



دانشگاه گیلان، دانشکده کشاورزی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و نهم، شماره دوم، ۱۳۹۸

۱۵۷-۱۷۱

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2019.14942.2337

تأثیر پلی آمین‌ها بر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) در شرایط تنش خشکی

ژیلا توپچی خسروشاهی^۱، * سید یحیی صالحی لیسار^۲، کاظم قاسمی گلعدانی^۳ و روح‌اله متفکر آزاد^۴

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، ایران،

^۲ دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران،

^۳ استاد گروه اکوفیزیولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران،

^۴ استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۱/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: خشکی رایج‌ترین عامل تنش‌زای غیرزیستی می‌باشد که بیش از سایر عوامل، رشد و نمو گیاهان را کاهش می‌دهد. از این جهت، شناسایی عوامل مؤثر در افزایش تحمل گیاهان نسبت به خشکی ضروری است. گیاهان در مقابله با خشکی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را برای مقابله با تنش اکسیداتیو افزایش می‌دهند. پلی‌آمین‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد، نقش مهمی در حفظ تمامیت غشاهای سلولی و کاهش تولید گونه‌های اکسیژن فعال در شرایط تنش خشکی دارند. گلرنگ یک گیاه زراعی روغنی، دارویی و صنعتی از تیره آفتابگردان است. بسیاری از مطالعات بر روی گیاهان دیگر نشان داده‌اند که پلی‌آمین‌ها سبب افزایش تحمل به تنش‌های محیطی می‌شوند، اما واکنش گلرنگ به غلظت‌های مختلف پوتریسین + اسپرمین تحت تنش خشکی مشخص نیست. بر همین اساس، این پژوهش برای بررسی تأثیر پلی‌آمین‌های مزبور روی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و پایداری غشاها در گلرنگ انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: این آزمایش در سال ۱۳۹۶-۱۳۹۵ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه تبریز انجام گرفت. در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف پوتریسین + اسپرمین (۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز)، غلظت مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و نشت الکترولیت، آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (فنل‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها) در گلرنگ تحت آبیاری کامل (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و آبیاری محدود (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان در مرحله ۶-۷ برگی برای اندازه‌گیری‌های مختلف برداشت شدند.

یافته‌ها: آبیاری و محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها، میزان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی، غلظت مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و نشت الکترولیت را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد. اثر متقابل این عوامل نیز برای تمام صفات معنی‌دار بود. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسیددیسموتاز، فلاونوئید کل برگ‌ها و و آنتوسیانین‌ها در اندام هوایی به‌طور معنی‌داری

* مسئول مکاتبه: y_salehi@tabrizu.ac.ir

تحت تیمار خشکی نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. محلول‌پاشی غلظت‌های ۶۰+۴۰ میکرومولار و ۴۰+۶۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین در گیاهان تحت تنش سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و غلظت آنتوسیانین‌ها گردید. تنش خشکی در برگ‌ها سبب افزایش معنی‌دار محتوای مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و نشت الکترولیت‌ها گردید. غلظت مالون‌دی‌آلدئید و میزان نشت الکترولیت‌ها در نتیجه کاربرد پوتریسین + اسپرمین به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند.

نتیجه‌گیری: تنش خشکی با القاء تنش اکسیداتیو اثر منفی بر رشد گیاه گلرنگ داشت. به‌طور کلی کاربرد ۶۰+۴۰ میکرومولار و ۴۰+۶۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین در کاهش گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از کمبود آب مؤثر بودند. محلول‌پاشی برگی ۴۰+۶۰ میکرومولار پوتریسین+اسپرمین، پراکسیداسیون لیپیدها، نشت الکترولیت و غلظت پراکسید هیدروژن را از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها کاهش داد و منجر به افزایش تحمل خشکی گلرنگ گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که محلول‌پاشی ۶۰+۴۰ میکرومولار و ۴۰+۶۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین می‌تواند برای کاهش اثرات مخرب تنش خشکی در مراحل اولیه رشد گیاه استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداسیون لیپید، پلی‌آمین، تنش خشکی، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، گلرنگ

مقدمه

پلی‌آمین‌ها در گیاهان سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنش می‌شود. پلی‌آمین‌ها پلی‌کاتیون‌های آلی هستند که در فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشد، نمو و پاسخ به تحمل تنش نقش مهمی دارند (۱۰). پلی‌آمین‌ها سبب افزایش تولید اسید آسبزیک تحت تنش خشکی می‌گردند (۳). در گیاهان عالی پلی‌آمین‌ها به فرم پوتریسین (Put)، اسپرمیدین (Spd) و اسپرمین (Spm) یافت می‌شوند. پلی‌آمین‌ها در پاسخ به خشکی به مقدار زیادی انباشته می‌شوند و در همانندسازی DNA و فسفریلاسیون پروتئین، تغییر فعالیت آنزیم‌ها و حفظ یکپارچگی و بقای غشای سیتوپلاسمی و اندامک‌های سلولی نقش دارند (۱۱) و (۲۰). موتانت‌های فاقد ژن‌های بیوسنتزی پلی‌آمین‌ها و حساس به تنش با کاربرد برون‌زای پلی‌آمین‌ها نسبت به تنش مقاوم‌تر می‌شوند (۲۸). پلی‌آمین‌ها در شرایط تنش ضعیف به‌عنوان پاک‌کننده رادیکال‌های سوپراکسید آزاد، ولی در شرایط تنش شدید به‌عنوان تنظیم‌کننده مثبت ژن‌های آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کنند. افزایش تحمل تنش‌های غیرزیستی با استفاده از پلی‌آمین‌ها

خشکی به‌شدت بر رشد و تولید گیاهان در سرتاسر دنیا تأثیر دارد و افزایش میانگین دمای کره زمین این اثر را شدید کرده است (۹). خشکی از ویژگی‌های بارز کشور ایران می‌باشد و بخش زیادی از اراضی زیر کشت کشور، در مناطق خشک و نیمه‌خشک قرار دارند (۹). خشکی سبب کاهش پتانسیل آب برگ، بستن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز و القاء تنش اکسیداتیو، تغییر تمامیت دیواره سلولی و تولید متابولیت‌های سمی و در نهایت کاهش رشد گیاهان می‌شود (۱۵). در شرایط خشکی برخی گونه‌های فعال اکسیژن مانند رادیکال سوپراکسید، یون هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن تولید می‌شوند که باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و اکسیداسیون پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌گردند (۲۳). در سال‌های اخیر حفظ عملکرد و افزایش تحمل گیاهان، به‌خصوص گیاهان زراعی تحت تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی از اهمیت زیادی برخوردار شده است. کاربرد برون‌زای ترکیبات آلی گوناگون مانند

صنعتی مطرح می‌باشد (۱۴). مطالعه روی گیاهان زراعی مانند گلرنگ که تحمل بیش‌تری به کمبود آب با حفظ بازدهی دارند، یک نیاز اساسی آینده می‌باشد و توجه به عوامل تأثیرگذار در کاهش اثرات تنش خشکی ضروری است (۲۰). با توجه به اثر پلی‌آمین‌ها در افزایش تحمل سایر گیاهان تحت تنش و به این دلیل که پاسخ‌های زیست- شیمیایی گلرنگ به غلظت‌های ترکیبی پلی‌آمین‌های اسپرمین و پوتریسین تحت شرایط کمبود آب مشخص نیست، در این پژوهش اثر ترکیبی این دو پلی‌آمین در افزایش احتمالی مقاومت به تنش خشکی در این گیاه مورد بررسی قرار گرفت. تأثیر این پلی‌آمین‌ها بر سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز)، سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی (فنل‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها)، غلظت مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و نشت الکترولیت در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*)، رقم بهاره گل‌دشت از مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان شرقی تهیه گردید و به مدت ۵ تا ۷ دقیقه با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شدند. در آزمایش مقدماتی اول، گیاهان در مرحله شروع سه‌برگی (۳۰ روز پس از کشت) برای تعیین مناسب‌ترین سطح تنش خشکی، با پنج سطح آبیاری ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (FC) با سه تکرار به مدت دو هفته تیمار شدند. با اندازه‌گیری شاخص‌های رشد، سطح آبیاری ۴۰ درصد ظرفیت زراعی برای اعمال تنش خشکی در آزمایش‌های بعدی انتخاب شد (داده‌ها نشان داده نشده است). در آزمایش مقدماتی دیگر، گیاهان پس از دو هفته تنش

به دلیل درگیری آن‌ها در مسیر ترانسسانی علامت^۱ می‌باشد (۲۳). کاربرد برون‌زای آن‌ها سبب کاهش ممانعت رشد القاء شده با تنش می‌شود. این پاسخ عمدتاً با حفاظت غشاء از طریق مهار پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش صدمه تنش اکسیداتیو صورت می‌گیرد. حفظ تمامیت غشاء، کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید و افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه در افزایش تحمل تنش کم‌آبی نقش زیادی دارند (۲۳). گیاهان برای مقابله با تنش‌ها دو نوع سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی دارند (۲۰ و ۲۵). سیستم آنتی‌اکسیدانی، گیاه را در مقابل صدمات انواع اکسیژن فعال حفاظت می‌کند (۱۸). تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یکی از راهبردهایی است که در گیاهان برای افزایش تحمل تنش رخ می‌دهد. گونه‌های گیاهی که به تنش مقاوم‌تر هستند، مقدار آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی آن‌ها، تحت تنش، افزایش بیش‌تری یافته و از غشا در مقابل صدمات ناشی از تنش محافظت می‌کند (۲). افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز تحت تنش شدید خشکی در گیاه بنگ دانه (*Hyosyamus niger* L.) مشاهده گردیده است که با کاربرد پوتریسین فقط کاتالاز افزایش می‌یابد (۲۹). در بابونه آلمانی تحت تنش خشکی، ۰/۱ میلی‌مولار پوتریسین، سبب تحریک فعالیت آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتیون ردوکتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز شده است. نخستین محلول‌پاشی، ۴۵ روز پس از کاشت بود. تنش خشکی در بابونه آلمانی باعث افزایش فعالیت این آنزیم‌ها شد. کاربرد پوتریسین نیز سبب تحریک فعالیت این آنزیم‌ها شد (۲۱).

گونه زراعی گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) گیاهی یک‌ساله از تیره آفتابگردان است. گلرنگ به‌عنوان گیاه زراعی چندمنظوره روغنی، دارویی و

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: نمونه‌ها در نیتروژن مایع پودر شده و عصاره‌های آنزیمی در بافر فسفات پتاسیم/ فسفات سدیم با غلظت ۵۰ میلی‌مولار استخراج و ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ساتریفوژ شدند. روش‌ناور جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز استفاده شدند. فعالیت آنزیم (CAT, EC 1.11.1.6) طبق روش چنس و مهلی (۵) و با اندازه‌گیری کاهش جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت سه دقیقه با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Dynamica, Halo- db-20 series, Switzerland) اندازه‌گیری شد. هر واحد فعالیت آنزیم کاتالاز، مقدار آنزیم لازم برای احیاء یک میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه در نظر گرفته شد. سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.1) با ثبت کاهش در جذب نور در طول موج ۲۹۰nm مطابق روش بومیناتان و دوران (۴) به مدت سه دقیقه سنجش گردید. یک واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی است که ۱ میکرومول آسکوربیک اسید را در مدت یک دقیقه اکسید کند. سپس فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم به ازای هر میلی‌گرم پروتئین برای همه نمونه‌ها و با استفاده از ضریب خاموشی اسید آسکوربیک (۲/۸ بر میلی‌مول بر سانتی‌متر) محاسبه شد. سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX, EC 1.11.1.7) به روش اینگر و همکاران (۲۲) با اندازه‌گیری افزایش جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر طی پلیمریزاسیون گایاکول و تشکیل تترآگایاکول انجام گرفت. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی گایاکول (۲۶/۶ بر میلی‌مول بر سانتی‌متر) محاسبه گردید و یک واحد فعالیت، مقدار آنزیم لازم جهت اکسیداسیون یک میکرومولار گایاکول به تترآگایاکول در دقیقه در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1) با

۴۰ درصد ظرفیت زراعی، با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار هر کدام از پلی‌آمین‌های پوتریسین و اسپریمین، به‌طور جداگانه، فقط یک بار محلول‌پاشی شدند. در نهایت پس از دو هفته گیاهان برداشت شده و پس از اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیک، غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میکرومولار از هر پلی‌آمین، به‌عنوان مؤثرترین غلظت هر پلی‌آمین در ایجاد تحمل گیاه به تنش خشکی انتخاب شدند. در آزمایش اصلی، بذرها در گلدان‌های پلاستیکی و در بستر پرلیت کشت شدند و با آب مقطر تا حد ظرفیت زراعی (FC)، آبیاری گردیدند. ظرفیت زراعی پرلیت به روش وزنی اندازه‌گیری شد و بقیه سطوح آبیاری با توجه به آن محاسبه گردیدند. گیاهان در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰ درصد و در دوره روشنایی/ تاریکی ۱۶/۸ ساعت نگهداری شدند. روز هفتم از محلول هوگلند ۵۰ درصد و روز چهاردهم تا مرحله سه‌برگی گیاهان، از محلول هوگلند ۱۰۰ درصد در حد ظرفیت زراعی جهت جبران آب از دست داده گیاهان استفاده شد. مقاومت گیاهان در مرحله سه‌برگی می‌تواند نمایانگر تحمل گیاه در مراحل بعدی نیز باشد. محلول غذایی هر هفته به گیاهچه‌ها داده شد. برای محاسبه میزان آب مورد نیاز هر گلدان از روش توزین گلدان‌ها و تعیین میانگین آن به‌عنوان آب مصرفی تیمارها استفاده گردید (۷). گیاهان گلرنگ در مرحله سه‌برگی با سطوح مختلف (۴۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و غلظت‌های ترکیبی ۰+۰، ۰+۴۰، ۴۰+۴۰، ۴۰+۶۰، ۶۰+۶۰ و ۶۰+۱۰۰ میکرومولار پوتریسین + اسپریمین به‌ترتیب محلول‌پاشی شدند. دو هفته بعد از محلول‌پاشی (۶۰ روز پس از کشت)، گیاهان جهت بررسی واکنش‌های زیست-شیمیایی برداشت شدند.

گرم وزن تر گیاه با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با ۱،۱،۳،۳، تترا اتوکسی پروپان (۱۰۰-۰) میکرومولار محاسبه شد (۴).

نشت الکتروولت‌ها: ۰/۱ گرم از برگ مشخص گیاه (چهارم یا پنجم) وزن گردید و به قطعات هم‌اندازه خرد شد. قطعات برگی با آب مقطر شستشو و در ۱۰ میلی‌لیتر آب بدون یون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شناور شدند. هدایت الکتریکی محلول پس از ۲۴ ساعت (EC₁) ثبت گردید. سپس قطعات برگ در بن‌ماری با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت قرار گرفتند و هدایت الکتریکی آن‌ها (EC₂) مجدداً اندازه‌گیری شد. میزان نشت الکتروولت‌ها طبق روش لوتس و همکاران (۱۶) و با استفاده از رابطه (۱) به دست آمد.

$$(۱) \quad \text{نشت الکتروولت} = (EC_1 / EC_2) \times 100$$

محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین‌ها: مقدار ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی در ۵ میلی‌لیتر متانول در یک هاون چینی ساییده شد. سپس، همگنای حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ گردید و روشناور برای سنجش فنل و فلاونوئید کل استفاده شد. برای سنجش فنل کل، ۱۰۰ میکرولیتر از فاز رویی با ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. در نهایت جذب محلول‌ها در ۷۲۰ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد (۱۷). جهت سنجش فلاونوئید کل، ۵۰۰ میکرولیتر از فاز رویی با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیم کلراید ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. جذب محلول‌ها در ۴۱۵ نانومتر نسبت به شاهد ثبت شد (۱۶). برای ترسیم منحنی استاندارد

روش ویتتر بورن و همکاران (۲۷) براساس اندازه‌گیری میزان ممانعت از احیاء نوری نیترو بلو تترازولیوم (NBT) توسط عصاره آنزیمی صورت گرفت. مقدار آنزیم لازم برای ممانعت ۵۰ درصدی از احیاء نوری NBT به‌عنوان یک واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد. فعالیت ویژه آنزیم‌ها به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA): استخراج عصاره‌های گیاهی در محلول ۰/۱ درصد از تری‌کلرواستیک اسید (TCA) انجام گرفت و نمونه‌ها ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شدند. ۰/۵ میلی‌لیتر از روشناور با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مول با pH=۷ و یک میلی‌لیتر محلول پتاسیم یدید ۱ M مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. محلول‌های استاندارد پراکسید هیدروژن در محدوده صفر تا ۱۲۰ میکرومولار تهیه شد و جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ nm توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و مقدار پراکسید هیدروژن نمونه‌ها به روش هاریناسوت و همکاران (۱۲) بر حسب واحد میکرومول بر گرم وزن تر گیاه گزارش شد. برای سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدئید، ۰/۲ گرم از بافت تازه برگی توزین و در هاون چینی حاوی دو میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد، ساییده شد و همگنای حاصل به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. به یک میلی‌لیتر از روشناور، چهار میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلرواستیک ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد اسید تیوباربتوریک، افزوده شد. مخلوط حاصل پس از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد، بلافاصله در یخ خردشده سرد گردید. مخلوط سرد شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس شدت جذب نور در طول موج ۵۲۳ نانومتر ثبت و غلظت MDA بر حسب واحد میکروگرم بر

فنل و فلاونوئید به ترتیب از اسید گالیک (۱۰۰-۰) میکروگرم و کوئرستین (۵۰۰-۰) میکروگرم استفاده شد. غلظت فنل کل بر اساس میلی گرم اکی‌والان گالیک اسید بر گرم وزن تر گیاه و غلظت فلاونوئیدها معادل میلی گرم اکی‌والان کوئرستین بر گرم وزن تر گیاه بیان گردید. برای سنجش غلظت آنتوسیانین‌ها، ۰/۰۲ گرم از بافت خشک گیاهی با ۴ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک یک درصد حاوی ۳۹۶ میلی لیتر متانول در یک هاون ساییده و ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. روشناور جدا شد و جذب محلول‌ها در ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. محتوای آنتوسیانین‌های نمونه‌ها با استفاده از (رابطه ۲) محاسبه شد (۱۹).

$$A = A_{530} - (0.25 \times A_{657}) \quad (2)$$

که در آن، A جذب نوری نمونه و اعداد اندیس نشانگر طول موج‌هایی است که جذب در آن‌ها اندازه‌گیری شد.

طرح آزمایشی و تجزیه داده‌ها: آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو عامل، شامل دو سطح خشکی ۴۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی و غلظت‌های مختلف پوتریسین + اسپرمین به ترتیب (۰+۰، ۴۰+۴۰، ۶۰+۴۰ و ۴۰+۶۰) میکرومولار در سه تکرار اجرا گردید. تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SAS (9.2) و با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گردید. شکل‌ها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ تهیه گردید.

نتایج و بحث

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: اثرات آبیاری و محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برگ معنی‌دار بود. اثر متقابل این

عامل‌ها برای این صفات در برگ معنی‌دار گردید (جدول ۱). فعالیت تمام آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ریشه و فعالیت آنزیم‌ها غیر از آسکوربات پراکسیداز در برگ به‌طور معنی‌داری در شرایط تنش خشکی در مقایسه با تیمار آبیاری کامل افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ و ریشه گیاه گلرنگ تحت تنش خشکی، نشان‌دهنده نقش مهم آن‌ها در دفاع آنتی‌اکسیدانی و نوعی سازگاری با شرایط تنش است که با نتایج حجتی و همکاران (۲۰۱۱) در گیاه گلرنگ تحت خشکی و فرهنگی آبریز و همکاران (۲۰۱۸) در گیاه سویا تحت تنش شوری مطابقت دارد (۸ و ۱۳). اسپری برگی غلظت‌های ۴۰+۶۰ و ۶۰+۴۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین در گیاهان تحت خشکی به ترتیب سبب افزایش بسیار معنی‌دار فعالیت کاتالاز و افزایش ۵/۸۸ و ۴۵/۸۸ درصدی سوپراکسید دیسموتاز برگ نسبت به گیاهان تحت تنش بدون محلول‌پاشی شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ریشه به ترتیب با تیمار ۴۰+۶۰ و ۶۰+۴۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین افزایش ۲۳/۵۰ و ۵۰/۸۷ درصدی نسبت به گیاهان تحت تنش بدون پلی‌آمین نشان داد. در شرایط آبیاری کامل نیز محلول‌پاشی غلظت‌های ترکیبی این پلی‌آمین‌ها اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌ها در برگ و ریشه داشت ($P \leq 0.05$) (جدول ۲). پلی‌آمین‌ها تحمل تنش خشکی را با دفاع آنتی‌اکسیدانی از طریق درگیری در سیستم ترانسسانی پراکسید هیدروژن تنظیم می‌کنند (۳۱). رابطه‌ای بین سطوح آنتی‌اکسیدانی و تحمل کمبود آب وجود دارد (۱۳). این آنزیم‌ها با سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن در ایجاد مقاومت به تنش اکسیداتیو در گلرنگ نقش اساسی دارند. نتایج مشابهی در گیاه شبدر سفید تیمار شده با اسپرمیدین تحت تنش خشکی و گیاه سویا تیمار شده با سالیسیلیک اسید در شوری مشاهده شده است (۸ و ۳۱).

در مقایسه با گیاهان تحت تنش بدون پلی‌آمین شد (جدول ۲). در بررسی دیگری اثر پوتریسین در تخفیف صدمات اکسیداتیو گیاه شبر سفید تحت تنش خشکی مورد بررسی و کاهش غلظت پراکسید هیدروژن مشاهده گردیده است (۳۱). در ریشه کاربرد غلظت‌های ۴۰+۶۰ و ۶۰+۴۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین در گیاهان تیمار شده با خشکی سبب افزایش معنی‌دار H_2O_2 شد. در ریشه پراکسید هیدروژن می‌تواند به‌عنوان پیام‌رسان عمل کرده و تولید بسیاری از ترکیبات دفاعی را در گیاهان در پاسخ به تنش خشکی القا کند. در بین گونه‌های فعال اکسیژن، پراکسید هیدروژن پایدار است و به آسانی قابل انتشار بوده و از طریق غشاهای سلولی در چندین فرآیند ملکولی و فیزیولوژیکی در گیاهان شرکت می‌کند. افزایش H_2O_2 در ریشه گیاهان تیمار شده با پلی‌آمین‌های برون‌زا می‌تواند نتیجه کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها نیز باشد (۳۰).

کاهش معنی‌دار غلظت مالون‌دی‌آلدئید پس از اعمال غلظت‌های ۴۰+۶۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین در شرایط آبیاری کامل در برگ و ریشه مشاهده گردید. تغییرات معنی‌داری در غلظت H_2O_2 و میزان نشت الکترولیت‌ها پس از اعمال پلی‌آمین‌ها در تیمار آبیاری نرمال در برگ مشاهده شد (جدول ۲). استفاده از غلظت‌های ترکیبی اسپرمین و پوتریسین در برگ گیاهان تحت تنش سبب کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید، نشت الکترولیت‌ها و غلظت پراکسید هیدروژن گردید که با پژوهش‌های امری و همکاران (۲۰۱۰) در گیاه سیتروس، سایکت و همکاران (۲۰۱۶) در ارقام مختلف گیاه برنج، زنگ و همکاران (۲۰۱۳) در دانه رست گوجه‌فرنگی مطابقت دارد (۱، ۲۴ و ۳۰).

مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و نشت الکترولیت‌ها: آبیاری در حد ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها، مقادیر MDA، H_2O_2 و نشت الکترولیت را به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر قرار دادند. اثر متقابل آبیاری در حد ۴۰ درصد ظرفیت زراعی \times محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها بر این صفات معنی‌دار بود (جدول ۱). میزان مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن (جدول ۲) و میزان نشت الکترولیت‌های برگ (شکل ۱) در شرایط تنش خشکی افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار آبیاری کامل نشان دادند که انباشتگی گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لپیدها را در محدودیت آبی نشان می‌دهد. نشت الکترولیت برای ارزیابی پایداری غشای پلاسمایی اندازه‌گیری می‌شود و غلظت مالون‌دی‌آلدئید نیز یک نشانگر برای مشخص کردن میزان صدمات اکسیداتیو به غشاها است (۲۰ و ۲۶). در این پژوهش تنش خشکی سبب تولید پراکسید هیدروژن شده و پراکسید هیدروژن اضافی سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌گردد. اگر پراکسید هیدروژن تولید شده به موقع از سلول دفع نشود، آنیون‌های سوپراکسید تولید شده در سلول منجر به تولید رادیکال هیدروکسیل می‌شوند که برای سلول بسیار خطرناک است (۲۹). وجود همبستگی مثبت بین غلظت پراکسید هیدروژن و انباشت مالون‌دی‌آلدئید ($r=0/305^*$) نشان از پراکسیداسیون لپیدهای غشائی دارد و همچنین بیانگر آن است که افزایش نشت الکترولیت‌ها در شرایط تنش خشکی به‌دلیل آسیب وارد شده به غشاهای سلولی است (جدول ۵).

کاربرد غلظت‌های ۴۰+۶۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین به‌ترتیب در گیاهان تحت تنش سبب کاهش معنی‌دار غلظت MDA و پراکسید هیدروژن در برگ

جدول ۱- تجزیه واریانس میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، غلظت مالون‌دی‌آلدید و پراکسید هیدروژن برگ‌ها و ریشه‌ها و نشت الکترولیت برگ گلرنگ تحت سطح مختلف آبیاری در واکنش به محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها.
Table 1. Analysis of variance of the antioxidant enzymes activities, MDA and H₂O₂ contents of leaves and roots and leaf electrolyte leakage of safflower grown under different levels of watering in response to foliar applications of polyamines.

منابع تغییرات Sources of variation	df	میانگین مربعات (برگ) Mean square (leaf)							نشت الکترولیت EL
		APX	CAT	SOD	POX	MDA	H ₂ O ₂	EL	
تکرار Replicate	2	0.00002 ^{ns}	0.415 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.386 ^{ns}	0.213 ^{ns}	0.156 ^{ns}	0.751 ^{ns}	
آبیاری Irrigation	1	0.00338 ^{**}	17.423 ^{**}	33.96 ^{**}	184.48 ^{**}	1019.46 ^{**}	22270.52 ^{**}	194.19 ^{**}	
پلی‌آمین‌ها polyamines	3	0.00065 ^{**}	9.613 ^{**}	4.17 ^{ns}	162.98 ^{**}	481.76 ^{**}	25651.42 ^{**}	6001.02 ^{**}	
محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها × آبیاری Irrigation × Polyamines	3	0.00025 ^{**}	2.348 ^{**}	7.04 ^{**}	173.35 ^{**}	323.42 ^{**}	2491.64 ^{**}	2924.70 ^{**}	
خطا Error	14	0.000007	0.698	1.045	1.685	0.278	0.098	0.348	
ضرب تغییرات (درصد) (%) CV		7.14	4.45	5.42	4.90	1.82	0.319	0.947	

منابع تغییرات Sources of variation	df	میانگین مربعات (ریشه) Mean square (root)							نشت الکترولیت EL
		APX	CAT	SOD	POX	MDA	H ₂ O ₂	EL	
تکرار Replicate	2	0.000008 ^{ns}	0.072 ^{ns}	0.924 ^{ns}	0.108 ^{ns}	0.692 ^{ns}	0.751 ^{ns}	-	
آبیاری Irrigation	1	0.000028 ^{**}	3.39 ^{**}	22.82 ^{**}	0.009 ^{ns}	176.74 ^{**}	194.19 ^{**}	-	
پلی‌آمین‌ها polyamines	3	0.000003 ^{ns}	0.944 ^{**}	24.44 ^{**}	20.59 ^{**}	70.01 ^{**}	6001.02 ^{**}	-	
محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها × آبیاری Irrigation × Polyamines	3	0.0000016 ^{ns}	0.295 ^{**}	30.23 ^{**}	4.72 ^{**}	84.66 ^{**}	2924.70 ^{**}	-	
خطا Error	14	0.000004	0.055	0.674	0.083	0.604	0.348	-	
ضرب تغییرات (درصد) (%) CV		54.85	3.38	5.48	7.90	4.26	0.947	-	

^{ns} و ^{**} Non-significant and significant at P≤0.01, respectively.

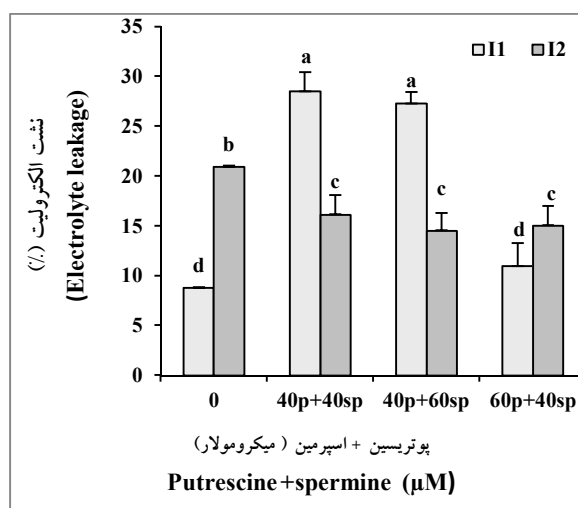
جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات بر همکنش آبیاری × پلی آمین‌ها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، میزان مالوندی آلدهید و پراکسید هیدروژن برگ‌ها و ریشه‌های گل‌زنگ تحت سطح مختلف آبیاری.

Table 2. Mean comparison of irrigation × polyamines on antioxidant enzymes activities, MDA and H₂O₂ contents in leaves and roots of safflower grown under different levels of watering.

Irrigation levels	Treatments (μM)	برگ Leaf					H ₂ O ₂ (μM g ⁻¹ FW)
		آسکوربات پراکسیداز APX (unit mg ⁻¹ protein)	کاتالاز CAT (unit mg ⁻¹ protein)	سوپراکسید دیسموتاز SOD (unit mg ⁻¹ protein)	پراکسیداز POX (unit mg ⁻¹ protein)	مالوندی آلدهید MDA (μg g ⁻¹ FW)	
I ₁ آبیاری کامل	0	7.48±0.005 ^d	0.31±0.01 ^{de}	2.01±0.26 ^c	1.62±0.09 ^c	28.66±0.12 ^c	37.46±0.12 ^{de}
	40 p+40 sp	13.17±0.13 ^a	0.24±0.10 ^c	0.85±0.07 ^d	2.41±0.10 ^b	25.82±0.54 ^d	143.34±0.14 ^b
	40 p+60 sp	7.13±0.10 ^d	0.36±0.01 ^{de}	2.41±0.10 ^{bc}	2.36±0.10 ^b	15.93±0.06 ^{de}	48.78±0.10 ^d
	60 p+40 sp	13.38±0.40 ^a	0.64±0.01 ^c	3.83±0.27 ^a	1.17±0.04 ^d	18.87±0.63 ^f	40.79±0.84 ^f
I ₂ درصد ظرفیت زراعی	0	13.56±0.51 ^a	0.41±0.02 ^d	2.55±0.22 ^{bc}	1.74±0.09 ^c	53.26±0.03 ^a	113.91±0.07 ^c
	40 p+40 sp	9.14±0.11 ^b	1.15±0.13 ^b	2.28±0.36 ^{bc}	11.67±0.08 ^a	24.64±0.54 ^d	242.12±1.00 ^a
	40 p+60 sp	8.01±0.12 ^c	1.44±0.09 ^a	3.72±0.13 ^a	0.42±0.05 ^e	42.68±0.75 ^b	113.71±0.04 ^c
	60 p+40 sp	7.36±0.11 ^d	1.16±0.09 ^b	2.70±0.35 ^b	0.13±0.01 ^f	20.83±0.76 ^e	44.33±0.27 ^e
ریشه Root							
I ₁ آبیاری کامل	0	7.83±0.30 ^c	0.14±0.01 ^{cd}	2.13±0.33 ^d	2.23±0.04 ^d	17.96±0.82 ^d	85.03±0.10 ^b
	40 p+40 sp	9.76±0.75 ^b	0.24±0.003 ^b	4.49±0.09 ^a	3.19±0.009 ^c	11.16±0.99 ^e	79.82±0.98 ^c
	40 p+60 sp	5.82±0.61 ^d	0.08±0.001 ^d	1.30±0.08 ^e	2.15±0.22 ^d	23.27±0.48 ^b	24.72±0.31 ^e
	60 p+40 sp	10.88±0.10 ^a	0.14±0.05 ^{cd}	1.02±0.001 ^e	2.14±0.007 ^d	9.70±0.90 ^f	48.26±0.27 ^d
I ₂ درصد ظرفیت زراعی	0	11.08±0.01 ^a	0.75±0.05 ^a	2.85±0.31 ^c	6.36±0.31 ^b	22.56±0.97 ^b	33.57±0.15 ^f
	40 p+40 sp	9.24±0.10 ^b	0.13±0.03 ^{cd}	1.91±0.11 ^d	0.19±0.008 ^e	24.95±0.50 ^a	134.43±0.78 ^a
	40 p+60 sp	9.30±0.62 ^b	0.14±0.01 ^{cd}	3.52±0.11 ^b	2.35±0.25 ^d	19.00±0.98 ^c	43.36±0.62 ^e
	60 p+40 sp	9.76±0.13 ^b	0.18±0.01 ^c	4.30±0.31 ^a	7.01±0.35 ^a	17.30±0.19 ^d	49.22±0.38 ^d

داده‌ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار را نشان می‌دهند. حروف متفاوت نمایانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. I₁ و I₂: به ترتیب ۱۰۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی. ۴۰ p+۴۰ sp: ۴۰ میکرومول پوترسین با ۴۰ میکرومول اسپرمین. ۴۰ p+۶۰ sp: ۴۰ میکرومول پوترسین با ۶۰ میکرومول اسپرمین. ۶۰ p+۴۰ sp: ۶۰ میکرومول اسپرمین با ۴۰ میکرومول پوترسین. ۶۰ p+۶۰ sp: ۶۰ میکرومول اسپرمین با ۶۰ میکرومول پوترسین. SOD: سوپراکسید دیسموتاز. APX: آسکوربات پراکسیداز. CAT: کاتالاز. POX: پراکسیداز. MDA: مالوندی آلدهید. H₂O₂: هیدروژن پراکسید.

The data represent the mean of three replications ± SD. Different letters indicate significant difference at P≤0.05. I₁, I₂: 100% and 40% Field Capacity (FC), respectively. 40 p+40 sp: 40 μM putrescine with 40 μM spermine, 40 p+60 sp: 40 μM putrescine with 60 μM spermine, 60 p+40 sp: 60 μM spermine with 40 μM putrescine, 60 p+60 sp: 60 μM spermine with 60 μM putrescine. APX: ascorbate peroxidase, CAT: catalase, POX: peroxidase, SOD: superoxide dismutase.



شکل ۱- اثر غلظت‌های پوتریسین + اسپرمین بر نشت الکترولیت‌ها در برگ‌های گلرنگ تحت سطوح مختلف آبیاری. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار را نشان می‌دهند. حروف متفاوت نمایانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. I₁ و I₂: به ترتیب ۱۰۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی، ۴۰ p + ۴۰ sp: ۴۰ میکرومولار پوتریسین با ۴۰ میکرومولار اسپرمین، ۴۰ p + ۶۰ sp: ۴۰ میکرومولار پوتریسین با ۶۰ میکرومولار اسپرمین، ۶۰ p + ۴۰ sp: ۶۰ میکرومولار پوتریسین با ۴۰ میکرومولار اسپرمین.

Fig. 1. The effect of putrescine+spermine concentrations on electrolyte leakage of safflower leaves under different levels of watering.

The data represent the mean of three replications \pm SD. Different letters indicate significant difference at $P \leq 0.05$. I₁, I₂: 100% and 40% Field Capacity (FC), respectively. 40 p+40 sp: 40 μM putrescine with 40 μM spermine, 40 p+60 sp: 40 μM putrescine with 60 μM spermine, 60 p+40 sp: 60 μM putrescine with 40 μM spermine.

(۲۵). در بررسی حاجی‌بلند و همکاران (۲۰۱۱) مقدار فنل برگ‌ها در گیاه توتون تحت تأثیر شوری قرار نگرفت و کاربرد پوتریسین تحت تنش شوری سبب کاهش مقدار فنل‌ها و اسپرمیدین موجب افزایش فنل‌ها شد (۱۱). بنابراین اثر پلی‌آمین‌ها بسته به نوع پلی‌آمین و غلظت آن‌ها متفاوت است. محلول‌پاشی غلظت‌های ترکیبی اسپرمین و پوتریسین در برگ اثر معنی‌داری بر محتوای فنل، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در شرایط خشکی نشان داد. در برگ کاربرد غلظت‌های ۴۰+۶۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین در خشکی، افزایش معنی‌داری را در غلظت فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها نسبت به تیمار خشکی بدون پلی‌آمین نشان داد. محلول‌پاشی ۶۰+۴۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین در خشکی، فقط سبب افزایش محتوای آنتوسیانین‌ها شد. در پژوهش دیگری که در گیاه

مقدار فنل، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها: آبیاری و محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها، فنل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین‌ها را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر فرار داد. اثر متقابل این عامل‌ها نیز برای این موارد معنی‌دار گردید (جدول ۳). غلظت فنل کل در گیاهان تحت تنش خشکی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. غلظت فنل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین‌ها تحت تأثیر شرایط محیطی است. زمانی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کرده‌اند که میزان این متابولیت‌های ثانویه در برخی گیاهان تحت خشکی افزایش می‌یابد. افزایش فلاونوئید و آنتوسیانین‌ها در برگ و ریشه گیاهان تیمار شده با خشکی (جدول ۴) نشان می‌دهد که راهبردهای غیرآنزیمی نیز نقش مهمی در غلبه بر تنش اکسیداتیو دارند. آنتوسیانین‌ها به‌عنوان یک رنگیزه آنتی‌اکسیدانی، تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند

آنتوسیانین‌ها نیز در سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارند (۲۹). کاربرد غلظت‌های مختلف دو پلی‌آمین در شرایط آبیاری کامل نیز سبب افزایش معنی‌دار میزان فنل و فلاونوئید کل ریشه و کاهش فنل، فلاونوئید برگ و آنتوسیانین‌ها در اندام هوایی شد (جدول ۴).

بنگ دانه انجام شده است، ترکیبات فنلی در خشکی کاهش یافته است که با کاربرد پوتریسین ۰/۰۵ میلی‌مولار افزایش معنی‌داری را نشان داده است (۳).

کاربرد غلظت‌های ترکیبی دو پلی‌آمین در شرایط خشکی باعث افزایش معنی‌دار مقدار فنل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین‌ها در ریشه شد ($P \leq 0.05$).

جدول ۳- تجزیه واریانس مقدار فنل، فلاونوئید کل برگ‌ها و آنتوسیانین‌ها در اندام هوایی گیاه گلرنگ در سطوح مختلف آبیاری در واکنش به محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها.

Table 3. Analysis of variance of the total phenol, flavonoid in leaves, and anthocyanin contents in shoots of safflower under different levels of watering in response to foliar applications of polyamines.

میانگین مربعات در برگ Mean square in leaf				
منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	فنل کل Total phenol	فلاونوئید کل Total flavonoid	آنتوسیانین کل Total anthocyanin
تکرار Replicate	2	0.386 ^{ns}	0.025 ^{ns}	0.095 ^{ns}
آبیاری Irrigation	1	184.48**	1.233**	0.203**
پلی‌آمین‌ها Polyamines	3	162.98**	0.251**	1.09**
محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها × آبیاری Irrigation × Polyamines	3	173.35**	0.387**	1.45**
خطا Error	14	1.685	0.013	0.017
ضریب تغییرات CV (%)	-	4.90	9.10	5.91
میانگین مربعات در ریشه Mean square in root				
منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی df	فنل کل Total phenol	فلاونوئید کل Total flavonoid	آنتوسیانین کل Total anthocyanin
تکرار Replicate	2	0.108 ^{ns}	0.0013 ^{ns}	0.00006 ^{ns}
آبیاری Irrigation	1	0.0094 ^{ns}	0.108**	0.07774**
پلی‌آمین‌ها Polyamines	3	20.59**	0.124**	0.03265**
محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها × آبیاری Irrigation × Polyamines	3	4.72**	0.086**	0.02952**
خطا Error	14	0.083	0.013	0.00028
ضریب تغییرات CV (%)	-	7.90	21.22	6.45

^{ns} و ^{**} به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

^{ns} and ^{**} Non-significant and significant at $P \leq 0.01$, respectively.

جدول ۴- اثر غلظت‌های پوتریسین + اسپرمین بر مقدار فنل کل، فلاونوئیدهای برگ‌ها و آنتوسیانین‌ها در اندام هوایی گلرنگ در سطوح مختلف آبیاری.

Table 4. Effect of putrescine +spermine concentrations on total phenol, flavonoids in leaves, and anthocyanin contents in shoots of safflower under different levels of watering.

اندام هوایی برگ Leaf Shoot				
سطوح آبیاری Irrigation levels	پوتریسین و اسپرمین (میکرومولار) Putrescine and spermine (μM)	فنل کل (میلی گرم اکی‌والان گالیک اسید بر گرم وزن تر) Total phenols (mg E GA g ⁻¹ FW)	فلاونوئید کل (میلی گرم اکی‌والان کوئرستین بر گرم وزن تر) Total flavonoids (mg EQ g ⁻¹ FW)	آنتوسیانین کل (میلی گرم بر گرم وزن تر) Total anthocyanins (mg g ⁻¹ DW)
I ₁ آبیاری کامل	0	39.62±1.37 ^a	1.68±0.12 ^{ab}	3.07±0.30 ^a
	40 p+40 sp	28.61±0.99 ^c	0.72±0.08 ^d	1.61±0.10 ^d
	40 p+60 sp	19.45±0.81 ^e	1.04±0.07 ^c	1.74±0.26 ^d
	60 p+40 sp	29.25±0.73 ^{bc}	0.88±0.17 ^d	2.07±0.02 ^c
I ₂ ۴۰ درصد ظرفیت زراعی	0	24.31±1.81 ^d	1.53±1.10 ^b	2.05±0.10 ^c
	40 p+40 sp	31.09±1.69 ^b	1.51±0.11 ^b	1.58±0.10 ^d
	40 p+60 sp	24.40±0.83 ^d	1.22±0.15 ^c	3.09±0.04 ^a
	60 p+40 sp	14.94±1.12 ^f	1.76±0.11 ^a	2.52±0.12 ^b
ریشه Root				
I ₁ آبیاری کامل	0	1.28±0.17 ^e	0.14±0.03 ^c	0.23±0.01 ^c
	40 p+40 sp	1.86±0.11 ^d	0.63±0.11 ^{ab}	0.33±0.01 ^b
	40 p+60 sp	7.02±0.22 ^a	0.67±0.13 ^{ab}	0.12±0.001 ^e
	60 p+40 sp	4.49±0.10 ^b	0.50±0.01 ^b	0.14±0.02 ^{de}
I ₂ ۴۰ درصد ظرفیت زراعی	0	1.94±0.63 ^d	0.58±0.02 ^b	0.16±0.001 ^d
	40 p+40 sp	3.56±0.30 ^e	0.79±0.14 ^a	0.40±0.01 ^a
	40 p+60 sp	4.54±0.05 ^b	0.52±0.19 ^b	0.35±0.03 ^b
	60 p+40 sp	4.46±0.28 ^b	0.58±0.07 ^b	0.35±0.007 ^b

داده‌ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار را نشان می‌دهند. حروف متفاوت نمایانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است. I₁ و I₂: به ترتیب ۱۰۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی، ۴۰ p + ۴۰ sp: ۴۰ میکرومولار پوتریسین با ۴۰ میکرومولار اسپرمین، ۴۰ p + ۶۰ sp: ۴۰ میکرومولار پوتریسین با ۶۰ میکرومولار اسپرمین، ۶۰ p + ۴۰ sp: ۶۰ میکرومولار پوتریسین با ۴۰ میکرومولار اسپرمین.

The data represent the mean of three replications ± SD. Different letters indicate significant difference at P≤0.05. I₁, I₂: 100% and 40% Field Capacity (FC), respectively. 40 p+40 sp: 40 μM putrescine with 40 μM spermine, 40 p+60 sp: 40 μM putrescine with 60 μM spermine, 60 p+40 sp: 60 μM putrescine with 40 μM spermine.

جدول ۵ - ضرایب همبستگی بین صفات مختلف گلرنگ.

Table 5. Coefficient of correlations among different traits of safflower.

صفات مورد مطالعه	آنتوسیانین Anthocyanin	فلاونوئید Flavonoid	فنل Phenol	نشت الکترولیت Electrolyte leakage	پراکسید هیدروژن H ₂ O ₂	مالوندی آلدئید MDA	پراکسیداز POX	سوپراکسید دیسموتاز SOD	کاتالاز CAT	آسکوربات پراکسیداز APX
آسکوربات پراکسیداز APX	0.401 ^{ns}	0.261 ^{ns}	0.132 ^{ns}	-0.326 ^{ns}	-0.125 ^{ns}	-0.236 ^{ns}	0.229 ^{ns}	0.235 ^{ns}	0.206 ^{ns}	1
کاتالاز CAT	0.347*	0.315 ^{ns}	0.093 ^{ns}	-0.595**	-0.246*	-0.153 ^{ns}	0.143 ^{ns}	0.307*	1	0.206 ^{ns}
سوپراکسید دیسموتاز SOD	-0.002 ^{ns}	-0.157 ^{ns}	0.275 ^{ns}	-0.234 ^{ns}	-0.158	-0.114 ^{ns}	-0.077 ^{ns}	1	0.307*	0.206 ^{ns}
پراکسیداز POX	-0.145 ^{ns}	-0.230 ^{ns}	0.368 ^{ns}	0.130 ^{ns}	-0.779**	-0.062 ^{ns}	1	-0.062 ^{ns}	-0.077 ^{ns}	0.206 ^{ns}
مالوندی آلدئید MDA	0.311*	0.187 ^{ns}	0.075 ^{ns}	0.140 ^{ns}	0.305*	1	-0.062 ^{ns}	-0.062 ^{ns}	0.305*	0.206 ^{ns}
پراکسید هیدروژن H ₂ O ₂	0.287 ^{ns}	0.246 ^{ns}	0.125 ^{ns}	0.413 ^{ns}	1	1	0.287 ^{ns}	0.287 ^{ns}	0.287 ^{ns}	0.206 ^{ns}
نشت الکترولیت EL	-0.454**	-0.257 ^{ns}	-0.329*	1	1	1	-0.454**	-0.454**	-0.454**	0.206 ^{ns}
فنل Phenol	0.331 ^{ns}	0.185 ^{ns}	1	1	1	1	0.331 ^{ns}	0.331 ^{ns}	0.331 ^{ns}	0.206 ^{ns}
فلاونوئید Flavonoid	0.278 ^{ns}	1	1	1	1	1	0.278 ^{ns}	0.278 ^{ns}	0.278 ^{ns}	0.206 ^{ns}
آنتوسیانین Anthocyanin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.206 ^{ns}

^{ns}، * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

^{ns}، * and ** Non-significant and significant at P≤0.05 and P≤0.01, respectively.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی تنش خشکی سبب افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و نشت الکترولیت گیاه گلرنگ شد و کاربرد برگی ۶۰+۴۰ میکرومولار و ۴۰+۶۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین در کاهش تنش اکسیداتیو مؤثر بود. محلول‌پاشی ۴۰+۶۰ میکرومولار پوتریسین + اسپرمین با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیداتیو و افزایش غلظت فلاونوئیدها و

آنتوسیانین‌ها سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، نشت الکترولیت، غلظت پراکسید هیدروژن و کاهش اثرات مخرب تنش خشکی گردید. بنابراین کاربرد این غلظت‌ها از طریق فعال کردن دو سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدانی و کاهش صدمات غشاهای سلولی می‌تواند سبب افزایش تحمل خشکی در مراحل اولیه رشد گلرنگ شود.

منابع

- Amri, E. and Shahsavari, A.R. 2010. Response of lime seedling (*Citrus aurantifolia* L.) to exogenous spermidine treatments under drought stress. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* 4: 9. 4483-4489.
- Ashraf, M. and Ali, Q. 2008. Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environ. Exp. Bot.* 63: 1. 266-273.
- Bitrián, M., Zarza, X., Altabella, T., Antonio, F. and Alcázar, R. 2012. Polyamines under Abiotic Stress: Metabolic Crossroads and Hormonal Crosstalks in Plants. *Metab.* 2: 3. 516-528.
- Boominathan, R. and Doran, P.M. 2002. Ni- Induced oxidative stress in roots of the Ni hyper accumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytol.* 156: 2. 205-215.
- Chance, B. and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases: *Methods Enzymol.* 2: 764-755.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10: 178-182.
- Daneshmandi, M.Sh. and Azizi, M. 2009. Survey of effect of water stress and application of mineral zeolite on quantity and quality properties of *Ocimum basilicum* L. var. keshkeny levelu) In: 6th Congress of Iranian Horticultural Science, Iran, 1-2 March 2009, Pp: 123-129. (In Persian)
- Farhangi-Abriz, S. and Ghassemi-Golezani, K. 2018. How can salicylic acid and jasmonic acid mitigate salt toxicity in soybean plants? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147: 1010-1016.
- Farooq, M., Wahid, A. and Lee, D.J. 2009. Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. *Acta Physiol. Plant.* 31: 1. 937-945.
- Groppa, M.D. and Benavides, M.P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids.* 34. 1: 35-45.
- Hajiboland, R. and Ebrahimi, N. 2011. Growth, photosynthesis and phenolic metabolism in tobacco plants under salinity and application of polyamines. *Iran. J. Plant Biol.* 3: 1. 13-26. (In Persian)
- Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K. and Charoensataporn, R. 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Sci. Asian.* 29: 109-113.
- Hojati, M., Modarres-Sanavy, S.M.M., Karimi, M. and Ghanati, F. 2011. Responses of growth and antioxidant systems in *Carthamus tinctorius* under water deficit stress, *Acta Physiol. Plant.* 33: 1. 105-112.
- Hussain, S., Farooq, M., Wahid, M.A. and Wahid, A. 2013. Seed priming with putrescine the drought resistance of maize hybrids. *Int. J. Agric. Biol.* 15: 6. 1349-1353.

15. Krouma, A., Fujimura, T. and Abdely, C. 2015. Growth, photosynthetic activity and water relations three Tunisian chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) subjected to a progressive water deficit stress. *Int. Res. J.* 5: 1. 206-214.
16. Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J. 1996. NaCl- induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Ann. Bot.* 78: 389-398.
17. Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkinafasa honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.* 91: 3. 571-577.
18. Mirzaee, M., Moini, A. and Ghanati, F. 2013. Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant Enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *J. Agric. Sci. Technol.* 15: 593-602.
19. Mita, S., Murano, N., Akaike, M. and Nakamura, K. 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that is inducible by sugars. *Plant J.* 11: 4. 841-851.
20. Mustafavi, S.H., Shekari, F., Nasiri, Y. and Hatami-Maleki, H. 2015. Nutritional and biochemical response of water-stressed valerian plants to foliar application of spermidine. *Biol. Forum . Int. J.* 7: 1. 1811-1815.
21. Nazarli, H., Hadian, J. and Ahmadi, A. 2015. Evaluation of putrescine effect in drought tolerance inducing and changing of enzyme activities in *Matricaria Chamomilla* L. plant. *Iran. J. Agric. Sci.* 46: 2. 222-293.
22. Obinger, C., Maj, M., Nicholls, P. and Loewen, P. 1997. Activity, peroxide compound formation, and heme d synthesis in *Escherichia coli* HPII catalase. *Arch Biochem. Biophys.* 342: 1. 58-67.
23. Pal, M., Szalai, G. and Janda, T. 2015. Polyamines are important in abiotic stress signaling. *Plant Sci.* 1: 1. 1-34.
24. Saikat, P. and Aryadeep, R. 2016. Seed priming with spermine ameliorates salinity stress in the germinated seedlings of two rice cultivars differing in their level of salt tolerance. *Trop. Plant Res.* 3: 3. 616-633.
25. Salehi-lisar, S.Y. and Bakhshayeshan-Agdam, H. 2016. Drought stress tolerance in plants: causes, consequences and tolerance. P 35-50, In: M.A. Hossain, Sh.H. Wani, S. Bhattacharjee, D.J. Burritt and L.S. Phan Tran, Eds. Springer Press. London.
26. Shukla, V., Ma, Y. and Merevitz, V. 2015. Creeping Bentgrass responses to drought stress and polyamine application, *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 140: 1. 94-101.
27. Winterbourn, C.C., Mc Grath, B.W. and Carrell, R.W. 1976. Reactions involving superoxide and normal unstable hemoglobins, *Biochem. J.* 155: 3. 493-502.
28. Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T. and Michael, A.J. 2007. A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352: 2. 486-490.
29. Zamani, Z., Niakan, M. and Gorbanly, M. 2013. Effect of exogenous putrescine in phenolic composition, antioxidant enzymes and nitrate reductase of *Hyosyamus niger* under drought stress, *J. Iran. Plant Ecophysiol. Res.* 3: 78-90. (In Persian)
30. Zhang, Zh. and Hung, Zhi. 2013. Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress. *Sci. Hortic.* 159: 172-177.
31. Zhou, L., Yn, Zh., Danda, P., Xiaojan, W., Yan, P. and Yan, Y. 2015. Polyamine regulates tolerance to water stress in leaves of white clover associated with antioxidant defense and dehydrin genes via involvement in calcium messenger system and hydrogen peroxide signaling. *Frontiers Physiol.* 6: 280. 1-16.

