

تأثیر تیمارهای مختلف آبیاری روی صفات فیزیولوژی و بیوشیمیایی گیاه داروئی خار مریم (*Silybum marianum*)

مصطفی سارانی ملاک^۱، مریم اله دو^{۲*}، لیلا مهرآوران^۲، حلیمه پیری^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳- گروه آبیاری و زهکشی، دانشکده آب و خاک، دانشگاه زابل، زابل، ایران

* مسئول مکاتبه: Maryam.allahdou@uoz.ac.ir

DOI: 10.22034/CSRAR.2022.322452.1175

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷

چکیده

تنش کمبود آب رفتار گیاهی را از طریق تأثیر بر متابولیسم گیاهی تغییر داده و بنابراین تأثیر زیادی در تولیدات گیاهان دارد. به منظور ارزیابی تأثیر تنش خشکی روی صفات فیزیولوژی و بیوشیمیایی گیاه خارمریم، تیمارهای ۱۰۰ درصد، ۷۵ درصد، ۵۰ درصد و ۲۵ درصد نیاز آبی گیاه در گلخانه شهرستان هیرمند روستای شندل بر گیاه اعمال و برداشت در مراحل مختلف شامل ۶ و ۱۳ هفته بعد از کاشت انجام و صفاتی نظیر وزن خشک، وزن تر، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئید، پروتئین، پرولین و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری در اثر زمان برداشت، سطوح مختلف آبیاری و اثر متقابل زمان برداشت و سطوح مختلف آبیاری نشان داد. میزان کاروتنوئید با افزایش شدت تنش در هر دو مرحله برداشت شروع به کاهش کرد. میزان کلروفیل a در مرحله ۶ هفته بعد از کاشت، کمتر از ۱۳ هفته بعد از کاشت بود ولی در هر دو مرحله، با افزایش تنش میزان آن کاهش پیدا کرد. میزان پروتئین و پرولین نیز با افزایش شدت تنش افزایش یافت. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز با افزایش شدت تنش افزایش یافت، بطوری‌که در شرایط ۱۰۰ درصد نیاز آبی کمترین مقدار و در شرایط ۲۵ درصد نیاز آبی به حداکثر مقدار رسید. نتایج این تحقیق ثابت کرد که گیاه خارمریم سازگاری خوبی به تنش خشکی داشته که احتمالاً به دلیل کاهش صدمات اکسیداتیو با القای سیستم آنتی‌اکسیدانی و تجمع اسمولیت‌هایی نظیر پرولین و پروتئین می‌باشد که این تغییرات نوعی سازگاری به شرایط تنش محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، آنزیم، تنش، رنگیزه‌های فتوسنتزی، کاتالاز

مقدمه

اهمیت دارویی این گیاه به دلیل حضور گروهی از فلاونوئیدها به نام سیلی‌مارین است. سیلی‌مارین ترکیبی از انواع فلاونوئیدها است که در آب نامحلول و در الکل محلول است. در بذره‌های گیاه خارمریم حدود ۴ درصد سیلی‌مارین وجود دارد که شامل ۵ فلاونوئید با نام‌های سیلیبین آ و ب، سیلیادین، سیلی کریستین و دی‌هیدروسیلیبین است. سیلیبین ترکیب اصلی سیلی‌مارین (۵۰ تا ۶۰ درصد) است و بیشتر خواص بیولوژیکی سیلی‌مارین وابسته به حضور این ترکیب است (Dermarderson et al., 2011).

گیاه خارمریم به دلیل وجود فلاونوئیدها سیلی‌مارین در میوه‌های آن، به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی برای محافظت از کبد و درمان طیف وسیعی از بیماری‌های کبدی مانند کبد حاوی سموم و هیپاتیت کبدی در نظر گرفته شده است

خار مریم یک گیاه دارویی علفی یکساله /دوساله متعلق به خانواده بزرگ *Asteraceae*، با نام انگلیسی *milk thistle* یا *Mary's thistle* می‌باشد. این گیاه در سراسر جهان پراکنش داشته و قرن‌ها در اروپا، آفریقا، چین، هند و استرالیا رشد کرده، اما بومی منطقه مدیترانه است. خارمریم در مصر با نام شوک الحلیب^۱ شناخته شده و در طب سنتی چینی (TCM) نیز مورد توجه قرار گرفته است (Polyak et al., 2013). در کشور ما، این گیاه در استان گلستان، دشت مغان، شوش، اهواز، ایذه و کازرون گسترش یافته است (Ghahraman, 1983).

1. Shook Elgamal

2. Traditional Chinese Medicine

(*et al.*, 2002)، گلوکاتایون پراکسیداز، پراکسی رادوکسین، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز بوده که سبب تنظیم گونه‌های اکسیژن فعال و هموستازی رادوکس می‌شوند (Poulos and Mittler, 2005). آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی خیلی مهم می‌باشند به دلیل اینکه آن‌ها شامل فنلیک‌ها و فلاونوئیدها بوده که نه فقط از گیاه در برابر صدمات ROS دفاع می‌کنند بلکه همچنین این متابولیت‌ها خصوصیات دارویی داشته که ثابت شده است در برابر بیماری‌ها مفید باشند (Bozin *et al.*, 2008).

غربال‌گری فیتوشیمیایی برگ‌های جمع‌آوری شده از گیاه خارمریم در مزرعه و نیز کالوس حاصل از برگ نارس، وجود فلاونوئیدها، فنولیک‌ها، آلکالوئیدها، استروئیدها، تانن‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آمینه را نشان داده است (Balian *et al.*, 2006). عملکرد میوه خارمریم و سیلیمارین بسته به شرایط محیطی، ژنوتیپ‌ها، تاریخ کاشت و برداشت، فاصله بین و داخل ردیف‌ها و شیوه‌های مختلف کشاورزی متفاوت است (Karkanis *et al.*, 2011). گزارش شده است که غلظت متابولیت‌های ثانویه گیاهان عمدتاً ترکیبات فلاونوئید و فنولیک تحت شرایط تنش افزایش می‌یابد (Kleinwächter, 2013) و Selmar and خارمریم بالا می‌برد (Zahir *et al.*, 2014). تحقیقات نشان داده است که تحت تنش خشکی در گیاه خارمریم، میزان کلروفیل برگ، اسکوربیک اسید و گلوکاتایون کاهش ولی میزان پراکسید هیدروژن، پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، اسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون رادوکتاز افزایش یافته است (Elsayed *et al.*, 2019). تأثیر تنش خشکی متوسط و شدید (بر اساس کاهش رطوبت خاک) در میزان سیلیمارین و ترکیبات آن در گیاه خارمریم در شرایط مزرعه نشان داد که تنش خشکی میزان سیلیمارین را در بذور گیاه افزایش داده، بطوری‌که میزان سیلیمارین در تنش متوسط و شدید به ترتیب ۴ تا ۱۷ درصد بیشتر از شرایط نرمال بود (Keshavarz Afshar *et al.*, 2015).

تأثیر تنش خشکی بر روی صفات فیزیولوژی و بیوشیمیایی گیاه *Maclura pomifera* نشان داد که با افزایش تنش میزان کربوهیدرات‌های محلول افزایش یافته اما در شرایط تنش شدید (۳۰ درصد ظرفیت زراعی) میزان آن کاهش یافت. میزان پرولین و مانیتول در شرایط تنش نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت.

(Abenavoli and Milic, 2017). با این حال، سایر فعالیت‌ها و عملکردهای بیولوژیکی بر اساس تداخل گیرنده‌های خاص با سیلی‌مارین در سال‌های اخیر به اثبات رسیده است. فعالیت‌های ضد سرطانی، محافظ قلب، هیپوکلسترولمی و محافظ عصبی از جمله فعالیت‌های بیولوژیکی گیاه خارمریم در نظر گرفته می‌شود و کاربردهایی نیز در خصوص اثرات شیمی‌درمانی، ضد سرطان و محافظتی مشاهده شده است (Dheeraj *et al.*, 2018; Vilahur *et al.*, 2018). کاربرد درمانی خارمریم در درمان بیماری‌های قلبی عروقی در بزرگ‌ترین کتاب پزشکی رسمی در چین، Taiping Shenghui Fang، قبل از قرن دهم پس از میلاد توضیح داده شده است (Zhao *et al.*, 2019). سیلیبین توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) به عنوان یک گیاه دارویی برای بیماری‌های کبد تأیید شده است (Takke and Shende, 2019).

تنش‌های محیطی با تأثیر بر مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تولید و غلظت مواد فعال در گیاهان را تغییر می‌دهند (Bohnert *et al.*, 1995). متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در مکانیزم‌های دفاعی بازی کرده و نیز یک منبع مهم از ترکیبات زیست‌فعال بوده که فعالیت‌های دارویی بر علیه بیماری‌های انسان دارند. با این وجود فلاونوئیدها نه تنها فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق آزادسازی رادیکال‌های آزاد داشته بلکه همچنین مسیرهای پیام‌دهی سلولی را در دفاع گیاهان در برابر تنش‌های محیطی تنظیم می‌کنند. گزارش شده است که تنش کمبود آب رفتار گیاهی را از طریق تأثیر بر متابولیسم گیاهی تغییر داده و تأثیر زیادی در تولیدات گیاهان دارد. لذا در معرض قرار دادن گیاهان در برابر تنش کمبود آب یک روش مفید برای بهبود تولید این سازنده‌های فعال می‌باشد (Bettaieb *et al.*, 2008). اگرچه، تنش خشکی باعث تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS^1) شده که اثرات منفی در سطح سلول: صدمه به غشاء، DNA، لیپید و آمینواسیدها داشته و فعالیت آنزیم‌های متعددی را محدود می‌کند (Maurino and Flügge, 2008). به‌منظور به حداقل رساندن این صدمات، گیاهان سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی شامل هر دو نوع آنزیمی و غیرآنزیمی را فعال می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسیددسموتاز (Alscher

1. reactive oxygen species

فاکتور B در نظر گرفته شد. گلدان‌ها به طور نرمال آبیاری و هر دو روز یکبار محلول غذایی هوگلند به آن‌ها داده شد. چهار هفته بعد از کشت رژیم آبیاری تغییر کرده و تیمارهای مختلف آبیاری اعمال شد. جهت اعمال تنش خشکی از روش وزنی (با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم) استفاده شد؛ بدین‌صورت که پس از اختلاط خاک و اضافه نمودن آن به گلدان‌ها، گلدان‌ها به‌صورت کامل اشباع شده و سپس روی گلدان‌ها جهت جلوگیری از تبخیر آب پوشانده شد. خروج آب ثقلی از انتهای گلدان در بازه‌های زمانی مشخص تا زمانی که خروج آب ثقلی متوقف شود، اندازه‌گیری شد. وزن گلدان در این حالت به‌عنوان وزن در حالت ظرفیت زراعی در نظر گرفته شد. کلیه گلدان‌ها تا زمان استقرار گیاه به‌صورت کامل (چهار هفته بعد از کاشت) تا حد ظرفیت زراعی آبیاری شدند. سپس گلدان‌ها هر هفته توزین شدند. کمبود آب در هر گلدان تا حد رطوبت زراعی گیاه (براساس تغییرات وزن گلدان‌ها) محاسبه شد و حجم آب محاسبه شده در اختیار گیاه قرار می‌گرفت. برای اعمال تنش‌های ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد نیاز آبی، حجم آب به‌دست آمده در این گلدان‌ها داده شد. سپس ۶ هفته پس از کاشت و ۱۳ هفته پس از کاشت از همه تیمارها و نیز تیمار کنترل نمونه جمع‌آوری و به دو قسمت تقسیم شدند. یک قسمت برای محاسبه وزن تر و وزن خشک مورد استفاده قرار گرفته و قسمت دیگر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای ارزیابی‌های بعدی قرار گرفت.

اندازه‌گیری صفات فیزیولوژی و بیوشیمیایی

وزن تر و خشک گیاه: برای اندازه‌گیری وزن تر گیاه، کل اندام هوایی و ریشه گیاه به‌طور کامل از خاک جدا و بعد از حذف خاک از ریشه، گیاه با ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها بر روی کاغذ صافی قرار گرفته و در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت خشک و با ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد.

میزان کلروفیل a و کلروفیل b و کاروتنوئیدها: مقدار نیم گرم از ماده تر گیاهی را در هاون چینی ریخته، سپس با استفاده از نیتروژن مایع آن را خرد کرده تا بخوبی پودر شود. ۲۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد به نمونه اضافه و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی به بالن شیشه‌ای منتقل و مقداری از نمونه داخل بالن را در کووت

میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز تحت تأثیر تنش قرار گرفته و نسبت به شرایط کنترل افزایش یافت (Khaleghi et al., 2019).

مکانیزم‌های مقابله با تنش خشکی در گیاهان دارویی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. بررسی تأثیر تنش خشکی بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، به شناسایی این مکانیزم‌ها کمک خواهد کرد. شناسایی آنزیم‌های دخیل در تحمل به تنش در دست‌کاری ژنتیکی این گیاه در جهت افزایش بیان ژن‌های رمزکننده این آنزیم‌ها مؤثر خواهد بود. همچنین با شناسایی میزان مقاومت این گیاه به تنش‌ها، می‌توان با کاربرد انواع تنش‌ها از جمله خشکی، میزان ترکیبات مؤثره در این گیاه را افزایش داده و از خصوصیات مفید آن‌ها بهره‌جست. بنابراین تحقیق حاضر تأثیر تیمارهای مختلف آبیاری را در سطح فیزیولوژی و بیوشیمیایی بر روی این گیاه بررسی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مؤثر در این تنش را بررسی کرده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تنش

بذور گیاه خارمریم از شرکت تولید بذر و نهال پاکان بذر تهیه شده و سپس در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲ دقیقه غوطه‌ور و بعد از شستشوی سطحی با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی شده و مجدداً با آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس به منظور جوانه‌زنی به پتری دیش محتوی کاغذ صافی منتقل و در ژرمیناتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. آزمایش در شهرستان هیرمند، روستای شندل در تیر ماه ۱۳۹۹ به صورت زیر انجام شد:

گلدان‌های با اندازه یکسان انتخاب و حدود یک‌سوم گلدان‌ها با شن و بقیه گلدان‌ها با خاک سبک گلدان محتوی کود گرانول پر شده و بذور جوانه زده شده به گلدان‌ها منتقل و در گلخانه تحت دما و رطوبت کنترل شده (دمای ۱۹ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ تا ۶۵ درصد) قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. زمان‌های مختلف برداشت (۶ هفته بعد از کاشت و ۱۳ هفته بعد از کاشت) فاکتور A و تیمارهای مختلف آبیاری شامل: شامل ۱۰۰ درصد، ۷۵ درصد، ۵۰ درصد و ۲۵ درصد نیاز آبی برای جبران کمبود رطوبت خاک تا حد ظرفیت زراعی خاک به عنوان

(Yoshimura *et al.*, 2000)، پلی فنل اکسیداز در طول موج ۴۲۰ نانومتر (Janovitz-Klapp *et al.*, 1990) و سوپراکسید دسموتاز در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد (Giannopolities and Ries, 1977).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

ابتدا داده‌ها در نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۸ از نظر نرمال بودن مورد بررسی قرار گرفت، بدین‌صورت که ابتدا تست نرمالیتی داده‌ها با استفاده از روش کولموگراف اسمیرنوف انجام و پس از تأیید نرمال بودن داده‌ها، خطاها نیز از نظر نرمال بودن بررسی شدند. سپس تجزیه واریانس کلیه صفات و آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد (SAS 2010). نمودار مقایسه میانگین صفات با نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۷ رسم شد.

نتایج و بحث

وزن تر و وزن خشک

نتایج تجزیه واریانس برای صفت وزن تر و وزن خشک برای فاکتور زمان برداشت و تیمارهای آبیاری معنی‌دار شد. میزان وزن تر و وزن خشک در مراحل مختلف برداشت اختلاف معنی‌دار نشان داد. بین تیمارهای مختلف آبیاری برای صفت وزن تر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی برای صفت وزن خشک اختلاف بسیار معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۱). با افزایش شدت تنش میزان این دو صفت شروع به کاهش کرده بطوری‌که در تیمار ۲۵ درصد نیاز آبی کمترین میزان وزن تر و وزن خشک در شرایط صد درصد نیاز آبی بیشترین میزان وزن تر و وزن خشک مشاهده شد (شکل ۱، الف و ب). تنش خشکی از طریق کاهش پتانسیل آب گیاه باعث کاهش رشد می‌شود. در شرایط تنش کاهش ماده خشک می‌تواند به دلیل کاهش نرخ فتوسنتزی به دلیل محدودیت‌های بیوشیمیایی ناشی از کمبود آب از قبیل کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی به‌ویژه کلروفیل باشد (Lowlor and Cornic, 2002).

اسپکتروفتومتر ریخته و سپس به طور جداگانه در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ برای کاروتنوئیدها مقدار جذب قرائت گردید.

در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه به دست می‌آید.

$$a = [(12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})] \times V / 1000 \times W \quad (۱)$$

$$b = [(22.9 \times A_{645}) - (4.69 \times A_{663})] \times V / 1000 \times W \quad (۲)$$

$$\text{کلروفیل کل} = [(20.2 \times A_{645}) + (8.02 \times A_{663})] \times V / 1000 \times W \quad (۳)$$

$$\text{کاروتنوئید} = \{ [1000(A_{470}) - 1.8(chla) - 85.02(chlb)] / 198 \} \times V / 1000 \times W \quad (۴)$$

در این روابط A میزان جذب در طول موج مورد نظر، V حجم نهایی استون ۸۰ درصد بر حسب میلی‌لیتر و W اندازه برگ بر حسب گرم می‌باشد (Lichtenthaler, 1987).

اندازه‌گیری پرولین و پروتئین برگ: میزان پرولین توسط دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده منحنی استاندارد و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (Bates *et al.*, 1973). میزان پروتئین کل استخراج و در طول موج ۵۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه گردید (Bradford *et al.*, 1976).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

به منظور استخراج عصاره آنزیمی، ۲۰۰ میلی‌گرم بافت سبز برگ با ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=7 در هاون چینی ساییده شده و پس از عبور از کاغذ صافی، با سرعت ۱۶ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. سپس فاز رویی جهت سنجش میزان فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر بر حسب واحد فعالیت (U) که برابر با میکرومول تجزیه پراکسید هیدروژن است اندازه‌گیری شد (Beers and Sizer, 1952). آنزیم گایاکول پراکسیداز در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Fielding and Hall 1978). اسکوربات پراکسیداز در طول موج ۲۹۰ نانومتر

Table 1- Results of analysis of variance of morpho- physiological traits of milk thistle under different irrigation treatments

منابع تغییرات S.O. V	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات Mean of square						
		وزن تر Wet weight	وزن خشک Dry weight	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کاروتنوئیدها Carotenoid	پروتئین Protein	پرولین Proline
زمان Time	1	6.266**	0.0376**	116.215**	943.15**	0.262*	157.81**	11.46**
تیمارهای آبیاری Irrigation treatment	3	1.36 ^{ns}	0.0016**	2.79*	0.674 ^{ns}	0.834**	0.352**	3.55**
زمان × تیمارهای آبیاری Time × irrigation treatment	3	0.276 ^{ns}	0.0003 ^{ns}	1.21 ^{ns}	0.574 ^{ns}	0.372 ^{ns}	0.313**	2.74**
خطا Error	16	0.553	0.0001	0.694	2.26	0.602	0.623	0.569
ضریب تغییرات CV(%)	-	28	13.34	14.7	19.54	25.67	10.03	5.67

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۵ درصد و معنی‌دار در سطح یک درصد

ns, * and **, non-significant, significant at 5% level, significant at 1% level respectively

میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید

میزان کلروفیل a و کلروفیل b تحت تأثیر زمان برداشت و تیمارهای آبیاری قرار گرفت. میزان کاروتنوئید در مراحل مختلف برداشت اختلاف چندانی نشان نداده ولی با افزایش شدت تنش در هر دو مرحله برداشت میزان آن شروع به کاهش کرده بطوری‌که در تنش ۲۵ درصد نیاز آبی به حداقل مقدار خود رسید. میزان کلروفیل a در زمان برداشت ۶ هفته پس از کاشت، کمتر از ۱۳ هفته پس از کاشت بود ولی در هر دو مرحله برداشت، با افزایش تنش میزان آن کاهش پیدا کرد؛ بطوری‌که در شرایط تنش شدید (۲۵ درصد نیاز آبی) به کمترین مقدار در مقابل ۱۰۰ درصد نیاز آبی رسید (شکل ۱، ج). میزان کلروفیل b فقط تحت تأثیر زمان برداشت قرار گرفته و مقدار آن در ۶ هفته پس از کاشت، به مراتب کمتر از ۱۳ هفته پس از کاشت بود ولی شدت تنش تأثیر چندانی روی این صفت نداشت. طیف جذبی کلروفیل a و کلروفیل b به طور قابل ملاحظه‌ای با هم متفاوت است. می‌توان کلروفیل a را به عنوان رنگیزه مرکزی فتوسنتز در نظر گرفت. همچنین کلروفیل b کارایی گیاه را برای استفاده از انرژی نورانی خورشید ارتقا می‌دهد. فتوسنتز به مصرف آب متکی است. هنگام کمبود آب گیاهان با بسته نگه داشتن کامل یا

نسبی روزنه‌های خود، از خروج آب از گیاه جلوگیری می‌کنند که این خود سبب توقف و یا کاهش شدید آسمیلاسیون دی‌اکسیدکربن می‌شود (Abbasi *et al.*, 2010). کلروفیل a نسبت به کلروفیل b حساسیت بیشتری به تنش خشکی داشته (Mafakheri *et al.*, 2010)، به همین دلیل میزان تغییرات کلروفیل a در شرایط تنش بیشتر از کلروفیل b می‌باشد. کاهش در میزان کلروفیل a و یا عدم تغییر در میزان کلروفیل b در سایر تحقیقات نیز مشاهده شده است (Basu and Chaturvedi, 2004; Hanci and Cebei, 2014). در شرایط تنش مولکول کلروفیل تخریب شده و به دلیل کاهش سنتز کمپلکس اصلی رنگدانه کلروفیل، تخریب نوری کمپلکس پروتئینی رنگدانه‌های a و b که محافظت کننده دستگاه فتوسنتزی هستند، صدمه اکسیداتیو لیپیدهای کلروپلاست، رنگدانه‌ها و پروتئین‌ها و نیز حضور آنزیم کلروفیلاز، رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تأثیر تنش خشکی کاهش می‌یابد (Egert and Tevini, 2002). با توجه به اینکه کلروفیل a رنگیزه مرکزی فتوسنتز است، شدت تنش بر روی میزان آن تأثیر بیشتری خواهد داشت. در مطالعات توسط دیگر محققین صفات وزن تر، وزن خشک و میزان کلروفیل برگ تحت تأثیر شدت تنش قرار

میزان پروتئین و پرولین کل

میزان پروتئین و پرولین تحت تأثیر مرحله برداشت، شدت تنش و اثر متقابل زمان برداشت و شدت تنش قرار گرفت (جدول ۱). میزان پروتئین کل در ۶ هفته پس از کاشت بیشتر از ۱۳ هفته پس از کاشت بوده ولی در هر دو مرحله برداشت با افزایش تنش، میزان آن افزایش یافت (شکل ۱، ۵). متابولیسم نیتروژن و پروتئین تا حد زیادی تحت تأثیر تنش کم‌آبی قرار می‌گیرد. کاهش سنتز پروتئین و رشد و ممانعت از سنتز پروتئین در شرایط تنش ملایم وجود داشته ولی میزان اسیدآمین در شرایط تنش خفیف افزایش می‌یابد (Lowlor and Cornic, 2002). در مراحل اولیه کاشت (۶ هفته) به نظر می‌رسد تنش تأثیر زیادی بر متابولیسم پروتئین نداشته لذا میزان آن بیشتر از زمان ۱۳ هفته پس از کاشت می‌باشد، به تدریج با افزایش شدت تنش در هر دو مرحله برداشت، گیاه برای سازگاری و پاسخ به تنش غلظت پروتئین را در برگ افزایش خواهد داد.

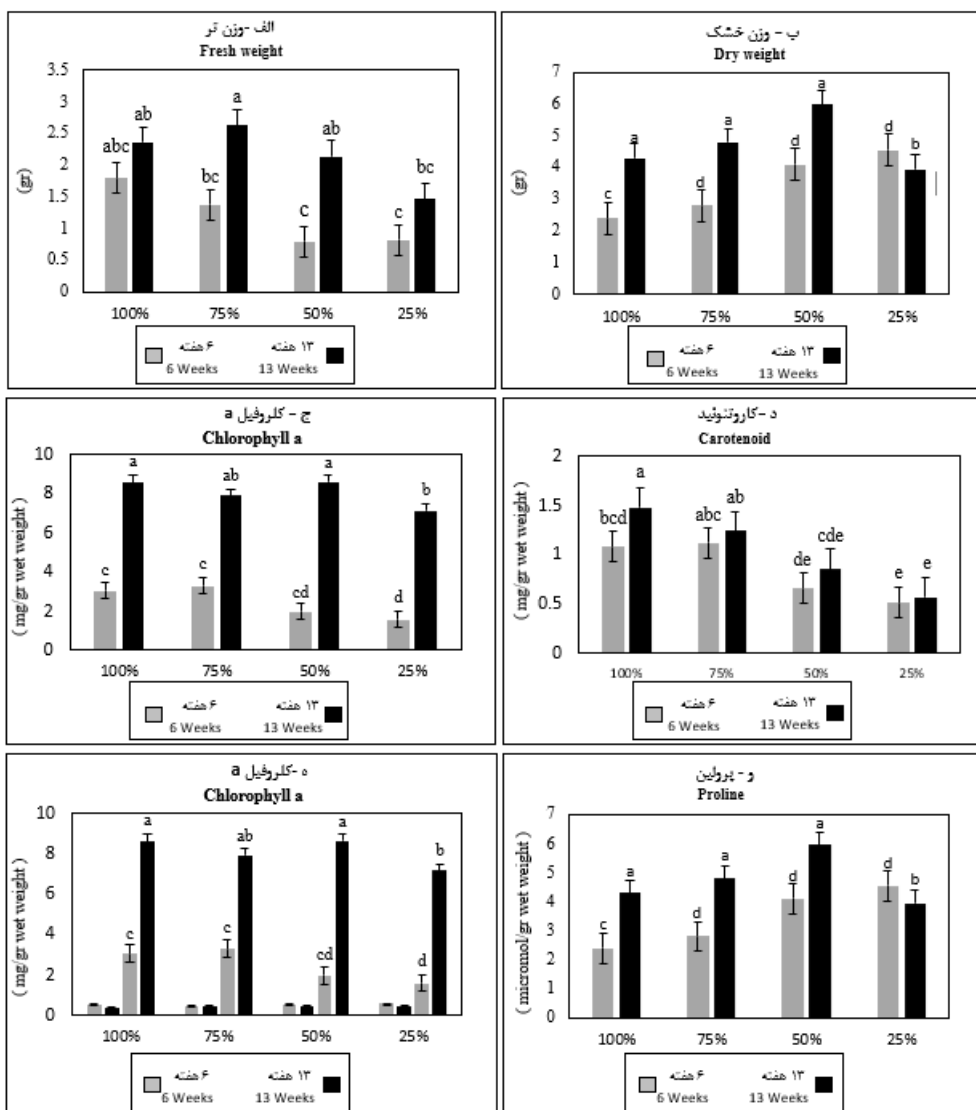
میزان پروتئین محلول در برگ سویا با افزایش تنش، کاهش یافت (Bahrololoumi *et al.*, 2018). در گیاه دارویی کدو پوست کاغذی نیز با افزایش شدت تنش میزان پروتئین کاهش یافت (Naemi *et al.*, 2012) که در تضاد با نتایج این تحقیق می‌باشد. در تطابق با نتایج این تحقیق، در بررسی تنش خشکی بر روی سویای رقم گرگان میزان پروتئین برگ در شرایط تنش ملایم و شدید افزایش یافته بود (Ghorbani and Niakan, 2005). میزان پرولین در مراحل اولیه برداشت (۶ هفته‌ای) کمتر از مرحله ۱۳ هفته پس از کاشت بود و با افزایش شدت تنش در هر دو مرحله برداشت، میزان آن افزایش پیدا کرد ولی این افزایش تا ۵۰ درصد نیاز آبی تداوم داشت و در شرایط تنش شدید (۲۵ درصد نیاز آبی گیاه) میزان آن کمتر از ۵۰ درصد نیاز آبی بود (شکل ۱، ۵). گلوتامات پیش‌ساز پرولین است که در شرایط کم‌آبی به دلیل تحریک رونویسی و ترجمه ژن‌های آنزیم‌های دخیل در سنتز آن (مانند ۱- Δ -پیرولین-۵-کربوکسیلاز ردوکتاز) سرعت سنتز آن افزایش و مقدار آن تجمع می‌یابد. تجمع احتمالاً برای سازگاری طولانی‌مدت و به عنوان یک اسمولیت محافظ، خنثی و املاح سازگار مهم‌تر است (DeLauney and Verma, 1993). اگرچه از آنجایی که پرولین عمدتاً در تنش بسیار شدید تجمع می‌یابد، نقش آن به عنوان یک محافظ مبهم است. در رابطه با متابولیسم فتوسنتزی، تجمع

گرفت، بطوری که در تنش ۵۰ درصد نیاز آبی به کمترین مقدار رسید (Elsayed *et al.*, 2019). همسو با نتایج این تحقیق، محققین دیگری با کاربرد غلظت‌های مختلف شوری در گیاه خارمریم مشاهده کردند که غلظت‌های پایین شوری تأثیری در میزان کلروفیل a, b و کل نداشته ولی با افزایش غلظت شوری به ۸ و ۱۲ دسی‌زیمنس میزان آن کاهش یافته بطوری که در غلظت ۱۲ دسی‌زیمنس به کمترین مقدار خود رسیدند (Safikhan *et al.*, 2018).

گیرنده‌ها در گیاهان شامل تعداد زیادی مولکول‌های کلروفیل متصل به پروتئین هستند که فوتون‌ها را جذب و انرژی حاصل از آن را به مرکز واکنش منتقل می‌کنند. در یک برگ تنها چند هزار مولکول کلروفیل اجزای اصلی مرکز واکنش هستند. علاوه بر رنگیزه‌های اصلی، گیرنده‌ها دارای رنگیزه کمکی نیز هستند که فوتون‌های طول موج‌های مختلف را برای فتوسنتز قابل استفاده می‌کنند. در گیاهان عالی این رنگیزه‌ها کاروتنوئیدها، بیشتر گزارتوفیل و همچنین کاروتن‌ها هستند (Abbasi *et al.*, 2010). مقدار کاروتنوئید با افزایش شدت تنش در مراحل مختلف برداشت گیاه کاهش پیدا کرد. کاهش این رنگدانه فتوسنتزی را می‌توان عموماً به تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی، فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها، واکنش آن‌ها با اکسیژن یکتایی و اختلالات هورمونی نسبت داد (Naghavi *et al.*, 2015). تخریب مولکولی کلروفیل به علت جدا شدن زنجیره فیتولی از حلقه پورفیرین در اثر ROS و یا آنزیم کلروفیل‌لاز صورت می‌گیرد (Severino and Auld, 2013). لذا می‌توان گفت که کاهش در مقادیر کلروفیل بخصوص کلروفیل a با افزایش شدت تنش به علت تخریب بیشتر کلروفیل نسبت به سنتز آن است. کمبود خفیف آب باعث افزایش میزان کاروتنوئیدها می‌شود، درحالی که کمبود شدید آب موجب کم شدن میزان کاروتنوئیدها می‌شود (Munné-Bosch and Alegre, 2004). در این مطالعه نیز میزان کاروتنوئید در شرایط صد درصد نیاز آبی و ۷۵ درصد نیاز آبی دارای بیشترین مقدار بوده ولی با شدت تنش به تدریج میزان آن کاهش یافت، بطوری که در شرایط تنش ۲۵ درصد نیاز آبی کاهش چشم‌گیری نسبت به شرایط ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه نشان داد (شکل ۱، ۵). لذا این مشاهدات دلالت بر وجود تنش اکسیداتیو در شرایط تنش دارد.

کاهش یافت. علت آن احتمالاً کاهش بیان ژن‌های آنزیم‌های دخیل در سنتز پرولین و یا برگشت به تعادل جریان الکترون فتوسنتزی باشد. در شرایط تنش شوری نیز با افزایش غلظت شوری میزان پرولین برگ افزایش یافته بود بطوری که در غلظت ۱۲ دسی‌زیمنس بیشترین افزایش را نشان داده بود (Safikhan *et al.*, 2018). در مطالعه تنش خشکی بر روی گندم نیز، مشاهده شده بود که با افزایش شدت تنش خشکی میزان پرولین، قند محلول و میزان پروتئین کل در برگ گندم افزایش یافته بود (Ghaderi *et al.*, 2019).

پرولین و سایر اسیدهای آمینه احتمالاً نتیجه عدم تعادل بین ادامه جریان الکترون فتوسنتزی، حفظ فعالیت میتوکندری و تغییر تنظیم تحت شرایط سلولی شدید (ATP) کم است. بنابراین، تجمع ممکن است به عنوان یک نتیجه از متابولیسم سلولی تغییر یافته در نظر گرفته شود تا یک پاسخ محافظ اولیه (Lawlor and Cornic, 2002). میزان پرولین در شرایط تنش ۵۰ درصد نیاز آبی در مرحله رشدی ۱۸ هفته‌ای در گیاه خار مریم افزایش یافته بود (Elsayed *et al.*, 2019) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد ولی در این تحقیق با افزایش تنش از ۵۰ درصد نیاز آبی به ۲۵ درصد نیاز آبی میزان پرولین مقداری



شکل ۱- تأثیر تیمارهای مختلف خشکی بر روی الف: وزن تر، ب: وزن خشک، ج: کلروفیل a، د: کاروتنوئید، ه: پروتئین، و: پرولین در مراحل مختلف برداشت ۶ هفته و ۱۳ هفته در گیاه خارمریم

Figure 1- The effect of different drought treatments on a: wet weight, b: dry weight, c: chlorophyll a, d: carotenoids, e: protein, and f: proline, at different harvest stages: 6 weeks and 13 weeks in milk thistle

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

کشت و شدت‌های مختلف تنش اندازه‌گیری و مشاهده شد که فعالیت این آنزیم‌ها تحت تأثیر زمان برداشت و شدت تنش قرار می‌گیرد (جدول ۲).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل: کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز، گایاکول‌پراکسیداز، سوپراکسیددسموتاز و اسکوربات‌پراکسیداز از برگ‌های گیاه خارمریم در مراحل مختلف

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی گیاه خار مریم تحت تیمارهای مختلف آبیاری

Table 2- Results of analysis of variance of biochemical traits of milk thistle under different irrigation treatments

منابع تغییرات S.O. V	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات Mean of square				
		گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate Peroxidase	پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase	کاتالاز Catalase	سوپراکسیددسموتاز Superoxide dismutase
زمان Time	1	0.748**	0.087 ^{ns}	0.0088**	0.0007 ^{ns}	0.103**
تیمارهای آبیاری Irrigation treatment	3	0.0161**	0.195*	0.0036**	0.0523**	0.297**
زمان × تیمارهای آبیاری Time × irrigation treatment	3	0.0001 ^{ns}	0.165 ^{ns}	0.0001**	0.0012 ^{ns}	0.139**
خطا Error	16	0.0015	0.065	0.00002	0.0027	0.0125
ضریب تغییرات CV(%)	-	5.89	11.2	6.11	7.5	14.18

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۵ درصد و معنی‌دار در سطح یک درصد

ns, * and **, non-significant, significant at 5% level, significant at 1% level respectively

از شرایط ۱۰۰ درصد و ۷۵ درصد نیاز آبی گیاه بود (شکل ۲، ب). روند تغییر در آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز با بقیه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوت بوده بطوری‌که میزان آن در شرایط ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه در هر دو مرحله رشدی بالا بوده ولی با شدت تنش میزان آن کم می‌شود بطوری‌که در شرایط تنش ۷۵ درصد و ۵۰ درصد نیاز آبی گیاه میزان آن کاهش می‌یابد ولی در شرایط تنش شدید (۲۵ درصد نیاز آبی گیاه) مجدداً میزان آن افزایش یافت (شکل ۲، ج). در سایر مطالعات نیز میزان آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در تمام مراحل رشدی با افزایش شدت تنش در مقایسه با شرایط ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه افزایش یافته بود بطوری‌که در شرایط ۵۰ درصد نیاز آبی بیشترین مقدار را نسبت به شرایط کنترل داشت (Elsayed et al., 2019) که در مقایسه با نتایج این تحقیق در تناقض می‌باشد؛ زیرا در این

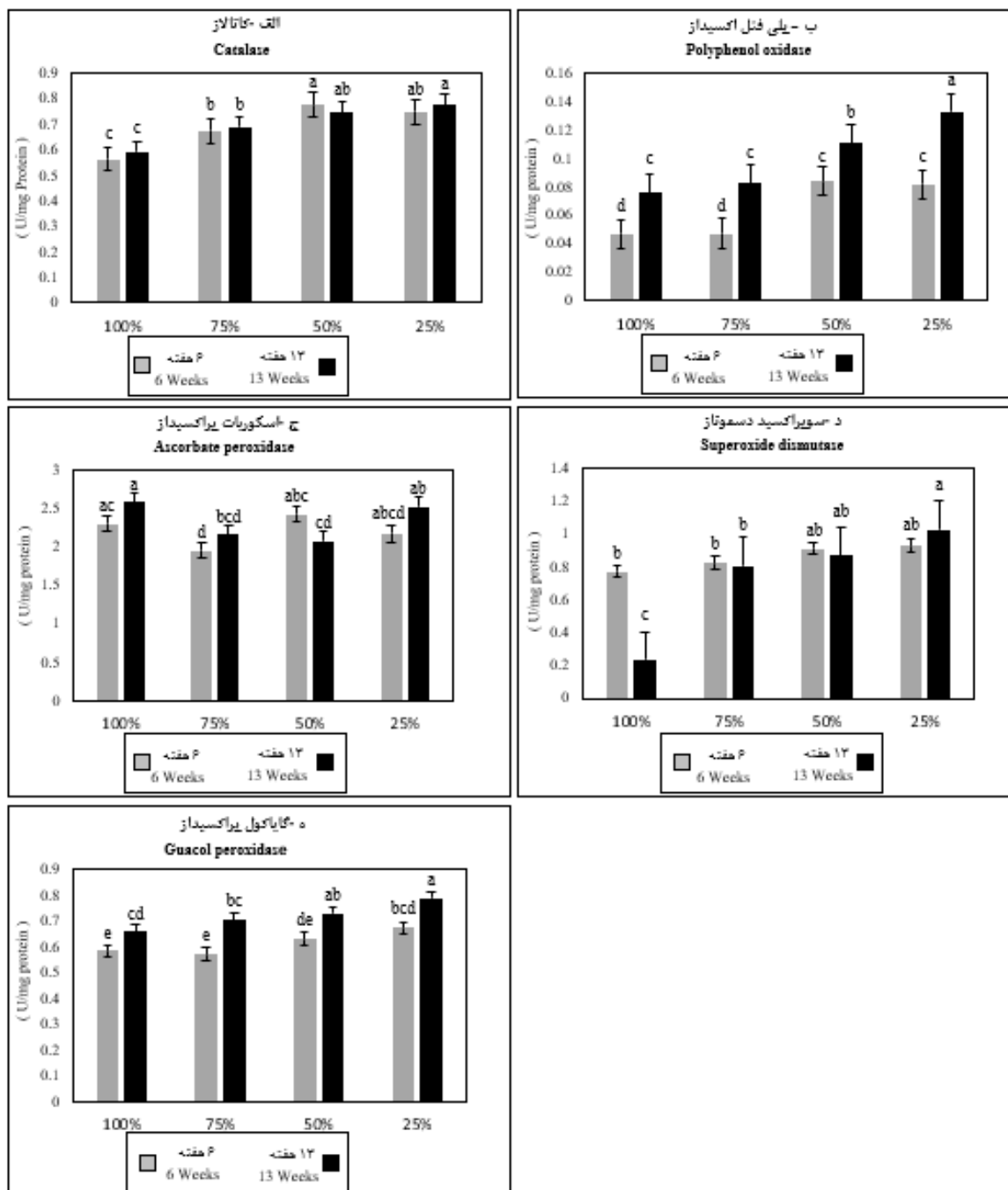
میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو مرحله برداشت (۶ هفته و ۱۳ هفته پس از کاشت) بتدریج با شدت تنش رو به افزایش بود بطوری‌که در شرایط ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه کمترین مقدار و در تنش شدید (۲۵ درصد نیاز آبی گیاه) به حداکثر مقدار رسید (شکل ۲، الف). در مطالعات قبلی فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش ۵۰ درصد ظرفیت آبی در هفته ششم کشت کاهش ولی در هفته دوازدهم و هجدهم کشت میزان آن در مقایسه با شرایط ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه افزایش یافته بود (Elsayed et al., 2019). آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز تحت تأثیر مرحله برداشت و شدت تنش قرار گرفت (جدول ۲)؛ بطوری‌که میزان آن در شش هفته پس از کاشت کمتر از مراحل ۱۳ هفته پس از کاشت بود ولی در هر دو مرحله برداشت، با افزایش تنش میزان آن افزایش و در تنش ۵۰ درصد و ۲۵ درصد نیاز آبی گیاه مقدار آن بیشتر

مقدار آن کاهش می‌یابد. ولی در شدت تنش شدید (۲۵ درصد نیاز آبی گیاه) میزان آن دوباره افزایش می‌یابد و این افزایش می‌تواند نوعی سازگاری محسوب شود؛ یعنی به منظور جبران خسارت و حفظ حالت تعادل ROS میزان این آنزیم در شرایط تنش شدید مجدداً افزایش می‌یابد. شایان ذکر است که تحت شرایط تنش خشکی تولید ROS به شدت، مدت زمان تنش، گونه و ژنوتیپ گیاهی و نیز مرحله نمو گیاه در معرض تنش وابسته است، به همین دلیل در مطالعات مختلف تفاوت در نتایج به صورت کاهش یا افزایش فعالیت آنزیم‌ها مشاهده می‌شود (Chaitanya *et al.*, 2002).

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز نیز تحت تأثیر زمان برداشت، شدت تنش و اثر متقابل زمان برداشت در شدت تنش (زمان در تنش) قرار گرفت (جدول ۲). میزان این آنزیم در مرحله ۶ هفته پس از کاشت کمتر از مرحله ۱۳ هفته پس از کاشت بوده ولی در هر دو مرحله با افزایش شدت تنش میزان آن افزایش یافت به طوری که در شرایط تنش ۲۵ درصد نیاز آبی گیاه و مرحله ۱۳ هفته پس از کاشت، میزان آن بیشترین و در شرایط ۱۰۰ و ۷۵ درصد نیاز آبی گیاه و مرحله ۶ هفته پس از کاشت کمترین مقدار را دارا بود (شکل ۲، د). تأثیر تنش خشکی در برگ‌های گیاه *Fargesia denudate* در مرحله گیاهچه‌ای بررسی و مشاهده شده بود که با شدت تنش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتینون ردوکتاز افزایش یافته و در بین این آنزیم‌ها، افزایش سوپراکسید دسموتاز بیشتر از بقیه آنزیم‌ها بود (Liua *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر نیز آنزیم سوپراکسید دسموتاز در مرحله ۱۳ هفته پس از کاشت، افزایش چشم‌گیری نسبت به شرایط صد درصد نیاز آبی گیاه داشته که نشان می‌دهد سوپراکسید دسموتاز دفاع حساس‌تر و مؤثرتری برای پاک‌سازی سموم افزایش یافته در شرایط تنش شدید در گیاه خار مریم ارائه می‌دهد. تحت تنش خشکی، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به طور قابل توجهی در برگ *J. curcas*، یک گونه درخت وحشی، افزایش یافت (Pompelli *et al.*, 2010).

میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز تحت تأثیر مرحله برداشت و شدت تنش قرار گرفت (جدول ۲).

تحقیق در شرایط ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه و تنش شدید (۲۵ درصد نیاز آبی گیاه) میزان این آنزیم حداکثر بود. اثر تنش خشکی بر روی اندام‌های مختلف گیاه زردچوبه بررسی و مشاهده شده بود که میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ نسبت به سایر اندام‌ها در شرایط تنش بیشتر بوده است (Zamani *et al.*, 2011). کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز آنزیم اصلی حذف پراکسید هیدروژن می‌باشند که هر کدام تمایل متفاوتی به این نوع ROS دارند. آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بیشتر محفظه‌های سلولی وجود دارد در حالی که کاتالاز تنها در پراکسی‌زوم یافت می‌شود. لذا پیشنهاد شده است که آسکوربات پراکسیداز به عنوان یک تنظیم‌کننده و کنترل‌کننده داخل سلولی خوب برای حفظ حالت تعادل ROS معرفی شود (Mittler, 2002). در بررسی تأثیر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بر روی فسکیوی بلند مشاهده شده بود که فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در تنش خشکی شدید نسبت به حالت شاهد و تنش خشکی متوسط کاهش می‌یابد (Pirnajmodin *et al.*, 2013). برخی محققان افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در واکنش به تنش خشکی را گزارش کرده‌اند (Jagtap and Bharagava, 1995). در مطالعه دیگری بر روی ذرت مشاهده شد که در شرایط تنش متوسط و شدید خشکی، پراکسیداسیون چربی‌ها افزایش یافته و تنش خشکی شدید، منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز شد (Li-Ping *et al.*, 2006). تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر روی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بر روی ارقام حساس و متحمل گندم بررسی و مشاهده گردید که میزان اسیداسکوربیک در رقم متحمل در شرایط تنش شدید افزایش یافته و در بقیه سطوح تنش (۵۰ درصد و ۷۰ درصد ظرفیت آبی) و نیز رقم حساس گندم میزان این متابولیت تغییری نشان نداده و نیز تنش خشکی شدید منجر به افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد (Rahimi *et al.*, 2018). در مورد تغییر در آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در تحقیقات مختلف نتایج ضد و نقیضی گزارش شده است. در این تحقیق با توجه به اینکه میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز به طور طبیعی در برگ گیاه خار مریم وجود دارد، در شرایط ۱۰۰ درصد نیاز آبی میزان این آنزیم زیاد بوده ولی به تدریج با شدت تنش



شکل ۲- تأثیر تیمارهای مختلف خشکی بر روی فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی شامل الف: کاتالاز، ب: پلی فنل اکسیداز، ج: آسکوربات پراکسیداز، د: سوپراکسیددسموتاز ه: گایاکول پراکسیداز در مراحل مختلف برداشت: ۶ هفته و ۱۳ هفته در گیاه خارمریم

Figure 2- The effect of different drought treatments on the activity of oxidative enzymes including a: catalase, b: polyphenol oxidase, c: ascorbate peroxidase, d: superoxide dismutase e: guaiacol peroxidase at different stages of harvest: 6 weeks and 13 weeks in milk thistle

تأثیر ورمی کومپست و قارچ مایکوریزا بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز، سوپراکسیددسموتاز و نیز میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید در گیاه خارمریم بررسی و مشاهده شده بود که کاربرد ترکیبی این دو ماده سبب افزایش میزان کلروفیل a،

میزان آن در مرحله ۶ هفته پس از کاشت کمتر از ۱۳ هفته پس از کاشت بوده ولی در هر دو مرحله برداشت با افزایش شدت تنش میزان آن افزایش یافت و در مرحله ۱۳ هفته‌ای و تنش شدید (۲۵ درصد نیاز آبی گیاه) بیشترین مقدار را نسبت به شرایط ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه دارا بود (شکل ۲، ه).

کلروفیل b تغییر زیادی مشاهده نشد زیرا کلروفیل a نسبت به کلروفیل b حساسیت بیشتری به تنش خشکی داشته به همین دلیل میزان تغییرات کلروفیل a در شرایط تنش بیشتر از کلروفیل b می‌باشد. میزان کاروتنوئید با افزایش شدت تنش در هر دو مرحله برداشت میزان آن شروع به کاهش کرده بطوری‌که در تنش ۲۵ درصد نیاز آبی به حداقل مقدار خود رسید. کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی را می‌توان عموماً به تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی، فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها، واکنش آن‌ها با اکسیژن یکتایی و اختلالات هورمونی نسبت داد. در ارتباط با تأثیر تنش بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز اکثر آنزیم‌ها مانند کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددسموتاز تحت تأثیر شدت تنش مقدار آن‌ها افزایش یافت. با توجه به این نتایج می‌توان گفت گیاه خارمریم برای مقابله با تنش خشکی از مکانیزم‌های مختلفی مانند افزایش پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه، کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده کرده که در این میان نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به عنوان آنزیم‌های مهم در پاسخ به تنش می‌تواند در تحقیقات آینده به منظور شناسایی ژن‌های رمزکننده این آنزیم‌ها و تغییر در بیان آن‌ها به منظور مقابله با تنش تعیین‌کننده باشد. همچنین با توجه به اینکه با افزایش تنش خشکی، میزان متابولیت‌ها در این گیاه افزایش می‌یابد، می‌توان با تعیین آستانه تحمل به تنش این گیاه، اقدام به کشت گیاه در سطح وسیع و اعمال تنش به منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه نمود.

کلروفیل b و کاروتنوئید و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده بود (Nikkah Naeeni et al., 2017). تأثیر تنش خشکی در شرایط کشت بافت با کاربرد پلی‌اتیلن‌گلیکول (صفر، ۳، ۶، ۱۲ و ۱۵ درصد) بر روی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دو رقم لیمو حساس به خشکی و مقاوم به خشکی بررسی و مشاهده شده بود در شرایط تنش شدید (۱۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلیکول) میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در رقم مقاوم به مراتب بیشتر از رقم حساس است (Rahimi et al., 2016). در این تحقیق با توجه به اینکه اکثر آنزیم‌های اکسیدانی در شرایط تنش افزایش یافته بودند، می‌توان گفت در این گیاه آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیددسموتاز، گایاکول پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز می‌توانند با همکاری یکدیگر ROS را در برگ‌های گیاه تحت تنش شدید حذف کنند و این نوعی سازگاری به تنش محسوب می‌شود. به عبارتی گیاه برای مقابله با تنش از مکانیزم‌های مختلفی از جمله کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی، افزایش پروتئین و پرولین و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده نموده تا بتواند صدمات ناشی از ROS را جبران نماید.

نتیجه‌گیری کلی

اکثر صفات تحت تأثیر مرحله رشدی و شدت تنش قرار گرفتند. میزان پروتئین و پرولین با شدت تنش افزایش یافت به طوری‌که در تنش شدید (۲۵ درصد نیاز آبی گیاه) نسبت به ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه افزایش قابل توجهی داشت. میزان کلروفیل a تحت تأثیر شدت تنش قرار گرفت ولی در میزان

References

- Abenavoli, L. and Milic, N.** 2017. Silymarin for liver disease. In: Muriel, P. (Ed.), *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Academic Press, 621-631.
- Bahrololoumi, S.M.J., Raeini Sarjaz, M. and Pirdashti, H.** 2019. The effect of drought stress on the activity of enzymatic antioxidants, malondialdehyde levels, soluble protein and total nitrogen of soybean leaf (*Glycine max.* L). *Environmental Stresses in Agricultural Sciences*, 12(1): 12-28.
- Balian, S., Ahmad, S. and Zafar, R.** 2006. Antiinflammatory activity of leaf and leaf callus of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Indian Journal of Pharmacology*, 38(3): 213-214.
- Bates, L.S., Waldern, R.P. and Tear, I.D.** 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207.
- Basu, A.M. and Chaturvedi, S.K.** 2004. Adaptation of photosynthetic components of chickpea to water stress. *4th international crop science congress*. Brisbane Australia, 26th Sep.-10th October.

- Chaitanya, K.V., Sundar, D., Masilamani, S. and Reddy, A.R.C.** 2002. Variation in heat stress induced antioxidant enzyme activities among three Mulberry cultivars. *Plant Growth Regulation*, 36: 175-180.
- Delauney, A.J. and Verma, D.P.S.** 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal*, 4: 215-223.
- Dheeraj, A., Tailor, D., Singh, S.P. and Singh, R.P.** 2018. Anticancer attributes of silibinin: chemo- and radiosensitization of cancer. In: Bharti, A.C., Aggarwal, B.B. (Eds.), *Cancer Sensitizing Agents for Chemotherapy, Role of Nutraceuticals in Cancer Chemosensitization*, 2: 199-220.
- Egert, M. and Tevini, M.** 2002. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany*, 48: 43-49.
- Elsayed A.I., Elhamahmy, M.A.M., Rafudeen, M., Mohamed, A.H. and Omar, A.A.** 2019. The impact of drought stress on antioxidant responses and accumulation of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum* L Gaertn). *Plants*, 8(12): 611-625.
- Giannopolities, C.N. and Ries, S.K.** 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
- Ghorbanli, M. and Niakan, M.** 2006. Evaluation of the effect of drought stress on soluble sugars, protein, proline, phenolic compounds and nitrate reductase enzyme activity of soybean cultivar 3. *Journal of Teacher Training University*, 5(1): 537-550.
- Hanci, F. and Cebei, E.** 2014. Investigation of proline, chlorophyll and carotenoids changes under drought stress in some onion (*Allium Cepa* L.) cultivars. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 2: 1499-1504.
- Jagtap, V. and Bharagava, S.** 1995. Variation in antioxidant metabolism of drought tolerant and susceptible varieties of *Sorghum bicolor* L. *Agricultural and Biological Chemistry*, 65: 445-454.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M. and Nicolas, J.J.** 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38: 926-931.
- Karkanis, A., Bilalis, D. and Efthimiadou, A.** 2011. Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. *Industrial Crop Production*, 34: 825-830.
- Khaleghi, A., Naderi, A., Brunetti, C., Maserti, B.A., Salami, S.A. and Babalar, M.** 2019. Morphological, physiochemical and antioxidant responses of *Maclura pomifera* to drought stress. *Scientific Reporters*, 9: 1-12.
- Li-Ping, B., Fang-Gang, S., Ti-Da, G., Zhao-Hui, S., Yin-Yan, L. and Guang-Sheng, Z.** 2006. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzyme antioxidant system of maize. *Pedosphere*, 16: 326-332.
- Lichtenthaler, H.K.** 1978. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands*, 148: 350-352.
- Liua, C., Wang, Y., Pana, K., Lia, W., Zhanga, L., Shena, B., Liua, L. and Denga, M.** 2014. Responses of the antioxidant defense system to drought stress in the leaves of *Fargesia denudata* seedlings, the staple food of the Giant Panda. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(3): 374-383.
- Lowlor, D.W. and Cornic, G.** 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment*, 25: 275-294.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B.P.C. and Sohrabi, Y.** 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 4(8): 580-585.

- Mehdi, M., Kordrostami, M., Maleki, M. and ModaresKia, M.** 2016. Investigating the effect of drought stress on expression of WRKY1 and EREBP1 genes and antioxidant enzyme activities in lemon balm (*Melissa Officinalis* L.). *Biotechnology*, 6(99): 1-8.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410.
- Munné-Bosch, S. and Alegre, L.** 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, 31(3): 203-216.
- Naeemi, M., Ali Akbari, G., Shirani Rad, A.H., Hassanloo, T. and Akbari, G.** 2012. Effect of zeolite application and selenium spraying on water relations traits and antioxidant enzymes in medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Crops Improvement*, 14(1): 67-81. (In Persian).
- Naghavi, M.R., Toorchi, M., Moghaddam, M. and Shakiba, M.R.** 2015. Evaluation of diversity and traits correlation in spring wheat cultivars under drought stress. *Notulae Scientia Biologicae*, 7(3): 349-351.
- Nikkah Naeeni, F., Ladan Moghadam, A.R., Moradi, P., Rezaei, M. and Abdoosi, V.** 2017. Effect of vermicompost and mycorrhiza fungi on yield and growth of milk thistle and antioxidant system activity. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 7(3): 2063-2074.
- Pirnajmoddin, F., Majidi, M.M., Gheysari, M. and Radan, Z.** 2013. Selection for drought stress tolerance based on root system and antioxidant enzymes in long fescue. *Iranian Crop Science*, 46(1): 157-168. (In Persian).
- Pompelli, M.F., BarataLuís, R., Vitorino, H.S., Gonçalves, E.R., Rolim, E.V., Santos, M.G., Almeida Cortez, J.S., Ferreira, V.M., Lemos, E.E. and Endres, L.** 2010. Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery, *Biomass Bioenergy*, 34: 12-22.
- Rahimi, Z., Panahi, F. and Siosemardeh, A.** 2019. Investigation of the effects of drought stress levels on the activity of antioxidant enzymes and some physiological traits in susceptible and drought tolerant wheat cultivars. (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Wheat Research*, 2(1): 69-86.
- Severino, L.S. and Auld, D.L.** 2013. Seed yield and yield components of castor influenced by irrigation. *Industrial Crops and Products*, 49: 52-60.
- Safikhani, S., Khoshbakht, K., Chaichi, M.R., Amini, A. and Motesharezadeh, B.** 2018. Role of chitosan on the growth, physiological parameters and enzymatic activity of milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) in a pot experiment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 10: 49-58.
- Selmar, D. and Kleinwachter, M.** 2013. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Product*, 42: 558-566.
- Takke, A. and Shende, P.** 2019. Nanotherapeutic silibinin: an insight of phytomedicine in healthcare reformation. *Nanomedicin: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 21: 1-10.
- Vilahrur, G., Casaní, L., Peñna, E., Crespo, J., Juan-Babot, O., Ben-Aicha, S., Mendieta, G., B'ejar, M.T., Borrell, M. and Badimon, L.** 2018. Silybum marianum provides cardioprotection and limits adverse remodeling post-myocardial infarction by mitigating oxidative stress and reactive fibrosis. *International Journal of Cardiology*, 270: 28-35.
- Zamani, Z., Mostajeran, A. and Asghari, Gh.** 2011. Effect of drought stress on growth and activity of antioxidant enzymes catalase and ascorbate peroxidase in turmeric (*Curcuma longa* L). *Plant Environmental Physiology (Iranian Plant Ecophysiology Research)*, 7(3): 31-37. (In Persian).
- Zhao, Z., Hodge, J., Wang, D. and Liu, Q.** 2019. New light shed on the old herb - *Silybum marianum*. *International Journal of Cardiology*, 288: 123-131.

The effect of various irrigation methods on physiology and biochemical traits of milk thistle (*Silybum marianum*)

Mostafa Sarani¹, Maryam Allahdou^{2*}, Leila Mehravaran², Halimeh Piri³

¹ M.Sc. Graduated of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

² Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

³ Department of Water Engineering, College of Water and Soil, University of Zabol, Zabol, Iran

*Corresponding Author: Maryam.allahdou@uoz.ac.ir

Received: 7 March 2021

Accepted: 28 April 2021

DOI: 10.22034/CSRAR.2022.322452.1175

Abstract

Introduction: Milk thistle contains flavonolignan silymarin in its fruits, making it one of the most important medicinal plants for protecting the liver and treating a variety of liver diseases, such as hepatitis and liver diseases containing toxins. The drought resistance mechanisms of medicinal plants, such as milk thistle, are of critical importance. The investigation of the effect of drought stress on the activity of antioxidant enzymes will aid in the identification of these mechanisms. Water stress modifies plant behavior via its effect on plant metabolism and consequently has a substantial effect on plant production. The biosynthesis pathway of secondary metabolites is altered by environmental stresses, altering the production and concentration of active substances in plants. In addition to playing a crucial role in defense mechanisms, secondary metabolites are an important source of bioactive compounds. However, flavonoids not only have antioxidant activity via the release of free radicals, but they also regulate cellular pathways in the defense of plants against environmental stresses, alter plant metabolism, and have a significant impact on plant production.

Materials and method: In order to determine the effect of drought stress on the physiological and biochemical characteristics of milk thistle, treatments of 100%, 75%, 50%, and 25% water requirement were applied in a greenhouse in the village of Shandel, city of Hirmand. There were multiple harvesting stages, including 6 and 13 weeks after planting. Measurements included dry weight, fresh weight, chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids, proteins, proline levels, and antioxidant enzyme activity. First, the data were examined for normality in Minitab software version 18, using the Smearnof Columnograph method to determine data normality, and then the errors were examined for normality to confirm data normality. Then, analysis of variance of all traits and comparison test of Duncan were performed at 5% level with SAS software version 9.2 (SAS 2010).

Results and discussion: The analysis of variance revealed significant differences in harvest time, irrigation level, and the interaction between harvest time and irrigation level. In both harvest stages, the concentration of carotenoids began to decrease as the level of stress increased. The amount of chlorophyll a at the stage 6 weeks after planting was less than at the stage 13 weeks after planting, but its amount decreased with increasing stress at both stages. The levels of protein and proline also increased as the level of stress increased. The activity of antioxidant enzymes also increased as the intensity of stress increased, to the point where 100% of water requirements reached the minimum value and 25% reached the maximum value. Due to the fact that most oxidative enzymes in this study increased in response to stress, it can be concluded that catalase, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase, polyphenol oxidase, and ascorbate peroxidase can eliminate ROS in this plant. Therefore, milk thistle has a good adaptation to drought stress, which is likely due to the reduction of oxidative damage caused by the activation of the antioxidant system and the accumulation of osmolytes such as proline and protein. These modifications are a form of adaptation to stress conditions.

Conclusion: The majority of traits were affected by growth stage and stress level. The levels of protein and proline increased with increasing stress intensity. Most antioxidant enzymes, including

catalase, ascorbate peroxidase, and superoxide dismutase, increased in activity under the influence of stress. According to these findings, milk thistle responds to drought stress by increasing proteins and amino acids, decreasing photosynthetic pigments, and increasing the activity of antioxidant enzymes, among other mechanisms. Also, because the amount of metabolites in this plant increases with increasing drought stress, it is possible to determine the stress tolerance threshold of this plant, cultivate it on a large scale, and apply stress to increase secondary metabolites.

Keywords: Ascorbate peroxidase, Catalase, Enzyme, Photosynthetic pigments, Stress