نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و چهارم، شماره چهارم، ۱۳۹۶
http://jopp.gau.ac.ir

# اثرات محلول‌پاشی سدیم نیترو پروساید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و عملکرد ماده موثره ماریتیغال تحت تنش خشکی

**اسماعیل زنگانی[1*]، سعید زهتاب سلماسی[2]، بابک عندلیبی[3] و عباسعلی زمانی[4]**

[1]دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه اکوفیزیولوژی گیاهی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[2]استاد گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[3]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
[4]استادیار گروه محیط زیست، دانشکده علوم دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۲۴

**چکیده**

**سابقه و هدف:** ماریتیغال گیاه دارویی است که برای تولید سیلیمارین و روغن کشت می‌شود. سیلیمارین ترکیبی از فلاونولیگنان-های مختلف می‌باشد که برای درمان بیماری‌های کبدی و بسیاری از بیماری‌های دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. تنش خشکی در این گیاه ضمن کاهش عملکرد دانه، عملکرد متابولیت‌های ثانویه را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. این پژوهش به منظور بررسی اثرات سدیم نیتروپروساید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و عملکرد ماده موثره ماریتیغال در شرایط کمبود آب انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** این آزمایش به صورت کرت‌های دو بار خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان در سال ۱۳۹۲ انجام گرفت. در این آزمایش سدیم نیتروپروساید (SNP) در سه سطح صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول در لیتر به‌عنوان عامل اصلی، تنش خشکی در سه سطح شاهد، قطع آبیاری از مرحله ساقه‌روی و قطع آبیاری از مرحله گرده‌افشانی به‌عنوان عامل فرعی و دو ژنوتیپ ماریتیغال (مجاری و ساری) به‌عنوان عامل فرعی‌فرعی در نظر گرفته شدند. صفات اندازه‌گیری شامل فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشاء سلولی، درصد و عملکرد سیلیمارین و عملکرد دانه بود.

**یافته‌ها:** تنش خشکی از مرحله ساقه‌روی محتوای نسبی آب برگ و از هر دو مرحله قطع آبیاری پایداری غشاء سلولی را کاهش داد، در صورتی که محلول‌پاشی با سدیم نیتروپروساید از کاهش بیشتر محتوای نسبی آب برگ در شرایط تنش جلوگیری و پایداری غشاء سلولی را بهبود داد. قطع آبیاری از مرحله ساقه‌روی فعالیت آنزیم کاتالاز را در هر دو ژنوتیپ بطور معنی‌داری افزایش داد، در حالی که فعالیت آنزیم پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را در رقم مجاری کاهش و در اکوتیپ ساری فعالیت آسکوربات پراکسیداز را افزایش و بر فعالیت پراکسیداز تاثیری نداشت. کاربرد SNP فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت را در رقم مجاری بطور معنی‌داری بویژه در مرحله تنش ساقه‌روی افزایش داد، اما در اکوتیپ ساری فقط در تنش گرده‌افشانی سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گردید در صورتی که در تنش ساقه‌روی سبب کاهش معنی‌دار آنزیم کاتالاز شد و تاثیری نیز بر فعالیت آنزیم پراکسیداز نداشت. با افزایش شدت تنش محتوای سیلیمارین دانه بطور معنی‌داری افزایش یافت، ولی تاثیری بر عملکرد سیلیمارین نداشت. کاربرد ۱۰۰ میکرومولار SNP اثر افزایشی بر درصد سیلیمارین دانه داشت و نیز عملکرد سیلیمارین

*مسئول مکاتبه: zangani@znu.ac.ir

را در هر دو مرحله قطع آبیاری نسبت به گیاهانی که فقط تحت تیمار خشکی بودند بهبود داد. همچنین عملکرد دانه تحت تاثیر تنش بطور معنی‌داری کاهش پیدا نمود در حالی که این کاهش با محلول‌پاشی ۱۰۰ میکرومولار SNP در مرحله تنش ساقه‌روی و گرده‌افشانی جبران گردید.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که محلول‌پاشی گیاهان با SNP بویژه در سطح ۱۰۰ میکرومولار با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و بهبود کارایی مصرف آب و ترویی غشاء سلولی از افت عملکرد دانه در شرایط کمبود آب جلوگیری و درصد و عملکرد ماده موثره ماریتیغال را افزایش می‌دهد.

***واژه‌های کلیدی:*** اکسید نیتریک، تنش آبی، خارمریم، سیلیمارین، گونه‌های فعال اکسیژن

## مقدمه

اهمیت گیاهان دارویی بدلیل داشتن مواد موثره اساسی بسیاری از داروها روز به روز در حال افزایش است. تنش‌های محیطی از جمله خشکی متابولیت‌های ثانویه تولیدی گیاهان دارویی را تحت تاثیر قرار می‌دهند، اگرچه متابولیت‌های ثانویه بطورمستقیم تحت فرایندهای متابولیکی اولیه مانند فتوسنتز، تنفس و تعرق قرار نمی‌گیرند، اما عملکرد مواد موثره تولیدی تحت تاثیر عملکرد اقتصادی گیاه و در نتیجه تابع شرایط محیطی می‌باشد. تنش خشکی اثرات زیان‌آوری روی فرایندهای متابولیکی گیاه از جمله روابط آبی، جذب مواد غذایی، فتوسنتز و توزیع اسیمیلات‌ها دارد (۱۰). در سطح گیاه کامل اثرات کمبود آب معمولا بصورت کاهش در فتوسنتز و رشد گیاه نمایان می‌گردد (۱۸،۴۹)، در سطح مولکولی، اثرات منفی تنش مرتبط با زیان اکسیداتیو به سلول‌های گیاهی بواسطه عدم توازن بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و مکانیسم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی می‌باشد (۴۴). البته گیاهان یک سری مکانیزم‌های دفاعی در جهت افزایش ظرفیت تحمل در طی کمبود آب مانند افزایش در تجمع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بکار می‌گیرند (۱۵). یک راهکار برای بهبود عملکرد گیاهان دارویی تولید گیاهانی است که نسبتاً به خشکی مقاوم بوده و عملکرد بیشتری تحت تنش نشان دهند. البته به نظر می‌رسد که کاربرد سیستم‌های کمبود آب در افزایش متابولیت‌های ثانویه موثر بوده (۴۲) و حتی اکوتیپ‌های مختلف یک گیاه نیز واکنش‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهند. ماریتیغال (*Silybium marianum* L.) گیاهی است یکساله یا دو ساله از تیره کاسنی که بومی مدیترانه بوده ولی در بسیاری از مناطق دنیا بویژه نواحی خشک و گرم رشد می‌نماید (۳۴). مواد موثره ماریتیغال تحت عنوان سیلیمارین شناخته می‌شود که از فلاونولیگنان‌های ارزشمندی مانند سیلیبین (Silibin)، سیلیکریستین (Silychristin) و سیلیدیانین (Silydianin) تشکیل شده که در دانه‌های این گیاه تجمع می‌یابند (۲۹). این مواد موثره در درمان مشکلات کبدی و برخی بیماریهای دیگر موثر می‌باشند (۱۴). تنش خشکی اگرچه ماده موثره برخی از گیاهان دارویی را تحت تاثیر قرار می‌دهد اما می‌تواند عملکرد دانه و در نتیجه عملکرد متابولیت‌های ثانویه در واحد سطح را کاهش دهد (۵). هنداوی و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی تاثیر فواصل آبیاری همراه با تیمارهای کودی در ماریتیغال نتیجه گرفتند که با افزایش فواصل آبیاری تمام اجزای فلاونولیگنان افزایش یافت اما در تیمارهای کودی بیشترین میزان سیلیمارین در تیمار کمپوست همراه با مایکوریزا حاصل گردید (۲۳). از طرف دیگر گنیوا و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد، اجزای سیلیمارین را تحت تاثیر

قرار داده و ترکیب آن‌ها با کودهای معدنی مقدار ترکیبات سیلیمارین را به‌واسطه افزایش در عملکرد دانه در واحد سطح افزایش داده است (۲۰).

امروزه کاربرد مولکول‌های پیام‌رسان تنش مانند هیدروژن پراکسید، اسید آبسیزیک، اکسید نیتریک و غیره پتانسیلی برای بهبود تحمل به تنش در گیاهان ایجاد نموده است. اکسید نیتریک (NO) یک مولکول گازی نسبتا پایدار کوچک و بعنوان یک مولکول پیام‌بر زیستی مهم در گیاهان و جانوران می‌باشد که از طریق غشاءها انتشار می‌یابد (۳۳،۳۸). اکسید نیتریک در تنظیم بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه از تحریک جوانه‌زنی (۴۱) تا تنظیم فتوسنتز و گلدهی (۴۷،۴۹) وارد عمل می‌شود، اخیرا مشخص شده که NO بعنوان یک مولکول پیام‌رسان کلیدی در واکنش گیاه به تنش‌های زنده و غیر زنده بعنوان واسطه و انتقال پیام در عمل تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شرکت می‌کند (۵۲). مطالعات نشان می‌دهد که NO برخی اثرات محافظتی برای گیاهان تحت تنش خشکی ایجاد می‌کنند که مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (٤). فان و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی اثرات کاربرد خارجی NO در *Dendrobium Huoshanense* گزارش نمودند که تیمار با ۵۰ میکرومولار SNP محتوای نسبی آب (RWC) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را افزایش داده است، اما غلظت‌های بالاتر آن اثرات تنش خشکی را تشدید نموده است (۱۲). محلول‌پاشی گیاهان با NO گیاهان را از صدمات اکسیداتیو به وسیله محدود کردن آنیون سوپر اکسید و رادیکال لیپید و فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و بیان ژن محافظت می‌نماید (۴۵). گان و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی تحمل به خشکی در جو نشان دادند که محلول‌پاشی گیاهان با ۱۰۰ میکرومولار SNP، سبب افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) گردیده و غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر از آن سبب کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم‌ها گردیده است (۱۶).

اگرچه در مورد بهبود اثرات منفی تنش در گیاهان راهکارهایی ارائه شده است، اما اطلاعات در مورد نقش فیزیولوژیکی NO در تعدیل تنش خشکی در گیاهان دارویی محدود بوده و در مورد گیاه ماریتیغال نیز هیچ مطالعه‌ای انجام نشده است. در این تحقیق نقش سدیم نیتروپروساید (SNP) به‌عنوان دهنده اکسید نیتریک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در شرایط کمبود آب و ارتباط آن با عملکرد متابولیت‌های ثانویه در سطح مزرعه مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان (با عرض جغرافیایی '۴۱ °۳۶ شمالی، طول جغرافیایی '۲۴ °۴۸ شرقی و با ارتفاع ۱۶۲۰ متر از سطح دریا) اجرا شد. خاک محل انجام تحقیق دارای بافت لومی‌رسی با اسیدیته ۷/۸ بود. این منطقه جزء مناطق نیمه خشک بوده و میانگین دمای ۵۰ ساله ۱۱/۲ درجه سانتی‌گراد و بارندگی سالانه ۳۰۰ میلی‌متر می‌باشد. مجموع بارش در طول دوره رشد گیاه ۷۰ میلی‌متر و میانگین حداقل و حداکثر دما در این دوره به‌ترتیب ۹/۴ و ۲۵/۸ سانتی‌گراد بود. طرح آزمایشی به‌صورت کرت‌های دوبار خرد شده بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. محلول پاشی با سدیم نیترو پروساید (SNP) به‌عنوان دهنده اکسید نیتریک (NO) در سه سطح صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول در لیتر به‌عنوان عامل اصلی، تنش خشکی در سه سطح کنترل (بدون قطع آبیاری تا پایان دوره رشد)، تنش ساقه روی (قطع آبیاری در اواسط ساقه‌روی تا پایان دوره رشد) و تنش گرده‌افشانی (قطع آبیاری در اواسط

گلدهی تا پایان دوره رشد) به‌عنوان عامل فرعی و دو ژنوتیپ ماریتیغال شامل رقم مجاری و اکوتیپ ساری بعنوان عامل فرعی فرعی در نظر گرفته شدند. کاشت بذور در تاریخ ۹۲/۱/۱۰ انجام شد. هرکرت فرعی فرعی شامل شش خط چهار متری با فاصله ۵۰ سانتی‌متر و تراکم هشت بوته در متر مربع تنظیم گردید. آبیاری مزرعه با استفاده از نوارهای آبیاری با شیرهای قابل کنترل تا زمان اعمال تیمارهای خشکی بصورت یکنواخت در کلیه کرت‌ها انجام شد. پس از قطع آبیاری بارندگی قابل توجهی در منطقه نبارید. مقدار کود مصرفی با توجه به نتایج آزمون خاک (جدول ۱) در حدود ۶۰ کیلوگرم نیتروژن خالص در هکتار (بصورت سرک بعد از کاشت و نیز در زمان ساقه‌روی) از طریق آب آبیاری اعمال گردید. محلول پاشی با SNP پنج روز بعد از قطع آبیاری در اواسط ساقه‌روی، اوایل صبح و بعد از غروب آفتاب بر روی کل گیاه در کلیه کرت‌ها به‌غیر از کرت‌های مربوط به تیمار عدم محلول‌پاشی صورت گرفت و یک هفته بعد نیز تکرار گردید (در اواسط گلدهی). برای اندازه-گیری صفات بیوشیمیایی از نمونه‌های برگی که ۲۲ روز پس از قطع آبیاری از زمان ساقه‌روی جدا شده بودند استفاده گردید.

**جدول ۱: برخی خواص فیزیکی و شیمیایی خاک محل مورد آزمایش (عمق ۳۰ – ۰ سانتی‌متر)**

**Table 1. Some physical and chemical characteristics of the studied soil.**

| اسیدیته کل (pH) | کربن آلی (٪) Organic carbon | بافت خاک Soil texture | رس Clay(٪) | سیلت Silt(٪) | شن Sand(٪) | هدایت الکتریکی (EC) dS $m^{-1}$ | فسفر قابل جذب Phosphor $mg.kg^{-1}$ | پتاسیم قابل جذب Potassium $mg.kg^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7.69 | 1.0 | لوم رسی سیلتی (Silty clay loam) | 29.84 | 32 | 38.16 | 4.13 | 55.12 | 280 |

**اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC):** محتوای نسبی آب برگ ۲۲ روز پس از قطع آبیاری از زمان ساقه‌روی تعیین گردید. برای این منظور پس از اندازه‌گیری وزن تازه برگ‌ها ، وزن اشباع آنها پس از هشت ساعت غوطه‌ورشدن در آب مقطر تعیین و در نهایت وزن خشک برگ‌ها اندازه‌گیری و با استفاده از رابطه (۱) محتوای نسبی آب برگ محاسبه شد.

رابطه (۱)

$$RWC\ (\%) = (FW - DW) / (SW - DW) \times 100$$

در این رابطه، FW وزن تازه برگ، SW وزن اشباع برگ و DW وزن خشک برگ می‌باشد.

**اندازه‌گیری پایداری غشاء سلولی:** برای اندازه‌گیری شاخص پایداری غشاء از روش ارائه شده توسط سایرام و همکاران (۱۹۹۷) با اندکی تغییرات استفاده شد (۴۰). نمونه‌های برگی تازه (۲۲ روز پس از تنش ساقه‌روی) به وزن تقریبی ۰/۵ گرم به قطعات یک سانتی‌متری بریده شدند. سپس نمونه‌های بریده شده به داخل ویال‌های شیشه‌ای منتقل و پس از سه مرتبه آبشویی، ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به داخل ویال‌ها ریخته شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. هدایت الکتریکی محلول درون ویال‌ها (C1) با دستگاه هدایت سنج (Model: Inolab, WTW) اندازه‌گیری شد. پس از آن ویال‌ها در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس هدایت الکتریکی نمونه‌ها (C2) با دستگاه هدایت سنج اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از رابطه (۲) شاخص پایداری غشاء محاسبه

گردید.

رابطه (۲)

$$MSI = [1 - (C1 / C2)]* 100$$

(شاخص پایداری غشاء)

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت:** به منظور سنجش فعالیت آنزیمی، ۰/۵ گرم از برگ منجمد شده در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ حاوی پلی وینیل پیرولیدن (PVP) ۱ درصد و EDTA یک میلی‌مولار، هموژنیزه شد. سپس همگنای حاصل در ۱۰/۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۱۷). سنجش کاتالاز با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت (۲). کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/VIS (Perkin Elmer; Lambada 25-USA) قرائت گردید. برای ارزیابی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷، آسکوربات ۱ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۰/۲ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد (۳۶). کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه قرائت گردید. در ارزیابی فعالیت گایاکول پراکسیداز نیز مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ ، گایاکول ۱۰ میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار بود که پس از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر عصاره، افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد (۷). همچنین برای سنجش دقیق‌تر آنزیم‌ها محتوای پروتئین کل با روش برادفورد (۱۹۷۶) و با استفاده از آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (۶).

**اندازه‌گیری محتوای سیلیمارین دانه:** به‌منظور استخراج سیلیمارین دانه، نمونه‌های بذری هر تیمار پس از آسیاب شدن با استفاده از حلال پترولیوم اتر بمدت ۸ ساعت جهت استحصال روغن سوکسله شدند. سپس نمونه‌های چربی زدایی شده به‌مدت ۱۰ ساعت با استفاده از حلال متانول سوکسله گردیدند. پس از تبخیر متانول، پودر زردرنگی حاصل گردید که شامل سیلیمارین می‌باشد (۴۸). پودر حاصل از مرحله استخراج در متانول حل شده و سپس یک میلی‌لیتر از آن به داخل بالن ژوژه ۱۰ میلی‌لیتری منتقل و ۲ میلی‌لیتر محلول ۲و۴ – دی نیترو فنیل هیدرازین – اسید سولفوریک به آن اضافه گردید و به مدت ۵۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس حجم آن با افزودن پتاس متانولی ۱۰ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از آن به یک لوله آزمایش منتقل و ۲ میلی‌لیتر متانول به آن اضافه و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به یک لوله آزمایش منتقل و در نهایت محتویات آن توسط متانول به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانیده شد و میزان جذب محلول متانولی حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید. درصد سیلیمارین (محاسبه شده بعنوان سیلی بینین) با استفاده از رابطه (۳) محاسبه شد (۴۸).

رابطه (۳)

$$X = (A / 585) * (25 * 10^3 / G * d)$$

X: محتوی سیلیمارین، محاسبه شده به‌عنوان (٪) سیلی بینین، d : ضخامت کووت دستگاه اسپکتروفتومتر [= 1 cm] ، A: جذب محلول آزمایش در ۴۹۰ نانومتر، ۵۸۵ : ضریب مخصوص جذب A 1 [% 1 cm = 585] و G : وزن نمونه

**عملکرد دانه و عملکرد سیلیمارین:** پس از رسیدگی فیزیولوژیکی بذرها، زمانی که ۶۰ درصد پاپوس‌های (تارهای بلند و سفیدرنگ بذور) گل‌آذین آشکار

شدند، عملکرد دانه پس از حذف حاشیه، از سطح چهار مترمربع برداشت و برحسب کیلوگرم در هکتار گزارش گردید. عملکرد سیلیمارین از حاصلضرب عملکرد دانه هر تیمار در محتوای سیلیمارین آن بدست آمد و برحسب کیلوگرم در هکتار گزارش گردید.

داده‌های بدست آمده از آزمایش در قالب کرت‌های دو بار خرد شده با استفاده از نرم افزار آماری SAS (ANOVA,Version 9.1) تجزیه واریانس شده و مقایسات میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح ۵ درصد صورت گرفت.

## نتایج و بحث

**جدول ۲: تجزیه واریانس مربوط به تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی و سدیم نیترو پروساید بر صفات اندازه‌گیری شده در دو ژنوتیپ ماریتیغال**

**Table 2. Analysis of variance for effect of drought stress and SNP on measured traits in two genotypes of milk thistle.**

| منابع تغییر s.o.v | درجه آزادی df | M.S. میانگین مربعات | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | کاتالاز Catalase | آسکوربات پراکسیداز ascorbate peroxidase | پراکسیداز peroxidase | نشت الکترولیت Cell membrane stability | محتوای نسبی آب Relative water content | محتوای سیلیمارین دانه Silymarin content | عملکرد سیلیمارین Silymarin yield | عملکرد دانه Grain yield |
| تکرار Replication | 2 | 0.028 | 0.188 | 171.27 | 14.46 | 18.69 | 0.377 | 62.609 | 106551.74 |
| سدیم نیترو پروساید (SNP) Sodium nitroprusside | 2 | 4.63** | 1.375$^{ns}$ | 68.95$^{ns}$ | 329.25** | 34.99$^{ns}$ | 5.501$^{ns}$ | 2156.88$^{ns}$ | 378050.63* |
| اشتباه کل کرت Main plot error | 4 | 0.037 | 1.025 | 88.72 | 14.30 | 11.08 | 3.526 | 709.90 | 15598.48 |
| تنش خشکی (S) Drought stress | 2 | 1.67** | 4.63** | 67.09$^{ns}$ | 160.62* | 366.69** | 6.264** | 198.93 | 795510.09** |
| اثر متقابل (SNP×S) Interaction SNP×S | 4 | 0.52** | 0.458$^{ns}$ | 130.56$^{ns}$ | 371.97** | 88.32** | 1.308* | 188.04* | 60213.11** |
| اشتباه کرت فرعی Sub plot error | 12 | 0.078 | 0.629 | 61.45 | 41.27 | 12.22 | 0.394 | 57.08 | 10409.62 |
| ژنوتیپ (G) Genotype | 1 | 0.0033$^{ns}$ | 0.342$^{ns}$ | 138.61* | 0.721$^{ns}$ | 5.93$^{ns}$ | 0.673$^{ns}$ | 2.88$^{ns}$ | 381412.18** |
| اثر متقابل (SNP×G) Interaction SNP×G | 2 | 0.338* | 1.51** | 465.18** | 131.55$^{ns}$ | 34.73$^{ns}$ | 0.417$^{ns}$ | 124.38$^{ns}$ | 46772.96$^{ns}$ |
| اثر متقابل (S×G) Interaction S×G | 2 | 0.223$^{ns}$ | 4.41** | 257.07** | 607.80** | 3.68$^{ns}$ | 0.607$^{ns}$ | 149.72$^{ns}$ | 10978.62$^{ns}$ |
| اثر متقابل (SNP×S×G) Interaction SNP×G×S | 4 | 0.393* | 1.35** | 118.52** | 48.44$^{ns}$ | 20.40$^{ns}$ | 0.527$^{ns}$ | 102.53$^{ns}$ | 40087.96$^{ns}$ |
| اشتباه کرت فرعی فرعی Sub sub plot error | 18 | 0.086 | 0.180 | 20.86 | 38.11 | 10.69 | 0.451 | 148.71 | 29401.16 |

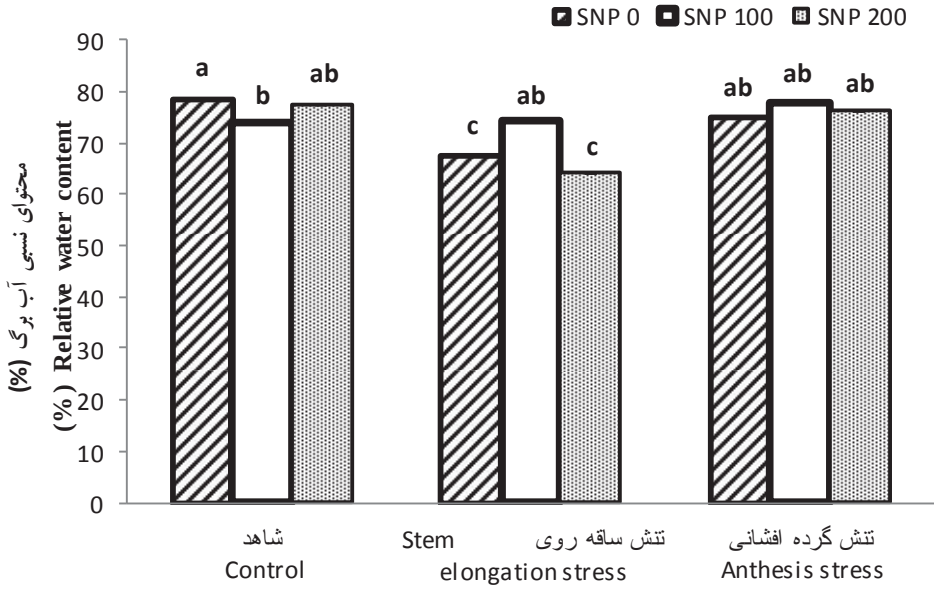
ns: غیر معنی‌دار، * و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح پنج درصد و یک درصد

*,**: significant at 5% and 1% probability respectively, ns: non significant

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر سدیم نیتروپروساید از نظر آنزیم کاتالاز، نشت الکترولیت و عملکرد دانه معنی‌دار بود، بین دو ژنوتیپ از نظر آنزیم پراکسیداز و عملکرد دانه تفاوت معنی‌داری وجود داشت. اثر سطوح خشکی به غیر از آنزیم پراکسیداز و عملکرد سیلیمارین برای بقیه صفات معنی‌دار بود. برهمکنش بین سطوح مختلف سدیم نتروپروساید و خشکی به غیر از آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز برای صفات دیگر تفاوت معنی‌داری نشان داد. همچنین برهمکنش بین سطوح

سدیم نیتروپروساید، قطع آبیاری و ژنوتیپ برای آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مورد مطالعه معنی‌دار بود (جدول ۲).

**محتوای نسبی آب برگ (RWC)**: اثر برهمکنش قطع آبیاری و کاربرد SNP بر محتوای نسبی آب برگ نشان داد که قطع آبیاری فقط از مرحله ساقه‌روی سبب کاهش معنی‌دار RWC برگ گردید (شکل ۱). از طرفی کاربرد خارجی ۱۰۰ میکرومولار SNP از کاهش آب برگ در مرحله تنش ساقه‌روی جلوگیری و سبب افزایش معنی‌دار RWC نسبت به عدم کاربرد این ماده در تیمارهای خشکی گردید. کاربرد ۲۰۰ میکرومولار SNP نیز تاثیر معنی‌داری بر RWC نداشت (شکل ۱).



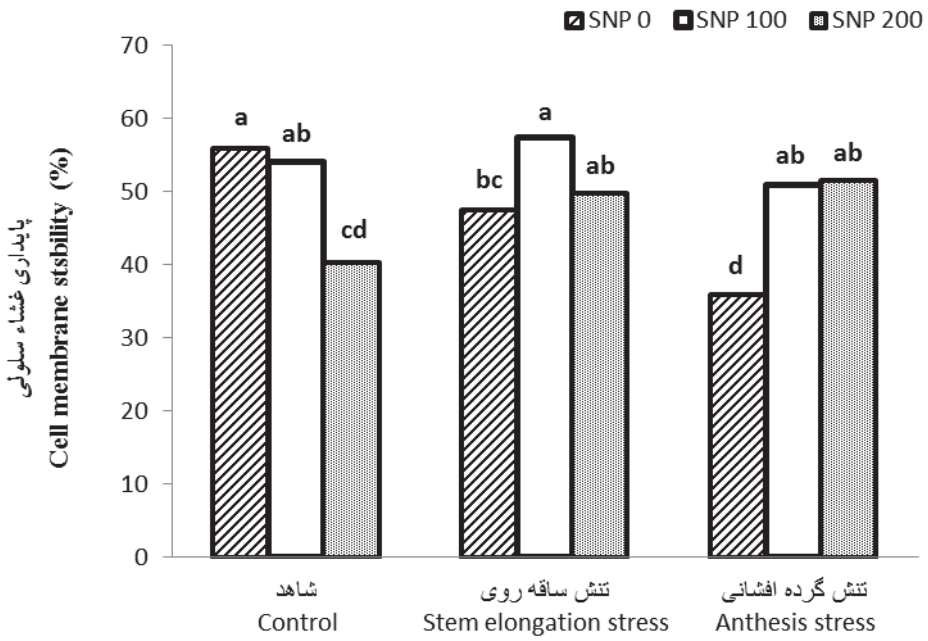

**شکل ۱: مقایسه میانگین محتوای نسبی آب برگ ماریتیغال تحت تاثیر سطوح قطع آبیاری و غلظت‌های مختلف SNP (حروف مشترک در بالای ستون‌ها عدم اختلاف معنی دار تیمارها با آزمون LSD در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد).**

**Figure 1. Mean comparison of leaf relative water content of milk thistle affected by withholding irrigation levels and different concentrations of SNP. (Different letters on the top of the bars indicate significant difference at P < 0.05 by LSD).**

کاهش در محتوای رطوبت نسبی برگ در شرایط تنش خشکی در فلفل شیرین (۲۸)، گشنیز (۲۱) و بسیاری دیگر از گیاهان زراعی و دارویی گزارش شده است (۴۹،۵۲). افزایش مقاومت روزنه‌ای با کاهش میزان رطوبت در خاک و به دنبال آن کاهش تعرق و در نتیجه کاهش جذب و انتقال آب و نیز کاهش کشسانی دیواره سلول از علل مهم کاهش محتوای نسبی آب برگ‌ها در شرایط خشکی می‌باشد (۸). قطع آبیاری از مرحله گرده‌افشانی اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت که به نظر می‌رسد تا حدودی غیر یکنواختی در زمان گرده‌افشانی بوته‌ها در این گیاه، مدت زمان کمتر اعمال تنش در مرحله گرده افشانی نسبت به ساقه‌روی و نیز وجود برگ‌های نسبتا آبدار و گوشتی در این گیاه در این امر تاثیر گذار باشد. کشاورز افشار و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی تاثیر تنش خشکی بر گیاه ماریتیغال نتیجه گرفتند که RWC برگ تحت تنش شدید خشکی کاهش پیدا نموده است ولی کاهش معنی‌داری تحت تنش متوسط

نداشت (۲۷) که مطابق با نتایج این آزمایش می‌باشد. کاربرد خارجیNO در شرایط تنش بستن روزنه‌ها را القاء کرده (۳۸) و در نتیجه تعرق و هدایت روزنه‌ای را کاهش می‌دهد (۱۳،۱۸)، که این امر در حفظ محتوای آب برگ موثر می‌باشد، به‌طوری‌که تیان و لی (۲۰۰۶) نیز بهبود در رشد و عملکرد در اثر کاربرد SNP در شرایط تنش خشکی را ناشی از حفظ محتوای رطوبت نسبی برگ و کاهش ROS نتیجه گرفتند (۵۰). نتایج بدست آمده از این آزمایش همسو با گزارش برخی از محققین درباره بهبود محتوای نسبی آب برگ با کاربرد ۱۰۰ میکرومولار SNP می‌باشد (۱۳،۱۶).

**پایداری غشاء سلولی:** میانگین اثرات کاربرد SNP بر پایداری غشاء سلولی در شرایط تنش خشکی نشان داد که قطع آبیاری از مرحله ساقه‌روی و گرده‌افشانی تا پایان دوره رشد گیاه پایداری غشاء سلولی را به طور معنی‌داری کاهش داد. این کاهش در مرحله تنش گرده‌افشانی بیشتر از تنش ساقه‌روی بود (شکل ۲)، در صورتی که کاربرد خارجی ۱۰۰ میکرومولار SNP در مرحله تنش ساقه‌روی و کاربرد هر دو سطح SNP در مرحله تنش گرده‌افشانی سبب افزایش پایداری غشاء سلولی نسبت به عدم کاربرد آن گردید و اثرات منفی تنش را کاهش داد (شکل ۲).




**شکل ۲: مقایسه میانگین پایداری غشاء سلولی برگ ماریتیغال تحت تاثیر سطوح قطع آبیاری و غلظت‌های مختلف SNP (حروف مشترک در بالای ستون‌ها عدم اختلاف معنی دار تیمارها با آزمون LSD ۵٪ را نشان می‌دهد).**

**Figure 2. Mean comparison of cell membrane stability of milk thistle affected by withholding irrigation levels and different concentrations of SNP. (Different letters on the top of the bars indicate significant difference at P < 0.05 by LSD).**

یکی از زیان‌های ایجاد شده به وسیله تنش کمبود آب خسارت به غشاء و آزاد سازی یون‌ها از سلول‌ها به فضاهای بین سلولی می‌باشد، که این امر منجر به پراکسیداسیون چربی‌ها، نفوذپذیری غشاء و مرگ سلولی می‌گردد (۱۸). بنابراین تحت شرایط خشکی، به واسطه پراکسیداسیون لیپید غشاء و تشکیل ترکیبات مخصوص مانند مالون دی‌آلدئید پایداری غشاء سلولی اغلب کاهش می‌یابد (۵۰،۴۴). در این آزمایش اعمال

تنش‌های کوتاه مدت نسبت به تنش‌های شدید به دلیل عدم سازگاری گیاه به شرایط خشکی، پایداری غشاء سلولی را نسبت به شاهد کاهش داد. کاهش در پایداری غشاء سلولی در شرایط تنش، در ماریتیغال توسط کشاورز افشار و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش شده است (۲۶). کاربرد خارجی ۱۰۰میکرومولار SNP در این تحقیق اثرات خشکی را تخفیف و پایداری غشاء سلولی را افزایش داد، که با نتایج گزارش شده از این ماده در گیاه برنج (۱۳)، جو (۱۶) و پنبه (۳۲) مشابهت دارد. کاربرد خارجیSNP در غلظت مناسب با کاهش $H_2O_2$و نیز ترکیبات خاص مانند MDA از نشت بیشتر یونی در شرایط تنش جلوگیری می‌نماید. این بیشتر نشان می‌دهد که کاربرد خارجی NO می‌تواند کشسانی دیواره سلولی را بهبود داده، روی دو لایه فسفولیپیدهای غشاء عمل کرده و سیالیت غشاها را بهبود و منجر به افزایش رشد گیاه گردد (۳۱). بنابراین این مطالعات تاکید می‌کند که کاهش در نشت الکترولیت با کاربرد SNP ممکن است بر پایه نقش SNP در کمک به نگهداری کارکرد غشاء از طریق القاء مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانت و بالا بردن جذب یون که به موجب آن گیاهان را در برابر زیان اکسیداتیو محافظت می‌نماید باشد (۳۲).

**فعالیت آنزیم کاتالاز:** فعالیت کاتالاز در پاسخ به قطع آبیاری از مرحله ساقه‌روی در هر دو ژنوتیپ به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۳). این افزایش در اکوتیپ ساری بیشتر از رقم مجاری بود ولی تنش گرده‌افشانی تاثیری بر محتوای آنزیم در هر دو ژنوتیپ نداشت. از طرف دیگر در رقم مجاری کاربرد خارجی ۱۰۰ میکرومولار SNP در مرحله تنش ساقه روی و ۲۰۰ میکرومولار در مرحله تنش گرده‌افشانی سبب افزایش معنی‌دار ۱۲۰درصدی محتوای این آنزیم نسبت به عدم کاربرد آن شد اما در اکوتیپ ساری کاربرد ۱۰۰ میکرومولار SNP سبب کاهش معنی‌دار فعالیت کاتالاز در مرحله تنش ساقه‌روی گردید (جدول ۳).

**فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:** تنش خشکی از مرحله ساقه‌روی و گرده افشانی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در رقم مجاری به طور معنی‌داری کاهش داد اما در اکوتیپ ساری تنش از مرحله ساقه‌روی سبب افزایش فعالیت آنزیم شد اما در مرحله گرده‌افشانی تاثیری نداشت. کاربرد خارجی سدیم نیتروپروساید در رقم مجاری کاهش در فعالیت آنزیم در مرحله تنش ساقه‌روی را جبران و سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آن گردید ولی تاثیری در مرحله تنش گرده‌افشانی نداشت. در اکوتیپ ساری کاربرد خارجی SNP در مرحله تنش ساقه‌روی تاثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم نداشت ولی در تنش گرده‌افشانی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آسکوربات پراکسیداز نسبت به عدم کاربرد این ماده شد (جدول ۳).

**فعالیت آنزیم پراکسیداز:** قطع آبیاری از مرحله ساقه-روی فقط در رقم مجاری سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد گردید ولی در اکوتیپ ساری تاثیری نداشت. بطورکلی بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به رقم مجاری با میانگین ۲۸/۳ میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بود که نسبت به اکوتیپ ساری با میانگین ۲۵/۱ میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). از طرف دیگر کاربرد خارجی ۱۰۰ میکرومولار SNP در رقم مجاری از کاهش فعالیت آنزیم در شرایط تنش ساقه‌روی جلوگیری و سبب افزایش معنی‌دار ۱۵۰ درصدی در فعالیت آنزیم نسبت به گیاهانی که فقط تحت تیمار خشکی بودند گردید. اما کاربرد ۱۰۰ میکرومولار SNP در اکوتیپ ساری تاثیر معنی‌داری در مراحل

قطع آبیاری نداشت ولی سطح ۲۰۰ میکرومولار آن سبب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم در شرایط تنش گردید (جدول ۳).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز در این آزمایش در شرایط تنش بخصوص در رقم مجاری کاهش نشان داد ولی در اکوتیپ ساری افزایش یافت. فاروق و همکاران (۲۰۰۹) نیز در آزمایش خود کاهش در فعالیت APX را در شرایط خشکی گزارش نمودند (۱۳). از طرف دیگر نصیبی (۲۰۱۱) افزایش در فعالیت APX تحت تنش خشکی را گزارش نمود (۳۷). با توجه به این که آسکوربات پراکسیداز در سیکل آسکوربات – گلوتاتیون، با مصرف آسکوربات به عنوان دهنده الکترون مقدار پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهد افزایش در مقدار پراکسید هیدروژن تحت تنش شدید خشکی، کاهش در فعالیت APX را به دنبال داشته باشد. کاتالاز فرآیند تبدیل $H_2O_2$ را به آب و اکسیژن کاتالیز می‌کند (۲۴). بنابراین این عامل، افزایش در میزان آنزیم کاتالاز در شرایط تنش را در این آزمایش توجیه می‌نماید، خزائی و همکاران (۲۰۱۴) نیز بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را در تیمار تنش شدید خشکی در فلفل شیرین گزارش نمودند (۲۸). چنین نتیجه‌ای در گوجه‌فرنگی (۳۷) و *Dendrobium huoshanense* (۱۲) تحت تنش خشکی گزارش گردید. لازم به ذکر است که در گیاه ماریتیغال تحت تنش خشکی تولید متابولیت‌های ثانویه (سیلیمارین) افزایش می‌یابد در بیوسنتز سیلیمارین آنزیم پراکسیداز واکنش اتصالی اکسیداتیو بین تاکسی‌فولین و الکل کونیفریل را کاتالیز می‌کند (۱). بنابراین با افزایش تنش خشکی در این گیاه به نظر می‌رسد که مقادیر بیشتری از این آنزیم در بیوسنتز سلیمارین شرکت نماید، که در نتیجه کاهش در محتوای آنزیم پراکسیداز در شرایط خشکی را در پی داشته باشد. کاربرد خارجی SNP در این آزمایش فعالیت بیشتر آنزیم‌ها را در تیمارهایی که در اثر تنش کاهش یافته بود افزایش و در تیمارهایی که در اثر تنش افزایش یافته بود، افزایش یا کاهش داده و یا تاثیر معنی‌داری بر آن اعمال نکرده است که نشان‌دهنده نقش تنظیمی این مولکول پیام رسان به‌عنوان یک تنظیم کننده رشد می‌باشد. اکسید نیتریک سریعاً با ROS، تیول‌ها و پروتئین‌ها واکنش نشان داده تا پیام‌های بیوشیمیایی تولید و به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم فعالیت آنزیمی را تنظیم نماید (۴۶). به عبارت دیگر NO ممکن است ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول‌ها را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مانند SOD ، که سوپر اکسید را به $H_2O_2$ تبدیل می‌کند، و CAT و APX که هر دو $H_2O_2$ را از بین می‌برند افزایش دهد (۳۳). فاروق و همکاران (۲۰۰۹) در برنج و گان و همکاران (۲۰۱۵) در جو در بررسی تحمل به خشکی نشان دادند که محلول‌پاشی گیاهان با ۱۰۰ میکرومولار SNP، سبب افزایش فعالیت SOD، CAT و APX شده و غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر از آن سبب کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم‌ها گردیده است (۱۶،۱۳). بنابراین می‌توان گفت که تحت تنش خشکی در ماریتیغال، ماده رها کننده اکسید نیتریک در غلظت مناسب به عنوان یک پیام‌رسان ثانویه، باعث افزایش فعالیت یا القای برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مانند CAT و APX گردیده و در نتیجه مانع عملکرد ROS شده و این امر به گیاه کمک می‌کند تا بهتر بتواند شرایط تنش را تحمل نماید.

**جدول ۳: مقایسات میانگین تاثیر سدیم نیتروپروساید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در ماریتیغال تحت تنش خشکی**

**Table 3. Comparison of means for the effect of SNP on enzymes antioxidant activity in milk thistle under drought stress.**

| اکوتیپ ساری Sari ecotype | رقم مجاری Hungarian cultivar | اکوتیپ ساری Sari ecotype | رقم مجاری Hungarian cultivar | اکوتیپ ساری Sari ecotype | رقم مجاری Hungarian cultivar | | **تیمار** Treatments |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| آنزیم پراکسیداز (میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) peroxidase [μmolmg$^{-1}$(protein)min$^{-}$ | آنزیم پراکسیداز (میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) peroxidase [μmolmg$^{-1}$(protein)min$^{-}$ | آسکوربات پراکسیداز (میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) ascorbate peroxidase [μmolmg$^{-1}$(protein)min$^{-}$ | آسکوربات پراکسیداز (میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) ascorbate peroxidase [μmolmg$^{-1}$(protein)min$^{-1}$] | آنزیم کاتالاز (میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم‌پروتئین) Catalase [μmolmg$^{-1}$(protein)min$^{-1}$] | آنزیم کاتالاز (میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) Catalase [μmolmg$^{-1}$(protein)min$^{-1}$] | تنش خشکی Drought stress | سدیم نیتروپروساید Sodiun nitroprusside |
| 30.43 b-d | 26.61 de | 2.19 h-j | 3.16 c-e | 6.41 e-h | 4.23 h | شاهد Control | صفر میکرومولار 0 μM |
| 34.88 a-c | 16.61 gh | 4.01 ab | 2.32 g-j | 15.35 ab | 9.55 b-e | تنش ساقه‌روی Stem elongation stress | |
| 30.24 b-d | 28.07 c-e | 1.88 ij | 2.42 f-i | 6.01 e-h | 6.57 e-h | تنش گرده‌افشانی Anthesis stress | |
| 11.61 h | 37.88 ab | 2.48 e-i | 3.12 c-f | 9.31 c-f | 9.39 c-f | شاهد Control | ۱۰۰ میکرومولار 100 μM |
| 30.40 b-d | 41.69 a | 4.24 a | 3.47 b-d | 8.62 c-g | 20.96 a | تنش ساقه‌روی Stem elongation stress | |
| 24.18 d-f | 21.49 e-g | 4.11 ab | 1.87 ij | 9.41 b-e | 5.58 f-h | تنش گرده‌افشانی Anthesis stress | |
| 18.18 f-h | 31.27 b-d | 1.69 j | 2.98 c-g | 5.15 gh | 4.21 h | شاهد Control | ۲۰۰ میکرومولار 200 μM |
| 24.62 d-f | 25.19 d-f | 3.62 a-c | 3.40 b-d | 7.44 d-g | 10.76 b-d | تنش ساقه‌روی Stem elongation stress | |
| 21.44 e-g | 26.02 de | 2.85 d-h | 2.86 d-h | 7.85 d-g | 14.62 a-c | تنش گرده‌افشانی Anthesis stress | |
| 7.83 | | 0.72 | | 4.13 | | LSD | |

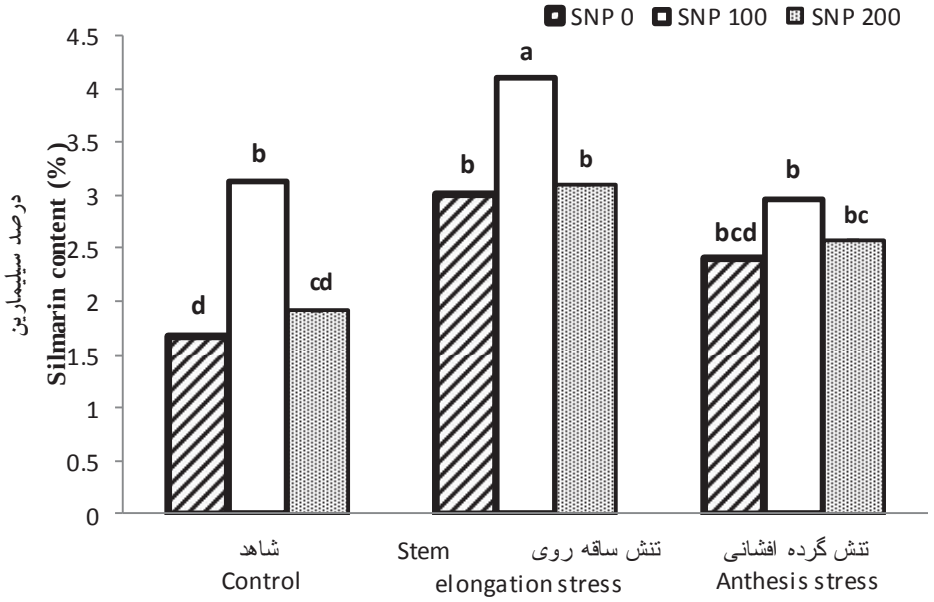
میانگین‌هایی که در هر ستون و ردیف در هر صفت دارای حروف مشابه می‌باشند، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد ندارند.

Means with at least one similar letter in each column or row in any trait have no signification difference based on LSD test at %5 of probability level.

**محتوای سیلیمارین دانه:** اثر برهم‌کنش بین زمان‌های قطع آبیاری و محلول‌پاشی با SNP بر محتوای سیلیمارین دانه بیانگر افزایش معنی‌دار ماده موثره ماریتیغال با افزایش شدت خشکی و کاربرد SNP می‌باشد (شکل ۳). تنش از مرحله ساقه‌روی محتوای سیلیمارین دانه را ۸۰ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. از طرف دیگر کاربرد SNP اثر افزایشی بر درصد سیلیمارین دانه در شرایط تنش خشکی داشت به نحوی که کاربرد ۱۰۰ میکرومولار SNP، محتوای سیلیمارین دانه را ۳۷ درصد بیشتر از عدم کاربرد آن در مرحله تنش ساقه‌روی افزایش داد. تنش از مرحله گرده‌افشانی و نیز کاربرد ۲۰۰ میکرومولار SNP در شرایط تنش افزایش معنی‌داری بر درصد سیلیمارین دانه ایجاد نکرد. همچنین کاربرد ۱۰۰ میکرومولار SNP افزایش معنی‌داری بر محتوای سیلیمارین دانه در گیاهان آبیاری شده ایجاد نمود. به‌طوری‌که درصد سیلیمارین دانه را ۸۷ درصد نسبت به عدم کاربرد آن افزایش داد (شکل ۳). بنابراین در مناطقی نیز که تنش خشکی حادث نمی‌شود استفاده از این ماده با توجه به

پایین بودن هزینه تهیه آن می‌تواند در افزایش عملکرد ماده موثره و کاهش هزینه تولید مورد توجه قرار گیرد.

در اثر تنش خشکی بدلیل کمبود آب روزنه‌ها بسته شده و ورود $CO_2$ کاهش می‌یابد، در نتیجه مصرف ترکیبات احیاء کننده برای تثبیت $CO_2$ از طریق چرخه کالوین به‌طور قابل ملاحظه‌ای پایین می‌آید و منبع بسیار بزرگی از $NADPH+H^+$ و ATP تولید می‌شود که کلروپلاست‌ها را در معرض انرژی تهییج شده اضافی قرار داده و در نهایت سبب افزایش تشکیل ROS و در نتیجه زیان به سلول‌ها می‌گردد (۹)، از طرف دیگر در گیاهان دارویی و از جمله در ماریتیغال در اثر تنش، بدلیل کاهش رشد، تثبیت کربن در طی فتوسنتز صرف تولید ترکیبات احیاء شده مانند فنل‌ها شده و تولید این مواد بدلیل جلوگیری از اکسیداسیون درون سلولی افزایش می‌یابد (۵۱) که این ترکیبات نیز با مصرف $NADPH+H^+$ که در شرایط تنش تجمع یافته از تشکیل ROS اضافی جلوگیری (۲۷) و در نتیجه مقاومت گیاه به خشکی را افزایش می‌دهند (۴۳).



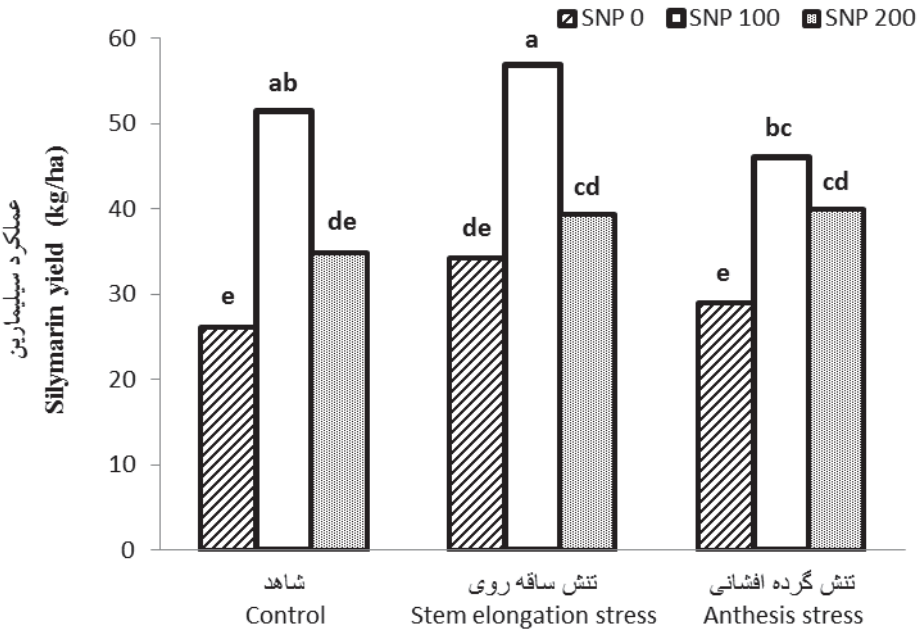

**شکل ۳: مقایسه میانگین درصد سیلیمارین دانه ماریتیغال تحت تاثیر سطوح قطع آبیاری و غلظت‌های مختلف SNP (حروف مشترک در بالای ستون‌ها عدم اختلاف معنی دار تیمارها با آزمون LSD در سطح ۵٪ را نشان می‌دهد)**

**Figure 3. Mean comparison of grain silymarin content of milk thistle affected by withholding irrigation levels and different concentrations of SNP. (Different letters on the top of the bars indicate significant difference at P < 0.05 by LSD).**

کشاورز افشار و همکاران (۲۰۱۵) و هنداوی و همکاران (۲۰۱۳) نیز افزایش در محتوای سیلیمارین دانه در شرایط کمبود آب را گزارش نمودند (۲۳،۲۷). کاربرد اکسید نیتریک در این آزمایش اثر مثبتی در افزایش درصد سیلیمارین دانه تحت شرایط تنش و عدم تنش داشت. به نظر می‌رسد که NO با کاهش گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، سرعت فتوسنتز را افزایش و کارایی مصرف آب را بالا برده و در نتیجه مواد فتوسنتزی بیشتری صرف تولید متابولیت‌های ثانویه می‌گردد. از طرف دیگر اکسید نیتریک با افزایش در فعالیت آنزیم‌ها بویژه پراکسیداز نقش مهمی در افزایش کاتالیز واکنش

اتصالی بین تاکسی‌فولین و الکل کونیفریل در بیوسنتز سیلیمارین عهده‌دار می‌باشد (۱). همچنین احتمال می‌رود کاربرد NO با افزایش گلدهی (۴۷) و طول دوره پر شدن دانه‌ها، انتقال و نیز انتقال مجدد مواد موثره از سایر بخش‌ها به میوه‌ها را در شرایط آبیاری و تنش تشدید نموده باشد که این امر نیز سبب افزایش ماده موثره شده است. چنین نتیجه‌ای توسط هامودا و همکاران (۱۹۹۳) نیز در ماریتیغال ارائه گردید (۲۲). برخی تحقیقات نقش مثبت القاء کننده‌ها را در افزایش تجمع متابولیت‌های ثانویه نشان داده‌اند، به‌طوری‌که کاربرد خارجی متیل جاسمونات تجمع سیلیمارین را در کشت سلولی ریشه و ریشه‌های مویی ماریتیغال تسریع کرده است (۱۱).

**عملکرد سیلیمارین:** قطع آبیاری تاثیر معنی‌داری بر عملکرد سیلیمارین نداشت (شکل ۴)، در صورتی که محلول‌پاشی گیاهان با ۱۰۰ میکرومولار SNP در مرحله تنش ساقه‌روی و کاربرد هر دو سطح آن در مرحله تنش گرده‌افشانی عملکرد سیلیمارین را بطور معنی‌داری نسبت به عدم کاربرد SNP افزایش داد (شکل ۴). بیشترین افزایش با کاربرد ۱۰۰ میکرومولار SNP در مرحله تنش ساقه‌روی حاصل شد. گرچه گیاهان آبیاری شده عملکرد دانه بالاتری داشتند و تنش خشکی سبب کاهش عملکرد دانه شد ولی با توجه به اینکه گیاهان آبیاری شده از درصد سیلیمارین دانه پایین‌تری برخوردار بودند همین عامل باعث کاهش عملکرد سیلیمارین شاهد گردید به نحوی که تفاوت معنی‌داری با گیاهان تحت تنش خشکی نداشت.




**شکل ٤: مقایسه میانگین عملکرد سیلیمارین ماریتیغال تحت تاثیر سطوح قطع آبیاری و غلظت‌های مختلف SNP**

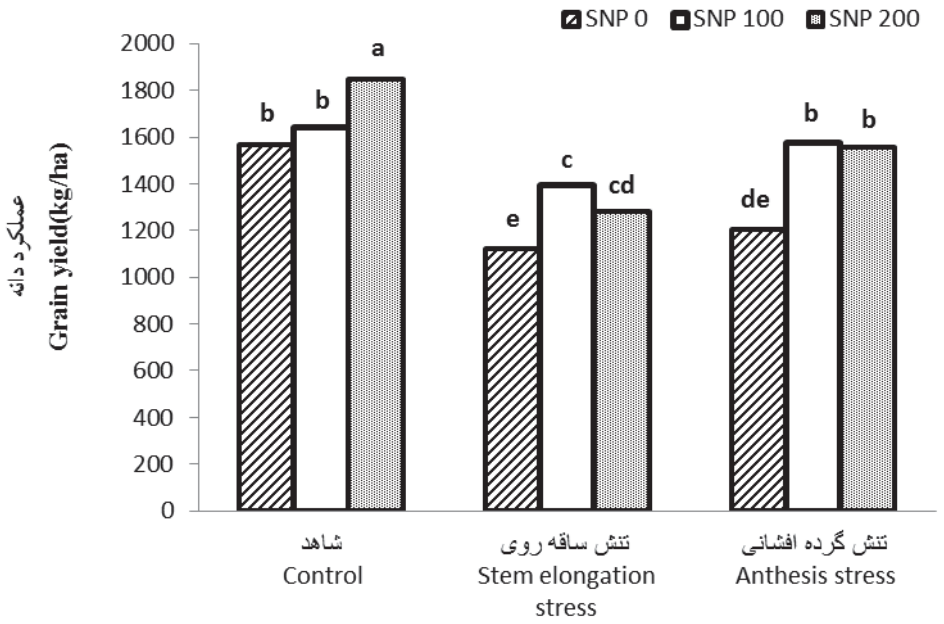
**(حروف مشترک در بالای ستون‌ها عدم اختلاف معنی‌دار تیمارها با آزمون LSD در سطح ۵٪ را نشان می‌دهد)**

**Figure 4. Mean comparison of silymarin yield of milk thistle affected by withholding irrigation levels and different concentrations of SNP. (Different letters on the top of the bars indicate significant difference at P < 0.05 by LSD).**

تنش خشکی درصد تولیدات ثانویه را در گیاهان دارویی و آروماتیک افزایش می‌دهد اما مقدار تولیدات ثانویه تحت تنش خشکی کاهش می‌یابد، (۲۳). در آزمایشی روی ماریتیغال گزارش شد که تنش شدید عملکرد سیلیمارین را تا ۱۳ درصد کاهش داده ولی تنش ملایم کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد ایجاد نکرده است (۲۷). با توجه به بهبود عملکرد دانه با کاربرد NO در شرایط تنش، عملکرد سیلیمارین نیز که تابع عملکرد دانه و درصد سیلیمارین دانه می‌باشد تحت تنش افزایش نشان داد.

گنیوا و همکاران (۲۰۰۸) نیز در بررسی اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در ماریتیغال گزارش نمودند که محتوی سیلیمارین دانه بطور معنی‌داری با محلول‌پاشی برگی با تیدیازورن (تنظیم کننده رشد گیاه با فعالیت سیتوکینین قوی) افزایش یافته است و این تنظیم کننده‌ها مقدار سیلیمارین کل را با افزایش عملکرد دانه در هکتار افزایش داده است (۲۰).

**عملکرد دانه:** بیشترین عملکرد دانه مربوط به اکوتیپ ساری با میانگین ۱۵۴۸/۷ کیلوگرم در هکتار بود که نسبت به رقم مجاری با میانگین ۱۳۸۰/۷ کیلوگرم در هکتار تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۱). همچنین نتایج نشان داد که اکوتیپ ساری تحمل بیشتری به شرایط قطع آبیاری نسبت به رقم مجاری دارا می‌باشد. همانگونه که نتایج مربوط به فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در این دو ژنوتیپ مشخص کرد تنش خشکی در اکوتیپ ساری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت را افزایش و در رقم مجاری به غیر از آنزیم کاتالاز، فعالیت آنها را کاهش داده است (جدول ۳). همچنین داده‌های مربوط به فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن بویژه پراکسید هیدروژن و سرعت فتوسنتز گیاه به ترتیب کمتر و بیشتر بودن آن در اکوتیپ ساری نسبت به رقم مجاری را نشان داد (داده‌ها گزارش نشده) که بیانگر فعالیت بیشتر راهبردهای دفاعی در این اکوتیپ در شرایط تنش می‌باشد که در نهایت با افزایش در تولید مواد فتوسنتزی، عملکرد بالاتری نسبت به رقم مجاری بدست آورده است. از طرف دیگر کاربرد SNP در رقم مجاری توانست کاهش در فعالیت آنزیم‌ها در شرایط تنش را جبران نماید، بنابراین استفاده از این ماده در این ژنوتیپ اهمیت بیشتری نسبت به اکوتیپ ساری در شرایط تنش خواهد داشت. بررسی میانگین برهمکنش SNP و تنش خشکی بر عملکرد دانه نشان داد که قطع آبیاری از مرحله ساقه‌روی سبب کاهش معنی‌دار ۲۸٪ و از مرحله گرده‌افشانی موجب کاهش معنی‌دار ۲۳٪ در عملکرد دانه نسبت به شاهد شده است (شکل ۵). کاربرد خارجی اکسید نیتریک از طریق محلول‌پاشی با SNP تاثیر معنی‌داری بر افزایش عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی داشت به نحوی که کاربرد ۱۰۰ میکرومولار SNP سبب افزایش ۲۴ و ۳۱ درصد و سطح ۲۰۰ میکرومولار سبب افزایش ۱۴ و ۲۹ درصد در عملکرد دانه به‌ترتیب در مرحله تنش ساقه‌روی و گرده‌افشانی گردید (شکل ۵). بنابراین با توجه به اینکه گیاهان شاهد تقریبا هفته‌ای یک‌بار آبیاری می‌شدند محلول‌پاشی با SNP با بهبود عملکرد دانه در شرایط تنش توانست تعداد دفعات آبیاری را ۵ و ۳ مرتبه به ترتیب در مرحله تنش ساقه‌روی و گرده افشانی کاهش و سبب صرفه‌جویی در مصرف آب گردد.




**شکل ۵: مقایسه میانگین عملکرد دانه ماریتیغال تحت تاثیر سطوح قطع آبیاری و غلظت‌های مختلف SNP (حروف مشترک در بالای ستون‌ها عدم اختلاف معنی دار تیمارها با آزمون LSD در سطح ۵ درصد را نشان می‌دهد).**

**Figure 5. Mean comparison of grain yield of milk thistle affected by withholding irrigation levels and different concentrations of SNP. (Different letters on the top of the bars indicate significant difference at P < 0.05 by LSD).**

کمبود آب سبب یک سری تغییرات در گیاهان شامل کاهش در سطح برگ، بستن روزنه‌ها و کاهش تعرق (۱۸)، اختلال در جذب آب و مواد غذایی (۱۹) و برهم خوردن تعادل بین ROS و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی (۳۹) می‌گردد، در نتیجه مواد فتوسنتزی منتقل شده به دانه کاهش یافته (۳۵) و این امر سبب کاهش عملکرد نهایی در شرایط مزرعه می‌گردد. کاهش در عملکرد دانه ماریتیغال با افزایش کمبود آب توسط هنداوی و همکاران (۲۰۱۳) و کشاورز افشار و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش شده است (۲۵،۲۳) . کاربرد خارجی اکسید نیتریک تاثیر مثبتی در بهبود عملکرد دانه ماریتیغال تحت تنش خشکی داشت. کاربرد SNP با کاهش هدایت روزنه‌ای و تعرق، کاهش ROS به‌ویژه پراکسید هیدروژن و افزایش در فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه افزایش کارایی مصرف آب و تجمع ماده خشک گردیده (۱۳،۱۶) و با انتقال بیشتر مواد به دانه بهبود عملکرد دانه در شرایط تنش را موجب گردیده است. عرب و همکاران (۲۰۱۶) نیز در بررسی تاثیر تنش خشکی و SNP بر گلرنگ نتیجه گرفتند که عملکرد دانه در واحد سطح با کاربرد ۱۰۰ میکرومولار SNP به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است که مطابق با نتایج این آزمایش می‌باشد (۳).

## نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد SNP با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در شرایط تنش سبب افزایش پایداری غشاء سلولی و حفظ محتوای نسبی آب برگ شده و در نتیجه سبب افزایش عملکرد دانه در واحد سطح می‌شود. همچنین محلول‌پاشی گیاهان با ۱۰۰ میکرومولار SNP با افزایش درصد سیلیمارین دانه، عملکرد ماده موثره در شرایط تنش را نیز افزایش داد. در این آزمایش رقم

مجاری حساسیت بیشتری بـه کمبـود آب و واکـنش-پذیری بیشتری بـه کـاربرد SNP نسـبت بـه اکوتیـپ ساری نشان داد. بنابراین مـی‌تـوان نتیجـه گرفـت کـه اکوتیپ ساری در شرایط کمبود آب از پتانسیل کشت بهتری برخوردار بوده، و کاربرد SNP نیـز در غلظـت مناسب می‌تواند به عنوان عاملی برای کـاهش شـدت تنش در شرایط کم آبیاری عمل کرده و سبب تقویـت کشت این گیاه در شرایط دیم و در نتیجه افـزایش در عملکرد مواد موثره را در پی داشته باشد.

## منابع


1.AbouZid, A. and Ahmed, O.M. 2013. Silymarin Flavonolignans: Structure–Activity Relationship and Biosynthesis. Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 40. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00014-X.

2.Aebi, H .1984. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105: 121–126.

3.Arab, S., Baradaran Firouzabadi, M. and Asghari, H.R. 2016. The effect of ascorbic acid and sodium nitroprusside foliar application on photosynthetic pigments and some traits of spring safflower under water deficit stress. J. Plant Prod. 38 (4): 93-104. (In Persian)

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

5.Bettaieb, I., Zakhama, N., Wannes, W.A., Kchouk, M.E.,and Marzouk, B. 2009. Water deficit effects on Salvia officinalis fatty acids and essential oils composition. Sci. Hortic. Amst. 120: 271–275.

6.Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analy. Biochem. 72: 248-254.

7.Chance, B. and Maehly, A.C.1995. Assay of catalases and peroxidase. Methods Enzymol. 2: 764-775.

8.Chaves, M.M., Maroco, J.P. and Pereira, J.S. 2003. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. Funct. Plant Biol. 30: 239-264.

9. Chen, H.X., Gao, H.Y., An, S.Z. and Li, W.J. 2004. Dissipation of excess energy in Mehler-peroxidase reaction in rumex leaves during salt shock. Photosynthetica, 42:117–122.

10.Egilla, J.N., Davies, J.R. and Boutton, T.W. 2005. Drought stress influences leaf water content, photosynthesis, and water-use efficiency of *Hibiscusrosa-sinensis* at three potassium concentrations. Photosynthetica. 43: 135–140.

11.Elwekeel, A., Elfishway, A. and AbouZid, S. 2012. Enhanced accumulation of flavonolignans in *Silybum marianum* cultured roots by methyl jasmonate. Phytochem Lett., 5: 393–396.

12.Fan, H., Li, T., Guan, L., Li, Z., Cai, Y. and Lin, Y. 2012. Effect of exogenous nitric oxide on antioxidant and DNA methylation of *Dendrobium huoshanense* grown under drought stress. Plant Cell Tiss Organ Cult. 109: 307-314.

13.Faroog, M., Basra, S.M.A., Wahid, A. and Rehman, H. 2009. Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice. J. Agro. Crop Sci. 195: 254-261.

14.Flora, K., Hahn, M., Rosen, H. and Benner, K. 1998. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. Am. J. Gastroentero, l93: 139-143.

15.Fu, J. and Huang, B. 2001. Involvement of antioxidant and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Environ Exp. Bot. 45: 105-114.

16.Gan, L., Wu, X. and Zhong, Y. 2015. Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in hulless barley. Plant Prod. Sci. 18(1): 52-56.

17.Gapinska, M., Sklodowska, M. and Gabara, B. 2008. Effect of short- and long-term salinity on the activities of ant oxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. Acta Physiol. Planta. 30:11-18.

18.Garcia-Mata, C. and Lamattina, L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. Plant Physiol. 126:1196-1204.
19.Garg, B.K. 2003. Nutrient uptake and management under drought: nutrient-moisture interaction Curr. Agri. 27: 1-8.
20.Geneva, M., Zehirov, G., Stancheva, I., Iliev, L. and Georgie, V.G. 2008. Effect of soil fertilizer, folia fertilizer, and growth regulator application on milk thistle development, seed yield, and silymarin content. Com. Soil Sci. Plant Anal. 39: 17-24.
21.Ghanbari, F., Sayyari, M., Seydi, and Amirinejad, M. 2014. The effect of 5-aminolevonlinic acid on some physiological responses of coriander under drought stress. J. Plant Prod. 36(4): 93-106. (In Persian).
22.Hammouda, F.M., Ismail, S.I., Hassan, N.M., Zaki, A.K. and Kamel, A. 1993. Evaluation of the Silymarin content in *Silybum marianum* Gaertn. cultivated under different agriculture conditions. Phytoth. Res. 7: 90-91.
23.Hendawy, S.F., Hussein, M.S., Youssef, A.A. and EL-Mergawi, R.A. 2013. Respnse of *Silybum marianum* plant to irrigation intervals combined with fertilization. Nusantara Bio, 5:22-29.
24.Kavita, S., Ritambhara, G.K., Shalini, V. and Dubey, R.S. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Sci. 161(6):1135-1144.
25.Keshavarz Afshar, R., Chaichi, M.R., Assareh, M.H., Hashemi, M. and Liaghat, A. 2014. Interactive effect of deficit irrigation and soil organic amendments on seed yield and flavonolignan production of milk thistle. Ind. Crops Prod. 58: 166-172.
26.Keshavarz Afshar, R., Hashemi, M., DaCosta, M., Spargo, J. and Sadeghpour, A. 2016. Biochar application and drought stress effect on physiological characteristics of *Silybum marianum*. Com Soil Sci. Plant Anal. 47(6): 743-752.
27.Keshavarz Afshar, R., Chaichi, M.R., Ansari, M., Jahanzad, E. and Hashemi, M. 2015. Accumulation of silymarin in milk thistle seeds under drought stress. Planta. 242: 539-543.
28.Khazaei, Z., Sayyari, M. and Seydi, M. 2014. Effect of 5-aminolevonlinic acid on changes water deficit stress tolerance index and catalase activity of sweet pepper seedlings. J Plant Prod. 37(4): 79-92. (In Persian)
29.Kvasnicka, F., Biba, B., Sevick, R., Voldrich, M. and Kratka, J. 2003. Analysis of the active components of silymarin. J. Chrom. A. 990, 239-245.
30.Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M. and Pagnussat, G. 2003. Nitrix oxide: The versatility of on extensive signal molecule. Ann. Rev. Plant Biol. 54:109-136.
31.Leshem, Y.Y. and Haramaty, E. 1996. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* L. foliage. J. Plant Physiol. 148: 258-263.
32.Liu, S., Dong, Y. and Xu, L. 2014. Effects of foliar applications of nitric oxide and salicylic acid on salt-induced changes in photosynthesis and antioxidative metabolism of catton seedlings. Plant Growth Reg. 73: 67-78.
33.Misra, A.N., Misra, M. and Singh, R. 2011. Nitric oxide ameliorates stress responses in plants. Plant Soil Environ. 57(3): 95-100.
34.Morazzoni, P. and Bombard, E. 1995. *Silybum marianum*. Fitoterapia, 66: 3-42.
35.Moussavi, S.M., Salari, M. and Mobasser, H.R. 2011. The effect of different irrigation intervals and mineral nutrition on seed yield of ajowan (*Trachysper mumammi*). Ann. Biol. Res. 2(6): 692-698.
36.Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiol. 22: 867-880.
37.Nasibi, F. 2011. Effect of different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) pretreatment on oxidative damages induced by drought stress in tomato plant. J. Plant. Biol. 9 (3): 74-63. (In Persian).
38.Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Rieeiro, D. and Wilson, I. 2008. Nitic oxide, stomatal closure and abiotic stress. J. Exp. Bot. 59:165-176.

39.Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis andantioxidant metabolism in higher plants. J. Plant Physiol. 161:1189-1202.
40.Sairam, R.K., Deshmukh, PS. and Shukla, D.S. 1997. Tolerance to drought and temperature stress is relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. J. Agro. Crop. Sci. 178:171-177.
41.Sarath, G., Bethke, P.C., Jones, J., Baird, L.M., Hou, G. and Mitchell, R.B. 2006. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. Planta. 223: 1154–1164.
42.Selmar, D. 2008. Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. Agron. Forest Res. 58: 139-144.
43.Selmar, D. and Kleinwächter, M. 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. Ind. Crop. Prod. 42: 558-566.
44.Sharma, P. and Dubey, R.S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activitiesof antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Reg. 46: 209-221.
45.Shi, Q., Ding, F., Wang, X. and Wei, M. 2007. Exogenous nitric oxide protect cucumber root against oxidative stress induced by salt stress. Plant. Physiol. Biochem. 45: 542-550.
46.Siddiqui, M., Al-Whaibi, M. and Basalah, M. 2010. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. Protoplasma. *doi 10.1007/s00709-010-0206-9.*
47.Simpson, G.G. 2005. No flowering. Bioess. 27: 239-241.
48.Stoiljkovic, Z., Petrovic, S.D. and Ilic, B.S. 2007. Examination of localization of silymarin and fatty oil in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Fruit. CI CEQ. 13(2): 55-59.
49.Tan, J., Zhao, H., Hong, J., Han, Y. and Zhao, W. 2008. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. World J. Agri. Sci. 4(3): 307-313.
50.Tian, X. and Lei, Y. 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Bio. Plantarum. 50: 775-778.
51.Turtola, S., Manninen, A., Rikala, R. and Kainulainen, P. 2003. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in scots pine and Norway spruce seedling. J. Chem. Ecol. 29: 1981-1995.
52.Xiong, J., Zhang, L., Fu, G., Yang, Y., Zhu, C. and Tao, L. 2012. Drought-induced proline accumulation is uninvolved with increased nitric oxide, which alleviates drought stress by decreasing transpiration in rice. J. Plant. Res. 125: 155-164.