Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 1, Page 191-205 (2024)

DOI:10.22092/ijmapr.2023.361669.3301:

Effects of drought stress on biochemical traits and its relationship with growth stage in milk thistle (*Silybum Marianum* L.)

Mostafa Sarani Mallak[1], Maryam Allahdou[2*], Leila Mehravaran[2] and Halimeh Piri[3]

1- M.Sc. graduated, Department of Plant breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
E-mail: Maryam.allahdou@uoz.ac.ir
3- Department of Water Engineering, Faculty of Soil and Water, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: March 2023 Revised: July 2023 Accepted: July 2023

Abstract

Background and objectives: Drought stress is the most critical factor limiting agricultural and medicinal plants' performance in arid and semi-arid areas. *Silybum Marianum* L. is a medicinal plant with antioxidant properties. In addition to the plant's genetic nature, flavonolignan production and accumulation are affected by various environmental conditions. The accumulation of secondary metabolites under drought stress was studied concerning the antioxidant defense system at the biochemical level. The purpose is to evaluate the secondary metabolites of milk thistle under non-stress conditions and different levels of drought stress and different growth conditions, as well as to identify the best level of moisture stress and the time of harvesting the plant to increase the effective compounds.

Methodology: Milk thistle seeds were disinfected and transferred to a Petri dish containing filter paper and placed in a germinator at 25°C for germination. The germinated seeds were transferred to the pots and put under controlled temperature and humidity in the greenhouse of Hirmand city, Shandel village, located 25 km from Zabul city, Sistan, and Baluchistan province. Evaluation of the effect of drought stress at four different levels of irrigation (25, 50, 75, and 100% of water requirement respectively severe stress, moderate stress, mild stress, and non-stress) and in 3 growth stages (6, 13 and 20 weeks after planting) on biochemical traits including proline content (PC), carbohydrates content (CC), total phenol content (TPC), total flavonoid content (TFC), antioxidant activity and activity of antioxidant enzymes such as catalase (CA), ascorbate peroxidase (AP), guaiacol peroxidase (GP), superoxide dismutase (SOD) and polyphenol oxidase (PO) was carried out. The experiment was done as a factorial based on a completely randomized design with three replications. Data and errors were examined for normality. After confirming the normality of the data and errors, analysis of the variance of the traits and comparing the mean of the traits (LSR) was done at the 5% level.

Results: The variance analysis of traits showed that the effect of different levels of irrigation, harvest time, and their interaction on all traits was significant. Comparison of the average interaction effect of irrigation treatment and harvest time of traits: proline content, carbohydrates content, phenol and flavonoid content, and antioxidant activity increased in all growth stages and the lowest and highest values were respectively observed in the growth stage 6 weeks after planting in 100 Percentage of water requirement and growth stage 20 weeks after harvesting in

Copyright: © 2024 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

the condition of 25% water requirement. Therefore, the drought stress factor can be used to improve the effective substances of this plant. In addition, the final growth stage is the most appropriate time to harvest this plant due to the accumulation of secondary metabolites at this stage. The interaction effect of irrigation treatment and harvest time was not significant for the activity of guaiacol peroxidase enzyme, and for other antioxidant enzymes it showed that the highest activity of catalase enzyme was at the growth stage 6 weeks after planting in conditions of 25 and 50% water requirement, for ascorbate peroxidase enzyme, it belonged to the growth stage 6 weeks after planting in the condition of 100% water requirement, and for polyphenol oxidase and superoxide dismutase enzymes, it belonged to the growth stage 20 weeks after planting in the condition of 25% water requirement. These results indicate that antioxidant enzymes act differently at different growth stages and under various moisture stress conditions.
Conclusion: The evaluation results of milk thistle in 4 irrigation regimes and three growth stages showed that most biochemical traits increased under stress conditions. This indicates that the milk thistle plant responds to drought stress through an enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system. Milk thistle plants had the highest total phenolic and flavonoid content at the final development stage (20 weeks after planting). Therefore, the best time to harvest is at the final stage of development, which has the most polyphenolic compounds.

Keywords: Antioxidant enzymes, flavonoid, antioxidant activity, secondary metabolite, developmental stages.

اثر تنش خشکی روی صفات بیوشیمیایی و ارتباط آن با مرحله رشدی در گیاه خارمریم (*Silybum Marianum* L.)

مصطفی سارانی ملاک[۱]، مریم الهدو[۲*]، لیلا مهرآوران[۲] و حلیمه پیری[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، پست الکترونیک: Maryam.allahdou@uoz.ac.ir

۳- استادیار، گروه مهندسی آب، دانشکده آب و خاک، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: تیر۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: تنش خشکی مهمترین عامل محدودکننده عملکرد گیاهان زراعی و دارویی در نواحی خشک و نیمه‌خشک است. گیاه خارمریم (*Silybum Marianum* L.) یک گیاه دارویی دارای متابولیت‌های ثانویه (فلاونولیگنان‌ها) با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. تولید و تجمع فلاونولیگنان‌ها در گیاه خارمریم علاوه بر ماهیت ژنتیکی گیاه به‌وسیله شرایط محیطی مختلف تحت تأثیر قرار می‌گیرد. تجمع متابولیت‌های ثانویه در این گیاه تحت تنش خشکی با توجه به سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در سطح بیوشیمیایی مطالعه شد. هدف از این پژوهش، ارزیابی متابولیت‌های ثانویه خارمریم در شرایط غیرتنش و سطوح مختلف تنش خشکی و مراحل مختلف رشدی و نیز شناسایی بهترین سطح تنش رطوبتی و زمان برداشت گیاه برای افزایش ترکیبات مؤثره گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بذرهای گیاه خارمریم ابتدا ضدعفونی شده و بعد به پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی منتقل و برای جوانه‌زنی در ژرمیناتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بذرهای جوانه زده شده به گلدان‌ها منتقل و در گلخانه شهرستان هیرمند، روستای شندل که در ۲۵ کیلومتری شهرستان زابل، استان سیستان و بلوچستان واقع شده است، در شرایط دمایی و رطوبت کنترل شده قرار گرفت. ارزیابی تأثیر تنش خشکی در ۴ سطح مختلف آبیاری (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد نیاز آبی به‌ترتیب تنش شدید، تنش متوسط، تنش ملایم و غیر تنش) و در ۳ مرحله رشدی (۶، ۱۳ و ۲۰ هفته پس از کاشت) روی صفات بیوشیمیایی شامل محتوی پرولین (PC)، محتوی کربوهیدرات‌ها (CC)، محتوی فنل کل (TPC)، محتوی فلاونوئید کل (TFC)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز (CA)، آسکوربات پراکسیداز (AP)، گایاکول پراکسیداز (GP)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و پلی‌فنول اکسیداز (PO) انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. نرمال بودن داده‌ها و خطاها ارزیابی شده و پس از تأیید نرمال بودن، تجزیه واریانس کلیه صفات و آزمون مقایسه میانگین (LSR) در سطح ۵٪ انجام شد.

نتایج: تجزیه واریانس صفات نشان داد که اثر سطوح مختلف آبیاری، زمان برداشت و اثر متقابل آنها بر روی کلیه صفات معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار آبیاری و زمان برداشت محتوی پرولین، محتوی کربوهیدرات‌ها، محتوی فنل و فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تمام مراحل رشدی افزایش داشته و کمترین و بیشترین آن به ترتیب در مرحله رشدی ۶ هفته پس از کاشت در شرایط ۱۰۰٪ نیاز آبی و مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از کاشت در شرایط ۲۵٪ نیاز آبی مشاهده شد. بنابراین فاکتور تنش خشکی به‌عنوان یک عامل بهبود دهنده مواد مؤثره این گیاه می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، همچنین مرحله رشدی نهایی بهترین زمان برداشت این گیاه با توجه به تجمع بیشتر متابولیت‌های ثانویه در این مرحله است. اثر متقابل تیمار آبیاری و زمان برداشت برای فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز معنی‌دار نبوده و برای سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز به مرحله رشدی ۶ هفته پس از کاشت در شرایط ۲۵٪ و ۵۰٪ نیاز آبی، آسکوربات پراکسیداز به مرحله رشدی ۶ هفته پس از کاشت در شرایط ۱۰۰٪ نیاز آبی آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز به مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از کاشت در شرایط ۲۵٪ نیاز آبی تعلق داشت. این نتایج بیانگر این است که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مراحل رشدی مختلف و در شرایط تنش رطوبتی مختلف به‌صورت متفاوت عمل

می‌کنند.
نتیجه‌گیری: نتایج بررسی گیاه خارمریم در ۴ رژیم آبیاری و ۳ مرحله رشدی نشان داد که بیشتر صفات بیوشیمیایی در شرایط تنش افزایش داشته که بیانگر این است که گیاه خارمریم از طریق سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی به تنش خشکی پاسخ می‌دهد. گیاه خارمریم در مرحله توسعه نهایی (۲۰ هفته پس از کاشت) بیشترین محتوی فنل و فلاونوئید کل را داشت. بر این اساس، بهترین زمان برداشت آن مرحله توسعه نهایی می‌باشد که بیشترین ترکیبات پلی فنولیک را دارد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، متابولیت ثانویه، مراحل رشدی.

مقدمه

گیاه خارمریم (*Silybum Marianum*) متعلق به خانواده Asteraceae به دلیل وجود فلاونولیگنان‌ها در میوه‌های آن، به‌عنوان یکی از مهمترین گیاهان دارویی برای حفاظت از کبد و درمان طیف وسیعی از بیماری‌های کبدی مانند کبد حاوی سموم و هپاتیت کبدی مطرح می‌باشد. فعالیت‌های ضد سرطانی، محافظ قلب، کاهنده چربی خون و محافظ عصبی ازجمله فعالیت‌های بیولوژیکی گیاه خارمریم می‌باشد و کاربردهایی نیز در مورد درمان کمکی در طول شیمی‌درمانی و بعد از آن و نیز ضد سرطانی آن مشاهده شده است (Dheeraj *et al*., 2018).

تحقیقات نشان داده است که شرایط تنش رطوبتی خاص منجر به افزایش متابولیت‌های ثانویه و افزایش کیفیت گیاهان می‌شود (Vosoughi *et al*., 2018؛ Ghotbzadeh Kermani *et al*., 2019). افزایش متابولیت‌های ثانویه در اثر تنش خشکی در گیاهان از دو جنبه حائز اهمیت است، یکی اینکه سیستم دفاعی گیاه را در مقابل تنش تقویت کرده و دیگر اینکه خاصیت دارویی گیاهان را افزایش داده که برای سلامت انسان مفید هستند (Ayaz *et al*., 2000). محققان متعددی افزایش متابولیت‌های ثانویه و افزایش کیفیت گیاه خارمریم را در نتیجه تنش خشکی گزارش کرده‌اند (Ibrahim & El-ElSayed *et al*., 2019؛ Khatib, 2019). متابولیت‌های ثانویه گیاه *Stellaria dichotoma* در شرایط تنش متوسط افزایش داشت، در حالی که در تنش شدید کاهش نشان دادند. ازاین‌رو، نتیجه گرفتند که تنش آبی متوسط برای تجمع مواد مؤثره این گیاه مفید هستند (Zhang *et al*., 2017).

فنولیک اسیدها و فلاونوئیدها به‌عنوان مواد آنتی‌اکسیدان اهمیت بالایی دارند، چون آنها نه تنها از گیاه در برابر صدمات گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند و عملکرد آنها را در شرایط تنش افزایش می‌دهند، بلکه این متابولیت‌ها خصوصیات دارویی دارند و برای درمان بیماری‌ها مفید می‌باشند (Bozin *et al*., 2008). سیلی‌مارین (یک ترکیب از مواد پلی‌فنولی) موجود در گیاه خارمریم به‌عنوان ماده مؤثره این گیاه نقش‌های مهمی در سیستم دفاعی گیاهان بر علیه تنش‌های زنده و غیر زنده ایفاء می‌کند (Treutter, 2005). فرض بر این است که تولید و تجمع بیشتر این متابولیت‌ها در محیط‌های تنش از تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب‌های مربوط به آنها جلوگیری می‌کند (Selmar & Kleinwachter, 2013). گزارش شده است که در شرایط تنش خشکی تجمع فلاونوئید و ترکیبات فنولیکی در گیاه خارمریم افزایش می‌یابد (Zahir *et al*., 2014). تأثیر تنش خشکی روی محتوی روغن و میزان فلاونوئیدهای اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش محتوی روغن و سیلی‌مارین و کاهش عملکرد میوه و صفات مربوط به آن شد (Majidi *et al*., 2021).

گیاهان دارای سازوکارهای دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی آنتی‌اکسیدان هستند که با همدیگر به‌عنوان یک سیستم دفاعی بسیار کارآمد برای مقابله با اثرهای زیان‌آور گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کنند (Esfandiari *et al*., 2009). افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نشان‌دهنده مهار کارآمد پراکسید هیدروژن به‌وسیله این آنزیم‌ها است که

این افزایش توسط محققان متعددی در گیاهان مختلف در شرایط تنش خشکی گزارش شده است (Razzaq *et al*., 2017؛ Yousefzadeh Najafabadi & Ehsanzadeh, 2017؛ Nouraei *et al*., 2018). گیاهان از طریق تجمع مواد آنتی‌اکسیدان و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به تنش اکسیداتیو واکنش می‌دهند. در نتیجه گیاهانی که دارای مقادیر بیشتر این ترکیبات یا فعالیت بیشتر این آنزیم‌ها باشند، تحمل بیشتری به تنش خشکی خواهند داشت و کاهش عملکرد اقتصادی آنها در شرایط تنش کمتر خواهد بود (Khaleghi *et al*., 2019). با مطالعه بخش‌های مختلف گیاه خارمریم در شرایط غیرتنش و تنش رطوبتی، مشخص شد که تنش رطوبتی موجب تجمع فنل‌ها، فلاونوئیدها و سیلی‌مارین در همه اندام‌های گیاه شده است. همچنین بیان گردید که محتوی فنل تام و سیلی‌مارین در دانه‌ها بیشتر از سایر اندام‌ها بوده است. بنابراین تنش خشکی یک راهبرد مؤثر برای افزایش کیفیت دارویی گیاه خارمریم می‌باشد (Ibrahim & El-Khatib, 2019). در مطالعه دیگری افزایش محتوی فنل و فلاونوئید کل و بیشتر ترکیبات فنلی در دانه گیاه کنجد گزارش شد. بنابراین تنش خشکی منجر به بهبود کیفیت دانه کنجد شده است (Ghotbzadeh Kermani *et al*., 2019).

با توجه به اینکه عمده متابولیت‌های ثانویه گیاه خارمریم در بذر بوده و امکان تولید بذر در تمام فصول سال و در تمام شرایط آب و هوایی میسر نیست، بررسی و امکان تولید متابولیت‌های ثانویه این گیاه در شرایط گلخانه‌ای و نیز میزان ترکیبات ثانویه در مراحل مختلف نموی این گیاه بررسی شد. ازاین‌رو، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر روی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیبات غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدان، ارزیابی متابولیت‌های ثانویه خارمریم در شرایط غیرتنش و سطوح مختلف تنش خشکی و مراحل مختلف رشدی و در نهایت شناسایی بهترین سطح تنش رطوبتی و زمان برداشت گیاه برای افزایش ترکیبات مؤثره گیاه خارمریم بود.

مواد و روش‌ها

تهیه بذرها و کشت

بذرهای گیاه خارمریم از شرکت پاکان بذر استان اصفهان تهیه شد. بذرها بعد از ضدعفونی در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ و شستشوی سطحی با آب مقطر استریل، به پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی منتقل و در ژرمیناتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

گلدان‌های با اندازه یکسان (۱۵×۱۹ سانتی‌متر) انتخاب و حدود یک سوم گلدان‌ها با شن و بقیه گلدان‌ها با خاک سبک محتوی کود گرانوله (کود خشک به‌صورت گلوله‌ای حاوی مواد مغذی فراوان) پر شده و بذرهای جوانه زده شده به گلدان‌ها منتقل و در گلخانه شهرستان هیرمند، روستای شندل در مختصات جغرافیایی ۳۱ درجه جنوبی، ۶۱ درجه شرقی و ارتفاع ۴۷۵ متری از سطح دریا، در شرایط دمایی و رطوبت کنترل شده (دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد روز، ۱۹ درجه سانتی‌گراد شب و رطوبت نسبی ۶۵-۶۰٪) قرار گرفت. این مطالعه به‌صورت آزمایش فاکتوریل ۳×۴ در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار در تیرماه سال ۱۴۰۰ انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل چهار سطح آبیاری (۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد نیاز آبی) و سه سطح زمان برداشت (۶، ۱۳ و ۲۰ هفته پس از کاشت) بود.

اعمال تنش

گلدان‌ها به‌طور 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. برای اعمال تنش خشکی از روش وزنی (با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱گرم) استفاده شد. بدین صورت که پس از اختلاط خاک و اضافه کردن آن به گلدان‌ها، گلدان‌ها به‌صورت کامل اشباع شده و بعد روی گلدان‌ها برای 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 گردیدند. 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 گرفت. برای اعمال تنش‌های ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد نیاز آبی، حجم آب بدست آمده در این اعداد ضرب شده و حجم بدست آمده به‌عنوان تیمار تنش به گلدان‌ها داده شد.

اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی

به منظور عصاره‌گیری، ابتدا برگ‌های خشک شده به‌خوبی پودر شدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به ۰/۵ گرم از نمونه‌های پودر شده در یک فالکون افزوده شد. فالکون مذکور به مدت ۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۱۰ rpm در تاریکی و دمای اتاق قرار گرفت. سپس عصاره‌های حاصل از کاغذ صافی عبور داده شدند تا محلول شفافی بدست آید و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند (Ardestani & Yazdanparast, 2007).

محتوی فنل کل

به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین-سیوکالتیو ۰/۲ نرمال اضافه شد. پس از ۵ دقیقه ۲ میلی‌لیتر از محلول ۷۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم به آن اضافه گردید. پس از ۲ ساعت، جذب محلول در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل BTS-45 شماره سریال: BTS-0638) قرائت شد. مخلوطی از واکنشگر به‌عنوان شاهد (بلانک) استفاده شد. از گالیک اسید به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. میزان کل فنولیک براساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک نمونه گزارش شد (Slinkard & Singleton, 1977).

محتوی فلاونوئید کل

به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آلومینیوم کلراید ۱۰٪ در اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر از استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب محلول ۳۰ دقیقه پس از نگهداری در دمای اتاق، در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. مخلوطی از واکنشگر به‌عنوان شاهد (بلانک) استفاده شد. از کوئرستین به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. میزان کل فلاونوئید براساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم ماده خشک نمونه گزارش شد (Chang *et al*., 2002).

فعالیت آنتی اکسیدانی

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) انجام شد. بدین صورت که ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره متانولی در غلظت‌های مختلف تهیه و به نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH ۰/۱ میلی‌مولار اضافه گردید. مخلوط به شدت با دست تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری گردید. سپس جذب نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. متانول ۸۰٪ به‌عنوان بلانک استفاده شد. برای نمونه کنترل، یک نمونه حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ و ۵ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH استفاده گردید. درصد بازدارندگی (inhibition%) نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{inhibition\%} = \frac{Ac-As}{Ac} \times 100$$

که As و Ac به‌ترتیب عدد جذب مربوط به نمونه‌های گیاهی و نمونه کنترل می‌باشد.

از شاخص IC_{50} برای بررسی فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال DPPH استفاده شد. برای بررسی بهتر این فعالیت از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (Huang *et al*., 2005).

میزان کربوهیدرات

۰/۲ گرم بافت سبز گیاه به همراه ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در لوله‌های آزمایش دربسته قرار داده شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از سرد شدن، ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ها را برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر فنل ۵٪ و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ اضافه گردید. در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۸ نانومتر نمونه‌ها قرائت شدند. میزان کربوهیدرات استخراجی براساس میکروگرم گلوگز در گرم وزن تر از جدول استاندارد استخراج شد.

غلظت پرولین

مقدار ۰/۱ گرم از ماده تر گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ به‌خوبی ساییده شد. بعد از عبور ماده همگن از کاغذ صافی، ۲ میلی‌لیتر از عصاره به لوله درب‌دار منتقل شده و به آن ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک اضافه گردید. استانداردهایی از پرولین از غلظت صفر تا ۰/۱ میکرومول بر میلی‌لیتر آماده گردید و مقدار جذب محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. محلول شاهد (بلانک) در این اندازه‌گیری تولوئن بود (Bates *et al*., 1973).

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 شد. سپس فاز رویی برای سنجش میزان فعالیت آنزیمی استفاده گردید. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر برحسب واحد فعالیت (U) که برابر با میکرومول تجزیه پراکسید هیدروژن است اندازه‌گیری شد (Beers & Sizer, 1952). آنزیم گایاکول پراکسیداز در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Fielding & Hall, 1978). اسکوربات‌پراکسیداز در طول موج ۲۹۰ نانومتر، پلی‌فنل‌اکسیداز در طول موج ۴۲۰ نانومتر (Janovitz-Klapp *et al*., 1990) و سوپراکسید دیسموتاز در طول موج ۵۶۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری گردید.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

ابتدا داده‌ها در نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۸ از نظر نرمال بودن بررسی شد، بدین‌صورت که ابتدا آزمون نرمالیتی داده‌ها با استفاده از روش کولموگراف اسمیرناف 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 ۵٪ با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد (SAS ver. 2010). نمودار مقایسه میانگین صفات با نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۷ رسم شد.

نتایج

محتوی پرولین، کربوهیدرات، فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که فاکتور تیمار آبیاری تأثیر معنی‌داری بر روی این صفات داشت که بیانگر این است که این صفات واکنش‌های متفاوتی در شرایط رطوبتی مختلف خاک داشتند. همچنین بین فاکتورهای زمان برداشت برای این صفات تفاوت معنی‌داری مشاهده شد که نشان‌دهنده تفاوت واکنش این صفات در مراحل مختلف رشدی است. البته اثر متقابل آنها برای این صفات نیز معنی‌دار بود (جدول ۱).

متناسب با افزایش شدت تنش مقدار محتوی پرولین افزایش نشان داد، به‌طوری که بیشترین مقدار را در تنش خشکی شدید (۲۵٪ نیاز آبی) داشت. مقدار افزایش محتوی پرولین ۱۴/۲، ۲۹/۷ و ۳۴/۶ درصد به‌ترتیب در شرایط ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد نیاز آبی نسبت به شرایط ۱۰۰٪ نیاز

آبی بود. کمترین و بیشترین مقدار آن به‌ترتیب ۳/۶۹ و ۵/۶۵ میکرومول در گرم وزن تر بود (جدول ۲). بنابراین گیاه خارمریم از طریق افزایش تجمع این اسمولیت در شرایط تنش خشکی به تنش اکسیداتیو پاسخ می‌دهد.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر آبیاری و زمان برداشت بر برخی صفات فیتوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه خار مریم (***Silybum marianum***)

Table 1. ANOVA of irrigation and harvest time effects on some phytochemical and physiological characteristics of *Silybum marianum*

S.O.V.	d.f.	M.S.				
		PC	CC	TPC	TFC	AA
Irrigation (I)	3	7.08**	2393**	1270**	14.3**	103.27**
Harvest time (H)	2	18.80**	19.20**	124**	0.95**	89.75**
I × H	6	3.96**	15**	39.40**	0.34**	12.41**
Experimental error	24	0.06	2.29	8.15	0.06	1.63
C.V. (%)	-	5.37	3.49	7.01	5.62	1.56

**: Significant at l% probability level.

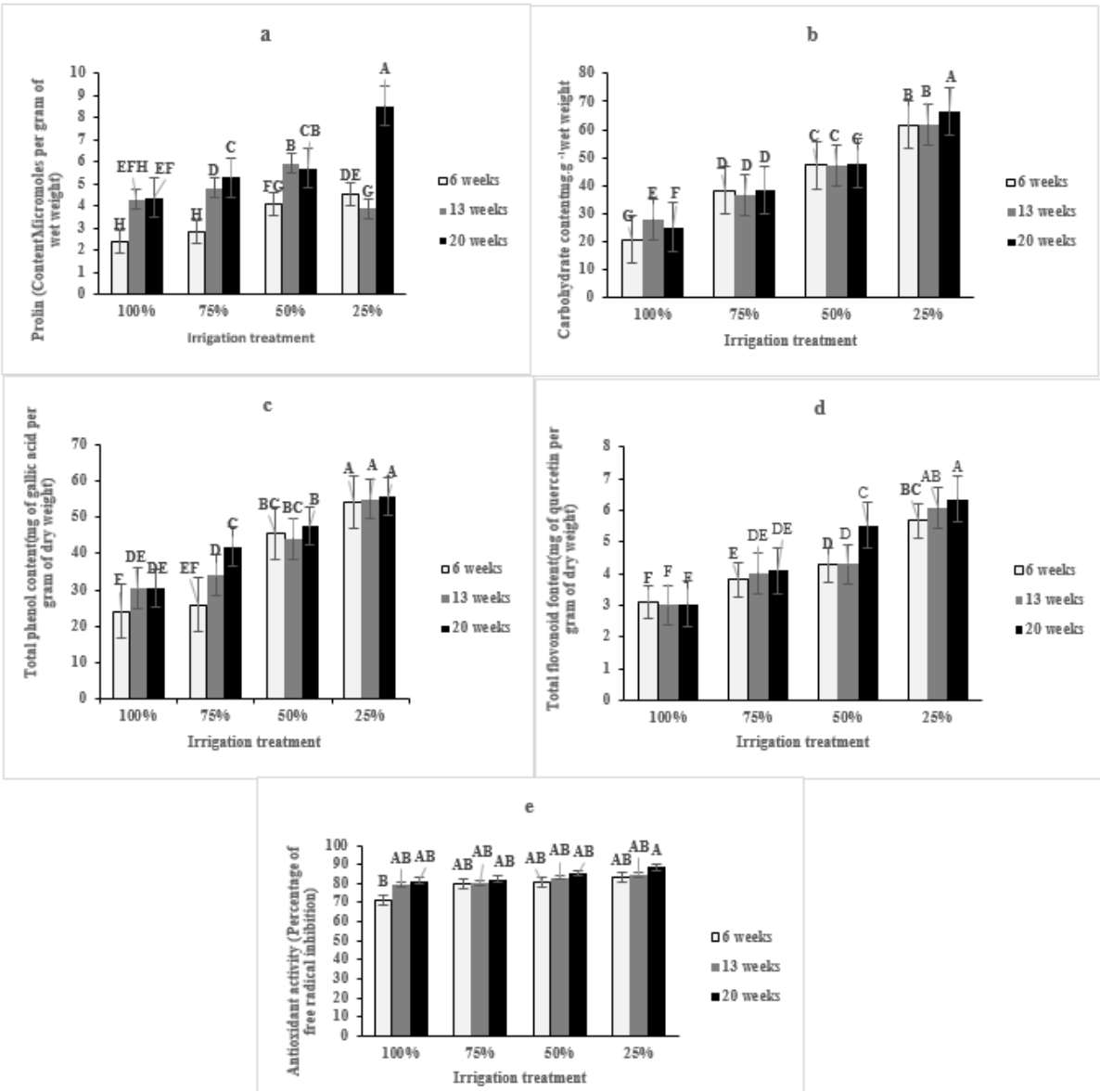
PC: Proline content, CC: Carbohydrate content, TPC: Total phenol content, TFC: Total flavonoid content, AA: Antioxidant activity

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار آبیاری و زمان برداشت محتوی پرولین نشان داد که محتوی پرولین در تمام مراحل رشدی افزایش یافت. کمترین و بیشترین آن به‌ترتیب در مرحله رشدی ۶ هفته پس از کاشت در شرایط ۱۰۰٪ نیاز آبی و مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از کاشت در شرایط ۲۵٪ نیاز آبی مشاهده شد (شکل ۱).

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار آبیاری و زمان برداشت نشان داد که محتوی کربوهیدرات‌ها در تمام مراحل رشدی متناسب با افزایش تنش مقدار آنها افزایش یافت. بیشترین مقدار محتوی کربوهیدرات (۶۶/۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از کاشت در شرایط تنش رطوبتی شدید (۲۵٪ نیاز آبی) بود (شکل ۱).

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار آبیاری و زمان برداشت محتوی فنل و فلاونوئید کل نشان داد که مقادیر آنها در تمام مراحل رشدی متناسب با افزایش شدت تنش زیاد شد. بیشترین مقدار محتوی فنل کل (۵۵/۶ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک) و فلاونوئید کل (۶/۳۵ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک) در مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از کاشت در شرایط ۲۵٪ نیاز آبی مشاهده شد (شکل ۱). بنابراین بهترین تیمار تنش خشکی برای افزایش مواد مؤثره این گیاه، تنش خشکی شدید (۲۵٪ نیاز آبی) و بهترین زمان برداشت آن در مرحله توسعه نهایی (۲۰ هفته پس از کاشت) است.

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار آبیاری و زمان برداشت نیز نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۸۸/۵۹٪) در مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از کاشت در شرایط ۲۵٪ نیاز آبی می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری × زمان برداشت بر برخی صفات فیتوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه خار مریم (***Silybum marianum***)

Figure 1. Means comparison of irrigation × harvest time interaction on some phytochemical and physiological characteristics of *Silybum marianum*

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، پلی فنول اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز) نشان داد که فاکتور تیمار آبیاری برای این صفات معنی‌دار بود که نشان‌دهنده این است که این صفات واکنش‌های متفاوتی در شرایط رطوبتی مختلف خاک داشتند. بین فاکتورهای زمان برداشت برای این صفات

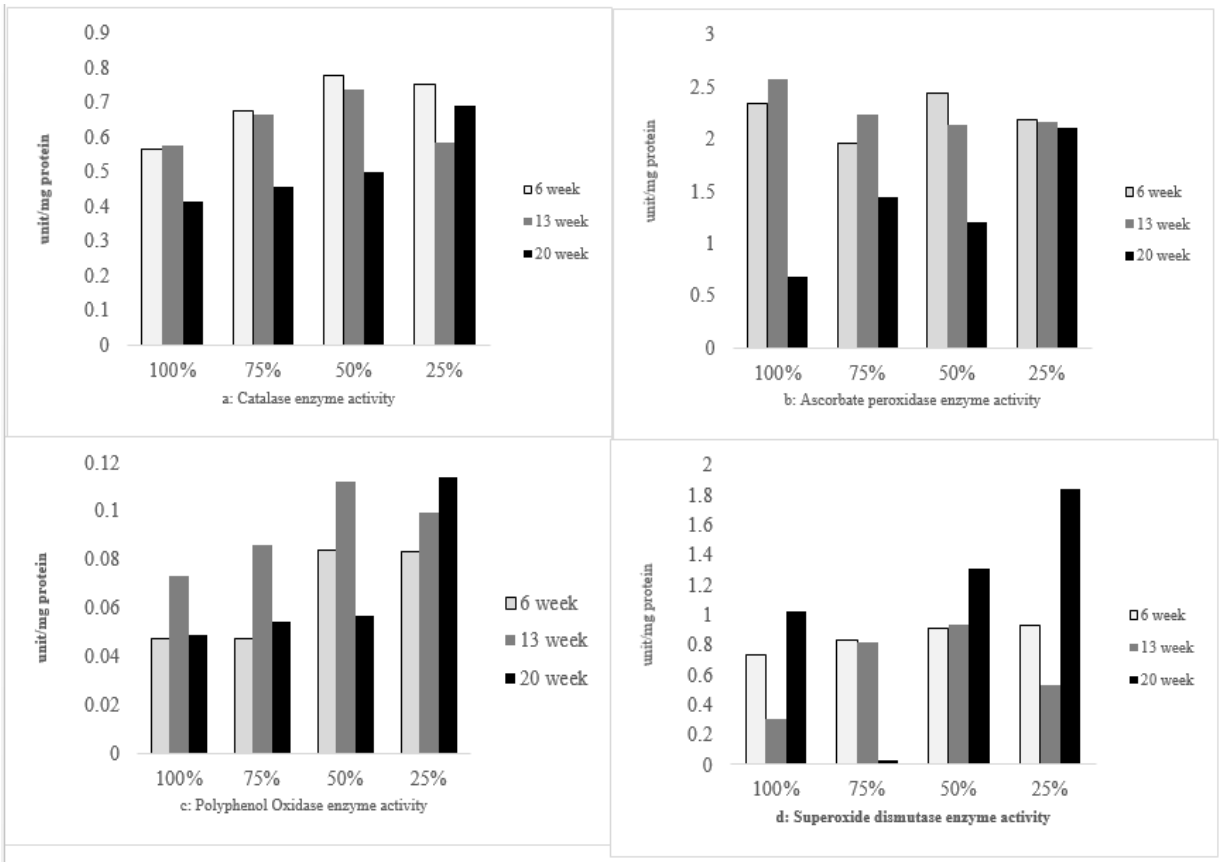
تفاوت معنی‌داری دیده شد که بیانگر تفاوت واکنش این صفات در مراحل مختلف رشدی است. اثر متقابل آنها نیز تأثیر معنی‌داری بر این صفات به غیر از فعالیت آنزیم گایاگول پراکسیداز داشت (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر آبیاری و زمان برداشت بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه خار مریم (***Silybum marianum***)

Table 2. ANOVA of irrigation and harvest time effects on antioxidant enzymes activity of *Silybum marianum*

S.O.V.	d.f.	M.S.				
		CAT	AP	GP	PPO	SOD
Irrigation (I)	3	0.050**	0.156*	0.022**	0.003**	0.291**
Harvest time (H)	2	0.100**	3.19**	0.036**	0.003**	1.33**
I × H	6	0.020**	0.575**	0.100n.s	0.0008**	0.204**
Experimental error	24	0.005	0.043	0.112	0.00005	0.006
C.V. (%)	-	11.97	10.58	10.06	9.78	8.28

n.s., *, and **: non-significant, significant at 1, and 5% probability levels, respectively.
CAT: Catalase, AP: Ascorbate peroxidase, GP: Guaiacol Peroxidase, PFO: Poly



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری × زمان برداشت بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه خار مریم (***Silybum marianum***)

Fig 2. Means comparison of irrigation × harvest time interaction on antioxidant enzymes activity of *Silybum marianum*

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

اثر متقابل تیمار آبیاری و زمان برداشت برای فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار آبیاری و زمان برداشت برای سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز به مرحله رشدی ۶ هفته پس از کاشت در شرایط ۲۵٪ و ۵۰٪ نیاز آبی، آسکوربات پراکسیداز به مرحله رشدی ۶ هفته پس از کاشت در شرایط ۱۰۰٪ نیاز آبی و پلی‌فنل اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز به مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از کاشت در شرایط ۲۵٪ نیاز آبی تعلق داشت (شکل ۲). این نتایج بیانگر این است که این آنزیم‌ها در مراحل رشدی مختلف و در شرایط تنش رطوبتی مختلف به‌صورت متفاوت عمل می‌کنند.

بحث

محتوی پرولین، کربوهیدرات، فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی اکسیدانی

تنظیم اسمزی با تجمع اسمولیت‌هایی مانند پرولین یکی از سازوکارهای کارآمدی است که گیاه در شرایط تنش خشکی برای حفظ تورژسانس و آماس سلولی بکار می‌برد که در نتیجه آن ظرفیت اسمزی سلول‌های تنش دیده کاهش می‌یابد، در نتیجه جذب آب به‌وسیله گیاه انجام می شود (Parviz & Satyawati, 2008).

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار آبیاری و زمان برداشت محتوی پرولین نشان داد که محتوی پرولین در تمام مراحل رشدی افزایش یافت. کمترین و بیشترین آن به‌ترتیب در مرحله رشدی ۶ هفته پس از کاشت در شرایط ۱۰۰٪ نیاز آبی و مرحله رشدی ۲۰ هفته پس از کاشت در شرایط ۲۵٪ نیاز آبی مشاهده شد (شکل ۱). مطابق با نتایج این تحقیق افزایش محتوی پرولین در گیاه شمعدانی عطری (Amiri *et al.*, 2017) و هویج (Razzaq *et al.*, 2017) مشاهده شد. در مطالعات متعددی گزارش شده است که در شرایط تنش رطوبتی تجمع محتوی پرولین در ارقام متحمل به خشکی بیشتر از ارقام حساس به خشکی بوده است (Gholami Zali & Ehsanzadeh, 2018؛ Alizadeh Yeloojeh *et al.*, 2019). بنابراین پرولین نقش حفاظتی در برابر تنش اکسیداتیو دارد و باعث افزایش عملکرد و تحمل گیاه به تنش خشکی می‌شود. سایر محققان نیز تأثیر معنی‌دار تنش خشکی بر روی محتوی پرولین را در گیاهان مختلف مانند مریم‌گلی (Caser *et al.*, 2018)، رازیانه (Gholami Zali & Ehsanzadeh, 2018) و گلرنگ (Alizadeh Yeloojeh *et al.*, 2019) گزارش کرده‌اند. پرولین به‌عنوان منبع کربن و هیدروژن، از طریق پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن، تثبیت ساختار پروتئین‌ها و تنظیم pH سیتوزول یا سیگنال‌دهی تنش، نقش سازگاری خود به تنش را ایفاء می‌کند (Hare & Cress, 1997). مطابق با نتایج این تحقیق، تأثیر معنی‌دار تنش خشکی بر روی میزان پرولین در گیاه خارمریم گزارش شده است (Zahir *et al.*, 2014؛ Ibrahim & El-Khatib, 2019). در سایر گیاهان مانند مریم‌گلی (Vosoughi *et al.*, 2018) و توت آمریکایی (Khaleghi *et al.*, 2019) اثر معنی‌دار تنش خشکی بر روی این صفت گزارش شده است.

تجمع کربوهیدرات‌های محلول داخل سلول‌ها در تنظیم اسمزی نقش مهمی دارد و به سلول کمک می‌کند تا ظرفیت آب آن کاهش یافته و آب بیشتری برای حفظ تورم و تورژسانس در شرایط تنش خشکی درون سلول باقی بماند. این پدیده منجر به پایداری بیشتر غشاء، پروتئین‌ها و افزایش فتوسنتز می‌شود. بنابراین سنتز و تجمع این اسمولیت در شرایط تنش خشکی عملکرد و تحمل گیاه به تنش خشکی را بهبود می‌دهد (Johari, 2010). نتایج این تحقیق نیز تأکیدی بر نقش این اسمولیت به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در برابر تنش اکسیداتیو در گیاه خارمریم است. در گیاه رازیانه گزارش شده است که تجمع کربوهیدرات در شرایط تنش خشکی افزایش داشته و در گیاهان متحمل به خشکی نسبت به گیاهان حساس افزایش بیشتری مشاهده شده است. این نتیجه نشان می‌دهد که تجمع این اسمولیت با تحمل گیاه به تنش خشکی ارتباط دارد (Askari & Ehsanzadeh, 2015). تجمع این اسمولیت در شرایط تنش خشکی در گیاهانی مانند شمعدانی عطری (Amiri *et al.*, 2017) و توت آمریکایی

(Khaleghi *et al*., 2019) نیز مشاهده شده است.

ترکیبات فنلی به‌طور مستقیم در فعالیت آنتی‌اکسیداتیو نقش دارند و گروه اصلی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در گیاهان هستند (Vosoughi *et al*., 2018). بنابراین ارزیابی مقادیر ترکیبات فنلی در شرایط مختلف ضروریست. مطابق با نتایج این تحقیق گزارش شده است که با بررسی گیاه خارمریم تحت تنش خشکی محتوی فنل و فلاونوئید به‌طور مثبتی با افزایش تنش خشکی افزایش داشته، همچنین تجمع این ترکیبات با وزن خشک گیاهچه‌ها همبستگی نشان داده است. بنابراین افزایش این ترکیبات در شرایط تنش خشکی منجر به بهبود عملکرد گیاه می‌شود (Zahir *et al*., 2014).

با مطالعه بخش‌های مختلف گیاه خارمریم در شرایط غیر تنش و تنش رطوبتی، مشاهده شده است که تنش رطوبتی موجب تجمع فنل‌ها، فلاونوئیدها و سیلی‌مارین در همه اندام‌های گیاه می‌شود. این محققان بیان کردند که محتوی فنول تام و سیلی‌مارین در دانه‌ها بیشتر از سایر اندام‌ها بوده است. بنابراین تنش خشکی یک راهبرد مؤثر برای افزایش محتوی سیلی‌مارین (افزایش کیفیت دارویی) گیاه خارمریم می‌باشد (Ibrahim & El-Khatib, 2019). گزارش شده است که بذرهای بدست آمده از گیاهان تنش دیده (تنش خشکی) سطوح بالاتری از سیلی‌مارین را در گیاه خارمریم دارند. همچنین این محققان بیان کردند که فلاونوئیدها دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی بوده و قادر به پاکسازی رادیکال‌های آزاد هستند. بنابراین تجمع این متابولیت‌ها در گیاهان در شرایط تنش خشکی ممکن است از تولید گونه‌های اکسیژن فعال جلوگیری کرده و متعاقباً از آسیب به گیاه ممانعت کند (ElSayed *et al*., 2019).

افزایش متابولیت‌های ثانویه در شرایط تنش خشکی در سایر گیاهان مانند آویشن (Emami Bistgani *et al*., 2017)، کنگرفرنگی (Nouraei *et al*., 2018)، هویج (Razzaq *et al*., 2017)، گندمک (Zhang *et al*., 2017)، مریم‌گلی (Vosoughi *et al*., 2018؛ Caser *et al*., 2018)، کنجد (Ghotbzadeh Kermani *et al*., 2019) و گلرنگ (Alizadeh Yeloojeh *et al*., 2020) مشاهده شد. بنابراین آنان پیشنهاد کردند که رژیم‌های آبیاری می‌تواند برای بهبود کیفیت غذایی و دارویی گیاهان مورد توجه قرار گیرد.

روش پایدار رادیکال آزاد DPPH روشی آسان، سریع و حساس برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات خاص یا عصاره‌های گیاهیست (Ebrahimzadeh *et al*., 2008). مطالعات متعددی نشان داده است که تنش خشکی منجر به افزایش فلاونوئید و فعالیت‌آنتی اکسیدانی می‌شود. کاربرد کودهای میکرو مانند Zn، Fe، B و Mn در شرایط تنش خشکی سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه خارمریم شده بود (Ebrahimian *et al*., 2021). همچنین در این مطالعه با افزایش سن گیاه میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته بود، به‌طوری که در ۲۰ هفته پس از کاشت حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ارتباط آن با مراحل رشدی گیاه در گیاه خارمریم قبلاً نیز بررسی و مشاهده شده بود، به‌طوری که گیاهان برداشت شده در هشتادمین روز پس از کاشت دارای بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند (Ahmad *et al*., 2013). نتایج این تحقیق دلالت بر این دارد که نه تنها از بذرهای گیاه سیلی‌مارین، بلکه از سایر اندام‌ها در مراحل انتهایی رشد نیز می‌توان در جهت خاصیت دارویی آن استفاده کرد. نتایج سایر تحقیقات نیز این نظریه را تأیید می‌کند (Ahmad *et al*., 2013).

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط تنش خشکی در سلول‌های گیاهی می‌تواند به‌وسیله مسیرهای دفاعی مختلف آنزیمی و غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدانی کنترل شوند. مسیر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، ردوکتاز سوپر اکساید، پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز است (ElSayed *et al*., 2019). نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که گیاه خارمریم می‌تواند آسیب تنش اکسیداتیو را از طریق کاربرد سیستم

دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی کنترل کند. مطابق با نتایج این تحقیق، سایر محققان نیز با بررسی گیاه خارمریم در سه شرایط رطوبتی و سه مرحله برداشت گزارش کردند که اثر تیمار رطوبتی، زمان برداشت و اثر متقابل آنها بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان معنی‌دار بود (ElSayed *et al.*, 2019). همچنین تأثیر معنی‌دار تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهانی مانند هویج (Razzaq *et al.*, 2017)، کنجد (Yousefzadeh Najafabadi & Ehsanzadeh, 2017) و کنگرفرنگی (Nouraei *et al.*, 2018) مشاهده شده بود.

آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز رادیکال آزاد سوپر اکساید، از گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده تحت شرایط تنش، را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند که سمّیت کمتری برای سلول دارد، اما همچنان می‌تواند به سلول آسیب برساند. پراکسید هیدروژن به‌وسیله آنزیم‌های کاتالاز یا پراکسیداز یا آسکوربات پراکسیداز از طریق تبدیل به مولکول‌های آب و اکسیژن پاکسازی می‌شود. پاکسازی پراکسید هیدروژن از اکسیداسیون مولکول‌های بیولوژیکی و تخریب سلول‌ها جلوگیری می‌کند (Yosefzadeh Najafabadi & Ehsanzadeh, 2017). بنابراین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش خشکی منجر به افزایش عملکرد گیاه و تحمل به تنش خشکی از طریق حذف گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت، بررسی گیاه خارمریم در ۴ رژیم آبیاری و ۳ مرحله رشدی نشان داد که همه صفات بیوشیمیایی شامل محتوی پرولین، کربوهیدرات، فنل و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش داشته که بیانگر این است که گیاه خارمریم از طریق سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی به تنش خشکی پاسخ می‌دهد. در شرایط تنش شدید (۲۵٪ نیاز آبی) حداکثر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوی فنل و فلاونوئید کل مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که فاکتور تنش خشکی می‌تواند از طریق افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاه خارمریم منجر به بهبود کیفیت و مواد مؤثره آن شود. گیاه خارمریم در مرحله توسعه نهایی (۲۰ هفته پس از کاشت) بیشترین محتوی فنل و فلاونوئید کل را داشت. بر این اساس، بهترین زمان برداشت آن مرحله توسعه نهایی می‌باشد که بیشترین ترکیبات پلی‌فنولیک را دارد.

References

- Ahmad, N., Abbasi, B.H. and Fazal, H., 2013. Evaluation of antioxidant activity and its association with plant development in *Silybum marianum* L. Industrial Crops and Products, 49: 164-168.
- Alizadeh Yeloojeh, Kh., Saeidi, Gh. and P. Ehsanzadeh**.,** 2019. Effectiveness of physiological traits in adopting safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes to water deficit condition. International Journal of Plant Production, 14(1): 1-10.
- Alizadeh Yeloojeh, Kh., Saeidi, Gh. and Sabzalian, M.R., 2020. Drought stress improves the composition of secondary metabolites in safflower at the expense of reduction in seed yield and oil content. Industrial Crops and Products, 154: 112496.
- Amiri, R., Nikbakht, A., Rahimmalek, M. and Hoseini, H., 2017. Variation in the essential oil composition, antioxidant capacity, and physiological characteristics of *Plargonium graveolens* L. inoculated with two species of Mycorrhizal Fungi under water deficit conditions. Journal of Plant Growth Regulation, 36: 502-515.
- Ardestani, A. and Yazdanparast, R., 2007. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chemestry, 104: 21-29.
- Askari, E. and Ehsanzadeh, P., 2015. Drought stress mitigation by foliar application of salicylic acid and their interactive effects on physiological characteristics of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) genotypes. Acta Physiologiae Plantarum, 37: 4-14.
- Ayaz, F.A., Kadioglu, A. and Turgut, R., 2000. Water stress effects on the content of low molecular weight carbohydras and phenolic acids in *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler. Canadian Journal of Plant Science, 80: 373-378.
- 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.
- Beers, G.R. and Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Biological Chemistry, 195(1): 133-140.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A. and Igic, R., 2008. Phenolics as antioxidants in garlic

- Hare, P.D. and Cress, W.A., 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regulation, 21: 79-102.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry, 53: 1841-1856.
- Ibrahim, H.M. and El-Khateeb., 2019. Growth, yield and active constituents of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn) under drought stress. Science Journal of Bioscience and Bioengineering, 6(1): 1-8.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M. and Nicolas, J.J., 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxadase. Journal of Agricultural Food Chemistry, 38: 926-931.
- Johari, M., 2010. Effect of water stress on yield and proline content of four wheat lines. African Journal of Biotechnology, 9: 36-40.
- 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. Nature, Scientific Reports, 9(1): 19250, 1-12.
- Majidi, M.M., Shafiei-Koij, F., Pirnajmedin, F., Jami, M. and Radan, Z., 2021. Fatty acid profile, silymarin content and production properties of milk thistle (*Silybum marianum*) germplasm under different water environments. Crop and Pasture Science, 72(4): 302-310.
- Nouraei, S., Rhimmalek, M. and Saeidi, Gh., 2018. Variation in polyphenolic composition, antioxidants and physiological characteristics of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus Hayek* L.) as effected by drought stress. Science Horticulture, 233: 378-385.
- Parviz, A. and Satyawati, S., 2008. Salt stress Phyto-biochemical responses of plants. Plant, soil and environment, 54: 89-99.
- Razzaq, M., Akram, N.A., Ashraf, M., Nazz, H. and Al-Quraini, A., 2017. Intreractive effect of drought and nitrogen on growth, some key physiological attributes and oxidative defense system in carrot (*Daucus carota* L.) plants. Scientia Horticulture, 225: 373-379.
- 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.
- Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977. Total phenol analysis automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.
- Treutter, D., 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. Plant Biology, 7: 581-591.
- Vosoughi, N., Gomarian, M., Ghasemi Pirbalouti, A., Khaghani, Sh. and Malekpoor, F., 2018. Essential oil (*Allium sativum* L., Alliaceae). Food Chemistry, 111: 925-929.
- Caser, M., Angiolillo, F., Chitarra, W., Lovisolo, C., Ruffoni, B., Pistelli, L. and Scariot, V., 2018. Eco physiological and phytochemical responses of *Salvia sinaloensis* Fern. to drought stress. Plant Growth Regulation, 84: 383-394.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Food and Drug Analysis, 10: 178-182.
- Dheeraj, A., Tailor, D., Singh, S.P. and Singh, R.P., 2018. Role of nutracuticals in cancer chemosensitization. Cancer Sensitizing Agents for Chemotherapy, 199-220.
- Ebrahimian, S., Pirzad, A., Jalilian, J. and Rahimi, A., 2021. The Effect of Micronutrients Supplementation (Fe, Zn, B, and Mn) on Antioxidant Activity of Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) under Rainfed Condition. Journal of Medicinal Plants and By-products, 1: 43-50.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmmorad, F. and Hafezi, S., 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish Journal of Biology, 32: 43-49.
- ElSayed, A.I., El-hamahmy, M.A.M., Rafudeen, M.S., Mohamed, A. and Omar, A.A., 2019. The impact of drought stress on antioxidant responses and accumulation of flavonolignans in milk thistle (*Silibum marianum* L. Gaertn). Plants, 8(611): 1-18.
- Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A. and Hashemi, M., 2017. Morpho-physiological and phytochemical traits of (*Thymus daenesis* Celark.) in responses to deficit irrigation and chitosan. Acta Physiologiae Plantarum, 39(10): 231-243.
- Esfandiari, E.A., Shakiba, M.R., Mahboob, S.A., Alyari, H. and Shahabivand, H., 2009. The effect of water stress on the antioxidant content, protective enzyme activities, proline content and lipid peroxidation in wheat seedling. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 1916-1922.
- Fielding, J.L. and Hall, J., 1978. A biochemical and cytochemical Study of peroxidase a activity in root pea. Journal of Experimental Botany, 29: 98-989.
- Gholami Zali, A. and Ehsanzadeh, P., 2018. Exogenous proline improves osmoregulation, physiological functions, essential oil, and seed yield of fennel. Industrial Crops and Product, 111: 133-140.
- Ghotbzadeh Kermani, S., Saeidi, Gh., Sabzalian, M.R. and Gianinetti, A., 2019. Drought stress influenced sesamin and sisamolin content and polyphenolic components in sesame (*Sesamum indicum* L.) populations with contrasting seed coat colors. Food Chemistry, 289: 360-368.

- Zahir, A., Abbasi, B.H., Adil, M., Anjum, S. and Zia, M., 2014. Synergistic effects of drought stress and photoperiods phenology and secondary metabolism of *Silybum marianum*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 174: 693-707.
- Zhang, W., Gao, Z., Xie, Z., Lang, D., Zhou, L., Chu, Y., Zhao, Q., Zhang, X. and Zhao, Y., 2017. Effect of water stress on roots biomass and secondary metabolites plant *Stellaria dichotoma* L. Var. *Lanceolata* Bge. Science Horticulture, 224: 280-285.

composition and total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies. Industrial Crops and Products, 117: 366-374.
- Yousefzadeh Najafabadi, M. and Ehsanzadeh, P., 2017. Photosynthetic and antioxidative upregulations in drought-stressed sesame (*Sesamum indicum* L.) subjected to foliar-applied salicylic acid. Photosynthetica, 55: 611-622.