

## تغییر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) در پاسخ به تاریخ کشت و دوره غرقاب خاک

- سمانه اسدی صنم<sup>۱</sup>، محسن زواره<sup>۲\*</sup>، همت‌اله پیردشتی<sup>۳</sup>، فاطمه سفیدکن<sup>۴</sup>، قربانعلی نعمت‌زاده<sup>۵</sup> و ابوذر هاشم‌پور<sup>۶</sup>
- ۱- دانشجوی دکترا، گروه زراعت، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان  
۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زراعت، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، پست الکترونیک: mzavareh@guilan.ac.ir  
۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری  
۴- استاد، بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور  
۵- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری  
۶- دانشجوی دکترا، گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۲

تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۲

### چکیده

با هدف بررسی اثر تاریخ کشت و دوره غرقاب خاک بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench)، آزمایشی به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه پژوهشی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان-دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۹۱ اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه تاریخ کشت (۱۰ تیر، ۹ مرداد و ۸ شهریور ۱۳۹۱) و سه دوره غرقاب (بدون غرقاب به‌عنوان شاهد، ۳ روز غرقاب و ۵ روز غرقاب) بودند که به ترتیب در کرت‌های اصلی و فرعی در نظر گرفته شدند. پس از پایان مدت غرقاب، مقدار مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و اکسیداسیون پروتئین برگ‌ها، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT)، میزان فنل و فلاونوئید کل و درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری شدند. نتایج آزمایش افزایش معنی‌دار مقدار MDA را در برگ سرخارگل نشان داد که بیشترین مقدار آن در غرقاب ۵ روزه و در تاریخ کشت ۸ شهریور بدست آمد. در این تاریخ کشت، پروتئین کل ۵ روز پس از غرقاب نسبت به شاهد ۹۰٪ کاهش یافت. بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و APX در سرخارگل‌های کشت شده در تاریخ ۱۰ تیر و در ۳ روز پس از غرقاب بدست آمد، در حالی‌که بیشترین فعالیت آنزیم POD و CAT مربوط به سرخارگل‌های نشاء شده در تاریخ ۹ مرداد بود. غرقاب ۵ روزه سرخارگل‌ها، میزان فنل و فلاونوئید کل گیاهان نشاء شده در تاریخ ۱۰ تیر را افزایش داد. بیشترین درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH (۷۹/۱٪)، در ۵ روز پس از غرقاب و در تاریخ کشت ۸ شهریور بدست آمد. به‌طور کلی، با توجه به یافته‌های این آزمایش می‌توان گفت که گیاه سرخارگل به تنش غرقاب تحمل نسبتاً خوبی دارد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین، سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench)، فلاونوئید، مالون‌دی‌آلدهید.

### مقدمه

ماه تعریف می‌شود، تنشی است که می‌تواند سبب تنش‌های دیگری از جمله تنش کمبود اکسیژن (Hypoxia) یا شرایط بدون اکسیژن (Anoxia) شده و انتقال اکسیژن به بافت‌های

غرقاب که با درجات مختلفی از آب‌ماندایی (Waterlogging) در خاک در دوره زمانی از چند روز تا چند

گیاهی را دچار اختلال کند ( Yanagawa & Komatsu, 2012) که در نهایت، می‌تواند کاهش شدید رشد و باروری گیاه را بدنبال داشته باشد (Perata *et al.*, 2011). انتظار می‌رود که این مشکل در برخی از مناطق، به دلیل تغییر اقلیم و گرمایش جهانی (Perata *et al.*, 2011) تشدید شود.

تنش غرقاب به علت کاهش هدایت هیدرولیک و کارکرد ریشه، موجب اختلال در جذب آب و مواد غذایی، ایجاد سمیت یونی، بسته شدن روزنه‌ها و کاهش فتوسنتز گیاه می‌شود (Unger *et al.*, 2009). بسته شدن روزنه‌ها و کاهش فراهمی CO<sub>2</sub> و در حضور تابش زیاد و ظرفیت پایین مصرف فوتون‌های فتوسنتزی به وسیله گیاه، واکنش‌گرهای اکسیژن ( ROS: Reactive Oxygen Species ) می‌تواند در کلروپلاست‌ها انباشته شود (Yordanova & Popova, 2001). انباشت این واکنش‌گرهای فعال در شرایط غرقاب، می‌تواند باعث اکسید شدن پروتئین‌ها، رنگدانه‌های فتوسنتزی و پراکسید شدن لیپیدهای غشا شود و سلول و اندامک‌های آن را در برابر اکسیداسیون و تنش اکسیداتیو آسیب‌پذیر نماید (Jackson *et al.*, 2009). از این رو، برای کنترل سطح ROSها و محافظت سلول‌ها، گیاهان تعدادی از آنتی‌اکسیدان‌ها با جرم مولکولی کم از جمله آسکوربات، گلوتاتیون و ترکیب‌های فنلی و همچنین آنزیم‌های حذف‌کننده ROS مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیدازهای متنوعی از جمله آسکوربات پراکسیداز (APX) را تولید می‌کنند (Tanou *et al.*, 2009). در شرایط بهینه، تولید و ظرفیت جاروکنندگی این گونه‌های فعال به خوبی تنظیم شده است ولی در شرایط تنش، تولید این ROSها ممکن است بیشتر از ظرفیت جاروکنندگی آنتی‌اکسیدان‌ها باشد (Yordanova *et al.*, 2004). در گزارش‌های علمی به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های سرخارگل اشاره شده است (Dalby-Brown *et al.*, 2004؛ Pellati *et al.*, 2005) که این ظرفیت می‌تواند به ترکیب‌های پلی‌فنولی مانند فلاونوئیدها و اسیدهای فنولی و یا دی‌ترین‌های فنولی نسبت داده شود. با وجود این، اطلاعات کمی در مورد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه سرخارگل به‌ویژه در شرایط تنش غرقاب وجود دارد که پژوهش در این زمینه را توجیه می‌کند.

*Echinacea purpurea* (L.) Moench با نام فارسی سرخارگل، گیاهی چندساله با گل‌های مخروطی شکل و به رنگ ارغوانی از خانواده گل‌ستاره (Asteraceae) و از خاستگاه شمال آمریکا است که از ریشه و اندام‌های هوایی آن برای تولید داروهای گیاهی استفاده می‌شود (Mrozikiewicz *et al.*, 2010). فراورده‌های این گیاه دارویی، جزو چهارمین گیاه دارویی پر فروش در اروپا و ششمین گیاه دارویی پر فروش در ایالات متحده در سال ۲۰۱۰ شناخته شده است (Blumenthal *et al.*, 2011)؛ European Advisory Services, 2007) که برای درمان عفونت‌های مزمن دستگاه تنفسی، عفونت‌های دستگاه ادراری، عفونت‌های ویروسی، افزایش سیستم ایمنی، دفاعی و سوختگی بکار رفته است.

سرخارگل در مکان‌های مرطوب، پرنور و در خاک‌های با بافت متوسط، حاصل‌خیز و سرشار از ترکیب‌های هوموسی می‌روید (Sabra *et al.*, 2012b). بنابراین، به دلیل تقاضای روزافزون صنایع دارویی برای استفاده از این گیاه و دامنه سازگاری آن به شرایط مختلف آب و هوایی و خاکی از جمله خشکی و سرما (تا دمای ۱۰- درجه سلسیوس) (Sabra *et al.*, 2012b؛ Stanisavijevic *et al.*, 2009)، کشت گسترده آن در سراسر جهان به‌ویژه ایران افزایش یافته است.

گیاهان دارویی و عملکرد متابولیت‌های ثانویه آنها همانند سایر گیاهان زراعی، تحت تأثیر مجموعه‌ای از ویژگی‌های ژنتیکی، بوم‌شناختی، فیزیولوژیک، محیطی (Letchamo *et al.*, 2002) و مدیریتی هستند. با توجه به دامنه سازگاری سرخارگل به شرایط مختلف اقلیمی، تنها در چند پژوهش به بررسی رفتار این گیاه دارویی با ارزش در شرایط سخت و تنش‌زای محیطی پرداخته شده است (Sabra *et al.*, 2012a,b؛ Tang *et al.*, 2010). در این پژوهش‌ها، کاهش عملکرد سرخارگل در شرایط شور تأیید شده است (Sabra *et al.*, 2012a,b)، اما گزارشی مبنی بر پاسخ این گیاه در تنش غرقاب دیده نشد. از آنجا که امکان‌سنجی و زراعت گیاه دارویی سرخارگل در برخی از مناطق کشور تأیید شده است، ولی گزارش مدونی از کشت و سازگاری آن در مناطق شمالی کشور در دسترس نیست. بر همین اساس و با توجه به آمار

فاصله بین بلوک‌های آزمایش، کانال‌های باریک و شیب‌داری برای زهکشی تعبیه شد. بافت خاک از نوع رسی سیلتی و هدایت الکتریکی خاک ۱/۷ دسی‌زیمنس بر متر بود. آبیاری نشاهای کاشته شده بلافاصله انجام شد. پس از آن هم آبیاری به صورت نشتی در تمام طول فصل رشد ادامه یافت.

زمان اعمال دوره‌های غرقاب صفر، سه و پنج روز، با توجه به آمار بارندگی‌های شدید منطقه در نظر گرفته شد. با کاربرد روزانه آب و حفظ دو سانتی‌متر ارتفاع آب روی سطح خاک، شرایط غرقاب ایجاد شد که با توجه به نوع تیمار، سه و پنج روز دوام یافت. کرت‌های شاهد هم به شیوه نشتی آبیاری شدند و روی آنها برای جلوگیری از ورود آب باران، تا پایان بارندگی با پلاستیک شفاف پوشانده شد. بلافاصله پس از اتمام دوره غرقاب، برگ‌های جوان و کاملاً توسعه‌یافته گیاهان در هر تیمار جمع‌آوری و به سرعت در نیتروژن مایع قرار گرفتند. برگ‌های جمع‌آوری شده پس از خروج از نیتروژن مایع، در یخچال ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند تا مقدار پراکسیده‌شدن لیپیدها (MDA)، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX)، و همچنین مقدار پروتئین کل، فنل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی موجود در آنها اندازه‌گیری شود.

#### سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا

برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان محصول پراکسیده‌شدن اسیدهای چرب غشاها به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، در ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ با نیتروژن مایع آسیاب و به آن ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ۱٪ اضافه شد. عصاره بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با دستگاه سانتریفیوژ مدل (Ependorf 5417 R) در ۱۴۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس، به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۵ میلی‌لیتر محلول ۲۰٪ TCA حاوی ۰/۵٪ تیوباربتوریک اسید (TBA) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار گرفت و بلافاصله

بارش‌های شدید و ناگهانی که در سال‌های اخیر در منطقه ثبت شده‌است و همچنین، با توجه به چندساله بودن این گیاه، احتمال وقوع تنش غرقاب در طول دوره رشد آن در این مناطق وجود دارد. از طرفی، تأثیر تاریخ‌های مختلف کاشت برای استقرار بهتر گیاه در خاک و بررسی دوره زمانی غرقاب بر زنده‌مانی گیاهچه‌ها، با توجه به شرایط اقلیمی و مرحله نمو گیاه می‌تواند بسیار متفاوت باشد (Gutierrez Boem *et al.*, 1996). بنابراین، با توجه به اهمیت و فراوانی تنش غرقاب در تاریخ‌های مختلف در منطقه ساری و اهمیت نقش پاک‌کنندگی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بهبود تحمل تنش غرقاب، آزمایش حاضر با هدف بررسی تأثیر تاریخ‌های کشت و مدت غرقاب بر تعدادی از ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی سرخارگل طراحی و اجرا شد.

#### مواد و روشها

این آزمایش در مزرعه پژوهشی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان-دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۳۹ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۳ درجه و چهار دقیقه شرقی و ارتفاع ۱۱ متر پایین‌تر از سطح دریا، به صورت طرح کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۱۳۹۱ طراحی و اجرا شد.

تیمارهای آزمایشی شامل سه تاریخ کشت (۱۰ تیر، ۹ مرداد و ۸ شهریور سال ۱۳۹۱ در کرت اصلی) و ۳ دوره غرقاب (بدون غرقاب به‌عنوان شاهد، ۳ روز غرقاب و ۵ روز غرقاب در کرت فرعی) بود. نشاهای گیاه دارویی سرخارگل از گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج تهیه شدند و در تاریخ کشت‌های مورد نظر به زمین اصلی منتقل شدند و به فاصله ۲۵ سانتی‌متر از هم روی ردیف‌ها کاشته شدند. هر کرت شامل ۶ ردیف کاشت با فاصله ۴۰ سانتی‌متر بود. البته بین کرت‌های هر تاریخ کشت، یک ردیف نکاشت و میان کرت‌های دوره‌های غرقاب، دو ردیف نکاشت در نظر گرفته شد. فاصله بین بلوک‌های آزمایش دو متر بود. در یک ردیف نکاشت از فاصله بین دوره‌های غرقاب و ۰/۵ متر از

و ۴۹۰ میکرولیتر محلول گایاکول ۴۵ میلی‌مولار با هم مخلوط گردید و به آن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد.

#### فعالیت آنزیم CAT

برای سنجش فعالیت آنزیم CAT از روش Luck (۱۹۷۴) استفاده شد: ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۹۸۰ میکرولیتر از بافر فسفات حاوی آب‌اکسیژنه ۲ میلی‌مولار مخلوط شدند و تغییرات جذب آنها در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد و فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد.

#### فعالیت آنزیم APX

برای سنجش فعالیت آنزیم APX از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) استفاده شد: مخلوط واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۷۷۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید ۵ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ۰/۱ میلی‌مولار بود و منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه محاسبه شد.

#### سنجش میزان پروتئین کل

سنجش غلظت پروتئین کل محلول با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

#### ارزیابی فنل کل

ارزیابی فنل کل با روش Folin-Ciocalteu (Meyers *et al.*, 2003) انجام شد. در این روش ۵۰ میکرولیتر از عصاره اتانولی استخراج‌شده را با ۱۲۵ میکرولیتر معرف فولین (۵٪) مخلوط کرده و پس از ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۷٪ بی‌کربنات سدیم به آن اضافه شد.

در یخ سرد شد. آنگاه نمونه‌ها مجدداً در ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ماده قرمز رنگ مالون‌دی‌آلدهید-تیوباریوتریک‌اسید (MDA-TBA) تولیدشده در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (PG Instrument+80) اندازه‌گیری شد و جذب سایر رنگی‌های اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. غلظت مالون‌دی‌آلدهید بر حسب نانومول بر گرم بافت تازه محاسبه شد.

#### استخراج پروتئین‌ها و آنزیم‌ها

۰/۵ گرم بافت تازه برگ با کمک نیتروژن مایع در هاون چینی آسیاب شد و پس از آن به بافت آسیاب‌شده، ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۵ مولار و PVPP ۲٪ اضافه و در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های SOD، POD، CAT و APX و همچنین میزان پروتئین کل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (PG Instrument+80) مورد استفاده قرار گرفت.

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها

##### فعالیت آنزیم SOD

سنجش فعالیت آنزیم SOD با استفاده از روش Giannopolitis و Ries (۱۹۷۷) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و NBT ۷۵ میکرومولار و ۱۵ میکرولیتر ریپوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده بود. مخلوط واکنش، به مدت ۱۵ دقیقه در معرض نور فلورسانس قرار گرفت و بعد جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت و فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه محاسبه شد.

##### فعالیت آنزیم POD

برای سنجش فعالیت آنزیم POD از روش In و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد: ۴۹۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه ۲۲۵ میلی‌مولار

محلول DPPH اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH محاسبه شد.

برای تجزیه آماری داده‌های بدست آمده، از نرم‌افزار SAS نسخه ۹ استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها، با آزمون LSD انجام و  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها در نظر گرفته شد. نمودارها، با نرم‌افزار SigmaPlot نسخه ۱۲ رسم شدند.

### نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، تأثیر بسیار معنی‌دار برهم‌کنش دوره غرقاب و تاریخ کشت را بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی غشا در برگ سرخارگل نشان داد (جدول ۱). برش‌دهی این برهم‌کنش با استفاده از تاریخ کشت نشان داد که میزان MDA در هر سه تاریخ کشت در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شده‌است (جدول ۲). بر مبنای میانگین‌های بدست آمده از داده‌های برهم‌کنش بین تیمارها، بیشترین مقدار MDA (۳۴/۴) نانومول بر گرم بافت تازه) مربوط به ۵ روز پس از غرقاب در تاریخ کشت ۸ شهریور بود (شکل ۱). کمترین میزان MDA (۹/۲۷) نانومول بر گرم بافت تازه) نیز در تیمار شاهد (بدون غرقاب) و در تاریخ کشت اول (۱۰ تیر) بدست آمد (شکل ۱).

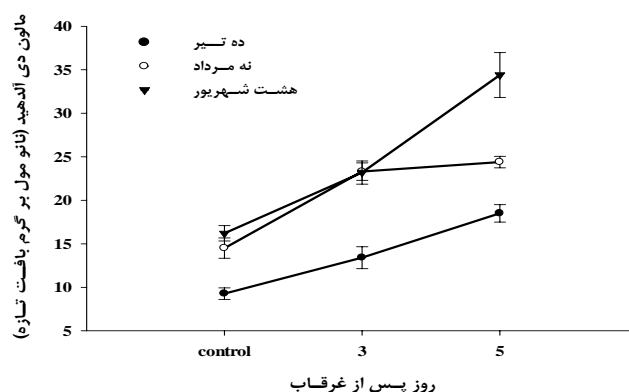
مقدار جذب مخلوط واکنش، پس از ۱۲۰ دقیقه نگهداری در شرایط بدون نور در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. سپس میزان فنل کل از روی منحنی استاندارد گالیک اسید برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه بیان شد.

### ارزیابی فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل با روش کالیمتری آلومینیوم کلراید اندازه‌گیری شد (Du *et al.*, 2009). ابتدا به ۱۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده به ترتیب ۱۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۳۰٪، ۱۵۰ میکرولیتر نیتريت سدیم ۰/۵ میلی‌مولار و ۱۵۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۰/۳ میلی‌مولار اضافه و بلافاصله به هم زده شد. پس از گذشت ۵ دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم ۱ میلی‌مولار اضافه شد. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه، میزان جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۰۶ نانومتر ثبت شد. سپس میزان فلاونوئید کل از روی منحنی استاندارد کاتچین برحسب میلی‌گرم کاتچین در گرم بافت تازه بیان شد.

### ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه، از طریق خاصیت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری تعیین شد (Brand-Williams *et al.*, 1995). برای این منظور، به ۲۰۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده نمونه‌ها، ۸۰۰ میکرولیتر



شکل ۱- اثر تاریخ کشت و دوره غرقاب بر تغییرات MDA برگ سرخارگل

مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده‌است

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های مورد مطالعه

میانگین مربعات									درجه آزادی	منابع تغییر
DPPH	PHL	PHO	PRO	APX	CAT	POD	SOD	MDA		
۰/۷۹ ns	۰/۰۰۸ ns	۰/۰۳۴ *	۱/۵۹ ns	۱/۱۹ ns	۱/۲۹ ns	۰/۰۱۹ ns	۱/۱۵ ns	۰/۶۵۸ ns	۲	تکرار
۳/۴۹ **	۴/۹۹ **	۱۲/۷ **	۸۲/۰۶ **	۴۵۸۶/۷ **	۳۸/۱ **	۱/۸۱ **	۲۰۹/۱ **	۲۷۲/۲ **	۲	تاریخ کشت
۳/۴۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۹	۰/۴۸	۰/۳۱	۰/۰۸۵	۰/۰۰۵	۰/۱۴۸	۱۳/۵	۴	خطای a
۱/۱ ns	۱/۱۷ **	۱/۰۷ **	۱۴۳۸/۱ **	۱۹۶۴/۹ **	۴۲۰/۳ **	۱۲/۲ **	۸۹۷/۸ **	۳۴۷/۷ **	۲	دوره غرقاب
۱۰/۱ **	۲/۴۹ **	۱۰/۰۶ **	۳۶۸/۷ **	۶۴/۶ **	۱۲۶/۴ **	۰/۳۱ **	۴۳/۷ **	۲۸/۳ **	۴	تاریخ کشت × دوره غرقاب
۰/۳۹۹	۰/۰۲۳	۰/۰۰۶	۱/۶۳	۲/۶۹	۰/۷۱۲	۰/۰۱۲	۲/۵	۲/۹۱	۱۲	خطای باقی مانده
۱/۱	۲/۹	۱/۲	۲/۲	۳/۶	۵/۸	۷/۹	۲/۴	۸/۷	-	ضریب پراکندگی (%)

MDA: مالون‌دی‌آلدهید، SOD: آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، POD: آنزیم پراکسیداز، CAT: آنزیم کاتالاز، APX: آنزیم آسکوربات پراکسیداز، PRO: پروتئین، PHO: فنول، PHL: فلاونوئید، DPPH: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

ns: عدم تفاوت معنی‌دار، \* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

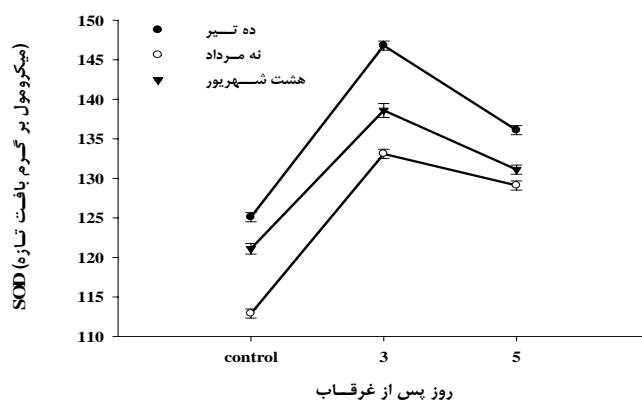
جدول ۲- برش‌دهی برهم‌کنش تیمارهای تاریخ کشت × دوره غرقاب با استفاده از دوره غرقاب

DPPH	PHL	PHO	PRO	APX	CAT	POD	SOD	MDA	درجه آزادی	روز پس از غرقاب
Pr>F										
۰/۰۰۰۲	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۹	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۲	صفر (شاهد)
۰/۰۰۰۳	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۲	۳
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۲	۵

MDA: مالون‌دی‌آلدهید، SOD: آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، POD: آنزیم پراکسیداز، CAT: آنزیم کاتالاز، APX: آنزیم آسکوربات پراکسیداز

PRO: پروتئین، PHO: فنول، PHL: فلاونوئید، DPPH: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

غرقاب پنج روزه بود (شکل ۲). همچنین، بیشترین فعالیت این آنزیم (۱۴۶/۸ میکرومول بر گرم بافت تازه) در تاریخ ۱۰ تیر و در سه روز پس از غرقاب بدست آمد (شکل ۲). کمترین فعالیت آن (۱۱۲/۹ میکرومول بر گرم بافت تازه) نیز، در تیمار شاهد و در تاریخ کشت ۹ مرداد مشاهده شد (شکل ۲).

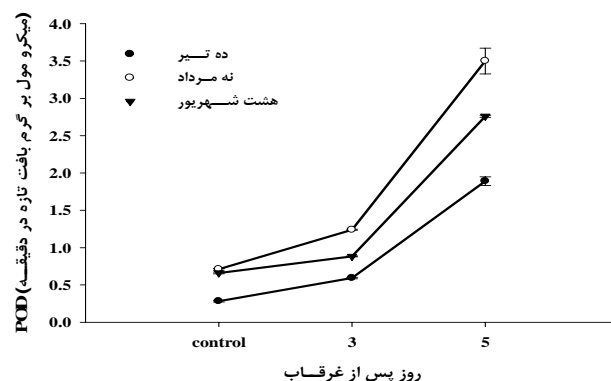


شکل ۲- اثر تاریخ کشت و دوره غرقاب بر فعالیت آنزیم SOD در برگ سرخارگل (مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده است).

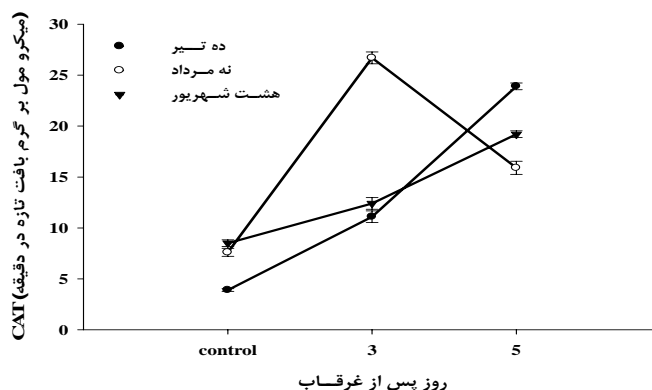
بر اساس نتایج پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم CAT هم تحت تأثیر برهم کنش معنی دار تاریخ کشت و دوره غرقاب قرار گرفت (جدول ۱). برش دهی به وسیله تاریخ کشت نشان داد که زمان غرقاب در بین تاریخ‌های کشت اختلاف بسیار معنی داری از نظر فعالیت آنزیم CAT داشت (جدول ۲). در بررسی برهم کنش‌ها مشاهده شد که افزایش دوره غرقاب به پنج روز توانست موجب افزایش فعالیت این آنزیم در مقایسه با تیمار شاهد در دو تاریخ کشت ۱۰ تیر و ۸ شهریور بجز تاریخ کشت ۹ مرداد شود (شکل ۴). در این تاریخ، بیشینه فعالیت آنزیم CAT با ۲۶/۷ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه در سرخارگل‌هایی بدست آمد که سه روز در شرایط غرقاب بودند (شکل ۴). کمترین فعالیت این آنزیم مانند آنزیم POD مربوط به شرایط بدون تنش (تیمار شاهد) و تاریخ ۱۰ تیر بود (شکل ۴).

برهم کنش دوره‌های غرقاب و تاریخ‌های مختلف کاشت در مورد فعالیت آنزیم SOD هم معنی دار بود (جدول ۱). نتایج برش‌دهی به وسیله تاریخ کشت بیانگر اینست که فعالیت این آنزیم در همه تاریخ‌ها بسیار معنی دار بوده است (جدول ۲). با وجود این، فعالیت آنزیم SOD در هر سه تاریخ کشت، در غرقاب سه روزه سرخارگل بیشتر از

بر پایه نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس، برهم کنش دوره‌های غرقاب با تاریخ‌های مختلف کشت سرخارگل بر فعالیت آنزیم POD بسیار معنی دار بود (جدول ۱). برش دهی این اثر با تاریخ کشت گویای این است که در بین دوره‌های غرقاب از نظر فعالیت این آنزیم اختلاف بسیار معنی دار وجود دارد (جدول ۲). روند تغییرات میانگین فعالیت آنزیم POD نشان داد که با افزایش زمان غرقاب به پنج روز، فعالیت این آنزیم در هر سه تاریخ کشت به‌طور چشمگیری نسبت به شرایط بدون تنش (تیمار شاهد) بیشتر شد، به طوری که بیشینه فعالیت این آنزیم (۳/۵ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه) در پنج روز پس از غرقاب در سرخارگل‌های کشت شده در تاریخ ۹ مرداد بدست آمد. کمترین فعالیت آن هم (۰/۲۸ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه) مربوط به تیمار شاهد و تاریخ ۱۰ تیر بود (شکل ۳).



شکل ۳- اثر تاریخ کشت و دوره غرقاب بر فعالیت آنزیم POD در برگ سرخارگل (مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده است).

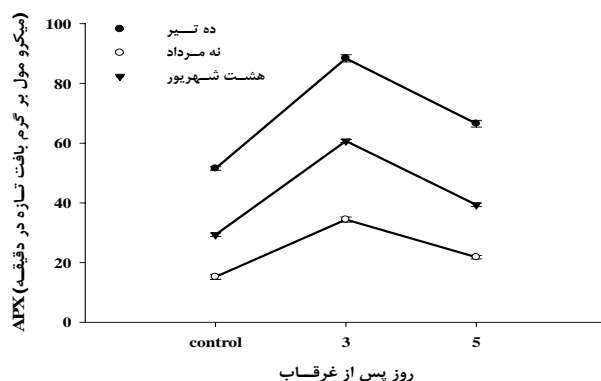


شکل ۴- اثر تاریخ کشت و دوره غرقاب بر فعالیت آنزیم CAT در برگ سرخارگل (مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده است).

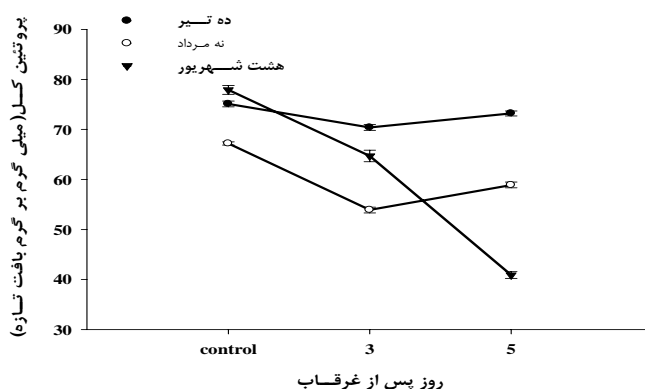
افزایش داشت که میزان فعالیت آن در هر سه تاریخ کشت به مانند آنزیم SOD در سه روز پس از غرقاب بیشتر از پنج روز پس از غرقاب بود (شکل ۵). آنزیم APX در تاریخ کشت ۱۰ تیر و در سه روز پس از غرقاب به بیشینه فعالیت خود به میزان ۸۸/۴ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه رسید و با افزایش زمان غرقاب به پنج روز، فعالیت این آنزیم به ۶۶/۵ میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه کاهش یافت (شکل ۵).

بر مبنای نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، تنش غرقاب در تاریخ‌های مختلف کشت تابستانه سرخارگل موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم APX شده است. برداشته‌ی برهم‌کنش‌ها به وسیله تاریخ کشت نشان داد که در زمان‌های غرقاب خاک، تاریخ‌های کشت منجر به ایجاد اختلاف بسیار معنی‌دار در فعالیت آنزیم APX شده است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم APX در شرایط تنش نسبت به شاهد (عدم غرقاب)





شکل ۵- اثر تاریخ کشت و دوره غرقاب بر فعالیت آنزیم APX در برگ سرخارگل (مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده است).



شکل ۶- اثر تاریخ کشت و دوره غرقاب بر تغییرات پروتئین برگ سرخارگل (مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده است).

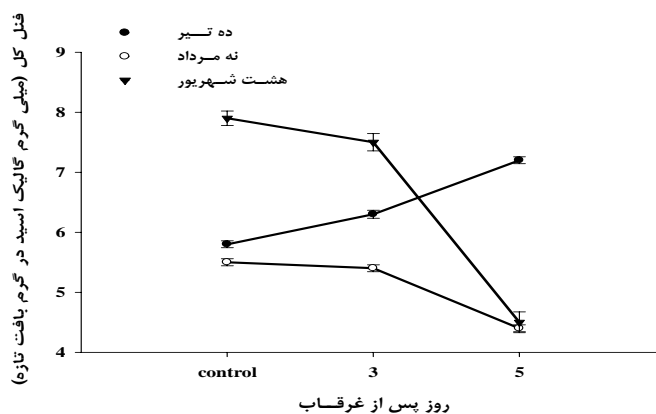
بافت تازه در حدود ۲۵٪ و ۹۰٪ کاهش داشت (شکل ۶)، ولی در تاریخ کشت اول (۱۰ تیر) میزان پروتئین در سه روز پس از غرقاب به میزان ۷۰/۴ میلی‌گرم بر گرم بافت تازه کاهش یافت که این کاهش در مقایسه با تیمار شاهد با ۷۵/۱ میلی‌گرم بر گرم بافت تازه، چندان چشمگیر نبود (شکل ۶).

اثر برهم‌کنش تنش غرقاب در تاریخ‌های مختلف کشت بر میزان فنل کل هم معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج برش‌دهی با استفاده از تاریخ کشت نشان داد که مقدار فنل کل در همه تاریخ‌های کشت و دوره‌های غرقاب بسیار معنی‌دار شده است (جدول ۲). میزان فنل به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در اولین تاریخ کشت تابستانه (۱۰ تیر) به بیشترین مقدار خود

در این آزمایش مقدار پروتئین برگ‌ها هم تحت تأثیر معنی‌دار برهم‌کنش دوره‌های غرقاب و تاریخ کشت قرار گرفت (جدول ۱). نتایج برش‌دهی با استفاده از تاریخ‌های کشت نشان داد که مقدار پروتئین در هر سه تاریخ کشت و در بین دوره‌های غرقاب بسیار معنی‌دار شده است (جدول ۲). بر پایه میانگین داده‌ها مشاهده می‌شود که تنش غرقاب توانست در هر سه تاریخ کشت مربوطه مقدار پروتئین برگ سرخارگل را نسبت به شرایط بدون تنش کاهش دهد (شکل ۶). بیشترین کاهش مربوط به سه روز پس از غرقاب در تاریخ ۹ مرداد و پنج روز پس از غرقاب در تاریخ ۸ شهریور بود که به ترتیب با ۵۳/۹ و ۴۰/۹ میلی‌گرم بر گرم بافت تازه نسبت به شاهد با ۶۷/۲ و ۷۷/۹ میلی‌گرم بر گرم

شده در این دو تاریخ، پنج روز پس از غرقاب کمترین میزان فنل کل را نشان دادند که مقدار آن به ترتیب ۴/۴ و ۴/۵ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه بود. بیشترین مقدار فنل برای این دو تاریخ ۵/۵ و ۸/۲ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه در تیمار شاهد بدست آمد (شکل ۷).

(۹/۲ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه) در پنج روز غرقاب رسید که نسبت به شاهد با ۵/۸ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم بافت تازه ۵۸/۶٪ افزایش داشت (شکل ۷)، ولی این ترکیب آنتی‌اکسیدانی در تاریخ ۹ مرداد و ۸ شهریور روندی رو به کاهش داشت (شکل ۷). سرخارگل‌های کشت

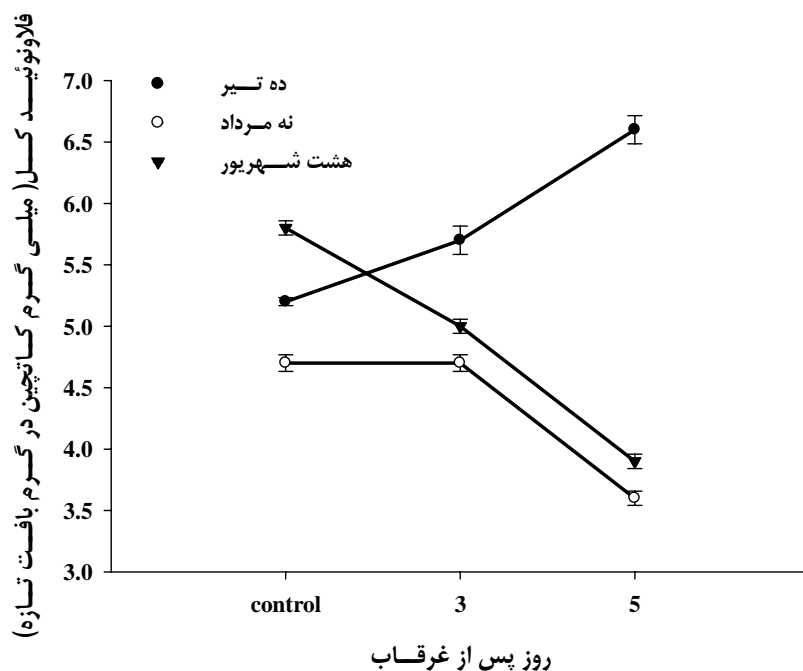


شکل ۷- اثر تاریخ کشت و دوره غرقاب بر تغییرات فنل کل در برگ سرخارگل  
مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده‌است.

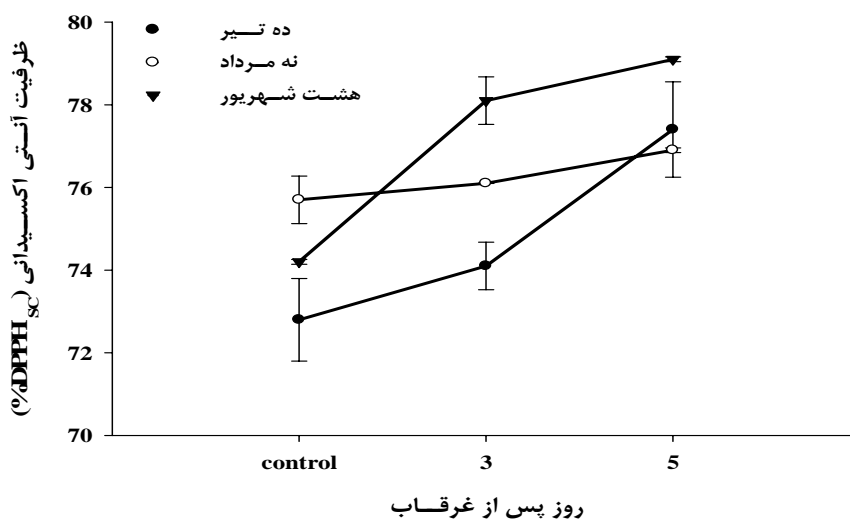
اثر برهم‌کنش دوره‌های غرقاب در تاریخ‌های مختلف کشت تابستانه بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کاملاً معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج برش دهی با استفاده از تاریخ کشت نشان داد که میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در بین دوره‌های غرقاب بجز تاریخ کشت مرداد، در دو تاریخ کشت دیگر بسیار معنی‌دار شده‌است (جدول ۲). بنابراین با افزایش دوره غرقاب نسبت به شاهد، افزایش فعالیت جاروکنندگی رادیکال آزاد DPPH در هر سه تاریخ کشت دیده شد (شکل ۹).

بیشترین درصد بازدارندگی DPPH به میزان ۷۹/۱٪ در پنج روز پس از غرقاب و در تاریخ کشت ۸ شهریور بدست آمد. ولی کمترین درصد بازدارندگی (۷۲/۸٪) در تیمار شاهد و برای تاریخ ۱۰ تیر ثبت شد (شکل ۹). وجود این، افزایش درصد بازدارندگی DPPH در برگ سرخارگل‌هایی که در تاریخ ۹ مرداد نشا شدند، قابل‌ملاحظه نبود (شکل ۹).

براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، برهم‌کنش تیمارها بر میزان فلاونوئید کل هم معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج برش دهی با استفاده از تاریخ‌های کشت سرخارگل نشان داد که مقدار فلاونوئید کل نیز در بین تاریخ‌های کشت و دوره‌های غرقاب بسیار معنی‌دار شده‌است (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین مقدار فلاونوئید کل (۶/۶ میلی‌گرم کاتچین در گرم بافت تازه) مربوط به تاریخ ۱۰ تیر در پنج روز پس از غرقاب بود (شکل ۸). در این آزمایش، فلاونوئیدها به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مؤثر تنها توانستند در تاریخ کشت اول (۱۰ تیر) افزایش نشان دهند که این نتیجه در مورد ترکیب‌های فنلی هم صادق بود (شکل ۷ و ۸). در دو تاریخ کشت ۹ مرداد و ۸ شهریور، فلاونوئیدها به‌مانند ترکیب‌های فنلی روند کاهشی را در پنج روز پس از غرقاب نسبت به شرایط بدون تنش نشان دادند که به ترتیب ۳۰/۵٪ و ۴۸/۷٪ بود (شکل ۸).



شکل ۸- اثر تاریخ کشت و دوره غرقاب بر تغییرات فلاونوئید کل در برگ سرخارگل (مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده است).



شکل ۹- اثر تاریخ کشت و دوره غرقاب بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ سرخارگل (مقدار خطای معیار با علامت میله‌ای نشان داده شده است).

## بحث

(شکل ۱) نشان داد که در هر سه تاریخ کشت مورد مطالعه، شرایط غرقاب سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده که این رادیکال‌ها به نوبه خود با خارج کردن  $H^+$  از

در آزمایش حاضر، افزایش معنی‌دار غلظت MDA در تیمارهای غرقاب در مقایسه با شاهد (شرایط بدون غرقاب)

آنزیم SOD را به دلیل تولید فراوان رادیکال سوپراکسید در شرایط غرقاب دانستند.

در این پژوهش با افزایش دوره غرقاب به پنج روز، فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر سه تاریخ کشت به طور چشمگیری نسبت به شرایط بدون تنش (با کمترین فعالیت آنزیمی) بیشتر شد (شکل ۳). بنابراین به نظر می‌رسد با ایجاد تنش اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد در طی تنش، آنزیم POD احتمالاً با افزایش فعالیت خود توانست با دخالت در پاکسازی یون سوپراکسید، تولید پراکسید هیدروژن درون سلولی را در شرایط تنش کاهش دهد. با وجود این احتمال می‌رود در شرایط تنش، آنزیم SOD با تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن، از یکسو موجب حذف این آنیون و از سوی دیگر با القای آنزیم پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز، سمیت پراکسید هیدروژن را کاهش دهد (Kopyra & Gwozdz, 2003). Simova-Stoilova و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی دخالت سیستم آنتی‌اکسیداتیو برگ دو ژنوتیپ شبدر و Kumutha و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای سودانی (*Pigeon pea*) در پاسخ به غرقاب خاک، افزایش فعالیت آنزیم POD را به افزایش همزمان غلظت پراکسید هیدروژن نسبت دادند که با یافته‌های این آزمایش هماهنگی دارد.

در این آزمایش، فعالیت آنزیم CAT روند مشابهی را با فعالیت آنزیم POD در هر سه تاریخ کشت بجز تاریخ ۹ مرداد داشت (شکل ۴). در تاریخ ۹ مرداد، حساسیت سرخارگل‌ها به تنش غرقاب سریع‌تر از دیگر تاریخ‌های کشت نشان داده شد، به طوری که در غرقاب سه روزه سرخارگل‌ها فعالیت بالایی از آنزیم CAT ثبت شد (شکل ۴). این نتیجه مشابه با یافته‌های Yordanova و همکاران (۲۰۰۴)، Lin و همکاران (۲۰۰۶a) و Yan و همکاران (۱۹۹۶) بود که در مطالعات خود به افزایش فعالیت آنزیم CAT در شرایط غرقاب اشاره کرده‌اند.

در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون، آنزیم APX با مصرف آسکوربات به عنوان دهنده الکترون، مقدار پراکسید هیدروژن

فسفولیپیدها، موجب تشکیل رادیکال فعال اسید چرب شدند. افزایش مقدار MDA در پنج روز پس از غرقاب و در سرخارگل‌های نشا شده در تاریخ ۸ شهریور، احتمالاً ناشی از استقرار ضعیف‌تر سرخارگل‌ها و حساسیت بیشتر غشاهای زیستی آنهاست. زمانی که تعادل بین تولید ROS و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیداتیو گیاه کاهش می‌یابد، تنش اکسیداتیو ایجاد شده منجر به پراکسید شدن اسیدهای چرب غیراشباع غشای اندامک‌های سلولی می‌شود که می‌تواند با برهم زدن شیب اسیدیته و نفوذپذیری غشاها موجب اختلال در فتوسنتز و کاهش تولید گیاه شود (Blokhin *et al.*, 2003). البته کاهش میزان اسیدهای چرب غیراشباع موجود در فسفولیپیدهای غشا تحت تنش غرقاب در گیاهان زنبق، گندم و جو هم گزارش شده است (Chirkova *et al.*, 1998). Qiuji *et al.*, 1996). Arbona و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی برخی ژنوتیپ‌های مرکبات در تحمل به تنش غرقاب، به افزایش میزان MDA در شرایط تنش اشاره کردند و بیان نمودند که رابطه مستقیمی بین مکانیسم آنتی‌اکسیداتیو کاراتر و تأخیر در شروع انباشت MDA می‌تواند وجود داشته باشد.

مهمترین تأثیر بیشتر تنش‌های غیرزیستی، تولید یون‌های مخرب از جمله آنیون‌های سوپراکسید در میتوکندری سلول و خسارت اکسیداتیو می‌باشد (Mittova *et al.*, 2004). آنزیم SOD می‌تواند سمیت‌زدایی یون سوپراکسید را افزایش داده و سبب کاهش آسیب‌های اکسیداتیو حاصل از آن شود. با وجود این، در این آزمایش افزایش فعالیت این آنزیم در تاریخ‌های مورد مطالعه احتمالاً توانسته سبب تبدیل آنیون سوپراکسید تولید شده ناشی از بستر غرقاب سرخارگل‌ها به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی شود که اگر پراکسید هیدروژن تولید شده به موقع از سلول دفع نشود، این آنیون‌ها واکنش داده و تولید رادیکال بسیار سمی و واکنش‌پذیر هیدروکسیل می‌کنند (Shi *et al.*, 2007). در این راستا، Tang و همکاران (۲۰۱۰) در ذرت و Arbona و همکاران (۲۰۰۸) در مرکبات در بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تحمل به شرایط غرقاب، افزایش فعالیت

را کاهش می‌دهد (Shi et al., 2007). فعالیت آنزیم APX در برگ سرخارگل‌های غرقاب، روند تقریباً مشابهی با فعالیت آنزیم SOD داشت (شکل ۶ و ۹). در آزمایش کنونی، افزایش فعالیت آنزیم‌های APX و CAT در برگ سرخارگل می‌تواند بیانگر توانایی جاروکنندگی خوب پراکسید هیدروژن در شرایط تنش باشد. نتیجه این آزمایش با نتایج آزمایش Lin و همکاران (۲۰۰۶b) در سیب‌زمینی شیرین، Arbona و همکاران (۲۰۰۸) در مرکبات و Tang و همکاران (۲۰۱۰) در ذرت در شرایط غرقاب همخوانی دارد.

کاهش پروتئین در طی تنش غرقاب در آزمایش حاضر، احتمالاً از یکسو به علت کاهش در سنتز پروتئین و از سوی دیگر به دلیل تسریع پروتئولیز و واسرشت پروتئین‌ها، تجزیه آنزیم‌های درگیر در سنتز پروتئین‌ها، اکسیداسیون اسیدهای آمینه به گروه‌های کربونیل، افزایش نیتрат، آمونیوم و اسیدهای آمینه آزاد، کاهش فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز و گلوتامین سنتتاز باشد (Sharma & Dietz, 2009). در این راستا، فرهنگیان کاشانی و ملک احمدی (۱۳۸۸) به کاهش معنی‌دار پروتئین برگ گیاه فلفل تحت تنش غرقاب نسبت به شرایط بدون تنش اشاره کردند. در این آزمایش، کاهش پروتئین در تاریخ ۱۰ تیر هم مشاهده شد ولی مقدار کاهش نسبت به تیمار شاهد چندان چشمگیر نبود (شکل ۶). بنابراین به نظر می‌رسد سرخارگل‌های کشت شده در این تاریخ به‌علت استقرار بهتر در زمین و سیستم آنتی‌اکسیدانی کاراتر (MDA کمتر و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو آنزیم POD و CAT) توانستند آسیب کمتری به ساختار غشاهای زیستی در اندامک‌های سلول گیاهی وارد کنند و نقش بسزایی در حفاظت پروتئین‌ها تحت شرایط تنش داشته باشند.

فنل‌های گیاهی در واقع متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که از مسیر شیکمیک اسید و از متابولیسم فنیل پروپانوئید سنتز می‌شوند و نقش بارزی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، خواص ضد میکروبی و ضد گیاه‌خواری در

گیاه دارند (Razali et al., 2008). در این آزمایش با افزایش مدت غرقاب به پنج روز، میزان فنل به‌عنوان آنتی‌اکسیدان تنها در تاریخ کشت ۱۰ تیر نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت (شکل ۷). از آنجایی که مکانسیم عمومی ترکیبات فنلی در جهت فعالیت آنتی‌اکسیدانی، حذف رادیکال‌های آزاد لیپید و جلوگیری از تجزیه هیدروپروکسیدازها به رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Razali et al., 2008)، افزایش میزان فنل کل در سرخارگل‌های کشت‌شده در تاریخ کشت ۱۰ تیر (شکل ۷) را می‌توان به خاصیت جاروکنندگی رادیکال‌های آزاد در این ترکیب نسبت داد. همچنین، با کاهش میزان فنل کل در شرایط غرقاب در دو تاریخ کشت ۹ مرداد و ۸ شهریور، می‌توان به افزایش تولید ROS و خسارت اکسیداتیو در سرخارگل‌های کشت‌شده در این دو تاریخ اشاره کرد که موجب افزایش MDA، فعالیت بیشتر آنزیم SOD و تغییر شکل پروتئین‌ها در این دو تاریخ شد. البته کاهش معنی‌دار میزان فنل‌ها در سه روز پس از غرقاب نسبت به شرایط بدون تنش، در مطالعه Lin و همکاران (۲۰۰۶b) در بررسی پاسخ آنتی‌اکسیدانی ژنوتیپ‌های سیب زمینی شیرین به تنش غرقاب نیز گزارش شده‌است

علاوه بر فنل‌ها، فلاونوئیدها هم توانایی بالایی در بازدارندگی رادیکال‌های DPPH و سوپراکسید دارند (Nijveldt et al., 2001). در این آزمایش روند تغییر فلاونوئیدها مشابه با تغییرات فنل بوده‌است (شکل ۸). البته افزایش میزان فلاونوئید در سرخارگل‌های نشا شده در تاریخ ۱۰ تیر (شکل ۸) می‌تواند احتمالاً به‌علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئید به همراه فنل برای کاهش آسیب اکسیداتیو القا شده در شرایط غرقاب باشد که در نتیجه آن، توانسته خسارت کمتری به ساختار غشا وارد کند. در دو تاریخ کشت ۹ مرداد و ۸ شهریور، روند تغییر فلاونوئیدها معکوس بود، به طوری که بیشترین مقدار فلاونوئید در تیمار شاهد (بدون غرقاب) دیده شد. در این دو تاریخ کشت، خسارت بیشتر ساختار غشا و افزایش فعالیت دو آنزیم SOD و APX در طی تنش غرقاب، نشان‌دهنده تولید ROS

## سیاسگزاری

بدین وسیله از حمایت و مساعدت مالی مسئولان محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، برای اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

## منابع مورد استفاده

- فرهنگیان کاشانی، س. و ملک احمدی، ف.، ۱۳۸۸. اثر تنش غرقابی بر برخی از پارامترهای فیزیولوژی گیاه فلفل ( *Capsicum annuum* L.). زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ۹۱: ۴۳-۵۲.

- Arbona, V., Hossain, Z., Lopez-Climent, M.F., Perez-Clemente, R.M. and Gomez-Cadenas, A., 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum*, 132(4): 452-466.
- Blokhin, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K., 2003. Antioxidant oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91: 179-194.
- Blumenthal, M., Lindstrom, A., Lynch, M.E. and Rea, P., 2011. Herb sales continue growth-up 3.3% in 2010. *HerbalGram*, 90: 64-67.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant capacity. *Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Chirkova, T., Novitskaya, V. and Blokhina, O.B., 1998. Lipid peroxidation and antioxidant systems under anoxia in plants differing in their tolerance to oxygen deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology*, 45: 55-62.
- Dalby-Brown, L., Barsett, H., Landbo, A.R., Meyer A.S. and Molgaard, P., 2005. Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24): 9413-9423.
- Demirci, B., Koşar, M., Demirci, F., Dinç, M., and Başer, K. H. C., 2007. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Chaerophyllum*

و افزایش خسارت اکسیداتیو می‌باشد. با وجود این، کاهش فلاونوئیدها در این تاریخ‌ها ممکن است ناشی از اکسیداسیون آنها توسط ROSها (Maclea *et al.*, 2006) باشد.

در آزمون حذف رادیکال‌های آزاد با استفاده از روش DPPH، رادیکال‌های DPPH با آنتی‌اکسیدان‌ها یا دیگر گونه‌های رادیکالی که دهنده هیدروژن هستند، واکنش داده و به شکل احیاشده در می‌آیند و بدین ترتیب، میزان جذب در طول موج ۵۱۷-۵۱۵ نانومتر کاهش می‌یابد (Demirci *et al.*, 2007). در بررسی یافته‌های این آزمایش مبنی بر حذف رادیکال‌های آزاد با استفاده از روش DPPH، افزایش فعالیت جاروکنندگی رادیکال DPPH در هر سه تاریخ کشت با افزایش مدت غرقاب نسبت به شاهد دیده شد (شکل ۹). بنابراین با توجه به رابطه مثبتی که بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل وجود دارد (Pennycooke *et al.*, 2005)، بالا بودن اثرات آنتی‌اکسیدانی در سرخارگل‌های نشا شده در تاریخ ۱۰ تیر می‌تواند احتمالاً به دلیل افزایش مقدار فنل و فلاونوئید کل در این تاریخ کشت باشد. از طرفی، ممکن است افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در این تاریخ کشت، به دلیل تعادل بین تولید ROSها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (Tavarini *et al.*, 2008) باشد.

به‌طور کلی، با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که گیاه دارویی سرخارگل به تنش غرقاب تحمل نسبتاً خوبی دارد. در این آزمایش، سرخارگل‌های کشت‌شده در تاریخ ۱۰ تیر در مقایسه با دیگر تاریخ‌های کشت تابستانه در منطقه مورد مطالعه، توانستند با کاهش انباشت پروتئین و MDA و همچنین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌طور مؤثری موجب کاهش خسارت به اسیدهای چرب و پروتئین‌ها در شرایط غرقاب شده و با تأثیر بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه سبب کاهش اثرات نامطلوب تنش و تحمل نسبی آن شوند. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد کشت زود هنگام سرخارگل‌ها در تابستان، به تحمل بیشتر گیاه در شرایط غرقاب در منطقه مورد مطالعه کمک کند.

- flooding and drought stresses on the antioxidant constituents in sweet potato leaves. *Botanical Studies*, 47: 417-426.
- Luck, H., 1974. In: *Methods in Enzymatic Analysis 2* (Ed *Bergmeyer*). Academic Press New York, 885P.
  - Maclean, D., Murr, D.P., Deell, J.R. and Horvath C.R., 2006. Postharvest variation in apple (*Malus domestica* Borkh.) flavonoids following harvest, storage, and 1-MCP treatment. *Agricultural and Food Chemistry*, 54: 870-878.
  - Meyers, K.J., Watkins C.B., Pritts M.P. and Hai-Liu, R., 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6887-6892.
  - Mittova, V., Guy, M., Tal, M. and Volokita, M., 2004. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1105-1113.
  - Mrozikiewicz, P.M., Bogacz, A., Karasiewicz, M., Mikolajczak, P.L., Ozarowski, M., Seremak-Mrozikiewicz, A., Czerny, B., Bobkiewicz-Kozłowska, T. and Grzeskowiak, E., 2010. The effect of standardized *Echinacea purpurea* extract on rat cytochrome P450 expression level. *Phytomedicine*, 17: 830-833.
  - Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22: 867-880.
  - Nijveldt, R.J., Vannood, E., Vanhoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Vannorren, K. and Vanleeuwen, P.A.M., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418-425.
  - Pellati, F., Benvenuti, S., Magro, L., Melegari, M. and Soragni, F., 2004. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35: 289-301.
  - Pennycooke, J.C., Cox, S. and Stushnoff, C., 2005. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia × hybrida*). *Environmental and Experimental Botany*, 53(2): 225-232.
  - Perata, W., Armstrong, L.A.C. and Voesenek, J., 2011. Plants and flooding stress. *New Phytologist*, 190: 269-273.
  - Qiujie, D., Bin, Y.S., Xiao, Z. and Wang, Z., 1996. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in Corn leaves. *Plant and Soil*, 179: 261-268.
  - *libanoticum* Boiss. et Kotschy. *Food Chemistry*, 105(4): 1512-1517.
  - Du, G., Li, M., Ma, F. and Liang, D., 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry*, 113(2): 557-562.
  - European Advisory Services., 2007. The Use of substances with nutritional or physiological effect other than vitamins and minerals in food supplements. Study undertaken for DG Sanco, European Commission. Service contract nr. Sanco/2006/E4/018, 82p.
  - Giannopolitis, C. and Ries, S., 1977. Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plant. *Plant Physiology*, 59(2): 309-314.
  - Gutierrez Boem, F.H., Lavado, R.S.L. and Porcelli, C.A., 1996. Note on the effects of winter and spring waterlogging on growth, chemical composition and yield of rapeseed. *Field Crops Research*, 47: 175-179.
  - Heath, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198.
  - In, B.C., Motomura, S., Inamoto, K., Doi, M. and Mori, G., 2007. Multivariate analysis of relation between preharvest environmental factors, postharvest morphological and physiological factors and vase life of cut Asomi Red Roses. *Japanese Society for Horticultural Science*, 76: 66-72.
  - Jackson, M.B., Ishizawa, K. and Ito, O., 2009. Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. *Annals of Botany*, 103(2): 137-142.
  - Kopyra, M. and Gwozdz, E.A., 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 1011-1017.
  - Kumutha, D., Ezhilmathi, K., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Deshmukh, P.S. and Meena, R.C., 2009. Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes. *Biology of Plants*, 53: 75-84.
  - Letchamo, W., Polydeonny, L.V., Gladisheva, N.O., Arnason, T.J., Livesey, J. and wang, D.V.C.A., 2002. Factors affecting *Echinacea* quality. *Trends in New Crops and New Uses*, 514-521.
  - Lin, K.H.R., Tsou, C.C., Hwang, S.Y., Chen, L.F.O. and Lo, H.F., 2006a. Paclobutrazol pre-treatment enhanced flooding tolerance of sweet potato. *Journal of Plant Physiology*, 163: 750-760.
  - Lin, K.H., Chao, P.Y., Yang, C.M., Cheng, W.C., Lo, H.F. and Chang, T.R., 2006b. The effects of

- Roots of Waterlogging-Tolerant and Waterlogging-Sensitive Maize Genotypes at Seedling Stage. *Agricultural Sciences in China*, 9: 651-661.
- Tanou, G., Molassiotis, A. and Diamantidis, G., 2009. Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 270-281.
  - Tavarini, S., DeglInnocenti, E., Remorini, D., Massai, R. and Guidi, L., 2008. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chemistry*, 107: 282-288
  - Unger, I.M., Motavalli, P.P. and Muzika, R.M., 2009. Changes in soil chemical properties with flooding: a field laboratory approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 131: 105-110.
  - Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S. and Wang, Z., 1996. Flooding induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil*, 179: 261-268.
  - Yanagawa, Y. and Komatsu, S., 2012. Ubiquitin/proteasome-mediated proteolysis is involved in the response to flooding stress in soybean roots, independent of oxygen limitation. *Plant Science*, 185-186: 250-258.
  - Yordanova, R.Y. and Popova, L.P., 2001. Photosynthetic response of barley plants to soil flooding. *Photosynthetica*, 39: 515-520.
  - Yordanova, R.Y., Christov, K.N. and Popova, L.P., 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 51: 93-10.
  - Razali, N., Razab, R., Mat Junit, S. and Abdulaziz, A., 2008. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chemistry*, 111: 38-44.
  - Sabra, A., Daayf, F. and Renault S., 2012a. Differential physiological and biochemical responses of three *Echinacea* species to salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 135: 23-31.
  - Sabra, A., Adam, L., Daayf, F. and Renault, S., 2012b. Salinity-induced changes in caffeic acid derivatives, alkamides and ketones in three *Echinacea* species. *Environmental and Experimental Botany*, 77: 234-241.
  - Sharma, S.S. and Dietz, K.J., 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14: 43-50.
  - Shi, Q., Fei, D., Wng, X. and Wei, M., 2007. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 542-550.
  - Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Kingaton-Smith, A. and Feller, U., 2012. Involvement of the leaf antioxidant system in the response to soil flooding in two *Trifolium* genotypes differing in their tolerance to waterlogging. *Plant Science*, 183: 43-49.
  - Stanisavijevic, I., Stojicevic, S., Velickovic, D., Veljkovic V. and Lazic, M., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. *Biotechnology and Bioengineering*. *Bioeng*, 17(3): 478-483.
  - Tang, B., Shang-zhong, X.U., Zou, X.L., Zheng, Y.L. and Qiu, F.Z., 2010. Changes of Antioxidative Enzymes and Lipid Peroxidation in Leaves and



**Changes in some biochemical characteristics of  
purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench)  
medicinal plant in response to planting date and soil flooding duration**

**S. Asadi Sanam<sup>1</sup>, M. Zavareh<sup>2\*</sup>, H. Pirdashti<sup>3</sup>, F. Sefidkon<sup>4</sup>, Gh.A. Nematzadeh<sup>5</sup>  
and A. Hashempour<sup>5</sup>**

1- Ph.D. Student, Department of Agronomy, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2\*- Corresponding author, Department of Agronomy, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran  
E-mail: mzavareh@guilan.ac.ir

3- Department of Agronomy and Plant Breeding, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

4- Medicinal Plants Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

5- Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Received: May 2013

Revised: October 2013

Accepted: October 2013

### **Abstract**

This research was aimed to investigate the effect of planting date and soil flooding duration on some biochemical characteristics of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) in Sari region. The study was conducted in a RCBD based split plot with three replications in the Research Farm of the Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, in 2012. Experimental treatments included three planting dates (June 30, July 30 and August 29) and three soil flooding durations (without flooding as control, three and five-day flooding) which were considered as main and sub-plots, respectively. Malondialdehyde (MDA), total phenols and flavonoids contents, protein oxidation of the leaves, enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POD) and catalase (CAT), as well as percentage of DPPH free radical inhibition were determined. Results of this experiment showed a significant increment of malondialdehyde (MDA) content in purple coneflower leaf with the highest level in five-day flooding duration and in August 29 planting date. The highest decrease in total protein was found in the same planting date and flooding duration with 90 % decline than control. The highest activity of antioxidant enzymes of superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) was recorded in the purple coneflowers leaves, cultivated in June 30, and flooded for three days, while the highest activity of peroxidase (POD) and catalase (CAT) were observed in plants cultivated in July 30. Five-day soil flooding markedly increased the total phenols and flavonoids content just in plants transplanted in June 30. In addition, the highest percentage of DPPH free radical inhibition was measured in plants subjected to continues five-day soil flooding and cultivated in August 29. In conclusion, it seems that the coneflower plant relatively showed a good tolerance to flooding stress.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, protein, purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), flavonoid, malondialdehyde.