10, PP: 5606- 5614.

26-Jiang, W., and Liu, D., 2010. Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L., BMC Plant Biol, 10(1), PP: 40–40.

27-Jiang, Z., Zhang, H., Qin, R., Zou, J., Wang, J., Shi, Q., and Liu, D., 2014. Effects of lead on the morphology and structure of the nucleolus in the root tip meristematic cells of *Allium cepa* L. Int. J. Mol. Sci, 15(8), PP: 13406-13423.

28-Kabir, M., Iqbal, M. Z., Shafiq, M., and Farooqi, Z. R., 2008. Reduction in germination and seedling growth of *Thespesia populnea* L., caused by lead and cadmium treatments, Pak. J. Bot, 40(6), PP: 2419-2426.

29-Kopittke, P. M., Asher, C. J., Kopittke, R. A., and Menzies, N. W., 2007. Toxic effects of Pb^{2+} on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). Environ. Pollut, 150(2), PP: 280-287.

30-Kranner, I., and Colville, L., 2010. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination, Env. Exp. Bot, 3, PP: 2-11.

31-Malar, S., Vikram, S. S., Favas, P. J., and Perumal, V., 2014. Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative

enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. Bot. Studies, 55, PP: 1-11

32-Mathiassen, S. K., Bak, T., Christensen, S., and Kudsk, P., 2006. The effect of laser treatment as a weed control method. Biosys. Eng, 95(4), PP: 497-505.

33-Michtchenko, A., and Hernández, M., 2010. Photobiostimulation of germination and early growth of wheat seeds (*Triticum aestivum* L) by a 980 nm semiconductor laser. Rev. Cub. Fís, 27(2B), PP: 271-274.

34-Murphy, J. M., Caban, M., and Kemper, K. J., 2000. Milk thistle (*Silybum marianum*). Longwood Herb Task Force Center Holistic Pediatr Ed Res, PP: 1-25.

35-Muszyn´ski, S., and Gładyszewska, B., 2008. Representation of He–Ne laser irradiation effect on radish seeds with selected germination indices. Int. Agrophys, 22(2), PP: 151–157.

36-Muthusamy, A., Kudwa, P. P., Prabhu, V., Mahato, K. K., Babu, V. S., Rao, M. R., Gopinath, P. M., and Satyamoorthy, K., 2012. Influence of Helium-Neon laser irradiation on seed germination in vitro and physico-biochemical characters in seedlings of Brinjal (*Solanum melongena* L.) var. Mattu Gulla. Photochem. Photobiol, 88(5), PP: 1227-1235.

37-Perveen, R., Ali, Q., Ashraf, M., Al-Qurainy, F., Jamil, Y., and Ahmad, M. R. S., 2010. Effects of different doses of low power continuous wave He–Ne laser radiation on some seed thermodynamic and germination parameters, and potential enzymes involved in seed germination of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Photochem. Photobiol, 86(5), PP: 1050-1055.

38-Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., and Malecka, A., 2002. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. Phytochem, 60(2), PP: 153–162.

39-Podlesny, J., Misiak, L., and Koper, R., 2001. Concentration of free radicals in faba bean seeds after the pre-sowing treatment of the seeds with laser light. Int. Agrophys, 15(3), PP: 185–189.

40-Podlesny, J., Stochmal, A., Podleśna, A., and Misiak, L. E., 2012. Effect of laser light treatment on some biochemical and physiological processes in seeds and seedlings of white lupine and faba bean. Plant Growth Regul, 67(3), PP: 227-233.

41-Sengar, R. S., Gautam, M., Garg, S. K., Sengar, K., and Chaudhary, R., 2009. Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants, "Rev. Environ. Contam.Tox, 196, PP: 1–21.

42-Shen, S. K., Wu, F. Q., Yang, G. S., Wang, Y. H., and He, S. Z., 2016. Seed germination and seedling emergence of *Euryodendron excelsum* HT Chang: implications for species conservation and restoration. Plant Species Bio, 31(3), PP: 233–239.

43-Siddiqui, M. M., Abbasi, B. H., Ahmad, N., Ali, M., and Mahmood, T., 2014. Toxic effects of heavy metals (Cd, Cr and Pb) on seed germination and growth and DPPH-scavenging activity in *Brassica rapa* var. turnip. Toxic Ind. Health, 30(3), PP: 238-249.

44-Soliman, A. S. H., and Harith, M. A., 2010. Effects of laser biostimulation on germination of *Acacia farnesiana*m (L.) Willd. Acta Hort, 854, PP: 41-50.

45-Srećković, M., Vasić, R., Dukić, M., Jevtić, S., and Jovanić, P., 2014. The influence of diode and He-Ne Lasers on corn and wheat seeds. J. Agri. Sci. Technol., B, 4(3B), PP: 165-175.

46-Tian, J., Jin, L. H., Li, J. M., Shen, B. J., Wang, C. Y., Lu, X., and Zhao, X. L., 2009. Effect on isoflavone of soybean seedlings by 532 nm laser irradiation. Saratov, Fall Meet, PP: 754-756.

47-Tomulescu, I. M., Radoviciu, E. M., Merca, V. V., and Tuduce, A. D., 2004. Effect of copper, zinc and lead and their combinations on the germination capacity of two cereals. J. Agri, Sci, 15, PP: 15-24.

48-Vasilevski, G., 2003. Perspectives of application of biophysical methods in sustainable agriculture. Bulg. J. Plant Physiol, 29(3), PP: 179-186.

49-Vecchia, F. D., Larocca, N., Moro, I., Defaveri, S., Andreoli, C., and Rascio, N., 2005. Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea Canadensis* exposed to cadmium. Plant Sci, 168(2), PP: 329–338.

50-Verma, S., and Dubey, R. S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci, 164(4), PP: 645–655.

51-Woltjen, C., Haferkamp, H., Rath, T., and Herzog, D., 2008. Plant growth depression by selective irradiation of the meristem with CO_2 and diode lasers. Biosys. Eng, 101(3), PP: 316-324.

52-Wu, J., Gao, X., and Zhang, S., 2007. Effect of laser pretreatment on germination and membrane lipid peroxidation of Chinese pine seeds under drought stress. Front. Bio. China, 2(3), PP: 314-317.

53-Xiao, Z., Storms, R., and Tsang, A., 2006. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. Analytical Biochem, 351(1), PP: 146-148.

The effect of laser pretreatment on seed germination indices and α-amylase activity and growth of *Silybum marianum* L. seedling in normal condition and under Pb stress

Banisharif[1,2] A. and Amooaghaie R.[3]

[1] Dept. of Plant Sciences, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

[2] Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, PhD student Plant Physiology, Tehran, I.R. of Iran

[3] Dept. of Biology, Biotecnology Research Institute, Shahrekord University, Shahrekord, I. R. of Iran

Abstract

Recently, seed pre-treatment with helium-neon laser as one of the safest methods for enhancing seed germination, seedling growth and increasing stress tolerance of plants attracted the keen interest of scientific community. Therefore, in this study the effect of laser was investigated on the germination indices of *Silybum marianum* L. at normal condition and under Pb stress. The first, effect of various concentrations of lead nitrate (0, 125, 250, 500 and 1000 ppm) were evaluated on relative seed germination, root resistance index and germination tolerance index of *Silybum marianum* seeds at a completely randomize design. The results showed that 125 ppm lead nitrate had no significant effect on seed germination and root growth, but higher concentrations reduced above-mentioned parameters. Second experiment, the effect of various powers (5, 10 and 15 mW) and different times (0, 5, 10, 20, and 40 minutes) of He–Ne laser radiation on seed germination at a factorial experiment with completely randomize design showed that the maximum seed germination percentage, germination velocity, germination energy, seedling length and vigor index were obtained by He–Ne laser irradiation with 10 mW power for 20 min. In the third experiment, the interactive effect of irradiation times (0, 20 and 40 minutes) He–Ne laser with 10 mW power and lead nitrate concentrations (0, 250 and 500 ppm) was assessed at a factorial experiment with completely randomize design showed that He–Ne laser increased seed germination percentage, α-amylase activity and seedlings growth at a dose-dependent pattern at both with and without pb stress conditions.

Key words: Pb stress, *Silybum marianum*, laser, germination, growth