

ارزیابی تغییر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی حاصل از تعامل علف‌کش تریفلورالین و همزیستی میکوریزی با قارچ *Glomus versiforme* در گیاه آفتابگردان (رقم لاکومکا)

هانیه مرادیگی و جلیل خارا*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

تأثیر غلظت‌های مختلف علف‌کش تریفلورالین بر روی خصوصیات فیزیولوژیک و میزان رشد ریشه و اندام هوایی، محتوای پروتئین کل، پرولین و اسیدهای آمینه آزاد در گیاهان آفتابگردان تلقیح شده با قارچ میکوریز *Glomus versiforme* و گیاهان غیرمیکوریزی در شرایط گلخانه‌ای مطالعه شد. در این مطالعه، ۶ غلظت متفاوت (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ ppm) از تریفلورالین استفاده شد. نتایج به دست آمده در گیاهان ۵ هفته‌ای نشان می‌دهد که در گیاهان تیمار شده با علف‌کش، طول ریشه و ساقه، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی و ریشه کاهش یافته است، که این کاهش در غلظت‌های بالای علف‌کش (۱۵، ۲۰، ۲۵ ppm) معنی‌دار است. جلوگیری از رشد در گیاهان میکوریزی نیز مشاهده می‌شود، ولی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی کمتر است. با افزایش غلظت علف‌کش محتوای پروتئین کل در ریشه و اندام هوایی کاهش یافته است. ریشه‌های گیاهان میکوریزی از محتوای پروتئین کمتری در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی برخوردارند. با افزایش غلظت علف‌کش، محتوای پرولین و اسیدهای آمینه آزاد در ریشه و اندام هوایی افزایش یافته است. طبق این نتایج، پیشنهاد می‌شود که قارچ میکوریزای آربوسکولار می‌تواند در تحمل سمیت تریفلورالین به گیاه زراعی آفتابگردان کمک کند.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، اسیدهای آمینه آزاد، پروتئین کل، علف‌کش تریفلورالین، میکوریز

مقدمه

گیاهان از فعالیت‌های انسان جلوگیری کرده، از طریق رقابت با گیاهان زراعی باعث کاهش عملکرد گیاه می‌گردند. یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل این گیاهان، کنترل شیمیایی آنها به وسیله علف‌کش‌هاست

علف‌های هرز با رشد خود امکان استفاده از مکان، فضا و زمان را از گیاه زراعی می‌گیرند. نیاز به کنترل علف‌های هرز زمانی بیشتر احساس می‌شود که این

انتخابی بودن علف‌کش‌ها ارائه دهد. هدف از انجام این تحقیق، شناسایی تأثیر این علف‌کش بر رشد و میزان پروتئین کل، پرولین و اسیدهای آمینه آزاد در گیاهان آفتابگردان تلقیح شده با قارچ میکوریز و گیاهان غیرمیکوریزی است، تا به کمک آن بتوان غلظت مؤثری از علف‌کش را یافت که علی‌رغم کنترل مناسب علف‌های هرز، تأثیر فیتو‌توکسیک بر گیاه آفتابگردان نداشته باشد.

مواد و روش‌ها

به منظور تهیه مایه تلقیح، به یک گلدان حدود ۲۰۰ گرم مایه تلقیح قارچ *Glomus versiforme* اضافه گردید و از گیاه ذرت (*Zea mays* L.) به عنوان گیاه میزبان استفاده شد. بذره‌های ذرت پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، با آب مقطر شسته شدند. اتاقک کشت با دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای شبانه روزی به ترتیب ۲۰ و ۳۲ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد. تمام گلدان‌ها پس از هفته سوم با استفاده از محلول غذایی Rorison تغذیه شدند، که میزان فسفر محلول غذایی برای ترغیب همزیستی نصف شد (Aliasgharzad *et al.*, 2009). محلول غذایی ۳ روز در هفته و به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر به هر گلدان داده شد. گیاهان ذرت پس از ۱۰ هفته برداشت شدند. مایه تلقیح شامل قطعات ریز ریشه ذرت همزیست حاوی ریشه‌ها، وزیکول‌ها و آربوسکول‌ها، اسپوره‌های قارچ و قطعات ریز ماسه چسبیده به آنها بود.

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی، با ۶ سطح غلظت تریفلورالین (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ ppm)

(کاب، ۱۳۷۸). در حال حاضر در کشاورزی مدرن به کارگیری علف‌کش‌ها امری رایج است. استفاده از علف‌کش‌های پیش‌رویشی نسبتاً موفقیت‌آمیز است. تریفلورالین (ترفلان) از جمله علف‌کش‌هایی است که در خاک و قبل از کاشت مصرف می‌شود و جزو خانواده دی‌نیتروآنیلین‌ها بوده، از تقسیم سلولی و طویل شدن سلول‌ها جلوگیری می‌کند؛ برای نخستین بار در سال ۱۹۶۳ از آن برای کنترل طیف وسیعی از علف‌های هرز پهن برگ و علف‌های هرز خانواده گرامینه در مزارع سویا، پنبه و آفتابگردان استفاده شد (Spencer and Cliath, 1974). این علف‌کش‌ها جزو علف‌کش‌های مهارکننده تقسیم میتوز محسوب می‌شوند و با اتصال به پروتئین توبولین در ساختمان میکروتوبول‌ها، باعث مهار تقسیم سلولی شده و از تشکیل دیواره سلولی جلوگیری می‌کنند (Hess and Bayer, 1974).

مطالعات نشان می‌دهد که مهار تقسیم میتوز توسط علف‌کش می‌تواند باعث کاهش سنتز DNA، RNA و پروتئین شود (Morland *et al.*, 1968). بر اساس مطالعات Arienes و همکاران (۱۹۹۳) میزان پروتئین در گیاهان شبدر میکوریزی افزایش می‌یابد. پرولین دارای توانایی حفظ و موازنه پروتئین‌ها و پایداری DNA و غشاست (Amutha *et al.*, 2007). همچنین، میزان اسیدهای آمینه آزاد در ریشه، لپه‌ها و محور زیرلپه گیاهان خربزه تحت تیمار تریفلورالین افزایش می‌یابد (Starratt and Lazarovits, 1999).

شناخت چگونگی تأثیر این علف‌کش روی رشد و خصوصیات فیزیولوژیک گیاهان آفتابگردان و تعیین غلظت مؤثر آن می‌تواند دیدگاه وسیعی در مورد علل

کمپلکس رنگی ایجاد می‌کند. در نهایت، شدت رنگ به وسیله اسپکتروفتومتر و در طول موج ۶۶۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

برای تعیین میزان پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. ۰/۵ گرم بافت تر برگ همراه با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد ساییده شد. به ۲ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده، ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین اضافه شد و مخلوط حاصل پس از قرار گرفتن در بن‌ماری جوشان و ظهور رنگ آجری در داخل آب-یخ قرار داده شد و ۴ میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه گردید. میزان جذب فاز رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری محتوای آمینواسیدهای آزاد از روش Xiong و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. ۰/۵ گرم از بافت تر برگ‌ها با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۱۰ درصد ساییده شد و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از صاف نمودن هموژنات با کاغذ صافی، برای تعیین اسیدهای آمینه آزاد ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده، برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر بافر استیک اسید-استات سدیم، ۳ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۰/۱ میلی‌لیتر آسکوربیک اسید ۳ درصد اضافه شد. محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰°C قرار گرفت. پس از سرد شدن، حجم محلول فوق با اتانول ۶۰ درصد به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

در ۳ تکرار انجام شد. بذرهاى آفتابگردان رقم لاکومکا که از مرکز تحقیقات کشاورزی ارومیه تهیه شده بود، با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی شد. درون هر گلدان مخلوط خاک و ماسه شسته و استریل شده که به نسبت ۵:۱ مخلوط شده بودند، ریخته شد. در حدود ۲۰ گرم مایه تلقیح به هر گلدان اضافه گردید. برای آماده‌سازی تیمارهای غیرمیکوریزی، از مایه تلقیح سترون شده استفاده شد. بذرهاى آفتابگردان با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. سپس علف‌کش تریفلورالین در غلظت‌های مختلف، ۲ روز قبل از کاشت به گلدان‌ها اضافه شد. گلدان‌ها به اتاقک‌های رشد با دمای شبانه‌روزی ۲۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۶۰ تا ۷۰ درصد و طول دوره روشنایی ۱۴ ساعت انتقال داده شدند. طول دوره رشد ۵ هفته در نظر گرفته شد که طی این مدت گلدان‌ها با محلول غذایی ۱/۲ هوگلد به صورت یک روز در میان تغذیه شدند. پس از پایان این مدت، اندام هوایی و ریشه گیاهان از هم جدا و بررسی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک روی آنها انجام شد.

وزن تر ریشه و اندام هوایی با استفاده از ترازو با دقت سه رقم اعشار اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک ریشه‌ها و اندام هوایی، گیاهان به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد در آون قرار داده شدند. سپس وزن خشک این نمونه‌ها با ترازو اندازه‌گیری شد. برای تعیین پروتئین کل از روش فولن لوری استفاده شد (Lowry et al., 1951). این آزمایش بر اساس هیدرولیز پروتئین‌ها و آزاد شدن اسیدهای آمینه موجود در ساختمان پروتئین‌هاست که با معرف فولن،

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که بر اثر افزایش غلظت علف‌کش تریفلورالین، طول اندام هوایی و ریشه در گیاهان غیرمیکوریزی و گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز کاهش می‌یابد. به طور کلی، کاهش طول ریشه و اندام هوایی در گیاهان میکوریزی کمتر از گیاهان شاهد است. در گیاهان همزیست با قارچ *G. versiforme* میزان کاهش طول اندام هوایی ۵۶٪ و در گیاهان فاقد قارچ این کاهش در حدود ۶۱٪ است. نتایج نشان می‌دهند که بین گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز و گیاهان شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ وجود دارد (شکل‌های ۱ و ۲)؛ به طوری که در غلظت ۲۵ ppm، طول اندام هوایی و ریشه در گیاهان میکوریزی، به ترتیب ۳۴٪ و ۷۹٪ بیشتر از گیاهان شاهد (بدون قارچ) است.

تیمار علف‌کش، باعث کاهش معنی‌دار وزن تر اندام هوایی و ریشه در گیاهان میکوریزی و در گیاهان غیرمیکوریزی می‌شود. آنالیز آماری داده‌های مربوط به وزن تر اندام هوایی و ریشه نشان می‌دهد که بین گیاهان تیمار شده با قارچ *G. versiforme* و گیاهان شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ وجود دارد (شکل‌های ۳ و ۴). در غلظت ۲۵ ppm، وزن تر اندام هوایی و ریشه در گیاهان میکوریزی به ترتیب ۷۲٪ و ۷۷٪ و در گیاهان غیرمیکوریزی ۷۸٪ و ۷۹٪ کاهش می‌یابد.

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که بر اثر افزایش غلظت علف‌کش تریفلورالین، وزن خشک اندام هوایی و ریشه در گیاهان غیرمیکوریزی و در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. گیاهان میکوریزی از وزن

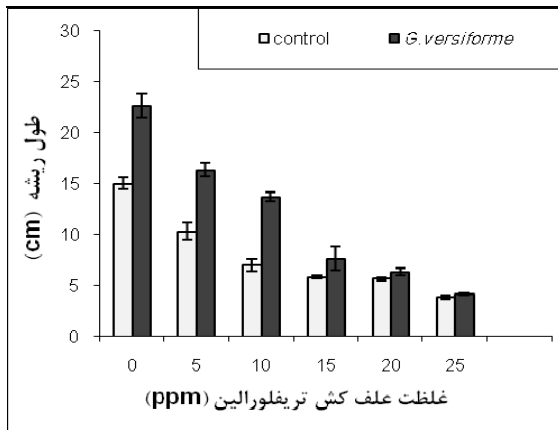
خشک ریشه و ساقه بیشتری در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی برخوردارند. بررسی داده‌های مربوط به وزن خشک ساقه و ریشه اختلاف معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ بین گیاهان آفتابگردان همزیست با *G. versiforme* و گیاهان شاهد نشان می‌دهند (شکل‌های ۵ و ۶).

آنالیز آماری داده‌های مربوط به محتوای پروتئین کل نشان می‌دهد که با افزایش غلظت تریفلورالین، محتوای پروتئین کل اندام هوایی و ریشه، هم در گیاهان غیرمیکوریزی و هم در گیاهان همزیست با قارچ میکوریز، در غلظت ۱۵ ppm افزایش و سپس در غلظت ۲۵ ppm کاهش می‌یابد (شکل‌های ۷ و ۸). محتوای پروتئینی اندام هوایی در گیاهان تلقیح شده با قارچ نسبت به گیاهان شاهد غیرمیکوریزی بیشتر است. آنالیز آماری داده‌های مربوطه نشان می‌دهد که بین گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح شده با قارچ *G. versiforme* اختلاف معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ در محتوای پروتئین کل اندام هوایی و ریشه وجود دارد.

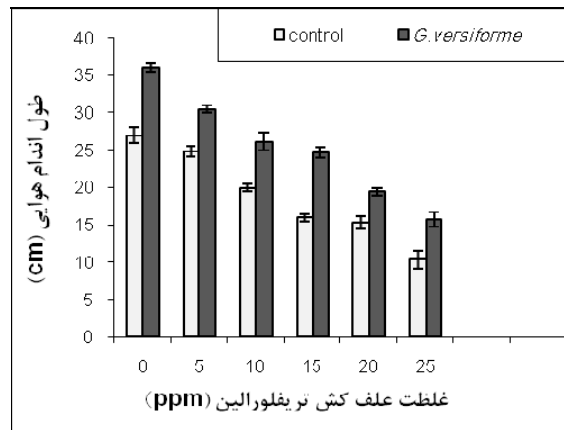
آنالیز آماری داده‌ها، افزایش محتوای پرولین را در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز و گیاهان غیرمیکوریزی، همراه با افزایش غلظت تریفلورالین نشان می‌دهد، که این تفاوت بین سطوح غلظت، در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۹). گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز، از محتوای پرولین کمتری نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی برخوردارند. آنالیز آماری داده‌های مربوط به محتوای پرولین، اختلاف معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ بین گیاهان شاهد و گیاهان همزیست با قارچ میکوریز *G. versiforme* نشان می‌دهد.

داده‌های مربوط به محتوای آمینو اسیدهای آزاد اختلاف معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ بین گیاهان شاهد و گیاهان همزیست با قارچ میکوریز *G. versiforme* نشان نمی‌دهد.

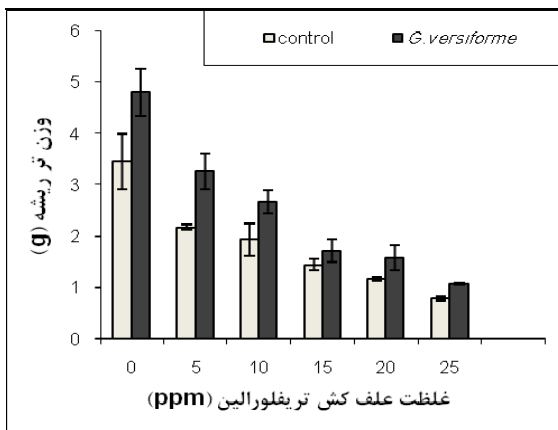
آنالیز آماری داده‌ها، افزایش محتوای اسیدهای آمینه آزاد را در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز و گیاهان غیرمیکوریزی، همراه با افزایش غلظت تریفلورالین نشان می‌دهد، که این تفاوت بین سطوح غلظت، در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۱۰). آنالیز آماری



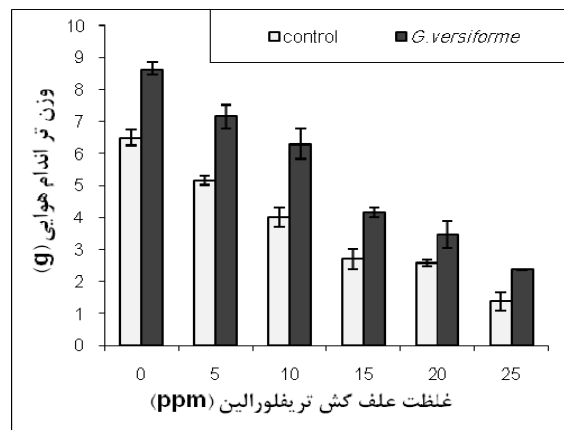
شکل ۲- تغییرات طول ریشه گیاهان آفتابگردان غیرمیکوریزی و میکوریزی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE است.



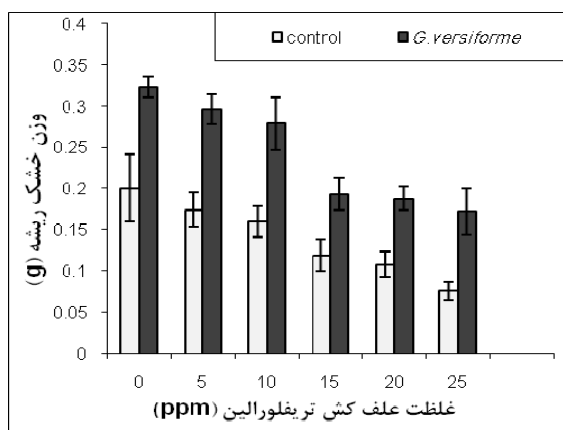
شکل ۱- تغییرات طول اندام هوایی گیاهان آفتابگردان غیرمیکوریزی و میکوریزی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE است.



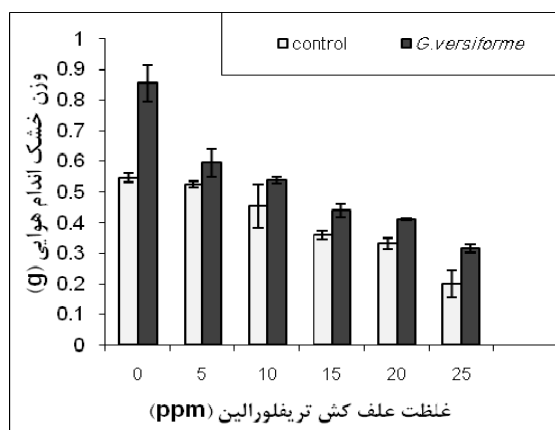
شکل ۴- تغییرات وزن تر ریشه گیاهان آفتابگردان غیرمیکوریزی و میکوریزی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE است.



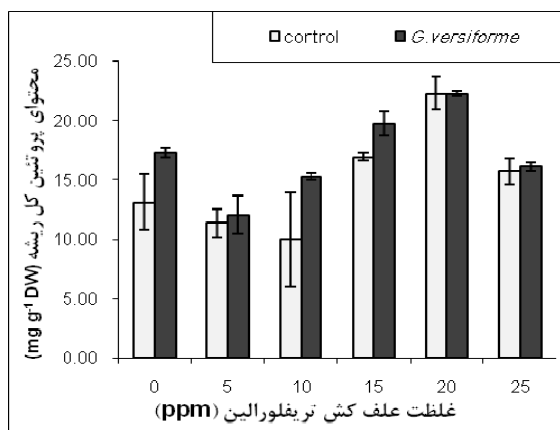
شکل ۳- تغییرات وزن تر اندام هوایی گیاهان آفتابگردان غیرمیکوریزی و میکوریزی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE است.



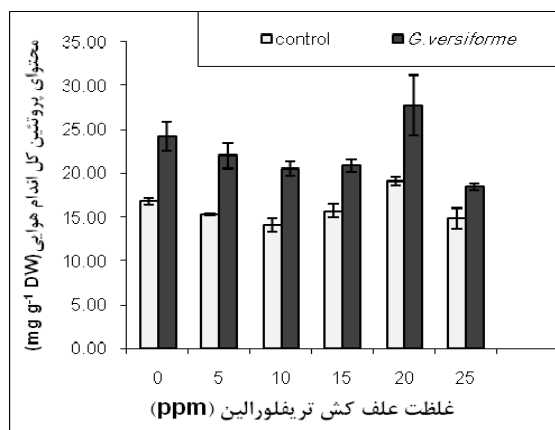
شکل ۶- تغییرات وزن خشک ریشه گیاهان آفتابگردان غیرمیکوریزی و میکوریزی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE است.



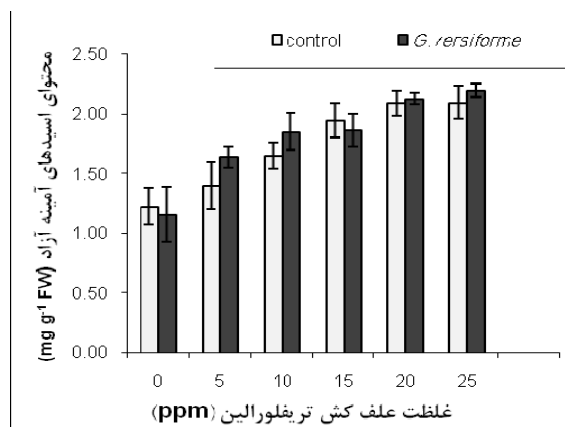
شکل ۵- تغییرات وزن خشک اندام گیاهان آفتابگردان غیرمیکوریزی و میکوریزی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE است.



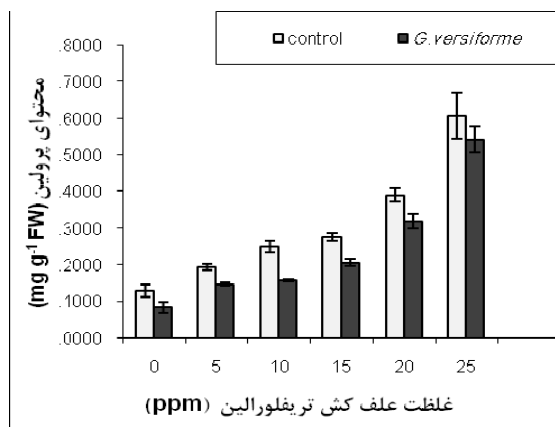
شکل ۸- تغییرات محتوای پروتئین کل ریشه گیاهان آفتابگردان غیرمیکوریزی و میکوریزی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE است.



شکل ۷- تغییرات محتوای پروتئین کل اندام هوایی گیاهان آفتابگردان غیرمیکوریزی و میکوریزی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE است.



شکل ۱۰- تغییرات اسیدهای آمینه آزاد گیاهان آفتابگردان غیرمیکوریزی و میکوریزی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE است.



شکل ۹- تغییرات محتوای پرولین گیاهان آفتابگردان غیرمیکوریزی و میکوریزی در غلظت‌های مختلف تریفلورالین. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE است.

نتیجه‌گیری و بحث

با توجه به نتایج به دست آمده، مشاهده شد که علف‌کش تریفلورالین باعث کاهش طول ریشه و اندام هوایی می‌شود (شکل‌های ۱ و ۲). بررسی‌ها نشان می‌دهند که مکانیسم عمل علف‌کش تریفلورالین، مهار تقسیم سلولی و جلوگیری از طویل شدن سلول‌ها در ناحیه مریستمی ریشه است. کاهش تقسیم سلولی باعث کاهش رشد ریشه و به دنبال آن موجب کاهش رشد اندام هوایی بر اثر کاهش جذب مواد غذایی می‌شود (Kust and Struckmeyer, 1971). مطالعات نشان داده‌اند که تیمار تریفلورالین، باعث مهار طویل شدن ریشه در گیاهان ذرت و گندم می‌شود (Lignowski and Scott, 1971). تریفلورالین و اوریزالین (هر دو از خانواده علف‌کش‌های دی‌نیتروآنیلین) به زیر واحدهای پروتئین توبولین متصل شده و کمپلکس توبولین- علف‌کش از پلیمریزه شدن میکروتوبول‌ها جلوگیری می‌کند. این امر به نوبه خود باعث اختلال در مرحله متافاز تقسیم میتوز می‌شود (Hess and Bayer, 1974). Amato و همکاران (۱۹۶۵) گزارش کردند که در گیاهان ذرت و پنبه تیمار شده با علف‌کش، تقسیم میتوز دچار اختلال می‌شود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهند که عموماً کاهش طول ریشه و ساقه در گیاهان میکوریزی کمتر از گیاهان شاهد است (شکل‌های ۱ و ۲). بنابراین، می‌توان رشد بهتر گیاهان میکوریزی را به بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه و دسترسی آن به عناصر غذایی از جمله فسفر مربوط دانست (Horst, 2004). افزایش جذب فسفر توسط قارچ میکوریز می‌تواند باعث افزایش سنتز ترکیبات کربنی در گیاه شود و همین امر به بهبود رشد گیاه کمک می‌کند. مطالعاتی

که توسط Allen و همکاران (۱۹۸۲) روی تغییرات هورمون‌های گیاهی در گیاهان میکوریزی صورت گرفت، نشان می‌دهند که محتوای هورمون جیبرلین در گیاهان میکوریزی افزایش پیدا می‌کند که این امر می‌تواند تا حدودی در بهبود وضعیت رشد گیاه تأثیری مثبت داشته باشد.

تیمار علف‌کش باعث کاهش وزن خشک ریشه و اندام هوایی هم در گیاهان غیرمیکوریزی و هم در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز می‌شود. با بررسی آماری داده‌های مربوط به وزن خشک اندام هوایی و ریشه، در مقایسه بین گیاهان تیمار شده با گونه قارچی و گیاهان غیرمیکوریزی تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود (شکل‌های ۵ و ۶). در همین راستا، می‌توان به کاهش جذب برخی عناصر ضروری توسط ریشه گیاهان اشاره کرد. علف‌کش تریفلورالین با اختلال در رشد ریشه‌های جانبی، سرعت جابه‌جایی یا جذب سطحی عناصر غذایی ضروری، از جمله نیتروژن، فسفر و گوگرد را کاهش می‌دهد و باعث ایجاد عدم تعادل در مواد معدنی گیاه می‌شود (Marenco and Lopes, 1994). این عوامل به نوبه خود باعث کاهش رشد و به دنبال آن کاهش توده زنده گیاه می‌شوند. همچنین، وزن خشک اندام هوایی و ریشه در گیاهان ۴ هفته‌ای سویا، تحت تیمار علف‌کش تریفلورالین کاهش می‌یابد (Kust and Struckmeyer, 1971). این کاهش رشد ممکن است ناشی از تأثیر مستقیم تریفلورالین بر تقسیم سلولی (Duke, 1990) و جذب و انتقال مواد غذایی باشد (Kust and Struckmeyer, 1971). تریفلورالین ممکن است اثر مهارکنندگی مستقیم و غیرمستقیم، بر روی فرآیندهای ضروری مانند سنتز پروتئین یا RNA

غیرمیکوریزی، در غلظت‌های متوسط علف‌کش افزایش و سپس در غلظت ۲۵ ppm کاهش می‌یابد (شکل‌های ۷ و ۸). کاهش محتوای پروتئین کل، می‌تواند به علت مهار سنتز اسیدهای نوکلئیک (RNA و DNA) در گیاهان تحت تیمار علف‌کش تریفلورالین باشد، که این امر باعث مهار سنتز پروتئین در این گیاهان می‌شود (Schultz *et al.*, 1968). همچنین، Moreland و همکاران (۱۹۶۹) بیان کردند که مهار تقسیم میتوز توسط علف‌کش، می‌تواند باعث کاهش سنتز RNA، DNA و پروتئین شود. Durgesha (۱۹۹۳) گزارش کرد که ساخت پروتئین ۲۴ ساعت پس از تیمار با فلوکلورالین در گیاه *Arachis hypogaea* L. تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد. در این مطالعه پس از تیمار فلوکلورالین محتوای اسیدهای آمینه آلانین، گلیسین و والین به شدت کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد کاهش این اسیدهای آمینه می‌تواند مقدمه‌ای برای کاهش سنتز پروتئین باشد. در حضور علف‌کش فلوکلورالین انباشتگی آمونیاک در ریشه و برگ‌ها به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، این نتایج نشان می‌دهند که الحاق آمونیاک به ساختار ترکیبات آلی از طریق بیوسنتز اسیدهای آمینه و همچنین سنتز پروتئین، مهار می‌شود. از آنجایی که این علف‌کش باعث کاهش جذب مواد غذایی از جمله ازت می‌شود، به نظر می‌رسد یکی از دلایل کاهش ساخت پروتئین، ممانعت از تشکیل اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک، در نتیجه کمبود عنصر ازت باشد. افزایش محتوای پروتئین کل، می‌تواند به علت افزایش سنتز بعضی آنزیم‌ها، از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و همچنین، سنتز پروتئین‌های درگیر در سیستم دفاعی سلول باشد

که در بزرگ شدن سلول نقش دارند، داشته باشد (Nooden and Thimann, 1963). Lang و Nitsan (۱۹۶۶) گزارش کردند که بزرگ شدن سلول در برخی از بافت‌های گیاهی، به ساخت DNA وابسته است. مطالعاتی که روی گیاه ذرت انجام شده، اثر مهارکنندگی تریفلورالین بر سنتز RNA، DNA و پروتئین در نوک ریشه این گیاه را تأیید می‌کنند (Schultz *et al.*, 1968). Demir (۲۰۰۴) گزارش کرد که وزن خشک گیاه فلفل همزیست با قارچ میکوریز *G. intraradices* از گیاهان غیرمیکوریزی بیشتر بوده است.

در گیاهان گندم تلقیح شده با دو گونه قارچ *G. etunicatum* و *G. mosseae*، میزان رشد گیاه تحت تنش خشکی افزایش یافته است (Al-Karaki *et al.*, 2004). در مواردی که گیاهان میکوریزی از وزن خشک بیشتری برخوردارند، تأثیرات مثبت میکوریزی شدن را می‌توان به بهبود جذب عناصر ضروری بخصوص عنصر فسفر توسط قارچ‌های همزیست نسبت داد (Chen *et al.*, 2003). مطالعات زیادی نیز افزایش جذب فسفر و تأثیرات مثبت آن توسط قارچ را به جذب فعال فسفر از خاک و فعالیت ریشه‌های خارج ریشه‌ای قارچ و انتقال آن به گیاه نسبت داده‌اند (Vogel-Mikus *et al.*, 2005). افزایش فسفر ممکن است توده زنده گیاه را افزایش و بنابراین، احتمالاً آثار سمی علف‌کش را به وسیله رقیق کردن، ته‌نشین کردن یا جذب سطحی روی گرانول‌های پلی فسفات کاهش دهد.

در این بررسی، میزان پروتئین کل ریشه و اندام هوایی در گیاهان آفتابگردان میکوریزی و

در دیواره سلولی گیاه بادام زمینی شده است (Durgesha, 1993). در این مطالعه، افزایش بارزی در محتوای اسیدهای آمینه آسپارتیک اسید، آسپارژین، گلوتامیک اسید و گلوتامین در ریشه و برگ‌های گیاه بادام زمینی مشاهده شد. گلوتامیک اسید، اولین اسید آمینه‌ای است که در فرآیند آمیناسیون تشکیل می‌شود (Nilsson, 1977) و می‌تواند پیش‌ماده تولید اسیدهای آمینه دیگر از جمله پرولین (Morris *et al.*, 1969) و آرژینین (Dougall and Fulton, 1967) باشد. مطالعات گذشته نشان داده‌اند تیمار علف‌کش کلروسولفورون، محتوای پرولین را در گیاهان نخود فرنگی و باقلا به شدت افزایش داده است؛ در حالی که علف‌کش‌های تریالات و نورفلورازون کمتر تأثیرگذار بوده‌اند (Fayez and Kristen, 1996). فلومیوکسازین از جمله علف‌کش‌هایی است که در خاک به کار برده می‌شود. سمیت ناشی از کاربرد آن باعث تجمع اسیدهای آمینه آزاد از جمله پرولین و به موازات آن کاهش پروتئین کل در گیاه *Vitis vinifera* L. می‌شود. پیشنهاد شده است که کاربرد این علف‌کش باعث القای تنش در این گیاهان و در نهایت، به پروتئولیز در برگ‌ها منجر می‌شود (Saladin *et al.*, 2003).

مهمترین عملکرد پرولین در گیاهان تحت تنش، خاصیت اسمولیت آن است که باعث تعادل وضعیت آبی بافت می‌شود. پرولین دارای توانایی حفظ و موازنه پروتئین‌ها و پایداری DNA و غشاست (Amutha *et al.*, 2007). چندین عملکرد فیزیولوژیک احتمالی به انباشته شدن پرولین نسبت داده می‌شود. تنظیم اسمزی، تأمین نیتروژن و انرژی و درک تنش‌ها جزو این عملکردها محسوب می‌شوند. در ضمن، افزایش

(Chaoui *et al.*, 1997). به علاوه، علف‌کش تریفلورالین در خاک ۱۲ متابولیت تولید می‌کند که ۲ متابولیت آن باعث افزایش معنی‌داری در محتوای پروتئین بذرهای گیاه سویا می‌شود. افزایش محتوای پروتئین در این بررسی، مطابق با نتایج Shabana و همکاران (۲۰۰۱) است که بیان کرده‌اند با افزایش غلظت پندی متالین، محتوای پروتئین کل در جلبک سبز *Protosiphon botryoides* به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد.

در مواردی که گیاهان میکوریزی از محتوای پروتئینی بیشتری برخوردارند، بر اساس نتایج Subramanian و Charest (۱۹۹۸) می‌توان بیان کرد که همزیستی با این قارچ‌ها به گیاه میزبان کمک می‌کند تا غلظت بالای پروتئین را در اندام‌های هوایی و ریشه خود حفظ کند. Arienes و همکاران (۱۹۹۳) افزایش ۱۷ درصدی غلظت پروتئین را با حضور میکوریز در گیاه شبدر گزارش کرده‌اند. همچنین، محتوای اسید آمینه در برگ‌های مرکبات میکوریزی نسبت به انواع غیرمیکوریزی افزایش می‌یابد (Nemec and Meredith, 1981). مطالعات نشان می‌دهند که جذب نیتروژن در گیاهان میکوریزی افزایش می‌یابد، که می‌تواند از عوامل افزایش پروتئین‌های محلول در این گیاهان باشد (Cheng and Baumgartner, 2006).

اندازه‌گیری محتوای پرولین نشان داد که تیمار تریفلورالین باعث افزایش این شاخص در گیاهان آفتابگردان میکوریزی و غیرمیکوریزی می‌شود (شکل ۹). تیمار فلوکلورالین از علف‌کش‌های خانواده دی‌نیتروآیلین باعث افزایش محتوای هیدرکسی پرولین

با نتایج حاصل از مطالعات Starratt و همکاران (۱۹۹۹) روی گیاه خربزه مطابقت دارد. آنها گزارش کرده‌اند که میزان اسیدهای آمینه آزاد در ریشه، لپه و محور زیرلپه، در اثر تیمار تریفلورالین افزایش می‌یابد. همچنین بیان کرده‌اند که علف‌کش‌های خانواده دی‌نیتروآیلین باعث افزایش محتوای اسیدهای آمینه آزاد می‌شوند. بیشترین تغییرات در میزان دو اسید آمینه شاخص در دانه‌رُست‌های گوجه‌فرنگی، شامل گلوتامین و آسپارژین است. تغییرات وابسته به غلظت در پاسخ به تیمار علف‌کش در ریشه بیشتر از سایر بافت‌هاست؛ اما افزایش محتوای اسیدهای آمینه در لپه‌ها و محور زیرلپه نیز معنی‌دار است. در مطالعاتی که توسط Saladin و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد، تجمع اسیدهای آمینه آزاد در گیاه انگور پس از کاربرد علف‌کش فلوئوکسازین مشاهده شد؛ که احتمالاً به علت تجزیه پروتئین‌ها و تبدیل آنها به اسیدهای آمینه در اثر سمیت علف‌کش است. از طرفی، این علف‌کش باعث القای کمبود آهن در گیاه می‌شود. از آنجایی که این عنصر در سنتز پروتئین‌ها دخالت دارد در شرایط کمبود آهن تعداد ریبوزوم‌ها کاهش یافته و به دنبال آن غلظت اسیدهای آمینه برگ افزایش می‌یابد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری سرکار خانم مهندس رؤیا ذوالفقاریان به جهت مشاوره در زمینه تهیه علف‌کش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

دانشگاهی مشهد، مشهد.

محتوای پرولین می‌تواند در بسیاری موارد نشانه‌ای از پیری و یا تنش خشکی باشد (Aspinall and Paleg, 1981). Toteva و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که محتوای پرولین در گیاهان حساس توتون یک روز پس از تیمار علف‌کش کلروسولفورون (chlorosulfuron) افزایش می‌یابد. همچنین، افزایش در محتوای پرولین گیاهان مقاوم نیز مشاهده شد ولی نسبت به گیاهان حساس کمتر بود. آنها همچنین غلظت‌هایی از پرولین آزاد را تعیین کردند که تحت تیمار علف‌کش، در گیاهان حساس نسبت به گیاهان شاهد افزایش شدیدی می‌یابد، در حالی که می‌تواند باعث افزایش تجزیه پروتئین‌ها شود. در گیاهان تراریخته مقاوم به علف‌کش، محتوای پرولین در گیاهان تیمار شده و شاهد کمتر است. ساخت پرولین و تجمع آن در گیاهان در نتیجه تنش‌های محیطی ممکن است از طریق تحریک سنتز پرولین از گلوتامات با حذف اثر کاهشی مهار پس‌خور و کاهش اکسیداسیون پرولین باشد که به کاهش ورود آن به ساختار پروتئین‌ها منجر می‌شود (Amutha et al., 2007). گیاهان میکوریزی از محتوای پرولین کمتری نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی برخوردارند. از این رو، احتمال می‌رود آغشتگی میکوریزی نقش مهمی در تحمل سمیت علف‌کش در گیاه آفتابگردان ایفا کند.

در این بررسی، با افزایش غلظت تریفلورالین، محتوای اسیدهای آمینه آزاد در گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی افزایش می‌یابد (شکل ۱۰). این نتیجه،

منابع

کاب، الف. (۱۳۷۸) علف‌کش‌ها و فیزیولوژی گیاهی. ترجمه فتحی، ق و ارجمند، ع. انتشارات جهاد

- Aliasgharzad, N., Shirmohamadi, E. and Oustan, S. (2009) Siderophore production by mycorrhiza sorghum roots under micronutrient deficient condition. *Soil and Environment* 28(2): 119-123.
- Al-Karaki, G. N., McMichael, B. and Zah, J. (2004) Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* 14: 263-269.
- Allen, M. F., Moore, T. S. and Christensen, M. (1982) Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhiza. II Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Canadian Journal of Botany* 60: 468-471.
- Amato, V. A., Hoverson, R. R. and Joseph, H. (1965) Microanatomical and morphological responses of corn and cotton to trifluralin. *Proceedings of Association of Southern Agricultural Workers*, p.234 (Abstracts).
- Amutha, R., Muthulaksmi, S., Baby Rani, W., Indira, K. and Mareeswari, P. (2007) Studies on biochemical basis of heat tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3(4): 234-238.
- Arienes, J., Palma, J. M. and Varion, A. (1993) Comparison protein pattern in nonmycorrhizal and VA mycorrhizal roots of red clover. *New Phytologist* 123: 763-768.
- Aspinall, D. and Paleg, L. G. (1981) Proline accumulation physiological aspects. In: *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants* (eds. Aspinall, D. and Paleg, L. G.) 205-240. Academic Press, Sydney.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H. and El ferjani, E. (1997) Cadmium and zinc of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant science* 127: 139-147.
- Chen, B. D., Li, X. L., Tao, H. Q., Christie, P. and Wong, M. H. (2003) The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere* 50: 839-846.
- Cheng, X. and Baumgartner, K. (2006) Effects of mycorrhizal roots and extraradical hyphae on ¹⁵N uptake from vineyard cover crop litter and the soil microbial community. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2665-2675.
- Demir, S. (2004) Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. *Turkish Journal of Biology* 28: 85-90.
- Dougall, D. K. and Fulton, M. M. (1967) Biosynthesis of protein amino acids in plant tissue culture. 111. Studies on the biosynthesis of arginine. *Plant Physiology* 44: 1023-1026.
- Duke, S. O. (1990) Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives* 87: 263-271.
- Durgesha, M. (1993) Effect of fluchloralin on protein synthesis, free amino acids and hydroxyproline content in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Annals of applied Biology* 123: 703-708.
- Fayez, K. A. and Kristen, U. (1996) The influence of herbicides on the growth and proline content of primary roots and on the ultrastructure of root caps. *Environmental and Experimental Botany* 36: 71-81.
- Hess, D. and Bayer, D. (1974) The effect of trifluralin on the ultrastructure of dividing cells of the root meristems of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) (Acala 4-42). *Journal of Cell Science* 15: 429-441.
- Horst, V. (2004) Further root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in already mycorrhizal plants in suppressed after a critical level of root colonization. *Plant Physiology* 161: 339-341.
- Kust, C. A. and Struckmeyer, B. E. (1971) Effects of trifluralin on growth, nodulation, and anatomy of soybeans. *Weed Science* 19: 147-152.

- Lignowski, E. M. and Scott, E. G. (1971) Trifluralin and root growth. *Plant and Cell Physiology* 12: 701-708.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. S., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-75.
- Marenco, R. A. and Lopes, N. F. (1994) Leaf chlorophyll concentration and nitrogen content in soybean plants treated with herbicide. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 6(1): 7-13.
- Moreland, D. E., Malhotra, S. S., Gruenhagen, R. D. and Shokraii, E. H. (1969) Effects of herbicides on RNA and protein syntheses. *Weed Science* 17(4): 556-563.
- Morris, C. J., Thompson, J. F. and Johnson, C. M. (1969) Metabolism of glutamic acid and N-acetyl glutamic acids in leaf discs and cell-free extracts of higher plants. *Plant Physiology* 44: 1023-1026.
- Nemec, S. and Meredith, F. I. (1981) Amino acid content of leaves in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus rootstocks. *Annual of Botany* 47: 351-358.
- Nilsson, G. (1977) Effects of glyphosate on the amino acid content in spring wheat plants. *Swedish Journal of Agricultural Research* 7: 153-157.
- Nitsan, J. and Lang, A. (1966) DNA synthesis in the elongating nondividing cells of the lentil epicotyl and its promotion by gibberellin. *Plant Physiology* 41: 965-70.
- Nooden, L. D. and Thimann, K. V. (1963) Evidence for a requirement for protein synthesis for auxin-induced cell enlargement. *Proceedings of National Academy Sciences* 50: 194-200.
- Saladin, G., Magne, C. and Clement, C. (2003) Stress reactions in *Vitis vinifera* L. following soil application of the herbicide flumioxazin. *Chemosphere* 53: 199-206.
- Schultz, D. P., Funderburk, H. H., and Negi N. S. (1968) Effect of Trifluralin on growth, morphology, and nucleic acid synthesis. *Plant Physiology* 43: 265-273.
- Shabana, E. F., Battah, M. G., Kobbia, I. A. and Eladel, H. M. (2001) Effect of pendimethalin on growth and photosynthetic activity of *Protosiphon botryoides* in different nutrient states. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 106-110.
- Spencer, W. F. and Cliath, M. M. (1974). Factors affecting vapor loss of Trifluralin from soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22: 987-991.
- Starratt, A. N. and Lazarovits, G. (1999) Herbicide-induced disease resistance and associated increased in free amino acids in melon plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21: 33-36.
- Subramanian, K. and Charest, C. (1998) Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Physiologia Plantarum* 102: 285-296.
- Toteva, T., Slavov, V. S., Batchvarova, R., Batchvarova, A. and Stefanov, D. (2004) Stress markers in chlorsulphron tolerant transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* 30(1-2): 103-111.
- Vogel-Mikus, K., Drobne, D. and Regvar, M. (2005) Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonization of pennycress (*Thlaspi praecox* Wulf. Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter Slovenia. *Environmental Pollution* 133: 233-242.
- Xiong, Z. T., Chao, L. and Bing, G. (2006) Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 273-280.

An evaluation of some physiological and biochemical parameters resulting from interaction of herbicide trifluralin and mycorrhizal colonization by *Glomus versiforme* in sunflower plants (cv. Lakomka)

Hanieh Moradbeigi and Jalil Khara *

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Urmia, Urmia, Iran

Abstract

Effects of different concentrations of herbicide trifluralin on physiological characters and growth of root and shoot, total protein, proline and free amino acids content in mycorrhizal (M) and non-mycorrhizal (NM) sunflower plants were studied under greenhouse conditions. Six different concentrations of trifluralin (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppm) were used. The obtained results of 5-week-old plants indicated that the length of shoots and roots as well as their fresh and dry weight decreased in herbicide treated plants, and this was significant in high herbicide concentrations (15, 20, 25 ppm). Also, growth inhibition in M plants was less obvious than NM plants. The amounts of total protein content decreased both in roots and shoots according to the amount of applied herbicide. Total protein contents of roots were higher in M than NM plants. By increasing herbicide concentrations, proline and free amino acids content in shoots and roots increased. According to these results, it is suggested that this fungus (*Glomus versiforme*) can help sunflower plants to tolerate trifluralin toxicity.

Key words: Free amino acids, Herbicide trifluralin, Mycorrhiza, Sunflower, Total protein

* Corresponding Author: j.khara@urmia.ac.ir