

## تأثیر پیش تیمار بذر با آب بر جوانه‌زنی، رشد و فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده گیاهچه‌های گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) در شرایط تنش کادمیوم

فاطمه محمودی<sup>۱</sup>، پریسا شیخ‌زاده‌مصدق<sup>۲\*</sup>، ناصر زارع<sup>۳</sup> و بهروز اسماعیل‌پور<sup>۳</sup>  
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۱۷)

### چکیده

کادمیوم یکی از فلزهای سنگین و از جمله آلاینده‌های مهم محیط‌زیست است که جوانه‌زنی و رشد و نمو گیاهان را مهار می‌کند، لذا در این شرایط استفاده از روش‌هایی که جوانه‌زنی گیاه را تحریک کند ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق تأثیر پیش تیمار بذر با آب (هیدروپرایمینگ) بر شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گیاه دارویی گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) در شرایط تنش کادمیوم به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۴ در دانشگاه محقق اردبیلی بررسی شد. عامل‌های آزمایشی شامل تنش کادمیوم در چهار سطح ( $S_1, S_2, S_3, S_4$ ): به ترتیب ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر) و پیش تیمار بذر با آب در چهار سطح (۰ (شاهد)، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بود. نتایج نشان داد، با افزایش شدت تنش، میانگین درصد و سرعت جوانه‌زنی، وزن خشک و طول گیاهچه، شاخص‌های طولی و وزنی توان و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز کاهش یافت. در شرایط بدون تنش، درصد و سرعت جوانه‌زنی و وزن خشک گیاهچه‌های ناشی از بذرهای پیش تیمار شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از بذرهای شاهد بود. پیش تیمار بذر با آب شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گاوزبان اروپایی در شرایط تنش کادمیوم را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. به طوری که، پیش تیمار بذر با آب به مدت ۴۸ ساعت سبب افزایش معنی‌دار و دو برابری در سرعت جوانه‌زنی بذرهای ۴/۵ برابری شاخص وزنی گیاهچه‌ها، ۳/۵ برابری فعالیت آنزیم کاتالاز و ۲/۵ برابری فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد شد. در مجموع، پیش تیمار بذر با آب به مدت ۴۸ ساعت بیشترین اثر مثبت را بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گاوزبان اروپایی داشت.

واژه‌های کلیدی: آنزیم کاتالاز، آنزیم پراکسیداز، فلزهای سنگین، گیاه دارویی، وزن خشک گیاهچه.

## The effect of hydropriming on germination, growth and antioxidant enzymes Activity of Borage (*Borago officinalis* L.) seedling under cadmium stress

Fatemeh Mahmoudi<sup>1</sup>, Parisa Sheikhzadeh Mosaddegh<sup>2\*</sup>, Naser Zare<sup>3</sup> and Behrouz Esmailpour<sup>3</sup>

1, 2, 3. Former MSc. Student, Assistant Professor and Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: May 8, 2016 - Accepted: Oct. 8, 2016)

### ABSTRACT

Cadmium is one of the heavy metals and the important environmental pollutants that inhibits seed germination and plant growth and development. So, in these conditions, the use of methods for stimulation of seed germination is necessary. In this research, the effects of hydropriming on germination and growth indice of borage seedlings under cadmium stress were investigated in a factorial experiment based on completely randomized design with three replications at the University of Mohaghegh Ardabili in 2015. The Experimental treatments were cadmium stress with four levels ( $S_1, S_2, S_3$  and  $S_4$ ; zero (control), 10, 50 and 100 mg.lit<sup>-1</sup>) and hydropriming with four levels (12, 24 and 48 hours). The results showed that the percentage and rate of germination, length and seedling dry weight, vigor indice and catalase and peroxidase enzymes activity were decreased with increasing stress level. In non stress condition, the percentage and rate of seed germination and seedlings dry weight of seedling derive from primed seeds were significantly higher than those of control seeds. Hydropriming significantly increased the seed germination and seedling growth indices of borage under cadmium stress conditions. 48 hours hydropriming under cadmium stress conditions, caused significant and 2-fold increase in the germination rate, 4.5-fold in the seedling weight index, 3.5 and 2.5-fold in the activity of catalase and peroxidase enzymes, respectively, as compared to control. In total, 48 hours hydropriming was the most positive effects on seed germination and growth of borage seedling.

**Keywords:** Catalase enzyme, heavy metals, medicinal plant, peroxidase enzyme, seedling growth.

## مقدمه

گیاه دارویی گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) گیاهی یکساله از خانواده گاوزبان<sup>۱</sup> است. این گیاه افزون بر خواص دارویی، خواص چند صنعتی و علوفه ای چندی نیز دارد که سبب افزایش اهمیت آن شده است. این گیاه امروزه در بیشتر نقاط جهان به منظور استفاده‌های درمانی پرورش می‌یابد، به این صورت که از گلبرگ‌ها و سرشاخه‌های این گیاه به‌عنوان آرام‌بخش، معرق، ضد سرفه و التهاب‌های ریه، تقویت قلب و اعصاب استفاده می‌شود. دانه‌های گاوزبان به‌عنوان یکی از منابع اصلی اسید چرب گامالینولئیک اسید است که کاربردهای خوراکی و آرایشی دارد (Salehi Sormagi, 2009).

فلزهای سنگین از عمده‌ترین آلاینده‌های محیطی به‌شمار می‌آیند که سمیت آن‌ها به دلایل اکولوژیکی، تکاملی، تغذیه‌ای و محیطی مشکل بزرگی به‌شمار می‌رود. تجمع این فلزات به دلیل ایجاد سمیت در خاک‌های کشاورزی می‌تواند، تولید گیاهان زراعی به‌ویژه گیاهان دارویی را تحت تأثیر قرار داده و منجر به کاهش رشد، عملکرد و کیفیت این گیاهان شود (Amani, 2008). کادمیوم به دلیل سمیت بالا و حل شدن سریع و آسان در آب به‌عنوان یکی از مهم‌ترین فلزهای سنگین آلوده‌کننده زنجیره غذایی به‌شمار می‌رود. این فلز به‌آسانی توسط یاخته‌های گیاهان مختلف جذب می‌شود (Lyne et al., 2007). کادمیوم جذب‌شده در ریشه از راه آوند چوبی و از مسیر آپوپلاست به اندام‌های هوایی منتقل می‌شود و همچنین قابلیت حرکت در آوندهای آبکش را دارد (Verret et al., 2004). این فلز سبب ایجاد بسیاری از تغییرپذیری‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی)، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ساختاری در گیاهان می‌شود که می‌توان به کاهش رشد به‌ویژه رشد ریشه، اختلال در جذب آب و در نتیجه تأثیر شدید بر وزن تر و خشک گیاهچه‌ها اشاره کرد (Mishra et al., 2006). در مرحله جوانه‌زنی و سبز شدن، کادمیوم موجب کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص توان، وزن

خشک گیاهچه (Munzuroglu & Geckil, 2002; Aziz Khan et al., 2012) کاهش طول ساقه‌چه (Zhang et al., 2010; Siddhu & Ali Khan, 2012) و ریشه‌چه (Dinakar et al., 2009) می‌شود. همچنین این فلز می‌تواند منجر به ایجاد تنش اکسایشی (اکسیداتیو) و تولید انواع اکسیژن‌های فعال مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل در گیاهان شود. این اکسیژن‌های فعال به‌طورمعمول با ایجاد آسیب‌های غشایی، فرآیندهای مختلف یاخته‌ای را دچار اختلال می‌کنند (Pereira et al., 2002; Zhang et al., 2009). Kiran & Sahin (2006) در نتایج بررسی خود نشان دادند، جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های عدس به‌شدت تحت تأثیر فلز سنگین کادمیوم قرار گرفت و شمار گیاهچه‌های غیرطبیعی در این شرایط افزایش یافت. در بررسی که توسط Egharevba & Omoregie (2010) در مورد تأثیر وجود کادمیوم بر قوه نامیه لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna sinensis*) انجام شد، مشخص شد که درصد جوانه‌زنی و طول ساقه‌چه کاهش یافت. همچنین آنان اظهار کردند که غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم می‌تواند درصد بذرهای زنده را تا حدود ۵۰ درصد کاهش دهد. Thamayanthi et al. (2011) با بررسی تأثیر کادمیوم بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های آهار (*Zinnia elegans*) به این نتیجه رسیدند که در همه سطوح تنش کادمیوم، کاهش جوانه‌زنی و فراسنجه‌های رشد مانند طول ریشه‌چه و ساقه‌چه رخ می‌دهد. بنابراین به‌کار بردن روش‌هایی که بتواند موجب غلبه بر تأثیر منفی تنش‌های محیطی از جمله فلزهای سنگین شده و از جذب آن‌ها توسط گیاه جلوگیری کند، اهمیت بسیاری دارد.

روش‌های چندی برای بهبود جوانه‌زنی و کاهش تأثیر منفی تنش‌های محیطی وجود دارد که یکی از این روش‌ها استفاده از پیش‌تیمار بذر (Seed priming) است که یک روش اقتصادی، ساده و قابل توصیه به کشاورزان برای بهبود جوانه‌زنی، سبز شدن، استقرار گیاهچه‌ها و تولید محصول است (Harris et al., 1999). پیش‌تیمار بذر روشی است که در آن ابتدا بذرهای خیس‌مانده شده و سپس خشکانده می‌شوند، به‌طوری‌که فرآیندهای

جوانه‌زنی آغاز شده، ولی ریشه‌چه از بذر خارج نمی‌شود (Ashraf & Foolad, 2005). هدف از پیش تیمار بذر افزایش سرعت و درصد جوانه‌زنی و سبز شدن و بهبود استقرار گیاهچه‌ها حتی در شرایط نامساعد محیطی است (Ansari et al., 2012). بذرهای پیش تیمار شده نسبت به بذرهای شاهد سریع‌تر جوانه زده و مراحل مختلف زیستی خود را نیز سریع‌تر کامل می‌کنند. به طوری که آسیب وارده در شرایط نامساعد محیطی به بذرهای پیش تیمار شده در حال جوانه‌زنی و گیاهان به دست آمده از آن‌ها، کاهش خواهد یافت (Soltani et al., 2011). پیش تیمار بذر از راه افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده (آنتی‌اکسیدان) مانند کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتیون ریداکتاز و دیگر آنزیم‌ها باعث حذف و غیرفعال شدن انواع فعال اکسیژن می‌شوند (Bailly, 2004). Hus & Sung (1997) در نتایج بررسی خود گزارش کردند که با پیش تیمار کردن بذرهای هندوانه (*Citrullus lanatus*) میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده در بذر افزایش می‌یابد که این آنزیم‌ها پراکسیداسیون لیپیدها را در فرآیند جوانه‌زنی کاهش می‌دهند و در نتیجه باعث افزایش درصد جوانه‌زنی می‌شوند.

در بین روش‌های مختلف پیش تیمار بذر، ساده‌ترین و ارزان‌ترین روش، استفاده از پیش تیمار با آب (Hydropriming) است. در این روش، بذرها بدون استفاده از هیچ ماده شیمیایی و تنها با آب خالص برای مدت‌های معین تیمار می‌شوند (Zhang et al., 2011; Thamayanthi et al., 2010). پیش تیمار بذر با آب از راه کاهش مدت لازم برای جذب آب، موجب بهبود جوانه‌زنی، سبز شدن و استقرار سریع و مطلوب گیاهچه‌ها در دامنه گسترده‌ای از شرایط محیطی می‌شود (Rowse et al., 2001). از سویی پیش تیمار بذر با آب امکان نگهداری را در انبار تا زمان کاشت نسبت به بذرهای تیمار نشده افزایش می‌دهد (Simth & Cobb, 1991). سودمندی اثرگذاری پیش تیمار بذر با آب بر جوانه‌زنی، رشد و استقرار گیاهچه‌های ناشی از بذرهای گندم (*Triticum aestivum*) (Sheikhzadeh mosaddegh et al., 2014)، ذرت (*Zea mays*) (Ashraf & Rauf, 2001)، زیره سبز

(Jabbari et al., 2010) (*Cuminum cyminum* L.) و چاودار کوهی (*Secale montanum*) (Tavakkol Afshari et al., 2012) گزارش شده است. با توجه به اینکه فلزهای سنگین یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی در بوم‌نظام (اکوسیستم)‌های زراعی امروزی به شمار می‌آید، افزون بر اینکه منجر به کاهش رشد و تولید گیاهان شود، می‌تواند سلامت انسان را به خطر انداخته و باعث بروز مسمومیت شود. بنابراین یافتن روش‌های جلوگیری یا کاهش تأثیر زیانبار ناشی از فلزهای سنگین مانند کادمیوم همواره مورد توجه محققان بوده است. بنابراین، این پژوهش به منظور بررسی تأثیر پیش تیمار با آب بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی، رشد و فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای گاوزبان اروپایی در شرایط تنش کادمیوم انجام شد.

### مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیر پیش تیمار با آب بر درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر، رشد گیاهچه‌ها و فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده در گیاهچه‌های گاوزبان اروپایی، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه بذر دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۴ اجرا شد. عامل‌های آزمایش شامل تنش کادمیوم در چهار سطح ( $S_1, S_2, S_3$  و  $S_4$ ): به ترتیب ۰ (شاهد)، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب مقطر) و پیش تیمار با آب در چهار سطح (۰ (شاهد)، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) بود. در آغاز بذرهای به چهار قسمت مساوی تقسیم شد و یک نمونه با رطوبت حدود ۱۰ درصد به عنوان شاهد درون کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۳ تا ۵ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد. سه نمونه دیگر در اتاقک رشد (انکوباتوری) با دمای ۱۰ درجه سلسیوس به مدت‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت درون آب مقطر خیسانده شدند. سپس بذرهای تیمار شده، در دمای آزمایشگاه خشک شد. برای انجام آزمون جوانه‌زنی، در آغاز سه تکرار ۲۵ بذری به طور تصادفی از هر نمونه جدا شد و درون پتری‌دیش به روش روی کاغذ (Top of paper) کشت شدند. سپس

آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز تا زمان استفاده در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Aebi (1984) استفاده شد که بر پایه تجزیه پراکسید هیدروژن توسط این آنزیم استوار است. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. پس از اضافه کردن عصاره، کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر) اندازه‌گیری شد (Alisoltani et al. 2011). از محلول بلانک که شامل همه مواد واکنش به‌جز عصاره آنزیمی بود، برای صفر کردن دستگاه طیف‌سنج نوری استفاده شد. برای سنجش میزان فعالیت این آنزیم از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{Unit/ml enzyme extract} = \frac{(\Delta A_{240\text{nm}})(3)(df)}{(40)(0.03)}$$

در این رابطه، df بیان‌کننده عامل رقیق‌سازی، عدد ۳ نشان‌دهنده حجم محلول موردسنجش برحسب میلی‌لیتر، ۰/۰۵ نشان‌دهنده حجم عصاره آنزیمی، عدد ۴۰ بیان‌کننده ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن و  $\Delta A_{240}$  بیان‌کننده عدد خوانده‌شده توسط طیف‌سنج نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر است. عدد به‌دست‌آمده بیان‌کننده میزان فعالیت آنزیم برحسب هر واحد از آنزیم است.

فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش Chance & Maehly (1955) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم بر پایه تشکیل تتراگایاکول از گایاکول در حضور پراکسید هیدروژن است. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، ۵۰ میکرولیتر گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره یاخته‌ای بود. پس از اضافه کردن عصاره یاخته‌ای، کاهش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی ( $\epsilon=26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) برای تتراگایاکول و با استفاده از رابطه زیر برحسب واحد در میلی‌لیتر عصاره آنزیمی محاسبه شد.

سطوح مختلف تنش کادمیوم ( $S_1, S_2, S_3$  و  $S_4$ ): به ترتیب ۰ (شاهد)، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب مقطر) با استفاده از  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  اعمال شد. برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. پس از این مرحله نمونه‌ها به ژرمیناتوری با دمای ۲۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. شمار بذره‌های جوانه‌زده به‌صورت روزانه تا ده روز شمارش شده و ظهور ریشه‌چه به اندازه ۲ میلی‌متر به‌عنوان معیاری برای جوانه‌زنی بذرها در نظر گرفته شد. پس از پایان مدت جوانه‌زنی، شمار جوانه‌های عادی و غیرعادی و درصد جوانه‌زنی بذرها تعیین شد. برای تعیین سرعت جوانه‌زنی از رابطه زیر استفاده شد (Ellis & Roberts, 1980):

$$\bar{R} = \frac{\sum n}{\sum D.n}$$

در این رابطه  $\bar{R}$  میانگین سرعت جوانه‌زنی، D شمار روزهای سپری‌شده از آغاز آزمایش و n شمار بذره‌های جوانه‌زده در روز مورد نظر است. در پایان آزمون جوانه‌زنی (۱۰ روز)، طول گیاهچه‌های عادی با استفاده از خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. شاخص طولی و شاخص وزنی توان با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (ISTA, 2010):

= شاخص طولی توان (cm)

(میانگین طول گیاهچه) × جوانه‌زنی استاندارد (٪)

= شاخص وزنی توان (mg)

(میانگین وزن خشک گیاهچه) × جوانه‌زنی استاندارد (٪)

برای تهیه عصاره آنزیمی از روش Chang & Koa (1988) استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز حدود ۰/۸ گرم ماده تر گیاهی از هر نمونه درون نیتروژن مایع و با استفاده از هاون چینی به‌طور کامل پودر شده و پس از آن ۶ میلی‌لیتر بافر استخراج (Tris-HCL ۰/۰۵ مولار (pH=7)، ۳  $\text{MgCl}_2$  میلی‌مولار و ۱ EDTA میلی‌مولار) به آن اضافه شد. محلول به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. سپس، محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت

از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب، درصد جوانه‌زنی بذرهای شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، درحالی‌که در این شرایط کاهش درصد جوانه‌زنی در بذرهای پیش‌تیمار شده به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی‌دار نبود. تحت تنش  $S_2$  و  $S_4$  درصد جوانه‌زنی بذرهای پیش‌تیمار شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از بذرهای شاهد به دست آمد. همچنین در این شرایط، بین مدت زمان‌های پیش‌تیمار با آب در این صفت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. کمترین درصد جوانه‌زنی، در شرایط تنش  $S_4$  در بذرهای شاهد به دست آمد (شکل ۱). کاهش جوانه‌زنی می‌تواند به علت تجمع کادمیوم در یاخته و در نتیجه تمایل ترکیبی آن با گروه سولفیدریل پروتئین‌ها بوده و موجب کاهش ساخت (سنتز) و تولید پروتئین‌های ساختمانی و مورد نیاز در فرآیندهای رشد، تقسیم یاخته‌ای و جوانه‌زنی می‌شود (Siddhu & Ali Khan, 2012). در پژوهش انجام شده توسط Egharevba & Omoregie (2010) روی لوبیا چشم‌بلبلی و Kiran & Sahin (2006) روی عدس (*Lens culinaris*) تحت اثر کادمیوم مشخص شد که درصد جوانه‌زنی بذرها به‌شدت تحت تأثیر کادمیوم قرار گرفت و شمار گیاهچه‌های غیرطبیعی در این شرایط افزایش یافت. اما پیش‌تیمار بذرها با آب می‌تواند منجر به افزایش درصد جوانه‌زنی در شرایط بدون تنش ( $S_1$ ) و تنش شدید کادمیوم ( $S_4$ ) شود، جوانه‌زنی سریع، یکنواخت و کامل بذرها، موجب سبز شدن مطلوب و رشد اولیه سریع گیاهچه‌ها می‌شود. رشد اولیه مطلوب نیز منجر به دریافت بیشتر نور خورشید و افزایش عملکرد می‌شود (Rabie & Bayat, 2008).

$$\text{Unit/ml enzyme extract} = \frac{(\Delta A_{470\text{nm}})(3)(\text{df})}{(26.6)(0.03)}$$

که در آن،  $\Delta A_{470}$  میزان جذب خوانده‌شده از هر نمونه توسط طیف‌سنج نوری، سه میزان حجم واکنش، df ضریب رقت که از روش تقسیم حجم نهایی واکنش مورد استفاده یعنی ۳ میلی‌لیتر (۳۰۰۰ میکرو لیتر) بر حجم اولیه عصاره آنزیمی مورد استفاده یعنی ۵۰ میکرو لیتر محاسبه می‌شود،  $26/6$  ضریب خاموشی تراگایاکول و  $0/05$  هم‌حجم عصاره آنزیمی مورد استفاده برحسب میلی‌لیتر است.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری (SAS Ver 9.1) انجام گرفت. عادی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون غیر فراسنجه‌ای کولموگروف-اسمیرنوف و نرم‌افزار آماری SPSS (Ver 16) ارزیابی شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده شد.

## نتایج و بحث

### درصد جوانه‌زنی

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد، درصد جوانه‌زنی، به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح تنش کادمیوم، پیش‌تیمار با آب و نیز اثر متقابل تنش کادمیوم  $\times$  پیش‌تیمار با آب قرار گرفت. در شرایط بدون تنش، میانگین درصد جوانه‌زنی بذرهای پیش‌تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت به‌طور معنی‌داری بیشتر از بذرهای شاهد بود. اما با بذرهای پیش‌تیمار شده به مدت ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (شکل ۱). با افزایش شدت تنش کادمیوم

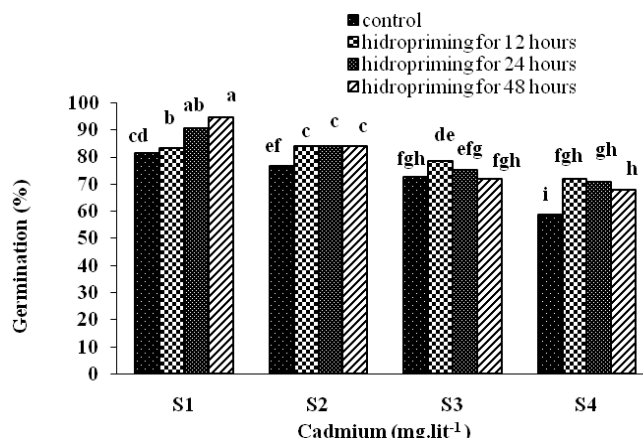
جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر تنش کادمیوم و پیش‌تیمار با آب بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بذرهای گاوزبان اروپایی

Table 1. Analysis of variance of cadmium stress and hydropriming effects on physiological and biochemical traits of borage seeds

S.O.V	df	Mean of Squares							
		Germination percentage	Germination rate	Seedling dry weight	Seedling length	Weight index	Length index	Catalase activity	Peroxidase activity
Cadmium	3	1051.63**	0.8**	$4 \times 10^{-4**}$	50.11**	6913606.26**	576286.06**	0.003**	236.7**
Hidropriming	3	192.97**	0.07**	$1 \times 10^{-3**}$	6.65**	13791630.5**	63219.43**	0.011**	1525.9**
Cadmium $\times$ Hidropriming	9	25.71**	0.006**	$1 \times 10^{-5\text{ns}}$	2.12**	333985.65**	12269.6**	$9 \times 10^{-4**}$	1.8**
Error	32	6.58	0.001	$6 \times 10^{-5}$	0.13	482811.75	1115.5	$2 \times 10^{-7}$	0.6
C.V. (%)		3.27	10.52	9.5	5.92	10.11	6.7	0.75	0.88

ns and \*\*: non significant and significant at 1% level, respectively.

ns و \*\*: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۱. تأثیر مدت پیش تیمار بذر با آب بر درصد جوانه زنی بذرهای گاوزبان اروپایی در شرایط تنش کادمیوم.

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> و S<sub>4</sub>: به ترتیب ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم کادمیوم در لیتر آب.

میانگین‌های دارای دست‌کم یک حرف مشترک، بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 1. The effects of hydropriming duration on the germination of borage seeds under cadmium stress

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> and S<sub>4</sub>: 0, 10, 50 and 100 mg.lit<sup>-1</sup> cadmium, respectively.

Means followed by the same letters are not significantly different ( $p \leq 0.05$ ), at 5% probability level based on Duncan's multiple range.

به مدت ۴۸ ساعت و بذرهای شاهد مشاهده شد (شکل ۲). همچنین با اعمال تنش S<sub>۳</sub> (۵۰ میلی گرم کادمیوم در لیتر آب) سرعت جوانه زنی بذرهای پیش تیمار شده به طور معنی‌داری بیشتر از بذرهای شاهد به دست آمد. در این شرایط بیشترین سرعت جوانه زنی در بذرهای پیش تیمار شده به مدت ۲۴ ساعت به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با بذرهای پیش تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت نداشت (شکل ۲). کمترین سرعت جوانه زنی تحت تنش ۱۰۰ میلی گرم کادمیوم در لیتر آب در بذرهای شاهد به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با بذرهای پیش تیمار شده به مدت ۱۲ ساعت نداشت. همچنین در این شرایط بیشترین سرعت جوانه زنی در بذرهای پیش تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت به دست آمد، اما بین مدت‌های پیش تیمار با آب از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲). در شرایط بدون تنش کادمیوم، پیش تیمار با آب سرعت جوانه زنی بذر را نسبت به شاهد در حدود ۱/۱ تا ۱/۵ برابر افزایش داد. در حالی که این افزایش با اعمال تنش کادمیوم (S<sub>۲</sub> تا S<sub>۴</sub>) در حدود ۱ تا ۲/۲ برابر بود (شکل ۲). این افزایش در نتیجه پیش تیمار با آب به احتمال ناشی از کوتاه کردن مدت زمان لازم برای جذب آب و همچنین افزایش فعالیت سوخت و سازی در فرآیند جذب آب است که این امر

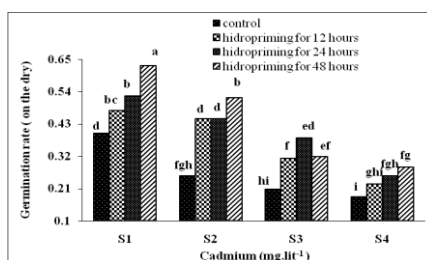
به رغم کاهش درصد جوانه زنی در شرایط تنش کادمیوم، پیش تیمار با آب این اثرگذاری را تا حدی بهبود بخشید. به طوری که پیش تیمار با آب در شرایط تنش شدید کادمیوم (S<sub>۴</sub>) درصد جوانه زنی بذر را در حدود ۱ تا ۱/۵ برابر افزایش داد (شکل ۱). بهبود درصد جوانه زنی در نتیجه اجرای پیش تیمار بذر به احتمال ناشی از فعال شدن سازوکارهای ترمیمی و فرآیندهای سوخت و سازی (متابولیکی) است که در فرآیند جذب آب رخ می‌دهد (Siddhu & Ali Khan, 2012).

#### سرعت جوانه زنی

تأثیر سطوح تنش کادمیوم، پیش تیمار با آب و نیز اثر متقابل تنش × پیش تیمار با آب روی صفت سرعت جوانه زنی معنی‌دار بود (جدول ۱). تنش کادمیوم موجب کاهش سرعت جوانه زنی در بذرهای شاهد و پیش تیمار شده، گردید (شکل ۲). Munzuroglu & Geckil (2002) در بذرهای گندم و Bahmani *et al.* (2012) در بذرهای لوبیا، کاهش سرعت جوانه زنی در اثر کادمیوم را گزارش کردند. در شرایط بدون تنش و اعمال تنش S<sub>۲</sub>، سرعت جوانه زنی بذرهای پیش تیمار شده به طور معنی‌داری بیشتر از بذرهای شاهد به دست آمد به طوری که، بیشترین و کمترین سرعت جوانه زنی به ترتیب در بذرهای پیش تیمار شده

می‌تواند موجب بهبود سرعت رشد گیاهان و افزایش کیفیت و کمیت عملکرد شود ( Sheikhzadeh et al., 2014). افزایش سرعت جوانه‌زنی نتیجه پیش تیمار با آب در بذرهای برنج (*Oryza sativa*) (Simth & Cobb, 1991)، پیاز (Rowse et al., 2001) و گندم (Sivasubramaniam et al., 2001)، زیره سبز (Jabbari et al., 2010) و چاودار کوهی (Tavakkol Afshari et al., 2012) نیز گزارش شده است.

سبب می‌شود، تا بذرهای پیش تیمار شده حتی در شرایط تنش از لحاظ مراحل جوانه‌زنی نسبت به بذرهای شاهد پیشرفته‌تر باشند و سریع جوانه بزنند (Rowse et al., 2001). همچنین آنان گزارش کردند پیش تیمار با آب مؤثرترین روش برای افزایش سرعت جوانه‌زنی بذرهای پیاز (*Allium cepa*) است. افزایش سرعت جوانه‌زنی در نتیجه اعمال پیش تیمار با آب، نمایانگر افزایش توان بذرهای پیش تیمار شده در شرایط بدون تنش و تنش کادمیوم است که این امر



شکل ۲. تأثیر مدت پیش تیمار بذر با آب بر سرعت جوانه‌زنی بذرهای گاوزبان اروپایی در شرایط تنش کادمیوم.

S<sub>۱</sub>, S<sub>۲</sub>, S<sub>۳</sub> و S<sub>۴</sub>: به ترتیب ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب.

میانگین‌های دارای دست‌کم یک حرف مشترک، بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 2. The effects of hydropriming duration on the germination rate of borage seed under cadmium stress.

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> and S<sub>4</sub>: 0, 10, 50 and 100 mg.lit<sup>-1</sup> cadmium, respectively.

Means followed by the same letters are not significantly different ( $p \leq 0.05$ ), at 5% probability level based on Duncan's multiple range.

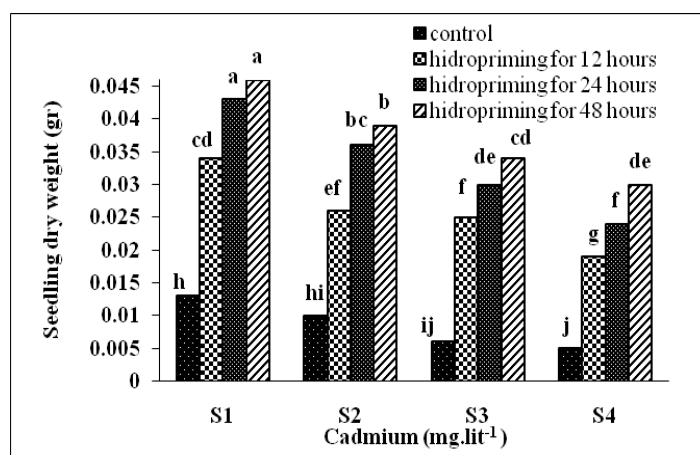
پیش تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بدون تنش به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از بذرهای شاهد و بذرهای پیش تیمار شده به مدت ۱۲ ساعت بود. اما بین مدت‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳). به طوری که در این شرایط، وزن خشک گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای پیش تیمار شده با آب را در حدود ۲/۵ تا ۳/۵ برابر افزایش داد. برتری بذرهای پیش تیمار شده از نظر تولید گیاهچه‌های بزرگ‌تر را می‌توان به سرعت جوانه‌زنی بالاتر نسبت داد. با توجه به اینکه بذرهای پیش تیمار شده سرعت و درصد جوانه‌زنی بالاتری نسبت به بذرهای شاهد داشتند، این امر موجب شد تا در یک زمان معین، سریع جوانه زده و ماده خشک بیشتری نسبت به بذرهای شاهد تولید کنند (Shekari et al., 2009). با اعمال تنش کادمیوم (S<sub>۳</sub> و S<sub>۴</sub>) پیش تیمار بذر با آب سبب شد تا وزن خشک گیاهچه‌ها به طور معنی‌داری افزایش یابد، به طوری که

### وزن خشک گیاهچه

تأثیر تنش کادمیوم، پیش تیمار با آب و اثر متقابل تنش کادمیوم × پیش تیمار با آب روی صفت وزن خشک گیاهچه‌ها معنی‌دار بود (جدول ۱). با افزایش غلظت کادمیوم وزن خشک گیاهچه‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت به طوری که کمترین میانگین وزن خشک گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای گاوزبان اروپایی تحت تنش ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب مشاهده شد که به طور معنی‌داری کمتر از شرایط بدون تنش بود (شکل ۳). این نتایج با یافته‌های Tiryakioğlu et al. (2006) در جو (*Hordeum vulgare*) همخوانی دارد. کاهش وزن خشک گیاهچه‌ها تحت تنش کادمیوم توسط Aziz Khan et al. (2012) روی بذرهای فلفل (*Capsicum annuum* L.) و Thamayanthi et al. (2011) روی بذرهای آهار (*Zinnia elegans*) نیز گزارش شده است. بیشترین میانگین وزن خشک گیاهچه‌ها از بذرهای

گیاهچه شد (شکل ۳). اثر متقابل غلظت‌های مختلف کادمیوم و مدت‌های پیش‌تیمار با آب نشان داد، این پیش‌تیمار باعث افزایش وزن خشک گیاهچه‌های به‌دست‌آمده می‌شود (شکل ۳)، پیش‌تیمار بذر با آب به‌احتمال از راه افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی و در نهایت افزایش وزن خشک گیاهچه نسبت به وزن خشک گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از بذرهای شاهد شده است (Alivand *et al.*, 2011).

در شرایط تنش  $S_2$ ،  $S_3$  و  $S_4$  وزن خشک گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از بذرهای پیش‌تیمار شده نسبت به گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از بذرهای شاهد به ترتیب در حدود ۲/۵ تا ۴ برابر، ۴/۵ تا ۶ برابر و ۴ تا ۶ برابر بیشتر بود. بنابراین، به‌رغم کاهش وزن خشک گیاهچه‌ها در نتیجه اعمال تنش کادمیوم، پیش‌تیمار با آب بذرهای گاوزبان اروپایی موجب کاهش اثرگذاری سوء تنش کادمیوم و حتی افزایش وزن خشک



شکل ۳. تأثیر مدت پیش‌تیمار با آب بر وزن خشک گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از بذرهای گاوزبان اروپایی در شرایط تنش کادمیوم.  $S_1$ ،  $S_2$ ،  $S_3$  و  $S_4$ : به ترتیب ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب.

میانگین‌های دارای دست‌کم یک حرف مشترک، بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 3. The effects of hydropriming duration on the seedling dry weight of borage seed under cadmium stress  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  and  $S_4$ : 0, 10, 50 and 100 mg.lit<sup>-1</sup> cadmium, respectively.

Means followed by the same letters are not significantly different ( $p \leq 0.05$ ), at 5% probability level based on Duncan's multiple range.

اندام‌های هوایی منتقل می‌شود این امر موجب کاهش طول گیاهچه‌های در معرض تنش کادمیوم می‌شود. همچنین دلیل کاهش رشد گیاهچه‌ها در نتیجه تیمار با فلزهای سنگین، می‌تواند در نتیجه کاهش یاخته‌های مریستمی در ناحیه غشای یاخته‌ای و برخی آنزیم‌ها در لپه و یا داندرون (آندوسپرم) باشد که در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک به واسطه فلزهای سنگین، میزان مواد غذایی رسیده به ساقچه و ریشه‌چه‌ها کاهش یافته و در نتیجه طول گیاهچه‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Noorani Azad & Kafilzadeh, 2010). در شرایط تنش ۱۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب، بیشترین طول گیاهچه‌ها از بذرهای پیش‌تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با بذرهای پیش‌تیمار شده

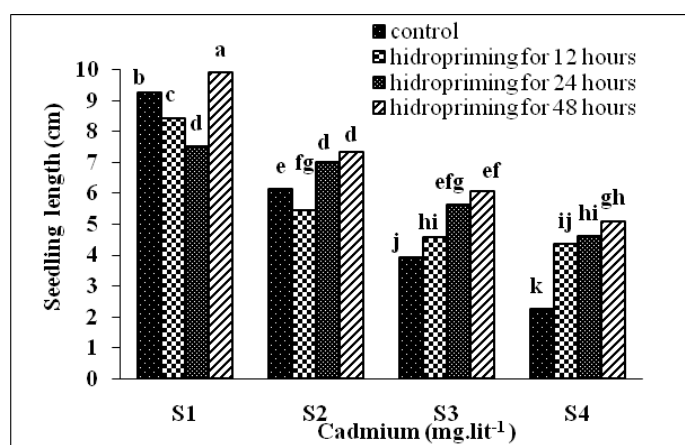
### طول گیاهچه

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که طول گیاهچه‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح تنش کادمیوم، پیش‌تیمار با آب و نیز اثر متقابل تنش کادمیوم  $\times$  پیش‌تیمار با آب قرار گرفت. در شرایط بدون تنش کادمیوم، طول‌ترین گیاهچه‌ها از بذرهای پیش‌تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت به دست آمد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از بذرهای شاهد و دیگر پیش‌تیمارها بود (شکل ۴). با اعمال تنش کادمیوم، طول گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از بذرهای گاوزبان کاهش یافت. کمترین طول گیاهچه‌ها در شرایط تنش ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب مشاهده شد. از آنجایی که محل اولیه تجمع کادمیوم ریشه‌چه بوده و میزانی از آن به



امر به احتمال ناشی از آن است که پیش تیمار بذر با آب از راه کاهش اثر منفی تنش کادمیوم، موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی این بذرها و طولیل شدن گیاهچه‌ها نسبت به گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای شاهد شده است. بنابراین هرچه بذرها سرعت جوانه‌زنی بالاتری داشته باشند، گیاهچه‌های به دست آمده طولیل تر و وزن خشک بیشتری خواهند داشت، که این امر موجب استقرار بهتر و تولید گیاهچه‌های قوی‌تری می‌شود (Shekari *et al.*, 2010).

به مدت ۲۴ ساعت نداشت. اگرچه طول گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای شاهد در شرایط بدون تنش ( $S_1$ ) نسبت به گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای پیش تیمار شده به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت و در شرایط تنش  $S_2$  نسبت به گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای پیش تیمار شده به مدت ۱۲ ساعت بیشتر بود، اما با اعمال تنش ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب ( $S_3$  و  $S_4$ )، طول گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای شاهد به طور معنی‌داری کمتر از بذرهای پیش تیمار شده به دست آمد (شکل ۴) که علت این



شکل ۴. تأثیر پیش تیمار با آب بر طول گیاهچه‌های گاوزبان اروپایی در شرایط تنش کادمیوم.

$S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  و  $S_4$ : به ترتیب ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب.

میانگین‌های دارای دست‌کم یک حرف مشترک، بر پایهٔ آزمون چند دامنه‌ای دانکن از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 4. The effects of hydropriming duration on the seedling length of borage seed under cadmium stress

$S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  and  $S_4$ : 0, 10, 50 and 100 mg.lit<sup>-1</sup> cadmium, respectively.

Means followed by the same letters are not significantly different ( $p \leq 0.05$ ), at 5% probability level based on Duncan's multiple range.

افزایش داشت. به طوری که بیشترین شاخص وزنی مربوط به بذرهای پیش تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت بود. اما، در تیمارهای  $S_2$  و  $S_3$  بین پیش تیمار با آب به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۵). پیش تیمار بذر با آب شاخص وزنی گیاهچه‌های گاوزبان اروپایی را در شرایط بدون تنش در حدود ۳ تا ۴ برابر و در تیمارهای  $S_2$  تا  $S_4$  در حدود ۴ تا ۴/۵ برابر نسبت به گیاهچه‌های به دست آمده از بذر شاهد افزایش داد (شکل ۵).

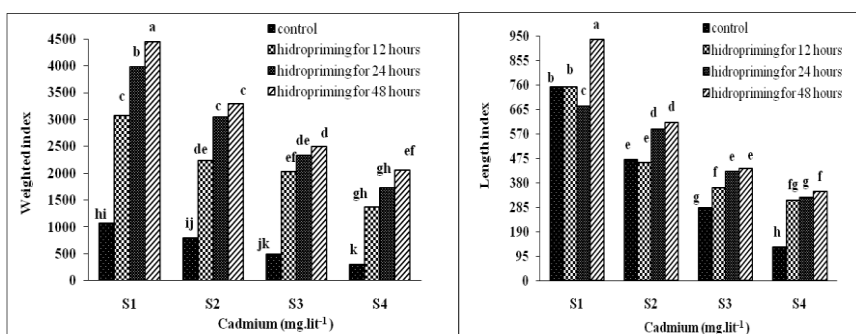
در شرایط بدون تنش کادمیوم، بیشترین شاخص طولی در گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای پیش تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت به دست آمد که

### شاخص وزنی و شاخص طولی

شاخص وزنی و طولی از نظر آماری تحت تأثیر سطوح تنش کادمیوم و پیش تیمار با آب و اثر متقابل سطوح تنش کادمیوم × پیش تیمار با آب قرار گرفت (جدول ۱). همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، با افزایش شدت تنش کادمیوم شاخص وزنی، کاهش یافت. کمترین و بیشترین شاخص وزنی بذرهای گاوزبان اروپایی به ترتیب در شرایط تنش  $S_4$  و شرایط بدون تنش ( $S_1$ ) به دست آمد (شکل ۵). در همهٔ سطوح تنش کادمیوم، شاخص وزنی بذرهای شاهد به طور معنی‌داری کمتر از بذرهای پیش تیمار شده بود. همچنین در این شرایط شاخص وزنی بذرهای پیش تیمار شده با افزایش مدت پیش تیمار بذر با آب،

و S<sub>۴</sub> شاخص طولی بذرهای پیش‌تیمار شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهچه‌های به‌دست آمده از بذرهای شاهد به دست آمد. تأثیر مثبت پیش‌تیمار با آب روی توان بذر لوتوس توسط Artola *et al.* (2003) گزارش شده است. شاخص‌های توان بذر (طولی و وزنی) را می‌توان به‌عنوان صفاتی در نظر گرفت که با توجه به نحوه محاسبه آن‌ها ارزش بیشتری در بررسی‌های جوانه‌زنی دارند و بیش از صفاتی چون وزن یا طول گیاهچه به تنهایی بیانگر شرایط توده بذر هستند. شاخص توان یکی از ویژگی‌های تعیین‌کننده کیفیت بذر است. این شاخص، کیفیت بذر را از راه اثر روی جوانه‌زنی، وزن خشک و طول گیاهچه متأثر می‌کند. گیاهچه‌هایی که شاخص توان بالاتری دارند، تنش‌های محیطی را بهتر تحمل می‌کنند و در نتیجه افزون بر داشتن درصد جوانه‌زنی بالا، گیاهچه‌های قوی و عادی نیز تولید می‌کنند (Rabie & Bayat, 2008).

به‌طور معنی‌داری بیشتر از دیگر گیاهچه‌های به‌دست آمده از بذرهای شاهد (شکل ۵). در این شرایط کمترین شاخص طولی در گیاهچه‌های به‌دست آمده از بذرهای شاهد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با شاخص طولی گیاهچه‌های به‌دست آمده از بذرهای پیش‌تیمار شده به مدت ۱۲ ساعت نداشت. با افزایش شدت تنش کادمیوم شاخص طولی بذرهای گاوزبان کاهش یافت. در گیاهچه‌های به‌دست آمده از بذرهای شاهد کاهش شاخص طولی از S<sub>۱</sub> به S<sub>۴</sub> معنی‌دار بود در حالی که، در بذرهای پیش‌تیمار شده به مدت ۱۲ ساعت کاهش در این صفت از S<sub>۳</sub> به S<sub>۴</sub> معنی‌دار نبود (شکل ۵). در تیمار S<sub>۲</sub> بیشترین شاخص طولی در گیاهچه‌های به‌دست آمده از بذرهای پیش‌تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با گیاهچه‌های به‌دست آمده از بذرهای پیش‌تیمار شده به مدت ۲۴ ساعت نداشت (شکل ۵). اما در شرایط تنش S<sub>۳</sub>



شکل ۵. تأثیر مدت پیش‌تیمار با آب بر شاخص وزنی و طولی گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از بذرهای گاوزبان اروپایی در شرایط تنش کادمیوم.

S<sub>۱</sub>, S<sub>۲</sub>, S<sub>۳</sub> و S<sub>۴</sub>: به ترتیب ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب.

در هر شکل، میانگین‌های دارای دست‌کم یک حرف مشترک، بر پایهٔ آزمون چند دامنه‌ای دانکن از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 5. The effects of hydropriming duration on the weight and length index of seedling borage under cadmium stress.

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> and S<sub>4</sub>: 0, 10, 50 and 100 mg.lit<sup>-1</sup> cadmium, respectively.

In each figure, means followed by the same letters are not significantly different ( $p \leq 0.05$ ), at 5% probability level based on Duncan's multiple range.

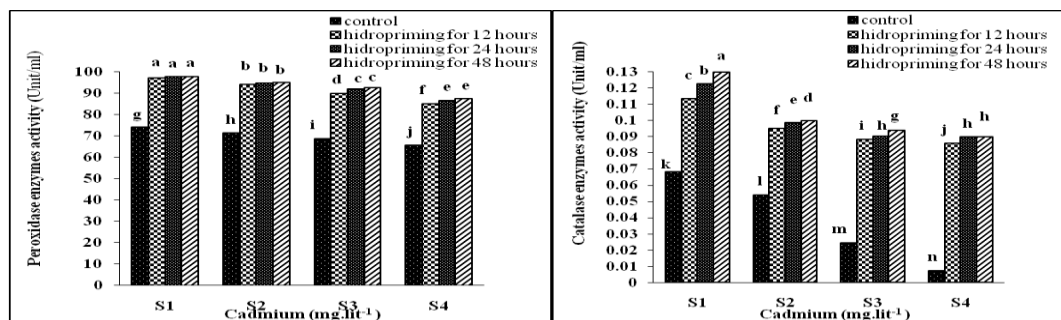
معنی‌داری کاهش پیدا کرد. به‌طوری‌که بیشترین و کمترین میزان فعالیت این آنزیم به‌ترتیب تحت تیمار S<sub>۱</sub> و S<sub>۴</sub> به دست آمد (شکل ۶). در همهٔ سطوح تنش کادمیوم (S<sub>۱</sub>, S<sub>۲</sub>, S<sub>۳</sub> و S<sub>۴</sub>)، میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های به‌دست آمده از بذرهای پیش‌تیمار شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهچه‌های به‌دست آمده از بذرهای شاهد بود (شکل ۶). همچنین

### فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز

بر پایهٔ نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ واریانس داده‌ها (جدول ۱)، فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح تنش کادمیوم، پیش‌تیمار با آب و اثر متقابل تنش کادمیوم × پیش‌تیمار با آب قرار گرفت. با افزایش شدت تنش کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های گاوزبان اروپایی به‌طور

حدود ۳ تا ۳/۵ برابر نسبت به شاهد شد (شکل ۶). کاتالاز آنزیمی است که پراکسید هیدروژن تولید شده در مسیرهای تنفس نوری درون پراکسیزوم‌ها را مهار می‌کند (Mittler, 2002). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز منجر به مهار انواع اکسیژن فعال از جمله پراکسید هیدروژن می‌شود که در تنش کادمیوم تجمع می‌یابد (Zhang *et al.*, 2009). نشان داده شده، کادمیوم باعث القاء نشانه‌های پیری در پراکسیزوم برگ و فعالیت سوخت‌وسازی آن می‌شود (Palma *et al.*, 2002). بنابراین، به نظر می‌رسد که یاخته‌های گیاهی از راه افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده (شامل آنزیم کاتالاز) موجود در پراکسیزوم‌ها به این تغییرات ناشی از کادمیوم پاسخ می‌دهد و به احتمال این پاسخ فیزیولوژیکی گاوزبان در نتیجه پیش تیمار با آب در مقایسه با شرایط بدون پیش تیمار بهبود یافت (شکل ۶).

در این شرایط، با افزایش مدت پیش تیمار بذر با آب، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به طور معنی‌داری افزایش یافت. به طوری که در این شرایط، بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای پیش تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از دیگر تیمارها بود (شکل ۶). در حالی که در شرایط تنش شدید کادمیوم (S<sub>۴</sub>)، بین گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای پیش تیمار شده به مدت‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در شرایط بدون تنش کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای پیش تیمار شده در حدود ۱/۶ تا ۱/۸ برابر بیشتر از گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای شاهد بود. همچنین تحت تیمارهای مختلف کادمیوم، پیش تیمار بذر با آب موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در



شکل ۶. تأثیر مدت پیش تیمار بذر با آب بر فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز گیاهچه‌های گاوزبان اروپایی در شرایط تنش کادمیوم. S<sub>۱</sub>، S<sub>۲</sub>، S<sub>۳</sub> و S<sub>۴</sub>: به ترتیب ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در لیتر آب.

در هر شکل، میانگین‌های دارای دست‌کم یک حرف مشترک، بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند. Figure 6. The effects of hydropriming duration on the Catalase and peroxidase enzymes activity in the borage seedling under cadmium stress.

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> and S<sub>4</sub>: 0, 10, 50 and 100 mg.lit<sup>-1</sup> cadmium, respectively.

In each figure, means followed by the same letters are not significantly different ( $p \leq 0.05$ ), at 5% probability level based on Duncan's multiple range.

فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در نتیجه وجود کادمیوم در گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) را گزارش کردند. کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز همراه با افزایش غلظت کادمیوم، می‌تواند به علت کاهش در میزان پروتئین‌های گیاه در اثر سمیت این فلز و تنش اکسایشی باشد (Vajpaee *et al.*, 2000). افزون بر این، علت کاهش فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده در اثر تنش کادمیوم را می‌توان به تکمیل ظرفیت فعالیت این آنزیم‌ها برای رادیکال‌های آزاد، تأثیر منفی افزایش

بنابر نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) تنش کادمیوم، پیش تیمار بذر با آب و اثر متقابل تنش کادمیوم × پیش تیمار با آب روی فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار بود. با افزایش شدت تنش کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به طور معنی‌داری در گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای گاوزبان کاهش یافت. به طوری که کمترین و بیشترین فعالیت این آنزیم مربوط به تیمارهای S<sub>۱</sub> و S<sub>۴</sub> است. Noorani Azad & Kafilzade (2010) نیز کاهش

پیش تیمار بذر با آب با افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز در شرایط تنش کادمیوم در مقایسه با نبود پیش تیمار موجب افزایش تحمل گیاهچه گاوزبان اروپایی به تنش کادمیوم شده و در نتیجه موجب شده تا بذرها حتی در شرایط تنش کادمیوم جوانه زنی و رشد گیاهچه مطلوب تری نسبت به بذرها شاهد داشته باشند (شکل ۶). Fateh et al. (2009) در نخود (Uonesi et al. (2012) در ارزن مرواریدی (*Pennisetum glaucum*) و Varier et al. (2010) در پنبه نیز گزارش کردند، پیش تیمار بذرها با آب سبب افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز شد.

#### نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد، با افزایش شدت تنش کادمیوم، صفات مورد بررسی کاهش یافت. به نظر می رسد که تنش کادمیوم از راه ایجاد تنش اکسایشی و تولید رادیکال های آزاد موجب کاهش جوانه زنی و رشد گیاهچه های به دست آمده از بذرها گاوزبان اروپایی شده است. با توجه به تأثیر منفی این تنش بر جوانه زنی و رشد گیاهچه های به دست آمده، پیش تیمار با آب از راه کوتاه کردن مدت زمان لازم برای جذب آب و افزایش فعالیت سوخت و سازی مانند افزایش فعالیت آنزیم های پاداکسنده در مرحله جوانه زنی، سبب می شود تا بذرها پیش تیمار شده از لحاظ مراحل جوانه زنی نسبت به بذرها شاهد پیشرفته تر باشند. این امر سبب می شود تا پیش تیمار با آب، بذر از آسیب های کادمیوم کاسته و فرآیند جوانه زنی را در برابر سمیت این فلز سنگین محافظت کند. به عبارتی انجام پیش تیمار بذر با آب در زمان های مختلف و در سطوح مختلف تنش کادمیوم از راه افزایش توان بذر و گیاهچه از تأثیر منفی تنش کادمیوم می کاهد و موجب بهبود ویژگی های جوانه زنی و رشد گیاهچه های به دست آمده، می شود.

تولید رادیکال های  $O_2^-$  و NO در پراکسیزوم ها و همچنین تأثیر منفی احتمالی کادمیوم در تولید این آنزیم ها در غلظت های بالای کادمیوم نسبت داد (Dell et al., 2003; Cakmak, 2000).

در همه سطوح تنش کادمیوم ( $S_1$  تا  $S_4$ )، کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از گیاهچه های به دست آمده از بذرها شاهد به دست آمد که به طور معنی داری کمتر از گیاهچه های به دست آمده از بذرها پیش تیمار شده بود. به طوری که میزان فعالیت این آنزیم در گیاهچه های به دست آمده از بذرها پیش تیمار شده در تیمار  $S_1$  در حدود  $1/3$  برابر و در تیمارهای  $S_2$  تا  $S_4$  در حدود  $2/3$  تا  $2/5$  برابر بیشتر از گیاهچه های به دست آمده از بذرها شاهد بود (شکل ۶). در شرایط بدون تنش و تنش ملایم ( $S_2$ )، فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه های به دست آمده از بذرها پیش تیمار شده به طور معنی داری بیشتر از گیاهچه های به دست آمده از بذرها شاهد به دست آمد. اما بین مدت های پیش تیمار با آب اختلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۶). در شرایط تنش  $S_3$  و  $S_4$  بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در بذرها پیش تیمار شده با آب به مدت ۴۸ ساعت به دست آمد. اما با گیاهچه های به دست آمده از بذرها پیش تیمار شده با آب به مدت ۲۴ ساعت از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشت (شکل ۶). Varier et al. (2010) گزارش کردند که پیش تیمار با آب باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در پنبه (*Gossypium hirsutum*) شد (Schloss et al., 1987). در شرایط تنش های محیطی از جمله تنش ناشی از فلز سنگین کادمیوم، آنزیم های پاداکسنده مانند پراکسیداز و کاتالاز، فعال می شوند که این ترکیب پاداکسندگی، گونه های اکسیژن فعال (ROS) را تجزیه می کنند. افزون بر این، ظرفیت پاداکسندگی گیاهان با تحمل تنش، رابطه مستقیم دارند (Mittler, 2002). به نظر می رسد

#### REFERENCES

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
2. Alisoltani, A., Alizadeh, H., Mahfoozi, S. & Khayalparast, F. (2011). Effect of short and long terms cold acclimation on biochemical characteristics of spring and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Iranian Journal of Crop Science*, 4(2), 108-120. (in Farsi)
3. Alivand, R., Tavakkol Afshari, R. & Sharifzadeh, F. (2011). Effects of gibberellin, salicylic acid, and ascorbic acid on improvement of germination characteristics of deteriorated seeds of *Brassica napus*. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 439, 561-571. (in Farsi)

4. Amani, A. (2008). Cadmium induced changes in pigment content, ion uptake, proline content and phospho enol pyruvate carboxylase activity in *Triticum aestivum* seedlings. *Australian Journal of Science*, 2, 57-62.
5. Ansari, O., Choghazardi, H. R., Sharif Zadeh, F. & Nazarli, H. (2012). Seed reserve utilization and seedling growth of treated seeds of mountain rye (*Secale montanum*) as affected by drought stress. *Cercetări Agronomice în Moldova*, 2(150), 43-48.
6. Artola, A., Carrillo-Castaneda, G. & Santos, G.D.L. (2003). Hydropriming: A strategy to increase *Lotus Corniculatus L.* seed vigor. *Seed Science and Technology*, 31, 455-463.
7. Ashraf, M. & Foolad, M. R. (2005). Pre-sowing seed treatment a shotgun approach to improve germination plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Advances in Agronomy*, 88, 223-271.
8. Ashraf, M. & Rauf, H. (2001). Inducing salt tolerance in maize (*Zea mays L.*) through seed priming with chloride salts: Growth ion transport at early growth stages. *Acta Plant Physiology*, 23, 407-414.
9. Aziz Khan, H., Ziaf, K. H., Amjad, M. & Iqbal, Q. (2012). Exogenous application of polyamine improves germination and early seedling growth of hot pepper. *Childhood Journal Agriculture Research*, 72(3), 429-433.
10. Bahmani, R., Hemati, M., Habibi, D. & Forozesh, P. (2012). Evaluation of germination, root and shoot growth under cadmium stress for different bean genotypes (*Phaseolus Vulgaris L.*). *Journal of Agriculture and Plant Breeding*, 8 (4), 145-154. (in Farsi)
11. Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14, 93- 107.
12. Cakmak, I. (2000). Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist*, 146, 185-205.
13. Chance, B. & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775.
14. Chang, C. J. & Koa, C. H. (1988). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism during sense scence of rice leaves changes in enzyme activities in light and darkness. *Plant Growth Regulation*, 25, 11-15.
15. Dell Rio, L. A., Copas, F. J., Sandali, L. M., Palma, J. M. & Barroso, J. B. (2003). Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life*, 55, 71-81.
16. Dinakar, N., Nagajyothi, P. C. Suresh, S., Damodharam, T. & Suresh, C. (2009). Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductase in *Arachis hypogaea L.* *Journal of Environmental Biology*, 30, 289-294.
17. Egharevba, M. & Omoregie, H. (2010). Effect of cadmium on seed viability of *Vigna unguiculata*. *Ethnobotanical Leaflets*, 14, 413-19.
18. Ellis, R. H. & Roberts, E. H. (1980). Towards a rational basis for testing seed quality. In: P.D. Hebblethwaite (Ed), *Seed production*. (pp. 605-635). Butterworths.
19. Fateh, H., Siosemardeh, A. & Karimpoor1, M. (2009). Effects of seed priming and sowing date on antioxidant enzymes activity and yield of chickpea under dryland condition. *Plant Production Technology*, 2, 1-16. (in Farsi)
20. Harris, D., Joshi, A., Khan, P. A., Gothkar, P. & Sodhi, P. S. (1999). On farm seed priming in semi-arid agriculture: development and evaluation in maize, rice and chickpea in India using participatory methods. *Experiential Agriculture*, 35, 15-29.
21. Hus, J. L. & Sung, J. M. (1997). Antioxidant role of glutathione associated with accelerated aging and hydration of triploid Waremelon seeds. *Physiological plantum*, 100, 967-974.
22. International Seed Testing Association (ISTA). (2010). International rules for seed testing, *Seed vigour testing*, Chapter 15, 1-20.
23. Jabbari, R., Amini Dehghi, M., Ganji Arjenaki, F. & Agahi, K. (2010). How duration and methods of priming may affect the germination of cumin seeds (*Cuminum cyminum L.*). *Journal of agriculture Science*, 4, 23-30. (in Farsi)
24. Kiran, Y. & Sahin, A. (2006). The effects of cadmium on seed germination, root development and mitotic of root tip cells of lentil (*Len culinaris Medik*). *Journal Agriculture Science*, 2(2), 196-200.
25. Lyne, M. A., Kang, Y. J., Sensi, S. L., Perdrizet, G. A. & Hightower, L. E. (2007). Heavy metal ions in normal physiology, toxic stress, and cytoprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113, 159-172.
26. Mishra, S., Srivastava, S. Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V. & Prasad, M. N. V. (2006). Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri L.* *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 25-37.
27. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405-410.
28. Munzuroglu, O. & Geckil, H. (2002). Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 203-213.

29. Noorani Azad, H. & Kafilzadeh, F. (2010). The effect of cadmium toxicity on growth, soluble sugars, photosynthetic pigments and some of enzymes in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Iranian Journal of Biology*, 6, 858-867. (in Farsi)
30. Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I. & Del Río, L. A. (2002). Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 521-530.
31. Pereira, G. J. G., Molina, S. M. G., Lea, P. J. & Zevedo, R. A. (2002). Activity of antioxidant enzymes in response to Cd in *Crotalaria juncea*. *Plant and Soil*, 239, 123-132.
32. Rabie, B. & Bayat, M. (2008). A study of seed germination and seedling growth indices of oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars through seed vigour tests. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 2, 93-104. (in Farsi)
33. Rowse, H. R., Mckee, J. M. T. & Finch-Savage, W. E. (2001). Membrane priming -a method for small samples of high value seeds. *Seed Science and Technology*, 29, 587-597.
34. Salehi Sormagi, M. (2009). *Medicinal plants and herbal medicine*. Vol. 1 (3<sup>rd</sup> ed.). Donyaye taghzieh press (in Farsi)
35. Schloss, P., Walter, C. & Mader, M. (1987). Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 170, 225-229.
36. Sheikhzadeh Mosaddegh, P., Lotfi, M. & Hayati, Y. (2014). The effect of hydropriming on seed germination of wheat cultivars under salt stress. In: *Proceedings of 3th national congress on organic and conventional agriculture*, 20-21 August. Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran, pp. 1-4. (in Farsi)
37. Shekari, F., Baljani, R., Afsahi, J., Kamran, S. & Shekari, F. (2009). Effect of seed priming with salicylic acid on growth characteristics of borage plants (*Borago officinalis*) seedlings. *Agroecology Journal*, 18, 47-53. (in Farsi)
38. Shekari, F., Baljani, R., Saba, J., Afsahi, K. & Shekari, F. (2010). Effect of seed priming with salicylic acid on growth characteristics of borage (*Borago officinalis* L.) plants seedlings. *Journal New Agriculture Sciences*, 6, 47-53.
39. Siddhu, G. & Ali Khan, M. A. (2012). Effects of cadmium on growth and metabolism of *Phaseolus mungo*. *Journal of Environmental Biology*, 33, 173-179.
40. Simth, P. T. & Cobb, B. G. (1991). Physiological and enzymatic activity of pepper seeds during priming. *Plant Physiology*, 82, 433-439.
41. Sivasubramaniam, K., Geetha, R., Sujatha, K., Raja, K., Sripunitha, A. & Selvarani, R. (2011). Seed Priming: Triumphs and Tribulations. *Madras Agriculture Journal*, 98 (7-9), 197-209.
42. Soltani, A., Aliade, A., Mahfuzi, H., & Khialparast, F. (2011). Effect of short and long terms cold acclimation on biochemical characteristics of spring and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Iranian Journal of Crop Science*, 4, 108-120. (in Farsi)
43. Tavakkol Afshari, R., Ansari, O., Sharifzade, F. & Shayanfar, A. (2012). The role of priming on seed reserve utilization and germination of mountain rye (*Secale montanum*) seeds under salinity stress. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 2, 181-189. (in Farsi)
44. Thamayanthi, D., Sharavanan, P. S. & Vijayaragavan, M. (2011). Effect of cadmium on seed germination, growth and pigments content of Zinnia plant. *Current Botani*, 2, 8-13.
45. Tiryakioglu, M., Eker, S., Ozkutlu, F., Husted, S. & Cakmak, I. (2006). Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20, 181-189.
46. Unesi, E., Bahari, A., Azadi, M. & Ansari, O. (2012). The effect of priming and aging worn on the index millet seed germination and catalase in seed *Panicum Miliaceum*. *Seed research*, 3(4), 61-70. (in Farsi)
47. Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Ali, M. B. & Singh, S. N. (2000). Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content of *Nymphaea alba*. *Chemosphere*, 41, 1075-1082.
48. Varier, A., Kuriakose, A. & Dadlani, M. (2010). The subcellular basis of seed priming. *Current Science*, 99 (4), 450-456.
49. Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A. & Richaud, P. (2004). Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett*, 576, 306-312.
50. Zhang, F. Q., Zhang, H. X. & Wang, G. P. (2009). Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolusaureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 76-84.
51. Zhang, X., Fan, X., Li, C. H. & Nan, Z. H. (2010). Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidant enzymes in *Achnatherum neobriens* plants infected with a Neotyphodi-umendophyte. *Plant Growth Regulatory*, 60, 91-97.