بسم الله الرحمن الرحیم

زیست‌شناسی گیاهی

علمی-پژوهشی

سال سوم - شماره هشتم - تابستان ۱۳۹۰

مجلـــه زیســـت‌شناســـی گیـــاهی بـــر اســـاس ابلاغیـــه شـــماره ۳/۱۱/۵۵۸ مـــورخ ۱۳۸۸/۰۳/۲۵ کمیســـیون بررســـی نشـــریات علمـــی وزارت علـــوم تحقیقـــات و فنـــاوری، دارای درجـــه **علمـــی – پژوهشـــی** و شـــماره اســـتاندارد بـــین‌المللـــی ۸۲۴۶-۲۰۰۸ از ســـازمان اســـناد و کتابخانـــه ملـــی جمهوری اسلامی ایران می‌باشد.

" این مجله حاصل فعالیت مشترک دانشگاه اصفهان و انجمن زیست‌شناسی ایران است."

متن کامل مجله در پایگاه‌های اطلاع‌رسانی زیر نمایه می‌شود:

سایت اختصاصی مجله	**http://uijs.ui.ac.ir/ijpb**
بانک اطلاعات نشریات کشور	**http://www.magiran.com**
سایت اینترنتی جهاد دانشگاهی	**http://www.SID.ir**
پایگاه استنادی علوم جهان اسلام	**http://www.ISC.gov.ir**

چاپ و لیتوگرافی: انتشارات دانشگاه اصفهان

ناشر: دانشگاه اصفهان

قیمت: ۲۰۰۰۰ ریال

تیراژ: ۱۰۰۰ نسخه

چاپ: تابستان ۱۳۹۰

مجله زیست‌شناسی گیاهی (علمی - پژوهشی)

سال سوم - شماره هشتم - تابستان ۱۳۹۰

شماره استاندارد بین‌المللی: ۲۰۰۸-۸۲۶۴

صاحب امتیاز: معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه اصفهان و انجمن زیست‌شناسی ایران

مدیر مسؤول: دکتر منصور شریعتی استاد - دانشگاه اصفهان

سردبیر: دکتر منصور شریعتی استاد - دانشگاه اصفهان

اعضای هیأت تحریریه

دکتر علی اکبر احسانپور	استاد - دانشگاه اصفهان
دکتر محمدرضا رحیمی‌نژاد رنجبر	استاد - دانشگاه اصفهان
دکتر شاهین زارع مبارکه	استاد - دانشگاه تهران
دکتر محمدرضا زمانی	استاد - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
دکتر منصور شریعتی	استاد - دانشگاه اصفهان
دکتر فائزه قناتی	دانشیار - دانشگاه تربیت مدرس
دکتر علی اصغر معصومی	استاد - مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

مدیر اجرایی: فریبا هادیان **(کارشناس ارشد)**

ویراستار تخصصی انگلیسی: فریدون پرویزیان

ویراستار ادبی: ناصر کریم‌پور

صفحه‌آرا: بهزاد حکیمی‌نیا و زهرا حشمت

صفحه‌آرای تخصصی: فریبا هادیان

ناشر: انتشارات دانشگاه اصفهان

اصفهان- دانشگاه اصفهان- سازمان مرکزی- معاونت تحقیقات و فناوری- طبقه دوم- اداره چاپ، انتشارات و مجلات

کد پستی: ۸۱۷٤٦۷۳٤٤۱- دفتر مجله زیست‌شناسی گیاهی

نشانی پست الکترونیک IJPB@ui.ac.ir

پیش از ارسال مقاله، روش تدوین و نگارش مقاله خود را به دقت با مطالب زیر مطابقت فرمایید.

نکات قابل توجه

۱- در مقاله، قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه ویژه قرار گیرد.

۲- مقالاتی که برای چاپ در این مجله ارسال می‌گردد نباید قبلاً چاپ شده باشد (مگر در شکل خلاصه در گردهمایی‌ها)، همچنین نباید به طور همزمان برای بررسی به مجلات دیگر ارائه شده باشد.

۳- مسؤولیت مطالب مندرج در مقاله بر عهده نویسنده یا نویسندگان مقاله است.

٤- مجله در قبول، رد و اصلاح مقاله‌ها آزاد است.

۵- مقاله‌های دریافتی توسط متخصصان امر داوری می‌گردد و در صورت تصویب در هیأت تحریریه با رعایت نوبت به چاپ می‌رسد.

٦- عدم رعایت دستورالعمل نگارش مقاله باعث عدم پذیرش و یا کُندی مراحل پذیرش مقاله خواهد شد.

روش تدوین مقاله

۱- مقاله‌ها بایستی به زبان فارسی تهیه شوند و هر مقاله باید یک چکیده به زبان انگلیسی داشته باشد و خلاصه انگلیسی (Abstract) و واژه‌های کلیدی (Key words) در انتهای مقاله آورده شود.

۲- مقاله کامل (Full Paper) دارای خلاصه فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج (شامل شکل، جدول و ...)، بحث، جمع‌بندی، قدردانی، منابع، خلاصه انگلیسی (Abstract) و واژه‌های کلیدی انگلیسی (Key words) باشد و حداکثر در ۱۵ صفحه در فرمت نهایی مجله تنظیم شود.

۳- مقاله کوتاه (Short Paper) کاملاً شبیه مقاله کامل دارای خلاصه فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج (شامل شکل، جدول و ...)، بحث، جمع‌بندی، قدردانی، منابع، خلاصه انگلیسی (Abstract) و واژه‌های کلیدی انگلیسی (Key words) بدون بخش‌بندی و عنوان و حداکثر در ۴ صفحه تنظیم شود.

۴- شکل‌ها، نمودارها و جدول‌ها شماره‌گذاری شده و به همراه زیرنویس آنها در متن مقاله آورده شود؛ در نرم‌افزار Word، فرمت شکل‌ها در بخش Text Wrapping، به صورت In line with text انتخاب شود؛ از ارسال شکل‌های گروه‌بندی شده (Group) اکیداً خودداری شود؛ نمودارها به صورت دو بعدی و سیاه و سفید طراحی و از حالت سه بعدی خارج شوند.

۵- مقاله‌ها بایستی با فاصله خطوط Single تایپ شود.

۶- تایپ مقاله با نرم‌افزار Microsoft Office Word 2003، به صورت یک رو، در کاغذ A4 ، با حاشیه‌های متن ۳ سانتی‌متر و به صورت یک ستونی انجام شود.

۷- از درج پاورقی برای بیان توضیحات انگلیسی و فارسی و بالعکس خودداری شود و در صورت نیاز در درون پرانتز و در متن مقاله آورده شود.

۸- هر مقاله علمی - پژوهشی بایستی دارای قسمت‌های زیر باشد:

عنوان: فارسی: 16 B Lotus Bold و انگلیسی: 14 Times New Roman Bold

نام نگارندگان: فارسی: 14 B Lotus Bold و انگلیسی: 12 Times New Roman Bold

درج شماره مربوط به آدرس هر نگارنده بعد از نام نگارنده به صورت Superscript

علاوه بر درج شماره مربوط، یک ستاره برای نویسنده مسؤول (Corresponding Author)

نشانی نگارندگان: فارسی: 12 B Lotus Bold و انگلیسی: 11 Times New Roman Bold

درج شماره مربوط به نشانی هر نگارنده قبل از نام نگارنده به صورت Superscript.

نشانی پست الکترونیک نویسنده مسؤول: فارسی: 10 B Lotus Bold و انگلیسی: 10 Times New Roman Bold

نمونه:

اثر تنش شوری و خشکی بر رشد گیاه گندم در مناطق سردسیر

حسن مختار پناه، [۱*]، علی اکبر مشتاقی [۲]

[۱*] گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان، [۲] مرکز تحقیقات زیستی

mokhtar-p@ui.ac.ir

خلاصه فارسی و انگلیسی: فارسی: 11 B Lotus و انگلیسی: 11 Times New Roman، شامل ۱۰۰ تا ۲۵۰ کلمه و بدون هر گونه کلمه اختصاری

واژه‌های کلیدی فارسی و انگلیسی: حداکثر حاوی شش کلمه مرتب شده بر اساس حروف الفبا

ترتیب بخش‌های مختلف مقاله: خلاصه فارسی، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج، بحث، جمع‌بندی، قدردانی، منابع، خلاصه انگلیسی (Abstract)، واژه‌های کلیدی انگلیسی (Key words): فارسی: 13 B Lotus و انگلیسی: 12 Times New Roman

تذکر: عنوان جدول در بالای جدول و عنوان نمودار و شکل در زیر آنها با خط 11 B Lotus نوشته شود.

نحوه مرجع‌دهی:

الف) مرجع‌دهی در متن (References in text): در متن به صورت نام نویسنده و یا نویسندگان (بدون نام کوچک) و سال انتشار نوشته شود.

نمونه فارسی: یک نویسنده: (قاسمی، ۱۳۸۸)، **دو نویسنده:** (اکبری و مشتاقی، ۱۳۶۵)، **سه نویسنده و بیشتر:** (پناهی و همکاران، ۱۳۷۶)

نمونه انگلیسی: یک نویسنده: (Weston, 1996)، **دو نویسنده:** (Schopfer and Plachy, 1984)، **سه نویسنده و بیشتر:** (Kruse *et al*., 2000)

کلمه *et al*., بایستی به صورت مورب نوشته شود (این کلمه لاتین است).

ب) مرجع‌دهی در بخش منابع (References in list): منابع بر اساس حروف الفبا مرتب و ابتدا منابع فارسی و سپس انگلیسی آورده شود.

ب-۱) مرجع‌دهی به مقاله (Paper): به ترتیب شامل: نام نویسنده یا نویسندگان، سال، عنوان مقاله، نام مجله، شمارهٔ مجلد، شمارهٔ صفحات. نام مجله به صورت کامل نوشته شود.

ب-۱-۱) مقاله با یک نگارنده

نمونه فارسی: ولی‌پور، ع. (۱۳۷۶) بررسی پراکنش گیاهان مقاوم به شوری در ایران. مجلهٔ زیست‌شناسی ۳: ۷۵-۹۱.

نمونه انگلیسی:

- Katz, A. D. (1985) Determination of intracellular osmotic volume and sodium concentration in *Dunaliella.* Plant Physiology 78: 817-820.

ب-۱-۲) مقاله با دو نگارنده:

نمونه فارسی: ولی‌پور، ع. و حسینی، ا. (۱۳۷۶) بررسی پراکنش گیاهان مقاوم به شوری در ایران، مجلهٔ زیست‌شناسی ۳: ۷۵-۹۱.

نمونه انگلیسی:

- Katz, A. D. and Brown, M. (1985) Determination of intracellular osmotic volume and sodium concentration in *Dunaliella.* Plant Physiology 78: 817-820.

ب-۱-۳) مقاله با سه نگارنده و بیشتر:

نمونه فارسی: ولی‌پور، ع.، حسینی، ا. و امینی، ا. ر. (۱۳۷۶) بررسی پراکنش گیاهان مقاوم به شوری در ایران، مجلهٔ زیست‌شناسی ۳: ۷۵-۹۱.

نمونه انگلیسی:

- Cowan, A. K., Rose, P. D. and Horne, L. G. (1992) A model system for studying the response of plant cells to stress. Journal of Experimental Botany 43: 1535-1547.

ب-۲) مرجع‌دهی به کتاب (Book): به ترتیب شامل: نام نویسنده یا نویسندگان، سال، عنوان کتاب، شمارهٔ Edition در صورت وجود، نام مؤسسهٔ انتشاراتی، نام اولین شهری که انتشار در آن انجام گرفته است.

نمونه فارسی: کردوانی، س. ح. (۱۳۷۳) اکوسیستم‌های طبیعی. جلد ٦، مرکز فرهنگی و انتشارات پائیز، تهران.

نمونه انگلیسی:

- Rizvi, S. J. H. and Rizvi, V. (1992) Allelopathy in plants: Basic and applied aspects. Chapman and Hall, London.
- Rice, E. L. (1984) An introduction to microbiology. 2nd Ed, Academic Press, New York.

مرجع‌دهی به ترجمه فارسی کتاب:

نوگل، جی. ر. و فریتز، ت. (۱۳۸۰) مقدمه‌ایی بر فیزیولوژی گیاهی. ترجمه لاهوتی، م. و رحیم‌زاده، ر. انتشارات آستان قدس رضوی. مشهد.

ب-۳) مرجع‌دهی به بخشی از کتاب (Chapter in Book) که هر بخش دارای نویسنده جداگانه باشد:

نمونه انگلیسی:

- Chou, C. H. (1990) The role of allelopathy in agroecosystems. In: Researching the ecology basis for sustainable agriculture (ed. Gliessman, S. R.) 105-121. Springer Verlag, Berlin.
- Blum, U. (1995) The value of model plant–microbe–soil system for understanding processes associated with allelopathic interaction. In: Organisms, processes and applications (eds. Jnderjit, K. M., Dakshini, M. and Einhelling, F. A.) 127-131. American Chemical Society, Washington D. C.

ب-٤) مرجع‌دهی به پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد یا دکترا: نام نویسنده، سال، عنوان پایان‌نامه، مقطع تحصیلی، نام دانشگاه، نام شهر، نام کشور.

نمونه فارسی: ظهرابی، م.ع. (۱۳۸۸) بررسی اثر شوری بر رشد و میزان پرولین گیاه گندم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

نمونه انگلیسی:

- Lawlor, H. J. (1989) Tissue culture of Australian brown seaweeds and an assessment of their tocopherol content. PhD Thesis, Murdock University, Perth, Australia.

ب-۵) مرجع‌دهی به Patent:

- Suzuki, T., Ohishi, N. and Yagi, K. (2000) Methods of obtaining a composition *9-cis β-Carotene* in high purity. US Patent 6057484.

ب-٦) مرجع‌دهی به همایش‌ها (سمینارها، سمپوزیوم‌ها، کنگره‌ها، میتینگ‌ها و ...): به ترتیب شامل: نام نویسندگان، سال انتشار، عنوان مقاله، دوره و نام همایش، محل برگزاری، شهر، کشور.

نمونه فارسی: رنگی‌پور، ا.، افشارزاده، س.، بلالی‌دهکردی، غ. ر. و صاحبی، ج. (۱۳۸۷) مطالعه جنس لویی در رودخانه زاینده‌رود. اولین همایش ملی زیست‌شناسی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تالش.

نمونه انگلیسی:

- Mason-Gamer, R. J. and Helfgott, D. M. (2002) Molecular phylogenetic investigation of allopolyploid *Elymus* in North America. 4th International Triticeae Symposium, Prague, Czech Republic.

ب-۷) مرجع‌دهی به مقاله‌های کامل همایش‌ها (سمینارها، سمپوزیوم‌ها، کنگره‌ها، میتینگ‌ها و ...) (Proceedings): به ترتیب شامل: نام نویسندگان، سال انتشار، عنوان مقاله، دوره و نام همایش، محل برگزاری، شهر، کشور.

نمونه فارسی: صفوی، و. و شریعتی، م. (۱۳۸٦) تأثیر الیسیتور متیل جاسمونات بر سنتز بتاکاروتن در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina*. مجموعه مقالات دومین همایش ملی زیست‌شناسی سلولی و ملکولی، کرمان، ایران.

نمونه انگلیسی:

- Mohsenzadeh, S. (1996) Study of nitrogen fertilizer time and amount on seed production and other characterizations of Sorgum. In: Proceeding of the 4th Iranian Congress of Agriculture and Plant Breeding, Isfahan, Iran.
- Shariati, M. and Lilley, R. McC. (1993) Triggering of glycerol synthesis in *Dunaliella tertiolecta* at constant osmotic pressure. 33rd Annual General Meeting of Australian Society of Plant Physiologist. Perth, Australia.

ب-۸) مرجع‌دهی به اینترنت: مرجع‌دهی به نشانی‌های اینترنتی تقریباً فاقد اعتبار بوده و پیشنهاد می‌شود استفاده نگردد. در مواقعی که ناگزیر از استفادهٔ محدود از آن باشد نام نویسنده، زمان چاپ و در انتها نیز زمان استخراج از اینترنت درج گردد.

نمونه:

- Rotblat, J. (2000) Fifty Pugwash conferences: a tribute to Eugene Rabinowitch. Retrieved from http://www.pugwash.org/reports/pac/pac256/otblat.htm. On: 22 June 2001.

پ) شکل‌ها و جدول‌ها: شکل‌ها و جدول‌ها به ترتیب ذکر شده درون متن قرار بگیرند، توضیحات شکل‌ها در پایین و توضیحات جدول‌ها در بالای آنها نوشته شود. زیرنویس شکل‌ها و بالانویس جدول‌ها به یکی از دو صورت زیر تنظیم شود:

- مقادیر، میانگین ... تکرار ± SE (یا StD یا انحراف معیار یا خطای معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون (دانکن یا توکی یا ...) است.
- مقادیر، میانگین ... تکرار ± SE (یا StD یا انحراف معیار یا خطای معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.05$ است.

نمونه: شکل ۱- درصد جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه بذرهای جوانه‌زده اقاقیا پس از دو روز در غلظت‌های مختلف نفت‌خام (۰٪، ۲٪ و ۴٪ وزنی/وزنی). مقادیر، میانگین ۶ تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $p<0.05$ است.

شکل ۲- میکروگراف الگوی تزئینات سطحی مریکارپ با نگاره (SEM). a: نمای کلی مریکارپ 25X، b: حلقه قاعده‌ای 62x، c: بافت حلقه قاعده‌ای مریکارپ 124X، d: بافت زگیلی و غده‌دار 100X، e: الگوهای متنوع مشبک و چین خورده 250X، f: سطح زگیل‌دار مریکارپ 500X.

شکل ۳- الف) دندروگرام بررسی روابط خویشاوندی رقم‌های پسته بر اساس باندهای پروتئینی محورهای جنینی. A: اکبری، AA: احمدآقایی، F: فندقی، K: کله قوچی. ب) دندروگرام بررسی روابط خویشاوندی رقم‌های پسته بر اساس باندهای پروتئینی لپه‌ها. A: اکبری، AA: احمدآقایی، F: فندقی، K: کله قوچی.

تذکر: درستی نام علمی گونه‌های گیاهی از لحاظ صفت گونه‌ای و نام آتور در سایت اینترنتی www.ipni.org بررسی شود.

نحوه ارسال مقاله: مقالات به صورت فایل word به صورت ضمیمه (attachment) به نشانی پست الکترونیک **ijpb@ui.ac.ir** ارسال گردد.

تماس با ما: شماره تماس: **۷۹۳۴۱۶۴- ۰۳۱۱**، دورنگار: **۷۹۳۲۱۷۷- ۰۳۱۱**، نشانی پست الکترونیک: ijpb@ui.ac.ir، اصفهان- خیابان هزار جریب دانشگاه اصفهان- سازمان مرکزی- طبقه دوم- اداره چاپ، انتشارات و مجلات- دفتر مجله **زیست‌شناسی گیاهی**، کدپستی: **۷۳۴۴۱ - ۸۱۷۴۶**

برای دریافت راهنمای کامل نگارش مقاله به سایت اختصاصی مجله http://uijs.ui.ac.ir/ijpb مراجعه بفرمایید.

داوران این شماره (سال سوم - شماره هشتم - تابستان ۱۳۹۰)

اعضای محترم هیأت علمی دانشگاه‌ها و مؤسسات آموزشی و پژوهشی کشور کـه در داوری و ارزیـابی مقالات این شماره از مجله علمی - پژوهشی زیست‌شناسی گیاهی همکاری داشته‌اند، معرفی شـده و از خدمات علمی آنها تقدیر می‌گردد:

دکتر کیوان آقایی جوبنی	دانشگاه زنجان
دکتر علی اکبر احسانپور	دانشگاه اصفهان
دکتر حسن پوربابایی	دانشگاه گیلان
دکتر عبدالکریم چهرگانی راد	دانشگاه بوعلی سینا
دکتر محمدرضا دادپور	دانشگاه تبریز
دکتر پرژک ذوفن	دانشگاه شهید چمران اهواز
دکتر شهریار سعیدی مهرورز	دانشگاه گیلان
دکتر مسعود شیدایی	دانشگاه شهید بهشتی
دکتر عمران عالیشاه	مؤسسه تحقیقات پنبه کشور
دکتر ریحانه عموآقایی	دانشگاه شهرکرد
دکتر فائزه قناتی	دانشگاه تربیت مدرس
دکتر فرح کریمی	دانشگاه شاهد
دکتر مریم مددکار حق‌جو	دانشگاه لرستان
دکتر محمدرضا مفید	دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان
دکتر علی موافقی	دانشگاه تبریز
دکتر علیرضا نقی‌نژاد	دانشگاه مازندران
دکتر مهدی یوسفی	دانشگاه پیام نور

مجله علمی - پژوهشی زیست‌شناسی گیاهی
سال سوم - شماره هشتم - تابستان ۱۳۹۰
شماره استاندارد بین‌المللی: ۸۲۴۶-۲۰۰۸

فهرست

■ **تأثیر برهمکنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر رشد و برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه بابونه (*Matricaria recutita* L.)** ۱۲-۱
نسرین فاضلیان و اسرار زهرا

■ **تأثیر پلی‌آمین‌های اگزوژن بر رشد، فتوسنتز و متابولیسم فنل‌ها در گیاه توتون تحت تنش شوری** ۲۶-۱۳
رقیه حاجی‌بلند و نشمین ابراهیمی

■ **بررسی فلور، شکل زیستی و کورولوژی رویشگاه‌های شمشاد در جنگل حفاظت شده خیبوس مازندران** ۴۰-۲۷
حامد اسدی، سید محسن حسینی، امید اسماعیل‌زاده و عباس احمدی

■ **تغییر غلظت هورمون‌های برون‌زا و تأثیر آن بر روی بلوغ رویان‌های بدنی و ریزبنه‌زایی زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.)** ۵۸-۴۱
شکیبا رجب‌پور، عذرا صبورا و علی وطن‌پور ازغندی

■ **تمایزیابی کیسه‌های ترشحی اسانس و رابطه آن با تکوین گل و میوه لیموترش (*Citrus limon* (L.) Burm.f.)** ۶۸-۵۹
مریم رفیعی و هما رجایی

■ **مطالعه ژن عامل رونویسی متصل‌شونده به عناصر پاسخ‌دهنده به تنش کم آبی در برخی ارقام گندم نان ایران** ۷۶-۶۹
ساسان محسن‌زاده، جواد کریمی اندانی و حسن محبت‌کار

■ **مطالعه سیتولوژیک و مورفولوژیک هیبریدهای حاصل از تلاقی دو گونه دیپلوئید پنبه بومی بندرعباس و آریا با گونه آربورئوم (*Gossypium arboreum*)** ۹۰-۷۷
زهرا هراتی، موسی‌الرضا وفایی‌تبار و محمود خسروشاهلی

زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هشتم، تابستان ۱۳۹۰، صفحه ۱-۱۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۷/۱۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۱۲/۱۸
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۲/۱۴

تأثیر برهمکنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر رشد و برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه بابونه (*Matricaria recutita* L.)

نسرین فاضلیان و زهرا اسرار *
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

چکیده

در این تحقیق تأثیرات سالیسیلیک‌اسید بر سمّیت آرسنیک در گیاهان بابونه (*Matricaria recutita*)، از طریق بررسی میزان رشد و برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی این گیاه مطالعه شده است. تیمار آرسنیک در گیاهان بابونه به مدت ۱۴ روز باعث تجزیه شدید کلروفیل و کاهش رشد گیاه گردید. همچنین، تجمع گونه فعال اکسیژن در گیاهان بابونه تحت تنش آرسنیک به طور معنی‌داری افزایش یافت و به پراکسیداسیون لیپیدها منجر گردید و افزایش میزان آلدئیدهای غشا این مطلب را تأیید نمود. پیش‌تیمار سالیسیلیک‌اسید (افشانه‌سازی با ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید به مدت ۱۰ روز قبل از تنش آرسنیک) در گیاه بابونه در اکثر موارد سبب افزایش میزان رشد، فتوسنتز، آنتوسیانین‌ها و قندهای احیا کننده شد، در حالی که پراکسیداسیون لیپیدها، پراکسید هیدروژن و تجمع آرسنیک کاهش یافت. نتایج نشان داد که سالیسیلیک‌اسید توانسته است تا حدودی باعث بهبود رشد و افزایش مقاومت گیاهان بابونه نسبت به تنش آرسنیک گردد.

واژه‌های کلیدی: آرسنیک، بابونه، پراکسیداسیون لیپیدها، پراکسید هیدروژن، رنگیزه‌های فتوسنتزی، سالیسیلیک‌اسید

مقدمه

آرسنیک، عنصری سمّی برای گیاهان و جانوران است که از طریق منابعی مانند سموم، کودها، مواد نگهدارنده چوب، سوختن زغال سنگ، معادن آرسنیک و طلا، احتراق سوخت‌های فسیلی و فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی در محیط انتشار می‌یابد (Gomez-Caminero *et al.*, 2001). آرسنیک معدنی باعث تولید گونه فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) در گیاهان می‌شود. ROS می‌تواند به طور مستقیم سبب تخریب آمینواسیدها، پروتئین‌ها، نوکلئیک اسیدها و تحریک پراکسیداسیون لیپیدهای غشا گردد. تحریک آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی، مکانیسم دفاعی گیاهان برای خاموش کردن ROS است. بر اساس گزارش‌های به دست آمده، آرسنیک باعث کاهش میزان فتوسنتز، تعرق گیاه، مهار جوانه‌زنی، کاهش رشد، تخریب غشای کلروپلاستی و

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: zasrar@mail.uk.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۴۱۳۲۰۲۰۶۳

افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌گردد (Stoeva and Bineva, 2003). سالیسیلیک‌اسید هورمونی است که نقش مهمی در مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایفا می‌کند و بر رشد گیاه، جوانه‌زنی دانه، ساختار غشا، جذب و انتقال یون، نرخ فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، مقدار کلروفیل، گلدهی و رسیدن میوه نیز تأثیر می‌گذارد (Belkhadi *et al.*, 2010). بررسی‌ها نشان داده است که سالیسیلیک‌اسید باعث تغییر پاسخ گیاهان به سرما، دمای بالا، تنش شوری، تنش اسمزی و علف‌کش‌ها می‌گردد و رشد گیاه را تحت این شرایط بهبود می‌بخشد (Belkhadi *et al.*, 2010)، همچنین سالیسیلیک‌اسید تأثیرات تخریبی فلزات سنگین بر رشد را نیز تعدیل می‌کند (Drazic and Mihailovic, 2005). برای مثال، کاربرد سالیسیلیک‌اسید، تخریب غشای ایجاد شده توسط سرب در گیاه برنج (Mishra and Choudhuri, 1999)، سمّیت منگنز در گیاه خیار (Shi and Zhu, 2008)، تنش اکسیداتیو القا شده توسط جیوه در گیاه یونجه (Zhou *et al.*, 2009)، سمّیت کادمیوم در گیاهان جو و ذرت (Metwally *et al.*, 2003) را بهبود بخشیده است، اما آزمایش‌هایی در زمینه اثر سالیسیلیک‌اسید در بهبود سمّیت آرسنیک انجام نگرفته است.

گیاهان دارویی از اهمّیت خاصی در تأمین بهداشت و سلامت جامعه برخوردارند و در سال‌های اخیر رویکردی همه جانبه برای استفاده از داروهایی با منشأ طبیعی و خصوصاً گیاهی در جوامع مختلف جهان پدید آمده است. از سوی دیگر، جهان در معرض خطر فلزات سنگین قرار دارد و ورود عناصر سنگین سمّی مانند آرسنیک به چرخه زندگی گیاهان و سایر موجودات زنده و افزایش آلودگی محیط‌زیست امری اجتناب‌ناپذیر است، لذا در این پژوهش اثر سالیسیلیک‌اسید بر کاهش میزان سمّیت ناشی از فلز سنگین آرسنیک در گیاه بابونه مطالعه گردیده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، بذرهای بابونه (*Matricaria recutita*) در گلدان‌های حاوی پرلیت کاشته شدند. این آزمایش در شرایط گلخانه‌ای و با سه تکرار انجام گرفت. در مدت رشد، گلدان ها هفته‌ای سه بار با ۷۰ میلی‌لیتر محلول غذایی لانگ – اشتون با رقت ۲:۱ و اسیدیته ۶/۵ آبیاری شدند و پس از دو ماه، به مدت ۱۰ روز با غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید (۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار) افشانه‌سازی شدند. سپس هفته‌ای سه بار و به مدت ۱۴ روز با محلول‌های سدیم آرسنیک (۰، ۱۰، ۴۵ و ۸۰ میکرومولار) تیمار گردیدند (Shi and Zhu, 2008).

اندازه‌گیری وزن تر اندام هوایی

برای اندازه‌گیری وزن تر گیاهان، ابتدا اندام هوایی هر گیاه از ریشه جدا شده و وزن تر هر یک از گیاهان با ترازوی دقیق آزمایشگاهی Sartarius مدل BP211D با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه

بر اساس روش Lichtenthaler (۱۹۸۷)، ۰/۲ گرم از برگ‌های تازه گیاه در هاون چینی حاوی ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد و جذب نمونه‌ها

در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی از رابطه‌های زیر محاسبه گردید:

$$\text{Chl. a} = (12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8})$$
$$\text{Chl. b} = (21.21\ A_{646.8} - 5.1\ A_{663.2})$$
$$\text{Chl. T} = \text{Chl. a} + \text{Chl. b}$$
$$\text{Car} = ((1000\ A_{470} - 1.8\ \text{Chl. a} - 85.02\ \text{Chl. b}) / 198)$$

سنجش میزان آنتوسیانین‌ها

برای سنجش میزان آنتوسیانین‌ها از روش Wagner (۱۹۷۹) استفاده شد. به این منظور، ۰/۱ گرم از بافت تازه برگی در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متیل الکل و کلریدریک‌اسید خالص با نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً ساییده شد و پس از سانتریفیوژ، جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر محاسبه شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از فرمول A=εbc به دست آمد. در این رابطه، A: شدت جذب، b: عرض کوت برابر با ۱ سانتی‌متر، c: غلظت آنتوسیانین (mol/g) و ε: ضریب خاموشی برابر با $۳۳۰۰۰\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ است.

اندازه‌گیری مقدار قندهای احیا کننده

مقدار قندهای احیا کننده به روش Somogy (۱۹۵۲) اندازه‌گیری شد. به منظور تهیه عصاره گیاهی، ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ در هاون چینی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ساییده شد. سپس محتوای هاون به بشری منتقل گردید و روی اجاق برقی حرارت داده شد تا به نقطه جوش برسد. در این مرحله محتوای بشر با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید و در نهایت عصاره گیاهی به دست آمد. سپس ۲ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده به لوله آزمایش منتقل و ۲ میلی‌لیتر محلول سولفات مس به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از سرد شدن لوله‌ها، ۲ میلی‌لیتر محلول فسفومولیبدیک اسید افزوده شد و در نهایت، شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان گردید.

اندازه‌گیری مقدار سایر آلدئیدها (پروپانال، بوتانال، هگزانال، هپتانال و پروپانال دی متیل استال)

سنجش مقدار این آلدئیدها بر اساس روش Meirs و همکاران (۱۹۹۲) انجام گرفت. مطابق این روش ۰/۲ گرم بافت تازه برگی در ۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد ساییده شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، ۴ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد TBA بود اضافه شد. پس از حرارت دادن مخلوط حاصل و سانتریفیوژ در ۱۰۰۰ g، شدت جذب این محلول در طول موج ۴۵۵ نانومتر خوانده شد. جذب سایر رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت این آلدئیدها از فرمول A=εbc استفاده شد. در این رابطه A: شدت جذب، b: عرض کوت، c: غلظت مالون دآلدئید (mol/g) و ε: ضریب خاموشی معادل $۰/۴۵۸ \times ۱۰۵\ mol^{-1}cm^{-1}$ است.

اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن

در روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) مقدار پراکسید هیدروژن بر اساس واکنش H_2O_2 با یدید پتاسیم (KI) تعیین گردیده است. در این روش

۵۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه برگ در ۵ میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد در حمام آب یخ ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۷/۵ و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده و سپس جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تعیین میزان یون آرسنیک در اندام هوایی به روش جذب اتمی

در این روش ۰/۲۵ گرم از بافت خشک اندام هوایی در ۵ میلی‌لیتر نیتریک اسید غلیظ حل گردید و نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آزمایشگاه قرار داده شدند تا بافت گیاهی به خوبی در اسید حل شود. سپس محلول حاصل به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد گرم گردید و پس از سرد شدن، ۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد به محلول اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در حرارت ۱۵۰ درجه سانتیگراد گرم گردید. سپس حجم محلول به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و از کاغذ صافی عبور داده شد. از محلول شفاف رویی برای اندازه‌گیری مقدار یون مورد نظر در دستگاه جذب اتمی (Atomic Absorbtion Spectrometer) مدل Spectra AA 220 ساخت کشور استرالیا استفاده گردید (Khan *et al*., 2009).

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب یک آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۱/۵ صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

نتیجه‌گیری

اثر برهمکنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر وزن تر اندام هوایی

با توجه به شکل ۱، تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک مانع از کاهش وزن تر ناشی از آرسنیک نسبت به گیاهان تیمار نیافته با سالیسیلیک‌اسید گردید. البته، در تیمارهای همزمان فقط تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار) و آرسنیک ۴۵ میکرومولار معنی‌دار بود. مطالعات انجام شده بر گیاه ذرت نیز نشان داده است که کاربرد سالیسیلیک‌اسید سبب تحریک رشد در این گیاهان می‌شود و مهار رشد القا شده از طریق تنش‌های غیرزیستی (تنش کم آبی، شوری، سرما، فلز سنگین و غیره) در گونه‌های مختلف ذرت را خنثی می‌کند (Belkhadi *et al*., 2010). اثر بهبودی سالیسیلیک‌اسید بر رشد گیاهان تحت تنش غیرزیستی می‌تواند به نقش آن در جذب مواد غذایی، ارتباط آبی، تنظیم روزنه‌ای، نرخ فتوسنتز و مقدار کلروفیل مربوط باشد (Noreen and Ashraf, 2008). همچنین گزارش شده است که علت تحریک رشد توسط سالیسیلیک‌اسید می‌تواند به افزایش آنتی‌اکسیدان‌های سلول مربوط باشد که گیاهان را در برابر تخریب اکسیداتیو ناشی از فلز سنگین حفاظت می‌نماید (El-Tayeb, 2005).

اثر برهمکنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر محتوای کلروفیل کل

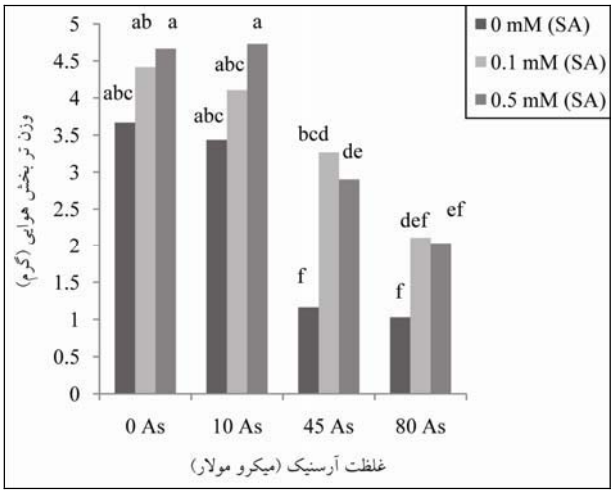
بر اساس نتایج به دست آمده، تیمار آرسنیک به تنهایی در غلظت ۸۰ میکرومولار محتوای کلروفیل کل را کاهش داد، ولی کاربرد آن به طور همزمان با سالیسیلیک‌اسید مانع از این اثر کاهشی شد (شکل ۲). پیش‌تیمار سالیسیلیک‌اسید در گیاهچه‌های برنج تحت تنش سرب باعث افزایش مقدار کلروفیل شده است (Jing *et al*., 2007). در رابطه با نتایج حاصل از مطالعه سالیسیلیک‌اسید بر گیاهچه‌های جو تحت سمّیت کادمیوم نیز گزارش مشابهی وجود دارد (Metwally *et al*., 2003). سالیسیلیک‌اسید بسته به غلظت، زمان و گیاه مورد استفاده دارای آثار دو گانه‌ای است، اما در غلظت‌های مناسب با کاهش تخریب رنگیزه کلروفیل (Belkhadi *et al*., 2010)، افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سلول، سنتز پروتئین‌های جدید از دستگاه فتوسنتزی حمایت کند (Popova *et al*., 2003).

اثر برهمکنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر محتوای کاروتنوئید

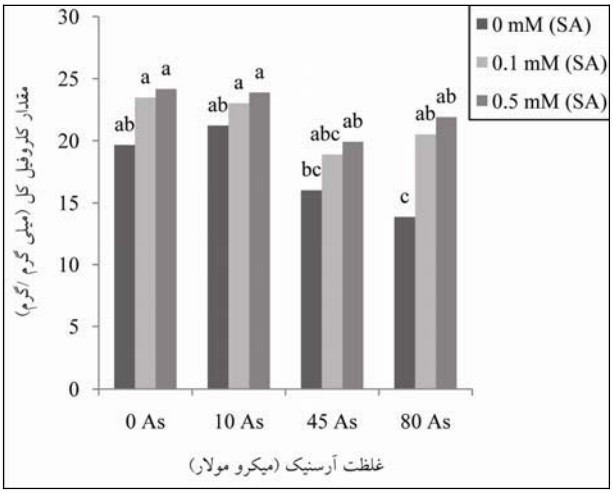
با توجه به شکل ۳، تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک تأثیر معنی‌داری بر محتوای کاروتنوئیدی بابونه نداشته است. کاروتنوئیدها معمولاً دارای نقشی عملکردی در خاموش کردن اکسیژن یکتایی و جاروب کردن رادیکال‌های آزاد هستند که به علت توانایی آنها در انتقال انرژی در فتوسنتز و نقش حفاظت نوری آنهاست (Jithesh *et al*., 2006). به نظر می‌رسد که افشانه‌سازی سالیسیلیک‌اسید با افزایش توان آنتی‌اکسیدانی بابونه از جمله کاروتنوئیدها موجب کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها و مقدار H_2O_2 و حفاظت بیشتر از غشاهای سلولی و فتوسنتزی و رنگیزه‌های فتوسنتزی شده و از کاتابولیسم کلروفیل جلوگیری کرده است (Costa *et al*., 2005).

اثر برهمکنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر مقدار آنتوسیانین

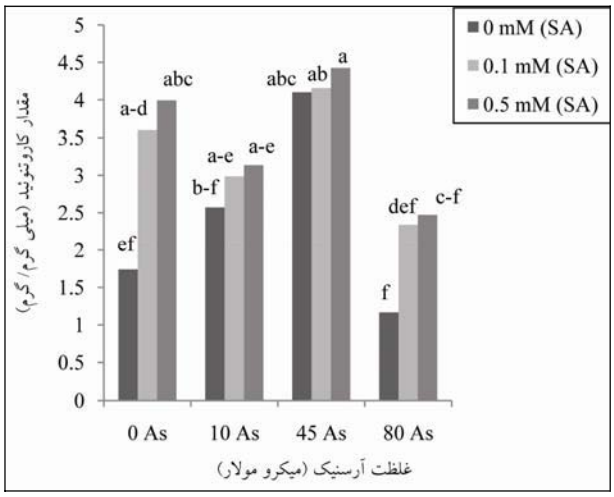
مطابق شکل ۴، تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک ۸۰ میکرومولار نسبت به گیاهان تیمار نیافته با سالیسیلیک‌اسید معنی‌دار بود و باعث افزایش معنی‌دار مقدار آنتوسیانین‌ها گردید. ترکیبات فنولی شامل لیگنین‌ها، فنولیک اسیدها، کومارین‌ها، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها از مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می‌شوند. این متابولیت‌های ثانویه می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان، خاموش‌کننده و یا جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد در گیاهان عمل کنند (Solecka, 1997). افزایش میزان آنتوسیانین‌ها احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت آنزیم PAL است (Chen *et al*., 2006) از طرف دیگر، لیگنین نیز به عنوان یکی از ترکیبات فنلی در مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می‌شود تغییر در مسیر سنتز این ترکیب نیز در طی پیش‌تیمار سالیسیلیک‌اسید می‌تواند یکی از دلایل تغییر در مقدار ترکیبات فنلی باشد.



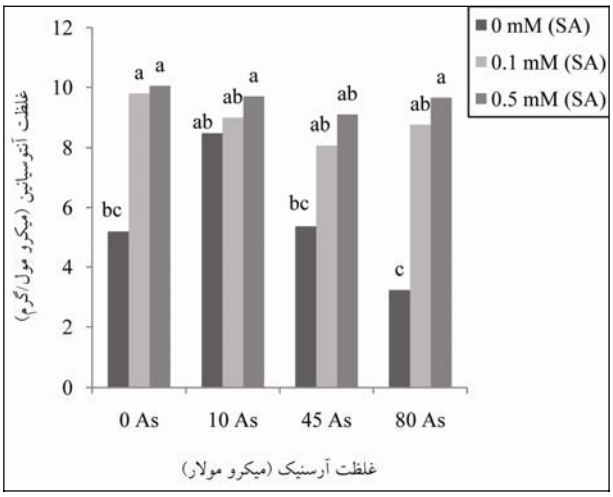
شکل ۱- اثر تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک بر وزن تر اندام هوایی گیاه بابونه، مقادیر میانگین ۳ تکرار است، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.05$ است.



شکل ۲- اثر تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک بر محتوای کلروفیل کل گیاه بابونه، مقادیر میانگین ۳ تکرار است، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.05$ است.



شکل ۳- اثر تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک بر محتوای کاروتنوئید گیاه بابونه، مقادیر میانگین ۳ تکرار است، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.05$ است.



شکل ۴- اثر تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک بر مقدار آنتوسیانین گیاه بابونه، مقادیر میانگین ۳ تکرار است، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.05$ است.

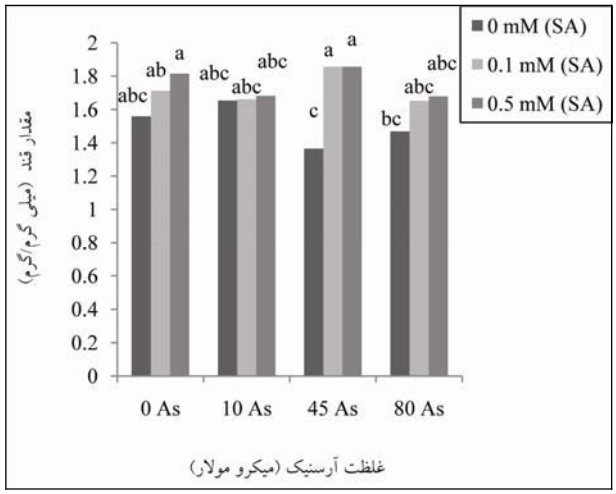
اثر برهمکنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر مقدار کربوهیدرات‌های احیا کننده

با توجه به شکل ۵، کاربرد همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک ۴۵ میکرومولار نسبت به گیاهان تیمار نشده با سالیسیلیک‌اسید معنی‌دار است و باعث افزایش معنی‌دار مقدار قند می‌گردد. غلظت بالای کربوهیدرات‌ها باعث کاهش خسارت‌های اکسیداتیو و حفظ ساختار پروتئین در طی کمبود آب محسوب می‌شود. به نظر می‌رسد که سالیسیلیک‌اسید با افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، کاهش تنش اکسیداتیو و حفاظت از غشاهای کلروپلاستی و سلولی و حفاظت از ماکرومولکول‌هایی، نظیر پروتئین‌ها، موجب افزایش

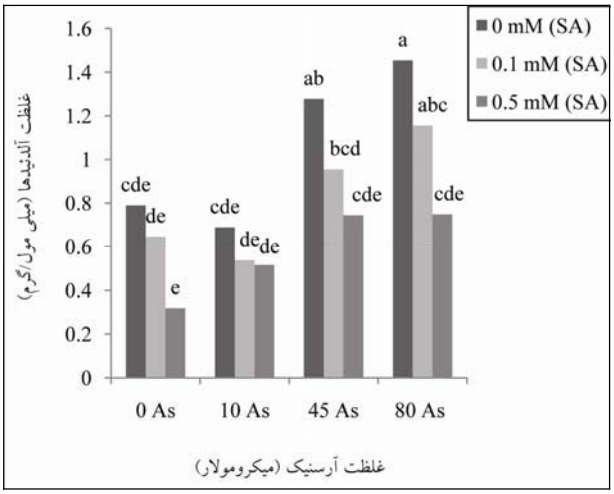
میزان قندهای موجود در گیاهان می‌شود و قندها علاوه بر نقش‌های اصلی خود، در تنظیم اسمزی نیز به گیاهان کمک می‌کنند (Khodary, 2004).

اثر برهمکنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر مقدار سایر آلدئیدهای غشا

کاربرد همزمان سالیسیلیک‌اسید ۰/۵ میلی‌مولار و آرسنیک ۴۵ و ۸۰ میکرومولار معنی‌دار بود و باعث کاهش معنی‌دار آلدئیدها نسبت به گیاهان بدون سالیسیلیک‌اسید گردید (شکل ۶). به نظر می‌رسد که فلزات سنگین باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند و این رادیکال‌ها با اثر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیر اشباع در غشا، واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون را تحریک کرده، به تخریب اسیدهای چرب و افزایش میزان آلدئیدهای غشا منجر می‌گردد (Candan and Tarhan, 2003). پیش‌تیمار دانه‌های کتان با سالیسیلیک‌اسید نیز باعث بهبود تأثیرات تخریبی ناشی از کادمیوم بر میزان پراکسیداسیون لیپیدها گردیده است. تأثیرات سودمند سالیسیلیک‌اسید می‌تواند به افزایش فعالیت مکانیسم‌های دفاعی، مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مربوط باشد. از طرف دیگر، سالیسیلیک‌اسید ترکیب جاروب‌کننده (Scavenger) مستقیم رادیکال‌های هیدروکسیل و همبندکننده آهن است و اثر تخریبی رادیکال‌های هیدروکسیل ناشی از واکنش فنتون را کاهش می‌دهد (Dinis *et al.*, 1994).



شکل ۵- اثر تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک بر مقدار کربوهیدرات‌های احیا کننده گیاه بابونه، مقادیر میانگین ۳ تکرار است، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.05$ است.



شکل ۶- اثر تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک بر مقدار سایر آلدئیدهای اندام هوایی گیاه بابونه، مقادیر میانگین ۳ تکرار است، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.05$ است.

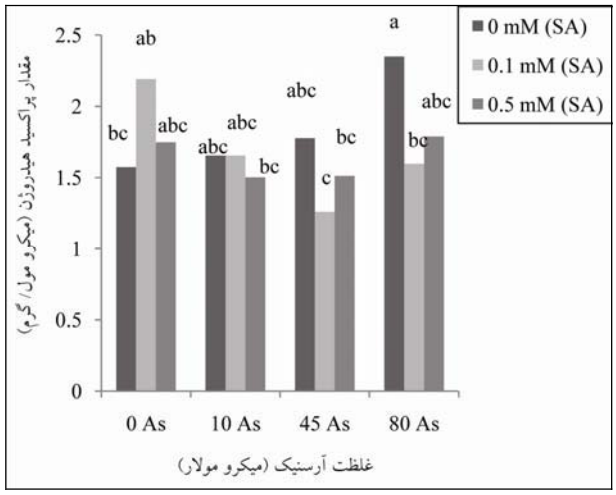
اثر برهمکنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر مقدار پراکسید هیدروژن

با توجه به شکل ۷، تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک تنها در تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید ۰/۱ میلی‌مولار و آرسنیک ۸۰ میکرومولار معنی‌دار است و باعث کاهش معنی‌دار پراکسیدهیدروژن بافت نسبت به گیاهان بدون سالیسیلیک‌اسید گردیده است. مطالعات انجام شده نشان داده است که نقش سالیسیلیک‌اسید در کاهش تجمع H_2O_2 در گیاهان تحت تنش فلز سنگین، احتمالاً مربوط به تنظیم فعالیت

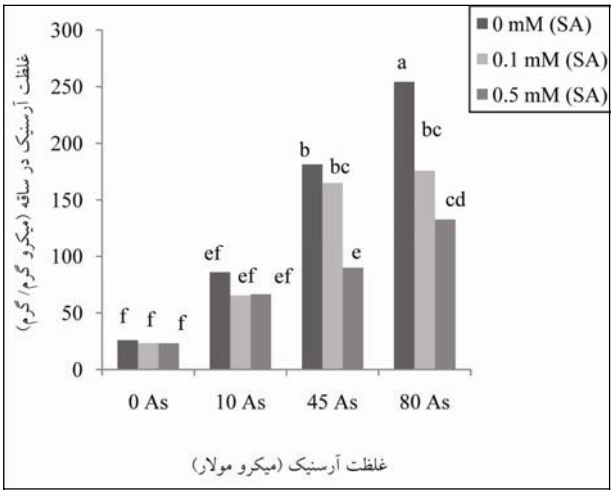
آنزیم‌ها یا آنتی‌اکسیدان‌های غیر از آنزیم کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) است، چون پیش‌تیمار سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های CAT و APX در گیاهچه‌های در معرض سرب (Jing *et al.*, 2007) و افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در گیاهان ذرت شده است (Krantev *et al.*, 2008).

اثر برهمکنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر مقدار تجمع آرسنیک در اندام هوایی گیاه بابونه

با توجه به شکل ۸، تیمار همزمان در اکثر موارد، به جز در تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار) و آرسنیک ۱۰ میکرومولار معنی‌دار است و تیمار سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش تجمع آرسنیک در بخش هوایی گردیده است. یکی از مکانیسم‌های حفاظتی سالیسیلیک‌اسید در گیاهان تحت تنش فلز سنگین، کنترل جذب و انتقال فلز سنگین از طریق ریشه است. برای مثال، علت کاهش سمّیت کادمیوم در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک‌اسید می‌تواند به دلیل کاهش جذب کادمیوم و ممانعت از ورود این فلز و یا تحریک خروج کادمیوم از ریشه‌ها باشد (Hall, 2002).



شکل ۷- اثر تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک بر مقدار پراکسید هیدروژن گیاه بابونه، مقادیر میانگین ۳ تکرار است، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.05$ است.



شکل ۸- اثر تیمار همزمان سالیسیلیک‌اسید و آرسنیک بر تجمع آرسنیک در اندام هوایی گیاه بابونه، مقادیر میانگین ۳ تکرار است، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0.05$ است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که افشانه‌سازی سالیسیلیک‌اسید در گیاهان بابونه در معرض آرسنیک باعث افزایش وزن تر بخش هوایی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، مقدار آنتوسیانین‌ها، مقدار قندهای احیاکننده شده است، در حالی که مقدار سایر آلدئیدها، تجمع آرسنیک و مقدار پراکسید هیدروژن نسبت به گیاهان بدون سالیسیلیک‌اسید کاهش یافته است. بنابراین، کاربرد خارجی سالیسیلیک‌اسید، مقاومت گیاهانی مانند بابونه را در برابر سمّیت آرسنیک تا حدودی افزایش می‌دهد.

منابع

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell and Environment 24: 1337-1344.

Belkhadi, A., Hediji, H., Abbes, Z., Nouairi, I., Barhoumi, Z., Zarrouk, M., Chaibi, W. and Djebali, W. (2010) Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L.. Ecotoxicology and Environmental Safety 1-8.

Candan, N. and Tarhan, L. (2003) Change in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn-stressed Mentha pulegium. Journal of Chemistry 27: 21-30.

Chen, J., Wen, P., Kong, W., Pan, Q., Zhan, J., Li, J., Wan, S. and Huang, W. (2006) Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. Postharvest Biology and Technology 40: 64-72.

Costa, M., Civell, P. M., Chaves, A. R. and Martinez, G. A. (2005) Effects of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20°C. Post harvest Biology and Technology 35: 191-199.

Dinis, T. C., Maderia, V. M. and Almeida, L. M. (1994) Action of phenolic derivates (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Archieves of Biochemistry and Biophysics 315: 161-169.

Drazic, G. and Mihailovic, N. (2005) Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. Plant Physiology 168: 511-517.

El-Tayeb, M. A. (2005). Response of barley gains to the interactive effect of salinity and salicylic acid . Plant Growth Regulation 45: 215-225.

Gomez-Caminero, A., Howe, P., Hughes, M., Kenyon, E., Lewis, D. R., Moore, M. and Ng, J. (2001) Arsenic and arsenic. compounds. World Health Organization 44: 591-594.

Hall, J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Experimental Botany 53: 1- 11.

Jing, CH., Cheng, Z., Li-ping, L., Zhong-yang, S. and Xue-bo, P. (2007) Effects of exogenous salicylic acid on growth and H2O2-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. Journal of Environmental Science 19: 44- 49.

Jithesh, M. N., Prashanth, S. R., Sivaprakash, K. R. and Parida, A. K. (2006) Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defense. Journal of Genetics 85(3): 237-254.

Khan, I., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2009) Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 626-634.

Khodary, S. E. A. (2004) Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed Maize Plants . International Journal of Agriculture and Biology 6: 5-8.

Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G. and Popova, L. (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maiz plants. Plant Physiology 165: 920-931.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids; Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 48: 350-382.

Meirs, S., Philosophhadas, S. and Aharoni, N. (1992) Ethylene increased accumulation of fluorescent lipid peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. Journal of the American Society for Horticulture Science 117:128-132.

Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. and Dietz, K. (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. Plant Physiology 132: 272-281.

Mishra, A. and Choudhuri, M. A. (1999) Effects of salicylic acid on heavy metal induced membrane degradation mediated by lipoxygenase in rice. Biological Plant 42: 409-415.

Noreen, S. and Ashraf, M. (2008) Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annus* L.) by exogenous application of salicylic acid: growth and photosynthesis. Pakistan Journal of Botany 40(4): 1657-1663.

Popova, L., Ananieva, V., Hristova, V., Christov, K., Geovgieva, K., Alexieva, V. and Stoinova, Z. (2003) Salicylic acid and methyl jasmonate-induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. Bulgarian Journal of Plant Physiology (Special issue) 133-152.

Shi, Q. and Zhu, Z. (2008) Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. Environmental and Experimental Botany 63: 317-326.

Solecka, D. (1997) Role of phenyl propanoid compounds in plant responses to different stress factor. Acta Physiology Plant 19(3): 257-268.

Somogy, M. (1952) Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry 195: 19-29.

Stoeva, N. and Bineva, T. (2003) Oxidative changes and photosynthesis in OAT plants grown in As-conttaminated Soil. Bulgarian journal of Plant Physiology 29(1-2): 87-95.

Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology 64: 88-93.

Zhou, Z. S., Guo, K., Abdou-Elbaz, A. and Yang, Z. M. (2009) Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa.* Environmental and Experimental Botany 65: 27- 34.

Arsenic and salicylic acid interaction on the growth and some other physiological parameters in *Matricaria recutita*

Nasrin Fazelian and Zahra Asrar *

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Abstract

In this study, the effects of salicylic acid on arsenic toxicity in chamomile plants (*Matricaria recutita*) were studied by investigating the plant growth and some of the biochemical parameters. Treatment by arsenic (0, 10, 45 and 80 μM) of chamomile plants for 14 days caused serious chlorosis and reduction of plant growth. Also, arsenic significantly increased the accumulation of reactive oxygen species, and resulted in the lipid peroxidation, which was confirmed the by increased concentration of membrane aldehyds. Pre-treatment of the plants by salicylic acid (spray with 0.1 and 0.5 mM salicylic acid for 10 days before arsenic stress) increased the rate of plant growth, photosynthesis, anthocyanins and reduced carbohydrates and significantly decreased lipid peroxidation, hydrogen peroxide and accumulation of arsenic in the leaves of arsenic-exposed plants. The results showed that salicylic acid could improve plant growth to some extend and increased chamomile resistance to arsenic stress.

Key words: Arsenic, *Matricaria recutita*, Lipids peroxidation, Hydrogen peroxide, Photosynthetic pigments, Salicylic acid

* Correspong Author: zasrar@mail.uk.ac.ir

زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هشتم، تابستان ۱۳۹۰، صفحه ۱۳-۲۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۸/۱۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۱۲/۲۴
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۳/۳۰

تأثیر پلی‌آمین‌های اگزوژن بر رشد، فتوسنتز و متابولیسم فنل‌ها در گیاه توتون تحت تنش شوری

رقیه حاجی‌بلند * و نشمین ابراهیمی
گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

در این پژوهش، تأثیر سدیم کلرید (غلظت ۵۰ میلی‌مولار) و دو نوع پلی‌آمین (غلظت ۰/۵ میلی‌مولار) بر روی رشد و فتوسنتز گیاه گلیکوفیت توتون (*Nicotiana rustica* L.) در محیط‌کشت هیدروپونیک بررسی گردید. شوری منجر به کاهش رشد گیاه منجر گردید. کاربرد پوترسین در شرایط شاهد (بدون شوری) موجب افزایش و اسپرمیدین موجب کاهش رشد آن‌ها شد. پوترسین تنها در ریشه عامل تخفیف اثر تنش شوری بود، ولی اسپرمیدین این کار را در هر دو اندام انجام داد. بدون کاربرد پلی‌آمین‌ها، شوری موجب کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل a و نسبت کلروفیل a/b گردید، ولی پس از کاربرد پلی‌آمین‌ها این دو شاخص افزایش یافت. هرچند کاربرد پلی‌آمین‌ها موجب کاهش تثبیت خالص CO_2 در گیاهان شاهد گردید، ولی در گیاهان تیمار شده با شوری آن را افزایش داد. مقدار فنل کل برگ‌ها تحت تأثیر تنش شوری قرار نگرفت، ولی کاربرد پوترسین در شرایط شوری موجب کاهش مقدار فنل‌ها و اسپرمیدین موجب افزایش آن گردید. فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز و پلی فنل اکسیداز در برگ‌ها تحت تأثیر شوری کاهش یافت، ولی کاربرد پلی‌آمین‌ها به ترتیب موجب افزایش و کاهش فعالیت این دو آنزیم شد. کاهش رشد در گیاهان شاهد تحت تأثیر کاربرد اسپرمیدین، احتمالاً نتیجه کاهش فتوسنتز و مقدار پروتئین و افزایش مقدار فنل‌های برگ بوده است. تخفیف اثر تنش شوری می‌تواند نتیجه بهبود برخی واکنش‌های فتوشیمیایی برگ و افزایش تبادل گاز فتوسنتزی باشد. هرچند متابولیسم ترکیبات فنلی به شدت تحت تأثیر کاربرد پلی‌آمین‌ها قرار گرفت، ولی ارتباطی بین تغییر در متابولیسم فنل‌ها و اثر تخفیف‌دهندگی پلی‌آمین‌ها دیده نشد.

واژه‌های کلیدی: توتون، تنش شوری، پلی‌آمین، ترکیبات فنلی

مقدمه

شوری یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی است که رشد و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. گونه‌های گیاهی بر اساس توانایی رشد در شرایط شور به دو گروه هالوفیت و گلیکوفیت طبقه‌بندی می‌شوند (Pitman and Läuchli, 2004). گونه‌های زراعی مهم

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ehsan@tabrizu.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۱۱۳۳۹۲۷۱۹

به طور عمده گیاهان گلیکوفیت هستند که شوری عملکرد آنها را به شدت کاهش می‌دهد (Marschner, 1995). شوری ناشی از سدیم کلرید از رایج‌ترین انواع شوری در خاک‌های زراعی ایران است. گیاهان برای مقابله با شوری از روش‌های متنوعی استفاده می‌کنند تا تأثیرات ناشی از تنش را تخفیف دهند. افزایش سنتز و انباشتگی اسمولیت‌ها یکی از این روش‌هاست که موجب تداوم جذب آب شده، تنش اسمزی را تخفیف می‌دهد. از جمله اسمولیت‌های با وزن مولکولی کم می‌توان به پرولین، گلیسین بتائین و سرانجام پلی‌آمین‌ها اشاره نمود (Rhodes *et al.*, 2004).

پلی‌آمین‌ها پلی کاتیون‌های مهمی هستند که در مراحل مختلف فیزیولوژیک و نموی گیاهان نقش دارند. پلی‌آمین‌ها در القای تقسیم سلولی، جنین‌زائی، ریخت‌زائی، نمو گل، میوه و دانه و پیری نقش ایفا می‌کنند. مهمترین پلی‌آمین‌ها شامل اسپرمیدین (تری آمین) اسپرمین (تترا آمین) و پیش‌ساز آنها پوترسین (دی آمین) است. در بافت گیاهان پلی‌آمین‌ها به شکل هم‌یوغ (conjugate) با مولکول‌های آلی دیگر و یا آزاد یافت می‌شوند (Martin-Tanguy, 2001).

اخیراً نقش پلی‌آمین‌ها در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیر زیستی، از جمله شوری و خشکی مورد توجه قرار گرفته است (Groppa and Benavides, 2008). در بسیاری از موارد، تنش به انباشتگی پلی‌آمین‌های آزاد و هم‌یوغ منجر می‌گردد که نشان می‌دهد بیوسنتز پلی‌آمین‌ها یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاهان به تنش است (Martin-Tanguy, 2001). تحت تنش شوری، بیان ژن‌های درگیر در سنتز این آنزیم‌ها از جمله آرژینین دکربوکسیلاز و فعالیت آنها افزایش می‌یابد که موجب افزایش مقدار پلی‌آمین‌ها شده و به افزایش مقاومت به تنش شوری منجر می‌گردد. از سوی دیگر، کاهش سنتز پلی‌آمین‌ها به دلیل کاهش فعالیت آنزیم آرژینین دکربوکسیلاز باعث کاهش تحمل به شوری می‌شود (Liu *et al.*, 2008).

انواع پلی‌آمین‌ها از نظر تأثیر تخفیف تنش با یکدیگر متفاوتند. رقم‌های متحمل شوری در گیاه برنج، مقدار بالایی اسپرمیدین انباشته می‌کنند، در حالی که ارقام حساس پوترسین را انباشته می‌نمایند. به بیان دیگر در این گیاه انباشتگی بالای پوترسین و کاهش اسپرمیدین و اسپرمین همراه با حساسیت به شوری است. مشابه این نتایج در سایر گونه‌ها دیده شده و به همین دلیل برخی پژوهشگران نسبت (اسپرمیدین+اسپرمین)/ پوترسین را در تعیین پاسخ گیاه به شوری، مهم قلمداد کرده‌اند (Krishnamorthy and Bhagwat, 1989). نقش اسپرمیدین و اسپرمین در حفاظت از غشاها و ممانعت از نشت الکترولیت‌ها و اسیدهای آمینه در طی تنش شوری در گیاه جو دیده شده است (Liu *et al.*, 2006).

در کنار مطالعه نقش پلی‌آمین‌های آندوژن در ایجاد تحمل شوری، اثر کاربرد اگزوژن این ترکیبات در القای مقاومت نیز در گیاهان مختلف بررسی شده است. کاربرد پلی‌آمین‌ها در گیاهان تحت تنش شوری، از پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب ماکرومولکول‌ها جلوگیری می‌کند (Tang and Newton, 2005). البته، درآزمایش با پلی‌آمین‌های اگزوژن نتایج متفاوتی بسته به نوع پلی‌آمین و گیاه مورد مطالعه به دست آمده است و مشخص نیست چرا انواع مختلف پلی‌آمین‌ها

نقش‌های متفاوتی در القای تحمل تنش ایفا می‌کنند (Liu *et al.*, 2007).

همه انواع تنش‌های غیر زیستی، از جمله شوری، تنش اکسیداتیو را القا می‌کنند (Apel and Hirt, 2004). اثر آنتی‌اکسیدانتی پلی‌آمین‌ها به طور عمده به ویژگی کاتیونی آنها مربوط است که برای برداشت رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و در نتیجه قادر به مهار پراکسیداسیون لیپیدها هستند. با این حال شواهد و داده‌های ضد و نقیضی در مورد نقش آنتی‌اکسیدانی پلی‌آمین‌های اگزوژن به دست آمده است. در برخی موارد این ترکیبات به عنوان پرواکسیدانت و القاکننده تنش و گاهی به عنوان آنتی‌اکسیدانت و کاهش‌دهنده رادیکال‌های آزاد معرفی شده‌اند (Groppa and Benavides, 2008). دلیل تفاوت در نقش این ترکیبات که بستگی به نوع پلی‌آمین و شرایط کاربرد آنها دارد، روشن نیست.

از میان پلی‌آمین‌ها، انواع هم‌یوغ شده با مولکول‌های دیگر، از اهمیت بیشتری در القای تحمل تنش برخوردارند. اتصال پلی‌آمین‌های آزاد به درشت مولکول‌ها، موجب حفاظت آنها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود، در حالی که نقش پلی‌آمین‌های آزاد، عمدتاً در تعادل اسمزی وpH سلولی است (Martin-Tanguy, 2001). پلی‌آمین‌ها معمولاً با ترکیبات فنلی، از جمله هیدروکسی سینامیک اسید هم‌یوغ می‌شوند. این آمیدهای فنولیک در اتصال کووالانسی به ماتریکس دیواره سلولی در ساختارهایی مانند لیگنین دیده شده‌اند. اصولا نه تنها پلی‌آمین‌ها، بلکه ترکیبات فنلی نیز به تنهایی به عنوان شاخص‌های تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند (Górecka *et al.*, 2007). انباشتگی انواع ترکیبات فنلی در شرایط تنشی می‌تواند به عنوان یک علامت عمل کند و برای راه‌اندازی زنجیره‌ای از واکنش‌های دیگر که در نهایت به افزایش تحمل تنش منجر می‌شوند، عمل نماید. نقش ترکیبات فنلی در دفاع آنتی‌اکسیداتیو در سلول‌های جانوری اثبات شده، ولی عمل آنها به عنوان آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های گیاهی هنوز مورد تردید است (Anderson and Jordheim, 2005). با این حال مشاهده شده است که کاهش رشد در طی تنش‌هایی مانند سمّیت فلزات سنگین، عمدتاً به افزایش انباشتگی فنل‌ها و تسریع در پلی‌مریزه شده آنها مربوط است که موجب توقف رشد می‌شود (Schützendübel *et al.*, 2001).

به رغم اینکه دلایل مختلفی در مورد سازوکار عمل پلی‌آمین‌ها در القای تحمل تنش در طی کاربرد آنها ارائه شده است (Groppa and Benavides, 2008)، ولی تاکنون نقش احتمالی این ترکیبات از طریق ایجاد تغییراتی در متابولیسم ترکیبات فنلی مطالعه نشده است. این احتمال وجود دارد که پلی‌آمین‌های اگزوژن از طریق تغییر در متابولیسم، هم‌یوغ شدگی و یا انباشتگی فنل‌ها موجب تغییر در تحمل تنش‌ها شوند.

توتون گیاهی یک‌ساله از تیره سیب‌زمینی است. دو گونه توتون معمولی (*Nicotiana tabaccum* L.) و توتون شرقی (*Nicotiana rustica* L.) اهمیت زراعی بیشتری دارند. گسترش کشت توتون شرقی از توتون معمولی بیشتر است که به دلیل بالاتر بودن مواد مؤثره و بهتر بودن رایحه آن است (خواجه‌پور، ۱۳۸۳). توتون گیاهی گلیکوفیت بوده، به شوری بسیار حساس است و رشد آن در بیش از ۵۰ میلی‌مول سدیم کلرید که در

خاک معادل هدایت الکتریکی ۵ دسی زیمنس بر متر است، متوقف شده، گیاه می‌میرد(Marschner, 1995).

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر کاربرد پلی‌آمین در القای تحمل تنش شوری در گیاه توتون انجام گرفته است. از دو پلی‌آمین پوترسین و اسپرمیدین به دلیل وجود گزارش‌های متفاوت از تأثیر دو پلی‌آمین پوترسین و اسپرمیدین بر القای تحمل شوری، از این دو پلی‌آمین استفاده شده است. میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های مربوطه در متابولیسم این ترکیبات، تحت تأثیر پلی‌آمین‌های اگزوژن، مورد سنجش قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کشت، اعمال تیمارها و برداشت

بذر گیاه توتون (*Nicotiana rustica* L.) رقم باسماس (Basmas) که از مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان غربی تهیه گردید، استفاده شد. بذرها به مدت ۵ تا ۷ دقیقه با استفاده از هیپوکلریت سدیم تجاری ۵ درصد ضدعفونی شده و سپس به دفعات با آب مقطر شستشو داده شدند. بذرهای ضدعفونی شده بر روی پرلیت مرطوب و در تاریکی جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند و هر روز با سولفات کلسیم ۰/۰۵ میلی‌مولار محلول‌پاشی شدند. مدت زمان لازم جهت جوانه‌زنی ۷ روز بود.

پس از ظهور برگ اولیه، دانه‌رُست‌های جوان به مدت ۲۴ ساعت به روشنایی انتقال یافته، پس از سبز شدن برگ‌ها، به محیط هیدروپونیک منتقل شدند. سپس دانه‌رُست‌های ۱۰ روزه به طور متوالی در محلول‌های غذایی ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ درصد هوگلند (Johnson *et al.*, 1957) هر کدام به مدت یک هفته سازگار شدند. دانه‌رُست‌های چهار هفته‌ای به تیمار شوری (۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید) انتقال داده شدند. یک هفته بعد، تیمار پلی‌آمین‌ها شامل کاربرد یکی از دو ترکیب پوترسین و اسپرمیدین (Sigma) با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌مولار به محلول غذایی آغاز شد. بنابراین تیمار شوری به مدت دو هفته و تیمار پلی‌آمین به مدت یک هفته اعمال گردید. گیاهان در اتاق رشد با شرایط دمایی ۲۰-۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰-۸۰ درصد و در دوره روشنایی/ تاریکی ۷/۱۷ ساعت نگهداری شدند. محلول غذایی هر هفته یک بار تعویض و pH آن روزانه، بر روی ۶ تنظیم شد. شش هفته پس از کاشت (دو هفته پس از تیمار شوری)، گیاهان برداشت شدند و وزن تر آنها تعیین گردید.

گروه دیگری از گیاهان برای سنجش شاخص‌های فلوئورسانس کلروفیل و تبادل گازی بررسی شده، سپس برای سنجش رنگیزه‌ها برداشت شدند. برای اندازه‌گیری فلوئورسانس کلروفیل و شاخص‌های تبادل گاز از سومین برگ جوان استفاده شد.

سنجش شاخص‌های فلوئورسانس کلروفیل

تعیین فلوئورسانس کلروفیل با استفاده از دستگاه فلوئورسانس سنج (Opti-Sciences, ADC, UK) انجام شد. شاخص‌های فلوئورسانس کلروفیل در برگ‌های سازش‌یافته به تاریکی شامل F_0 (فلوئورسانس پایه) و F_m (فلوئورسانس بیشینه) و شاخص‌های فوق در برگ‌های سازش‌یافته با روشنایی شامل F_t (شدت فلوئورسانس پایه) و F_{ms} (شدت فلوئورسانس بیشینه) اندازه‌گیری شد. سپس محاسبات لازم برای به دست آوردن سایر شاخص‌ها از جمله کارآیی بیشینه فتوشیمیایی فتوسیستم II (F_v/F_m)، ظرفیت برانگیختگی

فتوسیستم II (F'_v/F'_m)، خاموش شدگی فتوشیمیایی (q_P) و غیر فتوشیمیایی (q_N) انجام گردیدند (Oxborough, 2004).

سنجش شاخص‌های تبادل گاز

برای اندازه‌گیری شاخص‌های مختلف تبادل گاز فتوسنتزی از دستگاه (LCA4, ADC, UK) استفاده شد. شاخص‌ها شامل شدت فتوسنتز (A) بر حسب $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$، تعرق (E) بر حسب $mol\ m^{-2}s^{-1}$ و هدایت روزنه‌ای (gs) بر حسب $mol\ m^{-2}s^{-1}$ سنجش گردیدند.

سنجش رنگیزه‌ها و مقدار فنل کل

برای سنجش مقدار رنگیزه‌ها، نمونه‌های گیاهی با آب دوبار تقطیر شستشو و بر روی کاغذ صافی خشک شدند. استخراج رنگیزه با استفاده از حلال یا بافر استخراج مربوطه بر روی یخ و با هاون چینی سرد انجام شد. غلظت کلروفیل به وسیله اسپکتروفتومتر،پس از ۲۴ ساعت استخراج در استون ۱۰۰ درصد تعیین شد. جذب در ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت کلروفیل a، b و کل طبق فرمول‌های مربوطه محاسبه شد (Lichtenthaler and Wellburn, 1985).

برای سنجش مقدار فنل کل، عصاره حاصل از استخراج در حلال متانول/ کلریدریک اسید ۲:۹۸ (v/v) به مدت ۲۰ دقیقه در g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سنجش فنل کل در محلول روشناور با استفاده از معرف فولین شیکالتو (Folin-Ciocalteu) در ۷۶۰ نانومتر انجام شد. جهت تهیه محلول‌های استاندارد از غلظت‌های ۰ تا ۱۲ میکرومولار گالیک اسید استفاده شد. نتایج بر حسب $mg\ gallic\ acid\ g^{-1}\ FW$ ارائه گردید (Plessi *et al.*, 2007).

سنجش فعالیت آنزیم‌ها و مقدار پروتئین کل

برای سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL, EC 4.3.1.5) نمونه‌های گیاهی در بافر استخراج شامل بافر بورات (۱۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۷) و ۰/۱ گرم پلی وینیل پیرولیدون و ۲- مرکاپتواتانل (۱/۴ میلی‌مولار) در دمای یخ هموژن شده و سپس سانتریفیوژ گردیدند. فعالیت آنزیم در عصاره گیاه در بافر بورات (اسیدیته ۸/۸) واجد L-فنیل آلانین (۱۲ میلی‌مولار) پس از قرار گرفتن در حمام آب در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه با تشکیل سینامیک اسید سنجش گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از تغییر جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی سینامیک اسید و بر حسب $\mu mol\ trans\text{-cinnamic acid}\ min^{-1}\ mg^{-1}\ protein$ محاسبه گردید (Dickerson *et al.*, 1984).

برای سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO, EC 1.14.18.1) نمونه‌های گیاهی در بافر فسفات (۲۰۰ میلی‌مول و اسیدیته ۶/۵) و در دمای یخ هموژن و سپس سانتریفیوژ گردیدند. بافر فسفات واجد ۱۰ میلی‌مولار پیروگالل در حمام آب در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفته، سپس عصاره آنزیم به محلول واکنشی گرم اضافه شد. تغییر جذب در طول موج ۳۳۴ نانومتر به مدت ۲ دقیقه دنبال شد و فعالیت آنزیم با استفاده از محاسبه تغییر در جذب در طی یک دقیقه ($\Delta Abs\ min^{-1}\ g^{-1}\ Pro.$) گزارش گردید (Singh *et al.*, 1999).

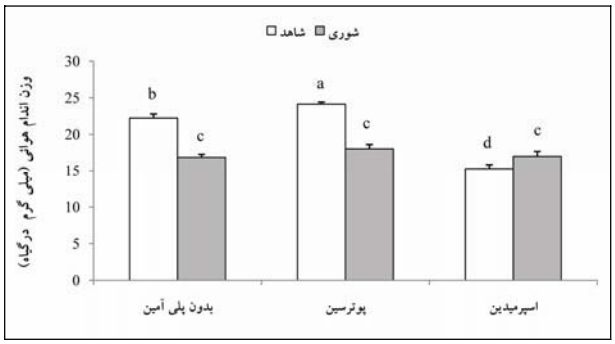
پروتئین کل با استفاده از روش برادفورد با استفاده از سرم آلبومین گاوی (Merck) به عنوان استاندارد و معرف تجاری برادفورد (Sigma) سنجش گردید (Bradford, 1976).

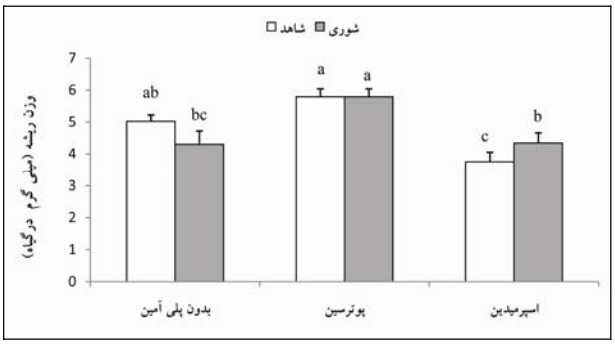
طرح آزمایشی و تجزیه داده‌ها

آزمایش در طرح بلوک‌های کامل تصادفی و با دو عامل شامل دو سطح شوری و سه سطح از کاربرد پلی‌آمین‌ها اجرا شد. تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار Sigma Stat (نسخه ۳/۰۲) و با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵٪ انجام گردید.

نتایج

شوری در گیاهانی که با پلی‌آمین‌ها تیمار نشده بودند، سبب کاهش وزن اندام هوایی گیاهان تا ۲۴ درصد گردید (شکل ۱). کاربرد پلی‌آمین‌ها در گیاهان شاهد بسته به نوع پلی‌آمین نتیجه متفاوتی داشت. پوترسین موجب افزایش وزن اندام هوایی و اسپرمیدین موجب کاهش آن شد. در حضور پوترسین اثر منفی شوری بر رشد گیاهان ۲۵ درصد بود و در نتیجه، تفاوتی با گیاهان بدون کاربرد پلی‌آمین‌ها نداشت. درگیاهان تیمار شده با اسپرمیدین، هرچند خود تحت تأثیر کاربرد این پلی‌آمین رشد کمتری داشتند، ولی وزن آنها به صورت معنی‌داری در شرایط شوری بیش از شاهد بود. رشد ریشه در غیاب پلی‌آمین‌های اگزوژن تحت تأثیر شوری قرار نگرفت ولی مشابه اندام هوایی، کاربرد پوترسین موجب افزایش و کاربرد اسپرمیدین موجب کاهش آن شد. اثر تخفیف‌دهندگی کاربرد پلی‌آمین‌ها بر رشد ریشه گیاهان در شرایط شور، مشابه اندام هوایی تنها درمورد اسپرمیدین مشاهده شد (شکل ۱).





شکل ۱- تأثیر پلی‌آمین‌های اگزوژن بر وزن اندام هوایی و ریشه در گیاه توتون شاهد و تحت تیمار شوری (۵۰ میلی‌مول سدیم کلرید). تفاوت بین ستون‌هایی که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، معنی‌دار نبوده است ($P<0.05$).

تیمار شوری در غیاب پلی‌آمین‌های اگزوژن سبب کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل a گردید، در حالی که تأثیر معنی‌داری بر مقدار کلروفیل b نداشت (جدول ۱). به همین دلیل، نسبت کلروفیل a/b درگیاهان تحت تنش شوری کاهش یافت. در حضور پوترسین اگزوژن مقدار کلروفیل a در هر دو گروه شاهد و شوری افزایش معنی‌داری نشان داد و در مورد کلروفیل b این افزایش در گیاهان شاهد معنی‌دار بود. برعکس پوترسین، اسپرمیدین اگزوژن موجب

تغییر در مقدار کلروفیل a گیاهان شاهد نشد، ولی مشابه پوترسین باعث چنین افزایشی در گیاهان تیمار شده با شوری در مقایسه با برگ‌ها در غیاب پلی‌آمین‌ها گردید. کارآیی بیشینه فتوسیستم II به صورت معنی‌داری تحت تأثیر تنش شوری یا تیمار پلی‌آمین قرار نگرفت، ولی ظرفیت برانگیختگی فتوسیستم II در گیاهان تیمار شده با شوری کاهش یافت. هر دو پلی‌آمین در شرایط شوری، ظرفیت برانگیختگی فتوسیستم II را افزایش دادند. شوری موجب کاهش خاموش‌شدگی فتوشیمیایی و غیر فتوشمیایی گردید و بر خلاف تأثیری که بر روی ظرفیت برانگیختگی فتوسیستم II داشت، کاربرد پلی‌آمین‌ها نه تنها این شاخص‌ها را بهبود نبخشید، بلکه موجب کاهش ملایم و یا معنی‌دار آنها در هر دو گروه شاهد و شوری گردید (جدول ۱).

جدول ۱- تأثیر کاربرد دو نوع پلی‌آمین بر مقدار کلروفیل a، b، کلروفیل کل ($mg\ g^{-1}\ FW$) و نسبت کلروفیل a/b و شاخص‌های مختلف فلوئورسانس کلروفیل شامل کارآیی بیشینه فتوشیمیایی فتوسیستمII (F_v/F_m)، ظرفیت انگیختگی فتوسیستم II (F'_v/F'_m)، خاموش‌شدگی فتوشیمیایی (q_P) و غیرفتوشیمیایی (q_N) در گیاه توتون تحت تیمار شاهد و شوری (۵۰ میلی‌مول سدیم کلرید). تفاوت بین داده‌های مربوط به یک ستون که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، معنی‌دار نبوده است ($P<0.05$).

نوع تیمار	تیمار پلی‌آمین	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کلروفیل a/b
شاهد	بدون پلی‌آمین	۱/۵۳±۰/۰۳ b	۰/۶۱±۰/۰۱ b	۲/۲۱±۰/۰۴ b	۲/۵۳±۰/۰۶ a
	پوترسین	۱/۷۶±۰/۰۴ a	۰/۷۰±۰/۰۵ a	۲/۵۳±۰/۱۰ a	۲/۵۲±۰/۱۳ a
	اسپرمیدین	۱/۵۴±۰/۱۱ b	۰/۶۰±۰/۰۴ b	۲/۱۹±۰/۱۵ b	۲/۵۵±۰/۰۳ a
شوری	بدون پلی‌آمین	۱/۲۷±۰/۰۸ c	۰/۵۹±۰/۰۲ b	۲/۰۴±۰/۰۸ b	۲/۱۳±۰/۰۴ b
	پوترسین	۱/۵۰±۰/۰۵ b	۰/۶۱±۰/۰۶ b	۲/۲۲±۰/۰۸ b	۲/۴۸±۰/۲۸ a
	اسپرمیدین	۱/۵۶±۰/۰۷ b	۰/۶۲±۰/۰۳ ab	۲/۲۱±۰/۱۵ b	۲/۵۴±۰/۰۲ a
		F_v/F_m	F'_v/F'_m	q_P	q_N
شاهد	بدون پلی‌آمین	۰/۸۳۹±۰/۰۰۵ a	۰/۵۹±۰/۰۱ b	۰/۸۷۰±۰/۰۰۶ a	۰/۳۳۸±۰/۰۲۶ a
	پوترسین	۰/۸۴۱±۰/۰۰۳ a	۰/۶۱±۰/۰۱ ab	۰/۷۹۰±۰/۰۱۸ bc	۰/۲۴۲±۰/۰۱۸ bc
	اسپرمیدین	۰/۸۴۸±۰/۰۰۳ a	۰/۶۰±۰/۰۱ b	۰/۷۹۸±۰/۰۰۶ bc	۰/۲۶۱±۰/۰۰۷ b
شوری	بدون پلی‌آمین	۰/۸۳۴±۰/۰۱۰ a	۰/۵۴±۰/۰۱ c	۰/۸۱۶±۰/۰۱۲ b	۰/۲۵۶±۰/۰۱۷ bc
	پوترسین	۰/۸۲۶±۰/۰۳۵ a	۰/۶۳±۰/۰۱ a	۰/۷۶۲±۰/۰۰۶ c	۰/۲۲۲±۰/۰۰۷ c
	اسپرمیدین	۰/۸۵۰±۰/۰۰۴ a	۰/۶۱±۰/۰۲ ab	۰/۷۹۵±۰/۰۲۴ bc	۰/۲۵۴±۰/۰۱۵ bc

شوری سبب کاهش ۳۹ درصدی در شدت تثبیت خالص CO_2 گردید که همراه با کاهش هدایت روزنه‌ای و کاهش تعرق بود. تثبیت خالص CO_2 در گیاهان شاهد با کاربرد پلی‌آمین‌ها کاهش یافت. این کاهش تحت تأثیر تیمار پوترسین بیش از آن بر اثر کاربرد اسپرمیدین بود. کاهش فتوسنتز خالص تحت تأثیر پلی‌آمین‌ها همراه با کاهش هدایت روزنه‌ای نبود. در گیاهان تیمار شده با شوری، برعکس، کاربرد پلی‌آمین‌ها موجب افزایش تثبیت خالص CO_2، هدایت روزنه‌ای و تعرق برگ‌ها گردید (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر کاربرد دو نوع پلی‌آمین بر مقدار شاخص‌های تبادل گاز شامل فتوسنتز A ($\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$)، تعرق E ($mol\ m^{-2}s^{-1}$) و هدایت روزنه‌ای g_s ($mol\ m^{-2}s^{-1}$) در گیاه توتون تحت تیمار شاهد و شوری (۵۰ میلی‌مول سدیم کلرید). تفاوت بین داده‌های مربوط به یک ستون که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، معنی‌دار نبوده است ($P<0.05$).

نوع تیمار	تیمار پلی‌آمین	A	E	g_s
شاهد	بدون پلی‌آمین	۵/۶۵±۰/۰۸ a	۱/۰۹±۰/۱۵ a	۱/۰۶±۰/۷۹ ab
	پوترسین	۴/۳۸±۰/۰۶ c	۱/۱۸±۰/۱۰ a	۱/۵۹±۰/۷۷ ab
	اسپرمیدین	۴/۹۰±۰/۰۵ b	۱/۲۵±۰/۰۷ a	۱/۹۶±۰/۶۴ ab
شوری	بدون پلی‌آمین	۳/۴۷±۰/۰۶ d	۰/۷۶±۰/۰۸ b	۰/۳۴±۰/۰۸ b
	پوترسین	۵/۰۵±۰/۱۶ b	۱/۲۶±۰/۱۲ a	۲/۷۴±۱/۶۶ a
	اسپرمیدین	۵/۴۶±۰/۱۴ a	۱/۲۷±۰/۰۴ a	۲/۲۱±۰/۶۴ ab

مقدار فنل کل برگ‌ها تحت تأثیر تنش شوری قرار نگرفت و تأثیر پلی‌آمین‌ها به نوع آنها بستگی داشت. پوترسین در گیاهان شاهد تأثیری بر مقدار کل فنل‌های برگ نداشت، ولی در شرایط شوری موجب کاهش غلظت فنل‌ها شد. برعکس، اسپرمیدین سبب افزایش ترکیبات فنلی برگ هم در شرایط شاهد و هم در تیمار شوری گردید. در ریشه‌ها، نه تنها شوری موجب کاهش فنل کل گردید، بلکه هر دو نوع پلی‌آمین به کار رفته نیز این کاهش را تشدید کردند (جدول ۳).

فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز برگ‌ها تحت تأثیر شوری تا ۲۰ درصد کاهش یافت. کاربرد پلی‌آمین‌ها بسته به تیمار، تأثیر متفاوتی روی فعالیت این آنزیم داشت. در گیاهان شاهد کاهش معنی‌دار و در گیاهان تیمار شده با شوری افزایش معنی‌دار در فعالیت این آنزیم تحت تأثیر کاربرد پلی‌آمین‌ها مشاهده شد. اثر کاربرد اسپرمیدین در هر دو کاهش و افزایش فعالیت آنزیم، چشمگیرتر از اثر پوترسین بود. بر خلاف اندام هوایی، شوری موجب افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز ریشه شد و کاربرد اسپرمیدین نیز موجب افزایش فعالیت در هردو تیمار شوری و شاهد گردید. پوترسین بر خلاف اسپرمیدین فعالیت این آنزیم را کاهش داد که درگیاهان تحت تنش شوری این اثر معنی‌دار بود (جدول ۳).

مشابه آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، شوری سبب کاهش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز گردید. تأثیر مشابهی نیز توسط کاربرد پلی‌آمین‌ها مشاهده شد و اثر اسپرمیدین مشابه آنچه برای آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز مشاهده شده بود، بیش از اثر پوترسین بوده است. در ریشه برخلاف برگ‌ها، شوری موجب افزایش فعالیت پلی فنل اکسیداز گردید و کاربرد پلی‌آمین‌ها نیز سبب افزایش این فعالیت شد و اثر اسپرمیدین بیش از اثر پوترسین بوده است. در عین حال، مقایسه بین تیمارهای شاهد و شوری پس از کاربرد اسپرمیدین نشان داد که فعالیت این آنزیم در شرایط شوری کاهش می‌یابد. مشابه این تأثیر در برگ‌ها نیز دیده شد (جدول ۳).

مقدار پروتئین کل برگ‌ها و ریشه به دنبال تیمار شوری تا ۳۰ درصد کاهش یافت. کاربرد پلی‌آمین‌ها نیز چنین تأثیری را بر روی مقدار کل پروتئین گیاهان داشت. تأثیر اسپرمیدین در کاهش مقدار پروتئین کل بیش از اثر کاربرد پوترسین بود (جدول ۳).

جدول ۳- تأثیر کاربرد دو نوع پلی‌آمین بر مقدار فنل کل (mg gallic acid g^{-1} FW)، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (nmol trans-cinnamic acid min^{-1} mg^{-1} pro.)، پلی فنل اکسیداز (ΔAbs min^{-1} g^{-1} pro.) و مقدار پروتئین کل (mg g^{-1} FW) در گیاه توتون تحت تیمار شاهد و شوری (۵۰ میلی‌مول سدیم کلرید). تفاوت بین داده‌های مربوط به یک ستون که با حروف یکسان مشخص شده‌اند، معنی‌دار نبوده است ($P<0.05$).

نوع تیمار	تیمار پلی‌آمین	فنل کل	فنیل آلانین آمونیالیاز	پلی فنل اکسیداز	پروتئین کل
			اندام هوایی		
شاهد	بدون پلی‌آمین	۸/۴۲±۰/۳۵ c	۲۶۸۶±۱۳۵ a	۵۹±۲ a	۴۱۴±۶ a
	پوترسین	۷/۶۴±۰/۲۸ c	۲۴۰۹±۱۴۸ b	۵۴±۱ b	۳۴۲±۸ b
	اسپرمیدین	۱۰/۸۹±۱/۷۲ b	۱۶۷۷±۵۴ d	۴۴±۲ d	۲۹۸±۷ cd
شوری	بدون پلی‌آمین	۸/۶۷±۰/۲۶ c	۲۱۶۳±۶۱ c	۴۷±۲ cd	۲۹۱±۷ d
	پوترسین	۵/۹۰±۰/۳۱ d	۲۴۶۴±۹۱ ab	۵۰±۲ c	۳۳۳±۶ b
	اسپرمیدین	۱۷/۱۲±۰/۱۴ a	۲۶۱۴±۸۲ ab	۳۵±۲ e	۳۰۹±۳ c
			ریشه		
شاهد	بدون پلی‌آمین	۸/۷۵±۰/۱۱ a	۷۴±۳ c	۱۴۳±۳ d	۳۶۱±۱۲ a
	پوترسین	۵/۲۵±۰/۱۴ e	۷۰±۲ cd	۱۵۷±۵ cd	۳۰۰±۸ c
	اسپرمیدین	۶/۵۲±۰/۱۱ d	۹۴±۴ a	۲۳۲±۱۰ a	۲۴۱±۱۱ e
شوری	بدون پلی‌آمین	۷/۰۱±۰/۱۸ c	۸۲±۲ b	۱۵۶±۵ cd	۲۷۵±۵ d
	پوترسین	۶/۴۷±۰/۱۸ d	۶۷±۱ d	۱۷۰±۵ c	۳۲۲±۱۰ b
	اسپرمیدین	۶/۴۹±۰/۰۷ d	۹۲±۲ a	۱۹۴±۱۰ b	۲۶۹±۹ d

بحث

رشد گیاه توتون تحت تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار، کاهش چشمگیری نشان داد. توتون گیاهی حساس به شوری است و رشد آن به شدت تحت تأثیر نمک قرار می‌گیرد (Marschner, 1995). در پژوهش حاضر نیز غلظت‌های ۷۵ میلی‌مولار نمک و بالاتر موجب مرگ گیاهان شد (مشاهدات شخصی) و به همین دلیل حداکثر غلظت نمک برای مطالعه اثر شوری در این گیاه در محدوده ۵۰ میلی‌مولار انتخاب شد.

کاربرد پلی‌آمین‌ها روی رشد گیاهان در شرایط شاهد مؤثر بود که به نوع پلی‌آمین بستگی داشت. نقش پوترسین در افزایش رشد گیاهان در شرایط شاهد احتمالاً مربوط به اثر آنتی‌اکسیداتیو، کمک به تعادل کاتیون-آنیون (Tang and Newton, 2005) و یا احتمالاً عمل به عنوان منبع ازت بوده است. از سوی دیگر، اثر منفی کاربرد اسپرمیدین روی رشد گیاهان که دارای یک گروه آمینی بیشتر نسبت به پوترسین است، می‌تواند به دلایلی از جمله تحریک سنتز بازدارنده‌های رشد مانند اتیلن باشد (Gallardo *et al.*, 1996). دلیل احتمالی دیگر افزایش فعالیت پلی‌آمین اکسیدازها و تولید پراکسید ئیدروژن و اختلال در پتانسیل عرض غشائی میتوکندری‌هاست (Seiler, 2004). دلایل احتمالی دیگر در ادامه بحث ذکر خواهد شد.

بررسی اثر کاربرد پلی‌آمین‌ها بر شرایط شوری، نشان داد که پوترسین تنها در ریشه عامل تخفیف اثر تنش شوری

است، ولی اسپرمیدین این کار را در هر دو اندام انجام می‌دهد. رشد گیاهان تحت تیمار مضاعف شوری و اسپرمیدین بیشتر از رشد گیاهان در شرایط فاقد نمک بوده است. می‌توان این تأثیر را به دلیل عمل پلی‌آمین‌ها به عنوان اسموتیکوم و نیز برقرار کردن تعادل بار (Zhu *et al.,* 2006) قلمداد کرد. این داده‌ها تفاوت بین عمل پلی‌آمین‌های مختلف را در رشد گیاهان و نیز تخفیف تنش نشان می‌دهد.

بررسی شاخص‌های فلوئورسانس کلروفیل و رنگیزه‌ها پیشنهاد می‌کند که کاهش مقدار کلروفیل a در طی تیمار شوری دلیل عمده کاهش ظرفیت برانگیختگی فتوسیستم II بوده است؛ به گونه‌ای که افزایش معنی‌دار در مقدار کلروفیل a توسط کاربرد پلی‌آمین‌های اگزوژن نیز در شرایط شوری موجب افزایش ظرفیت برانگیختگی فتوسیستم II گردید. مقدار کلروفیل a در مراکز واکنشی یکی از عوامل تعیین‌کننده کارآیی عملی یا ظرفیت برانگیختگی فتوسیستم II است (Oxborough, 2004). با این حال، کاهش خاموش‌شدگی فتوشیمیایی که معیاری برای انتقال الکترون به سمت واکنش‌های بیوشیمیایی فتوسنتز است و نیز خاموش‌شدگی غیر فتوشیمیایی که شاخص جلوگیری از آسیب الکترون‌های مازاد و تبدیل انرژی آنها به حرارت است (Oxborough, 2004)، نه تنها تحت تأثیر شوری کاهش یافت، بلکه کاربرد پلی‌آمین‌ها نیز موجب کاهش بیش از پیش آنها گردید. اصولاً کاهش خاموش‌شدگی فتوشیمیایی می‌تواند به دلیل آسیب فتوسیستم II باشد که می‌تواند به دلیل مهار نوری که یکی از دلایل آن کاهش کلروفیل (Pätsikkä *et al.* 2002) و نیز کاهش همزمان خاموش‌شدگی غیر فتوشیمیایی تحت تأثیر شوری است، اتفاق افتد. با این حال به دلیل اینکه کاربرد پلی‌آمین‌ها موجب افزایش کلروفیل a گردید، احتمال می‌رود در این مورد تنها سازوکار دوم؛ یعنی کاهش خاموش‌شدگی غیر فتوشیمیایی عمل کرده باشد. در واقع، افزایش ظرفیت برانگیختگی فتوسیستم II تحت تأثیر پلی‌آمین‌های اگزوژن، موجب افزایش الکترون‌های پرانرژی در محل مراکز واکنشی شده و به دلیل کاهش همزمان خاموش‌شدگی غیر فتوشمیایی افزایش آسیب را سبب گردیده است. کاهش خاموش شدگی غیر فتوشیمیایی می‌تواند به دلیل کاهش رنگیزه‌های مسؤول از جمله کاروتنوئیدها باشد (Müller *et al.*, 2001).

بسته شدن روزنه‌ها در شرایط شوری به دلیل مقابله با اتلاف بیشتر آب و کاهش پتانسیل آب بافت‌های تحت تأثیر شوری است و در بسیاری دیگر از گونه‌ها نیز دیده شده است (Tattini *et al.,* 1999). با این حال، تأثیر پلی‌آمین‌های اگزوژن بر روی تبادل گاز فتوسنتزی تاکنون بررسی‌های زیادی را به خود اختصاص نداده است. در پژوهش حاضر، تحت تأثیر پلی‌آمین‌ها، فتوسنتز گیاهان تیمار شده با شوری افزایش یافت که با تغییر رفتار روزنه‌ها بر اثر کاربرد پلی‌آمین‌ها سازگار بود. در گیاهان تیمار شده با شوری، پلی‌آمین‌ها با باز کردن روزنه‌ها نه تنها تعرق را افزایش دادند، بلکه موجب افزایش تثبیت خالص CO_2 نیز شدند. احتمال می‌رود این کار به دلیل عمل پلی‌آمین‌ها به عنوان اسموتیکوم و افزایش تورژسانس سلول‌های روزنه و گشودگی آنها رخ داده باشد. نقش پلی‌آمین‌ها به عنوان اسمولیت‌های سازگار در سایر بافت‌های گیاهان گزارش شده است (Zhu *et al.,* 2006). هرچند نقش اختصاصی پلی‌آمین‌ها در سلول‌های روزنه تاکنون بررسی نشده است، لیکن افزایش فعالیت پمپ‌های پروتون تونوپلاستی در سلول‌های ریشه تحت تأثیر پلی‌آمین‌های اگزوژن مشاهده

شده است (Liu *et al.,* 2006) که به نوبه خود عامل افزایش جذب یون‌ها به داخل واکوئل‌هاست. با این حال، پلی‌آمین‌های اگزوژن در گیاهان شاهد نه تنها تثبیت خالص را افزایش ندادند، بلکه موجب کاهش معنی‌دار آن نیز شدند. با توجه به اینکه این کار همراه با کاهش هدایت روزنه‌ای نبود، احتمال می‌رود پلی‌آمین‌های اگزوژن اثر خود را از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های مسؤول تثبیت CO_2 انجام دهند. علت این تأثیر احتمالی مشخص نیست و شایسته بررسی‌های بیشتر است. با این حال، به نظر می‌رسد به دلیل اینکه پلی‌آمین‌های اگزوژن موجب کاهش اثر شوری در بستن روزنه‌ها شده اند، مانع از ظهور اثر این سازوکار در گیاهان تحت تیمار شوری گردیده‌اند.

افزایش مقدار فنل‌های برگ تحت تأثیر اسپرمیدین، احتمالاً یکی از دلایل کاهش رشد گیاهان تحت تأثیر این پلی‌آمین بوده است، در حالی که پوترسین چنین نقشی نداشت. اصولاً انباشتگی ترکیبات فنلی نوعی پاسخ دفاعی در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی است (Hirt and Shinozaki, 2004) که موجب کاهش رشد می‌گردد.

آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز شروع کننده مسیر سنتزی ترکیبات فنلی است و آنزیم پلی فنل اکسیداز موجب تبدیل ترکیبات فنلی به کوئینون‌هاست که تحت تابش نور می‌توانند به انواع رادیکال‌های آزاد تبدیل شده، موجب آسیب سلول‌ها شوند (Marschner, 1995). در بررسی حاضر ارتباط مشخصی بین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و انباشتگی فنل‌ها دیده نشد.برای مثال، افزایش فعالیت این آنزیم تحت تأثیر شوری اثری روی مقدار فنل‌ها در این تیمار نداشت. البته به دلیل اینکه در این پژوهش تنها فنل‌های محلول مورد سنجش قرار گرفته‌اند، نمی‌توان اثر افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز را بر مقدار فنل‌های متصل به دیواره منتفی دانست. تأثیر پلی‌آمین‌ها روی فعالیت این آنزیم که در شرایط شاهد و شوری در جهت متفاوت بود، نشان داد که کاربرد پلی‌آمین‌ها متابولیسم فنل‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اهمیت این تأثیر در تعیین اثر تخفیف‌دهندگی این ترکیبات معلوم نیست، به گونه‌ای که بین پاسخ رشدی گیاهان به کاربرد پلی‌آمین‌ها در شرایط شوری و فعالیت این آنزیم نمی‌توان ارتباطی یافت.

به طور مشابه در مورد پلی فنل اکسیداز ارتباطی بین اثر پلی‌آمین‌ها روی رشد یا تخفیف تنش با فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز دیده نشد؛ به گونه ای که هم شوری و هم پلی‌آمین‌ها هردو موجب کاهش فعالیت این آنزیم در برگ‌ها و افزایش آن در ریشه شدند. کاهش مقدار پروتئین بر اثر کاربرد پلی‌آمین‌ها می‌تواند علت دیگر کاهش رشد ناشی از کاربرد این ترکیبات باشد.

جمع‌بندی

رشد گیاهان تحت تأثیر شوری به شدت کاهش یافت. در عین حال، در غیاب شوری کاربرد اسپرمیدین نیز موجب کاهش رشد گیاهان گردید. علی رغم اثر منفی روی رشد گیاهان، کاربرد پلی‌آمین‌ها در گیاهان تحت تنش شوری موجب تخفیف اثر تنش گردید. هرچند متابولیسم ترکیبات فنلی تحت تأثیر کاربرد پلی‌آمین‌ها قرار گرفت، ولی ارتباطی بین تغییر در متابولیسم فنل‌ها و اثر تخفیف‌دهندگی پلی‌آمین‌ها دیده نشد.

منابع

خواجه‌پور، م. ر. (۱۳۸۳) گیاهان صنعتی. مرکز نشر جهاد دانشگاهی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

Anderson, O. M. and Jordheim, M. (2005) The anthocyanins. In: Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications (eds. Anderson, O. M. and Markham, K. R.) 471-553. CRC Press, London.

Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitative titration of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Dickerson, D. P., Pascholati, S. F., Hagerman, A. E., Butler, L. G. and Nicholson, R. L. (1984) Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxyl cinnamate CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. Physiological Plant Patholgy 25: 111-123.

Gallardo, M., Sanchez-Calle, J., Rueda P. M. D. and Matilla, A. J. (1996) Alleviation of thermoinhibition in chickpea seeds by putrescine involves the ethylene pathway. Australian Journal of Plant Physiology 23: 479-487.

Górecka, K., Cvikrová, M., Kowalska, U., Eder, J., Szafrańska, K., Górecki, R. and Janas, K. M. (2007) The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in anther culture of carrot. Plant Physiology and Biochemistry 45: 54-61.

Groppa, M. D. and Benavides, M. P. (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids 34: 35-45.

Hirt, H. and Shinozaki, K. (2004) Plant responses to abiotic stress (Vol. 4). Springer Verlag, Netherlands.

Johnson, C. M., Stout, P. R., Broyer, T. C. and Carlton, A. B. (1957) Comparative chloride requirements of different plant species. Plant and Soil 8: 337-353.

Krishnamorthy, R. and Bhagwat, K. A. (1989) Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. Plant Physiology 91: 500-504.

Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1985) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. Biological Society Transactions 11: 591-592.

Liu, J. H., Inoue, H. and Moriguchi, T. (2008) Salt stress-induced changes in free polyamine titers and expression of genes responsible for polyamine biosynthesis of apple *in vitro* shoots. Environmental Experimental Botany 62: 28-35.

Liu, J., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y. and Morigushi, T. (2007) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. Plant Biotechnology 24: 117-126.

Liu, J., Yu, B. J. and Liu, Y. L. (2006) Effects of spermidine and sperimine levels on salt tolerance associated with tonoplast H^+ ATPase and H^+-PPase activities in barley roots. Plant Growth Regulation 49: 119-126.

Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2nd Ed, Academic Press, London.

Martin-Tanguy, J. (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). Plant Growth Regulation 34: 135-148.

Müller, P., Li, X. P. and Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiology 125: 1558-1566.

Oxborough, K. (2004) Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. Journal of Experimental Botany 55: 1195-1205.

Pätsikkä, E., Kairavuo, M., Šeršen, F., Aro, E. M. and Tyystjärvi, E. (2002) Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition *in vivo* by outcompeting iron and causing

decrease in leaf chlorophyll. Plant Physiology 129: 1359-1367.

Pitman, M. and Läuchli, A. (2004) Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: Salinity: Environment-plants-molecules (eds. Läuchli, A. and Lüttge, U.) 3-20. Springer Verlag, Netherlands.

Plessi, M., Bertelli, D. and Albasini, A. (2007) Distribution of metals and phenolic compounds as a criterion to evaluate variety of berries and related jams. Food Chemistry 100: 419-427.

Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A. and Rich, P. J. (2004) Salinity, osmolytes and compatible solutes. In: Salinity: Environment-plants-molecules (eds. Läuchli, A. and Lüttge, U.) 181-204. Springer Verlag, Netherlands.

Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L. and Polle, A. (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. Plant Physiology 127: 887-898.

Seiler N. (2004) Catabolism of polyamines. Amino Acids 26: 217-33.

Singh, N., Singh, R., Kaur, K. and Singh, H. (1999) Studies of the physioco-chemical properties and polyphenoloxidase activity in seeds from hybrid sunflower (*Helianthus annuus*) varieties grown in India. Food Chemistry 66: 241-247.

Tang, W. and Newton, J. R. (2005) Polyamines reduced salt induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. Plant Growth Regulation 46: 31-43.

Tattini, M., Marzi, L., Tafani, R. and Traversi, M. L. (1999) A review on salinity-induced changes in leaf gas exchange parameters of olive plants. Acta Horticulturae (ISHS) 474: 415-418.

Zhu, H., Ding, G. H., Fang, K., Zhao, F. G. and Qin, P. (2006) New perspective on the mechanism of alleviating salt stress by spermidine in barley seedlings. Plant Growth Regulation 49: 147-156.

Growth, photosynthesis and phenolics metabolism in tobacco plants under salinity and application of polyamines

Roghieh Hajiboland * and Nashmin Ebrahimi

Department of Plant Science, Faculty of Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

The Effect of salinity (50 mM NaCl) and exogenous putresine and spermidine (0.5 mM) on growth and photosynthesis of tobacco (*Nicotiana rustica* L) plants were studied in hydroponic medium. Salinity caused reduction of plants growth. Application of putresine increased dry weight of control plants while exogenous spermidine decreased it. Exogenous putresine ameliorated salinity stress only in roots, but spermidine exerted this effect on both shoot and roots. In the absence of polyamines, salinity decreased chlorophyll a significantly and chlorophyll a/b ratio as well but application of polyamines increased these parameters. Salinity caused reduction of net CO_2 assimilation rate. Under control conditions, polyamines reduced net CO_2 assimilation ratebut the rate was increased in the treated plants. Total leaf phenolics was not influence by salinity, but application of putresine in salinity conditions reduced phenolic contents and of spermidine increased total phenolics of leaves. The activities of leaf phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase decreased in salinized plants, while exogenous polyamines increase and decrease in their activity, respectively. Growth impairment due to exogenous spermidine in control plants could be resulted from reduction of photosynthesis and increase of leaf phenolics. In spite of a negative effect of exogenous spermidine on growth of control plants, application of both polyamines ameliorated salinity stress. This effect was likely mediated by the improvement of leaf photochemical parameters and increase of CO_2 assimilation. Phenolics metabolism was greatly influenced by exogenous polyamines, however, no correlation was found between ameliorative effect of polyamines and changes in the phenolics metabolism.

Key words: Tobacco, Salinity stress, Polyamines, Phenolics

* Correspong Author: ehsan@tabrizu.ac.ir

زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هشتم، تابستان ۱۳۹۰، صفحه ۲۷-۴۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۶/۰۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۱۲/۰۴
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۲/۱۴

بررسی فلور، شکل زیستی و کورولوژی رویشگاه‌های شمشاد در جنگل حفاظت شده خیبوس مازندران

حامد اسدی، سید محسن حسینی *، امید اسماعیل‌زاده و عباس احمدی
گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

چکیده

منطقه حفاظت شده خیبوس، یکی از بهترین و بکرترین رویشگاه‌های شمشاد (*Buxus hyrcana* Pojark.) در جنگل‌های هیرکانی را در خود جای داده است. این منطقه در محدوده ارتفاعی ۴۰۰ تا ۹۰۰ متر از سطح دریا و در شمال شرقی شهرستان سوادکوه استان مازندران واقع شده است. مطالعه فلوریستیک- فیزیونومیک منطقه به روش پیمایش زمینی (از اسفند ماه ۱۳۸۶ تا آذر ماه ۱۳۸۷) نشان داد که در این منطقه ۳۹ تیره، ۵۴ جنس و ۶۰ گونه گیاهی وجود دارند. تیره‌های Rosaceae (۶ گونه، ۱۰ درصد)، Aspidiaceae و Cyperaceae (۴ گونه، ۶/۷ درصد)، Asparginaceae و Poaceae (۳ گونه، ۵ درصد) به عنوان مهمترین تیره‌های گیاهی موجود در منطقه هستند که در مجموع ۳۳/۴ درصد از کل گونه‌ها را شامل می‌شوند. فانروفیت‌ها (۴۰ درصد)، کریپتوفیت‌ها (۳۳/۳ درصد) و همی‌کریپتوفیت‌ها (۲۱/۷ درصد) از مهم‌ترین گروه‌های ساختاری طیف زیستی منطقه بودند. نتایج مطالعه‌های کوریولوژیک نشان داد که کوروتیپ اروپا - سیبری، مهمترین فیتوکوریون‌های سازنده ساختار کورولوژیک رویشگاه‌های شمشاد در منطقه حفاظت شده خیبوس بودند.

واژه‌های کلیدی: جنگل حفاظت شده خیبوس، شمشاد، فلور، شکل زیستی، کوروتیپ

مقدمه

شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) یکی از معدود درختان پهن برگ همیشه سبز جنگل‌های خزری است که دیر زیستی بالایی (بالغ بر ۵۰۰ سال) داشته (مروی مهاجر، ۱۳۸۵)، جزو عناصر اکسین - هیرکانی (Euxino-Hyrcanian) محسوب می‌شود (بوبک، ۱۳۷۳). خاستگاه اصلی شمشاد خزری مانند برخی دیگر از درختان بومی جنگل‌های خزری نظیر شب خسب (*Albizia julibrissin* Durraz.) و کلهو (*Diospyros lotus* L.) ناحیه رویشی هند و مالزی (Indo- Malesian) است که قدمت حضور آنها در جنگل‌های خزری به دوران سوم زمین‌شناسی بر

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: hosseini@modares.ac.ir، شماره تماس: ۰۱۲۲۶۲۵۳۱۰۱

می‌گردد و از این نظر به عنوان یکی از درختان بازمانده اقلیمی دوره پلیوسین در جنگل‌های شمال محسوب می‌شود (Akhani *et al*., 2010). شمشاد خزری هر چند در منابع به عنوان یک نژاد جغرافیایی از گونه شمشاد اروپایی (*Buxus sempervirens* L.) معرفی می‌شود (ثابتی، ۱۳۷۴) اما این گونه به دلیل اختلافات گیاه‌شناسی و نیز خاستگاه جغرافیایی از گونه مشابه اروپایی متفاوت بوده و به عنوان یک تاکسون گیاهی مجزا در پایگاه بین‌المللی نام‌های گیاهان (International Plant Names Index, IPNI) معرفی شده است و انحصاری جنگل‌های خزری قلمداد می‌شود. بهترین رویشگاه آن در شمال ایران در ارتفاع ۲۰ تا ۴۰۰ متر از سطح دریای آزاد قرار دارد، ولی تا ارتفاع ۱۲۰۰ متر نیز مشاهده می‌شود (ثابتی، ۱۳۷۴). شمشاد به علت تولید چوب با ارزش، متأسفانه همواره مورد بی‌مهری قرار گرفته و سطوح وسیعی از جنگل‌های آن توسط قاچاقچیان بهره‌برداری شده است؛ تا اینکه امروزه به دلیل کاهش چشمگیر جنگل‌های آن، در فهرست گونه‌های در معرض خطر (Endangered species) جنگل‌های خزری قرار دارد (Jalili and Jamzad, 1999).

مناطق حفاظت شده نمونه‌های بکر و دست نخورده‌ای از بوم‌سازگان‌های (Ecosystem) طبیعی هستند که به دلیل ذخایر با ارزش گیاهی و جانوری و سایر ویژگی‌های استثنایی و متنوع از میراث‌های فرهنگی و ملی هر کشور محسوب می‌شوند. تاکنون تعدادی از این مناطق با رویکرد شناسایی فلور، جامعه‌شناسی گیاهی و تهیه نقشه پوشش گیاهی بررسی قرار شده‌اند. نگاهی به مقالات علمی منتشر شده در این زمینه، روند رو به گسترش این پژوهش‌ها را نشان می‌دهد که در این خصوص می‌توان برای مثال به مطالعه آتشگاهی و همکاران (۱۳۸۸) در جنگل‌های شرق دودانگه ساری، رضوی و حسن عباسی (۱۳۸۸) در رویشگاه سرو خمره‌ای سورکش، Akhani و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه فلوریستیکی و پراکنش جغرافیایی ترکیب گیاهی ناحیه رویشی خزری، اصغرزاده و همکاران (۱۳۸۷) در پارک جنگلی سی‌سنگان، خوشمو (۱۳۸۷) در جنگل‌های اساس سوادکوه، Malekmohammadi و همکاران (۲۰۰۷) در منطقه حفاظت شده قاسملو، Ghahreman و همکاران (۲۰۰۶) در جوامع جنگلی توسکا قشلاقی (*Alnus* glutinosa (L.) Gaertn.) شمال کشور، نجفی تیره شبانکار و همکاران (۱۳۸۷) در منطقه حفاظت شده گنو، اسماعیل‌زاده و همکاران (۱۳۸۴) در ذخیره‌گاه جنگلی سرخدار افراتخته، اجتهادی و همکاران (۱۳۸۳) در جنگل‌های دودانگه ساری، اکبری‌نیا و همکاران (۱۳۸۳) در رویشگاه توس سنگده و عصری (۱۳۸۲) در ذخیره‌گاه بیوسفر کویر اشاره کرد.

جنگل حفاظت شده خیبوس یک رویشگاه منحصر به فرد شمشاد در جنگل‌های کوهستانی هیرکانی را در خود جای داده است که در آن توده‌های خالص شمشاد، جنگل دو اشکوبه راش- شمشاد و توده‌های آمیخته راش (فاقد شمشاد) به صورت موزاییکی در سطح منطقه پراکنش دارند. این رویشگاه بستر تبلور درختان انبوه شمشاد (که ارتفاع آنها گاهی بالغ بر ۱۵ متر نیز می‌رسد) به صورت خالص و یا آمیخته در زیر تاج پوشش درختان قطور راش (*Fagus orientalis*) و دیگر درختان پهن برگ نظیر پلت (*Acer velutinum*)، نمدار (*Tilia platyphyllos*) و شیردار (*Acer cappadocicum*) است که حالت ویژه‌ای از

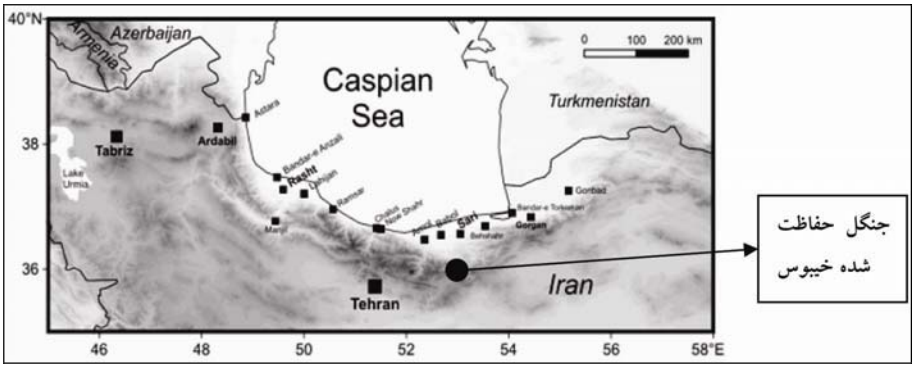
بوم‌سازگان جنگل‌های شمال را ارائه می‌دهند. هرچند مطالعه فلوریستیک چنین رویشگاهی به لحاظ فراهم ساختن اطلاعات پایه در خصوص شناخت ظرفیت‌های بوم‌شناختی گونه شمشاد در نواحی کوهستانی جنگل‌های شمال ضرورت فراوان دارد، ولی تاکنون پژوهشی در این ارتباط در جنگل حفاظت شده خیبوس انجام نشده است.

مطالعات فلوریستیک یکی از فرآیندهای مهم سیستماتیک گیاهی است که با ارائه دادن ویژگی‌های کمّی و کیفی ترکیب پوشش گیاهی، زوایایی از ناشناخته‌های سیمای فلور پوشش گیاهی آن منطقه را آشکار می‌سازد (یوسفی، ۱۳۸۸). همچنین، مطالعه جغرافیای گیاهی و بررسی فلوریستیک رُستنی‌های هر منطقه، موقعیت آن منطقه را در شبکه جهانی حفاظت از طبیعت (International Union for Conservation of Nature, IUCN) مشخص‌تر ساخته (ایران‌نژاد پاریزی و همکاران، ۱۳۸۰)، یکی از مؤثرترین روش‌ها برای شناخت ظرفیت‌ها و حفاظت از ذخایر توارثی زیست‌مندان تنوع زیستی موجود محسوب می‌شود (اکبری‌نیا و همکاران، ۱۳۸۳). بررسی فلور، به ویژه برای یک منطقه حفاظت شده به لحاظ فراهم ساختن اطلاعات زیربنایی در مورد ظرفیت اکولوژیک آن منطقه به منظور بررسی کارآیی مدیریت حاکم بر منطقه، امکان حفظ گونه‌های در خطر انقراض و آسیب‌پذیر حایز اهمیت فراوان است (نجفی تیره شبانکار و همکاران، ۱۳۸۷). این تحقیق در نظر دارد تا با مطالعه فلوریستیک و کورولوژیک، به مطالعه ظرفیت تنوع زیستی گیاهی و جغرافیای گیاهی رویشگاه‌های شمشاد در منطقه حفاظت شده خیبوس به عنوان رویشگاه دست نخورده شمشاد در جنگل‌های کوهستانی البرز مرکزی پرداخته، اطلاعات فلور، شکل زیستی و کورولوژی جنگل حفاظت شده خیبوس را ارائه دهد.

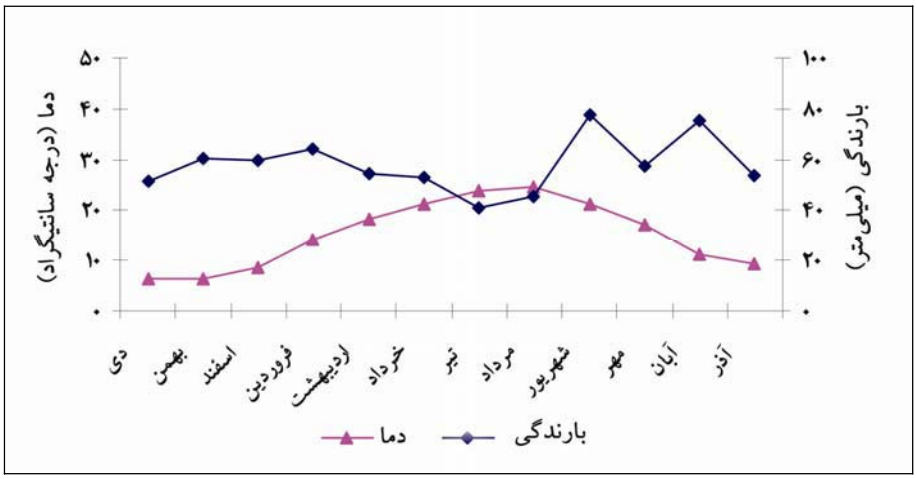
مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

منطقه مورد مطالعه در منطقه حفاظت شده خیبوس در محدوده طرح جنگلداری سری اسراک به مساحت ۹۱۴ هکتار در حوزه آبخیز تالار (حوزه شماره ۶۳ ب تقسیم‌بندی طرح جامع جنگل‌های شمال کشور) در مختصات جغرافیایی ″۵۵ ′۱۷ °۳۶ تا ″۵۰ ′۲۰ °۳۶ عرض شمالی و ″۲۰ ′۱ °۵۳ تا ۱۵ ′۴ °۵۳ طول شرقی قرار دارد. این منطقه در محدوده ارتفاعی ۴۰۰ تا ۹۰۰ متر از سطح دریا و در ۴۰ کیلومتری شمال شرق شهرستان سوادکوه استان مازندران واقع شده است (شکل ۱). در بررسی مشخصات هواشناسی منطقه بر اساس خطوط هم باران و هم دمای تهیه شده از دو ایستگاه هواشناسی شیرگاه و سنگده که نزدیک‌ترین ایستگاه هواشناسی به منطقه مورد مطالعه هستند، متوسط بارندگی سالیانه منطقه حدود ۱۶۰۰ میلی‌متر و متوسط دمای سالیانه آن ۱۳/۴ درجه سانتیگراد برآورد گردید. منحنی آمبروترمیک منطقه حاکی از آن است که در منطقه حدود ۵۰ روز دوره خشکی وجود دارد (شکل ۲). اقلیم منطقه بر اساس اقلیم نمای آمبرژه در اقلیم مرطوب سرد قرار دارد. قسمت اعظم منطقه را واحد سنگی تشکیل می‌دهد که به رسوبات پلیوسین مرتبط بوده، از سنگ‌های کنگلومرایی با کمی آهک‌های مارنی تشکیل یافته است (بی نام، ۱۳۷۷).



شکل ۱- نقشه موقعیت منطقه مورد مطالعه



شکل ۲- منحنی آمبروترمیک جنگل حفاظت شده خیبوس

روش تحقیق

برای شناسایی و معرفی فلور منطقه، جمع‌آوری گونه‌های گیاهی از اسفند ماه ۱۳۸۶ تا پایان آذر ماه ۱۳۸۷ به تناوب زمانی به روش پیمایش زمینی که یکی از روش‌های مرسوم مطالعات تاکسونومیک منطقه‌ای است (کنت و کاکر، ۱۳۸۰)، از تمام نقاط منطقه مورد مطالعه به عمل آمده است. سپس، با استفاده از منابع فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1963-1998)، فلور ایران (اسدی و همکاران، ۱۳۷۱-۱۳۸۱)، فلور رنگی ایران (قهرمان، ۱۳۷۵-۱۳۷۹) و فرهنگ نام‌های گیاهان ایران (مظفریان، ۱۳۷۵) به طور دقیق شناسایی شدند. شکل زیستی (Life form) گیاهان بر اساس رده‌بندی Raunkiaer (۱۹۳۴) تعیین گردید. در این رده‌بندی گیاهان بر اساس موقعیت جوانه‌های تجدید کننده حیات که شاخه‌ها و برگ‌های جدید پس از فصل نامساعد در آن‌ها منشأ می‌گیرند، به گروه فانروفیت‌ها (Phanerophytes)، همی کریپتوفیت‌ها (Hemicryptophytes)، کریپتوفیت‌ها (Cryptohytes) و تروفیت‌ها (Therophytes) تقسیم می‌شوند. سپس اشکال زیستی گیاهان منطقه تعیین و طیف زیستی اشکال زیستی منطقه ترسیم گردید. به منظور بررسی پراکنش جغرافیایی یا کورولوژی (Chorology)

گیاهان، ابتدا مناطق انتشار آنها با استفاده از منابع فلوری مذکور و سپس کورولوژی گونه‌ها بر مبنای تقسیم‌بندی نواحی جغرافیایی و مناطق فلوریستیک Zohary (Zohary *et al.*, 1980-1993) تعیین گردید. طیف پراکنش جغرافیایی گیاهان منطقه نیز به صورت هیستوگرام ترسیم گردید.

نتایج

مطالعه پوشش گیاهی در منطقه منجر به شناسایی تعداد ۶۰ گونه گیاهی متعلق به ۵۴ جنس و ۳۹ تیره گیاهی گردید (جدول ۱). تیره‌های Rosaceae (۶ گونه، ۱۰ درصد)، Aspidiaceae و Cyperaceae (۴ گونه، ۶/۷ درصد)، Asparagaceae و Poaceae (۳ گونه، ۵ درصد) به عنوان بزرگترین تیره‌های گیاهی موجود در منطقه هستند که در مجموع ۳۳/۴ درصد از کل گونه‌ها را شامل می‌شوند (شکل ۳).

بررسی طیف بیولوژیک پوشش گیاهی منطقه به روش Raunkiaer نشان داد که فانروفیت‌ها با ۴۰ درصد (۲۴ گونه)، کریپتوفیت‌ها با ۳۳/۳ درصد (۲۰ گونه) و همی‌کریپتوفیت‌ها با ۲۱/۷ درصد (۱۳ گونه) شکل‌های زیستی غالب ترکیب رُستنی منطقه بوده؛ در صورتی که کامه‌فیت‌ها با ۵ درصد (۳ گونه) به مقدار کم در سطح منطقه حضور دارند. در این رابطه تروفیت‌ها اصلاً در سطح منطقه حضور ندارند (شکل ۴).

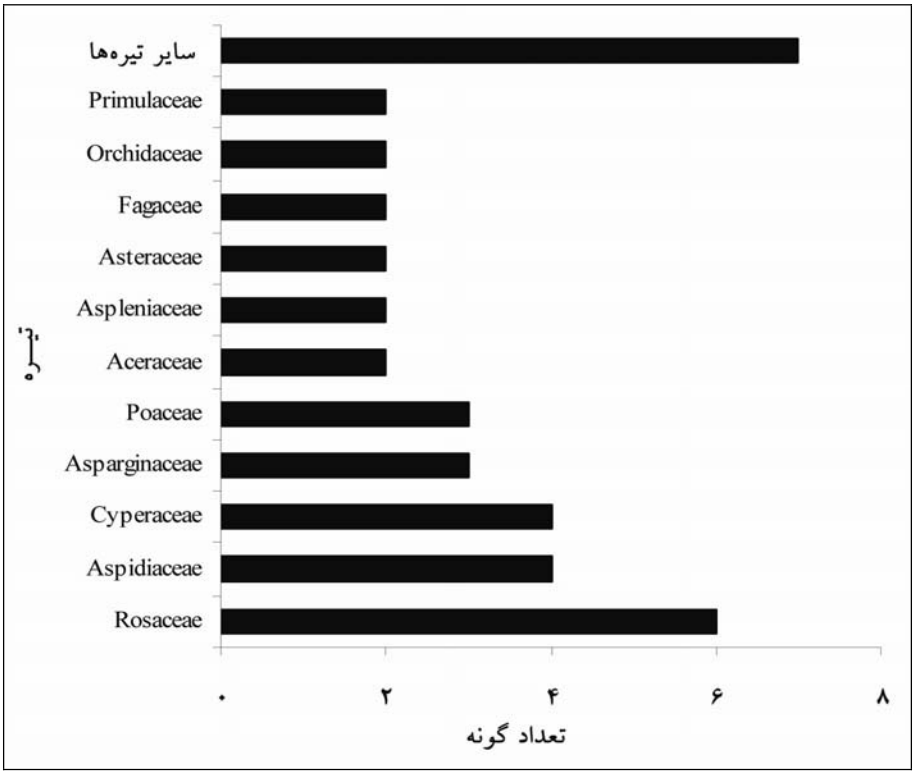
نتایج پراکنش جغرافیایی گیاهان نیز نشان می‌دهد که ۴۶/۷ درصد از گونه‌های این محدوده متعلق به ناحیه رویشی اروپا- سیبری، ۲۵ درصد گونه‌ها متعلق به ناحیه رویشی اروپا سیبری و مدیترانه‌ای، ۲۰ درصد گونه‌ها متعلق به ناحیه رویشی چند منطقه‌ای هستند و سایر کوروتیپ‌ها با مقادیر کمتر در سطح منطقه حضور یافتند (شکل ۵).

جدول ۱- فهرست گونه‌ها، تیره‌ها، شکل حیاتی و منطقه رویشی ترکیب گیاهی جنگل شمشادی خیبوس، (شکل‌های زیستی: Ph: فانروفیت‌ها، Ch: کامه‌فیت‌ها، He: همی‌کریپتوفیت‌ها و Cry: کریپتوفیت‌ها)، (منطقه رویشی: .Euro- Sib: اروپا- سیبری، Ir-Tur: ایرانی- تورانی، .Medit: مدیترانه‌ای و .Plurreg: چند منطقه‌ای)

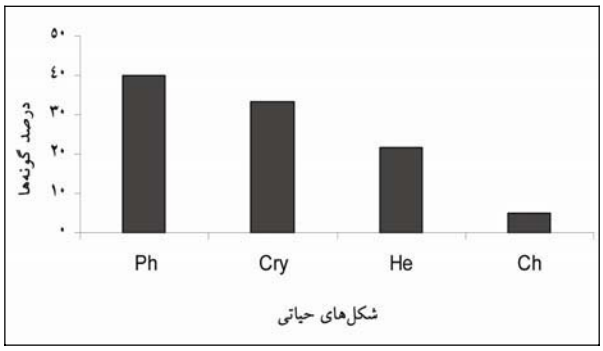
تیره و گونه‌های گیاهی	منطقه رویشی	شکل زیستی
Aceraceae		
Acer cappadocicum Gled.	Euro-Sib.	Ph
Acer velutinum Boiss.	Euro-Sib.	Ph
Aquifoliaceae		
Ilex spinigera Loes.	Euro-Sib.	Ph
Araliaceae		
Hedera pastuchovii Woronow	Euro-Sib.	Ph
Asparagaceae		
Danae racemosa (L.) Moench	Euro-Sib.	Ph
Polygonatum orientale Desf.	Euro-Sib.	Cry
Ruscus hyrcanus Woronow	Euro-Sib.	Ph
Aspidiaceae		
Dryopteris borreri Newman	Euro-Sib.	Cry
Dryopteris dilatata (Hoffm.) A. Gray	Plurreg.	Cry
Polystichum aculeatum (L.) Roth	Plurreg.	Cry

تیره و گونه‌های گیاهی	منطقه رویشی	شکل زیستی
Aceraceae		
Acer cappadocicum Gled.	Euro-Sib.	Ph
Acer velutinum Boiss.	Euro-Sib.	Ph
Aquifoliaceae		
Ilex spinigera Loes.	Euro-Sib.	Ph
Polystichum woronowii Fomin	Euro-Sib. Medit.	Cry
Aspleniaceae		
Asplenium adiantum-nigrum L.	Plurreg.	Cry
Phyllitis scolopendrium (L.) Newman	Plurreg.	Cry
Asteraceae		
Petasites hybridus (L.) G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.	Euro-Sib. Medit.	Cry
Solidago virga-aurea Auct.	Euro-Sib.	He
Athyriaceae		
Athyrium filix-femina (L.) Roth	Euro-Sib.	Cry
Betulaceae		
Alnus subcordata C. A. May.	Euro-Sib.	Ph
Buxaceae		
Buxus hyrcana Pojark.	Euro-Sib.	Ph
Celasteraceae		
Euonymus latifolia (L.) Mill.	Euro-Sib.	Ph
Cornaceae		
Cornus australis C. A. May.	Euro-Sib. Ir-Tur.	Ph
Corylaceae		
Carpinus betulus L.	Euro-Sib. Medit.	Ph
Crucifera		
Cardamine impatiens L.	Euro-Sib.	He
Cyperaceae		
Carex pendula Huds.	Euro-Sib. Ir-Tur.	Cry
Carex remota L.	Euro-Sib. Medit.	Cry
Carex riparia Curt.	Euro-Sib. Medit.	Cry
Carex sylvatica Huds.	Euro-Sib. Medit.	Cry
Dioscoraceae		
Tamus communis L.	Euro-Sib. Medit.	Cry
Ebenaceae		
Diospyros lotus L.	Euro-Sib. Ir-Tur.	Ph
Euphorbiaceae		
Euphorbia amygdaloides L.	Euro-Sib. Medit.	He
Equicetaceae		
Equisetum maximum auct. non Lam.	Euro-Sib. Medit.	Cry
Fabaceae		
Vicia crocea (Desf.) B. Fedtsch.	Euro-Sib.	Ch
Fagaceae		
Fagus orientalis Lipsky	Euro-Sib.	Ph
Quercus castaneifolia C. A. May.	Euro-Sib.	Ph
Hammameidaceae		
Parrotia persica (DC.) C. A. May.	Euro-Sib.	Ph
Hypericaceae		

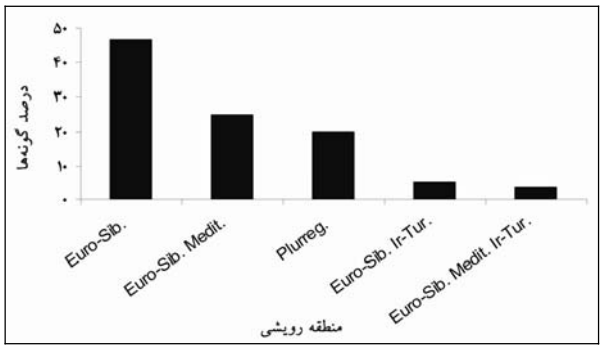
تیره و گونه‌های گیاهی	منطقه رویشی	شکل زیستی
Aceraceae		
Acer cappadocicum Gled.	Euro-Sib.	Ph
Acer velutinum Boiss.	Euro-Sib.	Ph
Aquifoliaceae		
Ilex spinigera Loes.	Euro-Sib.	Ph
Hypericum androsaemum L.	Plurreg.	Ch
Lamiaceae		
Lamium album L.	Plurreg.	He
Moraceae		
Ficus carica L.	Plurreg.	Ph
Onagraceae		
Circaea lutetiana L.	Euro-Sib.	He
Orchidaceae		
Cephalanthera caucasica Kraenzl.	Euro-Sib.	Cry
Epipactis helleborine (L.) Crantz	Plurreg.	Cry
Poaceae		
Brachypodium pinnatum (L.) P. Beauv.	Euro-Sib. Medit. Ir-Tur.	He
Festuca drymeia Mert. Koch.	Euro-Sib. Medit.	He
Oplismenus undulatifolius (Ard.) Roemer & Schultes	Plurreg.	He
Polypodiaceae		
Polypodium vulgare L.	Plurreg.	Cry
Primulaceae		
Primula heterochroma Stapf	Euro-Sib.	He
Cyclamen coum Mill.	Euro-Sib. Medit.	Cry
Pteridaceae		
Pteris cretica L.	Plurreg.	Cry
Rhamnaceae		
Frangula alnus Mill.	Euro-Sib. Medit.	Ph
Rosaceae		
Cerasus avium (L.) Moench	Euro-Sib.	Ph
Crataegus microphylla K. Koch	Euro-Sib.	Ph
Fragaria vesca L.	Plurreg.	He
Laurocerasus officinalis M. Roem.	Euro-Sib.	Ph
Mespilus germanica L.	Euro-Sib. Medit. Ir-Tur.	Ph
Rubus hyrcanus Juz.	Euro-Sib.	Ph
Rubiaceae		
Galium odoratum (L.) Scop.	Euro-Sib. Medit.	He
Solanaceae		
Solanum kieseritzkii C. A. May.	Euro-Sib.	Ch
Tiliaceae		
Tilia platyphyllos Scop.	Euro-Sib.	Ph
Ulmaceae		
Ulmus glabra Huds.	Euro-Sib.	Ph
Umbelliferae		
Sanicula europaea L.	Euro-Sib. Medit.	He
Violaceae		
Viola alba Besser	Euro-Sib. Medit.	He



شکل ۳- تعداد گونه‌های گیاهی مربوط به هر تیره گیاهی در جنگل حفاظت شده خیبوس



شکل ۴- طیف زیستی عناصر گیاهی جنگل حفاظت شده خیبوس، (شکل‌های حیاتی: Ph: فانروفیت‌ها، Ch: کامه‌فیت‌ها، He: همی‌کریپتوفیت‌ها و Cry: کریپتوفیت‌ها)



شکل ۵- درصد فراوانی پراکنش جغرافیایی گیاهان جنگل حفاظت شده خیبوس، (منطقه رویشی: .Euro- Sib: اروپا- سیبری، Ir-Tur: ایرانی - تورانی، .Medit: مدیترانه‌ای و .Plurreg: چند منطقه‌ای)

بحث

در پژوهش حاضر، فلور رویشگاه‌های شمشاد در جنگل حفاظت شده خیبوس که بستر تبلور جنگل راش با زیرآشکوب شمشاد در جنگل‌های کوهستانی هیرکانی مرکزی است، مطالعه شده است و طی آن تعداد ۶۰ گونه متعلق به ۳۹ تیره گیاهی شناسایی شده‌اند. تیره‌های Rosaceae، Aspidiaceae، Cyperaceae، Asparagaceae و Poaceae به ترتیب مهمترین تیره‌های گیاهی منطقه بودند. تیره‌های گیاهی Asteraceae و Rosaceae در مطالعات اسماعیل‌زاده و

همکاران (۱۳۸۴) (سرخدار افراتخته)، اصغرزاده و همکاران (۱۳۸۷) (شمشاد سی‌سنگان)، اکبری‌نیا و همکاران (۱۳۸۳) (توس سنگده) و خوشمو (۱۳۸۷) (جنگل راش اساس) نیز به عنوان مهمترین تیره‌های گیاهی از نظر سهم گونه‌های گیاهی معرفی شدند. همچنین، همهٔ تیره‌های گیاهی ذکر شده نیز در مطالعه Esmailzadeh و همکاران (۲۰۱۱) در جنگل راش دارکلا به عنوان مهمترین تیره‌های گیاهی قلمداد شدند.

بررسی غنای گونه‌ای منطقه و مقایسه آن با سایر تحقیقات مشابه که در مناطقی مشابهی از نظر پوشش گیاهی و اقلیم قرار دارند نظیر جنگل راش دارکلا (۹۳ گونه) (Esmailzadeh *et al.*, 2011) و جنگل راش اساس (۱۷۷گونه) (خوشمو، ۱۳۸۷)، نشان می‌دهد که رویشگاه‌های شمشاد در جنگل حفاظت شده خیبوس علی‌رغم حفاظتی بودن، از غنای گونه‌ای گیاهی نسبتاً کمی برخوردار است. علت پایین بودن میزان غنای گونه‌ای منطقه، در واقع همان حضور متراکم درختان شمشاد با تاج پوشش انبوه در اشکوب درختی جنگل است که با ایجاد محدودیت فضا و شرایط نوری مناسب، زمینه حضور متنوع گونه‌های زیر اشکوب جنگل را غیر ممکن می سازد. تراکم درختان شمشاد در توده‌های شمشادی منطقه به حدی است که نور و حتی فضای مناسب برای رویش گونه‌های زیرآشکوب نبوده و به غیر از گونه‌های عشقه (*Hedera pastuchovii*) و سرخس پنجه‌ای (*Pteris cretica*) هیچ گونه‌ای توانایی استقرار و رشد زیر سایه سنگین درختان شمشاد را ندارد. شایان ذکر است که گونه بالارونده عشقه به عنوان فراوان‌ترین گونه در زیرآشکوب توده‌های شمشادی منطقه محسوب می‌شود. این گیاه به طور انبوه و گسترده کف جنگل را اشغال کرده، به عنوان فراوان‌ترین گونه زیر اشکوب منطقه به شمار می‌رود. در داخل توده‌های غیر شمشادی نیز به علت متراکم بودن توده (بکر بودن توده‌های راش) و نیز حضور متراکم گونه زیر اشکوب کوله خاس که سهم عمده‌ای از مساحت زیر اشکوب توده‌های فاقد شمشاد را اشغال می‌کند، زمینه برای حضور و استقرار دیگر گونه‌های گیاهی زیر اشکوب مهیا نبوده است. بنابراین، با عنایت به موارد یاد شده، پایین بودن غنای گونه ای در جنگل حفاظت شده خیبوس قابل توجیه است. همچنین، مقایسه غنای گونه‌ای توده‌های شمشادی جنگل حفاظت شده خیبوس با پارک جنگلی سی‌سنگان که رویشگاه شمشادی جلگه‌ای جنگل هیرکانی محسوب می‌شود، حاکی از پایین‌تر بودن غنای گونه‌ای منطقه مورد مطالعه نسبت به پارک جنگلی سی‌سنگان (۷۴ گونه) (اصغرزاده و همکاران، ۱۳۸۷) است که علت آن را می‌توان به کوهستانی بودن جنگل شمشادی خیبوس و متراکم‌تر بودن تاج پوشش درختان شمشاد این منطقه و نیز تأثیر فشار توریست در جنگل سی‌سنگان منسوب کرد. در واقع، معرفی تعداد ۷۳ گونه گیاهی تنها در سطح ۴۰ هکتار از سطح کل ۵۹۲ هکتاری جنگل سی‌سنگان توسط اصغرزاده و همکاران (۱۳۸۷) بیانگر فلور نسبتاً غنی در جنگل سی‌سنگان، است اما با توجه به اینکه بخش عمده‌ای از منطقه مورد بررسی در تحقیق مذکور تحت فشار شدید توریست قرار دارد و با توجه به تأثیر منفی فعالیت‌های مخرب گردشگران بر میزان انبوهی و درصد تاج پوشش درختان شمشاد، میزان غلبه درختان شمشاد در جنگل سی‌سنگان نسبت به

توده‌های دست نخورده شمشاد جنگل خیبوس همواره در سطح پایین‌تری است. کاهش یافتن میزان غلبه درختان شمشاد در مناطق تحت مدیریت توریسم جنگل سی‌سنگان سبب گردید تا زمینه حضور و استقرار دیگر گونه‌های گیاهی در سطح منطقه فراهم شده و در نتیجه غنای گونه‌ای افزایش یابد. در این ارتباط گزارش شدن برخی از گونه‌های غیر معمول، مانند *Artemisia annua* L.، *Conyza canadensis* (L.) Cronquist و *Galinsoga parviflora* Cav. که به عرصه‌های باز جنگلی و نواحی حاشیه‌ای توده‌های جنگلی مربوط هستند نیز دگرگونی ایجاد شده، ترکیب گیاهی غیر طبیعی در توده‌های شمشاد تحت مدیریت توریسم جنگل سی‌سنگان را توجیه می‌کند.

طیف بیولوژیک منطقه بیانگر فلور تیپیک جنگل‌های معتدله است که در آن فانروفیت‌ها و کریپتوفیت‌ها فراوان هستند (کنت و کاکر، ۱۳۸۰). بالا بودن درصد حضور فانروفیت‌ها در منطقه به خاطر توسعه نیافتن گونه‌های علفی و بوته‌ای در زیر تاج پوشش انبوه درختان شمشاد است. پس از فانروفیت‌ها، کریپتوفیت‌ها و همی‌کریپتوفیت‌ها از حضور نسبتاً قابل توجهی در سطح منطقه برخوردار بودند. اکبری‌نیا و همکاران (۱۳۸۳)، اسماعیل‌زاده و همکاران (۱۳۸۴) و آتشگاهی و همکاران (۱۳۸۸) نیز به ترتیب در اجتماعات توس سنگده، جوامع گیاهی سرخدار افراتخته و جنگل‌های کوهستانی شرق دودانگه ساری، فانروفیت‌ها و همی کریپتوفیت‌ها به همراه کریپتوفیت‌ها را به عنوان فراوان‌ترین شکل رویشی گزارش نمودند. البته، در مطالعات مشابه مذکور، همی‌کریپتوفیت‌ها به عنوان فراوان‌ترین شکل رویشی مناطق مزبور معرفی شده، از این نظر شکل‌های رویشی فانروفیت و کریپتوفیت در درجه دوم و سوم اهمیت قرار داشتند. امّا در تحقیق حاضر، فانروفیت‌ها با حضور ۲۴ گونه به عنوان شکل رویشی غالب منطقه معرفی شده، سپس کریپتوفیت‌ها و همی‌کریپتوفیت‌ها به ترتیب با ارائه ۲۰ و ۱۳ گونه در درجه بعدی اهمیت قرار گرفتند. از آنجایی که دامنه ارتفاعی منطقه مورد مطالعه (۴۰۰ تا ۹۰۰ متر) نسبت به رویشگاه‌های توس در سنگده ساری (۲۳۰۰-۳۰۰۰ متر) (اکبری‌نیا و همکاران، ۱۳۸۳)، ذخیره‌گاه سرخدار افراتخته (۱۳۵۰-۲۰۰۰ متر) (اسماعیل‌زاده و همکاران، ۱۳۸۴) و جنگل‌های کوهستانی شرق دودانگه (۷۰۰-۲۰۱۰) (آتشگاهی و همکاران، ۱۳۸۸) در سطح پایین‌تری قرار دارد، به نظر می رسد که کمینه دمای ماهانه فصل سرد سال در منطقه مورد مطالعه نسبت به رویشگاه‌های مذکور همواره در سطح بالاتری قرار داشته باشد. بنابراین، آشکاراست که در چنین شرایطی، زمینه حضور برای رویش‌های چوبی فانروفیت در جنگل حفاظت شده خیبوس که یک ناحیه جنگلی کوهستانی پایین بند در ناحیه خزری محسوب می‌شود، نسبت به رویش‌های کوهستانی مورد مقایسه بیشتر فراهم باشد. در مقابل، شکل‌های رویشی همی‌کریپتوفیت و کریپتوفیت که در نواحی مرتفع‌تر با شرایط اقلیمی سردتر از فراوانی بالاتری برخوردارند، در منطقه مورد مطالعه نسبت به رویشگاه‌های مورد مقایسه در سطح پایین‌تری قرار داشتند. در این ارتباط، کامه‌فیت‌ها که تحمل کننده خشکی هستند، در فلور منطقه درصد کمی را به خود اختصاص دادند و تروفیت‌ها که مخصوص نواحی خشک و نامساعد هستند، در منطقه حضور پیدا نکردند (آتشگاهی و

همکاران، ۱۳۸۸). طبق نظر Archibold (۱۹۹۶) طیف زیستی غالب در یک اقلیم، معرف چگونگی سازش گیاهان به این اقلیم خاص است. اقلیم تعیین شده طبق روش دومارتون نیز از نوع اقلیم سرد کوهستانی است (بی‌نام، ۱۳۷۷)، بنابراین، ارتباط بین اقلیم و شکل زیستی گیاهان روابط تنگاتنگی را نشان می‌دهد.

در بررسی عرصه انتشار فلور منطقه، عناصر اروپا- سیبری بالاترین میزان حضور را نسبت به عناصر گیاهی سایر نواحی رویشی در منطقه مورد مطالعه نشان دادند. پراکنش جغرافیایی مجموعه گونه‌های گیاهی یک منطقه بازتاب تأثیرپذیری آن از ناحیه یا نواحی رویشی مختلف است (اکبرزاده، ۱۳۸۶). در واقع، با توجه به اینکه جنگل‌های شمال از نظر جغرافیای گیاهی متعلق به ایالت (Province) اکسین- هیرکانی از زیرحوزه‌های پونتیک (Pontic) از ناحیه بزرگ اروپا- سیبری است، بالا بودن عناصر اروپا- سیبری در فلور آن دور از ذهن نیست. این مسأله در دیگر مطالعات فلور به عمل آمده در سطح جنگل‌های شمال نظیر اکبری‌نیا و همکاران (۱۳۸۳)، اسماعیل‌زاده و همکاران (۱۳۸۴) و آتشگاهی و همکاران (۱۳۸۸) قابل مشاهده است.

منابع

آتشگاهی، ز.، اجتهادی، ح. و زارع، ح. (۱۳۸۸) معرفی فلور، شکل زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان در جنگل‌های شرق دودانگه ساری، استان مازندران. مجله زیست‌شناسی ایران ۲۲(۲): ۱۹۳-۲۰۳.

اجتهادی، ح.، زارع، ح. و امینی، ط. (۱۳۸۳) مطالعه و ترسیم پروفیل پوشش جنگلی در طول دره رودخانه شیرین‌رود، دودانگه ساری، استان مازندران. مجله زیست‌شناسی ایران ۱۷(۴): ۳۴۶-۳۵۶.

اسدی، م.، معصومی، ع. ا.، خاتمساز، م. و مظفریان، و. (۱۳۷۱-۱۳۸۱) فلور ایران. جلد ۱-۳۸. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران.

اسماعیل‌زاده، ا.، حسینی، س. م. و اولادی، ج. (۱۳۸۴) معرفی فلور، شکل زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان رویشگاه سرخدار افراتخته. پژوهش و سازندگی ۱۸(۳): ۶۶-۷۶.

اصغرزاده، پ.، زارع، ح. و حسینی، س. م. (۱۳۸۷) بررسی فلور، ساختار رویشی و کورولوژی عناصر گیاهی پارک جنگلی سیسنگان. علوم و فنون منابع طبیعی ۳(۱): ۱۳-۲۵.

اکبرزاده، م. (۱۳۸۶) بررسی فلوریستیک، شکل زیستی و کورولوژی گیاهان مراتع ییلاقی واز مازندران. پژوهش و سازندگی ۲۰(۲): ۱۹۸-۱۹۹.

اکبری‌نیا، م.، زارع، ح.، حسینی، س. م. و اجتهادی، ح. (۱۳۸۳) بررسی فلور، ساختار رویشی و کورولوژی عناصر گیاهی اجتماعات توس در سنگده ساری. پژوهش و سازندگی۶۴: ۸۴-۹۶.

ایران‌نژاد پاریزی، م. ح.، صانعی شریعت پناهی، م.، زبیری، م. و مروی مهاجر، م. ر. (۱۳۸۰) بررسی فلوریستیک و جغرافیای گیاهی پارک ملی خبر و پناهگاه حیات وحش روچون.منابع طبیعی ایران ۵۴(۲): ۱۱۱-۱۳۰.

بوبک، ه. (۱۳۷۳) جنگل‌های طبیعی و گیاهان چوبی ایران. ترجمه شاهسواری، ع. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران.

بی‌نام. (۱۳۷۷) طرح جنگلداری سری اسراک. اداره کل منابع طبیعی استان مازندران، ساری.

ثابتی ح. (۱۳۷۴) جنگل‌ها درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات دانشگاه یزد، یزد.

خوشمو، م. (۱۳۸۷) معرفی فلور، شکل زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان منطقه اساس سوادکوه. علوم و فنون منابع طبیعی ۳(۱): ۶۵-۷۵.

رضوی، ع. و حسن عباسی، ن. ع. (۱۳۸۸) بررسی فلوریستیک و کورولوژیک گیاهان رویشگاه سرو خمره‌ای سورکش (فاضل آباد-گلستان)، علوم و فناوری چوب و جنگل ۱۶(۲): ۸۳-۱۰۰.

عصری، ی. (۱۳۸۲) فلور، شکل‌های زیستی و کوریوتیپ‌های گیاهان ذخیره گاه بیوسفر کویر. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۷(۴): ۲۴۷-۲۶۰.

قهرمان، ا. (۱۳۷۵- ۱۳۷۹). فلور رنگی ایران. جلدهای ۱-۲۲. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور و دانشگاه تهران، تهران.

کنت، م. و کاکر، پ. (۱۳۸۰) توصیف و تحلیل پوشش گیاهی. ترجمه مصداقی، م. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد.

مروی مهاجر، م. ر. (۱۳۸۵) جنگل‌شناسی و پرورش جنگل. انتشارات دانشگاه تهران، تهران.

مظفریان، و. (۱۳۷۵) فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. انتشارات مؤسسه فرهنگ معاصر، تهران.

نجفی تیره شبانکاره، ک.، جلیلی، ع.، خراسانی، ن.، جم‌زاد، ز. و عصری، ی. (۱۳۸۷) بررسی رابطه عوامل اکولوژیک با انتشار جوامع گیاهی منطقه حفاظت شده گنو، فصلنامه پژوهشی تحقیقات مرتع و بیابان ایران ۱۵(۲): ۱۷۹-۱۹۹.

یوسفی، م. (۱۳۸۸) فلور ایران. انتشارات دانشگاه پیام نور، تهران.

Akhani, H., Djamali, M., Ghorbanalizadeh, A. and Ramezani, E. (2010) Plant biodiversity of Hyrcanian relict forests, N Iran: An overview of the flora, vegetation, palaeoecology and conservation. Pakistan Journal of Botany 42: 231- 258.

Archibold, O. W. (1996) Ecology of world vegetation, 1st Ed, Chapman and Hall, London.

Esmailzadeh, O., Hosseini, S. M. and Tabari, M. (2011) The Relationship between the soil seed bank and above-ground vegetation of a mixed-deciduous temperate forest in northern Iran. Journal of Agriculture Science and Technology 13: 411-424.

Ghahraman, A., Naqinezhad, A., Hamzehee, B., Attar, F. and Assadi, M. (2006) The flora threatened black Alder forests in the Caspian lowlands, Northern Iran. Rostaniha 7(1): 5-30.

Jalili, A. and Jamzad, Z. (1999) Red data book of Iran. Research institute of Forests and Rangelands Press. Tehran.

Malekmohammadi, L., Mahmoudzadeh A. and Hassanzadeh A. (2007) Floristic study of Ghasemloo (Shohada) valley forest reserve and adjacent area. Pakistan Journal of Biological Science 10(10): 1618-1624.

Raunkiaer, C. (1934). The life forms of plants and statistical plant geography. Clarendon, Oxford.

Rechinger, K. H. (ed.) (1963-1998) Flora Iranica, Vol. 1-173, Akademish, Druck-University Verlagsanstalt, Graz.

Zohary, M., Heyn, C. C. and Heller, D. (1980-1993) Conspectus flora orientalis, an annotated catalogue of the flora of the middle east. Vol. 1-8. Israel Academy of Sciences and Humanities, Israel.

Flora, Life form and chorological study of Box tree (*Buxus hyrcanus* Pojark.) sites in Khybus protected forest, Mazandaran

Hamed Asadi, Seyed Mohsen Hosseini *, Omid Esmailzadeh and Abbas Ahmadi

Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

Abstract

Khybus Protected Area has one of the best and the most intact habitats of boxtrees (*Buxus hyrcana* Pojark.) in Hyrcanian forests. In this area, the lowest and the highest altitudes are 400 and 900 meters and is located in north east of Savadkooh. The floristic-physiognomic investigation which was performed by field-walk procedure showed that Flora of this region included 60 plant species which belonged to 54 genera and 39 families. The important families were Rosaceae, Aspidiaceae, Cyperaceae, Asparginaceae and *Poaceae* with 10%, 6.7%, 6.7%, 5% and 5% respectively. These families contained 33.4 percent of the total species. Phanerophytes (40%), Hemicryptophytes (28.3%) and Cryptophytes (25%) were the most important structure groups of the local biological spectrum according to Raunkaiaer method. The result of chorological studies showed that the chorotype form Euro_Sibria was the most important phytochorion which make up the chorological structure of Box trees stands in Khybus Protected Area.

Key word: Khybus Protected Area, Boxtrees (*Buxus hyrcanus* Pojark.), Flora, Life form, Chorotype

* Correspong Author: Hosseini@modares.ac.ir

زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هشتم، تابستان ۱۳۹۰، صفحه ۴۱-۵۸
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۴/۱۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۱۱/۰۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۳/۱۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۳/۳۰

تغییر غلظت هورمون‌های برون‌زا و تأثیر آن بر روی بلوغ رویان‌های بدنی و ریزبنه‌زایی زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.)

شکیبا رجب‌پور [۱]، عذرا صبورا [۲*] و علی وطن‌پور ازغندی [۳]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران ۴۶۹۷ - ۱۹۳۹۵، ج. ا. ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
[۳] بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

زعفران از جمله گیاهان زراعی و ارزشمند استان خراسان است که با استفاده از بنه تکثیر می‌شود. این روش سنتی همراه با مشکلات عدیده‌ای، همچون تهاجم عوامل بیماریزا به بنه‌ها، نیازمند به دوره‌ای طولانی است. کاربرد طیفی از تنظیم‌کننده‌های رشد و القای رویان‌زایی بدنی، روشی مؤثر برای تکثیر سریع و انبوه بنه‌های سالم در شرایط آزمایشگاهی است. در این تحقیق تأثیر ۴ هورمون برون‌زا طی یک دوره سه ماهه در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوک (MS ۱/۲) بر روی بلوغ رویان‌های کروی، جوانه‌زنی و تولید ریزبنه زعفران بررسی شده است. اثر هورمون‌های گیاهی با استفاده از NAA (در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، BAP (در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و ABA (در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲و ۴ میلی‌گرم در لیتر) مورد آزمون قرار گرفت. همهٔ آزمایش‌ها در قالب طرح‌های آماری کاملاً تصادفی با حداقل ۴ تکرار اجرا گردید. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین تعداد رویان کروی در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۱ mg/l NAA تشکیل شدند، اما این محیط در مقایسه با محیط‌های حاوی BAP و IBA برای بلوغ رویان‌های کروی مناسب نبود. پس از گذشت دو ماه، استفاده از هورمون IBA در غلظت‌های ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر بهترین تیمار برای القای بلوغ رویان و تشکیل ریزبنه بود. هر چند در پایان ماه سوم بیشترین تعداد رویان بالغ در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۵ mg/l BAP به دست آمده بود، ولی تداوم کاربرد هورمون فوق در ریزبنه‌زایی مؤثر واقع نشد. غلظت‌های مختلف ABA موجب پیشبرد سریع بلوغ رویان‌های کروی شد اما در رابطه با تکثیر ریزبنه‌ها اثر مثبتی نداشت.

واژه‌های کلیدی: بلوغ رویان، تیمار هورمونی، ریزبنه، زعفران زراعی، *Crocus sativus* L.

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: saboora@alzahra.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۸۸۰۵۸۹۱۲

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus Sativus* L. از خانواده زنبق (Iridaceae) است. این گیاه دارویی و صنعتی، که نامش از Corycus نام منطقه‌ای در سیلیسیا واقع در شرق مدیترانه گرفته شده است، در صنایع غذایی و داروسازی به عنوان طعم‌دهنده، آرام‌بخش، ضد اسپاسم، کاهنده فشار، چربی و کلسترول خون، اشتهاآور، ضد افسردگی و مقوی معده استفاده می‌شود. همچنین، به دلیل داشتن آنتی‌اکسیدان به عنوان پیشگیری‌کننده از بیماری‌های قلبی- عروقی و سرطان نیز مطرح است. مهمترین ترکیبات موجود در کلاله زعفران شامل ترکیبات زردرنگ محلول در آب (مشتقات کروستین)، ترکیبات تلخ مزه (از جمله پیکروکروسین)، اسانس (سافرانال تا ۱ درصد وزن خشک)، چربی (حداکثر ۱۰ درصد)، رطوبت (حدود ۱۰-۱۳ درصد)، ویتامین‌ها و ترکیبات معدنی (حدود ۵ درصد) است (ابراهیم‌زاده و همکاران، ۱۳۸۵).

کشت این گیاه با ارزش در ایران به سال‌ها قبل از میلاد مسیح بر می‌گردد. برخی از محققان خاستگاه زعفران را ایالت قدیم ماد (دامنه‌های کوه الوند) و عده‌ای مبدأ آن را از منطقه وسیع‌تری شامل یونان، ترکیه، آسیای صغیر و ایران می‌دانند. نخستین مزارع کشت زعفران در اطراف همدان و کرمانشاه دایر شد و پس از آن به نقاط مختلف ایران، از جمله خراسان رسید. کلاله‌های قرمز رنگ زعفران که طلای سرخ نامیده می‌شود منبع درآمد خوبی برای کشاورزان خراسانی، به ویژه تربت حیدریه، قائن، فردوس، گناباد و بیرجند محسوب می‌گردد. از ۲۳۰ تن زعفرانی که هر سال در جهان تولید می‌شود، حدود ۱۷۰ تن آن در خراسان به دست می‌آید و بقیه عمدتاً در اسپانیا، یونان، مراکش، هند و افغانستان تولید می‌شود (Fernandez, 2004). بر اساس آمار منتشر شده توسط صندوق توسعه صادرات زعفران ایران طی سال‌های ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸، قیمت هر کیلو زعفران با توجه به کیفیت آن بین ۳ تا ۴ میلیون تومان عرضه شده است. بنابراین، تکثیر این گیاه از اهمیت زیادی برخوردار بوده، کاشت، داشت و برداشت آن فرصت‌های شغلی و توان ارزآوری فراوانی را به ارمغان می‌آورد.

از طرف دیگر، زعفران گیاهی اتوتریپلوئید و عقیم است (Ebrahimzadeh *et al*., 1998) و ایجاد مزارع جدید آن فقط به وسیله کشت بنه‌های این گیاه مقدور و معمول است. از آنجا که بنه‌ها مدت نسبتاً زیادی (۵ تا ۷ سال) در زمین می‌مانند، بنه‌های انتخاب شده باید سالم و عاری از هر گونه بیماری و یا آسیب‌دیدگی باشند و قبل از کاشت با سموم قارچ‌کش ضدعفونی شده باشند. با این حال، عدم رعایت اصول کشت زعفران، از جمله انتخاب زمین حاصلخیز و بنه‌های درشت و سالم، مبارزه با علف‌های هرز، تنظیم عمق کاشت، اضافه کردن کودهای حیوانی و شیمیایی، زعفران کاران را مجبور به کشت مجدد مزارع قبل از موعد می‌نماید. بنابراین، تهیه و انتخاب بنه‌های مرغوب جهت کاشت در ایجاد و گسترش کشت آن حایز اهمیت است. از آنجایی که تیمار بنه‌های آلوده به ویروس با موفقیت همراه نبوده است و با توجه به مشکلات موجود در رابطه با عاری از بیماری نمودن گیاهان پیازی، امروزه استفاده از روش‌های کشت بافت و ریزازدیادی به منظور تکثیر انبوه و عاری از عوامل بیماری‌زای آنها در مقیاس وسیع امری ضروری به نظر می‌رسد.

تحقیقات متعددی در زمینه کشت بافت زعفران، به ویژه در زمینه تولید ساختارهای کلاله مانند و رویان‌زایی رویشی زعفران انجام شده است؛ از جمله George و همکاران (۱۹۹۲) با کشت مناطق مریستمی بنه زعفران کالوس‌هایی به دست آوردند که پس از انتقال به محیط کشت MS (Murashing and Skoog, 1962) حاوی هورمون‌های IAA، Kin و آسکوربیک اسید رویان‌های کروی در آنها القا شد. سپس جوانه‌زنی در محیط MS ۱/۲ حاوی GA_3 انجام شد. جوانه‌زنی و تمایز نوشاخه‌ها در رویان‌های کروی به کمک محیط کشت MS ۱/۲ محتوی یک میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید و با استفاده از NAA و Kin نیز گزارش شده است. Ebrahimzadeh و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از ریزنمونه مریستم انتهایی در زعفران مشبک (*C. cancellatus*) کالوس‌های رویان‌زا تولید کردند. این کالوس‌ها مراحل بلوغ رویانی را به طور کامل طی کرده، پس از انتقال به محیط MS ۱/۲ حاوی GA_3 و یا NAA و BAP گیاهچه کامل واجد ریشه و نوشاخه تشکیل دادند. Sheibani و همکاران (۲۰۰۷) نیز با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف بنه در محیط MS حاوی BAP و 2,4-D و همچنین با استفاده از تنظیم‌کننده رشد تیدیازرون (TDZ) کالوس‌های رویان‌زایی را تولید کردند که در نتیجه ایجاد تغییرات هورمونی در محیط MS بلوغ این رویان‌های کروی میسر شد. همچنین Raja و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از محیط‌های کشت MS و B5 حاوی غلظت‌های نسبتاً بالای 2,4-D و BAP و NAA ریزبنه‌ها را به روش القای رویان‌زایی تولید کردند. Sharma و همکاران (۲۰۰۸) نیز شاخه‌زایی و بنه‌زایی را از طریق کشت جوانه‌های رأسی و جانبی دنبال کردند. همچنین، در سال ۲۰۰۹ نقش برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ارتباط با فرآیند تمایز و رویان‌زایی ریزنمونه‌های زعفران توسط Blazquez و همکاران بررسی شده است.

با این حال، به نظر می‌رسد علی‌رغم انجام تحقیقات متعدد، یافته‌های منتشر شده در رابطه با تولید انبوه بنه‌های سالم و عاری از عوامل بیماری‌زا که از طریق کشت بافت به دست آمده باشند، هنوز از نظر اقتصادی به صرفه نبوده، برای اینکه بتوان نیاز زعفران کاران را رفع نمود، لازم است گستره‌ای از تیمارهای هورمونی مختلف همراه با تغییرات اختصاصی در ترکیب محیط کشت به آزمایش گذاشته شود تا نتیجه مطلوب حاصل گردد. در پروژه حاضر سعی شده است با استفاده از تجارب قبلی، ضمن ارائه یک ترکیب محیط کشت ساده و کم هزینه برای بلوغ رویان‌های رویشی کروی، تولید ریزبنه‌های سترون حاصل از کشت در شیشه زعفران نیز بهبود یابد. بدین منظور، با توجه به نتایج و پژوهش‌های انجام شده در گذشته، با تهیه محیط کشت MS ۱/۲ و کاربرد غلظت‌های پایینی از چهار تنظیم‌کننده رایج در کشت بافت، سرعت بلوغ رویان‌ها و بنه‌زایی هر یک از تیمار مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، ماده گیاهی مورد استفاده، رویان‌های کروی به دست آمده از آزمایش‌های قبلی بود. این رویان‌ها حداقل دو ماه پس از کشت ریزنمونه‌های بنه زعفران در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های 2,4-D و

BAP یا TDZ تشکیل شده بودند (Rajabpoor *et al.*, 2007). ابتدا ریزنمونه‌های واجد کالوس‌های رویان‌زا به مدت ۲۵ روز در محیط کشت پایه MS بدون هورمون نگهداری شدند. سپس برای مطالعه مراحل بلوغ رویان‌های کروی و تبدیل آنها به رویان‌های شاخی و تشکیل ریزبنه، به سه نوع محیط کشت پایه MS ۱/۲ تغییر یافته که حاوی ساکاروز ۶ درصد و ۸ گرم در لیتر آگار بودند، منتقل شدند. محیط‌های مورد مطالعه عبارت بودند از: الف) محیط MS ۱/۲ حاوی هورمون NAA در سه غلظت ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر؛ ب) محیط MS ۱/۲ حاوی هورمون IBA در سه غلظت ۰/۲۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، ج) محیط MS ۱/۲ حاوی هورمون BAP در سه غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و د) محیط MS ۱/۲ حاوی هورمون ABA در چهار غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر. اسیدیته همه محیط‌های کشت قبل از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد. این آزمایش‌ها در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با ۴-۶ تکرار اجرا شد و هر تکرار حداقل حاوی ۴ ریزنمونه بود. کشت‌ها در اتاقک رشد و در دمای ۲±۲۴ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی/ ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند و شدت نور معادل تقریباً ۴۰۰۰ لوکس تنظیم شد. روند تغییرات القا شده در رویان‌های کروی شامل تعداد رویان‌های جوانه‌زده و تعداد ریزبنه‌های تولید شده در هر ریزنمونه در فاصله زمانی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز بعد از اعمال تیمارها ثبت و بررسی شد. تأثیر غلظت‌های مختلف هر یک از هورمونهای مورد بررسی و طول دوره کشت بر روی بلوغ رویان‌ها به کمک آزمون تجزیه واریانس دو طرفه توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۲ تجزیه و تحلیل شدند. سپس با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، میانگین‌ها مقایسه و تفاوت معنی‌دار بین آنها در سطح $P<0.05$ تعیین گردید. نمودارها بر اساس میانگین ± انحراف معیار رسم شده است.

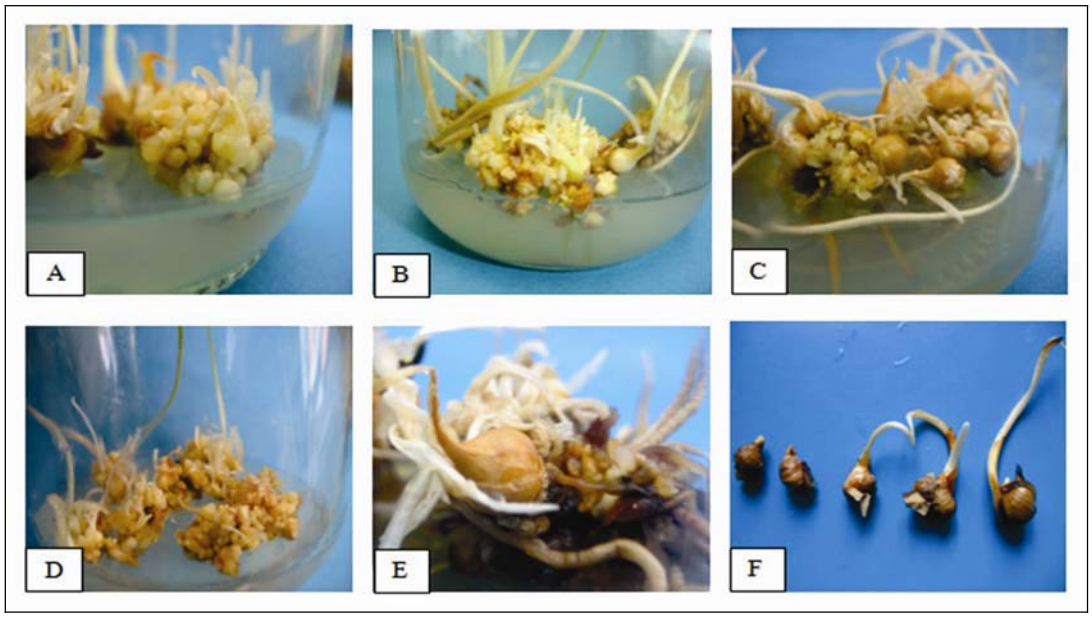
نتایج

در ابتدای آزمایش کالوس‌های رویان‌زای تقریباً هم اندازه، با تعداد رویان‌های کروی یکسان، برای انتقال به محیط‌های کشت جدید (القا بلوغ) انتخاب شدند. در تیمار شاهد،که محیط MS بدون هورمون بود، نه تنها تکثیر رویان‌های کروی متوقف شد، بلکه با تسریع روند قهوه‌ای شدن، پس از مدتی این رویان‌ها از بین رفتند، در حالی که در محیط‌های دیگر کم و بیش تولید و تمایز مراحل رویانی ادامه داشت. همچنان که در جدول ۱ دیده می‌شود، مقایسه میانگین‌های تعداد رویان‌های بالغ تولید شده در نتیجه تیمار با چهار ترکیب هورمونی مورد بررسی (NAA، IBA، ABA و BAP) تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال $P<0.05$ نشان می‌دهد.

شکل ۱ مراحل تکوین رویان‌های بدنی زعفران زراعی را تحت تیمارهای مختلف نشان می‌دهد. در این آزمایش رویان‌هایی بالغ در نظر گرفته شدند که وارد مرحله کلئوپتیلار شده و جوانه‌زنی را شروع کرده بودند.

جدول ۱- تجزیه واریانس دو طرفه تأثیر متقابل دو عامل زمان تیمار و غلظت هورمون‌های به کار برده شده در رابطه با تکمیل دوره بلوغ رویان‌های بدنی کروی زعفران زراعی؛ **تفاوت معنی‌دار در سطح P<0.01، *تفاوت معنی‌دار در سطح P<0.05، ns عدم تفاوت معنی‌دار در سطح P<0.05، اعداد داخل پرانتز در ستون دوم مربوط به درجه آزادی داده‌های مربوط به ABA است.

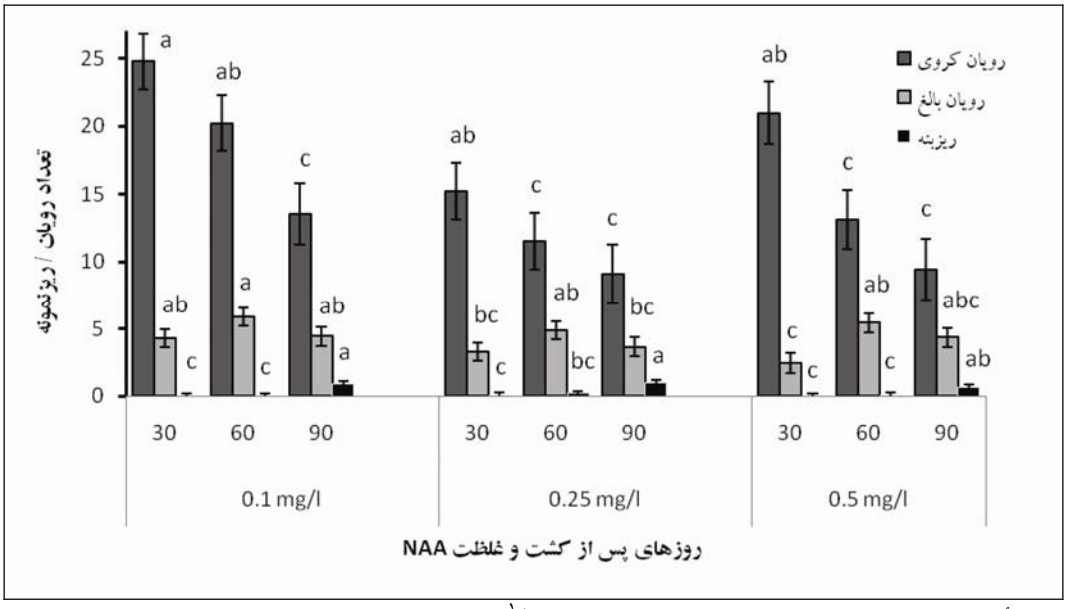
منبع تغییرات	درجه آزادی	ABA	BAP	IBA	NAA
زمان	۲	۸۱/۹۵ **	۴۴/۲۷ *	۶۳/۵۴ *	۱۷/۲۷ ns
غلظت	۲ (۳)	۸۱/۷۵ **	۱۳۰/۸۸ **	۳۲/۳۳ ns	۷۷/۳۶ **
زمان×غلظت	۴ (۵)	۱۱/۲۲ ns	۶۲/۹۳ **	۲/۱۲ ns	۵/۵۲ ns
خطا	۱۳۴ (۱۵۰)	۱۳/۵۰	۱۴/۹۴	۱۶/۹۳	۱۰/۹۰
کل	۱۴۳ (۱۶۱)				



شکل ۱- بلوغ رویان‌های کروی زعفران و تشکیل ریزبنه در یک دوره ۹۰ روزه پس از انتقال رویان‌های کروی به محیط‌های القای بلوغ: A) افزایش رویان کروی در محیط حاوی NAA ۰/۵ mg/l بعد از ۳۰ روز؛ B) رویان‌های جوانه‌زده در محیط NAA ۰/۲۵ mg/l؛ C) ریزبنه‌های تشکیل شده در محیط حاوی IBA ۱ mg/l سه ماه پس از انتقال؛ D) تکثیر (proliferation) رویان‌های کروی و القای بلوغ در محیط واجد BAP ۰/۵ mg/l سه ماه پس از انتقال؛ E) زوال رویان‌های جوانه‌زده در محیط واجد ABA ۱ mg/l سه ماه پس از کشت؛ F) جداسازی ریزبنه‌های نوپدید با فلس‌های غشایی مشابه بنه‌های طبیعی.

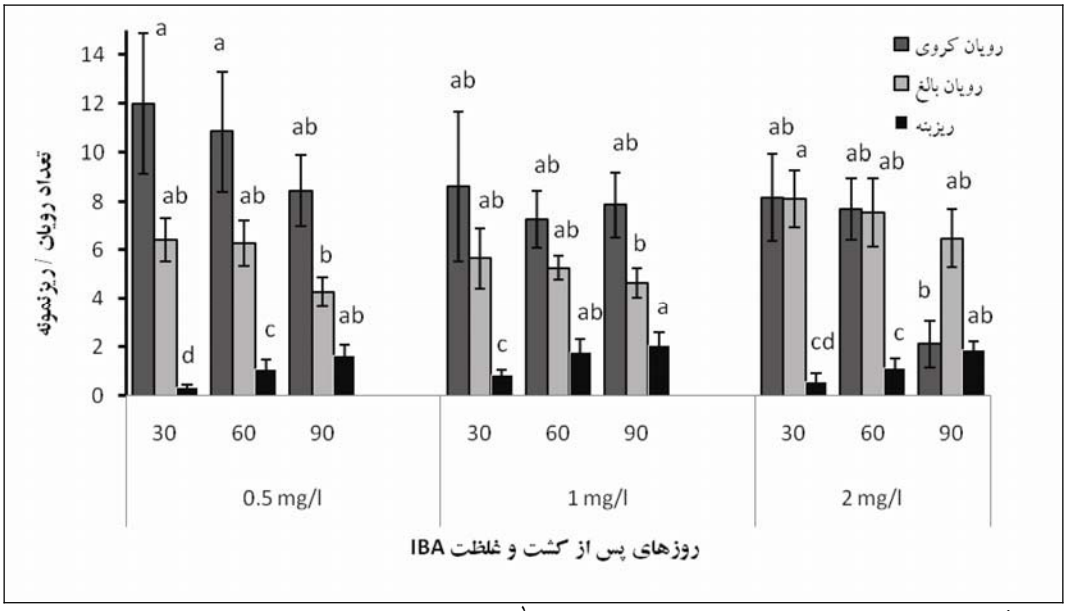
از آنجا که میزان تأثیر NAA و IBA دو هورمون به کار برده شده از گروه اکسین‌ها وابسته به غلظت و ساختار شیمیایی آنها بود، گستره متفاوتی از غلظت‌ها استفاده شد. NAA که بیشتر در تمایز ریشه‌ها مؤثر است، با غلظت‌های کمتر و IBA با قدرت اکسینی ضعیف‌تر در غلظت‌های بالاتر به محیط کشت اضافه شد. نتایج حاصل از کاربرد غلظت‌های مختلف این دوهورمون تفاوت معنی‌داری را نشان داد که در شکل‌های ۲ و ۳ به خوبی قابل مشاهده است. همان طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، در پایان اولین ماه کشت، رویان‌های کروی در محیط‌های حاوی ۰/۵ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، تعداد رویان‌های کروی القا شده بر روی ریزنمونه‌ها نسبت به تعداد اولیه در ابتدای

آزمایش و اعمال تیمارهای جدید به سرعت افزایش یافت (۲۴/۸ و ۲۱ عدد رویان کروی به ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA). میانگین تعداد رویان‌های بالغ بین ۲/۵– ۴/۳ عدد به ازای هر ریز نمونه متغیر بود. تعداد رویان‌های کروی تحت تیمار NAA در ماه‌های دوم و سوم نسبت به ماه اول به طور مشخص کاهش یافت. این پدیده رابطه مستقیم بین افزایش سن ریز نمونه‌ها و تکمیل مراحل رویان‌زایی را در هر یک از غلظت‌های آزمون شده NAA نشان می‌داد؛ به گونه‌ای که در محیط‌های کشت حاوی ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA میزان کاهش تعداد رویان‌های کروی شمارش شده به ترتیب برابر ۴/۵، ۳/۷ و ۷/۸ عدد در ماه دوم و ۱۱/۲، ۶/۱ و ۱۱/۵ عدد در ماه سوم بود و به همین ترتیب، بر تعداد رویان‌های بالغ در ماه دوم و تعداد ریزبنه در ماه سوم افزوده شد (شکل ۲).



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA در محیط‌کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ساکاروز ۶ درصد بر روی القای رویان‌های کروی، بلوغ رویان‌ها و تولید ریزبنه زعفران در طول سه ماه. مقادیر میانگین۴ تا ۶ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشابه روی هر ستون نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در مورد هر مرحله رویانی است.

در رابطه با دومین ترکیب اکسینی به کار برده شده جهت بلوغ رویان‌ها؛ یعنی ایندول بوتیریک اسید، چنان که در شکل ۳ نیز مشاهده می‌گردد، بیشترین تعداد رویان کروی در ماه اول و در غلظت‌های کم IBA تولید شد (۱۲ رویان کروی در هر ریزنمونه در تیمار ۰/۵ mg/l) و کمترین تعداد رویان‌های کروی برابر ۲/۱ رویان نیز در ماه سوم در نتیجه تیمار با غلظت ۲ mg/l از هورمون ایندول بوتیریک اسید حاصل گردید. طی ماه‌های اول و دوم تفاوت معنی‌داری بین میانگین تعداد رویان‌های کروی تشکیل شده در محیط‌های القای بلوغ که حاوی ۱– ۲ mg/l IBA بودند دیده نشد، اما با گذشت زمان وجود غلظت‌های بالاتر این هورمون موجب کاهش چشمگیری (۶۳ درصد) در تعداد رویان‌های کروی گردید (۲/۱ رویان کروی با تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA در ماه سوم به دست آمد).

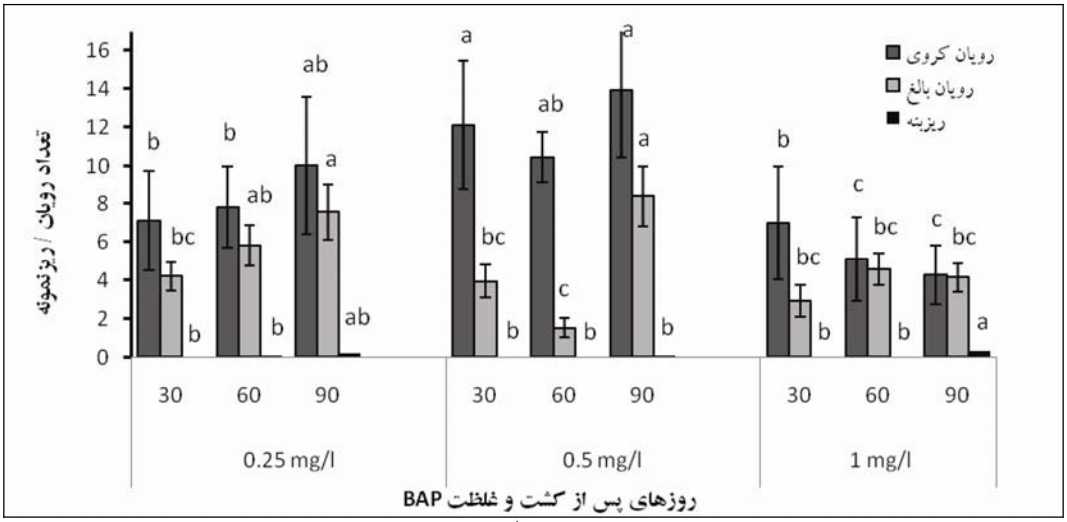


شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف IBA در محیط کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ساکاروز ۶ درصد بر روی القای رویان‌های کروی، بلوغ رویان‌ها و تولید ریزبنه در طول سه ماه. مقادیر میانگین۴ تا ۶ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشابه روی هر ستون نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در مورد هر مرحله رویانی است.

بر خلاف مرحله القای رویان‌های کروی، بلوغ و جوانه‌زنی رویان‌ها در این محیط کشت تقریباً وابسته به زمان و غلظت هورمون‌های به کار برده شده بود. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، نتایج حاصل از پیشبرد بلوغ رویان‌های کروی تیمار شده با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به طور متوسط باعث جوانه‌زنی ۵/۷- ۶/۴ عدد رویان در طول ماه‌های اول و دوم شد و با غلظت ۲mg/l این تنظیم‌کننده رشد تعداد رویان‌های بالغ حدود ۲۶ درصد افزایش یافت (میانگین ۸/۱ عدد رویان بالغ به ازای هر ریزنمونه در محیط حاوی ۲ mg/l IBA در برابر ۶/۴ عدد رویان بالغ در محیط حاوی ۰/۵ mg/l IBA). افزایش زمان نگهداری ریزنمونه‌ها در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف IBA نیز همانند اثر هورمون NAA اثر نامطلوبی به جا گذاشت و ۲۰- ۳۰ درصد از تعداد رویان‌های بالغ کاست. البته، کاهش تعداد رویان‌های بالغ به طور مستقیم با سیر تکاملی رویان‌ها در جهت تشکیل ریزبنه ارتباط داشت. برای مثال، طی تیمار با ۱ mg/l IBA میانگین تولید ریزبنه به ازای هر ریزنمونه ۰/۸عدد بود ودر ماه‌های بعد این تعداد افزایش یافت. بیشترین تعداد ریزبنه (۲/۱ و ۱/۹) به ترتیب در پایان ماه سوم طی تیمار رویان‌های کروی با ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. این ریزبنه‌ها پس از چند بار واکشت، ظاهری شبیه بنه‌های طبیعی با همان فلس‌های قهوه‌ای رنگ پیدا کردند که برای آزمایش‌های بعدی از قطعه بنه مادری جدا و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

با بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف BAP، از تنظیم‌کننده‌های سیتوکینینی، بر روی میزان جوانه‌زنی رویان‌های کروی و تشکیل ریزبنه (شکل ۴) مشخص گردید که این هورمون در غلظت ۰/۵ mg/l دارای بیشترین تأثیر در القای رویان‌های کروی بر روی سطوح ریزنمونه‌ها

بود و این اثر خود را حتی تا ماه سوم نیز حفظ کرد. بیشترین تعداد رویان کروی مشاهده شده به ازای هر ریزنمونه در ماه‌های اول تا سوم به ترتیب برابر ۱۲/۱، ۱۰/۴ و ۱۴ عدد بود، درحالی که در غلظت ۱ mg/l BAP تعداد رویان‌های کروی به ترتیب به ۷، ۵/۱ و ۴/۳ کاهش یافت.



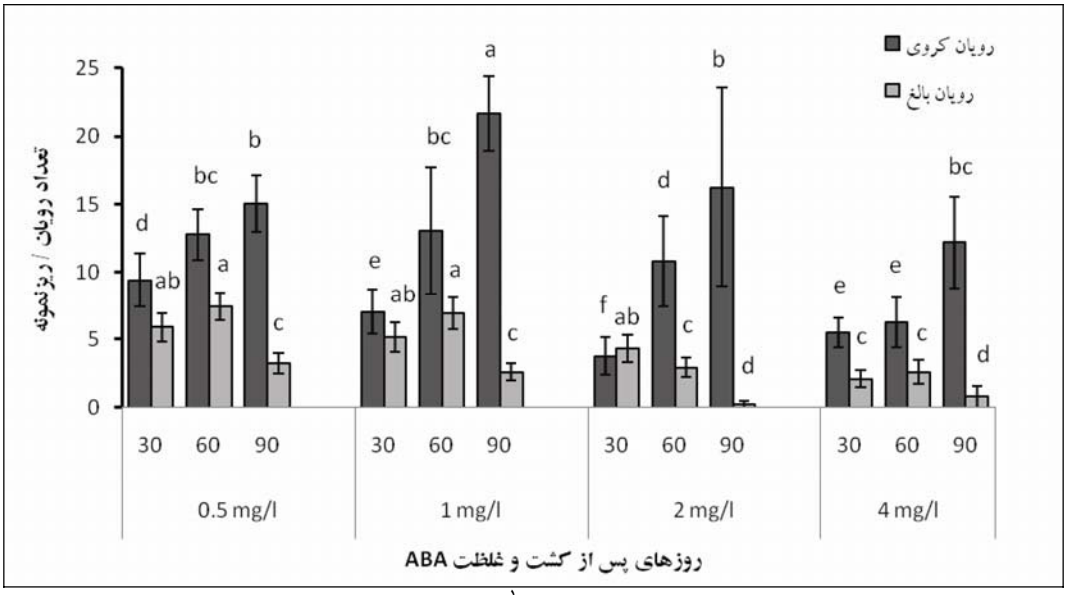
شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف BAP در محیط کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ساکاروز ۶ درصد بر روی القای رویان‌های کروی، بلوغ رویان‌ها و تولید ریزبنه در طول سه ماه. مقادیر میانگین۴ تا ۶ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشابه روی هر ستون نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در مورد هر مرحله رویانی است.

از طرف دیگر، فراوانی تشکیل رویان‌های بالغ و جوانه‌زنی آنها در غلظت‌های پایین BAP نسبت به غلظت‌های بالاتر (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بیشتر بود؛ چنانکه در غلظت ۰/۲۵ mg/l تعداد رویان‌های جوانه‌زده بر روی هر ریزنمونه طی ماه‌های اول تا سوم از ۴/۲ به ۷/۶ رویان افزایش یافت، درحالی که در غلظت ۱ mg/l BAP تعداد رویان‌های جوانه‌زده از ۲/۹ به ۴/۲ رسید. در غلظت ۰/۵ mg/l بنزیل آدنین آمینوپورین علی‌رغم بالا بودن تعداد رویان‌های کروی تشکیل شده بر روی ریزنمونه‌ها، تعداد رویان‌های بالغ شده در ماه اول و دوم به ۳/۹ و ۱/۵ عدد رسید و حتی در ماه دوم تغییر شکل غیر طبیعی تعدادی از رویان‌های جوانه‌زده را نیز نشان داد، اما با گذشت زمان؛ یعنی در ماه سوم میزان تمایز رویان‌های کروی به رویان‌های بالغ به طور معنی‌داری افزایش یافت و به ۸/۴ عدد رسید.

به طور کلی، مجموعه تیمارهای BAP از نظر تولید ریزبنه از ارزش کمتری برخوردار بود. میانگین ریزبنه‌زایی در غلظت‌های ۰/۲۵ mg/l و ۱ mg/l به ترتیب ۰/۲ و ۰/۳ ریزبنه به ازای هر ریزنمونه بود که نسبت به تیمارهای NAA ناچیز است.

چهارمین تیمار هورمونی آزمایش شده برای پیشبرد بلوغ رویان‌های کروی زعفران، آبسزیک اسید بود. این هورمون در چهار غلظت ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌های کشت MS ۱/۲ استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که این ترکیب در دو غلظت اول اثر بارزی در تحریک کالوس‌های رویان‌زای زعفران در جهت تشکیل

رویان‌های کروی و رویان‌های جوانه‌زده داشت. اثر این هورمون در مورد تشکیل رویان‌های کروی در طول زمان به صورت تصاعدی افزایش یافت (شکل ۵). برای مثال، تعداد رویان‌های کروی تشکیل شده در ماه اول تا سوم در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب برابر ۹/۴، ۱۲/۷ و ۱۵/۱ و در غلظت ۱ mg/l برابر ۷/۱، ۱۳/۱ و ۲۶/۱ عدد به ازای هر ریزنمونه بود. روند فوق با غلظت ۲ mg/l نیز به همین ترتیب دنبال شد؛ به طوری که بیشترین تعداد رویان‌های کروی؛ یعنی ۲۱/۶ و ۱۶/۳ عدد به ازای هر ریزنمونه در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد.



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف ABA در محیط کشت پایه MS ۱/۲ حاوی ساکاروز ۶ درصد بر روی القای رویان‌های کروی و بلوغ رویان‌ها در طول سه ماه، تولید ریزبنه در این گروه از تیمارها اغلب برابر صفر یا بسیار محدود بود. مقادیر میانگین۴ تا ۶ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشابه روی هر ستون نشانه عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در مورد هر مرحله رویانی است.

همان طور که در شکل ۵ دیده می‌شود، در کوتاه مدت، غلظت‌های کم ABA (۱ mg/l و ۰/۵) نقش مؤثری در پیشبرد مراحل تکوین رویان تا مرحله بلوغ و جوانه‌زنی داشتند، اما ریزبنه‌ها تمایز پیدا نکردند. افزایش دوره نگهداری در این نوع محیط کشت باعث سیاه شدن رویان‌های بالغ و از بین رفتن آنها شد. برای مثال، تعداد رویان‌های بالغ در محیط کشت حاوی ABA ۰/۵ mg/l از ۷/۴ در ماه اول به ۳/۳ در ماه سوم و در محیط حاوی ABA ۴ mg/l از ۲/۱ به ۰/۸ رویان طی ماه‌های اول تا سوم کاهش یافت، درحالی که در همین زمان و همین ترکیب محیط کشت میانگین تعداد رویان‌های کروی از ۵/۵ به ۱۲/۲ عدد افزایش یافته بود.

برعکس، در مورد تشکیل رویان‌های بالغ، واکشت‌های متعدد و نگهداری طولانی مدت در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف ABA منجر به عدم رشد و نمو طبیعی رویان‌ها شد و علی رغم تعداد بالای رویان‌های کروی، تعداد رویان‌های جوانه‌زده به شدت کاهش یافت و حتی به کمتر از ۵۰ درصد تعداد رویان‌های بالغ در ماه اول و دوم

نیز رسید. این پدیده با افزایش غلظت ABA در محیط بلوغ بیشتر مشاهده شد.

بحث

رویان‌زایی رویشی فرآیند تکاملی پیچیده‌ای است که از بسیاری جهات شبیه رویان‌زایی زایشی است. در مرحله اول، بافت‌های رویشی با تمایز زدایی توانایی رویان‌زایی را کسب می‌کنند (مرحله القا) و پس از دریافت محرک مناسب مراحل تکاملی شروع می‌شود. در نهایت طی بلوغ، رویان‌های بدنی برای جوانه‌زنی آماده می‌شوند. این مرحله پس از آبگیری و انباشتگی ذخایر دنبال می‌شود. رویان‌زایی بدنی ممکن است در پاسخ به علامت‌های متعدد، ازجمله حضور اکسین و عوامل تنش‌زا آغاز شود. سطح هورمون‌های درون‌زا و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌کشت، یکی از مهمترین عوامل برای دست‌یابی به واکنش ریخت‌زایی مناسب است (Grieb *et al.*, 1997). بنابراین، بررسی نتایج حاصل از تغییر غلظت و نوع هورمون‌های موجود در محیط‌کشت و پاسخ رویان‌زایی زعفران در هر مرحله باید مورد توجه قرار گیرد.

در بیشترمقالاتی که اخیراً چاپ شده است، حضور اکسین‌ها به تنهایی یا در ترکیب با سیتوکینین‌ها برای القای رویان‌زایی رویشی ضروری گزارش شده است (Gaj, 2004; Rajabpoor *et al.*, 2007). مروری بر نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که کاربرد اکسین‌های برون‌زا کارآمدترین تیمار برای القای رویان‌زایی بدنی در زعفران است، ولی تکامل بیشتر رویان‌های موجود به واسطه کاهش یا حذف اکسین از محیط‌کشت و حضور ABA تأمین می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان اظهار نمود که هرچند در ماه اول کشت وجود NAA در محیط القای بلوغ رویان‌های کروی زعفران زراعی محرک تولید تعداد بیشتری از رویان‌های کروی در سطح ریزنمونه است، اما نگهداری طولانی مدت ریزنمونه‌ها در این محیط‌ها نه تنها باعث افزایش قابل ملاحظه تعداد رویان‌های بالغ نشد، بلکه از تعداد رویان‌های کروی نیز کاست و به این ترتیب، توان بالقوه این ریزنمونه‌ها را برای تولید ریزبنه کاهش داد. برعکس، عامل زمان در این رابطه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بود؛ چنانکه در ماه دوم بیشترین تعداد رویان‌های بالغ و در ماه سوم بیشترین تعداد ریزبنه با تیمار NAA به دست آمد، اما در نخستین ماه کشت ریزنمونه‌ها، هیچ یک از غلظت‌های NAA به کار برده شده در محیط‌کشت نتوانستند محرک بلوغ رویان‌های کروی و تولید ریزبنه باشند.

هرچند تنظیم‌کننده رشد IBA به اندازه NAA در تکثیر و افزایش تعداد رویان‌های کروی القا شده بر روی هر ریزنمونه کارآیی لازم را نداشت و در مقایسه با NAA قدرت آن حتی به نصف کاهش می‌یافت، اما مکانیسم تأثیر آن تقریباً شبیه ترکیب اخیر بود؛ بدین ترتیب که تنظیم‌کننده رشد IBA در غلظت‌های کم و در ابتدای زمان کشت، محرک القای رویان‌های کروی در سطح کالوس‌های رویان‌زا بود، اما بعداً اثر آن به سرعت تعدیل شد. به احتمال زیاد، در این مرحله ژن‌های مؤثر در مسیر تکوین و تمایز رویان‌ها فعال شده بودند. با افزایش غلظت هورمون فوق سرعت این فرآیندها با روند تصاعدی افزایش یافت به طوری که در ماه اول میانگین ۶/۴ رویان جوانه‌زده در غلظت ۰/۵ mg/l و ۸/۱ رویان بالغ در غلظت ۲ mg/l ثبت شد و در ماه سوم به ازای ۴/۳ رویان بالغ در غلظت ۰/۵ mg/l حدود ۶/۵ رویان بالغ در غلظت ۲ mg/l حاصل شد. به همین ترتیب، شاخص تشکیل ریزبنه نیز افزایش

یافت. به عبارت دیگر می‌توان در ماه اول با کاربرد mg/l ۰/۵ از هورمون IBA ابتدا تعداد رویان‌های کروی را افزایش داد و سپس با بالا بردن غلظت این هورمون تا mg/l ۲ علاوه بر این که تعداد رویان‌های بالغ را می‌توان در سطح نسبتاً بالایی حفظ کرد، تعداد ریزبنه‌های تمایز یافته نیز تا حد قابل قبولی ارتقا می‌یابد. یکی از اهداف ارزشمند مورد مطالعه در بحث رویان‌زایی زعفران مزروعی تشکیل ریزبنه است. از این نظر تیمارهای IBA نقش تأثیرگذاری در تمایز نوشاخه‌ها در ارتباط با ذخیره‌سازی نشاسته و تشکیل ریزبنه‌ها داشتند، تا آنجا که حتی در ماه اول کشت، آثار تورم در بخش قاعده‌ای نوشاخه‌ها مشاهده شد. Grieb و همکاران (۱۹۹۷) نشان داده‌اند که مرحله بلوغ رویان‌های بدنی و آمادگی آنها برای جوانه‌زنی، تنها پس از آبگیری و انباشتگی ذخایر صورت می‌گیرد. بنابراین، کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر IBA که با پیشبرد تمایز سیستم آوندی انتقال ذخایر به بخش قاعده‌ای نوشاخه را سرعت می‌بخشند، تمایز ریزبنه را که از نظر گیاه‌شناسی ساقه زیرزمینی غنی از نشاسته است، افزایش می‌دهد. با گذشت زمان در ماه‌های دوم و سوم همراه با کاهش مختصر در تعداد رویان‌های کروی و جوانه‌زده تعداد ریزبنه‌ها در این گروه از تیمارها به تدریج افزایش نسبی یافت.

در رابطه با آثار مثبت NAA و IBA بر روی تکوین رویان‌های کروی زعفران، گزارش‌های تأیید کننده متعددی وجود دارد؛ از جمله Karaoğlu و همکاران (۲۰۰۷) از طریق کشت قطعات بنه زعفران و القا رویان‌زایی در محیط‌کشت MS حاوی BAP و NAA موفق شدند به طور میانگین ۱-۲ ریزبنه در هر ریزنمونه تولید نمایند. همچنین، ابراهیم‌زاده و همکاران (۱۳۸۵) نیز القای کالوس‌های رویان‌زا را در غلظت‌های بالای 2,4-D و غلظت‌های پایین کینتین گزارش کرده‌اند. آنها نشان دادند که NAA به عنوان یک اکسین برون‌زا محرک رویان‌زایی در گونه‌های مختلف زعفران (زراعی و وحشی) است. کاربرد تیمارهای هورمونی مختلف در محیط‌کشت پیاز گلایول نیز نشان داد که هرچند کاربرد اکسین‌ها به تنهایی خواب جوانه را می‌شکند، اما همچون زعفران، NAA اثر مستقیمی بر غده‌زایی ریزنمونه‌های گلایول نداشت (Nasir *et al.*, 1996).

در بین تنظیم‌کننده‌های رشد، اکسین‌ها از جمله متداول‌ترین ترکیبات استفاده شده برای گذار از مرحله رویشی به مرحله رویانی هستند. اثبات شده است که کالوس‌های رویان‌زا دارای مقادیر بالاتری از IAA آزاد هستند. تراز بالای IAA آزاد می‌تواند در پایه‌گذاری انتقال قطبی اکسین که برای تکمیل مراحل رویان‌زایی رویشی و تکوین اندام‌ها لازم است، مهم باشد. هنگامی که شرایط مناسب باشد و به محض تحریک کافی، احتمالاً با برقراری یک شیب اکسین درونی در ریزنمونه‌ها رویان‌زایی صورت می‌گیرد (Jimenez and Bangerth, 2001). از طرف دیگر، سطوح بالای اکسین از رشد و نمو مریستم نوشاخه ممانعت می‌کند. اگر غلظت اکسین کم باشد، پس از تشکیل لپه، شکل‌گیری مریستم ساقه خیلی سریع انجام می‌شود و سپس تحت شرایط مناسب محیط‌کشت جوانه‌زنی زود رس انجام می‌شود (Pareek, 2005).

نقش BAP در القای رویان‌زایی زعفران به غلظت این ماده در محیط‌کشت وابسته بود و به نظر می‌رسد که احتمالاً اثر خود را از طریق ایجاد توازن با اکسین‌های درون‌زا و تنظیم نسبت سیتوکینین به اکسین انجام می‌دهد؛ به طوری که با دو برابر شدن غلظت BAP از mg/l ۰/۲۵ به mg/l ۰/۵ این هورمون نقش مهمی در القای و تشکیل

رویان کروی داشت، اما با افزایش غلظت آن از ۰/۵ mg/l به ۱ mg/l این اثر معکوس شد و القای رویان‌های کروی به شدت قابل ملاحظه‌ای افت کرده تعداد آنها به نصف تقلیل یافت. در تک لپه‌ای‌ها، رویان‌زایی اولیه منحصراً در محیط‌های کشت حاوی اکسین القا می‌شود، اما القای رویان‌زایی بدنی توسط سیتوکینین‌ها هم به اثبات رسیده است (Faure *et al*., 1998). در این تحقیق، علی‌رغم نقش مؤثر هورمون BAP در القای و تشکیل رویان‌های کروی زعفران زراعی و بلوغ آنها در طول یک دوره سه ماهه، کاربرد این تنظیم‌کننده رشد در رابطه با تولید ریزبنه موفقیتی در پی نداشت و تنها تعداد ناچیزی از رویان‌های جوانه‌زده در ماه سوم قدرت ذخیره‌سازی نشاسته در سلول‌های قاعده‌ای نوشاخه و تبدیل آنها به بافت‌های ریزبنه را پیدا کردند. کاربرد تنظیم‌کننده‌های سیتوکینینی نظیر کینتین، زاتین، بنزیل آمینو پورین و تیدیازرون در محیط‌های کشت ریزنمونه‌های بنه، مریستم و برگ زعفران نتایج مشابهی را در رابطه با القای کالوس‌های رویان‌زا و جوانه‌زنی آنها نشان داده است (Karamian, 2004; Majourhat *et al*., 2006; Raja *et al*., 2007).

در مطالعه باززایی گلایول، Nasir و همکاران (۱۹۹۶) نیز نشان دادند که القا و تشکیل پیاز در ریزنمونه‌های حاوی جوانه در محیط‌کشت حاوی NAA ۰/۰۲ mg/l و BAP ۰/۰۸ mg/l تحریک شد. از طرف دیگر، افزودن کینتین موجب القای تشکیل پیازهای جدید گلایول شد.

در بین بازدارنده‌های رشد، آبسزیک اسید نقش ویژه‌ای را در فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه، از جمله تکامل مراحل نموی رویان‌های زایشی ایفا می‌کند. سرعت بلوغ رویان‌های بدنی زعفران زراعی در غلظت‌های کم ABA و در ماه‌های اولیه کشت رضایت بخش بود، اما از جوانه‌زنی رویان‌های بالغ و تشکیل ریزبنه‌ها در این محیط‌های کشت ممانعت شد. نتایج فوق با گزارش‌هایی مطابقت دارد که طبق آنها استفاده از آبسزیک اسید برون‌زا در شرایط درون شیشه‌ای موجب ممانعت از جوانه‌زنی رویان‌های بالغ، افزایش سنتز پروتئین‌های ویژه رویانی و سنتز mRNAهای مربوطه می‌شد (Zeevaart and Creelman, 1988). تحقیقات انجام شده دربارهٔ گیاهانی مانند هویج، یونجه، کاسنی و جهش‌یافته‌های آرابیدوپسیس مشخص کرده است که در اکثر آنها در اواخر دوره رویان‌زایی، بیان برخی ژن‌ها مانند LEA (Late Embryo-Abundant) تحت تأثیر هورمون ABA تشدید می‌شود. عملکرد این ژن‌ها در رویان‌های زایشی باعث حفاظت ساختارهای سلولی رویان‌های بالغ در طول خشک شدن بذر و جلوگیری از جوانه‌زنی زودرس می‌شود (Jimenez *et al*., 2005).

با توجه به نتایج به دست آمده در نتیجه کاربرد هورمون فوق در محیط‌کشت القاکنندهٔ بلوغ رویان‌های کروی زعفران می‌توان اظهار داشت که احتمالاً غلظت‌های ۰/۵ – ۱ mg/l هورمون ABA محرک رونویسی از ژن‌هایی است که در مراحل اولیه تا میانی رویان‌زایی فعال هستند. بیان این ژن‌ها به تولید و تکثیر رویان‌های کروی منجر می‌شود که حتی تا ماه سوم نیز مرحله تمایزی خود را حفظ می‌کردند. تعدادی از این رویان‌ها به سرعت وارد مراحل پیشرفته‌تر شده، باعث تشکیل رویان لپه‌ای و جوانه‌زنی آنها حتی در ۳۰ روز اول کشت شدند. بنابراین، تعداد قابل توجهی رویان بالغ در حضور غلظت‌های پایین ABA تولید می‌کردند. از طرف دیگر، افزایش غلظت ABA (بیشتر از ۲ mg/l) بر روی تکوین رویان‌های کروی و جوانه‌زنی رویان‌های بالغ تأثیرات منفی به جا گذاشت و با ورود به سومین ماه کشت ریزنمونه‌ها، این اثرات ممانعت کننده

تشدید شد تا آنجا که با کاربرد ۴ mg/l تأثیرات بازدارنده کاربرد ABA نه تنها در مرحله بلوغ و جوانه‌زنی، بلکه بر روی القای رویان‌های کروی نیز آثار ناهنجاری باقی گذاشت و همزمان از تعداد رویان‌های کروی و جوانه‌زده کاسته شد.

صرفنظر از نقش ABA در تسریع بلوغ رویان‌های زعفران، این ترکیب محرک تشکیل ریزبنه نبود. در واقع، القای ریزبنه‌ها در هیچ کدام از محیط‌های کشت حاوی ۴ mg/l -۱ از ABA رضایت بخش نبود و عدم انتقال رویان‌های بالغ و جوانه‌زده به محیط‌های عاری از ABA به تدریج موجب زوال رویان‌ها و سیاه شدن آنها شد. این مسأله با نظر پژوهشگرانی منطبق است که معتقدند مشخصه برجسته و قابل توجه رویان‌های بدنی، رشد آنها در نتیجه عدم حضور بازدارنده‌های رشد است. برای مثال، Raja و همکاران (۲۰۰۷) از تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر ABA و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر GA_3 برای جوانه‌زنی رویان‌های بالغ زعفران استفاده کردند. بر اساس نتایج Ahuja و همکاران (۱۹۹۴) پس از القای رویان‌زایی در ریزنمونه‌های زعفران، جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های کامل تنها در حضور هورمون تأمین گردید. تحقیقات Ginzburg (۱۹۷۳) و Ginzburg و Ziv (۱۹۷۳) نیز اثبات کرده است که گرچه ABA به عنوان مهمترین بازدارنده رشد درون‌زا، جوانه‌زنی پیاز گلایول را کنترل می‌کرد، اما حضور ABA در محیط کشت بر قدرت تشکیل پیاز آن اثر مثبتی نداشته، حتی از رشد آن جلوگیری کرد.

از طرف دیگر، تکامل مراحل رویانی زعفران، به خصوص تمایز ریزبنه‌ها، در غلظت‌های بالای ساکاروز (۶ درصد) رخ داد. سطوح بالای ساکاروز سبب افزایش اسمولاریته محیط کشت می‌شود. این فرآیند می‌تواند باعث افزایش سطح ABA درون‌زا و کنترل بلوغ رویان‌ها شود (Komatsuda and Ohyama, 1998). همان طور که طی اندام‌زایی *Adenia hondala*، همبستگی مثبتی بین انباشتگی نشاسته و سرعت تمایز مشاهده گردید (Aruna *et al.*, 2009)، غلظت بالای ساکاروز در محیط کشت زعفران و انباشتگی نشاسته به عنوان یک منبع انرژی ارزان و در دسترس برای فرآیندهای اندام‌زایی و یا به عنوان یک عامل تنظیم اسمزی (مانند قندهای محلول آزاد) در نمو وتمایز اندام‌ها ضروری است؛ هر چند ممکن است تصور شود که تعداد ریزبنه‌های تشکیل شده در سطح ریزنمونه‌ها کم است، اما با توجه به تعداد ریزنمونه‌ها در هر پتری‌دیش و تعداد تکرارهای هر تیمار نتایج به دست آمده در این پژوهش قابل تأمل است. بر اساس گزارش‌های موجود تعداد شاخه‌هایی که به ازای یک ریزنمونه بر روی گیاهان پیازدار تشکیل می‌شود، بسیار کم است. برای مثال، در *Eucrosia stricklandii* در نتیجه تیمارهای هورمونی مختلف ۰/۷- ۲/۲ نوشاخه تشکیل شده بود (Colque *et al.*, 2002). در پژوهش حاضر نیز با ترکیب هورمونی IBA ۱ mg/l به طور متوسط ۲/۰۷ عدد ریزبنه در هر ریزنمونه به دست آمد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاصل نشان داد که بیشترین تعداد رویان کروی زعفران زراعی ظرف مدت ۳۰ روز در محیط MS ۱/۲ حاوی NAA ۰/۱ mg/l تشکیل شدند، اما این محیط در مقایسه با محیط‌های حاوی BAP و IBA برای بلوغ رویان‌های کروی مناسب نبود. استفاده از هورمون IBA در غلظت‌های ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر پس از گذشت دو ماه بهترین تیمار برای القای بلوغ رویان و تشکیل ریزبنه بود. هر

چند در پایان ماه سوم بیشترین تعداد رویان بالغ در محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۵ mg/l BAP به دست آمده بود، ولی تداوم کاربرد هورمون فوق در ریزبنه‌زایی مؤثر واقع نشد. غلظت‌های مختلف ABA موجب تحریک بلوغ رویان‌های کروی شد، اما تأثیری در ریزبنه‌زایی نداشت. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد برای پیشبرد بلوغ رویان‌زایی در زعفران مزروعی از غلظت‌های کم ABA (۰/۲۵ -۱ mg/l) و آن هم فقط در ماه‌های اول و دوم کشت استفاده شود. سپس ریزنمونه‌های واجد رویان‌های بالغ به محیط‌های کشت عاری از ABA منتقل شوند که حاوی تنظیم‌کننده‌های مصنوعی IBA هستند. همان طور که گفته شد، هورمون اخیر بر روند تمایز و تکوین ریزبنه‌ها دارای آثار مثبت و چشمگیری است که آن را از سه ترکیب هورمونی دیگر متمایز می‌نماید. در نهایت، می‌توان اظهار نمود که برای کنترل مراحل القا و پیشرفت در هر مرحله رویانی، نیازهای متفاوتی وجود دارد. این پیچیدگی در رابطه با شناسایی چگونگی تکامل بیوشیمیایی و فیزیولوژیک رویان‌های رویشی و نقش هورمون‌های گیاهی و تنظیم‌کننده‌های رشد یک مانع اساسی است. از این رو، تحقیقات بیشتر در آینده می‌تواند به فهم مکانیسم عمل این هورمون‌ها در پیشبرد مراحل رویان‌زایی زعفران کمک کند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از یک پایان‌نامه کارشناسی ارشد از دانشگاه الزهراء (س) است که در قالب طرح پژوهشی در مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از کمک‌ها و پشتیبانی ریاست محترم مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی و همکاران بخش کشت بافت و انتقال ژن قدردانی کنند.

منابع

ابراهیم‌زاده، ح.، رجبیان، ط.، کرمیان، ر.، ابریشم‌چی، پ. و صبورا، ع. (۱۳۸۵) زعفران ایران با نگاه پژوهشی. انتشارات اطلاعات، تهران.

Ahuja, A., Kaul, S., Ram, G. and Kaul, B. L. (1994) Somatic embryogenesis and regeneration of plantlet in saffron (*Crocus sativus* L.). Indian Journal of Experimental Biology 32: 135-140.

Aruna, A., Joseph, J. P. and Joseph, G. (2009) *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis in *Adenia hondala* (Gaertn.) de Wilde, an endangered medicinal plant of the Western Ghats (Report). International Journal of Biotechnology and Biochemistry.

Blazquez, S., Olmos, E., Hernandez, J. A., Fernandez, N., Fernandez, J. A. and Piqueras, A. (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. Plant Science 97(1):49-57.

Colque, R., Villadomat, F., Bastida, J. and Codina, C. (2002) Micropropagation of the rare *Eucrosia stricklandii* (Amaryllidaceae) by twin-scaling and shake liquid culture. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 77(6): 739-743.

Ebrahimzadeh, H., Rajabian, T. and Karamian, R. (2000) *In vitro* production of floral buds and stigma-like structures on floral organ of *crocus sativus* L.. Pakistan Journal of Botany 32(1): 141-150.

Ebrahimzadeh, H., Saboora, A., Noori-Daloii, M. R. and Gaffari, M. R. (1998) Chromosomal

studies on four Iranian *Crocus* species (Iridacea). Iranian Journal of Botany 7(2): 179-192.

Faure, O., Dewitte, W., Nougarede, A. and Van Onckelen, H. (1998) Precociously germinating somatic embryos of *Vitis vinifera* have lower ABA and IAA levels than their germinating zygotic counterparts. Physiologia Plantarum 102: 591-595.

Fernandez, J. A. (2004) Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Plant Science 2: 127-159.

Gaj, M. D. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* L.. Plant Growth Regulation 43: 27-47.

George, P. S., Visvanath, S., Ravishakar, G. A. and Venkataraman, L. V. (1992). Tissue culture of saffron (*Crocus sativus* L.): Somatic embryogenesis and shoot regeneration. Food Biotechnology 6 (3): 217-223.

Ginzburg, C. (1973) Hormonal regulation of cormel dormancy in *gladiolus grandiflorus*. Journal of Experimental Botany 24: 558-566.

Ginzburg, C. and Ziv, M. (1973). Hormonal regulation of cormel formation in *gladiolus* stolon grown *in vitro*. Annual Bototany 37: 219-224.

Grieb, B., Schafer, F., Imani, J., Mashayekhi, K. N., Arnholdt-Schmitt, B., and Neumann K. H. (1997) Changes in soluble proteins and phytohormone concentration of cultured carrot petiole explants during induction of somatic embryogenesis (*Daucus carota* L.). Journal of Applied Botany 71: 94-103.

Jimenez, V. M. and Bangerth, F. (2001) *In vitro* culture and endogenous hormone levels in immature zygotic embryos, endosperm and callus culture of normal and high-lysine barley genotypes. Journal of Applied Botany 75: 1-7.

Jimenez, V. M. and Thomas, C. (2005) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. In: Somatic embryogenesis (eds. Mujib, A. and Šamaj, J.) 103-118. Speringer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Karamian, R. (2004) Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of *Crocus*. Acta Horticulture 650: 253-259.

Karaoğlu, C., Çöcü, S., Ipek, A., Parmaksız, I., Uranbey, S., Sarıhan, E., Arslan, N., Kaya, M. D., Sancak, C., Özcan, S., Gürbüz, B., Mirici, S., Er, C. and Khawar, K. M. (2007) *In vitro* micropropagation of saffron. Proceedings of the second international symposium on saffron biology and Technology. Acta Horticulture 739: 223-227.

Komatsuda, T. and Ohyama, K. (1998) Genotypes of high competence for somatic embryos and plantlet regeneration in soybean (*Glycine max*). Theoretical Applied Genetic 75:695-700.

Majourhat, K., Marinez, P., Fernandez, J. A. and Piqueras, A. (2006) Enhanced plantlet regeneration from cultured meristems in sprouting buds of saffron corms. Proceedings of the second international symposium on saffron biology and Technology. Acta Horticulture.

Murashing, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassys with tobacco tissue culture. Physiology of Plant 15: 437-493.

Nasir, I. A., Afrasiab, H. and Riazuddin, S. (1996) Plant regeneration of *gladiolus* through *in vitro* technique. Pakistan Journal of Biological Science 4: 165-169.

Pareek, L. K. (2005) Trends in plant tissue culture and biotechnology. Agro Botanical Publishers, Nagar Bikaner.

Raja, W., Zaffer, G. and Wanti, S. A., (2007). *In vitro* microcorm formation in saffron (*Crocus sativus* L.). Proceedings of the second international symposium on saffron biology and Technology. Acta Horticulture 739:291-301.

Rajabpoor, Sh., Azghandi, A. V. and Saboora, A. (2007) Effects of different concentrations of 2,4-D and BAP on somatic embryogenesis induction in saffron (*Crocus sativus* L.). Pakistan Journal of Biological Sciences 10(21): 3927-3930.

Sharma, K. D., Rathour, R., Sharma, R., Goel, S., Sharma, T. R. and Singh, B. M. (2008) *In vitro*

cormlet development in *Crocus sativus*. Biologie Plantarum 52(4):709-712.

Sheibani, M., Azghandi, A. V. and Nemati, S. H. (2007) Induction of somatic embryogenesis in saffron using thidiazuron (TDZ). Pakistan Journal of Biological Science 10: 3564-3570.

Zeevaart, J. A. D. and Creelman, R. A. (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 39: 439-473.

Changes in exogenous hormone concentration and its effect on somatic embryo maturation and microcorm formation of saffron (*Crocus sativus* L.)

Shakiba Rajabpoor [1], Azra Saboora *[2] and Ali Vatanpour Azghandi

[1] Department of Biology, Payame Noor University, 19395-4697 Tehran, I. R. of IRAN
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
[3] Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agriculturel Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.) is an important economic crop in Khorasan province which is propagated by corms. The traditional culture has various problems such as pathogen attack and a long period of time for proliferation. Application of plant growth regulators and induction of somatic embryogenesis is an efficient method to propagate a large number of intact corms in *in vitro* condition. In this research, effects of four exogenous hormones during 90 days on maturation of globular embryo, its germination and microcorm induction of saffron by using half strength Murashige and Skoog media were studied. Investigated phytohormones were NAA (0.1, 0.25 and 0.5 mg l^{-1}), IBA (0.5, 1 and 2 mg l^{-1}), BAP (0.25, 0.5 and 1 mg l^{-1}) and ABA (0.5, 1, 2 and 4 mg l^{-1}). All treatments carried out based on completely randomized design in 4 replicates. Results showed that the most number of globular somatic embryos were obtained in ½ MS medium containing 0.1 mg l^{-1} NAA, but this media in relation to which were contained BAP or IBA was not suitable for maturation. After 60 days, the media supplied with 1 and 2 mg l^{-1} IBA were the best for induction of embryo maturation and cormlet formation. Although at the end of 90 days, highest number of mature embryos was obtained in the presence of 0.5 mg l^{-1} BAP, microcorm induction did not occurred by BAP treatments in long term. Different concentration of ABA quickly improved maturation of globular embryos but they had no positive effect on cormlet regeneration.

Key word: Embryo maturation, Hormone treatment, Microcorm, Saffron, *Crocus sativus* L.

* Correspong Author: saboora@alzahra.ac.ir

زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هشتم، تابستان ۱۳۹۰، صفحه ۵۹-۶۸
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۲/۱۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۰۲/۱۴
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۴/۰۷

تمایزیابی کیسه‌های ترشحی اسانس و رابطه آن با تکوین گل و میوه لیموترش (*Citrus limon* (L.) Burm.f.)

مریم رفیعی [۱*] و هما رجایی [۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران
[۲] بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

چکیده

کیسه‌های ترشحی اسانس در همهٔ گونه‌های جنس *Citrus* از تیره مرکبات (Rutaceae) گزارش شده‌اند. در پژوهش حاضر، به ساختار و تکوین کیسه‌های ترشحی اسانس، در گل و میوه در حال نمو لیموترش (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) پرداخته شده است. نمونه‌های جمع‌آوری شده در ۶ مرحله نموی با استفاده از تکنیک متداول میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) آماده‌سازی و در میکروسکوپ نوری بررسی شدند. غده‌های روغنی کاسبرگ، گلبرگ و تخمدان در زمان‌های متفاوتی ظاهر شدند، امّا ویژگی‌های تشریحی یکسانی را نشان دادند. بنیان‌گذاری کیسه‌های ترشحی تا اولین مرحله نمو میوه ادامه داشت، اما پس از آن دیگر کیسه جدیدی تشکیل نشد و کیسه‌های موجود تنها افزایش اندازه نشان دادند. الگوی تکوین غده‌های روغنی گل و پوست میوه مشابه بود و بر اساس اختلافات سلولی و درجه تمایز کیسه‌های ترشحی، به ۴ مرحله تفکیک شد. تمایزیابی غده‌های روغنی از تقسیمات سلول‌های اپیدرمی و زیر اپیدرمی آغاز و به تشکیل یک حفره مرکزی وسیع در وسط کیسه‌ها منتهی شد. سلول‌های احاطه کننده حفره مرکزی، با ساختار و نقش متفاوت، از یکدیگر تفکیک شدند. دو پدیده جدا شدن دیواره‌ها و تجزیه سلولی با یکدیگر همپوشانی داشته، تکوین کیسه‌های ترشحی در لیموترش از نوع شیزولیزیژن است.

واژه‌های کلیدی: اسانس، تکوین، ساختار، غده روغنی، لیموترش

مقدمه

کیسه‌های ترشحی به طور طبیعی در تمام گونه‌های تیره مرکبات (Rutaceae) تشکیل می‌شوند و مهمترین صفت تشریحی این تیره هستند (Fahn, 1988). در جنس *Citrus* کیسه‌های ترشحی معمولاً غده روغنی نامیده می‌شوند و ساقه، مزوفیل برگ، اندام‌های گل (به جز پرچم‌ها) و برون بر میوه محل سنتز و تجمع اسانس هستند (Museth, 1998).

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: rafiei@iaua.ac.ir، شماره تماس: ۰۷۲۹۷۶۲۳۹۰۸

در رابطه با چگونگی تکوین کیسه‌های ترشحی اسانس در گونه‌های مختلف جنس *Citrus* اختلاف نظر وجود دارد. کتاب‌های معتبر آناتومی تشکیل حفره مرکزی کیسه را ناشی از شکستن و خرد شدن سلول‌ها (Lysigeny) می‌دانند (Esau, 1977; Fahn, 1990). در عین حال، تشکیل فضای حاصل از جدا شدن سلول‌ها (Schizogeny) در هنگام تقسیم سلولی (Turner *et al*., 1998; Kight *et al*., 2001) و یا ترکیبی از هر دو پدیده (Schizolysigeny)، که ابتدا فضا به وسیله جدا شدن سلول‌ها تشکیل و سپس بر اثر خرد شدن سلول‌های حفره عریض می‌شود، در تمایزیابی غده‌های روغنی برگ و میوه انواع مرکبات گزارش شده‌اند (Buvat, 1989; Bennici and Tani, 2004; Rafiei and Rajaei, 2007; Liang *et al*., 2009). مسأله لیزیژن و یا شیزولیزیژن بودن کیسه ترشحی اسانس از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا اتولیز سلول‌های غده روغنی و آزادسازی ترشحات در فضای بین سلولی می‌تواند مثالی از پدیده مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی باشد.

گیاه لیموترش در طول سال گل‌دهی مکرر داشته، بدین لحاظ اهمیت اقتصادی ویژه‌ای دارد (McGregor, 1968). از طرفی، اسانس لیموترش هم به لحاظ طعم و هم رایحه، کاربرد بیشتری نسبت به اسانس‌های سایر مرکبات دارد (Lawless, 1992). مطالعات ساختاری کیسه‌های ترشحی در لیموترش محدود به پوست میوه رسیده (Bennici and Tani, 2004) و برگ آن (Turner *et al*., 1998) می‌گردد و تاکنون گزارشی مبنی بر تکوین غده‌های روغنی در طی فاز زایشی، از زمان تشکیل گل تا بلوغ میوه در گونه مورد نظر ارائه نشده است. پژوهش حاضر با هدف بررسی الگوی تمایزیابی کیسه‌های ترشحی اسانس و مطالعه رابطه بین تکوین اندام‌های زایشی و نمو غده‌های روغنی در لیموترش (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) انجام شده است.

مواد و روش‌ها

برای مطالعات ساختاری کیسه‌های ترشحی اسانس، نمونه‌های گل و پوست میوه لیموترش در ۶ مرحله نموی (۲۰ نمونه به ازای هر مرحله فنولوژیک)، شامل غنچه کوچک سبز رنگ (مرحله ۱)، غنچه کروی با گلبرگ‌های سفید (مرحله ۲)، گل باز شده قبل از لقاح (مرحله ۳)، میوه سبز رنگ تازه تشکیل شده (مرحله ۴)، میوه در مرحله تغییر رنگ (مرحله ۵) و میوه رسیده (مرحله ۶) از شهرستان خفر استان فارس جمع‌آوری شده و در قطعات ۱×۱×۱ میلی‌متری، پس از تثبیت مضاعف به وسیله گلوتار آلدئید ۵ درصد و تتراکسید اسمیوم ۱ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار، در سری‌های مختلف استون آبگیری شدند. نفوذپذیری و قالب‌گیری در رزین (Epon-Araldite) انجام شده، سپس برش‌های عرضی به ضخامت ۰/۵-۱ میکرون توسط تیغ شیشه‌ای اولترامیکروتوم LKB تهیه گردیدند. برش‌های آماده شده، با دو روش ۱) آبی تولوئیدین ۱ درصد و ۲) آبی متیلن- آزور ب- فوشین بازی رنگ‌آمیزی شدند (Roland, 1987; Ruzin, 1999). برای مشاهده و عکس‌برداری نمونه‌ها از میکروسکوپ نوری مدل Zeiss مجهز به سیستم عکس‌برداری آنالوگ Photoautomat استفاده شد.

نتایج

تکوین غده‌های روغنی

بررسی‌های میکروسکوپی پژوهش حاضر از کوچک‌ترین اندازه غنچه آغاز شده، تا میوه کاملاً رسیده ادامه یافت. در این پژوهش، برش‌ها به دو روش

رنگ‌آمیزی شدند که روش رنگ‌آمیزی با آبی متیلن- آزور ب- فوشین بازی در مقایسه با آبی تولوئیدین، با تفکیک رنگ، مطالعه کیسه‌های ترشحی و تکوین آنها را آسان‌تر می‌نمود. طی این بررسی، کیسه‌های ترشحی کاسبرگ، گلبرگ و تخمدان لیموترش الگوی تکوینی مشابهی را نشان دادند.

با در نظر گرفتن ویژگی‌های بافتی- سلولی، کیسه‌های ترشحی اسانس طی ۴ مرحله مشخص تشکیل شده، به بلوغ نهایی رسیدند: ابتدا تعدادی از سلول‌های اپیدرمی و زیر اپیدرمی شروع به تقسیم نمودند که این سلول‌ها با هسته درشت تر و پروتوپلاسم متراکم تر از سلول‌های پارانشیم زمینه‌ای و یا پروتودرم قابل تشخیص بودند (مرحله ۱- شکل ۱). تقسیمات سلولی، همراه با افزایش ابعاد، تا زمانی ادامه یافت که یک خوشه سلولی کروی تا بیضی شکل با پایه‌ای متصل به سلول‌های اپیدرمی پدید آمد. سلول‌های مرکزی کیسه نسبت به سلول‌های اطراف درشت‌تر بوده، دیواره نازک‌تر، پروتوپلاسمی متراکم‌تر و میزان رنگ‌پذیری بیشتری داشتند، اما سلول‌های کناری کشیده تر با دیواره‌ای ضخیم‌تر بودند (مرحله ۲- شکل ۲). در این مرحله سلول‌های خوشه فاقد فضای بین سلولی بودند. سپس روند تقسیمات در سلول‌های کناری کیسه ادامه یافت و بر تعداد لایه‌های احاطه‌کننده افزوده شد. به طور همزمان، تحلیل سلول‌های درونی کیسه ترشحی و تشکیل حفره مرکزی آغاز گشته (مرحله ۳- شکل ۳) و اندازه حفره با ادامه روند اتولیز افزایش یافت. با گسترش حفره مرکزی، سلول‌های احاطه‌کننده آن به سمت لایه‌های خارجی فشرده شده و دارای شکل نامنظم شدند (شکل ۴). در پایان، کیسه بالغ با حفره مرکزی گسترده که Secretory cells با دیواره سلولی نازک و پروتوپلاسم متراکم همانند غلافی حفره را احاطه می کردند، تشکیل شد (مرحله ۴-شکل ۵). از مرکز کیسه به طرف خارج، سلول‌های کناری (Bordering cells) دیواره سلولی ضخیم‌تر، پروتوپلاسم رقیق‌تر و میزان رنگ‌پذیری کمتری داشتند (شکل ۶).

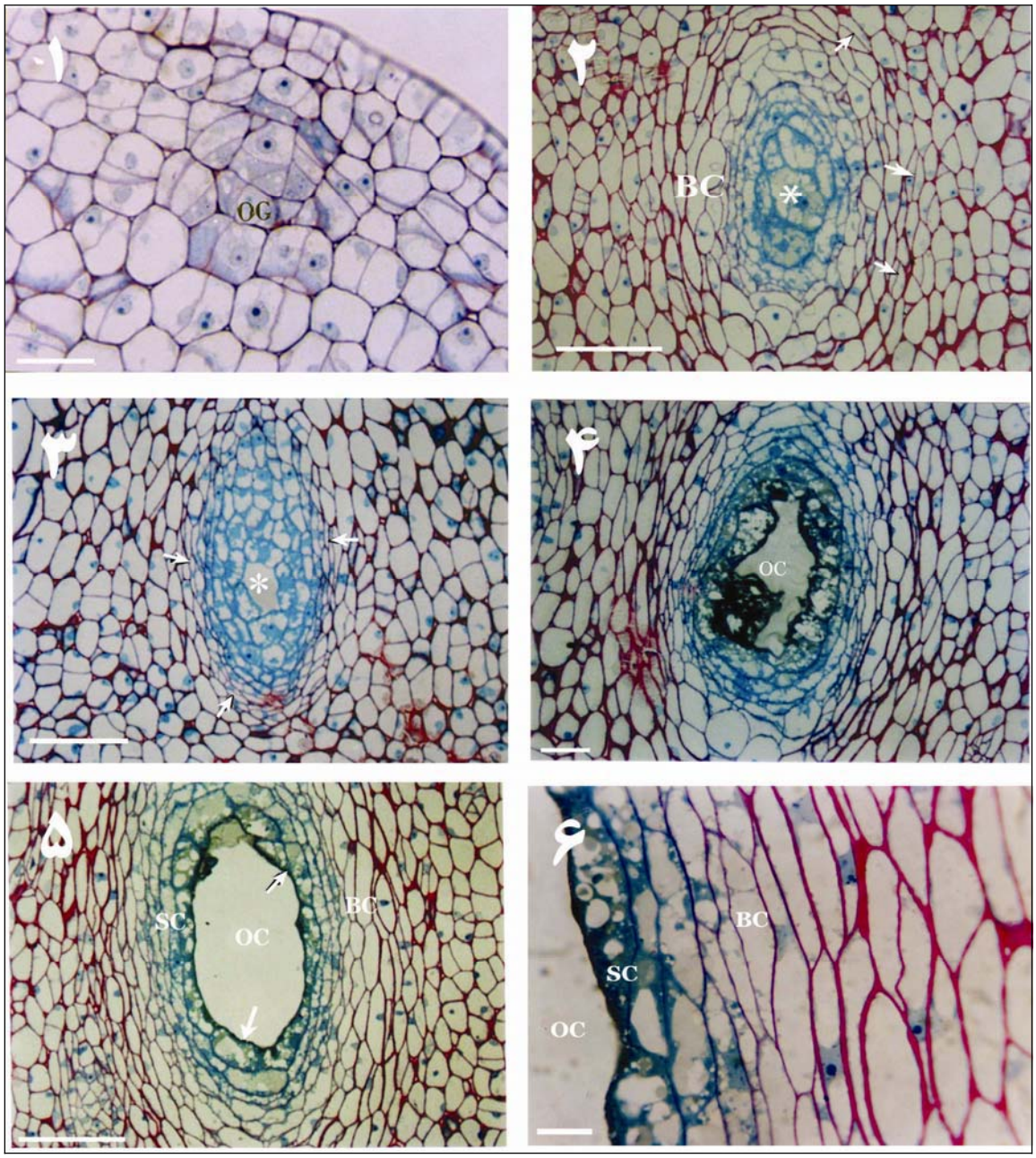
رابطه بین تکوین کیسه ترشحی و نمو اندام‌ها

غده‌های روغنی در کاسبرگ لیموترش خیلی زود تشکیل می‌شوند، به طوری که در کوچک‌ترین اندازه غنچه نیز کیسه‌های بالغ در کاسبرگ مشاهده شدند. این کیسه‌ها در قسمت پارانشیم زمینه‌ای کاسبرگ واقع شده، به اپیدرم خارجی آن متصل بودند (شکل ۷).

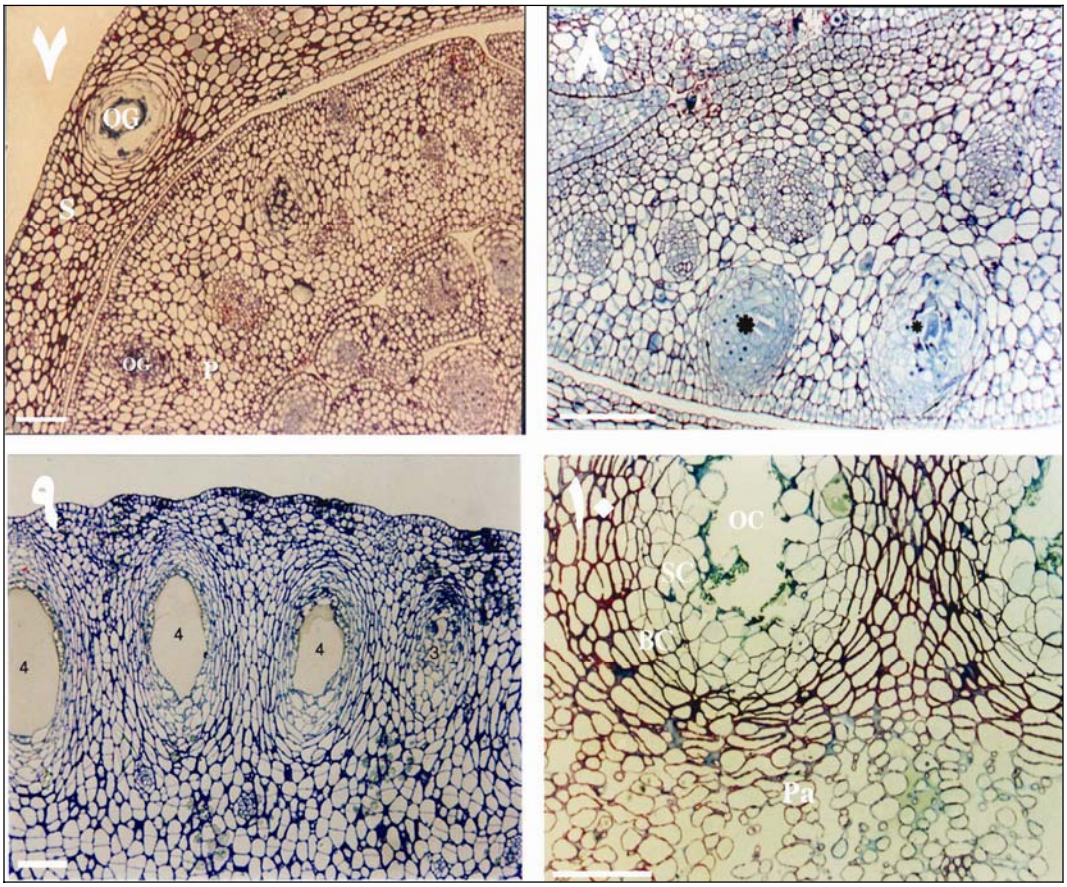
تشکیل کیسه‌های ترشحی گلبرگ نیز، نظیر کاسبرگ، از اولین مرحله نمو گل صورت گرفت (شکل ۷). این کیسه‌ها اغلب بدون پایه بودند که در پارانشیم زمینه‌ای گلبرگ و در سطوح متفاوتی نسبت به اپیدرم خارجی آن متصل بودند. تمایزیابی و بلوغ کیسه‌های ترشحی همگام با تکوین گلبرگ انجام شد (شکل ۸)، اما به طور همزمان تعدادی کیسه در حال تشکیل نیز مشاهده شد.

تشکیل کیسه‌های ترشحی تخمدان لیموترش، نسبت به کاسبرگ و گلبرگ، دیرتر آغاز شد. این کیسه‌ها از دومین مرحله نمو گل (غنچه کروی با گلبرگ‌های سفید رنگ) در دیواره تخمدان بنیان‌گذاری شدند (شکل ۱). غده‌های روغنی تخمدان در نزدیکی اپیدرم بیرونی، و به تعداد بیشتری نسبت به کاسبرگ و گلبرگ شکل گرفتند. اغلب این غده‌ها بدون پایه (بدون اتصال به اپیدرم) و تعداد کمتری از آن‌ها پایه‌دار بودند. در طی تکوین تخمدان بر تعداد کیسه‌های ترشحی بالغ (در مرحله ۴ نمو) افزوده شد، اما همزمان تعدادی کیسه نیز در مراحل قبلی نموی مشاهده شدند.

پس از لقاح و تبدیل تخمدان به میوه، روند تشکیل کیسه‌های ترشحی اسانس تا پایان مرحله اول نمو میوه ادامه یافت. اکثر غده‌های روغنی مشاهده شده در میوه سبز نارس لیموترش در مراحل پایانی تکوین خود مشاهده شدند (شکل ۹). اما در مراحل بعدی نمو میوه تشکیل کیسه‌های ترشحی متوقف شده، تنها اندازه کیسه‌ها افزایش یافت. تعداد لایه‌های احاطه‌کننده کیسه ترشحی با انجام تقسیمات فراوان افزایش یافته، خود سلول‌ها نیز حجیم شدند و دیواره آن‌ها نسبت به سلول‌های پارانشیمی اطراف ضخیم تر شد، در حالی که سلول‌های مرکزی دیواره نازک‌تر و سیتوپلاسم غلیظ‌تری داشتند (شکل ۱۰).



← شکل‌های ۱ تا ۶ – مراحل تکوین کیسه‌های ترشحی اسانس در تخمدان لیموترش بر پایه برش‌های عرضی (رنگ‌آمیزی توسط آبی متیلن- آزور ب- فوشین بازی)؛ شکل ۱- بنیان‌گذاری کیسه ترشحی. سلول‌های تشکیل‌دهنده کیسه ترشحی (OG) نسبت به سلول‌های اطراف هسته درشت‌تر، پروتوپلاسم غلیظ‌تر و رنگ‌پذیری بیشتری دارند. مقیاس =۱۰ میکرومتر؛ شکل ۲- مرحله دوم تکوین یک کیسه ترشحی. سلول‌های مرکزی (*) نسبت به سلول‌های اطراف درشت‌تر، دیواره نازک‌تر و پروتوپلاسم غلیظ‌تر دارند، در حالی که سلول‌های کناری (BC) کشیده‌تر بوده، دیواره ضخیم‌تر دارند. نوک پیکان‌ها تقسیمات سلول‌های کناری را نشان می‌دهند. مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۳- آغاز تحلیل سلول‌های مرکزی کیسه ترشحی (*) با فرآیند اتولیز و ادامه تقسیمات در سلول‌های کناری (نوک پیکان‌ها). مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۴- گسترش حفره مرکزی (OC) در فرآیند تکوین یک کیسه ترشحی. مقیاس= ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۵- مرحله نهایی تکوین یک کیسه ترشحی. حفره مرکزی (OC) گسترده شده و سلول‌های احاطه‌کننده ترشحی (SC) همانند غلافی حفره را در بر می‌گیرند (نوک پیکان‌ها)، (سلول‌های کناری=BC). مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۶- در یک کیسه ترشحی بالغ، سلول‌های کناری (BC) نسبت به سلول‌های ترشحی احاطه‌کننده حفره (SC)، دیواره سلولی ضخیم‌تر، پروتوپلاسم رقیق‌تر و رنگ‌پذیری کمتری دارند. OC = حفره مرکزی. مقیاس= ۵ میکرومتر.



شکل ۷- برش عرضی قسمتی از غنچه لیموترش در مرحله اول نمو گل. کیسه‌های ترشحی (OG) در کاسبرگ (S) و گلبرگ (P) از همان مرحله اول نمو گل شکل گرفته، در مراحل مختلف نموی مشاهده می‌شوند. رنگ‌آمیزی توسط آبی متیلن- آزور ب- فوشین بازی. مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۸- برش عرضی گلبرگ لیموترش در مرحله دوم نمو گل. کیسه‌های ترشحی در حال تمایز (*). رنگ‌آمیزی توسط آبی متیلن- آزور ب- فوشین بازی. مقیاس = ۲۵ میکرومتر؛ شکل ۹- برش عرضی تخمدان لیموترش در مرحله اول نمو میوه. بیشتر کیسه‌های ترشحی اسانس در مراحل نهایی تکوین هستند (3 و 4). رنگ‌آمیزی توسط آبی تولوئیدین. مقیاس = ۵۰ میکرومتر؛ شکل ۱۰- برش عرضی قسمتی از فرابر میوه رسیده لیموترش. به حجیم شدن سلول‌های ترشحی (SC)، افزایش تعداد لایه‌های احاطه‌کننده کیسه ترشحی (BC) و ضخیم بودن دیواره سلولی آن‌ها نسبت به سلول‌های پارانشیمی (Pa) توجه شود. OC= حفره مرکزی. رنگ‌آمیزی توسط آبی متیلن- آزور ب- فوشین بازی. مقیاس = ۲۵ میکرومتر.

بحث و نتیجه‌گیری

گزارش‌های ارائه شده از ویژگی‌های بافت‌شناختی و کیسه‌های ترشحی اسانس در لیموترش تنها شامل برگ و میوه بالغ شده (Turner *et al*., 1998; Bennici and Tani, 2004) و نتایج پژوهش حاضر اولین گزارش در مورد تغییرات تکوینی گل و میوه و ارتباط آن‌ها با غده‌های روغنی در *Citrus limon* است.

در دید کلی، دو نوع کیسه ترشحی پایه‌دار و بدون پایه در اندام‌های زایشی لیموترش مشاهده شدند، امّا با گرفتن برش‌های پشت سر هم (Serial sectioning) مشخص شد که کلیه کیسه‌های ترشحی، صرفنظر از درجه بلوغ آن‌ها، توسط پایه‌ای غالباً مخروطی شکل به اپیدرم متصل هستند و بر اساس آن که برش‌گیری از چه منطقه‌ای از کیسه صورت گرفته باشد، تعدادی از کیسه‌ها پایه‌دار و تعدادی بدون پایه دیده می‌شوند. محققان دیگر نیز در دیواره تخمدان *Citrus deliciosa* Ten (Bosabalidis and Tsekos, 1992a)، در میوه پرتقال ناول (Kight *et al*., 2001) و در میوه *C. medica* (Liang *et al*., 2006) به کیسه‌های ترشحی پایه‌دار اشاره کرده‌اند.

مراحل تکوینی غده‌های روغنی در کاسبرگ، گلبرگ، تخمدان گل و پوست میوه لیموترش از الگوی یکسان و ثابتی پیروی می‌کند. در هیچ یک از گونه‌های مرکبات تاکنون گزارشی مقایسه‌ای ارائه نشده است، امّا با توجه به الگوی تمایزیابی کیسه‌های ترشحی در برگ لیموترش (Turner *et al*., 1998) و میوه آن (Bennici and Tani, 2004) و مقایسه آن با نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که الگوی تمایزیابی جزء ویژگی‌های ذاتی بوده، در تمام اندام‌های رویشی و زایشی یک تاکسون مشخص ثابت است.

مراحل تمایزیابی کیسه‌های ترشحی اسانس در لیموترش به ۴ مرحله تفکیک شد که از تقسیم تعدادی از سلول‌های اپیدرمی و زیر اپیدرمی آغاز شده، تا تشکیل کیسه بالغ با یک حفره مرکزی احاطه شده توسط سلول‌های غلاف مانند ادامه می‌یابد. Kight و همکاران (۲۰۰۱) مراحل نموی این کیسه‌ها در میوه پرتقال ناول را به ۶ مرحله تقسیم نمودند که از یک خوشه ۱۰ سلولی آغاز شده، به یک کیسه ترشحی بالغ با حفره مرکزی وسیع منتهی می‌گردد. اختلاف میان تعداد مراحل تمایزیابی غده‌های روغنی در لیموترش و نتایج Kight و همکاران (۲۰۰۱) می‌تواند مربوط به این باشد که در تحقیق حاضر تفکیک مراحل تکوینی بر اساس اختلافات سلولی و درجه تمایز کیسه‌ها، و نه تعداد سلول‌ها و اندازه کیسه‌ها، انجام شده است.

با توجه به مشاهده همزمان تقسیمات سلولی در قسمت‌های بیرونی کیسه ترشحی و تحلیل رفتن سلول‌های مرکزی الگوی تکوینی شیزولیزیژن برای اندام‌های زایشی لیموترش پیشنهاد می‌شود. این گزارش با نتایج پژوهش‌های قبلی ما بر روی لیمو عمانی (*Citrus aurantifolia*) همخوانی دارد (Rafiei and Rajaei, 2007). گزارش‌های متعدد و متناقضی در مورد نحوه تشکیل غده‌های روغنی در مرکبات ارائه شده است؛ Henrich (۱۹۶۹) نمو این فضاها را در جنس‌های مختلف تیره مرکبات متفاوت توصیف کرد. وی تشکیل حفره در *Ruta graveolensis* را به صورت شیزوژنی و در *Citrus limon* از نوع لیزیژنی دانست. Kight و همکاران (۲۰۰۱) تشکیل حفره‌های ترشحی در میوه پرتقال ناول را از نوع شیزوژنی اعلام نمودند. قبل از آن Turner و همکاران (۱۹۹۸) با مقایسه تکنیک‌های متفاوت آماده‌سازی نمونه‌ها، پیشنهاد کرده

بودند که اصولاً مفهوم لیزیژنی در تکوین کیسه‌های ترشحی اسانس مرکبات می‌تواند مقوله نادرستی باشد که به دلیل تولید مواد غیر واقعی (artifact) در عملیات تثبیت نمونه حاصل شده است. محققان مزبور تکوین کیسه‌های ترشحی در برگ لیموترش را از نوع لیزیژن معرفی نمودند. در پژوهش حاضر از دو تثبیت کننده گلوتار آلدئید و تتراکسید اسمیوم استفاده شد. وجود لایه‌های منظم سلولی در اطراف حفره کیسه بالغ، نظم در تشکیل حفره، گسترده شدن آن و فشردگی لایه‌ها در اطراف حفره شکل گرفته، مخالف نظر Turner و همکاران (۱۹۹۸) در توصیف آن‌ها از پدیده lysis به علت تکنیک آماده‌سازی است. Bennici و Tani (۲۰۰۴) نیز با استفاده از تکنیک مشابه با پژوهش حاضر همپوشانی دو پدیده شیزوژنی و لیزیژنی را در پوست میوه‌های پرتقال و لیموترش گزارش نمودند. همچنین Liang و همکاران (۲۰۰۶ و ۲۰۰۹) تکوین غده‌های روغنی در میوه چند گونه از مرکبات را از نوع شیزولیزیژن دانستند.

در غده‌های روغنی بالغ گل و میوه لیموترش، لایه‌هایی از سلول‌های مسطح شده در اطراف حفره مرکزی مشاهده شد و ضخامت دیواره آنها به سمت خارج کیسه افزایش نشان داد. داخلی‌ترین این سلول‌ها ویژگی‌هایی مشابه با سلول‌های ترشحی داشتند و می‌توانند معادل boundary cells معرفی شده توسط Bosabalidis و Tsekos (۱۹۸۲b) در *Citrus deliciosa* باشند. خارجی‌ترین این سلول‌ها با دیواره‌های ضخیم‌تر، احتمالاً نقش حفاظت از سلول‌های داخلی‌تر غده را به عهده دارند. گزارش‌های مشابهی در برگ لیموترش (Turner *et al*., 1998)، میوه پرتقال و میوه لیموترش (Bennici and Tani, 2004) ارائه شده است.

مراحل سوم و چهارم تکوین کیسه‌های ترشحی در تمام اندام‌های زایشی لیموترش با شروع اتولیز سلول‌ها و گسترش حفره همراه بود. Liang و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنزیم پکتیناز را در مراحل اولیه تشکیل حفره مرکزی در میوه انواع مرکبات گزارش نموده اند که معادل مرحله سوم تکوین غده روغنی در پژوهش حاضر است. آنزیم سلولاز باعث گسترش حفره (مرحله چهار پژوهش حاضر) می‌شود و فعالیت این آنزیم در کیسه‌های ترشحی بالغ به اوج می‌رسد (Liang *et al*., 2009).

اندازه کیسه‌های ترشحی اسانس در لیموترش ارتباطی با درجه بلوغ آنها نداشت، ممکن است یک کیسه ترشحی بالغ اندازه کوچکی داشته باشد و یا برعکس، یک کیسه نابالغ از اندازه بزرگی برخوردار باشد.در این رابطه تاکنون گزارشی در مرکبات ارائه نشده است.

غده‌های روغنی در کاسبرگ و گلبرگ لیموترش از مرحله اول نمو گل به صورت بالغ و متمایز بودند، در حالی که پیدایش کیسه‌ها در تخمدان از مرحله دوم نمو گل آغاز شد. در عین حال، رابطه مستقیمی بین درجه تمایز کیسه ترشحی و تکوین اندام‌های گل مشاهده شد. در این رابطه گزارشی در مورد گونه‌های دیگر مرکبات موجود نیست.

بنیان‌گذاری و تمایزیابی کیسه‌های ترشحی تا مرحله اول نمو میوه لیموترش (میوه سبز نارس) ادامه یافت. Kight و همکاران (۲۰۰۱) و همچنین Bennici و Tani (۲۰۰۴) به ترتیب با در نظر گرفتن مراحل مختلف نموی میوه پرتقال و لیموترش بنیان‌گذاری غده‌های روغنی را محدود به مرحله اول نمو میوه (مرحله تقسیم سلولی) دانستند. در عین حال، یافته‌های پژوهش حاضر در تضاد با گزارش‌های Schneider (۱۹۶۸) است که پیشنهاد نمود تشکیل کیسه‌های ترشحی اسانس در طی بلوغ میوه تداوم می‌یابد.

اندازه کیسه‌های ترشحی در طی نمو میوه لیموترش افزایش یافت. این موضوع قبلاً در مورد پرتقال والنسیا (Bain, 1989) و پرتقال ناول (Kight *et al*., 2001) نیز گزارش شده است. با شمارش کیسه‌های ترشحی در پوست میوه پرتقال ناول هنگام نمو، مشخص شد در طی افزایش اندازه میوه، تعداد کیسه‌های ترشحی نسبتاً ثابت می‌ماند (Kight *et al*., 2001).

پژوهش‌های فراساختاری اختلافاتی را در چگونگی ترشح اسانس توسط اجزای سلولی در چند گونه از مرکبات نشان داده‌اند (Bosabalids and Tsekos, 1982b; Bennici and Tani, 2004). بررسی‌های تکمیلی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مکانیزم سلولی ترشح ترکیبات ترپنی را آشکار خواهند ساخت. همچنین، نتایج حاصل از پژوهش حاضر، در تعیین محدوده زمانی و نحوه تشکیل کیسه‌ها در گل و میوه، می‌تواند مقدمه‌ای برای پژوهش‌های بعدی در تشخیص زمان بهینه نمونه‌برداری جهت استخراج وشناسایی ترکیبات اسانس در لیموترش باشد.

منابع

Bain, J. M. (1989). Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Mencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Australian Journal of Botany 6(1): 1-24.

Bennici, A. and Tani, C. (2004). Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. Flora- Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 199: 56-64.

Bosabalidis, A. and Tsekos, I. (1982a). Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. I. Early stages of the gland cells differentiation. Protoplasma 112: 75-85.

Bosabalidis, A. and Tsekos, I. (1982b). Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. II. Development of the essential oil –accumulating central space of the gland and process of active secretion. Protoplasma 112: 86-97.

Buvat, R. (1989). Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants. Springer Verlag, Berlin.

Esau, K. (1977). Anatomy of Seed Plants. 2nd Ed, John Wiley & Sons, New York.

Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. New Phytology 108: 229-257.

Fahn, A. (1990). Plant Anatomy. 4th Ed, Pergamon Press, New York.

Heinrich, G. (1969). Elektronenmicroskopische Beobachtungen zur Entstehungsweise der Exkretbehälter von Ruta graveolens, *Citrus limon* und *Poncirus trifoliata*. Österreichische Botanische Zeitschrift 117: 73-93.

Kight, T. G., Keber, A. and Sedgley, M. (2001). The relationship between oil gland and fruit development in Washington Navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Annals of Botany 88: 1039-1047.

Lawless, J. (1995). The illustrated encyclopedia of essential oils. Element Books, Inc. Rockport, Massachusetts.

Liang, S. J., Wang, H., Yang, M. and Wu, H. (2009). Sequential actions of pectinases and cellulases during secretory cavity formation in Citrus fruits. Trees 23: 1-27.

Liang, S. J., Wu, H., Lun, X. and Lu, D. W. (2006). Secretory cavity development and its relationship with the accumulation of essential oil in fruits of *Citrus medica* L. var. sarcodactylis (Noot.) Swingle. Journal of Integrative Plant Biology 48(5): 578-583.

Meiseth, J. D. (1998). Plant Anatomy. The Benjamin Cumins Publishing Company Inc., Menlo Park, California.

McGregor, S. E. (1976). Insect pollination of cultivated crop plants. United States Department of Agriculture, Tucson, Arizona.

Rafiei, M. and Rajaei, H. (2007). Structural and developmental studies on oil producing reproductive organs in lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). Journal of Biological Sciences 6: 483-485.

Roland, J. C. (1978). General preparation and staining of thin sections. In: Electron microscopy and cytochemistry of plant cells. (ed. Hall, J. J.) 126. Elsevier North Holland Biochemical Press, New York.

Ruzin, S. E. (1999). Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press, New York.

Schneider, H. (1968). The anatomy of citrus. In: The citrus industry. Vol. 2. 2nd Ed. (eds. Reuther, W., Webber, H. and Batchelor, L. D.) 1-148. University of California Press, Division of Agricultural Science, Berkeley.

Turner, G. W., Berry, A. M. and Gifford, E. M. (1991). Schizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm.f. and a reevaluation of the lysigenous gland concept. International Journal of Plant Sciences 152(1): 38-50.

Differentiation of essential oil cavities in developing lemon (*Citrus limon*(L.)Burm.f.) flower and fruit

Maryam Rafiei *[1] and Homa Rajaei [2]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Science, University of Shiraz, Shiraz, Iran

Abstract

Essence of oil secretory cavities (glands) have been reported in all *Citrus* species of the Rutaceae family. The present study has focused on the histological aspect of the oil gland ontogeny during flower and fruit development in lemon(*Citrus limon*(L.)Burm.f.). Samples taken at six successive ontogenic stages were processed according to routine transmission electron microscope procedure, and viewed under the light microscope. Oil glands in sepals, petals and ovary wall appeared different time intervals, but showed the same histological aspect. In fruits, oil gland appearance was restricted to the immature stage. No new gland was formed during the fruit maturation process, and the preformed ones continued to enlarge. Secretory glands of the flower and fruit peel showed a similar developmental pattern and separated into four stages, based on cell features and the degree of gland differentiation. Oil gland ontogeny started from the divisions in some epidermal and hypoepidermal cells, and ended with an expended central cavity. The flattened cells bordering the central cavitiy were structurally distinguishable and had probably different functions. Wall separation and autolysis overlapped each other; the oil gland ontogeny in *Citrus limon* is therefore of schizolysigenous type.

Key words: Essential oil, Ontogeny, Structure, Oil gland, *Citrus limon*

* Correspong Author: rafiei@iaua.ac.ir

زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هشتم، تابستان ۱۳۹۰، صفحه ۶۹-۷۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۹/۲۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۱۱/۲۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۳/۳۰

مطالعه ژن عامل رونویسی متصل‌شونده به عناصر پاسخ‌دهنده به تنش کم آبی در برخی ارقام گندم نان ایران

ساسان محسن‌زاده [1*]، جواد کریمی اندانی و حسن محبت‌کار [1 و 2]
[1] بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[2] بخش زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

پروتئین عامل رونویسی متصل‌شونده به عناصر پاسخ‌دهنده به تنش کم آبی، یکی از عوامل مهم رونویسی است که در بسیاری از گیاهان نقش کلیدی را در تحمل‌پذیری به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند و تنها ویژهٔ عالم گیاهی است. تنش اسمزی از قبیل خشکی، شوری و سرما، یکی از مهم‌ترین تنش‌هاست. این پروتئین به عناصر پاسخ‌دهنده به تنش‌های اسمزی متصل شده، باعث بیان چندین ژن می‌شود که در نهایت با اعمال تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک باعث ارائه پاسخ مناسب به تنش محیطیِ اعمال شده می‌شود. خصوصیت اصلی این ژن، داشتن توالی حفاظت شده با نام ناحیه AP2 است که محصول آن به صورت پروتئین، به توالی خاصی از DNA متصل می‌شود. جداسازی و تعیین خصوصیات قسمتی از ژن این عامل مهم رونویسی از ارقام گندم نان امید، سرداری و زرین که بومی یا کشت‌شونده در ایران بوده، به ترتیب نیمه حساس، مقاوم و نیمه مقاوم به سرما هستند، صورت گرفت. استخراج DNA و mRNA، ساخت cDNA، طراحی پرایمرهای اختصاصی، PCR، الکتروفورز، عبور از ستون به منظور خالص‌سازی نمونه‌ها و تعیین توالی DNA، به شناسایی توالی‌های این ژن در ارقام مذکور منجر شد. تجزیه و تحلیل‌های مختلف بیوانفورماتیک نشان داد که آن‌ها دارای ناحیه AP2 بوده و متعلق به زیر خانواده عامل رونویسی متصل‌شونده به عناصر پاسخ‌دهنده به تنش کم آبی متعلق هستند. این توالی‌ها با شماره‌های دسترسی FC556848، FC556849 و FC55685 در بانک جهانی ژن (NCBI) به ثبت رسید.

واژه‌های کلیدی: جداسازی ژن، عامل رونویسی، گندم امید، گندم سرداری، گندم زرین، ناحیه AP2

مقدمه

عوامل محیطی بر روی رشد و نمو گیاهان اثر فراوانی دارند. شناسایی مکانیسم‌های مولکولی در تحمل‌پذیری گیاهان به تنش‌های محیطی برای گیاهان زراعی دارای اهمیت اقتصادی است. سرما یکی از تنش‌های محیطی است که همه ساله خسارات قابل

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: mohsenzadeh@susc.ac.ir، شماره تماس: ۰۷۱۱۶۱۳۷۷۳۷

توجهی را به گیاهان زراعی وارد می‌کند. سرما به عنوان یک تنش اسمزی، جذب آب از ریشه گیاه را محدود کرده، باعث افت پتانسیل آب و انتقال آب از سیمپلاست به آپوپلاست می‌شود و در نتیجه کم آبی شدیدی را به دنبال خواهد داشت. سازش‌پذیری گیاه به سرما حاصل تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک متنوعی است که اساساً از تغییر در بیان تعدادی از ژن‌های مسؤول در تحمل‌پذیری به تنش سرما ناشی می‌شود (Thomashow, 1999). از جمله ژن‌های تنظیمی درگیر در پاسخ به تنش‌ها، عوامل رونویسی هستند که نقش مهمی را در پاسخ به تنش در گیاهان ایفا می‌کنند. یکی از مهم‌ترین آنها پروتئین DREB (Dehydration Responsive Element Binding) است که اعضای آن نقش اصلی را در تنش‌های غیر زیستی چون خشکی، شوری و سرما دارند و در گیاهان مختلفی، مانند آرابیدوپسیس، جو، برنج، گوجه‌فرنگی، آفتابگردان و غیره شناسایی شده‌اند (Liu *et al*., 2000; Sakuma *et al*., 2002; Agarwal *et al*., 2006; Xiong and Fei, 2006; Badawi *et al*., 2007). عامل رونویسی DREB توالی‌ها یا عناصر خاصی به نام DRE (Dehydration Response Element) را روی پروموتر ژن‌های القا شونده توسط تنش اسمزی شناسایی می‌کند. خانواده DREB پروتئین‌های مخصوص گیاهی هستند که دارای یک ناحیه بسیار حفاظت‌شده شامل ۶۰ تا ۷۰ اسید آمینه هستند که ناحیه AP2 (Apetala 2) نام دارند (Shen *et al*., 2003). تاریخ شناسایی DREB به آزمایشی که بر روی آرابیدوپسیس انجام شد، بر می‌گردد. دو cDNA مختلف DREB1A و DREB2A کلون شد و مشاهدات بعدی نشان داد که ژن کد کننده پروتئینی DREB1A و دو همولوگ آن (B و C) تحت تنش سرما و ژن کد کننده پروتئینی DREB2A و همولوگ آن (B) تحت تنش‌های خشکی و شوری القا می‌شوند (Liu *et al*., 1998). همچنین با مطالعه آرابیدوپسیس تراریخت، عملکرد محصولات این ژن‌ها را ارزیابی کردند و دریافتند که پروتئین‌های مذکور هر چند که ناحیه AP2 مشابهی دارند، ولی مسیرهای متفاوتی را تحت این تنش‌ها در القای ژن ها دارند. خصوصیات توالی DRE و توالی حفاظت شده ناحیه AP2 در آرابیدوپسیس بررسی شده است (Sakuma *et al*., 2002).

نتایج تحقیقات نشان داد مسیرهای القای مقاومت در تنش‌های خشکی، شوری، سرما و حتی ABA در عین جدا بودن، برهمکنش‌های بسیاری با هم دارند و ممکن است افزایش مقاومت به یک تنش سبب القای مقاومت به تنش‌های دیگر شود (Thomashow, 1999; Kasuga *et al*., 1999; Liu *et al*., 2000; Fowler and Thomashow, 2002). تنش‌های غیر زیستی مختلف نظیر خشکی، شوری و سرما گرچه به شکل‌های مختلف اعمال می‌شوند، ولی همگی اثر مشابهی بر میزان آب گیاه دارند. در اثر این تنش‌ها آب سلول‌های گیاهی از دست رفته، فشار تورژسانس آنها کاهش می‌یابد و همه این تنش‌ها نوعی تنش اسمزی محسوب می‌شوند (Sakuma *et al*., 2002). با توجه به اینکه پهنه وسیعی از حاصلخیزترین مناطق تولیدی و قسمت عمده محصولات اقتصادی مهم کشور، از جمله گندم همه ساله در معرض تهدید تنش‌های محیطی است که آثار نامطلوبی بر تولید و کیفیت محصولات کشاورزی دارد، پیشرفت در زمینه ایجاد مقاومت به این تنش‌ها مخصوصاً در گیاهان غله‌ای یکی از اهداف مهم کشاورزی است.

گندم نان امید، توده بومی ایران و نیمه حساس به تنش خشکی و سرماست. این رقم کیفیت نانوایی متوسط تا خوب دارد و در اکثر مناطق کشور کاشته می‌شود. گندم نان سرداری، بومی ایران و منطقه کردستان و مقاوم به سرماست. این رقم گندم کیفیت نانوایی ضعیفی دارد و بیشتر در مناطق دیم کوهستانی کشور کشت می‌شود. گندم نان زرین، غیر بومی است و نیمه مقاوم به تنش سرماست اما کیفیت نانوایی بسیار عالی دارد و در اکثر مناطق کشور که سرمای ملایمی دارد، کشت می‌شود. در این پژوهش از سه رقم گندم مقاوم، نیمه مقاوم و نیمه حساس به سرما، ژن عامل نسخه‌برداری DREB جداسازی و تعیین خصوصیات شد. هدف اساسی از این پژوهش، جداسازی و تعیین خصوصیت ژن DREB از ارقام گندم نان ایرانی به منظور شناخت مکانیسم‌های تحمل‌پذیری این گیاهان به تنش سرما و بررسی امکان انتقال این ژن به گیاهان این خانواده و یا دیگر گیاهان زراعی حساس و همچنین شناسایی ژرم‌پلاسم ارقام ایرانی بود.

مواد و روش‌ها

بذر سه رقم گندم نان نیمه حساس، مقاوم و نیمه مقاوم به تنش سرما به ترتیب به نام‌های امید، سرداری و زرین از بانک ژن گیاهی ایران واقع در کرج تهیه شد. این بذرها ابتدا با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی و سپس در گلدان‌های مجزا کاشته شد. نمونه‌ها در اتاقک کشت با شرایط طول روز ۱۶ ساعت، طول شب ۸ ساعت، دمای روز ۲۲ درجه سانتیگراد، دمای شب ۱۵ درجه سانتیگراد، رطوبت ۶۰ درصد قرار داده شدند. برای القا تنش سرما، گیاهچه‌های ۱۶ روزه به مدت یک هفته و هر روز ۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد در یخچال گذارده شدند.

جداسازی و تعیین خصوصیات عامل رونویسی DREB در ارقام گندم شامل استخراج DNA، طراحی آغازگرهای اختصاصی، PCR، ژل الکتروفورز، عبور از ستون به منظور خالص‌سازی محصول PCR، تعیین توالی DNAو تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک و تأیید ناحیه AP2 با نرم‌افزارهایی همچون BLAST، ProDom، PROSITE، SMART، CDD، CDART، BLOCKS و Pfam و ثبت توالی‌ها در بانک جهانی ژن بود. استخراج DNA با روش CTAB تغییر یافته (Sumer *et al.*, 2003) و از برگ گیاهچه‌های ۱۶ روزه گندم صورت گرفت. با بهره‌گیری از نرم‌افزار الیگو ۵ و هم‌آرایی توالی‌های مشابه ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) یک جفت آغازگر مناسب ژن DREB به قرار زیر طراحی و توسط شرکت آلمانی MWG ساخته شد: توالی پیشرو:

5′-TATGGATTGCCTTGATGAACA-3′

و توالی برگشت:

5′-GACTCCGATTCATCCTTCCC-3′

برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR به صورت دمای اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل به صورت ۹۴، ۵۳ و ۷۲ درجه سانتیگراد هر کدام به مدت ۱ دقیقه و دمای نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد.

پرایمرهای اکتین مورد استفاده برگرفته از مقاله پژوهشی Pellegrineschi و همکاران (۲۰۰۴) و از این قرار بود، توالی پیشرو:

5'- GACCCAGACAACTCGCAACT -3'

و توالی برگشت:

5'-CTCGCATATGTGGCTCTTGA -3'

برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR به صورت فوق بود.

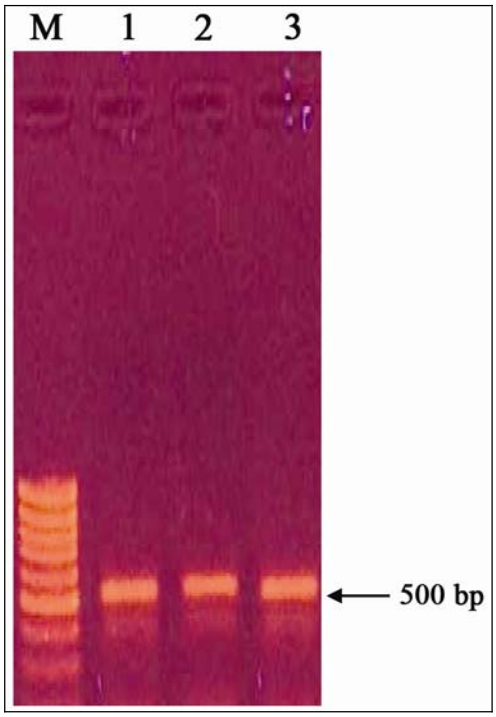
برای استخراج RNA از کیت مخصوص Bio-RAD (Aurum Total RNA Mini Kit, USA) استفاده شد. در این کیت از آنزیم DNase به منظور عدم آلودگی نمونه RNA به DNA ژنومی استفاده گردید. سپس اولین رشته cDNA از روی mRNA فاقد DNA ژنومی با کیت Roche ساخته شد که از روی آن رشته مکمل در اولین دور واکنش PCR سنتز می‌شود. از ژن اکتین نیز برای سنجش صحت انجام RT-PCR استفاده گردید. پس از انجام PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند. به منظور خالص‌سازی محصول PCR و آماده کردن آن برای تعیین توالی از کیت شرکت Roche (High Pure PCR Product Purification Kit, Germany) استفاده شد و سپس توسط شرکت MWG آلمان تعیین توالی گردید.

نتایج و بحث

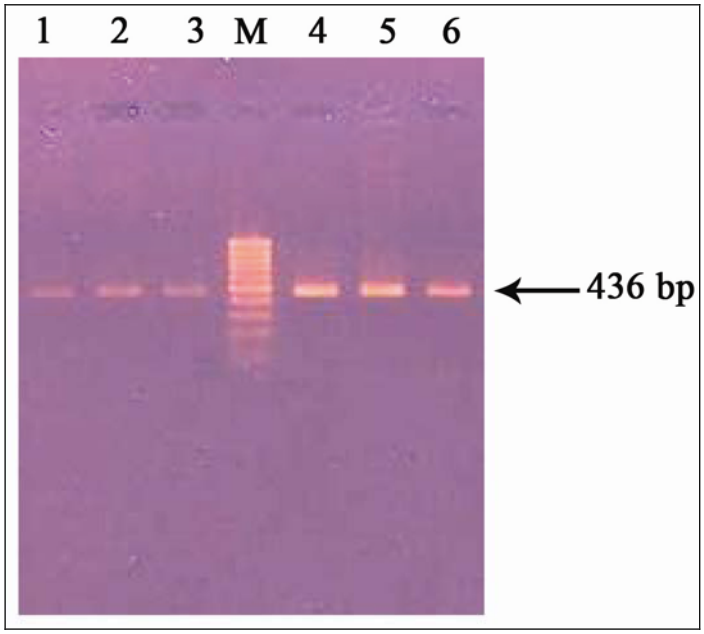
توالی ژن DREB گندم یا TADREB که در این پژوهش از دو منبع ژنومی و cDNA در سه نوع گندم امید، زرین و سرداری به دست آمد، در واقع قسمتی از ژن کامل است که طولی بین ۴۳۶ تا ۴۳۸ جفت نوکلئوتید دارد. برای اطمینان از استخراج mRNA و ساخت درست cDNA، محصول واکنش با آغازگر ژن اکتین که همیشه در سلول‌های گیاهی بیان می‌شود PCR و الکتروفورز شد. شکل ۱ ژل الکتروفورز محصول PCR با نواری به طول حدود ۵۰۰ جفت نوکلئوتید مربوط به cDNA سه نوع گندم با آغازگر اکتین را نشان می‌دهد. شکل ۲، ژل الکتروفورز محصول PCR سه رقم گندم امید، سرداری و زرین از دو منبع ژنومی و cDNA است. مقایسه ژل الکتروفورز این دو منبع نشان می‌دهد که TADREB به دست آمده از منبع ژنومی و cDNA هر سه نمونه گندم، در باندهایی با اندازه یکسان قرار گرفتند و مقایسه توالی آن‌ها نیز حاکی از شباهت ۱۰۰ درصدی از نظر طول توالی‌ها بود که نشان می‌دهد ژن مورد نظر حداقل در طول قطعه جدا شده، فاقد اینترون بوده، طول و توالی DNA و cDNA مشابه دارد و دست کم در این محدوده از ژنوم، اینترونی وجود ندارد. آنالیز بیوانفورماتیک نیز این مورد را تأیید نمود. شکل ۳، تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی از توالی اسید آمینه حاصل از ترجمه توالی ژن DREB به دست آمده از ارقام گندم مذکور را نشان می‌دهد. وجود ناحیه AP2 دومین اثبات نمود که ژن‌های مذکور از اعضای زیر خانواده مهم DREB هستند. شکل ۴ نشان می‌دهد که ناحیه AP2 در توالی جداسازی شده حاوی ۳ زنجیره β-sheets و یک زنجیره α-helix است و اسید آمینه والین در موقعیت ۱۴ و اسید آمینه گلوتامیک در موقعیت ۱۹ آن قرار دارند که نقش مهمی در تشخیص توالی متصل‌شونده به DNA ایفا می‌کنند. توالی نوکلئوتید و آمینو اسید به دست آمده از DREB cDNA گندم‌های نان مذکور نشان داد که این منطقه حاوی ۳ زنجیره β-sheets و یک زنجیره α-helix است که جایگاه هر قطعه دقیقاً در توالی مشخص شد. همچنین سایر قسمت‌های این ناحیه به لوپ‌های بینابینی مربوط می‌شود. با بررسی در بانک ژنی آرابیدوپسیس ۱۴۵ ژن کد کننده پروتئین‌های دارای ناحیه AP2 یافته شد. بر این اساس ۱۴ ژن دارای

دو ناحیه AP2 و ۱۳۱ ژن دارای یک ناحیه AP2 بودند که ۵۶ ژن از آن، پروتئین‌های زیر خانواده DREB را کد می‌کنند (Sakuma *et al*., 2002). فرض بر این است که انتقال جانبی ژن‌های سیانو باکترها و ویروس‌ها از طریق پدیده همزیستی داخلی به گیاهان صورت گرفته و منشأ تشکیل خانواده بزرگ عوامل رونویسی دارای ناحیه AP2 شده است. سپس در گیاهان از طریق پدیده‌های مختلفی چون حذف یا اضافه شدن اینترون‌ها و اگزون‌ها و جابه‌جایی و یا طرق دیگر اعضای مختلف و زیر خانواده‌های گوناگون این خانواده بزرگ به وجود آمده‌اند (Magnani *et al*., 2004).

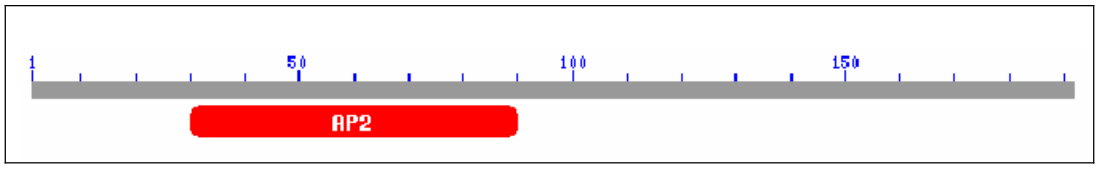
هم ردیفی توالی‌های cDNA سه رقم گندم امید، زرین و سرداری نشان می‌دهد که شباهت زیادی با یکدیگر دارند. توالی‌ها با شماره‌های دسترسی FC556848، FC556849 و FC556851 در بانک جهانی ژن NCBI به ثبت رسید. مهندسی ژنتیک این ژن با توجه به اینکه عامل رونویسی DREB قادر است همزمان القای چندین ژن القا شونده در تنش را تحت تنظیم خود داشته باشد، اهمیت زیادی دارد. در روش‌های معمول انتقال ژن گیاهان تراریخت فراوانی معرفی شداند، ولی به دلیل انتقال تنها یک ژن، بهبود نسبی مشاهده شده است، امّا انتقال ژن DREB به دلیل اینکه تنظیم بیان چندین ژن را بر عهده دارد، می‌تواند آثار چند گانه داشته باشد (Dubouzet *et al*., 2003; Savitch *et al*., 2005). نتایج این پژوهش علاوه بر شناسایی ژرم‌پلاسم ایرانی به یافتن راه‌های القا مقاومت در ارقام پر بازده به منظور افزایش محصول و کاهش خسارات ناشی از تنش‌های محیطی حساس کمک می‌نماید.



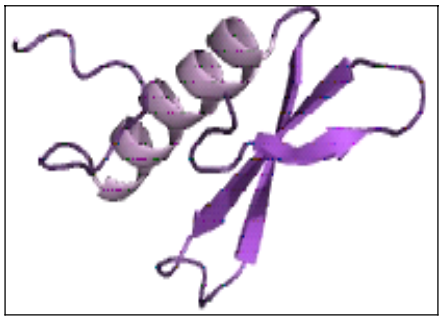
شکل ۱- ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به استخراج mRNA و ساخت درست cDNA با آغازگر اکتین.
1، 2 و 3 به ترتیب مربوط به گندم‌های نان امید، سرداری و زرین و M مارکر ۱۰۰bp است.



شکل ۲- ژل الکتروفورز محصول PCR سه رقم گندم از منبع cDNA (1، 2 و 3 به ترتیب مربوط به گندم‌های نان امید، سرداری و زرین) و از منبع DNA (4، 5 و 6 به ترتیب مربوط به گندم‌های نان امید، سرداری و زرین)، M مارکر ۱۰۰bp است.



شکل ۳- ناحیه AP2 در توالی اسید آمینه DREB جداسازی شده از این ارقام گندم با استفاده از نرم افزار CDD search



شکل ۴- ساختار سه بعدی پروتئین از ناحیه AP2 از توالی اسید آمینه DREB جداسازی شده از این ارقام گندم با استفاده از نرم‌افزار Pfam

منابع

Agarwal, P. K. A. Agarwal, P. Reddy, M. K. and Sopory, S. K. (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant Cell Reports 25(12): 1263-1274.

Badawi, M., Danyluk, J., Boucho, B., Houde, M. and Sarhan, F. (2007) The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBF*s.

Molecular Genetics and Genomics 277: 533-554.

Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G. and Miura, S. (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L. encode transcription activators that function in drought, high-salt- and cold-responsive gene expression. Plant Journal 33: 751-763.

Fowler, S. and Thomashow, M. F. (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. Plant Cell 14: 1675-1690.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature Biotechnology 17: 287-291.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. Plant Cell 10: 1391–1406.

Liu, Q., Zhao, N., Yamaguch-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2000) Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. Chinese Science Bulletin 45(11): 970-975.

Magnani, E., lander, K. and Hakea, S. (2004) From endonucleases to transcription factors: Evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. Plant Cell 16: 2265-2277.

Pellegrineschi, A., Reynolds, M., Pacheco, M., Brito, R. M., Almeraya, R., Shinozaki, K. Y. and Hoisington, D. (2004) Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. Genome 47: 493-500.

Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP_2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 290: 998-1009.

Savitch, L., Allard, G., Seki, M., Robert, L., Tinker, N., Huner, N. and Singh, K. (2005) The effect of overexpression of two Brassica CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus* Plant. Cell Physiology 46(9): 1525-1539.

Shen, Y. G., Zhang, W. K., Yan, D. Q., Du, B. X., Zhang, J. S. and Liu, Q. (2003) Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*. Theoretical and Applied Genetics 107: 155-161.

Sumer, A., Ahmet, D. and Gulay, Y. (2003) Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Herpes* L. Specimens. Plant Molecular Biology Reporter 21: 461a-461f.

Thomashow, M. F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annual Review of Plant Biology 50: 571-599.

Xiong, Y. and Fei, S. (2006) Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) Planta 224: 878-888.

Study of dehydration-responsive element binding-factor gene in some Iranian bread wheat cultivars

Sasan Mohsenzadeh *[1], Javad Karimi Andani and Hassan Mohabatkar [1, 2]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Shiraz, Shiraz, Iran
[2] Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Dehydration-responsive element binding-factor (DREB) protein is one of the transcription factors which play a key role in tolerance to environmental stresses in many plants. Drought, salinity and cold are examples of important osmotic stresses. DREB binds to stress responsive elements causing over expression of several genes and ultimately biochemical and physiological modification gives appropriate response to the related stress. The main property of DREB gene is AP2 domain a conserved sequence that its protein product binds to a specific sequence of DNA. In this research, isolation and characterization of DREB gene from some native or cultivated Iranian bread wheat were studied. These cultivars named Omid, Sardari and Zarrin were semi sensitive, resistant, and semi resistant to cold stress respectively. DNA and mRNA extraction, cDNA synthesis, specific primer design, PCR, Electrophoresis, column purification and DNA sequencing, led to identify the sequences of this gene in three cultivars. Different bioinformatics analyses of the sequences showed that they had AP2 domain and belonged to DREB subfamily. These sequences were submitted to NCBI GenBank, and were recorded as FC556848, FC556849, and FC556851 accession numbers.

Key words: Gene isolation, Transcription factor, Omid wheat, Sardari wheat, Zarrin wheat, AP2 domain

* Correspong Author: mohsenzadeh@susc.ac.ir

زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هشتم، تابستان ۱۳۹۰، صفحه ۷۷-۹۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۹/۱۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۱۲/۰۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۸۹/۰۳/۳۰

مطالعه سیتولوژیک و مورفولوژیک هیبریدهای حاصل از تلاقی دو گونه دیپلوئید پنبه بومی بندرعباس و آریا با گونه آربورئوم (*Gossypium arboreum*)

زهرا هراتی، موسی‌الرضا وفایی‌تبار [۱*] و محمود خسروشاهلی [۲]
[۱] بخش تحقیقات پنبه، مرکز تحقیقات کشاورزی استان تهران، ورامین، تهران، ایران
[۲] گروه اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی رفتار کروموزوم‌ها در میوز و خصوصیات کمّی و کیفی الیاف پنبه (*Gossypium*) در گونه‌های *G. herbaceum.* (هرباسئوم) (بومی ایران)، *G. arboretum* (آربورئوم)، هیبرید حاصل از تلاقی هرباسئوم با آربورئوم و نتاج بک‌کراس چهارم آنها صورت گرفت. در این تحقیق از ارقام بومی آریا و بومی بندرعباس (گونه هرباسئوم) و رقم VTDL (گونه آربورئوم) استفاده شد. صفات ظاهری در هیبرید F_1 آربورئوم با هرباسئوم حد واسط این دو گونه بود و در جمعیت‌های حاصل از نتاج بک‌کراس چهارم آنها نیز حدواسط و تا حدودی متمایل به گونه هرباسئوم بود. نتایج مربوط به مطالعات رفتار کروموزومی نشان داد که در هیبریدهای F_1 کوادری‌والان‌های مجاور و متناوب با فراوانی نسبتاً بالایی تشکیل می‌گردد. در جمعیت‌های حاصل از نتاج بک‌کراس چهارم نیز کوادری‌والان با فراوانی پایینی تشکیل شده بود. علاوه بر آن، ناهنجاری‌های دیگر مانند وجود یونی‌والان، تری‌والان و چند دسته شدن کروموزوم‌ها در متافاز ۲ و آنافاز ۲ نیز مشاهده شد که به دنبال آن انحراف از حالت تتراد دیده شد.

واژه‌های کلیدی: پنبه (*Gossypium*)، *G. herbaceum.* (هرباسئوم)، *G. arboretum* (آربورئوم)، میوز

مقدمه

پنبه گیاهی گلدار (دولپه‌ای) از خانواده Malvacea، زیر خانواده Hibiceae و از جنس *Gossypium* است. این جنس شامل ۴۴ گونه دیپلوئید و پنج گونه تتراپلوئید است (Stewart, 1995). الیاف قابل ریسندگی در جهان از چهار گونه اصلی و زراعی، شامل گونه‌های دیپلوئید، *G. arboreum* و *G. herbaceum* و گونه‌های تتراپلوئید *G. barbadense* و *G. hirsutum* (هیرسوتوم) به دست می‌آید. ارقام زراعی دیپلوئید اغلب در آسیا، به خصوص در هندوستان کاشته می‌شوند. این ارقام در مقایسه با ارقام تتراپلوئید در برابر آفات از مقاومت بیشتری برخوردارند، اما میزان تولید محصول در آنها کمتر از تتراپلوئیدهاست (Khel and Lewise, 1984).

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: mvafaiet@yahoo.com، شماره تماس: ۰۲۹۱۲۲۴۹۶۱۶

اولین کار شمارش کروموزومی در پنبه توسط Denham (۱۹۲۴) و Nikolajeva (۱۹۲۳) انجام شد. آنها گزارش کردند که پنبه‌های دنیای قدیم (*G. arboretum* و *G. herbaceum*) دارای 2n=26 کروموزوم و پنبه‌های دنیای جدید 2n=52 کروموزوم هستند. اختلاف کلی در دو ژنوم هرباسئوم و آربورئوم در وجود جابجایی بین دو کروموزوم شماره ۱ و ۲ است که در گونه آربورئوم اتفاق افتاده است و به سبب آن در میوز نسل اول تلاقی بین دو گونه کوادری‌والان تشکیل می‌گردد (Menzel and Brown, 1949). در مطالعه کاریولوژیک ارقام *G. herbaceum* بومی ایران مشاهده شد که به طور کلی کاریوتیپ‌های ارقام این گونه متقارن بوده ، دارای کروموزوم‌های کوچک هستند و بزرگترین طول کلی کروموزوم‌ها مربوط به رقم سبزوار ۴۶/۴۶ میکرومتر و کوچک‌ترین این مقدار مربوط به رقم محلات ۲۳/۸۳ میکرومتر بود (Sheidai *et al.*, 1999).

برای تعیین قرابت ژنومی و سطح واگرایی ژنومی در پنبه از فراوانی کروموزوم‌های یونی‌والان استفاده شده است. این شاخص در مقایسه با کاربرد مولتی‌والان‌ها برای تمایز بین گونه‌ای مناسب‌تر بوده و مشخص است که ژنوم‌های A تا E از یک نژاد اصلی و پایه منشعب شده‌اند (Phillips, 1974). مطالعه رفتار کروموزوم‌ها در میوز هیبرید تریپلوئید (AAD) بین گونه‌ای پنبه توسط VafaieTabar و Chandrashekaran (۲۰۰۷) انجام شد. این هیبرید از تلاقی میان *G. hirsutum* تتراپلوئید و *G. arboreum* دیپلوئید به دست آمده بود و پیش‌بینی می‌شد که در متافاز ۱ میوز ۱۳ بی‌والان (AA) و ۱۳ یونی‌والان (D) وجود داشته باشد، در حالی که در سلول‌های مادر گرده ۸ تا ۱۲ بی‌والان و ۱۲ تا ۱۷ یونی‌والان مشاهده شد و همچنین در هیبرید حاصل از تلاقی *G. thurberi*× *G. aridum* پنبه‌های دیپلوئید که به صورت D_1D_4 هستند، سلول‌هایی با ۱۲ بی‌والان و ۲ یونی‌والان گزارش شده است (Skovsted, 1935).

انجام مطالعات سیتوژنتیکی در گونه‌های گیاهی و همچنین جمعیت‌های آنها، به ویژه گیاهان وحشی و بومی اهمیت زیادی دارد. وجود اختلاف در شکل و اندازه کروموزوم‌ها در تقسیم میتوز و همچنین رفتار آنها در طی مراحل تقسیم میوز، به ویژه تقسیم کیاسما می‌تواند بیانگر تنوع ژنتیکی باشد. تنوع ژنتیکی در ۱۱ رقم از گونه *G. hirsutum* مانند رقم *G. oltan* بررسی گردید (Sheidai *et al.*, 2006). جفت شدن کروموزوم‌ها در متافاز میوز و فراوانی کیاسما میان این ژنوتیپ‌ها مطالعه شد. ناهنجاری‌هایی از قبیل وجود کروموزوم‌های سرگردان و چسبندگی بین کروموزوم‌ها مشاهده شد که می‌تواند در برنامه های اصلاحی استفاده شود. در مقایسه با ارقام تتراپلوئید تلاش زیادی در جهت اصلاح خصوصیات مختلف پنبه‌های دیپلوئید زراعی صورت نگرفته است. یکی از راه‌های اصلاحی این ارقام، انتقال صفات ممتاز از ذخایر ژنتیکی گونه‌های دیگر این خانواده از طریق دو رگ‌گیری است. گونه آربورئوم به عنوان ذخیره ژنتیکی اولیه می‌تواند به راحتی با گونه هرباسئوم تلاقی یابد و پتانسیل نوترکیبی بالایی را در نسل F_1 از خود نشان دهد (وفایی‌تبار، ۱۳۸۷)، لذا تلاقی بین این دو گونه زمینه مناسب و جدیدی را برای اصلاح و ارقام مربوط به آنها ایجاد می‌نماید. ارقام دیپلوئید (هرباسئوم) ارقام بومی ایران بوده که نسبت به تنش‌های محیطی و برخی بیماری‌های مهم پنبه مقام هستند (وفایی‌تبار، ۱۳۸۷). این

ارقام در حاشیه کویر؛ یعنی در مناطقی که به سبب کم آبی مناسب برای ارقام تتراپلوئید نیستند، کشت و کار می‌گردند. یکی از علل عمده کاهش سطح زیر کشت این ارقام، عملکرد پایین و کیفیت الیاف نامطلوب‌تر این ارقام نسبت به ارقام تتراپلوئید است و پیش‌بینی می‌شود در صورت بهبود کیفیت الیاف، سطح کشت آنها در کشور توسعه یابد (وفایی‌تبار، ۱۳۸۷).

هدف از انجام این مطالعه، بررسی تنوع مورفولوژیک و سیتولوژیک رفتار میوزی در نتایج حاصل از تلاقی و بک‌کراس‌های ارقام بومی ایران و رقم گونه آربورئوم وارداتی جدید از نظر هنجار بودن مراحل تقسیم میوز است.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از ۲رقم بومی ایران (بومی آریا و بومی بندرعباس) به عنوان والد مادری و یک رقم از گونه آربورئوم به نام VTDL که از هندوستان وارد ایران شده است، به عنوان والد پدری استفاده گردید. رقم VTDL دارای کیفیت الیاف مطلوب (طول الیاف ۲۶ میلی‌متر و ظرافت ۵/۲) است. این رقم از طریق تلاقی بین گونه‌ای آربورئوم با گونه *G. hirsutum* در کشور هندوستان به دست آمده است (وفایی‌تبار، ۱۳۷۵). بک‌کراس‌های مورد بررسی از تلاقی‌هایی به دست آمده‌اند که والدین آنها در سال ۱۳۸۳ به ازای ۶ خط مادری و ۴ خط پدری در کنار یکدیگر در ایستگاه مرکزی مرکز تحقیقات کشاورزی ورامین کشت گردیدند. کشت به صورت هیرم‌کاری و عمق کاشت حدود ۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. عملیات زراعی که عبارت بود از سله‌شکنی یک بار، وجین ۳ بار، آبیاری ۱۱ نوبت و سم‌پاشی علیه آفات تریپس، عسلک، آگروتیس، کرم قوزه و کنه با سموم توصیه شده طی سه مرحله انجام شد. عقیم‌سازی گل‌ها به صورت دستی روزانه بین ساعات ۴ تا ۷ بعدازظهر به مدت ۴۰ روز از زمان شروع گلدهی انجام گردید و گرده‌افشانی نیز در روز بعد از عقیم‌سازی بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح انجام شد. کلیه بذرهای دو رگ حاصل در آخر فصل (آبان ماه) به تفکیک برداشت و در سال دوم آزمایش (۱۳۸۴) هر یک از دو رگ‌های حاصله در یک خط ۱۰ متری در کنار کلیه والدین کشت گردیدند. از زمان شروع گلدهی تلاقی‌های برگشتی هر یک از دو رگ‌ها با والد مربوطه خود (بومی ایران) انجام شد. کلیه بذرهای حاصل از بک‌کراس به تفکیک برداشت شدند. در سال سوم تا پنجم آزمایش مانند سال دوم کلیه بک‌کراس‌ها بین نتاج و والد بازگرداننده انجام شد. در این تلاقی‌ها والد بازگردانده به عنوان والد پدری مورد استفاده قرار گرفت. طی سال آخر تک‌تک بوته‌ها در نتاج مورد بررسی و تیپ‌های ممتاز انتخاب شدند.

برای بررسی مراحل میوزی از سلول‌های مادری دانه گرده که در حال تولید گرده هستند، استفاده شد. غنچه‌های مناسب روزانه جمع‌آوری شدند و بلافاصله داخل محلول تثبیت‌کننده کارنوی (Carnoy) (محلول حجمی به نسبت ۳:۱، استیک اسید: اتانول خالص) حداقل به مدت یک هفته قرار گرفتند. بساک‌های تثبیت شده جداسازی شده و روی لام که حاوی چند قطره رنگ استواورسئین بود قرار گرفت. سپس با نوک سوزن بساک‌ها پاره شد تا سلول‌های موجود در آن داخل رنگ پخش شوند، در مرحله بعد سلول‌های

توده‌ای مربوط به دیواره بساک توسط سوزن از داخل رنگ خارج شد، سپس لامل روی نمونه قرار داده شد. عمل بعدی فشار مختصری است که به لام و لامل توسط انگشت وارد شده، در نهایت، اضافه رنگ را توسط دستمال کاغذی از اطراف لامل جمع‌آوری می‌کنیم و البته، چنانچه قبل از عمل خراش مقداری حرارت ملایم به لام بدهیم، هسته‌های سلول بهتر رنگ‌آمیزی خواهند شد. در نهایت، لام به دست آمده برای مشاهدات میکروسکوپی آماده شد. لام‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BX51) با بزرگ‌نمایی‌های ۱۰ و ۱۰۰ بررسی شدند و از سلول‌هایی که در مراحل مختلف میوزی از قبیل پروفاز، متافاز ۱ و ۲، آنافاز ۱ و ۲، تلوفاز ۱ و ۲ و تتراد و به شکل مناسبی بودند، توسط میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شد. در هر ژنوتیپ (اعم از والد و هیبریدهای F_1 و بک‌کراس‌ها) مرحله متافاز ۱ میوزی بررسی و خصوصیاتی از قبیل حضور بی‌والان‌ها، تعداد کوادری‌والان‌ها، نوع جهت‌گیری کوادری‌والان (مجاور و یا متناوب) و همچنین تعداد یونی‌والان‌ها (در صورت وجود) ثبت گردید. خصوصیات دیگری که مربوط به مراحل آنافازی و تلوفازی ۱ و ۲ بود، از قبیل عقب ماندن کروموزوم‌ها طی آنافازهای ۱ و ۲ و یا انتقال یک جفت همولوگ به یک قطب و آنیوپلوئید شدن قطب دیگر طی آنافاز و تلوفاز و همچنین چسبندگی کروموزوم‌ها بین دو قطب، ثبت و عکس‌برداری گردید.

خصوصیات ظاهری بوته‌ها در ۵ بوته تصادفی از هر کرت بررسی گردید. صفاتی از قبیل شکل گل، برگ، کاسبرگ، براکته و قوزه در جمعیت‌های حاصل از بک‌کراس چهارم آنها بررسی گردید.

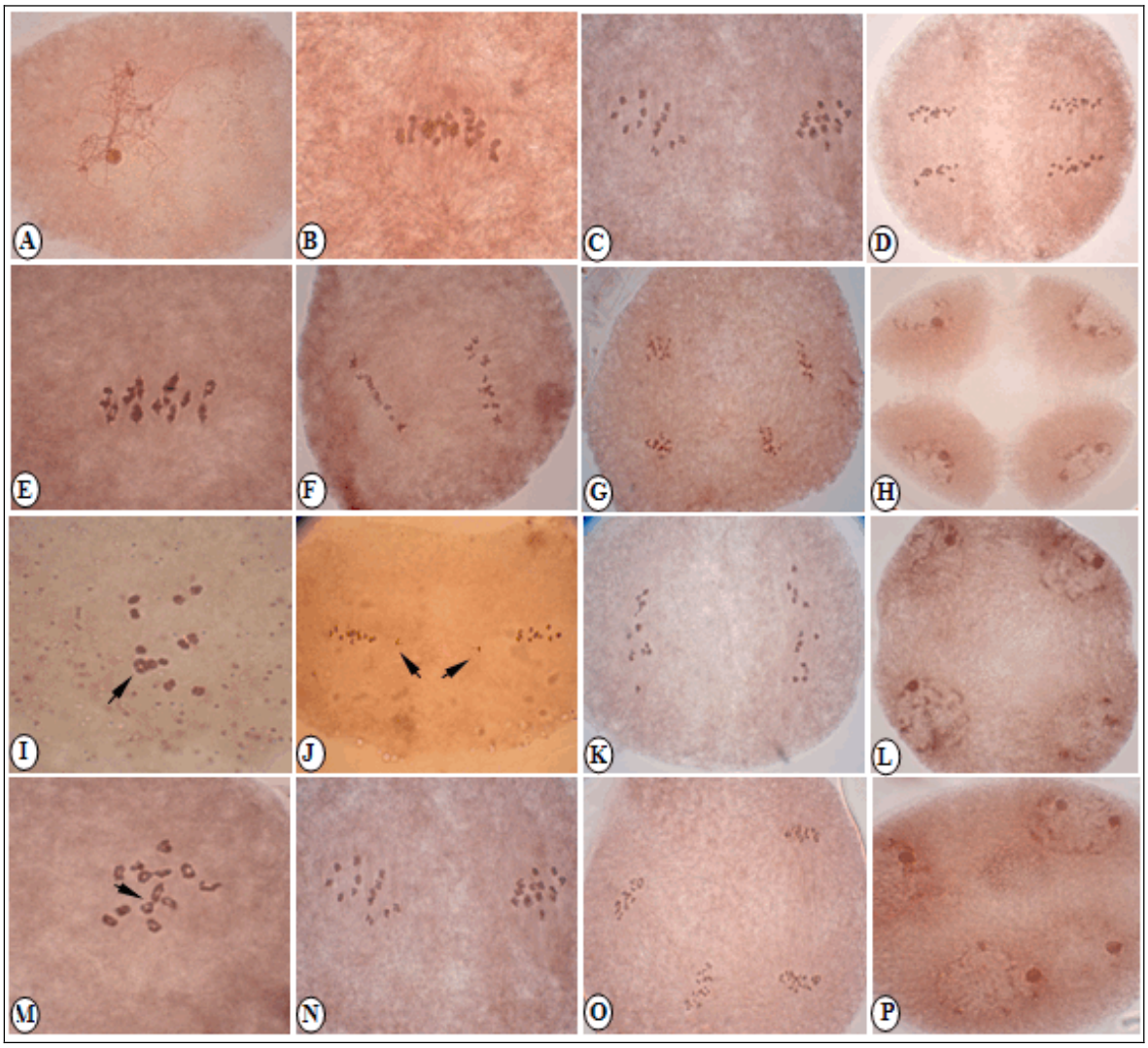
نتایج

الف) بررسی‌های سیتوژنتیک

نتاج F_1 حاصل از تلاقی‌های آربورئوم × ارقام بومی

نتایج مربوط به مطالعات رفتار کروموزومی در هیبریدهای F_1 نشان داد که کوادری‌والان‌های مجاور و متناوب در متافاز ۱ با فراوانی نسبتاً بالایی در هیبرید حاصل از تلاقی‌های مذکور تشکیل می‌شوند. همان‌طور که قبلاً نیز ذکر شد، اختلاف کلی در دو ژنوم هرباسئوم و آربورئوم در وجود جابجایی بین دو کروموزوم شماره ۱ و ۲ است که در گونه آربورئوم اتفاق افتاده است و این سبب می‌شود تا در نسل اول حاصل از تلاقی بین دو گونه مذکور نیز کوادری‌والان مشاهده گردد (Menzel and Brown, 1959). نتایج حاصل از بررسی رفتار کروموزوم‌ها در F_1 حاصل از تلاقی آربورئوم با بومی آریا در شکل ۱ نشان داده شده است. در ۶۰ درصد سلول‌های مشاهده شده در مرحله متافاز ۱ کوادری‌والان مجاور و متناوب دیده شد. در موارد نادر در مرحله آنافاز ۱ کروموزوم سرگردان دیده شد و کشیدگی کروموزوم در وسط سلول در مرحله متافاز ۲ دیده می‌شد (شکل ۱-J). سایر مراحل تقسیم در بوته‌های مطالعه شده در این F_1 کاملاً طبیعی و بدون ناهنجاری مشاهده شد.

نتایج حاصل از بررسی رفتار کروموزوم‌ها در F_1 حاصل از تلاقی آربورئوم با بومی بندرعباس در شکل ۱ نشان داده شده است. در ۴۶ درصد سلول‌های متافاز ۱ مطالعه شده کوادری‌والان متناوب مشاهده شد که برخلاف F_1 حاصل از تلاقی آربورئوم با بومی آریا، کوادری‌والان از نوع مجاور دیده نشد. سایر مراحل تقسیم نیز کاملاً طبیعی بود و ناهنجاری از خود نشان ندادند.



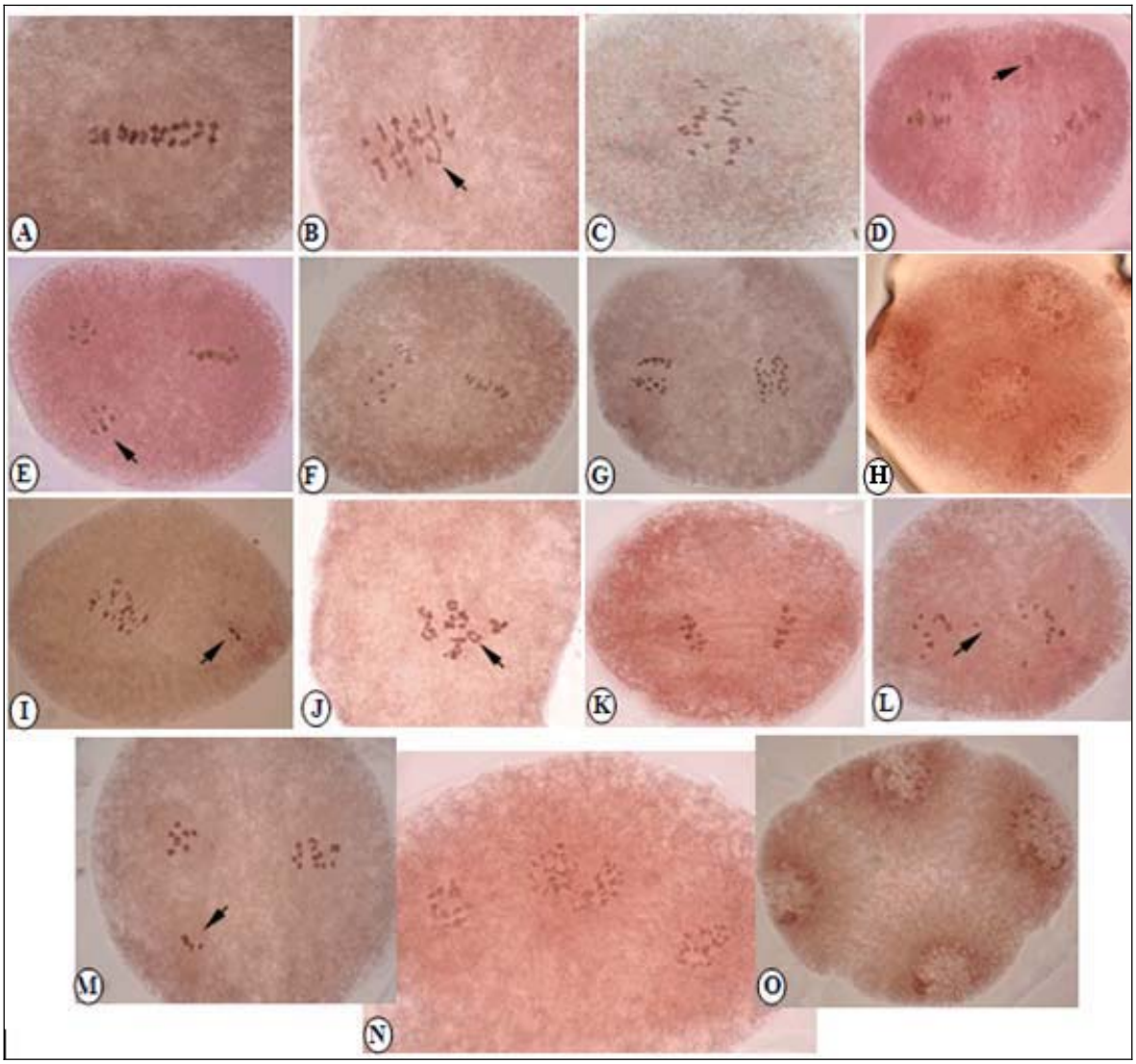
شکل ۱- مراحل مختلف میوز در بومی آریا (A: پروفاز، B: متافاز ۱، C: متافاز ۲ و D: آنافاز ۲)؛ بومی بندرعباس (E: متافاز ۱، F: متافاز ۲، G: آنافاز ۲ و H: تتراد (۴ سلول هاپلوئید گامتی)؛ F1 تلاقی آربورئوم × بومی آریا (I: متافاز ۱، JK: متافاز ۲ و L: تتراد (۴ سلول هاپلوئید گامتی)؛ F1 تلاقی آربورئوم × بومی بندرعباس (M: متافاز ۱، N: متافاز ۲، O: آنافاز ۲ و P: تتراد (۴ سلول هاپلوئید گامتی)؛ پیکان‌ها در I و M نشان‌دهنده کوادری‌والان و در J نشان‌دهنده کشیدگی کروموزوم بین دو قطب در متافاز ۲ است. (بزرگ‌نمایی عکس‌ها ۱۰۰ است).

جمعیت‌های حاصل از بک‌کراس چهارم آربورئوم × بومی آریا

تعداد ۵ بوته از جمعیت‌های حاصل از نتاج بک‌کراس چهارم آربورئوم × بومی آریا که در یک ردیف ۱۰ متری کشت شده بودند، بررسی شدند، نتایج نشان داد که ۶۰ درصد بوته‌ها دارای میوز طبیعی بودند و ۴۰ درصد ناهنجاری‌هایی در رفتار کروموزوم‌ها طی مراحل میوز نشان دادند. در هر ۴۰ درصد بوته‌ها، در مرحله تقسیم متافاز ۱ تجمعات کروموزومی به صورت کوادری‌والان با فراوانی ۱۵ تا ۲۵ درصد مشاهده شد (شکل ۲-B). کوادری‌والان‌های مشاهده شده به هر دو صورت مجاور و متناوب ظاهر شدند. وجود کوادری‌والان در مرحله متافاز ۱ باعث کشیدگی کروموزوم‌ها هنگام جدا شدن کروموزوم‌های همولوگ از یکدیگر در مرحله آنافاز ۱ شده بود (شکل ۲-C). تعدادی اندک از کروموزوم‌های سرگردان در برخی از سلول‌های مطالعه شده در مرحله متافاز ۲ دیده شد (شکل ۲-D). در ۵۰ درصد بوته‌های ناهنجار با فراوانی پایین (۴ درصد) در مرحله متافاز ۲ به جای دو دسته کروموزوم، تعداد سه دسته کروموزوم در سه صفحه متافازی آماده ورود به مرحله آنافاز ۲ بودند که این سبب ایجاد ناهنجاری در مراحل بعدی خواهد شد (شکل ۲-E) و در ۵ درصد سلول‌های متافاز ۲ مورد بررسی نیز رشته‌های دوک در دو جهت متفاوت در سلول جهت‌گیری کرده بودند (شکل ۲-F) که این حالت باعث شده بود که در مرحله آنافاز ۲ نیز کروماتیدها در دو جهت متفاوت از هم در حال جدا شدن باشند (شکل ۲-G). البته، این حالت ناهنجاری در میوز به حساب نمی‌آید، زیرا در نهایت باعث تشکیل تترادهایی می‌شود که قطب‌های آن در جهات متفاوت در سلول قرار گرفته‌اند (شکل ۲-H).

جمعیت‌های حاصل از نتاج بک‌کراس چهارم آربورئوم × بومی بندرعباس

تعداد ۵ بوته از جمعیت‌های حاصل از نتاج بک‌کراس چهارم آربورئوم × بومی بندرعباس که در یک ردیف ۱۰ متری کشت شده بودند، بررسی شدند. ۶۰ درصد بوته‌های مورد مطالعه رفتار میوزی کاملاً طبیعی نشان دادند و در ۴۰ درصد بوته‌ها ناهنجاری‌هایی در یک یا چند مرحله از تقسیم میوز مشاهده شد (شکل ۲). در یکی از بوته‌ها در شرایطی نادر در ۵ درصد سلول‌های متافاز ۱ یک جفت کروموزوم (بی‌والان) به طور کاملاً جدا از سایر کروموزوم‌ها در صفحه متافازی قرار گرفته، در حال تقسیم بود (شکل ۲-I) و در ۱۰ درصد سلول‌های بررسی شده در مرحله متافاز ۱ تجمعات کوادری‌والانی مشاهده گردید (شکل ۲-J). وجود کوادری‌والان در مرحله متافاز ۱ باعث تشکیل پل کروموزومی بین دو قطب در مرحله متافاز ۲ شد که حاکی از کشیدگی کروموزومی در آنافاز ۱ بوده که تا این مرحله باقی مانده بود (شکل ۲-L). در تعدادی از سلول‌های بررسی شده در مرحله متافاز ۲ تعداد سه دسته کروموزوم در امتداد سه دسته رشته دوک تشکیل شده بود که بیشتر در دسته سوم تعداد کروموزوم‌ها اندک بودند (شکل ۲-M). رشته‌های دوک در ۱۲ درصد سلول‌های آنافاز ۲ مورد بررسی در دو جهت متفاوت از هم با زاویه منفرجه قرار گرفته بودند (شکل ۲-N).

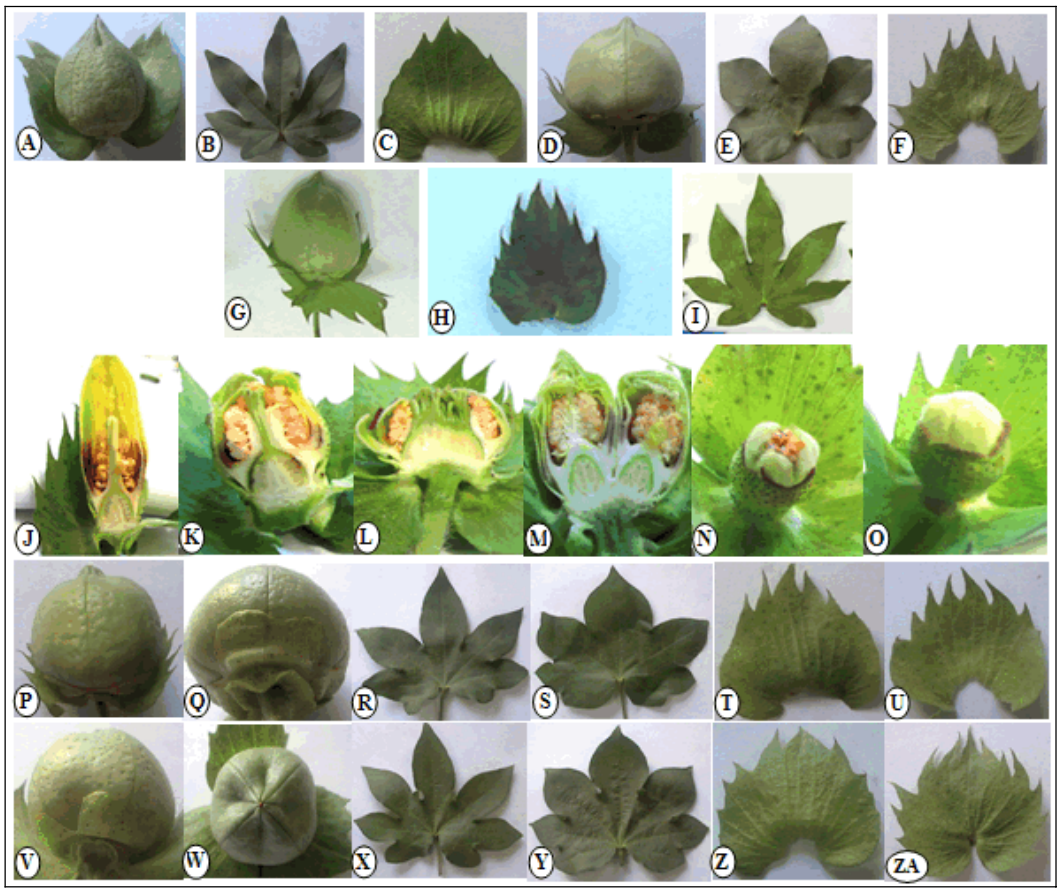


شکل ۲- مراحل مختلف میوز در جمعیت‌های حاصل از نتاج بک‌کراس چهارم آربورئوم × بومی آریا (AB: متافاز ۱، C: آنافاز ۱، DF: متافاز ۲، G: آنافاز ۲ و H: تلوفاز ۱)؛ جمعیت‌های حاصل از نتاج بک‌کراس چهارم آربورئوم × بومی بندرعباس (IJ: متافاز ۱، K: آنافاز ۱، LM: متافاز ۲، N: آنافاز ۲ و O: تتراد (۴ سلول هاپلوئید گامتی)؛ پیکان‌ها در B و J نشان‌دهنده کوادری‌والان، در E و M نشانگر دسته سوم کروموزوم‌ها، در D و I نشان‌دهنده کروموزوم سرگردان و در L نشان‌دهنده کشیدگی کروموزوم‌هاست (بزرگ‌نمایی عکس‌ها ۱۰۰ است).

ب) بررسی‌های مورفولوژیک

شکل برگ و براکته هیبریدهای F_1 حدواسط و کمی متمایل به والد آربورئوم مشاهده شد (شکل ۳). همان طور که در شکل نشان داده شده است، شکل ظاهری و سطح خارجی قوزه هیبریدها نیز حدواسط بین دو والد دیده شد. به علت وجود ناهنجاری‌های حاصل از اضافه و یا کم شدن قطعات کروموزومی در مراحل تولید گرده در نسل F_1، در سال سوم آزمایش (نتاج بک‌کراس اول) در بین نتاج حالت‌های غیر طبیعی از نظر شکل و فرم ظاهری بوته، به خصوص در اندام‌های زایشی مشاهده گردید (شکل ۳). در این نسل (BC_1) رشد بیش از حد کلاله سبب خوشه‌ای شدن آن در

برخی از گل‌ها گردید (شکل ۳-L) و برخی از گل‌ها فاقد کلاله بودند (شکل ۳-N و K) و همچنین در مواردی گل‌ها به صورت دو قلو ظاهرشدند (شکل ۳-M). تنوع موجود در صفات مورفولوژیک نتاج برخی از والدین و نسل بک‌کراس چهارم تلاقی آربورئوم × رقم آریا در شکل ۳ نشان داده شده است. سطح روی قوزه‌ها به صورت صاف (مانند گونه هرباسئوم) و با نقاط اندکی فرو رفته (متمایل به سمت گونه آربورئوم) و با ۴ و ۵ برچه دیده شد. لبه کاسبرگ به صورت صاف و نزدیک به گونه آربورئوم مشاهده شد. وضعیت دندانه‌ای لبه براکته‌ها حالت بینابینی دو گونه را داشت و براکته‌ها به صورت والد هرباسئوم و در مواردی بین دو گونه قرار گرفته بودند. برگ‌ها با تنوع ظریفی از نظر فرورفتگی بین لُب‌ها از یکدیگر تفاوت داشته، حدواسط دو والد دیده شدند. با توجه به بک‌کراس‌های متوالی به وضوح دیده شد که صفات ظاهری بوته‌ها کاملاً به سمت گونه هرباسئوم تمایل داشتند و فقط صفاتی محدود از گونه آربورئوم در نتاج باقی مانده بود. به طور کلی، ناهنجاری خاصی در صفات ظاهری بوته‌ها دیده نشد و بوته‌ها از رشد رویشی و زایشی طبیعی برخوردار بودند.



شکل ۳- AC: شکل قوزه، برگ و براکته در والد آربورئوم؛ DF: شکل قوزه، برگ و براکته در والد هرباسئوم؛ G: شکل قوزه، برگ و براکته در F_1 تلاقی هرباستوم× آربورئوم؛ J: مقطع طولی گل طبیعی در Bc_1؛ KI: مقطع طولی گل وغنچه غیر طبیعی در Bc_1؛ N: غنچه غیر طبیعی در Bc_1؛ O: غنچه طبیعی در Bc_1؛ PU: شکل قوزه، برگ و براکته در Bc_4 بومی آریا؛ VZA: شکل قوزه، برگ و براکته در Bc_4 بومی بندرعباس.

تنوع موجود در مورفولوژی نتاج برخی از صفات مورفولوژی بوته در والدین و نسل بک‌کراس چهارم تلاقی‌های رقم بندرعباس در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، شکل دندانه‌ای براکته‌ها در برخی از بوته‌ها مانند والد دهنده و در برخی از آنها مانند والد بازگردانده بود. قوزه‌ها حالت حدواسط دو والد و اکثر بوته‌ها دارای ۴ برچه بودند. سطح قوزه مانند والد آربورئوم به صورت نقاط فرو رفته زیادی دیده شد. شکل برگ‌ها نیز در مواردی مانند والد هرباسئوم و در مواردی به حالت بینابینی دارای لبه‌های کشیده، اما پهن‌تر از آربورئوم مشاهده شد.

بحث

هم اکنون در ایران حدوداً ۹۵ درصد از پنبه‌کاری را رقم تتراپلوئید آپلند (*G. hirsutum*) گونه هیرسوتوم تشکیل می‌دهد و ۵ درصد از پنبه‌کاری را رقم‌های بومی (گونه هرباسئوم) پوشش می‌دهند. علت کاهش سطح زیر کشت ارقام بومی ظرافت نامطلوب و طول الیاف کوتاه آنهاست. این مشکل می‌تواند از طریق تلاقی با گونه‌های دور (و انجام بک‌کراس‌های متوالی) رفع گردد (وفایی‌تبار، ۱۳۸۷). یکی از گونه‌های نزدیک به گونه بومی ایران، گونه آربورئوم است که برخی از ارقام آن از طریق تلاقی‌های دور اصلاح شده‌اند و می‌توانند با مشکلات کمتری با پنبه‌های بومی ایران تلاقی یابد. وجود کوادری‌والان سبب ایجاد شکست و بست‌هایی در آنافاز اول میوز شده، در نهایت به ایجاد عدم تعادل در تفرق کروموزومی و گرده‌هایی منجر می‌گردد که ۱۳ کروموزوم را با کمبود و یا اضافه در خصوص کروموزوم اول و دوم به نسل بعد منتقل می‌کند (VafaieTabar and Chandrashekaran, 2007). این ناهنجاری هرچند با فراوانی اندک، می‌تواند تا چند نسل با وجود بک‌کراس‌های متوالی نیز منتقل گردد. لاین‌های به دست آمده از بک‌کراس‌های چهارم که در این مطالعه بررسی شده‌اند، دارای صفات والد برگردانده (بومی ایران) بودند (به استثنای صفاتی از قبیل کیفیت مناسب الیاف که از گونه آربورئوم به ارث رسیده‌اند). بدیهی است که وجود ناهنجاری‌هایی مانند تشکیل کوادری‌والان‌ها، یونی‌والان‌ها و یا عدم تفرق طبیعی کروماتیدها در آنافاز ۲ سبب از بین رفتن و فقدان برخی از صفات در لاین‌های مورد نظر در نسل‌های آینده خواهد شد (وفایی‌تبار، ۱۳۸۷) و پروژه تولید لاین‌های مناسب را با شکست مواجه خواهد کرد. بنابراین، لاین‌های انتخابی از بک‌کراس‌های به دست آمده باید ضمن داشتن کیفیت الیاف بهتر نسبت به والدین خود رفتار میوزی طبیعی نیز از خود نشان دهند. در مطالعه‌ای نسل M_4 از تابش گاما در رقم shirpan از گونه *G. hirsutum* با هدف القای تنوع ژنتیکی جدید مطالعه شد که در نهایت، لاین‌هایی با خصوصیات خوب زراعی دارای میوز با اختلال کم، ولی درصد بالایی از کوادری‌والان متناوب مشاهده شدند (Sheidai *et al.*, 2002).

مطالعه رفتار میوزی در بین لاین‌های به دست آمده نشان داد که برخی از بوته‌های به دست آمده توانسته‌اند رفتار طبیعی در مراحل مختلف میوز از خود نشان دهند و برخی از بوته‌ها ناهنجاری‌هایی، از قبیل تجمعات کروموزومی غیر از بی‌والان‌ها در متافاز ۱ و یا

جهت‌گیری چند دسته‌ای کروموزوم‌ها در آنافاز ۲ را با فراوانی نسبتاً بالا نشان دهند. وجود این ناهنجاری‌ها سبب بروز صفات غیر معمول نیز در ظاهر بوته می‌گردد که می‌تواند شناخت ما را از تأثیرات ناهنجاری‌ها بر توارث صفات بیشتر کند.

در جمعیت‌های حاصل از نتاج بک‌کراس چهارم آریا در آربورئوم، رخداد کوادری‌والان در مرحله متافاز ۱ سبب کشیدگی کروموزوم‌ها هنگام جدا شدن کروموزوم‌های همولوگ از یکدیگر در مرحله آنافاز ۱ شده بود. در مرحله متافاز ۲ به جای دو دسته کروموزوم، تعداد سه دسته کروموزوم در سه صفحه متافازی آماده ورود به مرحله آنافاز ۲ بودند که این سبب ایجاد ناهنجاری در مراحل بعدی خواهد شد. چنین حالتی قبلاً در F_1 های تریپلوئید پنبه که از تلاقی گونه تتراپلوئید هیرستوم با گونه دیپلوئید آربورئوم به دست آمده‌اند نیز گزارش شده است (VafaieTabar and Chandrashekaran, 2007). در جمعیت‌های حاصل از نتاج بک‌کراس چهارم بندرعباس در آربورئوم نیز یک جفت کروموزوم (بی‌والان) به طور کاملاً جدا از سایر کروموزوم‌ها در صفحه متافازی قرار گرفته و در حال تقسیم بود. بدیهی است که با ادامه این حالت کروموزوم‌های جدا شده در این بی‌والان طی فرآیندهای بعدی میوز یک یا هر دوی آنها ممکن است حذف گردند و یا به مجموعه کروموزوم‌های یک قطب اضافه و سبب ایجاد آنیوپلوئیدی در نسل بعد گردند. مطالعات رفتار کروموزومی بر روی هیبرید حاصل از تلاقی *G. arboreum × G. herbaceum* توسط نیز نشان داده است که در این هیبرید فراوانی کیاسما پایین بوده، گاهی اوقات کروموزوم‌ها به صورت ۱۴-۱۲ تفکیک می‌شوند (Skovsted, 1993).

وجود کوادری‌والان در مرحله متافاز ۱ سبب تشکیل پل کروموزومی بین دو قطب در مرحله متافاز ۲ شد که حاکی از کشیدگی کروموزومی در آنافاز ۱ بوده که تا این مرحله باقی مانده است. در تعدادی از سلول‌های مورد بررسی در مرحله متافاز ۲ تعداد سه دسته کروموزوم در امتداد سه دسته رشته دوک تشکیل شده بود که بیشتر در دسته سوم تعداد کروموزوم‌ها اندک بود (شکل ۲-M). بدیهی است که در این شرایط گرده تولید شده از نظر تعداد کروموزوم ناقص خواهد بود. شرایط ایجاد شده در بوته‌های فوق فرصت‌های خوبی برای تولید لاین‌های ژنتیکی با یک یا دو کروموزوم اضافه و یا کمبود در اختیار ما قرارخواهد گرفت که می‌توان از آنها برای تولید آنیوپلوئیدها استفاده نمود.

همان طور که در بخش نتایج ذکر شد، ناهنجاری‌هایی از قبیل حجیم شدن کلاله، کوتاه شدن خامه و یا از بین رفتن کلاله، کوتاه شدن گلبرگ‌ها، دو قلو شدن تخمدان‌ها در نسل F_2 (وفایی‌تبار، ۱۳۸۷) و یا بک‌کراس‌های بعدی مشاهده شد. همانند سایر صفات، این ناهنجاری‌ها نیز به نسل های بعدی با فراوانی کمتر انتقال یافت. با انجام بک‌کراس‌های متوالی با والد هرباسئوم، ناهنجاری‌های مورفولوژی به کمترین میزان خود رسیده است؛ به طوری که در بک‌کراس چهارم ناهنجاری زیادی در اندام‌های ظاهری دیده نشد، ولی لاین‌های به دست آمده در برخی صفات با والد برگرداننده خود مشابه نبودند. این صفات شامل شکل

قوزه، شکل براکته، شکل برگ و کیفیت الیاف بودند که مشابه والد دهنده شدند. انتقال صفات مذکور به همراه رفتارهای خاص کروموزومی در مراحل میوز، سبب ایجاد تنوع زیاد و جدیدی در جمعیت‌های حاصل از نتاج بک‌کراس چهارم شده است.

جمع‌بندی

انتقال پایدار ژن‌های مربوط به کیفیت الیاف به رقم‌های بومی ایران، یکی از اهداف ارزشمند اصلاحی در برنامه‌های به‌نژادی تحقیقات پنبه در ایران است. هرچند که ناهنجاری‌های کروموزومی که از نسل اول تلاقی به سبب وجود کوادری‌والان بین کروموزوم‌های ۱ و ۲ به وجود آمده‌اند (Menzel and Brown, 19) سبب بی‌ثباتی و ایجاد نواقصی در خصوصیات ظاهری بوته‌ها شده‌اند، ولی انجام بک‌کراس‌های متوالی سبب تثبیت بیشتر و کاهش این ناهنجاری‌ها شده است؛ به طوری که درصد بیشتر بوته‌های مورد مطالعه دارای رفتار میوزی طبیعی بودند. شایان ذکر است که ممکن است لاین‌های به دست آمده از نظر یک یا دو صفت از والد بومی خود برتر نباشند، ولی در سایر صفات برتر باشند. از آن جایی که اصلاح همه صفات به طور همزمان و به خصوص از طریق تلاقی‌های دور در یک مرحله امکان‌پذیر نبوده، بنابراین، دسترسی به نتاج به دست آمده می‌تواند بزرگ‌ترین گام در مراحل اولیه اصلاح ارقام بومی ایران باشد؛ چرا که حداقل طول الیاف و برخی از صفات کیفیت الیاف آنها ارتقا یافته است. در مقابل، بوته‌هایی که رفتارهای ناهنجاری طی مراحل میوز از خود نشان می‌دهند، می‌توانند بهترین منبع برای تولید پایه‌های سیتوژنتیکی باشند و در مطالعه و شناخت بیشتر صفات و پیوستگی و همچنین مکان‌یابی ژن‌ها استفاده شوند.

منابع

وفایی‌تبار، م. (۱۳۷۵) جنبه‌های سیتوژنتیکی و قابلیت ترکیب‌پذیری ارقام تتراپلوئید پنبه آپلند، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

وفایی‌تبار، م. (۱۳۸۷) بهبود کیفیت الیاف پنبه‌های بومی ایران از طریق تلاقی با منابع ژنتیکی وارداتی. انتشارات مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، ورامین.

Nikolajeva, A. (1923) A hybrid between Asiatic and American cotton plant *Gossypium herbaceum* and *G. hirsutum*. Bulletin Applied Botany and Plant Breeding 13:1174734.

Phillips, L. L. (19) Cotton (*Gossypium*). In :Handbook of Genetic. (ed. King., R. C) 2: 111133. Plenum , New York.

Sheidai, M., Vojdani, P. and Alishah, O(19) Karyological studies in *G. herbaseum* cultivars of Iran. Cytologia 6: 3657.

Denham, H. J. (1924) The cytology of the cotton plant. II. Chromosome number of old and new world cotton. Annual Botany 38: 433438.

Kohel, R. J. and Lewise, C. F. (1984) Cotton American society of Agronomy, Wisconsin.

Menzel, M. Y. and Brown, M. S. (19) The tolerance of *Gossypium hirsutum* for deficiencies and duplications. The American Naturalist 843: 4074718.

Sheidai, M., Azarani, H and Hosseininejad, Z (2002) Cytogenetic study of gamma irradiated lines of cotton (*Gossypium hirsutum*). Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran 13: 311-322.

Sheidai, M., Golestanipoor, A. and Jorjani, E (2006) Chromosome pairing and heterozygote translocation in Iran cotton cultivar and its crossing progenies. Iranian Journal of Science and Technology 30: 103-109

Skovsted, A. (1933) Cytological studies in cotton. Vol. I. The mitosis and meiosis in diploid and triploid Asiatic cotton. Annual Botany 47: 227-231.

Skovsted, A. (1935) Cytological studies in cotton. Vol. III. A hybrid between *Gossypium davidsonii* and *G. sturtii*. Journal of Genetics 30: 399-405

Stewart, J. M. (1989) Potential for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering. In: Challenging the future (eds. Constable, G.A. and Forrester, N. W.) 313-327. Proceeding World Cotton Research Conference 1: 14-17 February 1989. CSIRO, Narrabri.

Vafaie-Tabar, M. and Chandrashekaran, S. (2007) Meiosis in a triploid hybrid of *Gossypium*: high frequency of secondary bipolar spindles at metaphase II. Journal of Genetics 86: 45-49

Cytological and Morphological Studies of back-crossed genotypes derived from Iranian endemic diploid cotton cultivars Aria and Bandarabas with *Arboreum* species hybrids

Zahra Harati, Mosareza Vafaie-Tabar *[1] and Mahmood Khosrowshahli [2]

[1] Department of Cotton Research, Agricultural Research Center of Tehran, Varamin, Iran
[2] Department of Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

This study was carried out in order to investigate chromosomal behavior during meiosis, morphological assessments and fibers quantitative and qualitative traits in *herbaceum* (Iranian endemic), *arboreum* species, F_1 hybrids of two species and BC_4 genotypes. In this study, the endemic varieties Aria and Bandarabas and VTDL as *arboreum* were used. Regarding to the morphological characters, the F1s traits were intermediate and BC_4 showed intermediated and resemble somewhat to the endemic parents traits. F_1s Cytological investigations showed the adjacent and alternative quadrivalents frequently but In the BC_4 offspring population the quadrivalents were appeared in low frequency. Besides, other abnormalities like univalent, trivalents and triple sets of chromosomes in MII and AII were observed which were resulted in the deviation from Tetrads.

Key words: Cotton, *Gossypium*, *G. herbaceum*, *G. arboretum*, meiosis

* Correspong Author: mvafaiet@yahoo.com

فرم اشتراک مجله زیست‌شناسی گیاهی

نام و نام خانوادگی: ..... سمت: .....

با ارسال فیش بانکی به مبلغ ۸۰۰۰۰ ریال (هزینه پست و اشتراک) به حساب شماره ۲۱۷۷۲۴۰۲۳۸۰۰۲ بانک ملی، کد ۱۱۰۲۲۷، شعبه دانشگاه اصفهان، به نام درآمدهای اختصاصی دانشگاه اصفهان، متقاضی اشتراک یک ساله (چهار شماره) مجله زیست‌شناسی گیاهی هستم. لطفاً مجله را از شماره ..... به نشانی زیر ارسال نمایید.

نشانی دقیق:.....

.....

شماره تماس: ..... دورنگار: .....

نشانی پست الکترونیک: ..... مسؤول پاسخگویی: .....

فیش بانکی به شماره (.....) به پیوست است. (**ضروری است).

نشانی: اصفهان- دانشگاه اصفهان- معاونت تحقیقات و فناوری - دفتر مجله زیست‌شناسی گیاهی - امور مشترکین

دورنگار: ۷۹۳۲۱۷۷ - ۰۳۱۱

Journal of Plant Biology
3rd Year, No. 8, Summer 2011
ISSN: 2008-8246

Content

- **Arsenic and salicylic acid interaction on the growth and some other physiological parameters in *Matricaria recutita*** **11**
  Nasrin Fazelian and Zahra Asrar
- **Growth, photosynthesis and phenolics metabolism in tobacco plants under salinity and application of polyamines** **26**
  Roghieh Hajiboland and Nashmin Ebrahimi
- **Flora, Life form and chorological study of Box tree (*Buxus hyrcanus* Pojark.) sites in Khybus protected forest, Mazandaran** **39**
  Hamed Asadi, Seyed Mohsen Hosseini, Omid Esmailzadeh and Abbas Ahmadi
- **Changes in exogenous hormone concentration and its effect on somatic embryo maturation and microcorm formation of saffron (*Crocus sativus* L.)** **57**
  Shakiba Rajabpoor, Azra Saboora and Ali Vatanpour Azghandi
- **Differentiation of essential oil cavities in developing lemon (*Citrus limon*(L.)Burm.f.) flower and fruit** **68**
  Maryam Rafiei and Homa Rajaei
- **Study of dehydration-responsive element binding-factor gene in some Iranian bread wheat cultivars** **76**
  Sasan Mohsenzadeh, Javad Karimi Andani and Hassan Mohabatkar
- **Cytological and Morphological Studies of back-crossed genotypes derived from Iranian endemic diploid cotton cultivars Aria and Bandarabas with Arboreum species hybrids** **89**
  Zahra Harati, Mosareza Vafaie-Tabar and Mahmood Khosrowshahli

Referees committee (3rd Year, No. 8, Summer 2011)

We express our deep gratitude to the following faculty members of the universities and of educational-research Institutes who have cooperated in evaluation and assessment of the articles of this issue of Journal of Plant Biology:

Dr. Keyvan Aghaei Jouboni	University of Zanjan
Dr. Omran Alishah	Cotton Research Inistitte of Iran
Dr. Reyhaneh Amooaghaei	University of Shahrkord
Dr. Abdolkarim Chehregani rad	Bu-Ali Sina University
Dr. Mohammadreza Dadpour	University of Tabriz
Dr. Ali Akbar Ehsanpour	University of Isfahan
Dr. Faezeh Ghanato	Tarbiat Modares University
Dr. Farah Karimi	Shahed University
Dr. Maryam Madadkar Haghjou	University of Lorestan
Dr. Mohammadreza Mofid	Isfahan University of Medical Sciences
Dr. Ali Movafeghi	University of Tabriz
Dr. Alireza Naqinejad	University of Mazandaran
Dr. Hassan Pourbabaei	University of Guilan
Dr. Shahriyar Saeidi Mehrvarz	University of Guilan
Dr. Masoud Sheidai	Shahid Beheshti University
Dr. Mehdi Yousefi	Payame Noor University
Dr. Parzhak Zoufan	Shahid Chamran University of Ahwaz

Journal of Plant Biology (Scientific Research Journal)

3rd Year, No. 8, Summer 2011

ISSN: 2008-8264

Managing Editor: Dr. Mansour Shariati (Ph.D) Professor - University of Isfahan

Editor-in-Chief: Dr. Mansour Shariati (Ph.D) Professor - University of Isfahan

Editorial Board

Dr. Ali Akbar Ehsanpour (Ph.D) Professor - University of Isfahan

Dr. Faezeh Ghanati (Ph.D) Associate Professor - Tarbiat Modares University

Dr. Ali Asghar Maassoumi (Ph.D) Professor - Research Institute of Forests and Rangelands

Dr. Mohammad Reza Rahiminejad (Ph.D) Professor - University of Isfahan

Dr. Mansour Shariati (Ph.D) Professor - University of Isfahan

Dr. Shahin Zare Mobarakeh (Ph.D) Professor - University of Tehran

Dr. Mohammad Reza Zamani (Ph.D) Professor - National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

Executive and Manuscript Manager: Fariba Hadian (M. Sc)

Scientific English Editor: Fereidoon Parvizian (M. Sc)

Literary Editor: Naser Karimpoor

General Layout Designer: Behzad Hakiminia, Zahra Heshmat

Professional Layout Designer: Fariba Hadian

Publisher: University of Isfahan

Address: Journal of Plant Biology Office- Department of Technology and Research- University of Isfahan- Isfahan- Iran.

Email: IJPB@ui.ac.ir

Journal of Plant Biology has been ranked as a ***scientific-research*** journal based on the document number 3/11/558 issued by the Evaluation Committee of Scientific Journals of Research and Technology Ministry in June, 2009; also it has been registered with ***International Standard Serial Number (ISSN): 2008-8246*** by National Library and Archives of Islamic Republic of Iran.

This Journal has been prepared through the cooperation of the University of Isfahan and Biology Society.

The complete text of this Journal is available at the following sites:

http://uijs.ui.ac.ir/ijpb
http://www.magiran.com
http://www.SID.ir
http://www.ISC.gov.ir

Publication and Lithography: University of Isfahan Publications
Publisher: University of Isfahan
Price: 20000 Rials
Number of Copies: 1000 Copies
Publised: Summer 2011

Journal of Plant Biology

3rd Year, No. 8, Summer 2011

Published by

University of Isfahan Research Center